

(第7号様式)

学位論文審査結果の要旨

氏 名	椿原 裕太郎
審 査 委 員	主査 安川 正貴 副査 東山 繁樹 副査 北澤 理子 副査 山田 武司 副査 大沼 俊名

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

審査結果の要旨

【研究の背景】 TGF- β および 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- β および 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- β および 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- β および BMP シグナルを活性化する。骨芽細胞分化は TGF- β および 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- β 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。

【研究の目的】 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て研究を遂行した。

【方法】 骨芽細胞は出生直後のマウスの頭頂骨を単離後、コラゲナーゼとトリプシンによる酵

素処理を行い、 α -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、培養後 5-6 日目に細胞密度がコンフルエントになったことを確認後、アスコルビン酸、 β グリセロフォスフェートおよび 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、ルシフェラーゼレポーター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- β および 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- β 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- β 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、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】 骨芽細胞分化において TGF- β と BMP は相反する作用を示す。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。

本研究に関する公開審査会は平成 27 年 1 月 19 日に開催され、申請者は研究成果を分かり易く明快に英語で発表した。その後、審査委員と下記の点について活発な質疑応答がなされた。1) 他の cofactor の存在の可能性も含めた分子間相互作用、2) Smad6 のユビキチン化に関するデータの解釈、3) 実験結果の時間的変化と解釈、4) 他細胞におけるデータの普遍性、5) Arkadia overexpression 実験系など。申請者はこれらの質問に対して、全体的確に答え、関連領域の知識も十分に有していると高く評価された。以上のことから、審査委員会は全員一致で本研究論文が学位授与に十分値するものと判断した。