

がんの増殖に関する基礎研究

所属機関 (財) 癌研究会癌研究所ウイルス腫瘍部
研究者名 畠山 昌則

《研究の概要》

癌の増殖に関する基礎研究は、多細胞生物における細胞増殖が外部環境ならびに内部環境に応答していかに調節・制御され、その機構破綻がいかにして脱制御された細胞増殖に象徴される細胞癌化へとつながるのかを分子レベルで理解することを最終的な目標とする。

本研究遂行のための具体的な第一のアプローチは、細胞増殖調節機構を癌抑制遺伝子の生理的な機能を追及する中から理解することである。一つの体細胞が自らとまったく同一の娘細胞を正確に複製する過程は細胞周期と呼ばれ、その進行は酵母からヒトに至るまで高度に保存された細胞周期制御分子群の秩序立った活性化／不活化により精密に監視・遂行される。人の遺伝性悪性腫瘍の一つとして知られる網膜芽細胞腫の原因遺伝子として単離された retinoblastoma (RB) 遺伝子ならびにその関連遺伝子である p107、p130 によりコードされる pRB ファミリー (pRB、p107、p130) は体細胞増殖の強力な抑制分子として、現在、細胞周期進行の可否を意思決定する重要な分子群と考えられている。本研究ではまずヒト由来 G1 サイクリンならびに CDK を酵母細胞内に異所性に共発現させることにより、pRB がサイクリン D-CDK ならびにサイクリン E-CDK の協調的なリン酸化を受け不活化されることを明らかにした。次に、細胞周期進行の負性制御因子としての pRB の普遍性を明らかにするため、哺乳動物細胞系における強力な外来遺伝子誘導発現系を樹立した。この系を用いてサイトカイン依存性の造血系細胞に各々の pRB ファミリー分子を人為的に誘導発現させた結果、pRB ファミリーの一つ p130 がその細胞周期制御に中心的な役割を担うことを明らかにした。これは、細胞種特異的な pRB ファミリーの機能的役割を示した世界で初の報告である。さらに、血球系細胞の分化に際して、p130 の細胞内発現レベルが選択的に増大する一方、pRB ならびに p107 の発現は強く抑制されることを見出し、細胞増殖と分化の協調的制御における pRB ファミリー特に p130 の二元的役割を明らかにした。

癌の増殖に関する第二のアプローチは細胞増殖制御シグナルと細胞周期制御系の共役機構の理解である。TGF- β は強力な細胞増殖抑制活性を有するサイトカインであり、多くの癌細胞において TGF- β に対する応答性の減弱・喪失が認められる。本研究では TGF- β レセプターの構造-機能解析から、細胞増殖抑制シグナルと分化関連シグナルがレセプターの活性化レベルで分岐することを明らかにした。さらに、TGF- β レセプターの下流シグナル伝達分子として知られる Smad ファミリーの各メンバーの有する機能的特異性ならびにファミリー分子間の複雑な相互作用の存在を種々の人工改変分子を用いて明らかにした。また、異所性発現系を用い、癌細胞に認められる変異 Smad 分子が細胞増殖ならびに細胞浸潤能獲得に促進的に機能することを明らかにした。

研究者氏名及び所属機関

研究者氏名	所属機関及び地位	分担研究課題
島山 昌則	(財) 癌研究会 癌研究所部長	癌細胞の増殖における pRB ファミリーの役割
宮園 浩平	(財) 癌研究会 癌研究所部長	細胞癌化と TGF- β シグナル伝達機構

研究報告

I 研究目的

本研究は、癌を細胞周期異常症としてとらえ直し、細胞周期制御機構ならびにその上位に位置する増殖制御シグナルの本態を明らかにすることにより細胞癌化の機構を分子レベルで把握することを最終的な目的とする。本研究から得られた成果は、癌遺伝子治療を含め、合理的な論理基盤を有する新たな癌治療法開発の糸口となることが期待される。

