



Title	骨形成因子BMPによる骨形成促進におけるSmad8の役割の研究
Author(s)	河合, 伸治
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/2369
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

学位論文

**骨形成因子 BMP による骨形成促進における
Smad8 の役割の研究**

河合伸治

要旨

[緒言] 骨格を構成する骨は常に吸収と形成を繰り返しながらその体積、強度を維持している。骨吸収は破骨細胞、そして骨形成は骨芽細胞によって行なわれるが、近年の骨粗鬆症患者の急増に伴い、骨量回復に直結する骨形成に対する関心がより高まっている。骨形成において中心的役割を演じる骨芽細胞は骨髄に存在する未分化間葉系細胞が様々なサイトカインの影響を受けながら分化することによって形成される。これらのサイトカインの中でも、骨形成因子 Bone Morphogenetic Protein (BMP) は、*in vivo*、*in vitro* を問わず未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化を誘導することにより強力に骨形成を促進することが知られている。しかしながら、その作用メカニズムに関しては未だ不明な点が多く残されている。本研究においては BMP による骨形成促進作用の分子メカニズムを解明する目的で、BMP の細胞内シグナルに関する分子の同定を行ない、その分子の生化学的機能および BMP の生物学的作用発現における役割について検討した。

[方法] 細胞内シグナル分子をコードする遺伝子は、PCR を用いたスクリーニング法により、マウス胎仔胚 cDNA ライブラリーからクローニングした。BMP 刺激によるシグナル伝達は、免疫沈降、抗リン酸化セリン抗体などを用いたウエスタンプロットティングにより検討した。細胞核への移行は免疫蛍光染色法により観察した。転写因子活性の検討には、個体発生における背腹の中胚葉形成に関与しているホメオボックス遺伝子 Xvent2 のプロモーター領域をルシフェラーゼレポーターに連結したベクターを使用した。また、BMP-2 により誘導される遺伝子群の解析には GeneChip を用いた。未分化間葉系細胞の骨

芽細胞への分化はアルカリホスファターゼ(ALP)、オステオカルシン、骨芽細胞特異的転写因子Cbfa1などを指標として検討した。

[結果] マウス胎仔胚cDNAライブラリーを用いてスクリーニングを行なった結果、BMPによって活性化されるシグナル分子Smad1およびSmad5と高い構造類似性を有するSmad8をクローニングできた。Smad8は種々の組織に広汎に発現されていたが、前立腺で特に高く、一方、骨格筋での発現は弱かった。恒常的活性型BMPレセプターALK2、ALK3およびALK6は、Smad8のセリン残基をリン酸化し、リン酸化されたSmad8は共有型SmadであるSmad4と物理的に結合した。さらに、リン酸化によりSmad8は細胞質から核に移行することも示された。また、Smad8の過剰発現はBMPにより誘導されるXvent2遺伝子プロモーターの転写を活性化し、このSmad8の効果はSmad4の存在により相加的に増強された。GeneChipを用いて、BMP-2によって誘導されるいくつかの遺伝子を同定し、これらの遺伝子の発現に対するSmad8の効果を調べたところ、Smad8はSmad4存在下でBMP-2と同様に、これらの遺伝子の発現を誘導した。Smad8はBMPの標的細胞である骨芽細胞系の細胞に発現されており、特にBMPによって骨芽細胞への分化が誘導される線維芽細胞C3H10T1/2あるいは初代培養骨芽細胞において高い発現が認められた。また骨芽細胞系細胞の特性を秘めているC2C12細胞にSmad8を高発現させるとALPおよびCbfa1の発現が高まり、骨芽細胞への分化が誘導された。これに対してSmad8変異体はBMP2によって誘導されるC2C12細胞の骨芽細胞への分化を抑制した。

[考察] マウスSmad8は恒常的活性型BMPレセプターによりリン酸化され、共有型Smad4と結合した後、核へ移行することから、BMPシグナル伝達分子であることが明らかとなった。レポーターアッセイの結果からSmad8は転写因子としての機能を有し、BMPシグ

ナルの下流に存在する遺伝子の転写活性調節にも関与することが示された。さらに、Smad8 は骨芽細胞で高レベルに発現され、ALP や Cbfa1 などの骨芽細胞分化マーカーの発現を誘導し、一方、Smad8 変異体は骨芽細胞の分化を阻害することから、骨形成に深く関与することが判明した。以上の結果より、BMP による骨形成促進過程において、Smad8 は BMP の作用発現に重要な役割を果たすシグナル伝達分子であることが示唆された。本研究の結果は複雑かつ多様な骨形成促進作用の分子メカニズムを解明するうえで有用な情報を提供するのみならず、将来において骨粗鬆症などの骨量減少をきたす代謝性骨疾患治療薬の開発にも役立つと期待される。

緒言

骨粗鬆症は、閉経（エストロジエン欠乏）や加齢に伴い骨形成と骨吸収のバランスが崩れ、骨量が減少する代謝性骨疾患である。高齢化社会の到来により骨粗鬆症患者の数は増え続けており、地球的規模での問題となっている。骨量が減少すると骨折の頻度が高まり、さらに骨折に伴う寝たきりなどにより身体ならびに精神的機能が著しく低下する。したがって骨粗鬆症の治療法確立は高齢者の数が激増する二十一世紀において極めて重要な課題の一つである。現時点において最も広汎に用いられている骨粗鬆症治療はエストロゲンやビスホスホネートなどの骨吸収抑制薬剤を用いる方法である（1）。しかしながら骨吸収の抑制による治療は病状の進展を食い止めることはできるものの、正常時の40%以下に減少した骨量を元通りに回復することはできないという大きな欠点がある。そのため将来的には骨形成を促進し、骨量を増加できるような治療法の開発が強く望まれている。そこで本研究においては骨形成のメカニズムを解明することを目的とした。

骨形成において中心的役割を演じるのは中胚葉性未分化間葉系細胞から分化する骨芽細胞である（2）。骨芽細胞は骨基質の形成や石灰化を直接担う細胞であり、一方において、破骨細胞の分化にも密接に関与し（3）、骨リモデリングを活発に行なうのみならず、骨細胞と共に骨組織の恒常性維持においても重要な役割を果たしている。成熟した骨芽細胞は、高いALP活性を示し、細胞外骨基質と基質小胞を分泌しながらリン酸とカルシウムから構成されるハイドロキシアパタイト結晶を形成し、石灰化を進める（4）。

このような骨芽細胞の分化および機能は様々なサイトカインあるいは増殖因子によって調節されている(5)。中でも骨形成因子 BMP は、*in vitro* および *in vivo* のいずれにおいても未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化を誘導することにより強力に骨形成を促進することが知られている(6)。BMP は皮下や筋肉内において骨形成を誘導するたんぱく質として同定された因子である(7)。BMP は Transforming Growth Factor (TGF)-ファミリーの一員であり、細胞の増殖ならびに分化を制御し、胚発生や成体における骨あるいは他の組織の維持、修復、骨折や創傷治癒などの過程においても重要な役割を果たしている(8)。しかしながら、その詳細な作用機序は未だに多くの点が不明のまま残されている。

BMP は標的細胞の膜表面に存在する BMP 受容体に結合し、その細胞内シグナル伝達経路を活性化することにより生物学的作用を発現することが明らかとなりつつある(9)。BMP 受容体は元来性のセリン/スレオニンキナーゼ活性を有しており、I 型と II 型の二つのタイプが存在する(10)。II 型受容体はリガンドの有無にかかわらずリン酸化活性を持つのに対し、I 型受容体はリガンドが存在しないと非活性化状態にある。BMP が受容体に結合し、II 型受容体と I 型受容体が会合すると、II 型受容体は I 型受容体をリン酸化し、リン酸化により活性化された II 型受容体は Smad として知られる細胞内シグナル伝達因子(受容体特異型 Smad)をリン酸化する。こうしてリン酸化された受容体特異型 Smad は、すべての受容体特異型 Smad と共に機能する共有型 Smad4 と複合体を形成後、核内に移行し、遺伝子の転写を制御する(11)。BMP のシグナルに関する Smad として、これまでに見出されているのは受容体特異型 Smad である Smad1 および Smad5 ならびに共有型 Smad4 が知られている(12、13)。ところが細胞外の BMP には非常に多くのファミ

リーメンバーが同定されており(14)、これら三つの Smad だけで全ての BMP ファミリー メンバーと関連し、その多彩な作用発現に関与するとは考えにくく、他にも BMP シグナルに関与する未同定の Smad が存在すると推測される。このような推測を支持する結果として、最近、Smad1 と Smad5 に相同意を示す新規の Smad、Smad8 がヒトとラットから同定された(15、16)。しかしながら BMP シグナル伝達における Smad8 の機能、そして BMP の骨形成誘導作用発現における役割は未だ明らかではない。本研究では BMP による骨形成誘導の分子メカニズムを解明する目的でマウス由来の Smad8 のクローニングを行ない、 Smad8 の BMP シグナル伝達における機能および骨形成における役割について検討した。

実験材料と実験方法

1. 実験材料

マウス線維芽細胞 C3H10T1/2、サル肝臓細胞 COS-7 は ATCC から購入し、マウス筋肉芽細胞 C2C12 はベイラー医科大学の G. Karsenty 教授から、マウス骨芽細胞 MC3T3-E1 はミシガン大学の R. Franceschi 教授から、Xvent2 プロモータールシフェラーゼベクターは、カリフォルニア大学 K.W.Y. Cho 教授より各々供与された。野生型および恒常的活性型の BMP 受容体、ALK2、ALK3、ALK5 は、ヘキストマリオナルセル日本の岡崎氏より、恒常的活性型 TGF- β 受容体 ALK5 は、トロント小児疾患病院の J. W. Wrana 教授より各々供与された。

2. 遺伝子クローニング

マウス Smad8 は PCR を用いたライブラリーのスクリーニング法 (17) により、12.5 日齢のマウス胎仔胚 cDNA ライブラリーよりクローニングした。まず、大腸菌に入った cDNA ファージライブラリーを各ウェルに約 500 クローンを含むように 96 ウェルプレートの 64 個のウェルに分注した。1 晩培養後、縦列の 8 つのウェルから一つにプールし、横列の 8 つのウェルからも一つにプールし、それぞれの縦列と横列から合計 16 のプールを PCR によりスクリーニングした。PCR は 2×マスターミックス (Qiagen, Hilden, Germany) を用い、オリゴヌクレオチドプライマーは、順方向プライマーには 5'-CCT CCT ATG CAC CCC AGC ACC CCC ATC AGC -3' と逆方向プライマーには 5'-AGA GCA CCA GTG CAG GGG CTC CTC GTA GCA -3' を使用し、PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により分析した。

PCR ポジティブのウェルから、同様に 2 次スクリーニング（各ウェルに約 30 クローン）および 3 次スクリーニング（各ウェルに約 2 クローン）を繰り返した。ポジティブウェルをアガロースプレート上に播いて単一クローンを分離し、塩基配列を ALF 自動シーケンサー（PE Applied Biosystems、Foster City、CA）により決定した（ジーンバンク、アクセッショナンバーAF175408 として登録）。マウス Smad1、Smad3、Smad4 は、RT-PCR 法によりクローニングし、マウスの Smad1、Smad3、Smad8 変異体は、C 末端のリン酸化部位を欠損させるため、それぞれ、アラニン 422 番目、アラニン 382 番目、アラニン 387 番目をストップコドンに変換したプライマーを用いて PCR によって作製し、シーケンサーにより塩基配列を確認した。これらの Smad 遺伝子はサイトメガロウイルスプロモーターを持った動物細胞発現ベクターpcDNA3.1（Invitrogen、Carlsbad、CA）にサブクローニングした。また、特異的免疫認識のための Xpress エピトープを持つ pcDNA3.1/His（Invitrogen）にフレームを合わせてサブクローニングした。

