

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592787

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いた生体内骨形成におけるSUMO化修飾の機能解析

研究課題名(英文) The effect of SUMOylation on bone formation in mouse

研究代表者

雪田 聡 (Akira, Yukita)

静岡大学・教育学部・講師

研究者番号：80401214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は様々な分化段階における骨芽細胞培養細胞に対して、SUMO化修飾の阻害がBMP添加による分化誘導に与える影響を検討した。その結果、骨芽細胞への分化段階が進んだ細胞株は、前駆細胞から未熟な骨芽細胞への分化過程を示す細胞株とは異なり、SUMO化修飾阻害がBMP添加による骨芽細胞分化を抑制することを明らかにした。

すなわち、骨芽細胞の分化成熟度によってSUMO化修飾阻害が抑制にも促進にも働き得ることが示唆され、SUMO化修飾を介した骨芽細胞分化制御には、細胞内のSUMO化修飾を全体的に抑制するよりも特定の標的タンパク質のSUMO化修飾を時期特異的に制御することが有効ではないかと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of SUMOylation on BMP-induced osteoblastic differentiation using various cell lines. Inhibition of SUMOylation suppressed the osteoblastic differentiation induced by BMP treatment in the MC3T3E1 cells, which derived from mouse calvaria, while enhanced it in ST2 mouse bone marrow derived stromal cells and murine fibroblasts (C3H10T1/2 cells). This Data shows that the effect of SUMOylation on osteoblastic differentiation might change depending on degree of osteoblasts.

研究分野：組織学

キーワード：骨芽細胞分化 SUMO化修飾 分化制御 培養細胞

1. 研究開始当初の背景

申請者らはユビキチン化に類似した翻訳後タンパク質修飾である SUMO (small ubiquitin-related modifier) 化修飾が BMP 刺激による骨芽細胞分化を抑制的に制御していることをマウス筋芽細胞由来 C2C12 細胞株を用いて明らかにしてきた (文献 1, 2)。いくつかの培養細胞株において、BMP シグナルにおいて転写調節因子として機能する Smad4 が SUMO 化修飾を受けることが明らかになっているが、C2C12 細胞においても Smad4 は SUMO 化を受けることを示し、また、SUMO 化修飾を受けるアミノ酸残基に変異を加えた SUMO 化修飾を受けない変異型 Smad4 を作成して C2C12 細胞に過剰発現させた場合、BMP 添加に対する応答能が野生型と比較して有意に上昇した。以上の事から、BMP 添加による骨芽細胞分化は Smad4 の SUMO 化修飾により抑制的に制御されていることが示唆された。

2. 研究の目的

これまでの研究から SUMO 化修飾が骨芽細胞分化に関与することが示唆されたため、本研究課題では、骨芽細胞分化に対する SUMO 化修飾の役割をさらに詳細に明らかにすることを目的とし、(1) マウス生体内の骨芽細胞特異的な SUMO 化修飾の阻害、(2) 骨芽細胞の分化段階に沿った複数の培養細胞株を用いた SUMO 化修飾阻害が骨芽細胞分化に与える影響の検討、(3) 骨芽細胞分化を制御するタンパク質のうち、Smad4 以外の SUMO 化修飾標的タンパク質の検索、を行う事とした。

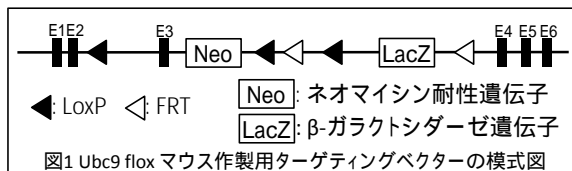
3. 研究の方法

(1) マウス生体内の骨芽細胞特異的な SUMO 化修飾の阻害

SUMO 化修飾に必須の酵素である Ubc9 を Cre-loxP システム骨芽細胞特異的にノックアウトすることにより、SUMO 化修飾を阻害することとした。

Ubc9 flox マウスの作製

図 1 に示すターゲティングベクターを作製し、ターゲティングベクターを導入したキメラマウスを作製し、仔マウスに Ubc9 flox 遺伝子を伝播させることで Ubc9 flox マウスを完成させる。



Ubc9 コンディショナルノックアウトマウスの作製

で作成した Ubc9 flox マウスと前骨芽細胞で Cre リコンビナーゼを発現することが知ら

れている Col1-2.3 Cre マウスを掛け合わせ、初期骨芽細胞分化時に Ubc9 が欠損し SUMO 化修飾が阻害される cKO マウス (Col1-2.3-Ubc9 cKO マウス) を作製する。

コンディショナルノックアウトマウスの骨組織評価

Col1-2.3-Ubc9 cKO マウスについて、骨形態計測およびマイクロ CT による骨密度の測定を行う。さらに *Osterix*, *Osteocalcin*, *Bone sialoprotein (BSP)* などの骨芽細胞マーカー遺伝子の発現を検討し、骨芽細胞にどのような影響が認められるかを形態学的に観察する。

