
原 著

High Temperature Requirement Protein A1 による Bone Morphogenetic Protein - 2/4 シグナル伝達の阻害機序

野 崎 洋 明

新潟大学大学院医歯学総合研究科神経内科学分野
(主任：西澤正豊教授)

**A Novel Mechanism for inhibition of Bone Morphogenetic Protein - 2/4 Signaling
by High Temperature Requirement Protein A1**

Hiroaki Nozaki

*Department of Neurology, Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Science
Course for Molecular and Cellular Medicine/
Molecular Neuroscience and Brain Disease/Neurology
(Director: Prof. Masatoyo NISHIZAWA)*

要 旨

High temperature requirement protein A1 (HtrA1) はセリンプロテアーゼ活性を持つ HtrA ファミリータンパクの一員である。HtrA1 は bone morphogenetic protein (BMP) - 2 及び BMP - 4 シグナル伝達を抑制するが、その機序は不明である。筆者は、HtrA1 が BMP - 2/4 前駆体を切断し、そのシグナル伝達を阻害するという仮説をたて、これを検証した。培養細胞系を用い、HtrA1 存在下での BMP - 2/4 の量を検討した。さらに、細胞混合アッセイを用い、その作用する場を検討した。また、細胞内において、HtrA1 由来の BMP - 2/4 前駆体の断片を検出した。結果として、HtrA1 存在下では、培養液中の成熟型 BMP - 2/4 の量が減少し、この効果は HtrA1 と BMP - 2/4 前駆体が同一の細胞内に存在するときのみ認められた。さらに、小胞体において、HtrA1 が BMP - 2/4 前駆体の C 末端を切断することを示した。成熟型 BMP - 2/4 は BMP - 2/4 前駆体がゴルジ装置以降で furin によるプロセッシングを受けて産生されるが、本論文は、

Reprint requests to: Hiroaki NOZAKI
Department of Neurology
Brain Research Institute Niigata University
1 - 757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8585 Japan

別刷請求先：〒951 - 8585 新潟市中央区旭町通 1 - 757
新潟大学脳研究所神経内科 野崎洋明

HtrA1 が furin によるプロセッシングに先行して小胞体で BMP-2/4 前駆体を切断し、成熟型 BMP-2/4 の量を減少させることで、そのシグナル伝達を阻害することを示した。

キーワード：high temperature requirement protein A1 (HtrA1), bone morphogenetic protein (BMP), furin, endoplasmic reticulum (ER)

はじめに

High temperature requirement protein A1 (HtrA1) は HtrA ファミリーに属する 480 アミノ酸からなる分子量 50kDa の分泌タンパクである。他の HtrA ファミリーと同様に、トリプシン様セリンプロテアーゼモチーフと PDZ モチーフを有しており、セリンプロテアーゼ活性を持つ¹⁾²⁾。近年、HtrA1 の新たな機能として、セリンプロテアーゼ活性依存性に TGF- β ファミリーのシグナル伝達を阻害することが報告された³⁾。しかし、その機序は明らかにされていない。

TGF- β ファミリーは多機能性サイトカイン群であり、さまざまな細胞の増殖、分化、遊走、アポトーシスを制御している⁴⁾。その中でも bone morphogenetic protein (BMP) は、骨の形成・修復・再生や発生に関与することが知られている⁵⁾。加えて、血管系にも関与し、圧負荷により、血管内皮細胞での BMP-2 の発現が亢進すること⁶⁾、BMP-2 が血管平滑筋細胞の増殖を抑制すること⁷⁾、シェアストレスによる血管の硬化性変化に BMP-4 が関与すること⁸⁾、肺高血圧症における血管の再構築や血管平滑筋細胞の増殖を BMP-4 が促進すること⁹⁾ が報告されており、BMP シグナルの血管疾患への関与が注目されている。一方、HtrA1 はストレス下の脳小血管内皮細胞で発現が増加する¹⁰⁾。また、HtrA1 のプロモーターの遺伝子多型が血管増殖性の加齢性黄斑変性症の遺伝的危険因子であり、機序として HtrA1 の発現増加が関与することが報告されている¹¹⁾。これらのことから、筆者は、BMP-2 及び BMP-4 シグナル伝達が血管の増殖、維持、さらに血管病態に深く関わっていると推察し、その調節機構の一つとして HtrA1 に注目した。

BMP によるシグナル伝達は、BMP の産生、成熟、受容体との反応、細胞内のセカンドメッセンジャーにより調節されている。BMP は、まずシグナルペプチドを持つ前駆体タンパクとして産生され、小胞体にてシグナルペプチドの切断後、糖鎖修飾を受け 2 量体となる⁵⁾。この 2 量体は trans Golgi network (TGN) および post TGN 内で前駆体タンパク転換酵素である furin により 2 段階の切断を受け、成熟型ペプチドの 2 量体 (成熟型 BMP) となり、細胞外に分泌される¹²⁾。成熟型 BMP は細胞表面に存在するセリン/スレオニンキナーゼ受容体によって認識され、細胞内のセカンドメッセンジャーである smad1, 5 のリン酸化を促進する。リン酸化された smad1, 5 は smad4 と複合体を形成して核内に移行し、標的となる遺伝子のプロモーター領域に結合して目的とする遺伝子群を誘導する¹³⁾。HtrA1 による BMP シグナル伝達の抑制は、これらの過程のいずれかに関与する。本論文では、この HtrA1 による BMP シグナル伝達抑制の場と機序を明らかにすることを目的とした。

方 法

コンストラクトの作成

全長型ヒト HtrA1 cDNA (Open biosystem) を pENTR D-TOPO ベクター (Invitrogen) に PCR 法を用いてサブクローニングした後、LR clonase (Invitrogen) を用いて、pcDNA-DEST40 ベクター (Invitrogen) に入れ替えた。また、制限酵素処理にて pEGFP-N3 (Clontech) に挿入した。ヒト BMP-2 前駆体 C-FLAG 発現ベクターとヒト BMP-4 前駆体 C-FLAG 発現ベクターは、ヒト BMP-2 前駆体 cDNA あるいはヒト BMP-4

