

# 多機能分子群である TGF- $\beta$ ファミリーが多機能である理由： シグナル伝達の観点からの検討

*Molecular bases of multifunction of pluripotent TGF- $\beta$  family members  
with emphasis on signal transduction*

舟場正幸<sup>1</sup>, 池田輝雄<sup>2</sup>, 村上 賢<sup>3</sup>

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

Masayuki Funaba<sup>1</sup>, Teruo Ikeda<sup>2</sup> and Masaru Murakami<sup>3</sup>

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

**Abstract.** In order to gain better understanding on multifunction of pluripotent TGF- $\beta$  family members at the molecular level, the genes that were up-regulated in response to treatment with members of the TGF- $\beta$  family were investigated in mouse bone marrow-derived cultured mast cells (BMMC). The cDNA microarray analyses indicated that in BMMC, five genes were induced by treatment with 4 nM activin A, a member of the TGF- $\beta$  family, for 2 h. Tocopherol-associated protein (*Tap*) was one of the induced genes, and the *Tap* induction in response to activin A treatment was confirmed by competitive RT-PCR and real-time RT-PCR analyses. Treatment with TGF- $\beta_1$  at 200 pM but not BMP-2 at 4 nM also increased *Tap* gene transcript in BMMC. Activin A-induced *Tap* expression was detected in BMMC and MC/9 mast cells but not in RAW264 macrophage-like cells, B16 melanoma cells or P19 embryonic carcinoma cells. Treatment with  $> 1 \mu\text{M}$  SB431542, an inhibitor of activin and TGF- $\beta$  type I receptors ALK4/5, reduced responsiveness of *Tap* expression to TGF- $\beta_1$ , whereas  $< 0.5 \mu\text{M}$  SB431542 effectively reduced TGF- $\beta_1$ -induced expression of *mmcp-1* and *mmcp-7*. Induction of *Tap* was also detected in BMMC from Smad3-null mice, although the levels were lower than observed with wild-type mice. These results suggest that *Tap* is induced not only through an activated ALK4/5- and Smad3-mediated mechanism but also through an ALK4/5-independent mechanism. Reporter assays indicated that *Tap* expression enhances transcription mediated by the activin/TGF- $\beta$  pathway. Thus, the present results suggest that *Tap* induction in response to activin/TGF- $\beta$  occurs predominantly in mast cells and serves as a positive regulator in activin/TGF- $\beta$  signaling.

## 1. 目的

TGF- $\beta$ ファミリーは、構造上、TGF- $\beta$ 群、activin群、BMP群に大別され、30種類を超えるメンバーから構成される。TGF- $\beta$ ファミリーに属するこれらの分泌性タンパク質は、発生・分化を始め生命維持に関係する実に多くの過程に関与している(1)。TGF- $\beta$ ファミリーの細胞内情報伝達に関しては、『TGF- $\beta$

ファミリータンパク質がリガンドとしてI型受容体キナーゼ：II型受容体キナーゼ複合体に結合すると、一連のSmadタンパク質がリン酸化され、核内に移動したSmad複合体が標的遺伝子の転写を調節する』というモデル(2)が提唱されているに過ぎない。リガンドは30種類を超える分子が知られているのに対して、I型受容体は7種類、II型受容体は4種類、Smadは8種類しか知られておらず、このシンプルな

情報伝達モデルだけで TGF- $\beta$ ファミリーの多彩な全機能を説明することは不可能である。リガンドの発現制御、受容体キナーゼの調節並びに他の情報伝達経路との相互作用が細胞特異的に起こる結果、多様な TGF- $\beta$ ファミリーの機能が惹起されていると想像されるものの、詳細に関しては不明な点が多い。

先の研究において、マウス骨髄由来前駆マスト細胞 (BMMC) において、activin A と TGF- $\beta_1$  は様々な活性を有することを明らかにした (3, 4)。本研究では、マスト細胞における TGF- $\beta$ ファミリーの標的細胞特異的な情報伝達の詳細な解析を試みた (5)。

## 2. 方法

BMMC の分離、各種細胞株の培養、cDNA microarray, 競合的 RT-PCR, realtime RT-PCR, reporter assay は既報 (3-5) の通り行った。

