

学位論文題名

TGF- β および Wnt ファミリーシグナル伝達系に
おける Smad の役割

学位論文内容の要旨

TGF- β ファミリーとWntファミリーはともに種々の生物の形態形成や器官形成、細胞の増殖・分化などにおいて重要な役割を果たしていることが知られている。これらのタンパク質は細胞外に分泌された後、細胞膜上の特異的な受容体に結合し、様々な細胞内伝達因子を介して核内にシグナルが伝えられる。TGF- β シグナル因子であるSmadファミリーは受容体によりリン酸化されたのち核移行し、種々の転写因子と複合体を形成し、標的遺伝子の転写を活性化する。一方、Wntシグナルが活性化されると β -cateninが細胞質内に蓄積し核へ移行する。核移行した β -cateninは転写因子LEF1/TCFと複合体を形成し、標的遺伝子の転写を活性化する。Wntシグナルはアフリカツメガエル胚においてオーガナイザー形成に重要な役割を果たしている。本研究ではオーガナイザー形成におけるWntシグナル伝達系の分子機構を検討した（第1章）。また、BMPシグナル伝達因子Smad8の選択的スプライシング産物を新たに単離し、このBMPシグナル伝達系における役割を検討した（第2章）。

第1章 Wntシグナル伝達系におけるSmad4の関与

Wntシグナルはアフリカツメガエル胚において、Homeobox遺伝子Xtwn (Xtwn) の発現を直接誘導することによりオーガナイザー形成に関与することが知られている。これまでの研究から、Xtwn遺伝子のプロモーターにはLEF1/TCF結合配列の存在が確認されているが、詳細な解析はされておらずその発現機構は明らかではない。そこでXtwnプロモーターの様々な欠失変異体を用いて、それらのオーガナイザー領域における活性を調べた。その結果、オーガナイザー領域におけるXtwnのプロモーター活性には、LEF1/TCF結合配列を含む領域以外に、さらにその5'上流側領域の関与が明らかになった。また、オーガナイザー領域におけるXtwnのプロモーター活性は不活性型Smad4を発現させることにより顕著に阻害された。一方、SmadファミリーのXtwnプロモーターへの結合を検討した結果、Smad4の特異的結合が確認された。その結合部位は欠失変異体の解析により明らかになったプロモーター活性に必要な領域に一致することから、Smad4はXtwnプロモーターに直接結合することによりオーガナイザー領域でのXtwn遺伝子の発現誘導に関与していると考えられた。

Xtwnプロモーター内にSmad4とLEF1/TCFの結合配列が隣り合わせて存在することから、Smad4はLEF1/TCFやその会合分子である β -cateninと複合体を形成していることが考えられた。そこで培養細胞系を用いて検討したところ、Smad4とLEF1- β -cateninの結合に加え、Wntシグナル依存的な内在性のSmad4と β -cateninの複合体形成が確認された。また、アフリカツメガエル胚予定外胚葉において、Smad4はWntシグナル依存的に核移行することを明らかにした。これらの結果から、Smad4はWntシグナル依存的にXtwn遺伝子発現に関与していることが考えられた。

Smad4のXtwn遺伝子発現への関与を詳細に検討するため、すべてのLEF1/TCF結合配列に変異を導入したXtwnプロモーターを用いて、そのオーガナイザー領域における活性を解析した。その結果、その変異プロモーターはオーガナイザー領域特異的に活性化され、さらに、その活性化は内在性のWntシグナルによるものであることを明らかにした。したがって、Smad4のXtwn遺伝子発現への関与はWntシグナル依存的なものであることが確認された。次に、Smad4のLEF1依存的な転写活性に与える影響を検討するため、LEF1/TCF結合配列のみをもつプロモーターを用いて培養細胞系においてレポーター解析を行った。その結果、Smad4と β -cateninは相乗的にLEF1による転写を活性化することが明らかになった。さらに、Xtwnプロモーターの活性もLEF1存在下においてSmad4と β -cateninによって相乗的に活性化された。以上の結果から、Smad4はWntシグナルによって核移行し、LEF1/TCFや β -cateninと複合体を形成することによりWnt標的遺伝子の転写を協調的に活性化していることが示された。したがって、これまでTGF- β シグナルの中心的な伝達因子として位置づけられていたSmad4が、Wntシグナル伝達系においても重要な役割を担っていることが示された。

第2章 Smad8BのBMPシグナル伝達系における役割

アフリカツメガエルSmad1 cDNAを用いてヒト胎盤cDNAライブラリーをスクリーニングした結果、BMPシグナル因子Smad8の選択的スプライシング産物を新たに単離しSmad8Bとした。Smad8Bは、Smad8の受容体によるリン酸化部位を含むC末端の47アミノ酸を欠損したタンパク質として発現されると予想された。受容体によるSmadのリン酸化はその活性に不可欠であることからSmad8BはSmad8の不活性型であると考えられた。Smad8とSmad8Bの転写産物は共に様々な組織でみられたが、その発現量の比は組織によって異なっていた。このことから、Smad8とSmad8Bの発現量のバランスが、それらの機能調節に関与している可能性が示唆された。

