

122

TGF- $\beta$ のG蛋白を介する細胞外基質産生の  
制御機構に関する研究 (06671160)

平成6年度～平成7年度科学研究費補助金  
(一般研究C) 研究成果報告書



平成9年3月10日



研究代表者 二 瓶 宏  
(東京女子医科大学医学部第四内科)

TGF- $\beta$  の G 蛋白を介する細胞外基質産生の制御機構に関する研究

(06671160)

平成6年度～平成7年度科学研究費補助金（一般研究C）研究成果報告書

平成9年3月10日

研究代表者 二瓶 宏

（東京女子医科大学医学部第四内科）

## (は し が き)

Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ は、細胞の増殖・分化や細胞外基質の産生の調節に関与している重要な成長因子である。近年、慢性糸球体腎炎の発症・進展にTGF- $\beta$ が関与しているという報告が増えている。しかし、TGF- $\beta$ の受容体が数種類あり、どのシグナルの伝達に関与しているかは、不明な点が多い。我々は、慢性糸球体腎炎の進行過程において、細胞外基質の増加に伴う硬化現象にはTGF- $\beta$ が深く関与しており、その制御について研究してきた。また、ヒト糸球体においては、Gs, Gi, GoおよびGqなどのG蛋白の存在を、免疫組織化学およびWestern blotで確認した（添付論文）。このG蛋白の役割に関する腎臓領域の報告はすくない。

今回は、腎間質由来の線維芽細胞の cell line である normal rat kidney (NRK)細胞を用いて、TGF- $\beta$ の情報伝達系を研究するとともに、その制御法について検討した。本研究の新しい点は、受容体の細胞内ドメインに存在すると考えられるGTP-結合蛋白（G蛋白）認識配列という考えを導入して、TGF- $\beta$ の情報伝達系について検討を行ったことである。主に、このアミノ酸配列を化学的に合成し、そのペプチドを用いた阻害実験によりアプローチした。

### 研究組織

研究代表者：二瓶 宏（東京女子医科大学医学部第四内科）

研究分担者：新田孝作（東京女子医科大学医学部第四内科）

研究分担者：土谷 健（東京女子医科大学医学部第四内科）

### 研究経費

平成6年度 1、000千円

平成7年度 700千円

計 1、700千円

## 論文

Kosaku Nitta, Keiko Uchida, Akira Kawashima, Takaaki Tsutsui, Hiroyuki Ozu, Takashi Naito, Wako Yumura, Hiroshi Nihei: Identification of GTP-binding protein in human glomeruli. Jpn J Nephrol 36: 9-12, 1994

## 研究発表

Kosaku Nitta, Akira Kawashima, Keiko Uchida, Wako Yumura, Takashi Okamoto, Hiroshi Nihei, Ikuo Nishimoto: Possible involvement of Go in an increased fibronectin production induced by TGF- $\beta$ . 28th Annual Meeting of American Society of Nephrology. Sangiego, CA, USA; November 5-8, 1995

## 【研究目的】

本研究は、不明な点が多いTGF- $\beta$ のシグナル伝達機構のメカニズムを明らかにするとともに、GTP-結合蛋白（以下G蛋白）とTGF- $\beta$ 受容体連関を制御することにより細胞外基質産生を制御しうるかどうかを検討することにある。

本研究の第一の目的は、正常ラット腎間質由来の細胞芽細胞（NRK細胞）における細胞外基質—特にフィブロネクチン（FN）—産生に対するTGF- $\beta$ の作用が、pertussis toxin (PTX) 感受性または非感受性のG蛋白を介するかどうかを検討することである。次いで、そのG蛋白の $\alpha$ サブユニット上に存在するTGF- $\beta$ 受容体と結合するであろうアミノ酸配列を予想し、それに対応するペプチドを合成し、TGF- $\beta$ で刺激したNRK細胞にこれらのペプチドを添加し、細胞外基質産生が変化するかどうか検討する。

第二の目的は、NRK細胞におけるFN産生を変化させるG蛋白が予想されるが、その特異性を検討する。そのためには、各々のG蛋白認識配列に対するペプチドを同じように添加して、TGF- $\beta$ で刺激したNRK細胞におけるFN産生の変化を確認する必要がある。次いで、G蛋白の各サブユニット間の相互作用を検討するために、Go $\alpha$ 、Gs $\alpha$ 、Gi $\alpha$ およびGq $\alpha$ をコードする遺伝子をtransfectして、各々のサブユニットの蛋白が発現していることをWestern blotで確認し、TGF- $\beta$ で刺激したNRK細胞におけるFN産生の変化を確認する必要がある。

