Thesis

BMPによる筋芽細胞から骨芽細胞への分化誘導における Smadシグナル経路の役割

埼玉医科大学 臨床医学研究系 口腔外科学

野島 淳也

Bone morphogenetic protein(BMP)は、筋組織内で異所性骨化を誘導するサイトカインとして発見 された.以前,我々は,BMPが培養系においても筋芽細胞の分化成熟を抑制し,さらに骨芽細胞への 分化を誘導することを見いだした.本研究では、BMPによる筋芽細胞から骨芽細胞への分化誘導に おけるSmadシグナル経路の役割を報告する. BMP受容体は,転写調節因子 Smad1/5/8のC末端に位 置する2つのセリン残基をリン酸化することで細胞内シグナルを活性化すると考えられていることか ら、リン酸化部位をアスパラギン酸残基に置換した変異体Smad1(DVD)を作製した.Smad1(DVD)は、 構成的活性型 Smad1として Smad4と協調的に筋芽細胞 C2C12の骨芽細胞分化を誘導した.一方,筋分 化の抑制作用は, Smad1(DVD)単独よりもSmad4存在下で強く認められた. Smad4に核移行シグナル (NLS)を付加したNLS-Smad4は、C2C12細胞の筋分化を強力に抑制した. NLS-Smad4は、MH2ドメイン を欠失すると筋分化抑制活性を失い,MH1ドメインを欠失すると逆に筋分化を促進したことから, 核移行したSmad4がMH2ドメインを介して他の分子と相互作用して筋分化を抑制すると考えられた. Smad4と相互作用する候補分子として、Zn²⁺フィンガーとE3ユビキチンリガーゼ構造を持つE4F1を 同定した. E4F1は、Smad4のMH2領域と結合し、過剰発現で筋分化を抑制した. また、C2C12細胞 の内在性 E4F1をノックダウンすると、BMP存在下でも筋分化が認められた.以上の結果から、BMP による骨芽細胞の分化誘導と筋芽細胞分化の抑制作用は、どちらもSmadシグナル経路に依存し、骨 芽細胞の分化誘導は特にリン酸化 Smad1と Smad4の協調作用,筋分化の抑制は核移行した Smad4と E4F1との協調作用によって制御されることが明らかとなった.

緒言

Bone morphogenetic protein (BMP) は, 分化や増 殖,細胞死などを制御するTransforming growth factorβ(TGF-β)スーパーファミリーに属するサイトカイン である¹⁾. BMPを筋組織内に移植すると、そこに骨 髄を伴った異所性の骨形成を誘導することが知られ ている^{2,3)}.筋組織内における異所性の骨形成はBMPに 極めて特異的な作用であり、TGF-β1をはじめ他のホ ルモンやサイトカインを移植しても骨形成を誘導する ことはできない⁴⁾. 我々は, 筋芽細胞 (C2C12細胞) を BMP存在下で培養すると、成熟筋細胞への分化が抑制 され、代わりに骨芽細胞への分化が誘導されることを 見いだした⁵⁾. 筋芽細胞における骨芽細胞への分化誘導 作用もBMP特異的で, 筋分化を抑制する他の生理活性 物質は骨芽細胞への分化を誘導しない5.9. これらの結 果は、BMPに特異的な細胞内シグナル伝達機構が筋芽 医学博士 甲第1103号 平成21年3月27日(埼玉医科大学)

細胞から骨芽細胞への分化を誘導することを示唆して おり、このC2C12細胞を用いたBMPによる骨芽細胞へ の分化誘導モデルは、BMPの細胞内シグナルを解析す るモデル実験系として国内外で広く用いられている.

BMPの細胞内シグナルは I 型と II 型に分類される膜 貫通型セリン/スレオニンキナーゼ受容体によって誘 導される^{1,10,11)}. BMPを結合した II 型受容体は, I 型レ セプターの細胞内領域に存在するセリンとグリシン残 基に富んだGSドメインと呼ばれる領域をリン酸化し, I型受容体のキナーゼを活性化する. 活性化された I 型 受容体は,細胞質に存在するReceptor-regulated Smad (R-Smad) と呼ばれる Smad1, Smad5および Smad8のC 末端に存在するセリン・バリン・セリン残基からなる SVSモチーフの2つのセリン残基をリン酸化し, これら の転写調節因子群を活性化する. また,活性化された BMP受容体は,p38 Mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) 等も活性化することが知られている. リン酸化 された R-Smad 2分子は,細胞質に存在する Smad4 1分 子とヘテロ3量体複合体を形成し、核へ移行してDNA 上のGC配列に富んだ特異的な塩基配列を認識して結 合し、標的遺伝子の転写を制御する.我々は海外のグ ループとは独立に、BMPシグナルの標的遺伝子の1つ として筋分化を抑制するhelix-loop-herix型の転写調節 因子 Id1を同定し、世界で初めてその5'上流約1.0 kb付 近に、BMP刺激依存的にSmad1/5/8とSmad4の複合体 が結合するGC配列に富んだ29塩基のBMP-responsive elementを見いだした¹².

進行性骨化性線維異形成症 (Fibrodysplasia Ossificans Progressiva, FOP)は、筋組織で異所性骨形成が進行す る希な遺伝性疾患である. 最近, FOPの責任遺伝子と してBMPの I 型受容体の一種であるALK2をコードす るACVR1遺伝子が同定された¹³⁾. 我々は,国内で確認 されているFOP症例の約半数に相当する19例について 遺伝子解析を行い、全てにACVR1遺伝子の617番目の塩 基GがAとなったヘテロ接合変異を確認した. この遺伝 子変異は、ALK2の206番目のアルギニン残基をヒスチ ジン残基に変異させる. 我々は, このALK2(R206H)の 機能的変異を筋芽細胞 C2C12を用いて解析し、世界に 先駆けて、これがBMPとの結合非依存的に構成的に活 性化されたBMP受容体であり、常にSmad1/5/8がリン 酸化されることを明らかにした¹⁴⁾. 従って, FOPにおけ る異所性骨誘導においても、BMP受容体の活性化とそ の下流で起こるSmad1/5/8のリン酸化が骨形成に重要 なことが示唆された.

