

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592270

研究課題名(和文)新しい軟骨コラーゲン発現増強因子の作用機序の解明と軟骨分化・再生医療への可能性

研究課題名(英文)Transcriptional regulation of a novel collagen gene in 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウス11型および27型コラーゲン遺伝子の基本転写調節機構について解析した。27型コラーゲン遺伝子においては、2つの転写産物が存在しており、それぞれの転写産物に対するプロモーター活性が認められたことから、この遺伝子が選択的プロモーターにより制御されている事が示された。一方、11型コラーゲン遺伝子においては、基本プロモーター内に転写因子NF-Yの結合領域が存在し、その領域の変異およびドミナントネガティブ変異体の強制発現により、プロモーター活性が低下した。更に、GC-rich配列もプロモーター活性に必要で、この領域に転写因子Sp1が関与していることが示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the proximal promoter of mouse Col11a1 and Col27a1 gene in chondrocytes. In Col27a1 gene, oligo-Capping Race analysis revealed that mouse Col27a1 gene has two alternative splicing variants 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. In Col11a1 gene, cell transfection experiments exhibited the suppression of the promoter activity without NF-Y binding sequence. Furthermore, dominant-negative NF-Y inhibited the promoter activity. In addition, 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 of Col11a1 gene. Taken together, these results indicate that the transcription factor NF-Y and Sp1 upregulates the proximal promoter activity of mouse Col11a1 gene in chondrocytes.

研究分野：分子生物学

キーワード：軟骨 転写 コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックス分子 (ECM) 特にコラーゲン分子は生体内タンパク質の約 3 割を占め、発生過程や再生時の組織形成や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・軟骨・皮膚など幅広い組織に発現し、特に骨では I, V, XXIV 型、軟骨では II, XI, XXVII 型コラーゲン分子が共存してコラーゲン分子会合体を形成している。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・軟骨などに分化し、それぞれの組織や器官を形成する。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。我々のグループは、細胞外マトリックス分子の発現調節と細胞分化の協調関係に着目し、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 V/XI 型及び骨・軟骨に局限して発現している XXIV/XXVII 型コラーゲン分子の発現調節機構の解析を行ってきた。そして、軟骨にしか発現していないと考えられていた Col11a1 遺伝子が非軟骨組織にも発現しており、組織特異的な選択的スプライシングにより制御されており (Iyama, Matsuo et al. Matrix Biol 2001)、転写因子 NF-Y が転写を正に制御している事を明らかにした (Matsuo et al. J Biol Chem 2003)。他のマイナーコラーゲンについて検討してみると、Col5a1 や Col5a3 遺伝子においても NF-Y が制御しており、異なるコラーゲン遺伝子に共通の発現調節機構が存在する事を初めて証明した。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 (Matrix Biol. 2005)。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 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010)。

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 (Matrix Biol. 2010)、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 (Connective

tissue Res. 2008)。そこで申請者は、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検討してきた。

2. 研究の目的

本研究では、マウス XXVII 型および XI 型コラーゲン 1 鎖遺伝子の軟骨特異的な転写調節機構を明らかにすることを目的として、基本プロモーター領域の同定及びプロモーター活性に関する転写因子の解析を行った。

3. 研究の方法

XXVII 型コラーゲン遺伝子の転写開始点を決定するために、Oligo nucleotide capping RACE 法を行った。次に、それぞれの基本転写開始点を含むゲノム DNA を用いて様々な長さの異なるルシフェラーゼコンストラクトを作製した。作製したコンストラクトを軟骨細胞に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定し、プロモーター活性を示す領域を決定した。活性を示した領域については、引き続き変異もしくは欠損を加えたルシフェラーゼコンストラクトを作製し、プロモーター活性に関する配列の同定を行った。更に、同定した基本プロモーター領域に関する転写因子について、ゲルシフト DNA プローブを作製し、Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA) により関与する転写因子について検討した。

一方、XI 型コラーゲン 1 鎖遺伝子についても、転写開始点を含む長さの異なるルシフェラーゼコンストラクトを作製し、軟骨細胞におけるプロモーター活性領域を同定し、関与する転写因子について検討した。

4. 研究成果

(1) XXVII 型コラーゲン 1 鎖遺伝子の基本転写調節機構の解析

XXVII 型コラーゲン 1 鎖遺伝子の転写開始点を決定したところ、2 つのスプライシング産物が存在することが示された。そこで、それぞれの転写産物に対応するルシフェラーゼコンストラクトを作製し、プロモーター活性を検討したところ、それぞれの転写産物に対するプロモーター活性が認められ、XXVII 型コラーゲン遺伝子は、選択的プロモーターにより制御されていることが明らかとなった。次に、それぞれの基本プロモーターについて、活性領域を検討したところ、下流プロモーターは、転写開始点上流 -568 ~ -445 の領域に、上流プロモーターは、転写開始点上流 -310 ~ +1 の領域にプロモーター活