(2) 複数の培養細胞株における SUMO 化修飾阻害が BMP 誘導性の骨芽細胞分化に与える影響の検討

筋芽細胞由来 C2C12 細胞への BMP 添加による骨芽細胞分化は前駆細胞から未熟な骨芽細胞への分化を模倣していると考えられている。そこで、さらに分化が進み、高い石灰化能を示す成熟骨芽細胞へと分化する MC3T3-E1 細胞 (マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株) をはじめ、マウス胎児繊維芽細胞由来 C3H10T1/2 細胞、マウス骨髄由来間葉系幹細胞 ST2 細胞を用い、C2C12 細胞と同様に siRNA により Ubc9 ノックダウンして SUMO 化修飾を阻害した状態で BMP2 を添加して骨芽細胞分化誘導を行う。

BMP2 添加による骨芽細胞誘導をアルカリホスファターゼ活性や骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現を比較検討することにより、SUMO 化修飾が骨芽細胞分化に与える影響が、各細胞株間で共通の現象かを明らかにする。

(3) SUMO 化修飾の標的となり得る骨芽細胞分化を制御するタンパク質の探索

申請者はこれまでに Smad4 の SUMO 化修飾が BMP シグナルに対する応答能の制御を介して骨芽細胞分化に影響を与えることを明らかにした。SUMO 化修飾の標的となるタンパク質は転写因子をはじめ数多く報告されているため、Smad4 以外にも骨芽細胞分化を制御する重要なタンパク質の機能が SUMO 化修飾の影響を受ける可能性が考えられる。

SUMO 化修飾を受けるタンパク質は共通のアミノ酸配列 (疎水性アミノ酸-リジン-任意のアミノ酸-アスパラギン酸またはグルタミン酸) を有する場合が多い。そこで、この配列を持ち、骨芽細胞に必須の転写因子である *Osterix* および *Runx2* に着目して SUMO 化修飾のターゲットとなり得るかを検討する。

C2C12 細胞に FLAG タグを付した *Osterix* または *Runx2* および HA タグを付した SUMO-1 を導入し、免疫沈降法により両転写因子の SUMO 化修飾を検討する。

4. 研究成果

(1) マウス生体内の骨芽細胞特異的な SUMO 化修飾の阻害

Ubc9 flox マウスを作製するためのターゲティングベクター構築を試みたが、予想外に難航を極め、研究開始から1年間経過しても構築に至らなかった。その一方で、培養細胞を用いた研究について以下に述べる進展が得られたため、コンディショナルノックアウトマウスの作製を中止し、培養細胞を用いて骨芽細胞分化に対する SUMO 化修飾の役割を詳細に検討することとした。

(2) 複数の培養細胞株における SUMO 化修飾阻害が BMP 誘導性の骨芽細胞分化に与える影響の検討

マウス骨組織における SUMO 化修飾に関与するタンパク質の局在を検討した結果、これらのタンパク質は骨髄中の繊維芽細胞様の細胞および骨細胞に局在が認められる一方で、骨芽細胞においては減弱する傾向が認められた。このことは、骨芽細胞の分化段階によって SUMO タンパク質の細胞内レベルが異なることを示唆しており、前駆細胞から未熟な骨芽細胞への分化、また、未熟な骨芽細胞から成熟した骨芽細胞さらには骨細胞へと変化するに伴って、SUMO 化修飾が担う役割が変化する可能性も考えられた。C2C12 細胞に対する BMP 添加は前駆細胞から未熟な骨芽細胞への分化を模倣していると考えられており、C2C12 細胞における SUMO 化修飾の阻害は、骨芽細胞分化を促進する。この促進は ST2 細胞および C3H10T1/2 細胞でも同様に観察されたが、興味深いことに骨芽細胞への分化段階が進んだ MC3T3-E1 細胞では BMP 添加によるアルカリホスファターゼ活性の上昇および石灰化能の促進とともに SUMO 化修飾の阻害により抑制されることが明らかになった(図2)。このことは、骨組織における SUMO 化修飾に関与するタンパク質の局在を検討した結果と同様に、骨芽細胞に対する SUMO 化修飾の影響はその分化段階によって変化することが示唆され、細胞内の SUMO 化修飾全体を抑制するよりも、骨芽細胞分化の制御に重要な SUMO 化修飾標的タンパク質を明らかにすることが重要ではないかと考えられた。

