

博士（薬 学） 黒 住 公 一

学 位 論 文 題 名

BMP タイプ Ia 受容体会合分子の遺伝子クローニング

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【序論】

TGF- $\beta$  スーパーファミリーに属する因子の細胞内情報伝達にはタイプIとIIからなる2種類のセリン・スレオニンキナーゼ型受容体が関わることが知られているが、細胞内への情報伝達には、タイプI受容体による細胞内基質のリン酸化が大きな役割を果たしていると考えられている。そこでこれまで、タイプI受容体会合分子のクローニングが行われてきた。

一方、新規 MAPKKK である TGF- $\beta$  activated kinase 1 (TAK1)、およびその活性化因子である TAK1 binding protein 1 (TAB1) が TGF- $\beta$  スーパーファミリーの情報伝達に関与することが明らかとなっている。TAK1 は MKK3、4、6、さらに SAPK/JNK、p38 を活性化することから、これらの新規 MAPK カスケードが TGF- $\beta$  スーパーファミリーの情報伝達に関与することが示唆されている。現在のところ、TAB1 より下流の情報伝達経路については明らかとなってきたが、受容体と TAK1、TAB1 の間の情報伝達因子は不明である。そこで、本研究では yeast two-hybrid system を用い、BMP タイプ Ia 受容体細胞内ドメイン会合分子の遺伝子クローニングを試みた。

【結果および考察】

1. BMP receptor associated molecule (BRAM) cDNA のクローニング

マウス BMP タイプ Ia 受容体 (BMPRIa) の細胞内ドメインを bait として、ヒト胎盤 cDNA library を yeast two-hybrid system によりスクリーニングした。その結果、新規遺伝子である BMP receptor associated molecule 2 (BRAM2)、既知のタイプI受容体会合因子 FKBP12、NF-KB のサブユニットである p50 の前駆体 p105 が得られた。p105 については受容体への結合は認められろものの、受容体刺激による活性化が認められないことから検討を止めた。新規遺伝子である BRAM2 は完全長 cDNA のクローニングを行ったところ、少なくとも 4 種の splicing variant が得られた。これらは、アデノウイルス E1A 結合蛋白質である BS69 の内部配列をコードしていた。これらを BRAM2a, b, c と命名した。この中で BRAM2c は一番短く、さらに N 末端の 12 アミノ酸が BS69 や他の BRAM2 isoform と異なっていた。

2. BRAM2 と BMPRIa、TAB1 との結合の検討

得られた全ての BRAM2 isoform および BS69 について BMPRIa 細胞内ドメインおよび TAB1 との結合を two-hybrid system により検討した。その結果、BS69 を除き全ての BRAM2 isoform で結合が確認された。これより BRAM2 isoform は BMPRIa と TAB1 の間の情報伝達に働く可能性が示された。ただし、BRAM2 isoform は核蛋白質である BS69 の部分配列をコードしていた。そこで BS69 と最も構造が異なることから、機能も異なる可能性が高い BRAM2c に絞って以後の解析を行うことにした。

3. BRAM2 mRNA の組織分布

BRAM2c をプローブとしてヒトの各組織における BRAM2 mRNA の発現を検討した。その結果、調べた全ての組織で 4.4 kb および 1.35 kb の mRNA が発現していた。1.35 kb の mRNA は BS69 をコードするには短すぎることから BRAM2 isoform をコードしていることが示唆された。

#### 4. BRAM2cの細胞内における局在

BRAM2cの細胞内での局在を検討した。その結果、対照としたBS69は核に局在したのに対し、BRAM2cは細胞質に局在がみられた。この結果は BRAM2c が BMPRIa と TAB1 との間の情報伝達に働くという可能性を支持すると思われた。

#### 5. COS 細胞における BRAM2c、BMPRIa、TAB1 の結合

つぎに、BMPRIa と BRAM2c の COS 細胞における結合を GST pull down assay により検討したところ、BRAM2c と BMPRIa 細胞内ドメインの結合が確認された。さらに TAB1 と BRAM2c の結合も同様に確認された。そこでさらに、BMPRIa、TAB1、BRAM2c が複合体を形成するかを共沈実験により検討した。その結果、BMPRIa 細胞内ドメインと共沈する TAB1 は BRAM2c の共存により増加した。TAB1 と BMPRIa 細胞内ドメインの直接の結合は認められないことから、この結果は BRAM2c が TAB1 と BMPRIa の結合の仲介する可能性を示す。ただし、BRAM2c 非存在下でも TAB1 の BMPRIa への結合が見られたが、この結合に内在の BRAM2 が関与するか否かは不明である。

#### 6. BRAM2c overexpression による TAK1 活性化への影響

BRAM2c の overexpression による TAK1 活性化への影響を調べた。TGF- $\beta$  により誘導される plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) のプロモーター活性化に TAK1 が関与することが明かとなっている。そこで、PAI-1 プロモーターをつないだ reporter プラスミド、TAK1、TAB1、および BRAM2c 発現ベクターを TGF- $\beta$  応答性の細胞へトランスフェクトし、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を検討して、BRAM2c の TAK1 活性への影響を調べた。その結果、BRAM2c の発現により TAK1 および TAB1 による PAI-1 プロモーター活性化が増強した。この作用は TAK1 あるいは TAB1 単独の場合は認められないことから、BRAM2c は TAB1 の活性化を介して TAK1 の活性化を行うことが示唆された。