## 【研究方法】

NRK細胞はAmerican Tissue Culture Co. Ltd. より購入し、5% FCSおよび抗生剤を含むDMEM培地で培養した。細胞増殖の変化は、0.1%FCSで12時間インキュベートとし静止状態とし、その後リガンドの添加または非添加のserum-free DMEM培地で12時間培養し、<sup>[3H]</sup>thymidineの取り込み率または細胞数の変化で確認した。また、その際の細胞周期をflow cytometryで検討した。さらに、同様の条件下で実験を行い、培養上清中のFN濃度の変化はWestern blotで観察し、ELISAで定量化した。

まず、NRK細胞におけるFN産生に対するTGF- $\beta$ の作用の濃度および時間依存性を確

認する。そして、この作用がPTX感受性かどうか検討する。100 ng/ml PTXで前処理後、TGF- $\beta$ で刺激しFN産生の変化を観察する。さらに、一般にPTX非感受性と考えられているGs, GqおよびGoの一部のどれが関与している可能性が高いか検討する。これらの $\alpha$ サブユニットの細胞内ドメインのG蛋白認識配列を同定するため、(1) N末端に2残基の塩基性アミノ酸を含み、(2) C末端にB-B-X-BあるいはB-B-X-X-B (B:塩基性、X:非塩基性)のアミノ酸配列を模索し、これらのアミノ酸 n 配列に対応するペプチドを合成する。500 pM TGF- $\beta$ の作用を阻害するペプチドを選別することにより、関与するG蛋白が明らかになる。次いで、その $\alpha$ サブユニットをコードする遺伝子の中で、300 bp以降の受容体結合領域をコードしているシーケンスを同定する。

一方、上記の方法で判明したG蛋白認識配列の特異性を検討する。まず、Gs, Gq, GiおよびGoの $\alpha$ サブユニット上に存在するG蛋白認識配列をコードする遺伝子をNRK細胞にtransfectあるいはco-transfectし、FN mRNAの変化をNorthern blotで、FN蛋白産生の変化をELISAおよびWestern blotで観察する。また、できればG $\alpha$ サブユニットをコードする遺伝子のシーケンスより、PCRを用いてmini geneを作製し、同様の变化も観察する。さらに、これらの作用をanti-sense probeを用いて抑制できるかどうかを検討する。

## 【研究結果】

図1に示すように、NRK細胞をTGF- $\beta$ によって24時間刺激した場合、培養上清中のFNは濃度依存性に増加した。500 pM~1 nMで最大値に達した。培養時間については、ほぼ12時間でプラトーに達し、24時間まで持続した。よって、以下の実験の培養時間は12時間とした。

このTGF- $\beta$ による培養上清中のFN濃度の変化が、細胞増殖にともなう変化かどうか検討した。図2に示すように、50 pM~500 pMまでのTGF- $\beta$ 刺激で、NRK細胞への<sup>3</sup>H]thymidineの取り込みは有意に変化しなかった。細胞数も変化しなかった。よって、TGF- $\beta$ による培養上清中への変化は、細胞増殖にともなうものではないと判明した。Flow cytometryによる検討では、G1→S期への有意な変化を認めた。

一方、TGF- $\beta$ による培養上清中のFN濃度の変化が、100 ng/mlPTXの6時間にわたる前処理により変化するかどうか検討したところ、有意な変化が認められなかった。また、Gsの阻害作用をコレラ毒素を用いて検討したところ、同様に培養上清中のFN濃度は有意に変化しなかった。よって、TGF- $\beta$ による培養上清中のFN濃度の変化は、PTX非感受性のG蛋白を介するか、あるいはG蛋白を介しない系の変化をともなっている可能性が考えられた。そこで、前者の可能性をまず検証することにした。一般的に、PTX非感受性と考えられているGs, GqおよびGoの一部のどれが関与している可能性を考えた。

