

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350959

研究課題名(和文) 骨組織再生を促進するNELL1タンパク質を利用した新規骨形成因子の創成

研究課題名(英文) Development of a novel osteoinductive factor using NELL1 proteins

研究代表者

新美 友章(Niimi, Tomoaki)

名古屋大学・生命農学研究科・講師

研究者番号：30377791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト頭蓋骨縫合早期癒合症の骨癒合部位に高発現する遺伝子として単離されたNELL1は、種々の動物実験において骨形成を促進することから、新しい骨形成因子として注目を集めているが、NELL1の特異的な受容体および骨形成を促進するシグナル伝達機構の詳細は明らかになっていない。本研究では、NELL1受容体の探索およびシグナル伝達機構の解明に取り組んだ結果、NELL1の機能領域としてN末端側のTSPNドメインにヘパリン結合活性、そしてEGF様ドメインにRobo3結合活性を見出し、NELL1タンパク質を利用した新規骨形成因子の創成への下地となる成果となった。

研究成果の概要(英文)：The NELL1 gene was originally identified in craniosynostosis patients as being specifically unregulated within prematurely fusing sutures. Because of its potent osteoinductive activity, NELL1 protein may be useful for bone regeneration therapy. However, there is little knowledge regarding NELL1 receptors and NELL1-mediated signaling pathways. In this study, we demonstrate that NELL1 binds to cell surface proteoglycans through its thrombospondin-1 N-terminal (TSPN) domain. Major heparin-binding sites were identified on the three-dimensional structural model of the TSPN domain of NELL1. Mutant analysis of the heparin-binding sites indicated that the heparin-binding activity of the TSPN domain is involved in interaction of NELL1 with cell surface proteoglycans. We also found that NELL1 binds to Robo3 receptor through its EGF-like repeats.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：骨分化 細胞接着 再生医療

1. 研究開始当初の背景

(1) 事故や骨関連疾患により生じた骨欠損の治療法として、成長因子を適当なキャリアおよび標的細胞と組み合わせて組織を再生するティッシュ・エンジニアリングの手法が急速に進展している。骨形成タンパク質；bone morphogenetic proteins (BMPs) は単独で異所性の骨形成を誘導する唯一のサイトカインで、BMP-2 や BMP-7 を主成分とする骨再生・欠損修復剤が米国や欧州で臨床使用されているが、BMPs は様々な臓器の発生にも関与しており、投与部位に炎症を惹起するなど多くの合併症が報告されているため、他の様々な成長因子の利用が試みられているが、期待する骨形成効果が得られないなどにより進展していない。

(2) ヒト散発性頭蓋骨縫合早期癒合症の骨癒合部位に高発現する遺伝子として単離された *NELL1* (*Nel-like molecule 1*) は、種々の動物実験において骨形成を促進することが示され、BMPs を投与したときのような炎症を惹起しないことから、新しい骨形成因子として注目を集めている。しかし、*NELL1* の特異的な受容体は不明であり、骨形成を促進するシグナル伝達機構の詳細は明らかになっていなかったため、本研究課題の前段の研究として、①*NELL1* 受容体の探索、②骨分化シグナル経路の解明、および③*NELL1* タンパク質の機能領域の解析等を実施した。

(3) *NELL1* タンパク質のドメイン構造から推定して、*NELL1* が細胞接着活性を有すること、およびその細胞接着受容体がインテグリン $\alpha 3 \beta 1$ であることを明らかにした。また、*NELL1* のインテグリンを介した細胞接着が、focal adhesion kinase (FAK) のリン酸化を経て、mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナルを活性化することにより、骨形成に寄与することを明らかにした。しかしながら、*NELL1* が間葉系細胞に対して特異的に骨形成を促進することを説明するには、インテグリン $\alpha 3 \beta 1$ の他に、骨芽細胞に特異的に発現する別の受容体、あるいはインテグリンの共受容体が存在することが推定され、その解明が次の課題として残された。

2. 研究の目的

本研究課題の前段の研究で残された課題を解明するために、(1) 間葉系細胞に特異的な *NELL1* 受容体を同定し、その下流のシグナル伝達経路を解明する。同時に、(2) *NELL1* タンパク質の種々の機能領域を同定し、それらの情報を基に合成した改変型 *NELL1* タンパク質の骨形成能を評価することにより、骨形成能を強化した新規骨形成因子を創成する。そして、(3) *NELL1* および *NELL1* 受容体の機能を応用した新規骨再生治療法の開発への展開研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *NELL1* タンパク質の全長を用い、Tandem affinity purification (TAP) 法による *NELL1* 受容体のスクリーニングを行った。

