

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591952

研究課題名（和文） 骨・軟骨に発現する新規線維性コラーゲン分子群の組織特異的
発現調節機構及び機能解析研究課題名（英文） Studies on the transcriptional regulation of newly fibrillar
collagens in osteoblasts and chondrocytes.

研究代表者

松尾 哲孝（MATSUO NORITAKA）

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：10284788

研究成果の概要（和文）：

マウス XXVII 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子の転写調節機構の解析を行った結果、下流領域の基本プロモーター活性は、エクソン 1 転写開始点上流-568~-445 の領域に、上流領域では、エクソン 1'転写開始点上流-310'~+1'の領域に認められた。しかしながら、軟骨特異的なエンハンサーエレメントは認めることはできなかった。組織局在を検討したところ、エクソン 1'を含む転写産物は軟骨特異的な発現パターンを示し、エクソン 1 を含む転写産物は主に皮膚に発現が見られた。

研究成果の概要（英文）：

The current study characterized the transcriptional regulation of the mouse type XXVII collagen gene (*Col27a1*). The transcriptional activity was seen from -568 to -445 in the downstream promoter (for Exon1), and EMSA indicated that nuclear protein bound to a region, from -504 to -465. However, no element, such as a chondrocyte-specific enhancer was detected within that region of *Col27a1* gene. Finally, an *in situ* hybridization analysis was performed to demonstrate the expression pattern of the two alternative splicing transcripts. The transcript with Exon1' was expressed in cartilage similar to that of type II collagen, whereas the other with Exon1 was mainly expressed in skin.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：コラーゲン 転写因子 発現調節

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の約3割を占めるコラーゲン分子は、組織の形成、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・軟骨形成の主役であり、骨ではI・V型、軟骨ではII・XI型コラーゲンを中心として構成されている。

我々は、量的には少ないがコラーゲン線維の直径を調節しているマイナーコラーゲン(V/XI型)に着目し、その発現調節機構の解析を行い、軟骨コラーゲンと考えられてきた $\alpha 1(XI)$ 鎖が非軟骨組織にも発現している、選択的スプライシングにより制御されている事、 $\alpha 1(V)$ 、 $\alpha 3(V)$ 、 $\alpha 1(XI)$ 鎖遺伝子のいずれにおいても転写因子 CBF/NF-Y が関与しているファミリー分子に共通な発現調節機構が存在する事、 $\alpha 3(V)$ のN末端ドメインに骨芽細胞特異的結合領域の存在する事などを示し、マイナーコラーゲンの骨格形成における重要性を示してきた。

一方、24型および27型コラーゲンは、線維性コラーゲンであるが、量的には非常に少なく、既知の線維性コラーゲン分子とは異なった構造が見られ、新しいサブタイプに分類された。面白い事に、24型は骨に、27型は軟骨に強く発現しているため、骨・軟骨形成および機能発現に関与している可能性が高い。我々は、次にこの新規コラーゲンの発現調節機構の解析を行い、24型コラーゲンには2つの選択的転写産物が存在し、この遺伝子の基本転写活性には、CREB/ATFファミリーが正に作用する事や、骨芽細胞分化過程で発現が誘導され、分化過程で発現が増強し、骨形成期においても維持されている事から、新しい骨マーカー分子になりうる事を見出した。また、27型コラーゲンにも、2つの選択的転写産物が存在し、これらは選択的プロモーターにより制御されている事を明らかに

している。

2. 研究の目的

24型・27型コラーゲンは、新しい線維性コラーゲン分子としてクローニングされ、その一次構造の違いにより、これまでの線維性コラーゲンとは異なったサブファミリーに分類される。生体内でのこれら分子の発現量は非常に少ないが、その発現部位は局限しており、24型は骨に、27型は軟骨に特異的に発現している。これらの事から、骨格形成過程および組織での機能発現において、質的に重要な役割を演じている可能性が示唆される。そこで本研究では、新しい線維性コラーゲン分子(24型・27型)の骨・軟骨特異的な発現調節機構及びその機能を解析し、骨格形成での役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

27型コラーゲン遺伝子の2つの転写産物の基本プロモーター領域を同定するために、ルシフェラーゼコンストラクトを作製し、トランスフェクションの実験を行うと共に、ゲルシフトアッセイ法によって関与する転写因子の有無を検討した。

