

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Notch1 activation represses TGF- β / Smad signaling
via coactivator p300.

和訳 Notch1 シグナルは転写補助因子 p300 を介して TGF- β / Smad
シグナルを抑制する。

指導教官 平井 久丸 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 増田 茂夫

Notch シグナルは細胞の分化・増殖・アポトーシスなど重要な運命決定に関わっていることが知られている。Notch は細胞膜表面に発現する 1 回膜貫通型レセプターで、隣接するリガンド細胞からの刺激が Notch を介して入り、その結果 Notch 細胞内領域が切り出されこれが核内へ移行し標的遺伝子の転写を活性化する。この Notch 細胞内ドメインは単独で発現された場合にも転写活性化を呈し、「活性型 Notch」ともいわれる。近年種々の知見により Notch シグナルの恒常的活性化が造腫瘍性に深く関与していることが明らかにされてきた。例えば *Notch1/TAN-1* がヒト腫瘍性疾患で初めてその関与を指摘されたのは染色体転座型ヒト白血病であった。同疾患は *t(7;9)(q34;q34.3)* を有する急性 T 細胞性白血病であるが、その転座切断点に *Notch1* が存在し *Notch1* の細胞外領域を欠失した結果、恒常的活性化を来した *Notch1* が T 細胞受容体プロモーターにより発現され、造腫瘍性を獲得したと考えられた。その他、マウスでは恒常的活性型 *Notch1* 及び *Notch3*

を骨髄細胞に導入し移植を行うと T 細胞性白血病を発症する。In vitro の解析では活性型 Notch1 及び Notch2 は rat kidney 細胞をアデノウイルス癌関連蛋白質 E1A と協調してトランスフォームする。また活性型 Notch4 はマウス乳癌発症に関与しているといわれている。

このように多くの知見が積み重ねられているものの、Notch シグナルの造腫瘍性に関する分子メカニズムの詳細は不明な点が多い。今回、私は Notch シグナルが、細胞増殖抑制因子である TGF- β シグナルを抑制することを見出し、Notch シグナルの造腫瘍性を説明し得る一つのメカニズムを明らかにしたので報告する。

TGF- β は先述の通り細胞増殖抑制因子であり、同シグナルの破綻が造腫瘍性に関与していることが広く知られている。すなわち TGF- β シグナルは腫瘍抑制因子としての重要な役割を担っていると考えられている。TGF- β スーパーファミリーは TGF- β , activin, BMPs からなり、その細胞内シグナル伝達因子として Smad が存在する。TGF- β が type II TGF- β レセプターに結合、type I TGF- β レセプターがリン酸化され、さらに Smad2, Smad3 がリン酸化される。この活性型 Smad2 及び Smad3 はそれぞれ Smad4 と複合体を形成し、核へ移行後、標的遺伝子のプロモーター上に結合し転写を開始する。その際、核内で Smad 複合体と基本転写因子を橋渡しする因子として転写補助因子 p300 が必須である。p300 は特に Smad3 と結合し、HAT 活性を有し転写を正に制御する。

p300 は種々のシグナル経路で最もよく利用されている転写補助因子の一つであるが、Notch シグナルにおいても必須であることが知られており、TGF- β シグナルと Notch シグナルの共通の因子であるといえる。今回、私はこの共通の因子である p300 に注目し以下の解析を行った。

最初に私は活性型 Notch1 が TGF- β の細胞増殖抑制作用に影響するか否かを明らかにするために、TGF- β 反応株である Mv1Lu 細胞株で stable に活性型 Notch1 を発現するクローンを複数樹立した。 ^3H thymidine-incorporation assay にて、活性型 Notch1 クローンでは mock クローンに比べ有意に TGF- β 反応性が減少していた。すなわち活性型 Notch1 シグナルにより TGF- β 抵抗性を獲得したと考えられた。

次に、活性型 Notch が TGF- β シグナルに与える影響をその転写活性化を指標にレポーターアッセイを行った。まず TGF- β 反応性レポーターである p3TP-Lux を用いたところ、TGF- β 刺激によるルシフェラーゼ活性の増加は活性型 Notch1 により 20-30%に抑制された。他のレポーターでも

同様の抑制が観察された。TGF- β シグナル伝達因子である Smad2 や Smad3 の過剰発現による転写活性化も同様に活性型 Notch1 により抑制を受け、この抑制は活性型 Notch1 の容量に依存した。また活性型 Notch2, Notch3 も同様の抑制作用を有した。以上より活性型 Notch が TGF- β シグナルによる転写活性化を抑制することが判明した。

