

機関番号：17601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790184

研究課題名（和文）軟骨形成における小胞体ストレスセンサーBBF2H7 の生体内機能解析

研究課題名（英文） Physiological function of ER stress transducer BBF2H7 in chondrogenesis.

研究代表者

日野 真一郎（SHINICHIRO HINO）

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：00372699

研究成果の概要（和文）：小胞体ストレスセンサーBBF2H7 の生体内の機能を明らかにするために、BBF2H7 遺伝子欠損マウスを作製した。この BBF2H7 遺伝子欠損マウスは軟骨形成異常を呈した。我々は、小胞体 ゴルジ間輸送に関わる COP11 コンポーネントの Sec23a が BBF2H7 の標的遺伝子であることを見出した。BBF2H7 欠損軟骨細胞に Sec23a を発現させると、軟骨基質タンパク質の輸送や分泌の障害が回復した。すなわち、BBF2H7-Sec23a 経路はタンパク質の分泌を活性化させることで軟骨形成に重要な役割を担う。

研究成果の概要（英文）：To assess the function of ER stress transducer BBF2H7 *in vivo*, we generated *BBF2H7* deficient mice. The mice exhibited severe chondrodysplasia. We identified Sec23a, a coat protein complex II component responsible for protein transport from the ER to the Golgi, as a target of BBF2H7. When Sec23a was introduced to *BBF2H7* deficient chondrocytes, the impaired transport and secretion of cartilage matrix proteins were totally restored, indicating that the BBF2H7-Sec23a pathway plays crucial roles in chondrogenesis by the activation of protein secretion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：細胞分化、組織形成

1. 研究開始当初の背景

(1)軟骨細胞はコラーゲンやプロテオグリカンなどの細胞外マトリックスを活発に分泌し、マトリックスなどで構成される軟骨小腔内で軟骨細胞は増殖や分化を行っている。これまでに、II 型コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスの遺伝子変異が多くの骨系統疾患から見出され、細胞外マトリックスの形成と軟骨分化が疾患発症に深く関わる

ことが明らかになってきている。

(2)小胞体はタンパク質の品質管理を行い、正しい立体構造をもつタンパク質だけを分泌経路に送り出す小器官である。分泌タンパク質あるいは膜結合型タンパク質は小胞体内で様々な修飾を受け正しい立体構造となるが、時として（正常な状態でも）一部がミスフォールドタンパク質になることが知ら

れている。細胞はこの異常タンパク質に対し、タンパク質の翻訳を抑制するシステム、分子シャペロンを介したタンパク質を再び折りたたむシステム、プロテアソーム分解系を調節するシステムを小胞体ストレス応答機構として活性化。この応答の発動には、小胞体膜上に存在する小胞体ストレスセンサーを必要とする。

(3)II型コラーゲンは軟骨細胞の小胞体内で3本鎖の立体構造を形成し分泌経路に送り出されるが、その3本鎖形成に必須な特異的分子シャペロン、異常タンパク質の分解システムや再折りたたみシステム、さらには小胞体からの分泌経路のこれらの詳細は全く解明されていない。本研究では小胞体でのタンパク質の品質管理という視点から小胞体ストレスセンサーBBF2H7欠損マウスの軟骨形成異常を解析した。

2. 研究の目的

ミスフォールドタンパク質(折りたたみの異常なタンパク質)が細胞内に蓄積すると、タンパク質品質管理に異常を来し小胞体の機能障害(小胞体ストレス)が引き起こされ、様々な疾患の発症につながる。申請者が同定した小胞体ストレスセンサーBBF2H7を欠損した遺伝子改変マウスでは著明な軟骨の形成異常がみられた。本研究の目的は、BBF2H7欠損マウスの軟骨形成異常メカニズムを解明することで軟骨細胞が持つ特別な仕組みを解析し、軟骨分化・軟骨形成におけるタンパク質品質管理の役割を明らかにすることにある。

