

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010~2011

課題番号：22791363

研究課題名(和文) STAT1の機能解明を軸としたFGFによる骨格形成制御の分子機構の解析

研究課題名(英文) Functional analysis of STAT1 to elucidate molecular mechanisms regulating skeletal development by FGF

研究代表者

宮岡 佑一郎(MIYAOKA YUICHIRO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：20549521

研究成果の概要(和文)：細胞から分泌されて情報を伝達する蛋白質であるFGFは、骨格形成に必須の役割を果たす。FGFを受け取った細胞は主にERKとSTAT1という蛋白質を介して、その情報を細胞の中へと伝達する。FGFとSTAT1の遺伝子をそれぞれ欠損したマウスを交配することにより、STAT1が特に下顎の骨の形成に重要であることが示唆された。また、Cfrという蛋白質の細胞内での局在が、FGFが情報を伝達する上で重要であることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：FGF, which is a family of proteins secreted from cells to convey cellular information, plays a indispensable role in skeletal development. Cells that received FGF transmit its information into the cells mainly through two proteins, ERK and STAT1. Crossing of mice genetically lacking either FGF or STAT1 demonstrated a possibility that STAT1 is important for formation of the skeletons of the lower jaw. In addition, I revealed that intracellular distribution of a protein, Cfr, is important for signal transduction by FGF.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：骨・軟骨代謝学、骨格形成、骨形成、FGF、STAT1

1. 研究開始当初の背景

(1) FGFシグナルは骨格形成に必須の役割を果たしていることが知られている。FGFの下流では主にSTAT1とERKがシグナルを伝達している。しかし、Stat1ノックアウト(KO)マウスには顕著な骨格形成異常は認められないなど、ERKに比較してSTAT1の果たす役割には未知な点が多かった。

(2) 我々はFGFに結合するCfrという膜蛋白質が、FGF受容体を介したシグナル伝達を増強していることを既に明らかにしていた。しかし、興味深いことにCfrはゴルジ体蛋白質であるという報告もあった。また、FGF受容体がゴルジ体や小胞体などで異所的に活性を持つと、ERKよりもSTAT1を強く活性化するという報告もあった。したがって、Cfrの細胞内局在が重要な意義を持つことが予想された。

2. 研究の目的

(1) ヒトおよびマウスにおいて FGFR の変異により恒常的に STAT1 が活性化されると、骨格形成異常を生じる。しかしこのような病態時とは対照的に、Stat1 KO マウスには顕著な骨格形成異常は認められず、正常な骨格形成における STAT1 の役割は明らかになっていない。本研究ではこの点に着目し、STAT1 に特異的な役割の解明を中心として FGF シグナルによる骨格形成制御の分子機構のより詳細な知見を得ることを1つの目的とした。

(2) FGFR の変異により恒常的に STAT1 が活性化される状況においては、変異を持つ FGFR がゴルジ体や小胞体に局在することが観察されている。したがって、Cfr が細胞内のどの部位に局在し、FGF シグナルに関与するかが STAT1 の活性に大きく影響することが予想された。そこで、Cfr の細胞内局在が FGF シグナルに与える影響、および Cfr の細胞内局在を制御する機構を明らかにすることを1つの目的とした。

3. 研究の方法

(1) Stat1 KO マウスで骨格形成に異常が認められない原因として、FGF シグナルの下流で STAT1 と共に活性化される ERK1/2 が STAT1 の機能を補償している可能性がある。この ERK1/2 による機能補償を低減させ、STAT1 の正常な骨格形成における役割を明らかにするために、主に Fgf18 KO マウスと Stat1 KO マウスの交配を行い、二重変異体の表現型を観察した。FGF18 は骨格形成において中心的な役割を担う FGF であり、Fgf18 KO マウスは顕著な骨格形成異常を示す。Fgf18 KO マウスでは、STAT1 と ERK1/2 の活性がともに減少していると考えられる。その上で STAT1 を欠損させれば、低い ERK1/2 の活性のもとで STAT1 特異的な役割を明らかにすることができると考えられた。具体的には、胎生期のさまざまな時点での骨格の形態を観察した。