性が認められた。そこで、それぞれの活性領域について、関与する転写因子の有無について検討した結果、下流プロモーターには1ヶ所に転写因子結合部位が認められたが、転写因子の同定は本研究期間内には出来なかった。一方、上流プロモーター領域では、複数の転写因子の関与が示唆されたが、結合領域の決定および関与する因子の同定は出来なかった。

(2) XI 型コラーゲン 1鎖遺伝子における転写因子 NF-Y の関与について

XI 型コラーゲン 1鎖遺伝子の基本プロモーター領域について解析を行った結果、基本プロモーター活性は-116~-256 の領域に認められ、-135~-145 の領域に転写因子が結合していることが EMSA により示された。*in silico* の解析により、転写因子 Nuclear Factor Y (NF-Y) の結合部位 (CCAAT box) が予測された。そこで、結合配列に変異を加えたコンペティター及び特異抗体を用いて EMSA を行った結果、結合している因子が NF-Y であることを認めた。更に、Chip assay により、細胞内においても NF-Y が、基本プロモーター領域に結合していることを示した。基本プロモーター領域内に欠失及び変異を導入したコンストラクトを用いたルシフェラーゼアッセイを行ったところ、約 40~60% の活性の低下が見られ、さらに、ドミナントネガティブの NF-Y A 変異サブユニットの強制発現により、プロモーター活性が抑制されたことから、NF-Y がプロモーター活性を制御していることが明らかとなった。

(3) XI 型コラーゲン 1鎖遺伝子における転写因子 Sp1 の関与について

次に、NF-Y 結合領域以外にも基本プロモーターに関与する部位の存在が示唆されたので、この基本プロモーター領域の更なる解析を行った。その結果、NF-Y の結合領域の下流部位にも、基本プロモーター活性に関与していることが示唆された。そこで、この領域の配列を検討したところ、TATA ボックスが存在せず、GC 配列が豊富な領域が存在していた。そこで、この GC 配列に変異をいれたルシフェラーゼコンストラクトを作製しルシフェラーゼ活性を比較検討したところ、転写調節に必要な配列であることを見出し、転写因子 Sp1 の関与が示唆された。そこで、Sp1 発現ベクターを作製し、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、XI 型コラーゲンの転写活性は増強し、Sp1 のノックダウンを行った結果、プロモーター活性が低下すると共に、XI 型コラーゲン遺伝子産物の発現も抑制した。これらの結果より、XI 型コラーゲン 1鎖遺伝子は転写因子 NF-Y と Sp1 により制御されていることが明らかとなった。

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 10 件)

Watanabe K, Hida M, Sasaki T, Yana H, Kawano K, Yoshioka H, Matsuo N.

Sp1 upregulated the proximal promoter activity of the mouse collagen a1(XI) gene (Col11a1) in chondrocytes.

In Vitro Cell Dev Biol Anim, 52: 235-42, 2016. 査読有

doi: 10.1007/s11626-015-9959-y

Hida M, Hamanaka R, Okamoto O, Yamashita K, Sasaki T, Yoshioka H, Matsuo N.

Nuclear factor Y (NF-Y) regulates the proximal promoter activity of the mouse collagen a1(XI) gene (Col11a1) in chondrocytes.

In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 50: 358-66, 2014. 査読有

doi: 10.1007/s11626-013-9692-3.

H, Hamanaka R, Nakamura-Ota M, Adachi S, Zhang JJ, Matsuo N, Yoshioka H.

Sp7/Osterix induces the mouse pro-a2(I) collagen gene (Col1a2) expression via the proximal promoter in osteoblastic cells. Yano Biochem Biophys Res Commun. 452: 531-6, 2014. 査読有

doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.100.

Dermatopontin regulates fibrin formation and its biological activity. Wu W, Okamoto O, Kato A, Matsuo N, Nomizu M, Yoshioka H, Fujiwara S. J Invest Dermatol. 134: 256-63. 2014. 査読有

doi: 10.1038/jid.2013.305.

Functional peptide of dermatopontin produces fibrinogen fibrils and modifies its biological activity. Wu W, Okamoto O, Kato A, Matsuo N, Kumai J, Nomizu M, Fujiwara S. J Dermatol Sci. 76: 34-43. 2014. 査読有

doi: 10.1016/j.jdermsci.2014.07.002.

Identification of fibronectin binding sites in dermatopontin and their biological function. Kato A, Okamoto O, Wu W, Matsuo N, Kumai J, Yamada Y, Katagiri F, Nomizu M, Fujiwara S. J Dermatol Sci. 76: 51-9. 2014. 査読有

doi: 10.1016/j.jdermsci.2014.07.003.

A new murine osteoblastic cell line immortalized with the SV40 large T antigen. Nakamura-Ota M, Hamanaka R, Yano H,

Adachi S, Sumiyoshi H, Matsuo N, Yoshioka H. Cell Tissue Bank. 12: 373-80, 2014. 査読有
doi: 10.1007/s10561-013-9394-9

Transient Expression of Mouse Pro- α 3(V) Collagen Gene (Col5a3) in Wound Healing. Sumiyoshi H, Kitamura H, Matsuo N, Tatsukawa S, Ishikawa K, Okamoto O, Fujikura Y, Fujiwara S, Yoshioka H. Connect Tissue Res. 53: 313-7, 2012. 査読有
doi: 10.3109/03008207.2011.653061.

