

セリン-スレオニンキナーゼ型レセプターによる 細胞内シグナル伝達機構

Study on the Signal Transduction by Serine-threonine Kinase Receptors

(研究プロジェクト番号: JSPS-RFTF 96L00304)

プロジェクトリーダー

宮園 浩平 (財) 癌研究会癌研究所生化学部・嘱託部長

コアメンバー

川畑 正博 (財) 癌研究会癌研究所生化学部・主任研究員

今村 健志 (財) 癌研究会癌研究所生化学部・主任研究員

野田 哲生 (財) 癌研究会癌研究所細胞生物部・部長



1. 研究目的

TGF- β (transforming growth factor- β) は多くの細胞の増殖を抑制する因子であり、TGF- β のレセプターやシグナル伝達に関与する分子は癌抑制遺伝子として働く。TGF- β や骨形成因子 (bone morphogenetic protein; BMP) は 2 種類のセリン-スレオニンキナーゼ型レセプターに結合し、Smad と呼ばれる分子を介して細胞内にシグナルを伝達する^{1,2)}。本研究プロジェクトではセリン-スレオニンキナーゼ型レセプターのシグナル伝達機構を Smad を中心に系統的に明らかにし、さまざまな疾患の病因の解明と治療法の確立のための基礎データを得ることを目的とする。そのために、(1) 下等動物を用いたセリン-スレオニンキナーゼ型レセプターのシグナル伝達の研究、(2) 哺乳類細胞でのセリン-スレオニンキナーゼ型レセプターのシグナル伝達の研究、(3) 遺伝子ターゲティングによるセリン-スレオニンキナーゼ型レセプターのシグナル伝達の研究という 3 つの研究の柱を作ってプロジェクトを推進した。

2. 研究成果概要

(1) 下等動物を用いたセリン-スレオニンキナーゼ型レセプターのシグナル伝達の研究:

ショウジョウバエには TGF- β の類縁因子 decapentaplegic (Dpp) が存在する。我々は酵母 two-hybrid 法を用いて Dpp のレセプター Thick veins と結合するアポトーシス抑制因子 Drosophila inhibitor of apoptosis-1 (DIAP1) をクローニングした。次にショウジョウバエの Smad 様分子、Mad、dSmad2、Medea と Dad の研究を行った³⁾ (図 1)。その結果、Medea はレセプターの刺激依存性に Mad と複合体を作り、Dad が Mad のリン酸化をレセプターレベルで抑制することを示した。また dSmad2 はアクチビンレセプター様分子 Atr-I によって特異的に活性化され、TGF- β やアクチビン様のシグナルを伝達することを確認し、ショウジョウバエにも TGF- β / アクチビン系の分子が存在し、細胞の増殖を調節していることを明らかにした。さらに Dpp の下流に存在する転写因子 Schnurri が Mad と結合することを示し、Schnurri の機能を分子生物学的に明らかにした。

以上のようなショウジョウバエの Smad 様分子の作用は哺乳類の Smad のそれと極めて類似したものであり、ショウジョウバエの解析結果は哺乳類の Smad の研究に大きく貢献した。

(2) 哺乳類細胞でのセリン-スレオニンキナーゼ型レセプターのシグナル伝達の研究:

哺乳類では 1~8 まで 8 種類の Smad が報告されている (図 1)。我々は Smad6 が他の Smad と異な

り TGF- β や BMP のシグナルを抑制する働きを持つことを明らかにした⁴⁾ (図 2)。Smad6 は TGF- β の I 型レセプターなどと安定的に結合し、Smad1 や Smad2 がレセプターによって活性化されるのを妨げ、シグナルを抑制した。さらに我々は Smad6 の mRNA の発現が BMP や TGF- β の刺激で著しく上昇することを明らかにした。このことはリガンドの刺激によりシグナルが自己調節的に抑制されることを示唆しており、シグナル伝達の新しい調節機構の存在が明らかとなった。さらに我々は、Smad2 と Smad3 がレセプターの刺激によって Smad4 とともにオリゴマー (三量体) を形成することを明らかにした⁵⁾ (図 2)。三量体の構造は Smad2 (または Smad3) が 2 分子に対し Smad4 が 1 分子からなることが示唆された。