これらのG蛋白の作用を特異的に阻害する因子が同定されていないため、Nishimotoらの報告(J. Biol. Chem. 269: 13756, 1994)に準じて、G蛋白認識配列の考え方を応用することにした。上記の方法のところで述べた条件を満たすアミノ酸配列をさがしたところ、表1に示すようなアミノ酸配列が、それぞれG蛋白認識配列と考えられた。これらのアミノ酸配列は、TGF- $\beta$ 受容体の細胞内ドメインに存在し、G蛋白の $\alpha$ サブユニットのある部位と反応する配列と考えられる。よって、これらのアミノ酸配列を合成し、阻害実験をすることにした。

GsおよびGq認識配列の添加によって、TGF- $\beta$ 添加による培養上清中のFN濃度は有意に変化しなかった。しかし、Go認識配列を添加した場合、図3に示すようにTGF- $\beta$ 添加による培養上清中のFN濃度の増加は有意に抑制されることをWestern blotで確認した。さらに、Go認識配列の効果の濃度依存性を検討したのが図4である。培養上清中のFN濃度の変化はELISAで定量化したところ、TGF- $\beta$ 添加による培養上清中のFN濃度の上昇は、Go認識配列によって濃度依存性に阻害された。よって、NRK細胞においては、TGF- $\beta$ による培養上清中のFN濃度の増加にGoが関与している可能性が考えられた。

実際、NRK細胞の蛋白抽出液を用いたWestern blotで、Go蛋白の存在が確認された。また、Go認識配列ペプチドがNRK細胞内に取り込まれているかどうか、このペプチドに対するモノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法で検討したところ、細胞質にGo認識配列の存在が確認された。

次いで、このGo認識配列をコードする遺伝子をNRK細胞に一過性にtransfectして、

その蛋白の発現をWestern blotで確認した後、TGF- $\beta$ 添加によるNRK細胞内のFNmRNAの変化を検討した。図5に示すように、Go認識配列の過剰発現により、500 pMTGF- $\beta$ で刺激しても、NRK細胞内のFNmRNAの変化を認めなかった。同様の実験操作後に、培養上清中のFN濃度の変化をWestern blot またはELISAで検討したが、有意な変化を認めなかった。

### 【考察】

これまで、TGF- $\beta$ の情報伝達にG蛋白が関与しているという報告は、AKR-2B線維芽細胞とmink lung epithelial (MLE)細胞においてなされている。前者に対してTGF- $\beta$ は増殖刺激作用を有し、後者に対しては増殖抑制効果を示すことが報告されている。これらのケースでは、TGF- $\beta$ の添加によりGTPaseの活性化やGTP $\gamma$ Sの結合促進作用が確認されている。

また、微小血管内皮細胞においては、TGF- $\beta$ の添加により細胞増殖の抑制、I型コラーゲン( $\alpha$ 1(1),  $\alpha$ 2(2))mRNAレベルの増加を認め、PTXの前処理により細胞増殖はさらに抑制された。よって、これらの変化は、PTX感受性のG蛋白が関与している可能性を否定している。これ以上の検討はなされていない。

一方、TGF- $\beta$ 受容体は1回膜貫通構造を有する受容体に属するが、そのシグナル伝達に関しては不明な点が多い。一般的には、G蛋白共役型の受容体は7回膜貫通構造を有すると考えられている。しかし、最近、NishimotoらによりIGF-II受容体という1回膜貫通構造を有する受容体においても、G蛋白と共役することが示された。BALB/c3H3細胞においては、IGF-IIの作用は、PTX感受性のG $\alpha$ i2を介することが証明された。さらに、彼らは、IGF-II受容体の細胞内ドメインにGiを特異的に活性化する機能をもつ領域(G蛋白認識配列)を特定した。これらの機能は、7回膜貫通構造を有する受容体の細胞内ドメインについても適応されることを見いだした。

そこで、我々はNishimotoらの報告より、(1) N末端に2残基の塩基性アミノ酸を含み、(2) C末端にB-B-X-BあるいはB-B-X-X-B(B:塩基性、X:非塩基性)のアミノ酸配



