

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861556

研究課題名(和文) NF- κ B, p65サブユニットとSmad4の会合部位におけるBMP誘導性骨形成研究課題名(英文) BMP-induced bone formation in binding site between p65 subunit of NF- κ B and Smad4

研究代表者

杉山 悟郎 (Sugiyama, Goro)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：00722828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：BMPは骨形成に重要なタンパク質であり、SMAD4を介して骨芽細胞分化に作用する。NF- κ Bは免疫、炎症性シグナルの主要な分子であり、p65サブユニットがSMAD4と会合し、相互作用することを見出した。この会合様式の解明は、BMPシグナルの抑制解除に着目した新たな分子標的薬の開発へとつながる。相互作用に重要なp65のTA2ドメインとSMAD4のMH1ドメインに対してリコンビナントタンパク質を精製した。両分子は直接結合することを明らかにした。またTA2の結合領域のアミノ酸配列に基づき合成したペプチドは、両者の結合を阻害し、BMPシグナルの抑制を解除した。

研究成果の概要(英文)：Bone morphogenic proteins (BMPs) are essential for bone formation in vivo and osteoblast differentiation in vitro via a Smad signaling pathway. The transcription factor NF- κ B plays a key role in immune and inflammatory responses, proliferation and tumorigenesis. Recent findings revealed the importance of NF- κ B in osteoblast differentiation and bone formation. We also showed that NF- κ B inhibits BMP-induced osteoblast differentiation via interaction between MH1 domain (MH1) of Smad4 and TA2 domain (TA2) of NF- κ B, p65 subunit. To identify the binding site between Smad4-MH1 and p65-TA2, we investigated interaction of these molecules using purified recombinant proteins of Smad4-MH1 and p65-TA2. We revealed that each molecules are directly bound. The peptide which based amino acid sequence of binding region of TA2 inhibited the suppression of BMP signal by p65, suggesting that the peptide is able to be a novel target protein of osteoblast differentiation.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：SMAD4 NF- κ B BMP2

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨代謝は骨芽細胞分化による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスにより成り立つ。破骨細胞を標的とした創薬は臨床応用され、有効な治療薬として確立されてきているが一方で顎骨壊死などの重篤な副作用が生じる。これに対して、骨芽細胞分化に特化した治療は少ない。骨形成を促進する分子は BMP2 をはじめ複数明らかとなっているが、これらのシグナル伝達が阻害されている可能性がある。例えば、炎症により骨吸収が引き起こされることがわかっており、炎症性シグナルと骨形成シグナルにおける関連性が示唆される。

(2) これまでの研究から、骨形成に重要な BMP シグナルが炎症性シグナルの NF- κ B シグナルによって阻害されることが明らかになった。さらに、この作用機序として骨形成に重要な SMAD4 と NF- κ B の p65 サブユニットが会合することで相互作用することもわかった()。このことから、この両シグナルの相互作用を阻害することができれば、炎症による骨形成阻害作用が抑制され、骨形成へと骨代謝がシフトすることが示唆される。さらに、分子間の結合が他の分子を介さず、直接的な結合であった場合は、その競合的阻害により、BMP シグナルと NF- κ B シグナルのクロストークを解除できる可能性がある。また、この場合はそれぞれの分子活性を抑制する作用機序でないため、副作用を低く抑えることができると推察される。以上のことを明らかにするためには、SMAD4 の MH1 ドメインと p65 サブユニットの会合様式に対する分子レベルでの詳細な解析が必須であると考えられる。

2. 研究の目的

SMAD4 と NF- κ B, p65 サブユニットの会合様式を明らかにし、両者の結合を阻害するペプチド化合物を合成することで NF- κ B シグナルによる BMP シグナルの抑制を解除することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) SMAD4 と p65 サブユニットに対して、大腸菌発現システムによるリコンビナントタンパク質を調製し、両分子の結合状態を調べる。まず大腸菌に対して、SMAD4 の MH1 ドメインと p65 の TA2 ドメインのアミノ酸配列をコードしたプラスミド遺伝子導入を行い、形質転換させることでタンパク質を精製する。これを透析膜を用いた抽出により、それぞれの分子のみを抽出・精製する。このタンパク質にはそれぞれ GST (グルタチオン S 転スフェラーゼ) と His (ヒスチジン) という標識タグを設計する。GST プルダウンアッセイにより、両分子の結合が直接的に行われているかウエスタンブロッティング法を用いて解析する。

(2) 直接的な結合であった場合、(1)と同様に大腸菌発現システムにより、全長タンパク質より短い欠失変異体を調製する。それ

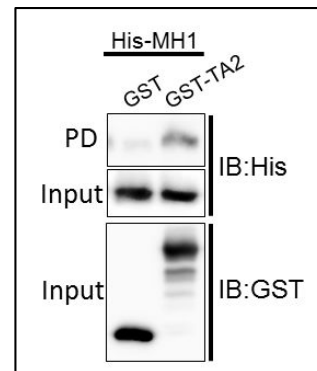
ぞれには GST タグと His タグを標識しておき、GST プルダウンアッセイを行い、それぞれの欠失変異体との結合状態を解析する。なお、タンパク質の分子量が 30kDa を下回ると発現効率が低下するため、欠失変異体は GST タグが標識されている p65 サブユニットの TA2 ドメイン側から作製する。