## 3. 結果と考察

BMMC の培養液中に activin A を添加した際に起こる早期の反応を詳細に調べるため、4 nM activin A 処理 2 時間後に誘導される遺伝子群の網羅的解析を Yale Univ. Biotech. Res. Lab. が提供する cDNA チップ (OMM13K) を利用して行った。標識蛍光ラベルを変えて 13,443 個の遺伝子を cDNA microarray 法によってスクリーニングした結果、3 回の実験いずれにおいても activin A 処理によって遺伝子発現増が認められた遺伝子は 5 個であり (Table 1), このうちの一つは、CRAL/TRIO 並びに GOLD ドメインを有する tocopherol-associated protein (*Tap*) であった。Activin A 処理による  $\beta$  発現増は、競合的 RT-PCR 法 (Fig. 1A) や realtime RT-PCR 法 (Fig. 1B) によっても確認された。この遺伝子誘導はマスト細胞株である MC/9 においても認められた (Fig. 1A)。BMMC における *Tap* の誘導は、TGF- $\beta_1$  (200 pM) 刺激後にも認

められたのに対して、BMP-2 (4 nM) 刺激時には認められなかった (Fig. 2A)。また、TGF- $\beta_1$  による *Tap* 誘導は新規のタンパク質合成を阻害する cycloheximide 処理によっても起こった (Fig. 2B)。一方、マクロファージ細胞株である RAW264, メラノーマ細胞株である B16 や胚性腫瘍細胞株である P19 では activin A 処理による *Tap* 発現の増加は認められず、TGF- $\beta_1$  や BMP-2 刺激に対しても *Tap* 発現レ

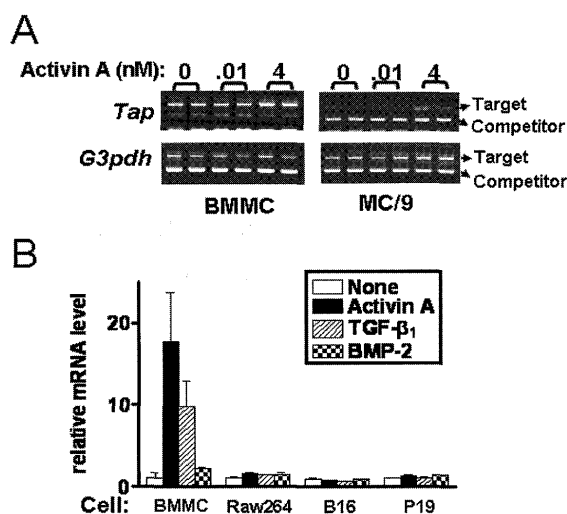


Fig. 1. Activin A and TGF- $\beta_1$  but not BMP-2 increase *Tap* gene transcript in mast cells. (A) Effects of activin A on *Tap* transcript levels were examined by competitive RT-PCR in BMMC and MC/9 mast cells. BMMC and MC/9 were cultured with the indicated concentrations of activin A in  $\alpha$ -MEM with 10% FCS and 10% PWM-SCM for 2 h. PCR using cDNA as a template was performed in the presence of a constant amount of competitor. A representative agarose gel electrophoresis of PCR products is shown. (B) BMMC, RAW264 macrophage-like cells, B16 melanoma cells and P19 embryonic carcinoma cells were cultured with activin A (4 nM), TGF- $\beta_1$  (200 pM) and BMP-2 (4 nM) for 24 h. Ligand was added to  $\alpha$ -MEM with 10% FCS and 10% PWM-SCM in BMMC, DMEM with 10% FCS in RAW264 and P19 cells, and RPMI1640 with 10% FCS in B16 cells. Real-time quantitative RT-PCR was performed. The mRNA level of *Tap* was expressed relative to *G3pdh*. The level of mRNA in the absence of ligand was assigned a value of 1.