4. 研究成果

二つの選択的プロモーター領域の中で、下流に存在する基本プロモーター活性は、エクソン1転写開始点上流-568~-445の領域に認められ、-504~-465の領域に結合する核タンパクの存在が明らかとなった。一方、上流領域の基本プロモーター活性は、エクソン1'転写開始点上流-310'~+1'の領域に認められたが、この領域内に結合する核タンパクの存在は、ゲルシフトアッセイ法では検出できなかった。次に、軟骨特異的シスエレメントの解析を行うために、マウス *Col27a1* 遺伝子の第1イントロンを含むルシフェラーゼコンストラクトを作製し、トランスフェク

ションの実験を行った。しかし、第1イントロン内に軟骨特異的なエンハンサーエレメントは認めることはできなかった。最後に、この2つのスプライシング産物の組織局在を *in situ* ハイブリダイゼーション法で検討した。エクソン1' (上流) を含む転写産物は軟骨特異的な発現パターンを示し、エクソン1 (下流) を含む転写産物は主に皮膚に発現が見られた。これらの結果より、マウス *Col27a1* 遺伝子には2つの選択的プロモーターが存在し、その転写調節機構はそれぞれ異なっていることが示唆された。

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9件)

1) Kato A, Okamoto O, Ishikawa K, Sumiyoshi H, Matsuo N, Yoshioka H, Nomizu M, Shimada T, Fujiwara S,

Dermatopontin interacts with fibronectin, promotes fibronectin fibril formation, and enhances cell adhesion.

J Biol Chem, 286, 14861-9, 2011

2) Kusunoki M, Misumi J, Shimada T, Aoki K, Matsuo N, Sumiyoshi H, Yamaguchi T, Yoshioka H,

Long-term administration of the fungus toxin, sterigmatocystin, induces intestinal metaplasia and increases the proliferative activity of PCNA, p53, and MDM2 in the gastric mucosa of aged Mongolian gerbils. Environ Health Prev Med, 16, 224-31, 2011

3) Ishikawa K, Sumiyoshi H, Matsuo N, Takeo N, Goto M, Okamoto O, Tatsukawa S, Kitamura H, Fujikura Y, Yoshioka H, Fujiwara S.

Epiplakin accelerates the lateral organization of keratin filaments during wound healing.

J Dermatol. Sci. 60. 95-104; 2010

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

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

5) 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.

6) Hamada Y, Sumiyoshi H, Matsuo N,

Yun-Feng W, Nakashima M, Yanagisawa S, Yoshioka H.

The pro-alpha2(XI) collagen gene is expressed in odontoblasts.

Biochem Biophys Res Commun. 392(2), 166-70. 2010.

7) Okamoto O, Hozumi K, Katagiri F, Takahashi N, Sumiyoshi H, Matsuo N, Yoshioka H, Nomizu M, Fujiwara S.

Dermatopontin promotes epidermal keratinocyte adhesion via alpha3beta1 integrin and a proteoglycan receptor.

Biochemistry. 49(1), 147-55. 2010

8) Wu Y, Matsuo N, Sumiyoshi H, Yoshioka H,

The Sp1 and CBF/NF-Y transcription factors cooperatively regulate the mouse pro-alpha3(V) collagen gene (Col5a3) in osteoblastic cells.

Acta Med Okayama 64, 95-108, 2010.

9) Kusunoki M, Misumi J, Aoki K, Simada T, Matsuo N, Sumiyoshi H, Ebine N, Yamaguchi T, Okamoto A, Yoshioka H.

Long-term administration of steigmatocystin with drinking water in Helicobacter pylori-infected aged Mongolian gerbils enhances carcinogenesis in the gastric mucosa.

J. Phy. Fit. Nutr. Immunol. 19, 8-16, 2009.

[学会発表] (計 20 件)

1) 矢野博之、濱中良志、住吉秀明、中村三紀、松尾哲孝、吉岡秀克
放射線によるコラーゲン遺伝子発現の解析
日本生化学会九州支部例会
平成23年5月22日、久留米

2) 矢野博之、濱中良二、住吉秀明、中村三紀、松尾哲孝、吉岡秀克
放射線によるコラーゲン遺伝子発現の解析
日本結合組織学会・マトリックス研究会
平成23年6月10日、別府

3) 加藤愛子、岡本修、松尾哲孝、吉岡秀克、野水基義、藤原作平
細胞外マトリックス蛋白質デルマトポンチンの活性ペプチドの同定
日本結合組織学会・マトリックス研究会
平成23年6月10日、別府

4) 岡本修、加藤愛子、矢野博之、住吉秀明、松尾哲孝、吉岡秀克、濱中良志、石川一志、清水史明、藤原作平
ケロイド線維芽細胞の発現解析
日本結合組織学会・マトリックス研究会
平成23年6月10日、別府