今回,我々は、リン酸化 Smadの骨形成における役 割を解明する目的で、Smad1のC末端の2つのセリン残 基をアスパラギン酸に置換した変異体 Smad1(DVD)を 作製した. Smad1(DVD)は, BMP非存在下でもSmad4 依存的にC2C12細胞の骨芽細胞への分化を誘導した. 一方, C2C12細胞の筋分化はSmad1(DVD)よりも核に 局在するSmad4によって抑制されることが判明した. Smad4と相互作用する分子を探索した結果, E4F1と呼 ばれるZnフィンガーとE3ユビキチンリガーゼの構造 を持つ転写因子を同定することに成功した. E4F1の 過剰発現は筋分化を抑制し、Smad4のMH2ドメイン に結合すること、さらに、C2C12細胞の内因性 E4F1 をノックダウンするとBMP存在下でも筋分化が誘導 されることが明らかとなった. これらの結果は、BMP による筋芽細胞から骨芽細胞への分化誘導がSmadシ グナルを介していることを示し、それぞれ、骨芽細胞 への分化はリン酸化されたR-SmadとSmad4, 筋分化 の抑制は核内 Smad4とE4F1の相互作用によって制御 される可能性を示唆する.

材料および方法

発現ベクターの構築:

マウスの野生型 Smad1と Smad4 cDNAは, TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて抽出したC2C12

細胞の全 RNAを鋳型として、 Platinum Pfx DNA polymeraseを用いてPolymerase chain reaction (PCR) 法でクローニングした. さらに, これらをpCMV2-FLAG (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) のHind IIIと Xba I切断部位間に挿入した後にシークエンスを確認 し、N末端にFLAGタグを付加する発現ベクターを構 築した. Smad1およびSmad4の変異体は、野生型発現 ベクターを鋳型として Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen) を用いたPCR法により、セリン463と セリン465をアスパラギン酸またはアラニンに置 換して作製した (Fig. 3A). Smad4変異体は, それ ぞれSV40由来の核移行シグナル (NLS) PPKKKRKV の付加 (NLS-Smad4), アミノ酸 2-138を欠失させた NLS-Smad4(△MH1), アミノ酸 316-552を欠失さ せたNLS-Smad4(△MH2)を作製した(Fig. 6A). マウ スE4F1 (accession #BC057011)は、C2C12細胞か らRT-PCR法でクローニングし、C末端にFLAGタグ を付加するpcDEF3-cFLAGベクターにクローニング した¹⁵⁾. E4F1(ΔE3)は, E3ユビキチンリガーゼド メイン (40-84 a.a.) を欠失させた. E4F1 microRNAは Mmi508063 (Invitrogen)を購入し、pcDNA6.2-GW/ EmGFP-miR (Invitrogen)にサブクローニングした. 細胞培養およびトランスフェクション:

マウス筋芽細胞C2C12,マウス線維芽細胞 C3H10T1/2,およびアフリカミドリザル腎細胞 COS-7 は、15%FBSを含むDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma Chemical Co.)で培養した^{5,16)}. また筋 分化は、2.5%FBSを含むDMEMに切り替えることで 誘導した. C. Deng博士 (National Institute of Health) より供与されたホモ接合体同士のSmad4^{floxed}マウス を交配し、11.5日令の胎児を0.25% Tripsin-EDTAで処 理後, セルストレーナー 40 µm (BD Falcon, Bedford, MA) で分散してマウス胎児線維芽細胞(MEF)を調 整した. Cre recombinaseを発現するアデノウィルス (AxCANCre) をMEFに感染させた後, さらに48時間培 養を行って内在性のSmad4を欠失させた. コントロー ルとしてhuman histon 2B-GFP unit (AxH2BGFP) 発現 アデノウィルスを感染させた^{17,18)}. Smad4^{floxed/floxed} MEF を3ヵ月間継代し、安定的に増殖する細胞群から限界希 釈法によってクローン化した細胞株 #16を取得した. それぞれの細胞は, 100 ng/ml recombinant human BMP-4 (R&D Systems, Inc) で処理した. MAP kinase および BMP 特異的 Smad シグナル経路の選択的阻害剤 として、それぞれ、U0126、SB203580、SP600125 (Merck, Nottingham, U.K.), Dorsomorphin (Calbiochem, San Diego, CA) を使用した¹⁹⁾. プラスミドのトランスフェ クションはLipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA)を使用し、96穴プレートの各ウェル当たり200 ng のプラスミドDNAと0.5 µlのLipofectamine 2000を用い て行った16).

免疫染色およびウエスタンブロット:

以下の抗体を免疫染色、ウエスタンブロット、お よび免疫沈降実験の一次抗体として使用した. 抗ミオ シン重鎖 (MHC) 抗体 (clone MF-20, Developmental Studies Hybridoma Bank, lowa City, IA), 抗 Myogenin 抗体 (clone F5D, SantaCruz, Santa Cruz, CA), 抗 FLAG抗体 (clone M2, Sigma Aldrich Chemicals), 抗 Myc抗体 (clone 9E10, SantaCruz), 抗 Myc polyclonal 抗体 (Medical & Biological Laboratories Co., Nagoya, Japan), 抗Smad4抗体 (clone B-8, SC-7966, SantaCruz), 抗V5抗体 (P/N46-0705, Invitrogen), 抗E4F1 antibody (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX), 抗 Phospho-Smad1/5/8 polyclonal抗体 (Cell Signaling, Beverly, MA), 抗β-actin抗体 (I-19, SC-1616, SantaCruz). 免疫 染色においては,抗マウス,抗ウサギ,または抗ヤギ IgG二次抗体として、ヒストファイン・シンプルステ インキット (Nichirei, Tokyo, Japan), またはAlexa488-, Alexa594-conjected抗体 (Invitrogen) を使用して可 視化した. ウエスタンブロットでは, houseradishperoxidase-conjected抗マウス, または抗ラビット IgG抗体 (GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, England)を使用した.

アルカリフォスファターゼおよびルシフェラーゼアッセイ:

骨芽細胞の分化マーカーとして、アルカリフォスファ ターゼ(ALP)の酵素活性を*p*-nitrophenylphosphataseを 基質に定量した²⁰⁾.ルシフェラーゼアッセイはDual-Glo Lucifease Assay System (Promega)を用いて定量 した.筋分化の指標として、骨格筋特異的転写因子で あるMyoDのプロモーターを組み込んだpGL3MG-185 レポーター (K. Kawakami博士より供与²¹⁾)を用いた. BMPのSmad依存的シグナルは、Smad1/5/8の標的遺 伝子であるId1のBMP応答領域を組み込んだIdWT4Flucレポーター¹²⁾で定量した.それぞれ、phRL-SV40 (Promega, Madison, WI)を同時にトランスフェクトす ることで標準化した.

