

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：82612
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2013～2014
課題番号：25871177
研究課題名(和文) TGF クロストーク制御因子の探索と解析

研究課題名(英文) A screen for novel TGFb crosstalk modulator

研究代表者

乾 雅史 (Inui, Masafumi)

独立行政法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・室長

研究者番号：20643498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はTGFシグナルと細胞内外のシグナルのクロストークに焦点を当て、ハイスループット・スクリーニングとシグナル依存性の検証を組み合わせることで新規のクロストークTGFシグナル制御因子を探索した。HEK293T細胞およびTGFレポーターを用い約16000の遺伝子をスクリーンし、異なるシグナル依存性のTGFシグナル制御因子が複数同定された。これらの因子は全て新規のTGFシグナル制御因子であり、かつTGFシグナルと他のシグナル伝達系とのクロストークの焦点となるため、今後制御の分子メカニズムや個体レベルにおける役割を解析することで新たなシグナルクロストークの意義が明らかになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study I performed a functional screening for novel TGF signaling modulators of which the activity to regulate TGF signaling depends on the input of other signaling pathways such as Wnt, BMP and FGF/MAPK. Using high-throughput gene expression system, TGF responsive luciferase reporter and mammalian cell line, I have screened more than 16000 factors and identified several novel TGF signaling modulator candidates of which activities change (promoted or inhibited) upon other signaling stimuli. Those factors could be the foci of the crosstalk and further analysis will reveal novel interaction between TGF signaling and other signaling pathways

研究分野：細胞生物学

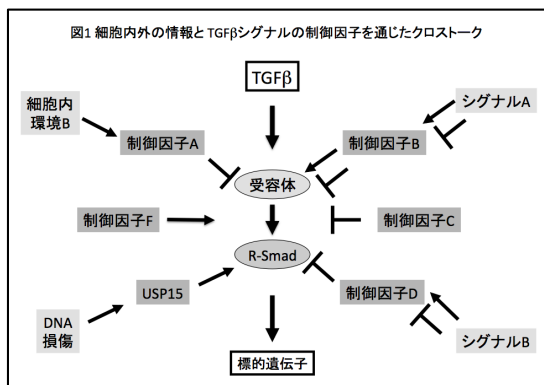
キーワード：TGF クロストーク

1. 研究開始当初の背景

TGFβシグナルは細胞の分化や増殖、胚発生、腫瘍形成など様々な生命現象に重要なシグナル伝達系である。一つのシグナル伝達系で多様な役割を果たすため定量的・定性的に多層的な制御機構が存在し、研究開始時までも数多くの TGFβ制御因子が同定されその分子メカニズムが研究されていた。研究代表者も TGFβシグナルの活性化に必須の制御因子として、細胞内メッセンジャーである R-Smad の脱ユビキチン化酵素 USP15 を近年同定し、R-Smad のモノユビキチン化によって TGFβシグナルが制御される機構を明らかにしていた。このような TGFβシグナル制御機構には細胞内外からの他のシグナル刺激に依存するものも知られており、BMP や Wnt と呼ぶシグナル伝達系や細胞の密度や形、細胞周期などの情報が TGFβシグナルの活性や標的因子の選択を調節していることが報告されているが、これら異なるシグナル間の相互作用(クロストーク)の分子の実体は十分に明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究では TGFβシグナルと細胞内外のシグナルのクロストークに焦点を当て、ハイスループット・スクリーニングとシグナル依存性の検証を組み合わせることで新規のクロストーク TGFβ制御因子を探索することを目的に研究を行った。他のシグナル依存的に TGFβシグナルの制御能を変化させる因子は細胞外からの TGFβシグナル刺激を細胞が自らの環境や文脈に沿って解釈するネットワークの焦点となると考えられる(図1)。また、細胞内からのシグナルに対する応答として DNA 損傷による USP15 のリン酸化および Smad2 のユビキチン化が TGFβシグナルに与える影響を検討する。



3. 研究の方法

(1) 本研究は哺乳類培養細胞の系を用い、約16000の発現ベクターライブラリを探索するハイスループットの一次スクリーニングとその結果得られた候補因子を異なるスケールおよび判定基準で検定する二次スクリーニング、さらにその陽性候補因子のシグナル依存性の検証からなる。一次スクリーニング

は pCAGA12 luciferase、293T 細胞、384 ウェルプレート、MGC clones および FLJ ライブラリの発現ベクター群を用い、過剰発現することで TGFβ1 リガンドによる pCAGA12 luciferase の活性化を促進する因子および抑制する因子の候補を探索した。