前駆体 cDNA (Open biosystem) を PCR 法にて primer (BMP-2 前駆体; 5'-gcgaattcagccgccacca tgggtggccggg, 3'-cgggatccgcagcgacaccaca, BMP-4 前駆体; 5'-gcgaattcagccgccaccatgattctgg, 3'-cgggatccgcagcgccaccacatcctc) を用いて増幅し、得られた産物を EcoR1/BamH1 で切断後、p3 × FLAG-CMVTM-14 発現ベクター (SIGMA-ALDRICH) に挿入して作製した。BMP シグナルを検討するレポーター遺伝子 pGL3-Id985WT, 全長型マウス smad1, 全長型マウス smad4 発現ベクターは、片桐岳信博士 (埼玉医科大学ゲノム医学研究センター) より供与していただいた。ヒト BMP-2 前駆体, ヒト BMP-4 前駆体発現ベクターは、ジャン・クリスチャン博士 (Oregon Health and Science University) より供与していただいた。全長型ヒト furin 発現ベクターは、中山和久博士 (京都大学大学院薬学研究科) より供与していただいた。

ELISA Assay

Human embryonic kidney (HEK) 293T 細胞を Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Invitrogen) に 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen), 1% penicillin-streptomycin (PS, Invitrogen) を添加して培養し、6-well dish に撒いた。翌日、Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いて、ヒト BMP-2 前駆体あるいはヒト BMP-4 前駆体と HtrA1 WT あるいは HtrA1 S328A の発現ベクターをトランスフェクションし、6時間後に培養液を Opti-MEM (Invitrogen) に入れ替え、18時間後に培養液を回収した。回収サンプルは BMP-2 Immunoassay Kit (R&D systems) あるいは BMP-4 Immunoassay Kit (R&D systems) を用いて定量を行った。

ウェスタンブロット解析

HEK293T 細胞を DMEM (10% FBS, 1% PS) で培養し、6-well dish に撒きなおした。翌日、Lipofectamine2000 を用いて、BMP-2 前駆体あるいは BMP-4 前駆体と、HtrA1 WT あるいは HtrA1 S328A, furin の発現ベクターをトランスフェ

クションした。24時間後に細胞を PBS で 2 回洗い、lysis buffer (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 5mM EDTA) を用いて回収した。回収サンプルは BCA assay (Thermo) でタンパク定量を行い、総タンパク量を合わせた後、同容量の sample buffer (95% Laemmli's sample buffer (BIO-RAD), 5% 2-Mercaptoethanol (SIGMA)) を加えた。100℃で 5 分間処理した後、電気泳動を行った。泳動後、PVDF 膜に転写し、5% スキムミルク含有 PBS-T (0.1% Tween20 添加 PBS) でブロッキングした。ブロッキング後、1 次抗体 monoclonal anti-HtrA1 antibody (1:2000; R&D systems), rabbit polyclonal anti-BMP-2 antibody (1:1000; Pepro Tec, Inc), monoclonal anti-BMP-4 antibody (1:500; Santa Cruz Biotechnology), monoclonal anti-FLAG M2 antibody (1:50000; Sigma-Aldrich), monoclonal anti-furin antibody (1:2000; ALEXIS Biochemicals), 2 次抗体 Goat polyclonal anti-mouse HRP conjugated antibody (1:10000; Chemicon Temecula), Goat polyclonal anti-rabbit HRP conjugated antibody (1:50000; Chemicon Temecula) で抗原抗体反応を行い、enhanced chemiluminescence (Millipore Corporation) で検出した。定量解析は scion image soft ware (Scion Corporation) にておこなった。

BMP シグナルレポーターアッセイ

BMP シグナル伝達系のレポーターとして、マウス Id 遺伝子由来の BMP 応答性プロモーターエレメントによりルシフェラーゼ遺伝子が操作されるレポータープラスミド pGL3-Id985WT を使用した¹⁴⁾。内部コントロールとして、pRL-TK (Promega) を使用した¹⁵⁾。マウス C2C12 筋芽細胞を DMEM (10% FBS, 1% PS) で培養し、24-well dish にまき、翌日、培養液を Opti-MEM に交換した。4時間後に Lipofectamine2000 を用いて、BMP-2 前駆体あるいは BMP-4 前駆体、HtrA1, Smad1, Smad4 の発現ベクターと、pGL3-Id985WT-firefly luciferase, pRL-TK-renilla luciferase を同時にトランスフェクションした。

その際、各 well の総 DNA 量が等しくなるように、pcDNA-DEST40 ベクター (Invitrogen) を加えて補正した。トランスフェクション 24 時間後に passive lysis buffer (Promega) を用いて細胞溶解液を回収し、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて、SIRIUS Luminometer (Berthold Detection Systems GmbH) で測定した。各ルシフェラーゼ活性の値は、内部コントロールとなる pRL-TK のルシフェラーゼ活性で補正した。

脱糖鎖処理

BMP の Western Blot 用 サンプルに 10 × Denaturing Buffer (10 % β-mercaptoethanol, 5 % SDS) を加え、100 °C で 10 分間処理した。処理後、10 × G7 Buffer (0.5M Sodium Phosphate) と 10 × NP40 を加えて混和し、ペプチド：N-グリカナーゼ F (PNGaseF) を 10U/tube となるように加えて、37 °C で 1 時間反応させた。

細胞混合アッセイ

HEK293T 細胞を DMEM (10 % FBS, 1 % PS) で培養し、6-well dish にまいた。翌日、Lipofectamine2000 を用いて、BMP-2 前駆体もしくは BMP-4 前駆体と Mock (pcDNA-DEST40) (a), BMP-2 前駆体もしくは BMP-4 前駆体と HtrA1 WT (b), HtrA1 WT のみ (c), Mock のみ (d) の発現ベクターをトランスフェクションした細胞を作成した。4 時間後に 0.25 % トリプシン EDTA で細胞を剥がした後、DMEM (10 % FBS, 1 % PS) で中和し、a と d, b と d, a と c の細胞をそれぞれよく混和し、6-well dish にまきなおした。さらに 2 時間後に培養液を Opti-MEM に入れ替えて、トランスフェクションの 24 時間後に培養液を回収した。

共焦点レーザー顕微鏡

Cos-7 細胞を DMEM (10 % FBS, 1 % PS) で培養し、6-well dish に播きなおした。Lipofectamine2000 を用いて、EGFP-HtrA1 WT の発現ベクターをトランスフェクションし、4 時

間後に培養液を DMEM (10 % FBS) に入れ替えた。トランスフェクション 24 時間後に glass bottom dish に細胞を播きなおした。さらに 24 時間後に ER tracker 1uM で 30 分処理し、4 % パラホルムアルデヒドを用いてチャンバースライド (IWAKI) 上に固定した。共焦点レーザー顕微鏡で観察を行い、AquaCosmos (Hamamatsu Photonics) で解析した。写真は 1snap/10sec で撮影した。