(3) SUMO 化修飾の標的となり得る骨芽細胞分化を制御するタンパク質の探索

研究課題(2)の結果から、Smad4 以外の骨芽細胞分化に重要なタンパク質が SUMO 化修飾を受け得るかを検討するため、複数のタンパク質について SUMO 化修飾を受ける共通のアミノ酸配列(コンセンサス配列)を有しているかを検討した。その結果、骨芽細胞分化に必須の転写因子である Runx2 および Osterix のアミノ酸配列中に SUMO 化修飾のコンセンサス配列が存在することを見出した。そこで、

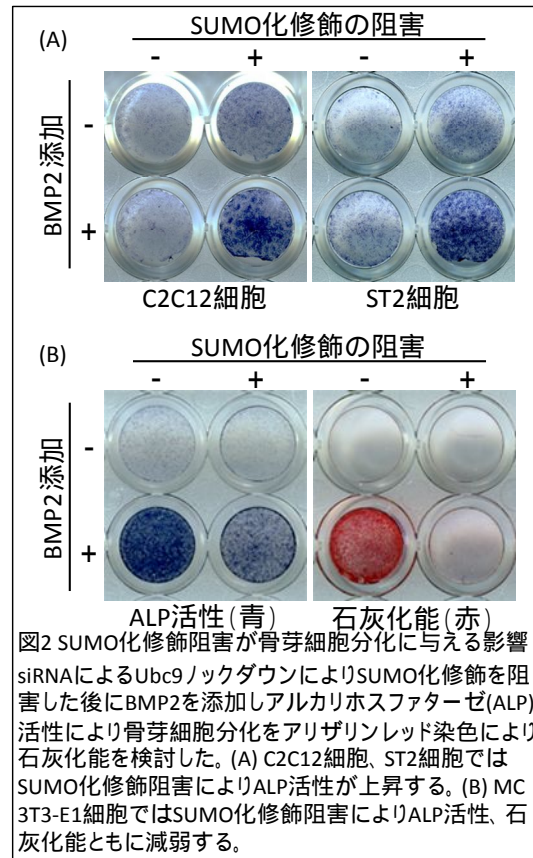


図2 SUMO化修飾阻害が骨芽細胞分化に与える影響
siRNAによるUbc9ノックダウンによりSUMO化修飾を阻害した後にBMP2を添加しアルカリホスファターゼ(ALP)活性により骨芽細胞分化をアリザリンレッド染色により石灰化能を検討した。(A) C2C12細胞、ST2細胞ではSUMO化修飾阻害によりALP活性が上昇する。(B) MC3T3-E1細胞ではSUMO化修飾阻害によりALP活性、石灰化能ともに減弱する。

これらの転写因子を C2C12 細胞に導入した後にタンパク質を回収し、免疫沈降法により Osterix および Runx2 が SUMO タンパク質と結合し得るかを検討した。その結果、Osterix について、SUMO 化修飾の標的タンパク質となることが明らかになった(図3)。

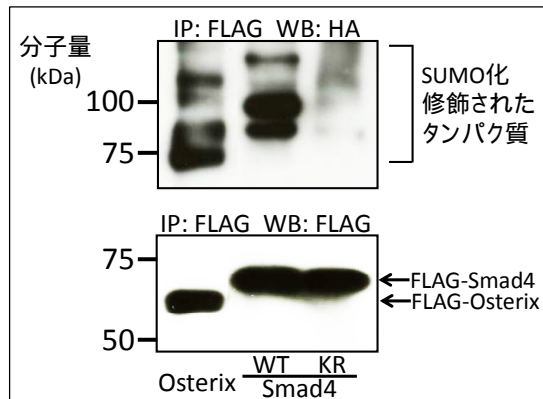


図3 OsterixのSUMO化修飾の検出

FLAGタグを付したOsterixまたはSmad4とHAタグを付したSUMO-1を過剰発現させたC2C12細胞からタンパク質を回収し、抗FLAG抗体を用いて免疫沈降後、抗HA抗体(上段)、抗FLAG抗体(下段)によりウェスタンブロッティングを行った。SUMO化修飾を受けることが知られている野生型Smad4(WT)と同様にOsterixはSUMO-1タンパクと結合し、SUMO化修飾を受け得る。また修飾を受けないSmad4変異体(KR)ではSUMO-1との結合は認められない。

Osterix には N 末端側および中央領域に SUMO 化修飾を受けることが予想されるアミノ酸配列が存在するため、今後、Osterix のこの領域のみの変異体を作製し、SUMO 化修飾を受ける領域を絞り込む。その後 SUMO タン

パク質が結合するリジン残基に変異を加え、SUMO化修飾を受けないOsterix変異体を細胞内に過剰発現し、野生型Osterixを過剰発現した場合と比較することによりOsterixのSUMO化修飾が骨芽細胞分化に役割を担っているのかを検討していく。