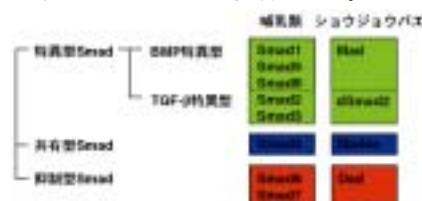


図 1. Smad の分類

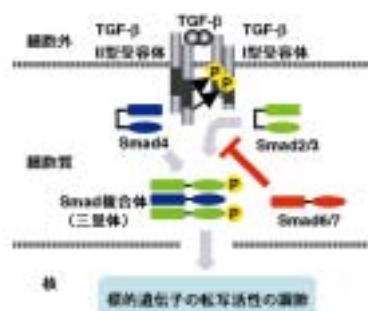


図 2. 哺乳類の TGF- β シグナル伝達機構

レセプターによって活性化された Smad は核内に移行した後、標的となるさまざまな遺伝子の転写因子として作用する。まず我々は、BMP に活性化される特異型 Smad (Smad1 や Smad5) が結合する BMP 反応性 DNA 配列を明らかにし、さらにこの配列を組み込んだ reporter vector 作製し、BMP 刺激特異的に反応するレポーターシステムを確立した⁶⁾。次に我々は、Smad と転写因子 Runx の協調作用を明らかにした。Smad は直接 DNA に結合するだけでなく、さまざまな転写因子と結合して間接的に特異的な DNA 配列に結合し、機能を発揮していると考えられる。

さらに我々は、p300 が TGF- β レセプターの刺激依存性に Smad2 や Smad3 と p300 が直接結合し、TGF- β による転写活性を増強することを明らかにした (図 3)。一方、Smad は c-Ski のようなコプレッサーと結合することによって HDAC1 などのヒストン脱アセチル化酵素をリクルートして転写を抑制することもわかった⁷⁾ (図 3)。

我々は、Smad3 が活性化されて核内へ移行した後ユビキチンプロテアソーム系において分解を受けることを明らかにし、Smad3 を認識する E3 ユビキチンリガーゼとして SCF に ROC1 が結合した複合体を同定した⁸⁾。さらに、抑制型 Smad の新たな作用メカニズムとしてもユビキチン化が重要であることを示した。すなわち E3 ユビキチンリガーゼ Smurf1 が Smad7 に結合し、その結果、活性化された I 型レセプターを分解することによって TGF- β の作用に抑制的に働くことが明らかとなった。

我々はアデノウイルスベクターに組み込んだ Smad1 や Smad5 を骨芽細胞前駆細胞に導入することによってこうした細胞の分化を促進することができることを明らかにし、Smad1、5 が BMP のシグナルに重要であることを明らかにした⁹⁾。Smad1 や Smad5 を活性化するレセプターは BMPR-IA、BMPR-IB の他、ALK-2 と ALK-1 の 4 種類があることを明らかにした。また抑制型 Smad である Smad6 や Smad7 を BMP で刺激した骨芽細胞に投与すると分化が著明に抑えられることを明らかにし、*in vivo* での役割を示した。

(3) 遺伝子ターゲティングによるセリン-スレオニンキナーゼ型レセプターのシグナル伝達の研究：

BMP は骨形成促進作用のみでなく、初期発生においても中胚葉誘導、形態形成、アポトーシスなど多彩な作用をもつ。我々はジーンターゲティング法を用いて BMP の II 型レセプター (BMPR-II) 欠損マウスを作製し、その機能を解析した¹⁰⁾。この変異マウスは胎生致死であることが示され、胎生 9.5 日以降は子宮内で死亡し回収できなかった。*in situ* hybridization 法などの結果から、BMPR-II はマウス初期発生の過程で重要な役割を担っており、特に中胚葉誘導などのイベントに必須であることが示された。BMPR-II のホモのノックアウトマウスは発生初期に死亡することが我々の研究によって明らかとなったが、ヘテロの欠損マウスは正常であった。しかし最近、ヒトでは BMPR-II のヘテロの異常により原発性肺高血圧症が起こることが報告された。我々はヒトの原発性肺高血圧症で見られた変異型 BMPR-II の機能を調べたところ優性抑制性に BMP の信号を抑制することが明らかとなった。

