

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32409

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20964

研究課題名（和文）ヒトとマウスのBMP受容体ALK2における1アミノ酸を介した活性制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the regulatory mechanism of human and mouse ALK2 activity via a single amino acid.

研究代表者

福田 枝里子（FUKUDA, Eriko）

埼玉医科大学・医学部・助手

研究者番号：60740777

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：ALK2は、TGF- β ファミリーに属するBMPの膜貫通型キナーゼ受容体である。研究者の所属するグループは、これまでヒトALK2とマウスALK2の活性に差があることを見出した。そこで、本研究では、動物種の違いに由来する特定の1アミノ酸残基によって調整されるALK2活性制御機構の解析を行った。ヒトALK2受容体と特定の1アミノ酸残基をマウス型の1アミノ酸に置換したALK2変異体による解析から、マウスALK2とヒトALK2で異なる活性に重要な特定の1アミノ酸残基を同定した。さらに、同定した1アミノ酸残基に依存してALK2のBMPリガンドに対する反応性が変化する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物種の違いに由来する特定の1アミノ酸残基によって調整されるALK2活性の分子メカニズムの解明により、ALK2の種差による生理的役割の解析や、軟部組織で異所性の骨が形成される難病のFOPや小児脳腫瘍のDIPG等のALK2の遺伝的変異に基づく疾患研究への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：ALK2 is a transmembrane kinase receptor for Bone morphogenetic protein (BMP), a member of the TGF- β family. We previously found that between human and mouse ALK2 differ in their activities. In this study, we investigated the molecular mechanism of ALK2 activity is regulated by different amino acid residues in mouse ALK2 and human ALK2. We analyzed the human ALK2 receptor and mutants in which specific amino acid residues were replaced with mouse-type amino acids. We identified a specific amino acid residue that is important for the different activities of mouse ALK2 and human ALK2. It was suggested that the response of ALK2 to BMP ligands may change depending on the identified an amino acid residue.

研究分野：病態生理学

キーワード：BMP ALK2 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

Transforming growth factor- (TGF-)ファミリーに分類される成長因子群である Bone Morphogenetic Protein (BMP) は、骨格筋に移植すると異所性骨化を誘導する成長因子として発見され、骨形成をはじめとした骨格の形成に重要なことが広く知られている。BMP は、二量体として存在し、標的細胞の細胞膜上で二分子ずつの I 型と II 型の膜貫通型受容体に結合する。I 型受容体の 1 つである ALK2(Activin receptor-like kinase 2)は、細胞内領域に 509 のアミノ酸残基を有する膜貫通型キナーゼ受容体であり、BMP の結合により II 型受容体からリン酸化を受け、下流転写因子 Smad1, Smad5 をリン酸化し、標的遺伝子の転写により骨形成を誘導する。(図 1)

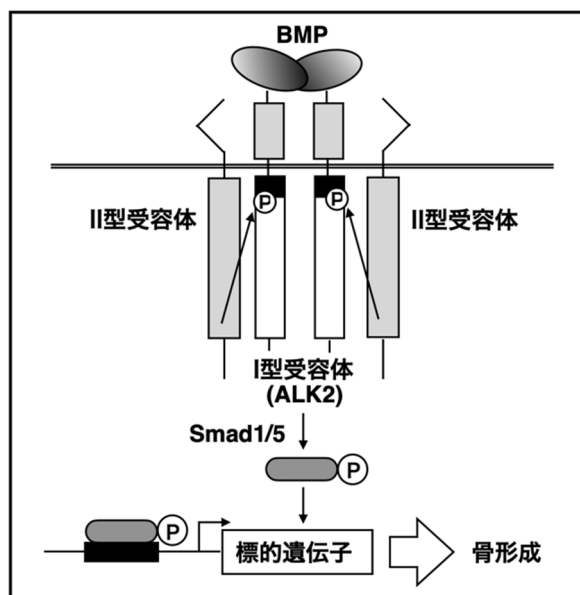


図1 BMP受容体情報伝達

ヒト ALK2 の機能獲得型変異体が複数の遺伝性疾患から見出されている。骨格筋や腱、靱帯などの軟組織で異所性骨化が起きる進行性骨化性線維異形成症 (fibrodysplasia ossificans progressive, FOP) は、ALK2 の遺伝的変異が見出された最初の疾患である。その後の研究で、脊椎の腱や靱帯が骨化するびまん性特発性骨増殖症 (diffuse idiopathic skeletal hyperostosis, DISH) 症例や小児の脳腫瘍であるびまん性橋膠腫 (diffuse intrinsic pontine glioma, DIPG) 症例でも、ALK2 変異体が見出されている。

FOP や DISH、DIPG 症例から見出されたヒト ALK2 変異は、全て ALK2 の細胞内領域のアミノ酸置換で、ALK2 のシグナル伝達の活性を亢進させる。

