

# アクチビンの情報伝達に関する分子機構： 普遍的伝達と組織特異的伝達

*Molecular mechanism of activin signaling: common pathway and tissue-specific regulation*

舟場正幸<sup>1</sup>, 池田輝雄<sup>2</sup>, 阿部又信<sup>1</sup>

<sup>1</sup>麻布大学獣医学部栄養学研究室, <sup>2</sup>微生物学第一研究室

Masayuki Funaba<sup>1</sup>, Teruo Ikeda<sup>2</sup> and Matanobu Abe<sup>1</sup>

Laboratories of <sup>1</sup>Nutrition and <sup>2</sup>Veterinary Microbiology I, Azabu University School of Veterinary Medicine

**Abstract.** Tissue-specific regulation of activin signaling was examined in mast cells. Gene expression of mouse mast cell protease-7 (mMCP-7) was up-regulated by activin A and TGF- $\beta_1$  in bone marrow-derived cultured mast cell progenitors. Smad3, a signal mediator of the activin/TGF- $\beta$  pathway, transcriptionally activated mMCP-7. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF), a tissue-specific transcription factor predominantly expressed in mast cells, melanocytes, heart and skeletal muscle, inhibited Smad3-mediated mMCP-7 transcription. MITF associated with Smad3, and the C-terminus of MITF and the MH1 and linker region of Smad3 were required for this association. Complex formation between Smad3 and MITF was neither necessary nor sufficient for the inhibition of Smad3 signaling by MITF. MITF inhibited the transcriptional activation induced by the MH2 domain of Smad3. In addition, MITF truncated N-terminal amino acids could associate with Smad3, but did not inhibit Smad3-mediated transcription. The level of Smad3 was decreased by co-expression of MITF but not of dominant-negative MITF, which resulted from proteasomal protein degradation. The changes in the level of Smad3 protein were paralleled by those in Smad3-mediated signaling activity. These findings suggest that MITF negatively regulates Smad-dependent activin/TGF- $\beta$  signaling in a tissue-specific manner.

## 1. 目 的

Activin は TGF- $\beta$  family に属する細胞増殖・分化調節因子である。TGF- $\beta$  を含めた他のファミリーメンバーと同様, activin の機能は胚誘導から造血, 骨形成, 免疫機能の調節に至るまで実に多彩である (1)。Activin のシグナル伝達は, 同じファミリーの TGF- $\beta$  シグナルと同様, それぞれの II 型受容体への結合に端を発する。リガンドが結合した II 型受容体は I 型受容体と会合し, 活性化された I 型受容体のセリンキナーゼが Smad2 / Smad3 の C 末端のセリン残基をリン酸化する。その結果, Smad2 / Smad3 は Smad4 と複合体を形成することにより標的遺伝子の発現を

転写レベルで制御している (2)。Activin / TGF- $\beta$  の多彩な機能に比べて, この単純な Smad を介したシグナル伝達経路は, 様々な経路と Smad シグナル経路のクロストークや組織特異的な Smad 経路の調節を予想させる。そこで, 本研究では, マスト細胞における activin シグナル伝達機構の解明を試みる一環として, マスト細胞に特異的に発現する転写因子である MITF (microphthalmia-associated transcription factor) と Smad 経路との関わり合いを調べた。

## 2. 方 法

マウス骨髄由来前駆マスト細胞 (BMCMCs) の分離, RNA 単離, cDNA 作製, 競合的 RT-PCR, ルシ

フェラーゼリポーターアッセイ、ウェスタンブロット、免疫沈降、mammalian two-hybrid アッセイは既報 (3,4) に準じて行った。

### 3. 結果および考察

BMCMCs の培養液中に activin A ならびに TGF- $\beta_1$  を添加したところ、マスト細胞プロテアーゼ-7 (mMCP-7) の遺伝子発現量が増加した (Fig. 1A)。Stem cell factor (SCF) 添加によっても mMCP-7 遺伝子発現量は増加したが、activin A ならびに TGF- $\beta_1$  はこの SCF による mMCP-7 遺伝子発現増をさらに増強した (Fig. 1A)。mMCP-7 遺伝子の上流域をルシフェラーゼ遺伝子の上流に組み込んだプラスミドを利用してリポーターアッセイを行った。その結果、activin あるいは TGF- $\beta$  の I 型あるいは II 型受容体だけを発現させた場合、有意なルシフェラーゼ活性は認められなかった。それに対して、恒常的に活性化

