

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659713

研究課題名（和文）Ⅱ型コラーゲンとアグリカンの転写制御に関する研究

研究課題名（英文）A study on the transcriptional regulation of type II collagen and aggrecan

研究代表者

篠村 多摩之（SHINOMURA TAMAYUKI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：70206118

研究成果の概要（和文）：

軟骨組織の主要構成成分であるⅡ型コラーゲンとアグリカンは、乾燥重量にして軟骨組織の50%以上を占めている。本研究ではこれら2種類の成分の軟骨組織における高い発現が、遺伝子レベルでどのように制御されているか、その制御機構について解析を行った。その結果、それぞれの遺伝子の発現制御に関わる新たなエンハンサー（遺伝子発現を調節する遺伝子領域）の存在を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：

Type II collagen and aggrecan which are the major components of cartilage occupy more than 50% of the tissue dry weight. In this study, the transcriptional mechanism that controls the high level expression of these two molecules in chondrocytes was analyzed. As a result, I found new enhancer elements that are responsible for the regulation of each gene expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野： 医師薬学

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： 軟骨、コラーゲン、アグリカン、エンハンサー、転写制御

1. 研究開始当初の背景

Ⅱ型コラーゲンとアグリカンは軟骨組織の主要構成成分であり、それぞれの遺伝子の軟骨組織における特異的な発現は、転写因子 Sox9 とそれが結合するゲノム DNA 上のエンハンサー配列によって制御されている。このことは、Sox9 が結合するエンハンサー配列を、Ⅱ型コラーゲンのプロモーター配列と組み合わせで作成したレポ

ーター遺伝子が、トランスジェニックマウスの系において軟骨組織特異的に発現することから明らかにされてきた。しかし、こうした実験で用いられてきたエンハンサー配列は、基本となる 48 塩基の配列を人工的に 4 回繰り返して繋いだものであり、単一のエンハンサー配列のみを用いた場合には、レポーター遺伝子の発現はかなり低いレベルに止まってしまう。このこと

は、基本となる 48 塩基のエンハンサー配列のみで、内在性の II 型コラーゲン遺伝子は高い発現レベルを維持していることと明らかに異なっている。言い換えると、既知のプロモーターとエンハンサーの組み合わせだけでは、軟骨細胞に於ける II 型コラーゲンの特異的な発現は説明できても、その高い転写活性までは説明することが困難であるということである。そしてこのことは、II 型コラーゲン遺伝子の高い転写活性をもたらす未知のエンハンサー配列が、遺伝子の何処かに存在することを強く示唆するものである。尚、以上のことはアグリカンについても全く同じ状況である。

一方、内因性の II 型コラーゲンおよびアグリカンの発現レベルは、発生初期の形態形成過程では非常に高いが、一旦組織が形成されてしまうと、特に関節軟骨組織に於いては、その転写は極端に低下することが解っている。従って、軟骨細胞における II 型コラーゲンおよびアグリカンの各遺伝子の転写レベルにおける発現制御機構を解明することは、軟骨組織の代謝を理解する上で非常に重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、II 型コラーゲンおよびアグリカンの遺伝子発現を制御する第 2、第 3 のエンハンサーの存在を明らかにすることである。そして、新たなエンハンサー配列が明らかになった場合は、そこに結合する転写因子の解明を進め、軟骨細胞に於けるそれぞれの遺伝子の発現レベルがどのようにコントロールされているか、その分子機構を明らかにすることである。

3. 研究の方法

遺伝子の発現制御機構を研究する場合、一般的には一過性の発現系を用いて、レポーター遺伝子の発現レベルを比較解析することが多い。しかしこの場合、発現レベルは導入されたレポーター遺伝子のコピー数や安定性に大きく依存してしまう。また、安定発現系を用いて解析を行う場合も、レポーター遺伝子が染色体のどこにどれだけのコピー数で挿入されたかによってその発現量は大きく変わってしまう。そこで本研究では、これらの不確定要素を排除するため、「染色体の特定部位に 1 コピー

