

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¹, 池田輝雄², 村上 賢³

麻布大学獣医学部¹栄養学研究室, ²微生物学第一研究室, ³分子生物学研究室

Masayuki Funaba¹, Teruo Ikeda² and Matanobu Abe³

Laboratories of ¹ Nutrition, ² Veterinary Microbiology I, and ³ Molecular Biology
Azabu University School of Veterinary Medicine

Abstract. Previous studies have indicated that activin A and TGF- β_1 , members of the TGF- β family, modulate functions of bone marrow-derived cultured mast cells (BMMC); cell maturation (up-regulation of mouse mast cell proteases (*mmcps*)), growth arrest and migration. At present activin signaling is indistinguishable from TGF- β signaling at the signaling molecule level of downstream of receptor binding. In the present study, the roles of p38 MAP kinase and Smad3 in TGF- β -mediated cell responses in BMMC were explored. Treating BMMC with TGF- β_1 induced the phosphorylation of p38 within 2 h and persisted for 24 h. The involvement of p38 in TGF- β_1 -induced cell responses depended upon mast cell functions; it was necessary for up-regulation of *mmcp-1* and migration, but not for up-regulation of *mmcp-7* and inhibition of MTT uptake and reduction. The decrease in MTT uptake and reduction in response to TGF- β_1 treatment was smaller in Smad3-deficient BMMC compared to wild-type BMMC. Maximal migration was detected at a TGF- β_1 concentration of 40 fM in wild-type BMMC, whereas TGF- β_1 -induced migration was absent in Smad3-deficient BMMC. Thus, the roles of p38 and Smad3 are different among TGF- β -mediated cell responses in BMMC.

1 目 的

Activin は TGF- β family に属する細胞増殖・分化調節因子である。TGF- β 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 の情報伝達は, 同じファミリーの TGF- β の情報伝達と同様, 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- β の多彩な機能に比べて, この単純な Smad を介した情報伝達経路は, 様々な経路と Smad による情報伝達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。

先の研究において, 免疫担当細胞であるマスト細胞において, activin A と TGF- β_1 は様々な活性を有することを明らかにした (3, 4)。現時点において, 受容体結合以降の情報伝達機構において activin と TGF-

β に差はない (2)。本研究では, activin の情報伝達機構の解明を試みる一環として, TGF- β によるマスト細胞の活性変化に対する Smad3 と p38 MAP キナーゼの関与を調べた。

2 方法

マウス骨髄由来前駆マスト細胞 (BMMC) の分離, RNA 単離, realtime RT-PCR, MTT assay, migration assay は既報 (3, 4) に準じて行った。

3 結果と考察

BMMC の培養液中に TGF- β_1 を添加し, p38 キナーゼの 180 番目の Thr と 182 番目の Tyr のリン酸化を認識する抗体で Western blot を行ったところ, 2 時間以降に有意なリン酸化が認められ, これは少なくとも 24 時間継続した (Fig. 1A)。一方, MAP キナーゼファミリーの別のキナーゼである JNK や ERK は TGF- β_1 処理に対して有意なリン酸化を示さなかった (Fig. 1A, data not shown)。p38 キナーゼのリン酸化は 200 pM TGF- β_1 処理によって検出され, それより低い濃度では検出下限以下であった (Fig. 1B)。又, p38 キナーゼのリン酸化は p38 inhibitor である SB203580 の前処理によって抑制された (Fig. 1B)。p38 キナーゼは Thr180/Tyr182 が MAP キナーゼキナーゼである MKK3/6 によってリン酸化されるか, あるいは TGF- β -activated protein kinase 1-binding protein 1 との相互作用を通して自己リン酸化によってリン酸化されると活性化する (5)。SB203580 は p38 キナーゼの活性部位に結合することによって p38 キナーゼ活性を抑制する (6) ことから, TGF- β_1 処理によ

