

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659678

研究課題名(和文)小胞体ストレスセンサータンパク質による骨格系細胞分化制御機構の解明

研究課題名(英文)The analysis of the skeletal cell differentiation regulated by endoplasmic reticulum stress transducers.

研究代表者

齋藤 敦(SAITO, ATSUSHI)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：30580394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体ストレストランスデューサーBBF2H7は小胞体ストレスに応答して膜内切断を受けたN末端断片が転写因子として機能し、軟骨細胞においてSec23aの発現誘導を介して軟骨基質タンパク質の分泌を促進する。今回、BBF2H7が軟骨細胞においてSox9によって転写誘導を制御されていることを明らかにした。また、C末端断片は細胞外に分泌され、ヘッジホッグ経路を活性化することで軟骨細胞の増殖に寄与していることが分かった。さらにBBF2H7のN末端断片はその下流でATF5-MCL1経路を活性化させることで、軟骨細胞死を抑制していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Endoplasmic reticulum (ER) stress transducer, BBF2H7, is cleaved in response to ER stress and the N-terminus acts as a transcription factor during chondrogenesis. The activated BBF2H7 promotes cartilage matrix protein secretion through the up-regulation of Sec23a, which is a target of BBF2H7. We elucidated the mechanisms of transcriptional activation of BBF2H7 in chondrocytes. Transcription of BBF2H7 is directly regulated by Sox9, a critical factor for chondrocyte differentiation that facilitates the expression of Type II collagen (Col2). Our findings demonstrate novel mechanisms of Sox9 for controlling the secretion of cartilage matrix proteins via activation of BBF2H7-Sec23a. Further, we demonstrated that the cleaved C-terminus is secreted to extracellular space and promotes chondrocyte proliferation via the activation of hedgehog signaling. In addition, we found that BBF2H7 activates ATF5-MCL1 pathway to avoid apoptosis during chondrogenesis.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：BBF2H7 小胞体ストレス応答 Sox9 軟骨細胞 軟骨細胞分化 ヘッジホッグシグナル

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の多くは小胞体で合成・分泌されるが、細胞が様々な異常環境(小胞体ストレス)に曝されると、小胞体の働きに破綻を来し、不完全なタンパク質が小胞体に大量に生み出される。細胞はこの様な異常事態を感知するストレスセンサーを持っており、異常タンパク質の修復や分解を行うシステムを積極的に駆動させて異常タンパク質の毒性から細胞を守る(小胞体ストレス応答)。申請者が同定した小胞体ストレストランスデューサーOASISおよびBBF2H7はそれぞれ骨芽細胞および軟骨細胞に発現しており、OASIS 欠損マウスでは骨芽細胞の小胞体機能障害による骨基質の減少に起因した骨形成不全が、BBF2H7 欠損マウスでは軟骨基質の分泌異常伴った軟骨形成不全が観察された。以上のことから、タンパク質の合成・分泌・品質管理を担う小胞体から発信されるシグナルが骨格系細胞の分化や骨・軟骨の形成、機能保持に重要な役割を果たしており、さらにこの系の破綻が骨格系疾患の発症に繋がることが明らかになりつつある。

2. 研究の目的

小胞体を発信源とするタンパク質ダイナミクス制御機構を明らかにするため、小胞体ストレスセンサーから発信されるシグナル応答系の解明、病態発現の分子機構解明、小胞体機能制御による骨・軟骨形成技術の開発を主要テーマとして研究を行った。これらのテーマに関して、小胞体シグナリングによる骨・軟骨代謝のシグナル系統図を、各センサー遺伝子改変マウスを用いながら細胞生物学的手法を駆使して完成させ、小胞体機能制御を標的とした薬剤をスクリーニングによって得ることを目指した。さらに病理組織学的あるいは生理学的解析を通して各センサー欠損マウスの疾患との関わりを追究し、ピックアップした薬剤によって病態改善を試みることで、小胞体を起点とする骨・軟骨代謝制御の新原理確立と骨格系疾患に対する革新的な治療戦略の構築を目指す。

