

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32409

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893228

研究課題名(和文) 転写因子Smad8による新たなBMPシグナル制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of a novel regulation of BMP signaling by Smad8

研究代表者

塚本 翔 (TSUKAMOTO, SHO)

埼玉医科大学・医学部・助手

研究者番号：20707658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：Smadは、BMPによる骨形成に重要な転写因子である。Smad1、Smad5とSmad8(別名 Smad9)は、BMP受容体によるリン酸化を受けて活性化される。我々は、Smad1、Smad5とSmad8の構成的活性型変異体を樹立し、Smad8は活性が弱いことを見出した。Smad8 mRNAの発現は、BMP-4刺激で上昇した。Smad8 siRNAは、BMP-4が誘導するALP活性を促進した。Smad8はSmad1に結合し、その結合能はSmad1同士よりも高かった。転写活性の低いSmad8は、Smad1と複合体を形成しドミナント・ネガティブにBMPシグナルを抑制すると予想された。

研究成果の概要(英文)：Smad proteins are transcription factors important for bone formation regulated by BMPs. Smad1, Smad5 and Smad8 (also known as Smad9) are induced phosphorylation by BMP receptors. We have established constitutively active forms of Smad1, Smad5 and Smad8 and found that Smad8 is less active than other Smads. The mRNA levels of Smad8 mRNA were increased by BMP-4 stimulation. RNAi knockdown of Smad8 increased the BMP-induced ALP activity in C2C12 cells. Therefore, Smad8 suppressed BMP activity via a novel molecular mechanism. Smad8 bound to Smad1 with a higher affinity than that of Smad1 homodimer. Taken together, our findings suggest that Smad8 represses intracellular BMP signaling as a dominant negative Smad.

研究分野：病態生理学

キーワード：骨・軟骨代謝学 シグナル伝達 骨系統疾患

1. 研究開始当初の背景

Bone Morphogenetic Protein (BMP) は、異所性骨化や生理的な骨形成を促す重要なサイトカインで、膜貫通型セリン・スレオニンキナーゼ受容体に結合して細胞内情報伝達系を活性化する。BMP 受容体は、相同性の高い3種類の転写調節因子 Smad1、Smad5、および Smad8(別名: Smad9)を基質としてリン酸化する。以前、我々は、Smad1 の構成的活性型変異体だけを過剰発現させると、BMP 刺激と同様に筋芽細胞から骨芽細胞への分化を誘導できることを報告した。さらに我々は、Smad5 と Smad8 に Smad1 と同様の構成的活性型変異を導入し、各 Smad 特異的な活性を検討した。すると、Smad5 は、Smad1 と同様に筋芽細胞から骨芽細胞への分化誘導活性を示したのに対し、Smad8 は Smad1 や Smad5 に比べて骨芽細胞分化誘導活性が著しく低いことが判明した。そこで、Smad8 による BMP シグナル制御機構を解析した結果、Smad8 は従来の報告とは異なる BMP シグナルを抑制する活性があることを見出した。

2. 研究の目的

Smad8 による新たな BMP シグナル制御機構を解明するために、以下の課題に取り組んだ。

- (1) Smad8 の活性評価、活性制御領域の同定
- (2) Smad8 の発現制御解析
- (3) Smad8 の複合体形成能、DNA 結合能の評価
- (4) Smad8 の in vivo での発現について

3. 研究の方法

(1) 構成的活性型 Smad8 を過剰発現及び、Smad8 の siRNA によるノックダウンを行い、BMP シグナルへの影響を定量的リアルタイム PCR 法とルシフェラーゼアッセイで解析した。さらに、Smad8 の活性に重要な制御領域を明らかにするため、Smad1 や Smad5 の各ドメインを Smad8 に置換した変異体を構築し活性を検討した。

(2) 株化細胞および初代培養細胞を BMP や TGF- β 1 で刺激し各 Smad の mRNA 発現パターンを定量的リアルタイム PCR 法で解析した。

(3) 免疫沈降-ウエスタンブロット法によって、Smad 同士や Smad 抑制因子との複合体形成能を検討した。さらに、Smad8 の DNA 結合を検討するため、BMP の応答配列を含む DNA プロブで DNA-タンパク質複合体を沈降し、得られた複合体をウエスタンブロット法で解析した。

