

Transcriptional induction of Smurf2 ubiquitin ligase by TGF- β

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大橋, 温 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/283

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 4 5 3 号	学位授与年月日	平成 1 8 年 3 月 1 5 日
氏 名	大 橋 温		
論文題目	Transcriptional induction of Smurf2 ubiquitin ligase by TGF- β (ユビキチンリガーゼ Smurf2 の TGF- β による転写誘導)		

博士(医学) 大 橋 温

論文題目

Transcriptional induction of Smurf2 ubiquitin ligase by TGF- β

(ユビキチンリガーゼSmurf2のTGF- β による転写誘導)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

Transforming growth factor- β (TGF- β)は、細胞周期、アポトーシス、分化や細胞外基質産生などを調節する多機能サイトカインで、そのシグナル伝達はSmads蛋白による。我々は最近、腎障害の進行に伴い、Smads蛋白のユビキチンリガーゼであるSmad ubiquitin regulatory factor 2(Smurf2)が増加し、Smad2やSmad7のユビキチン依存性の分解が亢進することを報告した。しかしながら、Smurf2の発現誘導のメカニズムは不明であり、本研究ではそれを検討した。

〔材料ならびに方法〕

- (1) TGF- β 応答性細胞株であるhuman hepatoma cell line(HepG2 cell)を使用し、TGF- β 投与後、cell lysateを回収し、mRNA、蛋白レベルの増加を検討。
- (2) C57/BL6Jマウスより、Smurf2 genomic DNAをクローニングし、PCR法により増幅後、ピッカージーンベクター(PGV-B)に転写開始部位を+1とした際、プロモーター領域を含むと思われる-1067から+103までを挿入したPGV-Bsf-1067、-272から+103までを挿入したPGV-Bsf-272の2つのreporter plasmidを作成。
- (3) HepG2 cellに上記reporter plasmidを遺伝子導入し、それにTGF- β 、interleukin(IL)-1 α 、platelet-derived growth factor(PDGF)、epidermal growth factor(EGF)などの各種増殖因子、サイトカインを添加し、ルシフェラーゼアッセイにて、その発現を検討。
- (4) Smurf2の転写に関与するシグナル伝達因子として、TGF- β の下流のSmad経路を考え、HepG2 cellに上述のreporter plasmid、Smad7、dominant negative(DN) Smad3、Smad binding element(SBE) mutantを同時に遺伝子導入し、ルシフェラーゼアッセイにてその発現を検討。Activin receptor-like kinase(ALK)5(TGF- β type I receptor) inhibitor(SB431542)を添加し、ルシフェラーゼアッセイにて、TGF- β による転写の抑制を検討。Electrophoretic mobility shift assay(EMSA)にてSmurf2プロモーター内のSBEへの結合の有無を検討。
- (5) Smad非依存性経路(phosphatidil inositol 3 kinase(PI3K)-Akt経路)の関与を検討するため、HepG2 cell、human cervical carcinoma cell line(HeLa cell)に上述のreporter plasmidとkinase negative(KN)-Aktを同時に遺伝子導入し、ルシフェラーゼアッセイにてその発現を検討。PI3 kinase inhibitor(LY294002)を添加し、ルシフェラーゼアッセイにてTGF- β による転写の抑制を検討。

〔結果〕

- (1) Smurf2は、mRNA・蛋白レベルともに、TGF- β による発現亢進を認めたが、Smurf2プロモーター活性で、他の増殖因子・サイトカイン(IL-1 α 、PDGF、EGF)による発現亢進を認めなかった。

- (2) Smurf2プロモーター活性は、TGF- β の用量に依存していた。更にそれはTGF- β 存在下でSmad7、SB431542により抑制された。
- (3) DN-Smad3により、Smurf2プロモーター活性は抑制されなかった。
- (4) Smurf2プロモーター活性は、SBE mutantで抑制されず、EMSAにてSBEの関与は否定的であった。
- (5) TGF- β によるSmurf2プロモーター活性の亢進は、LY294002、KN-Aktにより抑制された。

〔考察〕

我々は、今までに腎炎の進行によって生じる細胞外基質産生が、Smad3依存性の転写活性の結果生じることを明らかにしてきた。今回、我々が見出したSmurf2のTGF- β によるSmad非依存性の経路による転写誘導にて、TGF- β により誘導されるSmad7、Smad2が、Smurf2によりユビキチン依存性に分解を促進され、よってSmad3優位になる訳であるが、これは、我々の過去の理論を裏付けるものである。更にこのことは、Smurf2誘導の抑制が、将来、腎臓の線維化を抑制する治療的手段となる可能性も秘めていることを示唆している。

〔結論〕

Smurf2の発現誘導は、TGF- β によるTGF- β 受容体の活性化を介して転写レベルで起こり、その機序はSmad経路ではなく、主としてPI3 kinase-AktによるSmad非依存性の経路によると考えられた。

