

論文の内容の要旨

論文題目 細胞増殖抑制能を持つ Tob ファミリー蛋白質の
遺伝子欠損マウスを用いた機能解析

氏名 安島 理恵子

細胞増殖抑制活性を持つ Tob (transducer of ErbB-2)は、受容体型チロシンキナーゼ ErbB-2からのシグナル伝達に関わる蛋白質として見い出された。Tob は B 細胞リンパ腫の染色体転座位近傍より同定された BTG1、及び p53 依存的に発現が誘導される PC3、これらの蛋白質と高い相同性を有する蛋白質として同定された Tob2、ANA、PC3B と共にファミリーを形成する。これら Tob ファミリー蛋白質は、NIH3T3 細胞に過剰発現させると細胞増殖抑制活性を持つ。また、Tob ファミリー蛋白質は Caf1、Hoxb9、Id-1 等の転写因子及び転写調節因子に結合し、様々な遺伝子の転写制御に関わっていることが報告されている。更に、当研究部において作製した *tob* 遺伝子欠損(KO)マウスは大理石骨病様の骨量増加を示した。*tob* KO マウスを用いた解析により、Tob は BMP-2 下流の Smads を介した転写活性を抑制し、骨芽細胞における負の制御因子として働くことが明らかとなった。一方で *tob* KO マウスは加齢に伴い様々な器官に高頻度に腫瘍形成し、*tob* がマウスにおける癌抑制遺伝子であることがわかった。しかし、Tob ファミリー蛋白質の生理的機能、細胞増殖抑制や癌化における作用機構には依然として不明な点が多い。

本研究では Tob 並びに Tob ファミリー蛋白質の機能解明を目的として、(1) Tob の免疫担当細胞における機能解析、(2) Tob ファミリー蛋白質の中で、Tob と最も相同性の高い Tob2 欠損マウス作成と解析、並びに Tob と Tob2 の機能的相補性について *tob/tob2* KO マウスを用いた解析を行った。

初めに、*tob* KO マウスに胸腺及びリンパ節に高頻度に悪性腫瘍ができることから、T 細

胞の増殖調節や癌化機構への Tob の関与に注目し、機能解析を行った。Tob の T 細胞における発現解析から、マウス脾臓由来 T 細胞及び AE7 ヘルパー T 細胞クローンにおいて TCR 刺激依存的に一過的に発現が上昇することを見出した。このことより、Tob が T 細胞において TCR 刺激依存的な働きを持つことが示唆された。

そこで、*tob* KO マウスの由来 T 細胞を用いて解析を行った。しかし *tob* KO マウスの T 細胞の分化に異常は認められなかった。一方、*tob* KO マウス脾臓由来 T 細胞に TCR 刺激した際には、図 1 に示したように野生型マウス由来 T 細胞と比較し、細胞増殖、IL-2 産生及び IFN- γ 産生が亢進していた。