3 . 免疫沈降と免疫プロッティング

Xpress-Smad8 遺伝子をトランスフェクションした細胞を細胞溶解液（20 mM MOPS pH 7.2、150 mM NaCl、5 mM EGTA、1.5 mM MgCl₂、1 mM DTT、1% NP-40、75 mM -glycerophosphate、2.4 μg/mL pepstatine、1 μg/mL aprotinin、1 μg/mL leupeptin、1 mM NaVO₃）中で 4 にて 30 分間攪拌しながら溶解させた。30 分間遠心後、上清 500 μg に対してマウス Xpress モノクロナール抗体（Invitrogen）2 μg を加え 4 にて 2 時間反応させ、さらにプロテイン G セファロース（Amersham Pharmacia Biotech、Uppsala、Sweden）75% 懸濁液 40 μL を加え 4 にて 1 時間反応させ、遠心後、細胞溶解液で 4 回洗浄遠心し、免疫沈降さ

せた。免疫沈降物は、SDS-PAGE 後、PVDF 膜 Hybond-P (Amersham Pharmacia Biotech) に転写させ、ウサギ抗リン酸化セリンポリクロナール抗体 (Zymed Laboratories、South San Francisco、CA) またはヤギ抗 Smad4 ポリクロナール抗体 (Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、CA) で免疫プロッティングし、二次抗体として Horseradish peroxidase を結合した抗 IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories、West Grove、PE) と ECL プラスウェスタンプロッティング検出システム (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて検出した。

4 . 免疫蛍光染色

細胞内局在性は、免疫蛍光染色法により検出した。Xpress-Smad8 と Smad4、恒常的活性型受容体の遺伝子を過剰発現させた細胞を 3.7%パラフォルムアミドリン酸で 5 分間固定し、抗体を細胞内に透過させるため、0.1%トリトン X100 で 5 分間処理した。非特異的な抗体の結合を防ぐために 1%ウシ血清アルブミン(BSA)で 1 時間ブロッキング後、1% BSA で 500 倍希釈したマウス抗 Xpress モノクロナール抗体と 1 時間反応させ、さらに FITC を結合したヤギ抗マウス IgG 抗体 (200 倍希釈、Jackson ImmunoResearch Laboratories) と 1 時間反応させ、適切なフィルターを用いた蛍光顕微鏡にて観察した。

5 . アルカリホスファターゼ (ALP) 活性

細胞を 1% NP-40 と 1mM MgCl₂ を含む細胞溶解液 300 μL で 37 °C 、 1 時間溶解後、 100 μL を ALP 活性測定キット (Roche Diagnostics、Mannheim、Germany) を用いて iEMS リーダーMF (Thermo Labsystems、Helsinki、Finland) にて 1 分間当たりの活性増加量を測定

した。タンパク質濃度は、BSA の段階希釈溶液を基準濃度として、細胞溶解液 10 μL に BCA キット溶液 (Pierce、Rockford、IL) 100 μL を添加し、37 ℃、1 時間反応させ、iEMS リーダー MF にて発色量を測定した。ALP 活性は、タンパク質濃度当りの活性として表示した。

6 . リアルタイム定量的 TaqMan PCR (TaqMan PCR)

対象遺伝子の mRNA 発現量は、TaqMan PCR 法によって定量化した。鑄型の cDNA は、各細胞から全 RNA を RNAPlus (Qbiogen、Illkirch、France) により抽出後、逆転写酵素反応キット (PE Applied Biosystems) を用いて合成した。オリゴヌクレオチドプライマーと TaqMan プローブは、プライマーエクスプレス (PE Applied Biosystems) によりデザインした。内部基準のグリセラルデヒドリン酸脱水素酵素 (GAPDH) のプライマーと TaqMan プローブは、PE Applied Biosystems から購入した。1 μg の全 RNA を逆転写酵素と最終容積 20 μL 中で 42 ℃、1 時間反応させ、合成した cDNA を 5 倍希釈し、この溶液 5 μL を、TaqMan 反応液 (5mM 塩化マグネシウム溶液、200 μM dNTP 溶液、AmpliTaq Gold 0.625 ユニット)、正方向プライマーと逆方向プライマーを各 300nM、GAPDH プライマーを各 200nM、対象遺伝子および GAPDH TaqMan プローブを各 200nM、最終容積 25 μL 中で TaqMan PCR を行なった。TaqMan PCR は、ABI PRISM 7700 Sequence detector (PE Applied Biosystems) にて、95 ℃ 15 秒間、60 ℃ 1 分間の PCR サイクルを 40 サイクル繰り返す条件下で行なった。データは、付属の ABI PRISM 7700 SDS ソフトウェアにて、限界サイクル数 Ct に変換した。対象遺伝子の Ct は GAPDH の Ct 値で標準化し、表示した。また、コントロールとの差で表示する場合は、PCR の 1 サイクルの差は遺伝子量に換算すると 2

倍の差に相当するため、コントロールとの差の Ct 値を 2 乗することにより、遺伝子量を相対的に表示した。

実験結果

1. マウス Smad8 のクローニングとその一次構造

12.5 日齢のマウス胎仔胚 cDNA ライブラリーより PCR を用いてクローニングしたマウス Smad8 cDNA は、受容体により制御を受ける Smad (受容体特異型 Smad) の特徴である Mad homology 1 (MH1) ドメイン、プロリンに富んだリンカー領域、および MH2 ドメインを含んだアミノ酸をコードしていた (図 1)。得られた数個のクローンは、オルタネイティブスプライシングに起因する 2 つの型に分類され、リンカー領域に 6 塩基 (2 アミノ酸残基) の挿入を持ったもの (430 残基) と持たないもの (428 残基) が存在した。この挿入は、図 1 に小文字で示した。他の Smad と比較した結果、Smad8 は受容体特異型 Smad に属し、BMP シグナルの下流に位置する Smad1 および Smad5 と同じグループに分類できた。マウス Smad8 MH1 ドメインの DNA に結合すると予想されるアミノ酸残基はすべて保存されていた。Smad8 のリンカー領域では、Smad1 や Smad5 との相同性は低く、MAK キナーゼ Erk による 4 つのリン酸化部位 (18) のうち、三つは保存されていたが、Smad1 と Smad5 に存在するタンパク質分解に関わるユビキチンリガーゼの Smurf1 による認識部位 (19) は、Smad8 には存在しなかった。MH2 ドメインでは、L3 ループと C 末端、ヘリックス 1 で受容体に結合することが示されている。L3 ループと ヘリックスは、Smad1/5/8 間で保存されていた。L3 ループは、Smad4 との相互作用にも関与している。DNA 結合性コファクターに結合すると推定される ヘリックス 2 領域は、Smad1/5/8 間では、一個のアミノ酸の相違が見られた。

2 . Smad8 の組織局在

クローニングしたマウス Smad8 の各組織での発現を、TaqMan PCR を用いて分析した(図 2)。各組織の cDNA は、Clonetech 社製のマウス MTC パネル とパネル を使用した。その結果、マウス Smad8 は普遍的に各組織で発現し、前立腺で発現が最も高く、骨格筋でその発現が最も低いことが明らかとなった。

3 . Smad8 によるシグナル伝達

Smad8 が Smad1 および Smad5 と同様に受容体特異型 Smad であることを確認する目的で、恒常的活性型 BMP 受容体によってリン酸化を受けるかどうかを、Smad8 特異的免疫沈降後、リン酸化セリン残基を特異的に認識する抗リン酸化セリン抗体を用いて検討した(図 3)。恒常に活性化した受容体は、リガンド非存在下で受容体特異型 Smad をリン酸化し、シグナル伝達を活性化することが報告されている (20)。恒常的活性型 BMP 受容体 ALK2、ALK3、ALK6 はそれぞれ 207 番目、233 番目、203 番目のグルタミンをアスパラギン酸に置換、また恒常的活性型 TGF- β 受容体 ALK5 は 204 番目のスレオニンをアスパラギン酸に置換することにより作製した (20)。次いで遺伝子発現効率の高い COS-7 細胞に Xpress-Smad8 と恒常的活性型受容体 (caALK2、caALK3、caALK6、または caALK5) を同時に強制発現させ、Smad8 のリン酸化を調べた。ネガティブコントロールとしてリガンド非存在下ではリン酸化を誘発しない野生型 (wt) BMP 受容体を用いた。恒常的活性型 BMP 受容体 caALK2、caALK3 および caALK6 は Smad8 をリン酸化したのに対し (レーン 1、3、5)、恒常的活性型 TGF- β 受容体 caALK5 および野生型 BMP 受容体によっては、Smad8 はリン酸化されなかった (レーン 2、4、6、7)。

次にリン酸化された Smad8 と共有型 Smad である Smad4 との相互作用について検討した。COS-7 細胞に Xpress-Smad8 と Smad4 および恒常的活性型受容体を共発現させ、抗 Xpress 抗体により Smad8 を免疫沈降し、Smad8 との結合により共沈した Smad4 を抗 Smad4 抗体により免疫染色検出した（図 4）。恒常的活性型 BMP 受容体 caALK2、caALK3、caALK6 の存在により Smad8 は Smad4 と結合することが示された（レーン 1、3、5）のに対し、恒常的活性型 TGF- β 受容体 caALK5 は Smad8 と Smad4 との結合を誘導しなかった（レーン 7）。また、ネガティブコントロールとして、C 末端の 44 アミノ酸を除いた Smad8 変異体（図中 T として示す）は、Smad4 と結合するために必要な L3 ループの 2/3 が欠損しているため、恒常的活性型 BMP 受容体が存在しても Smad4 との結合を示さなかった（レーン 2、4、6、8）。

4 . Smad8 の細胞内移行

次に、このように Smad4 と複合体を形成した Smad8 が核移行を示すか否かについて、Xpress-Smad8 抗体を用いて、細胞免疫蛍光染色により検討した（図 5）。COS-7 紹胞に、Xpress-Smad8、Smad4、および、恒常的活性化受容体を共発現させ、抗 Xpress 抗体と蛍光試薬 FITC ラベルした 2 次抗体を用いて Smad8 の細胞内動向を観察した。その結果、Smad8 は恒常的活性型 BMP 受容体 caALK2、caALK3、および caALK6 の存在により、核に移行した（A、B、C）。しかし、恒常的活性型 TGF- β 受容体 caALK5 が存在しても核への移行を示さなかった（D）。Smad8 のみの発現では、Smad8 は細胞質と核の細胞内全体に分布していた（E）。