された activin (ALK4-TE) および TGF- $\beta$  (ALK5-TD) の I 型受容体を発現させた場合、ルシフェラーゼ活性が上昇した (Fig. 1B)。この結果は、activin A / TGF- $\beta_1$  による mMCP-7 遺伝子発現増は転写レベルでの制御によるものであり、受容体を介した活性であることを示唆している。そこで、各 Smad 遺伝子を発現させてリポーターアッセイを行ったところ、Smad2 や Smad4 の単独発現では効果が見られなかったのに対して、Smad3 および恒常的に活性化された Smad3 を発現させた時に mMCP-7 の転写が促進されることが明らかになった (Fig. 1C)。この結果は、mMCP-7 の転写に Smad3 が関与していることを示している。この Smad3 による mMCP-7 転写促進効果は、MITF の共発現によって用量依存的に抑制され、ドミナントネガティブ型の MITF である mi-MITF の共発現では抑制の程度が大幅に緩和された (Fig. 1D)。

MITF による Smad シグナリングの抑制機構を明ら

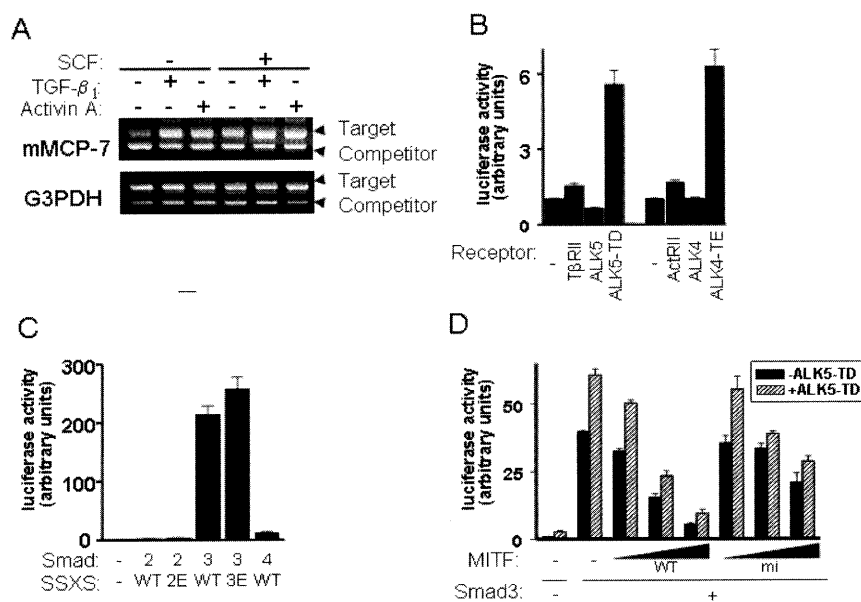


Fig. 1 Activin A and TGF- $\beta_1$  increase mMCP-7 gene transcript in BMCMCs, which is regulated by Smad3 at the transcription level, and the transcriptional activation is negatively regulated by MITF. A, The effects of activin A (2 nM) and TGF- $\beta_1$  (200 pM) on gene transcripts of mMCP-7 were examined by competitive RT-PCR in BMCMCs. BMCMCs were cultured with 10% PWM-SCM with or without SCF (50 ng/ml) for 24 h. PCR using cDNA as a template was performed in the presence of a constant amount of competitor. A representative agarose gel following electrophoresis of PCR products is shown. B-D, HepG2 cells were transiently transfected with mMCP-7-luc,  $\beta$ -galactosidase, and activin with one of the activin and TGF- $\beta$  receptor isoforms (B), wild-type or mutant Smad (C), or Smad3 and MITF (D). Luciferase activity was normalized to  $\beta$ -galactosidase activity, and luciferase activity in the cell lysates in the absence of activin or TGF- $\beta$  receptor isoform and Smad was set to 1. A representative result from three independent experiments is shown. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