Notch シグナルが TGF- β シグナルを抑制する分子メカニズムを明らかにするために、次に私は先述の通り転写補助因子 p300 が両シグナルに与える影響を調べた。p3TP-Lux によるレポーターアッセイにて Smad3 による転写活性化は活性型 Notch1 による抑制を受けるが、ここへ p300 を過剰発現したところその抑制は容量依存性に解除された。このことから Smad3 が利用可能な p300 の容量が限定された結果、その転写活性化が阻害される、つまり活性型 Notch1 が共存する場合、p300 が Smad3 から奪われる可能性が想定された。そこで逆に Notch シグナルが TGF- β /Smad シグナルにより抑制を受けるか否かを調べたところやはり抑制作用が認められ、両シグナル間に相互抑制の機序が存在することが示された。

次に活性型 Notch1 が Smad3 から p300 を奪うという仮説を検証するために、p300 結合能を欠失した Notch1 変異体を作製しそれを用いた解析を行った。最近 Notch1 上の、p300 との結合に必要な領域が同定され、EP ドメインと呼ばれている。この Notch1 の EP ドメイン欠失体、変異体が Smad3 による転写活性化を抑制するか否かを調べたところ、予想通り抑制作用は消失していた。このことから Notch1 上の EP ドメインは Smad シグナル抑制に必須であることが判明し、p300 を介したシグナル抑制機構の存在する可能性が示唆された。

では実際に蛋白間の相互作用の結果、p300 への結合の競合が生じているのであろうか。この点を検証するために以下の免疫沈降実験を行った。抗 p300 抗体による免疫沈降を行うと Smad3 が検出されることは知られているが、ここに活性型 Notch1 を共発現すると Smad3 の同検出量が大幅に減少した。また Notch1 の EP ドメイン変異体が共発現された場合には Smad3 の検出量に影響を与えなかった。以上より活性型 Notch1 は p300 の結合に必要な EP ドメインを介して Smad3 から p300 を奪うことにより Smad シグナルを阻害することが証明された。

ここまでの検証により、活性型 Notch1 は TGF- β /Smad シグナル抑制を p300 を介して行うことが明らかとなったが、果たしてこれ以外の経路による抑制が存在しないのであろうか。Notch シグナルの主要なエフェクターとして RBP-J が知られており、活性型 Notch はこの DNA 結合蛋白 RBP-J

と共役して標的遺伝子の転写を活性化する。上記 p300 を介した経路は RBP-J 非依存性経路と考えられるが、逆に RBP-J 依存性経路、すなわちその下流の因子を介した抑制経路が存在しないか否かを明らかにする目的で、ドミナント・ネガティブ型の RBP-J (DN-RBP)を用いて解析を行った。この DN-RBP は Notch1 とは結合可能だが DNA 結合能を欠いた変異体である。レポーターアッセイの結果、活性型 Notch1 の TGF- β シグナル抑制作用は DN-RBP 存在下でもキャンセルされないことが判明した。このことより、活性型 Notch1 による TGF- β シグナル抑制は RBP-J に依存しない経路、すなわち p300 への競合という機序により主に惹起されると考えられた。

以上、恒常的活性型 Notch シグナルの作用を明らかにしてきたが、Notch シグナルのより生理的な役割に言及するために Notch リガンド刺激によるナチュラルなシグナルが TGF- β シグナルに与える影響をさらに検討した。両リガンド刺激が可能な細胞株として C2C12 細胞株を見出しレポーターアッセイを行った。尚、Notch シグナルはリガンド表出細胞株(Balb 3T3-J1)との共培養によりその入力を行った。その結果、同様に Notch シグナルと TGF- β シグナルはナチュラルリガンド刺激の際にも相互抑制の作用を有することが判明した。

以上、本研究で私は Notch シグナルが TGF- β シグナルを抑制することを見出し、その分子メカニズムを解析した。転写補助因子 p300 への競合、奪い合いを介してその拮抗作用が惹起されることが明らかとなり、これを通じていわゆる腫瘍抑制因子としての TGF- β /Smad シグナルが阻害されることが判明した。これらのことから Notch シグナルの造腫瘍性を説明する一つの分子メカニズムが明らかにされたと考えられた。

