

令和元年6月18日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20064

研究課題名(和文) 軟骨に特異的に発現する線維性コラーゲン分子の発現調節機構の解析と軟骨再生への応用

研究課題名(英文) Transcriptional regulation of the fibrillar collagen genes, type XI and XXVII collagens, expressed in chondrocytes

研究代表者

樋田 真理子 (Mariko, Hida)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：10737224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨細胞における11型及び27型コラーゲン遺伝子の基本プロモーター機構について検討した。11型コラーゲンにおいて、これまで報告していた転写因子NF-Yの結合部位以外の領域にプロモーター活性領域が存在することを見出した。ルシフェラーゼアッセイにより、GC-rich領域がプロモーター活性発現に重要であり、転写因子Sp1の関与が考えられた。Sp1の強制発現によって活性が増強され、ノックダウンにより抑制されたことから、Sp1が発現を調節している事が見出された。27型コラーゲンにおいて、2つの選択的プロモーター領域の存在が認められたが、遺伝子発現のメカニズムについては、明らかにする事は出来なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らは、活性領域の同定が困難とされていた組織特異的シスエレメントの網羅的スクリーニング法を開発し、これまで報告のない2つの線維性コラーゲン遺伝子の軟骨特異的エンハンサー領域を発見する事ができた。本研究の進展により、軟骨における分子発現機構や軟骨分化メカニズムの解明に貢献するだけでなく、軟骨形成不全症の診断や治療に新知見を与える事ができ、再生医療への応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the proximal promoter of Col11a1 and Col27a1 gene in chondrocytes. In Col11a1 gene, cell transfection experiments exhibited the suppression of the promoter activity without NF-Y binding sequence. Luciferase assays exhibited that GC rich sequence is a critical elements. Overexpression of Sp1 was significantly increased, and knockdown of Sp1 was suppressed the expression of endogenous transcript. Taken together, the transcription factor NF-Y and Sp1 upregulates the proximal promoter activity of Col11a1 gene in chondrocytes. In Col27a1 gene, oligo-Capping Race analysis revealed that mouse Col27a1 gene has two alternative promoters in chondrocytes. Transient transfection experiments indicated that the proximal promoter activity was from -586 to -445 in the downstream promoter and was from -310 to +1 in the upstream promoter. However, the mechanism of col27a1 gene regulation in chondrocytes has not been understood in this study.

研究分野：生化学

キーワード：コラーゲン 軟骨 転写

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックス分子、特に生体内タンパク質の約3割を占めるコラーゲン分子は、組織形成、機能発現に重要な役割を演じている。その中で線維性コラーゲン分子は骨格形成の主役であり、骨ではI, V, XXIV型、軟骨ではII, XI, XXVII型コラーゲンが主成分として構成されている。一方、未分化間葉系幹細胞が組織特異的なシグナル刺激を受けた後、骨・軟骨・脂肪細胞などに分化し、それぞれの組織や器官を形成することが知られている。そして、細胞の分化過程において、組織特異的な細胞外マトリックス分子が発現しており、これらの分子が「細胞の足場」として機能するだけでなく「細胞分化の道しるべ」として、細胞にシグナルを伝達し、細胞の運命決定に積極的に働きかけている事が明らかになりつつある。

そこで、我々のグループがマイナーコラーゲン分子の組織特異的な発現パターンを検討したところ、V型コラーゲン3鎖遺伝子が骨形成部位に発現しており、更にN末端ドメインに骨芽細胞特異的な結合領域が存在する事を見出した(1)。

次に、この遺伝子の骨芽細胞特異的な転写調節機構を検討してみると、骨芽細胞の分化を制御しているSp7/Osterixが、基本プロモーターに作用して発現を増強させる事を見出した(2)。

面白い事に、他の骨芽細胞に発現している線維性コラーゲン遺伝子もSp7/Osterixに制御されており(3)、骨芽細胞特異的な発現調節機構の存在を示した。また、今回着目しているXXVII型コラーゲンと同じファミリー分子であるXXIV型コラーゲン遺伝子は、未分化間葉系幹細胞から前骨芽細胞へ分化する過程で発現が誘導され、骨芽細胞へ分化するにしたがってその発現が増強し、骨形成過程でも安定的に発現している事が明らかとなり、この分子が骨分化のマーカー遺伝子である事を報告した(4)。

1) Kenichi Yamaguchi, Noritaka Matsuo, Hideaki Sumiyoshi, Noritaka Fujimoto, Ken-ichi Iyama, Hidekatsu Yoshioka.

