

筋分化における転写調節因子 Id の発現制御機構の解析

研究代表者：黒岡 尚徳（医学部、准教授）

概要	
	転写調節因子 Id は、bHLH 型転写因子の機能を阻害し、筋肉、神経、血球細胞などの分化を抑制する。一方で Id は、血清刺激後、短時間で発現が上昇する初期応答遺伝子に分類されるが、その発現調節機構は不明な点が多い。代表者は昨年度、マウス線維芽細胞において、血清刺激による Id2 遺伝子の発現上昇に、BMP シグナルが重要であることを明らかにした。BMP シグナルは筋分化を阻害するが、筋肉の前駆細胞である筋芽細胞は、培地の血清濃度を下げると分化が誘導されることから、筋分化における BMP シグナル活性低下の重要性が考えられた。本研究では、その可能性を検証するため、低分子化合物 Dorsomorphin を用いて筋芽細胞の内在性 BMP シグナルを阻害した。その結果、Id の発現低下と筋分化の誘導が観察された。またその際、Id の発現低下が筋分化の誘導に重要であることが明らかになった。
関連キーワード	Id、血清刺激、BMP シグナル、筋分化、Dorsomorphin

研究の背景

HLH タンパク質 Id ファミリー (Id1~Id4) は、bHLH 型転写因子 (特に E タンパク質) に直接結合し、その機能を阻害することにより、様々な細胞の分化を抑制する転写調節因子である。特に筋肉、神経、血球細胞の分化に重要であることが細胞や個体レベルで報告されているが、分化誘導・抑制シグナルがどのように Id の発現を制御しているのかは不明な点が多い。一方で Id は、様々な刺激で発現が変動することが示されており、血清刺激後短時間で発現が上昇する、初期応答遺伝子に分類される。他の代表的な初期応答遺伝子として知られる AP1 (Jun や Fos)、Egr-1、c-Myc は、血清刺激による遺伝子発現に、MAP キナーゼや PI3 キナーゼ

が重要であることが示されているが、Id 遺伝子の発現制御機構は、これまでよくわかっていなかった。代表者が所属する研究室では以前、血清刺激によるマウス Id2 遺伝子の発現に、DNA 結合タンパク質である RFX1 が関与していることを報告したが (Wang et al. *J. Biol. Chem.* 282: 26167-26177, 2007.)、ノックダウンの実験から、必須の働きをする因子が他にあることが予想された。代表者は、そのような因子の探索を行い、昨年度の生命科学複合教育センター学内共同研究等の研究課題において、マウス線維芽細胞の NIH3T3 を用いて、血清刺激による Id2 遺伝子の発現上昇に、BMP シグナルが重要な働きをしていることを明らかにした。

研究の目的

本研究は、様々な細胞の分化を抑制する作用を持つ Id の遺伝子発現が、どのような分化誘導・抑制シグナルによって制御されているのかを明らかにすることで、細胞分化における Id の生理機能を、より深く理解することを目的とするものである。

代表者は、線維芽細胞以外でも、血清刺激で Id の発現が上昇することを確認しており、そのうちいくつかの場合で、BMP シグナルが関与していると考えられる。BMP シグナルは、筋肉や神経の分化を抑制する (細胞によっては、分化を促進する) が、

Id は、その代表的な標的遺伝子としても知られる。また、筋肉の前駆細胞である筋芽細胞は、培地の血清濃度を下げると細胞が融合し、最終的に筋管を形成するが、この際に生じる Id の発現の低下が重要であることが示されている。通常は、血清により活性化された BMP シグナルが、Id の発現を介して筋芽細胞の分化を抑制していると推測されることから、本研究は、低分子化合物を用いて筋芽細胞の内在性 BMP シグナルを阻害し、Id の発現や分化の状態が、どのように変動するのか検討した。

研究の成果

(1) Dorsomorphin は、筋芽細胞において Id の発現を低下させ、かつ筋分化を誘導する。

増殖培地(GM;growth media,+15% FCS;ウシ胎児血清)で培養しているマウスの筋芽細胞 C2C12 を、低濃度(1 μM 以下)で BMP シグナルを阻害することが最近報告された低分子化合物 Dorsomorphin (BMP-I 型受容体キナーゼ阻害剤;別名 Compound C)で一定時間処理後、回収した細胞抽出液を用いて、ウェスタンブロットを行った(図 1)。その結果、BMP シグナル活性の指標となる Smad1/5/8 のリン酸化は、阻害剤処理後 6 時間でほぼ消失し、Id1-3 の発現も、36 時間後までに徐々に低下していくことがわかった。逆に 12 時間後からは、初期の筋分化に重要な働きをする転写因子 Myogenin、そして 24 時間後からは、後期の筋分化マーカーであるミオシン重鎖(MHC)や、トロポニン T の発現が認められた。これら分子の発現変動パターンは、これまでに報告されている、筋芽細胞を分化誘導培地(DM; differentiation media,+2% HS;ウマ血清)で培養した際に観察されるものと、非常によく似ていた。

