

審査の結果の要旨

氏名 後藤 幸一郎

本研究は発生や種々の分化過程などにおいて重要な役割を果たしていると考えられる骨形成因子（BMP）シグナルの調節機構について、抑制因子 Smad6 に注目して、その新たな役割を明らかにすることを目的としている。マウス筋芽細胞株（C2C12）およびマウス骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1）を BMP により骨分化誘導する系と C2C12 およびアフリカミドリザル腎由来細胞株（COS7）を用いた過剰発現系において、BMP-2, BMP-6 シグナルおよび BMP I 型受容体（ALK-2, ALK-3）によるシグナルに対する Smad6 の抑制作用を詳細に解析し、下記の結果を得ている。

1. BMP-2 および BMP-6 で C2C12 細胞、MC3T3-E1 細胞を各々刺激し、誘導される遺伝子の発現を定量的 PCR 法で検討した。直接的標的遺伝子（Id1）の発現は同程度であるが、初期骨分化マーカーである alkaline phosphatase (ALP) の発現は BMP-6 刺激時の方が顕著に高い事が分かった。この条件下で BMP 受容体の下流のエフェクターである Smad1/5 のリン酸化を western blot で検討した。その結果、BMP-2 刺激より BMP-6 刺激の方が持続的な Smad1/5 のリン酸化を引き起こすことを見出した。BMP-2 と BMP-6 によるシグナル伝達能の差異のメカニズムを明らかにするため、BMP シグナルのネガティブフィードバック因子として知られる Smad6 の抑制作用に注目して検討を進めた。
2. BMP-2 および BMP-6 のシグナルに対する Smad6 の抑制作用を

luciferase assay で検討したところ、Smad6 は BMP-6 より BMP-2 シグナルを効果的に抑制する事から、これらのシグナルでは Smad6 に対する感受性が異なることが示された。また、内因性の Smad6 を knockdown した際の ALP の発現を定量的 PCR 法で検討したところ、BMP-6 刺激より BMP-2 刺激により誘導される ALP の発現が増加する事が示された。この条件下での Smad1/5 のリン酸化の持続性を western blot で検討したところ、BMP-6 刺激より BMP-2 刺激の方が顕著にその持続性を向上することが示された。したがって、BMP-6 より BMP-2 シグナルは内因性 Smad6 に対する感受性が高い事が示された。

3. C2C12 細胞、MC3T3-E1 細胞では BMP-2 は受容体として ALK-3, BMP-6 は ALK-2 を主に利用してシグナル伝達することが知られている。そこで、BMP-2 および BMP-6 のシグナルに対する Smad6 感受性の差異は ALK-2 および ALK-3 に対する Smad6 感受性の差異に由来することが考えられた。恒常的活性型 ALK-2 および ALK-3 による転写活性化能と Smad5 リン酸化能に対する Smad6 の抑制作用を luciferase assay と western blot で各々検討した。Smad6 は ALK-3 による転写活性化能および Smad5 リン酸化能を効果的に抑制するが、ALK-2 に関してはそれらに対する Smad6 の抑制作用が弱い事が示された。また、ALK-3 と比べると ALK-2 は Smad6 との結合が弱い事が示された。したがって、これらのシグナルに対する Smad6 の抑制作用の差異は各々 I 型受容体との相互作用に起因している事が示された。
4. ALK-3 の Smad6 への感受性に影響するアミノ酸残基を同定するために様々な変異受容体を作製し、それらのシグナルに対する Smad6 の抑制作用を luciferase assay で検討した。ALK-3 上の 4 つのアミノ酸残基 (R238/F264/T265/A269) が Smad6 への感受性に関与している事が示された。これらを互いに相同な部位で置換し

た ALK-2 変異体 (E212R/S238F/S239T/K243A) および ALK-3 変異体 (R238E/F264S/T265S/A269K) によるシグナルに対する Smad6 の抑制作用を検討した結果、Smad6 は ALK-3 変異体より ALK-2 変異体によるシグナルを効果的に抑制する事が示された。また、それらの結合を調べると ALK-2 変異体は Smad6 と強力に結合する一方、ALK-3 変異体は Smad6 との結合が弱くなる事が示された。したがって、Smad6 は ALK-3 の 4 つのアミノ酸残基 (R238/F264/T265/A269) に結合して、そのシグナルを抑制することが考えられた。

5. BMP I 型受容体として ALK-2, ALK-3 以外に ALK-1 と ALK-6 が知られている。ALK-1 は ALK-2 と ALK-6 は ALK-3 とサブグループを形成している。ALK-3 の Smad6 感受性に影響する 4 つのアミノ酸残基と相同な部位を ALK-1, ALK-2, ALK-6 で比較すると、ALK-6 は高度に保存されているが、ALK-2 同様 ALK-1 は異なっている事が分かった。これらのシグナルに対する Smad6 の抑制作用を luciferase assay で検討したところ、Smad6 は ALK-6 によるシグナルを効果的に抑制するが、ALK-1 によるシグナルに対してはその抑制作用が弱い事が示された。

以上、本論文は BMP により C2C12 および MC3T3-E1 を骨分化誘導する系と C2C12 および COS7 を用いた過剰発現系において、BMP シグナルに対する Smad6 の抑制作用に選択性が存在するという興味深い事実を明らかにした。未だに不明な点の多い BMP シグナル調節機構において本研究は重要な貢献をなすものであり、学位の授与に値するものと考えられる。