Table 1 Genes that are up-regulated in response to activin A treatment in BMMC

Accession number	Gene name	Fold induction	
		Mean	S.E.
BC005759	Tocopherol-associated protein	4.32	0.15
NM_023719	Thioredoxin interacting protein	3.42	1.73
X78543	MCP-Y1	3.37	0.31
AK017885	Rho-related GTP-binding protein rho H	1.78	0.25
BC005481	Elastin microfibril interface located protein 1	1.62	0.10

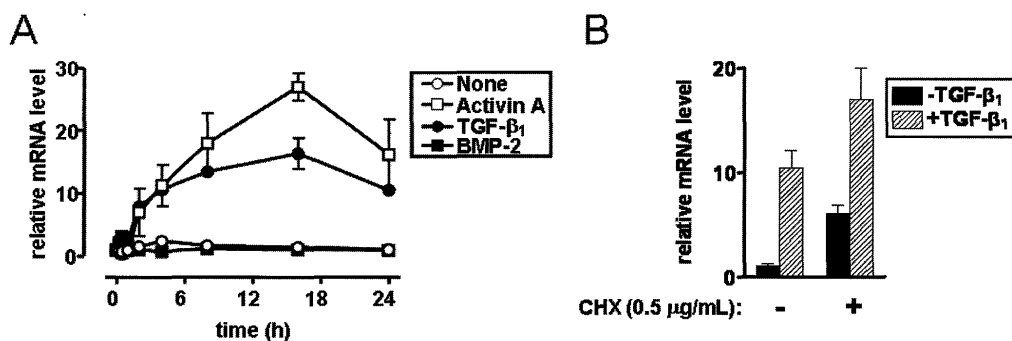


Fig. 2. TGF- $\beta_1$  increases *Tap* transcript levels in mast cells. (A) Time-course changes in *Tap* expression in response to activin A, TGF- $\beta_1$  and BMP-2. BMMC were cultured with activin A (4 nM), TGF- $\beta_1$  (200 pM) and BMP-2 (4 nM) in  $\alpha$ -MEM with 10 % FCS and 10 % PWM-SCM for the indicated time. (B) Effects of a protein synthesis inhibitor cycloheximide on TGF- $\beta_1$ -induced *Tap* expression. BMMC were treated with or without TGF- $\beta_1$  (200 pM) in the presence (+) or absence (-) of cycloheximide (0.5  $\mu$ g/ml) for 12 h. Real-time quantitative RT-PCR was performed. The mRNA level of *Tap* was expressed relative to *G3pdh*. The level of mRNA in the absence of ligand and cycloheximide was assigned a value of 1.

ベルは変動しなかった (Fig. 1B)。これらの細胞では、TGF- $\beta_1$ 、activin A 並びに BMP-2 刺激に対して Smad タンパク質のリン酸化が認められた (data not shown) ことから、*Tap* はマスト細胞特異的に activin A 並びに TGF- $\beta_1$  によって直接誘導される遺伝子と考えられた。

Activin/ TGF- $\beta$  経路の情報伝達分子である Smad3 の exon8 を標的とした Smad3 knock-out mice (6) から調製した BMMC においても TGF- $\beta_1$  による *Tap* 発現は観察されたが、その程度は野生型 BMMC に比べて小さなものであった (Fig. 3A)。Activin/TGF- $\beta$  の I 型受容体キナーゼ (ALK4/5) の阻害剤である SB431542 (7) で BMMC を前処理すると TGF- $\beta_1$  による *Tap* 発現は用量依存的に減少した (Fig. 3A) が、その程度は、activin/TGF- $\beta$  誘導性の別の遺伝子群 (*mmcp-1* と *mmcp-7*) の SB431542 による抑制に比べて小さいものであった (野生型 BMMC における *Tap* 発現の IC<sub>50</sub> 濃度は  $10.61 \pm 3.75 \mu\text{M}$  であったのに対して、*mmcp-1* や *mmcp-7* 発現の IC<sub>50</sub> 濃度はそれぞれ  $0.45 \pm 0.10 \mu\text{M}$ ,  $1.81 \pm 0.90 \mu\text{M}$  であった)。これらの結果は、activin A/ TGF- $\beta_1$  による *Tap* 発現増は、ALK4/5 を介した経路と介さない経路の両方存在する可能性を示唆している。