列を模索し、次のようなG蛋白認識配列を特定した。

Gi2: DAVTD VIKN NLKDC

Go1: NNIQV VFDAV TDIII ANNLR GC

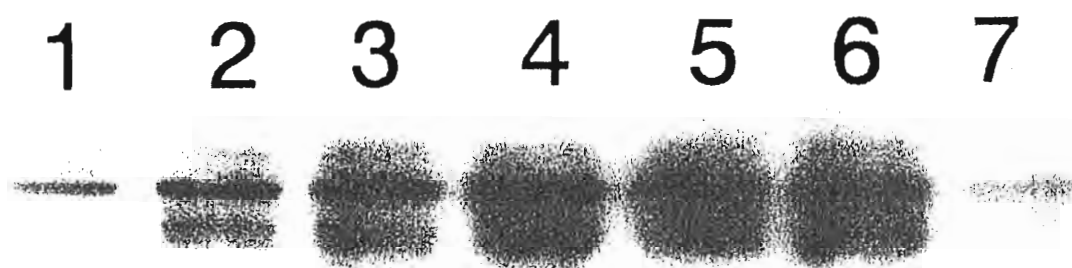
Go2: NNIQF VFDAV TDVII AKNLR GC

Gq: DTENI RFVFA AVKDT ILQLN LKEY

そして、これらを化学的に合成し、ペプチドとして阻害実験を行うことにした。

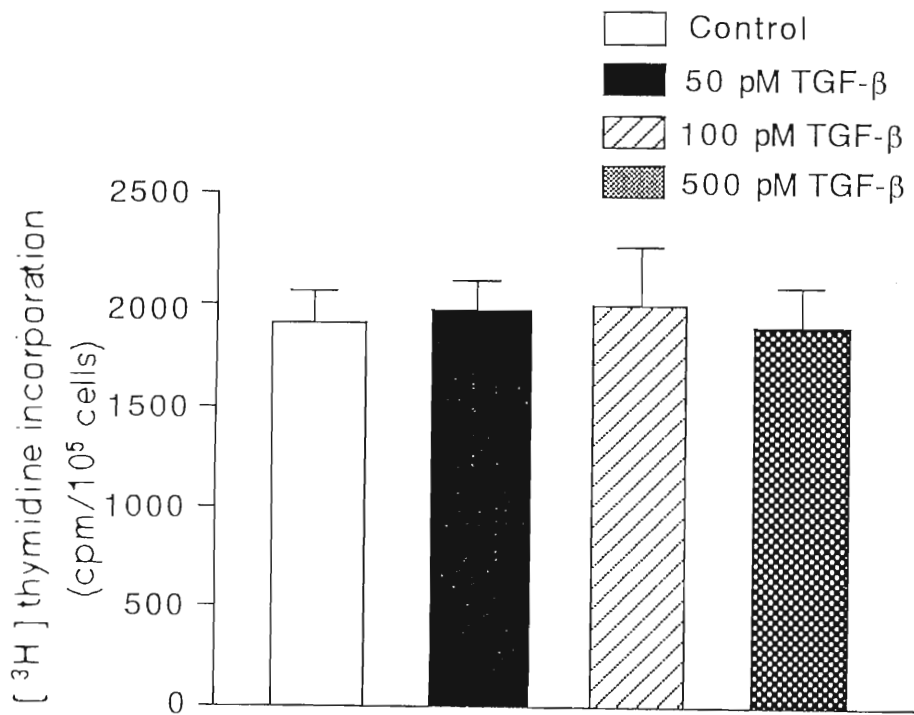
今回の検討では、TGF- $\beta$ によるFN産生刺激作用を阻害したのは、Go1: NNIQV VFDAV TDIII ANNLR GCだけであった。この結果より、TGF- $\beta$ によるFN産生刺激作用にはGoが関与している可能性が高いと結論した。Go $\alpha$ に対するモノクローナル抗体を用いたWestern blotにより、NRK細胞にはGo $\alpha$ が存在し、実際にペプチドを培養上清中に添加した場合に、細胞内へ取り込まれることを証明しているが、多少の問題を残した。

その一つは、Go1: NNIQV VFDAV TDIII ANNLR GCによる作用が特異的であるかどうかである。もう一つは、Go1はTGF- $\beta$ 受容体のどの領域と反応しているかが不明な点である。前者に関しては、Gi2、Go1、Go2およびGqをコードする遺伝子の領域からアプローチする必要がある。後者に関しては、NRK細胞に存在するTGF- $\beta$ 受容体を特定し、細胞膜を用いた再構成実験を施行する必要があると考えられた。



Dose-dependence of FN accumulation induced by TGF- $\beta$  in NRK cells. Lane 1, untreated; lane 2, 10 pM TGF- $\beta$ , lane 3, 50 pM TGF- $\beta$ , lane 4, 100 pM TGF- $\beta$ , lane 5, 500 pM TGF- $\beta$ , lane 6, 1 nM TGF- $\beta$ , lane 7, 500 pM TGF- $\beta$  + Go 10  $\mu$ M