5 . Smad8 の転写活性化能

さらに、このように核に移行した Smad8 が転写活性化能を有するか否かについて検討した。アフリカツメガエルの背腹の中胚葉形成に関するホメオボックス遺伝子 Xvent2 の転写は BMP によって調節されていることが知られている(21)。そこでこの遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼレポーターに連結したプラスミドベクターを使用し、Smad8 の転写活性化能を検討した。実験方法としては COS-7 細胞に Smad8 あるいは様々な Smad と、Xvent2 プロモータールシフェラーゼレポーターベクター (Xvent2-Luc) を過剰発現させた。BMP 受容体によって特異的に活性化される Smad8 ならびに Smad1、また TGF- β 受容体によって特異的に活性化される Smad3、そして共有型 Smad4 はそれぞれ単独である程度の転写活性化能を示した(図 6)。しかし、Smad8 と Smad4 が共存した場合、より強く転写を誘導し、相加効果が認められた(図 6)。一方、Smad3 は Smad4 が共存しても転写活性の増強を示さなかった。

6 . Smad8 の遺伝子発現誘導能

BMP-2 刺激により誘導される遺伝子に関しては知見が乏しい。そこで、アフィメトリックスジーンチップを用いて、C2C12 細胞を BMP-2 で刺激した場合に誘導される約 3 万 5 千個の遺伝子についてその経時的な発現の変動を解析した。その結果、ファイプロモジュリン、結合組織成長因子 CTGF、ヘリックスループヘリックスタンパク質である分化阻害因子/DNA 結合阻害因子 Id3、ホメオボックスタンパク質 Prx2、抑制型 Smad である Smad6 が非常に強く誘導されることが判明した(図 7)。そこで、Smad8 がこれらの遺伝子の発現を誘導するかについて検討した。C2C12 細胞に Smad8 単独または Smad8 と Smad4 を

過剰発現させ、細胞から抽出した mRNA から逆転写酵素で cDNA を合成し、TaqMan PCR にて定量評価した。Smad8 単独の場合、ファイプロモジュリン、Prx2、Smad6 の発現は、コントロールと比較して、若干抑制されたが、Smad4 が共存する場合、これら全ての遺伝子の発現は相乗的に促進された（図 8）。

7. 骨芽細胞系細胞における Smad8 の発現

BMP-2 は骨芽細胞分化を促進することにより骨形成を増加させている（6）。そこで BMP-2 のシグナルを伝達する Smad8 の骨芽細胞系細胞における発現を検討した。線維芽細胞 C3H10T1/2、間質細胞 ST2、筋芽細胞 C2C12、骨芽細胞 MC3T3-E1、マウス頭蓋冠から分離した初代培養骨芽細胞（Primary OB）における Smad8 mRNA の存在を、RT-PCR/サザンブロッティング法（図 9A）および TaqMan PCR（図 9B）を用いて検討した。その結果、Smad8 mRNA はこれらの細胞において構成的に発現されており、特に線維芽細胞 C3H10T1/2 と初代培養骨芽細胞での発現が高く、筋芽細胞 C2C12 での発現が低いことが示された。

8. Smad8 の骨芽細胞分化誘導能

次に、C2C12 細胞に Smad8 単独または Smad8 と Smad4 を過剰発現させ、骨芽細胞の分化マーカーである ALP、Cbfa1、オステオカルシン、I 型コラーゲンの発現を TaqMan PCR により定量的に測定した（図 10）。Smad8 単独ではこれらの分化マーカーの発現はほとんど誘導されなかったのに対し、Smad4 が共存する場合、ALP、Cbfa1 および I 型コラーゲンの発現が著しく増加した。

ゲン遺伝子の発現は相乗的に増加した。一方、オステオカルシンの発現は Smad8 と Smad4 が共存しても極めて軽度にしか誘導されなかった。

Smad の機能を解析するためによく用いられる手法として、Smad 変異体を用いる方法がある。たとえば C 末端の 44 個のアミノ酸を欠損する Smad3 変異体がドミナントネガティブな効果を示すことが報告されている（22）。そこで Smad8 の骨芽細胞分化における役割をさらに詳細に検討する目的で、C 末端の 44 個のアミノ酸を欠損する Smad8 変異体を作製し、骨芽細胞分化に対するその効果を調べた。実験としては Smad8 変異体を C2C12 細胞に過剰発現させ、BMP-2 刺激により誘導される ALP 活性を測定した（図 11）。その結果、この Smad8 変異体は、Smad1 変異体と同様に、BMP-2 により誘導される ALP 活性を完全に抑制した。一方、Smad3 変異体は、Smad8 や Smad1 ほど強い抑制効果を示さなかつた。また、骨芽細胞マーカーの mRNA 発現に対する Smad8 変異体の効果を TaqMan PCR を用いて検討したところ、抑制の程度に差が見られるが、BMP-2 により誘導される ALP、Cbfa1、オステオカルシン、I 型コラーゲンの発現は Smad8 変異体により抑制された（図 12）。

考察

本研究においては、強い骨形成促進作用を示すサイトカイン BMP の作用メカニズムを分子レベルで明らかにする目的で、PCR を用いたスクリーニング法により、マウス胎仔胚 cDNA ライブラリーから細胞内シグナル伝達分子 Smad8 をクローニングし、BMP シグナル伝達ならびに BMP による骨芽細胞分化誘導におけるその役割を検討した。マウス Smad8 はそのアミノ酸配列において BMP シグナルを特異的に伝達することが既に知られている Smad1 および Smad5 と高い相同意を示した。また Smad8 は骨芽細胞系の細胞に発現されているのみならず、様々な組織に広汎にその発現が見られた。Smad8 は恒常的活性型 BMP 受容体 ALK2、ALK3 および ALK6 によってセリン残基がリン酸化されたが、恒常的活性型 TGF- β 受容体 ALK5 によってはリン酸化されなかった。また活性化された Smad8 は共有型 Smad4 と物理的に会合し、複合体を形成した後、細胞質から核内に移行した。そして Smad4 存在下における Smad8 の過剰発現は、BMP で刺激した場合と同様に、Xvent2 遺伝子プロモーターの転写活性を促進した。さらに Smad8 はジーンチップを用いて同定されたファイブロモジュリン、CTGF、Id3、Prx2、Smad6 などの BMP-2 によって誘導される遺伝子の発現を Smad4 共存下で強く誘導した。これらの結果は、Smad8 は BMP に特異的なシグナル分子であり、Smad4 と複合体を形成することにより核内に移行し、転写因子として作用することを示唆する。また、骨芽細胞に分化する能力を秘めている筋芽細胞 C2C12 細胞において Smad8 は Smad4 と協働して ALP、Cbfa1、オステオカルシン、I 型コラーゲンなどの骨芽細胞マーカーの発現を高めることにより、骨芽細胞への分化を誘導した。これに対して Smad8 変異体は BMP-2 によって誘導される C2C12 細胞の骨芽細胞への分化を

抑制した。これらの結果は BMP による骨芽細胞分化誘導において Smad8 が促進的な役割を果たしていることを示唆する。本研究においてクローニングされた Smad8 は BMP の特異的シグナル伝達分子ならびに転写因子として機能し、BMP の骨形成誘導作用の発現に密接に関与することが明らかとなった。したがって本研究により BMP による骨形成誘導作用の分子メカニズムの一端が解明された（23）。

最近ラット Smad8 が恒常的活性型 BMP 受容体 ALK2 によりリン酸化され、Smad4 と結合すること、およびカエル胚においてドミナントネガティブ型 ALK2 により抑制された中胚葉遺伝子の発現を回復させることが報告された（15）。この結果は本研究と同様に Smad8 が BMP シグナルに関与し、その生物学的作用発現に重要であることを示唆する。一方、本研究においては、ALK2 がマウス Smad8 のリン酸化を誘導することを示したのみならず、恒常的活性型 BMP 受容体 ALK3 と ALK6 もマウス Smad8 をリン酸化し、引き続いて共有型 Smad4 と複合体を形成した後、核に移行し、BMP 標的遺伝子の転写活性を促進することを実験的に明確に示した。このように本研究は Smad8 が細胞膜から核に至るまでの一連の BMP シグナルを伝達することを明らかにした点において従来の研究をさらに一步進めたといえる。

骨芽細胞分化マーカーには、初期マーカーとして ALP と I 型コラーゲン、後期マーカーとしてオステオカルシン、骨芽細胞特異的な転写因子として Cbfa1 が知られている（4、24）。Smad8 と Smad4 の過剰発現により ALP、Cbfa1、I 型コラーゲンは強く誘導されたが、Smad4 （データは示さず）あるいは Smad8 のみの過剰発現ではこれらの遺伝子はほとんど誘導されなかった。したがって C2C12 細胞のような未分化間葉系細胞において、これらの遺伝子発現誘導には Smad8 と Smad4 の二つのシグナル分子が存在し、複合体を形

成することが必要であると推測される。実際に Smad4 と複合体を形成できない Smad8 変異体はおそらく内在性の Smad シグナルと拮抗することによりドミナントネガティブ作用を示し、BMP-2 により誘導されるこれらの骨芽細胞分化マーカーの発現を阻害したと考えられる。同様の結果が BMP の特異的シグナル分子で Smad8 と高い相同意を持つの Smad1 および Smad5 の場合においても報告されている(12、13)。Smad8 と Smad4 の過剰発現により骨芽細胞分化の初期マーカー遺伝子は強く誘導されるのに対して、骨芽細胞分化の後期マーカーであるオステオカルシンはわずかにしか誘導されなかった。その理由は不明であるが、最近の報告によると Cbfa1 は骨芽細胞の分化過程の後期においては抑制的に作用し、同時にオステオカルシンの発現も阻害することが示されていることから(25) Smad8 と Smad4 の過剰発現により誘導された Cbfa1 がオステオカルシンの発現を間接的に抑制した可能性が考えられる。

ジーンチップを用いた解析により C2C12 細胞において BMP-2 により強く誘導される遺伝子に着目した。ファイプロモジュリンはプロテオグリカンの一種であり、コラーゲンと結合して細胞外基質形成に関与する(26)。結合組織成長因子 CTGF は別名 Fisp12 あるいは Cyr61 として知られ、TGF- β によって誘導されて線維芽細胞および骨芽細胞の増殖あるいは細胞外基質形成に関与する(27)。ヘリックスループヘリックスタンパク質である分化阻害因子/DNA 結合阻害因子 Id は BMP-2 により誘導され、筋芽細胞分化を抑制する(28)。そしてホメオボックスタンパク質 Prx2 は胚発生過程で機能し、心臓、前脳、骨格(頭蓋顔面、内耳、四肢)ならびに血管の形成に関与する(29)。また Smad6 は BMP-2 により誘導され、Smad シグナルに対して抑制的に働く天然に存在するアンタゴニストである(30)。本研究の結果より、これらの遺伝子は Smad8 と Smad4 の過剰発現

によっても誘導されることが明らかとなった。これらの遺伝子が骨芽細胞分化においてどのような役割を演じるかは現時点では不明であるが、おそらく BMP-2 は Smad8/Smad4 の活性化を介して、これらの遺伝子の発現を誘導し、その発現の量、部位および発現時期を調節することにより骨芽細胞分化を制御していると推察される。

Smad8 はあらゆる組織で広範に発現されており、骨芽細胞前駆細胞や成熟した骨芽細胞での発現も観察された。したがって Smad8 は BMP が関与することが示唆されている生物の発生過程および骨芽細胞の分化過程などにおいて BMP のシグナルを媒介する機能を有していると想像される。興味深いことに Smad8 は前立腺において特に強い発現を示した。このことは骨に高率に転移する前立腺ガンが造骨性病変を誘導すること(31)と何らかの関連があるのかもしれない。一方、骨格筋において Smad8 は弱い発現しか示さなかった。この結果は BMP が筋芽細胞の分化を抑制し、骨芽細胞への分化を誘導するというこれまでの報告に合致する(32)。おそらく筋肉線維の形成には BMP のシグナルが遮断されている必要があり、そのために骨格筋では Smad8 の発現が何らかの機序により抑えられていると推察される。

