

氏名(本籍)	片川優子(静岡県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第146号
学位授与年月日	平成28年9月30日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 村上 賢 (副査) 山本 雅子 佐原 弘益 舟場 正幸

## 論文内容の要旨

Bone morphogenetic protein (BMP) は Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) ファミリーに属するサイトカインであり、生体内での役割は、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。BMP によるシグナル伝達は、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。すなわち、BMP が細胞膜表面の特異的な受容体に結合すると、receptor-regulated Smad (R-Smad) である Smad1、5、8/9 がリン酸化され、それが common-Smad (Co-Smad) である Smad4 とともに核内に移行し、転写因子として働いて標的遺伝子を活性化する。

Smad には上記の Smad1、4、5、8/9 のほかに、TGF- $\beta$ ファミリーの BMP とは別グループである TGF- $\beta$ 、アクチビンのシグナル伝達因子である Smad2、3 (R-Smad) やシグナル伝達を阻害する inhibitory-Smad (I-Smad) である Smad6、7 が知られている。TGF- $\beta$ ファミリーはこれら Smad (1~8/9) のリン酸化を介してその機能を発揮している。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。著者らは下記の先行研究において、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。

1) マウス脂肪前駆細胞由来細胞株 (3T3-L1) の TGF- $\beta$ ファミリー刺激下での分化過程における網羅的な遺伝子発現解析で、Smad8/9 の発現促進が認められた。この発現促進は TGF- $\beta$ ファミリーの中で BMP による刺激が最も顕著であり、またこの作用は持続的だった。

2) マウス筋芽細胞由来細胞株 (C2C12) の筋分化過程において、内因性 BMP の変動に伴い、Smad8/9 の遺伝子発現量も変動した。この変化は、他の R-Smad (Smad1、2、3、5) には見られなかった。

これらの事実をきっかけとして、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、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。

## 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

まず、C2C12 と 3T3-L1 を用いて BMP 刺激後 2 時間における Smad1~8/9 の各遺伝子発現を、qRT-PCR により定量的に調べた。その結果、これまでに報告されている Smad6、7 以外に、Smad8/9 の mRNA の著しい発現量の上昇が認められた。Smad1~5 の遺伝子発現量には変動が認められなかった。次に、この BMP による Smad8/9 の遺伝子発現促進が各種細胞で起こるのかを確認するため、マウスメラノーマ由来細胞株 (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)、ラット表皮由来初代培養細胞株を用いた。その結果、いずれの細胞においても BMP 刺激により Smad8/9 遺伝子発現の促進が認められた。

TGF- $\beta$ ファミリーの他のメンバーである TGF- $\beta$ 、アクチビンによる Smad8/9 遺伝子発現量の変化についても、C2C12 と 3T3-L1 を用いて調べた。TGF- $\beta$  またはアクチビンで 2 時間刺激したところ、TGF- $\beta$  とアクチビンのいずれにおいても BMP 刺激で見られたような Smad8/9 の顕著な発現上昇は認められなかった。

以上のことから、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 2 章 各種細胞における Smad8/9 の遺伝子解析

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。Smad8 の CDS 領域 (1290bp 長) の塩基配列の 642 番目に 6 塩基の挿入 (2 個のアミノ酸挿入 ; アルギニンとバリン) が見られるものが Smad9 であるが、機能的な違いは報告されていない。これらは対立遺伝子と考えられ、通常は区別されずに Smad8/9 と表される。第 1 章において、各種細胞での Smad8/9 mRNA の qRT-PCR では Smad8 と Smad9 のいずれも検出できるように、共通プライマーを用いて測定した。しかし、細胞により、BMP 刺激による Smad8 と Smad9 での遺伝子発現様態が異なることも考えられ、細胞により発現している Smad8/9 mRNA の塩基配列解析を行い Smad8 と Smad9 の特定を試みた。その結果、C2C12 では Smad8 のみを、B16、HepG2、H9c6 およびラット表皮由来初代培養細胞株では Smad9 のみを、そして 3T3-L1 では Smad8 と Smad9 の両方を発現していることがわかり、細胞により異なっていた。クローニングにより 3T3-L1 で発現している Smad8 と Smad9 の mRNA 量の割合を調べたところ、それぞれの発現は 41% (Smad8) と 59% (Smad9) と僅かの偏りがみられた。この偏りは、BMP に対する応答性の違いというよりは、核型解析などからゲノム DNA 中に存在するそれぞれの遺伝子の存在割合を反映していると思われた。以上のことより、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考えた。

