

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06626

研究課題名(和文) Smad複合体による転写活性化機構の解析

研究課題名(英文) Molecular mechanism for transcriptional activation by the Smad complex

研究代表者

伊藤 友香 (ITO, Yuka)

山梨大学・大学院総合研究部・特任助教

研究者番号：40454326

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)：TGF- β (transforming growth factor- β) は多様な細胞応答を調節するサイトカインである。TGF- β は転写因子であるSmad2あるいはSmad3 (Smad2/3) を活性化し、活性化したSmad2/3がSmad4を含むSmad複合体を形成し標的遺伝子のプロモーター領域に結合し、遺伝子発現を制御する。本研究ではSmad複合体との親和性は同程度であるがプロモーター活性化能が異なる2種類のDNA配列(SBEおよびCAGA)を用いて、Smad複合体による転写活性化の必要条件を明らかにした。また、TGF- β 標的遺伝子発現誘導とSBE、CAGAの関連について解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多機能性サイトカインであるTGF- β の作用は転写因子Smadを介した標的遺伝子発現制御によって主に調節されていると考えられている。近年、ChIP-seq解析からゲノム上にリクルートされたSmad複合体の中には転写活性化に関与していないものも存在することが明らかになってきた。本研究では、TGF- β による細胞応答機構の詳細を明らかにするため、DNAに結合したSmadが転写活性化能を持つための必要条件について検討した。本研究成果は、組織や細胞において異なる遺伝子発現調節を行うことが知られているTGF- β の作用の多様性の理解につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：TGF- β is a cytokine that regulates a wide variety of cellular responses. Smad2 and Smad3 (Smad2/3) are transcriptional regulators activated by TGF- β . Activated Smad2/3 forms a Smad complex with Smad4 and regulates expression of target genes in the nucleus. The Smad complex is known to bind to two distinct Smad-responsive motifs, the Smad-binding element (SBE) (5'-GTCTAGAC-3') and CAGA motifs (5'-AGCCAGACA-3' or 5'-TGTCTGGCT-3'). In this study, we dissected the details of Smad binding and function of the SBE and CAGA motifs. We found that either one SBE or a triple-CAGA motif forms a cis-acting functional half-unit for Smad-dependent transcription activation; combining two half-units allows efficient activation. We also found that CAGA-like motifs with a single base-pair mutation are partially active and the number of CAGA and CAGA-like motifs is correlated with fold induction of target gene expression by TGF- β in normal murine mammary gland (NMuMG) cells.

研究分野：細胞生物学、生化学

キーワード：TGF- β 転写活性化 Smad

1. 研究開始当初の背景

TGF- β (transforming growth factor- β) は多様な細胞応答を調節するサイトカインであり、細胞分化や細胞増殖、免疫応答、組織修復などに関与する。TGF- β が細胞表面の受容体に結合すると転写因子である Smad2 あるいは Smad3 (Smad2/3) が活性化し、活性化した Smad2/3 が Smad4 を含む Smad 複合体を形成し標的遺伝子のプロモーター領域に結合することで遺伝子発現を制御する。しかし、研究代表者は予備的な検討から Smad 複合体が結合するにもかかわらず、転写活性化能をもたない DNA 配列が存在するのを見だし、Smad 複合体による標的遺伝子の発現誘導には、DNA に結合した Smad 複合体の転写活性化を誘導するための条件が存在する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究は Smad 複合体との親和性は同程度であり、Smad 複合体による転写活性化を誘導するレポーターと誘導しないレポーターを比較解析することで、Smad 複合体による転写活性化の必要条件を明らかにする。そして、TGF- β シグナルによる遺伝子発現制御の理解につながる分子基盤を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) レポーターアッセイにより、Smad 複合体の活性化に必要な DNA 配列の条件について検討した。

(2) 転写活性化能を持つ Smad-DNA 複合体と転写活性化能を持たない Smad-DNA 複合体を構成する Smad の違いについて、DNA-affinity precipitation assay (DNAP) およびゲルシフトアッセイにより検討した。

(3) DNA 配列と TGF- β 標的遺伝子発現誘導の関連について TGF- β 標的遺伝子近傍の ChIP-seq データを用いて解析した。

4. 研究成果

(1) Smad 複合体の転写活性化を誘導する DNA 配列の必要条件

Smad 複合体が結合する代表的な DNA 配列として、Smad 結合に必要なコア配列 (GTCT あるいは AGAC) が 2 個連続してつながった回文配列である SBE 配列 (5'-GTCTAGAC-3') と、コア配列を 1 つ含む CAGA 配列 (5'-AGCCAGACA-3'/5'-TGTCTGGCT-3') が知られている。

