

TGF- β ファミリーの情報伝達機構： 普遍的機構と標的細胞特異的機構 —随想的報告書—

*Signal transduction of the TGF- β family: common and cell type-specific mechanisms
- an essay report*

舟場正幸¹, 村上 賢², 西野佳以³

¹麻布大学獣医学部栄養学研究室, ²分子生物学研究室, ³獣医免疫学研究室

Masayuki Funaba¹, Masaru Murakami² and Yoshii Nishino³

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

Abstract. Mouse TGF- β type I receptor, *Alk5*, encodes two types of mRNA generated by alternative splicing of four amino acids in the extracellular region. In the present study, the expression and function of alternative splice variants of *Alk5*, *i.e.*, *Alk5-L* (*Alk5* with the four amino acids) and *Alk5-S* (*Alk5* without the four amino acids), were examined. Expression of *Alk5* was detected in all examined tissues, and no significant differences in the ratio of *Alk5-S* to *Alk5-L* were detected between tissues. Expression of *Alk5* was also detected in various cells, with *Alk5-L* being especially abundant in A-6 ES cells. No clear difference in Smad2 phosphorylation in response to treatment with TGF- β_1 was detected between L17 cells expressing *Alk5-S* and those expressing *Alk5-L*. Consistent with these results, transcription mediated by *Alk5-S* in L17 cells treated with TGF- β_1 was comparable to that mediated by *Alk5-L*. In addition, alternative splicing had no effect on transcriptional activation induced by GDF-8, a member of the TGF- β family. The present results indicate ubiquitous expression of *Alk5* isoforms in mouse tissues and cells, and insignificant effects of alternative splicing on signaling induced by TGF- β_1 and GDF-8.

1. 目的

六十兆個もの細胞から成り立つ私たちの身体は、たった1個の受精卵に端を発している。絶え間ない細胞増殖・分化、さらにはプログラム細胞死を繰り返した結果、脳や骨や筋肉が出来上がり、さらに高次の行動も苦もなくできるようになる。多細胞生物が繰り返す生命現象は、大変複雑だが、個々の細胞内で働いている情報伝達経路は、MAP kinase 経路、Protein kinase A 経路、Protein kinase C 経路、Smad 経

路、JAK/STAT 経路をはじめとした10-20種類程度に限られている。これは、未だ発見されていない情報伝達経路が数多く残されていることを意味しているのではなく、限定された細胞内情報伝達経路が時空間的制御のもと、繰り返し利用されることを通して、様々な機能を発揮すると考えられている。つまり、単一情報伝達経路の多彩な機能こそが、多細胞生物固有の営みを可能にしていると言っても過言ではない。実際、ある細胞をアポトーシスへと誘導する細胞増殖・分化因子は、別の細胞でもアポトーシスを誘導するとは限らず、むしろ、細胞増殖を促進する

場合すらある。

『単一の細胞内情報伝達経路が細胞特異的に様々な機能を惹起するのは何故か？』

多細胞生物の生命現象の根幹とも思えるこの素朴な疑問に対する答えを見つけることを最終目標として、この研究グループは研究している。そのため、主要な情報伝達経路の一つである、Smad経路(TGF- β ファミリー経路)を取り上げ、TGF- β ファミリーによる細胞特異的な機能と非特異的な機能、ならびにその情報伝達を分子レベルで説明したいと考えている。

今回報告する研究は、その一環で行ったものである。きっかけは、ある目的で利用するために、TGF- β のI型受容体であるAlk5の発現constructを作製することに端を発している。発現constructの作成方法には幾つかあるが、今回、この研究グループの一員であるMMは、マウス培養細胞で発現しているAlk5のcoding region cDNAを、fidelityの高いDNA polymeraseを使ったRT-PCRによって単離した後、望みの発現vectorに挿入するというオーソドックスな方法を採用した。慎重にもMMはcloningしたAlk5の塩基配列を何クローンも調べた結果、2種類のAlk5が挿入されていることを見つけた。文献検索した結果、ラットAlk5において知られているalternative splicing variants (Alk5-long form (-L)とAlk5-short form (-S)と名付けた)のマウス版であることが分かった。議論するうちに、「Alk5にsplicing variantsがあるということは意味があるに違いないので、この違いの意義を明らかにする試みをしよう」ということになり、小さな研究は開始された。