腹側化誘導アッセイ:

4-cell stageのアフリカツメガエルの初期胚背側に, in vitroで転写した各 Smad1のmRNA 500 pgをインジェ クションし,発生する個体の腹側化の程度 (Dorsoanterior index, DAI) を形態学的に定量化した^{22, 23)}. RT-PCR法による遺伝子発現の評価:

C2C12細胞の骨芽細胞分化の指標として,RT-PCR 法により遺伝子発現を検討した.プライーマ-は,以 下の組合せを用いた²⁴⁾.ALP forward, 5'-GATCATTC CCACGTTTTCAC-3'; ALP reverse, 5'-TGCGGGGCTTG TGGGACCTGC-3'; Osterix forward, 5'-TTAAGCTTGC GTCCTCTCTGCTTGA-3'; Osterix reverse, 5'-TTTCT AGATCAGATCTCTAGCAGGTT-3'; glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase (GAPDH) forward, 5'-TGAA GGTCGGTGTGAACGGATTGGC-3'; GAPDH reverse,

5'-CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC-3'

結 果

BMPによる筋分化の抑制と骨芽細胞への分化誘導は Smad依存的シグナルによって制御される

C2C12筋芽細胞は,BMP処理によって筋分化が抑 制され,骨芽細胞への分化が誘導される⁵⁾.そこで,ま ず初めに,BMP-4を用いて,C2C12細胞の筋分化の抑 制と骨芽細胞への分化誘導に必要な最小処理時間を検 討した (Fig. 1A).C2C12細胞をFig.1Aに示すように, 100 ng/mlのBMP-4で各時間処理した後,BMP-4を含 まない培地で72時間目まで培養を継続し,筋分化の指 標であるMHCと骨芽細胞分化の指標であるALP活性 を検討した.その結果,72時間目におけるMHCの発 現は,始めの0.5時間BMP-4で処理するだけで非処理 群の約30%程度にまで抑制された (Fig.1C-1D).一方, 骨芽細胞の分化マーカーであるALP活性は,9時間以 上BMP-4で処理した群で誘導された (Fig.1B and 1E).

BMP特異的 Smadシグナル経路の選択的阻害剤で あるDorsomorphinでC2C12細胞を処理すると,BMP 存在下でもMHC陽性の筋細胞に分化し,ALPの誘導 が抑制された (Fig. 1F-H).一方,MAP kinase阻害剤 である U0126,SB203580 および SP600125で処理した C2C12細胞は,対照群のDMSO処理群と同様の筋分化 および骨芽細胞分化能を示した (Fig. 2).SB203580 処理群では,BMPによるALPの誘導が抑制されたが, BMP非存在下でのMHCの発現も抑制されたことか ら,細胞毒性によるものと考えられた (Fig. 2). 構成的活性型Smad1変異体の構築

BMP受容体は, Smad経路と共にさまざまな細胞 内シグナル伝達系を活性化することから, Smadに特 異的な役割を検討する目的で, BMP受容体によって リン酸化されるSmad1の463番目と465番目のセリン 残基を,アスパラギン酸あるいはアラニンに置換し 構成的活性型 Smad1の作製を試みた (Fig. 3A). BMP の初期応答遺伝子であるId1のルシフェラーゼレポー ターを用いて、各Smad1変異体の転写活性を比較検討 すると、2つのセリン残基ををアスパラギン酸に置換 したSmad1(DVD)に強い転写活性が認められた(Fig. 3B). Smad1(DVD)の転写活性は, Smad4のコトラン スフェクションによりさらに促進された (Fig. 3B). 一 方,核移行シグナル (NLS)を付加した NLS-Smad1は, ほとんど転写活性を示さなかった (Fig. 3B). 抗リン 酸化 Smad1/5/8抗体を用いたウエスタンブロットと 免疫染色法で検討すると、野生型 Smad1はBMPシグ ナル依存的に抗リン酸化 Smad抗体で認識されるのに 対し, Smad1(DVD)はBMPシグナル非存在下でも抗 体に認識された (Fig. 3C and 3D). ウエスタンブロッ トの結果から、Smad1(DVD)を発現させたC2C12細



Fig 1. Smad signaling pathway regulates both inhibition of myogenic differentiation and induction of osteoblastic differentiation of minimal treatment periods required for inhibition of myogenic differentiation and induction of osteoblastic differentiation by BMP-4 in C2C12 myoblasts. (A) Scheme of treatment of C2C12 myoblasts with BMP-4 in a window experiment. C2C12 cells were treated for 0, 0.5, 1, 9, 30, or 72 h with 100 ng/ml of BMP-4 (closed bars) and further incubated without BMP-4 (open bars) until 72 h before staining. (B) The cells were doubly stained for ALP and MHC in blue and red, respectively, at 72 h. Scale bar, 200 mm. (C–E) Quantitation of effects of BMP-4 on myogenic differentiation and osteoblastic differentiation of C2C12 cells. Western blots for MHC (C and D) and measurement of ALP activity (E) were performed on day 3. (F–H) Effects of Dorsomorphin on BMP-induced differentiation in C2C12 cells were doubly stained for ALP and MHC on ALP and MHC on day 3. Scale bar, 400 µm. MHC levels (G) and ALP activity (H) were measured on day 3. Values are means \pm S.D. (n= 3).

胞では,BMPシグナル非存在下で抗リン酸化 Smad 抗体に認識されるのは,内在性 Smadよりも移動度の 遅い Smad1(DVD)であることが確認された(Fig. 3C). Smad1(AVA)は,いずれの条件下でも抗 Smad1/5/8 抗体では認識されなかった.免疫沈降法で Smad1と Smad4の結合能を検討したところ,各 Smad1変異体は 同程度に Smad4と結合していた (Fig. 3E).

さらに、作製したSmad1変異体の活性をC2C12細胞

以外の実験系で検討するために、アフリカツメガエ ルの初期胚に各mRNAをインジェクションし、BMP 活性の指標である腹側化活性を検討した.その結果、 Smad1(AVA)はコントロール群と同様に全く腹側化を 起こさず、野生型Smad1は僅かに腹側化を誘導した (Fig. 3F and 3G).一方、Smad1(DVD)mRNAをイン ジェクトした初期胚では、BMPmRNAを直接インジェ クトした場合と同様に、強力に腹側化を誘導するこ



Fig 2. Effects of inhibitors of MAPK kinase on BMP-induced differentiation in C2C12 cells. (A) C2C12 cells were preincubated for 1h with 10 μ M U0126, 10 μ M SB203580, or 0.5 μ M SP600125 and 100 ng/ml of BMP-4 was then added. The cells were doubly stained for ALP and MHC on day 3. Scale bas, 400 μ m. Myogenic and osteoblastic differentiation were determined by expression levels of MHC (B and C) and ALP activity, respectively (D).