かにするため、MITFの共発現がSmad蛋白質の発現量に及ぼす影響を調べた。その結果、野生型のMITFに発現によってSmad2およびSmad3蛋白質の発現量の減少が認められた。この減少はproteasome阻害剤であるlactacystinの前処理によって抑制された (Fig. 2)。この結果は、MITFが共発現することによってSmad蛋白質はproteasome系を介して分解されることを示している。SmadとMITFが機能的に関係していることから、次に、両者の物理的な相互作用を調べた。その結果、mammalian two-hybridアッセイ (Fig. 3A) においても、共免疫沈降アッセイ (Fig. 3B) においてもSmad2 / Smad3とMITFはlactacystin依存的に複合体を形成することが分かった。以上の結果より、SmadとMITFが結合するとSmad蛋白質が壊され、Smadシグナリングが抑制される可能性が考えられた。そこで、この仮説を確認するため、様々なSmadとMITFの欠損変異体 (Fig.

4A, 5A) を作成し、転写活性 (Fig. 4B, 5B)、蛋白発現量 (Fig. 4C, 5C) および複合体形成 (Fig. 4D, 5D) を調べた。その結果、Smad3のMH2領域はMITFと複合体を形成できない (Fig. 4D) 一方、Smad3 MH2領域を介したシグナリングはMITFによって抑制さ

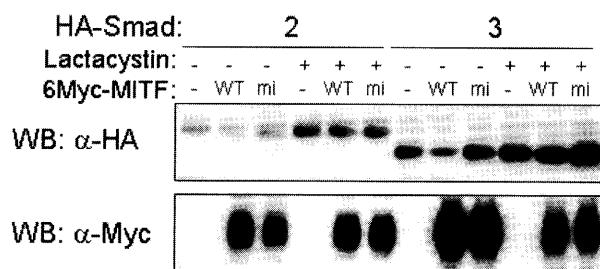


Fig. 2 Decreased Smad protein level by co-expression of wild-type MITF is blocked by inhibition of proteasomal protein degradation. Western blots of COS7 cells transfected with HA-tagged Smad2 or Smad3 and Myc-tagged MITF. Cells were cultured in the presence or absence of lactacystin.

