

審査の結果の要旨

氏名 永田基子

本研究は、細胞において細胞増殖抑制をはじめとする多様な作用を有する Transforming Growth Factor- β (TGF- β) スーパーファミリーのシグナルを、負に調節する因子のひとつである c-Ski の機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. c-Ski は本来、核内において標的遺伝子上で転写共役因子として機能することが知られているが、ある種の癌細胞においては、細胞質において高発現していることが報告された。そこで、c-Ski 核移行シグナルを同定、その変異体を用いることで細胞質局在 c-Ski の機能を解析した。その結果、c-Ski の 452-458 残基の PRKRKLT 配列が、c-Ski の核移行シグナルとして機能していることが示された。
2. c-Ski 核移行シグナルの変異体を用いた検討から、細胞質局在 c-Ski は TGF- β および BMP シグナルを野生型 c-Ski と同様に抑制し、TGF- β によって引き起こされる細胞表現型を抑制し得ることが示された。この細胞質局在 c-Ski の TGF- β および BMP シグナルの抑制機構は、R-Smad と Co-Smad の複合体の核移行を抑制することによることが示された。
3. 細胞質局在 c-Ski は核内局在を必要とする機能を有しておらず、TGF- β シグナルの抑制因子である Smad7 の発現抑制能を失っていることが示された。したがって、細胞質局在 c-Ski を用いることで、TGF- β シグナルに依存した c-Ski の機能と、TGF- β シグナルに依存しない c-Ski の核内機能とを区別して評価することが可能であることが明らかとなるとともに、細胞質局在 c-Ski による TGF- β シグナル抑制について新たな機構が示唆された。
4. c-Ski の細胞内局在制御機構について解析した結果、c-Ski はプロテアソーム阻害剤処理により、核内局在を示さず細胞質にも蓄積することが明らかとなり、これは、新たに合成された c-Ski の核移行が阻害されていることによることが推察された。また、本現象には複数の結合タンパク質の結合部位と一致する c-Ski の N 末端 (94-210) およびリン酸化の可能性の示唆される C 末端 (491-548) 部位が必要であることが明らかとなった。
5. c-Ski の細胞内局在制御とリン酸化の関連が示唆されたため、Smad4 との結合により亢進し、SDS-PAGE 上でバンドシフトをとまう c-Ski のリン酸化部位の同定を試みた結果、欠損変異体からの解析および直接的な MALDI-TOF-MS を用いた解析から、c-Ski の 515 残基目のセリンがリン酸化されていることが同定された。
6. c-Ski の 515 番目のセリンのリン酸化が c-Ski の機能に与える影響について、細胞内局在、タンパク質の安定性、TGF- β および BMP シグナル抑制効果、Smad 複合体結合性およびプロテアソーム阻害剤処理による細胞内局在変化について検討したが、明確な影響は認められなかった。

以上、本論文は TGF- β シグナル伝達機構における負の調節因子である c-Ski の核移行シグナルをはじめ決定することにより、細胞質局在 c-Ski の特性および機能の一部を明らかにした。本研究は癌細胞で見られる細胞質局在 c-Ski の機能を解明し、癌細胞における TGF- β シグナル伝達機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。