

PIASy による TGF- β シグナル伝達系の制御機構の解析

学位論文内容の要旨

【はじめに】

細胞増殖因子の一つである TGF- β は、細胞の分化・増殖の抑制、アポトーシスの誘導、細胞外マトリックスの産生、炎症の抑制など、きわめて多彩な生理活性を示す。この TGF- β のシグナルは、細胞表面の 2 種類のセリン/スレオニンキナーゼ型受容体に TGF- β が結合することにより細胞に伝達される。恒常的に活性化している II 型受容体は I 型受容体をリン酸化により活性化させ、活性化 I 型受容体は細胞内シグナル伝達分子である Smad をリン酸化して活性化させる。リン酸化 Smad は複合体を形成して核内に移行し、標的遺伝子の転写を誘導する。

TGF- β は、このシグナル伝達系を介して細胞増殖抑制作用や免疫抑制作用を示す。それゆえ、このシグナル伝達系の異常は発癌や免疫疾患などの発症と深く関連している。よって、TGF- β シグナル伝達系の制御機構を明らかにすることは、これらの疾患に対する新たな治療薬の開発に寄与すると考えられる。そこで、本研究では TGF- β シグナル伝達系を制御する分子の同定とその機能解析を行い、新知見を得ることを目的とした。

【結果と考察】

Smad7 の MH2 ドメインを Bait に用いて、yeast two-hybrid 法によるスクリーニングを行った。その結果、新規 Smad 結合分子として PIAS ファミリーの一つである PIASy を同定した。PIAS ファミリーはその機能としてサイトカインにより活性化される転写因子 STAT をはじめとする種々の転写因子と核内で結合して、そのシグナル伝達系を制御していることが報告されている。よって、PIASy は TGF- β シグナル伝達系においても制御的な役割を果たしている可能性が考えられ、TGF- β シグナル伝達系に対する PIASy の機能解析を行った。

まず、PIASy と Smad ファミリーとの結合を検討した。その結果、PIASy は Smad2, 3 (特異型)、Smad4 (共有型)、Smad6, 7 (抑制型) のいずれとも結合することが明らかとなった。さらに、PIASy は Smad3 の MH2 ドメインを介して結合することも明らかとなった。次に PIASy と Smad ファミリーとの結合が TGF- β シグナル伝達系に対し、どのような作用を示すかを検討するためレポーターアッセイを行った。その結果、活性型 I 型受容体または TGF- β 刺激による転写活性の増強は PIASy の発現によって抑制された。さらに、ヒト肝癌細胞株 Hep3B の PIASy 遺伝子を siRNA でノックダウンし、TGF- β 刺激で誘導される PAI-1 mRNA を Real-time PCR 法によって定量した。その結果、ノックダウンにより PAI-1 mRNA level の顕著な増大が認められた。以上の結果より、PIASy は TGF- β シグナル伝達系を抑制的に制御する分子であることが示された。

さて、PIASy による TGF- β シグナル伝達系の制御機構の解明にあたり、PIAS ファミリーの

SUMO-E3 ligase としての機能に着目した。つまり、「PIASy は Smad3 を SUMO1 化修飾して何らかの機能変換をさせて TGF- β シグナル伝達系を制御する」という仮説を立て検証した。まず、実際に Smad3 が PIASy により SUMO1 化修飾されることを明らかにした。次に、PIASy の SUMO-E3 ligase 活性が TGF- β シグナル伝達系の抑制に必要なかを検討した。RING-finger ドメインに変異を導入して機能を喪失した PIASyCA を用いた結果、TGF- β シグナル伝達系に対して抑制作用を示さなかった。よって、PIASy による TGF- β シグナル伝達の抑制には Smad3 の SUMO1 化修飾が関与する可能性が示された。

次に Smad3 の SUMO1 化修飾の生理的意義を検討するため、Smad3 の SUMO1 化修飾部位を探索した。Smad3 は N 末端から順に MH1 ドメイン、リンカー領域、MH2 ドメインの 3 つから構成されている。まず、転写活性化や他の転写因子との結合に関わる MH2 ドメインについて検討したが SUMO1 化部位は存在しなかった。また、リンカー領域にはリジン残基が存在しないことから、Smad3 の SUMO1 化部位は核移行や DNA 結合に関わる MH1 ドメインに存在する可能性が示された。

