

論文の内容の要旨

論文題目 Repression mechanism of BMP signaling by c-Ski
和訳 c-Ski による BMP シグナル抑制機構の解析
指導教官 藤田敏郎教授

東京大学大学院医学系研究科

平成12年4月入学

医学博士課程 内科学専攻

氏名 竹田昌史

従来 c-Ski は Smad2,3,4 と結合し、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)を recruit することにより TGF β /activin シグナルを強く抑制する共役転写抑制因子とされてきた。また c-Ski は BMP シグナルも抑制することが知られているが、c-Ski は BMP シグナルの R-Smad である Smad1,5 とは弱くしか結合せず、BMP シグナル抑制機構は十分には解明されていない。

今回 c-Ski のアミノ酸配列の 181 番目に Ala-Arg-Pro-Gly を挿入した変異体である c-Ski (ARPG) を用いてルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったところ、TGF β シグナルを抑制するが、BMP シグナルは全く抑制しないことを見いだした。そこで、c-Ski (ARPG)を用いて、Ski による BMP 抑制機構の解析を試みた。

まず c-Ski (ARPG)による選択的なシグナル抑制が、細胞培養の系でも見られるかどうかを検討した。C2C12 細胞は BMP 刺激によって骨芽細胞様に分化し、アルカリホスファターゼ(ALP)を産生することが知られている。アデノウィルスを用いて C2C12 細胞に c-Ski 又は c-Ski (ARPG)を遺伝子導入し、BMP 刺激による ALP 活性の上昇を測定したところ、c-Ski は ALP 活性の上昇を抑制したが、c-Ski (ARPG)は抑制しなかった。また、NMuMG 細胞は TGF β 刺激によって球形から紡錘形に形態変化を起こすことが知られている。アデノウィルスを用いて NmuMG 細胞に c-Ski 又は c-Ski (ARPG)を遺伝子導入し、TGF β 刺激による形態変化を観察したところ、c-Ski, c-Ski (ARPG) 共に形態変化を抑制

した。このように、細胞培養の系でも c-Ski (ARPG)の選択的なシグナル抑制が確認された。

次に *Xenopus* 胚の系で c-Ski (ARPG) によるシグナル抑制を検討した。*Xenopus* 胚に c-Ski の mRNA をマイクロインジェクションすると、内因性の BMP シグナルを抑制することにより 2 次軸形成が起こることが知られている。そこで c-Ski と c-Ski (ARPG) mutant を比較検討したところ、c-Ski (ARPG) では 2 次軸形成の頻度が著しく低かった。また *Xenopus* 胚に activin をコードした RNA をマイクロインジェクションすると中胚葉マーカーである muscle actin を発現することが知られているが、c-Ski を同時にコードすると muscle actin の発現は消失し、c-Ski (ARPG)でも同様であった。このように c-Ski (ARPG) は *Xenopus* 胚の系においても BMP シグナル抑制能が選択的に低いことが判明した。

このような ARPG mutant による TGF β /activin シグナル選択的な抑制機構を解析するために、活性型 Smad 複合体に HDAC を recruit できるかどうかを検討した。wild type の c-Ski は Smad3-Smad4 複合体、Smad5-Smad4 複合体双方に HDAC を recruit したが、c-Ski (ARPG)は Smad3-4 複合体にのみ HDAC を recruit し、Smad5-4 複合体に HDAC を recruit しなかった。c-Ski (ARPG) と Smad との相互作用を検討したところ、c-Ski (ARPG) は活性型 Smad3 とは結合できるが、Smad4 とは結合できないことが判明した。Smad4 と結合できない別の変異体 c-Ski (W274E) を用いてルシフェラーゼアッセイを行ったが、ARPG と同様 TGF β シグナルを抑制したが BMP シグナルを抑制しなかった。以上より c-Ski は Smad3, Smad4 両方と結合して HDAC を recruit することによって TGF β シグナルを抑制しているが、BMP シグナル抑制の場合は Smad4 との結合のみに依存していることが示唆された。(Fig1)