統計解析

SPSS ver11.0.1J (SPSS Inc.) を用いた。

結 果

培養液中の成熟型 BMP-2/4 量に対する HtrA1 の効果

HtrA1 の BMP シグナル伝達への影響を検討するため、マウス筋芽細胞 C2C12 を用いて、レポーターアッセイを行った。その結果、既報通り、HtrA1 WT は BMP-2/4 シグナル伝達を抑制し (BMP-2; Mock: 4.69 ± 0.25 , WT: 2.91 ± 0.08 , $p < 0.01$), (BMP-4; Mock: 4.79 ± 0.12 , WT: 2.71 ± 0.11 , $p < 0.01$), 一方で、セリンプロテアーゼ活性を欠いた変異体である HtrA1 S328A は、BMP シグナル伝達を抑制しないことを確認した (BMP-2; S328A: 4.17 ± 0.25), (BMP-4; S328A: 4.96 ± 0.67) (図 1A, B)。

次に、この抑制効果が培養液中に分泌される成熟型 BMP-2/4 の量の低下によるものかどうかを検討するため、HEK293T を用いて、培養液中の成熟型 BMP-2/4 の定量を行った。HtrA1 WT 導入細胞では、培養液中の成熟型 BMP-2/4 の量が有意に減少した (BMP-2; Mock: 9076 ± 664 pg/mL, WT: 2681 ± 130 pg/mL, $p < 0.001$), (BMP-4; Mock: 835 ± 70 pg/mL, WT: 468 ± 67 pg/mL, $p < 0.01$) (図 1C, D)。一方、セリンプロテアーゼ活性を欠いた変異体である HtrA1 S328A 導入細胞では、成熟型 BMP-2/4 の量に有意差を認めなかった (BMP-2; S328A: 7149 ± 365 pg/mL), (BMP-4; S328A: 683 ± 20 pg/mL) (図

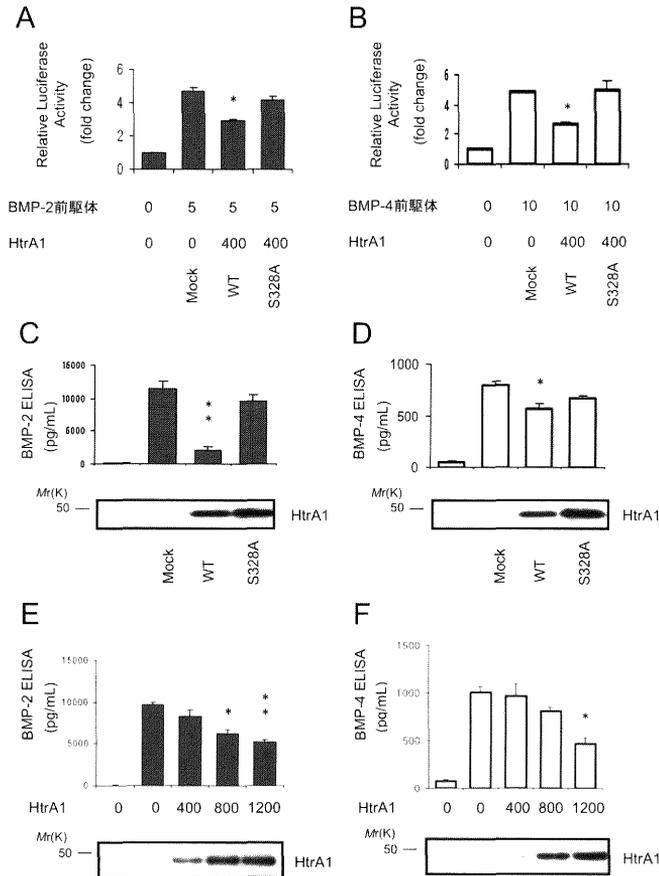


図1 HtrA1のBMPシグナル伝達に対する効果

(A) (B) レポーターアッセイを用いた HtrA1 存在下での BMP-2/4 シグナル伝達の検討

C2C12細胞に次の発現ベクターを導入した：Mock (pcDNA-DEST40) (400ng), HtrA1 野生型 (WT) (400ng), HtrA1 S328A (400ng) のいずれかに加えて, BMP-2前駆体 (5ng) もしくは BMP-4前駆体 (10ng), Smad1 (50ng), Smad4 (50ng), BMPシグナルのレポーターとして pGL3-Id985WT (250ng), リファレンスとして pRL-TK (25ng). 縦軸は, firefly ルシフェラーゼの発光量を renilla ルシフェラーゼの発光量で補正し, 前駆体 BMP-2/4 および HtrA1 を導入しない細胞での値に対する, 各条件での比率を示す. 平均±標準誤差 (n = 5). 群間比較は, ANOVA の後, Bonferroni 法にて行った * P < 0.01.

(C) (D) HtrA1 存在下での分泌型 BMP-2/4 量の検討

HEK293T細胞に次の発現ベクターを導入した：Mock (pcDNA-DEST40) (1200ng), HtrA1 WT (1200ng), HtrA1 S328A (1200ng) のいずれかに加えて, BMP-2前駆体 (50ng) (C) もしくは BMP-4前駆体 (40ng) (D). ベクター導入から24時間後に培養液中の BMP-2 もしくは BMP-4 を ELISA にて定量した. 縦軸の単位は pg/mL. データは平均±標準誤差 (n = 3). 群間比較は, ANOVA の後, Bonferroni 法にて行った * P < 0.01, ** P < 0.001. 下段は HtrA1 の免疫プロットを示す.

(E) (F) HtrA1 発現量による分泌型 BMP-2/4 量の検討

HEK293T細胞に次の発現ベクターを導入した：HtrA1 WT (0ng, 400ng, 800ng, 1200ng) に加えて, BMP-2前駆体 (50ng) (E) もしくは BMP-4前駆体 (40ng) (F). 導入ベクターの DNA 量が等しくなるように Mock (pcDNA-DEST40) で補正した. ベクター導入から24時間後に培養液中の BMP-2 もしくは BMP-4 を ELISA にて定量した. 縦軸の単位は pg/mL. データは平均±標準誤差 (n = 3). 群間比較は, ANOVA の後, Bonferroni 法にて行った * P < 0.01, ** P < 0.001. 下段は HtrA1 の免疫プロットを示す.