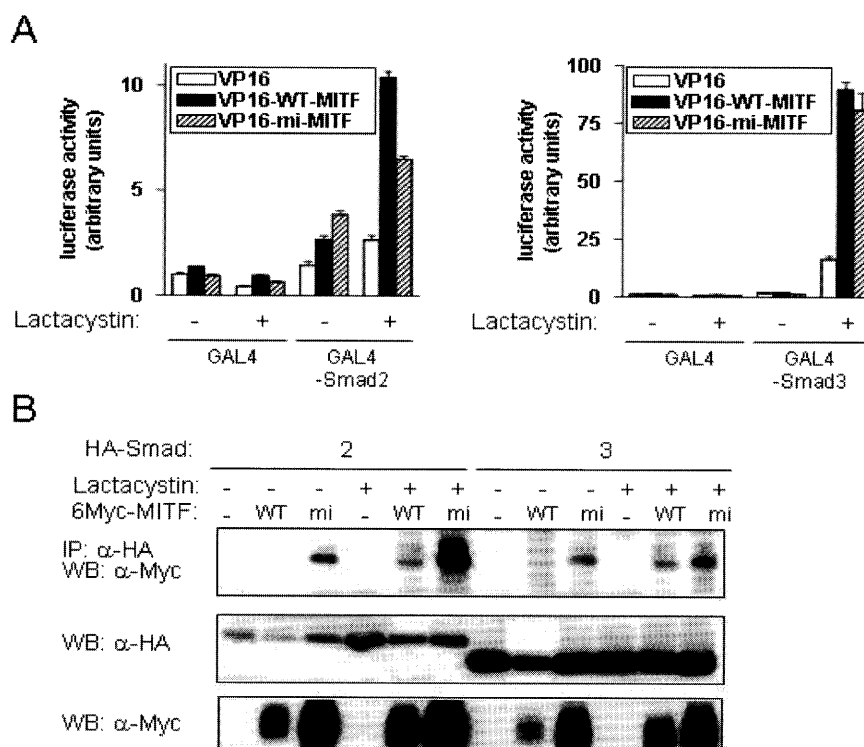


Fig. 3 Association of Smad2/3 and MITF. A, Interaction between Smad2/3 and MITF was examined by mammalian two-hybrid analysis. After transfection, HEK293 cells were cultured in the presence or absence of lactacystin. Luciferase activity was normalized to  $\beta$ -galactosidase activity, and luciferase activity in the cell lysates in the absence of MITF and Smad and of lactacystin was set to 1. A representative result from three independent experiments is shown. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 3). B, The interaction of HA-tagged Smad2/3 with Myc-tagged MITF was examined by immunoprecipitation (IP) followed by Western blotting (WB) in COS7 cells.

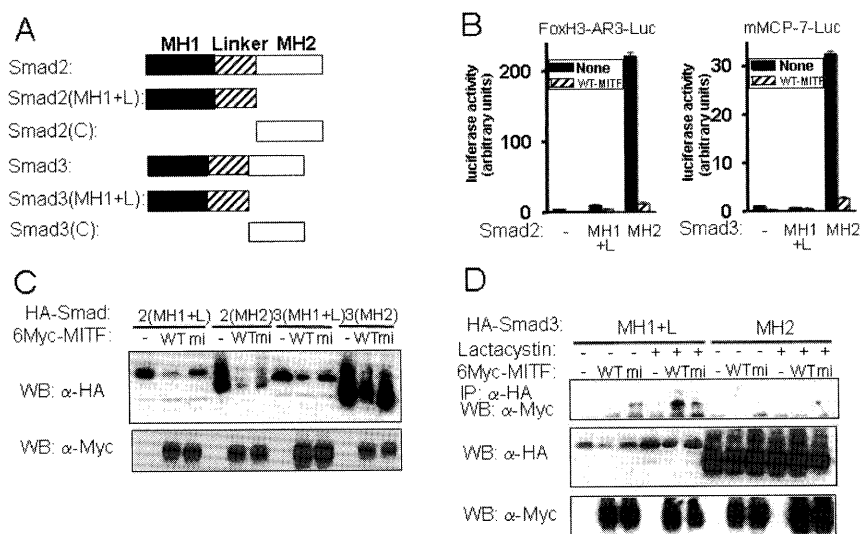


Fig. 4 Region of Smad2/3 responsible for inhibition of transcriptional activation by MITF, the reduced protein level by MITF and association of Smad2/3 and MITF. A, Diagram of C-terminally or N-terminally truncated Smad mutants used for reporter assays, Western blot analyses and co-immunoprecipitation assays. B, Effects of MITF on Smad2-mediated and FoxH3-dependent AR3-luc transcription (left) and on Smad3-mediated mMCP-7-luc transcription (right) in HepG2 cells. The MH1 and linker region of Smad (MH1 + L) and the MH2 domain of Smad (MH2) were examined. Luciferase activity was normalized to  $\beta$ -galactosidase activity, and luciferase activity in the cell lysates in the absence of MITF and Smad was set to 1. A representative result from three independent experiments is shown. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 3). C, Western blots of COS7 cells transfected with Smad2/3 and MITF. D, The interaction of HA-tagged Smad2/3 with Myc-tagged MITF examined by sequential immunoprecipitation (IP) and Western blotting (WB) in COS7 cells.

れること (Fig. 4B), MITF (128-419) は Smad3 と複合体を形成できる (Fig. 5D) 一方, Smad3 を介したシグナリングは抑制できないこと (Fig. 5B) が明らかとなった。それらの結果から, Smad と MITF の複合体形成はシグナル抑制の必要条件でもなければ十分条件でもないと考えられた。Smad のシグナル伝達の変化 (Fig. 4B, 5B) は Smad 蛋白質の発現量の変化 (Fig. 4C, 5C) と一致したことから MITF による Smad シグナリングの負の制御は Smad 蛋白質の発現量の制御によるものであると考えられた。

#### 4. 要 約

Activin シグナル伝達の組織特異的制御を調べた。前駆マスト細胞を activin A あるいは TGF- $\beta_1$  刺激すると mMCP-7 mRNA レベルは上昇した。リポーターアッセイによるプロモーター領域の解析から, この遺伝子発現の上昇は転写レベルの制御であり, activin A/TGF- $\beta_1$  の細胞内シグナル伝達分子の一つである Smad3 が関与していることが分かった。マスト細胞

