

学位授与番号	医博甲第1456号
学位授与年月日	平成13年3月22日
氏名	石田 濟
学位論文題目	Smad6 Is a Smad1/5-induced Smad Inhibitor

論文審査委員	主査	教授	多久和	陽
	副査	教授	山本	博
		教授	山本	健一

内容の要旨及び審査の結果の要旨

Smad は TGF- β スーパーファミリーのシグナル伝達系において mediator として働く蛋白であり、Smad1~8 が知られている。Smad には TGF- β やアクチビン、Bone morphogenetic protein (以下 BMP) のレセプターのいずれかに特異的に結合し、その C 末端にリン酸化を受ける特異型 Smad と、これら特異型 Smad と複合体を形成し一緒に核へ移行し発現に関与する共有型 Smad、また TGF- β スーパーファミリーのタイプ I レセプターに特異型 Smad と競合的に結合し、特異型 Smad の C 末端のリン酸化を防いだり、特異型 Smad と共有型 Smad の結合を競合的に阻害する抑制型 Smad がある。抑制型 Smad である Smad7 は IFN γ 刺激によりその誘導を受け、TGF- β シグナル伝達に抑制的に作用する。一方、同じく抑制型 Smad である Smad6 は BMP により発現を誘導され、ネガティブフィードバック作用に関与することが既に報告されているが、そのメカニズムを解析した報告はなく、シグナル伝達の mediator 自身によるネガティブフィードバックを示した報告も少ない。本研究はマウス Smad6 遺伝子 5'側上流域を cloning し、BMP 刺激に反応する領域の解析を行った。マウス胎児性癌細胞株の P19 細胞 (以下 P19 細胞) を用いて OP-1/BMP-7 (以下 BMP-7) 刺激に対するノーザンブロットによる経時的な mRNA の変化を検討したところ、経時的にバンドの増強が認められ刺激後 6 時間で最大 7 倍まで増強した。次にマウス Smad6 の cDNA をプローブとして用い、mouse genomic library より Exon1 と 5'側上流域を含む約 8.5kb の genomic clone を得た。coding 領域から 5'側上流約 3kb の塩基配列の同定を行った結果、TATA-box を認めなかったが、基本転写活性を認め TATA-box の無い転写開始部位の存在が示唆された。この 8.5kb の clone ならびに制限酵素により作成した種々の断片をルシフェラーゼレポーターベクターに組み込み、活性型 BMP Ib 型レセプターと共に P19 細胞に発現をさせ、ルシフェラーゼ活性を測定した。3 つの DNA 領域 (-3213/-2384、-2383/-1912、-1911/-1696) が BMP 刺激に反応した。ショウジョウバエにおける Smad と相同な蛋白である Mad が結合する GCCGnCGC モチーフを 4 個含む GC-rich 配列と、共有型 Smad である Smad4 が結合する CAGA ボックスを含む DNA 配列を -1911/-1696 の DNA 断片に認めた。次に GC-rich 配列を直列に 3 つ繋いだものを、X 型コラーゲンのプロモーター領域の上流に組込んだレポーター遺伝子 (以下 3GC2wt-Lux) を作成し、リガンド刺激とそれぞれの特異型 Smad の形質導入による変化を P19 細胞において比較した。BMP-7 刺激に対する反応性を認めたが、TGF- β /アクチビン刺激では顕著な反応を認めなかった。GC-rich 配列に点変異を加え作成した 3GC2mut1-Lux と 3GC2mut2-Lux を、3GC2wt-Lux と比較したところ、3GC2mut1-Lux では BMP への反応性は消失したが、3GC2mut2-Lux では反応性が上昇した。3GC2wt-Lux と 3GC2mut1-Lux、3GC2mut2-Lux の一部をそれぞれプローブとして特異型 Smad との結合を確認するためゲルシフトアッセイを行い、BMP シグナルの特異型 Smad と共有型 Smad との結合が確認された。以上、本研究では Smad6 の遺伝子の 5'上流を含む Genomic clone を得て、BMP 反応領域を同定した。この反応領域は BMP 刺激や Smad1/5 に反応したが、TGF- β /アクチビンシグナルを伝える特異型 Smad の Smad2/3 には全く反応せず、BMP に特異的な反応領域であることが示唆された。

本研究は BMP の細胞内シグナル伝達の解明に重要な貢献を果たし、学位論文に値すると評価された。