3. 研究の方法

(1)BBF2H7遺伝子欠損マウスの病理組織学的解析:免疫染色により細胞外マトリックス構成因子(II型コラーゲン,IX型コラーゲン、X型コラーゲン、アグリカン,スロンポスポンジン5(COMP))のタンパク質量や局在の変化を観察した。in situ hybridization法により、細胞外マトリックス構成因子および軟骨細胞の分化マーカーとなる分子(Sox9, Ihh, Runx2, PTH/PTHrP, X型コラーゲン)のmRNA発現レベルと局在を解析した。

(2)BBF2H7ターゲット遺伝子の探索:DNAジーンチップ解析(マイクロアレイ解析)によりBBF2H7欠損および野生型軟骨細胞の遺伝子発現を比較しBBF2H7が転写誘導する遺伝子の同定を行った。

(3)BBF2H7欠損軟骨細胞の小胞体ストレス応答の変化:BBF2H7欠損の軟骨細胞が小胞体ストレス状態になっているかを分子レベルで

解析した。軟骨細胞に小胞体ストレス誘導剤を添加し、小胞体ストレスに応答する分子の挙動に変化があるか否かを検討した。抽出したRNAやタンパク質サンプルに対し、RT-PCR、ノーザンブロット、ウエスタンブロットを行い、BBF2H7が欠損したことで起こるストレス応答の変化と軟骨基質分泌異常との関連性を解析した。

(4)酵母two-hybrid法を用いBBF2H7に結合する分子のスクリーニングを行った。

(5)小胞体関連分解に関わるユビキチンライゲース(E3)に対しsiRNAを用いて網羅的にノックダウンを行い、BBF2H7の安定性に関わる分子の同定を行った。

(6)HRD1ユビキチンライゲース(E3)の欠損MEF細胞を用いて、BBF2H7のタンパク質の安定性を解析した。

4. 研究成果

(1)BBF2H7遺伝子欠損マウスは、四肢および体幹の著明な短縮や胸郭の形成不全を示し、出生直後に呼吸不全のため死亡する。病理組織学的観察により、軟骨基質の著明な減少、成長軟骨の増殖層および肥大層の発達不全、および軟骨細胞の小胞体異常拡張が観察された。この軟骨形成異常のメカニズムを明らかにするために、野生型およびBBF2H7欠損軟骨組織を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、小胞体ゴルジ間輸送に関わるSec23aの発現がBBF2H7遺伝子欠損マウスで著明に減少していた。小胞輸送に焦点をあて解析を実施したところ、BBF2H7欠損軟骨細胞ではCOP11小胞の形成抑制のため、II型コラーゲンなどの軟骨基質タンパク質の小胞輸送が障害されていた。この現象はBBF2H7あるいはSec23aの強制発現によりレスキューされた。軟骨細胞は軟骨基質を大量に産生分泌する細胞であり、小胞体に常に過剰な負荷がかかる。BBF2H7はこの小胞体負荷に対して小胞体ゴルジ間輸送系をSec23aの転写を介して活性化させることでタンパク質の効率的な分泌に寄与しているものと考えられた。

(2)軟骨細胞が分化・成熟する際に生じる小胞体ストレスをBBF2H7が感知していることを新規に見出した。しかしながら、どのようなメカニズムでBBF2H7が活性化するかは不明なままであった。このBBF2H7の活性化機構を明らかにする目的でBBF2H7に結合する分子の探索を行ったところ、BBF2H7の活性化にプロテアソーム分解に関わる可能性を示す結果を得た。プロテアソーム阻害剤で細胞