細胞周期は真核細胞が進化の過程を超えて普遍的に共有する細胞増殖の進行過程であり、その進行はきわめて高度に保存された一連の細胞周期制御分子群により厳密な支配を受ける。本研究では(1) 高等真核細胞において細胞周期制御の中心を担うと考えられているレチノブラストーマ癌抑制蛋白 (pRB) ならびにその近縁分子である p107 及び p130 の機能ならびに制御機構を生化学的・遺伝学的・分子生物学的手法を駆使して理解するとともに、pRB ファミリーの異常が細胞癌化につながる過程を考察する；(2) 強力な細胞増殖抑制因子として知られる TGF- β を介する細胞内シグナルの本態を分子レベルで明らかにし、TGF- β シグナルが pRB ファミリーを含む細胞周期制御系に共役する機構に迫るとともに癌細胞における TGF- β シグナル伝達分子の変異を検索する。

II 研究計画及び材料と方法

1. 強力な細胞増殖抑制分子として知られる pRB の機能はサイクリン-サイクリン依存性キナーゼ (CDK) による細胞周期依存性のリン酸化機構により制御される。この pRB リン酸化の詳細なメカニズムを酵母モデル系を用い以下の方法で検討する。まず、酵母の持つ 2 つの CDK (Cdc28 および Pho85) を遺伝子破壊することにより酵母由来の pRB キナーゼ活性を失活させる。つぎに 4 種類の異なる栄養選択マーカーをもつ酵母発現ベクターを複製する。これらのベクターでは、cDNA は酵母 Gal11 プロモーターの下流に組み込まれ、ガラクトース存在下に強力な蛋白誘導が惹起される。各々の酵母発現ベクターにヒト由来の G1 サイクリンであるサイクリン D1、サイクリン E、サイクリン A、サイクリン B ならびに CDK2、CDK4、CDC2 をコードする cDNA をセンス方向あるいはアンチセンス方向に組み込んだ後 Pho85 (-) 酵母細胞に任意の組み合わせで導入し、安定変異株を樹立する。これら一連の細胞株をガラクトース含有培地で培養することによりヒト由来のサイクリンならびに CDK 分子をコンディショナルに誘導発現させ、pRB のリン酸化/不活化におけるこれらサイクリン-CDK の役割を検討する。

2. 哺乳動物細胞の細胞周期制御における pRB ならびにそのファミリー分子である p107、p130 の役割を検討するため、新たに開発したテトラサイクリンならびに IPTG の二重制御を受ける厳密な cDNA 誘導発現系を用い、以下の解析を行う。

a. サイトカイン（インターロイキン 2 あるいはインターロイキン 3）依存性に増殖するリンパ系細胞に pRB 蛋白を生理的細胞内濃度の数倍～数百倍程度まで誘導的に異所性過剰発現させ、pRB 発現レベルと細胞のサイトカイン応答能との関連を検討する。

b. pRB には p107 ならびに p130 と呼ばれる 2 つのファミリー分子が存在する。そこで、pRB に抵抗性を示すサイトカイン依存性リンパ球細胞増殖に及ぼすこれら pRB ファミリー蛋白の効果を検討する。

c. 種々の p130 人工改変体を用いてサイトカイン依存性細胞増殖の抑制にかかわる p130 の分子内領域を検討する。

d. リンパ系細胞の細胞周期制御における p130-E2F4 相互作用の重要性を明らかにするために、E2F4 を異所性に過剰発現するリンパ球細胞を樹立し、その細胞増殖能を検討する。

3. 細胞増殖と分化は相互排他的な細胞現象であり、一般に細胞分化プログラムの活性化には G1 細胞周期における細胞増殖停止が絶対的な必要条件となる。しかしながら、この増殖と分化の協調的制御を保証する分子機構はこれまでまったく明らかにされてはいない。そこで血球系細胞の分化に際して、レチノプラストーマ癌抑制遺伝子産物（pRB）ならびにそのファミリー分子の細胞周期ならびに分化プログラムに及ぼす影響を上述の cDNA 発現誘導系を用いて検討する。

4. TGF- β は二種類のセリン-スレオニンキナーゼ型レセプター（I 型、II 型）によってシグナルを伝達する。TGF- β はまず II 型レセプターに結合し、この結果 I 型レセプターをリン酸化してシグナルを伝達する。このシグナル伝達における I 型レセプターの機能を、膜貫通領域と GS ドメインの間の領域に存在する 172 番目のセリンならびに 176 番目のスレオニンを他のアミノ酸に置換した変異レセプターを作製し、I 型レセプターを欠如した細胞に導入することにより検討する。TGF- β の I 型レセプターが伝達するシグナルを明らかにするために酵母を用いた two-hybrid 法によって I 型レセプターと結合する細胞内蛋白質のクローニングを試みる。まず FKBP12（免疫抑制剤 FK506 やラパマイシンの結合ペプチド）や farnesyl transferase- α (FT- α) が I 型レセプターと結合することを見いだしたことから、その結合の特性を酵母や哺乳類細胞に cDNA を導入して調べる。さらに恒常的に活性化された I 型レセプターを用いてこれに結合するペプチドを two-hybrid 法でクローニングし、野性型レセプターと比較する。ショウジョウバエの TGF- β 類縁因子である decapentaplegic (DPP) のレセプターの基質となる因子を two-hybrid 法でクローニングするとともに、そのヒトホモログの検索を行なう。

