

[別紙 1]

### 論文の内容の要旨

論文題目 ; Region between  $\alpha$ -helices 3 and 4 of the Mad homology 2 domain of smad4: functional roles in oligomer formation and transcriptional activation

和訳 ; Smad4 の Mad homology 2 領域  $\alpha$ Helix3-4loop の機能解析;多量体形成と転写活性

指導教官 幕内雅敏教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 8 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 ; 多田敬一郎

Smads は TGF $\beta$ スーパーファミリーの細胞内情報伝達物質であり、これまでホ乳類では 8 種類同定されている。

Smad はその構造および機能の点からさらに 3 つのグループに分類される。すなわち、特異型 Smad、共有型 Smad、そして抑制型 Smad である。Smad2 と Smad3 は特異型 Smad であり、TGF- $\beta$ /Activin のシグナルを伝達する。Smad1、Smad5、Smad8 は BMP のシグナルを伝達する。Smad4 は共有型 Smad であり、Smad6 と Smad7 は抑制型 Smad である。リガンドがレセプターに結合すると、結果としてセリンスレオニンキナーゼであるレセプターが活性化する。このレセプターによって特異型 Smad がリン酸化を受け、特異型 Smad が活性化される。活性化した特異型 Smad は共有型 Smad と複合体を形成し、細胞質内から核内へ移行し、直接 DNA に結合したり、他の DNA 結合タンパクと複合体を形成することで、さまざまな標的タンパクの転写を調節する。一方、抑制型 Smad は主にレセプターレベルで特異型 Smad の活性化を抑制し、また特異型 Smad と共有型 Smad が複合体を形成するのを抑制することで、リガンドの作用に対して、抑制的に働くのである。

Smad は原則的に、N 端側にある MH(Mad Homology) 1 領域、C 端側にある MH2 領域、および両者をつなぐ Linker 領域という 3 つの領域からなりたっている。MH1 領域と MH2 領域は Smad の間で特に相同性の高い領域である。MH1 領域は DNA に Smad が結合するのに重要な領域である。また MH1 領域は c-Jun やビタミン

ンD リセプターなどの核内蛋白に結合するのにも重要である。一方、MH2 領域は、リセプターとの結合や、Smad の多量体の形成、ある種の DNA 結合蛋白との結合、転写活性の調節で重要である。

Smads Family を概観すると、Smad4 はきわめて特徴のある Smad であることがわかる。まず機能の上では、Smad4 は Mammalian では唯一の共有型 Smad である。また Smad4 は癌抑制遺伝子としても重要である。Smad4 はもともと膵癌の癌抑制遺伝子として、ポジショナルクローニングの手法で'DPC4'の名前で同定され、構造上の類似性から Smad の Family の重要な一員となったのである。さらに、Smad4 は膵癌のほか、胆道癌においても関係が示唆されている。構造の上では Smad4 は、他の Smad に比較して、2 つの特徴がある。まず 1 つ目レセプターのリン酸化部位である SSXS の配列を C 端持たないことである。そして、2 つ目には Smad4 の MH2 領域に 35 アミノ酸のシーケンスが挿入されていることである。これはショウジョウバエの共有型 Smad である MEDEA や線虫の共有型 Smad である Sma4 でも保存されている。この領域は Helix3 と Helix4 に挟まれているので、私は、この領域のことを H3/4loop と命名した。また H3/4loop が Smad4 の立体構造における位置を検討すると、Smad4 の表面に突出している部分にある。この特徴的な領域について現在までその機能的意義は明らかにされていなかった。

そこで私は以下のようなキメラ蛋白と Deletion Mutant を作成し、H3/4loop の機能解析を試みた。すなわち、Smad4 の H3/4loop を含んだ領域を Smad2 の相同領域と置換したキメラ蛋白を作成した。これを Smad4HL2 と命名した。同様に、Smad4 の Helix 3/4 Loop を Smad1 におきかえた Smad4HL1、Smad4 の H3/4 Loop を Smad6 におきかえた Smad4HL6 を作成したさらに H3/4loop を delete させた  $\Delta$ HL も作成した。