(2) *NELL1* タンパク質が有する複数のドメイン構造のうち、N 末端にある thrombospondin-1 N-terminal (TSPN) ドメインに注目して、*NELL1* のヘパリン結合活性とそれに伴う細胞接着活性について解析した。

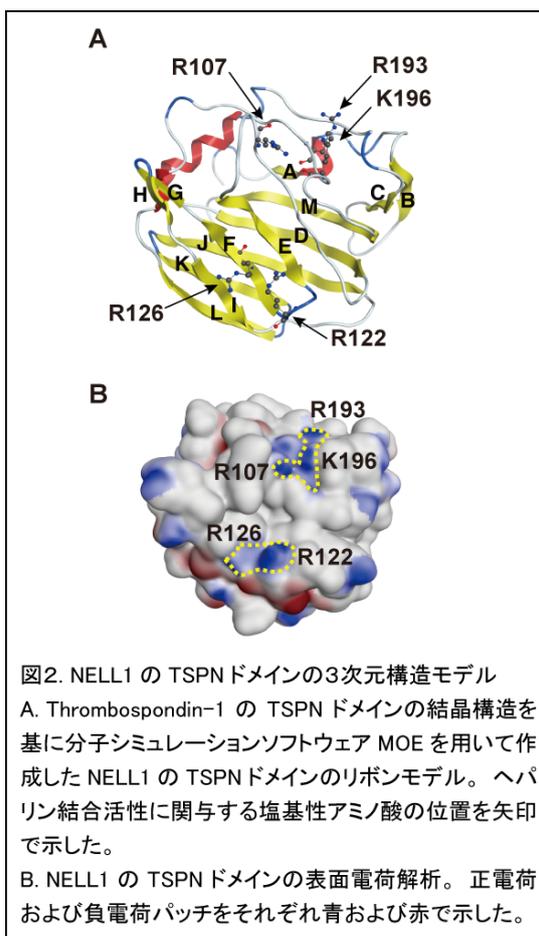
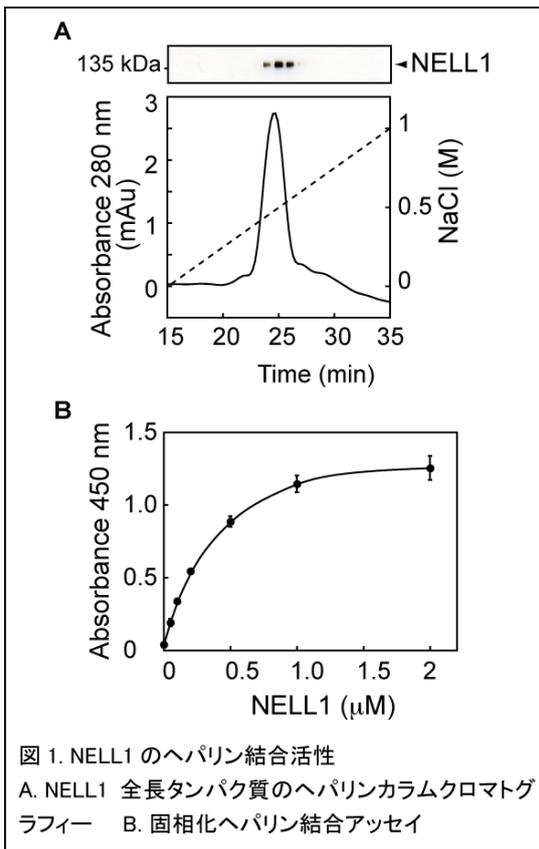
(3) *NELL1* の相同タンパク質である *NELL2* の新奇受容体が *Robo3* であることを海外の研究グループが報告したことから、*Robo* ファミリー受容体の *NELL1* への結合能について解析した。

4. 研究成果

(1) 共免疫沈降法や蛍光標識タンパク質の利用により、*NELL1* タンパク質の結合タンパク質を探索して *NELL1* 受容体を同定する試みは、本研究課題の前段の研究でも実施していたが、結合タンパク質の単離には至っていなかった。本研究では、全長の *NELL1* タンパク質の両末端にそれぞれ異なるエピトープタグを付加し、それぞれの特異抗体を用いて2段階の免疫沈降を行うことにより、特異性の高い結合タンパク質を単離する TAP 法を採用した。マウス間葉系細胞株である C3H10T1/2 および2種類のタグを付加した *NELL1* を強制発現させた C3H10T1/2 細胞の溶解液に対して、TAP 法を実施したところ、クロスリンカーを使用した場合のみ、*NELL1* に結合するタンパク質を検出することができた。しかし、クロスリンカー存在下では質量分析が困難との判断で、その後の解析に供するには至らなかった。今後、技術革新により、クロスリンカー存在下での質量分析が可能となった場合には、タンパク質の同定を試みる事が可能である。