3. 結論

我々は本研究を開始してすぐに抑制型 Smad である Smad6 をクローニングしてその機能を明らかにし、Smad を特異型、共有型、抑制型の 3 つに分類したことが本プロジェクトでの最初の大きな発見であった。その後、Smad のシグナル伝達のメカニズムの詳細な解析を行い、さらに Smad に結合するタンパク質を数多く同定し、TGF- β スーパーファミリーの多彩な機能を分子レベルで明らかにした。また、アデノウイルスベクターにレセプターや Smad の遺伝子を組み込むことによってさまざまな細胞への効率のよい遺伝子導入を確立した。これによって BMP がどのようにして骨形成に関与するかなど、TGF- β スーパーファミリーの *in vivo* での働きを詳細に明らかにすることが出来た。

また、本プロジェクトではショウジョウバエのシグナル伝達を分子生物学的に解明することの一つの柱としたが、DIAP1、Dad、Medea、dSmad2、Schnurri などさまざまなショウジョウバエ由来の分子を研究することにより、哺乳類細胞でのこれらの類縁分子の機能を詳細に明らかにすることができた。本プロジェクトでは更に II 型 BMP レセプターなどのノックアウトマウスを作製したが、II 型 BMP レセプターの異常はヒトの原発性肺高血圧症の原因となることが報告され、本研究でこの疾患の診断や治療への応用のための基礎的知見を得ることができたのは大きな成果である。

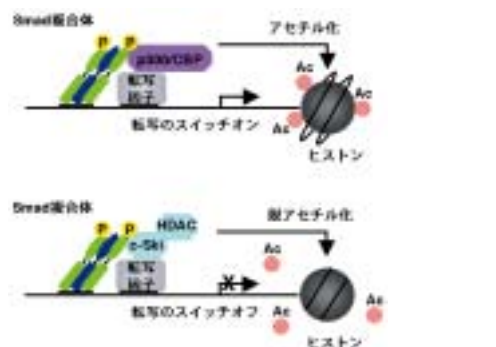


図 3. 核内における、Smad と転写のコアクチベーター、コリプレッサーとの結合と作用

主な発表論文

- 1) Heldin, C.-H., Miyazono, K., and ten Dijke, P.: TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through Smad proteins. *Nature*, 390: 465-471, 1997.
- 2) Miyazono, K.: TGF- β signaling by Smad proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 11:15-22, 2000.
- 3) Inoue, H., Imamura, T., Ishidou, Y., Takase, M., Udagawa, Y., Tsuneizumi, K., Tabata, T., Miyazono, K., and Kawabata, M. (1998) Interplay of signal mediators of Dpp: Molecular characterization of Mothers against dpp, Medea, and Daughters against Dpp. *Mol. Biol. Cell*, 9:2145-2156, 1998.
- 4) Imamura T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J.-i., Kawabata, M. and Miyazono, K.: Smad6 inhibits signalling by the TGF- β super family. *Nature*, 389: 622-626, 1997.
- 5) Kawabata, M., Inoue, H., Hanyu, A., Imamura T., and Miyazono, K.: Smad proteins exist as monomers *in vivo* and undergo homo- and hetero-oligomerization upon activation by serine/threonine kinase receptors. *EMBO J.*, 17: 4056-4065, 1998.
- 6) Kusanagi, K., Inoue, H., Ishidou, Y., Mishima, H.K., Kawabata, M., and Miyazono, K.: Characterization of a bone morphogenetic protein-responsive Smad binding element. *Mol. Biol. Cell*, 11: 555-565, 2000.
- 7) Akiyoshi, S., Inoue, H., Hanai, J.-i., Kusanagi, K., Nemoto, N., Miyazono, K., and Kawabata, M.: c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in TGF- β signaling through interaction with Smads. *J. Biol. Chem.*, 274: 35269-35278, 1999.
- 8) Fukuchi, M., Imamura, T., Chiba, T., Ebisawa, T., Kawabata, M., Tanaka, K., and Miyazono, K. Ligand-dependent degradation of Smad3 by a ubiquitin ligase complex of ROC1 and associated proteins. *Mol. Biol. Cell* 2 (5), 1431-1443, 2001.
- 9) Fujii, M., Takeda, K., Imamura, T., Aoki, H., Sampath, T.K., Enomoto, S., Kawabata, M., Kato, M., Ichijo, H., Miyazono, K.: Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblastic and chondroblastic differentiation. *Mol. Biol. Cell*, 10: 3801-3813, 1999.
- 10) Beppu, H., Kawabata, M., Hamamoto, T., Chytil, A., Minowa, O., Noda, T., and Miyazono, K.: BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos. *Dev. Biol.*, 221: 249-258, 2000.