(4) in vivo での Smad8 の生物活性を検討するため、マウス胎児での Smad8 mRNA の発現を定量的リアルタイム PCR 法で継時的に観察

した。

4. 研究成果

(1) Smad1、Smad5、Smad8 に構成的活性型変異を導入し、活性を比較検討した。BMP 特異的ルシフェラーゼ・レポーターの活性は、Smad1 と Smad5 の構成的活性型変異体によって誘導された。一方、Smad8 の活性は Smad1 や Smad5 よりも弱かった。さらに、内在性 Smad8 のノックダウン実験を行うと BMP-4 刺激で誘導される C2C12 細胞の BMP 特異的ルシフェラーゼ・レポーター活性及び ALP 活性を促進することが判明した。また、Smad8 の BMP シグナルを抑制する活性の原因となるドメインを明らかにするために、Smad1 の MH1、リンカー、MH2 ドメインを、それぞれ Smad8 の各ドメインと置換したキメラ Smad を構築した。Smad1 の MH1 および MH2 領域を Smad8 に置換した変異体は、Smad1 と同等の活性を示した。しかし、Smad8 のリンカー領域を Smad1 と置換した変異体は、Smad8 と同程度に活性が低下することが判明した。この結果から、Smad8 のリンカー領域が活性を制御することが示された。

(2) BMP-4 及び TGF- β 1 刺激後の C2C12 細胞の Smad mRNA の経時変化を定量的 PCR 法で解析した。従来から報告されているように、Smad1、Smad5、および Smad4 mRNA の発現量は、変化せず、抑制型 Smad である Smad6 と Smad7 の mRNA 量は BMP-4 処理後 24 時間目まで増加し続けた。さらに、Smad8 mRNA を検討すると、抑制型 Smad と同様に Smad8 mRNA は、増加し続けた (図 1)。また、マウス頭蓋骨由来初代骨芽細胞をはじめとした他の複数の細胞でも BMP-4 で刺激すると、Smad8 の発現増加が認められた。一方、TGF- β 1 で刺激すると、抑制型 Smad7 は増加したが、Smad8 の発現量は変化しなかった。この結果は、Smad8 mRNA の発現が、BMP-Smad シグナル系によって増加し、細胞内でネガティブ・フィードバック・ループを形成することが示唆される。

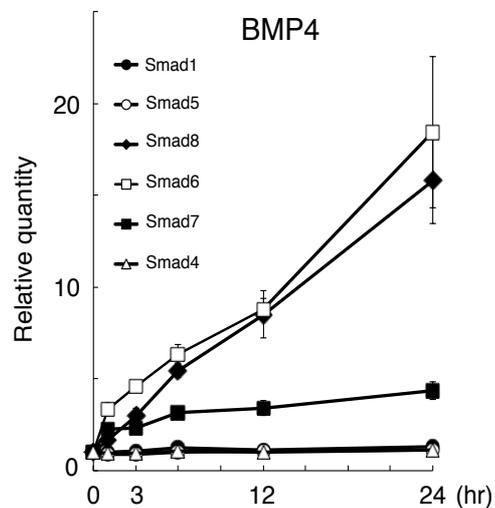


図 1. BMP による Smad8 の誘導

(3) C2C12 細胞に Smad1 と Smad8 を過剰発現させ DNA 結合能を検討すると Smad8 の方が DNA 結合能が高かった。しかし、Smad1 と Smad8 の両者を共発現させても、Smad1 の結合量に変化は認められなかった。そこで、Myc タグを付加した Smad1 と、FLAG タグを付加した Smad1 および Smad8 との複合体形成能を検討した。すると、Smad1 同士よりも Smad1 と Smad8 の親和性の方が高いことが判明した(図 2)。さらに、この現象は、BMP-Smad シグナル系の転写共役因子である Smad4 をノックダウンしても変化がなかった。この結果から、Smad8 による BMP シグナルの抑制機序は、Smad8 が Smad1 や Smad5 と転写活性の低い複合体を形成することで標的遺伝子の発現量を低下させる、ドミナント・ネガティブ効果によると考えられた。

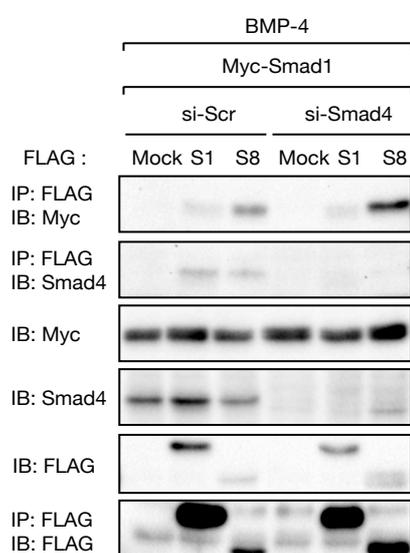


図 2. Smad1 と Smad8 の結合能

(4) Smad8 mRNA の発現変化を E7, E11, E15, E17 のマウス胎児で継時的に観察した。その結果、Smad8 mRNA の発現パターンは、Smad1 や Smad5 とは異なり、抑制型 Smad の Smad6 や Smad7 と高い相関が認められた。この結果は、in vivo においても Smad8 は、従来とは異なる BMP シグナルを抑制するという新たな制御機構が存在することを示唆する。

