

論文の内容の要旨

論文題目 Smad6 による BMP シグナル抑制機構の解析

指導教員 宮園 浩平 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 後藤 幸一郎

TGF- β スーパーファミリーに属している BMP (bone morphogenetic protein) には現在までに 10 種類以上もの分子が同定されている。これらは BMP ファミリーを形成し、その構造の類似性に基づき BMP-2/4 グループ、OP (osteogenic protein)-1 グループ や GDF (growth-differentiation factor)-5 グループなど、いくつかのサブファミリーに分類される。BMP は器官形成を含む胚発生や成体における組織修復など生理的に重要な役割を果たしている。また、BMP シグナルの異常がヒトの疾患に深く関与する例も知られている。

BMP が細胞表面に存在する I 型・II 型のセリン・スレオニンキナーゼ型受容体に結合するとこれらの受容体はヘテロ四量体を形成する。その複合体の中で II 型受容体は I 型受容体をリン酸化して活性化する。活性化した I 型受容体は Smad タンパク質を介して細胞内にシグナルを伝達する。Smad タンパク質には I 型受容体によりリン酸化される特異型 Smad およびリン酸化した特異型 Smad と結合する共有型 Smad がある。これらはヘテロ複合体をつくり細胞質から核内へと移行し、他の転写因子などと協調的に働き、標的遺伝子の発現を調節する。この他にシグナルをネガティブに制御する抑制型 Smad として Smad6 と Smad7 が知られている。Smad6 は BMP シグナルを、Smad7 は TGF- β , BMP シグナル全般を抑制すると考えられている。また、両者ともに BMP シグナルの直接の標的遺伝子であり、ネガティブフィードバック因子であると位置づけられている。

BMP の I 型受容体は 4 種類、II 型受容体は 3 種類同定されている。I 型受容

体として ALK (activin receptor-like kinase)-1, ALK-2, ALK-3, ALK-6 が知られている。これらのうち、ALK-1 と ALK-2 の相同性と ALK-3 と ALK-6 の相同性が高い。これら 4 種類の BMP I 型受容体に対する種々の BMP の親和性は多様である。さらに各 BMP I 型受容体によりリン酸化される特異型 Smad の種類に関しても違いが見られる。このように BMP の多彩な生物活性は I 型受容体の異なったリガンドに対する結合、リン酸化される特異型 Smad の種類、さらには自己のシグナルによって発現が誘導される抑制型 Smad によるシグナル調節などに起因していると考えられる。

これまで Smad6 は BMP シグナルを全般的に抑制するものと考えられていた。しかし、今回、私は BMP の I 型受容体である ALK-2 と ALK-3 を用いて、Smad6 の BMP シグナル抑制作用が I 型受容体に対して選択性をもつことを見出した。

種々の BMP リガンドによる骨芽細胞分化誘導能の違いを調べる目的でマウス筋芽細胞株 C2C12 とマウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 を BMP-2 (BMP-2/4 グループ) と BMP-6 (OP-1 グループ) の等用量で刺激した。刺激 1 時間後において直接の標的遺伝子である Id1 の発現誘導はどちらも同程度であった。しかし、刺激 48 時間後では初期骨分化マーカーである alkaline phosphatase (ALP) の発現誘導に劇的な違いがみられ、BMP-6 は BMP-2 よりも効果的にその発現を誘導することが分かった。また、その条件下ではどちらの細胞においても BMP-6 の方が BMP-2 より持続的に Smad5 のリン酸化を引き起こした。しかし BMP-2 や 6 による Smad5 のリン酸化持続性は protein phosphatase の影響を受けなかった。すなわち、BMP-2 または 6 のシグナルの違いは I 型受容体のキナーゼ活性の維持に起因していることが示唆された。そこで、BMP-2 または 6 刺激によるキナーゼ活性持続性の違いに主に Smad6 や 7 が関与していると考え、それらの抑制活性を詳細に検討した。