Smad8はBMP受容体であるALK2によりリン酸化された後、Smad4と結合し核移行することが知られている。そこで、Smad8Bと他のSmadファミリーとの相互作用を培養細胞系を用いて検討した結果、Smad8BはSmad8とSmad4に特異的に結合することが明らかになった。次に、Smad8とSmad8Bをそれぞれ培養細胞に発現させ、免疫蛍光法により細胞内局在を解析した。その結果、Smad8はBMP受容体であるALK2の恒常的活性型 (CA-ALK2) 依存的に細胞質から核へ移行したが、Smad8BはCA-ALK2の存在に関わらず細胞質に局在した。これらの結果より、Smad8Bは細胞質でSmad8とSmad4に結合することにより機能していると考えられた。

培養細胞系を用いたレポーター解析により、Smad8BのBMPシグナル伝達系に与える影響を検討した。Gal4-Smad8はCA-ALK2依存的にレポーター遺伝子の転写を活性化させたが、その活性はSmad8Bを共発現させることにより顕著に抑制された。一方、Smad8BはGal4-Smad1による転写活性には全く影響を与えなかったことから、Smad8Bは特異的にSmad8の機能を抑制することが示された。次に、BMPシグナルによって発現が誘導されることが知られているXvent2遺伝子のプロモーターを用いて、そのプロモーター活性に与えるSmad8Bの影響を調べた。その結果、Smad8BはCA-ALK2によるXvent2プロモーターの活性化を抑制することが示された。以上の結果からSmad8Bは細胞質でSmad8やSmad4と複合体を形成し、Smad8の機能を特異的に抑制することによりBMP標的細胞のシグナル応答性を調節していることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 寛 芳

副 査 教 授 上 野 直 人

(岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所)

副 査 助 教 授 松 本 健 一

副 査 助 教 授 松 岡 一 郎

学 位 論 文 題 名

TGF- β および Wnt ファミリーシグナル伝達系に おける Smad の役割

TGF- β ファミリーとWntファミリーは共に初期発生過程における最も重要な現象の一つである体軸形成に関与していることが知られている。体軸形成の制御機構は種を超えて高度に保存されており、実験動物として主にアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) などの両生類を用いた解析がなされてきた。その解析により、TGF- β ファミリーに属する骨形成因子 (BMP) は中胚葉の腹側因子として、また外胚葉における神経分化の抑制因子として作用していることが明らかにされている。また、両生類の体軸形成にはオーガナイザーと呼ばれる機能領域が不可欠であり、このオーガナイザーの形成機構にはWntシグナル伝達系が重要な役割を果たしていることがわかってきた。

申請者はオーガナイザー形成におけるWntシグナル伝達系の分子機構を検討し、その結果、TGF- β シグナル伝達因子Smad4がWntシグナルによる標的遺伝子の発現誘導に重要な役割を担っていることを示した。また、BMPシグナル伝達因子Smad8の新規選択的スプライシング産物Smad8Bを同定し、それがBMPシグナル伝達系における新たな抑制機構を担っていることを示した。以下に本研究により得られた主な成果を示す。

1) Wntシグナルはアフリカツメガエル胚において、homeobox遺伝子*xtwn* (*Xtwn*) の発現を直接誘導することによりオーガナイザー形成に関与することが知られている。申請者は、オーガナイザー領域における*Xtwn*の発現誘導には、Smad4が*Xtwn*プロモーターに直接結合することによって関与していることを明らかにした。

2) Wntシグナルが活性化されると β -cateninが核移行し、転写因子LEF1/TCFと複合体を形成することによって標的遺伝子の転写を活性化することが知られている。申請者は、Smad4がLEF1/TCFや β -cateninと複合体を形成することを示した。また、Smad4はWntシグナル依

存的に核移行することを示した。

3) Smad4のXtwn遺伝子発現への関与はWntシグナル依存的であることを示した。また、Smad4と β -cateninはLEF1による転写を相乗的に活性化することを明らかにした。これらの結果からSmad4はWntシグナルによって核移行し、LEF1や β -cateninと複合体を形成することによりWnt標的遺伝子の転写を協調的に活性化すると結論づけた。

4) Smad8の選択的スプライシング産物Smad8Bを同定した。Smad8BはSmadファミリーで保存されているC末端部分を欠損したタンパク質として、様々な組織に発現していることを示した。また、Smad8とSmad8Bの発現量の比は組織によって異なっていることを示した。

5) Smad8BはSmad8およびSmad4と特異的に複合体を形成すること、また、BMP刺激に関わらず細胞質に局在することを示した。

6) Smad8Bは、BMPシグナルによるSmad8の活性化と標的遺伝子の発現誘導を特異的に抑制することを示した。以上の結果からSmad8Bは細胞質でSmad8やSmad4と複合体を形成し、Smad8の機能を特異的に抑制することによりBMP標的細胞のシグナル応答性を調節していると結論づけた。

本研究は、これまでTGF- β シグナルの中心的な伝達因子として位置づけられていたSmad4が、Wntシグナル伝達系においても重要な役割を担っていることを明らかにするとともに、Smad8の選択的スプライシング産物がBMPシグナル伝達系の抑制機構を担っていることを示したものである。これらの研究結果は、本研究分野に大きく貢献するものであり、学位論文として十分ふさわしい内容であると判断した。

学位論文として提出された研究結果について口頭発表させた後、研究の内容および周辺の知識について試問を行った。その結果、申請者の応答はいずれも的確であったことから、関連領域に十分な知識を有しているものと思われる。また、英語の能力に関しては、国際誌に発表した論文から博士の学位に足る十分な能力を有するものと判定した。