

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：32409

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06568

研究課題名(和文) II型BMP受容体BMPR-IIの生理的機能の解析

研究課題名(英文) Functional analysis of bone morphogenetic protein receptor II

研究代表者

大手 聡 (Ohte, Satoshi)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：00547979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨形成因子(BMP)は骨格形成等に重要な役割を果たすサイトカインである。BMPの細胞内シグナルはI型とII型受容体によって伝達される。II型受容体であるBMPR-IIは細胞内に長い尾部構造を有する。本研究ではBMPR-IIの尾部領域の機能解明を目指した。肺動脈性肺高血圧症で見出されているBMPR-II変異体は機能喪失型であることが確認された。尾部を他のII型受容体に組み合わせたキメラ受容体はその活性が低下した。さらに、尾部領域が受容体発現量の低下を引き起こすことが示された。これらの結果、BMPR-IIの尾部領域が受容体の安定性に作用してシグナルを調節している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bone morphogenetic proteins (BMPs) are cytokines, which important for bone development. Intracellular BMP signaling is activated by type I and type II BMP receptors. These receptors contain intracellular kinase domain, which consist of about 300 amino acids. A long form (LF) of BMPR-II has a unique 500 amino acid tail domain at the C-termini. Several mutations in the tail domain of BMPR-II have been identified in patients with pulmonary arterial hypertension, suggesting that the tail domain has a novel function in BMP signaling. In this study, we analyzed a function of the BMPR-II tail domain. Western blot analysis revealed that protein level of BMPR-II LF was lower than that of BMPR-II short form (SF), but mRNA level seemed comparable. BMPR-II SF induced higher ALP activity than that of BMPR-II LF in C2C12 cells co-expressed with a BMP type I receptor. These findings suggest that BMPR-II LF is suppressed the activity by the tail domain through a reduction of protein stability.

研究分野：病態生理学

キーワード：骨形成因子 PAH

1. 研究開始当初の背景

Bone Morphogenetic Protein (BMP)は、骨格形成を始め、さまざまな組織の細胞増殖、分化、機能発現に重要なサイトカインである。これらの BMP シグナルは、I 型と II 型に分類される 2 種類の細胞膜貫通型セリン・スレオニンキナーゼ受容体による 2 段階のリン酸化反応を経て核内へ伝達されると考えられている。肺動脈性肺高血圧症 (PAH) と呼ばれる遺伝性疾患から、II 型 BMP 受容体の 1 つである BMPR-II の変異体が同定された。

BMPR-II は、細胞内のキナーゼの C 末端に約 530 アミノ酸残基からなる機能不明の尾部構造を有する。PAH の変異は、この BMPR-II の尾部に複数見出されている。この発見から、PAH は BMPR-II の機能喪失変異によって発症すると考えられているが、その詳細は明らかでない。しかし、我々は骨格筋で異所性骨化が起こる進行性骨化性線維異形成症 (FOP) の解析から、むしろ全長 BMPR-II は不活性で、尾部構造を欠失すると活性化する結果を得た。

2. 研究の目的

FOP や PAH 等の BMP 関連疾患に対する原因解明、予防・治療法を目的に、BMPR-II の尾部に存在が予想される機能領域の同定と、その生理的役割の解明を目指して研究を進めた。

3. 研究の方法

全長 BMPR-II をもとに、PAH で同定された尾部の点変異、及び欠失変異体の発現ベクターを構築した。さらに、別の II 型 BMP 受容体 (ActR-IIA および ActR-IIB) へ BMPR-II の尾部領域を挿入したキメラ受容体の発現ベクターを構築した。これらを筋芽細胞 C2C12 に一過性に発現させ、BMP シグナルを特異的ルシフェラーゼレポーター活性、RT-qPCR による BMP 標的遺伝子発現および骨芽細胞分化マーカーのアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性で評価した。

各受容体の発現は RT-PCR、ウエスタンブロットまたは免疫細胞染色法により確認した。

4. 研究成果

(1) BMPR-II SF と LF による BMP シグナル誘導活性

BMPR-II の尾部構造の BMP シグナルへの影響を確認するため、尾部構造を有する long form (LF) と尾部を欠損した short form (SF) の 2 種類の発現ベクターを構築し、I 型 BMP 受容体 (ALK2, 3, 6) と一過性に共発現させることで誘導される BMP シグナルを ALP 活性を指標に評価した。その結果、どの I 型受容体と組み合わせた場合でも BMPR-II(SF) は BMPR-II(LF) よりも強い ALP 誘導活性を示した (図 1)。また、別の II 型 BMP 受容体 (ActR-IIA, IIB) に BMPR-II の尾部領域を組み

込んだキメラ受容体においても、BMP シグナルの低下が認められた。このことから、BMPR-II 尾部領域は BMP シグナルに対して抑制的に作用している可能性が考えられた。