とが明らかとなった (Fig. 2F and 2G). 以上の結果から, Smad1(DVD)はBMPシグナル非依存的に活性化された状態にある,構成的活性型 Smad1変異体であることが明らかとなった.

<u>BMPによる骨芽細胞分化はリン酸化 Smadによって誘</u> <u>導される</u>

BMPによる骨芽細胞への分化誘導におけるSmadシ グナル経路の役割を検討するため、我々が作製した 各Smad1変異体をC2C12細胞に過剰発現させてALP活 性を測定した。各Smad1変異体とSmad4をコトランス フェクトした場合、ALP活性が上昇する傾向が認めら れ、特にSmad1(DVD)とSmad4のコトランスフェクト でALP活性が促進された (Fig. 4A). さらに、RT-PCR 法で骨芽細胞の分化マーカーの発現を検討したところ,Smad1(DVD)とSmad4のコトランスフェクトにより,ALPとOsterixの発現が増加した(Fig. 4B).次に,各Smad1変異体がBMP受容体の基質になるか否かを検討するため,構成的活性型BMP受容体であるBMPR-IA(Q233D)とC2C12細胞にコトランスフェクトした.すると,野生型Smad1存在下ではALP活性が著明に上昇したが,Smad1(DVD)存在下ではむしろALP活性は低下する傾向が認められた(Fig. 4C).この結果は,野生型Smad1がBMP受容体の基質として活性化されることを確認すると共に,C末端のリン酸化部位へ変異を導入すると受容体による活性化を阻害することを示唆する.さらに,構成的活性型BMP受容体が



Fig 3. Establishment of a constitutively activated Smad1. (A) Construction of mutant Smad1. Serine 463 and/or 465 at the carboxyl terminus of mouse Smad1 was substituted by aspartic acid or alanine. (B) Transcriptional activities of Smad1 mutants in luciferase assay in C2C12 cells. Wild-type and mutant Smad1 were transfected with IdWT4F-luc in C2C12 cells in the presence or absence of Smad4 (n = 3). Note that Smad1(DVD) activated reporter activity even in the absence of Smad4. (C and D) Smad1(DVD) was recognized by the α -phospho Smad1/5/8 antibody. C2C12 cells were co-transfected with empty vector (Vector) or V5-tagged BMPR-IA(Q233D) (IA(Q233D)) and an empty vector (V), Flag-tagged wild-type Smad1 (W), Smad1(DVD) (D), or Smad1(AVA) (A). Whole-cell lysates were immunoprecipitated (IP) with α -FLAG antibody followed by immunoblotting (IB) using α -P-Smads antibody to detect the mutant Smad1 and endogenous Smad1/5/8. (D) C2C12 cells transfected with Myc-tagged wild-type or Smad1(DVD), Smad1(AVA), or NLS-Smad1 were stained with α -P-Smads and α -Myc antibodies without BMP stimulation. Note that Smad1(DVD) was detected in cytoplasm with α -P-Smads antibody. Scale bar, 25 µm. (E) Interaction with Smad1 and Smad4. COS7 cells were co-transfected with Myc-tagged Smad4 and an empty vector (V), FLAG-tagged wild-type Smad1 (W), Smad1(DVD) (D), Smad1(AVA) (A), or NLS-Smad1 (N). Whole-cell lysates were immunoprecipitated (IP) with α -FLAG antibody followed by immunoblotting (IB) using α -Myc antibody to detect Smad4 (S4) in complex with Smad1. *, IgG. (F and G). Ventralization-inducing activity of Smad1 in Xenopus embryos. (F) Xenopus embryos at four-cell stage were injected with 500 pg of synthetic mRNA of wild-type, Smad1(AVA), or Smad1(DVD) into the dorsal marginal region. (G) Dorsal-anterior index of Xenopus embryos induced by Smad1. Values smaller than 5 indicate degree of ventralization.

Smad1(DVD)と相乗的に作用しないことから,主たる 骨芽細胞分化誘導シグナルはSmadの下流に位置する ことも示唆された.

さらに、Smad 依存的シグナル経路の骨芽細胞分化 における役割を検討する目的で、Smad4^{floxed/floxed}マウ スより調整したMEFを用いた実験を行った.この細 胞に、Cre DNAリコンビナーゼあるいはネガティブ コントロールのEGFPを発現するアデノウィルスを感 染させてSmad4をin vitroで欠失させた (Fig. 4D).こ の条件下では、BMPによって誘導されるSmad1/5/8 のリン酸化にCre DNAリコンビナーゼの影響は認め られず,ALP活性は低下したもののSmad4欠失群で も酵素活性は検出された (Fig. 4D and 4E). さらに, Smad4^{floxed/floxed} MEFからクローン化した株細胞#16を 樹立し,同様な実験を行った.その結果,クローン化 したMEFでもCre DNAリコンビナーゼはSmad4を欠 失させ,この条件下でBMPによって誘導されるALP 活性は部分的に低下した (Fig. 4F and 4G).これらの 結果より,BMPによる骨芽細胞分化はBMP 受容体に よってリン酸化されたSmad1を含むR-Smadによって



Fig 4. Smad1(DVD) induces osteoblastic differentiation of C2C12 myoblasts. (A) Smad1(DVD) induces ALP activity in C2C12 myoblasts. C2C12 cells were transfected with one of the Smad1 constructs in the presence (closed bars) or absence (open bars) of Smad4, and ALP activity was measured on day 3. Values are means \pm S.D. (n=3). (B) Smad4 enhances Smad1(DVD) activity. C2C12 cells were transfected with empty vector alone or Smad1(DVD) in the absence or presence of Smad4. RT-PCR was performed on day 3. (C) Synergism between Smad1 and a constitutively activated BMPR-IA receptor. C2C12 cells were transfected with one of the absence (open bars) or presence BMPR-IA receptor. C2C12 cells were transfected with one of the Smad1 constructs in the absence (open bars) or presence BMPR-IA(Q233D) (closed bars) , and ALP activity was determined on day 3. Values are means \pm S.D. (n=3). (D–G) Effects of Smad4 deletion on the osteoblastic differentiation induced by BMP-4. (D) MEFs prepared from Smad4^{floxed/floxed} were infected with adenovirus expressing Cre recombinase or EGFP. The cells were stimulated for 30 minutes with 100 ng/ml of BMP-4 to induce phosphorylation of Smad1/5/8. (E) Adenovirus-infected MEFs were treated for 3 days with 100 ng/ml of BMP-4, and ALP activity was determined on day 3. Values are means \pm S.D. (n=5). (F) Deletion of Smad4 by Cre-virus in clonal cell line # 16 prepared from Smad4^{floxed/floxed} MEFs. (G) Dose-dependent induction of ALP activity by BMP-4 in clonal cell line # 16 infected or not with Crevirus. Values are means \pm S.D. (n=3).

