

2017 (平成 29) 年度 博士学位論文

**c-Abl チロシンキナーゼによる SKIP のチロシンリン酸化を介した  
TGF- $\beta$ /Smad シグナリング制御メカニズムの解析**

千葉大学大学院医学薬学府 先端医学薬学専攻

ゲノム創薬学講座 分子細胞生物学研究室

15JD0102 九鬼 和雅

## 目次

序論・目的.....	2
材料・方法.....	5
結果.....	10
1. c-Ablによる TGF- $\beta$ /Smad シグナリングの増強.....	10
2. c-Ablによる SKIP/Smad3 間の結合の増強.....	10
3. c-Ablによる SKIP のチロシンリン酸化.....	11
3-1. c-Abl のキナーゼ活性依存的な SKIP のチロシンリン酸化.....	11
3-2. 内在性 c-Abl による SKIP のチロシンリン酸化.....	12
3-3. c-Abl による SKIP Tyr <sup>292</sup> 、Tyr <sup>430</sup> 及び Tyr <sup>433</sup> 残基のチロシンリン酸化.....	12
4. SKIP Tyr <sup>292</sup> 残基のチロシンリン酸化による SKIP/Smad3 間の結合の増強.....	13
5. SKIP Tyr <sup>292</sup> 残基のチロシンリン酸化による Smad3 の転写活性の増強.....	15
総括・考察.....	17
参考文献.....	21
図表.....	27
主論文目録.....	34
学位論文審査.....	35
謝辞.....	36

## 序論・目的

トランスフォーミング増殖因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ : TGF- $\beta$ ) は、細胞の増殖、分化、形態変化及び線維化などの多様な細胞応答を制御しているサイトカインである [1-3]。TGF- $\beta$  の機能の中では増殖抑制作用が最も良く研究されているが、癌の転移に関わるとされている上皮間葉分化転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) 作用や細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) を蓄積させることで組織の線維化を促進する作用についても研究が進んでおり、その多様な機能が注目されている [4,5]。TGF- $\beta$  は構造的に類似したスーパーファミリーを形成しており、TGF- $\beta$  スーパーファミリーは、TGF- $\beta$  ファミリー、アクチビンファミリー及び bone morphogenetic protein (BMP) ファミリーの主に3つのサブファミリーから構成される [6]。TGF- $\beta$  サブファミリーに属する TGF- $\beta$  はほぼ全ての組織で産生され、哺乳類では TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 及び TGF- $\beta$ 3 から成る3種類のアイソフォームが報告されている。TGF- $\beta$  は、活性を持たない潜在型 TGF- $\beta$  として分泌されるが、何らかの刺激を受けると小分子量の活性型 TGF- $\beta$  が切り離され、活性型 TGF- $\beta$  が TGF- $\beta$  受容体と結合する [7]。TGF- $\beta$  シグナリングは、セリン/スレオニンキナーゼである TGF- $\beta$  I型受容体 (T $\beta$ R-I) と TGF- $\beta$  II型受容体 (T $\beta$ R-II) によって細胞膜上で開始される [8] (図 1)。まず、活性型 TGF- $\beta$  が細胞膜上の T $\beta$ R-IIへ結合し、T $\beta$ R-IIと T $\beta$ R-Iがヘテロ四量体を形成した後に、T $\beta$ R-IIが T $\beta$ R-Iをリン酸化することで T $\beta$ R-Iが活性化する。TGF- $\beta$  受容体は mothers against decapentaplegic homolog (Smad) を介することで核へのシグナル伝達を行う [9]。Smad は特異型 Smad (receptor-regulated Smad: R-Smad)、共有型 Smad (common-partner Smad: Co-Smad) 及び抑制型 Smad (inhibitory Smad: I-Smad) の3つのグループに分類され、それぞれ異なった役割を果たす [6]。R-Smad に分類される Smad2 及び Smad3

(Smad2/3) は TGF- $\beta$  シグナリングの中で転写因子としての役割を果たす重要な分子である。活性化した T $\beta$ R-IIは細胞質の Smad2/3 をリン酸化する。その後、リン酸化 Smad2/3 は Co-Smad である Smad4 と結合することで核内移行し、例えば activator protein 1 (AP-1) ファミリーに属する c-Jun や JunB といったタンパク質発現に関わる遺伝子の転写を制御し、TGF- $\beta$  シグナリングの調節を行っている [10–12]。また、TGF- $\beta$  シグナリングは、ECM 構成因子である I 型コラーゲンやフィブロネクチンなどの発現を介することで線維化の誘導に関わっており [13]、フィブロネクチンの発現には c-Jun が関与していることも知られている [14]。

近年の研究で、T $\beta$ R-Iや T $\beta$ R-IIのようなセリン/スレオニンキナーゼだけではなく、いくつかの非受容体型チロシンキナーゼも TGF- $\beta$  シグナリングに関わっていることが明らかにされてきた。Src 型チロシンキナーゼ (Src family kinases: SFKs) に属する c-Src [15] は、TGF- $\beta$  によって誘導されるアポトーシスの制御に関与している [16]。また、focal adhesion kinase (FAK) [17] は、Smad 非依存的な TGF- $\beta$  シグナリングの制御に関与している [18]。更に、がん原遺伝子産物である c-Abl [19] (図 2) が TGF- $\beta$  依存的な細胞の形態変化、増殖及び線維化に関与していることが、*in vivo* 及び *in vitro* 試験で明らかにされてきた [20–23]。これらの知見は非受容体型チロシンキナーゼが TGF- $\beta$  シグナリングへ関与していることを示唆しているものの、その詳細な分子機構は未だ明らかにされていない。

c-Abl による TGF- $\beta$  シグナリング制御メカニズムを明らかにするため、我々は質量分析法を用いて c-Abl の基質探索を行った [24,25]。c-Abl に核移行シグナル (nuclear localization signal: NLS) を付加することで NLS-c-Abl を作製し、NLS-c-Abl を安定発現させた HeLa S3 細胞からの抽出液を質量分析に用いた。

抗リン酸化チロシン抗体を用いて免疫沈降することで、NLS-c-Abl 安定発現 HeLa S3 細胞抽出液からリン酸化タンパク質を単離した。その後、単離したリン酸化タンパク質をトリプシンで消化し、質量分析法でリン酸化ペプチドを検出した。その結果、私は c-Abl の新規基質候補として核内受容体共役因子 SKI-interacting protein (SKIP、SNW domain-containing protein 1: SNW1、Nuclear coactivator-62 kDa: NCoA62) を解析することにした (図 3)。SKIP はカルボキシル末端側に NLS を 1 つ持つことで核内に局在している [26]。また、SKIP はビタミン D 受容体 (vitamin D receptor: VDR) や myoblast determination protein (MyoD)、Smad2/3 などの転写に関わる重要な分子と結合することで、それらの活性を調節している [27]。近年の研究で、SKIP は直接 Smad3 と結合し、TGF- $\beta$  シグナリングにおいて Smad3 の転写活性を増強していることが明らかとなっている [28]。c-Abl は TGF- $\beta$  シグナリングに関与しているものの、その制御メカニズムに関わる基質は不明であった。更に、c-Abl は 3 つの NLS を持ち、DNA 損傷などの刺激で核内移行することも知られている [29,30]。そこで、本研究では c-Abl を介した SKIP のチロシンリン酸化と、そのリン酸化が TGF- $\beta$  依存的な SKIP/Smad3 間の結合及び Smad3 の転写活性に与える影響を調べた (図 1)。

## 材料・方法

### プラスミド

ヒト野生型 c-Abl-1b (c-Abl) (Dr. Canaani [31] から供与、Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) 及びその変異体をコードした cDNA を pcDNA4/TO ベクター (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) に組み込んだ [29,32]。SKIP 又は Smad3 をコードした cDNA 断片は、HeLa S3 から得られた total RNA の逆転写産物から PCR 法で合成した。その後、アミノ末端に myc タグ又は Flag タグを結合させ、pcDNA4/TO ベクター (タカラバイオ株式会社、滋賀県草津市、日本) 又は pCMV\_S-FLAG ベクター (理化学研究所 バイオリソースセンター、茨城県つくば市、日本) へそれぞれ組み込んだ。チロシン残基をグルタミン酸又はフェニルアラニンへ置換させた SKIP 点変異体は four-primer polymerase chain reaction (four-primer PCR) 法で作製した [33]。PCR 法に使用したプライマーの配列は表 1 に記した。

### 抗体

抗 c-Jun 抗体 (60A8; Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA)、抗 JunB 抗体 (G53; Cell Signaling Technology, Inc.)、抗 SKIP 抗体 (H-300; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA)、抗 myc 抗体 (9E10; Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、抗 Flag 抗体 (M2 and polyclonal antibody; Merck KGaA, Darmstadt, Germany)、抗 Abl 抗体 (8E9; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)、抗 Actin 抗体 (clone C4; Merck KGaA) 及び抗リン酸化チロシン抗体 (抗 pTyr) (4G10; Merck KGaA) を一次抗体として用いた。

HRP (horseradish peroxidase)-F(ab')<sub>2</sub> 二次抗体として GE Healthcare UK, Ltd. (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) から購入したものを使用した。