5. TGF- β は強力な増殖抑制因子として知られ、TGF- β レセプターが活性化されると細胞内に存在する Smad がリン酸化され、核へ移行してさまざまな標的遺伝子の転写を促進する。この Smad の機能を明らかにするため、以下の検討を加える。

a. Smad4 は元来は DPC4 として膵臓癌の癌抑制遺伝子として発見された分子である。ま

た Smad2 も大腸癌などで変異が起こることが明らかとなっており、Smad 分子の癌抑制遺伝子としての役割が注目されている。そこで大腸癌において変異が見られる Smad2 の 450 番目のアスパラギン酸と相同する部位にあたる Smad3 の 407 番目のアスパラギン酸をグルタミン酸に置換した改変分子を作り、その作用を検討する。

b. Smad にはレセプターによって活性化される特異型 Smad、特異型 Smad のアダプターとなる共有型 Smad、特異型 Smad の作用を抑制する抑制型 Smad の 3 種類に分けることができる。このうち抑制型 Smad の一つである Smad6 に関し、その発現誘導機構を検討する。

c. Smad2 と Smad3 はアミノ酸レベルで互いに 90% の相同性をもつ。しかし、Smad2 は Smad3 に比べて plasminogen activator inhibitor-1 などに対する転写活性が低いことなどが観察されており、その作用のメカニズムの検討が重要である。我々は Smad2 の N 末端側の MH1 領域に注目し、その DNA 結合能を検討する。

d. p300 はアデノウイルスの E1A に結合することでクローニングされた癌関連蛋白質で、さまざまな転写因子の coactivator として作用する。そこで p300 の TGF- β による転写活性への役割を検討する。

III 研究成果

1. 酵母細胞を用いた再構成実験から、単独のサイクリン-CDK の異所性発現では十分な pRB リン酸化／不活化は誘導されないことが明らかになった。これに対し、D 型サイクリン-CDK4 ならびにサイクリン E-CDK2 からなる 2 つの G1 サイクリン-CDK を共発現させることによりきわめて強力な pRB リン酸化／不活化が誘導された。

2. 血球系細胞のサイトカイン依存性細胞周期の開始ならびに進行は pRB の細胞内レベルにはまったく影響を受けないことが明らかになった。同様の結論はサイクリン依存性キナーゼの標的となるセリン残基ならびにスレオニン残基をすべて欠くリン酸化抵抗性の pRB 変異分子を用いても確認された。pRB と同様、p107 を誘導的に過剰発現させてもサイトカイン依存性の血球細胞増殖能に有意の変化は認められなかったが、p130 の異所性発現により細胞のサイトカイン依存性増殖は著しく抑制された。この抑制は細胞周期進行の G1 期-S 期移行の阻止であり、細胞は p130 の濃度依存的に G1 細胞周期に停止した。サイクリンとの相互作用に必要なスペーサー領域を欠失させた p130 人工改変分子はこの細胞増殖抑制活性を保持していたが、C 末側約 200 アミノ酸を欠損させることにより p130 の細胞増殖抑制活性は消失した。この領域は E2F4 に代表される E2F 転写因子と p130 の複合体形成に必須の領域である。そこで、血球系細胞増殖における E2F4 の役割を明らかにするために、E2F4 を構成的に発現する細胞株を作製した。得られた細胞はサイトカイン非依存性の細胞増殖能を獲得した。

3. 造血系を構成する骨髄系細胞は granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) 存在下に成熟顆粒球（好虫球）へと分化する。この顆粒球分化に際して、p130 の細胞内発現レベルが急速に増大することが明らかになった。これに対し、pRB ならびに p107 の発現は逆に強く抑制された。また、高密度細胞培養など p130 の細胞内発現を誘導・維持する状態を作り出すことより G-CSF 非存在下での自律的な顆粒球分化が誘導された。