論文審査の結果の要旨

Transforming growth factor- β (TGF- β)は、細胞周期、アポトーシス、分化や細胞外基質産生などを調節する多機能サイトカインで、その主なシグナル伝達はSmad蛋白によることが知られている。申請者の属する研究室では最近、腎炎モデルにおいてSmad蛋白のユビキチンリガーゼであるSmad ubiquitin regulatory factor 2(Smurf2)が増加し、Smad2やSmad7のユビキチン依存性の分解が亢進することを見出していた。しかし、Smurf2の発現誘導のメカニズムは不明であり、申請者はその分子機構を明らかにしようとした。

まず、HepG2細胞にTGF- β 、interleukin-1 α (IL1 α)、platelet-derived growth factor(PDGF)、epidermal growth factor(EGF)を添加して、Smurf2 mRNAの増加をreal-time RT-PCR法にて測定したところ、TGF- β 添加によってのみSmurf2 mRNAの増加が認められた。同じことはウエスタンブロット法を用いたSmurf2蛋白の増加でも確認できた。そこで、マウスSmurf2遺伝子をPCR法で増幅後、PicaGene Basic Vector(PGV-B)にプロモーターを含む-1067から+103までのDNA断片を挿入したPGV-Bsf-1067と-272から+103までを挿入したPGV-Bsf-272の2つのレポータープラスミッドを作成した。HepG2細胞に上記レポータープラスミッドを遺伝子導入し、それにTGF- β 、IL1 α 、PDGF、EGFを添加して、ルシフェラーゼ活性を測定したところ、TGF- β を添加した場合だけルシフェラーゼ活性が増加していた。このことから、TGF- β によりSmurf2遺伝子は正に遺伝子調節されていることが明らかになった。

TGF- β によるSmurf2発現がTGF- β 受容体を介していることを確かめるために、HepG2細胞にレポータープラスミッドを遺伝子導入する際同時にTGF- β 受容体を介するSmad2/3のリン酸化を阻害するSmad7発現ベクターを遺伝子導入したり、レポータープラスミッドを遺伝子導入した後TGF- β 添加前にactivin receptor-like kinase 5(TGF- β receptor type I)阻害剤SB431542を添加しておくこと、TGF- β によるルシフェラーゼ活性の増加がおこらなかった。

次に、TGF- β によるSmurf2遺伝子の転写活性化がいずれのシグナル伝達系を介しているかを明らかにしようとした。長いSmurf2遺伝子プロモーター断片には10箇所、短い断片には5箇所にSmad binding element (SBE)が存在していた。TGF- β によるルシフェラーゼ活性の増加は長い断片でも短い断片でも同じであったので、短い断片を以後用いた。HepG2細胞にレポータープラスミッドとドミナントネガティブSmad3発現ベクターを共遺伝子導入しても、ルシフェラーゼ活性はレポータープラスミッド単独遺伝子導入の時と変化がなかった。また、短いプロモーターの5箇所のSBEに突然変異を加え、もはやSmadが結合できなくした短い変異レポータープラスミッドを遺伝子導入後TGF- β を添加しても、ルシフェラーゼ活性は短い野生型レポータープラスミッド遺伝子導入の時と変化がなかった。また、短いプロモーター内にある5つのSBEはSmad3に結合できないことをゲルシフトアッセイにて示した。以上のことから、TGF- β によるSmurf2遺伝子の転写活性化はSmad経路ではないことが示唆されたので、phosphoinositol-3-phosphate kinase (PI3K)-Akt経路を検討した。HepG2細胞にレポータープラスミッドを遺伝子導入しTGF- β 添加前にPI3K阻害剤LY294002処理をしたり、レポータープラスミッドとドミナントネガティブAkt発現ベクターの共遺伝子導入をした場合、TGF- β によるルシフェラーゼの増加は完全に抑制された。

本研究は、Smurf2遺伝子がTGF- β により転写誘導されることを発見し、その分子メカニズムとしてはTGF- β 受容体は介するものの、通常のSmad経路によるのではなく、PI3K-Akt経路により転写活性化することも明らかにした素晴らしい研究であると評価できる。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) HepG2細胞を選んだ理由は
- 2) ドミナントネガティブSmad3とはどういうものか
- 3) ドミナントネガティブAktとはどういうものか
- 4) Smurf2遺伝子の組織特異的発現パターンは
- 5) Smad2ではなくSmad3を選んだ理由は
- 6) TGF- β 添加よりもSmad3強制発現が効果大なのはなぜか
- 7) 2つの実験的腎炎では、Smad2、Smad3、Smurf2の変化はどうか
- 8) 実験腎炎局所でのTGF- β 濃度は

論文審査担当者 主査 三 浦 直 行

副査 大 園 誠一郎 副査 中 村 浩 淑