

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 山角祐介

TGF β 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。多くの癌細胞では、TGF β 受容体や Smads に変異があり、TGF β 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 β 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 β 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 β による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 TGF β 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明らかになっていた。しかしながら、D8 の標的となる RNA が Bim 以外見つかっておらず、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にアポトーシスが誘導されることが明らかとなっていたため、D8 が TGF β 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。本論文ではその可能性を検証するとともに、D8 の標的 RNA の同定を試みている。

マイクロアレイ法を用いた解析により、TGF β 刺激によって D8 の発現が誘導されることが明らかになっていたが、その詳細な発現誘導機構はわかっていない。TGF β 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および Smad 抗体を用いたクロマチン免疫沈降実験の結果、D8 プロモーターが TGF β 刺激に応答し、かつ TGF β 刺激依存的に Smads が D8 のプロモーター領域に結合した。これらの結果から、D8 は TGF β シグナルの直接の標的遺伝子であることが示された。

また、D8 が TGF β 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、TGF β 誘導性アポトーシスに感受性の高い SNU16 細胞、初代培養肝細胞の 2 種の細胞を用い、この可能性を検証した。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、TGF β 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。

D8 が mRNA の安定化を介してアポトーシスを誘導していることが明らかになっていたため、いくつかのアポトーシス誘導因子に絞り、D8 の下流で働いている因子の同定を試みた。TGF β 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刺激による Bmf mRNA 量の増加が抑制されていることがわかった。以上の結果から、D8 の下流で Bmf が機能していることが示された。

D8 が mRNA の安定化機能を有することから、D8 による Bmf mRNA の制御は mRNA の安定化を介していると考えられた。この可能性を検証するため、actinomycinD を添加して転写を止めた際の Bmf mRNA の半減期を調べたところ、D8 の発現を抑制すると Bmf mRNA の半減期が短くなることがわかった。また、D8 ノックアウトマウス由来初代培養肝細胞では、野生型マウス由来肝細胞と比較して Bmf mRNA の半減期が短くなっていた。これらの結果から、D8 は Bmf mRNA の安定化を介して Bmf mRNA 量を制御していることが示された。

本研究では、TGFβの新規標的遺伝子として D8 を同定し、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。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、本論文で見出され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。なお、本論文は鯉沼代造、塚原（河村）由布子、大野陽子、秋山徹との共同研究であるが、いずれも論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の単位論文として価値あるものと認めた。