(3) 結合実験により得られた結合領域のアミノ酸配列を解析することにより、ペプチド合成を行う。ペプチド合成は実績のある外部の委託業者へ依頼する。合成されたペプチドは希釈保存溶液にて希釈し、使用時まで -80 で保存する。

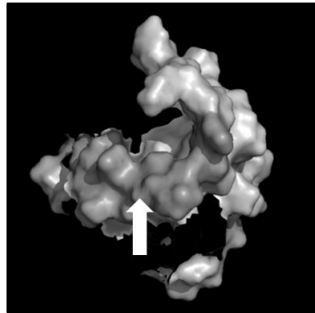
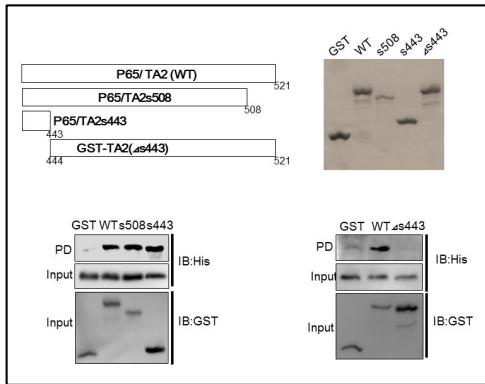
(4) 合成したペプチド化合物を用いて、SMAD4 の MH1 ドメインと p65 の TA2 ドメインの結合を阻害することができるか、GST プルダウンアッセイにより確認する。また、BMP シグナルに対する NF- κ B シグナルによる抑制が解除できるか検討する。

4. 研究成果

(1) GST タグを標識した p65 TA2 ドメインのリコンビナントタンパク質と、His タグを標識した SMAD4 の MH1 ドメインのリコンビナントタンパク質を用いた GST プルダウンアッセイを行った。その結果、SMAD4 の MH1 ドメインと共沈した p65 の TA2 ドメインがウエスタンブロッティング法により確認でき、両者が直接的に結合することを明らかにした。

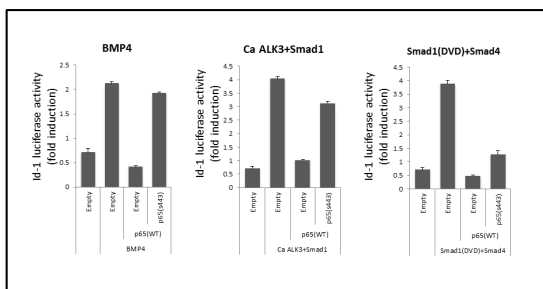


(2) p65 分子の欠失変異体を調製し、プルダウンアッセイによる結合実験を行ったところ、SMAD4 の MH1 ドメインは TA2 ドメインの 428 番目グルタミンから 443 番目のフェニルアラニンまでの 15 個のアミノ酸でのみ結合することがわかった。すなわち、SMAD4 の MH1 ドメイン分子は NF- κ B, p65 サブユニットの TA2 ドメインはこの領域を介して直接結合していると考えられた。分子の 3 次元立体構造モデルを作成したところ、同部がポケットのように分子表面に存在することが明らかになり、同部の電氣的結合を中心とした結合ではないかと推察された。



(3) 結合領域のアミノ酸配列を含むペプチド合成を行った。

(4) ID-1 遺伝子をリポーターとしたルシフェラーゼアッセイを行い、ペプチドが BMP シグナルに対する NF- κ B による抑制を解除することを明らかにした。このことから、合成したペプチドは NF- κ B シグナルを阻害することで、BMP シグナルの増強を行っている作用機序が考えられた。すなわち、同部を標的にした新たな分子標的薬となる可能性が考えられた。



< 引用文献 >

. Hirata-Tsuchiya, S., Fukushima, H., Katagiri, T., Ohte, S., Shin, M., Nagano, K., Aoki, K., Morotomi, T., Sugiyama, G., Nakatomi, C., Terashita, M., Hirata, M., Kitamura, C., Jimi, E: Inhibition of BMP2-induced bone formation by the p65 subunit of NF- κ B via an interaction with Smad4. *Mol. Endocrinol.* 28(9), 1460-1470, 2014

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 4 件)

. Sugiyama, G., Kokabu, S., Nakatomi, C., Nakano, H., Jimi, E., Mori Y.: Crosstalk between MH1 domain of Smad4 and TA2 domain of NF- κ B, p65 subunit JADR 2015: Fukuoka, Japan, Dec 30, 2015.

. Sugiyama, G., Kokabu, S., Tada, Y., Nakatomi, C., Jimi, E.: Study of interaction between MH1 domain of Smad4 and TA2 domain of NF- κ B, p65 subunit. Asia-Pacific Conference in Fukuoka 2015: Kitakyushu, Japan, Jan 24, 2015.

. Sugiyama, G., Kokabu, S., Tada, Y., Nakatomi, C., Jimi, E.: Binding of NF- κ B, p65 subunit to Smad4. The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2014: Kitakyushu, Japan, November 5-7, 2014.

. 杉山悟郎, 古株彰一郎, 多田幸代, 自見英治郎: Interaction between MH1 domain of Smad4 and TA2 domain of NF- κ B, p65 subunit 第 5 6 回歯科基礎医学会学術大会: 福岡市、9 月 2 5 ~ 2 7 日 2 0 1 4 年

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

杉山 悟郎 (SUGIYAMA, Goro)
九州大学病院・顔面口腔外科・医員
研究者番号：00722828