## 細胞・遺伝子導入

HeLa S3 細胞 (国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンク、大阪府茨木市、日本) 及び COS-1 細胞は、37°C の条件下で 5% fetal bovine serum (FBS) を含有する Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) で培養した。A549 細胞 (Dr. Tagawa から供与、細胞治療開発研究部、千葉県がんセンター研究所、千葉県千葉市、日本) は、37°C の条件下で 5% FBS を含有する Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で培養した。直径 60-mm の培養皿に細胞を播種し、15 µg の直鎖状 polyethylenimine (25 kDa) (Polyscience, Inc., Warrington, PA, USA) を用いて 3 µg のプラスミド DNA を一過性遺伝子導入した [24]。内在性 c-Abl によるチロシンリン酸化を検出するために、3 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> を用いた。c-Abl を介したチロシンリン酸化を確認するために、20 µM イマチニブ (c-Abl 阻害剤; LC Laboratories, Inc., Woburn, MA, USA)、10 µM SU6656 (SFKs 阻害剤; Merck KGaA)、20 µM PP2 (SFKs 阻害剤; Merck KGaA) 又は溶媒 (dimethyl sulfoxide: DMSO) を用いた。5 ng/mL TGF-β1 (活性型; PeproTech, Inc., Rocky Hill, NJ, USA) 又は溶媒 (4 mM HCl 及び 1 mg/mL bovine serum albumin) は、37°C の条件下で 0.1% FBS を含有する IMDM 又は DMEM に溶解させて用いた。

## ウエスタンブロッティング及び免疫沈降

ウエスタンブロッティングは既報に記された方法に従い、セミドライ式を実施した [25]。SDS サンプルバッファー [50 mM NaF、20 mM  $\beta$ -グリセロリン酸及び 10 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  を含有] を用いて細胞を溶解し、8 又は 10%のポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。その後、パワーサプライを用いて PVDF メンブレン 1  $\text{cm}^2$  あたり 1 mA の電流で約 90 分間通電し、PVDF メンブレンへ転写した。転写済 PVDF メンブレンをブロッキングした後、適切な 1 次抗体及び 2 次抗体で処理し、ECL を基質として化学発光を惹起した。化学発光の強度は、ChemiDoc XRSPlus image analyser (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) 及び Quantity One software (Ver. 4.6.9; Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いて測定した。

免疫沈降は既報に記された方法に従い実施した [25]。TNE バッファー [20 mM Tris/HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、1% Triton X-100、2 mM EDTA、2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  及び 50 mM NaF を含有] を用いて細胞を溶解し、15,000 rpm で 10 分間遠心分離した後、上清を回収した。Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare UK, Ltd.) に抗 myc 抗体を結合させた後、回収した上清に添加し、4°C に設定した低温室で約 3 時間インキュベートさせた。インキュベート後、Protein G Sepharose 4 Fast Flow を回収し、SDS サンプルバッファー [50 mM NaF、20 mM  $\beta$ -グリセロリン酸及び 10 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  を含有] にタンパク成分を溶解させてウエスタンブロッティングに用いた。

## デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ

細胞を 96 ウェルプレートに播種し、pGL4.48[luc2P/SBE/Hygro] ベクター (Promega Corporation, Madison, WI, USA)、pGL4.74[hRluc/TK] ベクター (Promega Corporation)、pCMV\_S-FLAG/Smad3 ベクター及び pcDNA4/TO/SKIP(野生型、Y292E 及び Y292F) ベクターを一過性遺伝子導入した。ルシフェラーゼ活性は、使用説明書に従い Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega Corporation) 及び FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Readers (Molecular Devices, LLC., San Jose, CA, USA) を用いて測定した。具体的な操作を以下に示す。まず、Dual-Glo Luciferase Buffer を Dual-Glo Luciferase Substrate へ全量添加し、Dual-Glo Luciferase Reagent を作製した。続いて、Dual-Glo Stop & Glo Substrate と Dual-Glo Stop & Glo Buffer を 1:100 の割合で混合し、Dual-Glo Stop & Glo Reagent を作製した。Dual-Glo Luciferase Reagent を培地と同量添加することで細胞を溶解し、10 分後にホタルルシフェラーゼの発光を測定した。その後、Dual-Glo Stop & Glo Reagent を培地と同量添加し、10 分後にウミシイタケルシフェラーゼの発光を測定した。

## 定量的リアルタイム PCR

RNeasy Micro Kit (Qiagen N.V., Hilden, Germany) を用いて、細胞溶解液から total RNA を抽出した。精製した total RNA を、High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて一本鎖 cDNA に変換した。ABsolute QPCR ROX Mix (Thermo Fisher Scientific, Inc.)、TaqMan probes (Thermo Fisher Scientific, Inc.) for *JunB* (Hs00357891\_s1) 及び Eco real-time PCR system (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) を用いて、得られた一本鎖 cDNA に関して定量的リ

アルタイム PCR を行った。PCR の反応条件として、95°C で 15 分処理した後、95°C を 15 秒と 60°C を 1 分のサイクルを 45 回繰り返した。得られた *JunB* 遺伝子の発現量をリファレンス遺伝子である *HPRT1* (Hs99999909\_m1) 遺伝子の発現量で補正し、比較 Ct 法 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) で解析した。

## 統計解析

R (Ver. 3.3.2; the R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) のユーザーインターフェースである EZR (Ver. 1.35; 自治医科大学附属さいたま医療センター、埼玉県さいたま市、日本) を用いて統計解析を行った [34]。 $p$  値が 0.05 より小さい時、統計的に有意な差があるとみなした。

## 結果

### 1. c-Abl による TGF- $\beta$ /Smad シグナリングの増強

TGF- $\beta$ /Smad シグナリングの下流には c-Jun 及び JunB が存在することが知られている [10,11]。そこで、TGF- $\beta$ /Smad シグナリングに対する c-Abl の関与を確かめるため、c-Jun 及び JunB の発現量に対する c-Abl の影響を調べた (主論文: Supplementary Fig. S1)。HeLa S3 細胞を溶媒 (DMSO) 又は 20  $\mu$ M イマチニブで 24 時間処理し、更に最後の 3 時間は溶媒 (4 mM HCl 及び 1 mg/mL bovine serum albumin) 又は 5 ng/mL TGF- $\beta$ 1 処理を行った。その後、細胞溶解液を回収し、抗 c-Jun 抗体、抗 JunB 抗体及び抗 Actin 抗体を用いたウエスタンブロッティング法で各種タンパク質の発現量を解析した。主論文 Supplementary Fig. S1 には、Actin に対する c-Jun 又は JunB の量比を相対値として表記した。その結果、TGF- $\beta$  処理で c-Jun 及び JunB タンパク質の発現量は上昇した。また、TGF- $\beta$  処理による c-Jun 及び JunB タンパク質の発現量上昇は、c-Abl 特異的阻害剤であるイマチニブの処理によってそれぞれ阻害された。

以上の結果から、c-Abl が TGF- $\beta$ /Smad シグナリングを増強することが内在レベルで確認された。

### 2. c-Abl による SKIP/Smad3 間の結合の増強

SKIP は Smad3 と結合することで、Smad3 の転写活性を増強することが知られている [28]。そこで、SKIP/Smad3 間の結合に対する c-Abl の関与を調べるため、共免疫沈降法を用いて SKIP に対する Smad3 の結合量を調べた (図 4、主論文: Fig. 1)。COS-1 細胞に myc-SKIP(野生型) 及び Flag-Smad3 を共遺伝子導入し、24 時間培養した。更に、最後の 3 時間は溶媒、5 ng/mL TGF- $\beta$ 1、20  $\mu$ M イマチニブ、20  $\mu$ M PP2 又は 10  $\mu$ M SU6656 処理を行った。その後、細胞溶解液

を回収し、抗 myc 抗体で myc-SKIP(野生型) を免疫沈降した後、抗 SKIP 抗体及び抗 Flag 抗体を用いたウエスタンブロッティング法で各種タンパク質の発現量を解析した。図 4 及び主論文 Fig. 1A では、myc-SKIP(野生型) に対する Flag-Smad3 の量比を相対値として表記した。更に、同様に独立した実験を合計 3 回行い、主論文 Fig. 1B にグラフとして結果を纏めた。グラフでは、myc-SKIP(野生型) に対する Flag-Smad3 の相対量比を  $\text{mean} \pm \text{S.E. (n=3)}$  として表記し、Welch's *t*-test で統計的検定を行った。アスタリスクは統計的有意差 ( $**p < 0.01$ ) を示す。その結果、これまでの報告通り [28]、TGF- $\beta$  処理で SKIP に対する Smad3 の結合量は上昇した。また、TGF- $\beta$  処理によって増強した SKIP/Smad3 間の結合は、イマチニブ処理によって有意に減少した。一方、TGF- $\beta$  処理によって増強した SKIP/Smad3 間の結合は、SFKs 特異的阻害剤である SU6656 処理では阻害されなかった。尚、PP2 は SFKs 特異的阻害剤とされているものの、TGF- $\beta$  受容体の活性も阻害することが知られており [35]、PP2 処理を行うことで SKIP/Smad3 間の結合が減弱した。

以上の結果から、c-Abl が SKIP/Smad3 間の結合を増強することが示唆された。

### 3. c-Abl による SKIP のチロシンリン酸化

#### 3-1. c-Abl のキナーゼ活性依存的な SKIP のチロシンリン酸化

質量分析での結果を確かめるため、c-Abl による SKIP のチロシンリン酸化を確認した (主論文: Fig. 2B)。COS-1 細胞へ、myc-SKIP(野生型) に加えて恒常活性型である c-Abl(G2A) [36] 又はキナーゼ活性欠失体である c-Abl(G2A/K290R) を過剰発現させて 24 時間培養した。その後、細胞溶解液を回収し、抗 myc 抗体で myc-SKIP(野生型) を免疫沈降した後、抗リン酸化チロシン抗体、抗 myc

