

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成 2 4 年 5 月 2 3 日現在

機関番号：3 2 4 0 9

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：2 3 6 5 9 7 3 2

研究課題名(和文) 増殖と分化を結ぶオーバーフローモデルの確立

研究課題名(英文) A novel model for connecting growth and differentiation

研究代表者

片桐 岳信 (KATAGIRI TAKENOBU)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：8 0 2 4 5 8 0 2

研究成果の概要(和文): Bone Morphogenetic Protein (BMP) により、発現が誘導される Id2 と Id3 遺伝子の転写制御機構を解析した。両者とも、転写開始点の 5' 上流域に、Id1 遺伝子と相同英の高い 6塩基のコア配列を含む BMP 応答配列 (BRE) が同定された。コア配列に変異を導入すると、BMP に対する応答性と転写因子 Smad の結合性が失われた。Smad1 と Smad4 を共発現させると、レポーターのルシフェラーゼ活性が上昇した。従って、Smad が初期応答遺伝子のコア配列に結合し、転写を制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文): We analyzed Bone morphogenetic protein (BMP)-responsive element (BRE) in the Id2 and Id3 genes. They had homologous BREs containing a 6 bp core sequence. The core sequence was essential for both the BMP-response and recognition by Smads. Co-transfection of Smad1 and Smad4 induced the reporter activity. These findings suggest that BMP signaling induces transcription of the Id genes through binding of Smads to the core sequences in the BREs.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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: 遺伝子、転写、細胞・組織、骨形成

1. 研究開始当初の背景

異所性骨化を誘導する Bone Morphogenetic Protein (BMP) は、標的細胞の膜表面に存在する膜貫通型セリン・スレオニンキナーゼ受容体に結合してさまざまな生物活性を示す。BMP を結合した BMP 受容体は、細胞内で Smad 経路、p38 MAP キナーゼ経路、イノシトール 3 リン酸経路等の細胞内情報伝達系を活性化する。

BMP の筋組織における異所性骨誘導活性を反映する in vitro のモデル実験系として、我々は筋芽細胞 C2C12 を用いた骨芽細胞への分化誘導系を確立した。C2C12 細胞を BMP で処理すると、筋分化が抑制され、代わりに骨芽細胞分化が誘導される。この BMP の作用は、構成的活性型 BMP 受容体

の過剰発現でも起こる。

我々は、BMP 刺激後の C2C12 細胞において、初期応答遺伝子として Id1, Id2, Id3 遺伝子の転写が誘導されることを見出した。すでに、Id1 遺伝子の BMP シグナルによる転写制御メカニズムを解析し、1) 転写開始点の 5' 上流に存在する GC リッチな配列が BMP 応答に必須であること、2) この配列に BMP 受容体で活性化された Smad が結合すること、を報告した。さらに、Smad 経路の役割を解明する目的で、Smad1 の BMP 受容体によるリン酸化部位に変異を導入した。この Smad1 変異体を過剰発現すると、骨芽細胞分化を誘導することが明らかとなった。これらの結果は、Smad 依存的情報伝達系が、細胞増殖に重要な遺伝子群と、骨芽細胞分

化に重要な遺伝子の転写を制御する可能性を示す。しかし、相反する細胞増殖と分化を、どのように Smad が調節するかは明らかでない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、BMP の初期応答遺伝子として同定した Id2 と Id3 遺伝子の BMP 応答領域を同定し、その転写制御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

マウス Id2 及び Id3 遺伝子の 5' 上流領域を組み込んだルシフェラーゼ・レポーターを構築した。この段階的な欠失変異体を作製し、C2C12 細胞にトランスフェクションして、BMP 応答に必要な領域を決定した。BMP 応答領域をプローブとして、Smad の結合を EMSA 法で解析した。遺伝子発現は、total RNA を用いた RT-PCR 法で解析した。

4. 研究成果

マウス Id2 及び Id3 遺伝子の 5' 上流 2.9 kb と 3.4 kb をそれぞれ PCR 法で増幅し、ルシフェラーゼ・レポータープラスミドを構築した。これらのルシフェラーゼ活性が、BMP-4 刺激によって上昇することを確認した。そこで、両プラスミドを基に、5' 側から段階的な欠失変異体を作製し、BMP に対する応答性を検討した。

その結果、Id2 は -2867 から -2820 の間、Id3 は -3299 から -3265 の間の配列が、BMP-4 刺激に対する応答に必須であることが判明した (図 1)。これらの配列を 4 コピーずつ minimal promoter 上流に挿入しても、BMP に対する反応が認められた。しかし、この領域に存在する 6 塩基から成る GC コア配列に変異を導入すると、BMP に対する反応性が完全に失われた (図 1、及び図 2)。