#### 【結論】

- 1 Yeast two-hybrid system を用いて BMP タイプ Ia 受容体細胞内ドメイン会合分子 BRAM2 の cDNA を単離した。BRAM2 は長さの異なる isoform をもち、これらはアテノウイルス E1A 結合蛋白である BS69 の部分配列をコードしていた。
- 2 COS 細胞における共沈実験より、BRAM2c は BMPRIa と TAB1 の結合を仲介する可能性が示された。
- 3 BRAM2c の発現により TAK1 活性の増強が見られた。この作用は TAB1 が共存する場合のみ認められたことから、BRAM2c は TAB1 の活性化を介して TAK1 を活性化することが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 徳光幸子  
副査 教授 横沢英良  
副査 助教授 沢田均  
副査 助教授 澄谷浩司

## 学位論文題名

### BMPタイプIa受容体会合分子の遺伝子クローニング

TGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する因子の細胞内情報伝達にはタイプIとIIからなる2種類のセリン・スレオニンキナーゼ型受容体が関わることが知られているが、細胞内への情報伝達には、タイプI受容体による細胞内基質のリン酸化が大きな役割を果たしている。一方、新規MAPKKであるTGF- $\beta$  activated kinase 1 (TAK1) およびその活性化因子であるTAK1 binding protein 1 (TAB1) がTGF- $\beta$ スーパーファミリーの情報伝達に関与することが明らかとなっている。しかし、受容体とTAK1、TAB1の間の情報伝達因子は不明である。

本論分提出者は、yeast two-hybrid systemを用い、BMPタイプIa受容体細胞内ドメイン会合分子の遺伝子クローニングを行った。その結果、BMPタイプIa受容体細胞内ドメイン会合分子BMP receptor associated molecule 2 (BRAM2) のcDNAの単離に成功し、そのisoformの1つであるBRAM2cの情報伝達因子としての役割を追求して、以下のような成果をおさめた。

1. マウスBMPタイプIa受容体の細胞内ドメインをbaitとして、ヒト胎盤cDNA libraryをyeast two-hybrid systemによりスクリーニングした。その結果、新規遺伝子であるBRAM2、既知のタイプI受容体会合因子FKBP12、NF-KBのサブユニットであるp50の前駆体p105が得られた。新規遺伝子であるBRAM2は完全長cDNAのクローニングを行ったところ、4種のsplicing variantが得られた。これらは、アデノウイルスE1A結合蛋白質であるBS69とBS69の内部配列をコードしている新規物質であり、BRAM2a, b, cと命名した。この中でBRAM2cは一番短く、さらにN末端の12アミノ酸がBS69や他のBRAM2 isoformと異なっていた。

2. 得られた全てのBRAM2 isoformおよびBS69についてBMPタイプIa受容体の細胞内ドメインおよびTAB1との結合をtwo-hybrid systemにより検討した。その結果、BS69を除き全てのBRAM2 isoformで結合が確認された。これよりBRAM2 isoformはBMPタイプIa受容体とTAB1の間の情報伝達に働く可能性が示された。そこでBS69に最も構造が異なることから、機能も異なる可能性が高いBRAM2cについて解析を行った。

3. BRAM2cをプローブとしてヒトの各組織におけるBRAM2 mRNAの発現を検討した。その結果、調べた全ての組織で4.4 kbおよび1.35 kbのmRNAが発現

していた。1.35 kbのmRNAはBS69をコードするには短すぎることからBRAM2 isoformをコードしていることが示唆された。

4. BRAM2cの細胞内での局在を調べたところ、BS69は核に局在したのに対し、BRAM2cは細胞質に局在がみられ、BRAM2cがBMPタイプIa受容体とTAB1との間の情報伝達に働くという可能性を示した。

5. BMPタイプIa受容体とBRAM2cのCOS細胞における結合をGST pull down assayにより検討したところ、BRAM2cとBMPタイプIa受容体の細胞内ドメインとの結合、さらにTAB1とBRAM2cの結合も確認された。そこで、BMPタイプIa受容体、TAB1、BRAM2cが複合体を形成するかを共沈実験により検討した。その結果、BMPタイプIa受容体細胞内ドメインと共沈するTAB1はBRAM2cの共存により増加した。TAB1とBMPタイプIa受容体細胞内ドメインの直接の結合は認められないことから、この結果はBRAM2cがTAB1とBMPタイプIa受容体の結合を仲介している可能性を示している。

6. BRAM2cのoverexpressionによるTAK1活性化への影響を調べた。TCF- $\beta$ により誘導されるplasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) のプロモーター活性化にTAK1が関与することが明かとなっている。そこで、PAI-1プロモーターをつないだreporterプラスミド、TAK1、TAB1、およびBRAM2c発現ベクターをTGF- $\beta$ 応答性の細胞へトランスフェクトし、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を検討して、BRAM2cのTAK1活性への影響を調べた。その結果、BRAM2cの発現によりTAK1およびTAB1によるPAI-1プロモーター活性化が増強した。この作用はTAK1あるいはTAB1単独の場合は認められないことから、BRAM2cはTAB1の活性化を介してTAK1を活性化していることが示唆された。

Yeast two-hybrid systemを用いてBMPタイプIa受容体細胞内ドメイン会合分子BRAM2のcDNAを3種単離し、その中の1つであるBRAM2cはBMPタイプIa受容体とTAB1の結合を仲介して、TAB1を活性化することにより、TAK1を活性化していることが示された。

以上の新知見およびこれらの成果を得るに用いた新しい研究方法は、BMPタイプIa受容体とクローニングに成功したBRAM2cの情報伝達の解析に大きく貢献したものである。審査員一同これらの研究を高く評価し、本論文提出者が博士（薬学）の称号を受けるにふさわしいものと一致して判断した。