

## 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 :

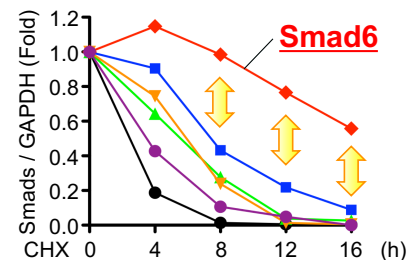
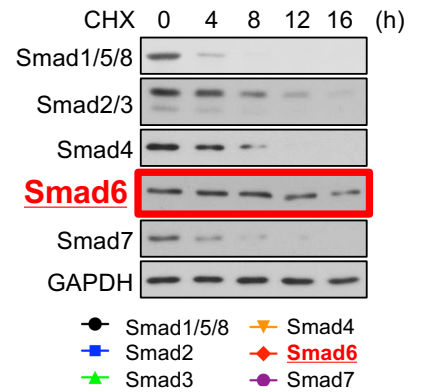
権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

# Smad6 のタンパク質量制御機構の解明

薬効安全性学分野 3PS16003K 大場 悠生

## 【序論】

TGF- $\beta$ /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。そこで私たちは、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[図 1]。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。そこで私たちは、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。



[図 1] Smad6 の半減期は、他の Smad と比べて長い

## 【方法】

### 質量分析計を用いた Smad6 と結合する分子の網羅的探索

マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞に FLAG-Smad6 を過剰発現させ、FLAG に対する抗体を用いて免疫沈降をした。そのサンプルを質量分析計にて解析することにより、Smad6 と結合する分子を網羅的に探索した。

### Smad タンパク質の半減期の測定

タンパク質の合成を阻害するシクロヘキシミド(CHX)を C2C12 細胞に処置し、経時的にサンプルを回収した。その後、Western Blotting を行うことにより、各 Smad タンパク質の半減期を求めた。

フローサイトメトリーによる乳がん幹細胞の割合の計測

CD44、CD24 に対する抗体を用いて、Smad6 あるいは USP5 を安定発現させたマウス乳がん細胞株 4T1 細胞を染色し、フローサイトメトリーにより乳がん幹細胞(CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>)の割合を計測した。

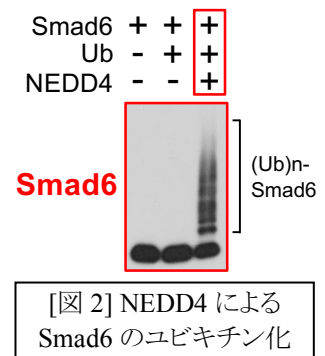
### 乳がん細胞の皮下移植

Smad6 あるいは USP5 を安定発現させた 4T1 細胞 1000 個をヌードマウスの皮下に移植した。4 日おきにノギスを用いて腫瘍の体積を計測し、移植してから 24 日後に腫瘍を摘出した。

## 【結果・考察】

### 1. Smad6 のユビキチンリガーゼとして NEDD4 を同定

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、NEDD4 というユビキチンリガーゼを同定した。実際に NEDD4 は Smad6 を直接ポリユビキチン化した[図 2]。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。

