

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18580299  
 研究課題名（和文） 胚性多分化能細胞から中胚葉系列細胞への分化における TGF-βファミリー  
 研究課題名（英文） Role of the TGF-β family during differentiation from embryonic stem cells to mesodermal cells  
 研究代表者  
 舟場 正幸 (FUNABA MASAYUKI)  
 京都大学・農学研究科・准教授  
 研究者番号：40238655

## 研究成果の概要：

胚性多分化能細胞から中胚葉系列細胞への分化過程において細胞分化因子群である TGF-βファミリーが果たす役割を明らかにすることを目的とした。胚性多分化能細胞では TGF-βファミリーの受容体群および情報伝達分子群が発現しており、とくに、中胚葉系列細胞への分化には、Nodal/Cripto 軸が重要な役割を果たしていることが分かった。また、従来の情報伝達モデルでは説明できないリガンド-受容体-情報伝達分子の組み合わせが存在することが分かった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,400,000	0	1,400,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	600,000	4,000,000

研究分野：生化学・分子生物学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学；基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：TGF-βファミリー、胚性多分化能細胞、分化、中胚葉系列細胞

## 1. 研究開始当初の背景

動物の個体は1個の受精卵から発生・分化する。たった1個の受精卵から個体を作るためには、膨大な数の細胞分裂が不可欠であり、一方で数百種類にも及ぶ細胞を産み出す必要がある。個体の身体が正しく作られるためには、細胞増殖と細胞分化が巧妙に調節されながら進行しなければならない。受精卵や発生初期の細胞（胚性幹細胞：ES細胞）は分化における全能性を有しており、ES細胞は各胚葉の幹細胞に分化した後、様々な細胞に運命決定（コミットメント）され、多段階の分化過程を経て

最終分化細胞になる。ES細胞の分化制御には多くの因子が複雑に関与していることが想像されているものの、その詳細の多くは依然として不明である。

TGF-βファミリーに属する分泌性蛋白質は30種類を超えるメンバーから構成され、構造上、TGF-β群、アクチビン群、BMP群に大別される。TGF-βファミリーは細胞増殖や分化を調節することにより生命維持に関係する様々な過程—がん抑制、ホルモン分泌、アポトーシス、造血、骨・神経形成、免疫応答など—に関与することが知られてきた。これらの知見の多くは、

TGF- $\beta$ ファミリーを外因的に処理した時の反応から得られており、多分化能を有する幹細胞からの分化や増殖過程で果たす役割については、可能性として示唆されているもののその詳細のほとんどは不明である。

## 2. 研究の目的

研究全体では、『TGF- $\beta$ ファミリー—TGF- $\beta$ 群、アクチビン群、BMP群—がES細胞の分化過程で果たす役割とその分子機構を明らかにする』ことを最終的な目的としている。従来、研究代表者らはTGF- $\beta$ ファミリーの構成因子の一つであるアクチビンに着目し、アクチビンが中胚葉由来の細胞である軟骨細胞・骨芽細胞さらには血液細胞の分化に及ぼす影響を調べてきた。

カエルの初期胚においてTGF- $\beta$ ファミリーは中胚葉誘導に重要な役割を果たすことも示されてきたものの、哺乳類の細胞においてES細胞から中胚葉系列への細胞分化については不明な点が多い。そこで、本研究では、哺乳類のES細胞から中胚葉系列の幹細胞への分化ならびに幹細胞から中胚葉系列の各細胞へのコミットメントにおいてTGF- $\beta$ ファミリーが果たす役割に注目することとし、三胚葉いずれにも分化できる胚性多分化能細胞におけるTGF- $\beta$ ファミリーの遺伝子発現、分化調節機能ならびにその分子機構の解析を行う。

## 3. 研究の方法

マウス胚性腫瘍細胞P19を用いて、a) 多分化能細胞から中胚葉系列の幹細胞分化、ならびに、b) 中胚葉系列の幹細胞から各細胞へのコミットメントにおけるTGF- $\beta$ ファミリーの役割を解析する。P19細胞は、発生初期の胚盤胞内部細胞塊に類似した性質を持つ多能性細胞で、培養条件の違いによって三胚葉のいずれにも分化誘導が可能であることが知られている。

このES細胞様細胞は、他のES細胞株とは異なり、培養が比較的容易であること、発現ベクターやsiRNAの導入が可能であること、遺伝子発現を調べるために十分な質と量のRNA回収が可能であることが確認された。また、TGF- $\beta$ ファミリーに属する代表的な3つの因子(TGF- $\beta$ 、アクチビンA、BMP-2)の応答遺伝子であることが文献上明らかにされている*smad6*と*smad7*遺伝子発現量を定量的リアルタイムRT-PCR法により調べたところ、アクチビンAやBMP-2処理によってこれらの遺伝子発現量は増加することも確認しており、少なくともP19細胞はアクチビンAやBMP-2の標的細胞であることも確認された。

