

審査の結果の要旨

氏名 森川 真大

本研究は、血管内皮細胞における骨形成因子 (bone morphogenetic protein、BMP) シグナルに関して、BMPシグナルの細胞内シグナル伝達因子Smad1、Smad5 (Smad1/5) が結合するゲノム領域を網羅的に解析したものである。血管内皮細胞におけるBMPシグナルの破綻がヒト遺伝疾患である遺伝性出血性毛細血管拡張症 (Osler-Weber-Rendu病、HHT) の病因として知られているが、これまでSmad1/5を介した転写調節のメカニズムやHHTの病態に関係する標的遺伝子は明らかにされていなかった。本研究ではヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) を用いて、クロマチン免疫沈降-シーケンシング法 (ChIP-seq法) により解析を行い、下記の結果を得ている。

1. ChIP-seq法によりSmad1/5が結合するゲノム領域を同定した。BMP-9刺激時にはゲノム上の3、750ヶ所、BMP-6刺激時には880ヶ所に結合していた。Smad1/5結合領域の30%程度は既知遺伝子のイントロンに存在し、これまで解析の対象とされてきた標的遺伝子のプロモータ領域よりも頻度が高かった。また、結合領域の配列は異なる種間で保存されていることを示した。
2. 遺伝子発現マイクロアレイとあわせて解析することで、Smad1/5の結合が転写活性亢進と関係していることが示唆された。公開済みのヒストン修飾マーカーのデータを利用することで、Smad1/5結合領域の85%がH3K4me1、H3K27acで特徴付けられるエンハンサー領域と一致することを示した。以上より、Smad1/5は進化の段階で保存されたエンハンサーに結合する傾向があることを示した。
3. Smad1/5の結合モチーフを解析し、複数の候補の中から、C(T/C)G(G/C)(A/C)GCC配列が妥当であることを示した。このモチーフは、GC-rich配列として既に報告されていた「GCCG」や「GGCGCC」といった配列を含んでいたことから、GC-SBE (Smad binding element) と名付けた。
4. GC-SBEの中で出現頻度が高く、これまでGC-rich配列として報告されていない「GGAGCC」配列に関し、「GGCGCC」との比較を中心にて解析を行った。BMP 2型受容体 (*BMPR2*) 遺伝子の第3イントロンに存在するSmad1/5結合領域をクローニングしてluciferase assayを行い、このGGAGCC配列を含むSmad1/5結合領域がエンハンサーとして機能することを示した。また、1塩基置換による解析で、GGCGCC \geq GGAGCC \geq GGTGCC>GGGGCCの順にエンハンサーとしての活性が弱くなることも示した。
5. GGAGCC配列を含む25塩基対のプローブとSmad1のDNA結合ドメインであるSmad1 MH1の精製蛋白を用いてgel shift assayを行い、Smad1が直接GGAGCC配列と結合していることを示した。また、GGCGCC>GGAGCC \geq GGTGCC>GGGGCCの順に結合能が弱くなることも示した。

6. BMPへの応答には、Smad1/5が結合するGC-SBEは必要だが十分ではなく、Smad4が結合すると報告されているCAGA配列も必要であることを示した。
7. 今回同定した標的候補遺伝子の中から、Notchリガンドの一つであるJagged1に着目し解析を行った。BMP-9がJagged1を誘導することを、mRNAレベル、蛋白レベルで確認した。更に、BMP-9により内皮細胞で誘導されたJagged1が機能を有し、隣接する細胞のNotchシグナルを活性化することが示された。

以上のように、本論文は血管内皮細胞における Smad1/5 の結合領域を詳細に解析することで、Smad1/5 による標的遺伝子の転写調節メカニズムの一端を明らかにした。さらに、血管内皮細胞において BMP-9/ALK-1-Smad1/5-Jagged1 経路が HHT の血管病変の発生に関与することが示唆され、今後新たな治療法の開発に重要な貢献をなすものである。よって、本論文は学位授与に値するものと考えられる。