

審査の結果の要旨

氏名 増田 茂夫

本研究は Notch シグナルの有する造腫瘍性の分子メカニズムを明らかにするため、細胞増殖抑制因子である TGF- β シグナルとのクロストークに注目し、下記の結果を得た。

1. 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。
2. 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。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。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。
3. 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、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。

4. 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。Notch1 上の、p300 との結合に必須な領域は EP ドメインと呼ばれているが 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。
5. 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かを検証するために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 の結合に必須な 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。
6. 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。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。

7. 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。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、本論文では Notch シグナルが TGF- β シグナルを抑制することを見出し、さらに転写補助因子 p300 への競合を介してその拮抗作用が惹起されるといふ分子メカニズムを明らかにした。本研究はこれまで不明であった Notch シグナルの造腫瘍性の解明に重要な貢献をなすと考えられると同時に、これまで未知であった両シグナルのクロストークを通じた種々の生命現象の解明に寄与する礎となるべき研究であり、学位の授与に値するものと考えられる。