

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 30 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790340

研究課題名（和文） 骨・軟骨形成における小胞体関連分解の生理的役割

研究課題名（英文） Physiological roles of ER-associated degradation in osteogenesis and chondrogenesis.

研究代表者

日野 真一郎 (HINO SHINICHIRO)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：00372699

研究成果の概要（和文）：小胞体膜に局在する小胞体ストレスセンサーBBF2H7 および OASIS は、それぞれ軟骨形成および骨形成に重要な役割を持つ。これらの分子はユビキチン-プロテアソーム経路により分解を受けタンパク質量は通常低いレベルを保つ。一方、小胞体ストレス下においては、両タンパク質は分解を免れ安定化し、それぞれの標的遺伝子の遺伝子誘導を促進する。BBF2H7 および OASIS は HRD1 ユビキチン E3 ライゲースと複合体を形成し、その複合体中で分解を受けるが、小胞体ストレス下においては複合体形成が阻害され BBF2H7 および OASIS は安定化する。HRD1 欠損細胞においては OASIS が安定化し骨芽細胞の分化時のコラーゲン分泌が促進するが、HRD1 欠損細胞で OASIS をノックダウンさせるとコラーゲン分泌が抑制される。小胞体ストレス下での BBF2H7 および OASIS の安定化による骨・軟骨形成制御機構が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：BBF2H7 and OASIS, ER-resident transmembrane proteins, have been identified as novel ER stress transducers that have roles in chondrogenesis and osteogenesis. BBF2H7 and OASIS are notably unstable proteins that are easily degraded via the ubiquitin-proteasome pathway under normal conditions. ER stress conditions enhanced the stability of BBF2H7 and OASIS, and promoted transcription of their target genes. HMG-CoA reductase degradation 1 (HRD1), an ER-resident E3 ubiquitin ligase, ubiquitinated BBF2H7 and OASIS under normal conditions, whereas ER stress conditions dissociated the interaction between HRD1 and BBF2H7 or OASIS. The stabilization of OASIS in Hrd1^{-/-} cells enhanced the expression of collagen fibers during osteoblast differentiation, whereas a knockdown of OASIS in Hrd1^{-/-} cells suppressed the production of collagen fibers. These findings suggest that ER stress stabilizes OASIS family members and this is a novel molecular mechanism for the activation of ER stress transducers.

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	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：タンパク質分解、骨・軟骨形成

1. 研究開始当初の背景

(1) 小胞体関連分解 (ERAD; ER-associated

degradation) では、小胞体内のミスフォルドタンパク質（折りたたみの異常なタン

パク質) がサイトゾルに逆輸送された後に、ユビキチン化を受けて最終的に 26S プロテアソームによって分解される。これらの過程において、小胞体膜貫通型 E3 ユビキチンリガーゼが中心的な役割を果たすことが知られており、これらの因子の生化学的性状に関する報告が数多く存在している。

(2) 小胞体膜貫通型 E3 ユビキチンリガーゼの 1 つ HRD-1/Synoviolin の代表的な基質としては HMG-CoA レダクターゼが知られているが、その他にも APP (アルツハイマー病原因タンパク質アミロイド β の前駆体) や Pael-R (家族性パーキンソン病原因遺伝子 Parkin の基質タンパク質) などが分解基質であることが明らかになっており、小胞体関連分解 (ERAD) の異常と疾患発症との関連が注目されている。HRD-1/Synoviolin が過剰に発現するマウスでは、関節炎の症状を呈し、滑膜細胞での機能が明らかとなっている。一方、HRD-1/Synoviolin のノックアウトマウスは比較的早期に胎生致死となるために、発生や組織形成における HRD-1/Synoviolin の細胞機能は不明なままである。HRD-1/Synoviolin プロモーターの下流に LacZ レポーター遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスの解析から、胎生期において HRD-1/Synoviolin は小脳、腎盂、神経管さらには mesenchymal condensations (軟骨組織の原基を形成する間葉系幹細胞の凝集塊) に強く発現することが示唆されている。そこで本研究では骨や軟骨の発生や組織形成における小胞体関連分解 (ERAD) の生理的役割に着目した。骨芽細胞および軟骨細胞はコラーゲンなどの細胞外マトリックスの分泌を活発に行う細胞であり、小胞体内での分泌タンパク質の品質管理が特に重要である。

HRD-1/Synoviolin の胎生期における発現パターンやタンパク質品質管理の重要性から小胞体関連分解 (ERAD) が重要な役割を担っている可能性が高い。

2. 研究の目的

骨芽細胞、軟骨細胞における HRD-1/Synoviolin の基質あるいは活性化制御因子をスクリーニングし、骨や軟骨の分化に関わる新規のメカニズムを解明する。同定したタンパク質分解関連遺伝子の性状を解析することで運動器疾患との関連を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 小胞体ストレス誘導剤やプロテアソーム阻害剤を骨芽細胞株、前駆軟骨細胞株を添加し、ウエスタンブロット法、PCR、免疫組織化学的手法によりタンパク質や mRNA のレベルを検討した。免疫沈降法を用いて、タンパク質間相互作用を解析した。

(2) 小胞体関連分解に関わるユビキチンライゲース (E3) に対し siRNA を用いて網羅的にノックダウンを行い、OASIS ならびに BBF2H7 の安定性に関わる分子のスクリーニングを行った。

