

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：若手研究（A）
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19689037
 研究課題名（和文）転写因子 Sox9 の新規転写コファクターの同定とその機能的役割の解明
 研究課題名（英文）Transcriptional Regulation of Sox9 during endochondral ossification

研究代表者
 波多 賢二 (HATA KENJI)
 大阪大学・大学院歯学研究科・助教
 研究者番号：80444496

研究成果の概要（和文）：

骨格の大部分を形成する内軟骨性骨化は、未分化間葉系細胞から分化誘導された軟骨細胞により遂行される。軟骨細胞分化過程においては転写因子 Sox9 が必須的役割を担うことから、本研究では Sox9 の転写活性を調節する転写コファクターの検索を行い p54^{nrB} および Dmrt5 を同定した。p54^{nrB} は Sox9 のスプライシング因子として内軟骨形成を制御すること、また Dmrt5 は軟骨細胞分化のみならず Sox9 依存性の性分化にも関与していることを見出した。本研究より、我々の構築したスクリーニングシステムの有効性とそれにより得られた Sox9 新規転写コファクターの生物学的重要性が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Most of bones were formed through unique ossification pathway called endochondral ossification. It is well known that transcriptional factor Sox9 is essential for chondrocyte differentiation. To understand the molecular basis for chondrogenesis, we established screening system which can allow us to identify transcriptional co-factor for Sox9. We have identified p54^{nrB} and Dmrt5 as a novel transcriptional partner for Sox9. Further studies revealed that p54^{nrB} modulate mRNA splicing of Sox9 target genes. Moreover, we found that Dmrt5 is involved in Sox9 dependent sex differentiation as well as chondrocyte differentiation. Our findings indicate that the screening system is valid and the newly identified Sox9 transcriptional cofactor is important for chondrocyte differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2008 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2009 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
年度			
年度			
総計	20,700,000	6,210,000	26,910,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：口腔生化学、軟骨細胞、転写因子、Sox9

1. 研究開始当初の背景

骨格を形成する骨の大部分は、間葉系細胞から軟骨組織の形成後に骨組織に置き換わる、いわゆる内軟骨性骨化により形成される。また、関節軟骨などの一部の軟骨は、骨に置き換えられることなく、永久軟骨として身体に可動性を与えている。従って、軟骨細胞は運動器の形成および機能において非常に重要な役割を担っている。一方、近年の高齢化社会の到来に伴って、リウマチ性関節炎などの軟骨疾患患者が急増し、医療費の増大をはじめとした社会的問題となっている。したがって、軟骨細胞の分化および機能の調節機構に関する研究は、学術的にも社会的にもその重要性が増している。

間葉系細胞から軟骨細胞への分化においては、転写因子 Sox9 が中心的な役割を担っている。すなわち、Sox9 はⅡ型コラーゲン (Col2a) などの軟骨組織特異的遺伝子のプロモーターに直接結合し、その発現を誘導する。また、軟骨組織特異的 Sox9 ノックアウトマウスでは、軟骨組織が全く形成されないことが報告されている。さらに、ヒトにおける Sox9 遺伝子の変異は、著しい骨格異常と性転換を呈する Campomelic Dysplasia を発症させることから、臨床的にも骨格形成における Sox9 の重要性が明らかとなっている。したがって、軟骨細胞分化メカニズムの解明には、Sox9 の詳細な転写制御機構の解析が必須の研究課題であるが、未だ不明な点が多く、全貌の解明には至っていない。

最近の知見から、マスター遺伝子として機能する転写因子は、単一で細胞分化を制御しているのではなく、複数の転写コファクターと転写複合体を形成して、組織特異的な遺伝子の発現を調節し、細胞分化プログラムを調節していることが明らかになりつつある。Sox9 も軟骨特異的な転写コファクターとの協調作用や組み合わせにより、軟骨組織特異的遺伝子の発現を調節し、軟骨細胞分化を制御していると推察される。したがって、Sox9 転写コファクターを同定しその生物学的機能を明らかにすることは、軟骨細胞分化の詳細な分子メカニズムを理解する上で重要な研究課題である。

2. 研究の目的

軟骨細胞分化過程における Sox9 の詳細な転写制御機構の解明を目的に、軟骨組織特異的マーカーを指標にしたハイスループットアッセイを行い、Sox9 と協調的に機能する軟骨特異的および非特異的 Sox9 転写コファクターを網羅的に同定し、その生物学的意義を明らかにする。さらに、本研究では、内軟骨性骨化に加えて、精巢形成過程における新規転写コファクターの機能解析も併せて行い、Sox9 による器官形成メカニズムの総合的理解を目指す。