BMP は、骨形成のみならず、個体発生やアポトーシスなど非常に多様な生理活性を持つことが知られている。このように多様な BMP の機能発現には Smad のみの関与以外に、他のシグナル経路とのクロストークも関わり合っていると推測される。たとえば EGF などの増殖因子により活性化される MAP キナーゼ系は BMP によっても活性化されることが報告されている。MAP キナーゼ系の TAK1 は、アポトーシスや腹側中胚葉誘導に関与し(33) MAP キナーゼ p38 の阻害剤は、骨芽細胞マーカーの発現を抑制する(34)。Smad8 は MAP キナーゼによりリン酸化される部位を三つ、Smad1 および Smad5 は四つ有しており、Smad8

と Smad1 あるいは Smad5 とでは MAP キナーゼによる制御に相違がある可能性が示唆される。また MAP キナーゼによりリン酸化される ATF-2 (35) や c-Jun (36) も Smad と相互作用することが示されている。その他にも MAK キナーゼ系に限らず、Wnt シグナル (37) や LIF シグナル (38) が核内で Smad シグナルとクロストークしていることも示されている。したがって Smad は単独で機能するばかりでなく、他のシグナル分子あるいは転写因子と複雑にクロストークすることによっても機能していると推測される。

本研究でクローニングされた Smad8 が、同様に BMP シグナルに特異的に関与する Smad1 および Smad5 と異なる機能を有するか否かについては今のところ不明である。ただ、Smad1、Smad5、Smad8 のコファクターに結合すると予想される ヘリックス領域のアミノ酸配列に相違が見られることから、これらの Smad はそれぞれ異なる転写因子と相互作用し、役割分担をしていることも十分考えうる。

本研究により BMP の作用メカニズムの一端が解明されたが、今後の課題としては、Smad8 の生体内での役割を知るためのノックアウトマウスの作製、BMP シグナルに特異的である Smad1、Smad5 および Smad8 間での機能的相違の有無、また Smad8 と他のシグナル経路あるいは転写因子とのクロストークの存在などが検討される必要があると思われる。

緒言でも述べたように人口の高齢化に伴い骨粗鬆症は大きな社会的問題となっている。骨粗鬆症の治療において最終的な目標は骨形成を高め、失われた骨量を回復することにある。本研究において得られた結果は複雑かつ多様な骨形成促進作用の分子メカニズムを解明する上で有用な情報を提供するのみならず、将来において骨粗鬆症などの骨量減少をきたす代謝性骨疾患治療薬の開発にも役立つと期待される。

結語

- 本研究の結果を以下に要約した。
- 1 . BMP に特異的なシグナル伝達因子 Smad8 をマウス胎仔胚 cDNA ライブラリーからクローニングした。
 - 2 . Smad8 は BMP 受容体を通じてリン酸化され、共有型 Smad4 と結合して複合体を形成することにより核へ移行した。
 - 3 . Smad8 は Smad4 と協働して核内で転写因子として BMP 標的遺伝子の転写活性を促進した。
 - 4 . 未分化間葉系細胞において、Smad8 は Smad4 と協働して骨芽細胞分化に関連する遺伝子の発現を誘導し、骨芽細胞への分化を促進した。
 - 5 . 以上の結果より、Smad8 が BMP の骨形成誘導作用発現に重要な役割を果たすシグナル伝達分子として密接に関与することが明らかとなった。

謝辞

本研究に関して、ご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学歯学部ならびテキサス大学サンアントニオ校医学部 米田俊之教授、エール大学歯学部ならびアベンティスファーマフランス骨疾患研究室 Roland Baron 教授、大阪大学歯学部 西村理行助教授、アベンティスフランス骨疾患研究室 Sergio Roman-Roman 博士に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。また、貴重な試料を供与頂いた G. Karsenty 教授、R. Franceschi 教授、K.W.Y. Cho 教授、岡崎誠氏、J.W. Wrana 教授（カナダ、トロント）に深く感謝致します。本研究にご助力頂いた M. Harnois 博士、C. Geslin 女史、L. Wiart 氏、V. Stiot 女史、G. Rawadi 博士、丸山博巳博士、松石哲郎博士、同僚諸氏に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Baylink, D.J., Strong, D.D. and Mohan, S. (1999): The diagnosis and treatment of osteoporosis: future prospects. *Mol Med Today*, **5**, 133-140.
- 2) Wlodarski, K.H. (1990): Properties and origin of osteoblasts. *Clin Orthop*, , 276-293.
- 3) Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M.T. and Martin, T.J. (1999): Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev*, **20**, 345-357.
- 4) Aubin, J.E. (1998): Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol*, **76**, 899-910.
- 5) Zheng, M.H., Wood, D.J. and Papadimitriou, J.M. (1992): What's new in the role of cytokines on osteoblast proliferation and differentiation? *Pathol Res Pract*, **188**, 1104-1121.
- 6) Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M. and Wang, E.A. (1988): Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, **242**, 1528-1534.
- 7) Urist, M.R. (1965): Bone: formation by autoinduction. *Science*, **150**, 893-899.
- 8) Hogan, B.L. (1996): Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev*, **10**, 1580-1594.
- 9) Dewulf, N., Verschueren, K., Lonnoy, O., Moren, A., Grimsby, S., Vande Spiegle, K., Miyazono, K., Huylebroeck, D. and Ten Dijke, P. (1995): Distinct spatial and temporal expression patterns of two type I receptors for bone morphogenetic proteins during mouse embryogenesis. *Endocrinology*, **136**, 2652-2663.
- 10) Yamashita, H., Ten Dijke, P., Heldin, C.H. and Miyazono, K. (1996): Bone morphogenetic protein receptors. *Bone*, **19**, 569-574.

- 11) Heldin, C.H., Miyazono, K. and ten Dijke, P. (1997): TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, **390**, 465-471.
- 12) Hoodless, P.A., Haerry, T., Abdollah, S., Stapleton, M., O'Connor, M.B., Attisano, L. and Wrana, J.L. (1996): MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell*, **85**, 489-500.
- 13) Nishimura, R., Kato, Y., Chen, D., Harris, S.E., Mundy, G.R. and Yoneda, T. (1998): Smad5 and DPC4 are key molecules in mediating BMP-2-induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *J Biol Chem*, **273**, 1872-1879.
- 14) Ducy, P. and Karsenty, G. (2000): The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int*, **57**, 2207-2214.
- 15) Watanabe, T.K., Suzuki, M., Omori, Y., Hishigaki, H., Horie, M., Kanemoto, N., Fujiwara, T., Nakamura, Y. and Takahashi, E. (1997): Cloning and characterization of a novel member of the human Mad gene family (MADH6). *Genomics*, **42**, 446-451.
- 16) Chen, Y., Bhushan, A. and Vale, W. (1997): Smad8 mediates the signaling of the ALK-2 [corrected] receptor serine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12938-12943.
- 17) Israel, D.I. (1993): A PCR-based method for high stringency screening of DNA libraries. *Nucleic Acids Res*, **21**, 2627-2631.
- 18) Kretzschmar, M., Doody, J. and Massague, J. (1997): Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature*, **389**, 618-622.
- 19) Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J.L. and Thomsen, G.H. (1999): A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature*, **400**, 687-693.

- 20) Wieser, R., Wrana, J.L. and Massague, J. (1995): GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *Embo J.*, **14**, 2199-2208.
- 21) Onichtchouk, D., Gavantka, V., Dosch, R., Delius, H., Hirschfeld, K., Blumenstock, C. and Niehrs, C. (1996): The Xvent-2 homeobox gene is part of the BMP-4 signalling pathway controlling [correction of controlling] dorsoventral patterning of Xenopus mesoderm. *Development*, **122**, 3045-3053.
- 22) Mucsi, I. and Goldberg, H.J. (1997): Dominant-negative SMAD-3 interferes with transcriptional activation by multiple agonists. *Biochem Biophys Res Commun*, **232**, 517-521.
- 23) Kawai, S., Faucheu, C., Gallea, S., Spinella-Jaegle, S., Atfi, A., Baron, R. and Roman, S.R. (2000): Mouse smad8 phosphorylation downstream of BMP receptors ALK-2, ALK-3, and ALK-6 induces its association with Smad4 and transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*, **271**, 682-687.
- 24) Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S. and Kishimoto, T. (1997): Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, **89**, 755-764.
- 25) Liu, W., Toyosawa, S., Furuichi, T., Kanatani, N., Yoshida, C., Liu, Y., Himeno, M., Narai, S., Yamaguchi, A. and Komori, T. (2001): Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J Cell Biol*, **155**, 157-166.
- 26) Gori, F., Schipani, E. and Demay, M.B. (2001): Fibromodulin is expressed by both chondrocytes and osteoblasts during fetal bone development. *J Cell Biochem*, **82**, 46-57.
- 27) Xu, J., Smock, S.L., Safadi, F.F., Rosenzweig, A.B., Odgren, P.R., Marks, S.C., Jr., Owen, T.A. and Popoff, S.N. (2000): Cloning the full-length cDNA for

rat connective tissue growth factor: implications for skeletal development. *J Cell Biochem*, **77**, 103-115.

- 28) Ogata, T., Wozney, J.M., Benezra, R. and Noda, M. (1993): Bone morphogenetic protein 2 transiently enhances expression of a gene, Id (inhibitor of differentiation), encoding a helix-loop-helix molecule in osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9219-9222.
- 29) ten Berge, D., Brouwer, A., Korving, J., Martin, J.F. and Meijlink, F. (1998): Prx1 and Prx2 in skeletogenesis: roles in the craniofacial region, inner ear and limbs. *Development*, **125**, 3831-3842.
- 30) Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M. and Miyazono, K. (1997): Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature*, **389**, 622-626.
- 31) Yoneda, T. (1998): Cellular and molecular mechanisms of breast and prostate cancer metastasis to bone. *Eur J Cancer*, **34**, 240-245.
- 32) Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J.M., Fujisawa-Sehara, A. and Suda, T. (1994): Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol*, **127**, 1755-1766.
- 33) Takatsu, Y., Nakamura, M., Stapleton, M., Danos, M.C., Matsumoto, K., O'Connor, M.B., Shibuya, H. and Ueno, N. (2000): TAK1 participates in c-Jun N-terminal kinase signaling during Drosophila development. *Mol Cell Biol*, **20**, 3015-3026.
- 34) Gallea, S., Lallemand, F., Atfi, A., Rawadi, G., Ramez, V., Spinella-Jaegle, S., Kawai, S., Faucheu, C., Huet, L., Baron, R. and Roman-Roman, S. (2001): Activation of mitogen-activated protein kinase cascades is involved in regulation of bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation in pluripotent C2C12 cells. *Bone*, **28**, 491-498.

- 35) Sano, Y., Harada, J., Tashiro, S., Gotoh-Mandeville, R., Maekawa, T. and Ishii, S. (1999): ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem*, **274**, 8949-8957.
- 36) Zhang, Y., Feng, X.H. and Derynck, R. (1998): Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature*, **394**, 909-913.
- 37) Nishita, M., Hashimoto, M.K., Ogata, S., Laurent, M.N., Ueno, N., Shibuya, H. and Cho, K.W. (2000): Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature*, **403**, 781-785.
- 38) Nakashima, K., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Kawabata, M., Miyazono, K. and Taga, T. (1999): Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science*, **284**, 479-482.