(3) HRD1 ユビキチンライゲース (E3) の欠損 MEF 細胞を用いて、OASIS ならびに BBF2H7 のタンパク質の安定性を解析した。

(4) HRD1 ユビキチンライゲース (E3) の欠損 MEF 細胞に BMP2 を添加することで分化誘導を行い、骨芽細胞分化におけるコラーゲン分泌に対する HRD1 の影響を検討した。HRD1 欠損 MEF 細胞で OASIS を siRNA にてノックダウンし、骨芽細胞分化におけるコラーゲ

ン分泌への影響を解析した。

4. 研究成果

(1) Tet-on off のシステムを用いて OASIS または BBF2H7 を小胞体ストレス非存在下で誘導すると全長型に加え、膜内切断をうけたものを認めた。さらに、小胞体ストレス誘導剤で処理すると、全長型の OASIS および BBF2H7 が安定化して増加し、N 末断片も蓄積することが明らかとなった。これまで、小胞体ストレスセンサーは小胞体ストレスにより誘導され膜内切断を受けると考えられてきたが、本研究の結果から、OASIS および BBF2H7 は小胞体ストレスがない状態でも膜内切断をうけるということ、さらに、小胞体ストレス時には、OASIS の全長型が安定化して、膜内切断が増加するということが判明した。

(2) プロテアソーム阻害剤である MG132 やラクタシスチンで細胞を処理すると、OASIS および BBF2H7 のタンパク質量が増加したことから、OASIS および BBF2H7 は常にユビキチン-プロテアソーム系により分解を受けていることが明らかとなった。

(3) BBF2H7 を分解する過程で作用するユビキチンライゲース (E3) を探索する目的で、小胞体関連分解に関わる E3 ライゲースを siRNA によりノックダウンし OASIS および BBF2H7 の分解に関与する分子のスクリーニングを行った。その結果、小胞体膜上に存在する HRD1 を同定することに成功した。分解制御機構を検討したところ、HRD-1/Synoviolin が軟骨細胞と骨芽細胞のそれぞれの細胞内で BBF2H7 や OASIS と複合体を形成し、両蛋白質の分解を制御していることが明らかとなった。また、小胞体ストレス存在下では、OASIS および BBF2H7 は

HRD1/Synoviolin 複合体から解離することで分解を免れ、安定化した OASIS および BBF2H7 はそれぞれの標的遺伝子の遺伝子誘導を促進させることが判明した。

(4) HRD1/Synoviolin 欠損株に BMP2 を用いて分化誘導を行うと有意なコラーゲンの分泌増加を認め、HRD1/Synoviolin 欠損株での OASIS ノックダウン細胞に分化誘導を行うと有意なコラーゲンの分泌増加を認めなかった。本研究により HRD1/Synoviolin は BBF2H7 や OASIS の分解制御を介して軟骨細胞や骨芽細胞の分化時における基質の分泌に関わっている可能性が示唆された。

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 2 件)

- (1) Kondo S, Hino S-I, Saito A, Kanemoto S, Kawasaki N, Asada R, Izumi S, Iwamoto H, Oki M, Miyagi H, Kaneko M, Nomura Y, Urano F and Imaizumi K.: Activation of OASIS family, ER stress transducers, is dependent on its stabilization. Cell death and differentiation 19:1939-1949, 2012. doi:10.1038/cdd.2012
- (2) Murakami T, Hino S-I, Nishimura R, Yoneda T, Wanaka A, Imaizumi K.*: Distinct mechanisms are responsible for osteopenia and growth retardation in OASIS-deficient mice. Bone, 48:514-523, 2011. doi: 10.1016/j.bone.2010

[学会発表] (計 6 件)

- ① 日野真一郎、Choi jookhuu Narantsog、菱川善隆：マウス消化管における小胞体膜貫通型ユビキチンリガーゼ HRD1 の発現検討. 第 118 回日本解剖学会・全国学術集会. 2013, 3, 28, 香川

② 日野真一郎、菱川善隆：小胞体膜貫通型 E3 ユビキチンリガーゼ HRD-1 のマウス消化管における発現検討. 第 54 回日本顕微鏡学会九州支部総会学術講演会. 2012, 11, 10, 大分

③ 日野真一郎、菱川善隆：Ubiquitin ligase HRD1 expression in the mouse intestine. 第 14 回国際組織細胞化学会議 (ICHC) シンポジウム. 2012, 8, 28, 京都

④ 日野真一郎、菱川善隆：小胞体膜貫通型 E3 ユビキチンリガーゼ HRD-1 のマウス小腸における発現検討. 第 117 回日本解剖学会総会. 2012, 3, 28, 甲府

⑤ 日野真一郎、菱川善隆：マウス小腸における小胞体膜貫通型 E3 ユビキチンリガーゼ HRD-1 の免疫組織化学的検討. 第 53 回日本顕微鏡学会九州支部総会学術講演会. 2011, 12, 3, 熊本

⑥ 日野真一郎、菱川善隆：小胞体膜貫通型 E3 ユビキチンリガーゼ HRD-1 結合因子の同定.
第 67 回日本解剖学会九州支部学術集会.
2011, 10, 22, 宮崎

〔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
<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/anatomy1/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者

日野 真一郎 (HINO SHINICHIRO)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：00372699