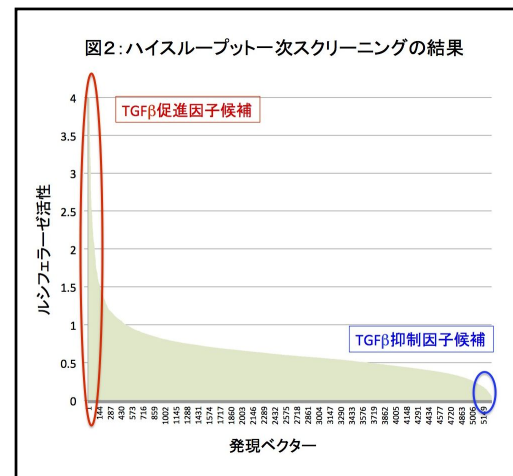
(2) その結果得られた候補因子について、二次スクリーニングとして 96 ウェルプレートにスケールアップして同様の活性を確認するとともに異なる TGFβ応答配列を持つレポーター ARE-luciferase に対する活性を観察し、複数のアッセイにおいて TGFβシグナルを制御する因子を絞り込んだ。

(3) これらのスクリーニングの結果、TGFβシグナルを促進する因子や抑制する因子を新規制御因子候補として同定し、これらの因子の TGFβシグナルへの制御能が BMP2、FGF2、Wnt3a、Dorsomorphin (BMPシグナル阻害剤)、PD98059 (FGFシグナル阻害剤)、XAV939 (Wntシグナル阻害剤)で処理することで変化するかどうかを検証した。

(4) USP15 のリン酸化と Smad2 のユビキチン化の制御について USP15 のリン酸化標的アミノ酸をアラニンに置換した Phospho-deficient 変異体およびグルタミン酸に置換した Phospho-mimic 変異体を作成し、Smad2 のユビキチン化に対する影響を検討した。また、Smad2 のユビキチン化の生体内での意義を検証するために Smad2 のユビキチン化に重要であることが知られている PY モチーフを欠損したマウスを作製することを目標にゲノム編集法を用いた点変異マウス作製法を確立し、これを用いて Smad2-deltaPY マウスを作製した。

4. 研究成果

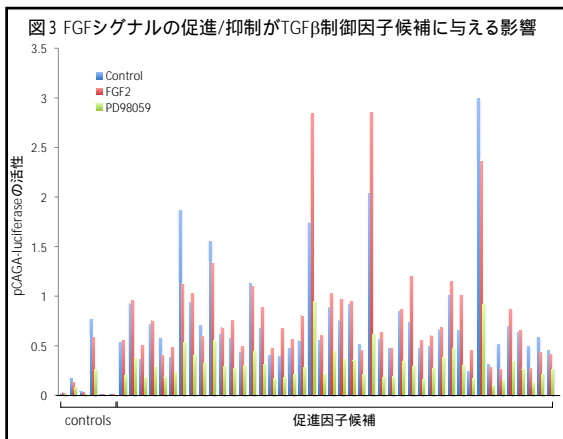
(1) 上記の通り、384 ウェルプレート、293T 細胞、pCAGA12 luciferase を用いた一次スクリーニングにより約 16000 の発現ベクターを探索し、TGFβ1 リガンド刺激によるレポーターの活性化を 3 倍以上促進するもの、あるいは 1/3 以下に抑制するものをそれぞれ



促進因子候補、抑制因子候補としてリスト化した(図2)。

(2) これら一次スクリーニング陽性因子について、96 ウェルプレート形式で2つのTGFβシグナルのレポーターである pCAGA12 luciferase および ARE-luciferase を用いてアッセイを行い、異なる実験スケールおよび異なるTGFβレポーターを用いて一次スクリーニングの結果を検証した。その結果、44の抑制因子候補および45の促進因子候補がコントロールに比べてTGFβシグナルを抑制および促進することが確かめられた。これらの因子のほとんどはTGFβシグナルとの関連について未報告であったが、その中にはTGFβシグナルの mediator である Smad3 や既知の抑制因子である TRAF2 が含まれていたことからスクリーニングの妥当性が示唆された。

