

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 井出 寛子

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 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。本研究では、TGF- β の標的遺伝子を同定することを目的として、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い、MAFbx を単離、同定した。

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、Muscle atrophy F-box protein (MAFbx) 遺伝子を単離、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、即ち廃用性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。

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 NLS(核移行)シグナルと 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 の発現の経時的変化、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、及び myostatin 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 1) 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12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。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。

この実験で用いた MAFbx と種類の変異体の細胞内局在を調べたところ、MAFbx が核内に局在するのに対して、NLS シグナルを欠失する Δ N Δ C は核外に局在することが明らかとなった。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、その活性には MAFbx が核内に局在していることが必要であると考えられる。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。

MAFbx は骨格筋に発現が高い。一方、TGF- β ファミリーの一員である myostatin (GDF-8) は骨格筋での発現が高く、マウス成体に投与すると筋肉の萎縮を引き起こすことが知られている。また、myostatin のシグナルは TGF- β と類似した経路をとることが報告されており、MAFbx との関連性が示唆される。そこで、MAFbx と myostatin を細胞に発現させて SBE-Luc リポータープラスミドによるルシフェラーゼアッセイを行ったところ、MAFbx は TGF- β と同様、myostatin シグナルの転写活性を促進することが明らかとなった。

以上、本論文は、MAFbx の発現が TGF- β によって直接誘導され、TGF- β シグナルを正にフィードバックしていることを明らかにしたものであり、学術上、応用上貢献することが少なくない。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。