

氏 名 (本 籍)	久 米 真 司 (滋賀県)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 4 0 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 9 年 3 月 2 6 日
学 位 論 文 題 目	SIRT1 Inhibits Transforming Growth Factor β -induced Apoptosis in Glomerular Mesangial Cells via Smad7 Deacetylation (抗老化遺伝子 SIRT1 は Smad7 の脱アセチル化を介し、TGF β による腎糸球体メザンギウム細胞のアポトーシスを抑制する)
審 査 委 員	主 査 教 授 岡 部 英 俊 副 査 教 授 後 藤 敏 副 査 教 授 西 山 勝 夫

論文内容要旨

※整理番号	545	(ふりがな) 氏名	くめ しんじ 久米 真司
学位論文題目	<p>SIRT1 inhibits TGFβ-induced apoptosis in glomerular mesangial cells via Smad7 deacetylation. (抗老化遺伝子 SIRT1 は Smad7 の脱アセチル化を介し、 TGFβによる腎糸球体メザンギウム細胞のアポトーシスを抑制する)</p>		
<p>【目的】 サイトカインの一つである TGFβは、メザンギウム細胞を含む糸球体構成細胞のアポトーシスを惹起し、糸球体硬化病変の発症・進展に関わる事が示唆されている。また、その発症機構に TGFβシグナル制御蛋白の一つである Smad7 の細胞内発現が重要な役割を果たしていることも報告されている。Smad7 の細胞内発現量は、そのアセチル化により調節されることが知られているが、脱アセチル化機構、Smad7 のアセチル化が及ぼすアポトーシスへの関与は解明されていない。</p> <p>近年、抗老化作用を有する蛋白として同定された mammalian homolog silent information regulator 2 (SIRT1・クラス III ヒストン脱アセチル化酵素) は、ヒストン蛋白以外の核内蛋白を脱アセチル化することにより、酸化ストレス下での抗アポトーシス作用を含む様々な生理作用を示す事が報告された。現在、SIRT1 について、様々な疾患の発症・進展機構に関わる可能性も示唆されており、新たな標的蛋白の同定が進められている。</p> <p>今回、糸球体硬化病変に関わるメザンギウム細胞の TGFβ誘発アポトーシスにおける SIRT1 の役割を解明するため、Smad7 が SIRT1 の新たな標的蛋白であるという仮説のもと検討を行った。</p> <p>【方法】 培養マウスメザンギウム細胞 (MMC) における SIRT1 と Smad7 の内因性結合、ウサギ網状赤血球溶血液翻訳系を用いて発現させた両蛋白の直接的な結合を免疫沈降法にて検討した。SIRT1 の Smad7 に対する脱アセチル化作用は、抗アセチル化抗体を用いて検討した。SIRT1 の生理的作用を検討するために、レトロウイルスを用い SIRT1 過剰発現 MMC ならびに SIRT1 発現抑制 (RNA 干渉) 細胞を樹立し、SIRT1、Smad7 蛋白発現量を WB 法にて確認した。SIRT1 が Smad7 の蛋白分解に及ぼす効果を Pulse-chase 法にて、SIRT1 が Smad7 のユビキチン化に及ぼす効果を抗ユビキチン抗体を用いて検討した。SIRT1 過剰発現、SIRT1 発現抑制細胞 MMC に対して、Smad7 の過剰発現、あるいは TGFβ孵置を行い、Smad7 誘発、および TGF 誘発アポトーシスに対する SIRT1 の役割を検討した。アポトーシスの評価は DAPI 染色による核の形態学的変化、WB 法による Caspase-3 および PARP の切断化にて検討した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

【結果】免疫沈降法にて、SIRT1 と Smad7 の内因性結合、直接的な結合が確認された。SIRT1 過剰発現にて Smad7 の脱アセチル化が亢進した。この脱アセチル化の亢進が脱アセチル化活性を欠失した点変異 SIRT1 (H355A) の過剰発現にて抑制されたことから、SIRT1 が Smad7 に対する直接的な脱アセチル化作用を有することが示された。

