

審査の結果の要旨

氏名 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、TGF- β シグナルの増強因子として重要であるE3リガーゼのArkadiaというタンパク質について、yeast two-hybrid法で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ものであり、以下の結果を得ている。

1. 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ArkadiaがAP-2複合体と結合している可能性が示唆された。

2. AP2 μ は、ArkadiaのE3リガーゼ活性依存的にユビキチン化された。さらにArkadiaがユビキチン化するAP2 μ 内のリジン残基は、AP2 μ のリッカー領域にある130番目のリジンであることを同定した。

3. ArkadiaによるAP2 μ のユビキチン化は、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。

4. 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 のユビキチン化を介した作用か検討するため、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。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い、下記の結果を得ている。

1. 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、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 細胞或いは HaCaT 細胞に特異的であることが明らかとなった。

2. 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。

3. HNF4 α は hepatocyte nuclear factor family のメンバーであり、肝臓特異的な機能に関わっている核内受容体である。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。

4. MIXL1 に関して、ChIP-qPCR にて 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。

以上のことから、HepG2 細胞における Smad2/3 結合部位近傍に 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 Smad と 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 HNF4 α が関わっていることが明らかとなった。

これまでに TGF- β シグナル増強作用以外の Arkadia の役割については明らかではなく、第 I 章の検討は新たなシグナル伝達制御機構の解明に重要な貢献をなすと考えられる。また第 II 章の検討は細胞・組織によってシグナル応答が異なることの一因を示唆する研究であり、学位の授与に値するものと考えられる。