誘導され,Smad4はこの作用を促進する因子であることが示唆された.

BMPの筋分化抑制作用にはSmad4が必須である

次に、BMPによる筋分化の抑制における Smad シグナル経路の役割を検討した. C3H10T1/2細胞に MyoDと Smad1(DVD)を含む各 Smad1変異体をコト ランスフェクトすると、誘導される MHC陽性の筋 細胞数に変化は認められなかった (Fig. 5A and 5B). しかし、さらに Smad4をコトランスフェクトする と、Smad1(DVD)は MHC陽性細胞数を減少させた (Fig. 5A and 5B). この結果は、さらに Smad4^{floxed/floxed} MEFにおいても確認された. すなわち、筋分化に伴っ て発現する Myogenin遺伝子のプロモータで発現する ルシフェラーゼレポーターで定量すると、Cre DNA リコンビナーゼ発現ウイルスを感染させた MEFでは BMP非存在下でもレポーター活性は抑制されなかった (Fig. 5C). そこで、Smad4^{floxed/floxed} MEF Clone #16に MyoDを発現させて筋分化を誘導すると、Cre DNAリ コンビナーゼウイルスの感染でBMP存在下でもMHC 陽性筋細胞が多数出現した (Fig. 5D and 5E). さらに、 一過性にSmad4をトランスフェクションすると、Cre ウイルス感染群でもBMPによる筋分化の抑制活性が 回復した (Fig. 5D and 5E). これらの結果は、BMP による筋分化抑制にはSmad4が必須であることを示 している.

核内で発現するSmad4が筋分化を抑制する

Smad4は、BMPシグナル依存的にSmad1/5/8と複 合体を形成しながら核へ移行すると考えられている. そこで、BMPシグナル非依存的に核内で発現させるた め、核移行シグナルを付加したSmad4 (NLS-Smad4) を作製した.さらに、筋分化の抑制に重要な分子内の 領域を決定する目的で、それぞれMH1ドメインおよ びMH2ドメインを欠失させたNLS-Smad4も作製した (Fig. 6A).それぞれの細胞内局在を検討したところ、 野生型 Smad4はC2C12細胞内で細胞質と核内の両方



Fig 5. Smad4 is involved in the inhibition of myogenic differentiation. (A and B) Smad1(DVD) inhibits myogenic differentiation only in the presence of Smad4. C3H10T1/2 fibroblasts were co-transfected with MyoD and empty vector (Vec), Smad1(DVD), Smad1(AVA), or NLS-Smad1 (NLS-S1) in the absence (upper panels) or presence (lower panels) of Smad4 (A). Myogenic cells were immunostained for MHC (red) on day 5. Scale bar, 400 µm. (B) Fusion index was determined in the presence (closed bars) or absence (open bars) of Smad4. Values are means \pm S.D. (n=3). *, p<0.05. (C) Smad4 is required for suppression of transcriptional activity of MyoD by BMP-4. MEFs prepared from Smad4^{floxed/floxed} were infected with adenovirus expressing EGFP or Cre recombinase, and then the transcriptional activity of MyoD was determined in the presence and absence of 100 ng/ml of BMP-4. Values are means \pm S.D. (n=10). ***, p<0.001. (D and E) Smad4 is essential for inhibition of myogenic differentiation by BMPs. Clonal cell line \ddagger 16 infected or not with Cre-virus was transfected with MyoD and stained for MHC on day 5 (D). (E) The numbers of MHC-positive cells was counted in cultures prepared as in (D).

に分布していたのに対し、NLSを付加したS各 mad4 変異体は全て核内で発現していることが確認された (Fig. 6B). これらのSmad4をC3H10T1/2細胞にMyoD とコトランスフェクトして筋分化を誘導すると,野 生型 Smad4は MHC陽性細胞数に影響しなかったのに 対し、NLS-Smad4はMHC陽性細胞数を有意に減少さ せた (Fig. 6C and 6D). 一方, NLS-Smad4のMH2ドメ インを欠失させると筋分化抑制作用は消失し, MH1 ドメインを欠失させると逆にMHC陽性細胞数が増加 した.以上の結果から、Smad4を単独で核に発現させ ることで筋分化が抑制され、その活性にはSmad4の MH1とMH2の両ドメインが必須であることが明らか となった. また, NLS-Smad4(△MH1)が筋分化を促 進したことから, Smad4はMH2ドメインを介して細 胞内に存在する別の因子と相互作用して筋分化を抑制 し、NLS-Smad4(△MH1)は本因子に対してドミナン トネガティブに作用すると予想された.

<u>核内のE4F1がSmad4のMH2ドメインに結合し筋分化</u> <u>を抑制する</u>

Smad4のMH2に結合する分子を探索するため, RIKENグループによって確立されたmammalian twohybridを基礎としたProtein-Protein-Interaction (PPI) のデータベースをサーチした²⁵⁾.その結果,分子内 にE3ユビキチンリガーゼとZnフィンガードメインを もつE4F1が同定された.FLAGタグを付加し,細胞 内局在を検討すると,E4F1は,NLS-Smad4と同様に C2C12細胞の核内で発現することが明らかとなった (Fig. 7A). E4F1のSmad4との結合を免疫沈降法で検討 すると、E4F1は野生型Smad4よりも核内で発現する NLS-Smad4とより多く結合した (Fig. 7B). さらに、内 在性Smad4と内在性E4F1は、BMP刺激により結合す ることも確認された (Fig. 7C). Smad4の欠失変異体 を用いてE4F1との結合に必要な領域を解析した結果、 E4F1はNLS-Smad4(Δ MH1)と結合するもののNLS-Smad4(Δ MH2)とは結合しなかったことから、Smad4 のMH2ドメインがE4F1との結合に必須な領域である ことが明らかとなった (Fig 7D).