WB 法による検討にて、Smad7 発現量は SIRT1 過剰発現 MMC で減少し、SIRT1 抑制 MMC で増加していることが確認された。SIRT1 過剰発現 MMC において、Smad7 のユビキチン化増強を伴う蛋白分解が亢進し、プロテアソーム阻害剤の孵置にて Smad7 発現の減少が抑制されたことから、SIRT1 過剰発現 MMC における Smad7 発現量の減少はユビキチン-プロテアソームを介した蛋白分解亢進によるものと考えられた。さらに、SIRT1 過剰発現 MMC における Smad7 発現量減少およびユビキチン化亢進が、点変異 SIRT1 (H355A) 過剰発現にて抑制されたことから、SIRT1 の Smad7 蛋白分解亢進作用には SIRT1 の脱アセチル化作用が直接関与していたものと考えられた。

MMC において、Smad7 過剰発現によりアポトーシスが誘導され、RNA 干渉を用いた Smad7 発現抑制により TGF β 誘発アポトーシスが抑制されたことから、MMC の TGF β 誘発アポトーシスに細胞内 Smad7 発現が重要であることが確認された。Smad7 誘発、TGF β 誘発アポトーシスは共に Smad7 蛋白発現が減少する SIRT1 過剰発現 MMC では抑制され、Smad7 蛋白が増加する SIRT1 抑制 MMC では増強することが明らかとなった。

【考察】近年、SIRT1 の核内蛋白に対する脱アセチル化活性により細胞死などの生理作用を制御しうることが報告されつつあり、新たな標的蛋白の同定が進められているが、本研究により、TGF β シグナル制御蛋白の一つである Smad7 が SIRT1 の脱アセチル化活性の新たな標的蛋白であることが明らかとなった。更に、SIRT1 が MMC において Smad7 の細胞内蛋白量を制御し、さらに TGF β 誘導アポトーシスを抑制しうることが示された。これまでに、我々は SIRT1 が転写因子 p53 の脱アセチル化を介し、酸化ストレスによる MMC のアポトーシスを抑制することも報告しており、今回の結果も含め、SIRT1 が腎メザンギウム細胞において、様々な刺激に対するアポトーシスを抑制し、細胞保護に働く可能性が示唆された。腎メザンギウム細胞のアポトーシスは腎糸球体疾患の発症・進展に関わっていることから、今後、SIRT1 の活性化が腎疾患の治療標的になりうる可能性が示唆された。

【結論】Smad7 が抗老化遺伝子 SIRT1 の新たな標的蛋白であり、SIRT1 による Smad7 の細胞内蛋白発現量調節が、腎メザンギウム細胞における TGF β 誘発アポトーシスの抑制機構の一つであることが明らかとなった。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	545	氏名	久米 真司
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>本研究は、メザンギウム細胞における SIRT1 の TGFβ誘導アポトーシスの抑制効果を検討したものである。</p> <p>メザンギウム細胞において、TGFβによりアポトーシスが誘導され、このアポトーシスは脱アセチル化酵素・SIRT1 により抑制された。この抑制機構の解明から、TGFβシグナルの細胞内伝達分子の一つである Smad7 が SIRT1 の脱アセチル化活性に対する新たな標的蛋白であることが明らかとなった。SIRT1 は Smad7 の脱アセチル化を介し、Smad7 のプロテアゾームでの蛋白分解の亢進、Smad7 発現量の減少をもたらした。メザンギウム細胞における TGFβ誘導アポトーシスには Smad7 発現が不可欠であることも示され、SIRT1 による Smad7 発現量の減少が、TGFβ誘導アポトーシス抑制機構に関与していたものと考えられた。</p> <p>本論文は糸球体硬化に関与するメザンギウム細胞の TGFβ誘導アポトーシスにおける SIRT1 の役割を解明したものであり、糸球体硬化の発症機構の理解に寄与するものである。よって博士(医学)の学位を授与するに値すると評価された。</p> <p>なお、本学位授与申請者は 2007 年 2 月 1 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け合格と認められた。</p>			
(平成 19 年 2 月 1 日)			