(2) ①Cfr の細胞内局在を制御する機構を探るために、種々の Cfr の変異体を作製した。これらの変異体を Ba/F3 細胞株に発現させ、その細胞内局在、蛋白質量、mRNA 量、FGF18 シグナルへの影響を、それぞれ蛍光免疫染色、ウェスタンブロット解析、ノザンブロット解析、WST-1 アッセイにより検討した。

②Cfr と STAT1 の機能的関連を検討するために、Cfr KO マウスと Stat1 KO マウスの交配を行い、Cfr と Stat1 の間に遺伝的相互作用が存在するかを解析した。

4. 研究成果

(1) Fgf18+/-マウスと Stat1+/-マウスを交

配し、Fgf18+/-;Stat1+/-ダブルヘテロマウスを得た。ダブルヘテロマウスに異常は認められなかった。

次にダブルヘテロマウスどうしを合わせて様々な遺伝型のマウスを得た。その結果、Fgf18 KO;Stat1+/-マウス、Fgf18 KO;Stat1 KO ダブル KO マウスは共に Fgf18 KO マウスと同様に出生前後に死亡することが明らかとなった。

胎齢 18.5 日目の Fgf18 KO;Stat1+/-マウスとダブル KO マウスの一部に、下顎骨の形成が著しく阻害されている個体が観察された(図1)。このような表現型は Fgf18 単独 KO マウスでは全く観察されないことから、STAT1 が下顎骨の発生に特異的な機能を持つことが示唆された。STAT1 の正常な骨格形成における明確な役割の報告は世界でも初めてであり、FGF シグナルによる骨格形成制御の分子機構を理解する上で非常に重要な知見である。また、FGF シグナルに関連する遺伝子の変異は様々なヒトの遺伝病の原因であることから、これらの病気の発症の機構を明らかにしていく手がかりともなる。

今後は、この異常が発生のどの段階で起き始めるのか、どのような細胞種に影響を与えてこのような表現型になるのかといった、より詳細な解析をしていくことが必要となる。また、現在までのところこの表現型にはばらつきがあり、その原因がマウスの遺伝的背景にあるのか、もしくは異なる要因があるのかを明確にすることも今後の課題である。

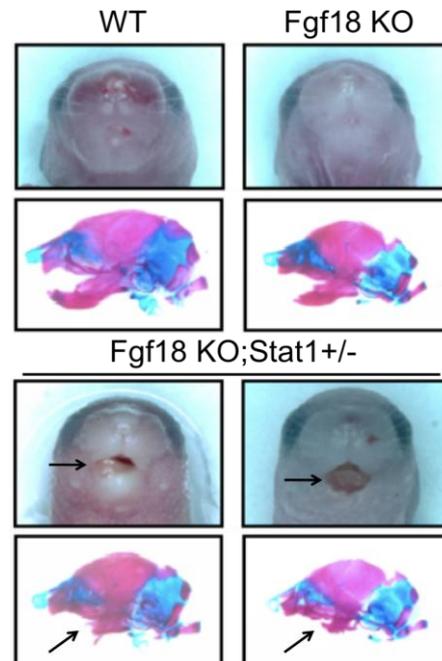


図1. Fgf18 KO;Stat1+/-新生児マウス
各遺伝型の上段は顔面の写真、下段は硬骨と軟骨をそれぞれ赤色と青色に染色した写真。ダブル KO マウスでも類似した表現型が観察された。

(2) ①様々な Cfr の変異体を作製し(図 2)、その Ba/F3 細胞における細胞内局在を観察した。野生型の FLAG-Cfr がゴルジ体に強く局在したのに対し、FLAG-Cfr Δ 1169 や FLAG-Cfr-GPI はゴルジ体には局在せず、細胞表面に局在したことから Cfr の C 末端が Cfr のゴルジ体への局在に必要であることが明らかとなった(図 3)。しかし、FLAG-Cfr Δ 1169 や FLAG-Cfr-GPI の蛋白質は非常に不安定であった(図 4)。