*Tap* が activin/TGF- $\beta$  刺激によって誘導されることの意義を調べるため、HepG2, B16 及び P19 の各細胞株を用いて activin/TGF- $\beta$  responsive reporter による解析を行った (Fig. 4)。Activin  $\beta_A$  の発現ベクターあるいは恒常的に活性化した ALK5 の発現ベクター

(ALK5-TD) の導入によって、各 reporter 遺伝子の転写は促進した。また、*Tap* の共発現は activin  $\beta_A$  並びに ALK5-TD による reporter 遺伝子の転写を増強した。B16 や P19 では activin A や TGF- $\beta_1$  に対して *Tap* の誘導は起こらない (Fig. 1B) ことから、これらの結果は、*Tap* は activin/TGF- $\beta$  シグナルの増強因子であると考えられた。

*Tap* には *in vitro* において  $\alpha$ -tocopherol に対する結合能 (8)、phosphatidylinositol の輸送能 (9) 並びに cholesterol 生合成のため squalene 輸送能 (10) がある。最近、*Tap* には GTPase 活性があり (11)、phosphatidylinositide 3-kinase 経路の抑制に関与することが報告された (12)。本研究の結果、それらの役割に加えて activin/ TGF- $\beta$  経路の正の regulator としても作用することが明らかになった。結論として、マスト細胞に対して activin A/TGF- $\beta_1$  処理を行うと、*Tap* 誘導が細胞特異的に起こり、*Tap* は activin/ TGF- $\beta$  経路の増強因子として作用することが分かった。自身の経路の modulator 遺伝子の細胞特異的な誘導は TGF- $\beta_1$  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

TGF- $\beta$  ファミリーに属する分子群は、生命を維持する上で重要と考えられる生物現象の多くに関与しているが、現在知られている情報伝達経路は極めて単純である。したがって、多様な生物活性を惹起するためには、標的細胞の種類に関わらない普遍的な

