

平成 30 年 5 月 9 日現在

機関番号：32682

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18558

研究課題名(和文) SOX9翻訳後修飾による骨格形成制御メカニズムの解析

研究課題名(英文) The analysis of the role of SOX9 post-translational modification in vertebrate skeletal development

研究代表者

乾 雅史 (Inui, Masafumi)

明治大学・農学部・専任講師

研究者番号：20643498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：SOX9は軟骨分化のマスター転写因子であり、正確な骨格形成にはその活性が定量的に厳密に制御されている必要があることが示されているが、そのためのメカニズムは十分解明されていない。本研究ではSOX9タンパク質の翻訳後修飾に着目し、SUMO化の標的アミノ酸であるK396に点変異を導入したマウスを複製・解析を行った。その結果、SOX9K396Rマウスは低身長・低体重であり骨格に異常が見られたことから、正確な骨格の形成にはSOX9K396に対する翻訳後修飾が重要であることが示唆された。また、SUMO化SOX9は野生型SOX9に対して抑制的に働くことが示され、今後はその詳細なメカニズムの解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：SOX9 is the master regulator of cartilage formation and its quantitatively precise activity is crucial for the reproducible skeletal development. In this study, we focused on the protein post-translational modification on SOX9, especially SUMOylation on K396, and generated the point mutation mouse carrying the K396R substitution and thus devoid of SUMOylation on this residue. SOX9K396R mouse showed reduced body weight and length with skeletal abnormality, which imply the importance of K396 SUMOylation on reproducible skeletal development. Molecularly, SUMO-SOX9 showed repressive activity on wild type SOX9. Further study will be necessary to identify the associating protein(s) that could account for this activity.

研究分野：発生生物学

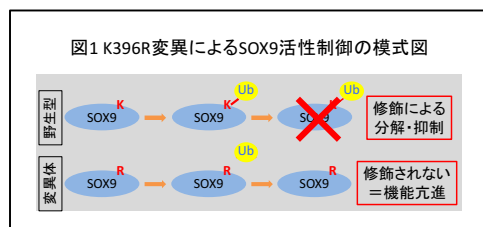
キーワード：SOX9 翻訳後修飾 軟骨 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

SOX9 は軟骨分化のマスター転写因子であり、発生中の胚の軟骨の前駆細胞に発現、多数の標的遺伝子を制御し、軟骨および硬骨の形成を導く。ヒトにおいて SOX9 遺伝子のハプロ不全は長管骨の屈曲などの骨格形成異常を伴う Campomelic Displasia の原因である (Foster et al. Nature 1994)。ヒトと同様に Sox9 遺伝子のヘテロ変異マウスでは骨格形成不全により出生後に致死となるが、SOX9 のタンパク質が 20%程度増加したマウスでも骨格異常が見られることから正常な骨格形成のために SOX9 の活性は定量的に厳密に制御されていないことを示されていた。実際にユビキチン化や SUMO 化などの翻訳後修飾を始め SOX9 の活性を制御するための多層的な制御機構が報告されていた。SOX9 の翻訳後修飾は培養細胞レベルでは SOX9 の機能に抑制的であると報告されていたが個体レベルでの役割は未解明であった。申請者はこれを解明するために CRISPR/Cas9 システムを用いて SOX9 の翻訳後修飾の標的アミノ酸に点変異を導入したモデルマウス (SOX9K396R マウス) を作製した。

2. 研究の目的

本研究は申請者が作成した SOX9K396R マウスを用い SOX9 のタンパク質翻訳後修飾が骨格形成に果たす役割を個体レベルで明らかにすることを目的とした。この SOX9K396R マウスではユビキチン化や SUMO 化の標的である SOX9 の 396 番目のリジン残基(K396)がアルギニン残基に置換されておりこれらの翻訳後修飾が起こらないため、骨形成過程における SOX9 翻訳後修飾の役割を可視化できると考えられ (図 1)、本研究はこの SOX9K396R マウスを用いて骨格形成における SOX9 のユビキチン化や SUMO 化の意義を明らかにすること、また培養細胞と生化学的解析を通じて SOX9 の翻訳後修飾による制御の分子メカニズムを明らかにすること、そしてこれらの解析を通じて複雑な骨格が正確に形成される過程を支えるメカニズムを明らかにすることを目的とした。



