

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790323

研究課題名(和文) 骨形成における膜貫通型転写因子 OASIS の解析

研究課題名(英文) Analysis of a membrane bound transcription factor OASIS in osteogenesis

研究代表者

村上 智彦 (Tomohiko Murakami)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：50510723

研究成果の概要(和文): OASIS の生体内における役割を明らかにするために、OASIS 遺伝子欠損マウスを作製したところ、骨形成不全および成長抑制を示した。組織学的および分子細胞生物学的な解析により、OASIS は骨芽細胞にて I 型コラーゲンの転写および分泌に関与することが明らかとなった。一方、OASIS 欠損マウスの成長抑制は OASIS を骨芽細胞に導入しても改善されないことから、血中成長ホルモンおよび IGF-1 の低下によると考えられた。

研究成果の概要(英文): To assess the role of OASIS in vivo, we generated OASIS deficient mice. The mice exhibited osteopenia and growth retardation. Histological, and molecular and cellular biological analyses revealed that OASIS is involved in bone formation through transcription of type I collagen and secretion of bone matrix proteins. In contrast, the growth retardation in OASIS deficient mice were not improved by OASIS introduction in osteoblasts, indicating that the growth retardation is caused by the decrease in growth hormone and IGF-1 levels in OASIS deficient mice.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：小胞体・骨形成・コラーゲン・分泌・成長

1. 研究開始当初の背景

細胞内外から様々な刺激あるいはストレスによりタンパク質の折り畳みが障害され、小胞体内腔に折り畳み不全のタンパク質が蓄積する状態を小胞体ストレスという。本研究者はこれまで新規小胞体ストレスセンサーとして OASIS を同定してきた。OASIS はアストロサイトや骨芽細胞など細胞種特異的に発現していた。OASIS の生体内での役割を明らかにするために OASIS 遺伝子欠損マウス

を作製したところ、骨形成不全および成長抑制を示した。

2. 研究の目的

本研究では OASIS 欠損マウスに見られる骨形成不全を分子レベルで解明することを最終目的として、骨芽細胞における OASIS の機能を生化学的および細胞生物学的に解析する。

(1) 骨芽細胞における OASIS のターゲット

遺伝子

転写因子 OASIS のターゲット遺伝子を同定することは、OASIS 欠損により骨形成不全に陥るメカニズムを解明する上で、また骨芽細胞における OASIS の機能を解析する上でも非常に重要である。そこで転写因子としての OASIS のターゲットを探索する。

(2) OASIS 欠損による骨基質の産生あるいは分泌に対する影響

OASIS 欠損マウスの骨芽細胞は小胞体内腔に分泌物が貯留している(図3)ことから、OASIS 欠損により小胞体タンパク質の品質管理能力が低下し、骨芽細胞の骨基質分泌あるいは産生が減少している可能性がある。骨基質の産生あるいは分泌異常は骨形成障害につながることで、OASIS と骨基質の産生あるいは分泌との関連を解析する。

(3) 骨芽細胞における OASIS の活性制御メカニズム

OASIS は膜貫通型の転写因子であり、OASIS が活性化するには膜内切断 regulated intramembrane proteolysis (RIP) を受ける必要がある。骨芽細胞の OASIS は通常より活性化型を伴って発現している。OASIS の活性化に關与する内腔ドメインと結合する分子を解析し、骨芽細胞における OASIS の活性化機構を明らかにする。このことは骨芽細胞における小胞体タンパク質品質管理のメカニズムを理解する上でも重要である。

3. 研究の方法

(1) OASIS 欠損マウスの病態解析

OASIS 欠損マウスの骨組織の解析

OASIS 欠損マウスから採取した頭蓋骨から骨基質タンパク質を抽出したところ、野生型に比べ I 型コラーゲンのタンパク質量が減少していた。そこで、ウエスタンブロットリングなどの手法や内部標準を取り入れることにより、骨に含まれるコラーゲンを比較・定量できるシステムを構築する。また、本システムを応用することでオステオカルシンやオステオポンチンなどの骨基質タンパク質を定量するシステムを順次構築し、OASIS 欠損による骨質の変化を調べる。