る p38 キナーゼのリン酸化は自己リン酸化による可能性がある。

以前の研究において, TGF- β_1 処理した BMMC では *mmcp-1* や *mmcp-7* を含めたマスト細胞プロテアーゼの遺伝子発現量が増加することを明らかにしている (3, 4)。この活性に対する p38 キナーゼと Smad3 の影響を調べた。Smad3 の影響を調べるため, Smad3 exon8 を標的とした Smad3 knock-out mice (7) から BMMC を調製した。TGF- β_1 による *mmcp-1* の発現増は野生型及び Smad3 欠損のいずれの BMMC においても観察され, SB203580 処理によって発現量の減少が認められた (Fig. 2A, B)。興味深いことに, ERK をリン酸化, 活性化するキナーゼである MEK1 の inhibitor である PD98059 や JNK inhibitor である SP600125 処理によって, TGF- β_1 -誘導性の *mmcp-1* 発現増はさらに亢進した。一方, 野生型及び Smad3 欠損のいずれの BMMC においても TGF- β_1 による *mmcp-7* の発現増は, SB203580 処理によって変化しなかった (Fig. 2C, D)。又, 野生型 BMMC では PD98059 や SP600125 によって *mmcp-7* 発現量はさらに増加したのに対して, Smad3 欠損 BMMC ではその現象は認められなかった。これらの結果は, TGF- β_1 による *mmcp-1* 遺伝子発現増に対して p38 キナーゼ活性が必要である一方, *mmcp-7* 遺伝子発現には必要ではないことを示している。又, 両遺伝子誘導に対して Smad3 は必須ではないことも示唆している。

次に, TGF- β_1 による BMMC の増殖抑制活性を MTT assay によって調べた。BMMC を TGF- β_1 処理すると MTT の取り込みは減少したが, その程度は野生型に比べて, Smad3 を欠損した BMMC では小さかつ

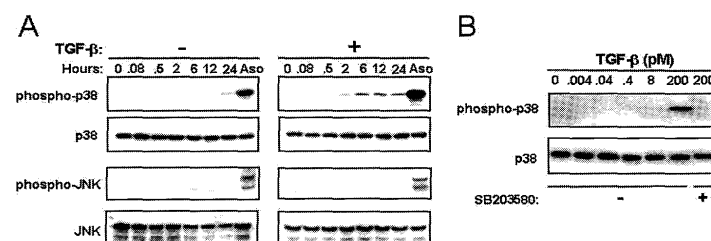


Fig. 1 TGF- β induces the phosphorylation of p38 MAP kinase in BMMC. (A) BMMC were treated with or without TGF- β_1 (200 pM) for the indicated time period, or with Aso (50 ng/ml) as a positive control for 30 min. (B) BMMC were treated with TGF- β_1 at the indicated concentration for 6 h. SB203580 (5 μ M) was added 20 min prior to TGF- β_1 treatment. The phosphorylation of p38 and JNK was examined using Western blot analysis.

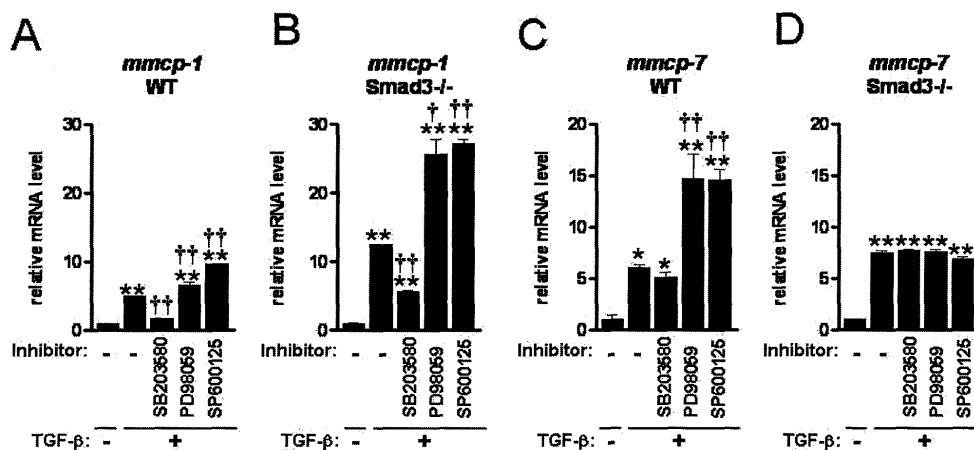


Fig. 2 The p38 MAP kinase is required for the TGF- β -induced up-regulation of *mmcp-1* but not *mmcp-7* in BMMC. BMMC from WT mice (A and C) or Smad3-null mice (B and D) were treated with or without TGF- β_1 (200 pM) for 8 h after pretreatment with vehicle (DMSO) or the indicated kinase inhibitor for 20 min. Vehicle or the kinase inhibitor was not washed out during TGF- β_1 treatment. The mRNA levels of *mmcp-1* (A and B) and *mmcp-7* (C and D) were measured using quantitative real-time RT-PCR. The mRNA level in BMMC treated without TGF- β_1 and kinase inhibitor was set at 1. The data are expressed as the mean \pm SD ($n = 3$). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ as compared with TGF- β (-); † $P < 0.05$ and †† $P < 0.01$ as compared with TGF- β (+) in the absence of kinase inhibitor.

