

論文の内容の要旨

論文題目 TGF- β と EGF シグナル伝達制御機構の解析

指導教員 宮園 浩平 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成19年 4月 進学

医学博士課程

病因・病理学専攻

水谷 アンナ

本研究では、TGF- β と EGF シグナルの細胞内シグナル伝達機構について、2つのテーマを設定し解析を行った。第I章では、E3 ユビキチンリガーゼ Arkadia による AP-2 複合体のユビキチン化を介した、EGF 受容体のクラスリン依存性エンドサイトーシスの制御機構について検討を行った。第II章では HepG2 細胞における TGF- β シグナル下流の転写因子 Smad2/3 の結合部位を ChIP-chip を用いて網羅的に同定し、HNF4 α との関係を見出して解析を行った。

第I章では yeast two-hybrid 法で E3 リガーゼ Arkadia 結合候補タンパク質として同定された AP2 μ との関係に着目して検討を行った。Arkadia は gene-trap

mutagenesis を用いて得られたマウスの解析により、胚体外の組織で anterior definitive endoderm (ADE)の誘導に必須の因子として同定された。また、アフリカツメガエルを用いた研究から Arkadia は TGF- β ファミリーの一つ Nodal シグナルを増強することで中内胚葉を誘導することが示されている。Arkadia の基質として、Smad7、c-Ski および SnoN が知られており、いずれも TGF- β シグナルの抑制因子である。Arkadia はまた、リン酸化された Smad をユビキチン化することで Smad のターンオーバーに関わり、TGF- β シグナルを増強することが報告されている。しかしながら TGF- β シグナル増強作用以外の Arkadia の役割の有無についてはこれまで明らかではなかった。

まず過剰発現させた Arkadia と AP2 μ の結合を確認したうえで、その結合部位の同定を行った。Arkadia の変異体を用いた検討の結果、AP2 μ は Arkadia の N 末側で結合すること、さらにその領域に AP2 μ の認識配列 YXX Φ に相当する YALL モチーフが存在し、この配列を通して Arkadia が AP2 μ に結合していることを明らかにした。また 293T 細胞に Arkadia のみ過剰発現させ、免疫沈降を行ったところ、内因性の AP2 μ との結合を認め、さらに AP2 α や AP2 β との共沈も認められたことから、Arkadia が AP-2 複合体と結合している可能性が示唆された。

AP2 μ のユビキチン化の検討により Arkadia の E3 リガーゼ活性依存性の誘導が

認められた。さらに Arkadia によってユビキチン化を受ける AP2 μ 中のリジン残基を AP2 μ のリンカー領域にある 130 番目のリジンであると同定した。ユビキチンには 7 つのリジン残基が存在し、どのリジンで連結したポリユビキチン鎖かということで役割が異なる。ユビキチン分子のリジン残基の変異体を用いた検討により、Arkadia による AP2 μ のユビキチン化は、比較的報告の少ないリジン 27 リンクによることが示唆された。リジン 27 リンクに関しては、これまでプロテアソームでのタンパク質分解に関わることが知られている。本研究でも、過剰発現では Arkadia により誘導された AP2 μ のユビキチン化がプロテアソーム阻害剤によって増強し、Arkadia による AP2 μ のユビキチン化がタンパク質分解を促進することが示唆された。しかしながら Arkadia の発現をノックダウンしても内因性の AP2 μ の増加は認められなかった。

続いて EGF 刺激後の EGF 受容体のエンドサイトーシスにおける Arkadia の関与について検討した。cell surface labeling 法による検討で、Arkadia ノックダウン下では細胞膜表面から細胞内に取り込まれる EGF 受容体量が減少した。Arkadia による AP2 μ のユビキチン化がこの現象に関与するか検討するため、内因性の AP2 μ をノックダウンした上で、siRNA 耐性の野生型 AP2 μ (WT-SR)と、その Arkadia によりユビキチン化されない変異体(K130R-SR)のそれぞれを発現させ

て、EGF 受容体のエンドサイトーシスを検討した。その結果 K130R-SR 変異体を導入すると細胞内に取り込まれる EGF 受容体の量が減少した。

以上のことから、Arkadia の TGF- β シグナル増強以外の新規の作用として、AP2 μ のユビキチン化を介して、EGF 受容体のエンドサイトーシスを促進していることが示唆された。