の遺伝子を挿入して、レポーター活性を測定できる新たなシステム」を構築し、それを用いて解析を行った。このシステムは、以下に記載する 3 つのステップからなる。

(ステップ 1) エクソントラップ型のレトロウイルスベクター (rvPtrap) を用いて、レポーター遺伝子を染色体へ 1 コピー導入する段階。

(ステップ 2) 部位特異的組み換え酵素 (Flp リコンビナーゼ) を用いて、新たに loxP 配列をレポーター遺伝子の前に導入し、同時にレポーター遺伝子を不活性化する段階。

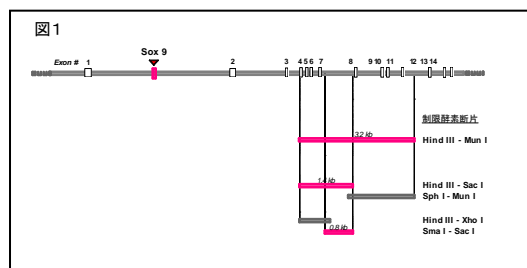
(ステップ 3) II 型コラーゲンあるいはアグリカンのプロモーター配列と、未知のエンハンサー配列を含むゲノム DNA 断片を、Cre-loxP システムを用いてレポーター遺伝子の前に配置し、レポーター遺伝子を再度活性化する段階。

以上の操作を通して、レポーター遺伝子の活性化を引き起こすゲノム DNA 断片を同定した。尚、本研究では軟骨細胞としての性質を安定に維持し、長期培養が可能であるラット軟骨肉腫細胞 (LTC-RCS) を用いて解析を行った。この細胞は、II 型コラーゲンおよびアグリカンの合成が活発に見られ、転写制御機構を解析するのに最適な細胞である。

4. 研究成果

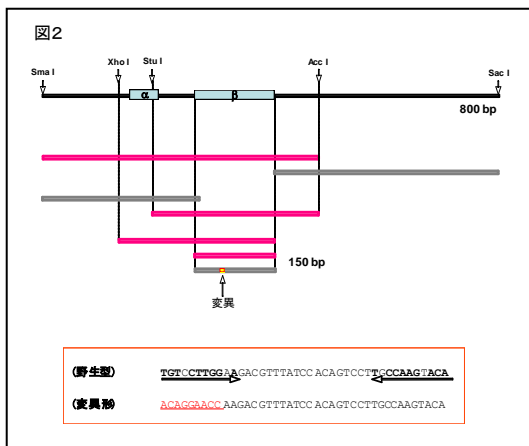
本研究を通して、II 型コラーゲンおよびアグリカンの発現レベルを制御しているシスエレメントとして、今まで全く知られていなかった新たなエンハンサー配列の存在を明らかにすることができた。

(1) II 型コラーゲン遺伝子については、下の図 1 の赤線で示したように、新たなエンハンサー活性は最終的に第 7 イントロンに収束した。

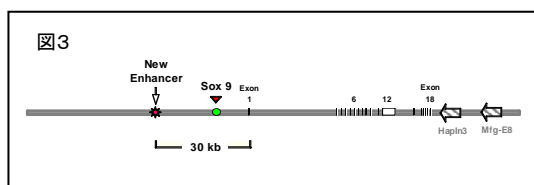


当初、エンハンサー領域を 0.8 kb のサ

イズにまで絞り込んだが、更にその後 PCR 産物を用いたより詳細な解析により、次の図 2 に示すようにエンハンサー活性は、DNA サイズを最小 150 bp まで小さくしても検出できることが解った。更に、このβと名付けた領域内の一部塩基配列を変化させると、エンハンサー活性は完全に消失してしまうことから、エンハンサー活性は特異的な塩基配列に依存していることが解った。またこのことは、異なった動物種間でこの領域の塩基配列が高度に保存されていることから、その塩基配列の重要性が強く示唆された。