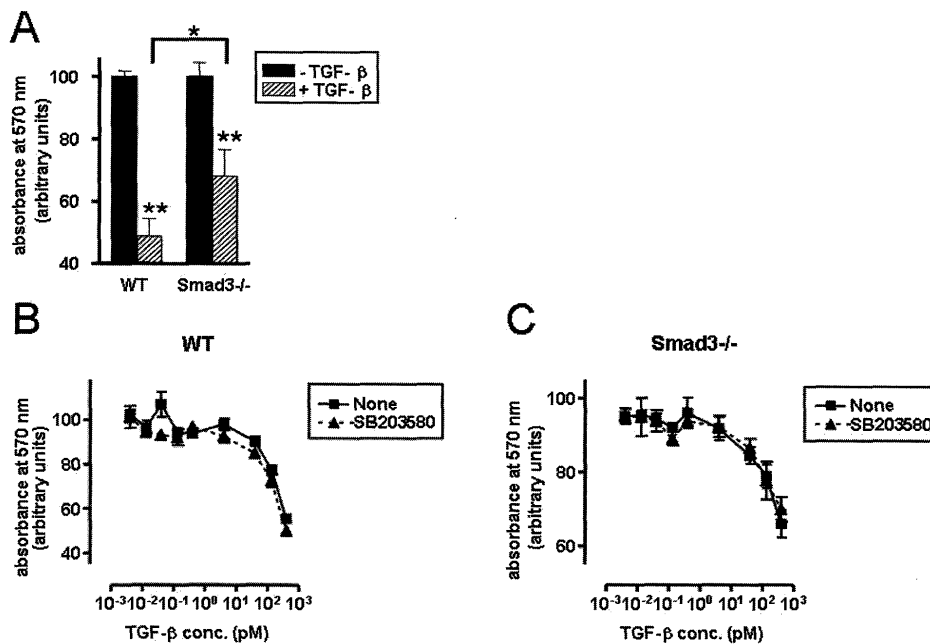


Fig. 3 Smad3, but not p38 MAP kinase, is involved in TGF- β -induced changes in metabolic activity in BMMC. (A) BMMC from WT or Smad3-null mice were treated with or without TGF- β_1 (200 pM) for 24 h. (B-C) BMMC from WT (B) or Smad3-null (C) mice were treated with TGF- β_1 at the indicated concentration. SB203580 (5 μ M) was added 20 min prior to TGF- β_1 treatment. SB203580 was not washed out during TGF- β_1 treatment. A representative result from three independent experiments is shown. BMMC were treated with MTT for 4 h, and the absorbance at 570 nm in BMMC without TGF- β_1 and SB203580 was set at 100. The data are expressed as the mean \pm SD ($n = 3$). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

た (Fig. 3A)。一方、どちらのBMMCにおいてもSB203580は、TGF- β_1 によるMTT取り込み抑制活性に影響しなかった (Fig. 3B)。この結果は、TGF- β_1