C2C12 を用いて BMP-2 や 6 のシグナルに対する Smad6 と 7 の抑制効果をルシフェラーゼレポーターアッセイで検討した。Smad7 はどちらの刺激に対してもシグナルを抑制するのに対し、Smad6 の抑制効果は BMP-6 のシグナルに対して弱かった。すなわち、BMP-2 と BMP-6 のシグナルでは抑制型 Smad、特に Smad6 に対する感受性が異なることが示唆された。そこで、これらのシグナルにより発現が誘導される Smad6 のノックダウンを行い、ALP の発現を検討した。その結果、BMP-6 より BMP-2 の方が刺激 36 時間後における ALP の発現が効果的に上昇した。また、その条件下での Smad5 のリン酸化においても BMP-6 より BMP-2 の方が、Smad5 のリン酸化を効果的に持続させた。すなわち、BMP-2 シグナルは BMP-6 シグナルより Smad6 に対する感受性が高いことが示唆された。BMP-2 は I 型受容体のうちで ALK-3 や ALK-6 と結合するのに対し、BMP-6 は主に ALK-2 に結合する。また、C2C12 や MC3T3-E1 では ALK-2

と ALK-3 が発現している。以上から私は BMP-2 と BMP-6 シグナルにおける Smad6 の感受性の違いは、Smad6 の各 BMP I 型受容体への作用の違いであると考えた。そこで、C2C12 と MC3T3-E1 を用いて恒常活性型 ALK-2 や 3 のシグナルに対する Smad6 と 7 の抑制効果をルシフェラーゼレポーターアッセイで検討した。どちらの細胞においても Smad7 は ALK-2 または 3 によるシグナルを効果的に抑制したが、Smad6 の抑制効果は ALK-3 に選択的であった。さらに、ALK-2 による Smad5 のリン酸化は Smad6 により抑制されにくく、ALK-2 と Smad6 の結合は、ALK-3 と Smad6 の結合と比べて非常に弱いことが分かった。すなわち、ALK-2 と 3 に対する Smad6 の抑制効果の違いは、ALK-2 と 3 に対する Smad6 の相互作用の違いに起因していることが考えられた。

そこで、私は ALK-3 の Smad6 結合部位の同定を試みた。ALK-2 と ALK-3 の細胞内ドメインのアミノ酸配列の相同性は 58 % である。これら受容体の細胞内ドメインを 5 つの領域に分割し、ALK-2 をベースとして 5 つの恒常活性型 ALK-2/ALK-3 キメラ受容体を作製した。これらのキメラ受容体のシグナルに対する Smad6 の抑制効果をルシフェラーゼレポーターアッセイで検討した結果、Smad6 の抑制作用に影響する 36 アミノ酸からなる細胞内領域 (ALK-3 I234-A269) を見出した。さらに ALK-3 のこの領域に存在し Smad6 との相互作用に重要なアミノ酸残基を同定するため、ALK-2 と ALK-3 の当該領域のアミノ酸配列を比較し、異なるアミノ酸を互いに置換した様々な変異受容体を作製した。各変異受容体のシグナルに対する Smad6 と 7 の抑制効果をルシフェラーゼレポーターアッセイで検討した結果、最終的に ALK-3 の R238, FT264-265, A269 の 4 アミノ酸残基が Smad6 との相互作用に影響するアミノ酸であることが示唆された。そこでそれら 4 つのアミノ酸を ALK-2 と 3 で同時に置換した ALK-2 変異体 (E212R, SS238/239FT, K243A) と ALK-3 変異体 (R238E, FT264/265SS, A269K) を作製し、それらの抑制型 Smad の感受性をルシフェラーゼレポーターアッセイで検討した。ALK-2 変異体によるシグナルは ALK-3 と同様に Smad6 により効果的に抑制された。一方、ALK-3 変異体によるシグナルは Smad6 によりほとんど抑制されなかった。また、ALK-3 と比較すると ALK-3 変異体による Smad5 のリン酸化は Smad6 により抑制されにくく、Smad6 との結合は減弱する結果が得られた。以上のことから私は、ALK-3 の 4 つのアミノ酸残基 (R238, FT264-265, A269) が Smad6 の感受性に深く関与していると結論した。

Smad6 は BMP I 型受容体を介した全てのシグナルを特異的に抑制すると考えられていた。しかし、BMP I 型受容体に対して Smad6 による抑制作用に選択性があることが今回の研究で初めて明らかとなった。これらの結果ともう 1 つの抑制因子 Smad7 の BMP I 型受容体に対する抑制作用が詳細に解析される

ことにより、**BMP** シグナルの調節機構がさらに明らかにされることが期待される。**BMP** シグナルを適切に制御し、調節することができれば、発生や分化のメカニズム、そのシグナル異常による疾患との関係がさらに詳細に明らかになることが予想される。こうした研究により、**BMP** シグナルが再生医療など様々な臨床の場で役立つことが期待される。