Tob ファミリー蛋白質は様々な遺伝子の転写制御への関与が報告されている。そこで Tob

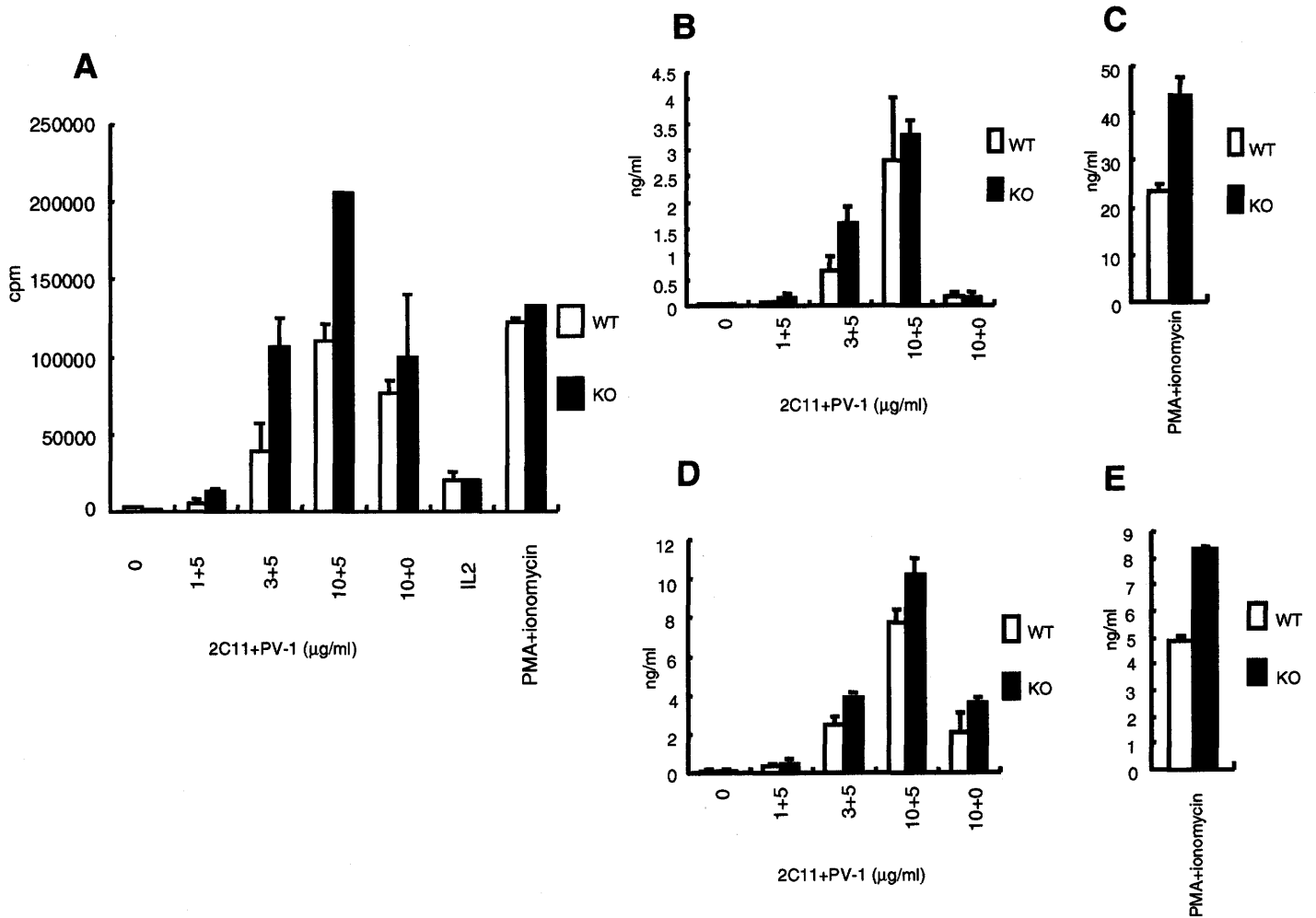


図 1 *tob* 遺伝子欠損マウス脾臓由来 T 細胞の増殖及びサイトカイン産生の亢進

(A) 脾臓細胞を表示した濃度の抗 CD3 抗体 (2C11) と抗 CD28 抗体 (PV-1)、1 μ g/ml 抗 CD3 抗体と 10 ng/ml IL-2、5ng/ml PMA と 0.5 μ M ionomycin で刺激後、 3 H-チミジンの取り込みを指標に増殖を解析した。

(B、C) 脾臓細胞を表示した様に刺激し、2 日後の培養上清に含まれる IL-2 の濃度を ELISA 法を用い解析した。

(D、E) 脾臓細胞を表示した様に刺激し、2 日後の培養上清に含まれる IFN- γ の濃度を ELISA 法を用い解析した。

が *IL-2* 及び *IFN γ* 遺伝子の転写を制御している可能性を考え、*IL-2* 及び *IFN- γ* 遺伝子プロモーターのレポーターを用いたレポーターアッセイを行った。Jurkat T 細胞株及び EL-4 T 細胞株にレポーターと共に Tob 発現ベクターをトランスフェクションし、TCR 刺激もしくは PMA 及び ionomycin 刺激をすると、Tob は濃度依存的に *IL-2* 及び *IFN- γ* 遺伝子プロモーターのレポーター活性を抑制していることがわかった。更に Tob による *IL-2* 遺伝子プロモーター活性制御について詳細な検討を行う為、様々な変異型 *IL-2* 遺伝子プロモーターのレポーターを用い解析を行った。その結果、Tob が *IL-2* 遺伝子プロモーター上の、NFAT/AP1 結合領域を介して *IL-2* 遺伝子プロモーター活性を抑制することが示唆された。

近年、当研究部における解析により Tob のリン酸化機構が明らかになった。Tob は、EGF や PDGF を初めとする細胞増殖因子によって活性化された Erk1/2 によりリン酸化され、その結果細胞増殖抑制活性が減弱する。更に、NIH3T3 細胞の活性化 Ras 及び活性化 MEK による足場非依存的な細胞増殖において、野生型及び Tob のリン酸化型を模倣した変異体は抑制活性を持たないものの、Tob の非リン酸化型変異体は抑制する。これらの知見は、Tob のリン酸化制御が細胞増殖制御および癌化機構において非常に重要であることを示唆している。

Tob の Erk1/2 によるリン酸化部位は、Tob ファミリー蛋白質の中で Tob2 においてのみ保存されている。その為、Tob2 も細胞増殖因子からの刺激依存的に Erk1/2 にリン酸化される可能性が考えられた。そこで、血清もしくは PDGF 刺激後の NIH3T3 細胞の可溶化液を用い、Tob2 のリン酸化についてウエスタンブロットにより解析したところ、刺激依存的に Tob2 のリン酸化による泳動度の変化が確認された。またこの泳動度の変化は細胞の MEK インヒビター (PD98059) 処理により減弱することから、Tob2 も Tob と同様に Erk1/2 にリン酸化されることが示唆された。