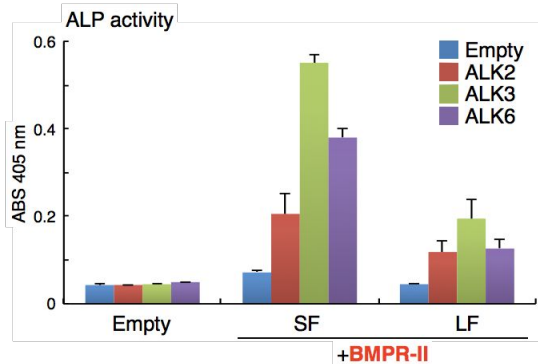


図 1 BMPR-II SF と LF の ALP 誘導活性

(2) PAH で見出された BMPR-II 変異体の活性

PAH から見出された BMPR-II 変異体のうち、欠損変異体 (R211X, Q403X, V804fsX1) および点変異体 (H533R) の BMP シグナル誘導活性について、ALP およびルシフェラーゼレポーターアッセイを評価した。その結果、いずれの変異体も SF と比べて活性は弱く、LF と同等あるいはそれよりも弱い活性を示した。このことから、PAH で見出された BMPR-II 変異体は機能喪失型である可能性が示唆された。

(3) BMPR-II 尾部領域によるタンパク発現への影響

尾部領域のタンパク発現への影響を確認するため、ウエスタンブロットおよび免疫染色法を用いて BMPR-II SF, LF のタンパク発現を確認した。その結果、BMPR-II LF は SF と比較し、明らかにタンパク発現量が低下していた (図 2)。しかし、それぞれの mRNA の発現量を RT-PCR 法にて比較したところ、タンパク発現とは異なり顕著な差は認められなかった (図 3)。これらの結果から、BMPR-II 尾部領域はタンパクの安定性に関与することで BMP シグナルを調節している可能性が示唆された。

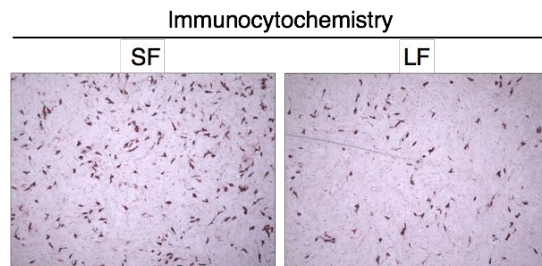


図 2 BMPR-II SF, LF 免疫細胞染色

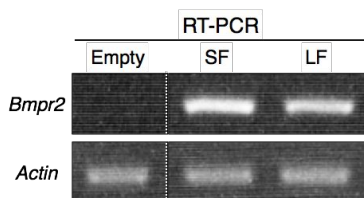


図 3 BMPR-II SF, LF の mRNA 発現

(4) BMPR-II 尾部領域機能部位の推定

BMPR-II 尾部領域における機能部位を特定するため、種々の BMPR-II 尾部欠損変異体を作成し、その BMP シグナル誘導活性を比較した。その結果、尾部領域を 75% 保持した欠損変異体は BMPR-II LF と同等の活性を示した。一方、50% 保持した欠損体では SF よりも LF よりも強い活性を示すことが明らかとなった。

これらの結果から、BMPR-II の尾部領域は BMPR-II 受容体のタンパクの安定性に関与し、BMP シグナルに対して抑制的に作用している可能性が示唆された。今後、詳細な作用機構が明らかとなることで、PAH を含む BMP シグナル関連疾患に対して新たな治療戦略を提供する可能性が考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Satoshi Ohte, Aiko Machiya, Sho Tsukamoto, Takenobu Katagiri : Functional analysis of the role of cytoplasmic tail domain of BMP type II receptor, BMPR-II. 第 14 回 RCGM フロンティア国際シンポジウム (2016 年 11 月 11 日、埼玉)

2. Aiko Machiya, Satoshi Ohte, Sho Tsukamoto, Noriko Sekine, Eijiro Jimi, Naoto Suda, Takenobu Katagiri : The TGF- β family signaling is involved in regulation of incisor formation of adult mice. 第 14 回 RCGM フロンティア国際シンポジウム (2016 年 11 月 11 日、埼玉)

3. Tsukamoto Sho, Ohte Satoshi, Sekine Noriko, Kuratani Mai, Machiya Aiko, Katagiri Takenobu : TGF- β signaling suppresses chondrocyte differentiation. 2016 Bone&Teech Gordon Research Seminar and Conference (2016 年 2 月 14 日、ガルベストーン、アメリカ)

4. Satoshi Ohte, Katsumi Yoneyama, Sho Tsukamoto, Mai Kuratani, Aiko Machiya, Takenobu Katagiri : Establishment and analysis

of Dox-inducible FOP associated mutant ALK2 expressing C2C12 cell lines. Australian New Zealand Bone and Mineral Society Annual Scientific Meeting 2015 (2015 年 11 月 2 日、ホバート、オーストラリア)

5. Aiko Machiya, Fujimoto Mai, Ohte Satoshi, Tsukamoto Sho, Suda Naoto, Takenobu Katagiri : A role of FKBP12 in activation of mutant mutant ALK2 responsible for fibrodysplasia ossificans progressive (FOP). Australian New Zealand Bone and Mineral Society Annual Scientific Meeting 2015 (2015 年 11 月 2 日、ホバート、オーストラリア)

〔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 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

埼玉医科大学ゲノム医学研究センター
<http://www.saitama-med.ac.jp/genome/>

埼玉医科大学 FOP 診療・研究プロジェクト
http://www.saitama-med.ac.jp/medlinks/saitama_univ_fop/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大手 聡 (Ohte Satoshi)
埼玉医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 00547979

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

片桐 岳信 (KATAGIRI Takenobu)
埼玉医科大学・医学部・教授

塚本 翔 (TSUKAMOTO Sho)
埼玉医科大学・医学部・助手

倉谷麻衣 (KURATANI Mai)
埼玉医科大学・医学部・研究員