骨形態計測

X 線写真による解析を行った結果、OASIS 欠損マウスでは骨密度の低下が認められた。そこで、カルセイン二重ラベルを施したマウスを用いた骨形態計測を行い、OASIS 欠損マウスの骨形成率及び骨吸収率を定量化する。

(2) OASIS 欠損マウスから採取した骨芽細胞の細胞生物学的解析

初代培養骨芽細胞を用いた OASIS ターゲット遺伝子の探索

OASIS 欠損マウスと野生型マウスに由来する骨芽細胞において、発現量の異なる遺伝子をマイクロアレイ及び RT-PCR 法を用いて網羅的に探索する。更に、取得したターゲット遺伝子の細胞及び組織内での発現をウエスタンブロットリング、in situ hybridization、免疫組織化学を用いて詳細に検討する。

アデノウイルスを用いた OASIS の過剰発現得られたターゲット遺伝子の発現が OASIS により制御されていること確認するために、OASIS を強制発現させた骨芽細胞におけるターゲット遺伝子の発現変動を調べる。

骨芽細胞における OASIS の発現制御機構の解析

骨芽細胞培養に骨形成促進因子である BMP2 を添加すると OASIS の発現が RNA 及びタンパク質レベルで誘導されることがわかっている。BMP2 シグナルの下流には骨形成に重要な Runx2 などの転写因子が存在する。それらの転写因子が OASIS の発現制御に関わるかを検証する。

4. 研究成果

OASIS 欠損マウスは骨折を伴う重度の骨形成不全を示したことから、OASIS が骨形成において重要な働きをすることが想定された。OASIS 欠損により骨形成不全になるメカニズムを解明するために、野生型および OASIS 欠損マウスより採取した骨組織を用いて、発現量の異なる遺伝子をマイクロアレイ及び RT-PCR 法により網羅的に探索した。その結果、OASIS 欠損骨芽細胞において骨基質の主成分である I 型コラーゲンの転写レベルでの減少が認められた。この OASIS 欠損骨芽細胞のコラーゲン転写の減少は OASIS 欠損骨芽細胞にアデノウイルスを用いて OASIS を過剰発現させることによって救済された。また、コラーゲンプロモーター (Col1a1) 領域を用いたリポーターアッセイにより、OASIS はコラーゲンプロモーターを直接活性化させることがわかった。これらの結果より、OASIS のターゲット遺伝子の一つは I 型コラーゲンであることが判明した。更に、野生型および OASIS 欠損マウス骨組織の超微細構造変化の検討を行ったところ、OASIS 欠損骨芽細胞の小胞体は異常に拡張しておいた。この小胞体の異常拡張は骨基質の貯留によるものと考えられた。そこで骨基質であるコラーゲンの免疫染色を行ったところ、OASIS 欠損骨芽細胞の小胞体内にはコラーゲンが貯留していることがわかった。つまり、OASIS 欠損マウスの骨芽細胞は骨基質分泌傷害を起こしていた。以上より、OASIS は骨芽細胞の I 型コラーゲンの転写および骨基質の分泌を介して骨形成に關与することが明らかになった。続いて、OASIS 欠損マウスにおける病態発現が骨芽細胞での OASIS 欠損に依存するかを確

かめるために、OASIS を骨芽細胞特異的に発現するマウス(OASIS Tg マウス)を作製した。このマウスと OASIS 欠損マウスを掛け合わせることで骨芽細胞特異的に OASIS を発現する OASIS 欠損マウス(OASIS-/-;Tg) マウスを作製した。この OASIS-/-;Tg マウスでは OASIS 欠損マウスにみられた骨形成不全が救済されていた。その一方、OASIS 欠損マウスは骨形成不全とともに成長抑制を呈するが、その成長抑制は OASIS-/-;Tg マウスでは救済されていなかった。この結果は、OASIS 欠損マウスの成長抑制は骨形成不全とは異なるメカニズムによって引き起こされることを示すものであった。野生型マウスと OASIS 欠損マウスの血中成長ホルモンおよび IGF-1 を測定したところ、OASIS 欠損マウスでは野生型に比べ成長ホルモンおよび IGF-1 が低下していた。OASIS-/-;Tg マウスにおいてもそれらの低下は改善されていなかったことより、OASIS 欠損マウスにみられた成長抑制は骨芽細胞以外での OASIS の欠損が起因となり、成長ホルモンおよび IGF-1 の低下、そして成長抑制につながっていると考えられた。

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5件)

Murakami T, Hino S-I, Nishimura R, Yoneda T, Wanaka A, and Imaizumi K.: Distinct mechanisms are responsible for osteopenia and growth retardation in OASIS-deficient mice. *Bone*, 査読有, 48(3):514-523, 2011.