第 II 章では、TGF- β シグナルの下流因子 Smad2/3 の転写制御に関して研究を行った。TGF- β シグナルは細胞増殖抑制、上皮間葉転換など多彩な作用を有するが、細胞の種類によってリガンド刺激に対する異なる応答が認められる。また協調する転写因子等との関係により、そのコンテキスト依存的な転写制御が存在する。本研究では、ヒト肝癌細胞株である HepG2 細胞におけるプロモーター上の Smad2/3 結合部位に着目して検討を行った。まず、HepG2 細胞で抗 Smad2/3 抗体による ChIP-chip データ取得を行った。得られたデータを、所属研究室で発表したヒト正常皮膚角化上皮細胞株である HaCaT 細胞での抗 Smad2/3 抗体による ChIP-chip のデータと比較した。HepG2 細胞での Smad2/3 結合部位のうち HaCaT 細胞でも結合が見られた箇所は 19%であり、逆に HaCaT 細胞で Smad2/3 結合部位のうち HepG2 細胞でも結合が見られた箇所は 25%であり、多くの Smad2/3 結合部位が HepG2 或いは HaCaT に特異的であることが明らかとなった。

何らかの組織特異的な転写因子が HepG2 での Smad2/3 結合のメカニズムの一つとして関与しているのではないかと考えた。そこで HepG2 細胞での Smad2/3 結合部位に関して、結合シグナルのピーク位置から 250 bp の範囲の DNA 配列について CisGenome を用いて解析し、Smad2/3 の結合箇所の近傍に濃縮されている配列を見出した。この配列について JASPAR データベースを用いて検索したところ、既知の HNF4 α 結合モチーフの類似配列であることがわかった。

HNF4 α は hepatocyte nuclear factor family のメンバーであり、哺乳類においてよく保存された核内受容体のうちのひとつである。主に、肝臓、腎臓、小腸、膵臓で発現しており、肝細胞分化、肝臓の器官形成に必須の因子であり、生体でもコレステロールやリポタンパク質の分泌という肝臓特異的な機能に関わっていることが知られている。TGF- β シグナルによる遺伝子発現に対する HNF4 α の影響については、これまでにアポリポタンパク質の一つ APOC3 のプロモーター上で HNF4 α と Smad3/4 が結合して協調的に転写活性を上昇させることが報告されている。TGF- β 刺激後の遺伝子発現変動と HNF4 α の関係を網羅的に理解するため、HepG2 細胞における HNF4 α ノックダウン下で発現マイクロアレイデータを取得した。その結果、TGF- β 1.5 時間刺激時の遺伝子発現変動が HNF4 α ノックダウンで抑制される傾向が認められた。こうして同定した HNF4 α による制御を

受ける標的遺伝子候補のうち、HaCaT 細胞で Smad2/3 の結合が認められない遺伝子として MIXL1 を同定した。

MIXL1 に関して、抗 Smad2/3 抗体による ChIP-qPCR と抗 HNF4 α 抗体による qPCR を行い Smad2/3 および HNF4 α の結合を確認した。MIXL1 のプロモーターをクローニングし、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行い TGF- β 応答性であることを確認した。MIXL1 のプロモーター領域には HNF4 α 結合モチーフ類似配列が 2 箇所あり、それらの配列それぞれに変異を導入すると MIXL1-luc の TGF- β 応答性が減少し、2 箇所に変異を導入すると TGF- β に対する活性が著しく減少した。この転写活性上昇は HNF4 α の DNA に結合しない変異体では認めず、また HNF4 α 発現のノックダウンにより転写活性が減少した。このことから、TGF- β による転写活性上昇に HNF4 α のその認識モチーフへの結合が重要であることが示唆された。

以上のことから、HepG2 細胞における Smad2/3 結合部位近傍に比較的高頻度に HNF4 α が結合しており、TGF- β による遺伝子発現変化に全体的な影響を与えることが示唆される結果を得た。また HNF4 α の新規標的遺伝子として MIXL1 を同定し、HepG2 細胞における TGF- β による MIXL1 の発現誘導機構に関わっていることが明らかとなった。