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 5 件)

- ① Tsukamoto S, Mizuta T, Fujimoto M, Ohte S, Osawa K, Miyamoto A, Yoneyama K, Murata E, Machiya A, Jimi E, Kokabu S, Katagiri T. Smad9 is a new type of transcriptional regulator in bone morphogenetic protein signaling. *Sci Rep.* 2014 Dec 23;4:7596. doi: 10.1038/srep07596. 査読あり

- ② Fujimoto M, Ohte S, Shin M, Yoneyama K, Osawa K, Miyamoto A, Tsukamoto S, Mizuta T, Kokabu S, Machiya A, Okuda A, Suda N, Katagiri T. Establishment of a novel model of chondrogenesis using murine embryonic stem cells carrying fibrodysplasia ossificans progressiva-associated mutant ALK2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Dec 12;455(3-4):347-52. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.012. 査読あり
- ③ Fujimoto M, Ohte S, Osawa K, Miyamoto A, Tsukamoto S, Mizuta T, Kokabu S, Suda N, Katagiri T. Mutant activin-like kinase 2 in fibrodysplasia ossificans progressiva are activated via T203 by BMP type II receptors. *Mol Endocrinol.* 2015 Jan;29(1):140-52. doi: 10.1210/me.2014-1301. 査読あり
- ④ Katagiri T, Osawa K, Tsukamoto S, Fujimoto M, Miyamoto A and Mizuta T: Bone morphogenetic protein-induced heterotopic bone formation: What have we learned from the history of a half century? *J Dent Sci Rev.* 2015 May; 51(2):41-58. doi:10.1016/j.jdsr.2014.09.004. 査読あり
- ⑤ Kokabu S, Sato T, Ohte S, Enoki Y, Okubo M, Hayashi N, Nojima J, Tsukamoto S, Fukushima Y, Sakata Y, Katagiri T, Rosen V, Yoda T. Expression of TLE3 by bone marrow stromal cells is regulated by canonical Wnt signaling. *FEBS Lett.* 2013 Dec; 588(4):614-9, (2014). doi: 10.1016/j.febslet.2013.12.031. 査読あり

[学会発表] (計 18 件)

- ① Tsukamoto S, Mizuta T, Fujimoto M, Ohte S, Osawa K, Miyamoto A, Yoneyama K, Murata E, Jimi E, Kokabu S, Katagiri T: Smad9 is a new type of transcriptional repressor in BMP signaling. The 12th RCGM International Symposium of Academic Frontier (2014 年 10 月 31 日 ~11 月 1 日、埼玉県 日高市)
- ② Tsukamoto S, Mizuta T, Fujimoto M, Ohte S, Osawa K, Miyamoto A, Yoneyama K, Murata E, Jimi E, Kokabu S, Katagiri T: Smad8 is a novel regulator of BMP signaling. 10th International BMP Conference (2014 年 9 月 16 日 ~20 日、ドイツ ベルリン)
- ③ Tsukamoto S, Mizuta T, Fujimoto M, Ohte

