

# 研究題目 Smad6 の翻訳後修飾を介した BMP シグナル制御機構の解明

## 研究組織

研究代表者：仲矢 道雄（九州大学大学院薬学研究院薬効安全性学分野）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：大場 悠生、廣中 貴則（九州大学大学院薬学府薬効安全性学分野）

## 【1】研究の概要

### [1-1]本研究の目的・概要

Smad6 は、骨形成タンパク質 BMP が BMP 受容体に結合することによって惹起されるシグナル伝達を抑制する分子である（図 1）。BMP シグナルは、骨形成を促進するだけでなく、初期発生や細胞分化、さらには発がんにも関与する重要なシグナル伝達である。

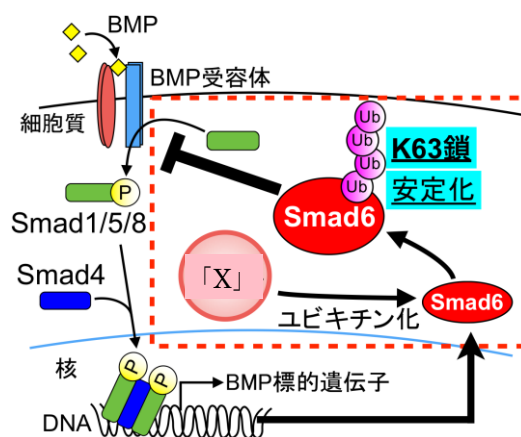
研究代表者らは、昨年度の本共同利用により、質量分析計を用いて Smad6 の新たなユビキチンリガーゼとして「X」を同定した。興味深いことに、「X」による Smad6 のポリユビキチン化は、一般的に良く知られた、タンパク質分解へと導く、ユビキチンのリジン 48（K48）を介したポリユビキチン化ではなく、リジン 63（K63）を介したポリユビキチン化であった。

そしてこの「X」による Smad6 の K63 を介したポリユビキチン化は、Smad6 を安定化することを見出した（図 1）。

そこで今年度の共同利用では、「X」による Smad6 のユビキチン化部位を同定し、「X」による Smad6 の安定化機構の解明を目指した。

### [1-2]研究の方法・経過

HEK293 細胞に「X」と Smad6 を過剰発



現させ、免疫沈降を行った。その後、免

図 1. BMP シグナルにおける Smad6 の役割と「X」による Smad6 のユビキチン化

疫沈降物を酵素処理し、質量分析計によって Smad6 のユビキチン化部位を探索した。

さらに parallel reaction monitoring (PRM) 法を用いたターゲット質量分析によってユビキチン化ペプチドを精密定量し、同定したユビキチン化部位のうち、「X」の発現によってユビキチン化量が増加する部位を絞り込んだ。その結果、Smad6 のいくつかのリジン残基が、「X」によってユビキチン化されることを見出した。

そこで次に、「X」によってユビキチン化されると考えられる Smad6 の 7 箇所のリジンの全てをアルギニンに置換した Smad6 変異体 (Smad6 7KR) を作成し、この Smad6 変異体 (Smad6 7KR) におい

て、「X」によるユビキチン化が認められなくなるかを検討した。その結果、Smad6 7KR は、「X」によるユビキチン化をほとんど受けないことが明らかとなった。

続いて、この Smad6 7KR の安定性を調べた所、Smad6 7KR は、そのタンパク質の半減期が、顕著に短くなった (図 2)。従って、「X」による K63 を介したポリユビキチン化は、Smad6 のタンパク質の安定性に大きく貢献していると考えられた。

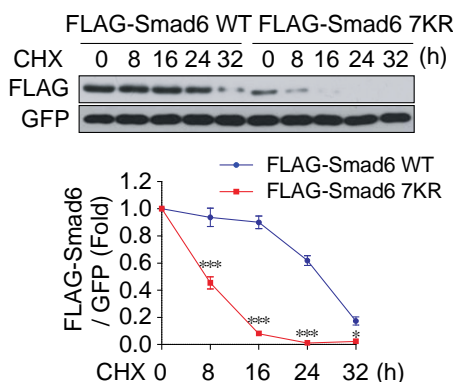


図 2. 「X」によるユビキチン化を受けない Smad6 7KR 変異体は、Smad6 WT の場合と比べ、タンパク質の半減期が短くなる

## 【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

Smad6 を安定化させるユビキチンリガーゼ、およびそのユビキチンリガーゼによる Smad6 のユビキチン化サイトを同定することができた。さらに、そのユビキチン化が、Smad6 の安定性に大きく寄与することを見出した。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

Smad6は、BMPシグナルの重要な制御分子であるが、これまでその活性化や安定化の制御メカニズムは殆ど明らかになっていなかった。従って、本研究は、BMPシグナル研究にインパクトを与えるものと考えられる。

## 【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

2) [書籍]著者名.題名. In : 編集者名・編書籍名.出版社,発行地, 頁-頁,発行年

なし

[3-2]学会発表

1) 発表者名.題名.学会名, 発表地, 発表月日, 発表年

Michio Nakaya, Yuki Ohba, Takanori Hironaka, Hidetaka Kosako, Hitoshi Kurose. Identification of an E3 ubiquitin ligase that stabilizes Smad6 and inhibits BMP signaling. 12<sup>th</sup> International BMP Conference, Tokyo, October 24<sup>th</sup>, 2019

[3-3]成果資料等

なし

## 【4】今後の課題等

今後は、「X」による Smad6 のポリユビキチン化の生理的な役割を調べたいと考えている。Smad6 を過剰発現させると、がんが悪化・再発しやすくなることが知られている。そこで、「X」による Smad6 のユビキチン化が、腫瘍形成能に与える影響を調べていく予定である。