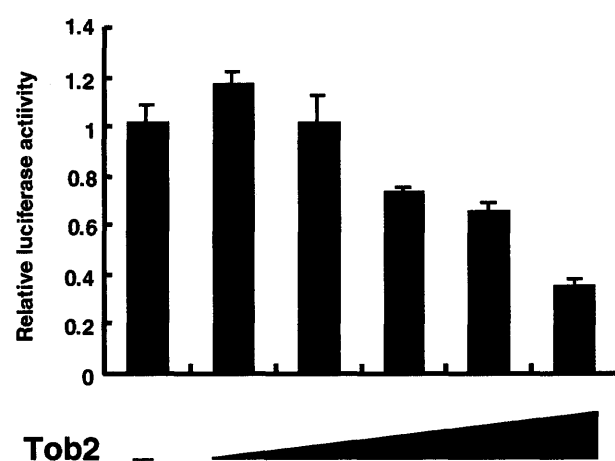


図 2 Tob2 の *cyclin D1* 遺伝子プロモーター抑制活性説明は本文参照。

また Tob は *cyclin D1* の発現を転写レベルで制御している可能性が、*cyclin D1* 遺伝子プロモーターのレポーターを用いた解析から示唆されている。Tob2 が Tob と同様に *cyclin D1* 遺伝子の転写の抑制活性を持つか、*cyclin D1* 遺伝子プロモーターのレポーターを用いて解析した。その結果、図 2 に示す通り Tob2 は、Tob と比較し転写抑制活性は弱いものの、発現量依存的に *cyclin D1* 遺伝子プロモーターの転写活性を抑制することがわかった。

これらの結果から、Tob2 は細胞内において Tob と同様に増殖因子からシグナルによるリン酸化による制御を受け、Tob と機能的に相補している可能性が考えられた。そこで、Tob2

の生体内での機能及び Tob と Tob2 の機能的相補性を解析するため、*tob2* KO マウス及び *tob/tob2* KO マウスを作製した。*tob2* KO マウス及び *tob/tob2* KO マウスは、生後 1 年齢まで見かけ上正常に発育し、繁殖も可能であった。

tob KO マウスが骨石灰化を制御する骨芽細胞の分化・増殖亢進により大理石骨病様の骨量増加を示すことから、*tob2* 遺伝子欠損による骨代謝への影響を調べる為、*tob/tob2* KO マウスの骨量解析を行った。その結果、驚くべきことに *tob/tob2* KO マウスでは、*tob* KO マウスとは反対に骨量が減少していた (図 3)。

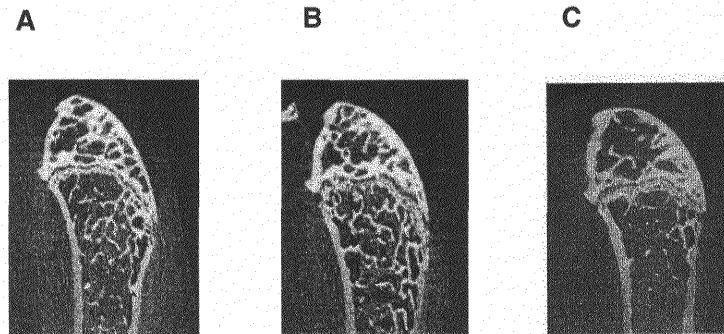


図3 *tob/tob2*遺伝子ダブル欠損マウスの骨量解析

(A)野生型マウス、(B)*tob* KO マウス、及び (C)*tob/tob2* KO マウスの大腿骨の μ CT 像

また、*tob2* KO マウスの骨髄を用いた分化誘導実験で、骨吸収を制御する破骨細胞への分化の亢進が示された。このことにより、Tob2 は破骨細胞の増殖・分化抑制活性を持ち、その為 *tob/tob2* KO マウスの骨量減少が生じることが示唆された。骨芽細胞と破骨細胞における Tob 及び Tob2 の発現は、Tob は前者で高く後者で低い、Tob2 は前者で低く後者で高いという、相反する発現パターンを示すことがわかっている。骨形成に関わるこの 2 種の細胞においてこのような発現パターンを示すことにより、Tob もしくは Tob2 の欠損をもう一方の蛋白質が機能的に補うことが出来ず、骨量の増加及び減少という相反する表現型が表れたことが示唆される。

以上の解析により、Tob 及び Tob2 は成体内の様々な組織において、細胞の増殖・分化を抑制する働きを持つことが示された。また、Tob と Tob2 は様々な組織において機能的に相補していることが示唆された。

今後、Tob 及び Tob2 の個体内の免疫系における機能、細胞の分化増殖制御、及び癌化機構における機能の解明の為には、*tob*、*tob2*、及び *tob/tob2* KO マウスを用いた更なる解析が必要である。また、Tob 及び Tob2 の個体レベルにおける機能的相補性を、Tob 及び Tob2 の発現部位に着目し解析していくことが重要であると考えられる。