

# 研究題目 Smad6 のユビキチン化を担う分子群の同定とそれら分子の BMP シグナルにおける機能解明

## 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：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。

研究代表者らは、昨年度まで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。また、「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、さらにその安定化が、がんの腫瘍形成を促進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」によって付加される Smad6 の K63 ポリユビキチン鎖を切断する脱ユビキチン化酵素を同定することを目的とした。

### [1-2] 研究の方法・経過

HEK293 細胞に Flag-Smad6 を過剰発現させ、Flag 抗体による免疫沈降を行った。その後、免疫沈降物を酵素処理し、質量分析計によって Smad6 に結合する脱ユビキチン化酵素を探索した。

その結果、Smad6 と結合する可能性がある脱

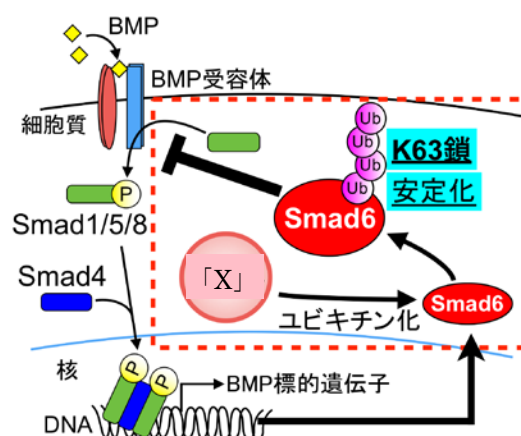


図 1. BMP シグナルにおける Smad6 の役割と「X」による Smad6 のユビキチン化

ユビキチン化酵素として、USP9X と USP「Y」の 2 分子を同定した。そこで、これらの脱ユビキチン化酵素が「X」による Smad6 のポリユビキチン鎖を取り除くかについて、HEK293T 細胞を用いた脱ユビキチンアッセイにより評価した。その結果、USP9X ではなく、USP「Y」を発現させることで、「X」による Smad6 のポリユビキチン化が著しく減少することが明らかになった(次ページ図 2)。

次に、私たちは USP「Y」と Smad6 の結合を確認するため、HEK293T 細胞に FLAG-Smad6 WT 及び HA-USP「Y」を発現させ、抗 FLAG 抗体磁気ビーズを用いて、免疫沈降を行った。その結果、USP「Y」は Smad6 と結合することを見出した。実際、C2C12 細胞において、内在性の USP「Y」と Smad6 は結合した。

次に、USP「Y」の脱ユビキチン化活性をなくした変異体 USP「Y」C-to-A を用いて、脱ユ

ビキチンアッセイを行った。その結果、USP「Y」WTを発現することで抑制される Smad6 のポリユビキチン化が USP「Y」C-to-A では抑制されないことが明らかになった。この結果に一致して、C2C12 細胞において USP「Y」をノックダウンすると、Smad6 のポリユビキチン化が増加することを見出した。

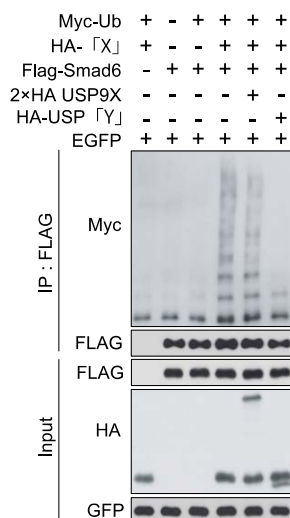


図 2.  
「Y」は「X」による Smad6 の K63 を介したポリユビキチン鎖を切断する

## 【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「X」によって付加される Smad6 の K63 ポリユビキチン鎖を切断する脱ユビキチン化酵素を同定することができた。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

これまで、Smad6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と考えられる。

## 【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

1) [雑誌]

廣中貴則, 大場悠生, 黒瀬等, 仲矢道雄  
「がんの進行における抑制型 Smad の役割」  
日本薬理学会誌、154、No. 1 : 44 (2019)

2) [書籍]

なし

[3-2]学会発表

1) 廣中 貴則、大場 悠生、長坂 明臣、仲矢 道雄、黒瀬 等. Smad6 を安定化させ、BMPシグナルを抑制するユビキチンリガーゼの同定、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2019, 8月31日, 2019年

[3-3]成果資料等

なし

## 【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

「X」による Smad6 のポリユビキチン化は、腫瘍形成能を促進することを見出している。そこで今後は、「Y」による Smad6 の脱ユビキチン化が、腫瘍形成能に与える影響を調べていく予定である。