最後に, E4F1の筋分化における役割を検討した.野 生型 E4F1をC3H10T1/2細胞に一過性に発現させる と、MyoDが誘導するMyogenin陽性の筋細胞数が減 少した (Fig. 7E). 野生型 E4F1と同様に, 分子内のE3 ユビキチンリガーゼドメインを欠失させたE4F1変 異体(ΔE3)も筋分化を抑制した (Fig. 7E). E4F1の microRNAをC3H10T1/2細胞に過剰発現させると、内 在性のE4F1タンパク量が減少することを確認した (Fig. 7F). このE4F1に対するmiRNAまたはコントロー ルのmiRNA発現ベクターをMyoDと共にC3H10T1/2 細胞にコトランスフェクトすると、NLS-Smad4によっ て抑制されたMHC陽性細胞への分化が, E4F1 miRNA ベクターの用量依存的に回復した(Fig. 7G). さらに, BMPR-IA(Q233D)によって抑制したMyogeninn陽性 の筋分化も、E4F1 miRNAの用量依存的に回復した (Fig. 7H). 以上の結果から, Smad4を介したBMPに よる筋分化の抑制作用には、Smad4のMH2ドメイン



Fig 6. Nuclear Smad4 inhibits Myogenic differentiation. (A) Scheme of construction of FLAG-tagged Smad4 mutants. (B) Cellular localization of FLAG-tagged Smad4 mutants in C3H10T1/2. The cells were immunostained with α -FLAG antibody. Scale bar, 25 µm. (C) Effects of Smad4 mutants on myogenic differentiation. C3H10T1/2 cells were co-transfected with MyoD and one of the Smad4 constructs and immunostained for MHC on day 5. Scale bar, 400 µm. (D) Fusion index was determined from cultures prepared as in (C). Values are means ±S.D. (n=3). *, p<0.05. ;**, p<0.01.



Fig 7. E4F1 inhibits myogenic differentiation in cooperation with nuclear Smad4. (A) E4F1 and Smad4 overlapped in nuclei in C2C12 cells. Flag-tagged E4F1 and empty vector (Vec), Myc-Smad4 (WT), or Myc-NLS-Smad4 (NLS) were cotransfected and stained with α -Myc and α -FLAG antibodies. Scale bar, 25 µm. (B and C) E4F1 interacts with Smad4 in vivo. (B) COS-7 cells were co-transfected with FLAG-E4F1 and empty vector (Vec), Myc-Smad4 (WT), or Myc-NLS-Smad4 (NLS). Whole-cell lysates were immunoprecipitated (IP) with α -FLAG antibody followed by immunoblotting (IB) using α -Myc antibody. (C) Whole-cell lysates of non-transfected C2C12 cells treated for 1 h without or with 100 ng/ml of BMP-4 were immunoprecipitated with α -E4F1 or α -Sma4 antibody followed by immunoblotting with antibody in reverse order. (D) The MH2 domain of Smad4 is required for interaction with E4F1. The interaction between E4F1 and Smad4 was determined by cotransfection of FLAG-E4F1 and Myc-NLS-Smad4(Δ MH2) or Myc-NLS-Smad4(Δ MH1) in COS-7 cells. (E) Over-expression of E4F1 inhibits myogenic differentiation. C3H10T1/2 cells were co-transfected with MyoD and wild-type E4F1 or E4F1 (Δ E3) and immunostained for myogenin on day 3. Values are means \pm S.D. (n=3). ***, p<0.001. (F) Knockdown of endogenous E4F1 by transfection of a microRNA expression vector. C2C12 cells were transfected with an expression plasmid of microRNA as a negative control (Cont), unrelated LacZ, or E4F1. Whole-cell lysates were immunoblotted with α -E4F1 antibody. (G and H) E4F1 microRNA abolished the inhibition of myogenic differentiation induced by NLS-Smad4 (G) or a constitutively active BMPR-IA(Q233D) (H). (G) C3H10T1/2 cells were co-transfected with MyoD, NLS-Smad4, and a microRNA expression vector as a negative control or E4F1. The microRNA vector-transfected cells and myogenic cells were detected by expression of EGFP and MHC, respectively, on day 5. Scale bar, 50 µm. (H) C3H10T1/2 cells were co-transfected with MyoD, BMPR-IA(Q233D), and a microRNA expression vector as a negative control or E4F1. Myogenic differentiation was determined by immunostaining for myogenin. Values are means \pm S.D. (n=3). **, p<0.01; ***, p<0.001.

に結合する核内のE4F1が重要であることが明らかと なった. 筋組織内で異所性骨形成を誘導するBMPは,筋芽 細胞の培養系においても筋分化を抑制し,代わりに骨 芽細胞への分化を誘導する.筋芽細胞の筋分化は他の TGF-βsやFGFsのようなサイトカインによっても抑

考察

制されるが, in vivoで異所性の骨を誘導し, さらにin vitroの培養系で骨芽細胞分化を誘導するのはBMPに 特有の活性として知られている¹¹⁾.本研究により,筋 分化の抑制はBMP-4処理30分で起こるのに対して、骨 芽細胞の分化を誘導するのには最低でも9時間のBMP 処理を要することが明らかとなった. 阻害剤を用いた 実験から, BMPの筋分化の抑制作用と骨芽細胞への 分化誘導作用は、どちらもSmadシグナル経路に依存 することも判明した. BMPで処理した筋芽細胞細胞 では, 筋分化のマーカーである MHCと骨芽細胞分化 のマーカーである ALPを同時に発現するような細胞は 認められず,また,分化して融合した筋細胞をBMP処 理してもALPは誘導されない(データ未発表).以上の 結果から、筋分化の初期段階でBMPが拮抗するシグ ナルを伝達し、その後に骨芽細胞への分化を誘導する と考えられる.