(2) アグリカンについては、II型コラーゲンと同様の解析から、以下の図 3 に示したように転写開始点の上流 30 kb の位置に新たなエンハンサー活性が存在することが明らかになった。



更に詳細な解析から、最終的に 450 bp のサイズまで絞り込むことができたが、それ以上サイズを小さくしていくと活性は徐々に低下し、必ずしも最小単位が存在する訳ではないことが明らかになった。この点は明らかに II型コラーゲンの新しいエンハンサー配列とは異なる点である。また、アグリカンとII型コラーゲンのエンハンサー配列には、塩基配列の相同性が全く見られなかった。このことから、両者の遺伝子発現制御には、何らかの差があることが

示唆される。

今回新たに見いだされたII型コラーゲンおよびアグリカンの両エンハンサーは、いずれも従来から知られている Sox9 結合性のエンハンサー配列と協調的に働き、それぞれの遺伝子の転写活性を数十から数百倍に促進することが確認できた。こうした結果は、軟骨肉腫細胞を用いて得られたものであるが、それぞれの遺伝子の塩基配列は、正常細胞のものとは何ら変わるものではないので、ヒトを含めた正常軟骨組織でも同じエンハンサーが機能しているものと考えられる。

ところで、変形性関節症を初めとする軟骨組織の病態は、多くの場合、細胞外基質の分解を伴う。そしてその結果引き起こされる細胞外基質の減少は、組織変性を更に加速させる原因となっている。従って、細胞外基質の産生を亢進させることは、組織を再生させる上で必要不可欠のステップであり、この点に於いて、軟骨組織の主成分であるII型コラーゲンとアグリカンの転写レベルをコントロールしているメカニズムの一端を明らかにすることができたことは、軟骨組織の修復・再生に向けた今後の研究にとって、非常に重要なものであると確信している。尚、本研究を通して明らかにすることができた2つのエンハンサー配列には、相同性が全く見られない。このことから、それぞれのエンハンサーに結合する転写因子は、異なっている可能性が高い。そこで、今後はそれぞれのエンハンサーに結合する転写因子の同定に向けた研究を展開していく。

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2件)

(1) Shinomura, T., Ito, K., Höök, M., and Kimura, J. H. A Newly Identified Enhancer Element Responsible for Type II Collagen Gene Expression. 査読有 J. Biochem. 152 565-575 (2012)

(2) Wasa J., Nishida Y., Shinomura T.,

Isogai Z., Futamura N., Urakawa H.,
Arai E., Kozawa E., Tsukushi S., and
Ishiguro N. Versican V1 isoform
regulates cell-associated matrix
formation and cell behavior
differentially from aggrecan in Swarm
rat chondrosarcoma cells. 査読有 Int.
J. Cancer 130 2271-2281 (2012)

〔学会発表〕（計6件）

(1) 伊藤和生、池田裕一、篠村多摩之. II
型コラーゲンの高レベル発現に必要な新
たなエンハンサー配列の存在について.
第25回 日本軟骨代謝学会、2012年3月、
名古屋

(2) 池田裕一、伊藤和生、篠村多摩之. ア
グリカンの高レベル発現に必要な新たな
エンハンサー配列について. 第44回 日
本結合組織学会、2012年6月、東京

(3) 池田裕一、大城暁子、和泉雄一、篠村
多摩之. アグリカンの高レベル発現に必
要な新たなエンハンサー配列について.
第54回 歯科基礎医学会、2012年9月、福
島

(4) 池田裕一、伊藤和生、篠村多摩之. ア
グリカンの高レベル発現に必要な新たな
エンハンサー配列. 第26回 日本軟骨代謝
学会、2013年3月、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠村 多摩之 (SHINOMURA TAMAYUKI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研
究科・准教授
研究者番号：70206118

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：