

学位論文題名

Regulation of transforming growth factor- β and
bone morphogenetic protein signaling by
transcriptional co-activator GCN5

(転写共役因子 GCN5 による TGF- β ・BMP シグナル伝達の制御機構)

学位論文内容の要旨

背景

Transforming growth factor- β (TGF- β) スーパーファミリーは、細胞増殖、分化、アポトーシスを初めとする多種多様な生理活性を有するタンパク群で、TGF- β 、アクチビン、BMP (骨形成誘導因子) など30種以上のファミリー分子が報告されている。

TGF- β スーパーファミリーのシグナル伝達は、I型とII型のセリン/スレオニンキナーゼ型受容体と細胞内伝達物質である Smad タンパクにより行われる。Smad はその構造と機能の違いより、特異型 Smad, 共有型 Smad, 抑制型 Smad に分類される。特異型 Smad は主に TGF- β やアクチビンにより活性化される Smad2/3 と BMP により活性化される Smad1/5/8 に分けられる。リガンドの結合により、恒常活性型のII型受容体は、I型受容体をリン酸化し、リン酸化されたI型受容体は特異型 Smad をリン酸化する。リン酸化された特異型 Smad は共有型 Smad と活性型複合体を形成し、核内へ移行し、DNA上の Smad 結合配列である CAGA 領域に結合し、標的遺伝子の転写を調節する。その際、Smad は種々の転写因子、転写共役因子と結合することが報告されている。

TGF- β スーパーファミリーは生体内では、免疫系、創傷治癒や発癌、癌の進展等において重要な役割を果たしており、そのシグナル伝達を明らかにすることは、その破綻によりもたらされる疾患の分子メカニズムを解明する上で重要である。

方法と結果

1. GCN5 は活性型 Smad 複合体と結合する

TGF- β 細胞内シグナル伝達に関わる分子を明らかにする目的で、活性型 Smad 複合体に結合するタンパクを精製、同定した。

乳癌細胞株 MCF-7 の核抽出液より、ビオチン化オリゴ (CAGA) とストレプトアビジンビーズを用い、DNA-タンパク複合体を精製 (DNAP 法; DNA affinity purification 法) 後、質量分析法で解析した。その結果、ビオチン化 CAGA に結合するタンパクとしてヒストンアセチル化酵素活性 (HAT 活性) を有する転写共役因子の GCN5 が同定された。COS7 細胞を用いた DNAP 法では、GCN5 は直接 DNA には結合せず、活性型 Smad を介して間接的に DNA に結合することが示された。また、クロマチン免疫沈降法により、GCN5 は TGF- β 依存性にゲノム上の CAGA 領域に Smad とともに動員されることが示された。

2. GCN5 は TGF- β 及び BMP 依存性に特異型 Smad に結合する

GCN5 と各種 Smad の結合について免疫沈降法を用いて検討した。その結果、GCN5 は TGF- β 、BMP 両方に対する特異型 Smad である Smad2/3 と Smad1/5 の MH2 ドメインとリガンド依存性に結合した。

GCN5 のファミリータンパクである PCAF は、GCN5 と高い相同性を有する HAT 型転写共役因子である。PCAF は Smad2/3 とリガンド依存性に結合し、その転写活性を増強することが既に報告されている。そこで、PCAF とその他の Smad との結合を調べることにより、GCN5 と PCAF の機能的差異を検討した。その結果、PCAF は GCN5 とは異なり BMP に対する特異型 Smad である Smad1/5 と結合できなかった。

3. GCN5 は TGF- β シグナルと BMP シグナルをともに増強する

TGF- β シグナルに対する GCN5 の影響をルシフェラーゼアッセイを用い検討した。GCN5 は TGF- β による転写活性化能を複数の cell line で容量依存的に増強した。また、転写活性化ドメインを持たない GCN5 の N 末端側欠失変異体はドミナントネガティブ効果を示した。BMP シグナルに対する検討では、GCN5 は TGF- β 同様に BMP の転写活性化能を増強した。一方、PCAF はその結合様式より推測された通り、BMP シグナルに対して影響を及ぼさなかった。

4. TGF- β シグナル伝達において内因性 GCN5 は必要である

TGF- β シグナル伝達における GCN5 の重要性を検討するために、GCN5 の siRNA オリゴを作製し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、内因性 GCN5 の発現を抑制することにより、TGF- β による転写活性化能の抑制が認められた。

結論

DNAP 法と質量分析法により、活性型 Smad 複合体に結合する分子として同定された転写共役因子 GCN5 は、特異型 Smad とリガンド依存性に結合し、TGF- β シグナル及び BMP シグナルを正に制御した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 一 馬