抗体及び抗 Abl 抗体を用いたウエスタンブロッティング法で各種タンパク質の発現量を解析した。主論文 Fig. 2B では、myc-SKIP(野生型) に対するリン酸化 myc-SKIP(野生型) の量比を相対値として表記した。その結果、恒常活性型である c-Abl(G2A) を共発現させると SKIP のチロシンリン酸化が検出された。一方、キナーゼ活性欠失体である c-Abl(G2A/K290R) を共発現させても SKIP のチロシンリン酸化は検出されなかった。

以上の結果から、c-Abl は SKIP をキナーゼ活性依存的にチロシンリン酸化することが示唆された。

### 3-2. 内在性 c-Abl による SKIP のチロシンリン酸化

続いて、内在性 SKIP のチロシンリン酸化に対する c-Abl の影響を調べた (主論文: Fig. 2C)。A549 細胞を 24 時間培養し、最後の 3 時間は溶媒、5 ng/mL TGF- $\beta$ 1 又は 20  $\mu$ M イマチニブ処理を行った。抗 SKIP 抗体で内在性 SKIP を免疫沈降した後、抗リン酸化チロシン抗体及び抗 SKIP 抗体を用いたウエスタンブロッティング法で各種タンパク質の発現量を解析した。主論文 Fig. 2C では、SKIP に対するリン酸化 SKIP の量比を相対値として表記した。その結果、内在性 SKIP のチロシンリン酸化レベルは TGF- $\beta$  処理で上昇し、上昇したリン酸化レベルはイマチニブ処理で減弱した。

以上の結果から c-Abl は SKIP をチロシンリン酸化することが内在レベルで示唆された。

### 3-3. c-Abl による SKIP Tyr<sup>292</sup>、Tyr<sup>430</sup> 及び Tyr<sup>433</sup> 残基のチロシンリン酸化

質量分析の結果から、SKIP の Tyr<sup>292</sup> 及び Tyr<sup>433</sup> 残基を含むリン酸化ペプチドが検出された (主論文: Fig. 2A)。また、リン酸化サイト予測プログラムである

NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) を用いると、SKIP のチロシンリン酸化サイトとして Tyr<sup>292</sup> 及び Tyr<sup>430</sup> を含む複数のチロシン残基が予測された。更に、プロテオミクスデータベースである PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org/>) を用いて検索すると、SKIP のチロシンリン酸化サイトとして Tyr<sup>292</sup> 及び Tyr<sup>433</sup> を含む複数のチロシン残基が示唆された。これらの予測及び検索結果を考慮し、SKIP の Tyr<sup>292</sup> 残基をグルタミン酸に置換した myc-SKIP(Y292E) 変異体及び SKIP の Tyr<sup>430</sup> 及び Tyr<sup>433</sup> 残基をグルタミン酸に置換した myc-SKIP(2YE) 変異体を作製した (主論文: Fig. 2D)。

c-Abl による SKIP のチロシンリン酸化部位を探索するため、myc-SKIP(野生型、Y292E 又は YE) のチロシンリン酸化レベルを比較した (図 5、主論文: Fig. 2E)。COS-1 細胞へ、c-Abl(G2A) に加えて myc-SKIP(野生型、Y292E 又は 2YE) をそれぞれ過剰発現させて 24 時間培養した。その後、抗 myc 抗体で myc-SKIP を免疫沈降し、抗リン酸化チロシン抗体及び抗 SKIP 抗体を用いたウエスタンブロッティング法で各種タンパク質の発現量を解析した。主論文 Fig. 2E では、myc-SKIP に対するリン酸化 myc-SKIP の量比を相対値として表記した。その結果、野生型 SKIP を過剰発現させた場合と比較して、SKIP(Y292E) 変異体又は SKIP(2YE) 変異体を過剰発現させた場合では SKIP のチロシンリン酸化レベルがそれぞれ 3 割程度低かった。

以上の結果から、c-Abl は SKIP の Tyr<sup>292</sup>、Tyr<sup>430</sup> 及び Tyr<sup>433</sup> 残基を含む複数のチロシン残基をリン酸化することが示唆された。

#### 4. SKIP Tyr<sup>292</sup> 残基のチロシンリン酸化による SKIP/Smad3 間の結合の増強

SKIP のチロシンリン酸化が SKIP/Smad3 間の結合に与える影響を調べるため、SKIP の Tyr<sup>292</sup>、Tyr<sup>430</sup> 及び Tyr<sup>433</sup> 残基をそれぞれフェニルアラニンに置換し

た myc-SKIP(Y292F)、myc-SKIP(Y430F) 及び myc-SKIP(Y433F) 変異体を作製した。更に、SKIP の Tyr<sup>430</sup> 及び Tyr<sup>433</sup> 残基をフェニルアラニンに置換した myc-SKIP(2YF) 変異体を作製した。フェニルアラニンはリン酸化されていないチロシンと構造が類似しているため、作製した SKIP YF 変異体を非リン酸化変異体として用いた (図 6)。

共免疫沈降法を用いて、SKIP/Smad3 間の結合に対する SKIP YF 変異の影響を調べた (主論文: Fig. 3B)。COS-1 細胞へ、Flag-Smad3 に加えて myc-SKIP(野生型、Y292F、Y430F、Y433F 又は 2YF) をそれぞれ共遺伝子導入し、24 時間培養した。更に、最後の 3 時間は、溶媒又は 5 ng/mL TGF-β1 処理を行った。その後、細胞溶解液を回収し、抗 myc 抗体で myc-SKIP を免疫沈降した後、抗 SKIP 抗体及び抗 Flag 抗体を用いたウエスタンブロッティング法で myc-SKIP に対する Flag-Smad3 の結合量を解析した。主論文 Fig. 3B には、myc-SKIP に対する Flag-Smad3 の量比を相対値として表記した。その結果、TGF-β 処理下において、SKIP(Y292F) 変異体のみが野生型 SKIP 及び他の各種 SKIP YF 変異体と比較して Smad3 の結合量が少なかった。

同様の実験を、3-3.項で作製した SKIP(Y292E) 変異体を用いて実施した (図 7、主論文: Fig. 3C)。グルタミン酸はリン酸化チロシンと同様に負電荷を帯びているため、SKIP YE 変異体を疑似リン酸化変異体として用いた (図 8)。COS-1 細胞へ、Flag-Smad3 に加えて myc-SKIP(野生型又は Y292E) をそれぞれ共遺伝子導入し、共免疫沈降法を用いて SKIP に対する Smad3 の結合量を調べた。図 7 及び主論文 Fig. 3C には、myc-SKIP に対する Flag-Smad3 の量比を相対値として表記した。更に、同様に独立した実験を合計 3 回行い、主論文 Fig. 3D にグラフとして結果を纏めた。グラフでは myc-SKIP に対する Flag-Smad3 の相対量比を mean ± S.E. (n=3) として表記し、Tukey's test で統計的検定を行った。アス

タリスクは統計的有意差 ( $*p < 0.05$ ) を示す。その結果、TGF- $\beta$  処理下において、SKIP(Y292E) 変異体は野生型 SKIP と比較して Smad3 の結合量が有意に多かった。なお、TGF- $\beta$  処理を行わずに同様の実験を実施したところ、SKIP(野生型、Y292E 及び 2YE) 間で Smad3 の相対結合量に大きな差は見られなかった (主論文: Fig. 3A)。

以上の結果から、SKIP の Tyr<sup>292</sup> 残基がチロシンリン酸化されることで SKIP/Smad3 間の結合が増強することが示唆された。

## 5. SKIP Tyr<sup>292</sup> 残基のチロシンリン酸化による Smad3 の転写活性の増強

最後に、SKIP(Y292E 又は Y292F) 変異体を用いて、SKIP Tyr<sup>292</sup> 残基のチロシンリン酸化が Smad3 の転写活性に与える影響を調べた (主論文: Fig. 4)。

まず、A549 細胞へ、myc-SKIP(野生型、Y292E 又は Y292F)、Flag-Smad3、Smad binding element (SBE) の下流にルシフェラーゼ遺伝子をコードしたレポーターベクター及びコントロールベクターを共遺伝子導入し、24 時間培養した。更に、最後の 6 時間は溶媒又は 5 ng/mL TGF- $\beta$ 1 処理を行った。その後、細胞溶解液を回収し、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイを行った (主論文: Fig. 4A)。グラフでは、相対ルシフェラーゼ活性として mean  $\pm$  S.E. ( $n=3$ ) を表記し、Tukey's test で統計的検定を行った。アスタリスクは統計的有意差 ( $*p < 0.05$ ; *n.s.*, not significant) を示す。その結果、TGF- $\beta$  処理下において、野生型 SKIP を発現させた場合と比較して SKIP(Y292E) 変異体を発現させた場合は、ルシフェラーゼ活性が有意に高かった。一方、野生型 SKIP を発現させた場合と比較して SKIP(Y292F) 変異体を発現させても、ルシフェラーゼ活性に有意な上昇は見られなかった。

続いて、Smad3 の下流遺伝子である *JunB* 遺伝子の発現量に対する SKIP 点変異の影響を調べた。A549 細胞に myc-SKIP(野生型、Y292E 又は Y292F) 及び Flag-Smad3 を共遺伝子導入し、48 時間培養した。更に、最後の 24 時間は溶媒又は 5 ng/mL TGF- $\beta$ 1 処理を行った。その後、細胞溶解液を回収し、定量的リアルタイム PCR 法で *JunB* 遺伝子及びリファレンス遺伝子である *HPRT1* 遺伝子の相対発現量を調べた (主論文: Fig. 4B)。グラフでは、*HPRT1* 遺伝子に対する *JunB* 遺伝子の相対発現量として mean  $\pm$  S.E. ( $n=4$ ) を表記し、Tukey's test で統計的検定を行った。アスタリスクは統計的有意差 ( $*p < 0.05$ ; *n.s.*, not significant) を示す。その結果、TGF- $\beta$  処理下において、野生型 SKIP を発現させた場合と比較して SKIP(Y292E) 変異体を発現させた場合は、*JunB* 遺伝子の発現量が有意に多かった。一方、野生型 SKIP を発現させた場合と比較して SKIP(Y292F) 変異体を発現させても、*JunB* 遺伝子の発現量に有意な上昇は見られなかった。

