

BMP 応答細胞内シグナル伝達因子である Smad8/9 の  
遺伝子発現制御に関する研究

Studies on the regulation of gene expression of  
BMP pathway-specific R-Smad, Smad8/9

麻布大学大学院 獣医学研究科

獣医学専攻 分子生物学研究室

DV1261 片川 優子

## 目次

序文	1
第 1 章 新規な BMP 応答遺伝子としての Smad8/9 の遺伝子発現解析	3
図表	9
第 2 章 各種細胞における Smad8/9 の遺伝子解析	16
図表	24
第 3 章 BMP による Smad8/9 遺伝子発現促進の制御機構の解析	32
図表	38
第 4 章 BMP による Smad8/9 遺伝子発現における遺伝子発現制御領域 (プロモーター領域) の解析	41
図表	49
総括	55
General Overview	57
引用論文	61
謝辞	68

This (A part of this dissertation) is the peer reviewed version of the following article: Smad8/9 is regulated through the BMP pathway. Katakawa Y., Funaba M. and Murakami M. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117, 8, 1789-1796, 2016, which has been published in final form at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.25478/abstract;jsessionid=DFA0D48CCAAAF7622AC536747E261C6F.f04t01>. This article may be used for non-commercial purposes in accordance with Wiley Terms and Conditions for Self-Archiving.

## 序文

Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ファミリーは、構造上 TGF- $\beta$ 群、activin 群、bone morphogenetic protein (BMP) 群の 3 つの群に分類される (Miyazono et al., 2010; Massagué, 2012; Sasaki-Yumoto et al., 2013)。これらの生理学的な役割は、生体内で細胞分裂の制御や、初期胚のパターン化、細胞分化の決定など多岐にわたる (Derynck et al., 2008)。さまざまな機能と比べると、これらの転写産物へのシグナル伝達は比較的単純である。シグナル伝達は Smad 経路および非 Smad 経路によって行われるが、なかでも Smad 経路において、TGF- $\beta$ ファミリーメンバーはリガンド固有のセリン/スレオニンキナーゼII型受容体を介しI型受容体をリン酸化することで、receptor-regulated Smad (R-Smad) の C 末端のセリンをリン酸化する。リン酸化した R-Smad は common Smad (Co-Smad) である Smad4 と複合体を形成して核内に移行し、標的遺伝子をトランス活性化する (Miyazono et al., 2010; Massagué, 2012; Sasaki-Yumoto et al., 2013)。R-Smad のうち、Smad1、Smad5 および Smad8/9 は BMP 受容体複合体を介して制御され、Smad2 と Smad3 は activin もしくは TGF- $\beta$ 受容体複合体を介して制御される。

また、一部の TGF- $\beta$ ファミリーのシグナル伝達の負の制御は Smad タンパク質を介して行われる。Inhibitory-Smad (I-Smad) である Smad6 と Smad7 は TGF- $\beta$ 1、activin A、BMP2 そして BMP7 によって発現が上昇し (Nakao et al., 1997; Ishisaki et al., 1998; Takase et al., 1998)、I 型受容体に直接結合して R-Smads と競合する (Hayashi et al., 1997)。あるいは、I-Smads は Smad-interacting ユビキチンリガーゼである Smurf に働きかけ、これらの受容体のユビキチン化とプロテオソーム分解を引き起こす (Ebisawa et al., 2001; Murakami et al., 2003)。また、TGF- $\beta$ ファミリーのシグナル伝達は R-Smad の脱リン酸化によっても負の制御を受ける (Duan et al., 2006; Knockaert et al., 2006; Lin et al., 2006)。

TGF- $\beta$ によって Smad3 の発現が調節されているという報告が一部あるもの

の (Yanagisawa et al., 1998; Poncelet et al., 1999; Winbanks et al., 2011)、I-Smad と異なり、R-Smad の活性化は遺伝子発現レベルでは制御を受けていないとされている (Nakao et al., 1997; Poncelet et al., 1999; Herrera et al., 2009; Murakami et al., 2009)。しかし先行研究により、マウス筋芽細胞由来細胞株 (C2C12) の筋分化過程において、Smad8/9 の遺伝子発現量に変化が見られることを見つけた (Furutani et al., 2011)。この Smad8/9 発現量の大幅な変化は、内因性 BMP 活性の変動と一致し、かつ Smad1 と Smad5 には見られなかった。また、TGF- $\beta$ ファミリー刺激下でのマウス脂肪前駆細胞由来細胞株 (3T3-L1) の分化過程における網羅的な遺伝子発現解析でも、Smad8/9 の発現促進を見つけた。そこで予備実験として TGF- $\beta$ ファミリー刺激下における Smad8/9 遺伝子発現の変動を qRT-PCR により継時的に測定したところ、TGF- $\beta$ ファミリーのなかでも BMP による刺激が最も顕著であり、またこの作用は持続的であった。これらの結果より、BMP はそのシグナル伝達因子である Smad8/9 タンパク質を介した Smad 経路により、自らの Smad8/9 の遺伝子を標的として発現を制御しているという仮説を立て、BMP による Smad8/9 の遺伝子発現制御について詳細な研究を行った。

そこで本研究ではまず、BMP による Smad8/9 の発現促進をさまざまな細胞を用いて調べた (第 1 章)。続いて、各種細胞における Smad8/9 の遺伝子解析を行った (第 2 章)。次いで、タンパク質合成阻害剤と BMP の I 型受容体阻害剤を用いて、BMP による Smad8/9 遺伝子発現促進の制御機構の解明を行った (第 3 章)。さらに、レポーターアッセイと ChIP により、BMP による Smad8/9 遺伝子発現における遺伝子発現制御領域 (プロモーター領域) の解析を試みた (第 4 章)。

# 第1章 新規な BMP 応答遺伝子としての Smad8/9 の 遺伝子発現解析

## 1 序論

TGF- $\beta$ ファミリーは細胞の分化や増殖を調節する分泌性のタンパク質であり (Massagué, 1990)、大きなファミリーを形成している。TGF- $\beta$ ファミリーは構造上、TGF- $\beta$ 群、activin や Nodal を含む activin 群および BMP 群に分類され (Roberts et al., 1986; Massagué, 1998)、シグナル伝達は Smad 経路、非 Smad 経路を介して行われる。

Smad 経路では、細胞外に存在する TGF- $\beta$ ファミリーのリガンドが、細胞膜上のセリン/スレオキナーゼ型受容体である I 型受容体と II 型受容体に結合し、II 型受容体が I 型受容体をリン酸化して活性化させ、I 型受容体が Smad 転写因子をリン酸化することによりシグナルが伝達される (Massagué, 2008)。Smad は約 50~80kDa のタンパク質であり、R-Smad、Co-Smad、I-Smad に分類される。I 型受容体により R-Smad がリン酸化されると、R-Smad は Co-Smad である Smad4 と複合体を形成して核内に移行し、Id1 や Id2 などの標的遺伝子の転写を活性化する (Heldin et al., 1997; Piek et al., 1999; Massagué, 2000)。Smad 経路は、R-Smad の脱リン酸化もしくは I-Smad である Smad6 か Smad7 の遺伝子誘導により抑制される (Imamura et al., 1997; Souchelnytskyi et al., 1998)。R-Smad のうち、TGF- $\beta$ と activin は Smad2 と Smad3 を、BMP は Smad1、Smad5 および Smad8/9 をリン酸化する。TGF- $\beta$ ファミリーによるシグナル伝達の模式図を図1に示した。しかし、これら R-Smad の遺伝子発現制御についてはいまだに解明されていないことも多い。

先行研究により、筋芽細胞の筋分化過程における内因性 BMP の変動に伴い、Smad8/9 の遺伝子発現量に変化が見られることを見つけた (Furutani et al., 2011)。また、TGF- $\beta$ ファミリー刺激下での 3T3-L1 の分化過程における網羅的

な遺伝子発現解析で、Smad8/9 の発現促進を見つけた (データは示していない)。そこで本研究では、これらの事実をもとに TGF- $\beta$ ファミリーによる R-Smad である Smad8/9 の遺伝子発現制御に注目し、Smad 経路の制御機構のより詳細な研究を行うこととした。

本章ではまず、外因性 BMP による Smad8/9 の発現量に対する影響を、複数の細胞を用いて明らかにした。また、他の TGF- $\beta$ ファミリーによる Smad8/9 の発現量に対する影響も調べた。

## 2 材料と方法

### 材料

BMP2、BMP4、TGF- $\beta$ 1 および activin A の組換え体タンパク質は R & D Systems (Minneapolis, MN) から購入した。

マウス前駆脂肪細胞由来細胞株 3T3-L1、マウス筋芽細胞由来細胞株 C2C12、マウス由来メラノーマ細胞株 B16、ヒト肝癌由来細胞株 HepG2、ラット心臓横紋筋由来細胞株 H9c6 は、京都大学農学研究科の舟場正幸准教授に提供していただいた。

### 細胞培養

3T3-L1、C2C12、B16、HepG2 および H9c6 は、非働化した 10%牛胎児血清 (FBS) と 1% ペニシリン-ストレプトマイシン (100 U/mL ペニシリンおよび 100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン, Life Technologies, Grand Island, NY) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (043-30085, DMEM, Wako) を増殖培地とした。通常の継代培養には 10 mL の増殖培地が入った 100-mm 組織培養用シャーレを使用し、0.05%トリプシン-EDTA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて継代を行った。

ラットの表皮由来初代培養細胞株はウイスター・ラットの表皮より分離した線維芽細胞を (Messenger 1984)、上記と同様の方法で継代を行った。

RNAを抽出する場合は、 $3.0 \times 10^4$ 個 /  $\text{cm}^2$ となるように 24-well plate (IWAKI) もしくは 96-well plate (IWAKI) に細胞を播種した。播種 24 時間後に 0.2%FBS と 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを含む DMEM 培地に交換し、2 時間後に BMP2、BMP4、および activin A は最終濃度 4nM、TGF- $\beta$ 1 は最終濃度 100pM になるように添加し、37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で 2 時間培養した。

### RNA の抽出および RT による cDNA の作製

Quick gene 800 (KURABO) と Quick gene RNA tissue kit S (KURABO)

を用い添付のマニュアルに従って total RNA を抽出した。抽出された total RNA の濃度を Multi-Detection Microplate Reader POWERSCAN® HT (DS ファーマ) を用いて吸光度により測定した。High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific) により cDNA を作製し、2.5ng /  $\mu$ L total RNA に相当するように cDNA を滅菌蒸留水で希釈した。

一部のサンプルについては、RealTime ready Cell Lysis Kit (Roche, Mannheim, Germany)、Transcriptor Universal cDNA Master (Roche) を用い、添付のマニュアルに従って total RNA の抽出、cDNA の作製を行った。

### Smad 遺伝子の定量的リアルタイム RT-PCR

KAPA SYBR® FAST Universal qPCR Kit (KAPA Biosystems, Wilmington, MA) および Thermal Cycler Dice® Real Time System TP800 (タカラバイオ) を用い、5 ng の total RNA に相当する cDNA を鋳型として qRT-PCR を行った。各遺伝子の発現レベルは各遺伝子に対するプライマーを用いた PCR 増幅産物を段階希釈したものを標準溶液とし、標準曲線法を用いて決定した。ハウスキーピング遺伝子である  $\beta$ -actin もしくは GAPDH の発現レベルに対する比の値を相対的な遺伝子発現レベルとした。使用したプライマーの配列は表 1 に記載した。

### 統計分析

データは標準誤差により示した。細胞間での遺伝子発現の違いは t 検定を用いて解析を行った。危険率 5%未満を統計学的に有意差ありと判定した。

### 3 結果

#### 複数の細胞種における BMP4 による Smad8/9 遺伝子の発現上昇

マウス・ラット・ヒトの 3 動物種、6 細胞株において、BMP4 で 2 時間刺激し、Smad1~8/9 の発現量を qRT-PCR 法によって調べたところ、今回調べたすべての細胞において Smad8/9 の発現量の上昇が認められた (図 2)。また、これまでの報告されている通り、I-Smad である Smad6 と Smad7 の発現量は上昇したが (Nakao et al., 1997 ; Takase et al., 1998)、Smad8/9 以外の R-Smad の発現量は BMP4 処理をしても変化しなかった。また、3T3-L1 において、BMP4 と同じサブファミリーに属する BMP2 で処理した場合にも、Smad8/9 の発現上昇が認められた (図 3)。

#### TGF- $\beta$ ファミリーによる Smad 遺伝子の発現上昇

C2C12 および 3T3-L1 において、Smad8/9 発現における、ほかの TGF- $\beta$ ファミリーのメンバーである TGF- $\beta$ 1 と activin A の影響を調べた (図 4)。これまでの報告通り、TGF- $\beta$ 1 は C2C12 (図 4A) と 3T3-L1 (図 4B) において I-Smad の発現を上昇させた。activin A は 3T3-L1 においては I-Smad の発現上昇を促進したが、C2C12 では I-Smad の顕著な発現上昇は認められなかった。また、TGF- $\beta$ 1 と activin A どちらで刺激を加えても、Smad8/9 の大幅な上昇は認められなかった。

## 4 考察

BMP は R-Smads をリン酸化して Smad4 と複合体を形成させ、標的遺伝子の転写活性を導く。BMP によるシグナル伝達は R-Smad の脱リン酸化と、BMP のシグナル伝達を抑制する I-Smad の遺伝子誘導によって抑制されると考えられており (Miyazono et al., 2010 ; Massagué, 2012 ; Sasaki-Yumoto et al., 2013)、R-Smad の活性は、遺伝子の発現というよりはむしろリン酸化によって制御されると報告されていた (Miyazono et al., 2010)。

しかし先行研究により、筋分化過程における内因性 BMP 活性に伴い、Smad8/9 の発現量が増加することが明らかになったため (Furutani et al., 2011)、本研究においてその詳細な検討を行ったところ、複数の細胞種において BMP4 による Smad8/9 の mRNA レベルでの発現上昇が認められた。この反応は分化過程とは関係なく起こり、BMP2 によっても同様の結果が得られた。

また、他の TGF- $\beta$ ファミリーのメンバーである TGF- $\beta$ 1 と activin A による刺激 2 時間後の Smad8/9 の mRNA のレベルを調べたところ、TGF- $\beta$ 1 と activin A いずれの刺激によっても、Smad8/9 の顕著な発現上昇は認められなかった。

これらの結果より、Smad8/9 は BMP 刺激によって mRNA レベルで正の制御を受ける R-Smad であり、その遺伝子誘導は複数の細胞種で起こることが示唆された。

表 1 Smad1~8/9 の mRNA の発現を検出するための qRT-PCR に使用したプライマー

Gene	5'-primer	3'-primer	GenBank accession number
Human			
<i>Smad1</i>	5'-caacagccaccggttctct-3'	5'-gtttgggtaactgctattggga-3'	U59423
<i>Smad2</i>	5'-tcatagcttgatttacagccag-3'	5'-acaccaaagtgcaggttctgag-3'	BC014840
<i>Smad3</i>	5'-tggacgcaggttctccaaac-3'	5'-gtgctggggacatcggattc-3'	BC0550743
<i>Smad4</i>	5'-gccaaacttcccaacattctcg-3'	5'-tgctgctgtcctggctgag-3'	BC002379
<i>Smad5</i>	5'-ctttccaccagcccaacaacac-3'	5'-taggcaggaggaggcgtatcag-3'	AF009678
<i>Smad6</i>	5'-tctctcgcgacgagtacaa-3'	5'-ccggagcagtgatgagggagt-3'	NM_005585
<i>Smad7</i>	5'-accgatggatttctcaaac-3'	5'-gccagataattcgttcccc-3'	AF015261
<i>Smad9</i>	5'-atgtgattactgctgcgtg-3'	5'-cggtagtggtaagggttaatgc-3'	BC011559
<i>β-actin</i>	5'-ccaaccgcgagaagatga -3'	5'-ccagaggcgtacagggatag -3'	NM_001101
Mouse			
<i>Smad1</i>	5'-tgaaaacaccaggegcacata-3'	5'-tgaggcattccgcatacac-3'	NM_008539
<i>Smad2</i>	5'-tgtgcagagccccaactgt-3'	5'-gcctggtgggatcttacacact-3'	U60530
<i>Smad3</i>	5'-ggaatgcagccgtggaact-3'	5'-aagacctcccctccgatgtag-3'	AB008192
<i>Smad4</i>	5'-aagctgccctgtgtgactgt-3'	5'-ggagagttgaccaagcaaaag-3'	NM_008540
<i>Smad5</i>	5'-gcagtaacatgattcctcagacc-3'	5'-gcgacaggctgaacatctc-3'	AF063006
<i>Smad6</i>	5'-gttgcaaccctaccattc-3'	5'-ggagagacagccgagaata-3'	AF010133
<i>Smad7</i>	5'-acccccatcaccttagtcg-3'	5'-gaaaatccattgggtatctgga-3'	AF015260
<i>Smad8/9</i>	5'-cggatgagctttgtgaagg-3'	5'-gggtgctcgtgacatcct-3'	AY145520
<i>β-actin</i>	5'-ctaaggccaaccgtgaaaag-3'	5'-accagaggcatacagggaca-3'	NM_007393
<i>GAPDH</i>	5'-cgtgttctacccccaatgt-3'	5'-tgtcatcatactggcaggttct-3'	NM_008084

