

令和 7 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02948

研究課題名(和文)新規シグナル伝達系・NELL-Roboシグナルの骨形成における作用機序の解明

研究課題名(英文)Functional analysis of a novel NELL-Robo signaling system in osteogenesis

研究代表者

新美 友章(Niimi, Tomoaki)

名古屋大学・生命農学研究科・講師

研究者番号：30377791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト頭蓋骨縫合早期癒合症の骨癒合部に高発現する遺伝子として同定されたNELL1は、その骨形成能に基づいて骨再生治療への応用が進展しているが、その分子機構は不明な点が多い。本研究では、NELL1とその新奇受容体であるRobo2が酸性でのみ結合する特性に注目し、NELL-Robo複合体のシグナル伝達機構の解明に取り組んだ。その結果、NELL1/2ファミリーとRobo1/2/3ファミリーがpH依存的に結合することを明らかにし、pHによるシグナル伝達制御機構が存在することを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨再生療法への応用を目指して、骨形成能を有するNELL1タンパク質のシグナル伝達機構の解明に取り組み、NELLファミリーリガンドとその新奇受容体であるRoboファミリーのpH依存的な複合体形成のメカニズムを発見した。このことは細胞外pHの変動によるシグナル伝達制御機構が存在することを示唆しており、NELLおよびRoboファミリータンパク質がともに発現している組織や器官においては、細胞外pHの制御が疾患の治療や創薬のターゲットとなり得ることを示している。

研究成果の概要(英文)：The NELL1 gene was originally identified in craniosynostosis patients as being specifically upregulated within prematurely fusing sutures. Because of its potent osteoinductive activity, NELL1 protein may be useful for bone regeneration therapy. However, there is little knowledge regarding NELL1-mediated signaling pathways. In this study, we focused on the property that NELL1 and its novel receptor, ROB02, bind only in acidic conditions to elucidate the signaling mechanism of the NELL-ROBO complex. The results revealed that the NELL1/2 and ROB01/2/3 families bind in a pH-dependent manner, suggesting the existence of a pH-dependent signal transduction regulatory mechanism.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：軸索誘導因子 シグナル伝達

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

事故や疾病により生じた組織欠損の治療法として、成長因子を適当なキャリアおよび標的細胞と組み合わせて組織を再生するティッシュ・エンジニアリングの手法が急速に進展している。骨再生治療において、骨形成タンパク質 BMP (bone morphogenetic protein) は単独で異所性の骨形成を誘導する唯一のサイトカインとして知られており、BMP-2 等を主成分とする骨再生・欠損修復剤が米国や欧州で臨床使用されているが、BMP は様々な臓器の発生にも関与するため、投与部位に炎症を惹起するなど多くの合併症が報告されている。そのため、他の成長因子による代替利用が試みられているが、期待する骨形成効果は得られていない。

ヒト頭蓋骨縫合早期癒合症 (Craniosynostosis) 患者の骨癒合部で高発現している遺伝子として単離された *NELL1* は、種々の動物実験において骨形成を促進することが示され、BMP を投与したときのような炎症を惹起しないことから、新しい骨誘導因子として注目を集めている。しかし、*NELL1* の骨形成作用を説明できる特異的な受容体は不明であり、骨形成を誘導するシグナル伝達機構の詳細は明らかになっていなかったため、本研究の前段の研究として、*NELL1* の受容体を探索した結果、Robo 受容体ファミリーに属する Robo2 と酸性条件下でのみ特異的に結合することを見出した。生体内では組織レベルでも pH は中性付近で一定に維持されているが、骨組織では破骨細胞の骨吸収における酸性環境や、骨折時の炎症期における pH 低下が知られている。このような環境下において *NELL1* と Robo2 の結合が可能となり、下流のシグナル分子が活性化されるのではないかと考えられ、これらの仮説の検証が次の課題として残された。

### 2. 研究の目的

前段の研究で残された課題を解決するために、*NELL1* と Robo2 の結合を起点としたシグナル伝達系を *NELL-Robo* シグナルと命名し、骨組織形成における *NELL-Robo* シグナルの役割を明らかにすることによって、*NELL1* を利用した骨再生治療の基盤研究を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

最初に、酸性環境で *NELL1* と Robo2 が結合する仕組みの解明に取り組んだ。その研究方法として、1) *NELL1* および Robo2 の変異体を用いた結合実験、2) 蛍光共鳴エネルギー移動: Förster resonance energy transfer (FRET) の変化を指標にした Robo2 細胞外ドメインの構造解析、3) 酸性条件における Robo2 細胞外ドメインの X 線結晶構造解析等を実施した。