4. TGF- β の I 型レセプターの機能解析では膜貫通領域と GS ドメインの間の領域の 172 番目のセリンや 176 番目のスレオニンを他のアミノ酸に置換すると、増殖抑制のシグナルは伝達されなくなるのに対し、細胞外マトリックスなどの産生は正常のレセプターと同様に伝えられることが明らかとなり、I 型レセプターの段階で異なる二つの TGF- β シグナルが分岐することを確認した。出芽酵母を用いた two-hybrid 法による I 型レセプター結合蛋白質のクローニングでは FKBP12 と FT- α が単離された。恒常的に活性化された I 型レセプターを用いた two-hybrid クローニングにおいても野性型と同じ cDNA のみが単離され、野性型レセプターを用いたスクリーニングが有用であることが確認された。FKBP12 と I 型 TGF- β レセプターの複合体形成はヒト細胞内でも確認された。

また酵母細胞内での結合特性は FKBP12 と FT- α では明らかな相違が見られた。

FKBP12 は TGF- β レセプターのキナーゼ活性とは無関係に結合し、レセプターの機能を間接的に調節している可能性が示唆された。

5. 407 番目のアスパラギン酸をグルタミン酸に置換した変異型 Smad3 は TGF- β のシグナルを伝達しないだけでなく、正常の Smad と競合して優勢抑制型変異体として作用することが明らかとなった。この変異型 Smad3 を大量に発現させた細胞は TGF- β の増殖抑制作用に対し抵抗性を示した。さらにこれらの細胞をコラーゲンゲルの上で 3 次元培養するとコラーゲンゲルの中に細胞が浸潤していく像が見られ、腫瘍細胞の浸潤能の獲得と Smad の作用の関わりが示唆された。

抑制型 Smad である Smad6 の mRNA が TGF- β や BMP によって転写レベルで誘導されることを明らかにした。アデノウイルスベクターに組み込んだ Smad6 を BMP で刺激した骨芽細胞に投与すると分化が著明に抑えられることから、骨形成における同分子の役割が示唆された。

Smad2 の MH1 領域にはエクソン 3 によってコードされる 30 アミノ酸からなる領域が存在するが、これに対応する領域は Smad3 では見られない。ある種の細胞ではエクソン 3 を欠いた Smad2 (Smad2 Δ exon3) が作られる。Smad2、Smad2 Δ exon3、Smad3 の転写活性を調べたところ Smad2 Δ exon3 は Smad2 より強く、Smad3 とほぼ同等の転写活性を持つことが明らかとなった。さらに Smad2 Δ exon3 と Smad3 は plasminogen activator inhibitor-1 のプロモーター領域に結合するのに対し、Smad2 は結合しないことが明らかとなり、エクソン 3 に相当する部分が DNA への結合を阻害していることが明らかとなった。

転写の co-activator として知られる p300 が TGF- β 依存性の転写を増強することを明らかにし、その増強作用が TGF- β レセプターの刺激依存性に Smad2 ならびに Smad3 と p300 が直接結合する結果であることを見出した。Smad3 は C 末端側の MHZ 領域、p300 は C 末端側の約 600 アミノ酸からなる領域を介して各々結合することが明らかになった。また p300 の Smad との結合部位は優勢抑制性に Smad による転写を抑えることが示された。

IV 考察

1. ヒト由来のサイクリンならびに CDK 分子を異所性に共発現させることによりヒトサイクリン-CDK 依存性に細胞周期が進行する出芽酵母をモデル系として用い、サイクリン