表 1 (続き) Smad1~8/9 の mRNA の発現を検出するための qRT-PCR に使用したプライマー

Gene	5'-primer	3'-primer	GenBank accession number
Rat			
<i>Smad1</i>	5'-gcagccctttcagatgccag-3'	5'-ggctgagagccatcctgggc-3'	NM_013130
<i>Smad2</i>	5'-caggacgattagatgagcttg-3'	5'-cgtatttgctgtactcagtcccc-3'	NM_019191
<i>Smad3</i>	5'-cctgccactgtctgcaagata-3'	5'-gcaaattcctggttgaagat-3'	NM_013095
<i>Smad4</i>	5'-gaacctggatggacgactg-3'	5'-acagacggcatagatcaca-3'	NM_019275
<i>Smad5</i>	5'-cagcctatggacacaagcaa-3'	5'-ggcaacaggctgaacatctc-3'	NM_021692
<i>Smad6</i>	5'-gttgcaaccctaccacttc-3'	5'-ggaggagacagccgagaata-3'	NM_001109002
<i>Smad7</i>	5'-accccatcaccttagtcg-3'	5'-aatccatcgggtatctgga-3'	NM_030858
<i>Smad9</i>	5'-accattaccgagagtgaga-3'	5'-tgagggtgtactcgtgtg-3'	AF012347
<i>β-actin</i>	5'-ctaaggccaaccgtgaaaag-3'	5'-accagaggcatacagggaca-3'	NM_031144

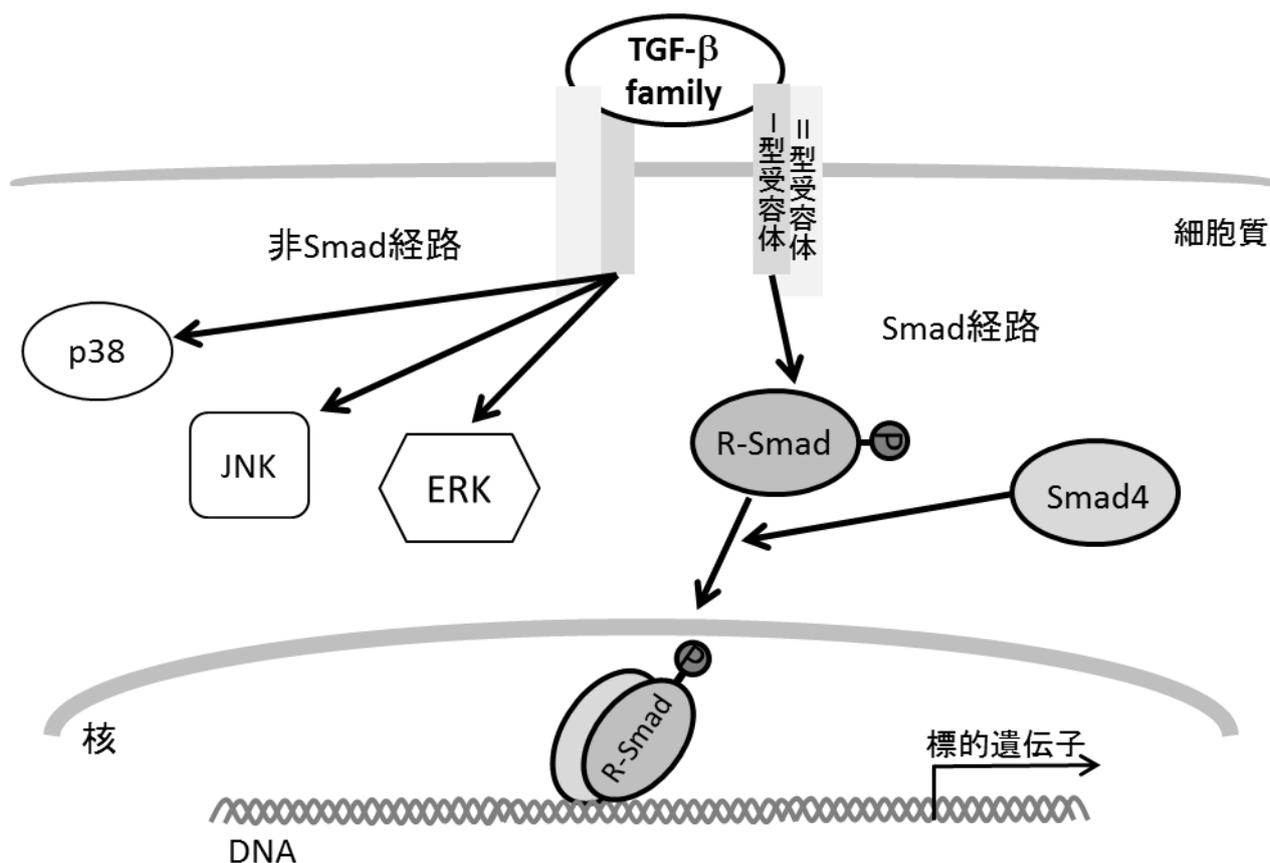
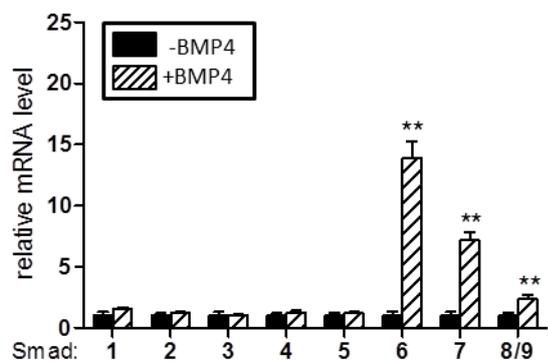


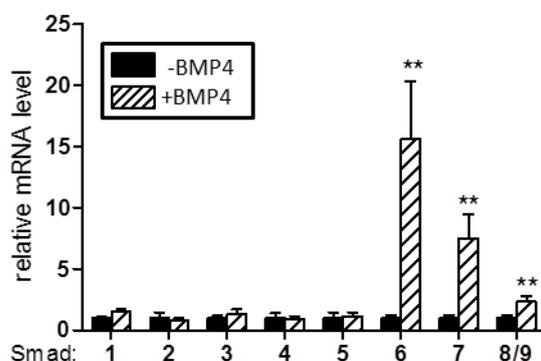
図1 TGF-βファミリーのシグナル伝達経路

細胞外のTGF-βファミリーのリガンドは細胞膜に存在するI型受容体とII型受容体に結合する。BMP2/4のI型受容体はAlk2/3/6 (Attisano et al., 1993)、II型受容体はBmpRIIおよびActRII/IIB (Massagué et al., 2000; Kawabata et al., 1998) である。I型受容体によりR-Smadがリン酸化されると、R-SmadはCo-SmadであるSmad4と複合体を形成して核内に移行し、Id1やId2などを含む遺伝子の転写を活性化する。

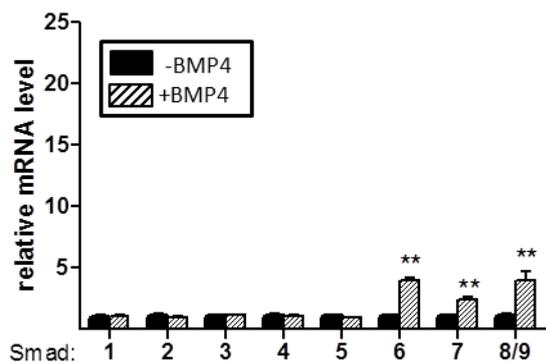
**A** マウス筋芽細胞由来細胞株  
C2C12



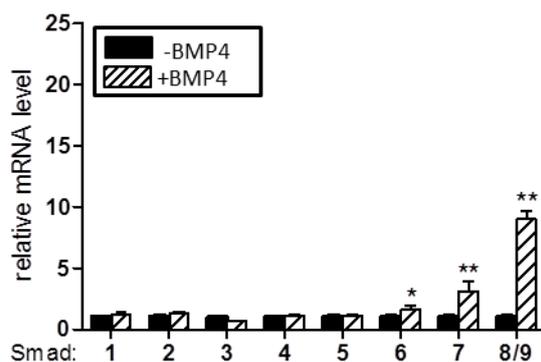
**B** マウス脂肪前駆細胞由来細胞株  
3T3-L1



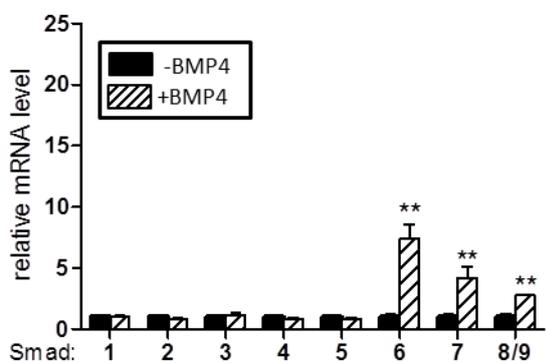
**C** ヒト肝癌由来細胞株  
HepG2



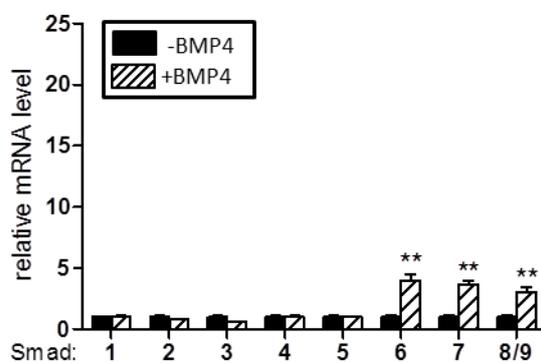
**D** ラット心臓横紋筋由来細胞株  
H9c2



**E** マウスメラノーマ由来細胞株  
B16



**F** ラット表皮由来初代培養細胞株  
Fibroblasts



**図 2 複数の細胞種における BMP4 に対する Smad の発現量**

BMP4 処理に対する Smad の発現量を C2C12 (A)、3T3-L1 (B)、HepG2 (C)、H9c2 (D)、B16 (E)、Fibroblasts (F) の各種細胞において測定した。細胞は BMP4 (4nM) を添加後 2 時間培養した。Smad の発現量は qRT-PCR によって測定し、 $\beta$ -actin の発現レベルに対する比の値を相対的な遺伝子発現レベルとした。また、BMP4 を添加していない細胞をコントロールとして遺伝子発現レベルを 1 とした。データは平均値±標準誤差で示し、n=4、\* : P<0.05、\*\* : P<0.01 とし、それぞれコントロールと比較した。

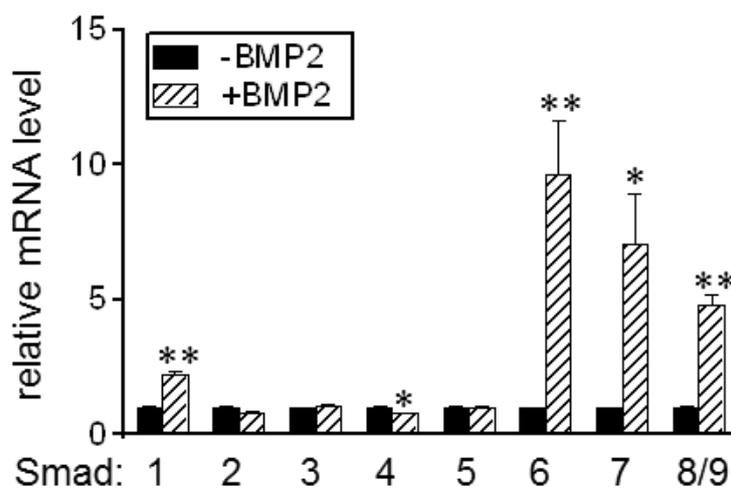
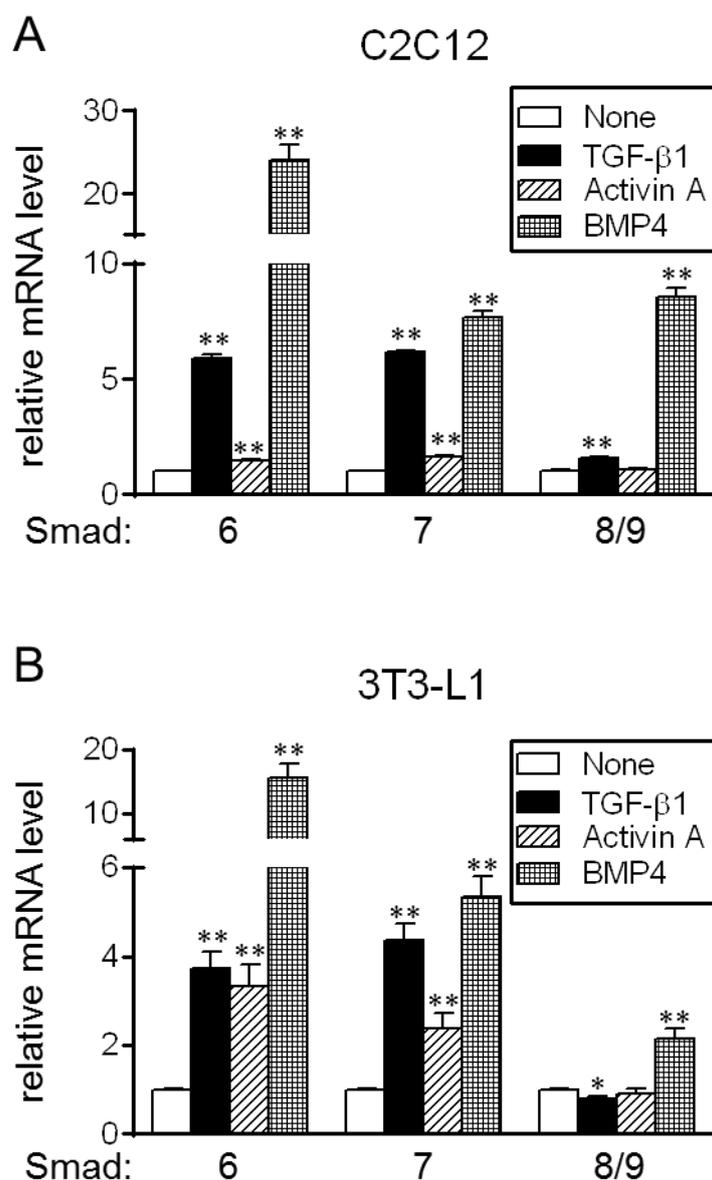


図 3 3T3-L1 における BMP2 に対する Smad の発現量

BMP2 処理に対する Smad の発現量を 3T3-L1 細胞において測定した。細胞は BMP2 (4nM) を添加後 2 時間培養した。Smad の発現量は qRT-PCR によって測定し、GAPDH の発現レベルに対する比の値を相対的な遺伝子発現レベルとした。また、BMP2 を添加していない細胞をコントロールとして遺伝子発現レベルを 1 とした。データは平均値±標準誤差で示し、n=4、\* : P<0.05、\*\* : P<0.01 とし、それぞれコントロールと比較した。



**図4 C2C12、3T3-L1におけるTGF-βファミリーに対するSmadの発現量**

TGF-β1、activin A および BMP4 処理に対する Smad の発現量を C2C12 (A)、3T3-L1 (B) において測定した。細胞は TGF-β1 (100pM)、activin A (4nM) もしくは BMP4 (4nM) を添加後 2 時間培養した。Smad の発現量は qRT-PCR によって測定し、β-actin の発現レベルに対する比の値を相対的な遺伝子発現レベルとした。また、それぞれ刺激を加えていない細胞をコントロールとして遺伝子発現レベルを 1 とした。データは平均値±標準誤差で示し、n=4、\*:P<0.05、\*\* : P<0.01 とし、それぞれコントロールと比較した。