2. 方法

用いた方法は全て既報(1, 2)の通りである。

3. 結果と考察

研究開始を決めた時点で、ここで報告する項目を検討することは決まっていた。つまり、1) 各臓器、培養細胞におけるAlk5-LとAlk5-Sの発現比をRT-PCRの後、image analyzerを使って正確に定量する、2) 機能的なAlk5を欠損している細胞を使ってAlk5-

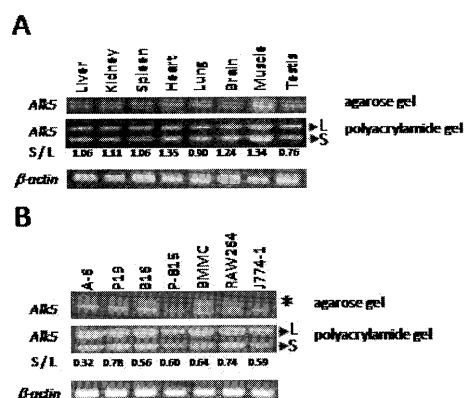


Fig. 1. Expression of *Alk5* isoforms in mouse tissues and cells. Expression of *Alk5* isoforms in mouse tissues (A) and various cells (B) was examined by RT-PCR. PCR products were separated on agarose gels (upper and bottom panels) or polyacrylamide gels (middle panel). *: non-specific band, which was verified by subcloning of the products.

LあるいはAlk5-Sを導入してTGF- β_1 あるいはGDF-8 (TGF- β 以外にGDF-8もAlk5を受容体とするリガンドであることが近年明らかにされた(3))の転写活性化能をTGF- β 応答elementをluciferase遺伝子の upstreamに組み込んだreporterを使って調べることに、3) 同様に、リガンド刺激に対して、TGF- β_1 /GDF-8の情報伝達分子の一つであるSmad2のリン酸化を調べることに、であり、実際、それらを解析した。当初の予想—明確な根拠のあるものではないが—では、このうち、少なくとも一つくらいはAlk5-LとAlk5-Sで違いが出るだろうと考えていた。

しかしながら、結果は、Alk5-S: Alk5-Lは臓器間で大きく異なることもなければ (Fig. 1A), いくつかの培養細胞間でも違いは顕著ではなかった (Fig. 1B)。また、機能的なAlk5が欠損しているL17細胞にSmad2とともにAlk5を導入した場合、Alk5の発現にshort formとlong formで違いはなく (Fig. 2B), TGF- β_1 刺激によるSmad2のリン酸化はAlk5-Sを導入した場合もAlk5-Lを導入した場合ほぼ等しく起こった (Fig. 2A)。また、GDF-8で刺激した場合もAlk5-SとAlk5-L間で違いはなかった (Fig. 2A)。さらに、L17細胞を使ってTGF- β 応答性のreporterを使って転写活性を調べたところ、3TP-lux (4)をreporterとした場合 (Fig. 3A, B)も、FoxH2依存的に転写が活性化するAR3-luc (5)をreporterとした場合 (Fig. 3C-F)も、TGF- β_1 (Fig. 3A-D)あるいはGDF-8 (Fig. 3E, F)刺激に応じたreporter遺伝子の転写活性はAlk5-Sを

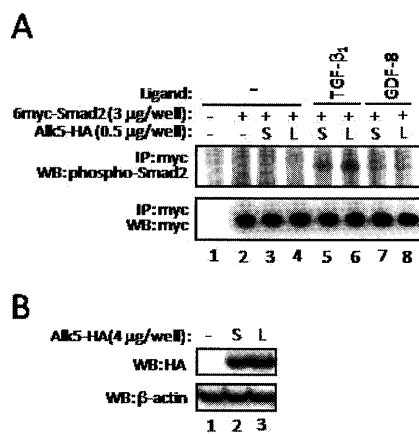


Fig. 2. Phosphorylation of Smad2 mediated by Alk5 isoforms. (A) L17 cells, which are deficient in functional Alk5, were transfected with HA-tagged Alk5 isoforms and 6myc-Smad2. Phosphorylation of Smad2 in response to treatment with TGF- β_1 (200 pM) or GDF-8 (10 nM) was examined in immunoprecipitates (IP) with anti-myc (9E10) antibody by Western blot (WB) analyses. (B) Expression of Alk5 in L17 cells were examined by Western blot (WB) analyses.

