

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 大上 智弘

本研究は ChIP(クロマチン免疫沈降)-sequencing を用いて TGF- β シグナルの下流因子である Smad の転写因子結合部位の網羅的な同定・解析により①表皮角化細胞と、②乳腺上皮細胞の上皮間葉転換 (EMT) における Smad2/3 のゲノム上の結合領域についての検討を行い、下記の結果を得ている。

表皮角化細胞における TGF- β 標的遺伝子の探索

- 1 HaCaT 細胞、HPEK 細胞という 2 種類の表皮角化細胞を用いて TGF- β 刺激した後、TGF- β シグナルの下流因子である Smad の抗体を用いて ChIP-sequencing を行った。また、未分化状態と分化した状態をコントロールできる HPEK 細胞を用いて RNA-sequencing も行った。その結果、2 種類の細胞で Smad3 ないし Smad2/3 の結合領域をもち、TGF- β により遺伝子の発現が 2 倍以上になる遺伝子は 110 遺伝子に絞り込まれ、さらに未分化状態の HPEK 細胞では発現していないが分化した HPEK 細胞で発現する遺伝子として 7 種類の遺伝子が絞り込まれた。
- 2 その 7 種類の遺伝子の中で、機能未知である遺伝子 C2orf54 の解析を行ったところ、表皮角化細胞の分化の後期で発現してくることが明らかとなり、細胞内にびまん性に存在していることが明らかとなった。この C2orf54 は分化した状態である HaCaT 細胞において元々発現しているが、TGF- β 刺激により mRNA は 1.5 時間後、タンパクは 4 時間後に発現の上昇を認めた。
- 3 C2orf54 をノックダウンすることで、表皮の基底層で発現しているケラチン 5、ケラチン 14、p63 の発現が低下する傾向が認められた。有棘層で発現しているケラチン 1、ケラチン 10 の発現には影響を与えなかった。そして、顆粒層で発現しているインボルクリンの発現が著明に抑制された。
- 4 C2orf54 をノックダウンした状態で Smad2/3 抗体を用いて ChIP を行ったところ、TGF- β シグナルの直接の標的遺伝子として知られている PAI1 や p21 への Smad2/3 の結合の増強と、mRNA の低下が認められた。同様の働きをする TGF- β シグナルの抑制因子として c-Ski が考えられ、Smad と c-Ski と C2orf54 の協調作用を確認し

たところ C2orf54 は Smad3 と結合していることが示され、また C2orf54 の用量依存的に c-Ski の発現が減弱し、C2orf54 が c-Ski の分解を促進していることが示唆された。

乳腺上皮細胞 (NMuMG) 細胞における Smad2/3 の結合領域の解析

- 5 上皮間葉転換(EMT)における TGF- β の役割を解析するため NMuMG 細胞を用いて TGF- β 刺激後 Smad2/3 抗体で ChIP-sequencing を行った。その結果、TGF- β により誘導される Snai1(Snail)が EMT において重要であると認識されていたが Snai1 には Smad2/3 の有意な結合を認めず、TGF- β の制御を受けていないことが示唆された。
- 6 TGF- β 刺激による遺伝子の発現変動を確認したところ Smad2/3 が結合している遺伝子も TGF- β 刺激により発現の上昇や低下が増加するわけではないことが明らかとなった。オントロジー解析では発現上昇する遺伝子は細胞接着に関する遺伝子が多く、発現低下する遺伝子では細胞周期に関する遺伝子が多いことが明らかとなった。
- 7 TGF- β により発現変動する遺伝子のうち、転写開始点から 10kbp 以内に Smad2/3 の結合がある結合領域は 800 存在しこの領域のモチーフ解析を行ったところ既知のモチーフと類似のモチーフが 6 種類同定された。その中でも TEAD 類似のモチーフの頻度は Smad 非結合領域や Smad が結合しているものの遺伝子の発現変動をきたさない領域と比べて 2 倍以上の上昇を認め、このモチーフが遺伝子の発現変動に影響を与える Smad2/3 の結合領域に濃縮していることが明らかとなった。

以上、本論文は TGF- β シグナルの下流因子である Smad に着目し ChIP-sequencing の手法を用いることで表皮角化細胞において機能未知であった C2orf54 が TGF- β シグナルの制御を受け、表皮の中でバリアー機能に重要な役割を果たしているインボルクリンの発現に影響を与えていることを示した。また、上皮間葉転換(EMT)において重要な因子である Snai1、Snai2 に Smad2/3 の結合がないことを明らかとし、モチーフ解析の結果 TEAD 類似のモチーフが遺伝子の発現変動に影響を与える Smad2/3 の結合領域に濃縮していることを示し、TGF- β シグナルの多彩な作用の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。