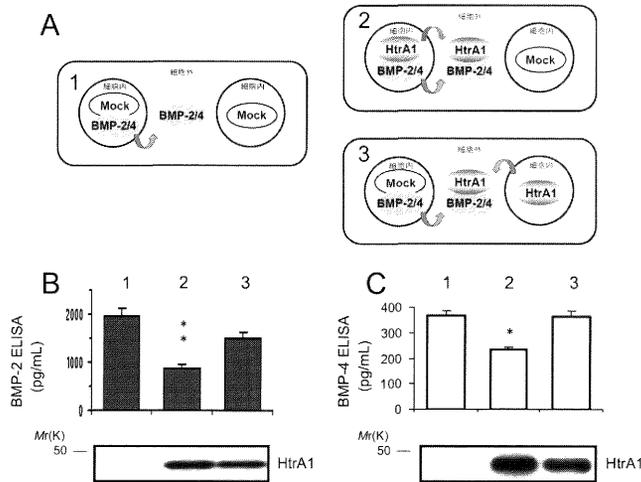


図2 成熟型 BMP-2/4 を減少させる HtrA1 の作用部位

(A) 細胞混合アッセイの模式図

HEK293T 細胞に次の発現ベクターを導入した：1 左 BMP-2 前駆体 (50ng) もしくは BMP-4 前駆体 (40ng) と Mock (1200ng), 右 Mock (1200ng)；2 左 BMP-2 前駆体 (50ng) もしくは BMP-4 前駆体 (40ng) と HtrA1 WT (1200ng), 右 Mock (1200ng)；3 左 BMP-2 前駆体 (50ng) もしくは BMP-4 前駆体 (40ng) と Mock (1200ng), 右 HtrA1 WT (1200ng). 各々の細胞を共培養し、培養液中の成熟型 BMP-2/4 量を解析した。BMP-2/4 と HtrA1 が、細胞内で反応する場合は 2 の条件で、細胞外でのみ反応する場合は 3 の条件で、培養液中の成熟型 BMP-2/4 量の減少を認める。

(B) (C) 細胞混合アッセイによる BMP-2/4 の定量

A の条件で HEK293T 細胞に発現ベクターを導入した (B：BMP-2 前駆体, C：BMP-4 前駆体を導入した)。ベクター導入から 4 時間後にトリプシン処理を行い、各々の細胞を混合培養した。ベクター導入から 24 時間後の培養液中の BMP-2 もしくは BMP-4 を ELISA で定量した。(B, C レーン 1：図 2A-1 の条件；B, C レーン 2：図 2A-2 の条件；B, C レーン 3：図 2A-3 の条件)。縦軸の単位は pg/mL。データは平均±標準誤差 (n = 3)。統計解析は、ANOVA の後、群間比較を Bonferroni 法にて行った * P < 0.01, ** P < 0.001。下段は HtrA1 の免疫プロットを示す。

IC, D)。また、培養液中の成熟型 BMP-2/4 の量は、HtrA1 の発現増加に伴い有意に減少した (BMP-2; HtrA1 WT 0ng/well: 9657 ± 306 pg/mL, HtrA1 WT 800ng/well: 6188 ± 521 pg/mL, p < 0.01, HtrA1 WT 1200ng/well: 5200 ± 288 pg/mL, p < 0.001), (BMP-4; HtrA1 WT 0ng/well: 1006 ± 63 pg/mL, HtrA1 WT 1200ng/well: 464 ± 65 pg/mL, p < 0.01) (図 1E, F)。

HtrA1 が成熟型 BMP-2/4 量に影響を与える場の検討

HtrA1 による BMP-2/4 シグナル伝達の抑制は、培養液中の成熟型 BMP-2/4 の減少によることが示された。その機序として、HtrA1 が、細胞外で成熟型 BMP-2/4 を減少させる可能性と、細胞内で BMP-2/4 前駆体から成熟型へのプロセッシングに影響を与える可能性を考えた。そこで、HtrA1 による BMP-2/4 シグナル伝達抑制の場を明らかにするため、HEK293T を用いた細胞混合アッセイ¹⁶⁾を行った (図 2A)。このアッセイは、

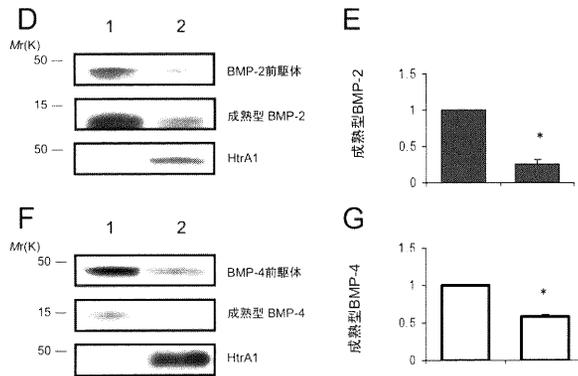


図2 成熟型 BMP-2/4 を減少させる HtrA1 の作用部位

(D) (E) 細胞内 BMP-2 のウェスタンブロット解析

(D) HEK293T 細胞に次の発現ベクターを導入した: Mock (1200ng) もしくは HtrA1 WT (1200ng) のいずれかに加えて, BMP-2 前駆体 (50ng). ベクター導入から 24 時間後に細胞を回収し, 細胞溶解液をウェスタンブロットで解析した. 上段は 45kDa の BMP-2 前駆体, 中段は 12kDa の成熟型 BMP-2, 下段は HtrA1 の免疫ブロットを示す. (E) 成熟型 BMP-2 のウェスタンブロット解析の定量解析を示す. 縦軸は D レーン 1 に対する arbitrary unit の比で表す. データは平均±標準誤差 (n = 3). 群間比較は, 等分散を仮定しない t 検定にて行った * P < 0.01.

(F) (G) 細胞内 BMP-4 のウェスタンブロット解析

(F) HEK293T 細胞に次の発現ベクターを導入した: Mock (1400ng) もしくは HtrA1 WT (1400ng) のいずれかに加えて, BMP-4 前駆体 (40ng). ベクター導入から 24 時間後に細胞を回収し, 細胞溶解液をウェスタンブロットで解析した. 上段は 47kDa の BMP-4 前駆体, 中段は 14kDa の成熟型 BMP-4, 下段は HtrA1 の免疫ブロットを示す. (G) 成熟型 BMP-4 のウェスタンブロット解析の定量解析を示す. 縦軸は F レーン 1 に対する arbitrary unit の比で表す. データは平均±標準誤差 (n = 3). 群間比較は, 等分散を仮定しない t 検定にて行った * P < 0.01.