したがって、この細胞に対して、定量的RT-PCR、Western blot ならびに siRNA を用いた遺伝子ノックダウンなどの手法を用いてTGF- $\beta$ ファミリーの役割を調べる。

## 4. 研究成果

### ・主な成果

- (1) マウス胚性腫瘍細胞 P19 を用いて解析を行った。この細胞は、培養条件に応じ三胚葉のいずれにも分化することができる。分子刺激前において TGF- $\beta$ ファミリーの受容体群ならびに情報伝達分子(Smad)群の発現が認められたので、TGF- $\beta$ ファミリーの標的細胞になり得ると考えられた(図1)。*Smad*群はリン酸化によって活性化するので、活性化状態をWestern blot法によって検討したところ、分化刺激前において*Smad2*は高い活性化状態を示していた(図2)。さらに、リガンドの発現をRT-PCR法により調べたところ、BMPとNodalの発現も見られた(図1)。中胚葉系列細胞への分化においてBrachyuryとGoosecoidは重要な役割を果たすが、

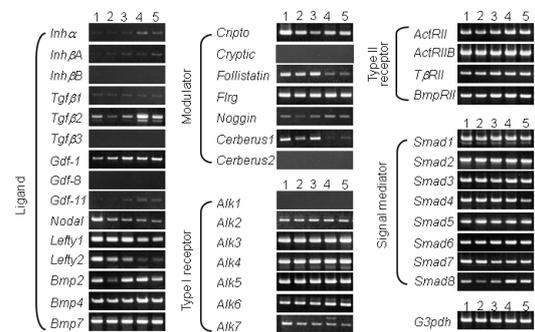


図1 P19細胞の分化に伴うTGF- $\beta$ ファミリー遺伝子の変化

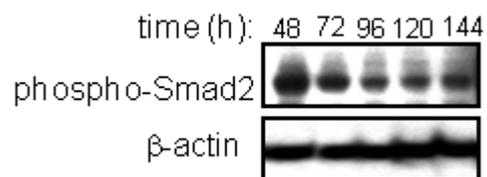


図2 P19細胞の分化に伴うSmad2リン酸化の変化

これらの遺伝子発現はNodal/Criptoによって制御されていることがsiRNA法(図3)および添加実験(図4)によって明らかになり、胚性多分化能細胞から中胚葉系列細胞への分化過程においてNodal/Cripto軸が中心的な役割を果たしていると考えられた。



図3 Nodal siRNAによるNodal (A)、Brachyury (B)およびGoosecoid (C)遺伝子発現変化

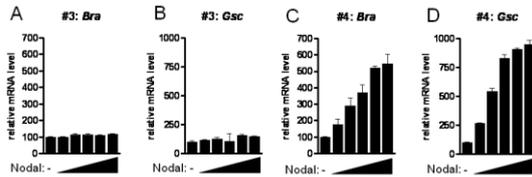


図4 P19細胞 clone #3 (A, B)ならびに clone #4 (C, D)においてNodal添加がBrachyury (A, C)およびGoosecoid (B, D)遺伝子発現に及ぼす影響

(2) Smad 活性化の鋭敏な検出を試みる過程において、リガンド刺激に対して、従来考えられていた Smad だけではなく、別の Smad もリン酸化活性化される細胞群が存在することを見出した (図5)。この新規の Smad リン酸化は *in vitro* キナーゼ

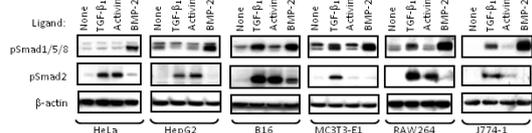


図5 様々な培養細胞における TGF-βファミリーに対する Smad リン酸化

法によっても確認された (図6)。例外的な Smad リン酸化を引き起こす細胞群の特徴として、受容体発現量が多いことが定量的 real-time RT-PCR 法によって明らかになり (図7)、受容体発現量による TGF-βファミリー情報伝達の調節機構が分かった。

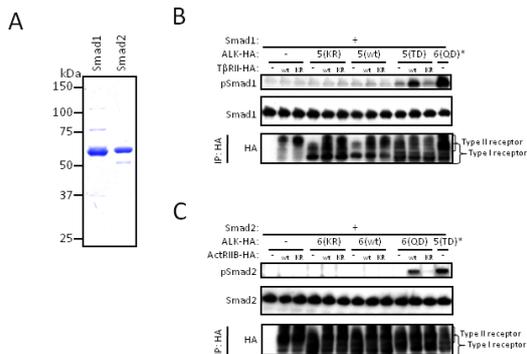


図6 基質 Smad タンパク質(A)と *in vitro* キナーゼによる Smad リン酸化 (B, C)