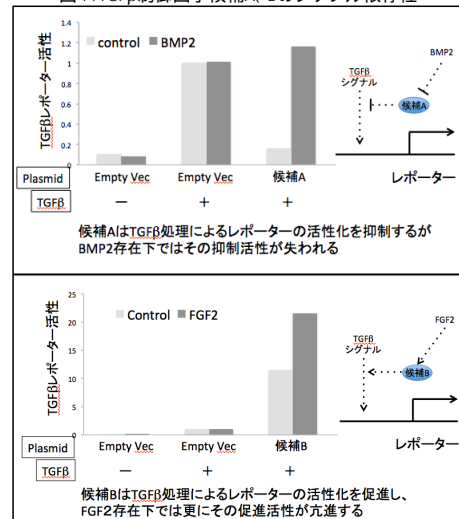
(3) 次にこれらの因子について、他のシグナル伝達、具体的には BMP、FGF、Wnt の各シグナル刺激の存在下でそのTGFβシグナル制御活性が変化するかを検討した。上記のようなシグナル刺激によりTGFβの制御活性が変化する因子は本研究の目的であるクロストーク制御因子であると期待される。二次スクリーニングと同様に96ウェルプレート、293T細胞およびpCAGA12 luciferaseを用い、上記の候補因子を過剰発現、TGFβ1リガンド刺激と同時にリコンビナントBMP2、FGF2、Wnt3a、Dorsomorphin (BMPシグナル阻害剤)、PD98059 (FGFシグナル阻害剤)、XAV939 (Wntシグナル阻害剤) で処理し、レポーター活性に与える影響を検討した(図3)。



その結果、無刺激状態ではTGFβシグナルの抑制活性を示すがBMP2リガンドの存在化ではTGFβシグナル抑制活性を示さない因子Aや、無刺激状態ではTGFβシグナルを促進し、FGF2リガンドの刺激があるとその活性がさらに高まる因子Bなど他のシグナル刺激依存的にTGFβシグナルへの制御活性を変化させる因子を複数同定することが出来た(図4)。因子Aは細胞膜に局在する膜タンパク質制御因子であり、レセプターレベルでのBMPシグナルとTGFβシグナルの相互作用

が示唆される。因子BはRNAのプロセシングに関わることが報告されているタンパク質であり、TGFβシグナルの構成因子の発現がRNAレベルでFGF-MAPKシグナルによって制御されている可能性を示唆している。TGFβシグナル制御におけるこれらの因子の役割や分子的な作用機序は全く未知であり、今後解析を続けることで全く新しいTGFβシグナル制御機構が明らかになることが期待される。また、これらの因子はTGFβシグナルと他のシグナル伝達系とのクロストークの焦点となるため、今後細胞レベルでの分子メカニズムを解明すること、個体レベルで発生や恒常性、あるいは発ガンなどの疾患の機序におけるこれらクロストークの役割や意義について明らかにすることでTGFβシグナルを軸として複数のシグナル伝達間が相互作用することが複雑な生命現象においてどのような役割を果たしているのかを明らかにすることが出来ると期待される。

図4: TGFβ制御因子候補A、Bのシグナル依存性



(4) USP15のPhospho-deficientおよびPhospho-mimic変異体は野生型と比較してSmad2に対する脱ユビキチン活性に大きな変化は見られなかった。このことからDNA損傷によるUSP15のリン酸化はTGFβシグナルの制御に直接的には関与していない可能性が示唆された。また、近年開発されたゲノム編集の手法を用い、マウスの受精卵にSmad2のリンカドメインを認識するsgRNAとhCas9のmRNAおよび鋳型となる一本鎖DNAをインジェクションすることでSmad2遺伝子のPYモチーフをコードする15塩基を欠損させた点変異マウスを作製した。ゲノム編集を用いた点変異の導入は短時間および低コストで個体のゲノムに変異を加えることが出来る点で画期的であり、このSmad2-deltaPYマウスの解析を進めることでこれまで困難であった個体レベルでのSmad2のユビキチン化の意義や、この制御が個体発生やホメオスタシスにおいてどの

ように他のシグナル刺激と相互作用するかが解明されることが期待される。

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 1件)

Inui M, Miyado M, Igarashi M, Tamano M, Kubo A, Yamashita S, Asahara H, Fukami M, Takada S. Rapid generation of mouse models with defined point mutations by the CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.* 2014; 4:5396. DOI: 10.1038/srep05396 査読有

〔学会発表〕(計 1件)

乾雅史、宮戸真美、五十嵐麻希、玉野萌恵、久保純、山下聡、浅原弘嗣、深見真紀、高田修治「CRISPR/Cas9 システムを用いた点変異マウスの作製と解析」第 37 回日本分子生物学会年会・2014 年 11 月 25 日・パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

乾 雅史 (INUI, Masafumi)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・研究所・システム発生・再生医学研究部・室長

研究者番号：20643498