CAGAAGGAAAGGCAAGCTTGGTCTATGACATCCGTGGACAGGTAATTGCCGCCACCTG	60
CCCCGGGCCCTGCAAGCCTGAAAGGCTCATCCTCTTCCCCGTGCAGCAGCCTGAGCT	120
CTGCCTCC <u>T</u> ATGCACCCCAGCACCCCATCAGCTCCCTTCTCCCTTACCCAGCCCCGCA	180
M H P S T P I S S L F S F T S P A	
GTGAAGCGGCTGCTGGGCTGGAAGCAGGGAGATGAAGAGGAGAAAGTGGGCAGAGAACCG	240
V K R L L G W K Q G D E E E E K W A E K A	
GTGGACTCTTGGTGAAGAAGTTAAGAAGAAGAACCGCCATGGATGAACGGAGG	300
V D S L V K K L K K K G A M D E L E R	
GCGCTGAGCTGCCGGGTCAAGCTAGCAAGTGTGTCACCACATCCACGGTCCCTCGATGGA	360
A L S C P G Q P S K C V T I P R S L D G	
CGCCCTCAGGTGCTCCACCGAAAGGGCTGCCACGTCATCTACTGCCGCGTGTGGCGC	420
R L Q V S H R K G L P H V I Y C R V W R	
TGGCCAGACCTGCACTCCCACATGAGCTGAAGCCCTGGAGTGCTGTGAGTCCCCTTC	480
W P D L Q S H E L K P L E C C E F P F	
GGCTCCAAGCAGAAGGAGGTCTGCATCAACCCATACCATACCGCAGAGTGGAGACCCCA	540
G S K Q K E V C I N P Y H Y R R V E T P	
GTTCTGCCTCCAGTGTGGTACCAAGACACAGCAGTACAACCCCTCAGCTCAGCCTCTG	600
V L P P V L V P R H S E Y N P Q L S L L	
GCCAAGTTCGAAGTGCCTCGCTGCACAGCGAACCCCTCATGCCGCACAACGCCACCTAC	660
A K F R S A S L H S E P L M P H N A T Y	
CCTGACTCTTCCAGCAGTCTCTGTCCGGCACCGCCCTCTCGCCAGGCCATGTGTTT	720
P D S F Q Q S L C P A P P S S P G H V F	
CCGCAGTCTCCATGCCACAGCTACCCGCACTCCCCCGGAAGTCTccgagTCAGAC	780
P Q S P C P T S Y P H S P G S P s e S D	
AGTCCCTATCAACACTCAGACTTCCGGCCAGTTGCTACGAGGAACCCAGCACTGGTGT	840
S P Y Q H S D F R P V C Y E E P Q H W C	
TCTGTTGCCTACTACGAACATAAACACCGGGTCGGAGAGACTTCCAGGGCTCTCGGG	900
S V A Y Y E L N N R V G E T F Q A S S R	
AGCGTGCCTACAGCGCTCACCGACCCCTCAATAACAGGAATAGGTTTGCTGG 960	
S V L I D G F T D P S N N R N R F C L G	
CTTCTCTCAAATGTAACACAGAAAACCTCGACCATAGAAAACACCGAGGACATTGGAAAG	1020
L L S N V N R N S T I E N T R R H I G K	
GGTGTGCATTGTTACTACGTGGGGCGAGGTGTATGCCGAGTGCCTGAGCAGCAGCAGC	1080
G V H L Y Y V G G E V Y A E C V S D S S	
ATCTTGTCAGAGCGGAACCTGCAACTACCAGCACGGCTTCCACCCGGCCACCGCTCTGC	1140
I F V Q S R N C N Y Q H G F H P A T V C	
AAGATCCCCAGCGGCTGCAGTCTCAAGGTCTTCAACAAACCAGCTTCGCCAGCTGCTC	1200
K I P S G C S L K V F N N Q L F A Q L L	
GCCCACTCCGTGCAACCACGGCTTGAAGTGGTGTATGAGCTGACGAAGATGTGCACGATT	1260
A Q S V H H G F E V V Y E L T K M C T I	
CGGATGAGCTTGTGAAGGGCTGGGAGCAGAGTATCATGCCAGGATGTCAAGCAGCACC	1320
R M S F V K G W G A E Y H R Q D V T S T	
CCCTGCTGGAGATCCATCTCATGGACCGCTGCAGTGGTGGATAAGGTGCTCACT	1380
P C W I E I H L H G P L Q W L D K V L T	
CAGATGGGCTCCCCACACAAACCTATCTCTCAGTGTCTTAAAGTCACGTCGTAGCCACG	1440
Q M G S P H N P I S S V S *	
TTGCCACAGAACAGACTCGGGCAGGGCTCCATCGTGGCAACCGCAGCTAATGCAGGGT	1500
TCCGGATGCAGATGTAATAACACGTGAACGCATCCGAGTCACGTTATATCA	1553

図1 マウスSmad8のcDNAおよび翻訳したアミノ酸配列

予想される開始コドンと終始コドンの塩基に下線を付した。N末端側のMH1ドメインとC末端側のMH2ドメインのアミノ酸残基は太字で示した。リンカー領域のオルタネイティブスプライシングの6塩基(2アミノ酸残基)の挿入は小文字で示した。

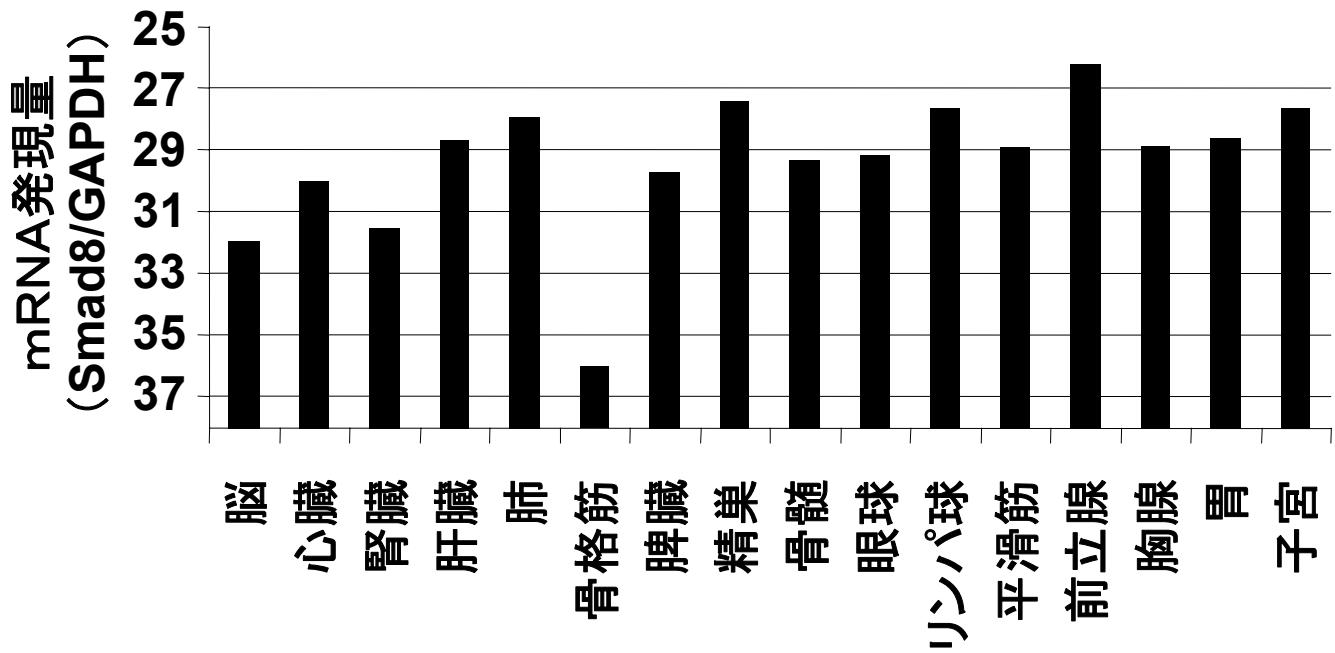


図2 Smad8の各組織での発現

マウスSmad8に特異的なプライマーとプローブを用いて、リアルタイム定量的TaqMan PCRで分析した。各組織のcDNAは、Clonetech社製のマウスMTCパネルIとパネルIIを使用した。縦軸の値はTaqMan PCRで得られたSmad8のサイクル数を各組織で発現量の一定なGAPDHのサイクル数で標準化した値として示した。マウスSmad8は普遍的に各組織で発現し、前立腺で発現が最も高く、骨格筋でその発現が最も低かった。

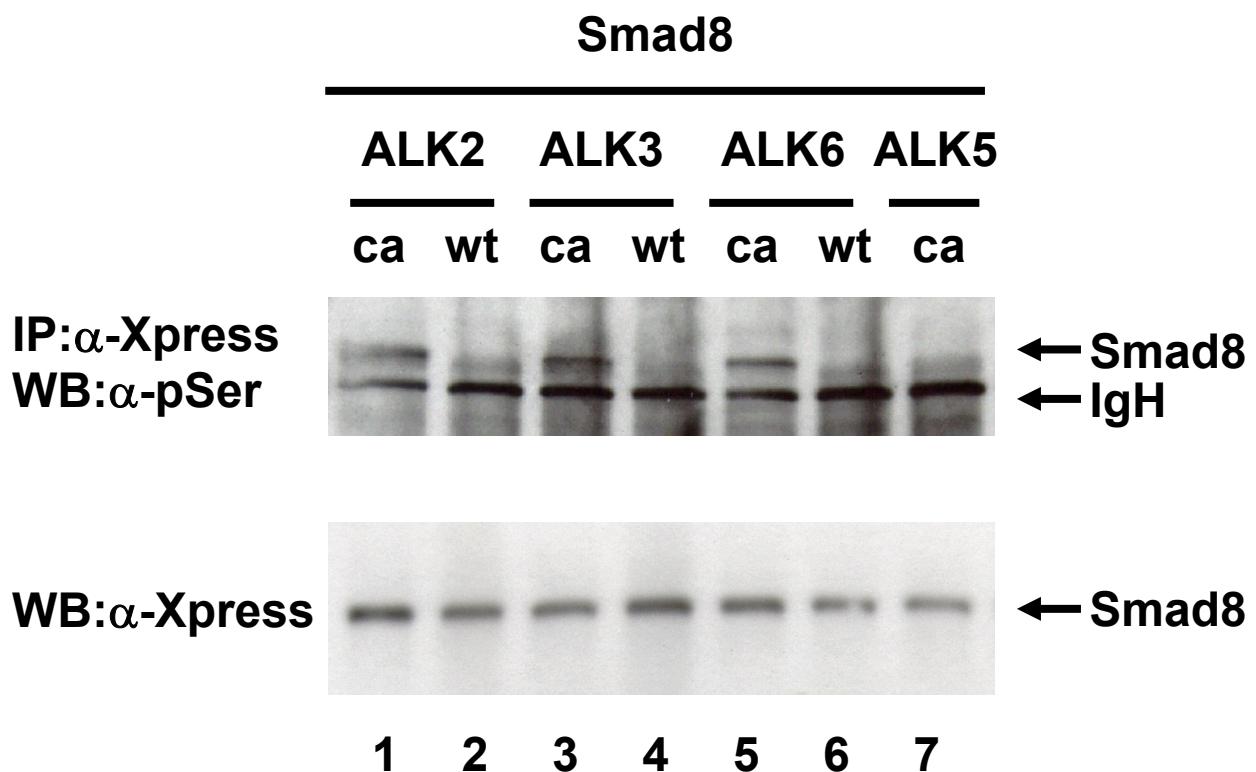


図3 恒常的活性型BMP受容体によるSmad8のリン酸化

ALK2、ALK3、ALK6はBMP受容体、ALK5はTGF- β 受容体を示す。ca: 恒常的活性型受容体(レーン1、3、5、7)、wt: 正常型受容体(リガンド非存在下ではSmadをリン酸化できない)(レーン2、4、6)。上のパネル: リン酸化されたSmad8。IgHは非特異的バンド。下のパネル: 免疫沈降前の細胞溶解液中のSmad8発現量のウエスタンブロッティング。caALK2、caALK3およびcaALK6はSmad8をリン酸化し(レーン1、3、5)、caALK5およびwtBMP受容体によっては、Smad8はリン酸化されなかった(レーン2、4、6、7)。