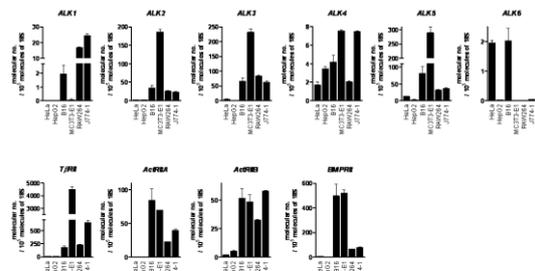


図7 様々な培養細胞における TGF-βファミリー受容体の遺伝子発現

・国内外における位置づけ

- (1) P19 細胞の中胚葉系列細胞への分化における TGF-βファミリーの役割に関して、包括的に調べた例はなく、意義がある。
- (2) 例外的な Smad リン酸化については、ほとんど報告例がなかった。最近、ほぼ同時期に例外的 Smad リン酸化に関する報告がなされた。本研究課題で得られた結果もその一つである。

・今後の展望

本研究を遂行する過程で、当初予想もしなかった結果—受容体発現量に依存した TGF-βファミリーの情報伝達の調節—が得られた。TGF-βファミリーは多様な生物活性を持つものに対して、現在提唱されている情報伝達モデルは比較的シンプルである。本研究で得られた結果は、TGF-βファミリーの多様な活性を一部分説明するものであり、今後、この点についてさらに詳細な解析を行う。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6件)

- ① Murakami, M., Kawachi, H., Ogawa, K., Nishino, Y. and Funaba, M. Receptor expression modulates the specificity of transforming growth factor-β signaling pathways. *Genes Cells*, in press. 査読有
- ② Murakami, M., Matsuzaki, F. and Funaba, M. Regulation of melanin synthesis by the TGF-β family in B16 melanoma cells. *Mol. Biol. Rep.*, in press. 査読有
- ③ Murakami, M., Suzuki, M., Nishino, Y. and Funaba, M. Regulatory expression of genes related to metastasis by TGF-β and activin A in B16 murine melanoma cells. *Mol. Biol. Rep.*, in press. 査読有
- ④ Nakaya, K., Murakami, M. and Funaba, M. Regulatory expression of Brachyury and Goosecoid in P19 embryonal carcinoma cells. *J. Cell. Biochem.*, 105: 801-813. 2008. 査読有

- ⑤ Funaba, M. and Murakami, M. A sensitive detection of phospho-Smad1/5/8 and Smad2 in Western blot analyses. J. Biochem. Biophys. Methods, 70: 816-819. 2008. 査読有
- ⑥ Murakami, M., Kondo, S. and Funaba, M. Expression and function of alternative splice variants of mouse TGF- $\beta$  type I receptor. Cell. Biol. Int., 32: 848-854. 2008. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① Murakami, M., Ogawa, K. and Funaba, M. Modulation of signal specificity of the TGF- $\beta$  family related to the receptor expression. 48<sup>th</sup> American Society for Cell Biology Annual Meeting. San Francisco. 2008 年 12 月 16 日
- ② 村上 賢、小川健司、舟場正幸. TGF- $\beta$ による BMP-regulated Smad のリン酸化と BMP による TGF- $\beta$ /activin-regulated Smad のリン酸化. 第 31 回日本分子生物学会大会. 神戸. 2008 年 12 月 12 日
- ③ 村上 賢、小川健司、舟場正幸. TGF- $\beta$ ファミリーの情報伝達: 受容体発現量と Smad リン酸化. 第 145 回日本獣医学会大会. 相模原. 2008 年 3 月 30 日
- ④ 中谷航平、村上 賢、舟場正幸. SP600125 によるマウス胚性腫瘍細胞 P19 の巨大化と核内倍加. 第 30 回日本分子生物学会大会. 横浜. 2007 年 12 月 12 日
- ⑤ 近藤祥子、村上 賢、舟場正幸. マウスにおける I 型 TGF- $\beta$  受容体 ALK5 のアイソフォーム発現と機能. 2006 年分子生物学フォーラム. 名古屋. 2006 年 12 月 7 日
- ⑥ 中谷航平、村上 賢、舟場正幸. マウス胚性腫瘍細胞 P19 のクローン株における分化マーカー遺伝子の発現. 2006 年分子生物学フォーラム. 名古屋. 2006 年 12 月 8 日
- ⑦ Funaba, M. and Murakami, M. Regulatory gene expression of *PAI-1* and *tyrosinase* by activin A and TGF- $\beta$  in B16 melanoma cells. 20<sup>th</sup> International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Kyoto. 2006 年 6 月 21 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

舟場 正幸 (FUNABA MASAYUKI)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号: 40238655

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

村上 賢 (MURAKAMI MASARU)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号: 80271360