続いて、培養細胞系を用いて *NELL1* と Robo2 の相互作用に起因するシグナル伝達系の解明に取り組んだ。その研究方法として、1) 前駆骨芽細胞株 MC3T3-E1 の酸性条件培養法の確立、2) 酸性条件で培養した MC3T3-E1 細胞に対する *NELL1* の効果の検討、3) *NELL1-Robo2* シグナルの下流のシグナル因子の同定を行った。

最後に、*NELL-Robo* シグナルの範囲を拡大して、*NELL2-Robo3* 複合体の pH 依存的な結合制御機構の解明にも取り組んだ。

### 4. 研究成果

(1) 酸性環境で *NELL1* と Robo2 が結合する仕組みとして、前段の研究から Robo2 の細胞外ドメインのコンフォメーションが pH により変化することが予想されていたため、おもに Robo2 の細胞外ドメインの欠失変異体を用いた結合実験を行うことにより、中性では Robo2 の細胞外ドメインが湾曲して *NELL1* との結合部位をマスクしているが、酸性では *NELL1* の結合部位が露出することを明らかにした (図 1)。また、pH 変化に伴う Robo2 の細胞外ドメインのコンフォメ

ーション変化を観察するために、細胞外ドメインの両端にドナーおよびアクセプター蛍光タンパク質をそれぞれ融合して FRET 実験を行い、酸性環境における Robo2 の細胞外ドメインの推定構造をモニタリングすることに成功した。すなわち、pH 変化に伴って、Robo2 の細胞外ドメインの湾曲度合いが少しずつ変化していくことが FRET 観察により示された (図 2)。さらに、NELL1 との結合親和性が異なる Robo2 の選択的スプライシングアイソフォームのコンフォメーション解析にも成功した。これらの結果は、酸性環境における NELL-Robo シグナルの役割の解明の一助となる。一方、Robo2 細胞外ドメインの酸性条件における立体構造を得るための X 線結晶構造解析は、タンパク質の結晶化に成功せず実施できなかった。

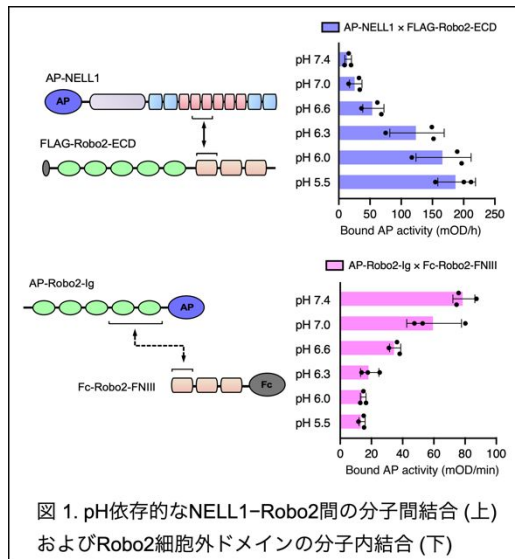


図 1. pH 依存的な NELL1-Robo2 間の分子間結合 (上) および Robo2 細胞外ドメインの分子内結合 (下)

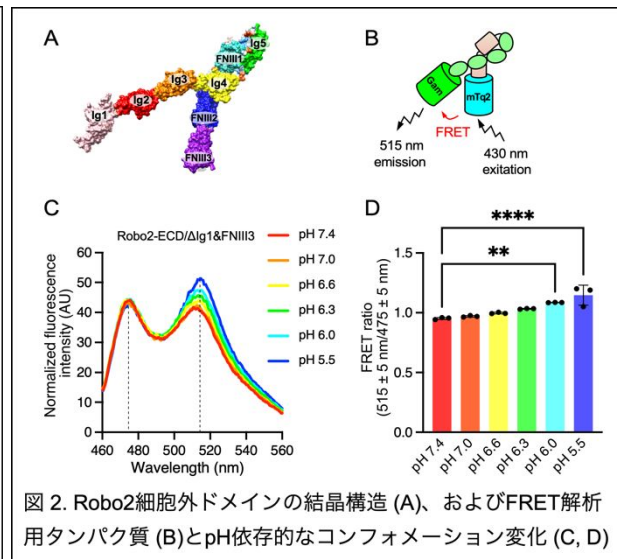


図 2. Robo2 細胞外ドメインの結晶構造 (A)、および FRET 解析用タンパク質 (B) と pH 依存的なコンフォメーション変化 (C, D)