以上の結果から、SKIP Tyr<sup>292</sup> 残基のチロシンリン酸化によって Smad3 の転写活性が増強することが示唆された。

## 総括・考察

非受容体型チロシンキナーゼは TGF- $\beta$  シグナリングにおいて重要な役割を果たしていることは知られていたが、これらチロシンキナーゼの基質や TGF- $\beta$  シグナリング制御メカニズムの詳細に関しては不明であった [16,18,20–23]。本研究では、まず c-Abl が TGF- $\beta$  刺激下で SKIP/Smad3 間の結合を増強させ、Smad3 の標的遺伝子産物を増加させていることを示した (結果 1.項、2.項)。そして、c-Abl が SKIP をチロシンリン酸化することを示した (結果 3.項)。更に、SKIP の Tyr<sup>292</sup> 残基がリン酸化されることで、TGF- $\beta$  刺激依存的な SKIP/Smad3 間の結合及び Smad3 の転写活性が増強することを示した (結果 4.項、5.項)。以上の実験結果から、c-Abl が SKIP Tyr<sup>292</sup> 残基をチロシンリン酸化することで SKIP/Smad3 間の結合を強め、Smad3 の転写活性を増強した結果、TGF- $\beta$ /Smad シグナリングを正に制御していることを新規に見出した (図 9)。また、我々はこれまでにチロシンキナーゼの基質を探索しており、c-Abl の基質として JunB や HDAC1 を新規に見出してきた [25,37]。本研究では、c-Abl の新たな基質候補として SKIP を見出した。

疑似リン酸化変異である SKIP Y292E 変異は、TGF- $\beta$  刺激下では SKIP/Smad3 間の結合を強める一方で、TGF- $\beta$  非刺激下では結合に影響を与えなかった (図 7、主論文: Fig. 3A, C, D)。TGF- $\beta$  による刺激は、T $\beta$ R-I 依存的な Smad3 のリン酸化及び Smad3 の核内移行を引き起こす [8]。また、SKIP は NLS を持つことで主に核内に局在するため [26,27]、SKIP と Smad3 の相互作用は核内で起こると考えられる。そのため、恐らく TGF- $\beta$  非処理下では SKIP Tyr<sup>292</sup> 残基のリン酸化の影響を受けるのに十分な量の核内 Smad3 が存在していないことが原因で、SKIP の Y292E 変異で Smad3 との結合が増強しなかったと考えられる。これらの結果は、TGF- $\beta$  刺激下で核内 c-Abl が SKIP をチロシンリン酸化し、SKIP と

核内移行してきた Smad3 との結合を誘導することも示唆している。今後、核内 c-Abl が SKIP をチロシンリン酸化していることの検証など、核内 c-Abl に関する更なる研究が必要である。

本研究で点変異させた SKIP Tyr<sup>292</sup> 残基は SKIP が Smad3 と相互作用する部位 (201-303 a.a.) に含まれる一方で、Tyr<sup>430</sup> 及び Tyr<sup>433</sup> 残基はこの相互作用部位に含まれない [27,28]。更に、SKIP Tyr<sup>292</sup> 残基付近の 299-360 a.a.領域は  $\alpha$ -ヘリックスを形成しており、電荷を帯びている [27]。そのため、SKIP Tyr<sup>292</sup> 残基のチロシンリン酸化による電荷の変化が SKIP の構造に影響を与え、SKIP/Smad3 間の結合が増強した可能性が考えられる (図 10)。この仮説を確かめるためには、SKIP の X 線結晶構造解析及び SKIP/Smad 間の 3 次元結合シミュレーションが必要であると考えられる。

SKIP は Smad3 以外にも様々な核内分子と結合することで、それらの活性制御などに関わっていることが知られているため [27]、SKIP のチロシンリン酸化が Smad3 以外の分子との相互作用に影響を与える可能性が考えられる (図 11)。本研究の結果から SKIP Tyr<sup>292</sup> 残基のチロシンリン酸化は SKIP/Smad3 間の結合に影響を与えることが示唆されており、更に SKIP Tyr<sup>292</sup> 残基は Smad3 との相互作用部位 (201-303 a.a.) 内に存在する。この SKIP Tyr<sup>292</sup> 残基は Smad3 以外の SKIP 結合分子との相互作用部位、例えば核内受容体である VDR やレチノイド X 受容体 (retinoid X receptor: RXR) との結合部位ともオーバーラップしている。活性型ビタミン D (1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) が結合した VDR は、RXR とヘテロ 2 量体を形成することでビタミン D 標的遺伝子の転写を促進するが、SKIP は VDR/RXR ヘテロ 2 量体と結合することでその転写活性を調節している [38]。また、非受容体型チロシンキナーゼである c-Src は活性型ビタミン D により活性化することが知られている [39]。このことから、活性型ビタミン D によって

活性化した c-*Src* が SKIP をチロシンリン酸化し、SKIP と VDR/RXR ヘテロ 2 量体との相互作用に影響を与える可能性がある。この仮説を検証するため、まずは c-*Src* による SKIP Tyr<sup>292</sup> 残基のリン酸化を調べる必要がある。

SKIP は多くの重要な転写因子の活性制御に関わっており [27]、SKIP の発現は臨床的な意義も持つため [40]、SKIP がこれらの転写因子を制御するメカニズムの解明は重要だと考えられる。また、SKIP は Smad3 と結合することで Smad3 の転写活性を増強することが知られている [28]。しかしながら、SKIP が Smad3 の転写活性を増強する際の詳細な制御機構は未だ明らかとされていない。転写共役活性化因子である p300 及び CREB-binding protein (CBP) は、Smad2/3 と結合することで Smad2/3 の転写活性増強に関与する [41]。p300/CBP はヒストンアセチル基転移酵素 (histone acetyl transferase: HAT) 活性を有しており、ヒストンをアセチル化することでクロマチン構造を緩め、転写を活性化させる [42,43]。SKIP は p300 と相互作用することで、VDR 及び RXR 依存的な転写を調節する [44]。また、SKIP は MLL1 ヒストンメチル基転移酵素複合体のサブユニットである Menin と結合することで、HIV-1 Tat タンパク質の転写活性調節に寄与している [45]。そのため、SKIP はヒストン修飾に関わるタンパク質との相互作用を介して Smad3 の転写活性を調節している可能性が考えられる (図 12)。疑似リン酸化変異体である SKIP(Y292E) 変異体は TGF- $\beta$  刺激下で SKIP/Smad3 間の結合を増強させるため、この変異体を使用することで SKIP による Smad3 の活性制御メカニズムの一端を解明出来る可能性がある。

我々はこれまでに、核内 c-*Abl* がクロマチン凝縮を誘導すること、ヒストン修飾に関わること、転写を抑制することなどを見出してきた [24,29]。一方、本研究の結果から c-*Abl* は Smad3 の転写活性を増強することで TGF- $\beta$ /Smad シグナリングを正に制御していることが示唆されている。そこで、c-*Abl* は核内全

体としては転写抑制に関わっていると考えられるものの、SKIPなどのチロシンリン酸化を介することでシグナル伝達経路選択的な局所の転写活性化に寄与している可能性が考えられる。チロシンキナーゼによる核内制御に関して、今後更なる研究の発展が望まれる。

## 参考文献

- [1] J. Massague, D. Wotton, Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system, *EMBO J.* 19 (2000) 1745–1754.
- [2] J. Massagué, TGF- $\beta$  signal transduction, *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 753–791.
- [3] M. Morikawa, R. Derynck, K. Miyazono, TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 8 (2016) a021873.
- [4] X.M. Meng, D.J. Nikolic-Paterson, H.Y. Lan, TGF- $\beta$ : The master regulator of fibrosis, *Nat. Rev. Nephrol.* 12 (2016) 325–338.
- [5] C.H. Heldin, M. Landström, A. Moustakas, Mechanism of TGF- $\beta$  signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition, *Curr. Opin. Cell Biol.* 21 (2009) 166–176.
- [6] K. Miyazawa, M. Shinozaki, T. Hara, T. Furuya, K. Miyazono, Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling, *Genes to Cells.* 7 (2002) 1191–1204.
- [7] M. Shi, J. Zhu, R. Wang, X. Chen, L. Mi, T. Walz, T.A. Springer, Latent TGF- $\beta$  structure and activation, *Nature* 474 (2011) 343–349.
- [8] C.H. Heldin, K. Miyazono, P. ten Dijke, TGF- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins, *Nature* 390 (1997) 465–471.
- [9] J. Massague, J. Seoane, D. Wotton, Smad transcription factors, *Genes Dev.* 19 (2005) 2783–2810.
- [10] L.J.C. Jonk, S. Itoh, C.-H. Heldin, P. ten Dijke, W. Kruijer, Identification and Functional Characterization of a Smad Binding Element (SBE) in the JunB