3. 研究の方法

(1) SOX9K396R マウスにおける骨格の表現型の組織学的評価

SOX9K396R のホモ変異マウス及び野生型マウスの 16.5 日胚前肢からパラフィンあるいは凍結切片を作成し、HE 染色、アルシアンブ

ルー染色、2 型あるいは 10 型コラーゲンの in situ hybridization 法によって軟骨の形態及び遺伝子発現を解析した。

SOX9K396R のホモ変異マウス及び野生型マウスの 12 ヶ月齢雄の全身及び後肢をサンプリングし、マイクロ CT 撮影を行い成体の骨格を観察した。

(2) SOX9K396R マウス軟骨細胞・胚芽間葉細胞を用いた遺伝子発現解析

SOX9K396R のホモ変異マウス及び野生型マウスの 12.5 日胚前肢から間葉系細胞を単離し、マイクロマスカルチャー法により in vitro で軟骨・硬骨分化を誘導した後にアルシアンブルー染色、アリザリンレッド染色、qPCR 解析により軟骨・硬骨分化の度合いやその過程で発言するマーカー遺伝子の発現量を評価した。

(3) 野生型 SOX9 及び SUMO 融合型 SOX9 を用いた SUMO 化 SOX9 の機能解析及び生化学的解析

HEK293T 細胞及び C3H10T1/2 細胞に SOX9 及び SUMO を導入し、SOX9 タンパク質を免疫沈降あるいはオリゴ DNA によるプルダウンをして SOX9 の SUMO 化状態を生化学的に評価した。また、C 末端に SUMO を融合させた SOX9 コンストラクトを作成し、293T 細胞に発現させたのちに DNA 結合能を評価した。

野生型 SOX9 及び SUMO 融合型 SOX9 を HEK293T 細胞、C3H10T1/2 細胞及び軟骨細胞へ導入し、ルシフェラーゼレポーター、SOX9 の標的遺伝子の発現の変化を観察した。

(4) SUMO 化 SOX9 結合タンパク質の解析

HEK293T 細胞に野生型 SOX9 及び SUMO 融合型 SOX9 を発現させ、それぞれを免疫沈降したのちに特異的に共沈降してくる結合タンパク質を SDS-PAGE 後に銀染色及び CBB 染色で同定した。

4. 研究成果

(1) SOX9K396R マウスにおける骨格の表現型の組織学的評価

SOX9K396R マウスでは 16.5 日胚の長管骨における内軟骨性骨化が遅延し、野生型では開始している骨芽細胞の進入が見られなかった。一方でアルシアンブルー陽性の軟骨組織の構造には大きな変化はなく、コラーゲン 2 型や 10 型の発現から推定される肥大化軟骨層の厚さには顕著な差は見られなかった。

成体においては SOX9K396R マウスの長管骨は野生型と比較して太くまた筋腱付着部や種子骨等の構造が肥大化していること、仙骨の融合が促進されていることが観察された。

(2) SOX9K396R マウス軟骨細胞・胚芽間葉細胞を用いた遺伝子発現解析

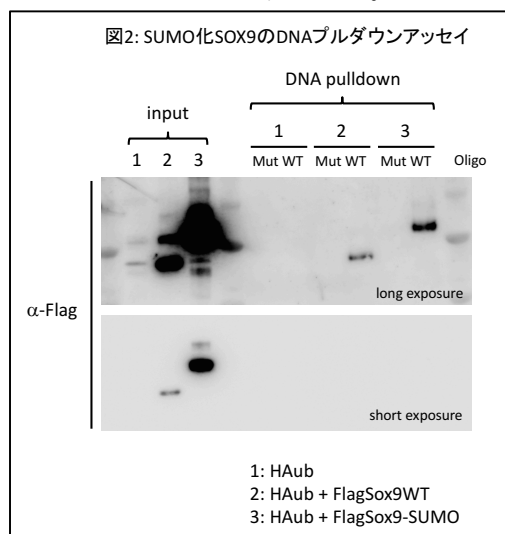
マイクロマスカルチャーの結果、SOX9K396R マウスの間葉系細胞は野生型と比較して有意に軟骨分化が促進した (アルシアンブルー染