Cfr repeat と呼ばれる繰り返し配列を 4 つ欠いた FLAG-Cfr Δ 13-16-GPI は FLAG-Cfr-GPI より安定であったため、この領域が Cfr の不安定化に関与していることが示された。さらに、FLAG-Cfr Δ 13-15-GPI、FLAG-Cfr Δ 16-GPI の安定性を検討したところ、Cfr repeat の数が少ないほど安定性が高まることが明らかとなり、Cfr repeat が Cfr の安定性に関与していることが示された。

次に、Cfr の細胞内局在と FGF シグナルとの関連を検討するために、野生型の FLAG-Cfr と FLAG-Cfr-GPI をそれぞれ FGF18 受容体とともに Ba/F3 細胞株に発現させ、FGF18 依存的な Ba/F3 細胞の増殖を WST-1 アッセイによって定量した。FGF18 に強く反応するほどこの Ba/F3 細胞は増殖するため、Ba/F3 の増殖を検討することで FGF18 シグナルの強度を定量することができる。その結果、ゴルジ体には局在しない FLAG-Cfr-GPI も野生型の Cfr と同様に FGF18 シグナルを増強することが明らかとなった。これは、Cfr は細胞表面で FGF シグナルに関与することを示している。また、この Ba/F3 細胞の増殖は ERK1/2 の活性に依存し、STAT1 の活性は増殖に抑制的に機能すると言われているため、Cfr は ERK1/2 の活性に影響を与えていると考えられる。

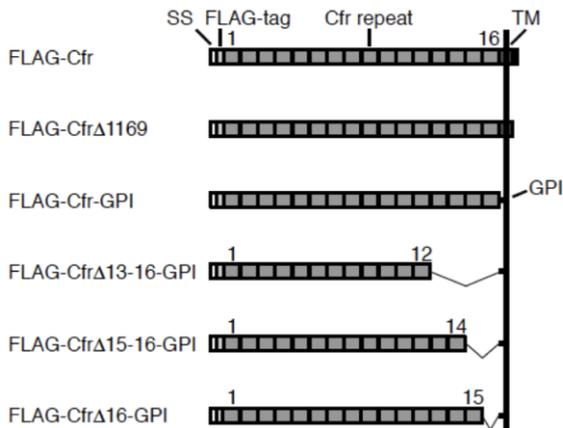


図 2. 実験で使用した Cfr 変異体

Cfr は 16 個の Cfr repeat からなる細胞外領域と、わずか 13 アミノ酸残基のペプチドからなる細胞内領域を持つ。全ての変異体に FLAG タグを付加した。SS: シグナルシーケンス、TM: 膜貫通領域、GPI: glycosylphosphatidylinositol アンカー

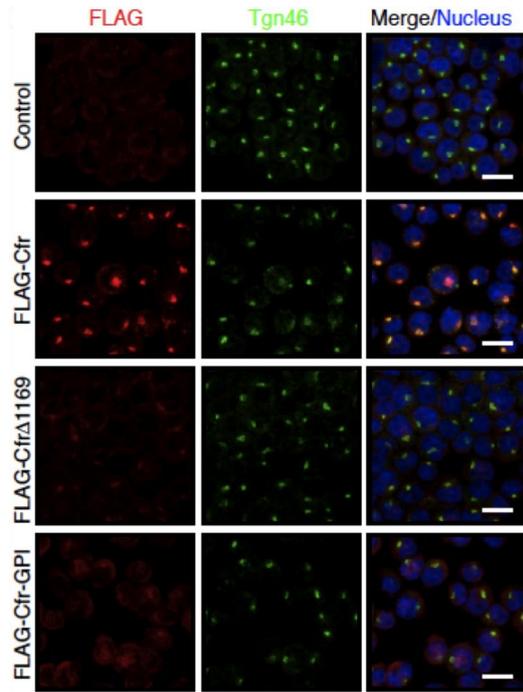


図 3. Cfr 変異体の細胞内局在

蛍光免疫染色により各 Cfr 変異体(赤)の細胞内局在を検討した。ゴルジ体をマーカーである Tgn46(緑)で可視化した。全長の FLAG-Cfr は強くゴルジ体に局在したのに対し、C 末を欠いた変異体はゴルジ体には局在しなかった。