また、Smad8/9 遺伝子には、いくつかのスプライシングバリエントの配列もマウスにおいて登録されている。そこで、それらのバリエントをそれぞれ検出するプライマーを設定し PCR を行ったところ、BMP 刺激によりすべてのバリエントの発現が同程度に促進していた。従って、BMP による Smad8/9 遺伝子発現促進において Smad8/9 バリエントの識別も必要ないと思われた。

このように BMP は全体として Smad8/9 遺伝子発現を促進していると考えられた。

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

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、C2C12 と 3T3-L1 を用いてこの遺伝子発現促進の制御機構を調べることにした。

1) 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 刺激後 12 時間の Smad8/9 の遺伝子発現量を qRT-PCR により調べたところ、シクロヘキシミドの存在の有無にかかわらず、BMP 存在下では Smad8/9 の発現量が増加した。このことから、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が示唆された。

2) あらかじめ細胞に 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 の発現上昇は見られなかった。また、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もウエスタンブロットで確認した。このことは、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を示している。

1) 、2) より、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た。そこで、マウスの Smad8/9 遺伝子の推定プロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだコンストラクト (Smad8/9 の転写開始点を+1 として、-1000~+113 の領域 : Smad8/9(-1000)-luc とする) を作製し、レポーターアッセイを行った。その結果、BMP 存在下ではルシフェラーゼの発光量の著しい上昇が認められた。また LDN-193189 を用いるとその応答性は低下した。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。

### 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

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、Smad8/9(-1000)-luc を基とする 9 種類のデリベー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。C2C12 及び 3T3-L1 を用いてこれらのミュータントを導入し、レポーターアッセイを行ったところ、BMP に対する応答性は-338 からゆるやかに減少し、-4 まで欠失させると消失した。したがって、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 BMP 応答配列 (BMP responsive element : BRE) である GCCG もしくは GC-rich 配列を検索したと

ころ、-101~-14にBRE候補が5ヶ所存在していた。これらの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11種類作製し、レポーターアッセイを行ったところ、5ヶ所のBRE候補のいずれにもBMPに対する応答性が認められた。そのうち-51~-46に位置するGGCGCCの6塩基が、最も影響の大きいBRE候補であった。なお、5ヶ所すべてに変異を加えると、BMPに対する応答性は完全に消失した。これらより、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が示唆された。

続いて、BMPによるSmad8/9遺伝子の転写促進時に、これら5ヶ所のBRE候補にSmad1/5/8/9タンパク質が結合しているかを調べるために、クロマチン免疫沈降(Chromatin immunoprecipitation: ChIP)を行った。BMP刺激後2時間のC2C12から得られたクロマチンサンプルを、抗リン酸化Smad1/5/8/9抗体により免疫沈降し、沈降したDNA断片を鋳型として上記のSmad8/9遺伝子のプロモーター領域のBRE候補5ヶ所を含む領域においてPCRによる増幅を試みたところ、目的のサイズの増幅産物が得られた。このことから、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。

以上、本研究により1) Smad8/9遺伝子はBMPの新たな標的遺伝子であり、BMPによるこの遺伝子誘導はあらゆる細胞で普遍的に起こっている可能性があること、2) BMPによるSmad8/9の遺伝子発現は転写レベルで制御されていること、3) BMPによるSmad8/9の転写活性にはSmad8/9遺伝子のプロモーター領域における5ヶ所のBRE候補が関与していること、を示した。すなわち、BMP応答細胞内シグナル伝達因子であるSmad8/9は、その遺伝子発現が転写レベルでBMPによって制御されていること、およびその制御領域を明らかにした。

BMPによる様々な細胞変化(生物現象)は、これまで考えられていたSmad1/5/8/9のリン酸化による活性化だけでなく、Smad8/9それ自体の遺伝子発現を増加させることによっても促進されるのかもしれない。