3. 研究の方法

小胞体ストレストランスデューサーとして機能する BBF2H7 の軟骨細胞における役割を明らかにするため、胎生期 18.5 日目のマウスより軟骨細胞を採取し、適切な薬剤を添加することによって成熟軟骨細胞として維持し、各種実験に使用した。BBF2H7 の発現制御機構を明らかにするため、BBF2H7 のプロモーター領域における配列をプロモーターサーチにかけ、BBF2H7 のプロモーター領域に結合し得る転写因子をピックアップした。複数の候補転写因子に関して、その転写因子を強く発現するアデノウイルスを作成して初代培養軟骨細胞に感染させることで BBF2H7 の発現変化を RT-PCR、ウェスタンブロットングによって確認した。ピックアップした候補転写因子が

BBF2H7 のプロモーター領域に直接結合してその発現を誘導することをルシフェラーゼアッセイ、Chromatin immunoprecipitation アッセイおよびゲルシフトアッセイを行って解析した。さらに転写因子として活性化した BBF2H7 が軟骨基質タンパク質の分泌を促進することをウェスタンブロットングおよび免疫沈降法によって確認した。

また、BBF2H7 の C 末端断片の細胞内局在を免疫染色法によって解析した。C 末端断片が細胞外に分泌され、ヘッジホッグシグナルの活性化を介して細胞増殖を促進させることを BBF2H7 欠損マウスおよび軟骨細胞特異的に BBF2H7 の C 末端断片を発現する遺伝子改変マウスの細胞、組織を用いてウェスタンブロットング、免疫染色法、免疫沈降法および種々の細胞増殖アッセイを行うことで解析した。さらに転写因子として機能する BBF2H7 の N 末端断片の軟骨細胞における標的遺伝子を網羅的にピックアップするために BBF2H7 欠損軟骨細胞を用いたマイクロアレイ解析を行った。ピックアップした候補遺伝子に関してその転写因子を強く発現するアデノウイルスを作成して BBF2H7 欠損初代培養軟骨細胞に感染させることで異常が回復するかどうかを RT-PCR、ウェスタンブロットングでチェックした。

4. 研究成果

小胞体ストレストランスデューサーとして機能する BBF2H7 は骨格系組織において軟骨細胞で優勢的に発現しており、小胞体ストレスに応答して膜内切断を受け、N 末端断片が核内に移行して転写因子として機能する。その発現制御機構を明らかにするため BBF2H7 プロモーター領域内の配列を調べると、そのプロモーター領域内に Sox9 が結合し得る Sox-binding site が存在していることを見出した。Sox9 は軟骨細胞の分化、成熟を制御するマスター転写因子であり主要な軟骨基質タンパク質である 2 型コラーゲンの転写を誘導する。一連のプロモーターアッセイによって Sox9 が BBF2H7 プロモーター領域内の Sox-binding site に直接的に結合して、その転写を誘導していることを明らかにした。さらに初代培養軟骨細胞において Sox9 を過剰発現させると BBF2H7 の転写は促進され、タンパク質へと翻訳された後に切断を受け、転写因子として活性化することが分かった。Sox9 は BBF2H7 の転写誘導を促進すると同時に 2 型コラーゲンをはじめとする軟骨基質タンパク質の発現レベルも上昇させる。Sox9 による軟骨基質タンパク質の合成促進が小胞体の負荷を増大させ、生理的で緩やかな小胞体ストレスを発生させることが分かった。BBF2H7 はこの生理的小胞体ストレスに応答して活性化して転写因子として活性化し、大量に合成された軟骨基質タンパク質をスムーズに細胞外へ分泌していることが明らかになった。