TGF- $\beta$  had no effect on [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation into NRK cells. After 12 h incubation of NRK cells with MEM containing 0.5% FCS (incubation medium), the cells were incubated for additional 12 h in the incubation medium in the presence or absence of various concentrations of TGF- $\beta$



Gly (G): 75.07    Ala (A): 89.09    Val (V): 117.15    Leu (L): 131.17    Ile (I): 131.17  
Ser (S): 105.09    Thr (T): 119.12    Tyr (Y): 181.19    Cys (C): 121.16    Met (M): 149.21  
Asp (D): 133.10    Asn (N): 132.12    Glu (E): 147.13    Gln (Q): 146.15    Arg (R): 174.2  
Lys (K): 146.19    His (H): 155.16    Phe (F): 165.19    Trp (W): 204.22    Pro (P): 115.13

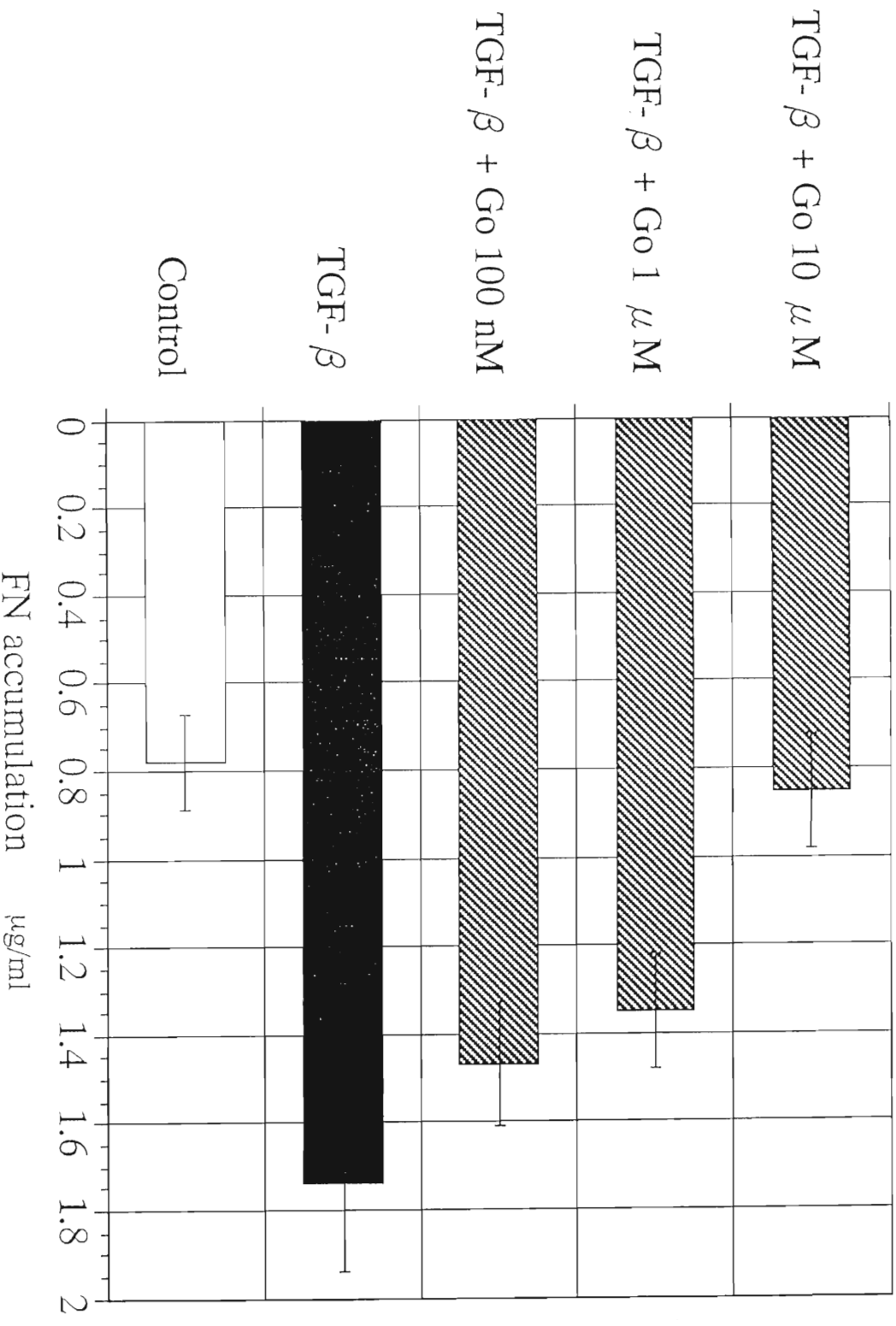
ACGi2 MW: 1661.1  
DAVTD VIKN NLKDC

ACGo1 MW: 2402.73  
NNIQV VFDAV TDIII ANNLR GC

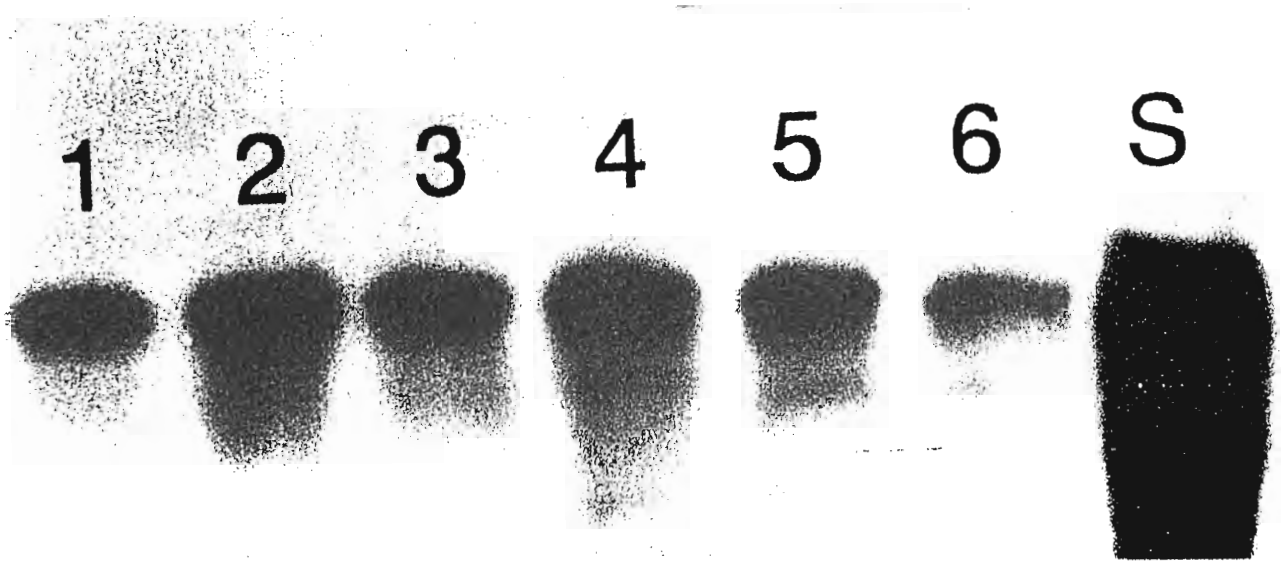