(2) NELL1 は酸性条件で Robo2 に結合するため、骨芽細胞の培養系で NELL1 の機能を評価するために、細胞の酸性条件培養法を確立した。細胞は培地の pH 低下に弱いため、培地に添加する重炭酸ナトリウム濃度と添加時間、培養時間経過に伴う pH 変化、生細胞数などを計測して培養条件を決定した。細胞の遊走能を評価するスクラッチアッセイを行ったが、NELL1 添加による効果は見られなかった。NELL1-Robo2 シグナルの下流のシグナル因子を同定するために、種々のリン酸化タンパク質や低分子量 G タンパク質の活性化を調べたが、変化は見られなかった。

(3) NELL1-Robo2 複合体の解析と並行して行った実験により、NELL2-Robo3 複合体においても pH 依存的に結合親和性が上昇することを発見した。NELL1 および NELL2 からなる NELL ファミリーリガンドの Robo 受容体に対する結合特性は同等であるが、Robo2 と Robo3 の NELL リガンドに対する結合特性は細胞外ドメインの構造が異なるため、同等ではない。NELL2-Robo3 複合体の pH 依存的な結合親和性は、NELL1-Robo2 複合体で見られるようなコンフォメーション変化が原因ではなく、NELL2 との結合部位付近にある Robo3 のグルタミン残基のプロトン化が新たな水素結合形成に関与することを証明した (図 3)。この結果は、NELL2-Robo3 複合体形成に起因するシグナル伝達も細胞外 pH によって制御されることを示唆する。さらに、NELL ファミリーリガンドと Robo 受容体ファミリー間の多くの組み合わせにおいても、その制御機構が適用されることが想定されるため、細胞外 pH によるシグナル伝達制御機構はより多くの組織や器官にも存在することになり、そのインパクトは大きい。

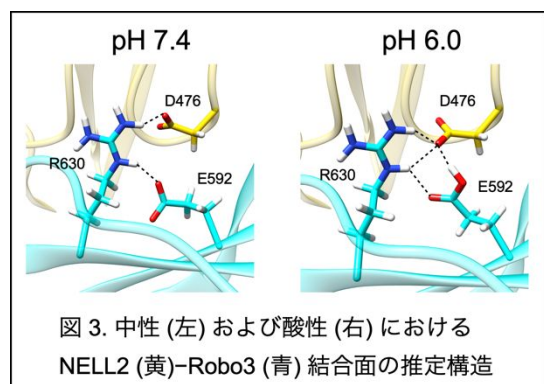


図 3. 中性 (左) および酸性 (右) における NELL2 (黄)-Robo3 (青) 結合面の推定構造

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mizutani Kimihiko, Toyoda Mayuko, Ojima Kato Teruyo, Maturana Andres D., Niimi Tomoaki	4. 巻 599
2. 論文標題 Glu592 of the axon guidance receptor ROBO3 mediates a pH dependent interaction with NELL2 ligand	5. 発行年 2025年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 571 ~ 580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.15054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Miyaguchi Masaki, Nakanishi Yoichi, Maturana Andres D., Mizutani Kimihiko, Niimi Tomoaki	4. 巻 434
2. 論文標題 Conformational Change of the Hairpin-like-structured Robo2 Ectodomain Allows NELL1/2 Binding	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 167777 ~ 167777
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2022.167777	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 新美友章	4. 巻 4
2. 論文標題 骨形成を促進する新奇因子NELL1の骨誘導分子基盤の解明	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 884-886
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tomoaki Niimi	4. 巻 21
2. 論文標題 Roles of Slit Ligands and Their Roundabout (Robo) Family of Receptors in Bone Remodeling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Adv. Exp. Med. Biol.	6. 最初と最後の頁 143-154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/5584_2020_586.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 新美友章	4. 巻 47
2. 論文標題 骨形成を促進する新奇因子NELL1の骨誘導分子基盤の解明	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 106-107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮口昌樹、中西洋一、新美友章
2. 発表標題 骨分化誘導タンパク質NELL1の新奇受容体候補Robo2の構造特性解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔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
研究 分 担 者	水谷 公彦  (Mizutani Kimihiko)  (40314281)	京都大学・農学研究科・助教   (14301)	

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
---------	---------