

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成12年度博士課程進学

氏名 井出 寛子

指導教官 秋山 徹

論文題目 TGF- β 標的遺伝子 MAFbx の単離および機能解析

TGF- β は、細胞の増殖制御、創傷治癒、炎症・免疫、恒常性の維持などの多岐にわたる重要な生理作用を担っており、そのシグナルの異常は、癌、繊維症疾患、動脈硬化、自己免疫疾患などの様々な病態をもたらす。TGF- β のシグナルは細胞内シグナル伝達分子である Smad を介して核内に伝わり、標的遺伝子の発現を制御することが明らかにされている。従って、TGF- β の標的遺伝子を同定し、その遺伝子産物の機能を解析することは、TGF- β の生理作用の解明や上記病態の病因解明に大きく貢献するものと期待される。

そこで、TGF- β に対して早期に応答する遺伝子群を探索するために、ミンク肺上皮細胞 Mv1Lu を用いて SSH (Suppressive subtractive hybridization) 法を利用したスクリーニングを行った結果、TGF- β 1 処理 30 分で応答する MAFbx を単離、同定した。2001年11月、Bodine SC らによるノックアウトマウスの解析から、MAFbx は Muscle Atrophy、即ち筋萎縮を引き起こすことが報告されたが、TGF- β シグナルとの関係については知られていない。本研究では TGF- β シグナルとの関連性を中心に MAFbx の機能の解明を試みた。

1. MAFbx の単離

TGF- β 1 処理を1時間行ったミンク肺上皮細胞 Mv1Lu をもとに、SSH

(Suppressive subtractive hybridization) 法を用いてサブトラクションを行い、ライブラリーを構築した。このライブラリーから任意に約 100 個の独立クローンを選択し、これをプローブとして TGF- β 1 処理群と未処理群の細胞についてノーザンブロット法を用いたスクリーニングを行った。その結果、Connective tissue growth factor (CTGF) と Muscle atrophy F-box protein (MAFbx) の 2 種類の遺伝子が単離された。

2. MAFbx の構造

MAFbx は 355 アミノ酸から成る約 40kDa のタンパク質で C 末側に F-box ドメインを持つ。最近の知見から、F-box ドメインを持つタンパク (F-box タンパク) は Skp-1、Cul-1 と共にユビキチンリガーゼである SCF 複合体を形成し、ユビキチンシステムを介したタンパク質分解を担うことが示されており、特に F-box タンパクはこの複合体において、分解する標的基質を識別していることが報告されている。

Human MAFbx 遺伝子は、*C.elegans* DY3.6 遺伝子とアミノ酸レベルで約 48 %、Mouse とは約 97 % の相同性を示し、その他にも Rat、*Xenopus*、Zebra fish、*Drosophila*、などの幅広い種で保存されている。更に、Mouse、Rat 及び Human では MAFbx 遺伝子とアミノ酸レベルで約 60 % 程度の相同性を示すファミリー分子 (Fbx25) が存在している。但し、RT-PCR の結果から Fbx25 は TGF- β による誘導を受けなかった。

3. MAFbx の発現の経時的变化、及びシクロヘキシミド処理による発現の影響

MAFbx はノーザンブロットの解析から TGF- β 1 処理 30 分でその mRNA 発現量が上昇し、3 時間で最大となる。MAFbx が TGF- β 1 の直接的な標的遺伝子であるかどうかを検討するために Mv1Lu 細胞をタンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミド及び、転写活性阻害剤であるアクチノマイシン D で処理し、TGF- β 1 による MAFbx の発現を調べた。その結果、シクロヘキシミドで処理しても MAFbx の mRNA の発現が上昇したことから、MAFbx は TGF- β の直接的な標的遺伝子であり、早期にその発現が誘導されることが示唆された。

4. MAFbx の組織特異的な発現

MAFbx の mRNA の発現を組織で調べたところ、心臓、及び筋肉で発現が見られた。とりわけ筋肉ではその発現量が多かった。

5. MAFbx の TGF- β シグナルに対する影響

MAFbx と TGF- β シグナルの関連性を検討するために Mv1Lu 細胞に 3TP-Luc リポータープラスミドと MAFbx をトランスフェクションした後、TGF- β 1 で経時的に処理し、ルシフェラーゼアッセイを行った。3TP-Luc リポータープラスミドは TGF- β の標的遺伝子として知られている PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor type I) のプロモーター領域にルシフェラーゼ遺伝子をつなげたプラスミドである。

その結果、MAFbx を発現させた細胞は、発現させなかった細胞に比べ、TGF- β 1 処理 1 2 時間後にルシフェラーゼの活性が上昇した。また、TGF- β レセプターの活性化型 ALK5ca と MAFbx をトランスフェクションして、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、ALK5ca と MAFbx を共に発現させた細胞は、ALK5ca 単独を発現させた細胞に比べ、その活性が上昇した。但し、MAFbx を単独で発現させてもルシフェラーゼ活性の上昇は見られなかった。一方、F-box を除いた変異体 Δ Fbox と ALK5ca を発現させた場合は、MAFbx 野生型までの活性上昇は見られなかった。

次に、SBE (Smad binding element) -Luc リポータープラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイを行った。SBE-Luc リポータープラスミドは Smad が結合する DNA 配列 CAGA を 9 個並べたリポータープラスミドである。その結果、ALK5ca と MAFbx を共に発現させた場合は 3TP-Luc リポータープラスミドと同様に転写活性を上昇させた。また、Smad3 及び Smad4 と MAFbx を共発現させた場合も同様であった。興味深いことに N 末端側と C 末端側を削った変異体 Δ N Δ C を共発現させると、ALK5ca 或いは Smad3 と Smad4 を発現させた場合に比べ、転写活性を半分程度まで減少させた。

これらの結果から、MAFbx は TGF- β シグナルを正に制御していると考えられる。その機構としては、MAFbx が F-box タンパクであることから、TGF- β シグナルを負に制御する何らかの因子を基質として分解に導き、その結果、

TGF- β シグナルをより強化することが考えられる。また最近の知見から、SCF 複合体によるユビキチン化によって転写因子が安定化し、転写活性が上昇することが報告されている。従って、MAFbx も何らかの因子をユビキチン化してその転写活性を上昇させていることが考えられる。

まとめ

本研究では TGF- β シグナルより早期誘導される遺伝子 MAFbx を単離した。MAFbx は TGF- β によって発現が直接誘導され、TGF- β シグナルを正にフィードバックしていることが明らかになった。

最近の研究から、TGF- β スーパーファミリーに属し、筋肉の発生に重要な役割を担っている myostatin (GDF-8) のシグナルは、TGF- β と同様なシグナル伝達経路を経由して核内に伝わり、標的遺伝子の発現を制御していることが明らかにされた。また、筋萎縮を引き起こす薬剤によってその mRNA 発現量が増加することも知られている。

従って、MAFbx が筋肉特異的な発現を示すことと併せて考えると、筋組織における MAFbx は myostatin のシグナルを正に制御している可能性が考えられる。