5) 松尾哲孝
細胞外マトリックス分子の発現調節機構について
生物機能研究会
平成23年7月2日、福岡

6) 矢野博之、濱中良志、住吉秀明、中村三

紀、松尾哲孝、吉岡秀克
放射線によるコラーゲン遺伝子発現の解析
アイソトープ・放射線研究発表会
平成23年7月7日、東京

7) 矢野博之、濱中良志、住吉秀明、中村三紀、松尾哲孝、吉岡秀克
放射線によるコラーゲン遺伝子発現の解析
日本生化学会九州支部例会
平成22年5月22日、鹿児島

8) 矢野博之、濱中良志、住吉秀明、中村三紀、松尾哲孝、吉岡秀克
放射線によるコラーゲン遺伝子発現の解析
アイソトープ・放射線研究発表会
平成22年7月8日、東京

9) 加藤愛子、岡本修、松尾哲孝、吉岡秀克、野水基義、藤原作平
真皮細胞外マトリックス蛋白質デルマトポンチンの創傷治癒における役割
日本結合組織学会・マトリックス研究会
平成22年8月19日、秋田

10) 松尾哲孝、Wu Yung-Feng、住吉秀明、吉岡秀克
Sp7/Osterix は、骨芽細胞分化家庭においてマウスV型コラーゲンα3鎖遺伝子の発現を増強する
日本結合組織学会・マトリックス研究会
平成22年8月19日、秋田

11) 矢野博之、濱中良志、住吉秀明、中村三紀、松尾哲孝、吉岡秀克
放射線によるコラーゲン遺伝子発現の解析
日本分子生物学会・日本生化学会
平成22年12月8日、神戸

12) Wu Yung-Feng、松尾哲孝、住吉秀明、吉岡秀克
Sp7/Osterix は、骨芽細胞分化家庭においてマウスV型コラーゲンα3鎖遺伝子の発現を調節する
日本分子生物学会・日本生化学会
平成22年12月8日、神戸

13) 住吉秀明、松尾哲孝、吉岡秀克
創傷治癒過程におけるV型コラーゲンα3鎖の機能
日本分子生物学会・日本生化学会
平成22年12月8日、神戸

14) Wu Yungfen、松尾哲孝、住吉秀明、吉岡秀克
マウスV型コラーゲンα1鎖遺伝子の転写調節機構の解析
日本生化学会、九州支部例会

平成21年5月16日、福岡

15) 松尾哲孝、Wu Yungfen、住吉秀明、吉岡秀克
マウスV型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子の転写調節機構の解析
生物機能研究会
平成21年6月13日、宮崎

16) Wu Y, Matsuo N, Sumiyoshi H, Yoshioka H: Sp1 and CBF/NF-Y transcriptional factors upregulated the proximal promoter of mouse $\alpha 3(V)$ collagen gene in osteoblast.
8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium,
2009, June 4, Yokosuka, Japan

17) Sumiyoshi H, Matsuo N, Yoshioka H: Study of Fibrogenesis using a wound hearing model.
8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium,
2009, June 4, Yokosuka, Japan

18) 矢野博之、濱中良志、住吉秀明、中村三紀、松尾哲孝、吉岡秀克
放射線照射によるコラーゲン遺伝子発現の解析
蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
平成21年9月10日、唐津

19) Wu Yunfeng, 松尾哲孝、住吉秀明、吉岡秀克
The Sp7/Osterix transcription factors up-regulate the mouse pro- $\alpha 3(V)$ collagen gene (Col5a3) in osteoblastic cells.
日本分子生物学会
平成21年12月9日、横浜

20) 住吉秀明、松尾哲孝、吉岡秀克
The study of fibrogenesis using a wound hearing model.
日本分子生物学会
平成21年12月9日、横浜

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

松尾哲孝 (MATSUO NORITAKA)
大分大学・医学部・准教授
研究者番号：10284788

(2)研究分担者

吉岡秀克 (YOSHIOKA HIDEKATSU)
大分大学・医学部・教授
研究者番号：00222430

濱中良志 (HAMANAKA RYOUZI)
大分大学・医学部・助教
研究者番号：60274750

住吉秀明 (SUMIYOSHI HIDEAKI)
大分大学・医学部・助教
(現東海大学・医学部・研究員)
研究者番号：60343357
(平成21-22年度まで研究分担者)

(3)連携研究者

なし