c-Ski は従来 R-Smad, Co-Smad のヘテロマーに結合し、HDAC を recruit することによって転写を抑制すると考えられてきた。しかし Wu らは昨年、Smad4-Ski 複合体の結晶構造解析を行い、Ski は R-Smad, Co-Smad と別々の部位で結合し、さらに Smad4 の R-Smad 結合部位の高次構造を変化させ、活性型 Smad 複合体の形成を阻害することによって、TGF β /activin シグナルを抑制することを示した (CELL, Vol.111,357-67,Nov 1, 2002)。(Fig2)

そこで、c-Ski (W274E)および(ARPG)を用いた免疫沈降を行い、c-Ski が Smad3-Smad4 と結合する際に Smad のヘテロマー形成を阻害するかどうか

ついて検討した。その結果 c-Ski (ARPG)、(W274E)は直接 Smad4 と結合することはできないが、活性型 Smad3 存在下では c-Ski (ARPG),(W274E)と Smad4 は共沈することが判明した。これは Ski が Smad3-Smad4 のヘテロマー形成を阻害しないため Smad3 を介して Smad4 が共沈するからだと考えられる(Fig3)。さらに Smad3-Smad4 複合体に c-Ski を加えていくと、dose-dependent に Smad3-Smad4 の結合を増強することが示された。

【結論】 c-Ski は TGF β /activin シグナルにおいては R-Smad, Co-Smad 両方と、BMP シグナルにおいては Co-Smad のみと結合することによって、HDAC を recruit し、転写を制御している。Smad4 と結合しない c-Ski (ARPG) は TGF β /activin シグナルのみを特異的に抑制するツールとしても有用であると考えられる。また TGF β シグナルにおいては、c-Ski が Smad 複合体と結合する際、ヘテロマー形成を阻害せず、むしろ Smad 間の結合を強固にする。