SBE を 3 個タンデムにつなげた配列 (3xSBE) は TGF- β 応答性を示したが、CAGA を 3 個タンデムにつなげた配列 (3xCAGA) では TGF- β 応答性を示さなかった。CAGA の個数と転写活性化の関連を検討したところ、3xCAGA では転写活性化がみられなかったが、4 個以上に増やすと CAGA の個数依存的な転写活性化の上昇が認められた。一方、SBE の場合、1 個では転写活性はなく、2 個から活性がみられ、3 個で最大の活性を示した。転写活性化の程度を比較すると、SBE を 2 個つなげたレポーターと CAGA を 6 個つなげたレポーターが同程度の活性を示した。

次に、SBE1 個と CAGA1 個から 3 個からなるキメラレポーターを作製し、SBE2 個からなるレポーターと転写活性化能を比較した。すると、CAGA の個数に対応して転写活性が上昇し、SBE1 個と CAGA3 個からなる配列を用いた場合、SBE2 個と同程度の転写活性を示した。

以上の結果から SBE1 個あるいは CAGA3 個は不活性型ハーフユニットであり、これらが 2 個つながることで活性型配列になることが示唆された。

(2) 転写活性化能を持つ Smad 複合体の必要条件

3xSBE と 3xCAGA に結合する Smad を DNAP により検討したところ、どちらの配列も TGF- β 刺激 1 時間でリン酸化 Smad3、Smad2 と Smad4 の結合がみられた。また、ビオチンラベルしていない competitor を共存させた場合、DNA-Smad 複合体の結合は 3xSBE、3xCAGA 共に互いに排他的であった。

結合する Smad 複合体の集団に違いがあるのか検討するため、3xSBE あるいは 3xCAGA と結合しなかった Smad 複合体が異なる DNA 配列と結合できるかどうか、プローブを変えながら 2 回連続して DNAP を行うことで検討した。DNAP を 2 回連続して行った場合、DNA 配列に結合する Smad 複合体がなかったことから、3xSBE と 3xCAGA に結合する Smad 複合体の集団には違いがないと考えられた。

次に、3xSBE あるいは 3xCAGA 結合している Smad 複合体の違いについて、ゲルシフトアッセイにより検討した。転写活性化能のない 3xCAGA と結合したタンパク質複合体と比較して、転写活性のある 3xSBE と結合したタンパク質複合体は移動度が小さくなった。このタンパク質複合体には Smad3 と Smad4 が含まれていることを、抗体を用いたスーパーシフ

トアッセイにより明らかにした。また、DNAP の結果と同様に、3xCAGA-タンパク質複合体、3xSBE-タンパク質複合体の形成はラベルしていない 3xSBE あるいは 3xCAGA を加えることで阻害された。

以上の結果より、転写活性化能を持つ DNA-タンパク質複合体は、転写活性化能を持たない DNA-タンパク質複合体と比較して DNA 上でより大きな DNA-タンパク質複合体を形成すると考えられた。この大きな複合体を構成するタンパク質の同定にはさらなる検討が必要である。レポーターアッセイの結果より SBE1 個と 3xCAGA はそれぞれ不活性型ハーフユニットでありこれらの配列を 2 個つなげた場合には転写活性がみられること、転写活性化能をもつ DNA と Smad 複合体はより大きな DNA-タンパク質複合体を形成することから、Smad 複合体が 2 ユニットで転写活性化能を持つようになると推察された。

(3) Smad 複合体の転写活性化を誘導する DNA 配列と遺伝子発現誘導の関連

SBE と CAGA がどのように内在性の TGF- β 標的遺伝子発現制御に関与しているのか、DNA マイクロアレイより得られた TGF- β 刺激依存的に発現が誘導された遺伝子発現のデータと、ChIP-seq より得られた TGF- β 刺激 1.5 時間後の TGF- β 標的遺伝子近傍 50Kb に存在する Smad2/3 結合部位のデータより解析した。