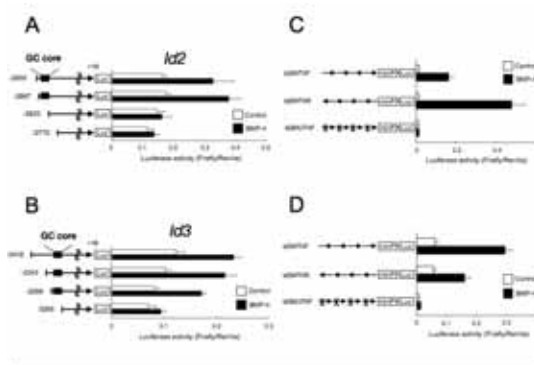


図 1. Id2 と Id3 遺伝子における BRE の同定

同定された Id2 と Id3 の BRE をプローブとして、BMP-4 で 1 時間刺激した C2C12 細胞の核抽出液を用いた EMSA を行った。その結

果、Id2 および Id3 共に、BMP-4 刺激によって、DNA-タンパク質複合体の形成が誘導された。さらに、これらの複合体は、抗 Smad1 および抗 Smad4 抗体の添加でスーパーシフトした (図 2)。また、Id1 の BRE をプローブとした EMSA では、Id2 および Id3 の BRE が塩基配列特異的に複合体形成を阻害することが確認された (図 2)。

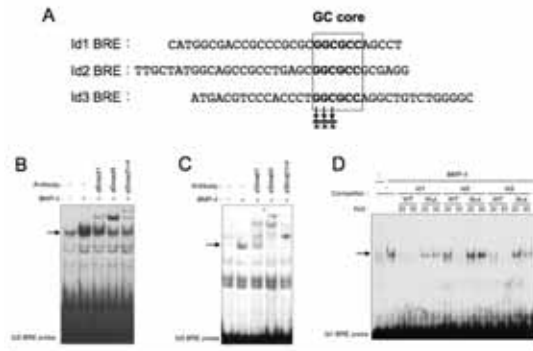


図 2. Id2 と Id3 の BRE に対する Smad1/4 の結合

構築した Id2 および Id3 の BRE を含むレポーター活性を指標に、Smad1 と Smad4 の転写活性を検討した。それぞれの活性は、Smad1 の単独発現で上昇し、Smad4 を共発現させるとさらに上昇した (図 3)。

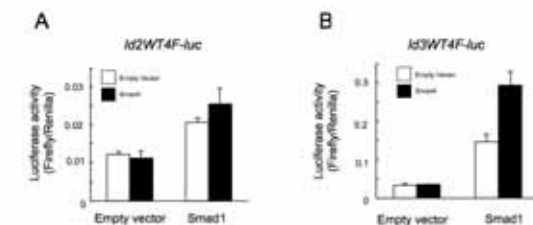


図 3. Id2 と Id3 の BRE を介した Smad1/4 による転写

以上の結果より、BMP 刺激による Id2 と Id3 遺伝子の発現も、Id1 と同様に、Smad1 と Smad4 がそれぞれの遺伝子の 5' 上流に存在する GC core に結合して転写を誘導していることが明らかとなった。Smad の過剰発現が骨芽細胞分化を誘導することも判明していることから、今回同定された GC core 配列が、増殖制御因子のみならず、分化制御因子の遺伝子上にも存在する可能性が示唆される。

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)

1. Katagiri T. (2012) Recent topics in fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Oral Biosci*, in press. (査読有)
2. Seo Y, Fukushima H, Maruyama T, Kurikoshi K, Osawa K, Nagano K, Aoki K, Weih F, Doi T, Zhang M, Ohya K, Katagiri T, Hosokawa R, and Jimi E. (2012) Accumulation of p100, a precursor of NF- κ B2, enhances osteoblastic differentiation *in vitro* and bone formation *in vivo* in *aly/aly* mice. *Mol Endocrinol* 26:414-422. (査読有)
3. Kokabu S, Gamer L, Cox K, Tsuji K, Raz R, Economides A, Katagiri T, and Rosen V. (2012) BMP3 suppresses osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells via interaction with Acvr2b. *Mol Endocrinol* 26:87-94. (査読有)
4. Takahashi M, Katagiri T, Furuya H, and Hohjo H. (2012) Disease-causing allele specific silencing against the ALK2 mutants, R206H and G356D, in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. *Gene Ther*, in press. (査読有)
5. Ohte S, Kokabu S, Iemura S, Sasanuma H, Yoneyama K, Shin M, Suzuki S, Fukuda T, Nakamura Y, Jimi E, Natsume T, and Katagiri T. (2011) Identification and functional analysis of Zranb2 as a novel Smad-binding protein that suppresses BMP signaling. *J Cell Biochem* 113:808-814. (査読有)
6. Nakamura Y, Jennifer BI, Katagiri T, and Kobayashi T. (2011) Chondrocyte-Specific *MicroRNA-140* Regulates endochondral bone development and targets *Dnpep* to modulate BMP signaling. *Mol Cell Biol* 31:3019-3028. (査読有)

〔学会発表〕(計25件)

1. 自見英治郎, 片桐岳信, NF- κ B, p65 サブユニットは Smad4 と会合し、Smad の DNA 結合を抑制することで BMP シグナルによる骨芽細胞分化を抑制する, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月13-16日, 神奈川横浜市
2. 米山克美, 他, 骨格筋組織の再生過程に関する組織学的研究, 第9回RCGMフロンティアシンポジウム, 2011年11

