

氏名・所属・職位

仲矢道雄 九州大学大学院 薬学研究院 薬効安全性学分野 准教授

大場悠生 九州大学大学院 薬学研究院 薬効安全性学分野 大学院生

研究項目

共同利用 A3 (プロテオーム解析) (担当: 細胞情報学分野 小迫英尊教授)

研究題目

GRK2 による BMP シグナルの制御機構の解明

研究目的

Gタンパク質共役型受容体キナーゼ(GRK)は、活性化したGタンパク質共役型受容体 (GPCR) をリン酸化することで、GPCRを脱感作へと導くキナーゼとして知られてきた。一方で近年、GRKがGPCR以外の細胞内タンパク質をリン酸化したり、それらと相互作用したりすることで、様々な生理機能に関与することが明らかになってきた (図1)。申請者らは、GRKの新規結合分子を探索する中で、GRK2がSmad6という分子と結合することを見出した (図2)。

Smad6は、骨形成タンパク質BMPにより活性化されるシグナルを抑制する、抑制型Smadとして知られている。BMPシグナルは、骨形成を促進するだけでなく、初期発生や細胞増殖・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 (図3)。

上記のように、GRK2がSmad6と結合することから、GRK2がSmad6を介してBMPシグナルを制御する可能性が考えられた。そこでGRK2のBMPシグナルへの関与を調べた所、GRK2がSmad6のユビキチン化状態を制御することで、BMPシグナルを促進することを見出した。そこで、

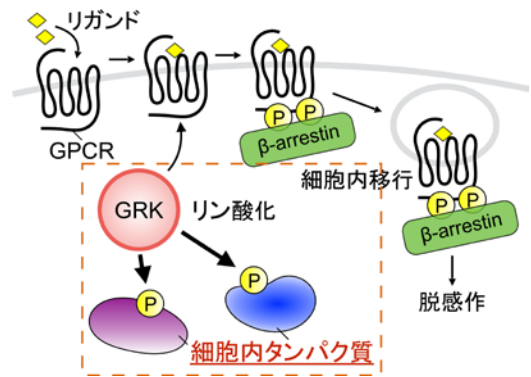


図 1. GRK による GPCR および細胞内タンパク質のリン酸化

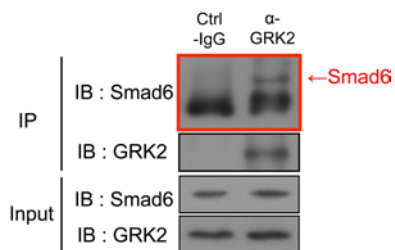


図 2. C2C12 細胞における GRK2 と Smad6 の相互作用

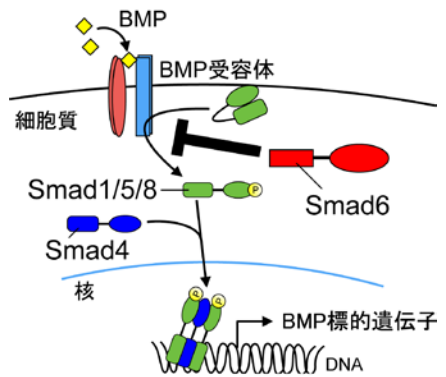


図 3. Smad6 による BMP シグナルの抑制

本研究課題では、①Smad6のユビキチンリガーゼとユビキチン化部位の同定、②GRK2がSmad6をリン酸化する可能性の検討を通じて、GRK2によるBMPシグナルの制御機構の解明を目的とした。

研究成果

Smad6のユビキチンリガーゼを同定するために、FLAG-Smad6を過剰発現させたHEK293細胞の細胞溶解液に対して、anti-FLAG抗体を用いた免疫沈降を行い、その免疫沈降物に対して質量分析計を用いた解析を行った。その結果、Smad6のユビキチンリガーゼ候補分子をいくつか同定することができた。その後、それぞれの候補分子について*in vitro* ubiquitin assayを行い、ユビキチンリガーゼNEDD4がSmad6を直接ポリユビキチン化することを明らかにした。さらにparallel reaction monitoring (PRM)法を用いてユビキチン化されたペプチドの定量を行った結果、NEDD4によりユビキチン化量が増加するSmad6のユビキチン化部位を複数ヶ所、同定することに成功した。

一方で、*in vitro* kinase assayにより、GRK2がSmad6を直接リン酸化する可能性を検討した。その結果、Smad6はGRK2の直接の基質ではないことが明らかになった。しかしながら、質量分析計を用いた解析の過程で、Smad6のいくつかの残基がリン酸化されることを見出した。これら残基のAla変異体をそれぞれ作成し、それらAla変異体のBMPシグナルへの影響を調べた。その結果、あるリン酸化部位のAla変異体は、野生型Smad6に比べ、BMPシグナルへの抑制効果が減弱していた。すなわち、このSmad6の残基のリン酸化は、Smad6によるBMPシグナルの抑制効果を増強すると考えられた。

論文

なし（投稿準備中）

学会発表

第16回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム2017

「GRK2はSmad6を介してBMPによる骨芽細胞の分化を促進する」

2017.9.9-10, 北海道大学（札幌市）