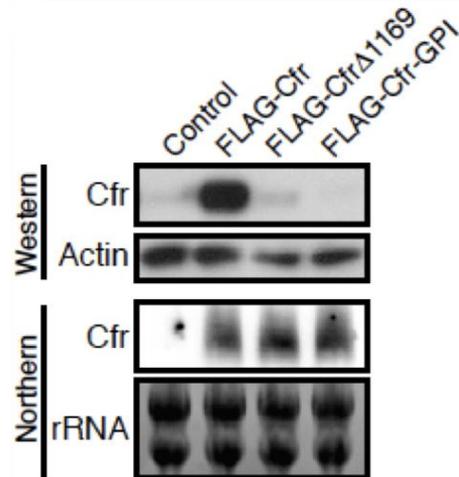


図 4. Cfr 変異体蛋白質の安定性

Cfr 変異体を発現する Ba/F3 細胞から蛋白質と RNA を回収し、それぞれウェスタブロットとノザンブロットで Cfr の発現量を検討した。mRNA の量は全ての Cfr 分子で同程度であったのに対し、C 末を欠いた Cfr 変異体では蛋白質量が著しく減少していた。

②Cfr と STAT1 の機能的関連を明らかにするために、Cfr と Stat1 の遺伝的相互作用を検討した。Cfr^{+/-};Stat1^{+/-}のダブルヘテロマウスを得たが、特に表現型は認められなかった。次に、ダブルヘテロマウスどうしを掛け合わせ、ダブル KO マウスも得たが、Cfr 単独 KO マウスと同様の生育遅延、尾の形成異常、口蓋裂が認められただけだった (図 5)。

これらの結果から、FGF シグナルによる骨格形成制御は主に ERK1/2 を介して行われ、Cfr と STAT1 はともにその調整役として機能していることが示唆された。

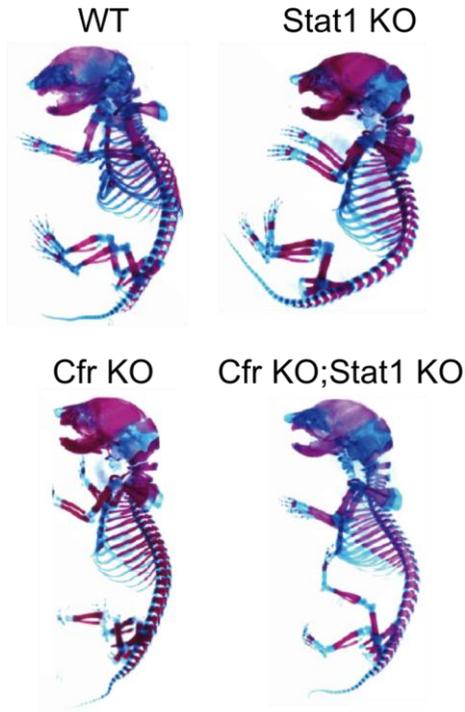


図 5. Cfr と Stat1 のダブル KO 新生児マウス各遺伝型新生児マウスの硬骨と軟骨をそれぞれ赤色と青色で染色した結果。

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 1 件)

Miyaoka Y, Kato H, Ebato K, Saito S, Miyata N, Imamura T, Miyajima A. Retention in the Golgi apparatus and expression on the cell surface of Cfr/Esl-1/Glg-1/MG-160 are regulated by two distinct mechanisms. *Biochemical Journal*. 査読有、440 (1), 2011, pp. 33-41.

[学会発表] (計 1 件)

宮岡 佑一郎、齋藤 滋、今村 亨、宮島 篤
Fgf 結合分子 Cfr/Glg-1 の細胞内局在制御機構

BMB2010

2010 年 12 月 7 日

神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮岡 佑一郎 (MIYAOKA YUICHIRO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：20549521