BMPのI型受容体であるBMPR-IA, BMPR-IB, およ びALK2の構成的活性型変異体の筋芽細胞における過 剰発現は、いずれも筋分化を誘導して骨芽細胞分化を 誘導する^{26, 27)}. この結果は, BMPのI型受容体が活性 化する細胞内シグナルが細胞分化の制御に重要である ことを示唆している.活性化されたBMPのI型受容体 は、Smad以外にもMAPKやPI3Kのシグナル経路を活 性化することが知られている. そこで、Smadシグナ ル経路の役割を検討するために、I型受容体を活性化 せずに Smadシグナル伝達経路を活性化できるような 実験系が必須と考えられた. そこで我々は、Smad1の BMP受容体によるリン酸化部位を酸性アミノ酸に置 換し、リン酸化を受けた場合と同様に負の電荷を導入 することでBMPシグナル非依存的に構成的に活性化 されたSmad1の構築を試みた.Smad1はリン酸化され ることで立体構造に変化を起こし、p300、OAZ、また はRunx2などのコアクチベーターと会合すると考えら れている¹⁰⁾. Smad1(DVD)は, BMP受容体で活性化さ れないものの,抗リン酸化Smad1/5/8抗体で認識され るように、構造的にリン酸化 Smad1/5/8と類似の構 造を取ると予想される.実際,Smad1(DVD)はBMP非 存在下でもSmad標的遺伝子の転写を誘導し、C2C12 細胞から骨芽細胞への分化を誘導したことから、構 成的活性型 Smad1であると考えられた.しかし, Smad1(DVD)とSmad4の共発現によって誘導される 骨誘導活性は、恒常的活性型 BMPR-IA(Q233D)と野 生型 Smad1によって誘導される骨芽細胞分化よりも 弱かった. これは、Smad1(DVD)が構造的にリン酸化 Smad1と類似しているものの、コアクチベーターとの 親和性が低いためと推察される. 今後, 構成的活性型 Smad1(DVD)による骨芽細胞への分化誘導作用機序を 解明するためには、この点についてさらに詳細な解析 が必要である.

本研究の結果から, BMPによる筋分化の抑制におい

てもSmadシグナル伝達経路が重要なことが明らかと なった.興味深いことに,BMPによる骨芽細胞分への 化誘導にはR-Smadが重要であったのに対して,筋分 化の抑制には特に核内で発現するSmad4が重要である ことが判明した.Smad4はTGF-βスーパーファミリー に共通の転写因子であることから,TGF-βファミリー に属するTGF-β, myostatin, activinのようなBMP以 外の因子が筋分化を抑制するメカニズムにも関与し ている可能性が考えられる^{28,29)}.

SmadのMH1ドメインはDNA結合に, MH2ドメ インはタンパク同士の相互作用に重要と考えられ ている³⁰⁾.本研究の結果から、筋分化の抑制はBMPシ グナル依存的に核移行したSmad4が、MH2ドメイン を介して他の転写調節因子と相互作用し, MH1ドメ インを介して特定のDNA上にリクルートすることが 予想された. 実際, NLS-Smad4(Δ MH1)が筋分化を促 進した結果は、DNAに結合できない本変異体が筋分 化を抑制する他の転写調節因子とMH2ドメインを介 して結合し,結果的にドミナントネガティブに作用 した結果と考えられた.そこで、このSmad4のMH2 ドメインを介して相互作用する因子を探索した結果, E4F1を同定することに成功した. E4F1はZn フィン ガーを持つ転写因子で, 癌原遺伝子のターゲットと して同定され、細胞周期を制御する遺伝子として知 られている³¹⁻³³⁾. 我々は, E4F1が核で発現する転写因 子で、Smad4のMH2ドメインと結合することを確認 した. さらに、E4F1の過剰発現によって筋分化が抑 制され、また、E4F1をノックダウンした細胞では、 BMPや核で発現したSmad4存在下でも筋分化が起こ ることから、E4F1がBMPシグナルによる筋分化の抑 制に重要な因子であると考えられた. E4F1は, p53の E3ユビキチンリガーゼとして作用することが報告さ れている³⁴⁾. しかし, ユビキチンリガーゼ領域を欠失 したE4F1の変異体も筋分を化抑制したことから、こ の活性は筋分化には関与しないことが判明した. 興味 深いことに、p53とSmad4の機能喪失型変異が種々の 腫瘍で発見されている^{35,36)}. Smad4-E4F1-p53を軸と したシグナルの変異が、これらの腫瘍形成過程に関係 している可能性を示唆する.

従来,Smad4はSmadを介したさまざまなシグナル 伝達系に必須と考えられてきた³⁷⁾.しかし,本研究の Smad4^{floxed} MEFを用いた解析から,少なくとも BMPシグナルによる骨芽細胞への分化誘導には,促 進的に作用するものの必須ではないことが明らかと なった.この原因として,以下のような理由が推測さ れる.1)我々の実験系では,検出限界以下のSmad4 がMEFに残存しており,この低レベルのSmad4が骨 芽細胞への分化誘導には十分であった.2)Smad4以 外の未知の因子が代償的にBMPシグナルを促進した. 3)Smad4はBMPシグナルによる骨芽細胞の誘導に必 須でない.これまでの報告から,軟骨特異的なSmad4 ノックアウトマウスは,正常ではないものの軟骨が発 達すること,さらに骨芽細胞特異的なSmad4ノックア ウトマウスでも骨量は有意に減少するものの,骨形 成や骨芽細胞分化は認められることが明らかとなっ ている³⁸⁾.これらのin vivoおよびin vitroの知見を合わ せると,Smad4のBMPシグナルにおける役割は明ら かでない点が多く,今後も骨代謝におけるSmad4の役 割はさらなる検討が必要と思われる.

結論

本研究により、BMPシグナルによる筋芽細胞から 骨芽細胞分化への分化誘導作用は、主にR-Smadと Smad4の相互作用によって誘導される骨芽細胞分化 と、主にSmad4とE4F1による筋分化抑制によって制 御されることが明らかとなった。

謝 辞

稿を終えるにあたり,ご指導をいただきました埼 玉医科大学口腔外科学教室 依田哲也教授に心より 感謝いたします.また,直接ご指導をいただきました 埼玉医科大学ゲノム医学研究センター病態生理部門 片桐岳信教授に深く感謝いたします.また,ゲノム医 学研究センターゲノム科学部門 岡崎康司教授,実験 動物施設 津久井通講師,病態生理部門の教室員の皆 様からの多くのご協力に深謝いたします.

参考文献

- Katagiri T. Suda T. and Miyazono K. The bone morphogenetic proteins, In Miyazono K and Derynck R. editors. The TGF-β family. New York: Cold Spring Harbor; 2008. p. 121-149.
- Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Science 1965;150(698):893-9.
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science 1988;242(4885):1528-34.
- 4) Sampath TK, Muthukumaran N, Reddi AH. Isolation of osteogenin, an extracellular matrixassociated, bone-inductive protein, by heparin affinity chromatography. Proc Natl Acad Sci U S A 1987;84(20):7109-13.
- 5) Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, et al. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. J Cell Biol 1994;127(6 Pt 1):1755-66.
- 6) Salminen A, Braun T, Buchberger A, Jurs S, Winter B, Arnold HH. Transcription of the

muscle regulatory gene Myf4 is regulated by serum components, peptide growth factors and signaling pathways involving G proteins. J Cell Biol 1991;115(4):905-17.