- Promoter That Acts as a Transforming Growth Factor- $\beta$ , Activin, and Bone Morphogenetic Protein-inducible Enhancer, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 21145–21152.
- [11] C. Wong, E.M. Rougier-Chapman, J.P. Frederick, M.B. Datto, N.T. Liberati, J.-M. Li, X.-F. Wang, Smad3-Smad4 and AP-1 Complexes Synergize in Transcriptional Activation of the c-Jun Promoter by Transforming Growth Factor  $\beta$ , *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 1821–1830.
- [12] F. Verrecchia, C. Tacheau, M. Schorpp-Kistner, P. Angel, A. Mauviel, Induction of the AP-1 members c-Jun and JunB by TGF- $\beta$ /Smad suppresses early Smad-driven gene activation, *Oncogene.* 20 (2001) 2205–2211.
- [13] A. Leask, D.J. Abraham, TGF- $\beta$  signaling and the fibrotic response, *FASEB J.* 18 (2004) 816–827.
- [14] B. a Hocevar, T. l Brown, P. h Howe, TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway, *EMBO J.* 18 (1999) 1345–1356.
- [15] S.J. Parsons, J.T. Parsons, Src family kinases, key regulators of signal transduction., *Oncogene.* 23 (2004) 7906–9.
- [16] S.S. Park, Y.-W. Eom, E.H. Kim, J.H. Lee, D.S. Min, S. Kim, S.-J. Kim, K.S. Choi, Involvement of c-Src kinase in the regulation of TGF- $\beta$ 1-induced apoptosis, *Oncogene.* 23 (2004) 6272–6281.
- [17] J.T. Parsons, Focal adhesion kinase: the first ten years, *J. Cell Sci.* 116 (2003) 1409–1416.
- [18] M. Hong, M.C. Wilkes, S.G. Penheiter, S.K. Gupta, M. Edens, E.B. Leof, Non-Smad Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling Regulated by Focal Adhesion

- Kinase Binding the p85 Subunit of Phosphatidylinositol 3-Kinase, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 17841–17850.
- [19] Y. Shaul, c-Abl: activation and nuclear targets., *Cell Death Differ.* 7 (2000) 10–16.
- [20] Y. Aono, Y. Nishioka, M. Inayama, M. Ugai, J. Kishi, H. Uehara, K. Izumi, S. Sone, Imatinib as a Novel Antifibrotic Agent in Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis in Mice, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171 (2005) 1279–1285.
- [21] C.E. Daniels, M.C. Wilkes, M. Edens, T.J. Kottom, S.J. Murphy, A.H. Limper, E.B. Leof, Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF- $\beta$  and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis, *J. Clin. Invest.* 114 (2004) 1308–1316.
- [22] S. Wang, M.C. Wilkes, E.B. Leof, R. Hirschberg, Imatinib mesylate blocks a non-Smad TGF- $\beta$  pathway and reduces renal fibrogenesis in vivo, *FASEB J.* 19 (2005) 1–11.
- [23] S. Wang, M.C. Wilkes, E.B. Leof, R. Hirschberg, Noncanonical TGF-beta pathways, mTORC1 and Abl, in renal interstitial fibrogenesis., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 298 (2010) F142-9.
- [24] K. Aoyama, R. Yuki, Y. Horiike, S. Kubota, N. Yamaguchi, M. Morii, K. Ishibashi, Y. Nakayama, T. Kuga, Y. Hashimoto, T. Tomonaga, N. Yamaguchi, Formation of long and winding nuclear F-actin bundles by nuclear c-Abl tyrosine kinase, *Exp. Cell Res.* 319 (2013) 3251–3268.
- [25] N. Yamaguchi, R. Yuki, S. Kubota, K. Aoyama, T. Kuga, Y. Hashimoto, T. Tomonaga, N. Yamaguchi, c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation of JunB is required for Adriamycin-induced expression of p21, *Biochem. J.* 471 (2015) 67–

77.

- [26] C. Zhang, D. Dowd, A. Staal, C. Gu, J.B. Lian, A.J. van Wijnen, G.S. Stein, P.N. MacDonald, Nuclear Coactivator-62 kDa/Ski-interacting Protein Is a Nuclear Matrix-associated Coactivator That May Couple Vitamin D Receptor-mediated Transcription and RNA Splicing, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 35325–35336.
- [27] P. Folk, F. Půta, M. Skružný, Transcriptional coregulator SNW/SKIP: the concealed tie of dissimilar pathways, *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (2004) 629–640.
- [28] G.M. Leong, N. Subramaniam, J. Figueroa, J.L. Flanagan, M.J. Hayman, J.A. Eisman, A.P. Kouzmenko, Ski-interacting Protein Interacts with Smad Proteins to Augment Transforming Growth Factor- $\beta$ -dependent Transcription, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 18243–18248.
- [29] K. Aoyama, Y. Fukumoto, K. Ishibashi, S. Kubota, T. Morinaga, Y. Horiike, R. Yuki, A. Takahashi, Y. Nakayama, N. Yamaguchi, Nuclear c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation induces chromatin structural changes through histone modifications that include H4K16 hypoacetylation., *Exp. Cell Res.* 317 (2011) 2874–2903.
- [30] S. Taagepera, D. McDonald, J.E. Loeb, L.L. Whitaker, A.K. McElroy, J.Y.J. Wang, T.J. Hope, Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 (1998) 7457–7462.
- [31] E. Shtivelman, B. Lifshitz, R.P. Gale, E. Canaani, Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia, *Nature* 315 (1985) 550–554.
- [32] K. Kasahara, Y. Nakayama, Y. Nakazato, K. Ikeda, T. Kuga, N. Yamaguchi, Src Signaling Regulates Completion of Abscission in Cytokinesis through ERK/MAPK Activation at the Midbody, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 5327–5339.

- [33] S.N. Ho, H.D. Hunt, R.M. Horton, J.K. Pullen, L.R. Pease, Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction, *Gene*. 77 (1989) 51–59.
- [34] Y. Kanda, Investigation of the freely available easy-to-use software “EZR” for medical statistics, *Bone Marrow Transplant*. 48 (2013) 452–458.
- [35] H. Ungefroren, S. Sebens, S. Groth, F. Gieseler, F. Fandrich, The Src Family Kinase Inhibitors PP2 and PP1 Block TGF-Beta1-Mediated Cellular Responses by Direct and Differential Inhibition of Type I and Type II TGF-Beta Receptors, *Curr. Cancer Drug Targets*. 11 (2011) 524–535.
- [36] O. Hantschel, B. Nagar, S. Guettler, J. Kretzschmar, K. Dorey, J. Kuriyan, G. Superti-Furga, A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl, *Cell* 112 (2003) 845–857.
- [37] K. Aoyama, N. Yamaguchi, R. Yuki, M. Morii, S. Kubota, K. Hirata, K. Abe, T. Honda, T. Kuga, Y. Hashimoto, T. Tomonaga, N. Yamaguchi, c-Abl induces stabilization of histone deacetylase 1 (HDAC1) in a kinase activity-dependent manner, *Cell Biol. Int*. 39 (2015) 446–456.
- [38] P.N. MacDonald, D.R. Dowd, C. Zhang, C. Gu, Emerging insights into the coactivator role of NCoA62/SKIP in Vitamin D-mediated transcription, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 89–90 (2004) 179–186.
- [39] C. Buitrago, G. Vazquez, A.R. De Boland, R.L. Boland, Activation of Src kinase in skeletal muscle cells by 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> correlates with tyrosine phosphorylation of the vitamin D receptor (VDR) and VDR-Src interaction, *J. Cell. Biochem*. 79 (2000) 274–281.
- [40] L. Wang, M. Zhang, Y. Wu, C. Cheng, Y. Huang, Z. Shi, H. Huang, SKIP

- expression is correlated with clinical prognosis in patients with bladder cancer, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7 (2014) 1695–1701.
- [41] C. Pouponnot, L. Jayaraman, J. Massague, Physical and Functional Interaction of SMADs and p300/CBP, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 22865–22868.
- [42] H.M. Chan, N.B. La Thangue, p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds, *J. Cell Sci.* 114 (2001) 2363–2373.
- [43] J.L. Wrana, Regulation of Smad Activity, *Cell* 100 (2000) 189–192.
- [44] G.M. Leong, N. Subramaniam, L.L. Issa, J.B. Barry, T. Kino, P.H. Driggers, M.J. Hayman, J.A. Eisman, E.M. Gardiner, Ski-interacting protein, a bifunctional nuclear receptor coregulator that interacts with N-CoR/SMRT and p300, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315 (2004) 1070–1076.
- [45] V. Brès, T. Yoshida, L. Pickle, K.A. Jones, SKIP Interacts with c-Myc and Menin to Promote HIV-1 Tat Transactivation, *Mol. Cell.* 36 (2009) 75–87.
- [46] A.S. Anthony, A. Schneider, S. Chatterjee, O. Bousiges, B.R. Selvi, A. Swaminathan, Acetyltransferases (HATs) as targets for neurological therapeutics, *Neurotherapeutics* 10 (2013) 568–88.