Saito A, Ochiai K, Kondo S, Tsumagari K, Murakami T, Cavener, DR, and Imaizumi K.: Endoplasmic reticulum stress response mediated by the PERK-eIF2 -ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2. *Journal of Biological Chemistry*, 査読有, 286(6):4809-4818, 2011.

Sekiya H, Murakami T, Saito A, Hino S-I, Tsumagari K, Ochiai K, and Imaizumi K.: Effects of the bisphosphonate risedronate on osteopenia in OASIS-deficient mice. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 査読有, 28(4):384-394, 2010.

Murakami T, Saito A, Hino S-I, Kondo S, Kanemoto S, Chihara K, Sekiya H,

Tsumagari K, Ochiai K, Yoshinaga K, Saitoh M, Nishimura R, Yoneda T, Kou I, Furuichi T, Ikegawa S, Ikawa M, Okabe M, Wanaka A, and Imaizumi K.: Signalling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in bone formation. *Nature Cell Biology*, 査読有, 11(10):1205-1211, 2009.

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, and Imaizumi K.: Regulation of endoplasmic reticulum stress response by a BBF2H7-mediated Sec23a pathway is essential for chondrogenesis. *Nature Cell Biology*, 査読有, 11(10):1197-1204, 2009.

[学会発表](計7件)

村上智彦、西村理行、米田俊之、今泉和則:小胞体ストレスセンサーOASIS欠損マウスにおける骨形成不全と成長抑制. 第28回日本骨代謝学会学術集会. 2010, 7, 21-23, 東京.

Murakami T, Nishimura R, Yoneda T, Ikegawa S, and Imaizumi K.: OASIS, an endoplasmic reticulum stress transducer, is involved in bone formation. Experimental Biology 2010 (2010 American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB) Annual Meeting). 2010, 4, 24-28, Anaheim, CA, USA.

日野真一郎、齋藤 敦、村上智彦、津曲健志、落合希実子、今泉和則:小胞体ストレスセンサーOASISファミリーの活性化機構と生体機能調節. 第115回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2010, 3, 28-30, 盛岡.

村上智彦、西村理行、米田俊之、池川志郎、和中明生、今泉和則:小胞体ストレスセンサーOASISの骨形成における新機能. 第32回日本分子生物学会年会. 2009, 12, 9-12, 横浜.

村上智彦:小胞体ストレスセンサーOASISによる骨格形成制御. 特定領域研究「タンパク質の社会」2009年度班会議. 2009, 11, 12-14, 伊賀.

村上智彦、西村理行、米田俊之、古市達哉、和中明生、今泉和則：小胞体膜貫通型転写因子OASISと骨形成．第 27 回日本骨代謝学会学術集会．2009, 7, 23-25, 大阪．

村上智彦、西村理行、米田俊之、池川志郎、和中明生、今泉和則：小胞体ストレスセンサーOASISによる骨形成制御．日本分子生物学会第 9 回春季シンポジウム．2009, 5, 11-12, 宮崎．

研究者番号：50510723

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

〔図書〕(計 2 件)

今泉和則、**村上智彦**、齋藤 敦：小胞体ストレスセンサーによる骨軟骨形成制御．**実験医学** 28(4)：563-567, 2010.

今泉和則、**村上智彦**：骨代謝のダイナミクスにおける小胞体ストレス応答の役割．**実験医学** 27(4)：505-510, 2009.

〔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〕

受賞

村上智彦：第 27 回日本骨代謝学会学術集会において、優秀演題賞 (JSBMR Young Investigator Award) を受賞。(2009/7/24, 大阪) 演題：小胞体膜貫通型転写因子 OASIS と骨形成。

6. 研究組織

(1)研究代表者

村上 智彦 (Murakami Tomohiko)
宮崎大学・医学部・助教