さらに、本研究課題はSUMO化修飾が骨芽細胞分化に与える影響を詳細に検討するための研究を行ったので報告する。

(4) SUMO化修飾阻害時に発現が大きく上昇する遺伝子群の骨芽細胞分化に対する影響の検討

申請者はこれまでに、SUMO化修飾を阻害してBMP刺激を促進させた場合に発現が変化する遺伝子群をマイクロアレイにより網羅的に探索している。この結果をもとに、これまでに骨芽細胞分化に対する役割が報告されていないものを「候補遺伝子」としてピックアップし、siRNAにより候補遺伝子をノックダウンしたC2C12細胞がBMP添加による骨芽細胞分化誘導に変化を呈するかを検討した。その結果、T-box型転写因子の1つであるTbx19遺伝子をノックダウンするとBMP刺激によるアルカリホスファターゼ活性の上昇が減弱し、骨芽細胞分化が阻害されていることが示唆された(図4)。

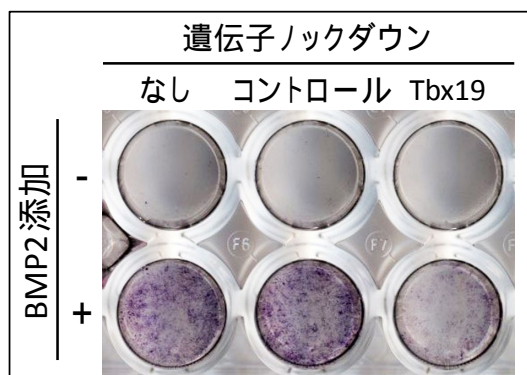


図4 Tbx19ノックダウンが骨芽細胞分化に与える影響

siRNAによりTbx19をノックダウンしたC2C12細胞にBMP2を添加しアルカリホスファターゼ(ALP)活性を検討した結果、siRNAなし(なし)、どの遺伝子発現にも影響を与えないコントロールsiRNA(コントロール)と比較し、Tbx19のノックダウンはALP活性が明確に減少している。

現在までにアナカルジン酸など、SUMO化修飾を阻害する低分子化合物が報告されつつある。今後、SUMO化修飾阻害剤が骨粗鬆症など、骨組織を失う疾患に対する治療薬となり得る可能性があるとして申請者は考えており、SUMO化修飾が骨芽細胞分化および骨組織の維持に与える影響をさらに解明していくことにより、SUMO化修飾を介した骨組織維持の制御が可能となるのではないかと期待している。

参考文献

Ubc9 negatively regulates BMP-mediated osteoblastic differentiation in cultured cells.

Yukita A(1), Hosoya A(2), Ito Y(3), Nakamura H(6)(他2名).

Bone誌. 2012年、50巻(5)、頁:1092-9.査読有

doi: 10.1016/j.bone.2012.02.008.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Localization of SUMOylation factors and Osterix in odontoblast lineage cells during dentin formation and regeneration.

Hosoya A(1), Yukita A(2), Nakamura H(8)(他5名).

Histochem Cell Biol誌. 2013年、140巻(2)、頁:201-11. 査読有

doi: 10.1007/s00418-013-1076-y.

Two distinct processes of bone-like tissue formation by dental pulp cells after tooth transplantation.

Hosoya A(1), Yukita A(2), Nakamura H(6)(他3名).

JHistochem Cytochem誌. 2012年、60巻(11)、頁:861-73. 査読有

doi: 10.1369/0022155412459741.

Ubc9 negatively regulates BMP-mediated osteoblastic differentiation in cultured cells.

Yukita A(1), Hosoya A(2), Ito Y(3), Nakamura H(6)(他2名).

Bone誌. 2012年、50巻(5)、頁:1092-9. 査読有

doi: 10.1016/j.bone.2012.02.008.

[学会発表](計 3 件)

堀池俊秀、雪田 聡、SUMO化修飾阻害によるBMP誘導性骨芽細胞分化の促進. 第37回日本分子生物学会年会. 2014年11月27日. パシフィコ横浜・神奈川・横浜市.

雪田 聡、細矢 明宏、中村 浩彰、マウス歯髄におけるプロテオグリカン局在の検討. 第54回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2012年9月15日. 奥羽大学・福島県・郡山市.

雪田 聡、細矢 明宏、中村 浩彰、FKBP5の骨組織における局在とデキサメタゾン応答に対する制御. 第30回日本骨代謝学会学術集会. 2012年7月23日. 京王プラザホテル・東京都・新宿区.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

雪田 聡 (YUKITA, Akira)
静岡大学・教育学部・講師
研究者番号：80401214

(2) 研究分担者

中村 浩彰 (NAKAMURA, Hiroaki)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：50227930

細矢 明宏 (HOSOYA, Akihiro)
松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：70350824

(3) 連携研究者

伊藤 弓弦 (ITO, Yuzuru)
産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・研究チーム長
研究者番号：30500079

小林 泰浩 (HOSOYA, Akihiro)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：20264252