Fig1

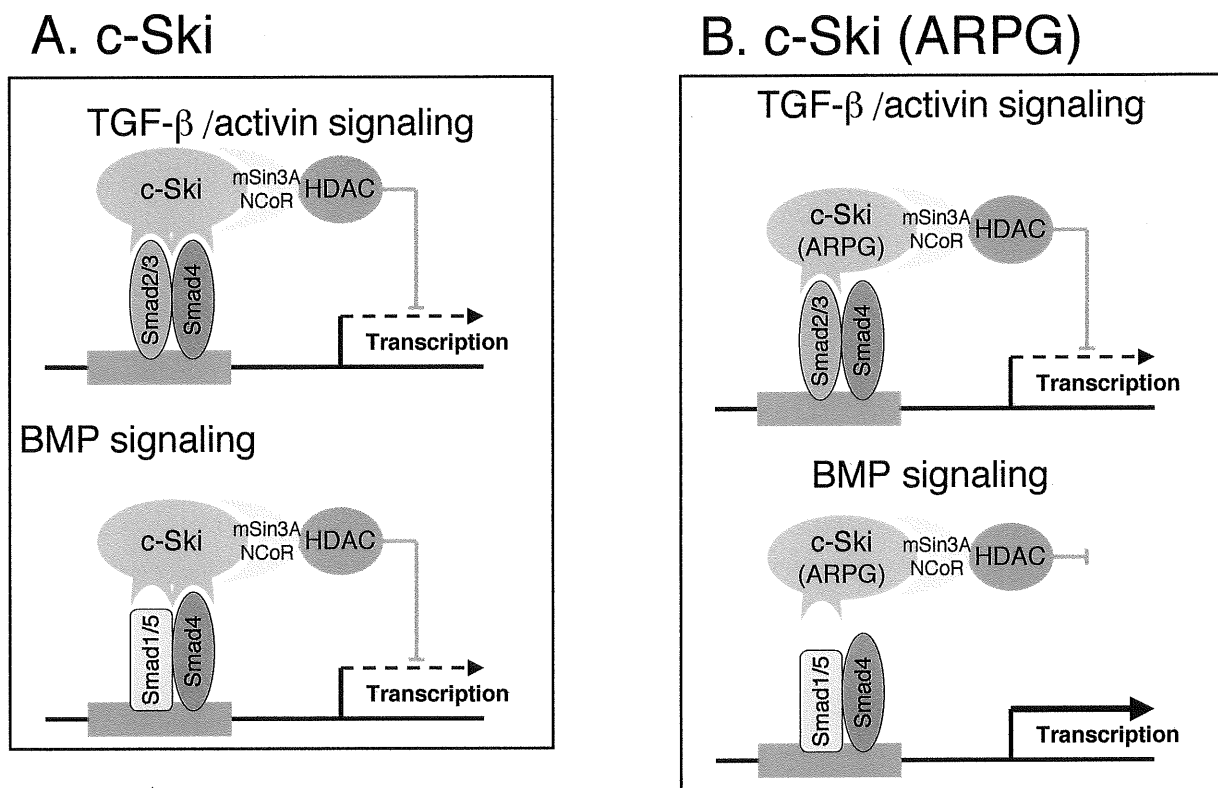
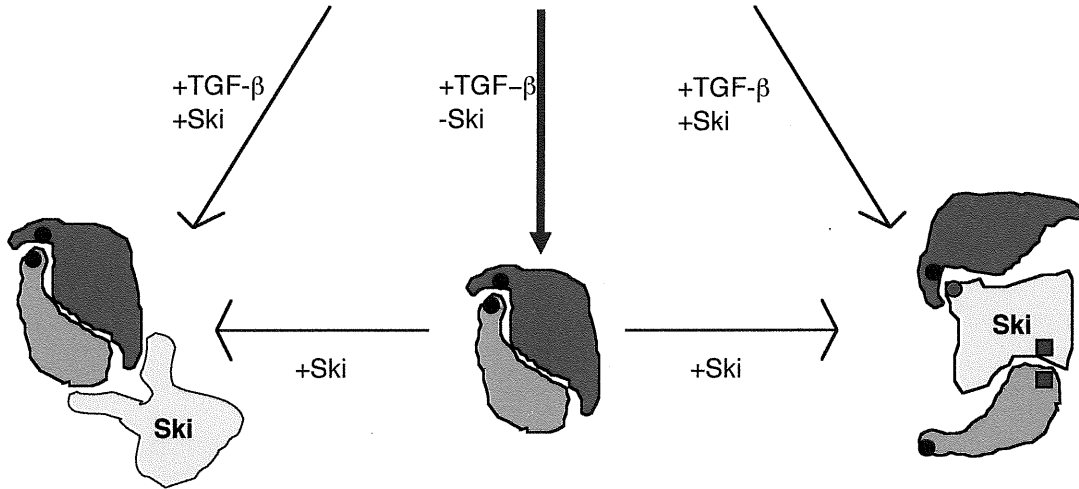
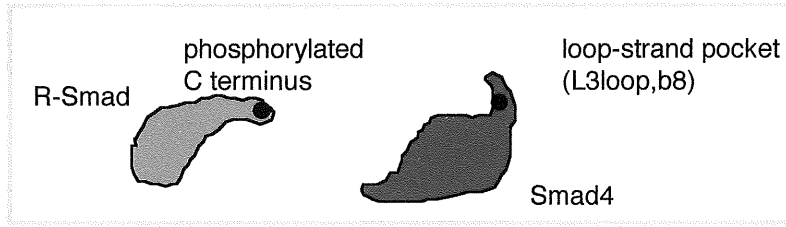


Fig2



活性型Smad複合体に結合
Qin et al. (2002)

非活性型Smad複合体に結合
Wu et al. (2002)

Fig3