- S, Osawa K, Miyamoto A, Yoneyama K, Murata E, Jimi E, Kokabu S, Katagiri T: Smad8 negatively regulates BMP signaling in a dominant negative fashion. 2014 ASBMR Annual Meeting (2014年9月12日~15日、アメリカ ヒューストン)
- ④ 塚本翔、水田誉人、藤本舞、大手聡、大澤賢次、宮本阿礼、米山克美、村田栄子、自見英治郎、古株彰一郎、片桐岳信: Smad8による新たなBMPシグナルの制御機構。第21回BMP研究会(2014年7月27日、大阪府 大阪市)
- ⑤ Tsukamoto S, Mizuta T, Fujimoto M, Ohte S, Osawa K, Miyamoto A, Yoneyama K, Murata E, Jimi E, Kokabu S, Katagiri T: A novel regulation of BMP signaling by Smad8. FASEB Science Research Conferences Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells (2014年7月20日~25日、アメリカ スティームボート・スプリングズ)
- ⑥ 塚本翔、水田誉人、大澤賢次、藤本舞、宮本阿礼、片桐岳信: 転写因子Smad8によるBMPシグナル調節機構の解明。第11回RCGMフロンティアシンポジウム(2013年11月22日~23日、埼玉県 日高市)
- ⑦ Tsukamoto S, Ohte S, Fujimoto M, Mizuta T, Miyamoto A, Osawa K, Kokabu S, Murata E, Jimi E, Katagiri T: Smad8 is a Novel Type Regulator of BMP Signaling. 2013 ASBMR Annual Meeting (2013年10月3日、アメリカ ボルチモア)
- ⑧ Tsukamoto S, Ohte S, Fujimoto M, Mizuta T, Miyamoto A, Osawa K, Kokabu S, Murata E, Jimi E, Katagiri T: Smad8 is a Novel Type Regulator of BMP Signaling. 2013 ASBMR Symposium Cutting Edge Discoveries in Muscle Biology, Disease and Therapeutics (2013年10月4日~7日、アメリカ ボルチモア)
- ⑨ Osawa K, Tsukamoto S, Fujimoto M, Miyamoto A, Mizuta T, Katagiri T: Establishment of a new in vivo experimental model for heterotopic bone formation in skeletal muscle. The 12th RCGM International Symposium of Academic Frontier (2014年10月31日~11月1日、埼玉県 日高市)
- ⑩ Mizuta T, Tsukamoto S, Fujimoto M, Miyamoto A, Osawa K, Katagiri T: Establish of a new Luciferase reporter plasmid for monitoring intracellular signaling of non-osteogenic members of the TGF- β family. The 12th RCGM International Symposium of Academic Frontier (2014年10月31日~11月1日、埼玉県 日高市)
- ⑪ Miyamoto A, Osawa K, Tsukamoto S, Fujimoto M, Mizuta T, Ohte S, Katagiri T: Establishment of a new model of chondrogenesis using skeletal muscle cells. The 12th RCGM International Symposium of Academic Frontier (2014年10月31日~11月1日、埼玉県 日高市)
- ⑫ Fujimoto M, Ohte S, Shin M, Yoneyama K, Mizuta T, Osawa K, Tsukamoto S, Miyamoto A, Okuda A, Suda N, Katagiri T: Chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells carrying an active form of ALK2. The 12th RCGM International Symposium of Academic Frontier (2014年10月31日~11月1日、埼玉県 日高市)
- ⑬ Fujimoto M, Ohte S, Shin M, Yoneyama K, Osawa K, Tsukamoto S, Miyamoto A, Mizuta T, Kokabu S, Okuda A, Suda N, Katagiri T: Establishment and characterization of a novel Tet-Off embryonic stem cell lines carrying ALK2. 2014 ASBMR Annual Meeting (2014年9月12日~15日、アメリカ ヒューストン)
- ⑭ Fujimoto M, Ohte S, Shin M, Yoneyama K, Osawa K, Tsukamoto S, Miyamoto A, Mizuta T, Kokabu S, Okuda A, Suda N, Katagiri T: Establishment of a novel model for chondrogenic differentiation using murine embryonic stem cells carrying mutant ALK2. FASEB Science Research Conferences Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells (2014年7月20日~25日、アメリカ スティームボート・スプリングズ)
- ⑮ 水田誉人、塚本翔、藤本舞、宮本阿礼、大澤賢次、片桐岳信: TGF- β のI型受容体における活性化機序の解析。第11回RCGMフロンティアシンポジウム(2013年11月22日~23日、埼玉県 日高市)
- ⑯ 藤本舞、塚本翔、大澤賢次、宮本阿礼、水田誉人、須田直人、片桐岳信: 進行性骨化性線維異形成症(FOP)におけるALK2変異体の活性化メカニズムの解析。第11回RCGMフロンティアシンポジウム

(2013年11月22日～23日、埼玉県 日高市)

⑰ 大澤賢次、宮本阿礼、塚本翔、藤本舞、水田誉人、片桐岳信：FOPの変異ALK2は異所性骨化を誘導する。第11回RCGMフロンティアシンポジウム(2013年11月22日～23日、埼玉県 日高市)

⑱ 宮本阿礼、大澤賢次、塚本翔、藤本舞、水田誉人、片桐岳信：マウス骨格筋由来細胞によるALK2(R206H)の新しい解析法の樹立。第11回RCGMフロンティアシンポジウム(2013年11月22日～23日、埼玉県 日高市)

[図書](計1件)

① 片桐岳信、塚本翔、大澤賢次：TGF- β ファミリーからみえる骨と筋の新しい接点。実験医学増刊 2014年 Vol.32 No.7 1010-1016. 査読なし

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

http://www.saitama-med.ac.jp/genome/Div04_PPhysiol/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 翔 (TSUKAMOTO SHO)
埼玉医科大学・医学部・助手
研究者番号：20707658

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：