さて、PIASy は核に局在することから Smad3 の SUMO1 化修飾は核内で起こると考えられる。そして、SUMO1 化部位が MH1 ドメインならば、SUMO1 化修飾により Smad3 の DNA 結合能に影響を及ぼす可能性が考えられる。これを検討するため、Smad3 結合配列を含む二本鎖オリゴヌクレオチドをセファロース担体に連結させたオリゴヌクレオチド固定化セファロースビーズ（以下、オリゴビーズと記す）を用いて pull-down assay を行った。その結果、SUMO1 化 Smad3 はオリゴビーズと結合せず、さらに非 SUMO1 化 Smad3 とオリゴビーズとの結合も著しく減少した。これは MH1 ドメインが SUMO1 化修飾によってマスクされる、あるいは構造が変化することにより DNA 結合を阻害される可能性が考えられる。そして、非 SUMO1 化 Smad3 の DNA 結合も阻害されていることについては、SUMO1 化 Smad3 が非 SUMO1 化 Smad3 と複合体を形成してドミナントネガティブとして機能している可能性が考えられる。

活性化した Smad3 が転写因子としての役割を果たすためには一定の間、核内に留まる必要がある。そして、Smad3 の核内での局在保持の要因として DNA 結合能があげられている。Smad3 の SUMO1 化修飾によって DNA 結合能が低下するならば、SUMO1 化 Smad3 は核外排出されやすくなる可能性がある。そこで、Hep3B 細胞に ECFP-Smad3 を単独発現、または PIASy、EYFP-SUMO1 と共発現させて共焦点顕微鏡で細胞内局在を観察した。その結果、ECFP-Smad3 は単独発現下では TGF- β 刺激 30 分後は核内に集積していたが、三者の共発現下では主に細胞質に局在していた。しかし、三者の共発現下でも刺激 10 分後は核内に ECFP-Smad3 の集積が見られたことから、核移行の異常ではなく核外排出が亢進していると考えられる。

これを裏付けるため、三者の共発現下で TGF- β 刺激 30 分後に細胞質に局在している Smad3 が SUMO1 化修飾を受けたものかどうかを EYFP-ECFP 間の FRET 効率の測定により検討を試みた。アクセプターブリーチング法で解析した結果、刺激 10 分後には核内に、30 分後には細胞質に SUMO1 化 Smad3 が存在することが示された。よって、SUMO1 化 Smad3 は核内から細胞質に排出されている可能性が示唆された。

【まとめ】

PIASy は Smad3 を含む Smad ファミリーと結合し、TGF- β シグナル依存的な転写活性を抑制した。これは、PIASy が核内に移行してきた Smad3 と結合して、その MH1 ドメインを SUMO1 化修飾す

ることにより Smad3 の DNA 結合能を低下させ、核内での局在保持を阻害した結果、Smad3 の転写因子としての機能が十分に果たされないことによると考えられる。このように本研究では、PIASy を介した Smad3 の SUMO1 化修飾による TGF- β シグナル伝達系の制御機構の存在を示した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 田 正
副 査 教 授 有 賀 寛 芳
副 査 教 授 横 沢 英 良
副 査 助 教 授 川 原 裕 之

学 位 論 文 題 名

PIASy による TGF- β シグナル伝達系の制御機構の解析

平成18年12月11日に当該申請者に対する学位論文の発表，同14日口頭試問を行い，また平成19年2月9日主論文に関する審査員による書面審査を実施した。

発表内容は新たな TGF- β シグナル伝達系制御に関与する分子の同定である。細胞増殖因子の一つである TGF- β は，細胞の分化・増殖の抑制，アポトーシスの誘導，細胞外マトリックスの産生，炎症の抑制など，きわめて多彩な生理活性を示すため，TGF- β シグナル伝達系の異常は発癌や免疫疾患などの発症と深く関連している。そのため，TGF- β シグナル伝達系の制御機構を明らかにすることはきわめて重要であり，その研究成果は TGF- β を介する病態への新たな治療薬の開発に寄与すると期待される。