Pro-alpha3(V) collagen chain is expressed in bone and its basic N-terminal peptide adheres to osteosarcoma cells.

Matrix Biol. 24; 283-94; 2005

2) Wu Y, Matsuo N, Sumiyoshi H, Yoshioka H.

Sp7/Osterix up-regulates the mouse pro-alpha3(V) collagen gene (Col5a3) during the osteoblast differentiation.

Biochem Biophys Res Commun. 394(3), 503-8. 2010.

3) Wu Y, Matsuo N, Sumiyoshi H, Yoshioka HH.

Sp7/Osterix is involved in the up-regulation of the mouse pro-alpha1(V) collagen gene (Col5a1) in osteoblastic cells.

Matrix Biol. 29. 701-6; 2010

4) Matsuo N, Tanaka S, Yoshioka H, Koch M, Gordon MK, Ramirez F.

Collagen XXIV (Col24a1) gene expression is a specific marker of osteoblast differentiation and bone formation.

Connective tissue Res. 49, 68-75, 2008

## 2. 研究の目的

申請者は、骨組織同様に軟骨組織にも特異的な発現調節機構が存在すると考え、軟骨に特異的に発現しているXI型コラーゲン1鎖およびXXVII型コラーゲン1鎖遺伝子に着目し、これらコラーゲン分子の軟骨特異的な発現調節機構について、以下の項目に着目して試みる。

(1) XI型コラーゲンおよびXXVII型コラーゲン遺伝子のプロモーター領域の解析を行う。特に、XXVII型コラーゲン遺伝子に存在する2つの選択的プロモーター、特に軟骨組織に関与しているプロモーターについて、その軟骨特異的な転写調節機構について解析する。

(2) 2つの軟骨特異的なエンハンサー活性発現に重要な結合配列及び結合する因子を同定すると共に、強制発現およびノックダウン等による機能解析を行う。

(3) トランスジェニックマウスを作製し、個体レベルでの発現パターンを解析する。

(4) 見出した軟骨特異的な発現調節因子が、未分化間葉系幹細胞やES細胞からの分化過程(軟骨分化誘導や骨分化抑制等)にどのような役割を果たしているかを検証する。

(5) non-coding RNAによる遺伝子発現調節機構との関連を検討する。

(6) エンハンサー活性に重要な結合配列や結合因子と軟骨形成不全症との関連を調べる。

## 3. 研究の方法

(1) XI型およびXXVII型コラーゲン遺伝子の基本プロモーターの基本転写調節機構を調べる。  
XI型コラーゲンおよびXXVII型コラーゲン遺伝子は、軟骨組織に発現している事は分かっているが、その発現調節機構についての情報は全くない。申請者は、この遺伝子の基本転写調節機構の解析を進めたところ、2つの転写産物が存在し、その発現が異なっている(軟骨・皮膚)事を見出した。

加えて、この遺伝子の選択的プロモーターのメカニズムおよび関与する転写因子については全くわかっていない。

そこで、基本プロモーター領域を同定するために、まず、この領域を含むルシフェラーゼコンストラクトを作製し、軟骨細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイを行い、活性を測定する。

次に、関与する転写因子を決定するために、ルシフェラーゼ活性を示した領域を含む DNA プロンプを作製し、ゲルシフトアッセイを試みる。ゲルシフトアッセイにより、核タンパク/DNA 複合体のバンドが検出された時には、その DNA 配列により予測される転写因子に対する特異抗体を用いて、スーパーシフトアッセイを行う。スーパーシフトを確認できた場合には、Chip アッセイを行い、細胞内での転写因子のプロモーター領域への結合を明らかにする。

(2) 発見した XI および XXVII 型コラーゲン遺伝子に存在する軟骨特異的エンハンサー領域を導入したトランスジェニックマウスを作製し、個体レベルでの発現パターンを解析する。

まず、2つの軟骨特異的シスエレメントの個体レベルでの活性を検討するために、

エンハンサー領域を含んだコンストラクト DNA (X-gal, GFP) を構築後、作製したコンストラクト DNA を、マイクロインジェクション (または、CRISPR-Cas9 システム) により受精卵に導入してトランスジェニックマウスを作製する。