(2) *NELL1* がヘパリン結合活性を有することが以前から知られていたため、本研究では最初にヘパリン結合部位の同定を行った。*NELL1* の欠失変異体を用いたヘパリン結合アッセイにより、N 末端に位置する TSPN ドメインがヘパリン結合部位であることを同定した。*NELL1* のヘパリン結合活性は、解離定数が約 400 nM と算出され、比較的弱い結合であったが、*NELL1* の細胞接着活性はヘパリンにより阻害されることから、*NELL1* が細胞表面の膜貫通型ヘパラン硫酸プロテオグリカンであるシンデカンファミリータンパク質に結合していることが示唆された (図1)。

次に、分子シミュレーション解析により、TSPN ドメインのタンパク質表面上の正電荷を示す 16 箇所のリジンおよびアルギニン残基を算出し、TSPN ドメインとコイルドコイル領域からなるタンパク質において、これらのアミノ酸をそれぞれアラニンに置換して、ヘパリンビーズとの結合実験を行ったところ、



少なくとも 5 箇所のリジンおよびアルギニンのアラニン置換変異体で活性が消失した (図 2)。これらのアミノ酸はいずれもタンパク質

表面上の近い距離に位置しており、これらのアミノ酸置換変異体ではヘパリン結合活性に加えて細胞結合活性も消失した。以上のことから、NELL1 と細胞表面のヘパリン硫酸プロテオグリカンとの結合は、NELL1-インテグリン結合の共受容体としての働きをしていることが示唆された。

(3) *NELL2* は *NELL1* とともに *NELL* 遺伝子ファミリーを構成しており、*NELL1* が骨形成能を有するのに対して、*NELL2* は脳神経系の機能に重要な働きをしている。近年、*NELL2* の新奇受容体として、Robo ファミリー受容体に属する Robo3 が同定され、神経軸索の正中線交差を誘導することが報告された (Jaworski, A. *et al.*, 2015)。そこで本研究では、Robo ファミリー受容体の *NELL1* への結合能について解析した。*NELL1* と Robo1~3 の結合を免疫沈降法によって調べ、*NELL1* が Robo3 とのみ結合することを明らかにした。また、Robo3 との結合部位は *NELL1* の EGF 様ドメインに存在し、その立体構造が Robo3 との結合に重要な役割を果たしていることを見出した。Robo3 はマウス頭蓋冠組織にも微量ながら発現しており、Robo3 が *NELL1* の受容体として骨形成に関与する可能性が示唆された。

<引用文献>

Jaworski, A., Tom, I., Tong, R.K., Gildea, H.K., Koch, A.W., Gonzalez, L.C., and Tessier-Lavigne, M. (2015). Operational redundancy in axon guidance through the multifunctional receptor Robo3 and its ligand *NELL2*. *Science* 350, 961-965.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Takahashi, K., Imai, A., Iijima, M., Yoshimoto, N., Maturana, A.D., Kuroda, S., and Niimi, T. (2015). Mapping the heparin-binding site of the osteoinductive protein *NELL1* by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett.* 589, 4026-4032. 査読有
doi: 10.1016/j.febslet.2015.11.032.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 山本菜央佳、新美友章：骨分化誘導タンパク質 *NELL1* の Robo ファミリー受容体への結合能の解析、日本農芸化学会 2017 年度大会、平成 29 年 3 月 19 日、京都女子大学 (京都市)
- ② 高橋謙嘉、今井杏理沙、新美友章：骨分化誘導タンパク質 *NELL1* のヘパリン結合部位の解析、BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、平成 27 年 12 月 1 日、神戸ポートアイランド (神戸市)

- ③ 今井杏理紗、黒田俊一、新美友章：骨分化誘導タンパク質 NELL1 のヘパリン結合活性の役割、第37回日本分子生物学会年会、平成26年11月25日、パシフィコ横浜（横浜市）
- ④ 高橋謙嘉、黒田俊一、新美友章：骨形成蛋白質 NELL1 のインテグリンおよびヘパラン硫酸プロテオグリカンを介したシグナル伝達、第46回日本結合組織学会学術大会・第61回マトリックス研究会大会合同学術集会、平成26年6月6日、愛知県産業労働センター ウィンク愛知（名古屋市）

〔図書〕（計 1 件）

- ① Niimi, T. (2016). *Leishmania tarentolae* for the production of the multi-subunit complexes. In: *Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization, Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 896, (Ed: Vega, M.C.) Springer, NY, USA. pp155-165.
doi: 10.1007/978-3-319-27216-0_10.

〔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

<https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~tagen/tagen/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新美 友章 (NIIMI, Tomoaki)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・講師
研究者番号：30377791

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

黒田 俊一 (KURODA, Shun'ichi)
大阪大学・産業科学研究所・教授
研究者番号：60263406