ACGo2 MW: 2451.14  
NNIQF VFDAV TDVII AKNLR GC

biot-ACGo2 MW: 2677.44 (= 2451.14 + 244.3 - 18.0)  
biot-NNIQF VFDAV TDVII AKNLR GC

ACGq MW: 2841.57 421217: 97.3%  
DTENI RFVFA AVKDT ILQLN LKEY



ELISA analysis for the inhibitory effect of various concentrations of a nucleotide exchange inhibitor in  $Go\alpha$  on FN accumulation induced by TGF- $\beta$



Effect of guanine nucleotide exchange inhibitors on TGF- $\beta$  regulation of FN accumulation in NRK cells.

Lane 1, untreated; lane 2, 500 pM TGF- $\beta$ , lane 3, TGF- $\beta$  + Gs, lane 4, TGF- $\beta$  + Gi2, lane 5, TGF- $\beta$  + Go, lane 6, TGF- $\beta$  + Gq, S, standard (1  $\mu$ M rat serum FN)



1~5: non-transfect; 1, 1nMTGF- $\beta$ ; 2, 500 pM TGF- $\beta$ ;3, 100 pM TGF- $\beta$ ;4, 50 pM TGF- $\beta$ ;5, 10 pM TGF- $\beta$ ; 6~9: Go cDNAtransfect; 10, 0.5% FCS