さらにその機能が不明であったBBF2H7のC末端断片について機能解析を行った。BBF2H7欠損マウスでは軟骨細胞数が顕著に減少していたので、C末端断片が細胞増殖に關与する可能性を疑った。初代培養軟骨細胞を用いて細胞増殖能を調べると、BBF2H7欠損細胞でBrdUの取り込みの減少、細胞周期関連遺伝子の発現減少、G1期からS期への進行抑制等が見られ、細胞増殖速度が低下していることがわかった。BBF2H7欠損細胞に転写因子として機能するN末端断片を発現させても細胞増殖速度は回復しなかった。それに対し小胞体内腔側のC末端断片を発現させると野生型と同程度まで回復した。C末端断片の細胞内局在を調べると、切断後、小胞体から速やかに細胞膜側へ移動し、細胞外へと分泌された。分泌されたC末端断片が細胞増殖を促進するメカニズムを解析した結果、C末端断片はヘッジホッグリガンドのインディアンヘッジホッグとその受容体であるPtch1に作用し、下流シグナルを活性化することで細胞増殖を促進させることがわかった。以上の結果より、小胞体ストレストランスデューサーの新規機能が発見され、小胞体ストレス応答による新たな細胞間情報伝達のメカニズムが明らかになった。

さらにBBF2H7欠損マウスにおける軟骨細胞数の減少とアポトーシスとの関連を調べた。軟骨組織におけるTUNEL染色を行うと、TUNEL陽性細胞数が野生型と比較して、BBF2H7欠損マウスで増加していた。軟骨組織におけるBBF2H7の細胞生存に關与する標的遺伝子の同定を試みた結果、抗アポトーシス因子として知られているATF5の発現レベルが、BBF2H7欠損軟骨細胞では極度に低下していることが明らかになった。BBF2H7は小胞体ストレスに応答して転写因子として活性化することから、小胞体ストレスを初代培養軟骨細胞に負荷することでATF5の発現レベルが上昇するかどうかをリアルタイムPCRによって検討した。野生型初代培養軟骨細胞を小胞体ストレス負荷剤タプシガルギンで処理すると、ATF5の発現レベルは上昇した。しかしBBF2H7欠損初代培養軟骨細胞では、タプシガルギンで処理してもATF5の発現レベルの上昇は抑制されていた。ATF5はその下流で、Bcl2ファミリーの一つで抗アポトーシス作用を示すMcl1の発現を誘導し、アポトーシスを抑制することが報告されている。初代培養軟骨細胞をタプシガルギンで処理し、Mcl1の発現レベルをリアルタイムPCRによって検討すると、野生型初代培養軟骨細胞ではMcl1の発現レベルが上昇した。しかしBBF2H7欠損初代培養軟骨細胞をタプシガルギンで処理してもMcl1の発現レベルの上昇は抑制されていた。これらの結果より、軟骨細胞において、転写因子BBF2H7がATF5-Mcl1経路を活性化させている可能性が示唆された。ATF5のプロモーター領域内を調べると、BBF2H7が結合し得るcAMP responsive element (CRE) 配列が

存在することを見出した。一連のプロモーターアッセイを行うことで、BBF2H7が軟骨細胞においてATF5プロモーター領域内のCRE配列に直接的に結合し、ATF5の転写誘導を行っている結論付けた。以上の結果より、軟骨細胞ではBBF2H7がその下流であるATF5-Mcl1経路を活性化することでアポトーシスを抑制していることが示唆された。近年、小胞体ストレスおよび小胞体ストレス応答が細胞の分化・成熟あるいは機能発現を制御していることが分かってきた。しかしながら生体制御に必須の小胞体ストレスがもたらす細胞傷害を、どのように回避しているのかは不明であった。今回の結果より、BBF2H7は軟骨細胞分化時に発生する小胞体ストレスによって誘導されるアポトーシスをATF5-Mcl1経路を活性化させることで回避していることが示唆された。

<参考文献>

(1) Kondo, S, Saito, A, Hino, S-I, Murakami, T, Ogata, M, Kanemoto, S, Nara, S, Yamashita, A, Yoshinaga, K, Hara, H, Imaizumi, K.: BBF2H7, a novel transmembrane bZIP transcription factor, is a new type of endoplasmic reticulum stress transducer. *Molecular and Cellular Biology*, 27: 1716-1729, 2007.