BMP-2/4 前駆体発現細胞と Mock (pcDNA-DEST40) 導入細胞 (図 2A-1), BMP-2/4 前駆体と HtrA1 を共発現した細胞と Mock 導入細胞 (図 2A-2), BMP-2/4 前駆体発現細胞と HtrA1 発現細胞 (図 2A-3), それぞれの共培養系を作成し, 培養液中の成熟型 BMP-2/4 を定量したものである. その結果, BMP-2/4 前駆体発現細胞と Mock 導入細胞の共培養に比し, BMP-2/4 前駆体と HtrA1 を共発現した細胞と Mock 導入細胞の共培養では, 成熟型 BMP-2/4 量の有意な減少を認めた (BMP-2; 1976 ± 140 → 893 ± 70 pg/mL, p < 0.001), (BMP-4; 683 ± 20 → 364 ± 21 pg/mL, P < 0.01) (図 2B, C). 一方で, BMP-2/4 前駆体発現細胞と HtrA1 発現細胞の共培養では, 成熟型 BMP-2/4 量に有意差は認めなかつ

た. (BMP-2; 1976 ± 140 → 1498 ± 130 pg/mL), (BMP-4; 367 ± 19 → 364 ± 21 pg/mL) (図 2B, C). さらに, HtrA1 の共発現による細胞内の成熟型 BMP-2/4 量について HEK293T を用いた一過性発現系で検討したところ, 細胞内の成熟型 BMP-2/4 量は HtrA1 の共発現により有意に減少した (BMP-2; 0.26 ± 0.06, p < 0.01), (BMP-4; 0.58 ± 0.03, P < 0.01) (図 2D, E, F, G).

BMP-2/4 前駆体に対する HtrA1 の効果

HtrA1 が細胞内で成熟型 BMP-2/4 を減少させる機序として, BMP-2/4 前駆体から成熟型 BMP-2/4 へのプロセッシングに影響を与えている可能性を考え, これを検討した. 検出感度を上げるため, C 末端に FLAG tag をつけた前駆体

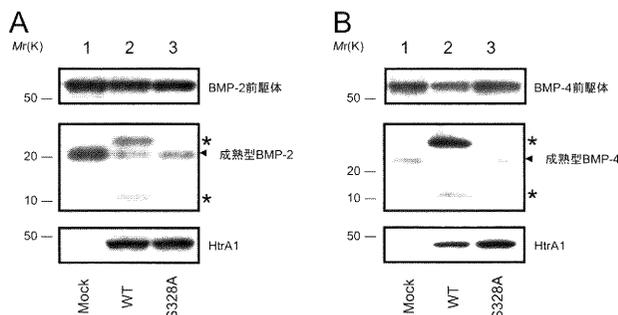


図3 HtrA1によるBMP-2/4前駆体の切断

(A) BMP-2前駆体C末FLAGのウェスタンブロット解析

HEK293T細胞に次の発現ベクターを導入した；BMP-2前駆体C末FLAG(50ng)に加え、レーン1：Mock(800ng)、レーン2：HtrA1 WT(800ng)、レーン3：HtrA1 S328A(800ng)。24時間後に細胞を回収し、細胞溶解液をウェスタンブロットで解析した。上段は53kDaのBMP-2前駆体、下段はHtrA1の免疫ブロットを示す。中段ではレーン2で20kDaの成熟型BMP-2(矢頭)に加えて、22kDaと10kDaの異常C末断片(★)を認める。

(B) BMP-4前駆体C末FLAGのウェスタンブロット解析

HEK293T細胞に次の発現ベクターを導入した；BMP-4前駆体C末FLAG(40ng)に加え、レーン1：Mock(800ng)、レーン2：HtrA1 WT(800ng)、レーン3：HtrA1 S328A(800ng)。24時間後に細胞を回収し、細胞溶解液をウェスタンブロットで解析した。上段は55kDaのBMP-4前駆体、下段はHtrA1の免疫ブロットを示す。中段ではレーン2で22kDaの成熟型BMP-4(矢頭)に加えて、24kDaと10kDaの異常C末断片(★)を認める。

BMP-2/4発現プラスミド(BMP-2/4前駆体-FLAG)を用い、HEK293Tにて解析した。HtrA1 WT発現下で、成熟型BMP-2/4(BMP-2; 20kDa, BMP-4: 22kDa)に加えて、BMP-2では22kDaと10kDa, BMP-4では24kDaと10kDaのC末断片を認めた(図3A, B)。一方、プロテアーゼ活性を喪失したHtrA1 S328A発現下では、成熟型BMP-2/4のみで、他のC末断片を認めなかった(図3A, B)。

BMP-2/4前駆体は、前駆体タンパク質転換酵素であるfurinによるプロセッシングを受ける。そこで次に、HtrA1によるBMP-2/4前駆体の切断と、furinによるBMP-2/4前駆体のプロセッシングとの関係をHEK293Tで検討した。まず、一定量の前駆体BMP-2/4とfurinの発現下において、HtrA1の量の違いによる効果を検討した。その結果、HtrA1の増加に伴い、成熟型BMP-2/4の細胞内の量が減少した(BMP-2; レーン4

0.54 ± 0.10, p < 0.05), (BMP-4; レーン3 0.74 ± 0.03, P < 0.05, レーン4 0.65 ± 0.07, P < 0.01)(図3C, D, E, F)。さらに、HtrA1の増加に伴い、BMP-2では22kDaと10kDa, BMP-4では24kDaと10kDaのC末断片が増加した(図3C, E)。

BMP-2/4前駆体にHtrA1が作用する細胞内の場合の検討

furinによるBMP-2/4前駆体の正常なプロセッシングはTGN以降で行われる。先の結果から、HtrA1がfurinによるこの正常なプロセッシングに先行して、BMP-2/4前駆体の切断を行う可能性を考えた。そこで、BMP-2/4前駆体-FLAGとHtrA1あるいはfurin発現ベクターをHEK293Tに導入し、小胞体-ゴルジ体輸送の阻害剤であるBrefeldin A(Sigma)処理下で解析した。Brefeldin Aによって小胞体からゴルジ体へのタ