次に、筋芽細胞の内在性 BMP シグナルを阻害した場合、形態的に筋分化が誘導されるかどうか調べた。C2C12 細胞を 0.3 μM Dorsomorphin で 48 時間処理し、ミオシン重鎖、またはトロポニン T に対する抗体を用いて免疫染色を行った(図 2 左側)。その結果、Dorsomorphin 処理によって、筋芽細胞が融合して筋管を形成し、さらに融合した細胞は、筋分化マーカーを強く発現していることが明らかになった。従来の、低血清培地による置換で誘導される筋管形成は、通常 72 時間以上を要することから(図 2 右側)、Dorsomorphin によって誘導される筋芽細胞の分化の効率は、非常によいと言える。

(2) Id の発現の低下は、Dorsomorphin による筋芽細胞の分化誘導に重要である。

BMP シグナルの阻害による Id の発現の低下が、筋芽細胞の分化を誘導する直接の要因かどうかを検討するため、Id1 或いは Id2 を恒常的に発現する C2C12 細胞株を、レトロウイルスを用いて樹立した。その結果、これらの細胞株では Dorsomorphin 処理(1 μM , 48 時間)による細胞の融合と筋管の形成が、顕著に阻害されることがわかった(図 3)。Id の強制発現は、低血清培地への置換により誘導される筋芽細胞の分化も顕著に阻害されており、これらのことは、増殖培地に含まれる血清によって活性化された内在性の BMP シグナルが、主に Id の発現を介して、筋芽細胞を未分化な状態に維持していることを強く示唆するものである。

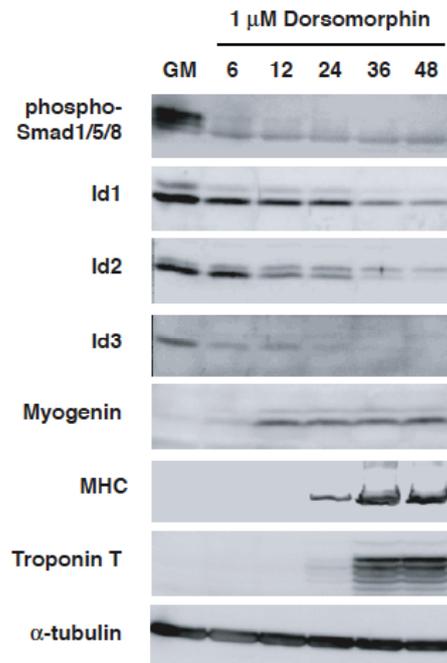


図 1. Dorsomorphin による Id と筋特異的因子の発現の変動(ウェスタンブロット)

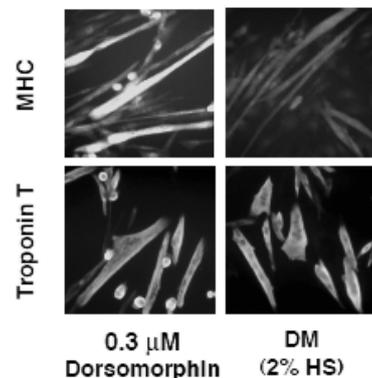


図 2. Dorsomorphin による筋芽細胞の融合と筋分化マーカーの発現(免疫染色)

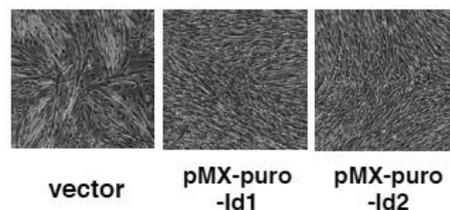


図 3. Id の強制発現による筋分化の阻害

特記事項・発表論文など

「本研究に関わる発表論文」

Takeshi Nakahiro, Hisanori Kurooka, Kentaro Mori, Kazuo Sano, and Yoshifumi Yokota.

Identification of BMP responsive elements in the mouse Id2 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 399(3): 416-421, 2010.