これまでに，TGF- β シグナル伝達系を制御する分子の同定を目的とした yeast two-hybrid 法によるスクリーニングを行い，TGF- β シグナルの細胞内伝達因子である Smad の新規結合分子として PIAS ファミリーの一つである PIASy を同定した。PIAS ファミリーはその機能としてサイトカインにより活性化される転写因子 STAT をはじめとする種々の転写因子と核内で結合して，そのシグナル伝達系を制御していることが報告されている。よって，PIASy は TGF- β シグナル伝達系においても制御的な役割を果たしている可能性が考えられ，TGF- β シグナル伝達系における PIASy の機能解析を行った。

その結果，PIASy は Smad ファミリーと結合し，TGF- β シグナル伝達系を負に制御する分子であることを明らかにした。また，その分子機構の追究にあたり PIASy の SUMO-E3 ligase 活性について着目した。まず，Smad3 が PIASy によって SUMO1 化修飾されることを明らかにし，さらに PIASy の SUMO-E3 ligase 活性に必要な RING ドメインの機能を欠失させると，PIASy による TGF- β シグナル伝達系の抑制作用が消失することを示した。つまり，Smad3 の SUMO1 化修飾と PIASy の TGF- β シグナル伝達系の抑制

作用が関連することを明らかにした。

そして次に、Smad3 の SUMO1 化部位の探索を行った。その結果、核移行や DNA 結合に関わる MH1 ドメインに存在することが判明した。ここで、PIASy は核局在性分子であることから Smad3 の SUMO1 化修飾は核内で起こると考えられる。SUMO1 化部位が MH1 ドメインならば、SUMO1 化修飾により Smad3 の DNA 結合能に影響を及ぼす可能性が考えられる。これについて Smad3 結合配列を含む二本鎖オリゴヌクレオチドをセファロース担体に連結させたビーズを用いた pull-down assay で検討した結果、SUMO1 化 Smad3 は二本鎖オリゴと結合しなかった。これは SUMO1 化修飾によって MH1 ドメインがマスクされる、あるいは構造が変化することにより DNA 結合を阻害される可能性が考えられる。

さて、活性化 Smad3 が転写因子として機能するためには一定の間、核内に留まる必要がある。SUMO1 化修飾により DNA 結合能が低下するならば、SUMO1 化 Smad3 は核から細胞質へ排出されやすくなる可能性がある。そこで、培養細胞に ECFP-Smad3 を単独発現、または PIASy, EYFP-SUMO1 と共発現させ、その細胞内局在を観察した。その結果、共発現下の Smad3 は単独発現時に比べて、核移行してから細胞質へ排出されるまでの時間が短くなっていた。さらに、この細胞質の Smad3 が SUMO1 化修飾を受けたものか否かを EYFP-ECFP 間の FRET 効率の測定により検討した結果、SUMO1 化 Smad3 であった。よって、SUMO1 化 Smad3 は核から細胞質へ排出されることが示唆された。以上の結果から、PIASy による Smad3 の SUMO1 化修飾を介した新たな TGF- β シグナル伝達系の制御機構の存在を示した。

論文発表に続いて発表内容を中心として関連ある専門分野を含めた口頭試問を実施した。その内容は、本研究の背景、目的および関連分野等における知識、また TGF- β インヒビターの有用性や薬剤開発への応用とその根拠など多岐に亘った。これらに対する回答は、適切かつ高度なものであり、博士の学位を与えるに相応しいと判断した。

提出された学位論文の内容はよくまとまっており、その研究成果は独創的かつ有用性に富み、本専門研究分野の中で高く評価されるに値する内容であると判断した。

以上の結果、本論文審査委員会は、井本世祐氏を博士（薬学）の学位を授与するに相応しい十分な学力と研究能力を有するものと認めた。