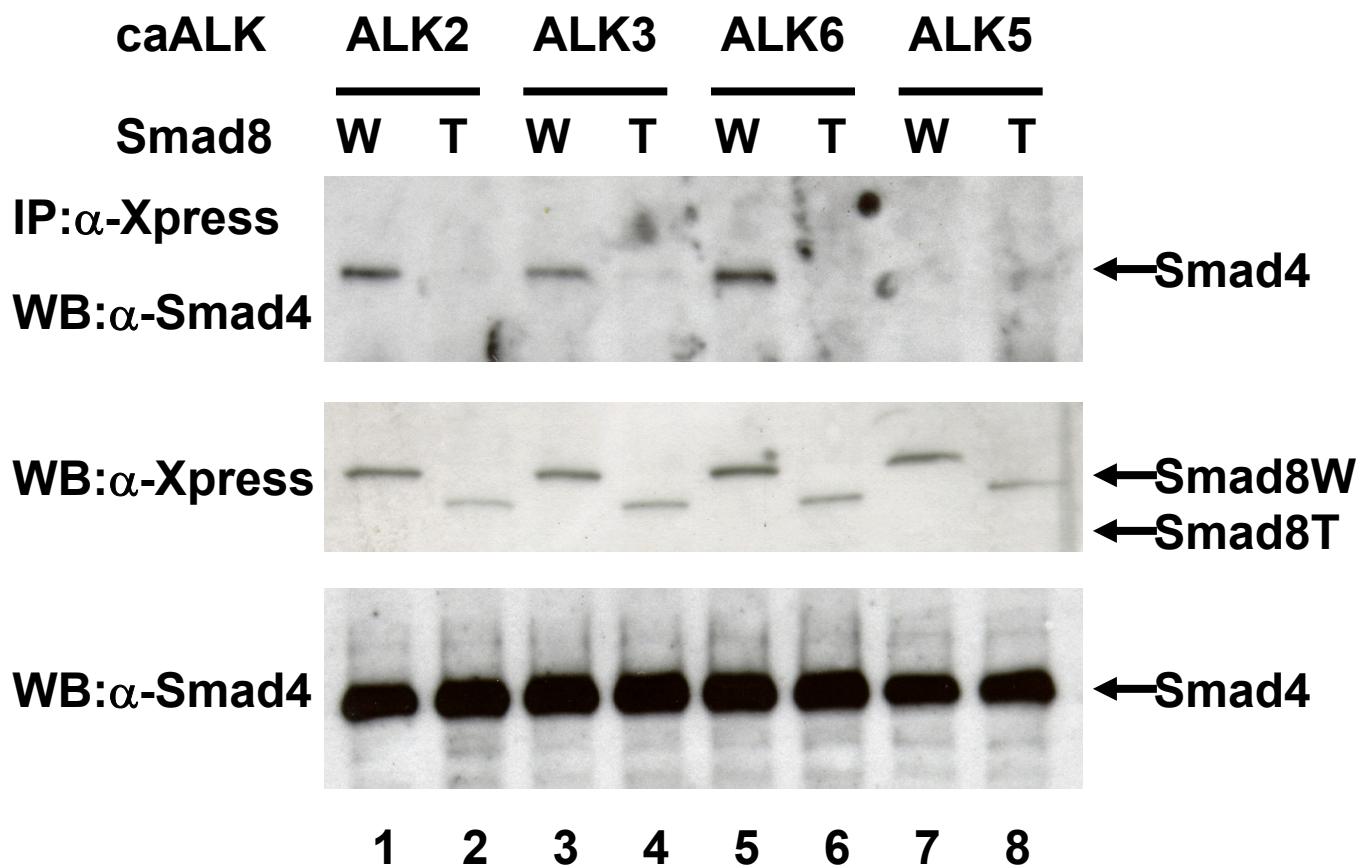


図4 恒常的活性型BMP受容体によるSmad8とSmad4との結合

W:正常型Smad8(レーン1、3、5、7)、T:Smad8変異体(レーン2、4、6、8)。上のパネル: Smad8と共に沈したSmad4を示す。二段目のパネル:免疫沈降前の細胞溶解液中の正常型(W)およびSmad8変異体(T)の発現量のウエスタンブロッティング。下のパネル: Smad4の発現量のウエスタンブロッティング。caALK2、caALK3、caALK6によりSmad8はSmad4と結合し(レーン1、3、5)、caALK5およびSmad8TはSmad4との結合を示さなかった(レーン2、4、6、7、8)。

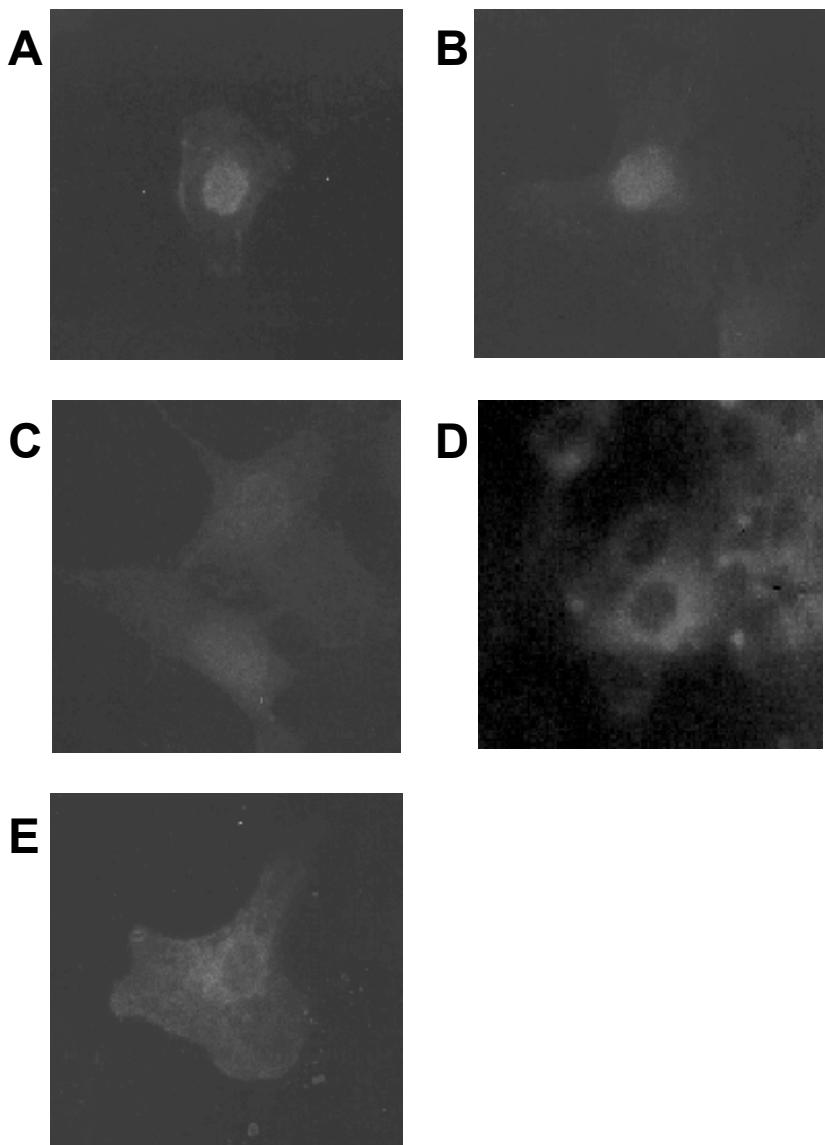


図5 恒常的活性型BMP受容体によるSmad8 の核移行

恒常的活性化型BMP受容体ALK2(A)、ALK3(B)、ALK6(C)、または恒常的活性化型TGF- β 受容体ALK5(D)存在下におけるSmad8の細胞内局在を示した。コントロールとしてSmad8のみの発現(E)を示した。Smad8はcaALK2、caALK3、およびcaALK6の存在により、核に移行し(A、B、C)、caALK5では核への移行を示さなかった(D)。Smad8のみの発現では、Smad8は細胞質と核の細胞内全体に分布していた(E)。

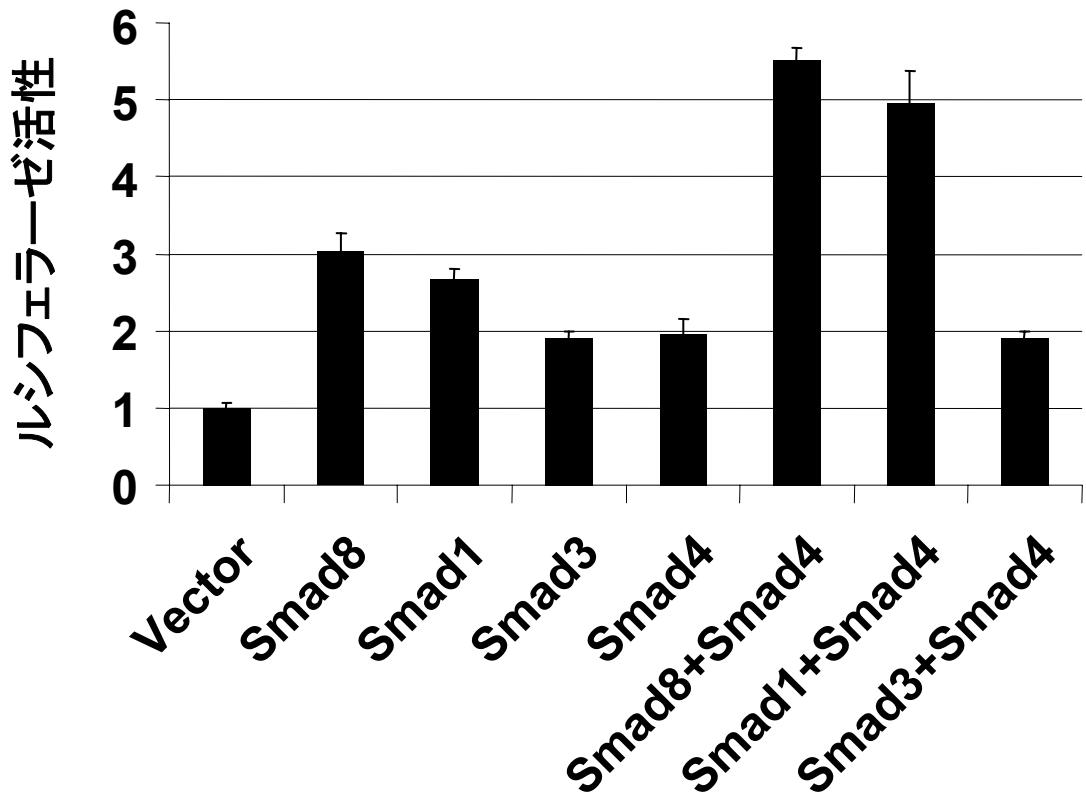


図6 Smad8による転写活性化:Xvent2プロモーターの誘導

横軸は用いたSmadを示し、縦軸は誘導されたXvent2プロモータールシフェラーゼ活性を内部基準の β ガラクトシダーゼ活性で標準化した値を示す。Smad8、Smad1、Smad3、共有型Smad4はそれぞれ単独である程度の転写活性化能を示し、Smad8とSmad4が共存した場合、より強く転写を誘導し、相加効果が認められた。Smad3はSmad4が共存しても転写活性の増強は見られなかった。