Table 1
EC₅₀ concentration of ligand to elicit transcriptional activation

Alk5:		S	L
Ligand:	Reporter:		
TGF- β_1 (pM)	3TP-lux	5.2 \pm 0.5	7.9 \pm 0.1
	AR3-luc	7.4 \pm 1.8	6.8 \pm 2.0
GDF-8 (nM)	AR3-luc	0.27 \pm 0.03	0.34 \pm 0.08

Mean \pm SE (n = 3).

発現させた場合と Alk5-L を発現させた場合とで違いはなかった (Table 1)。つまり、発現レベルでも情報伝達活性でも Alk5-S と Alk5-L に大した違いはなかった。

結果として、Alk5-S と Alk5-L 間で何ら違いは見られなかったが、研究目的自体は合理的であり、目的に沿った方法を選択し、問題のない手技で実験結果を得たのだから、学術論文として (高望みはできないにしろ) どこかの雑誌に掲載されるのではないだろうか? と考えた。実際、研究費獲得の際、つまり、研究を実施する以前の段階で、結果を求められる現状からすると、学術論文として掲載される必要もあるという下品な考えもあった。しかしながら、複数の雑誌の審査員のコメントは、いずれも、「negative data だから掲載に値しない」というものであり、けんもほろろの対応の末、却下された。その後、再挑

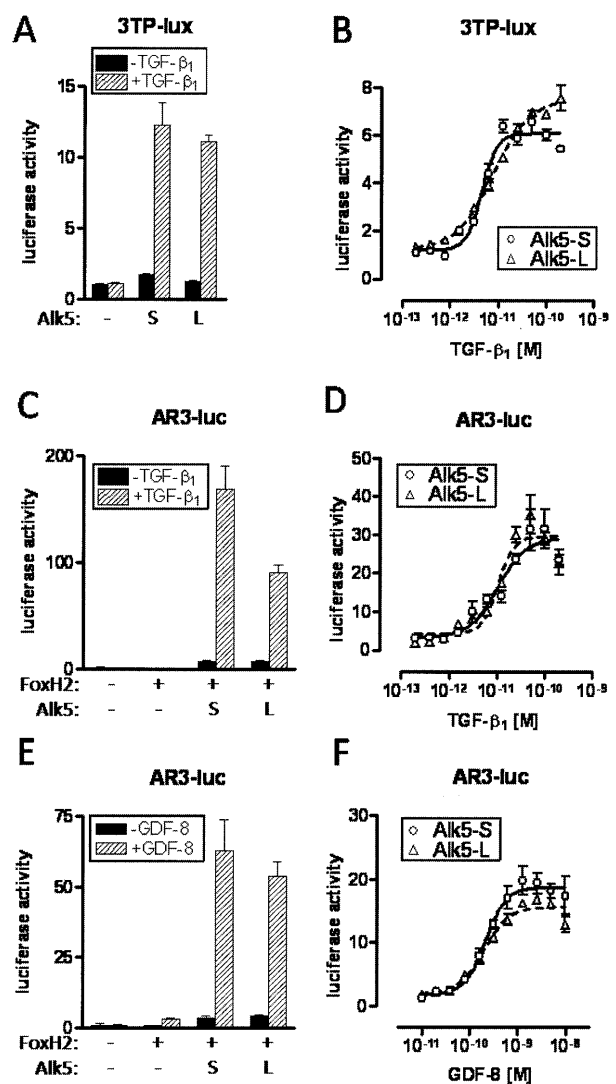


Fig. 3. Transcriptional activation mediated by Alk5 in response to treatment with TGF- β_1 and GDF-8. L17 cells, which are deficient in functional Alk5, were transfected with HA-tagged Alk5 isoforms, β -galactosidase expression vector, and 3TP-lux (A and B) or AR3-luc and FoxH2 (C-F). At 32 h of transfection, cells were treated with 200 pM (A and C) or the indicated concentrations (B and D) of TGF- β_1 or 10 nM (E) or the indicated concentrations (F) of GDF-8 for 16 h. Luciferase activity was normalized to β -galactosidase activity, and the luciferase activity in cell lysates in the absence of ligand or Fox H2, Alk5 and ligand was set at 1. Data are expressed as the mean \pm S.D.