図表

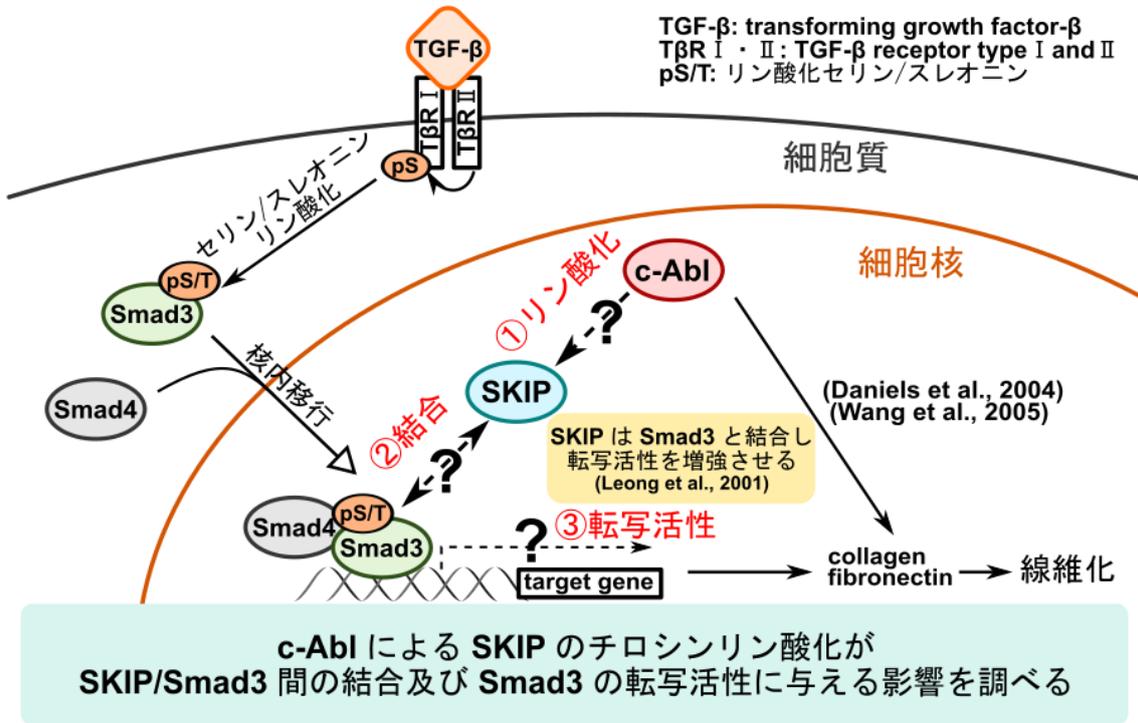
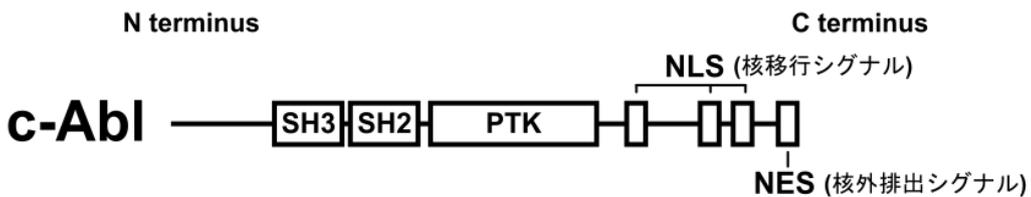
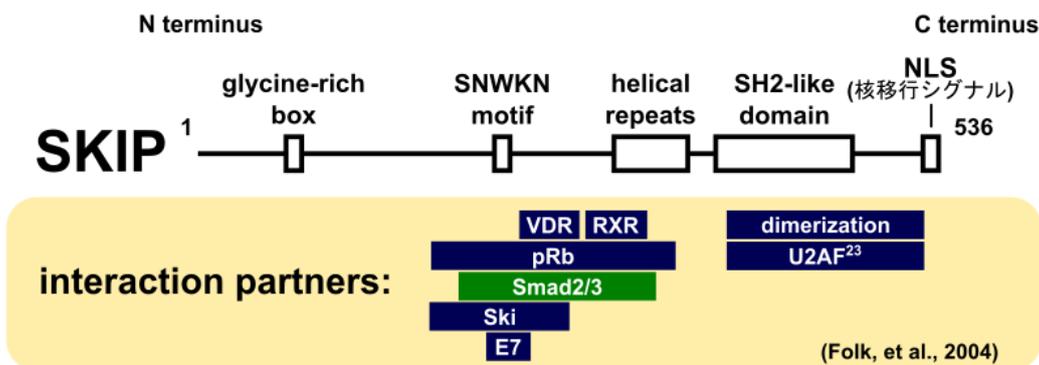


図 1. TGF-β/Smad シグナリングと本研究の概要 [21,22,28]



- ・ 非受容体型チロシンキナーゼ
- ・ 細胞増殖, 分化, 接着などを制御
- ・ NLS と NES を持ち核内外をシャトリングする
- ・ ヘテロクロマチン化に関与 (Aoyama et al., 2011)
- ・ c-Abl の遺伝子転座が慢性骨髄性白血病 (CML) の原因
- ・ imatinib (Gleevec®): c-Abl の阻害薬, CML の治療薬

図 2. c-Abl チロシンキナーゼ [29]



- ・ 核内受容体共役因子
- ・ **NLS** (核移行シグナル) を持ち核内に局在
- ・ 多くの核内タンパク質と結合することで機能
- ・ **Smad2/3** と **interaction** することで **TGF-β** シグナリングを正に制御
- ・ チロシンリン酸化による影響は未報告

転写因子 **Smad3** は **TGF-β** 刺激で活性化し線維化を誘導する  
 ⇒ **SKIP** と **Smad3** の **interaction** に着目

図 3. 核内受容体共役因子 **SKIP** [27]

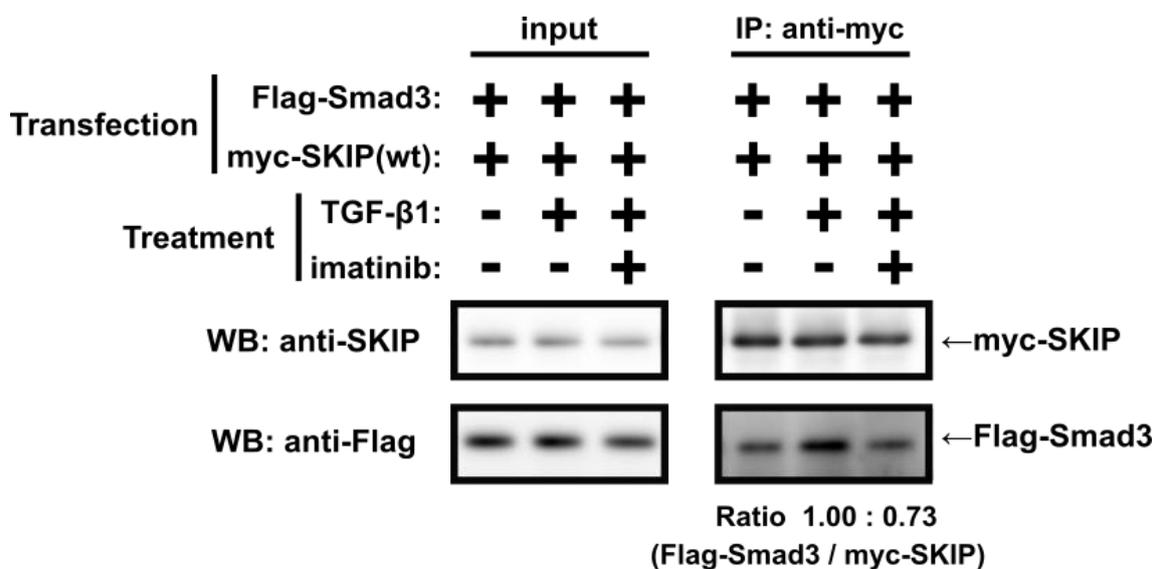


図 4. c-Abl による **SKIP/Smad3** 間の結合の増強

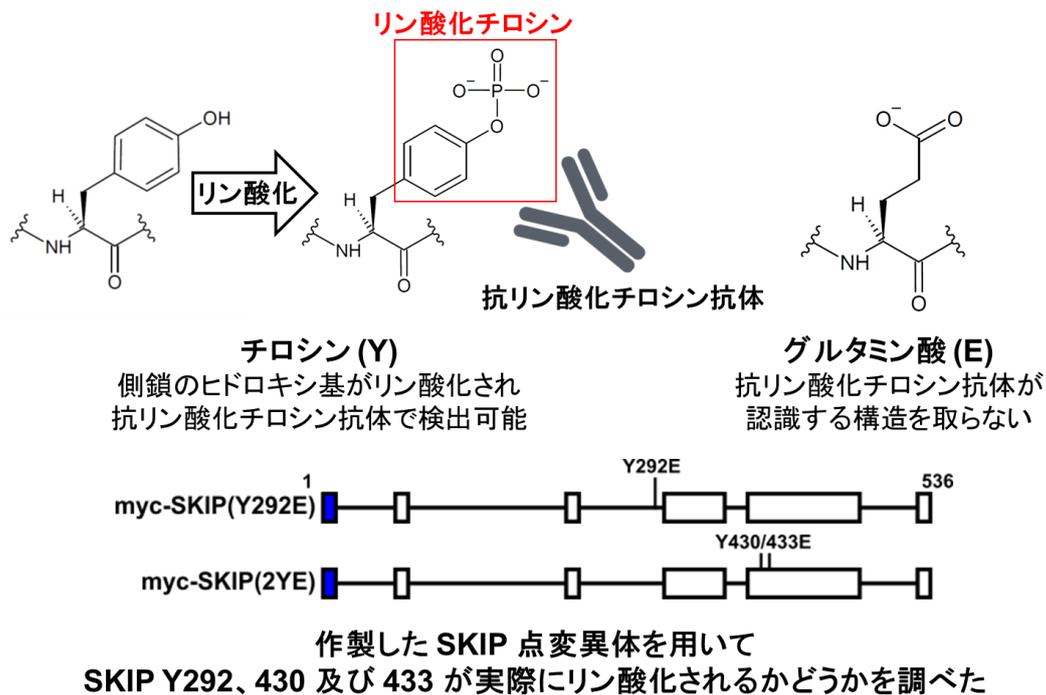


図 5. SKIP YE 変異体 (点変異体)