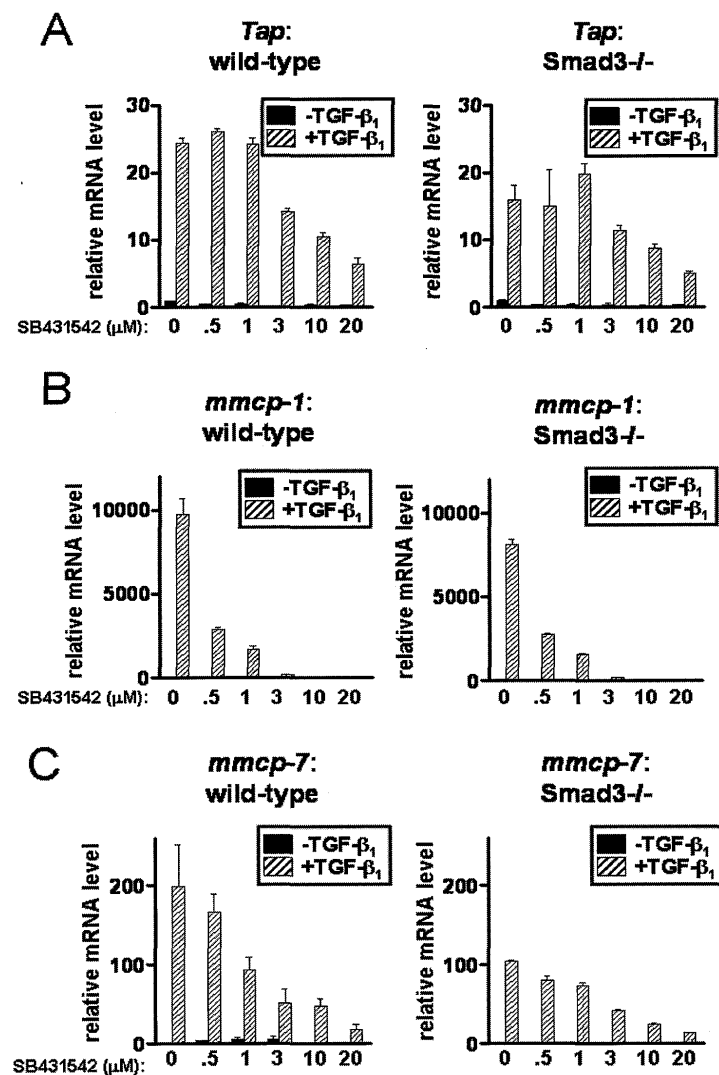


Fig. 3. Inhibition of TGF- $\beta_1$ -induced expression by the ALK4/5/7 inhibitor SB431542. BMMC from wild-type or Smad3-null mice were treated with or without TGF- $\beta_1$  (200 pM) for 24 h after pretreatment with the indicated concentrations of SB431542 for 20 min. Real-time quantitative RT-PCR was performed. The mRNA levels of *Tap* (A), *mmcp-1* (B) and *mmcp-7* (C) were expressed relative to *G3pdh*. The level of mRNA in the absence of ligand and SB431542 was assigned a value of 1.

情報伝達機構と標的細胞特異的な情報伝達機構があるものと推測される。そこで、TGF- $\beta$ ファミリーが如何にして多機能を発揮するかを分子レベルで明らかにすることを目的として本研究を行った。本年度は、免疫担当細胞であるマスト細胞を用いて、TGF- $\beta$ ファミリーによる標的細胞特異的な情報伝達についての解析を試みた。マウスの骨髄より調製した前駆マスト細胞 (BMMC) において activin A (4 nM) 刺激2時間後に誘導される遺伝子群を網羅的に解析したところ、CRAL/TRIO並びに GOLD ドメインを

有する tocopherol-associated protein (*Tap*) が activin A によって誘導されることが明らかになった。activin A 刺激による *Tap* 発現の増加は、マスト細胞株である MC/9 においても認められたが、マクロファージ細胞株である RAW264、メラノーマ細胞株である B16 や胚性腫瘍細胞株である P19 では activin A 処理によって *Tap* の増加は認められなかった。また、BMMC における *Tap* 誘導は、TGF- $\beta_1$  (200 pM) 刺激後にも認められたのに対して、BMP-2 (4 nM) 刺激時には認められなかった。一方、activin/TGF- $\beta$  の I