TGF- β 標的遺伝子近傍の Smad2/3 結合部位 1000bp における SBE、CAGA の個数と遺伝子発現誘導の関連について検討した。この際、転写活性化にほとんど影響しなかった CAGA (5'-AGCCAGACA-3') の上流 2 塩基を対象から除いた 7 塩基 (5'-CCAGACA-3') を CAGA 配列として計測した。また、これまでに報告されている CAGA 一塩基置換体 (5'-ACAGACA-3') (引用文献 1) と、今回新たに見いだされた転写活性化能をもつ一塩基置換体 (5'-CTCAGACA-3'、5'-CCAGTCA-3、5'-CCAGACG-3') の 4 種類の配列を CAGA-like motif として遺伝子発現誘導との相関を検討した。

TGF- β 標的遺伝子近傍には SBE はあまり含まれておらず、CAGA と CAGA-like motif (5'-ACAGACA-3') が多く存在していた。TGF- β 刺激 3 時間、8 時間で誘導される遺伝子発現誘導と CAGA および CAGA-like motif の総数において、CAGA 単独の場合を比較して強い正の相関が見られることが明らかになった。

CAGA を介した転写活性化は Smad 複合体の DNA 結合だけでは誘導されず、転写活性化能を持つためにはさらに制御機構が存在すること、CAGA は個数あるいは配列に依存して転写活性化能を柔軟に制御できることから、生体内での遺伝子発現制御では SBE と比較して CAGA がよく利用されている可能性が示唆された。

<引用文献>

1 Dennler S., Itoh S., Vivien D., ten Dijke P., Huet S., and Gauthier J. M. (1998) Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF β -inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. EMBO J. 17, 3091–3100 10.1093

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tsuzuki K, Itoh Y, Inoue Y, Hayashi H.	4. 巻 593
2. 論文標題 TRB1 negatively regulates gluconeogenesis by suppressing the transcriptional activity of FOXO1.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Lett.	6. 最初と最後の頁 369-380
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.13314	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nishikawa S, Itoh Y, Tokugawa M, Inoue Y, Nakashima KI, Hori Y, Miyajima C, Yoshida K, Morishita D, Ohoka N, Inoue M, Mizukami H, Makino T, Hayashi H.	4. 巻 24
2. 論文標題 Kurarinone from Sophora Flavescens Roots Triggers ATF4 Activation and Cytostatic Effects Through PERK Phosphorylation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules.	6. 最初と最後の頁 E3110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules24173110	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Itoh Y, Koinuma D, Omata C, Ogami T, Motizuki M, Yaguchi SI, Itoh T, Miyake K, Tsutsumi S, Aburatani H, Saitoh M, Miyazono K, Miyazawa K.	4. 巻 294
2. 論文標題 A comparative analysis of Smad-responsive motifs identifies multiple regulatory inputs for TGF-transcriptional activation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 15466-15479
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.009877.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Murayama K, Kato-Murayama M, Itoh Y, Miyazono K, Miyazawa K, Shirouzu M.	4. 巻 212
2. 論文標題 Structural basis for inhibitory effects of Smad7 on TGF- family signaling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Struct Biol.	6. 最初と最後の頁 107661
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jsb.2020.107661	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Otake S, Itoh Y, Omata C, Saitoh M, Miyazawa K.	4. 巻 112
2. 論文標題 ZEB1 and oncogenic Ras constitute a regulatory switch for stimulus dependent E cadherin downregulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 205-216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14701	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Motizuki M, Koinuma D, Yokoyama T, Itoh Y, Omata C, Miyazono K, Saitoh M, Miyazawa K.	4. 巻 16
2. 論文標題 TGF- β -induced cell motility requires down-regulation of ARHGAPs to sustain Rac1 activity.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 100545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100545	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 伊藤友香、宮澤恵二
2. 発表標題 TGF- β による転写制御とSmad結合配列の多様性
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuka Itoh, Kunio Miyake, Masao Saitoh, Keiji Miyazawa
2. 発表標題 Analysis of DNA binding properties of Smad proteins by cyclic amplification of selective target method
3. 学会等名 12th International BMP Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuka Itoh, Daizo Koinuma, Masao Saitoh, Keiji Miyazawa
2. 発表標題 Transcription activation by TGF- through the Smad-binding element and CAGA motifs
3. 学会等名 The TGF- Superfamily Conference: Signaling in Development and Disease (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤友香、小俣千帆、三宅邦夫、齋藤正夫、宮澤恵二
2. 発表標題 TGF- シグナル伝達分子SmadとETSファミリー転写因子による協調的な転写制御
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山梨大学医学部生化学講座第2教室ホームページ https://www.med.yamanashi.ac.jp/basic/bioche02/bioch2.html

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------