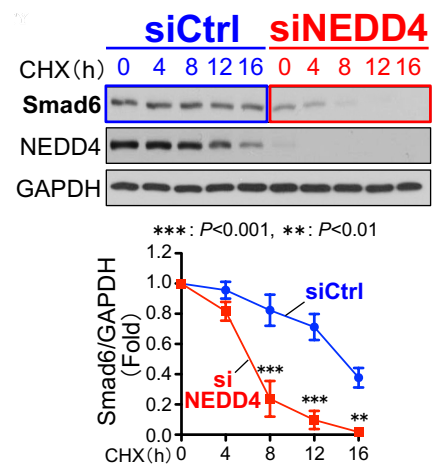


### 2. NEDD4 は Smad6 を分解へと導くのではなく、逆に安定化させる

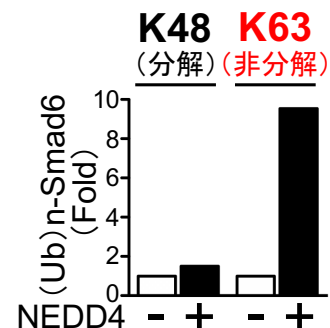
まず NEDD4 が Smad6 のタンパク質量を制御する可能性を検討した。その結果、NEDD4 を過剰発現させると、意外なことに、そのユビキチンリガーゼ活性に依存して Smad6 のタンパク質量が増加することを見出した。反対に、NEDD4 をノックダウンすると Smad6 の半減期が有意に短くなった[図 3]。以上の結果から、NEDD4 は Smad6 を安定化させると考えられた。

それではなぜ、NEDD4 は Smad6 を分解へと導くのではなく、安定化させるのであろうか。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[図 4]。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。

さらに私たちは、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 の半減期は、WT と比較して顕著に短いことを見出した。



[図 3] NEDD4 をノックダウンすると Smad6 の半減期が短くなる

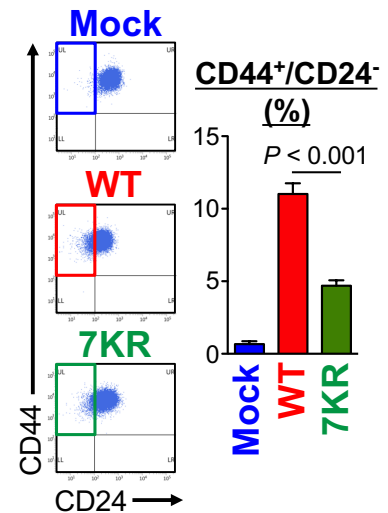


[図 4] K63 を介した NEDD4 による Smad6 のユビキチン化

### 3. NEDD4 によるユビキチン化を受けない Smad6 7KR を乳がん細胞に発現させると、

#### Smad6 WT と比較して乳がんの腫瘍形成が抑制される

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 (Gao H et al., *Cell.*, 2012)。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、フローサイトメリーにより 4T1 細胞における乳がん幹細胞 (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>) 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 [図 5]。さらにヌードマウスの皮下に上記の 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 [図 6]。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、Smad6 WT と比較して、乳がんの腫瘍形成能を減弱させると考えられた。

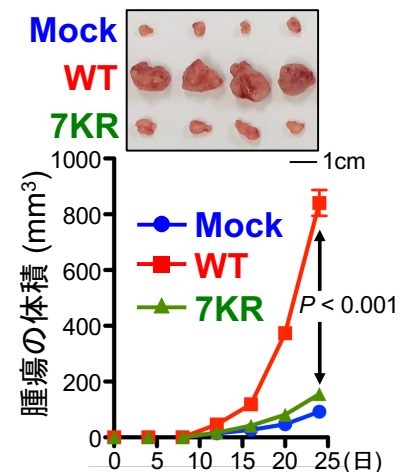


[図 5] Smad6 7KR では Smad6 WT と比較して乳がん幹細胞の割合が減少する

### 4. 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として USP5 を同定

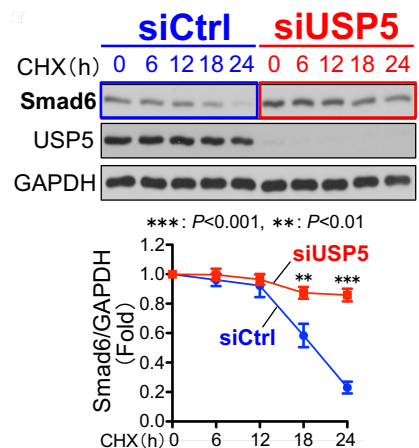
一方で、基質に付加されたポリユビキチン鎖は、脱ユビキチン化酵素によって切断される。そこで私たちは、NEDD4 が Smad6 に付加したポリユビキチン鎖を切断する脱ユビキチン化酵素の同定を試みた。質量分析計を用いて Smad6 に結合する脱ユビキチン化酵素を網羅的に探索し、USP5 という脱ユビキチン化酵素を同定した。実際に USP5 は、NEDD4 が付加した Smad6 のユビキチン鎖を切断した。さらに、USP5 をノックダウンすると、Smad6 の半減期が延長することが見出した [図 7]。これらの結果から、USP5 は NEDD4 が Smad6 に付加したポリユビキチン鎖を切断することで、Smad6 を不安定化させると考えられた。