トランスジェニックマウスは、胎生 13.5~16.5 日で取り出し、X-gal 染色後 (又は GFP) にホルマウントまたは切片を作製し、エンハンサー活性の発現パターンを解析すると共に、免疫染色により関与する因子の生体内での作用機序を明らかにする。

#### 4. 研究成果

申請者は、XI 型コラーゲン 1 鎖の軟骨細胞における基本転写調節機構の解析を試みた。これまでに報告した NF-Y 以外の転写因子の関与を確かめる為に、NF-Y 結合部位より下流の領域について検討した結果、転写因子が結合しうる配列 (GC-rich sequence, -96>-67) の存在を見出した。

最初に、この領域に変異を加えたコンストラクトを作製 (m1: -96>-87, m2: -86>-77, m3: -76>-67) し、ルシフェラーゼアッセイを行った結果、3種類のコンストラクトすべてにおいて、基本プロモーター活性が低下し、特に m2 (-86>-77) に変異を加えた場合においてその低下が顕著であった。

そこで、データベース検索を行った結果、予測される転写因子に Sp1 が見出されたので、Sp1 の強制発現実験を行ったところ、-96>-67 の GC-rich sequence を含むルシフェラーゼコンストラクトでのみ基本プロモーターの上昇が認められた (図 1)。

加えて、Sp1 のノックダウン実験を行った結果、ルシフェラーゼ活性の低下と共に XI 型コラーゲン転写産物の低下も認められた (図 2)。以上の結果より、XI 型コラーゲン遺伝子の軟骨細胞における基本転写調節に Sp1 が正に関与していることが明らかとなった。

次に、XXVII 型コラーゲン遺伝子の基本転写調節機構について解析を試みた。この遺伝子は、これまでの解析により 2つの選択的プロモーターの存在が確認できているので、それぞれの基本プロモーターについて解析を試みた。

その結果、下流のプロモーター領域には、1つの転写因子と思われる核タンパクの結合が確認されており、結合領域に変異を加えたルシフェラーゼコンストラクトにおいて、活性の低下が認められた。この結合因子について、更なる解析を試みているが、その詳細については明らかにすることが出来なかった。

一方、上流の基本プロモーター領域には、複数の核タンパクの結合が確認できたが、これらの因子の XXVII 型コラーゲン遺伝子のプロモーター活性発現への作用機序は、明らかにすることは出来なかった。

最後に、XI 型および XXVII 型コラーゲン遺伝子の発現に関与する軟骨特異的エンハンサー活性に関与するシスエレメントの検索および結合因子の同定を試みたが、明らかな結合配列および関与する転写因子の同定までには至らなかった。



図 1

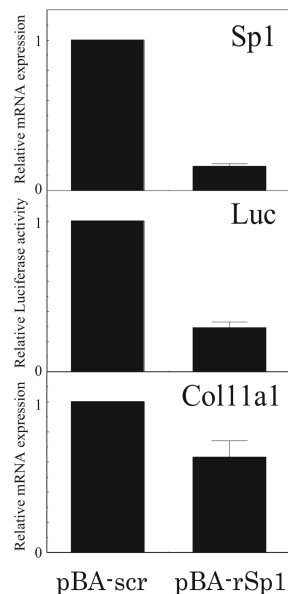


図 2

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

Uehara E, Hokazono H, Hida M, Sasaki T, Yoshioka H, Matsuo N, GABA promotes elastin synthesis and elastin fiber formation in normal human dermal fibroblasts(HDFs), Biosci. Biotechnol. Biochem., 査読有、2017, 1198-1205

Watanabe K, Hida M, Sasaki T, Yano H, Kawano K, Yoshioka H, Matsuo N, Sp1 upregulates the proximal promoter activity of the mouse collagen a1(XI) gene(Col11a1) in chondrocytes, In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim., 査読有、2016, 235-42

### 〔学会発表〕(計 2 件)

樋田真理子 他、XXVII 型コラーゲン 1 鎖遺伝子(Col27a1)の転写調節機構の解析、日本生化学会・九州支部例会、2017

渡邊啓次郎、樋田真理子 他、転写因子 Sp1 は、軟骨における Col11a1 の基本プロモーター活性を調節する、日本結合組織学会、2016

### 〔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：  
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：  
国内外の別：

### 〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：松尾 哲孝

ローマ字氏名：Matsuo Noritaka

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。