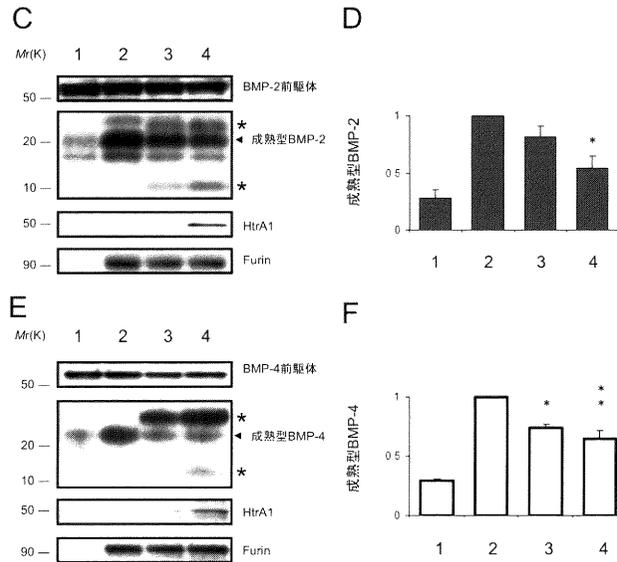


図3 HtrA1によるBMP-2/4前駆体の切断

(C) (D) HtrA1のfurinによるBMP-2のプロセッシングへの影響

(C) HEK293T細胞に次の発現ベクターを導入した；BMP-2前駆体C末FLAG(100ng)に加え、レーン1：HtrA1 WT(0ng), furin(0ng), レーン2：HtrA1 WT(0ng), furin(800ng), レーン3：HtrA1 WT(400ng), furin(800ng), レーン4:HtrA1 WT(800ng), furin(800ng). 各wellで導入ベクターのDNA量が等量になるようMockで補正した。ベクター導入から24時間後に細胞を回収し、細胞溶解液をウェスタンブロットで解析した。上段は53kDaのBMP-2前駆体、中段はHtrA1とfurinの免疫ブロット。中段では20kDaの成熟型BMP-2(矢頭)に加えて、22kDaと10kDaの異常C末断片(★)を認める。(D)成熟型BMP-2を定量解析した。縦軸はCレーン2に対するarbitrary unitの比で表す。データは平均±標準誤差(n=3)。統計解析は、ANOVAを行い、群間比較はBonferroni法にて行った* P<0.05。

(E) (F) HtrA1によるBMP-4のプロセッシングへの影響

(E) HEK293T細胞に次の発現ベクターを導入した；BMP-4前駆体C末FLAG(100ng)に加え、レーン1：HtrA1 WT(0ng), furin(0ng), レーン2：HtrA1 WT(0ng), furin(800ng), レーン3：HtrA1 WT(400ng), furin(800ng), レーン4:HtrA1 WT(800ng), furin(800ng). 各wellで導入ベクターのDNA量が等量になるようMockで補正した。ベクター導入から24時間後に細胞を回収し、細胞溶解液をウェスタンブロットで解析した。上段は55kDaのBMP-4前駆体、中段はHtrA1とfurinの免疫ブロット。中段では22kDaの成熟型BMP-4(矢頭)に加えて、24kDaと10kDaの異常C末断片(★)を認める。(F)成熟型BMP-4を定量解析した。縦軸はEレーン2に対するarbitrary unitの比で表す。データは平均±標準誤差(n=3)。統計解析は、ANOVAを行い、群間比較はBonferroni法にて行った* P<0.05, ** P<0.01。

ンパク輸送を遮断した系では、予想通り、furinによって切り出される成熟型BMP-2/4は消失した(図4A5レーン, B5レーン)。一方、HtrA1存在下で認められるBMP-2の22kDaと10kDa C末断片、BMP-4の24kDaと10kDa C末断片は、Brefeldin A処理により、BMP-2の22kDa,

BMP-4の24kDa C末断片は消失したが、10kDaのC末断片は認められた(図4A3レーン, B3レーン)。この結果から、HtrA1は小胞体でBMP-2/4前駆体に作用し、10kDaのC末断片を産生すると考えた。そこで、HtrA1の細胞内局在を検討するため、N末にGFPタグをつけたHtrA1を

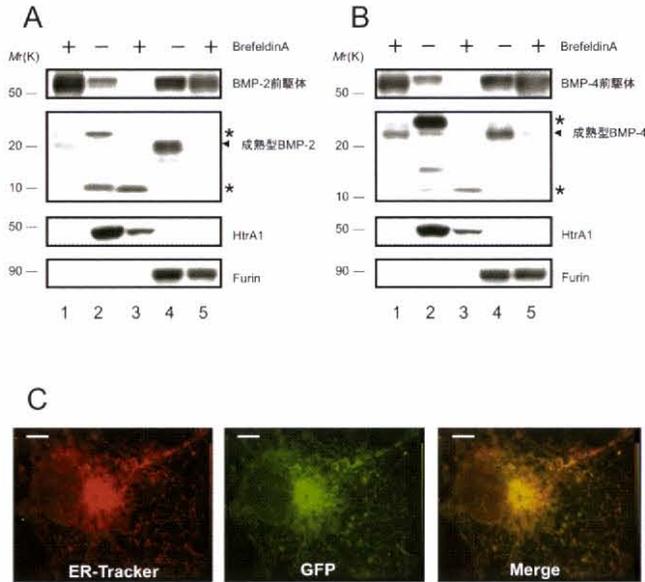


図4 HtrA1の細胞内でのBMP-2/4前駆体の切断の場の検討

(A) (B) 細胞内タンパク輸送阻害時のHtrA1のBMP-2/4前駆体への効果

HEK293T細胞に次の発現ベクターを導入した；BMP-2前駆体C末FLAG(50ng)もしくはBMP-4前駆体C末FLAG(40ng)に加え、レーン1：Mock(800ng)、レーン2,3：HtrA1 WT(800ng)、レーン4,5：Furin(800ng)。ベクター導入から6時間後にBrefeldinAを培養液に添加し(2 μ g/ml)、24時間後に回収した細胞溶解液を用いて、ウェスタンブロット解析を行った。上段は、Aでは53kDaのBMP-2前駆体、Bでは55kDaのBMP-4前駆体、中段はHtrA1とFurinの免疫ブロットを示す。中段では、Aでは20kDaの成熟型BMP-2(矢頭)に加えて、22kDaと10kDaの異常C末断片(★)を認め、Bでは22kDaの成熟型BMP-4(矢頭)に加えて、24kDaと10kDaの異常C末断片(★)を認める。

(C) HtrA1の細胞内局在

Cos-7細胞にEGFP-HtrA1 WT(2000ng)発現ベクターを導入。24時間後にER-Trackerで30分処理し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、共焦点レーザー顕微鏡で観察。左(ER-Tracker)、中央(GFP)、右(Merge)画像を示す。スケールは5 μ mを示す。