(2) Saito, A, Hino, S-I, Murakami, T, Kanemoto, S, Kondo, S, Saitoh, M, Nishimura, R, Yoneda, T, Furuichi, T, Ikegawa, S, Ikawa, M, Okabe, M, Imaizumi, K.: Regulation of endoplasmic reticulum stress response by a BBF2H7-mediated Sec23a pathway is essential for chondrogenesis. *Nature Cell Biology*, 11: 1197-1204, 2009.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

(1) Hino K, Saito A, Kido M, Kanemoto S, Asada R, Takai T, Cui M, Cui X, Imaizumi K.: Master Regulator for Chondrogenesis, Sox9, Regulates Transcriptional Activation of the ER Stress Transducer BBF2H7/CREB3L2 in Chondrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 289: 13810-13820, 2014. 査読有.

(2) Saito A, Kanemoto S, Zhang Y, Asada R, Hino K, Imaizumi K.: Chondrocyte Proliferation Regulated by Secreted Luminal Domain of ER Stress Transducer BBF2H7/CREB3L2. *Molecular Cell*, 53: 127-139, 2014. 査読有.

(3) Saito A.: Physiological functions of endoplasmic reticulum stress transducer OASIS in central nervous

system. *Anatomical Science International*, 89: 11-20, 2014. 査読有.

(4) Izumi S, Saito A, Kanemoto S, Kawasaki N, Asada R, Iwamoto H, Oki M, Miyagi H, Ochi M, Imaizumi K.: The Endoplasmic Reticulum Stress Transducer BBF2H7 Suppresses Apoptosis by Activating the ATF5-MCL1 Pathway in Growth Plate Cartilage. *Journal of Biological Chemistry*, 287: 36190-36200, 2012. 査読有.

〔学会発表〕(計 16 件)

(1) 齋藤敦、今泉和則: Chondrocyte proliferation regulated by liminal domain of ER stress transducer BBF2H7. 第8回 Bone Research Seminar(招待講演)、東京、2/15、2014.

(2) 立本淑子、齋藤敦、木戸美織、日野健太、今泉和則: Sox9 による小胞体ストレストランスデューサー-BBF2H7 の発現制御. 第36回日本分子生物学会、神戸、12/5、2013.

(3) 齋藤敦、今泉和則: 小胞体から発信される細胞間コミュニケーションシグナル. 第8回小胞体ストレス研究会、金沢、10/26、2013.

(4) 齋藤敦、今泉和則: 小胞体ストレス応答と骨軟骨形成. 第14回運動器科学研究会、東京、9/13、2013.

(5) 齋藤敦、今泉和則: 小胞体ストレスセンサー-OASIS ファミリーを介した細胞分化制御機構. 第86回日本生化学会大会、横浜、9/11、2013.

(6) 岩本秀雄、齋藤敦、今泉和則: 小胞体ストレスセンサー-BBF2H7 の分泌切片による癌細胞増殖促進作用. 第86回日本生化学会大会、横浜、9/12、2013.

(7) Kanemoto S., Saito A., Kobayashi T., Miyamoto T., Takahashi N., Imaizumi K.: Luman, an ER stress transducer, is involved in osteoclastogenesis through the regulation of DC-STAMP expression. ANZBMS 23rd Annual Scientific Meeting, Melbourne, オーストラリア、9/8、2013.

(8) 齋藤敦: 小胞体ストレストランスデューサー-BBF2H7 の小胞体内腔ドメインの新機能. 第14回 ORIGIN 神経科学研究会夏のワークショップ2013、岐阜、8/31、2013.