E-CDK2 ならびにサイクリン D1-CDK4 という 2 種類の G1 サイクリン-CDK 複合体が協調的に関与する pRB リン酸化／不活化機構の存在が示された。各々の G1 サイクリン-CDK 複合体活性は異なる細胞増殖関連上位シグナルにより制御されているものと推察され、これまでの解析からサイクリン D1-CDK4 の活性は生理的には細胞増殖因子に代表される増殖シグナルにより制御されると考えられる。一方、サイクリン E-CDK2 の活性制御機構は今だ不明であるが、細胞の大きさや DNA の損傷状態といった細胞内環境シグナルによりコントロールされている可能性が示唆される。pRB の不活化に至るリン酸化の過程に 2 種類或はそれ以上の異なる組み合わせからなるサイクリン-CDK が関与するという結論は、pRB がリン酸化という生化学的修飾を介して細胞内外の情報を集積・統合することにより細胞増殖の可否を決定する分子として機能している可能性を強く示唆している。また、G1 細胞周期における D 型サイクリン-CDK4 の活性化はサイクリン E-CDK 2 の活性化に必ず先行して引き起こされることから、pRB の機能不活化にはまず D 型サイクリン-CDK4 による予備的リン酸化が起これ、この予備的リン酸化を受けた pRB のみがサイクリン E-CDK 2 のリン酸化標的となる可能性が示唆される。この段階的リン酸化モデルが正しいとするならば、pRB の不活化には秩序立ったサイクリン-CDK の活性化が要求されることになり、G1 細胞周期のモニター分子としての pRB の働きが分子レベルで説明される。

2. 酵母モデル系を用いて得られたこれらの知見を哺乳動物細胞において検証するため、テトラサイクリンオペレーターならびにラクトースオペレーターを組み合わせた高度な発現制御能をもつ哺乳動物細胞内遺伝子発現誘導系を確立した。この発現誘導では、テトラサイクリン存在下における強い蛋白発現の抑制とテトラサイクリン除去ならびにラクトースアナログである IPTG 添加による強力な誘導が期待され、pRB に代表される潜在的に強い細胞増殖抑制能を持つと予想される蛋白の機能解析に強力な手段を提供する。

この発現誘導系を用いてヒト pRB ならびに p107、p130cDNA をサイトカイン依存性リンパ系細胞細胞株に導入し、pRB を迅速かつ強力に誘導発現する一連の安定変異細胞株を樹立した。これらの細胞株を用いて、pRB ファミリー蛋白の細胞内発現レベルが細胞のサイトカイン依存性増殖能に与える影響に関し検討を加えた。その結果、これまですべての体細胞において細胞周期進行の中心的制御分子として普遍的に機能していると考えられていた pRB が、ある種の血球系細胞においては何ら積極的な増殖制御機能を担っていないことが明確に示された。驚くべきことに、このような pRB 不応性細胞においては他の pRB ファミリー分子のひとつ p130 が細胞増殖の負性制御分子として重要な役割を担っていた。p130 は細胞周期進行を促進する E2F4 転写因子と物理的に会合しその機能を抑制する結果、血球系細胞のサイトカイン依存性増殖を抑制することが示された。これら一連の研究結果から、細胞周期制御において負の細胞周期制御分子として知られる pRB ファミリー間で細胞種特異的な分子の使い分けが行なわれていることが示された。現在、pRB ファミリーの標的となる細胞増殖関連転写 E2F には 1 から 6 までの分子が知られており、これら E2F 分子と pRB ファミリー分子との相互作用にはある種の特異性が存在することが知られている。したがって細胞種間における pRB ファミリーの使い分けは、各細胞種の細胞増殖においてどの E2F ファミリー分子が第一義的に重要な役割を担っているかにより選択されるものと推察される。pRB はこれまですべての体細胞周期の普遍的な制御分子と考えられてきたが、

本研究は、異なる細胞種間の細胞周期制御が異なる pRB ファミリー分子により支配されていることを他に先駆けて明らかにした。これらの事実は、各々の pRB ファミリー分子が異なる細胞系列の増殖を選択的に担っている可能性を強く示唆している。pRB の遺伝的不活化は網膜芽細胞腫、骨肉腫、肺小細胞癌といった特定の悪性腫瘍に特徴的に見られる。これらの癌の発生源となる細胞種では pRB が細胞周期進行制御の主体となるものと推察され、その不活化が細胞癌化に直接結びつくものと推察される。p16 は pRB ファミリーのリン酸化に係わる D 型サイクリン-CDK の特異的インヒビターである。したがって、p16 の不活化により D 型サイクリン-CDK のキナーゼ活性は亢進し、すべての pRB ファミリー分子が不活化されることになり、pRB 依存性あるいは p130 依存性細胞周期のいずれもが正常な制御から逸脱することになるものと考えられる。この考えは、p16 の遺伝的不活化が多様なヒト癌に認められる事実からも強く支持される。

3. 細胞の増殖と分化はお互いに相反する細胞現象であり、一般に細胞分化プログラムの活性化には G1 細胞周期における細胞増殖停止が絶対的な必要条件となる。本研究では増殖と分化の協調的制御を保證する分子機構に pRB ファミリー蛋白が組み込まれる可能性を検討した。その結果、骨髄系血球細胞の分化に際して、p130 が G1 細胞周期停止を誘導するのみならず、細胞分化プログラムを直接活性化することにより増殖と分化の相互排他性を保證している可能性を示唆する結果が得られた。一般に細胞癌化は増殖異常と同時に分化異常の側面を兼ね備えており、これらの事実は各々の pRB ファミリー分子が異なる細胞系列の増殖のみならず分化の意思決定にさいしても特異的な役割を担っている可能性を強く示唆するとともに、pRB ファミリー分子の機能異常が細胞癌化における脱制御された細胞増殖ならびに細胞分化異常の両面に直接結びつくことを強く示唆している。

4. 本研究を通して、TGF- β の I 型レセプターの細胞内ドメインには細胞増殖抑制シグナル産生に関与する機能領域と細胞外マトリックス産生など細胞分化に関連する機能領域とが独立して存在することが示された。この事実から TGF- β シグナルは I 型レセプターの段階で二つに分岐することが結論付けられた。TGF- β I 型レセプターの細胞内ドメインには FKBP12 と FT- α が物理的に会合する。このうち、FKBP12 と I 型レセプターの結合はレセプター自身に内在されるセリン/スレオニンキナーゼ活性とは関係しない。したがって、複合体形成を通して FKBP12 は触媒活性とは異なるレセプター機能を調節している可能性が示唆される。

5. TGF- β レセプターの下流シグナル伝達分子として知られている Smad の解析結果から、大腸癌で変異が見られる Smad2 の 450 番目のアスパラギン酸と相同部位に当たる 407 番目のアスパラギン酸のグルタミン酸への置換を導入した Smad3 人工改変分子が、正常の Smad と競合する優勢抑制型変異体として機能することを明らかにした。この変異型 Smad3 を大量に発現させることにより細胞は TGF- β 増殖抑制作用に対し抵抗性を獲得する。このような変異型 Smad が発現することにより細胞は TGF- β による増殖抑制から逃れ、癌化へ悪性度を高めるものと推察された。興味深いことに、変異型 Smad3 の大量発現細胞においては細胞浸潤能の亢進が認められ、腫瘍細胞の浸潤能獲得と Smad の関連が注目される。

一方、抑制型 Smad として知られる Smad6 の mRNA 発現は TGF- β や BMP によって誘導されることを見い出すとともに、BMP で刺激した骨芽細胞に Smad6 を異所性発現させることにより細胞分化が著明に抑えられることを明らかにした。さらに、ある種の細胞ではスプライシングバリエーションとしてエクソン 3 を欠失した Smad2 (Smad2 Δ exon3) が作られる。このバリエーション Smad2 の転写活性を調べたところ Smad3 とほぼ同等の転写活性を持つことが明らかとなった。このバリエーションは本来 Smad2 が結合しない plasminogen activator inhibitor-1 のプロモーター領域に結合することから、エクソン 3 に相当する部分が Smad3 の DNA への結合を阻害していることが示された。

TGF- β による転写活性の増強作用の機序の一つとして、TGF- β レセプターの刺激依存性に Smad2 ならびに Smad3 が転写の co-activator として知られる p300 と直接結合しその機能を増強させることが明らかになった。この結合には、Smad3 は C 末端側の MH2 領域が、一方 p300 は C 末端側の約 600 アミノ酸からなる領域が必要となることが示された。また p300 の Smad との結合部位は優勢抑制的に Smad による転写を抑えることが明らかとなった。

TGF- β は強力な増殖抑制因子として知られ、TGF- β レセプターが活性化されると細胞内に存在する Smad がリン酸化され、核へ移行してさまざまな標的遺伝子の転写を促進する。Smad ファミリー分子は、レセプターによって活性化される特異型 Smad、特異型 Smad のアダプターとなる共有型 Smad、特異型 Smad の作用を抑制する抑制型 Smad の 3 種類に分けることができる。本研究から、各々の Smad がユニークな生物学的特製を有し、それらが多様な組み合わせで活性化されることにより TGF- β の多彩な生理活性が誘導されることが明らかになった。さらに、癌に付随して認められる変異型 Smad 分子が野性型 Smad の優勢抑制 (dominant negative) 体として機能するという事実は、細胞癌化における TGF- β シグナル伝達系遮断の重要性を強く示唆している。得られた成果から、正常な TGF- β シグナル伝達系を癌細胞に再構築することにより癌細胞の増殖を抑えこむ新たな癌治療法の開発が期待される。

V 研究成果の発表

1. Saitoh, M., Nishitoh, H., Amagasa, T., Miyazono, K., Takagi, M., and Ichijo, H. Identification of important regions in the cytoplasmic juxtamembrane domain of type I receptor that separate signaling pathways of transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem.*, 271, 2769-2775. 1996.
2. Okadome, T., Oeda, E., Saitoh, M., Ichijo, H., Moses, H.L., Miyazono, K., and Kawabata, M. Characterization of the interaction of FKBP12 with the transforming growth factor- β -type I receptor in vivo. *J. Biol. Chem.*, 271, 21687-21690. 1996.
3. Nakao, A., Imamura, S., Souchelnytskyi, S., Kawabata, M., Ishisaki, A., Oeda, E., Tamaki, K., Hamai, J., Heldin, C. H., Miyazono, K. and ten Dijke, P. Heteromeric complex formation and activation of Smad2, Smad3 and Smad4 in

- TGF- β receptor-mediated signaling. *EMBO J.* 16, 5353-62. 1997.
4. Hoshikawa, Y., Amimoto, K., Mizuguchi, R. and Hatakeyama, M. Highly controlled heterologous gene expression through combined utilization of the tetracycline-repressible trans activator and the lac repressor. *Anal. Bio chem.*, 261, 211-218. 1998.
 5. lwabe, K., Teramura, M., Yoshinaga, K., Kobayashi, S., Hoshikawa, Y., Maeda, T., Hatakeyama, M. and Mizoguchi, H. K-252a induced polyploidization and differentiation of a human megakaryocytic cell line, Meg-J; Transient elevation and subsequent suppression of cyclin B1 and cdc2 expression in the process of polyploidization. *British J. Haematol.*, 102, 812-819. 1998.
 6. Hoshikawa, Y., Mori, A., Amimoto, K., lwabe, K. and Hatakeyama, M. Control of pRB-independent hematopoietic cell cycle by the pRB-related p130. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 8574-8579. 1998.
 7. Mizuguchi, R. and Hatakeyama, M. Conditional activation of Janus kinase (JAK) confers factor independence. upon IL-3-dependent cells. Essential role of Ras in JAK-triggered mitogenesis. *J. Biol. Chem.*, 273, 32297-32303. 1998.
 8. Noto, S., Maeda, T., Hattori, S., Inazawa, J., Imamura, M., Asaka, M. and Hatakeyama, M. A novel human RasGAP-like gene that maps within the prostate cancer susceptibility locus at chromosome 1q25. *FEBS Letters*, in press
 9. Horie, K., Yamashita, H., Takenoshita, S., Mogi, A. and Miyazono, K. lack of transforming growth factor- β type II receptor expression in human retinoblastoma cells. *J. Cell Physiol.*, 175, 305-13. 1998
 10. Takase, M., Imamura, T., Sampath, T. K., Takeda, K., Ichijo, H., Miyazono, K., and Kawabata, M. Induction of Smad6 mRNA by bone morphogenetic proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 244, 26-29. 1998.
 11. Goto, D., Yagi, K., Inoue, H., Iwamoto, I., Kawabata, M., Miyazono, K., and Kato, M. A single missense mutant of Smad3 inhibits activation of both Smad2 and Smad3, and has a dominant negative effect on TGF- β signals. *FEBS Lett.* 430, 201-204. 1998.
 12. Nishihara, A., Hanai, J.-i., Okamoto, N., Yanagisawa, J., Kato, S., Miyazono, K., and Kawabata, M. Role of p300, a transcriptional coactivator, in signaling of TGF- β . *Genes to Cells* in press.

13. Yagi, K., Goto, D, Hamamoto, T., Takenoshita, S., Kato, M. and Miyazono, K. Alternatively-spliced variant of Smad2 lacking exon 3: Comparison with wild-type Smad2 and Smad3. *J. Biol. Chem.*, in press.