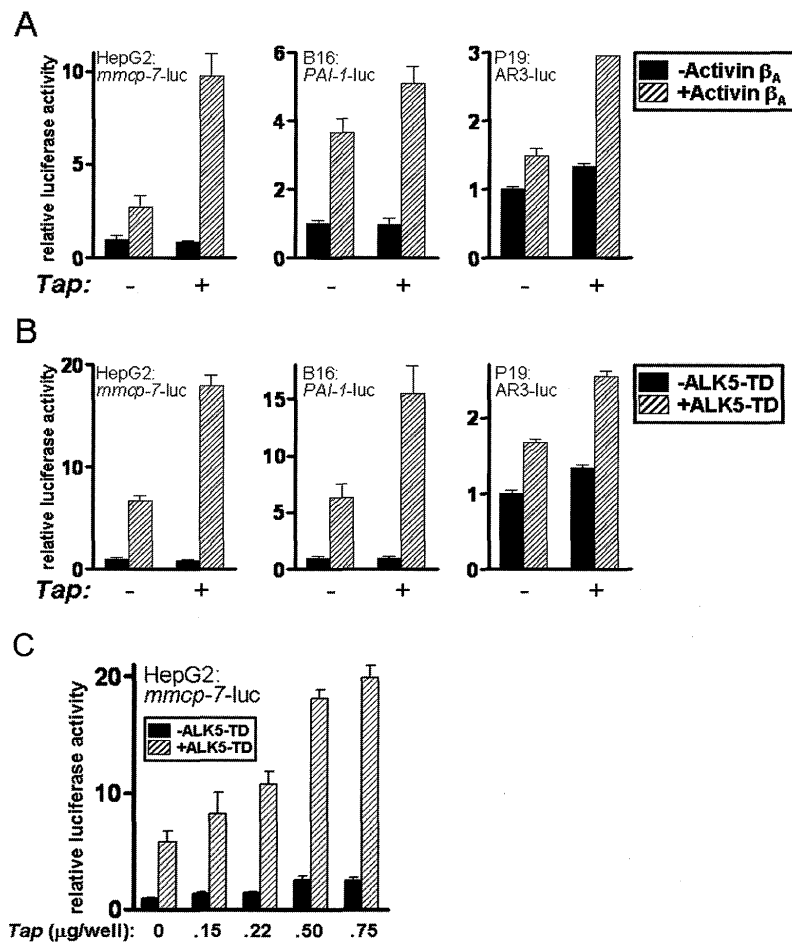


Fig. 4. Expression of *Tap* enhances activin/TGF- $\beta$ -mediated transcriptional activation. Along with  $\beta$ -galactosidase expression plasmid, HepG2, B16 and P19 cells were transiently transfected with *mmcp-7-luc*, *PAI-1-luc* and *AR3-luc*, respectively. Cells were also transfected with or without *Tap* and activin  $\beta_A$  (A) and a constitutively active TGF- $\beta$  receptor, ALK5-TD (B, C). For P19 cells, FoxH3 plasmid was also transfected. At 40 h after transfection, cells were harvested. Luciferase activity was normalized to  $\beta$ -galactosidase activity. Luciferase activity in the cell lysates in the absence of activin  $\beta_A$ , ALK5-TD and *Tap* was assigned a value of 1. A representative result from three independent experiments is shown. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD (n = 3).

型受容体キナーゼの阻害剤である SB431542 の前処理によってこの遺伝子誘導は減少したが、その程度は、activin/TGF- $\beta$  誘導性の別の遺伝子群 (*mmcp-1* と *mmcp-7*) の SB431542 による抑制に比べて小さいものであった。*Tap* が activin/TGF- $\beta$  刺激によって誘導されることの意義を調べるため、activin/TGF- $\beta$  responsive reporter を用いて解析したところ、*Tap* 存在下によって activin/TGF- $\beta$  シグナルは増強された。*Tap* 発現が activin/TGF- $\beta$  によって誘導されるのはマスト細胞に特異的であり、誘導された *Tap* は activin/TGF- $\beta$  シグナルの増強因子であると考えられた。

## 文献

- 1) Kulkarni AB, Thyagarajan T, Letterio JJ. *Curr Mol Med.* 2, 303-327. 2002.
- 2) Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K. *Genes Cells.* 7, 1191-1204. 2002.
- 3) Funaba M, Ikeda T, Ogawa K, Murakami M, Abe M. *J Leukoc Biol.* 73, 793-801. 2003.
- 4) Funaba M, Ikeda T, Murakami M, Ogawa K, Tsuchida K, Sugino H, Abe M. *J Biol Chem.* 278, 52032-52041. 2003.
- 5) Funaba M, Murakami M, Ikeda T, Ogawa K, Tsuchida

- K, Sugino H. *Biochim Biophys Acta*. 1763, 900-906. 2006.
- 6) Yang X, Letterio JJ, Lechleider RJ, Chen L, Hayman R, Gu H, Roberts AB, Deng C. *EMBO J*. 18, 1280-1291. 1999.
- 7) Inman GJ, Nicolas FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD, Laping NJ, Hill CS. *Mol Pharmacol*. 62, 65-74. 2002.
- 8) Zimmer S, Stocker A, Sarbolouki MN, Spycher SE, Sassoon J, Azzi A. *J Biol Chem*. 275, 25672-25680. 2000.
- 9) Phillips SE, Sha B, Topalof L, Xie Z, Alb JG, Klenchin VA, Swigart P, Cockcroft S, Martin TF, Luo M, Bankaitis VA. *Mol Cell*. 4, 187-197. 1999.
- 10) Shibata N, Arita M, Misaki Y, Dohmae N, Takio K, Ono T, Inoue K, Arai H. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98, 2244-2249. 2001.
- 11) Habermehl D, Kempna P, Azzi A, Zingg JM. *Biochem Biophys Res Commun*. 326, 254-259. 2005.
- 12) Ni J, Wen X, Yao J, Chang HC, Yin Y, Zhang M, Xie S, Chen M, Simons B, Chang P, di Sant'Agnese A, Messing EM, Yeh S. *Cancer Res*. 65, 9807-9816. 2005.