(9) 岩本秀雄、齋藤敦、今泉和則: 小胞体ストレスセンサー-BBF2H7 の小胞体内腔ドメインによる癌細胞の増殖促進. 第54回日本生化学会 中国・四国支部例会、徳島、5/31、2013.

(10) Saito A., Asada R., Iwamoto H., Izumi S., Kanemoto S., Imaizumi K.: Chondrocyte proliferation controlled by secreted partial fragments of endoplasmic reticulum stress transducer BBF2H7. IBMS-JSBMR 2013、神戸、5/28、2013.

(11) Izumi S., Saito A., Ochi M., Imaizumi K.: The endoplasmic reticulum stress sensor BBF2H7 suppresses apoptosis by activating ATF5-MCL1 pathway in chondrocytes. IBMS-JSBMR 2013、神戸、5/29、2013.

(12) Saito A., Asada R., Iwamoto H., Izumi S., Kanemoto S., Zhang Y., Kamon M., Imaizumi K.: Secreted partial fragments of ER stress transducer BBF2H7 promote proliferation of neighboring cells via activation of hedgehog signaling. ASBMB Special Symposia Series 2013, The Malutitasking Endoplasmic Reticulum in Health and Disease、バージニア、アメリカ合衆国、5/3、2013.

(13) 木戸美織、齋藤敦、金本聡自、浅田梨絵、今泉和則: 軟骨細胞における Sox9 を介した小胞体ストレスセンサー-BBF2H7 の発現制御機構. 福岡、12/15、2012.

(14) 齋藤敦、浅田梨絵、岩本秀雄、泉聡太郎、金本聡自、今泉和則: 小胞体ストレスセンサー-BBF2H7 の小胞体内腔ドメインは細胞外に分泌され、周辺細胞の細胞増殖を促進する. 第85回日本生化学会大会、福岡、12/14、2012.

(15) 齋藤敦、浅田梨絵、岩本秀雄、泉聡太郎、金本聡自、今泉和則: 小胞体ストレスセンサー-BBF2H7 の小胞体内腔ドメインの新機能. 第7回小胞体ストレス研究会、広島、11/9、2012.

(16) 齋藤敦、今泉和則: 小胞体ストレスセンサー-OASIS ファミリーを介した骨軟骨形成. 第30回日本骨代謝学会全国学術集会(招待講演)、東京、7/20、2012.

〔図書〕(計 4 件)

(1) 齋藤敦、今泉和則: 小胞体ストレス応答におけるトランスデューサー-BBF2H7 の小胞体内腔ドメインによる軟骨細胞の増殖の制御. **ライフサイエンス新書論文レビュー** <http://first.lifesciencedb.jp/archives/8232>, 2014.

(2) 齋藤敦、今泉和則: 骨形成における小胞体ストレスシグナル. *CLINICAL CALCIUM* 23(11):21-27, 2013.

(3) 齋藤敦、浅田梨絵、岩本秀雄、泉聡太郎、金本聡自、今泉和則: 小胞体ストレスセンサー-BBF2H7 の小胞体内腔ドメインの新機能. *Pharma Medica* 31(2):158-159, 2013.

(4) 木戸美織、齋藤敦、金本聡自、浅田梨絵、今泉和則: 軟骨細胞における Sox9 を介した小胞体ストレスセンサー-BBF2H7 の発現制御機構. *Pharma Medica* 31(2):166, 2013.

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：BBF2H7(BBF2 human homologue on chromosome 7)部分アミノ酸配列を有するペプチドまたはそれに結合する抗体を含む細胞増殖調節用組成物

発明者：今泉 和則、齋藤 敦

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2013/072964

出願年月日：2013 年 8 月 28 日

国内外の別：外国

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/imaizumi/>

6．研究組織

(1)研究代表者

齋藤 敦 (SAITO ATSUSHI)

広島大学・大学院 医歯薬保健学研究院・
助教

研究者番号：30580394

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし