

## 論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻  
平成 18 年度博士課程 進学  
氏名 山角 祐介  
指導教員名 秋山 徹

### 論文題目 TGF- $\beta$ シグナルにおける D8 の意義

#### 【序論】

TGF $\beta$ は細胞増殖の制御を主とした様々な生理現象に関わる重要なサイトカインである。例えば、TGF $\beta$ は造血性細胞や肝細胞、T リンパ球に作用し、細胞周期の停止やアポトーシスを誘導する。また、多くの癌細胞では、TGF $\beta$ 受容体や Smads に変異があり、TGF $\beta$ による増殖抑制に抵抗性を示すことが報告されている。そのため TGF $\beta$ シグナルは細胞癌化の抑制に重要であり、その機構を明らかにすることは細胞の癌化を理解する上で極めて重要であると考えられている。これまでに、TGF $\beta$ による細胞の増殖抑制に関しては非常によく研究されてきたが、TGF $\beta$ のアポトーシス誘導機構に関しては未だ不明な点が多い。

D8 は当研究室において TGF $\beta$ によって発現が誘導される新規遺伝子として同定された。D8 タンパク質の特徴は N 末端側に KH ドメインを 2 つ有することである。これまでに、KH ドメインタンパク質は RNA と結合し、スプライシング制御、翻訳阻害、mRNA の分解制御といった様々な転写後調節を行うことが報告されており、実際に D8 も Bim mRNA に結合し、Bim mRNA の安定化に寄与していることが当研究室での先行研究により明らかになっている。しかしながら、D8 の標的となる RNA が Bim のみとは考え

にくく、さらなる標的 RNA の探索を行う必要がある。

これまでに、D8 の過剰発現によって癌細胞のアポトーシスが誘導されることや、DNA ストレスによって誘導されるアポトーシスに D8 が重要であることが明らかとなっている。本研究では、TGFβが細胞にアポトーシスを誘導する機能を持つことから、D8 が TGFβによる細胞のアポトーシスに関与している可能性について検討した。またその過程で、D8 の標的となる RNA の同定に成功した。

### 【第 1 章 TGFβシグナルによる D8 の発現制御】

これまでに、マイクロアレイ法を用いた解析により、A549 細胞に TGFβを添加すると D8 の mRNA 量が増加することが明らかとなっている。TGFβシグナルによる標的遺伝子の発現誘導は、主として Smads を含む転写因子複合体による転写活性化であることから、TGFβシグナルによって D8 の転写が促進されている可能性が考えられた。本章ではその転写制御機構を詳細に解析するため、D8 の転写制御領域の解析を行った。

D8 プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイの結果、D8 プロモーターが TGFβに応答することが明らかになった。さらに Smad 抗体を用いたクロマチン免疫沈降実験の結果、TGFβ刺激依存的に Smads が D8 のプロモーター領域に結合することが明らかになった。以上の結果から、D8 は TGFβシグナルの直接の標的遺伝子であることが明らかとなった。

### 【第 2 章 TGFβが誘導するアポトーシスにおける D8 の役割】

先行研究により、D8 の過剰発現によって癌細胞のアポトーシスが誘導されることが明らかとなっている。また、前章で D8 は TGFβシグナルの直接の標的遺伝子であることを明らかにした。D8 が TGFβ誘導性アポトーシスに関与している可能性が考えられたため、本章ではまず TGFβによってアポトーシスが誘導されることが報告されている SNU16 細胞を用い、D8 の関与について検討した。さらに、SNU16 細胞だけでなく初代培養肝細胞においても TGFβによってアポトーシスが誘導されることがわかっていることから、当研究室で作製された D8 ノックアウトマウス由来初代培養肝細胞を用いて、TGFβ誘導性アポトーシスにおける D8 の重要性について検討した。

D8 の発現を抑制した SNU16 細胞、D8 ノックアウトマウス由来初代培養肝細胞が共に、TGFβ誘導性アポトーシスに抵抗性を示したことから、D8 が本経路で重要な働きを担っていることが明らかになった。

### 【第 3 章 D8 の下流因子の同定】

第 1 章および第 2 章では、D8 が TGFβによって誘導されるアポトーシスにおいて重要な働きを担っていることを明らかにした。しかしながら、D8 にはアポトーシスを直接誘導できるような既知の機能ドメインが含まれていないため、D8 によるアポトーシ

ス誘導は別のタンパク質を介している可能性が高いと考えられた。またこれまでに、D8によるアポトーシス誘導にはRNA結合ドメインであるKHドメインが必要であること、そしてD8がKHドメインを介してアポトーシス誘導因子であるBimのmRNAに結合し、mRNAを安定化させることでアポトーシスを誘導していることが明らかになっている。これに加えて最近、BH3-only proteinであるBim、BmfがTGFβによって発現誘導され、かつTGFβ誘導性アポトーシスに重要であることが報告された。こうした知見から、TGFβによって誘導されるアポトーシスにおいて、D8の下流でBimやBmfなどのアポトーシス誘導因子が機能している可能性が考えられた。本章では、これらのアポトーシス誘導因子のうち、D8の下流で働いている因子の同定を試みた。

TGFβによって発現が誘導され、かつD8の発現抑制によってその発現誘導が抑えられるような遺伝子を探索した結果、Bmfがこの条件を満たすことがわかった。さらにD8ノックアウトマウス由来初代培養肝細胞では野生型マウス由来初代培養肝細胞と比較して、TGFβの添加によるBmfの発現量の増加が抑制されていることが分かった。以上の結果から、D8の下流でBmfが機能していることが強く示唆された。

#### 【第4章 D8によるBmfの発現制御機構】

第3章において、D8がBmfのmRNA量を制御することでアポトーシスを誘導していることが明らかになったことから、D8によるBmf mRNAの制御機構として、転写促進、RNAの安定化などの機構が考えられた。そこで本章ではそれらの可能性について検討した。

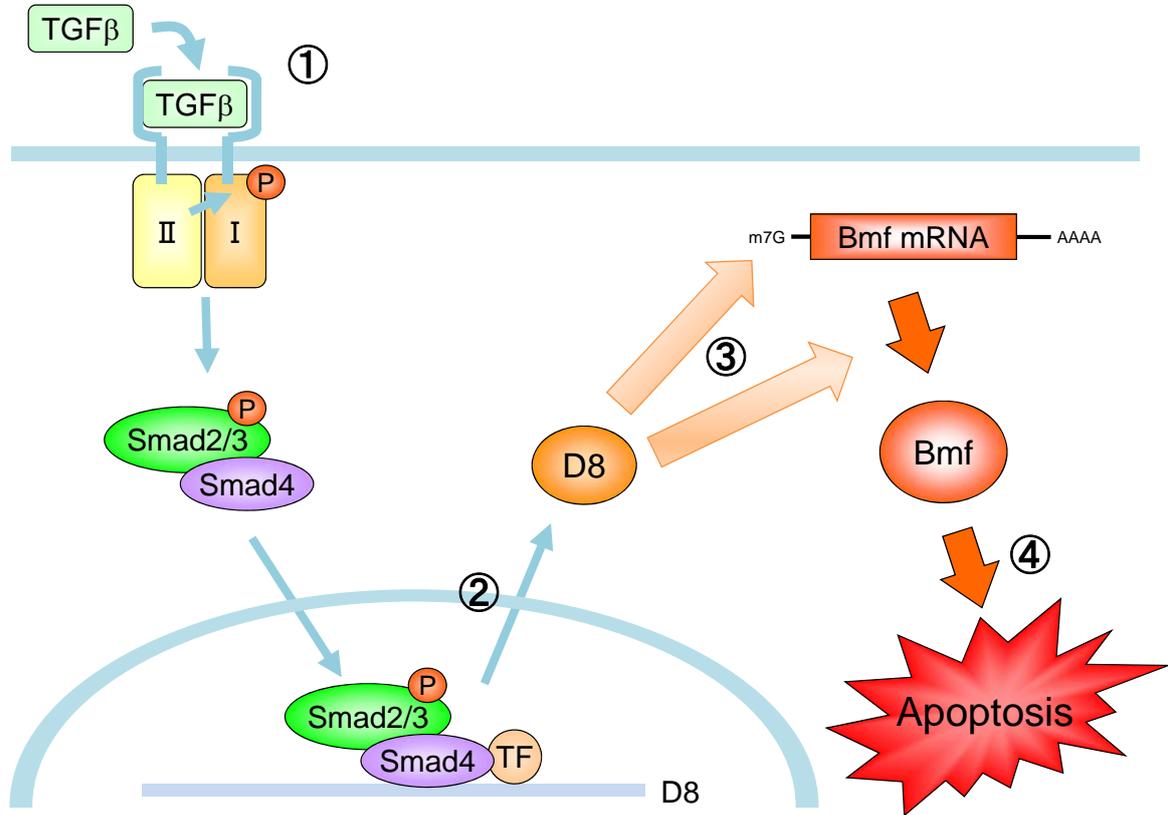
ActinomycinDを添加して転写を止めた際のBmf mRNAの分解速度を調べたところ、D8の発現を抑制するとBmf mRNAの分解速度が速くなることがわかった。この結果から、D8によるBmfの発現制御には少なくともBmf mRNAの安定化が関与していることが示唆された。

#### 【総括】

本研究では、TGFβの新規標的遺伝子としてD8を同定した。また、D8がBmf mRNAの安定化を介してアポトーシスを誘導することを明らかにした（モデル図）。TGFβシグナル標的遺伝子で、RNAの転写後調節に関与している遺伝子の報告はTTP遺伝子以外なく、しかもアポトーシスに関連した標的遺伝子はD8が初めての報告である。したがって、本研究により見出した経路は極めて新規性が高いと考えられる。また、TGFβによって誘導されるアポトーシスは組織の恒常性の維持や癌化の抑制に重要であると考えられており、本研究によって得られた知見はこれらの生命現象を詳細に解明するために必要な新規の研究領域を提示するものである。すでに当研究室ではD8ノックアウトマウスが作製されており、本研究によって見出された経路の生理的意義を調べる実験

が進行中である。今後の展開に期待がもたれる。

### TGFβによるD8介在性新規アポトーシス誘導機構



- ① TGFβがレセプターに結合
- ② SmadによるD8の転写の促進
- ③ D8によるBmf mRNAの安定化 or 翻訳促進
- ④ アポトーシスの誘導