3. 研究の方法

軟骨細胞に分化誘導可能な培養細胞株 ATDC5 細胞から作成した cDNA ライブラリーを用いてハイスループットアッセイを行い、遺伝子スクリーニングを行う。一次スクリーニングは、軟骨細胞における Sox9 の標的遺伝子であるⅡ型コラーゲン (Col2a) のプロモーター活性を、二次スクリーニングは精巢形成過程における Sox9 の標的遺伝子であるミューラー管阻害因子 (MIS/AMH) のプロモーター活性を指標に、ルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーターアッセイにより行い、Sox9 の転写活性を増強する遺伝子を検索した。そして、Col2a のみ陽性の遺伝子を軟骨特異的 Sox9 転写コファクター、Col2a および MIS/AMH 陽性の遺伝子を軟骨非特異的 Sox9 転写コファクターとして同定した。

4. 研究成果

(1) Sox9 転写コファクターの同定

我々は軟骨組織特異的遺伝子であるⅡ型コラーゲン遺伝子のプロモーター活性を指標に1次スクリーニングを行った結果 p54^{nrh} および Dmrt5 を Sox9 の転写コファクターとして同定した。さらにこれら2遺伝子から、精巢特異的遺伝子であるミューラー管阻害因子 (MIS/AMH) 遺伝子プロモーター活性を指標に2次スクリーニングを行った。その結果、Dmrt5 のみが性分化制御因子 SF-1 存在下で Sox9 依存性の MIS/AMH 遺伝子プロモーター活性を顕著に促進した。

これらの結果より、我々は軟骨組織特異的 Sox9 転写コファクターとして p54^{nrh} を、軟骨

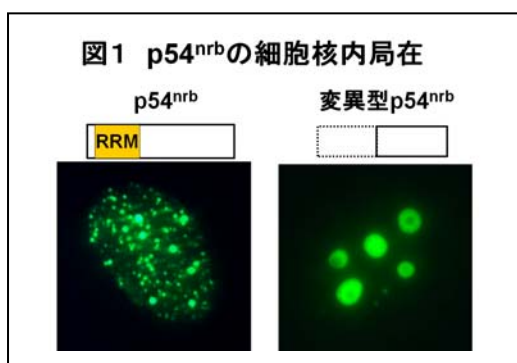
組織および精巢の Sox9 転写コファクターとして同定し。その生物学的機能について検討を進めた。

(2) 軟骨細胞分化における p54^{nrh} の役割

① p54^{nrh} は II 型コラーゲン遺伝子のプロモーター活性に対する Sox9 の転写活性を顕著に増強させた。この Sox9 転写促進効果は siRNA による p54^{nrh} のノックダウンにより抑制された。さらに、アデノウィルスを用いて未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2 細胞に p54^{nrh} を過剰発現させると Sox9 誘導性の II 型コラーゲンおよびアグリカンなどの軟骨軟骨細胞分化マーカーの発現が著明に誘導された。さらに免疫沈降法により p54^{nrh} は Sox9 の HMG ドメインを介して Sox9 と物理的に結合している事、またマウス肋軟骨より採取した初代培養軟骨細胞の細胞免疫染色の結果 p54^{nrh} と Sox9 は明らかとなった。

② p54^{nrh} の機能的役割

p54^{nrh} は N 末端領域に 2 つの RRM ドメイン (RNA Recruitment Motif) を有する。したがって p54^{nrh} は Sox9 の転写活性を促進するのみならず Sox9 と協調して標的遺伝子の RNA スプライシングにも関与する可能性が推察される。スプライシング因子の特徴として細胞核内においてスペckルと呼ばれるドット状の局在を示すことから GFP を融合した p54^{nrh} を作製しその核内局在を共焦点レーザー顕微鏡にて検討したところ、p54^{nrh} はスペckルに局在している事が明らかとなった (図 1)。さらに興味深いことに RRM ドメインを欠損させた変異型 p54^{nrh} はスペckルが巨大化した異常な形態を示した。



次に、II 型コラーゲン遺伝子を用いた Minigene アッセイを行った結果、p54^{nrh} は II 型コラーゲン遺伝子の RNA スプライシングを制御すること、また変異型 p54^{nrh} は II 型コラ

ーゲン遺伝子の RNA スプライシングを抑制することにより Sox9 依存性の II 型コラーゲン遺伝子の発現抑制ならびに軟骨細胞分化を阻害することが明らかとなった。