副 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 小 林 邦 彦

学 位 論 文 題 名

Regulation of transforming growth factor- β and bone morphogenetic protein signaling by transcriptional co-activator GCN5

(転写共役因子 GCN5 による TGF- β ・BMP シグナル伝達の制御機構)

Transforming growth factor- β (TGF- β) スーパーファミリーは、生体内において、免疫系、創傷治癒や発癌、癌の伸展等において重要な役割を果たしており、そのシグナル伝達を明らかにすることは、その破綻によりもたらされる疾患の分子メカニズムを解明する上で重要である。TGF- β スーパーファミリーの細胞内シグナル伝達を担う Smad タンパクは、リガンド依存性に活性型複合体を形成し核内へ移行した後、標的遺伝子のプロモーター上に直接結合する。その際、種々の転写因子、転写共役因子と結合し、転写を調節する。本研究では、Smad 結合配列の DNA オリゴヌクレオチドを用い、活性型 Smad を含む転写複合体を精製し (DNAP 法; DNA affinity purification 法)、その構成分子を質量分析法で同定した。その結果、ヒストンアセチル化酵素活性 (HAT 活性) を有する転写共役因子の GCN5 が同定された。さらに、クロマチン免疫沈降法により、GCN5 が TGF- β 依存的に標的遺伝子のプロモーター上に動員されること、COS7 細胞を用いた DNAP 法により、GCN5 が直接 DNA には結合せず、活性型 Smad を介して DNA に結合することが示された。免疫沈降法では、GCN5 は TGF- β 及び BMP に対する特異型 Smad とリガンド依存性に結合した。GCN5 の TGF- β スーパーファミリーシグナル伝達における機能については、ルシフェラーゼアッセイと siRNA 法にて検討した。その結果、GCN5 が TGF- β シグナルを増強すること、内因性 GCN5 の発現抑制により TGF- β による転写活性化能が減弱することが示された。GCN5 と高い相同性を有する PCAF は TGF- β 依存性に特異型 Smad と結合し、その転写活性を増強することが既に報告されているが、本研究での免疫沈降法による検討では、PCAF は BMP の特異型 Smad とは結合せず、ルシフェラーゼアッセイでは BMP シグナルに対し影響を及ぼさなかった。一方で GCN5 は BMP の転写活性化能を増強した。以上より GCN5 は活性化された特異型 Smad と結合し、TGF- β スーパーファミリーの転写活性を正に制御し、その作用は BMP シグナル伝達においてファミリー分子の PCAF と異なることが明らかになった。

口頭発表後、副査小林教授より、GCN5 の転写制御機構について、ヒストンのアセチル化とメチル化の関係について、GCN5 と PCAF の BMP シグナルにおける機能的差異のメ

カニズムについて質問があった。これらに対し申請者は、GCN5 の転写活性可能が HAT 活性に起因すること、メチル化との関連については検討中であること、BMP シグナルにおける GCN5 と PCAF の機能的差異が特異型 Smad との親和性に起因する可能性があることを回答した。次いで、副査浅香教授より、本実験で示された現象が、他の細胞株でも見られるかどうか、GCN5 による TGF- β シグナル制御の生体内、特に癌化と癌の進展における作用について、siRNA 法による GCN5 の発現抑制の際の Smad との結合の検討についての質問があった。これに対し申請者は、各実験系においてそれぞれ複数の細胞株で検討したが、傾向は全て同じであったこと、GCN5 が生体内での TGF- β の様々な生理活性の多くにおいて重要な役割を果たしている可能性があること、また、内因性の GCN5 と Smad の結合は、その発現量の低さのため検出できなかったことを回答した。最後に主査田中教授より、他の HAT 型転写共役因子の TGF- β シグナルへの関与があるかどうか、またその場合 GCN5 との機能的な差異について、GCN5 と Smad の結合ドメインについて、また、GCN5 の発現を siRNA 法で抑制した場合、PCAF でシグナル伝達の回復が見られるかについて質問があった。申請者はこれに対し、PCAF と p300 が既に報告されていること、その差異については現在検討中であるが、PCAF とは組織特異性が異なる可能性が、p300 とは協調的に作用する可能性があることと回答した。GCN5 の Smad 結合部位については、複数存在し、それらが協調的に Smad との親和性を増強している可能性があることと回答した。また、GCN5 の発現抑制による転写活性の抑制を PCAF の強発現により回復可能かについては現在検討中であると回答した。

本研究は、多種多様な生理活性を有する TGF- β シグナル伝達に GCN5 の関与が重要であることを複数の実験系で証明したことが高く評価され、今後さらなる研究により GCN5 と疾患との関連性が明らかになることが期待された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。