- Yoshida S, Fujisawa-Sehara A, Taki T, Arai K, Nabeshima Y. Lysophosphatidic acid and bFGF control different modes in proliferating myoblasts. J Cell Biol 1996;132(1-2):181-93.
- Massague J, Cheifetz S, Endo T, Nadal-Ginard B. Type beta transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A 1986;83(21):8206-10.
- Liu D, Black BL, Derynck R. TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. Genes Dev 2001;15(22):2950-66.
- 10) Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. Cytokine Growth Factor Rev 2005;16(3):251-63.
- 11)Wan M, Cao X. BMP signaling in skeletal development. Biochem Biophys Res Commun 2005;328(3):651-7.
- 12) Katagiri T, Imada M, Yanai T, Suda T, Takahashi N, Kamijo R. Identification of a BMP-responsive element in Id1, the gene for inhibition of myogenesis. Genes Cells 2002;7(9):949-60.
- 13) Shore EM, Xu M, Feldman GJ, Fenstermacher DA, Cho TJ, Choi IH, et al. A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. Nat Genet 2006;38(5):525-7.
- 14) Fukuda T, Kohda M, Kanomata K, Nojima J, Nakamura A, Kamizono J, et al. Constitutively activated ALK2 and increased smad1/5 cooperatively induce BMP signaling in fibrodysplasia ossificans progressiva. J Biol Chem. 2008; in press
- 15) Goldman LA, Cutrone EC, Kotenko SV, Krause CD, Langer JA. Modifications of vectors pEF-BOS, pcDNA1 and pcDNA3 result in improved convenience and expression. Biotechniques 1996;21(6):1013-5.
- 16) Katagiri T, Akiyama S, Namiki M, Komaki M, Yamaguchi A, Rosen V, et al. Bone morphogenetic protein-2 inhibits terminal differentiation of myogenic cells by suppressing the transcriptional activity of MyoD and myogenin. Exp Cell Res 1997;230(2):342-51.
- 17)Yang X, Li C, Herrera PL, Deng CX. Generation of Smad4/Dpc4 conditional knockout mice.

2002;Genesis 32(2):80-1.

- 18)Kanegae Y, Lee G, Sato Y, Tanaka M, Nakai M, Sakaki T, et al. Efficient gene activation in mammalian cells by using recombinant adenovirus expressing site-specific Cre recombinase. Nucleic Acids Res 1995;23(19):3816-21.
- 19)Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, Babitt JL, Deng DY, Hoyng SA, et al. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. Nat Chem Biol 2008;4(1):33-41.
- 20) Kodaira K, Imada M, Goto M, Tomoyasu A, Fukuda T, Kamijo R, et al. Purification and identification of a BMP-like factor from bovine serum. Biochem Biophys Res Commun 2006;345(3):1224-31.
- 21) Ohto H, Kamada S, Tago K, Tominaga SI, Ozaki H, Sato S, et al. Cooperation of six and eya in activation of their target genes through nuclear translocation of Eya. Mol Cell Biol 1999;19(10):6815-24.
- 22) Suzuki A, Thies RS, Yamaji N, Song JJ, Wozney JM, Murakami K, et al. A truncated bone morphogenetic protein receptor affects dorsal-ventral patterning in the early Xenopus embryo. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91(22):10255-9.
- 23)Kao KR, Elinson RP. The entire mesodermal mantle behaves as Spemann's organizer in dorsoanterior enhanced Xenopus laevis embryos. Dev Biol 1988;127(1):64-77.
- 24)Zhao B, Katagiri T, Toyoda H, Takada T, Yanai T, Fukuda T, et al. Heparin potentiates the in vivo ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2. J Biol Chem 2006;281(32):23246-53.
- 25)Suzuki H, Fukunishi Y, Kagawa I, Saito R, Oda H, Endo T, et al. Protein-protein interaction panel using mouse full-length cDNAs. Genome Res 2001;11(10):1758-65.
- 26) Akiyama S, Katagiri T, Namiki M, Yamaji N, Yamamoto N, Miyama K, et al. Constitutively active BMP type I receptors transduce BMP-2 signals without the ligand in C2C12 myoblasts. Exp Cell Res 1997;235(2):362-9.
- 27) Fujii M, Takeda K, Imamura T, Aoki H, Sampath TK, Enomoto S, et al. Roles of bone morphogenetic

© 2009 The Medical Society of Saitama Medical University

protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation. Mol Biol Cell 1999;10(11):3801-13.

- 28) McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. Nature 1997;387(6628):83-90.
- 29) He L, Vichev K, Macharia R, Huang R, Christ B, Patel K, et al. Activin A inhibits formation of skeletal muscle during chick development. Anat Embryol (Berl) 2005;209(5):401-7.
- 30) Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. EMBO J 2000;19(8):1745-54.
- 31) Le Cam L, Lacroix M, Ciemerych MA, Sardet C, Sicinski P. The E4F protein is required for mitotic progression during embryonic cell cycles. Mol Cell Biol 2004;24(14):6467-75.
- 32)Rooney RJ, Rothammer K, Fernandes ER. Mutational analysis of p50E4F suggests that DNA binding activity is mediated through an alternative structure in a zinc finger domain that is regulated by phosphorylation. Nucleic Acids Res 1998;26(7):1681-8.
- 33) Lee KA, Green MR A. cellular transcription factor E4F1 interacts with an E1a-inducible enhancer and mediates constitutive enhancer function in vitro. Embo J 1987;6(5):1345-53.
- 34) Le Cam L, Linares LK, Paul C, Julien E, Lacroix M, Hatchi E, et al. E4F1 is an atypical ubiquitin ligase that modulates p53 effector functions independently of degradation. Cell 2006;127(4):775-88.
- 35) Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. Nature 1991;351(6326):453-6.
- 36) Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. Science 1996;271(5247):350-3.
- 37)Lan X. Regulation of Smad activities. Biochim Biophys Acta 2006;1795:503-13.
- 38)Tan X, Weng T, Zhang J, Wang J, Li W, Wan H, et al. Smad4 is required for maintaining normal murine postnatal bone homeostasis. J Cell Sci 2007;120(Pt 13):2162-70.

http://www.saitama-med.ac.jp/jsms/