## 第 2 章 各種細胞における Smad8/9 の遺伝子解析

### 1 序論

Smad 経路のシグナル伝達において主要な役割を果たす R-Smad は、N 末端に Mad homology (MH) 1 領域が、C 末端には MH2 領域が存在し、リンカー領域と呼ばれる領域でつながっている。I 型受容体により R-Smad の C 末端側に存在する SSXS モチーフがリン酸化されると、MH2 領域が Co-Smad と複合体を形成し、核内に移行して標的遺伝子の転写制御を行う (Derynck., 2003)。リンカー領域をコードする箇所、Smad8 の CDS 領域の塩基配列の 642 番目には 6 塩基 (5'-cgagtc-3') の挿入があるものを Smad9 としているものの (図 1A)、機能的な違いは認められておらず、通常区別されていないことが多い。第 1 章より、実験で用いたすべての細胞において、BMP による Smad8/9 の発現上昇が認められたため、BMP により発現が上昇した Smad8/9 の性状をより詳細に調べるために、第 1 章で用いた細胞において発現していた Smad8/9 が Smad8 か Smad9 の判別を行うため、ヌクレオチドシーケンスを行った。

また、Smad8/9 遺伝子には、スプライシングバリエントが存在する。ヒトにおいては、受容体複合体によりリン酸化される C 末端のセリンが欠失しているもの (Smad8B) (Nishita et al., 1999) や、エクソン 2 と 3 が欠失しているもの、あるいはエクソン 3 のみが欠失しているものの報告がある (Cheng et al., 2004)。しかし、マウスにおけるスプライシングバリエントは配列が登録されているだけである。そこで本章では、マウスにおけるスプライシングバリエントの検索、および BMP4 刺激によって発現が上昇した Smad8/9 がこれらスプライシングバリエントのどれにあたるのかを明らかにすることを試みた。

## 2 方法

### 材料

6 週齢の健常 ICR マウス（雄 2 匹、雌 2 匹）を日本エスエルシー株式会社より購入した。

### 細胞培養

3T3-L1、C2C12 および HepG2 の培養は第 1 章と同様の方法で行った。

### DNA 抽出

培養細胞およびマウスの肝臓から、Get *pure*DNA Kit - Cell, Tissue (Dojindo) を用い、添付のマニュアルに従って DNA を抽出した。

### RNA の抽出および RT による cDNA の作製

RNA の抽出は第 1 章と同様の方法で行った。抽出した total RNA から、SSIII SuperScript™III First-strand Synthesis System for RT-PCR (Thermo Fisher Scientific) を用い、添付のマニュアルに従って cDNA を作製した。

### PCR と塩基配列の決定

使用したプライマーの配列は表 1 に記載した。Smad8/9 522F-679R、human Smad8、human Smad8B の PCR 反応は、Ex-Taq DNA polymerase (タカラバイオ) を用い、添付のマニュアルに従って、初期熱変性を 95°C 3 分間の後、熱変性 95°C 20 秒間、アニーリング温度 60°C 20 秒間、伸長反応 72°C 20 秒間 (Smad8or9 determination) もしくは 50 秒間 (human Smad8、human Smad8B) のセットを 35 サイクル、最終反応として伸長反応 72°C 5 分間の条件で行った。mouse Smad8/9 の PCR 反応は PrimeSTAR GXL DNA polymerase (タカラバイオ) を用い、添付のマニュアルに従って、初期熱変性を 98°C 2 分間の後、熱変性 98°C 10 秒間、アニーリング温度 60°C 15 秒間、伸長反応 68°C 20

秒間 (exon1-2) もしくは 100 秒間 (exon1-4、exon1-6) のセットを 35 サイクル、最終反応として伸長反応 68°C 3 分間で行った。

PCR 産物は、1.5%アガロースゲルを用いて 5 $\mu$ L を電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色し、UV ライトにより可視化して、目的のサイズが増幅されていることを確認した。

PCR 産物は exonuclease I (Wako) と shrimp alkaline phosphatase (タカラバイオ) を用いて精製した。BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) によってサイクルシーケンスを用い、BigDye<sup>®</sup> XTerminator<sup>™</sup> Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて精製し、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) によって配列を決定した。

Smad8/9 522F-679R のプライマーはマウスの配列より設計した。ヒトにおいては数塩基の変異が認められた (図 2A) が、マウスと同一条件で目的のサイズが増幅され、シーケンスにより配列が決定できた。

### クローニングとインサートの確認

TA クローニングには pGEM-T Easy Vector System II (Promega, Madison, WI) を用いた。ライゲーション反応にはキットに付属の T4 DNA Ligase と 2 $\times$ Rapid Ligation Buffer を用いて行い、形質転換には E.coli JM109 Competent Cell (タカラバイオ) を使用した。コンピテントセル 25  $\mu$ L とライゲーション液 4  $\mu$ L を混合し、氷中で 30 分静置した。42°C で 1 分間インキュベートした後、混合液に滅菌蒸留水を 200  $\mu$ L 加え、アンピシリン (50  $\mu$ g/mL) 加 LB 培地に播種し、37°C で一晩培養した。

インサートサイズ確認のために、PCR によりプラスミドベクターに対するフォワードプライマーとリバースプライマーを用いてインサート部分を増幅した。PCR 反応には、Ex-Taq DNA polymerase (タカラバイオ) を用い、添付のマニュアルに従って、初期熱変性を 95°C 3 分間の後、熱変性 95°C 20 秒間、アニーリング温度 55°C 20 秒間、伸長反応 72°C 20 秒間のセットを 32 サイクル、最終反応として伸長反応 72°C 5 分間の条件で行った。PCR 産物は、上記と同じ

方法でインサートを確認し、配列を決定した。

### 核型分析

細胞分裂中期のクロマチンを得るため、3T3-L1 細胞を 100-mm 組織培養用シャーレにて密集度 80%になるまで培養した。コルヒチン (Calbiochem, La Jolla, CA) を最終濃度が 0.1  $\mu\text{g} / \text{mL}$  になるように加え、細胞周期を停止させた。1 時間後、細胞を回収し、1,000 rpm で 10 分間遠心した。上清を除去し、低張液 0.075 KCl を 8 mL 加え、よく攪拌し 37°C で 30 分インキュベートした。

低張処理後、酢酸 : 100%メタノールを 1 : 3 で調整したカルノア液を 1 mL 低張液に重層させ、低張液をピペットで吸いカルノア液にゆっくり滴下させて混和し、カルノア液と低張液が混ざったら全体をよくピペッティングしたのちに 1,000 rpm で 10 分間遠心した。上清を 1 mL 残して捨て、新しいカルノア液を 7 mL 重層し、よくピペッティングしたのち再び 1,000 rpm で 10 分間遠心した。上清を 1 mL 残して捨てたのち、同様の行程をもう一度行い、遠心後上清を捨て、細胞量に合わせてカルノア液を加え、固定細胞懸濁液とした。

よく拭いたスライドガラスに、固定細胞懸濁液を 10  $\mu\text{L}$  滴下し空気乾燥法にて顕微鏡用の染色体中期標本作製した。完成した標本は 5%ギムザ染色 (MERCK, Darmstadt, Germany) により染色を行い、倍率 1,000 倍の顕微鏡下で良好な染色体像が得られた 23 個の染色体中期標本の観察を行った。

### 3 結果

#### 各種細胞における Smad8 と Smad9 の判別

第 1 章で用いた細胞における Smad8/9 の判定を行うため、マウスで見つかった 6 塩基の違いを含むプライマー Smad8/9 522F-679R (図 1A) で PCR し、シーケンス反応を行い、塩基配列を決定した (図 1B)。今回用いた細胞のうち、C2C12 をのぞくすべての細胞において 6 塩基の挿入が認められた (図 1B に一部の細胞のデータを示した) ことから、C2C12 は Smad8、その他の 5 種の細胞は Smad9 を発現していることが示された。RT-PCR 産物のダイレクトシーケンスにより調べたところ、C2C12 において、BMP4 処理による Smad9 の発現は認められなかった (データは示していない)。

また、3T3-L1 のヌクレオチドシーケンスでは、Smad8 と Smad9 どちらも発現が認められた (図 1B・下)。この結果には再現性が得られたため、クローニングを行い 3T3-L1 における Smad8/9 の mRNA の配列を調べたところ、得られた 58 クローンのうち、24 クローン (41%) が Smad8、34 クローン (59%) が Smad9 であった。そこでゲノム DNA においても同様にクローニングを行ったところ、得られた 41 クローンのうち、16 クローン (39%) が Smad8、25 クローン (61%) が Smad9 であった。mRNA とゲノム DNA における Smad8 と Smad9 の比率はほとんど等しかった。さらに核型解析を行い、得られた 23 個の染色体中期標本を観察したところ、3T3-L1 における染色体数は  $63 \pm 15$  であった (図 2、表 2)。通常のマウスでは染色体数は 40 であると考えられている。よって、Smad8 と Smad9 の比が 1:1 でないのはこれらの異常な染色体数を反映していると考えられた。一方で、ICR マウスの肝臓より抽出したゲノム DNA においても同様の実験を行い Smad8/9 の判定を行ったところ、用いた 4 サンプルすべてにおいて Smad8 であることが確認された (データは示していない)。

#### スプライシングバリエントに関する詳細な検討

ヒトにおいて報告されている Smad8/9 のスプライシングバリエントの有無を

調べるため、まずヒト由来の細胞株である HepG2 細胞において、過去に報告のある PCR プライマー、human Smad8 および human Smad8B (表 1) を用いて Smad8B の発現を調べたが (Nishita et al., 1999)、BMP4 刺激の有無にかかわらず、Smad8B の発現は認められなかった (図 3)。また、マウスにおいても Smad8/9 の登録配列を検索したが、C 末端のセリンが欠失した配列の登録はなかった。

また、マウスの Smad8/9 の塩基配列のデータベースを調べたところ、エクソン 1 と 2 の間に挿入配列があるもの (variant 1: XM\_006501728)、エクソン 2 の一部に欠失があるもの (variant 2: XM\_00651729) が見つかった (図 4A、B)。そこで C2C12 において、これらの Smad8/9 バリエーションの発現と、BMP4 処理による影響を、これらのバリエーションを判別できるプライマー、mouse Smad8/9 (表 1) を用いて調べたところ、BMP4 は 3 つのバリエーション、Smad8/9 の野生型、Smad8/9 の variant 1 と 2 の遺伝子転写レベルを増加させた (図 4C に一部のデータを示した)。これらのアミノ酸配列を比較したところ、wild type と variant 1 のアミノ酸配列は CDS 領域において完全に一致した (図 4B)。しかし、wild type と variant 2 のアミノ酸配列には、13 個のアミノ酸の違いが見られ、wild type の最初の 9 個のアミノ酸が variant 2 では欠失しており、続く 5 個のアミノ酸にも違いが見られた。MH1 をコードする領域においても、2 個のアミノ酸の違いが見られ、そのうちの 1 個はトレオニンがアスパラギン酸に変わっていたが、それ以降のアミノ酸に違いは認められず、C 末端のセリンの欠失も認められなかった。

## 4 考察

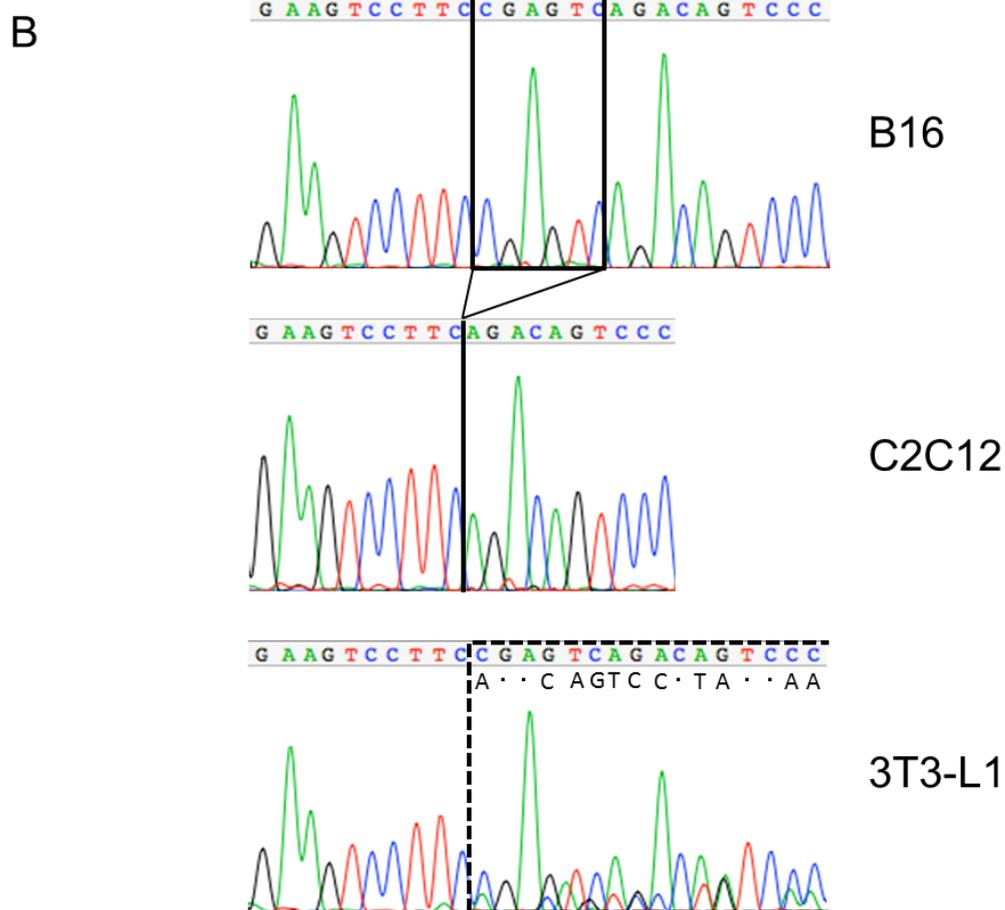
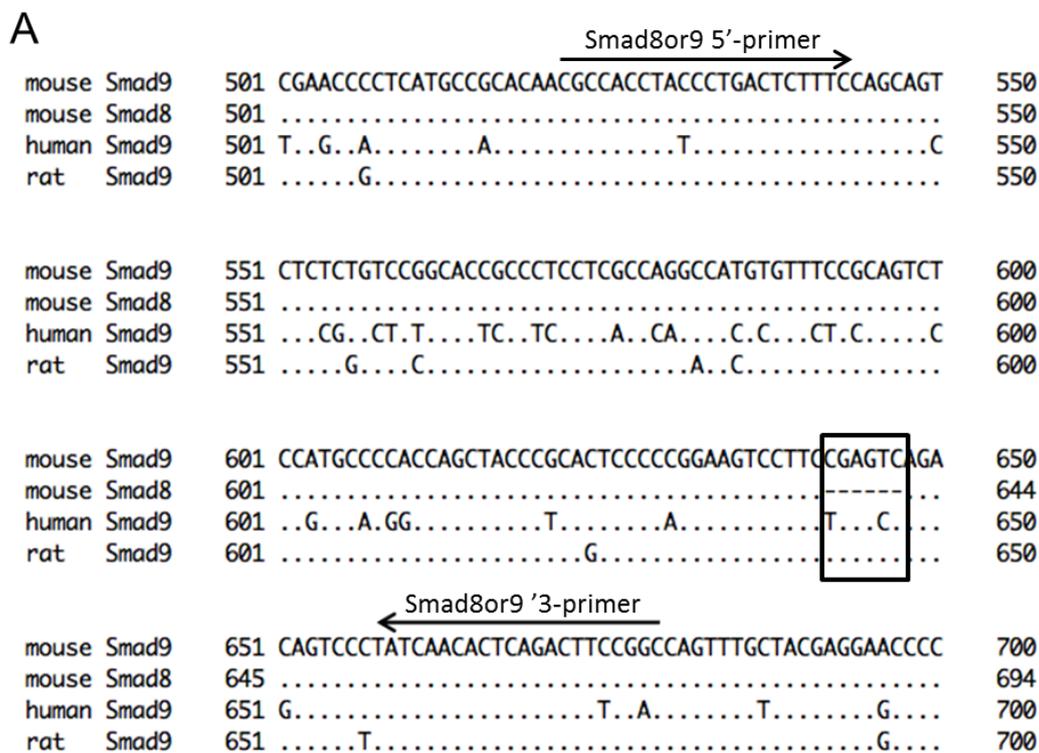
実験で用いた各種細胞において Smad8/9 の判別を行ったところ、C2C12 のみ Smad8、ほかの細胞は Smad9 を発現していることが明らかになった。C2C12 ではゲノム DNA、BMP4 刺激により発現が上昇した mRNA いずれも 6 塩基の欠失が見られる Smad8 であった。Smad9 を発現している細胞のうち、3T3-L1 は Smad8 と Smad9 のいずれも発現していることが分かり、クローニングによりゲノム DNA および mRNA 中の Smad8/9 の存在比を調べたところ、いずれもおおよそ Smad8 : Smad9 = 4 : 6 であった。ゲノム DNA がヘテロであったら、その存在比は本来なら 5 : 5 になるはずである。そこで核型解析を行ったところ、3T3-L1 の染色体数は通常のマウスより多く、染色体異常が起こっていることが示唆された。がん細胞株においては、かなりの割合で染色体異常が起こっていることはすでに報告されている (Roschke et al., 2003)。また、ヒトの細胞株において、染色体の不分離によって異数体になるということが分かっている (Shi et al., 2005) ことから、3T3-L1 はがん化細胞ではないものの、なんらかの原因により異数体となり、Smad8/9 の存在比が不均等になった可能性が考えられる。また、3T3-L1 の元となったマウスでも Smad8/9 の判別を行うことを試みた。3T3-L1 は Swiss 系マウス胎子由来であるが、Swiss 系マウスは手に入らなかったため、非近交系 Swiss 系マウスを起源とする ICR マウスを購入し、肝臓より抽出した DNA により判別を行ったところ、用いた 4 個体すべてにおいてゲノム DNA が Smad8 であることが確認された。この違いは、今回用いたマウスが Swiss 系ではなく ICR だったことに起因しているのかもしれない。

以上のことから、各種細胞において BMP4 刺激により上昇している Smad8/9 は、その細胞のゲノム DNA を反映したものであり、Smad8/9 の差は BMP4 刺激による Smad8/9 の発現上昇には関与しないものと考えられた。

ヒトで報告のある Smad8/9 のスプライシングバリエントおよび Smad8B の検出を HepG2 において試みたが、BMP4 刺激の有無にかかわらず、Smad8B

の増加は認められなかった。また、マウスにおいても Smad8B 配列を検索したが見つからなかったため、複数種の細胞における BMP4 による Smad8/9 遺伝子の発現は C 末端のセリンを欠いた Smad8/9 のバリエントの発現とは関連がないと結論付けた。

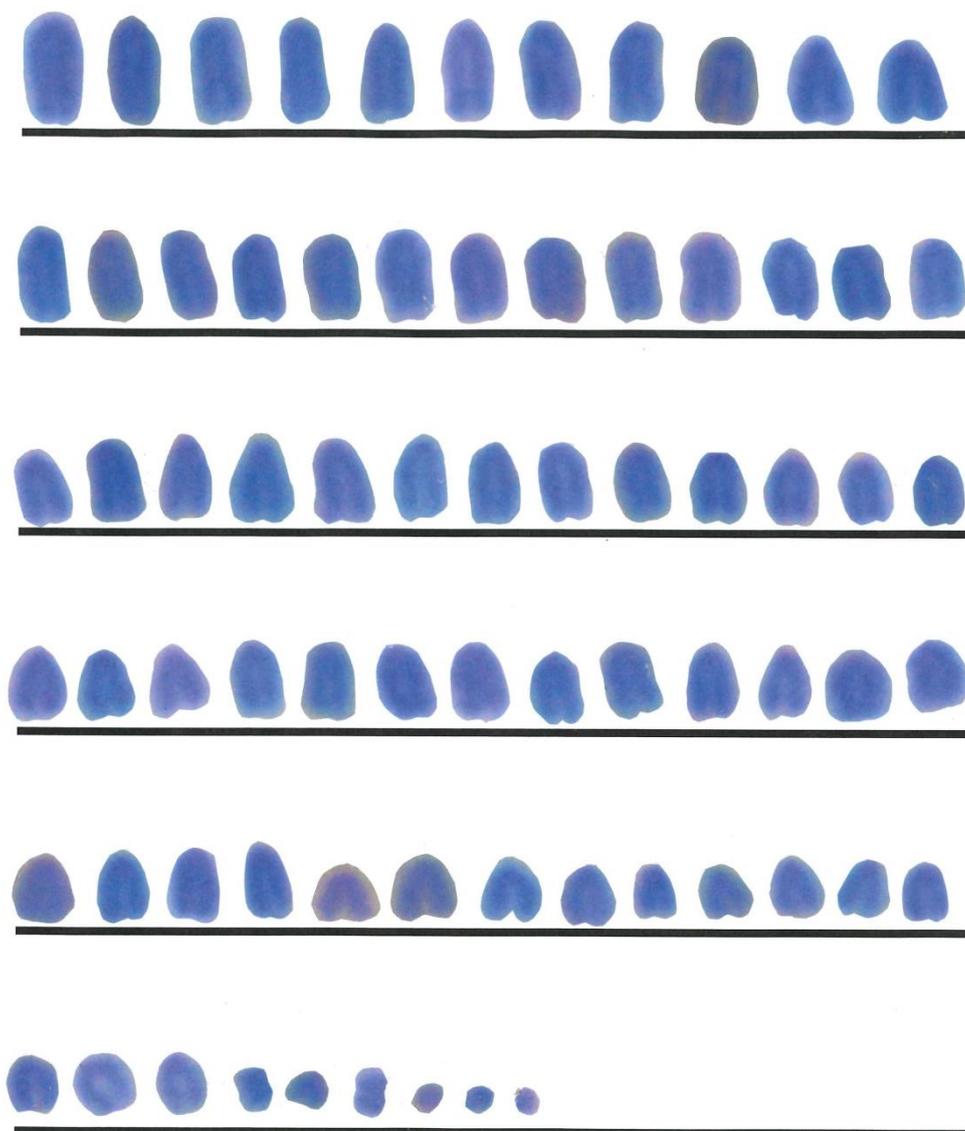
また、マウスにおいて塩基配列が登録されていた Smad8/9 の variant1 と variant2 を検出することに成功した。variant2 では CDS 領域にアミノ酸の変化を伴う変異が認められた。しかしヒトで報告されているようなエクソン 2 もしくは 3 全体の欠失は認められず、2 個のアミノ酸変異が及ぼす影響は未知である。ただ、BMP4 刺激によってこれらのバリエントの発現がすべて同じように増加したことから、BMP4 刺激によってバリエント特異的な反応が起こるといよりは、全体的に発現が上がるだけであり、この系にバリエントは関与しないことが示唆された。



**図 1 複数の動物種および細胞における Smad8/9 の塩基配列比較**

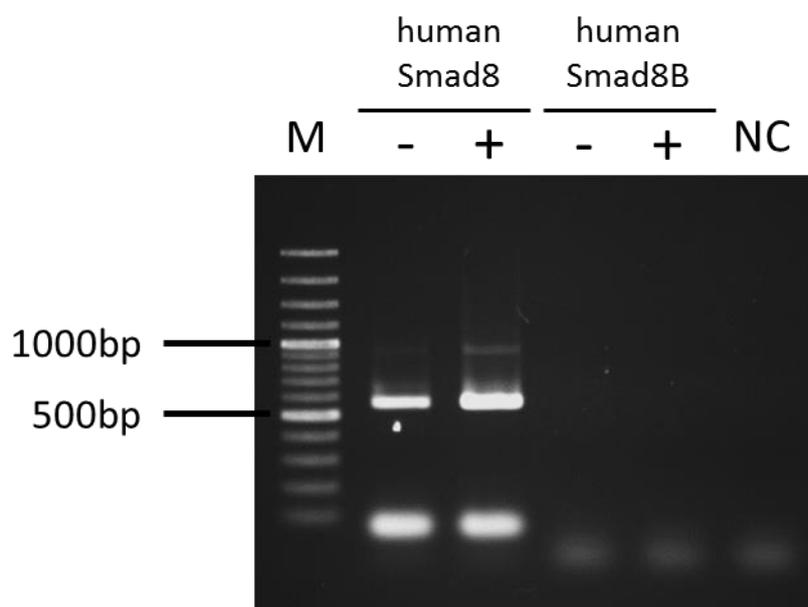
A: 翻訳開始点を+1 とし、マウス (Smad8: AF175408、Smad9: NM\_019483)、ヒト (NM\_005905)、ラット (NM\_138872) の塩基配列を比較した。黒矢印はプライマー、黒い四角は Smad8 における 6bp 欠失箇所を示す。欠失箇所は、転写開始点を+1 とすると+961、翻訳開始点を+1 とすると+641 の箇所に見られる。プライマーはマウスの配列をもとに設計した。

B: B16 (上)、C2C12 (真ん中)、3T3-L1 (下) の Smad8/9 の塩基配列の波形を示した。



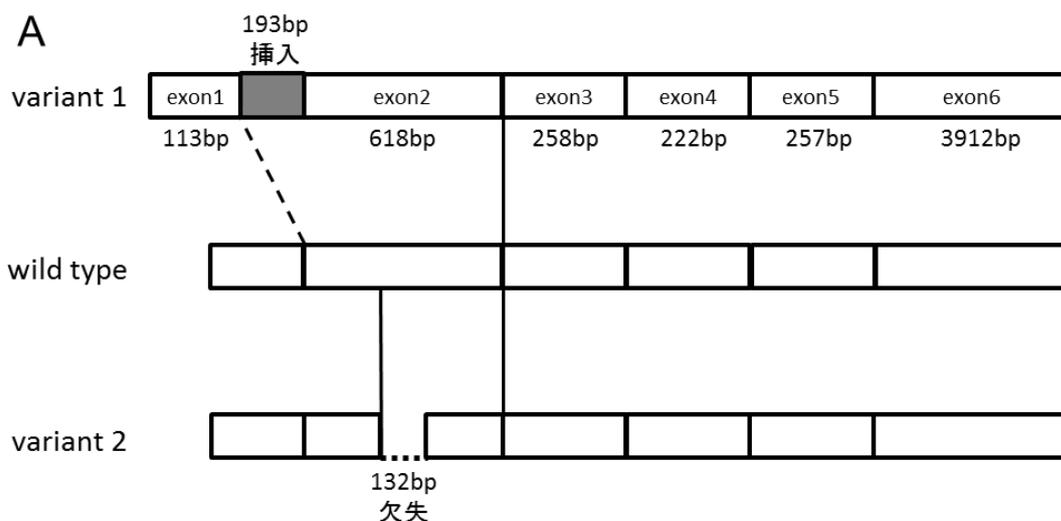
**図 2 3T3-L1 の染色体中期標本**

3T3-L1 の核型解析により得られた染色体中期標本のなかの代表例を示す。通常のマウスの染色体数は 40 であるが、72 本の染色体が確認できる。



**図 3 HepG2 における huSmad8、huSmad8B プライマーを用いた PCR 結果**

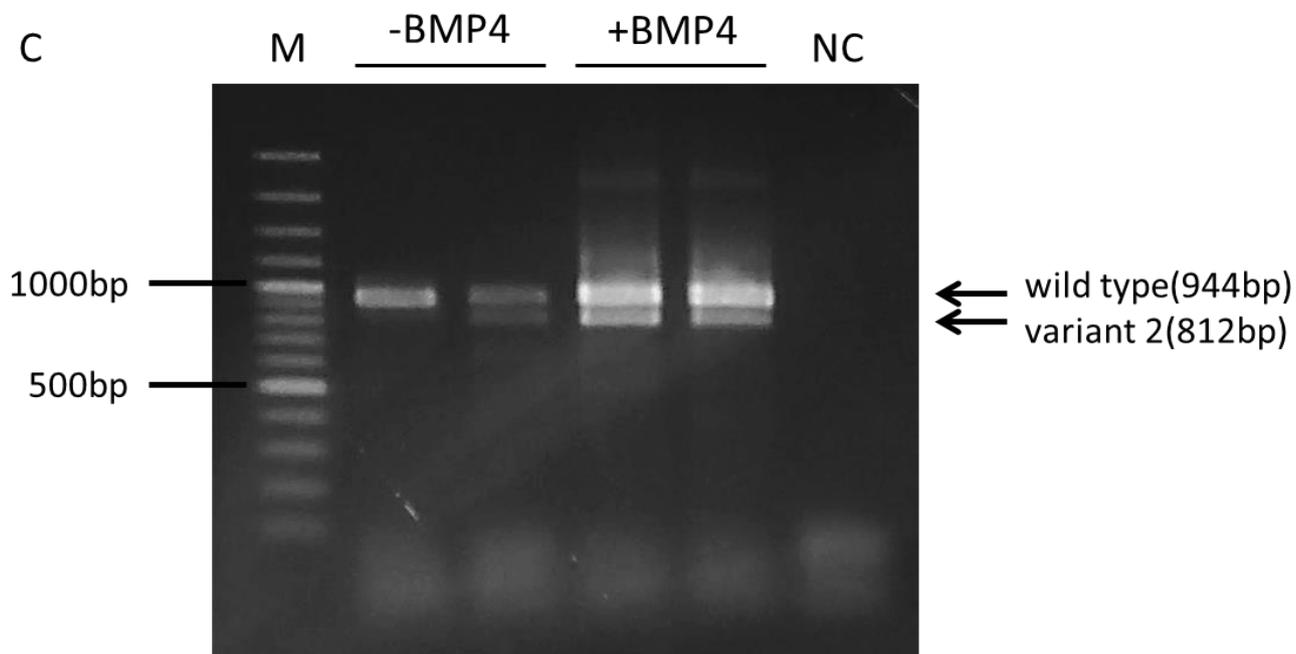
HepG2 における PCR 結果を示す。BMP4 未処理を-、BMP4 処理を+とした。human Smad8 プライマーにおいては 560bp のバンドが観察されたが、human Smad8B プライマーではバンドは確認されなかった。



**B**

		MH1	
wild type	1	MHPSTPISSLFSFTSPAVKRLLGWKQGDEEEKWAEKAVDSL VKKKKKKG	50
variant 1	1	.....	50
variant 2	1	-----MTVD.....	41
wild type	51	AMDELERALSCPGQPSKCVTIPRSLDGRLQVSHRKGLPHVIYCRVWRWPD	100
variant 1	51	.....	100
variant 2	42	.....	91
wild type	101	LQSHHELKPLECCEFPFGSKQKEVCINPYHYRRVETPVLPPVLVPRHSEY	150
variant 1	101	.....	150
variant 2	92	.....	141
wild type	151	NPQLSLLAKFRSASLHSEPLMPHNATYPDSFQQSLCPAPPSSPGHVFPQS	200
variant 1	151	.....	200
variant 2	142	.....	191
wild type	201	PCPTSYPHSPGSPSESDSPYQHSDFRPVCYEE PQHWCSVAYYELNNRVGE	250
variant 1	201	.....	250
variant 2	192	.....	241
wild type	251	TFQASSRSVLIDGFTDPSNNRNRFLGLLSNVNRNSTIENTRRHIGKGVH	300
variant 1	251	.....	300
variant 2	242	.....	291
wild type	301	LYYVGGEVYAECVSDSSIFVQSRNCNYQHGFHPATVCKIPSGCSLKVFNN	350
variant 1	301	.....	350
variant 2	292	.....	341
wild type	351	QLFAQLLAQSVHHGFVYVELTKMCTIRMSFVKGWGAEYHRQDVTSTPCW	400
variant 1	351	.....	400
variant 2	342	.....	391
wild type	401	IEIHLHGPLQWLDKVLTQMGSHPNPISVS	430
variant 1	401	.....	430
variant 2	392	.....	421

MH2



**図 4 スプライシングバリエントの模式図、アミノ酸配列図および PCR 結果**

A: マウスにおけるスプライシングバリエント 3 種、wild type (NM\_019483)、variant 1 (XM\_006501728)、variant 2 (XM\_006501729) の模式図を示した。variant 1 の灰色の四角は variant 1 における 193bp の挿入、variant 2 の点線は 132bp の欠失を表す。

B: マウスにおけるスプライシングバリエント 3 種、wild type (NM\_019483)、variant 1 (XM\_006501728)、variant 2 (XM\_006501729) のアミノ酸配列を比較した。黒い四角はそれぞれ MH1、MH2 領域をコードする配列を示す。wild type と variant 1 のアミノ酸配列は CDS 領域において完全に一致したが、variant 2 においては 9 個の欠失、続くアミノ酸にも 4 個の違いが認められた。

C: 代表例として、mouse Smad8/9 exon1-4 の PCR 結果を示した。wild type では 944bp、variant 1 では 1137bp、variant 2 では 812bp の PCR 産物が期待される。本プライマーによる PCR では、BMP4 刺激により、wild type および variant 2 のバンドの増強傾向が確認された。

表 1 Smad8/9 のバリエーションを検出するための PCR に使用したプライマー

Gene	5'-primer	3'-primer
Smad8or9 判別用プライマー		
<i>Smad8/9 522F-679R</i>	5'-cgccacctaccctgactctttc-3'	5'-gccggaagtctgagtgtgata -3'
Smad8/9 スプライシングバリエーション検出用プライマー		
Human		
<i>human Smad8</i>	5'-atgccacagctgatagacatgtagtgctat-3'	5'-ggtgacatcctggcgatgatactcagcacc-3'
<i>human Smad8B</i>	<i>Smad8</i> と同一プライマーを使用	5'-gagtagcttcattgagtcctcagtgct-3'
Mouse		
<i>mouse Smad8/9 exon1-2</i>	5'-gggcacgcgtggcacctctcggaca-3'	5'-ccagcccagcagccgcttactgcg-3'
<i>mouse Smad8/9 exon1-4</i>	<i>exon1-2</i> と同一プライマーを使用	5'-aacaccagtgcggggttcctcgta-3'
<i>mouse Smad8/9 exon1-6</i>	<i>exon1-2</i> と同一プライマーを使用	5'-gggtgctcgtgacatcctggcgatg-3'

表 2 3T3-L1 で観察された染色体数

Chromosome	37	45	49	50	52	57	58	59	60	61	64	66	67	68	70	72	115	total
Count number	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	3	1	1	23

## 第 3 章 BMP による Smad8/9 遺伝子発現促進の制御機構の 解明

### 1 序論

第 1 章、第 2 章より、Smad8/9 は R-Smad のなかでも BMP 刺激により mRNA レベルによって上昇する特殊な遺伝子であり、その変化は様々な細胞において分化に関係なく起こること、発現が上昇する Smad8/9 はゲノム DNA を反映していること、Smad8/9 にスプライシングバリエントは存在するが、それらのバリエントはこれらの反応には関与しないことが示唆された。

次に、Smad8/9 の発現の制御にかかわる分子機構に着目した。I 型受容体による C 末端のリン酸化も Smad の活性化には重要であるが (Massagué, 2000; Itoh et al., 2000; Moustakas et al., 2001)、ほかのキナーゼ経路によっても Smad 経路は制御される。たとえば、Smad2 は mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路の extracellular signal-regulated kinase (ERK) 2 によってリン酸化され、結果的に TGF- $\beta$ ファミリーに応答性のある DNA 配列の転写を増強することが報告されている (Funaba et al., 2002)。TGF- $\beta$ ファミリー刺激による反応であっても、必ずしも Smad 経路を介しているとは限らない。

そこで本章では、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド、及び BMP の I 型受容体阻害薬 LDN-193189 (Yu et al., 2008) を用いて、Smad8/9 の発現の制御にかかわる分子機構を解明することを目的とした。

## 2 方法

### 材料

LDN-193189 は Stemgent より購入した。

ウエスタンブロット法では一次抗体として抗 pSmad1/5/8 ラビット由来ポリクローナル抗体 (#13820 ; Cell Signaling Technology, Danvers, MA)、抗 Smad1 ラビット由来モノクローナル抗体 (ab33902 ; Abcam, Cambridge, MA)、抗 Smad5 ラビット由来モノクローナル抗体 (#12534 ; Cell Signaling Technology)、抗 Smad8 / 9 ゴート由来ポリクローナル抗体 (ab48011 ; Abcam)、二次抗体として抗ラビット IgG 抗体 (#7074 ; Cell Signaling)、抗マウス IgG 抗体 (#7076 ; Cell Signaling)、抗ゴート IgG 抗体 (sc-2020 ; Santa Cruz, Dallas, TX) を用いた。また、タンパク質量のコントロールには抗 $\alpha$ -tubulin マウスモノクローナル抗体 (ab11304) を Abcam より購入した。

### 細胞培養

第 1 章と同様の方法で行った。

シクロヘキシミドを用いる場合は、第 1 章と同様に 24-well plate (IWAKI) に細胞を播種して培養し、BMP4 (4nM) を添加後 12 時間培養したのち、シクロヘキシミド (0.5  $\mu$ g/mL) を 15 分間処理した。

LDN-193189 を用いる場合は、第 1 章と同様に 24-well plate (IWAKI) に細胞を播種して培養し、LDN-193189 (100nM) を 15 分間処理したのち、BMP4 (4nM) を添加後それぞれの実験手技に合わせ、1 時間 (ウエスタンブロット)、2 時間 (RT-qPCR) および 16 時間 (レポーターアッセイ) 培養した。

### RNA の抽出および RT による cDNA の作製

第 1 章と同様の方法で行った。

## Smad 遺伝子の定量的リアルタイム RT-PCR

第 1 章と同様の方法で行った。

## プラスミド

マウス Smad8/9 のプロモーターの-1000 から+113 の領域の DNA 配列を増幅し、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む pGL4 ベクターに組み込み、Smad8/9(-1000)-luc を作製した。なお、転写開始点を+1 とした。

## レポーターアッセイ

C2C12、3T3-L1 を 48-well plate に  $3.0 \times 10^4$  個 / well で播種し、4 時間後に Polyethylenimine Max reagent (Polysciences, Warrington, PA) を用いて Smad8/9 のレポーターコンストラクトとウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミド (pRL-tk) をトランスフェクションした。24 時間後に TGF- $\beta$ ファミリーを含む 0.2% FBS を加えた DMEM に交換し、16 時間培養した。発光量の測定には、Dual-Luciferase reporter kit (Promega) および Multi-Detection Microplate Reader POWERSCAN<sup>®</sup>HT (BioTek, Winooski, VT) を用いた。細胞溶液中のホタルルシフェラーゼ活性は、ウミシイタケルシフェラーゼ活性により補正を行った。

## 総タンパク質の抽出および Western blotting 法

EzRIPA Lysis Kit (ATTO) を用いてプロトコールに従い細胞を溶解した。タンパク質濃度は Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。95 °C で 5 分間加熱後、等量のサンプルを 10% のポリアクリルアミドゲルを用い、e-PAGEL (ATTO) にて電気泳動を行った。iBlot Gel Transfer System (Thermo Fisher Scientific) を用いて PVDF membrane に転写し、Ez-Block (ATTO) にて室温 2 時間のブロッキングを行った後、Can Get Signal solution (Toyobo) で一次抗体を 1 : 1,000-5,000 の濃度で希釈し 4°C で一晩静置した。その後、HRP が標識された二次抗体を 1 : 50,000 の濃度で室温 1 時間反応させ、添付のマニュアルに従い ECL Select Western blotting

detection system (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) で検出し、ImageQuant LAS 4000mini (GE Healthcare) を用いて撮影を行った。

### 3 結果

#### BMP4 を介した Smad8/9 の発現は転写によって制御されている

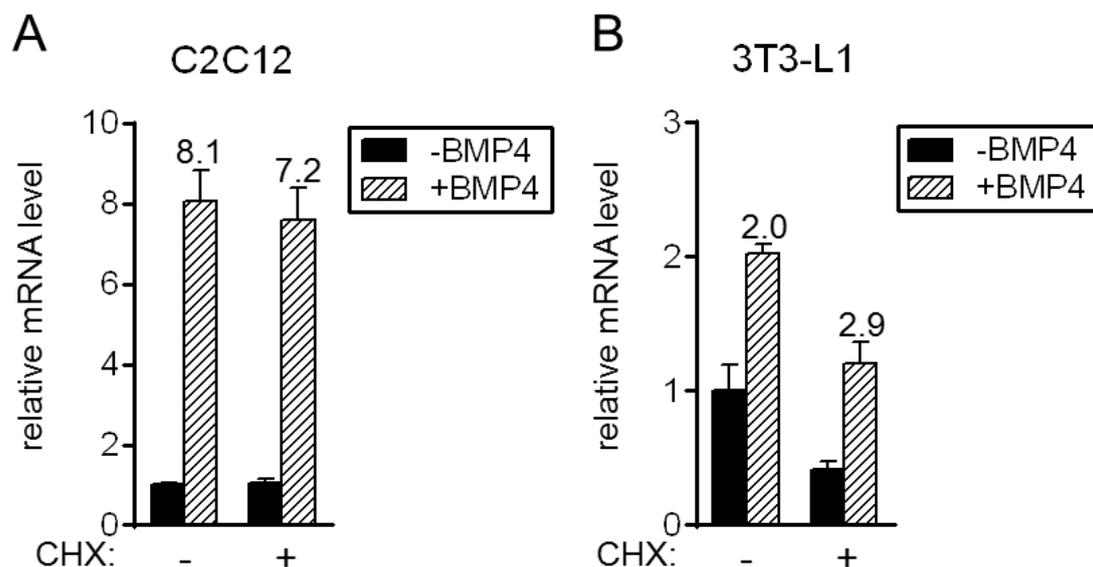
Smad8/9 の発現の制御にかかわる分子機構を調べるため、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを用い、BMP を介した Smad8/9 の発現を調べた (図 1)。BMP4 処理に対する Smad8/9 の発現上昇は、シクロヘキシミドの有無と関係なく起こったため、Smad8/9 の発現上昇は新規のタンパク質合成を伴わない直接的な反応であることが示唆された。次に、あらかじめ C2C12 に BMP の I 型受容体阻害薬である LDN-193189 を処理しておき、BMP で刺激したところ、Smad8/9 の mRNA の発現上昇が抑制された (図 2A)。ウエスタンブロット法により、R-Smad である Smad1、Smad5、Smad8/9 およびリン酸化 Smad1/5/8/9 のタンパク質レベルを調べたところ、R-Smad の 3 種では変化が見られなかったが、BMP4 の刺激によりリン酸化 Smad1/5/8/9 のレベルが増加した。また、この反応は、LDN-193189 によって阻害された (図 2B)。

これらのことから、BMP による Smad8/9 発現上昇は、転写によって制御されているのではないかと考え、Smad8/9 のプロモーターを用いてルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。Smad8/9 遺伝子のプロモーター領域 1,000bp を含むレポーターを用い、BMP4 を介する Smad8/9 の転写を調べた (図 3)。C2C12、3T3-L1 において、BMP4 はルシフェラーゼの発現を増加させ、BMP の I 型受容体阻害薬 LDN-193189 の存在下では BMP4 に対する反応は抑制された。このことから、BMP4 を介した Smad8/9 の発現は、BMP の I 型受容体の活性化によって転写が制御されていることが示唆された。

## 4 考察

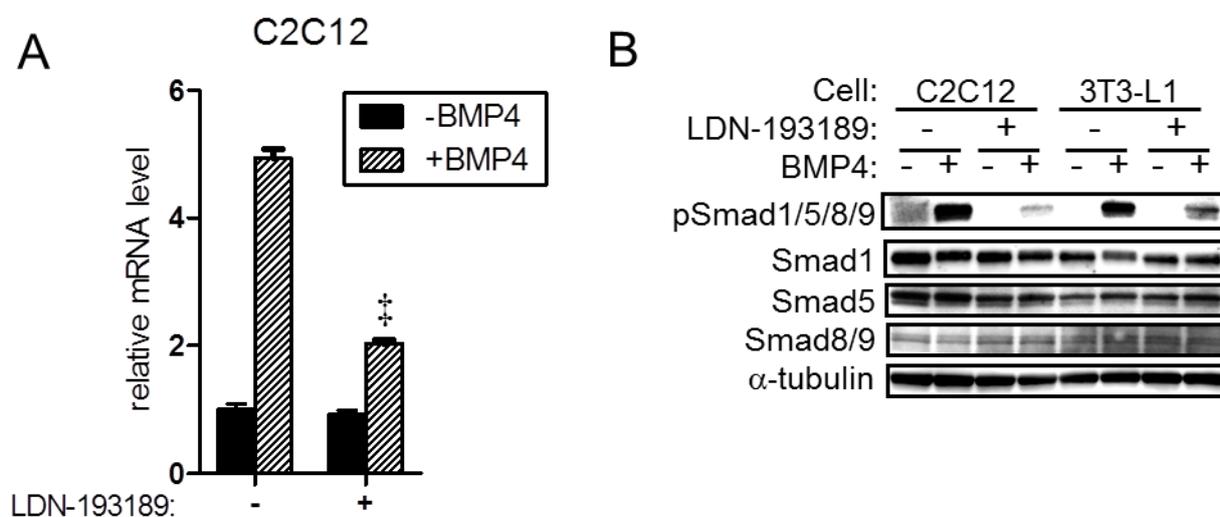
タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドの有無にかかわらず、BMP4 による Smad8/9 の遺伝子発現上昇が見られたことから、BMP によって誘導される Smad8/9 遺伝子発現は BMP 刺激後に新たなタンパク質（転写因子、エンハンサーなど）の新生を必要としないことが示唆された。また BMP の I 型受容体阻害薬である LDN-193189 によって BMP4 による Smad8/9 遺伝子発現の上昇が抑制され、ウエスタンブロットによっても BMP 刺激後に生じる Smad1/5/8/9 のリン酸化が LDN-193189 によって阻害されることを確認できた。これらのことから、BMP による Smad8/9 の遺伝子発現促進は、すでに細胞内にある Smad1/5/8/9 タンパク質をリン酸化させ、通常の Smad 経路 (Miyazono et al., 2010 ; Massagué 2012 ; Sasaki-Yumoto et al., 2013) によってシグナルが伝達されていることが示唆された。

そこで、BMP 刺激後はこの受容体を介したリン酸化 Smad1/5/8/9 が、直接転写因子として作用して転写段階を制御していると推測し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったところ、BMP4 による転写活性が認められた。また、BMP の I 型受容体阻害薬である LDN-193189 を用いると、BMP4 による転写活性は阻害された。このことから、BMP による Smad8/9 遺伝子発現促進は転写レベルで制御されていることが確認できた。



**図 1 BMP4 を介した Smad8/9 の発現量に対するシクロヘキシミドの影響**

BMP4 による Smad8/9 の発現促進において新規のタンパク質合成が必要であるかを、C2C12 (A) および 3T3-L1 (B) を用いて Smad8/9 の mRNA 発現量により調べた。細胞は BMP4 (4nM) を添加後 12 時間培養したのち、シクロヘキシミド (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を 15 分間処理した。Smad8/9 の発現量は qRT-PCR によって測定し、 $\beta$ -actin の発現レベルに対する比の値を相対的な遺伝子発現レベルとした。また、BMP4、シクロヘキシミドともに未処理の細胞をコントロールとして遺伝子発現レベルを 1 とした。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示し、 $n=4$  とし、それぞれコントロールと比較した。バーの上の数字は fold-induction の値を示す。

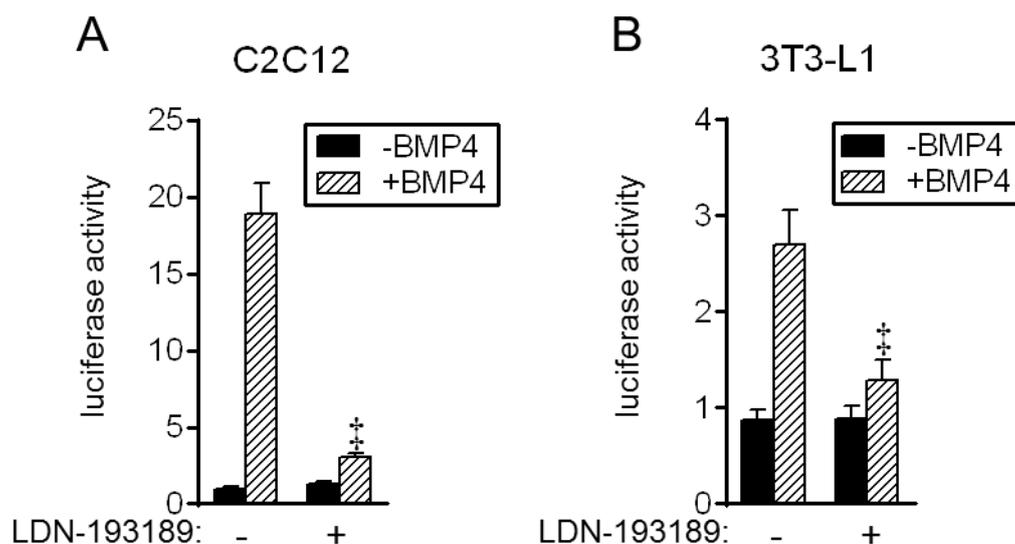


**図 2 BMP4 を介した Smad8/9 の発現量およびリン酸化に対する LDN-193189 の影響**

C2C12 (A, B) および 3T3-L1 (B) における BMP の I 型受容体の活性を、BMP の I 型受容体阻害薬 LDN-193189 を用いて調べた。細胞は LDN-193189 (100nM) を 15 分間処理したのち、BMP4 (4nM) を添加後 1 時間 (B) もしくは 2 時間 (A) 培養した。

A: Smad8/9 の発現量は qRT-PCR によって測定し、 $\beta$ -actin の発現レベルに対する比の値を相対的な遺伝子発現レベルとした。また、BMP4、LDN-193189 とともに未処理の細胞をコントロールとして遺伝子発現レベルを 1 とした。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示し、n=3、 $\ddagger$ : P<0.01 とし、それぞれコントロールと比較した。

B: C2C12 と 3T3-L1 における、Smad1/5/8/9 のリン酸化および Smad1、Smad5、Smad8/9 タンパク質への LDN-193189 の影響をウエスタンブロット法により検証した。コントロールとして、 $\alpha$ -tubulin を用いた。



**図 3** LDN-193189 による BMP4 を介した Smad8/9 の転写活性の変化

C2C12 (A) および 3T3-L1 (B) における BMP4 を介した Smad8/9 の転写を Smad8/9(-1000)-luc の発現によって測定した。細胞は LDN-193189 (100nM) を 15 分間処理したのち、BMP4 (4nM) を添加後 16 時間培養した。ホタルルシフェラーゼ活性は、ウミシイタケルシフェラーゼ活性との比によって表され、BMP4、LDN-193189 とともに未処理の細胞をコントロールとして遺伝子発現レベルを 1 とした。データは平均値±標準誤差で示し、n=6、‡: P<0.01 とし、それぞれコントロールと比較した。

## 第 4 章 BMP による Smad8/9 遺伝子発現制御領域

### (プロモーター領域) の解析

#### 1 序論

第 3 章より、BMP4 による Smad8/9 の転写刺激は、Smad 経路によって伝えられるということが示唆された。

R-Smad と Co-Smad の転写活性は、C 末端の MH2 ドメインが介する。この MH2 ドメインは、転写共役因子である CBP/p300 を動員することができる。

TGF- $\beta$ によって刺激を伝達する R-Smad である Smad2 と Smad3 は、自身の MH1 ドメインの中の Smad binding element (SBE) と呼ばれる 5'-GTCT-3'配列を通じて応答遺伝子の結合領域を選択的に認識することが知られており (Dennler et al., 1998; Shi et al., 1998; Zawel et al., 1998)、SBE 様の配列は複数の TGF- $\beta$ 応答遺伝子の TGF- $\beta$ を介した活性化に非常に重要な役割を果たしている (Attisano et al., 2000; Derynck et al., 1998; Massague et al., 2000)。

一方 BMP による刺激を伝達する R-Smad である Smad1、Smad5 および Smad8/9 では、BMP の標的遺伝子である XVent2B においては GCAT モチーフが、Smad6 においては GCCG を含む配列がそれぞれのプロモーター領域に存在し、その領域に R-Smad を含む複合体の結合が起こることが報告されている (Henningfeld et al., 2000; Ishida et al., 2000)。これらの配列に変異を加えると、BMP を介したプロモーターの活性化は減少するが、GC-rich 配列を多く含むリポーターコンストラクトの BMP 誘導能は非常に低く、R-Smad の過剰発現を必要としたという報告がある (Kusanagi et al., 2000; Yoshida., 2000)。他にも、BMP に応答するさまざまな遺伝子で、プロモーター領域における BMP response element (BRE) が報告されている (表 1)。しかし、BMP/Smad 経路が特定の標的遺伝子をどのように活性化しているかといった機構はまだ完全にはあきらかにされていない。

そこで本章では、BMP 応答遺伝子である Smad8/9 において、BMP4 に対する Smad8/9 プロモーターの責任領域を探索することを目的とし、デリーションミュータントを加えた Smad8/9 レポーターを用いてレポーターアッセイを行った。さらに、見つかった BRE の候補配列と Smad1/5/8/9 が結合しているかを確認するために、ChIP 法を行った。

## 2 方法

### レポーターアッセイ

第 3 章と同様の方法で行った。

### ChIP

C2C12 を BMP4 (4nM) を添加後 2 時間培養し、添付のマニュアルに従って Simple ChIP Plus Enzymatic Chromatin IP (Cell Signaling Technology) によりサンプルの調整を行った。クロマチンサンプルは、ネガティブコントロールとしてコントロール IgG もしくは抗 pSmad1/5/8 抗体に反応させた。予備実験において Smad に対する複数の抗体を用いて ChIP 法を行ったが、再現可能な結果が得られたのは抗 pSmad1/5/8 ラビット由来ポリクローナル抗体 (#11971 ; Cell Signaling Technology) を用いた時のみであった。

これらをテンプレートとし、Smad8/9 遺伝子上の BMP 応答配列 (BRE) を含む領域 (BRE of Smad8 : nt -164~nt +21) に Smad1/5/8/9 が結合しているかを PCR によって調べた。用いた PCR プライマーは表 2 に示した。GC 含量が 77% と非常に高かったため、PCR には PrimeSTAR GXL DNA polymerase (タカラバイオ) を用い、添付のマニュアルの 2step の条件に従い、初期熱変性を 98°C 2 分間の後、熱変性 98°C 10 秒間、アニーリング温度 68°C 20 秒間のセットを 30 サイクル、最終反応として伸長反応 68°C 3 分間で行った。また、BRE 配列以外でも PCR を行った。Smad8/9 遺伝子上の BRE 以外の領域は Outside BRE of Smad8 (nt -2861~nt -2702)、ヘプシジンの BMP シグナリングに関与しない領域は Unrelated to responsiveness to BMP in hepcidin (nt -150~nt -35) (Truksa et al., 2009)、Id2 遺伝子の BRE を含む領域 BRE of Id2 (nt -2872~nt -2673) (Nakahiro et al., 2010) をそれぞれ PCR プライマーとして用いた。Id2 遺伝子の BRE を含む領域は GC 含量が 75% と高かったため、BRE of Smad8 と同様の条件で PCR したが適切に増幅しなかったため、添付のマニュアルの 3step の条件に従い、初期熱変性を 98°C 2 分間の後、熱変性 98°C

10 秒間、アニーリング温度 55°C 15 秒間、伸長反応 68°C 20 秒間のセットを 30 サイクル、最終反応として伸長反応 68°C 3 分間で行った。その他のプライマーセットに関しては、Ex-Taq DNA polymerase (タカラバイオ) を用い、添付のマニュアルに従って、初期熱変性を 95°C 3 分間の後、熱変性 95°C 20 秒間、アニーリング温度 60°C 20 秒間、伸長反応 72°C 20 秒間のセットを 30 サイクル、最終反応として伸長反応 72°C 3 分間の条件で行った。PCR 産物は、2.0% アガロースゲルを用いて 5 $\mu$ L を電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色し、UV ライトにより可視化した。

### 3 結果

#### BMP4 に対する Smad8/9 プロモーターの応答性は-43 近傍で消失する

BMP4 による Smad8/9 の転写活性化における Smad8/9 プロモーターの責任領域を調べるため、Smad8/9(-1000)-luc を最長とする長さが異なる 9 種類のデリーションミュータントを用いて実験を行った (図 1)。C2C12 において、Smad8/9(-1000)-luc では BMP4 による著しい転写活性の促進が認められたが、Smad8/9(-338)-luc から BMP4 に対する Smad8/9 遺伝子の応答性は徐々に低下し、Smad8/9(-4)-luc を使用した際には、BMP4 への応答性はほとんど消失した。3T3-L1 においては、Smad8/9(-1000)-luc における BMP4 に対する応答性は Smad8/9(-670)-luc のものと変わらなかったものの、C2C12 と同様にそれ以降は応答性が漸減していき、Smad8/9(-4)-luc では BMP4 は転写活性を示さなかった。これらの結果より、Smad8/9 プロモーターにおいて、BRE は nt-338～nt-4 の領域に位置することが示唆された。

#### 複数の BMP 応答領域が BMP4 を介した Smad8/9 の転写活性に必要とされる

BMP を介した Smad1/5/8/9 のリン酸化は標的遺伝子のプロモーター領域に位置する GCCG もしくは GC-rich 配列に結合することで転写を促進する (Kusanagi et al., 2000 ; López-Rovira et al., 2002)。nt-338～nt-4 の領域における塩基配列を調べたところ、BMP 応答可能性配列 GCCG (BRE-1, 2, 4, 5) もしくは GC-rich 配列 (BRE-3) が nt-101～nt-14 の間に 5 ヶ所見つかった (図 2A)。BMP4 を介した転写においてこれらの BRE 候補が関与しているかを調べるため、BRE 候補に個別もしくは組み合わせでミューテーションを加えたリポータープラスミドを作製した。

BRE 候補の 5 つ全てにミューテーションを加えると、BMP4 に対する反応性は完全に阻害された (図 2B)。BRE 候補にそれぞれ独立して変異を加えると、BMP 応答性は減少したが、なかでも BRE-3 のミューテーションが BMP4 に対するルシフェラーゼ活性を著しく減少させた。BRE-1 と BRE-2 のミューテーシ

オンは、BRE-3 に対し相加効果を示さなかった。同様の結果が BRE-4 と BRE-5 のミュートーションにおいても認められた。BRE-4 と BRE-5 のミュートーションはどちらも BRE-3 のミュートーションによる BMP4 の反応性を阻害しなかった。これらのことから、すべての BRE は BMP4 を介した Smad8/9 の転写に必要であるが、このうち BRE-3 が最も重要な配列であることが示唆された。

#### **リン酸化した Smad1/5/8/9 は Smad8/9 遺伝子上の BRE 候補配列に結合している**

さらに、Smad1/5/8/9 が Smad8/9 遺伝子の BRE 候補を含む領域 (nt -101～nt -14) に結合しているかを確かめるため、C2C12 を用いて ChIP 法を行った (図 2C)。抗リン酸化 Smad1/5/8/9 抗体を用いて ChIP 法を行うと、Smad8/9 の BRE 候補を含む領域が増幅され、バンドは BMP4 処理により増加傾向が見られた。コントロール IgG を用いた場合にはなにも増幅されなかった。リン酸化 Smad1/5/8/9 は Id2 の BRE を含む領域にも BMP4 依存的に結合した。一方で、Smad8/9 の BRE 候補以外の領域、及びヘプシジン遺伝子の BMP 応答に関与しない領域を検出するプライマーセットを使用した際には、明らかなバンドは検出されなかった。これらの結果より、C2C12 の細胞内において、リン酸化 Smad1/5/8/9 は Smad8/9 遺伝子上の BRE 候補を含む領域に結合していることが示唆された。

## 4 考察

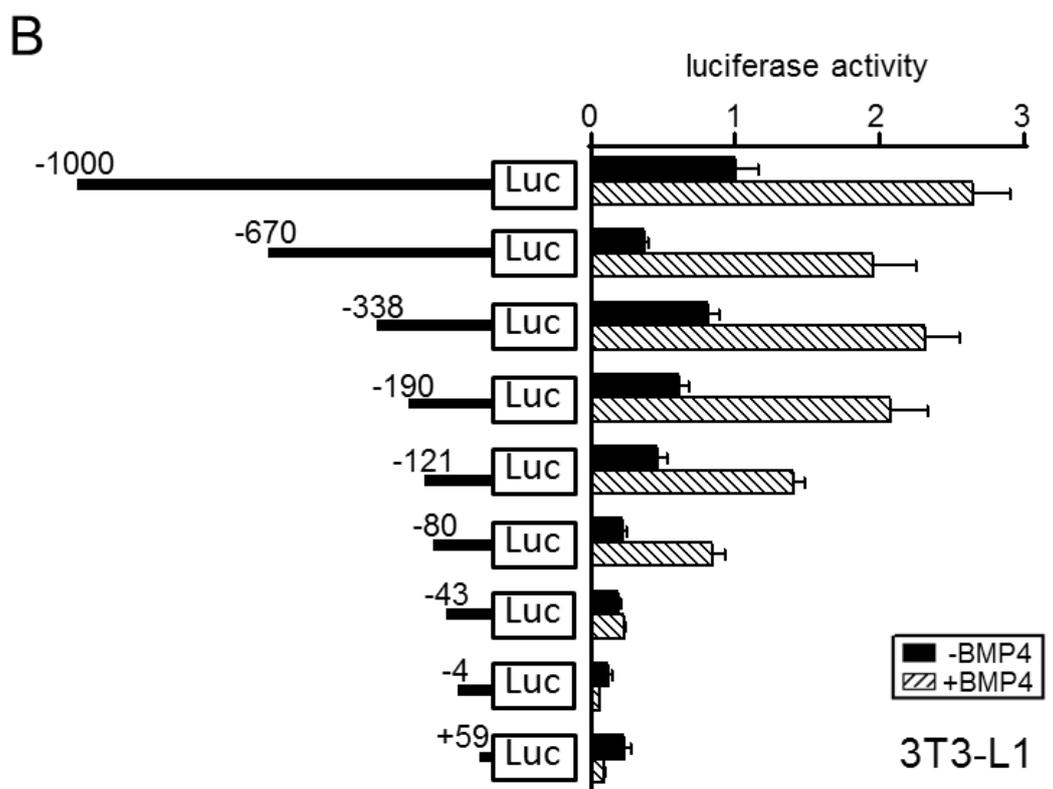
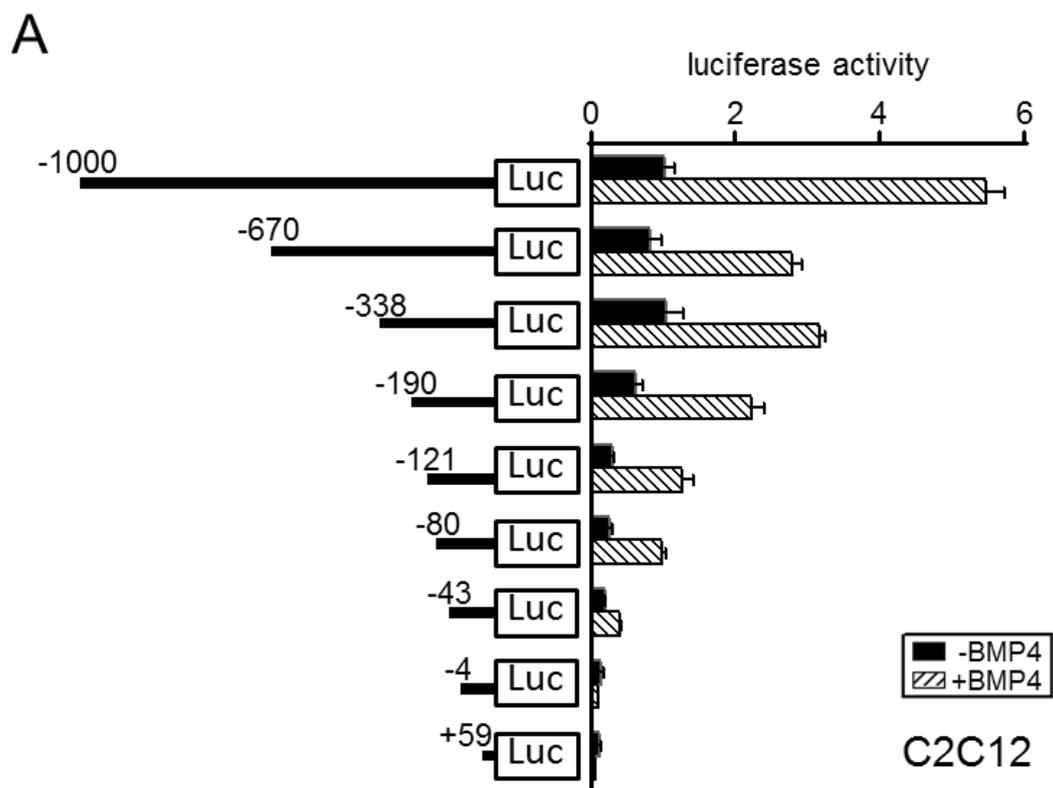
Smad8/9(-1000)-luc を最長とする長さが異なる 9 種類のデリーションミュータントを用いて、Smad8/9 プロモーター領域における BRE の探索を行ったところ、Smad8/9(-338)-luc から BMP に対する応答性が減少していき、Smad8/9(-4)-luc でほとんど消失したことから、BRE は nt-338~nt-4 の領域内に位置することが示唆された。そこでその領域内において見つかった BMP 応答可能性配列 GCCG もしくは GC-rich 配列である 5 つの BRE 候補に、個別もしくは組み合わせでミューテーションを加え、BRE の特定を行ったところ、5 つの BRE 候補すべてが BMP を介した Smad8/9 の転写に関与しているが、なかでも GC-rich 配列である BRE-3 が重要であることが示唆された。

さらに、ChIP 法によって、Smad1/5/8/9 が BRE 候補を含む領域に結合しているかを確認した。C2C12 において、抗リン酸化 Smad1/5/8/9 抗体を用いて ChIP 法を行った結果、バンドが確認されたため、リン酸化 Smad1/5/8/9 が今回特定された Smad8/9 プロモーター上の 5 つの BRE 候補に結合していることが示唆された。なお、qRT-PCR での検出も試みたが、Smad8/9 遺伝子上の BRE 候補を含む領域の GC 含量が高かったために適切に増幅せず、再現性のある結果は得られなかった。

Smad8/9 の機能的な役割については、いまだに分かっていないことが多い。Smad8/9 は Smad1 や Smad5 と同じく、BMP に反応してリン酸化する R-Smad に分類され (Miyazono et al., 2010; Massagué, 2012; Sasaki-Yumoto et al., 2013)、Smad1 や Smad5 と同様に、Smad8/9 も Id1 をもとにした BRE のレポーターで転写が促進した (Kawai et al., 2000; Tsukamoto et al., 2014) ことから、Smad8/9 の機能に Smad1 や Smad5 との矛盾は見られない。現に、Smad8/9 は脳の発達 (Hester et al., 2005) や胎児期の背腹軸パターン形成 (Wei et al., 2014) に必要とされ、これらの作用は Smad1 と似ている。一方で、近年 Smad8/9 により BMP 経路が阻害されることが示された (Tsukamoto et al., 2014)。BMP

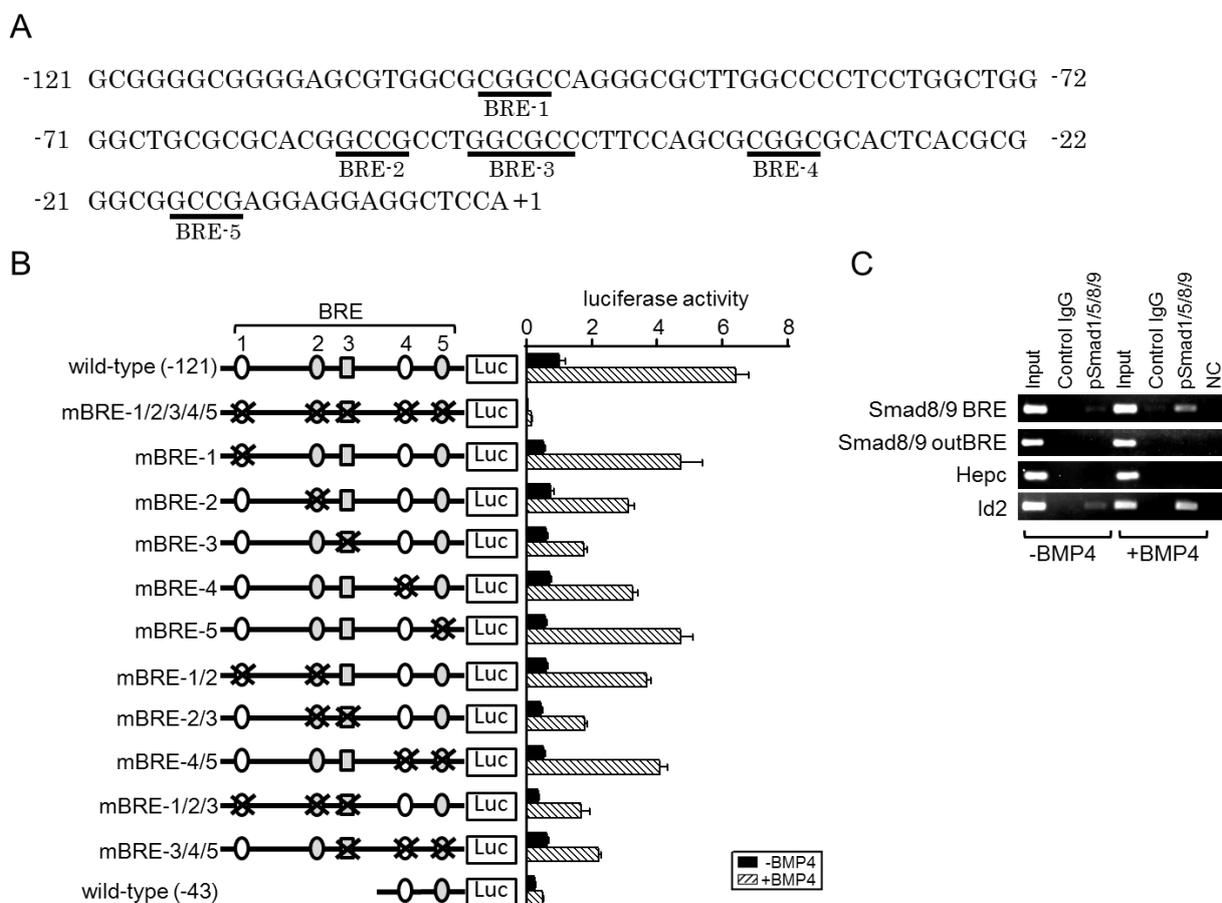
は Smad1 と Smad8/9 のリン酸化を誘導し、リン酸化した Smad8/9 は Smad1 と複合体を作ることにより Smad1 を介した転写を阻害する。このことは、Smad1 による転写活性において、Smad8/9 がドミナントネガティブとしての役割を果たしていることを示唆している。この結果の通りだとすると、BMP による Smad8/9 の発現上昇は BMP シグナル伝達の進行を阻害することになる。つまり Smad8/9 は、I-Smad である Smad6 や Smad7 と似た働きをし、BMP 活性の刺激と阻害を同時に起こすことによって、BMP のシグナル伝達を緻密に調整しているのかもしれない。しかし、Tsukamoto ら (2014) によって示された Smad8/9 のドミナントネガティブとしての役割の生物学的機構はいまだ明らかになっていない。

Smad8/9 遺伝子の誘導の意義を明らかにするためには、Smad8/9 の生物学的な役割についてさらなる研究が必要である。



**図 1 BMP4 を介した Smad8/9 の転写制御**

C2C12 (A)、3T3-L1 (B) における Smad8/9 のプロモーターの BRE について、デリレーションミュータントを加えた Smad8/9 のレポーターを用いて調べた。細胞は該当するレポータープラスミドと Renilla-luc をトランスフェクションし、BMP4 (4nM) を添加後 16 時間培養した。ホタルルシフェラーゼ活性は、ウミシイタケルシフェラーゼ活性との比によってあらわされ、Smad8/9(-1000)-luc をトランスフェクションし、BMP4 を添加していない細胞をコントロールとした。データは平均値±標準誤差で示し、n=4 である。



**図 2 Smad8/9 の転写制御**

A : Smad8/9 の BRE-1 から BRE-5 までの塩基配列を示した。

B : C2C12 において Smad8/9 プロモーターにポイントミューテーションを加えたものを用いてレポーターアッセイを行い、Smad8/9 プロモーターの BRE を探索した。細胞は該当するレポータープラスミドと Renilla-luc をトランスフェクションし、BMP4 (4nM) を添加後 16 時間培養した。ホタルルシフェラーゼ活性は、ウミシイタケルシフェラーゼ活性との比によってあらわされ、wild-type の Smad8/9(-121)-luc をトランスフェクションし、BMP4 を添加していない細胞をコントロールとした。データは平均値±標準誤差で示し、n=4 である。

C : C2C12 は BMP4 (4nM) 処理、未処理で 2 時間培養した。クロマチン抽出物を抗リン酸化 Smad1/5/8/9 もしくはコントロール IgG で免疫沈降し、

Smad8/9 遺伝子の BRE が含まれる領域 (Smad8/9 BRE)、Smad8/9 遺伝子の BRE 以外の領域 (Smad8/9 outBRE)、ヘプシジン遺伝子の BMP 応答性とは関係のない領域 (Hepc)、Id2 遺伝子の BRE 領域 (Id2) を増幅した。PCR は蒸留水をネガティブコントロール (NC) とした。PCR 産物はアガロースゲルにて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドによって染色した。図には代表的な結果を示した。

表 1 BMP 応答遺伝子における主要な BMP 応答配列

Gene (species)	Critical sequence (location)	References
Smad6 (mouse)	GCCGnCGC (nt-1627 to nt -1599)	Ishida et al., 2000
Smad7 (Xenopus)	TGGCGCC (nt+2260 to nt +2275)	Karaulanov et al., 2004
Id1 (mouse)	GTGT(SBE),GGCGCC (nt -1105 to nt -1080)	Korchynskyi et al., 2002
Id2 (mouse)	GGCGCC, GTGT, GGCG/CCGC (nt -3000 to nt -2734)	Nakahiro et al., 2010
Id3 (human)	CAGA box, TGGCGCC (nt -3138 to nt -2923, nt +906 to nt +1067)	Shepherd et al., 2008
Hamp (mouse)	GGCGCC (nt -294 to nt -174, nt -1834 to nt -1634)	Truksa et al., 2009
Hamp (human)	GGCGCC (nt -84 to nt -79, nt -2255 to nt -2250)	Casanovas et al., 2009
BAMBI (Xenopus)	TGGCGCC (nt -2052 to nt -2047)	Karaulanov et al., 2004
Vent2B (Xenopus)	GCAT (nt -275 to nt -152)	Henningfeld et al., 2000
Vent2 (Xenopus)	CAGA(SBE),TGGAGC(OAZ) (nt -173 to nt -151)	von Bubnoff et al., 2005

nt 番号は、転写開始点を+1 とする。

表 2 ChIP に使用したプライマー

Gene	5'-primer	3'-primer	GenBank accession number
ChIP			
BRE of Smad8	5'-aaggctctctgcaggcatgatgtg-3'	5'-tccagaggcgctcagtcaggctgga-3'	NC_000069.6
Outside BRE of Smad8	5'-gggtggtgccagtcaggtttgctt-3'	5'-cacatcaatcataaactaagaaaa-3'	NC_000069.6
Unrelated to responsiveness to BMP in hepcidin	5'-cactatcttcttggaaatgagtcagagc-3'	5'-tgtgtggtggctgtctaggagcc-3'	NC_000073.6
BRE of Id2	5'-gctgagtgacggcgcggttgctat-3'	5'-gtgatccctgacaggtgatgaatt-3'	NC_000078.6

## 総括

BMP は TGF- $\beta$ ファミリーに属するサイトカインであり、シグナル伝達は、主に細胞内シグナル伝達因子である Smad を介して行われる。これまでに TGF- $\beta$ ファミリーがそれ自身のシグナル伝達因子である Smad の遺伝子発現を制御する（つまり Smad を標的遺伝子とする）という報告が I-Smad については知られているが、R-Smad については見られない。著者らは筋芽細胞および脂肪前駆細胞を用いた先行研究において、TGF- $\beta$ ファミリー、特に BMP がそれ自身の R-Smad である Smad8/9 の遺伝子発現を促進していることを見つけたことから、BMP はそのシグナル伝達因子である Smad8/9 の遺伝子を標的としてその発現を制御しているという仮説を立て、本研究では BMP による Smad8/9 の遺伝子発現制御について詳細な研究を行った。3 動物種 6 細胞株を用いて TGF- $\beta$ ファミリーにより刺激し、qRT-PCR により Smad1~8/9 各遺伝子を定量的に解析したところ、TGF- $\beta$ ファミリーのうち、BMP が Smad8/9 の遺伝子発現を正に制御しており、この反応はあらゆる細胞において普遍的である可能性が示唆された（第 1 章）。本研究で注目している Smad8/9 は、正確には登録配列上、Smad8 と Smad9 に分けられるが、機能的な違いは報告されておらず、通常は区別されずに Smad8/9 と表される。第 1 章で用いた 6 細胞株でこの判別を行ったところ、細胞により Smad8 か Smad9 かの遺伝子の違いはあるものの、BMP 刺激による Smad8/9 の発現上昇を調べる上でこれらを区別して検討する必要はないと結論付けられた。また、マウスにおいて 2 種のバリエーションの存在が確認されたが、いずれのバリエーションも BMP4 刺激により発現が上昇したことから、これらのバリエーションも BMP 刺激による Smad8/9 の発現上昇には影響がないと考えられた（第 2 章）。第 1 章より、Smad8/9 が新規の BMP 応答遺伝子であることが示唆されたため、先行研究および予備実験でも用いられた C2C12 と 3T3-L1 を用いて、タンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミドおよび BMP の I 型受容体阻害薬である LDN-193189 によってこの遺伝子発現促進の制御機構を調べたところ、BMP によって誘導される Smad8/9 遺伝子発現には、BMP 刺

激後に新たなタンパク質の産生を必要としないこと、および BMP による Smad8/9 遺伝子発現上昇は、BMP 刺激後の BMP の I 型受容体を介した Smad1/5/8/9 のリン酸化が関与していることが示唆された。これらのことから、BMP による Smad8/9 遺伝子発現促進は、BMP 刺激後、受容体を介したリン酸化 Smad1/5/8/9 が直接転写因子として作用して転写段階を制御していると推測し、レポーターアッセイを行ったところ、BMP による Smad8/9 遺伝子発現促進は転写レベルで制御されていることが確認できた (第 3 章)。続いて BMP による Smad8/9 の遺伝子発現の制御領域 (プロモーター領域) を詳細に解析するため、デリションミュータントを作製し、プロモーターの責任領域の絞り込みを行ったところ、応答領域は-338~-4 の領域に位置すると考えられた。この領域において、既知の BRE である GCCG もしくは GC-rich 配列を検索して見つかった 5ヶ所の BRE 候補に様々な組み合わせで変異を加えたコンストラクトを用いたところ、BMP による Smad8/9 遺伝子発現促進には、転写開始点の近位上流 (-101~-14) に存在するプロモーター領域の 5ヶ所すべての BRE 候補が重要であること、中でも-51~-46 に位置する GGCGCC の 6 塩基が、最も影響の大きい BRE 候補であることが示唆された。また、ChIP により、BMP 刺激時において、本研究での Smad8/9 遺伝子制御機構における BRE 候補とリン酸化 Smad1/5/8/9 の結合が細胞内で起こっていることが示された (第 4 章)。

BMP による様々な細胞変化 (生物現象) はこれまで、Smad1/5/8/9 のリン酸化による促進と、I-Smad である Smad6/7 による抑制のバランスによって制御されていると考えられていた。しかしそれだけではなく、Smad8/9 自体の遺伝子発現を増加させることでも促進されている可能性が、本研究によって示唆された。

本論文の一部は以下に公表した。

Katakawa Y., Funaba M. and Murakami M.

Smad8/9 is regulated through the BMP pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117, 8, 1789-1796, 2016

## General overview

Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) family members, comprising three subfamilies, TGF- $\beta$ , activin and bone morphogenetic protein (BMP) groups, are pluripotent growth/differentiation factors involved in diverse physiological processes. They transmit signals through a complex formation consisting of a ligand, type I and type II receptors. Activation of receptor complexes resulting from ligand binding induces the phosphorylation of receptor-regulated (R)-Smad, followed by complex formation with Co-Smad, Smad4. Subsequently, R-Smad and Co-Smad translocate into the nucleus where they participate in transcriptional regulation of target genes. R-Smad is categorized into two subclasses: BMP pathway-specific R-Smad (Smad1/Smad5/Smad8/9), and TGF- $\beta$ /activin pathway-specific R-Smad (Smad2/Smad3).

We previously showed that the expression of Smad8/9 is decreased in response to the differentiation stimulation of myoblasts into myotubes. This change of expression in Smad8/9, but not Smad1 and Smad5, paralleled changes in endogenous BMP activity. We also find the up-regulation of Smad8/9 expression in 3T3-L1 during the differentiation; so far, it is known that among Smads, only Smad6/Smad7, inhibitory Smads, are inducible genes by the TGF- $\beta$  family. These findings suggested that unlike the other R-Smads, Smad8/9 is a target gene for the BMP pathway. In this study, we examined regulation of the expression of Smad8/9 by BMPs.

### Chapter 1

To examine the up-regulation of Smad8/9 expression, we detected mRNA level of Smads in various cell types using RT-qPCR. Treatment with BMP4 for 2 h increased Smad8/9 expression in all examined cells. The expression levels of R-Smads other than Smad8/9 were not affected by BMP4. In

addition, the up-regulation of Smad8/9 expression was also detected in cells treated with BMP2. Both TGF- $\beta$ 1 and activin A did not substantially increase Smad8/9 expression. These results suggests that Smad8/9 is a unipue R-Smad gene regulated at the mRNA level through BMPs.

## Chapter 2

To investigate the character of Smad8/9 up-regulated by BMP4, we analyzed nucleotide sequences.

### 1) Determination of Smad8 or Smad9

The nucleotide sequence of mouse Smad9 indicates that six nucleotides are inserted at nt +961 of mouse Smad8. According to analysis of nucleotide sequences, C2C12 cells express Smad8, whereas the other examined cells express Smad9. Moreover, the nucleotide sequencing in 3T3-L1 cells reproducibly indicated the expression of both Smad8 and Smad9.

### 2) Detection of Smad8/9 splicing variants

There are some reports about splicing variants of Smad8/9 in human. We detected Smad8/9 variants 1 and 2 in mouse cells. BMP4 increased the gene transcript level of all 3 Smad8/9, that is, wild-type, variants 1 and variant 2, but the stimulated BMP pathway substantially increases activity of wild-type Smad8/9.

## Chapter 3

To examine the molecular mechanism underlying the regulation of Smad8/9 expression, the effects of cycloheximide, an inhibitor of protein synthesis, on BMP-induced Smad8/9 expression were examined. Smad8/9 expression by BMP4 was up-regulated, regardless of treatment with cycloheximide, suggesting that Smad8/9 expression by BMP is transcriptionally regulated.

We next examined the BMP-induced transcription of Smad8/9 by luciferase-based reporter assays using the Smad8/9 promoter. BMP4

increased the expression of luciferase, and pretreatment with LDN-193189, an inhibitor of BMP type I receptors, suppressed the responsiveness to BMP4 in C2C12 and 3T3-L1 cells. These results suggested that BMP-induced Smad8/9 expression is transcriptionally regulated through the activation of BMP type I receptors.

#### **Chapter 4**

Next we explored the potential region within the Smad8/9 promoter responsible for transcriptional activation in response to BMP4 treatment using deleted mutants of the Smad8/9 reporter. The deletion of 330bp within 1,000bp upstream of the Smad8/9 gene decreased responsiveness to BMP4 in C2C12 and 3T3-L1 cells. BMP4 did not induce transcriptional activation, when Smad8/9(-43)-luc was used in both cells, indicating that BMP-responsive elements (BREs) are located at the distal region of nt -43 of the Smad8/9 promoter.

Examination of the nucleotide sequence indicated five potential BREs within nt -121 of the Smad8/9 promoter. According to reporter plasmids with individual or combinational mutation of the BREs, all five BREs are necessary for BMP-induced Smad8/9 transcription, although BRE-3 is the most critical region.

We further explored whether Smad1/5/8 binds to the region including BREs of Smad8 gene in C2C12 cells by ChIP assay, indicating that phosphorylated Smad1/5/8/9 binds to the BREs of Smad8 gene, and that the binding is dependent on BMP signaling in C2C12 cells.

We demonstrate that Smad8/9 is an exceptional R-Smad positively regulated by BMPs at the mRNA level, and that gene induction occurs in multiple cell types in Chapter 1. In addition, we showed that expression of

Smad8 and Smad9 is cell-type dependent, there is some splicing variants of Smad8/9 in mouse cells in Chapter 2. In Chapter 3, Smad8/9 gene expression is transcriptionally regulated by BMP and this gene expression regulated via the BMP pathway were revealed. Finally, we demonstrated that several BREs within nt -121 of the Smad8/9 promoter are involved in the transcriptional activation of Smad8/9 in Chapter 4.

The present study reveals that Smad8/9 is a unique R-Smad regulated through the BMP pathway at the mRNA level. We has not been shown in biological process yet, however, further studies to explore the biological role of Smad8/9 clarify the significance of Smad8/9 gene induction.

## 引用論文

- Attisano L, Carcamo J, Ventura F, Weis FM, Massagué J, Wrana JL. 1993. Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* 75:671-680.
- Attisano L, Wrana JL. 2000. Smads as transcriptional co-modulators. *Curr Opin Cell Biol* 12:235-243.
- Casanovas G, Mleczko-Sanecka K, Altamura S, Hentze MW, Muckenthaler MU. 2009. Bone morphogenetic protein (BMP)-responsive elements located in the proximal and distal hepcidin promoter are critical for its response to HJV/BMP/SMAD. *J Mol Med (Berl)* 87:471-480.
- Cheng KH, Ponte JF, Thiagalingam S. 2004. Elucidation of epigenetic inactivation of SMAD8 in cancer using targeted expressed gene display. *Cancer Res* 64:1639-1646.
- Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM. 1998. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* 17:3091-3100.
- Derynck R, Zhang Y, Feng XH. 1998. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* 95:737-740.
- Derynck R, Zhang YE. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425:577-584.
- Duan X, Liang YY, Feng XH, Lin X. 2006. Protein serine/threonine phosphatase PPM1A dephosphorylates Smad1 in the bone morphogenetic protein signaling pathway. *J Biol Chem* 281:36526-36532.
- Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T, Miyazono K. 2001. Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor

- degradation. *J Biol Chem* 276:12477-12480.
- Funaba M, Zimmerman CM, Mathews LS. 2002. Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem* 277:41361-41368.
- Furutani Y, Umemoto T, Murakami M, Matsui T, Funaba M. 2011. Role of endogenous TGF-beta family in myogenic differentiation of C2C12 cells. *J Cell Biochem* 112:614-624.
- Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA, Jr, Wrana JL, Falb D. 1997. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* 89:1165-1173.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390:465-471.
- Henningfeld KA, Rastegar S, Adler G, Knochel W. 2000. Smad1 and Smad4 are components of the bone morphogenetic protein-4 (BMP-4)-induced transcription complex of the Xvent-2B promoter. *J Biol Chem* 275:21827-21835.
- Herrera B, van Dinther M, Ten Dijke P, Inman GJ. 2009. Autocrine bone morphogenetic protein-9 signals through activin receptor-like kinase-2/Smad1/Smad4 to promote ovarian cancer cell proliferation. *Cancer Res* 69:9254-9262.
- Hester M, Thompson JC, Mills J, Liu Y, El-Hodiri HM, Weinstein M. 2005. Smad1 and Smad8 function similarly in mammalian central nervous system development. *Mol Cell Biol* 25:4683-4692.
- Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, Miyazono K. 1997. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* 389:622-626.
- Ishida W, Hamamoto T, Kusanagi K, Yagi K, Kawabata M, Takehara K, Sampath TK, Kato M, Miyazono K. 2000. Smad6 is a Smad1/5-induced

- smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. *J Biol Chem* 275:6075-6079.
- Ishida W, Hamamoto T, Kusanagi K, Yagi K, Kawabata M, Takehara K, Sampath TK, Kato M, Miyazono K. 2000. Smad6 is a Smad1/5-induced smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. *J Biol Chem* 275:6075-6079.
- Ishisaki A, Yamato K, Nakao A, Nonaka K, Ohguchi M, ten Dijke P, Nishihara T. 1998. Smad7 is an activin-inducible inhibitor of activin-induced growth arrest and apoptosis in mouse B cells. *J Biol Chem* 273:24293-24296.
- Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P. 2000. Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* 267:6954-6967.
- Karaulanov E, Knochel W, Niehrs C. 2004. Transcriptional regulation of BMP4 synexpression in transgenic *Xenopus*. *EMBO J* 23:844-856.
- Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. 1998. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 9:49-61.
- Kawai S, Faucheu C, Gallea S, Spinella-Jaegle S, Atfi A, Baron R, Roman SR. 2000. Mouse smad8 phosphorylation downstream of BMP receptors ALK-2, ALK-3, and ALK-6 induces its association with Smad4 and transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 271:682-687.
- Knockaert M, Sapkota G, Alarcon C, Massagué J, Brivanlou AH. 2006. Unique players in the BMP pathway: small C-terminal domain phosphatases dephosphorylate Smad1 to attenuate BMP signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11940-11945.
- Korchynskiy O, ten Dijke P. 2002. Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic

- protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem* 277:4883-4891.
- Kusanagi K, Inoue H, Ishidou Y, Mishima HK, Kawabata M, Miyazono K. 2000. Characterization of a bone morphogenetic protein-responsive Smad-binding element. *Mol Biol Cell* 11:555-565.
- Kusanagi K, Inoue H, Ishidou Y, Mishima HK, Kawabata M, Miyazono K. 2000. Characterization of a bone morphogenetic protein-responsive Smad-binding element. *Mol Biol Cell* 11:555-565.
- Lin X, Duan X, Liang YY, Su Y, Wrighton KH, Long J, Hu M, Davis CM, Wang J, Brunnicardi FC, Shi Y, Chen YG, Meng A, Feng XH. 2006. PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGFbeta signaling. *Cell* 125:915-928.
- Lopez-Rovira T, Chalaux E, Massagué J, Rosa JL, Ventura F. 2002. Direct binding of Smad1 and Smad4 to two distinct motifs mediates bone morphogenetic protein-specific transcriptional activation of Id1 gene. *J Biol Chem* 277:3176-3185.
- Massagué J. 2012. TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:616-630.
- Massagué J. 2008. TGFbeta in Cancer. *Cell* 134:215-230.
- Massagué J. 2000. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:169-178.
- Massagué J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67:753-791.
- Massagué J. 1990. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6:597-641.
- Massagué J, Wotton D. 2000. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 19:1745-1754.
- Messenger AG. 1984. The culture of dermal papilla cells from human hair follicles. *Br J Dermatol* 110:685-689.

- Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. 2010. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem* 147:35-51.
- Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. 2001. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 114:4359-4369.
- Murakami G, Watabe T, Takaoka K, Miyazono K, Imamura T. 2003. Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol Biol Cell* 14:2809-2817.
- Murakami M, Kawachi H, Ogawa K, Nishino Y, Funaba M. 2009. Receptor expression modulates the specificity of transforming growth factor-beta signaling pathways. *Genes Cells* 14:469-482.
- Murakami M, Ohi M, Ishikawa S, Shirai M, Horiguchi H, Nishino Y, Funaba M. 2015. Adaptive expression of uncoupling protein 1 in the carp liver and kidney in response to changes in ambient temperature. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 185:142-149.
- Nakahiro T, Kurooka H, Mori K, Sano K, Yokota Y. 2010. Identification of BMP-responsive elements in the mouse Id2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 399:416-421.
- Nakahiro T, Kurooka H, Mori K, Sano K, Yokota Y. 2010. Identification of BMP-responsive elements in the mouse Id2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 399:416-421.
- Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH, ten Dijke P. 1997. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* 389:631-635.
- Nishita M, Ueno N, Shibuya H. 1999. Smad8B, a Smad8 splice variant lacking the SSXS site that inhibits Smad8-mediated signalling. *Genes Cells* 4:583-591.
- Piek E, Heldin CH, Ten Dijke P. 1999. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J* 13:2105-2124.

- Poncelet AC, de Caestecker MP, Schnaper HW. 1999. The transforming growth factor-beta/SMAD signaling pathway is present and functional in human mesangial cells. *Kidney Int* 56:1354-1365.
- Roschke AV, Tonon G, Gehlhaus KS, McTyre N, Bussey KJ, Lababidi S, Scudiero DA, Weinstein JN, Kirsch IR. 2003. Karyotypic complexity of the NCI-60 drug-screening panel. *Cancer Res* 63:8634-8647.
- Sakaki-Yumoto M, Katsuno Y, Derynck R. 2013. TGF-beta family signaling in stem cells. *Biochim Biophys Acta* 1830:2280-2296.
- Shepherd TG, Theriault BL, Nachtigal MW. 2008. Autocrine BMP4 signalling regulates ID3 proto-oncogene expression in human ovarian cancer cells. *Gene* 414:95-105.
- Shi Q, King RW. 2005. Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature* 437:1038-1042.
- Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massagué J, Pavletich NP. 1998. Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* 94:585-594.
- Souchelnytskyi S, Nakayama T, Nakao A, Moren A, Heldin CH, Christian JL, ten Dijke P. 1998. Physical and functional interaction of murine and *Xenopus* Smad7 with bone morphogenetic protein receptors and transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem* 273:25364-25370.
- Takase M, Imamura T, Sampath TK, Takeda K, Ichijo H, Miyazono K, Kawabata M. 1998. Induction of Smad6 mRNA by bone morphogenetic proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 244:26-29.
- Truksa J, Lee P, Beutler E. 2009. Two BMP responsive elements, STAT, and bZIP/HNF4/COUP motifs of the hepcidin promoter are critical for BMP, SMAD1, and HJV responsiveness. *Blood* 113:688-695.
- Truksa J, Lee P, Beutler E. 2009. Two BMP responsive elements, STAT, and bZIP/HNF4/COUP motifs of the hepcidin promoter are critical for BMP,

- SMAD1, and HJV responsiveness. *Blood* 113:688-695.
- Tsukamoto S, Mizuta T, Fujimoto M, Ohte S, Osawa K, Miyamoto A, Yoneyama K, Murata E, Machiya A, Jimi E, Kokabu S, Katagiri T. 2014. Smad9 is a new type of transcriptional regulator in bone morphogenetic protein signaling. *Sci Rep* 4:7596.
- von Bubnoff A, Peiffer DA, Blitz IL, Hayata T, Ogata S, Zeng Q, Trunnell M, Cho KW. 2005. Phylogenetic footprinting and genome scanning identify vertebrate BMP response elements and new target genes. *Dev Biol* 281:210-226.
- Winbanks CE, Wang B, Beyer C, Koh P, White L, Kantharidis P, Gregorevic P. 2011. TGF-beta regulates miR-206 and miR-29 to control myogenic differentiation through regulation of HDAC4. *J Biol Chem* 286:13805-13814.
- Yanagisawa K, Osada H, Masuda A, Kondo M, Saito T, Yatabe Y, Takagi K, Takahashi T, Takahashi T. 1998. Induction of apoptosis by Smad3 and down-regulation of Smad3 expression in response to TGF-beta in human normal lung epithelial cells. *Oncogene* 17:1743-1747.
- Yoshida Y, Tanaka S, Umemori H, Minowa O, Usui M, Ikematsu N, Hosoda E, Imamura T, Kuno J, Yamashita T, Miyazono K, Noda M, Noda T, Yamamoto T. 2000. Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts. *Cell* 103:1085-1097.
- Yu PB, Deng DY, Lai CS, Hong CC, Cuny GD, Bouxsein ML, Hong DW, McManus PM, Katagiri T, Sachidanandan C, Kamiya N, Fukuda T, Mishina Y, Peterson RT, Bloch KD. 2008. BMP type I receptor inhibition reduces heterotopic [corrected] ossification. *Nat Med* 14:1363-1369.
- Zawel L, Dai JL, Buckhaults P, Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B, Kern SE. 1998. Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell* 1:611-617.

## 謝辞

本論をまとめるにあたり、終始懇切なるご指導とご助言を賜りました麻布大学解剖学第一研究室、山本雅子教授、麻布大学基礎生物学研究室、佐原弘益教授ならびに麻布大学薬理学研究室、白井明志准教授に深く感謝の意を表します。

本論をまとめるにあたり、及び本研究を行うにあたり、終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました京都大学大学院動物栄養科学研究室、舟場正幸准教授ならびに麻布大学分子生物学研究室、村上賢教授に深く感謝の意を表します。

また、本研究を行うにあたり、多大なるご指導とご協力を頂いた麻布大学分子生物学研究室内の皆さま方に厚く御礼を申し上げます。