### 論文審査の結果の要旨

Bone morphogenetic protein (BMP) は Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) ファミリーに属するサイトカインであり、細胞分裂の制御、初期胚のパターン化、細胞分化の決定など多様な生体応答を示す。分子作用機序において、BMPは細胞膜表面の特異的な受容体に結合すると、細胞内シグナル伝達因子であるSmad1、5、8/9がリン酸化され、そのリン酸化Smad1、5、8/9はSmad4と結合して核内に移行し、転写因子として働いて標的遺伝子を活性化する。これらのSmad経路を介した細胞内シグナル伝達により、BMPの作用が発揮されることが知られている。なお、Smadには1~8/9があり、Smad1、2、3、5、8/9はreceptor-regulated Smad (R-Smad)に、Smad4はcommon-Smad

(Co-Smad) に、Smad6 と 7 は inhibitory-Smad (I-Smad) に分類される。

著者らはマウス脂肪前駆細胞由来細胞株 (3T3-L1) やマウス筋芽細胞由来細胞株 (C2C12) を用いた脂肪分化や筋分化過程における TGF- $\beta$ ファミリーの関与に関する先行研究において、BMP がそれ自身のシグナル伝達因子である Smad8/9 の遺伝子発現を促進している可能性を見つけた。これまでに、TGF- $\beta$ ファミリーによる、シグナル伝達因子である各種 Smad の遺伝子発現制御については、I-Smad である Smad6 と 7 については報告されているが、これら以外の Smad (R-Smad および Co-Smad) については知られていない。本研究では、先行研究における BMP がそれ自身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新たな現象の発見をきっかけとして、その分子作用機序を詳細に解析した。本論文は、4 章から構成されており、各章の成績は以下のように要約できる。

## 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

まず、C2C12 と 3T3-L1 を用いて BMP 刺激後 2 時間における Smad1~8/9 の各遺伝子発現を、定量的逆転写(qRT)-PCRにより調べた。その結果、これまでに報告されている Smad6,7以外に、Smad8/9 の mRNA の著しい発現量の上昇を確認した。Smad1~5 の遺伝子発現量には変動が認められなかった。次に、マウスメラノーマ由来細胞株 (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)、ラット表皮由来初代培養細胞株の各種細胞株を用いて同様の実験をしたところ、いずれの細胞においても BMP 刺激により Smad8/9 遺伝子発現が促進することを示した。

BMP 以外の TGF- $\beta$ ファミリーのメンバーである TGF- $\beta$ やアクチビンによる刺激では、Smad8/9 の顕著な遺伝子発現上昇がないことを確認した。

このように、3 動物種 6 細胞株を用いた TGF- $\beta$ ファミリー刺激による各 Smad 遺伝子の定量的発現解析から、TGF- $\beta$ ファミリーのうち BMP は Smad8/9 の遺伝子発現を正に制御しており、この制御はあらゆる細胞において普遍的に生じている可能性を示した。

## 第 2 章 各種細胞における Smad8/9 の遺伝子解析

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。Smad8 の CDS 領域 (1290bp 長) の塩基配列の 642 番目に 6 塩基の挿入 (2 個のアミノ酸挿入 ; アルギニンとバリン) が見られるものが Smad9 であるが、機能的な違いは報告されていない。これらは対立遺伝子と考えられ、通常は区別されずに Smad8/9 と表される。第 1 章において、用いた 6 細胞株の各種細胞での Smad8/9 mRNA の qRT-PCR では Smad8 と Smad9 を区別せずに、いずれも検出できるように、共通プライマーを用いて測定している。しかし、BMP 刺激における Smad8 と Smad9 での遺伝子発現様態が異なることも考慮し、細胞株により発現している Smad8/9 mRNA の塩基配列解析を行い Smad8 と Smad9 の特定を試みた。その結果、C2C12 では Smad8 のみを、B16、HepG2、H9c6 およびラット表皮由来初代培養細胞株では Smad9 のみを、そして 3T3-L1 では Smad8 と Smad9 の

両方を発現していることがわかった。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 の遺伝子発現上昇は同程度に制御されており、これらを区別して検討する必要はないことを示した。

また、マウスの Smad8/9 遺伝子には、2つのスプライシングバリエーションの存在も知られている。そこで、これらのバリエーションをそれぞれ検出するプライマーを設定し PCR を行ったところ、BMP 刺激によりバリエーションの発現に違いがないことも示した。