を処理したところ、小胞体ストレスがない状態でも BBF2H7 のタンパク量が著しく増加した。すなわち、BBF2H7 は通常ユビキチン-プロテアソーム系により分解を受け非常に不安定であることが明らかとなった。BBF2H7 を分解する過程で作用するユビキチンライゲース(E3)を網羅的に探索したところ、小胞体膜上に存在する HRD1 を同定することに成功した。HRD1 が欠損する MEF 細胞を用いて BBF2H7 のタンパク質量を解析した結果、野生型 MEF 細胞に比べ HRD1 欠損 MEF 細胞では著しく BBF2H7 のタンパク質量が増えていた。BBF2H7 は HRD1 と細胞内で複合体を形成しているが、小胞体ストレス時には BBF2H7 と HRD1 の結合が抑制されることがわかった。これらのことから、HRD1 が BBF2H7 の特異的ユビキチンライゲースとして働き、小胞体ストレス時の BBF2H7 の安定性と活性化を制御していることが示唆された。本研究の意義は、タンパク質分解という視点から小胞体ストレスセンサーの活性化メカニズムを解明したことにある。このようなアプローチはこれまでに行われていない。本研究のようなアプローチにより軟骨形成メカニズムがさらに解明できれば、種々の軟骨疾患の治療法に応用できる可能性が高い。

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)

Murakami T, Hino S-I, Nishimura R, Yoneda T, Wanaka A, Imaizumi K.: Distinct mechanisms are responsible for osteopenia and growth retardation in OASIS-deficient mice. *Bone*, 48(3):514-523, 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* 28(4):384-394, 2010

Hino S-I, Kondo S, Yoshinaga K, Saito A, Murakami T, Kanemoto S, Sekiya H, Chihara K, Aikawa Y, Hara H, Kudo T, Sekimoto T, Funamoto T, Chosa E, and Imaizumi K.: Regulation of ER molecular chaperone prevents bone loss in a murine model for osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 28(2):131-138, 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* 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* 11(10):1197-1204, 2009. (The first two authors are contributed equally to this work)

Chihara K, Saito A, Murakami T, Hino S-I, Aoki Y, Sekiya H, Aikawa Y, Wanaka A, and Imaizumi K.: Increased vulnerability of hippocampal pyramidal neurons to the toxicity of kainic acid in OASIS-deficient mice. *Journal of Neurochemistry* 110(3): 956-965, 2009.

[学会発表](計8件)

日野真一郎、今泉和則：小胞体ストレスセンサーOASISファミリーの生体内機能と活性化制御機能。日本解剖学会第66回九州支部学術集会。2010, 10, 9, 福岡。

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。

齋藤敦, 日野真一郎, 西村理行, 米田俊之, 古市達哉, 池川志郎, 今泉和則.: Regulation of ER stress response by BBF2H7/Sec23a pathway is essential for chondrogenesis. The 26th Naito Conference on Osteobiology. 2009, 11, 4-7, Awaji.

津曲健志、齋藤敦、日野真一郎、西村理行、米田俊之、古市達哉、池川志郎、今泉和則：軟骨形成における小胞体ストレス応答の役割。第82回日本生化学会大会。2009, 10, 21-24, 神戸。

日野真一郎、齋藤敦、西村理行、米田俊之、池川志郎、今泉和則.: The roles of ER stress transducer BBF2H7 in chondrogenesis. The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 31st Annual Meeting.

2009, 9, 11-15, Denver, Colorado, USA.

津曲健志、齋藤敦、日野真一郎、西村理行、米田俊之、古市達哉、池川志郎、今泉和則：小胞体ストレスセンサーBBF2H7 の生体内機能。第 33 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム。2009, 9, 10-12, 唐津。

齋藤敦、日野真一郎、西村理行、米田俊之、古市達哉、今泉和則：小胞体ストレス応答と軟骨形成。第 27 回日本骨代謝学会学術集会。2009, 7, 23-25, 大阪。

齋藤敦、日野真一郎、西村理行、米田俊之、古市達哉、池川志郎、今泉和則：軟骨形成における小胞体ストレスセンサーBBF2H7 の役割。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。

〔図書〕(計 0 件)

〔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 1 件)

名称：軟骨疾患のモデル非ヒト動物
発明者：今泉和則、日野真一郎
権利者：今泉和則、日野真一郎
種類：特許
番号：特開 2009-131169
取得年月日：2009 年 6 月 18 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/anatomy>
1/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日野 真一郎 (SHINICHIRO HINO)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号：00372699

(2) 研究分担者

研究者番号

(3) 連携研究者

研究者番号