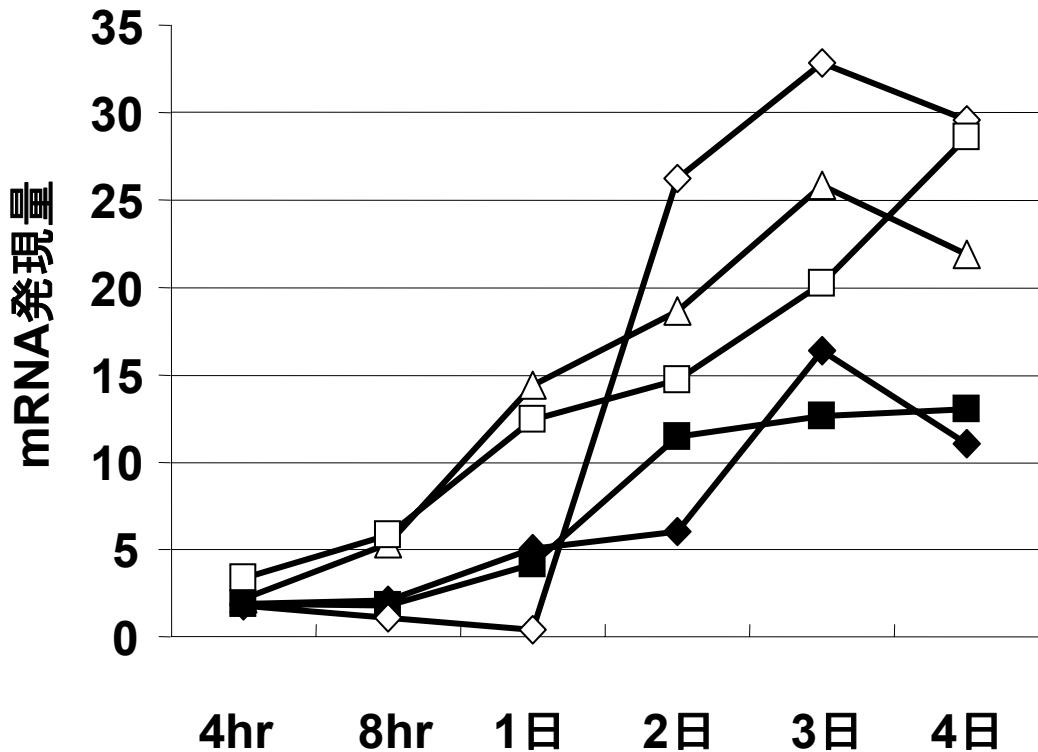


図7 Smad8による転写活性化:BMP-2により誘導される遺伝子のジーンチップによる解析
約3万5千の遺伝子中、C2C12細胞においてBMP-2により強く誘導される遺伝子として、ファイブロモジュリンFmod(◇)、結合組織成長因子CTGF(□)、分化阻害因子Id3(△)、ホメオボックスタンパク質Prx2(◆)、抑制型Smad6(■)が同定された。これらの遺伝子の経時的な誘導を図に示した。縦軸はジーンチップ上のmRNAの発現強度を示す。

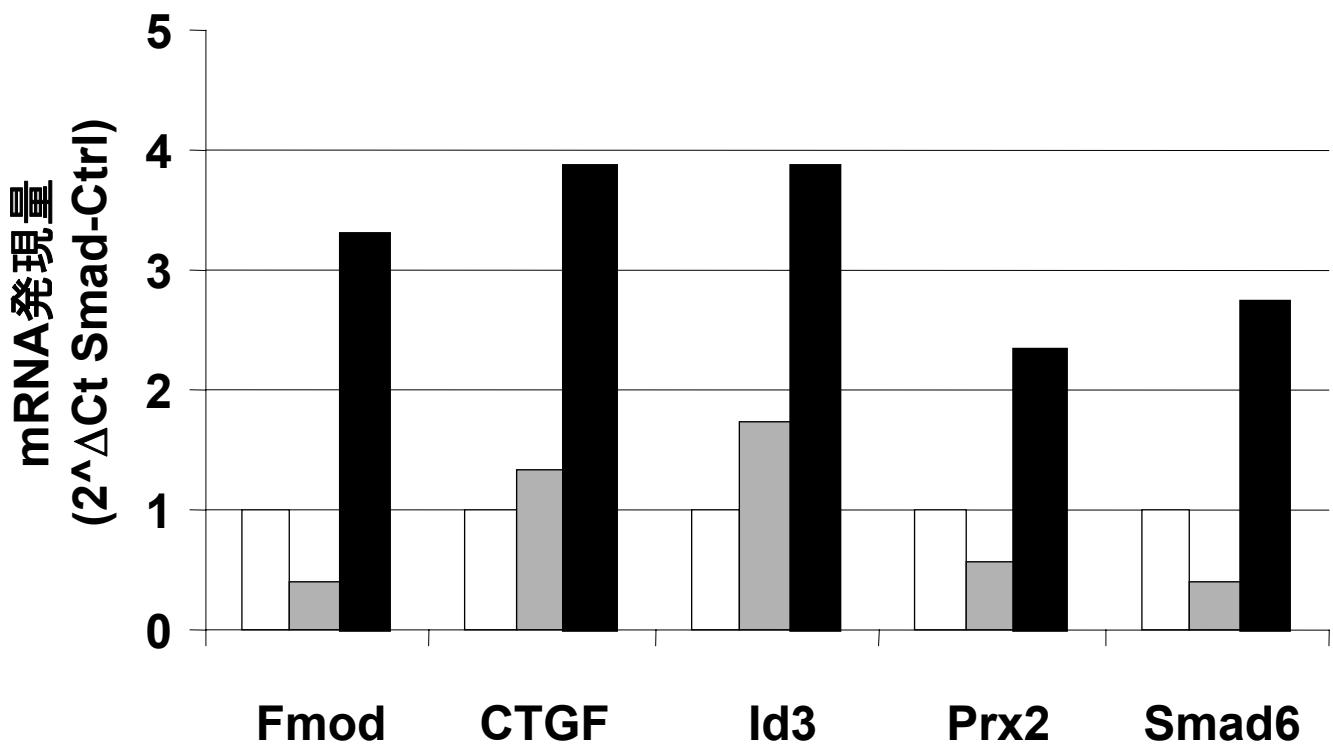


図8 Smad8による転写活性化:BMP-2により誘導される遺伝子のSmad8による制御
 コントロールベクター(□)、Smad8(■)、または、Smad8とSmad4(■)をC2C12細胞に過剰発現させ、TaqMan PCRにてファイブロモジュリン(Fmod)、結合組織成長因子(CTGF)、分化阻害因子(Id3)、ホメオボックスタンパク質(Prx2)、Smad6のmRNA発現量を測定した。縦軸には、各遺伝子の測定されたサイクル数をGAPDHのサイクル数で標準化し、コントロールとの差を2乗することにより、発現量を相対的に表示した。Smad8単独の場合、Fmod、Prx2、Smad6の発現は、コントロールと比較して、若干抑制されたが、Smad4が共存する場合、これら全ての遺伝子の発現は相乗的に活性化された。

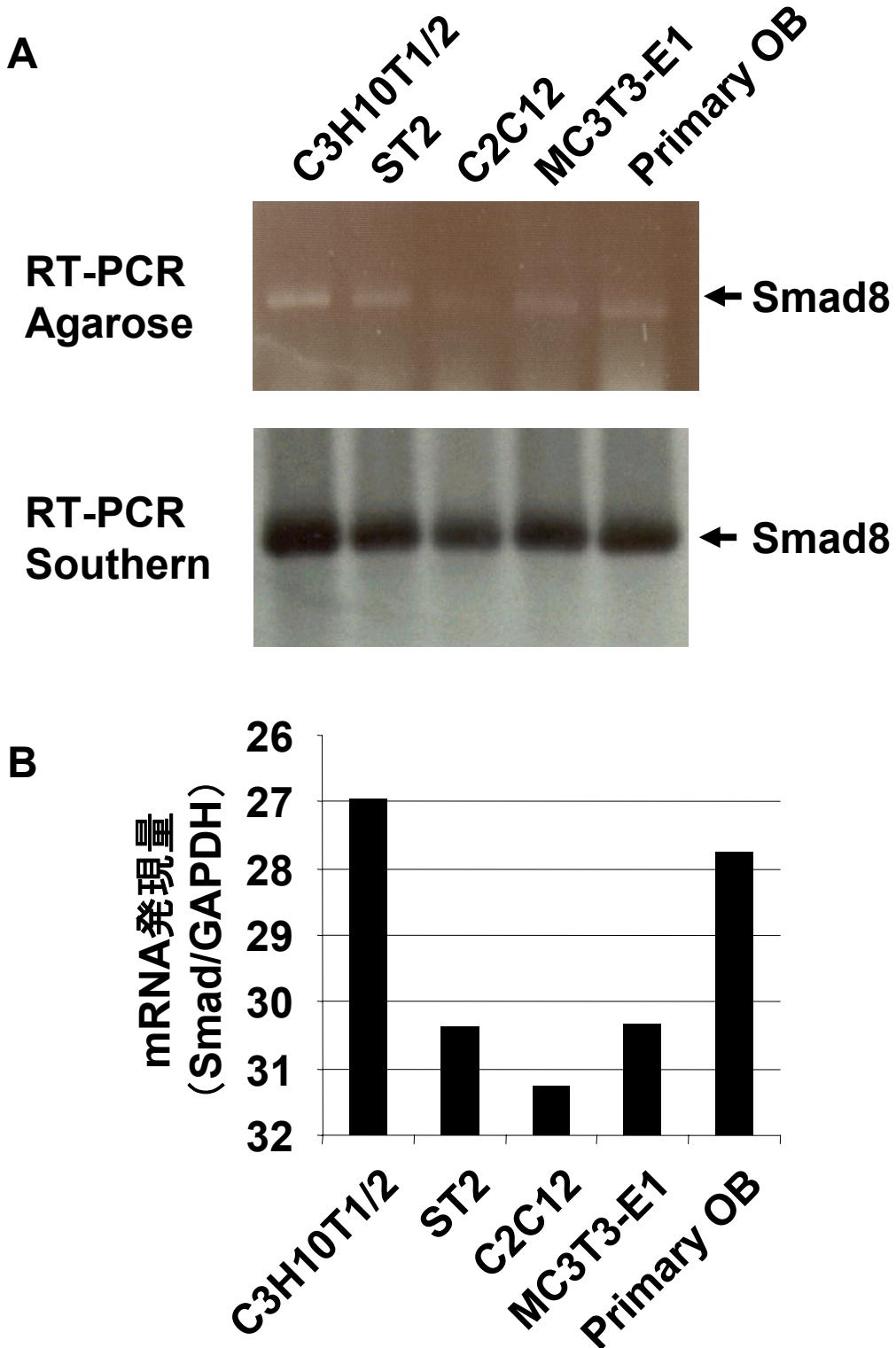


図9 骨芽細胞系細胞株におけるSmad8の発現

図Aの上のパネル: PCR産物のアガロース電気泳動パターン。下のパネル: アガロース電気泳動後のサザンブロッティングによるパターン。図B: TaqMan PCRにより定量化したSmad8のmRNA発現量をGAPDHで標準化した値。Smad8 mRNAはこれらの細胞において構成的に発現されており、C3H10T1/2細胞と初代培養骨芽細胞での発現が高く、C2C12細胞での発現が低いことが示された。