の分化に組織特異的転写因子である MITF が関わっていることが知られているので mMCP-7 転写と MITF との関係を検討したところ, Smad3 による mMCP-7 転写は MITF の共発現によって抑制された。MITF と Smad3 は細胞内で複合体を形成し, Smad3 の MH1 + linker 領域と MITF の C 末端がこの複合体形成に必要であった。しかしながら, 複合体形成は, MITF による Smad3 シグナル抑制に対して必要条件でも十分条件でもなかった。Smad3 の MH2 領域による mMCP-7 転写上昇は MITF の共発現によって抑制され, N 末端を欠いた MITF は Smad3 シグナルを抑制しなかった。MITF の共発現によって Smad3 の蛋白発現量は減少し, Smad3 蛋白発現量とシグナル活性は相関した。以上の結果, MITF は activin/TGF- $\beta$  シグナル伝達を組織特異的に抑制することが明らかになった。

#### 文 献

- 1) Mathews LS. Endocr Rev. 15, 310-325. 1994.

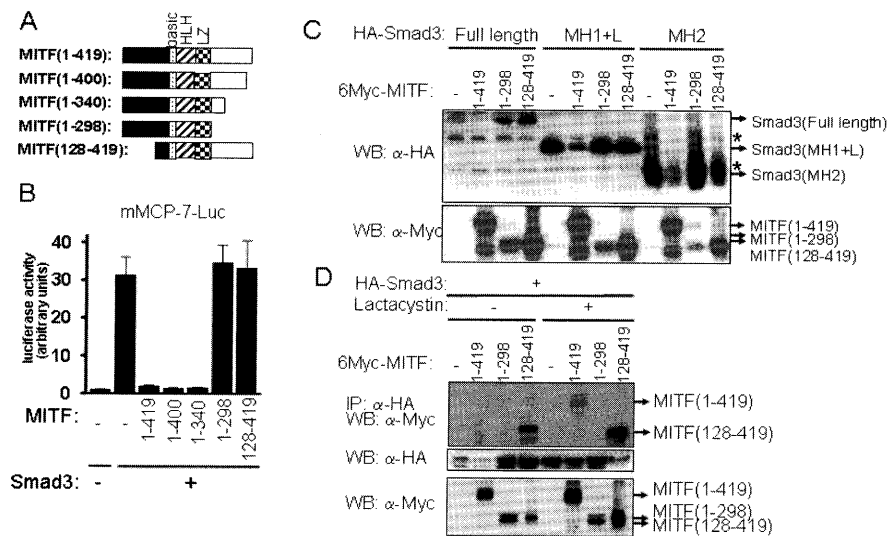


Fig. 5 Region of MITF responsible for the inhibitory effect on Smad3-mediated transcription of mMCP-7, reduced protein level of Smad3 and association of Smad2/3 and MITF. A, Diagram of C-terminally or N-terminally truncated MITF mutants used for reporter assays, Western blot analyses and co-immunoprecipitation assays. B, Effect of MITF on Smad3-mediated mMCP-7-luc transcription in HepG2 cells. Luciferase activity was normalized to  $\beta$ -galactosidase activity, and luciferase activity in the cell lysates in the absence of MITF and Smad3 was set to 1. A representative result from three independent experiments is shown. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ). C, Western blots of COS7 cells transfected with Smad2/3 and MITF. The MH1 and linker region of Smad3 (MH1 + L) and the MH2 domain of Smad3 (MH2) were examined. \*: non-specific band. D, The interaction of HA-tagged Smad2/3 with Myc-tagged MITF examined by sequential immunoprecipitation (IP) and Western blotting (WB) in COS7 cells.

- 2) Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K. *Genes Cells*. 7, 1191-1204. 2002.
- 3) Funaba M, Zimmerman CM, Mathews LS. *J Biol Chem*. 277, 41361-41368. 2002.
- 4) Funaba M, Ikeda T, Ogawa K, Murakami M, Abe M. *J Leukoc Biol*. 73, 793-801. 2003.