による細胞増殖抑制に対して、Smad3は部分的に関与しているがp38キナーゼは関与しないことを示している。

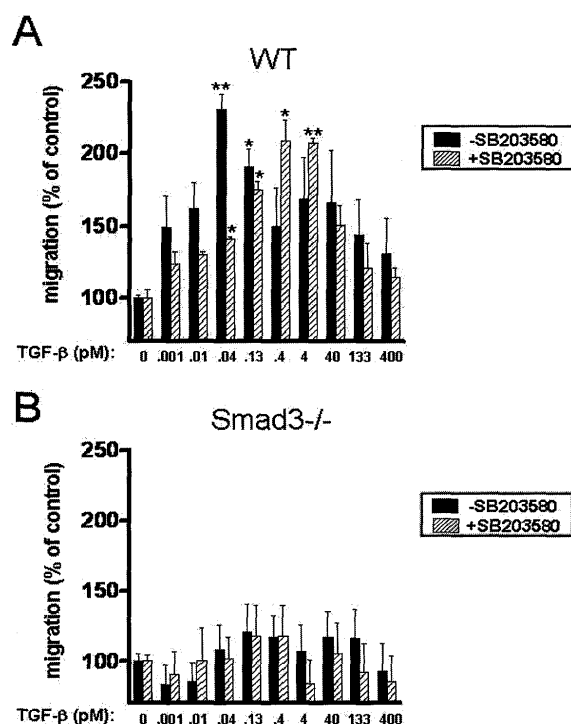


Fig. 4 Smad3 and p38 MAP kinase are required for TGF- β -induced migration in BMMC. Migration was evaluated in BMMC from WT (A) or Smad3-null (B) mice treated with TGF- β_1 at the indicated concentration for 4 h. SB203580 (5 μ M) was added 20 min prior to TGF- β_1 treatment. SB203580 was not washed out during TGF- β_1 treatment. A representative result from three independent experiments is shown. Migration in BMMC without TGF- β_1 was set at 100. The data are expressed as the mean \pm SD (n = 3). * P < 0.05 and ** P < 0.01 as compared with TGF- β (-).

BMMCにはTGF- β_1 に対する遊走能がある(3)。野生型BMMCにおいて最高遊走能を示すTGF- β_1 の濃度は40 fMであったのに対して、SB203580処理すると、最高遊走能を示す濃度が、4 pMにまで増加した(Fig. 4A)。一方、Smad3欠損BMMCではTGF- β_1 に対する遊走は全く見られなかった(Fig. 4B)。この結果は、TGF- β_1 に対する遊走能に対してSmad3は必須であること、並びにp38キナーゼは最高活性を引き起こす上で必要であることを示している。

結論として、BMMCに対してTGF- β_1 処理を行うと、p38キナーゼの活性化が起こり、このp38キナーゼとTGF- β のsignal mediatorであるSmad3はTGF- β_1 によるBMMCの機能変化に関与していることが分かった。p38キナーゼとSmad3の関与の仕方はBMMCの機能によって異なり、このことがactivinを含めたTGF- β ファミリーの単純な情報伝達経路に比べて多

様な生物活性を部分的に説明する。

4 要約

以前の研究において、TGF- β ファミリーに属するactivin AとTGF- β_1 は、ともに、骨髄由来の培養マスト細胞(BMMC)の機能—細胞の成熟(マスト細胞プロテアーゼ(*mmcps*)の発現増)、細胞増殖抑制や遊走—を同じように変化させることを明らかにしている。現時点において、受容体結合以降の細胞内情報伝達機構に関して、activinとTGF- β において差はない。本研究では、アゴニストとしてTGF- β_1 を用いて、TGF- β_1 によるBMMCの機能変化におけるSmad3とp38 MAPキナーゼの関与を調べた。TGF- β_1 処理したBMMCではp38キナーゼは2時間以内にリン酸化され、リン酸化は少なくとも24時間継続した。TGF- β_1 によるBMMCの機能変化におけるp38キナーゼの関与の仕方は、機能に依存した。すなわち、TGF- β_1 による*mmcp-1*の誘導や遊走に対してp38キナーゼは必要なのに対して、*mmcp-7*の誘導や細胞増殖の抑制に対しては必要ではなかった。野生型BMMCと比較して、Smad3欠損BMMCではTGF- β_1 による細胞増殖抑制程度は小さくなった。野生型BMMCでは40 fMのTGF- β_1 に遊走する活性があったが、Smad3欠損BMMCではTGF- β_1 に対する遊走能は消失した。以上の結果、BMMCにおいてTGF- β_1 が引き起こす細胞の反応においてp38キナーゼとSmad3の関与の仕方は機能によって変化することが明らかになった。

文 献

- Mathews LS. Endocr Rev. 15, 310-325. 1994.
- Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K. Genes Cells. 7, 1191-1204. 2002.
- Funaba M, Ikeda T, Ogawa K, Murakami M, Abe M. J Leukoc Biol. 73, 793-801. 2003.
- Funaba M, Zimmerman CM, Mathews LS. J Biol Chem. 277, 41361-41368. 2002.
- Ge B, Gram H, Di Padova F, Huang B, New L, Ulevitch RJ, Luo Y, Han J. Science 295, 1291-1294. 2002.
- Wang Z, Canagarajah BJ, Boehm JC, Kassisa S, Cobb MH, Young PR, Abdel-Meguid S, Adams JL, Goldsmith EJ. Structure 6, 1117-1128. 1998.
- Yang X, Letterio JJ, Lechleider RJ, Chen L, Hayman R, Gu H, Roberts AB, Deng C. EMBO J. 18, 1280-1291. 1999.