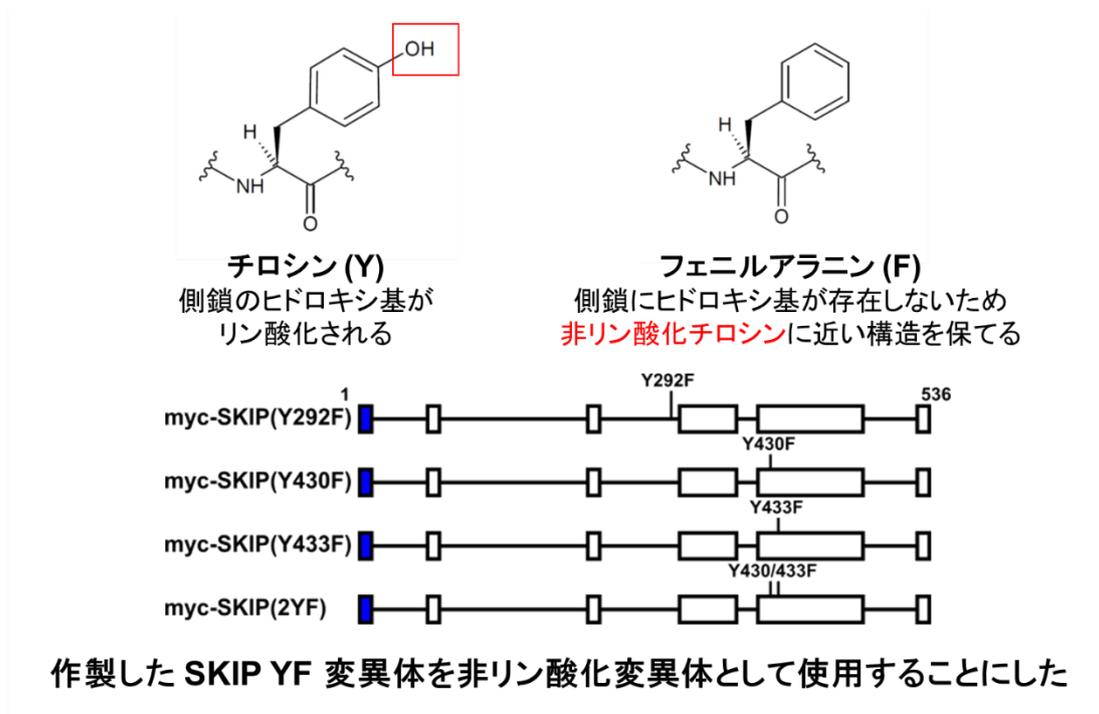


図 6. SKIP YF 変異体 (非リン酸化変異体)

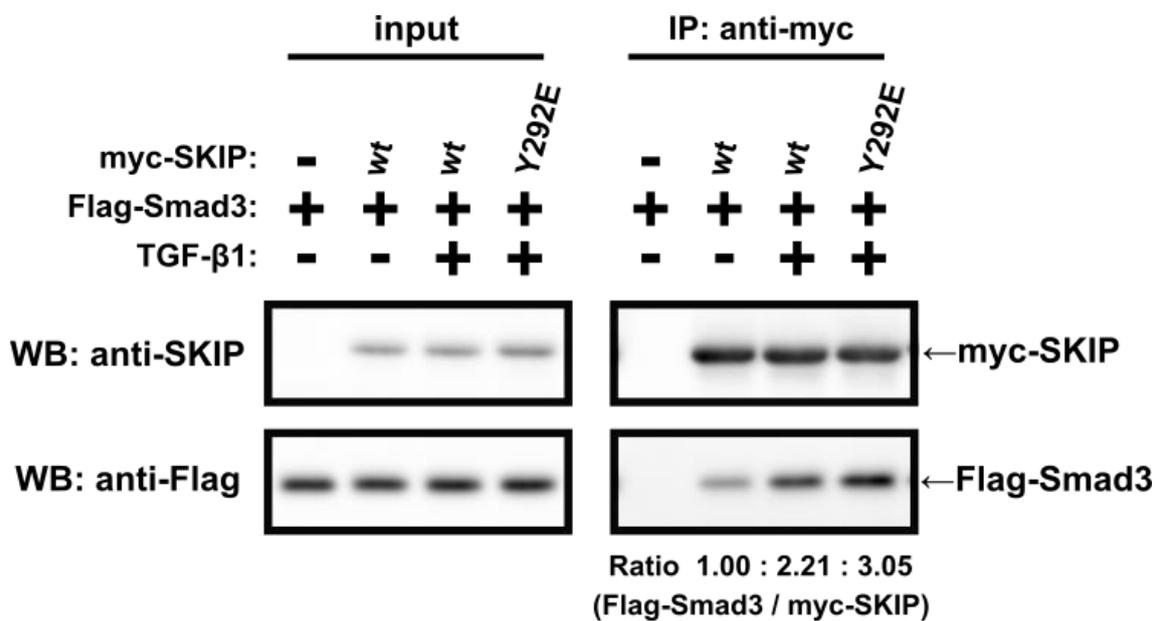


図 7. SKIP Tyr<sup>292</sup> 残基のチロシンリン酸化による

SKIP/Smad3 間の結合の増強

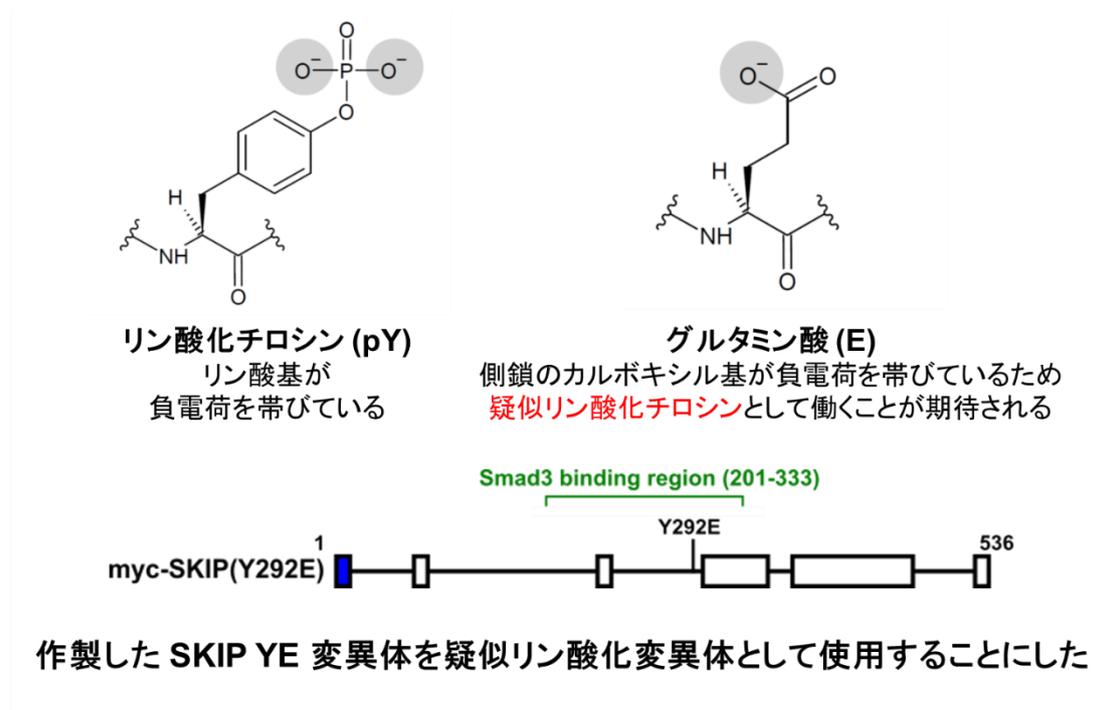


図 8. SKIP YE 変異体 (疑似リン酸化変異体)

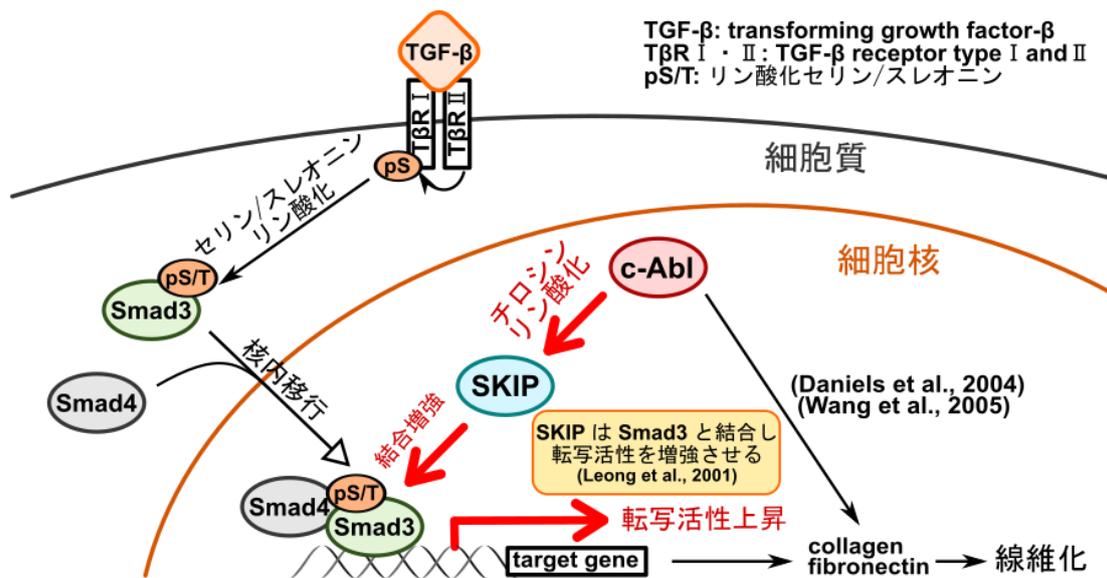
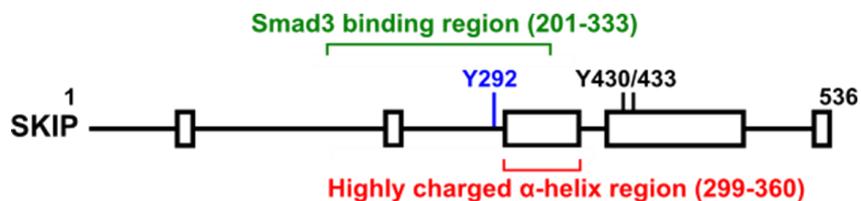