③ In Vivo における p54^{nrh} の役割

最後に II 型コラーゲン遺伝子プロモーターを用いて軟骨組織特異的に変異型 p54^{nrh} を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製し、In Vivo における p54^{nrh} の生物学的重要性を検討した。変異型 p54^{nrh} トランスジェニックマウスは四肢の短縮ならびに顕著な骨格成長障害を示した。組織学的検討の結果変異型 p54^{nrh} トランスジェニックマウスは内軟骨性骨化の遅延を呈している事が明らかとなった。

以上の結果より、Sox9 の新規転写コファクター p54^{nrh} は、Sox9 の転写活性を促進するのみならず、Sox9 標的遺伝子のスプライシングを制御することにより内軟骨性骨形成に関与することが明らかとなった。

(3) 軟骨細胞分化における Dmrt5 の役割

上記のスクリーニングシステムを用いて Sox9 による軟骨細胞分化および性分化を制御する因子として転写因子 Dmrt5 (Doublesex and mab-3 related transcription factor 5) を同定した。Dmrt5 は Dmrt ファミリーに属する転写因子としてクローニングされたが、その生物学的役割については全く不明であった。免疫組織学的検討の結果 Dmrt5 は軟骨組織および精巢に強く発現していた。Dmrt5 は Sox9 と物理的に結合し、細胞核内においてその発現パターンが一致していた。さらに詳細な検討の結果、Dmrt5 は II 型コラーゲンプロモーター上に存在する DM ドメイン結合領域に結合することが明らかとなった。また様々な Dmrt5 変異体を作製し Sox9 への効果を検討したところ DM ドメインを欠損させた変異体は軟骨組織ならびに精巢における Sox9 標的遺伝子のプロモーター活性を顕著に抑制した。

以上の結果より、Dmrt5 は Sox9 の転写コファクターとして軟骨細胞分化ならびに性分化を制御し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6件)

1. Sox9 family members negatively regulate maturation and calcification of chondrocytes through up-regulation of PTHrP

Amano K, Hata K, Sugita A, Takigawa Y, Ono K, Wakabayashi M, Kogo M, Nishimura R, Yoneda T

Mol Biol Cell (2009) : 21, 4541-51 査読あり

2. Cbp recruitment of Csk into lipid rafts is critical to c-Src kinase activity and bone resorption in osteoclasts

Matsubara T, Ikeda F, Hata K, Nakanishi M, Okada M, Yasuda H, Nishimura R, Yoneda T

J Bone Miner Res (2009) 印刷中 査読あり

3. BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation.

Matsubara T, Kida A, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, Aburatani H, Nishimura R, and Yoneda T

J Biol Chem (2008). 283, 29119-29125. 査読あり

4. Paraspeckle protein p54nrb links Sox9-mediated transcription with RNA processing during chondrogenesis in mice.

Hata K, Nishimura R, Muramatsu S, Matsuda A, Matsubara T, Amano K, Ikeda F, Harley VR, Yoneda T

J Clin Invest (2008)118: 3098-3108 査読あり

5. MSX2 stimulates chondrocyte maturation by controlling Ihh expression.

Amano K, Ichida F, Sugita A, Hata K, Wada M, Takigawa Y, Nakanishi M, Kogo M, Nishimura R, Yoneda T

J Biol Chem (2008) 283: 29513-29521 査読あり

6. Ihh/Gli2 signaling promotes osteoblast differentiation by regulating Runx2 expression and function.

Shimoyama A, Wada M, Ikeda F, Hata K, Matsubara T, Nifuji A, Noda M, Amano K, Yamaguchi A, Nishimura R, Yoneda T

Mol Biol Cell (2007)18: 2411-2418 査読あり

あり

[学会発表] (計5件)

1. Kenji Hata
Transcriptional Regulation of Endochondral Ossification
KSO Expert Meeting
2010年2月10日 Incheon, 韓国

2. 波多賢二
Sox9 転写調節メカニズムの解明
第12回骨発生・再生研究会
2009年10月31日 東京

3. 波多賢二
転写因子 Sox9 を基盤とした内軟骨性骨化因子メカニズムの解明
第10回運動器科学研究会
2009年9月18日 東京

4. 波多賢二
転写因子 Sox9 を基盤とした内軟骨性骨化因子メカニズムの解明
第51回歯科基礎医学会・サテライトシンポジウム
2009年9月10日 新潟

5. 波多賢二
転写因子 Sox9 を基盤とした内軟骨性骨化因子メカニズムの解明
第26回日本骨代謝学会・シンポジウム
2008年10月30日 大阪

6. 研究組織

(1)研究代表者

波多 賢二 (HATA KENJI)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：80444496

(3)連携研究者

米田 俊之 (YONEDA TOSHIYUKI)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：80142313
西村 理行 (NISHIMURA RIKO)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：60294112