研究者の所属するグループを含め国内外で、ALK2 変異における骨系統疾患の発症機序解明や治療薬開発に関する研究が長年行われており、研究者の所属するグループは、FOP の変異 ALK2 の活性化機構の解析の過程で、マウスとヒトで高度に保存された 7 種類の ALK 受容体の中で、ALK2 だけがヒトとマウスで活性に差があることを見出した。

ALK2 の活性が、動物種により異なるという事実は、さまざまな病態モデルにおいても疾患を正確に反映していない可能性があり、疾患の解明や創薬の分野において各種検討を行う際にも留意しなければならないことを意味する。

そこで、高い相同性を持つヒトとマウスの ALK2 のアミノ酸配列の中で、異なる特定のアミノ酸残基による活性制御機構を解析することで、新たな ALK2 の活性化機構の一端を明らかにすることができるのではないかと考えた。

動物種の違いに由来する特定の 1 アミノ酸残基によって調整される ALK2 活性の分子メカニズムの解明により、ALK2 の種差による生理的役割の解析や、ALK2 の遺伝的変異に基づく複数の疾患研究への応用が期待できる。

2. 研究の目的

研究者の所属するグループでは、独自の解析結果から、ヒト ALK2 とマウス ALK2 の活性に差があることを見出した。ALK2 はヒトとマウスで高度に保存されているが、一部に異なるアミノ酸残基を持つ。

本研究ではヒト ALK2 とマウス ALK2 で異なるアミノ酸残基に着目し、特定のアミノ酸残基による ALK2 活性制御機構を解明することを目的とし、「マウス ALK2 とヒト ALK2 で異なる細胞内領域の特定の 1 アミノ酸残基を別のアミノ酸残基に置換した ALK2 変異体の活性比較」と「ヒト ALK2 受容体と特定の 1 アミノ酸残基をマウス型のアミノ酸に置換したマウス型変異体へのリガンド刺激による、細胞内シグナルの定量解析」について検討を行った。

3. 研究の方法

変異を導入する任意のプライマーを設計し、PCR による部位特異的変異導入法によって、マウス ALK2 とヒト ALK2 で異なる細胞内領域の特定のアミノ酸残基をコードする cDNA 配列と置換し、別のアミノ酸残基に置き換え、ALK2 変異体を構築した。

野生型 ALK2 と構築した ALK2 変異体を HEK293A 細胞に一過性に過剰発現させリガンドで刺激した。細胞内シグナルを BMP 特異的なルシフェラーゼレポーターで定量解析し、動物種の違いに由来する ALK2 活性に重要なアミノ酸残基を同定した。

また、特定のアミノ酸残基による BMP リガンドに対する反応性についても、ルシフェラーゼレポーターを用いた検討を行った。

ALK2変異体の作成 ➡ 細胞に一過性に過剰発現 ➡ リガンド刺激 ➡ 細胞内シグナルの定量解析

4. 研究成果

ヒトとマウスの ALK2 のアミノ酸配列は、高い相同性を持つ。マウスとヒトの ALK2 のアミノ酸配列の違いは、182 番目と 330 番目の 2 箇所のみである。

研究者の所属するグループは、各動物種における ALK2 のアミノ酸配列の比較と細胞内シグナルの定量解析から、ALK2 の 330 番目のアミノ酸残基が活性に重要である可能性を見出していた。330 番目のアミノ酸残基は、活性の高いマウス ALK2 ではセリンであるのに対し、活性の低いヒトではプロリンであった。

そこで、活性の低いヒト ALK2 の 330 番目のプロリン残基を他のアミノ酸残基に置換した変異体を構築した。野生型 ALK2 と構築した ALK2 変異体を HEK293A 細胞に一過性に過剰発現させリガンド刺激を与え、細胞内シグナル解析を行った。

その結果、マウス型のセリンや酸性アミノ酸であるアスパラギン酸やグルタミン酸をはじめとしたある種のアミノ酸残基に置換した変異体では ALK2 活性が亢進することが分かった。

以上のことから、ALK2 の 330 番目のアミノ酸残基が ALK2 活性に重要なアミノ酸残基である可能性が示唆された。

そこで、ヒト ALK2 と 330 番目のアミノ酸残基だけをマウス型のアミノ酸に置換したマウス型ヒト ALK2 変異体 (ヒト ALK2 P330S 変異体) を培養細胞に発現させ、複数の種類の BMP リガンドで刺激し、細胞内シグナルを定量解析した。

すると、ヒト ALK2 とヒト ALK2 P330S 変異体は、ある種の BMP リガンドに対して、異なる反応を示すことが判明した。

本研究から、動物種の違いに由来する特定の 1 アミノ酸残基によって、ALK2 の BMP リガンドに対する反応性が変化する可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------