図 9. c-Abl による SKIP のチロシンリン酸化を介した

TGF- $\beta$ /Smad シグナリングの制御 [21,22,28]



- **$\alpha$ -helix region (299-360)**: 塩基性アミノ酸(アルギニン及びリジン)を多く(約32%)含有  $\Rightarrow$  **プラス**にチャージ
- **Y292**: リン酸化される  $\Rightarrow$  **マイナス**にチャージ
- **Smad3 binding region (201-333)**:  **$\alpha$ -helix region** 及び **Y292** とオーバーラップしているため、Smad3 との結合が構造変換の影響を受けやすい

SKIP の構造から考えても  
SKIP Y292 のリン酸化が Smad3 との結合に影響を与える可能性は高い

図 10. SKIP Tyr<sup>292</sup> のリン酸化が SKIP の構造変換に与え得る影響

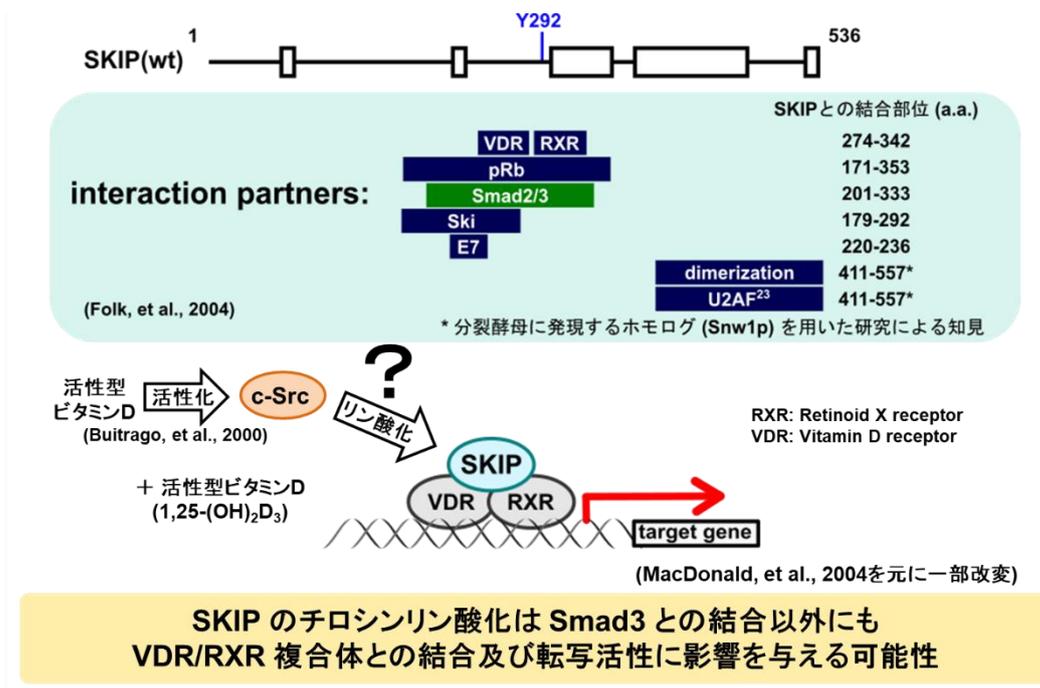


図 11. SKIP Tyr<sup>292</sup> のリン酸化が Smad3 以外の結合分子に影響する可能性 [27,38,39]

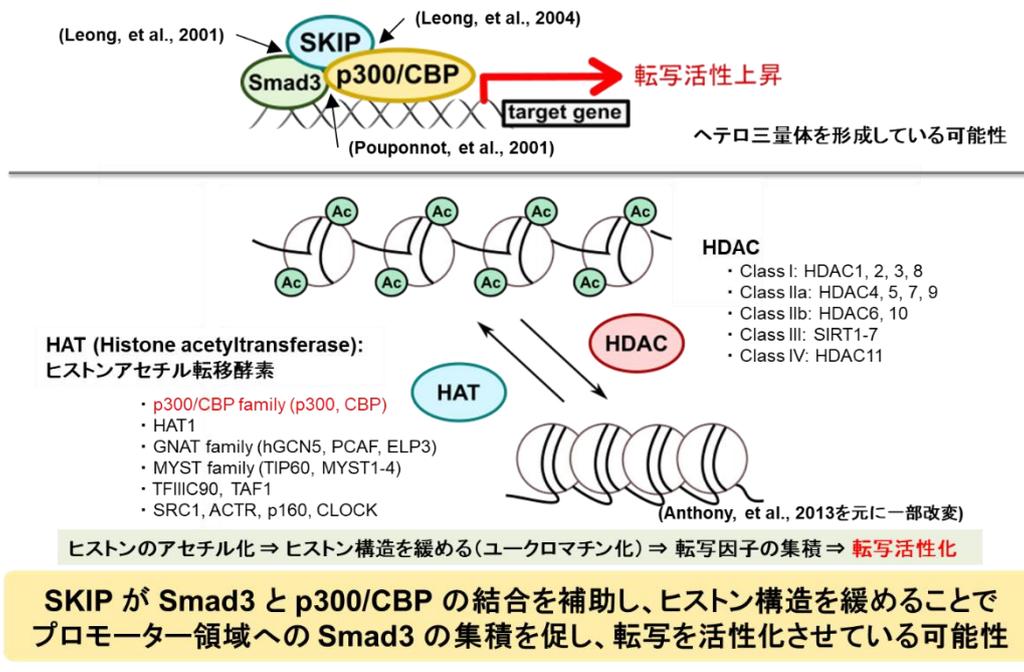


図 12. 推測される SKIP の転写促進メカニズム [28,41,44,46]

	上段: Forward primers (5' → 3')
	下段: Reverse primers (5' → 3')
SKIP cDNA	AAAGGATCCGCGCTCACCAGCTTTTACCTGC
	GCAAGAAGAGGAGGAAGGAATAGGAATTCTTT
SKIP(Y292E) 変異体	GGCAGAAGCCCTCGAGATTGCTGATCG
	CGATCAGCAATCTCGAGGGCTTCTGCC
SKIP(2YE) 変異体	GAAGATGAAATTGAAAACGTTGAAGATCAAGCCTGG
	CCAGGCTTGATCTTCAACGTTTTCAATTCATCTTC
SKIP(Y292F) 変異体	GGCAGAAGCCCTCTTTATTGCTGATCG
	CGATCAGCAATAAAGAGGGCTTCTGCC
SKIP(Y430F) 変異体	GAAGATGAAATTAACGTTTATGATCAAGCCTGG
	CCAGGCTTGATCATAAACGTTGAAAATTCATCTTC
SKIP(Y433F) 変異体	GAAGATGAAATTTATAACGTTTTTCGATCAAGCCTGG
	CCAGGCTTGATCGAAAACGTTATAAATTCATCTTC
SKIP(2YF) 変異体	GAAGATGAAATTTTCAACGTTTTTCGATCAAGCCTGG
	CCAGGCTTGATCGAAAACGTTGAAAATTCATCTTC

表 1. PCR 法に使用した各種プライマー配列

## 主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

K. Kuki, N. Yamaguchi, S. Iwasawa, Y. Takakura, K. Aoyama, R. Yuki, Y.

Nakayama, T. Kuga, Y. Hashimoto, T. Tomonaga, N. Yamaguchi, Enhancement of TGF- $\beta$ -induced Smad3 activity by c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation of its coactivator SKI-interacting protein (SKIP), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 490 (2017) 1045–1051.

本文中では「主論文」の名称で引用した。

## 学位論文審査

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院教授(薬学研究院) 薬学博士 村山俊彦

副査 千葉大学大学院教授(薬学研究院) 医学博士 伊藤素行

副査 千葉大学大学院教授(薬学研究院) 薬学博士 川島博人

## 謝辞

本研究に際し、終始御指導、御鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学研究院分子細胞生物学研究室教授 山口直人先生に深く感謝致します。

また、本研究を進行し論文発表するにあたって細やかで的確なご指導を下された准教授 山口憲孝先生に心より御礼申し上げます。また、日々の研究活動において様々な助言を下さいました元准教授 中山祐治先生 (現 京都薬科大学教授)、講師 福本泰典先生に御礼申し上げます。

大変お忙しい中、本論文を審査し、貴重な意見を下さった本学教授 村山俊彦先生、教授 伊藤素行先生、教授 川島博人先生に深く感謝致します。

研究を進めるにあたって様々な助言を下された先輩方、共に励まし合いながら研究を進めて下さった同輩、後輩の皆様に深く御礼申し上げます。

最後に、学生生活を陰で支え、励まし応援してくれた、家族、親戚一同に深く感謝致します。