

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：17501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893208

研究課題名(和文) XI/XXVII型コラーゲンの軟骨特異的発現調節機構の解明と軟骨再生への応用

研究課題名(英文) Transcriptional regulation of XI/XXVII collagen gene in chondrocyte

研究代表者

樋田 真理子 (Hida, Mariko)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：10737224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨細胞におけるXI型コラーゲン遺伝子の転写調節機構を解析した結果、基本プロモーター領域におけるNF-Yの結合が示唆され、ドミナントネガティブ発現によりプロモーター活性の低下が示された。更なる解析により、GC配列の重要性が示され、Sp1が関与していることが強制発現とKD実験により示された。以上の結果は、軟骨細胞のXI型コラーゲン遺伝子の転写調節がNF-YとSp1で制御されている事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We investigated the proximal promoter of mouse Col11a1 gene in chondrocytes. Cell transfection experiments with reporter constructs in the absence of NF-Y binding sequence exhibited the suppression of the promoter activity. Furthermore, NF-Y protein directly bound to this region in vivo, and dominant-negative NF-Y A mutant inhibited the promoter activity. Next, we further characterized the proximal promoter activity of mouse Col11a1 gene. Luciferase assays exhibited that GC rich sequence is a critical elements of Col11a1 promoter activity, and the most effective candidate was transcription factor Sp1. Overexpression of Sp1 was significantly increased the activity and knockdown of Sp1 expression was suppressed the proximal promoter activity and the expression of endogenous transcript of mouse 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 コラーゲン 転写

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックス分子、特に生体内タンパク質の約3割を占めるコラーゲン分子は、組織形成、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、骨では I, V, XXIV 型、軟骨では II, XI, XXVII 型コラーゲンが主成分として構成されている。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・脂肪細胞などに分化し、それぞれの組織や器官を形成することが知られている。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」として細胞に積極的に働き、かけている事が明らかになりつつある。

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発現調節機構について検討してきた。

2. 研究の目的

骨・軟骨に発現しているコラーゲン遺伝子の中で、XI 型コラーゲン遺伝子は、線維性マイナーコラーゲンに属しており、その発現量は少ないが、軟骨組織に局限して発現している。また、1/ 2/ 3 鎖の3つの遺伝子の分子型が存在しており、軟骨組織において、ヘテロトライマー構造を形成している。XI 型コラーゲン 1 鎖遺伝子は、遺伝子欠損マ

ウスにおいて、軟骨形成不全症を示すことが報告されており、軟骨組織の構築及び機能発現に必要な分子である。

そこで、本研究では、マウス XI 型コラーゲン 1 鎖遺伝子の軟骨特異的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關与する転写因子の解析を行った。

3. 研究の方法

XI 型コラーゲン遺伝子について、基本プロモーター領域を同定後、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た。活性を示す領域については、ゲルシフトアッセイのプロープを作製し、關与する転写因子を検索した。更に、見出した転写因子について、その機能解析を行った。遺伝子発現を確認するために、RT-PCR を行うと共に、Oligo-nucleotide-capping-RACE 法により転写開始点を決定した。次に、基本プロモーター領域を同定するために、5' 側の長さが異なるルシフェラーゼコンストラクトを作成し、ルシフェラーゼアッセイを行った。また、同定した基本プロモーター領域に關与する転写因子について、Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA) により検討した。

更に、見出した転写因子の細胞内での結合を明確にするために、Chip assay を行った。最後に、転写因子の結合領域を欠失、変異させたコンストラクトおよびドミナントネガティブ変異体の発現ベクターを用いて、プロモーター領域における転写因子の機能解析を行った。

4. 研究成果

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

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、XI 型コラーゲン 1 鎖遺伝子の発現は、RCS 細胞 (ラット軟骨肉腫由来) 及び ATDC5 細胞 (マウス奇形腫線維芽様細胞由来) 共に認められ、その発現量は、軟骨での分化を示す RCS 細胞でより高かった。この遺伝子の軟骨における転写開始点は、翻訳開始コドン ATG の -299bp 上流に位置していることが明らかとなった。ルシフェラーゼアッセイにより、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。最後に、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。

(文献 Hida et al. 2014)

(2) 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、見出した 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(-135~-145)の下流部位(-116~+1)にも、この遺伝子の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、最小プロモーター領域内には、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、トランスフェクションによる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た。次に、この領域に関与する転写因子をデータベースを用いて検討したところ、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た。更に、Sp1 にノックダウンベクターを用いて機能解析を行った結果、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。

(文献 Watanabe, Hida et al. 2016)

(3) 結語

以上の結果から、軟骨細胞におけるマウス XI 型コラーゲン 1 鎖遺伝子の転写調節機構を解析した結果、その基本プロモーター領域に転写因子 NF-Y と Sp1 が関与しており、この遺伝子の転写活性を正に制御している事が明らかとなった

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 2 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.

[学会発表](計 2 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

[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 (HIDA Mariko)

樋田 真理子

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：10737224

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：