このように、BMP は全体として Smad8/9 遺伝子発現を促進していると考えられた。

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

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、C2C12 と 3T3-L1 を用いてこの遺伝子発現促進の制御機構を調べた。

- ・タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドの存在の有無にかかわらず、BMP 存在下では Smad8/9 の発現量が増加したことから、BMP によって誘導される Smad8/9 遺伝子発現には、新たなタンパク質の産生を必要としないことを示した。

- ・BMP の I 型受容体阻害薬である LDN-193189 の処理により、BMP 刺激による Smad8/9 の mRNA の発現上昇は消失した。また、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ウエスタンブロットで確認した。

このように、BMP による Smad8/9 遺伝子発現上昇には、BMP 刺激後に BMP の I 型受容体を介してリン酸化した Smad1/5/8/9 が関与しており、そのリン酸化 Smad が転写因子として直接作用して転写段階を制御していると考えられた。

そこで、マウスの Smad8/9 遺伝子の推定プロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだコンストラクト（転写開始点を+1として、-1000~+113の領域：Smad8/9(-1000)-lucとする）を作製し、レポーターアッセイを行った。その結果、BMP 存在下ではルシフェラーゼの発光量の著しい上昇が認められ、その応答性は LDN-193189 により低下した。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。

### 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

BMP による Smad8/9 の遺伝子発現の制御領域を詳細に解析するため、Smad8/9(-1000)-luc を基とする 9 種類のデリー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。C2C12 及び 3T3-L1 を用いてこれらのミュータントを導入したレポーターアッセイにより、BMP に対する応答性は -338~-4 の領域に位置することを示した。この応答領域において、既知の BMP 応答配列（BMP responsive element : BRE）である GCCG もしくは GC-rich 配列を検索したところ、-101~-14 に BRE 候補が 5ヶ所存在していた。これらの BRE 候補に変異を加えたコンストラクトを 11 種類作製し、レポーターアッセイを行ったところ、5ヶ所の BRE 候補のいずれにも BMP に対する応答

性が認められた。そのうち-51~-46に位置する GGCGCC の 6 塩基が、最も影響の大きい BRE 候補であった。5ヶ所すべてに変異を加えると、BMP に対する応答性は完全に消失した。これらより、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 候補が重要であり、特に-51~-46の BRE 候補が重要であることが示唆された。続いて、BMP 刺激時に、これら 5ヶ所の BRE 候補に Smad1/5/8/9 タンパク質が本当に結合しているのかを、クロマチン免疫沈降 (Chromatin immunoprecipitation : ChIP) 法により調べた。BMP 刺激後 2 時間の C2C12 から得られたクロマチンサンプルを、抗リン酸化 Smad1/5/8/9 抗体により免疫沈降し、沈降した DNA 断片を鋳型として Smad8/9 遺伝子のプロモーター領域の増幅を試みたところ、BRE 候補 5ヶ所を含む目的のサイズの増幅産物が得られた。このことから、BMP 刺激時において、Smad8/9 遺伝子制御機構におけるこれら 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を示した。

以上、本研究により 1) BMP 応答細胞内シグナル伝達因子である Smad8/9 遺伝子は BMP の新たな標的遺伝子であり、BMP によるこの遺伝子誘導はあらゆる細胞で普遍的に起こっている可能性があること、2) BMP による Smad8/9 の遺伝子発現は Smad1/5/8/9 経路を介して転写レベルで制御されていること、3) BMP による Smad8/9 の転写活性には Smad8/9 遺伝子のプロモーター領域における 5ヶ所の BRE 候補が関与していること、を示した。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 (Smad6 と 7) による抑制とのバランスによって制御されていると考えられていたが、それだけではなく Smad8/9 遺伝子自体の発現を増加させることによってもシグナル伝達が促進されている可能性が本研究によって示された。本研究で得られた BMP によるそれ自身の細胞内応答シグナル伝達因子の制御機構に関する知見は、BMP による様々な細胞変化を分子レベルで説明する際の新たな機序の一つとして考慮すべきであることを示しており、基礎生物学上及び獣医学上意義ある業績として高く評価できることから、博士 (獣医学) の学位を授与するのに相応しい研究と判定した。