

氏 名 (本籍)	こい 鯉	ぬま 沼	だい 代	そう 造
学位の種類	博 士 (医 学)			
学位記番号	医 博 第 2 0 7 8 号			
学位授与年月日	平 成 16 年 3 月 25 日			
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻			
学位論文題目	Arkadia は Smad7 の分解により TGF- $\beta$ スーパー ファミリーシグナルを増強する			

(主 査)

論文審査委員	教授 貫 和 敏 博	教授 帯 刀 益 夫
	教授 竹 島 浩	

## 論文内容要旨

Arkadia は元来、マウスの変異導入によるスクリーニングで胎生致死となる標的遺伝子の一つとして単離されて、オーガナイザー node の誘導に必須の細胞内タンパク質であること、またヘテロ接合体マウスの実験、アフリカツメガエルの実験で Nodal シグナルを増強することが報告された。Arkadia の Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) シグナル増強作用の分子メカニズムを明らかにすることを目的として、解析を行った。

まずマウス Arkadia を nested PCR 法によりクローニングした。続いてルシフェラーゼアッセイで TGF- $\beta$  及び bone morphogenetic protein (BMP) の転写活性を、その C 末端の RING finger ドメイン依存的に強化することを示した。Arkadia は物理的に抑制型 Smad である Smad7 と結合し、そのポリユビキチン化と分解を引き起こした。Smad7 をユビキチン化する HECT 型 E3 ligase として Smurf1 が知られているが、Smurf1 が Smad7 を介して TGF- $\beta$  受容体コンプレックスと結合し、それらを分解するのに対して、Arkadia は TGF- $\beta$  受容体と結合することが出来ず分解も促進しなかった。

内在性 Arkadia 遺伝子の発現を RNA 干渉法で抑えると TGF- $\beta$  及び BMP による転写活性の抑制と Smad7 タンパク質の蓄積を生じた。

Arkadia がマウス胚の中で広く発現していることが知られているが、定量的リアルタイム PCR 法にて Arkadia が成体の組織でも広く発現して、その発現が Smad7 とは逆に TGF- $\beta$  によって一過性に抑制されることを示した。

以上のことから Arkadia は生理的条件下に TGF- $\beta$  スーパーファミリーシグナルを増幅する蛋白として重要な役割を果たしており、その作用機序のひとつとして、Smad7 のポリユビキチン化と分解が考えられた。

## 審査結果の要旨

上皮細胞の組織形成や炎症反応に大きな役割を持つ TGF- $\beta$ 1 をはじめとする TGF- $\beta$  スーパーファミリーのシグナル伝達を巡っては Smad ファミリーによるその増強・抑制の研究が進んでいる。最近になりこれら Smad ファミリーそのものの発現制御には新たに Smurf1/2 や ROC1-SCF などによるポリユビキチン化とプロテアソームによる分解が関与することが明らかになった。申請者は、元来マウスの変異導入スクリーニングで胎生致死となる標的遺伝子の一つとして同定され、オーガナイザー node の誘導に必須の細胞内タンパク質であり、Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) スーパーファミリーのひとつである Nodal シグナルを増強する Arkadia に注目し、多様な方法をもって以下の事実を明らかにした。

- ① マウス Arkadia を nested PCR 法によりクローニングし、TGF- $\beta$  及び bone morphogenetic protein (BMP) シグナルへの影響を 9xCAGA 及び 3GC2 ルシフェラーゼレポーターアッセイで検討し、Arkadia が上記リガンドによる転写活性を C 末端の RING finger ドメイン依存的に増強することを示した。
- ② Arkadia が抑制型 Smad である Smad7 と結合し、E3 ligase としてポリユビキチン化とプロテアソーム依存性の分解を引き起こすことを示した。
- ③ HECT 型 E3 ligase である Smurf1 との比較で、Smurf1 が Smad7 を介して I 型 TGF- $\beta$  受容体と結合しこれを分解するのに対し、Arkadia は I 型 TGF- $\beta$  受容体と結合せずその分解も促進しないということを明らかにした。
- ④ 内因性 Arkadia 蛋白質の機能を RNA 干渉法による Arkadia 発現抑制によって評価した実験で、TGF- $\beta$  及び BMP による転写活性の低下と Smad7 蛋白質の蓄積を認め、Arkadia が生理的発現量においてもシグナル増強、Smad7 の分解に働いていることが示された。
- ⑤ 広くヒト組織で発現が認められた Arkadia 遺伝子の発現制御について定量的リアルタイム PCR 法により、その発現が Smad7 とは反対に TGF- $\beta$  によって一過性に抑制されることを示した。(一過性抑制は培養細胞での検討)

以上の結果から本論文は、発生期の重要な役割が示唆される Arkadia 遺伝子が、広く TGF- $\beta$  スーパーファミリーの多彩な生理作用の制御に携わっている可能性を明らかにし、ことに E3 ligase として Smad7 のポリユビキチン化とプロテアソーム依存性の分解に関与する新作用機序を明らかにしており、優れて学位(医学博士)論文に値するものであると判断する。