

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 廣子 貴俊

---

TGF- $\beta$ シグナル伝達経路は発癌の抑制に重要であると考えられている。そこで、本研究では TGF- $\beta$ シグナル伝達経路による発癌の抑制メカニズムの解明のため、サブトラクション法やマイクロアレイの解析を行い、TGF- $\beta$ によって発現誘導される遺伝子を検索した結果、アポトーシス促進因子である BH3-only タンパク質 Bim を見出した。本論文は、TGF- $\beta$ による Bim の発現制御や TGF- $\beta$ により誘導されるアポトーシスに対する Bim の発現誘導の重要性について検討したものである。

### 1. TGF- $\beta$ によるアポトーシス関連因子の発現誘導

ヒト肝臓がん細胞 Hep3B に TGF- $\beta$ とタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを同時に処理してアポトーシス誘導を検討した結果、TGF- $\beta$ の標的遺伝子の発現誘導によりアポトーシスが誘導されると示唆された。そこで、Bim を含めたアポトーシス関連因子の発現誘導についてノーザン解析を行った結果、Bim は TGF- $\beta$ により発現誘導したが、Bim 以外のアポトーシス促進因子やアポトーシス抑制因子の発現誘導はなかった。このことから、TGF- $\beta$ により誘導されるアポトーシスに対して Bim の発現誘導が重要である可能性が推論された。

### 2. Smad による Bim の転写制御

Hep3B 細胞に TGF- $\beta$ とシクロヘキシミドを同時に作用させ、ノーザン解析により Bim の発現量を経時的に確認した結果、TGF- $\beta$ による Bim の発現誘導には、他の標的遺伝子の発現誘導は関係なく、TGF- $\beta$ シグナル伝達経路の下流因子である Smad の関与が考えられた。そこで、Bim のプロモーター領域と予想されるヒトゲノム DNA 断片の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したレポーターを作成し、Smad3 と Smad4 を強制発現してルシフェラーゼアッセイを行ったところ、Smad による Bim の転写制御には、Bim の ORF より 2.4kb から 3.3kb 上流の領域が関係し、この領域内にある 2 つの Smad 結合配列が重要であると示唆された。

### 3. TGF- $\beta$ により誘導されるアポトーシスに対する Bim の発現誘導の重要性

Bim の様々な欠失変異体を作成し、Bim の細胞死に対する影響を検討したところ、欠失変異体 Bim<sub>ΔN51</sub> は Bim のドミナントネガティブとして機能することが判明した。そこで、Hep3B 細胞に Bim<sub>ΔN51</sub> を強制発現した後、TGF- $\beta$ により誘導されるアポトーシスに対する影響を検討した結果、Bim<sub>ΔN51</sub> は濃度依存的に TGF- $\beta$ によって誘導される細胞死を抑制した。このことから、Bim の発現誘導が TGF- $\beta$ によるアポトーシス誘導重要な役割を果たしていることと示唆された。

以上、本論文は TGF- $\beta$ の標的遺伝子としてアポトーシス促進因子である Bim を同定し、TGF- $\beta$ による Bim の発現誘導という現象が TGF- $\beta$ によるアポトーシス誘導に重要な役割を果たしていることを明らかにした。本研究は今後 TGF- $\beta$ によるアポトーシス誘導の生理的役割や TGF- $\beta$ による発癌の抑制を理解

する上で重要な基礎になると考えられる。よって、審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。