Smad, but not MAPK, pathway mediates the expression of type I collagen in radiation induced fibrosis. Yano H, Hamanaka R, Nakamura M, Sumiyoshi H, Matsuo N, Yoshioka H. Biochem Biophys Res Commun. 418: 457-63, 2012. 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.01.039.

The PI3K/Akt pathway mediates the expression of type I collagen induced by TGF- β 2 in human retinal pigment epithelial cells. Yokoyama K, Kimoto K, Itoh Y, Nakatsuka K, Matsuo N, Yoshioka H, Kubota T. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 250: 15-23, 2012. 査読有
doi: 10.1007/s00417-011-1766-x.

〔学会発表〕(計 14 件)

渡邊啓次郎、樋田真理子、佐々木隆子、河野憲司、吉岡秀克、松尾哲孝
XI 型コラーゲン 1 鎖遺伝子 (Col11a1) の転写調節機構の解明
第 39 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、豊泉荘(大分県、別府市) 2015、9 月 10 - 12 日

樋田真理子、渡邊啓次郎、佐々木隆子、吉岡秀克、松尾哲孝
マウス XI 型コラーゲン 1 鎖遺伝子 (Col11a1) の転写調節機構の解析
生物機能研究会、九重共同研究所(大分県、九重町) 2014、7 月 12 - 13 日

矢野博之、濱中良志、中村三紀、足立佐和子、松尾哲孝、吉岡秀克
放射線照射による I 型コラーゲン発現調節に関する miRNA の解析
日本生化学会、九州大学(福岡県、福岡市) 2014、5 月 17 日

矢野博之、濱中良志、中村三紀、足立佐和子、松尾哲孝、吉岡秀克
放射線照射後の microRNA による I 型コラーゲン発現調節

日本結合組織学会、マトリックス研究会、ウイング愛知(愛知県、名古屋市) 2014、6 月 6 日

矢野博之、濱中良志、中村三紀、松尾哲孝、吉岡秀克
放射線による I 型コラーゲン発現調節における microRNA の機能とその発現
日本分子生物学会、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市) 2014、11 月 25 - 27 日

矢野博之、濱中良志、中村三紀、足立佐和子、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
日本生化学会、佐賀大学(佐賀県、佐賀市) 2013、5 月 18 日

矢野博之、濱中良志、中村三紀、足立佐和子、松尾哲孝、吉岡秀克
放射線照射による I 型コラーゲンの発現に關与する miRNA の解析
日本結合組織学会、マトリックス研究会、和歌山県立医科大学(和歌山県、和歌山市) 2013、6 月 28 日

Yano H, Hamanaka R, Adachi S, Nakamura M, Matsuo N, Yoshioka H.: The regulation of collagen gene expression on ionizing radiation. Gordon Research Conference "collagen" New Hampshire, USA, 2013、7 月 14 - 19 日

矢野博之、濱中良志、中村三紀、足立佐和子、松尾哲孝、吉岡秀克
放射線による I 型コラーゲン発現調節における miRNA の機能とその発現
日本分子生物学会、神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市) 2013、12 月 3 - 6 日

矢野博之、濱中良志、中村三紀、足立佐和子、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
日本生化学会、九州大学(福岡県、福岡市) 2012、5 月 26 日

矢野博之、濱中良志、中村三紀、足立佐和子、松尾哲孝、吉岡秀克
放射線照射による I 型コラーゲンの発現に關与するシグナル伝達の解析
日本結合組織学会、マトリックス研究会、日本青年館ホテル(東京都) 2012、6 月 7 日

樋田真理子、松尾哲孝、山下広平、足立佐和子、佐々木隆子、吉岡秀克

マウス XXVII 型コラーゲン 1 鎖遺伝子の転写調節機構の解析
日本分子生物学会、マリンメッセ福岡(福岡県、福岡市)、2012、12月12日

矢野博之、濱中良志、中村三紀、足立佐和子、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
日本分子生物学会、マリンメッセ福岡(福岡県、福岡市)、2012、12月12日

中村三紀、濱中良志、矢野博之、足立佐和子、住吉秀明、松尾哲孝、吉岡秀克
SV40 ラージ T 抗原不死化遺伝子を用いた新しいマウス骨芽細胞株の樹立
日本分子生物学会、マリンメッセ福岡(福岡県、福岡市)、2012、12月12日

〔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〕

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

佐々木 隆子 (SASAKI Takako)
大分大学・医学部・助教
研究者番号：30133193

岡本 修 (OKAMOTO Osamu)

大分大学・医学部・客員研究員
研究者番号：40284799

(3) 連携研究者

()

研究者番号：