

## 学位論文の要約 (研究成果のまとめ)

氏 名 椿原 裕太郎

学位論文名 骨芽細胞における Arkadia の機能解析と新規標的タンパク質 Smad6 の同定

---

### 学位論文の要約

#### 【背景】

TGF- $\beta$ /BMP シグナルにおいてリガンドの受容体への結合後、Smad2, 3 および Smad1, 5, 8 がそれぞれリン酸化され、Smad4 と複合体を形成後、核内へと移行して標的遺伝子の活性化を行う。TGF- $\beta$ /BMP シグナルの制御因子として、Smad のリン酸化を抑制する Smad6, Smad7 と Smad 複合体による転写活性化を抑制する c-Ski, SnoN などが存在する。またその他の制御系としてユビキチン・プロテアソーム系が知られている。

E3 ユビキチンリガーゼである Arkadia は TGF- $\beta$ /BMP シグナルの抑制因子である Smad7, c-Ski, SnoN をいずれもユビキチン化し、プロテアソームを介した分解系へと導くことで、TGF- $\beta$ /BMP シグナルを活性化する。骨芽細胞分化は TGF- $\beta$ /BMP シグナルによって厳密に制御されており、BMP は骨芽細胞分化を促進し、一方で TGF- $\beta$  は抑制作用を示す。Arkadia は両シグナルを活性化することから、骨芽細胞分化において何らかの役割を担っていると考えられるが、Arkadia ノックアウトマウスは胎生致死であるため、骨における Arkadia の役割は明らかにされていない。

#### 【目的】

骨芽細胞分化における Arkadia の役割を明らかにし、さらに Arkadia の標的分子の同定とそれに対する作用の解明を目的とした [Tsubakihara, 2015 : 主論文]。

#### 【方法】

骨芽細胞は出生直後のマウスの頭頂骨を単離後、 $\alpha$ -MEM 培地で培養後に骨から出現してくる細胞を実験に使用した。骨芽細胞に sh-Arkadia 発現レンチウイルスベクターを感染させ、コンフルエントになったことを確認後、アスコルビン酸、 $\beta$  グリセロフォスフェート、BMP2 によって骨芽細胞の分化誘導を行った。骨芽細胞分化の確認には、分化誘導後 7 日目に ALP 染色、14 日目に von Kossa 染色を行った。また分化誘導後 0, 1, 3, 7, 14 日目の細胞から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法を用いて各種分化マーカーの発現を確認した。Arkadia と Smad6 の結合実験、Arkadia による Smad6 のユビキチン化実験には各種発現ベクターを COS-7 細胞

にトランスフェクションし、共免疫沈降法を用いた。ArkadiaによるSmad6の分解はHaloTagシステムを利用してpulse-chase実験を行った。Smad6およびArkadiaによるBMPシグナルへの作用についてはBMP応答配列の3GC2を利用し、ルシフェラーゼアッセイによって評価を行った。

#### 【結果】

骨芽細胞においてArkadiaをノックダウンすると後期分化の指標である石灰化が抑制され、また分化マーカーのmRNA発現も分化誘導の後期でのみ抑制された。ArkadiaはTGF- $\beta$ /BMPシグナルを活性化するが、前者は骨芽細胞分化に抑制的、後者は促進的に働くことから、ArkadiaはBMPシグナルを優位に活性化していると考えられた。さらにTGF- $\beta$ シグナルを抑制した条件でArkadiaをノックダウンしても石灰化および各種分化マーカーの発現が抑制されたことで、Arkadiaが骨芽細胞においてBMPシグナルを選択的に活性化していることが確認された。しかしながらArkadiaの既知の標的分子であるSmad7, c-Ski, SnoNはTGF- $\beta$ およびBMPシグナルの両方を抑制することから、ArkadiaはBMPシグナルを優位に抑制する未知の標的分子を分解へと導くことで骨芽細胞分化を促進すると考えられた。そこで我々はBMPシグナルを選択的に抑制するSmad6がArkadiaと結合するという報告に着目し [Koinuma 2003 : 参考論文]、ArkadiaとSmad6の結合を再確認した後、その結合に重要な配列について検討した。またArkadiaによってSmad6がポリユビキチン化されること、またこのユビキチン化がプロテアソームによる分解に重要である48番目のリジン残基を介して行われていること、さらにはArkadiaがユビキチンリガーゼ活性依存的にSmad6を分解へと導くことを明らかにした。最後にArkadiaのBMPシグナルへの影響を確認したところSmad6によるBMPシグナルの抑制がArkadiaによって解除されることを明らかにした。

#### 【結論】

本研究結果よりArkadiaは骨芽細胞分化過程においてBMPシグナルを優位に活性化することで分化を促進すると考えられた。またArkadiaの新規標的タンパク質としてSmad6を同定し、ArkadiaがBMPシグナルを選択的に抑制するSmad6をユビキチン化し分解へと導くことを明らかにした。なお、この学位論文の内容は以下の原著論文に既に採択済みである。

主論文 : Tsubakihara Y, Hikita A, Yamamoto S, Matsushita S, Matsushita N, Oshima Y, Miyazawa K, Imamura T: Arkadia enhances BMP signaling through ubiquitylation and degradation of Smad6. *The Journal of biochemistry*, 2015

参考論文 : Koinuma D, Shinozaki M, Komuro A, Goto K, Saitoh M, Hanyu A, Ebina M, Nukiwa T, Miyazawa K, Imamura T, Miyazono K: Arkadia amplifies TGF-beta superfamily signaling through degradation of Smad7. *The EMBO Journal* 22:6458-6470, 2003 DOI: 10.1093/emboj/cdg632