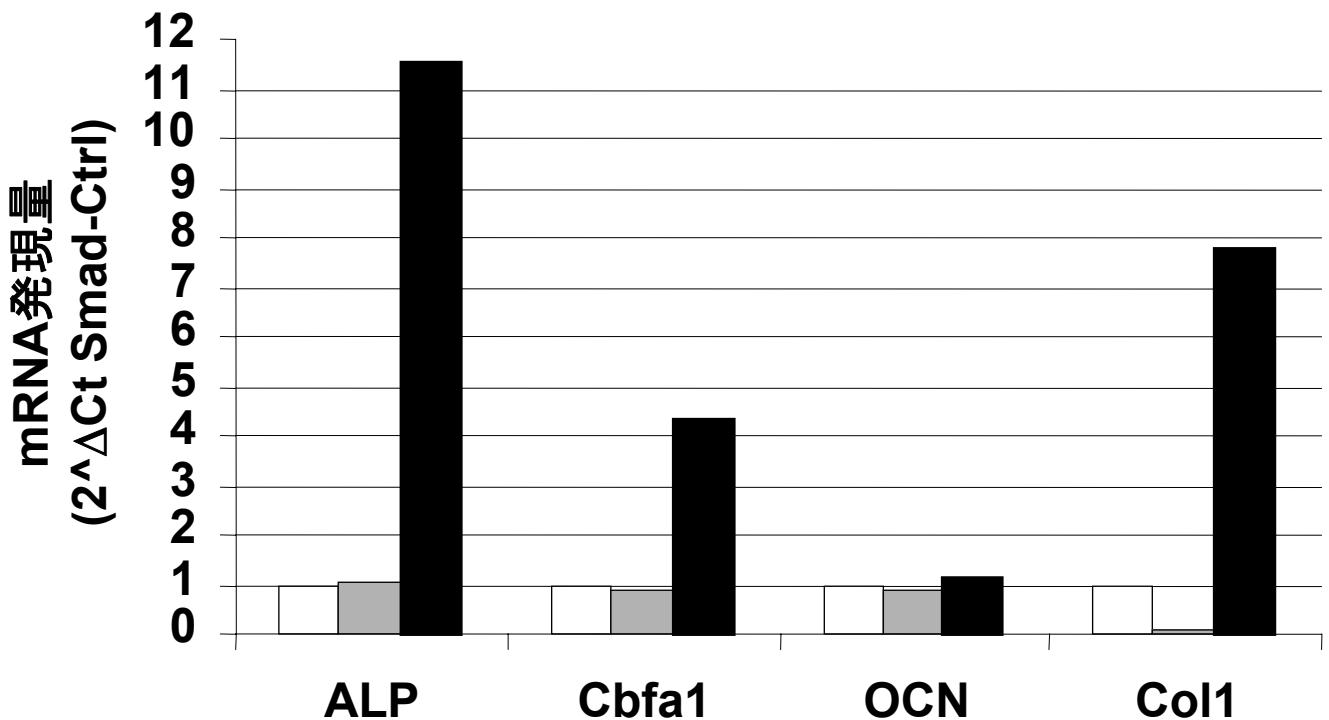


図10 Smad8による骨芽細胞マーカーの発現誘導

コントロールベクター(□)、Smad8(■)、または、Smad8とSmad4 (▨)をC2C12細胞に発現させ、TaqMan PCRを用いてALP、Cbfa1、オステオカルシン(OCN)、I型コラーゲン(Col1)の発現量を測定した。縦軸の値は、図8と同様にmRNA発現量を相対的に示す。Smad8単独ではこれらの発現はほとんど誘導されなかったのに対し、Smad4が共存する場合、ALP、Cbfa1およびCol1遺伝子の発現は相乗的に増加した。一方、OCNの発現はSmad8とSmad4が共存しても極めて軽度にしか誘導されなかった。

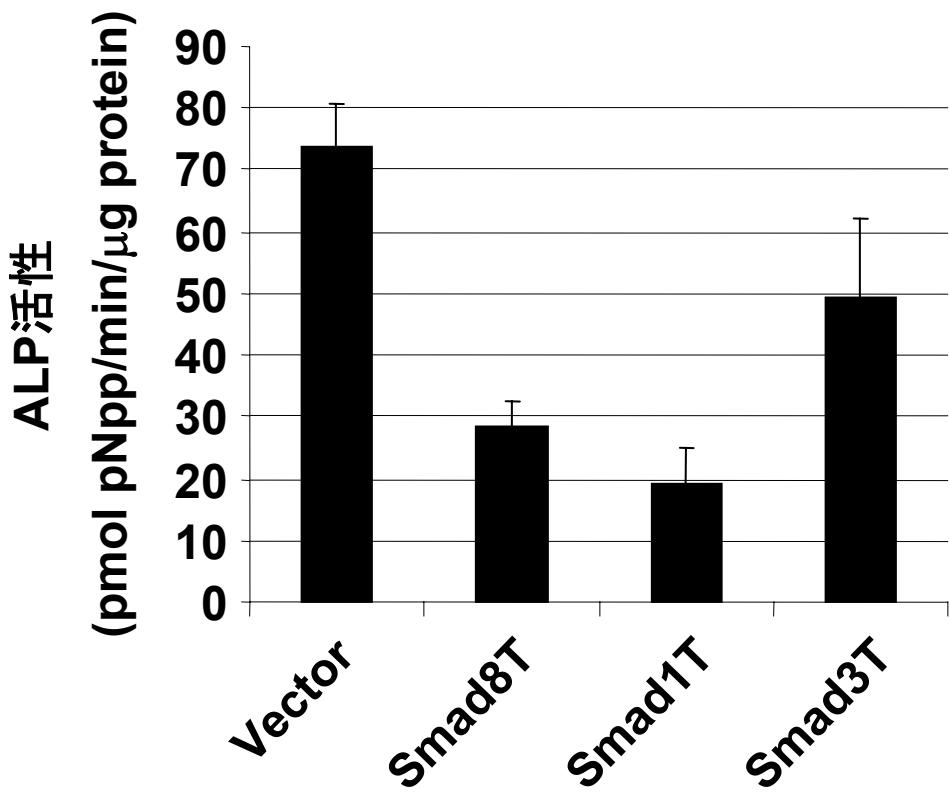


図11 Smad8変異体によるALP活性の阻害

コントロールベクター、Smad8変異体(Smad8T)、Smad1変異体(Smad1T)、またはSmad3変異体(Smad3T)をC2C12細胞に発現させ、BMP-2により誘導されるALP活性に対する影響を示した。Smad8Tは、Smad1Tと同様に、BMP-2により誘導されるALP活性を完全に抑制した。一方、Smad3Tは、Smad8やSmad1ほど強い抑制効果を示さなかった。

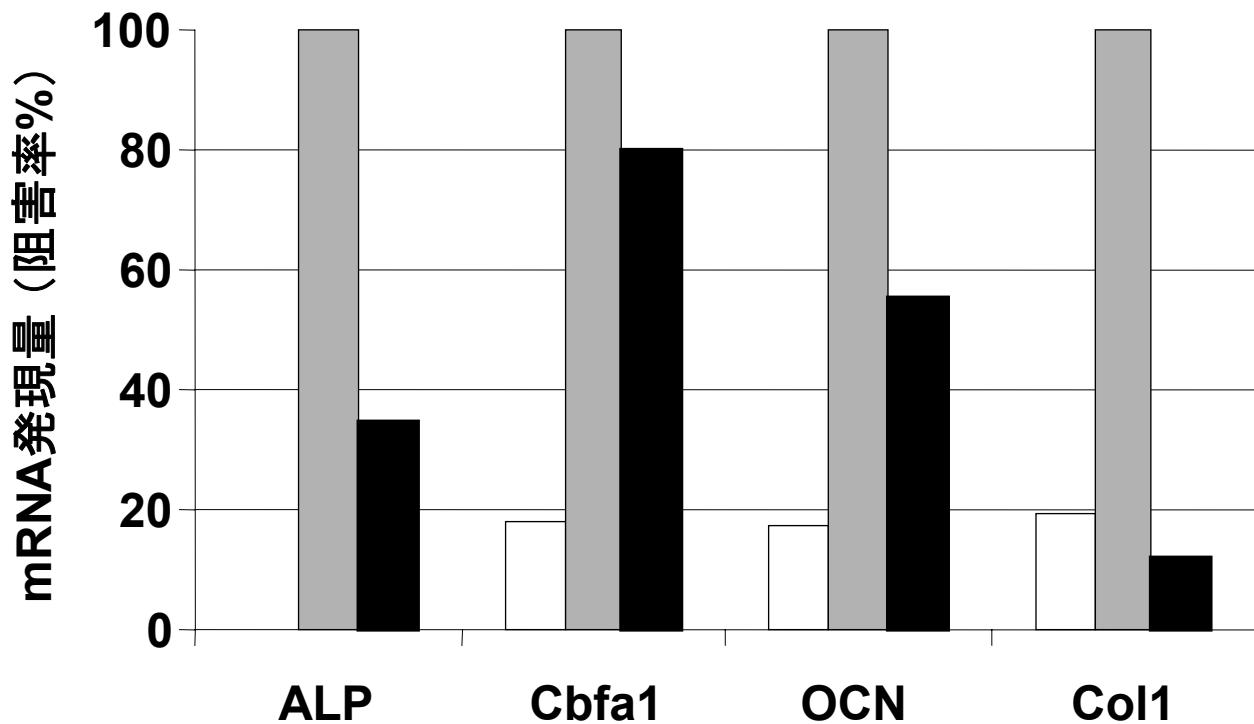


図12 Smad8変異体による骨芽細胞マーカーmRNA発現の阻害

骨芽細胞マーカーのmRNAの発現をTaqMan PCRを用いて測定した。縦軸の値は、測定されたサイクル数をGAPDHのサイクル数で標準化し、BMP-2により誘導される各々のmRNA発現量を100%（■）として、BMP-2未処理のコントロール（□）、Smad8Tが存在する場合のBMP-2により誘導される各々のmRNA発現量（■）を示す。BMP-2により誘導されるALP、Cbfa1、OCN、Col1の発現はSmad8Tにより抑制された。