

Smad6のタンパク質量制御機構の解明

大場, 悠生

<https://hdl.handle.net/2324/2236172>

出版情報 : Kyushu University, 2018, 博士 (創薬科学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

氏名	大場 悠生
論文名	Smad6 のタンパク質量制御機構の解明
論文調査委員	主査 九州大学 教授 黒瀬 等
	副査 九州大学 教授 藤田 雅俊
	副査 九州大学 准教授 渡 公佑
	副査 九州大学 准教授 仲矢 道雄

論文審査の結果の要旨

TGF- β /BMP は、胚発生や骨形成、がんの腫瘍形成などを制御する重要なサイトカインであり、Smad を介して細胞内シグナルを伝達する。Smad ファミリーは、Smad1-8 の 8 種類で構成されているが、これら Smad タンパク質の安定性に関しては不明な点が多い。そこで申請者は、8 種類の Smad タンパク質の半減期を調べた。その結果、Smad6 の半減期が、他の Smad と比較して明らかに長いことを見出した。Smad6 は BMP シグナルを抑制する分子として知られているが、そのタンパク質量がどのように調節されているかについては、ほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、Smad6 のタンパク質量を制御する分子を同定し、その制御機構を明らかにすることを目的とした。

はじめに質量分析計を用いて Smad6 と結合するタンパク質を網羅的に探索した結果、NEDD4 というユビキチンリガーゼが同定された。その後、*in vitro* ubiquitin assay により、NEDD4 が Smad6 を直接ポリユビキチン化することを確認した。ユビキチン化されたタンパク質の多くは、プロテアソームによって分解されることが知られている。そこで、NEDD4 が Smad6 のタンパク質の分解を促進しているのではないかと考え、以下の実験を行なった。

まず NEDD4 が Smad6 のタンパク質量を制御する可能性を検討した。その結果、NEDD4 を過剰発現させると、意外なことに、そのユビキチンリガーゼ活性に依存して Smad6 のタンパク質量が増加することを見出した。反対に、NEDD4 をノックダウンすると Smad6 の半減期は有意に短くなった。以上の結果から、NEDD4 は Smad6 を安定化させると考えられた。

続いて、なぜ NEDD4 は Smad6 を分解へと導くのではなく、安定化させるのかについて検討した。プロテアソームにより分解へと導かれるポリユビキチン鎖の多くは、ユビキチンの 48 番目のリジン (K) を介したものであることが知られている。質量分析計により解析した結果、NEDD4 による Smad6 のポリユビキチン化は、ユビキチンの 48 番目のリジン (K48) を介したのではなく、63 番目のリジン (K63) を介したものであった。このポリユビキチン鎖の違いが、分解ではなく、安定化という現象を生み出したと考えられる。

次に、NEDD4 による Smad6 のユビキチン化部位の同定を試みた。Smad6 の 12 個のリジン (K) のそれぞれ 1 つのみを残した変異体と質量分析計を用いて解析した結果、NEDD4 は Smad6 の C 末端側の 7 カ所のリジン (K290、K328、K387、K396、K430、K438、K469) をユビキチン化することが明らかとなった。実際にこれら 7 カ所のリジン (K) をアルギニン (R) に置換した Smad6 7KR では、NEDD4 によるユビキチン化は観察されなかった。さらにこの Smad6 7KR タンパク質は、WT と比較して、不安定であることを見出した。

Smad6 は BMP シグナルを抑制し、高い腫瘍形成能を持つ乳がん幹細胞の数を増加させることで、乳がんの腫瘍形成を促進することが報告されている。そこで、NEDD4 による Smad6 のユビキチン化が乳がんの腫瘍形成に与える影響について検討した。まず Smad6 WT、Smad6 7KR を発現させたマウス乳がん細胞株 4T1 細胞を作成し、フローサイトメトリーにより 4T1 細胞における乳がん幹細

胞 (CD24⁺/CD44⁺) の割合を計測した。その結果、Smad6 WT の過剰発現により増加した乳がん幹細胞の割合が、Smad6 7KR の過剰発現により有意に減少した。さらにヌードマウスの皮下に 4T1 細胞を移植することにより、乳がん幹細胞が持つ腫瘍形成能を評価した。その結果、Smad6 WT で見られた腫瘍の増大が、Smad6 7KR では減弱していた。以上の結果から、Smad6 7KR は、NEDD4 による安定化を受けないことで、WT と比較して、乳がんの腫瘍形成能が減弱すると考えられた。

一方で、基質に付加されたポリユビキチン鎖は、脱ユビキチン化酵素によって切断される。そこで、NEDD4 が Smad6 に付加したポリユビキチン鎖を切断する脱ユビキチン化酵素の同定を試みた。質量分析計を用いて Smad6 に結合する脱ユビキチン化酵素を網羅的に探索し、USP5 という脱ユビキチン化酵素を同定した。*In vivo ubiquitin assay* を行ったところ、USP5 は NEDD4 による Smad6 のユビキチン化を阻害することが明らかになった。さらに USP5 は、NEDD4 が Smad6 に付加したポリユビキチン鎖を切断することで、Smad6 を不安定化させることを見出した。

最後に、USP5 が乳がんの腫瘍形成に与える影響について検討した。Smad6 WT を安定発現させた 4T1 細胞に、USP5 WT あるいはユビキチンリガーゼ活性欠損体である USP5 C335A を共発現させ、フローサイトメトリーにより 4T1 細胞における乳がん幹細胞の割合を計測した。その結果、Smad6 WT の過剰発現により増加した乳がん幹細胞の割合が、USP5 WT の共発現により有意に減少した。一方で、USP5 C335A の共発現では、乳がん幹細胞の割合は減少しなかった。さらにヌードマウスの皮下に 4T1 細胞を移植したところ、Smad6 WT で見られた腫瘍の増大が USP5 WT の共発現では抑制されたが、USP5 C335A の共発現では抑制されなかった。以上の結果から、USP5 はそのプロテアーゼ活性依存的に Smad6 を不安定化させることで、乳がんの腫瘍形成を抑制すると考えられた。

これまで、Smad6 のタンパク質量の制御機構はほとんど明らかになっていなかった。本研究で、NEDD4 が Smad6 にユビキチンの K63 を介したポリユビキチン鎖を付加することで、Smad6 を分解へと導くのではなく、逆に安定化させることを見出した。このユビキチン化による安定化という現象は珍しいものであり、ユビキチン研究分野にインパクトを与えるものと考えられる。さらに、NEDD4 により付加された Smad6 のポリユビキチン鎖が、脱ユビキチン化酵素である USP5 によって切断され、その切断により Smad6 は不安定化させることを明らかにした。また、乳がんにおいて、NEDD4 によるユビキチン化を受けない Smad6 7KR では、Smad6 WT と比較して、乳がんの腫瘍形成能が減弱することが明らかとなった。一方で、USP5 は Smad6 を不安定化させることで、乳がんの腫瘍形成を抑制することを見出した。以上のことから、NEDD4 と USP5 が Smad6 のタンパク質量を調節することで、乳がんの腫瘍形成を制御すると考えられた。

本研究は、ユビキチンが持つ多様な機能の解明や乳がんの腫瘍形成メカニズムの解明において高い重要性を持つものであり、薬学や分子生物学の進歩にとって有意義な貢献をなすものである。したがって、本学位請求論文は博士（創薬科学）の学位に値すると認める。