戦した雑誌でも、同様に、「negative data だから掲載に値しない」というコメントもあったが、それ以外のコメントもあり、結局、改訂のチャンスを与えてくれたので、改訂できる部分は可能な限り修正を行い、問題のコメントに対しては、「この分野の研究者にとって Alk5 variants の存在は、意義を求めたくなる。今回分かったことは、少なくとも調べた範囲の

組織や細胞での発現に違いがないこと、シグナル伝達に関しても違いがないことがはっきりしたことであり、今後、同じ興味を持った研究者が避けるために必要な情報という意味において掲載には意味がある」という意の返答を行ったところ、エディターに「variantsがあるということは絶対に意味がある筈だ。意味のないことなどない。違いを見つけたら掲載を考える」という、最早、宗教的な理由としか言いようのない理由の末、却下された。

この小さな研究で私たちは以下に掲げることを学んだ。これを糧にして、今後はより上質の研究に邁進したい。

- 1) 丁寧な（しつこい）解析は研究テーマを生む：現役研究者ならば研究テーマがないという理由で困ることはない。
- 2) 論文至上主義は本質を見失わせがちになる。
- 3) 根拠不明の予想は妄想であり、可能な限り慎むべきである：この研究の原点とある雑誌のエディターの反応に象徴されている。
- 4) 予想もしない研究ほど面白いものはない。

いつの日か、Alk5-SとAlk5-Lの違いの意味をこの手で掴みたいと考えている。

本研究のデータ収集には近藤祥子（分子生物学研究室）が参画した。

4. 要約

TGF- β は、細胞の分化・増殖を調節する分泌性蛋白質である。TGF- β はII型受容体に結合した後、I型受容体（Alk5）と会合し、情報を細胞内に伝達する。ラット血管平滑筋細胞では、細胞外領域をコードする12塩基の選択的スプライシングの結果生じる、2つのAlk5 isoform—short form: Alk5-Sおよびlong form: Alk5-L—の存在が知られているものの不明な点が多い。本研究は、マウス組織ならびに各種細胞株におけるAlk5 isoformの遺伝子発現ならびにAlk5 isoformを介した情報伝達を検討した。マウスの臓器

（肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳、精巣、筋肉）におけるAlk5 isoformの発現をRT-PCRならびにPAGEにより比較したところ、Alk5-SとAlk5-Lは調べた臓器全てにおいて発現が見られ、発現比は臓器間で違いはなかった。また、ES細胞様細胞（P19）、色素細胞（B16）、マスト細胞（P-815, BMMC）とマクロファージ（Raw264）においても両Alk5 isoformの発現が見られ、発現比に違いはなかった。次に、Alk5 isoform間での転写活性を比較した。Alk5を介して情報伝達を行うリガンドとして、TGF- β だけでなく、GDF-8も知られている。そこで、TGF- β_1 ならびにGDF-8の情報伝達に関して、機能的なAlk5を欠損しているL17細胞を用いて検討した。Alk5の活性化によりFoxH2依存的に転写が促進されるAR3-lucをreporterとしてluciferase-based reporter assayを行ったところ、いずれのAlk5 isoformを発現させた場合でも、TGF- β_1 とGDF-8はともに用量依存的にAR3-lucの転写を促進した。Alk5発現時の各リガンドに対するEC₅₀濃度は、TGF- β_1 をリガンドとした場合もGDF-8をリガンドとした場合もAlk5 isoform間で違いはなかった。以上のことから、Alk5の2つのアイソフォームはマウスの様々な臓器および細胞で発現しており、今回調べた活性に関して、これらの両方が同等にTGF- β / GDF-8の受容体として機能していると考えられた。

文献

- 1) Funaba M, Zimmerman CM, Mathews LS. J Biol Chem. 277: 41361-8. 2002.
- 2) Murakami M, Iwata Y, Funaba M. Mol Cell Biochem. 303: 251-7. 2007.
- 3) Rebbapragada A, Benchabane H, Wrana JL, Celeste AJ, Attisano L. Mol Cell Biol. 23: 7230-42. 2003.
- 4) Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang XF, Massagué J. Cell. 71: 1003-14. 1992.
- 5) Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA Jr, Wrana JL, Falb D. Cell. 89: 1165-73. 1997.