最初に Smad2 と Smad4 はリセプターの刺激で 3 量体を形成するが、この中に Smad4 が占める割合を IP-Western 法を用いて検討した。その結果、Smad2 の発現量を変化させても Smad4 同士の結合は認められなかった。in vitro では Smad4 同士の結合や Smad4 の 3 分子による三量体の形成の可能性も報告されているが、一方で、Smad4 同士の結合力は非常に弱く、3 量体を形成する Smad4 の割合も少ないことが報告されている。今回、Smad4 は活性型 Smad2

との3量体の中でも1分子しか存在しないことが示唆された。次に、先に作成した construct を使い、Luciferase Assay をおこなった。Reporter Gene としては、TGF $\beta$  に Response することで有名な p3TP-Lux をもちいた。Wild type Smad4 を発現させても、わずかしか p3TP の転写活性は上昇しない。しかし、Smad4HL2 は dose dependent に p3TP の転写活性を上昇させた。Smad4HL1 も同様に p3TP の転写活性を上昇させた。HL6 および  $\Delta$ HL では、転写活性はほとんど上昇していなかった。

Smad4HL2 の転写活性能を転写因子である TFE3 の存在化でも検討したが、相乗効果は認められず、Smad4HL2 の転写活性能は TFE3 とは独立していることが考えられた。

次に Smad2 存在下で p3TP-Lux の転写活性能を検討した。しかし、Smad2 存在する場合、さらにはレセプターで活性化した Smad2 が存在する場合でも、Wild-type と HL2 の間に転写活性に差は認められなかった。つまり、Smad4HL2 は Smad2 がなくとも p3TP の活性を上昇させられるものの、Wild-type Smad4 の様に Smad2 と協調することはできなかった。Smad4HL6 は Smad2 の転写活性能に全く影響を与えなかった。

Smad4HL2 の作用を pAR3-Lux でも検討したが、Smad4HL2 による高い転写活性能は認められなかった。これは ARF 複合体が DNA に結合するのは同複合体中の FAST1 が主であり、Smad の pAR3 に対する結合は転写活性にほとんど影響を与えないためと考えられた。

Smad4HL2 による p3TP-Lux 活性のメカニズムの解明のため、Smad4 chimera 蛋白が Homo-oligomer 形成するかの検討を行った。FLAG の tag のついた Smad4 と 6Myc の tag の Smad4 を COS7 細胞に Co-transfection した。つぎに、Cell lysate を FLAG の抗体で免疫沈降して、Myc の抗体で Blot した。Smad4HL2 で Wild type に比較して、強い Homo-oligomer のシグナルがみられた。 $\Delta$ HL では Wild type と同程度の Homo-oligomer の形成がみられるが、Smad4HL6 ではほとんど Homo-oligomer の形成はみられなかった。すなわち、転写活性を有する Smad4 は多量体として存在していることが示唆された。

次に Smad4 の DNA に対する結合をゲルシフトアッセイで検討した。DNA は 3TP promoter の一部である AP-1 を使用している。Wild type では DNA に対する結合はほとんどみられない。しかし、

Smad4HL2 では DNA に対する結合は認められた。さらに、Smad4HL2 に抗体を加えると、Band の supershift も認められた。Smad4 の DNA 結合能を DNA-affinity precipitation Assay でも検討した。FLAG-Smad4 を COS7 細胞に transfection した。その後 Cell lysate をビオチン化した DNA と incubate したのち、avidin で沈降して、FLAG の抗体で Blot した。Smad4HL1 と Smad4HL2 の DNA に対する結合能が Wild type に比較して強く、Smad4HL6 のに対する結合能が弱いことが示唆された。

以上、まとめると、活性化した Smad 複合体は 2 分子の Smad2 と 1 分子の Smad4 から形成されることを示した。in vivo で Smad4 が homo-oligomer を形成する可能性はあるものの、その数は圧倒的に少ない。Smad4 が homo-oligomer を効率的に形成できないのは H3/4loop のためではないかと考えられた。Smad1 や Smad2 の H3/4loop 相同部分は homo-oligomer 形成に重要だが、C 端の SSXS motif によってマスクされている。homo-oligomer を形成した Smad は DNA に結合して、転写活性を調節する。Smad4HL2 の転写活性能は T $\beta$ R-I(TD)ほどではないものの、Smad の constitutively active form の作成に将来的に役立つものと考えられた。