Cos-7に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡で検討したところ、HtrA1の小胞体への局在を確認した(図4C)。

考 察

本論文では、HtrA1が小胞体においてBMP-2/4前駆体を切断して、Furinによる正常なBMP前駆体のプロセッシングを阻害し、その結果、成熟型BMP-2/4の分泌量を減少させ、BMP-2/4シグナル伝達を抑制することを明らかにした。

BMPシグナル伝達の抑制機序として、細胞外では、BMPと結合して受容体による認識を阻害するnoggin¹⁷⁾、chordinファミリー¹⁸⁾、twisted gastrulation(Tsg)^{19)–21)}、Danファミリー²²⁾が知られている。一方、細胞内ではSmad1/5/8のリン酸化を阻害するSmad6/7²³⁾、Smad特異的ubiquitin ligaseであるSmurf1²⁴⁾が知られている。しかし、BMP前駆体のプロセッシングに影響し、シグナル伝達を調整する機序は、今回のHtrA1が初めてである。

Okaらは、HtrA1が培養液に添加したTGF- β

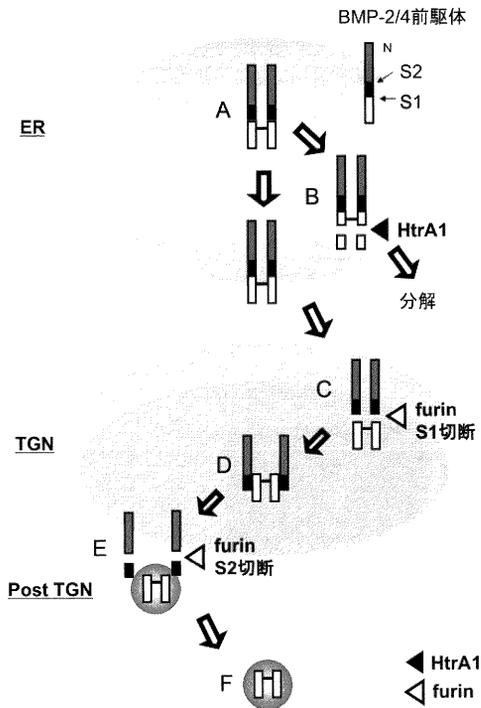


図5 HtrA1によるBMP-2/4前駆体プロセッシング阻害モデル

- (A) BMP前駆体は小胞体で2量体を形成する
 (B) HtrA1は小胞体でBMP前駆体のC末端を切断する
 (C) furinはTGNでBMP前駆体をS1部位で切断し、成熟型BMP(白色長方形)を産生する。
 (D) 切断されたBMP前駆体(灰色-黒色長方形)は、成熟型BMP(白色長方形)と複合体を形成する
 (E) furinはPost TGNでBMP複合体をS2部位で切断し(灰色と黒色長方形の間)、成熟型BMP(白色長方形)の2量体を遊離させる
 (F) 遊離した成熟型BMP(白色長方形)の2量体は細胞外へ分泌される

正常のBMP前駆体のプロセッシングは、A→C→D→E→Fの順にすすむ。A→BはHtrA1が介入する分解経路を示す。BMP前駆体のS1部位よりC末側を白色長方形(成熟型BMPペプチドに相当する)、S1とS2部位の間を黒色長方形、S2よりN末側を灰色長方形で示す。白色長方形間の実線は成熟型BMP間のジスルフィド結合を表す。HtrA1; high temperature requirement protein A1, BMP; bone morphogenetic protein, ER; endoplasmic reticulum, TGN; trans Golgi network.

によるTGF- β のシグナル伝達を抑制することを挙げ、HtrA1がTGF- β ファミリーシグナル伝達を抑制する場を、細胞外と推定した³⁾。しかし、彼らも示しているように、HtrA1はTGF- β を直接基質とはせず、その抑制機序は不明であった。またBMPに関しては、同様の実験を行っておらず、その抑制の場を明らかにしていない。今回我々は、細胞混合アッセイを用い、HtrA1のBMPシグナル伝達抑制の場が細胞内であることを明確に示した。さらにHtrA1によるBMP前駆体のプロセッシング過程を明らかにした。このことからBMPに関しては細胞外ではなく細胞内での抑制機序が主体であると結論した。

TGF- β ファミリータンパクの産生において細胞内プロセッシングは重要な役割を担っている。TGF- β ファミリータンパクはいずれも前駆体として産生され、細胞内でプロセッシングを受け成熟型が分泌される。BMP前駆体は、まずERにおいて2量体を形成した後(図5A)、TGNにてfurinによりS1部位が切断され、成熟型BMPが切り出される(図5C)。切断された前駆体は、成熟型BMPと複合体を形成する(図5D)。この複合体形成が成熟型BMPの細胞内での安定性に重要である。次ぎにpost TGNにおいて、furinにより複合体の前駆体側のS2部位が切断され、成熟型BMPのみが分泌される(図5E, F)。BMP産生と分泌には、この順序だった切断が重要である¹²⁾。HtrA1はfurinに先行して、小胞体においてS1よりC末端側でBMP前駆体を切断するため(図5B)、成熟型BMPの産生、分泌の低下を引き起こすと考える。BMPの細胞外の半減期は短く、そのシグナル伝達の調節として、細胞外での量の調節より、直接産生量を変化させる機序は、より効率的と考えられる。

動脈硬化は血管内膜肥厚を初期変化とする血管再構築に起因し、高血圧が最大の危険因子であるが、その機序に関しては明確になっていない。BMPシグナルは動脈硬化の病態機序に深く関与していることが推察される。BMP-2/4は血管平滑筋細胞の分化・増殖を制御しており⁷⁾⁹⁾、実際に、肺小動脈の平滑筋増殖と内膜肥厚を特徴とす

る遺伝性の原発性肺高血圧症は BMP の受容体である BMPR II の遺伝子変異により引き起こされる²⁵⁾。また、動脈硬化の危険因子である高血圧は、血管壁に対して圧やシェアストレスを負荷する。培養血管内皮細胞では、圧負荷では BMP-2⁶⁾、シェアストレスでは BMP-4⁸⁾ の発現が増加する。これらの事実から、遺伝性のみならず、ありふれた高血圧性の動脈硬化においても BMP シグナルの関与が疑われる。今後、実際の生体内の血管内皮、平滑筋細胞における BMP シグナルの検討により、動脈硬化の分子病態機序が明らかになることが期待される。