[図 6] Smad6 7KR は WT と比較して腫瘍形成能が低い

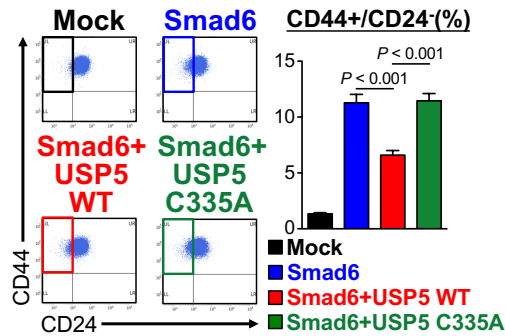
### 5. USP5 は乳がんの腫瘍形成を抑制する

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 あるいはプロテアーゼ活性欠損体である USP5 C335A を共発現させ、フローサイトメリーにより 4T1 細胞における乳がん幹細胞の

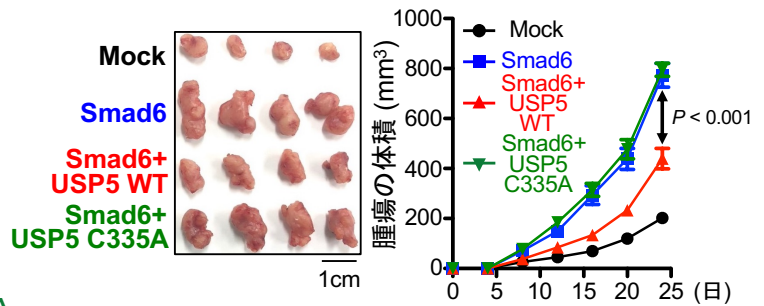


[図 7] USP5 をノックダウンすると Smad6 の半減期が延長する

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[図 8]。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[図 9]。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。



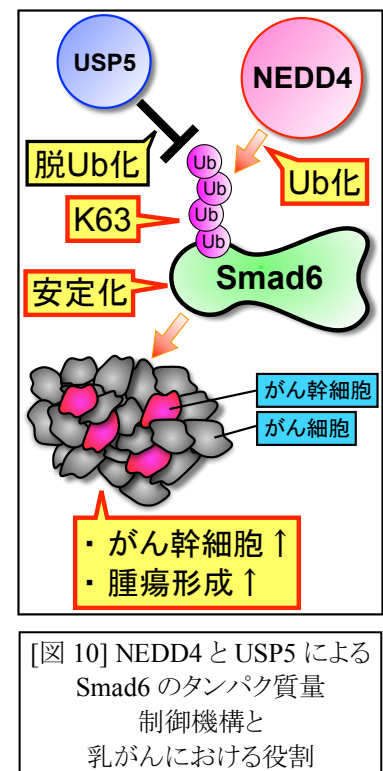
[図 8] USP5 は乳がん幹細胞の割合を減少させる



[図 9] USP5 は腫瘍形成能を減弱させる

## 【まとめ】

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 は不安定化す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[図 10]。本研究成果が、Smad6 のタンパク質量制御機構や乳がんの腫瘍形成機構の解明につながることを期待する。



[図 10] NEDD4 と USP5 による Smad6 のタンパク質量制御機構と乳がんにおける役割

## 【主な発表論文】

1. **Ohba Y** (1 番目), ..., & Kurose H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2015)
2. Nagasaka A\*, **Ohba Y**\* (1 番目), Kurose H & Nakaya M. *Macrophage.* (2015) (\*: equal contribution)
3. Nagasaka A, ..., **Ohba Y** (6 番目), ..., & Kurose H. *Sci. Rep.* (2017)