色が亢進した) 一方で骨芽細胞分化には大きな影響は見られなかった。同様に軟骨分化時に発現が見られる 2 型コラーゲンやアグリカンなどの発現が亢進していた一方で骨芽細胞マーカー遺伝子の発現には変化がなく、これらの結果は SOX9K396R 変異によって間葉系細胞は軟骨のアイデンティティが促進された状態であることが示唆され、これが内軟骨性骨化遅延の原因であると考えられる。

(3) 野生型 SOX9 及び SUMO 融合型 SOX9 を用いた SUMO 化 SOX9 の機能解析及び生化学的解析 293T 及び 10T1/2 細胞において SOX9 の SUMO 化を変化させる条件を探索したところ、BMP 刺激によって SUMO 化が促進する可能性が示唆された。

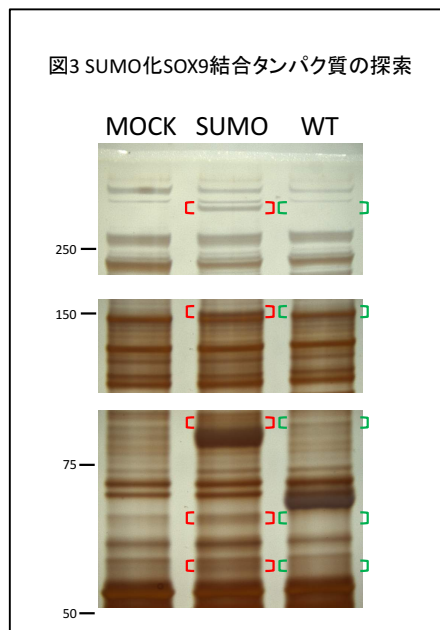
2 型コラーゲンのエンハンサーに存在する SOX9 結合配列を用いた DNA プルダウンアッセイの結果、野生型 SOX9 及び SUMO 融合型 SOX9 は同程度 DNA に結合したことから、SOX9 の SUMO 化は DNA への結合に関与しないことが示唆された (図 2)。

SOX9 応答配列ルシフェラーゼレポーターに対する活性の解析から SUMO 化 SOX9 は野生型 SOX9 によるレポーターの活性化を抑制することが示された。同様に軟骨細胞に過剰発現することで SOX9 の標的遺伝子の発現が抑制されたことから SUMO 化 SOX9 は何らかのメカニズムで野生型 SOX9 の機能を積極的に抑制する活性があることが示唆された。



(4) SUMO 化 SOX9 結合タンパク質の解析

免疫沈降・SDS-PAGE・銀染色の結果、複数のバンドが SUMO 化 SOX9 と特異的に共沈降していることが確認された (図 3)。これらの結果から SOX9 は SUMO 化されることで新たな結合パートナーを獲得し、これらのパートナーを介して野生型の SOX9 の活性を抑制しているものと考えられる。今後は質量分析やウェスタンブロットによってこれらのバンドを構成するタンパク質を同定し、SOX9 の機能制御や軟骨分化におけるその役割を解析していく。



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 3 件)

(1) Inui M, Tamano M, Kato T, Takada S. CRISPR/Cas9-mediated simultaneous knockout of Dmrt1 and Dmrt3 does not recapitulate the 46, XY gonadal dysgenesis observed in 9p24.3 deletion patients. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2017 9:238-244 査読あり

(2) Asahara H, Inui M, Lotz MK. Tendons and Ligaments: Connecting Developmental Biology to Musculoskeletal Disease Pathogenesis. *Journal of bone and mineral research* 2017 32(9):1773-1782 査読あり

(3) Inui M, Mokuda S, Sato T, Tamano M, Takada S, Asahara H. Dissecting the roles of miR-140 and its host gene. *Nature Cell Biology* 2018 20:516-518 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

(1) 乾雅史「ゲノム編集による疾患モデルマウスの作製と解析」第 69 回日本生物工学会大会 (2017)

(2) 乾雅史「CRISPR/Cas9 mediated amino acid substitution revealed the role of SOX9 post-translational modification in skeletal development」2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 (2017)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

乾 雅史 (INUI, Masafumi)

明治大学農学部生命科学科動物再生システム学研究室・専任講師
研究者番号：20643498