今回明らかにした HtrA1 による新たな BMP シグナル伝達抑制機序の解明は、HtrA1 の機能を調節することによって、BMP-2/4 シグナル伝達を介した血管の硬化性病変を制御できる可能性を提唱し、さらに BMP シグナル異常により引き起こされる血管疾患の新たな治療戦略を提唱する可能性がある。

謝 辞

最後に、本研究をご指導いただきました新潟大学脳研究所 神経内科学分野教授 西澤正豊先生、新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター分子神経疾患資源解析学分野准教授 小野寺理先生、新潟大学大学院医歯学総合研究科博士課程志賀篤先生、新潟大学大学院医歯学総合研究科修士課程（現ロシュ・ダイアグノスティックス）小山哲秀先生、新潟大学脳研究所 神経内科学分野助教 横関明男先生に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Clausen T, Southan C and Ehrmann M: The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol Cell* 10: 443 - 455, 2002.
- 2) Krojer T, Garrido - Franco M, Huber R, Ehrmann M and Clausen T: Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease - chaperone machine. *Nature* 416: 455 - 459, 2002.
- 3) Oka C, Tsujimoto R, Kajikawa M, Koshihara - Takeuchi K, Ina J, Yano M, Tsuchiya A, Ueta Y, Soma A, Kanda H, Matsumoto M and Kawaichi M: HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgf β family proteins. *Development* 131: 1041 - 1053, 2004.
- 4) Heldin CH, Miyazono K and Dijke P: TGF - β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390: 465 - 471, 1997.
- 5) Xiao YT, Xiang LX and Shao JZ: Bone morphogenetic protein. *BBRC* 362: 550 - 553, 2007.
- 6) Hruska KA, Mathew S and Saab G: Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ Res* 97: 105 - 114, 2005.
- 7) Csiszar A, Smith KE, Koller A, Kaley G, Edwards JG and Ungvari Z: Regulation of bone morphogenetic protein - 2 expression in endothelial cells: role of nuclear factor - κ B activation by tumor necrosis factor - α , H₂O₂, and high intravascular pressure. *Circulation* 111: 2364 - 2372, 2005.
- 8) Sorescu GP, Sykes M, Weiss D, Platt MO, Saha A, Hwang J, Boyd N, Boo YC, Vega JD, Taylor WR and Jo H: Bone morphogenetic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress stimulates an inflammatory response. *J Biol Chem* 278: 31128 - 31135, 2003.
- 9) Frank DB, Abtahi A, Yamaguchi DJ, Manning S, Shyr Y, Pozzi A, Baldwin HS, Johnson JE and de Caestecker MP: Bone morphogenetic protein 4 promotes pulmonary vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension. *Circ Res* 97: 496 - 504, 2005.
- 10) Grau S, Baldi A, Bussani R, Tian X, Stefanescu R, Przybylski M, Richards P, Jones SA, Shridhar V, Clausen T and Ehrmann M: Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 6021 - 6026, 2005.
- 11) Yang Z, Camp NJ, Sun H, Tong Z, Gibbs D, Cameron DJ, Chen H, Zhao Y, Pearson E, Li X, Chien J, Dewan A, Harmon J, Bernstein PS, Shridhar V, Zabriskie NA, Hoh J, Howes K and Zhang K: A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age - related macular degeneration. *Science* 314: 992 - 993, 2006.

- 12) Degnin C, Jean F, Thomas G and Christian JL: Cleavages within the prodomain direct intracellular trafficking and degradation of mature bone morphogenetic protein - 4. *Mol Biol Cell* 15: 5012 - 5020, 2004.
- 13) Miyazono K, Maeda S and Imamura T: BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 251 - 263, 2005.
- 14) Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa - Sebara A and Suda T: Identification of a BMP - responsive element in Id1, the gene for inhibition of myogenesis. *Genes Cells* 7: 949 - 960, 2002.
- 15) Lorenz WW, McCann RO, Longiaru M and Cormier MJ: Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4438 - 4442, 1991.
- 16) Zacchigna L, Vecchione C, Notte A, Cordenonsi M, Dupont S, Maretto S, Cifelli G, Ferrari A, Maffei A, Fabbro C, Braghetta P, Marino G, Selvetella G, Aretini A, Colonnese C, Bettarini U, Russo G, Soligo S, Adorno M, Bonaldo P, Volpin D, Piccolo S, Lembo G and Bressan GM: Emilin1 links TGF - beta maturation to blood pressure homeostasis. *Cell* 124: 929 - 942, 2006.
- 17) Groppe J, Greenwald J, Wiater E, Rodriguez - Leon J, Economides AN, Kwiatkowski W, Affolter M, Vale WW, Belmonte JC and Choo S: Structural basis of BMP signaling inhibition by the cystine knot protein noggin. *Nature* 420: 636 - 642, 2002.
- 18) Piccolo S, Sasai Y, Lu B and De Roberis EM: Dorsoroventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP - 4. *Cell* 86: 589 - 598, 1997.
- 19) Ross JJ, Shimmi O, Vilmos P, Petryk A, Kim H, Gaudenz K, Hermanson S, Ekker SC, O'connor MB and Marsh JL: Twisted gastrulation is a conserved extracellular BMP antagonist. *Nature* 410: 479 - 483, 2001.
- 20) Chang C, Holtzman DA, Chau S, Chikering T, Woolf EA, Holmgren LM, Bodorova J, Gearing DP, Holmes WE and Brivanlou AH: Twisted gastrulation can function as a BMP antagonist. *Nature* 410: 483 - 487, 2001.
- 21) Scott IC, Blitz IL, Pappano WN, Maas SA and Cho KW and Greenspan DS: Homologues of twisted gastrulation are extracellular cofactors in antagonism of BMP signaling. *Nature* 410: 475 - 478, 2001.
- 22) Hsu DR, Economides AN, Wang X, Eimon PM and Harland RM: The *Xenopus* dorsalizing factor gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell* 1: 673 - 768, 1998.
- 23) Onichtchouk D, Chen Y - G, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massague J and Niehrs C: Silencing of TGF β signaling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 401: 480 - 485, 1999.
- 24) Zhang Y, Chang C, Gehling DJ, Hemmati - Brivanlou A and Derynck R: Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, and E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 974 - 979, 2001.
- 25) Lane KB, Machado RD, Pauculo MW, Thomson JR, Phillips JA 3rd, Loyd JE, Nichols WC and Trembath RC: Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF - beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. The International PPH Consortium. *Nat Genet* 26: 81 - 84, 2000.

(平成21年1月15日)