3. 片桐岳信, 筋肉が骨になるメカニズム, 第9回RCGMフロンティアシンポジウム, 2011年11月3日, 埼玉県日高市
4. 大手駿, 他, 進行性骨化性線維異形成症で同定された ALK2 変異体と II 型 BMP 受容体の相互作用解析, 第9回RCGMフロンティアシンポジウム, 2011年11月3日, 埼玉県日高市
5. 笹沼寛樹, 他, 筋サテライト細胞は BMP シグナルにより骨芽細胞様細胞へ分化する, 第9回RCGMフロンティアシンポジウム, 2011年11月3日, 埼玉県日高市
6. 進正史, 他, BMP 初期応答遺伝子 Id2, Id3 における BMP 応答配列の解析, 第9回RCGMフロンティアシンポジウム, 2011年11月3日, 埼玉県日高市
7. 片桐岳信, 他, 構成的活性型 Smad5 及び Smad8 の構築, 第9回RCGMフロンティアシンポジウム, 2011年11月3日, 埼玉県日高市
8. 片桐岳信, BMP による骨形成機序の解明と難病研究への展開, 第53回歯科基礎医学会学術大会・総会 ライオン学術賞受賞講演, 2011年10月1日, 岐阜県岐阜市
9. 進正史, 他, 初期応答遺伝子の Idファミリーにおける BMP 応答領域の同定, 第53回歯科基礎医学会学術大会演, 2011年10月1日, 岐阜県岐阜市
10. 片桐岳信, 他, Smad の新規転写抑制因子 Zranb2 の同定と機能解析, 第53回歯科基礎医学会学術大会演, 2011年10月1日, 岐阜県岐阜市
11. 古株彰一郎, 他, BMP3 は Acvr2b を介して骨髄間質細胞の骨芽細胞分化を制御する, 第53回歯科基礎医学会学術大会演, 2011年10月1日, 岐阜県岐阜市
12. 妹尾吉訓, 他, NF- κ B 非古典的経路による骨形成の抑制, 第53回歯科基礎医学会学術大会演, 2011年10月1日, 岐阜県岐阜市
13. Kokabu S, et al., BMP3 suppresses osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells via interacting with Acvr2b, ASBMR 2011 Annual Meeting, 2011年9月16-20日, San Diego, California, U. S. A.
14. Ohte S, et al., BMP type II receptors further stimulate constitutively activated mutant ALK2 found in fibrodysplasia ossificans progressiva, ASBMR 2011 Annual Meeting, 2011年9月16-20日,

- San Diego, California, U. S. A.
15. Katagiri T, et al., BMP signaling inhibits myogenesis and induces osteoblastic differentiation in satellite cells during muscle regeneration, ASBMR 2011 Annual Meeting, 2011 年 9 月 16-20 日, San Diego, California, U. S. A.
 16. Shin M, et al., Identification of a common BMP-responsive element in the Id1, Id2 and Id3 genes, ASBMR 2011 Annual Meeting, 2011 年 9 月 16-20 日, San Diego, California, U. S. A.
 17. Katagiri T, et al., Molecular mechanisms of heterotopic bone formation in skeletal muscle induced by BMP signaling, Gordon Research Conference on Myogenesis, 2011 年 8 月 24 日 -9 月 2 日, Waterville Valley, New Hampshire, U. S. A.
 18. 大手聡, 他, 新規 Smad 結合分子 Zranb2 は BMP シグナル抑制因子である, 第 18 回 BMP 研究会, 2011 年 7 月 31 日, 大阪府大阪市
 19. 片桐岳信, 筋が骨化する難病 進行性骨化性線維異形成症, 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 2011 年 7 月 29 日, 大阪府大阪市
 20. 笹沼寛樹, 他, 骨格筋の再生と異所性骨化におけるサテライト細胞に対する BMP シグナルの役割, 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 2011 年 7 月 28-30 日, 大阪府大阪市
 21. 大手聡, 他, 進行性骨化性線維異形成症 (FOP) で同定された ALK2 は II 型 BMP 受容体によってさらに活性化される, 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 2011 年 7 月 28-30 日, 大阪府大阪市
 22. 進正史, 他, BMP 初期応答遺伝子における BMP 応答配列の解析, 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 2011 年 7 月 28-30 日, 大阪府大阪市
 23. 片桐岳信, 筋の中に骨ができる, 第 1 回彩の国骨フォーラム, 2011 年 6 月 30 日, 埼玉県入間郡毛呂山町
 24. Katagiri T, Characterization of mutant forms of ALK2 found in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva, Gordon Research Conference on Myogenesis, 2011 年 6 月 19-24 日, Les Diablerets, Switzerland
 25. Katagiri T, Heterotopic bone formation and muscle regeneration, 32nd Annual Meeting of Japanese

Society of Inflammation and Regeneration, 2011 年 6 月 3 日, 京都府京都市

〔その他〕
ホームページ等
http://www.saitama-med.ac.jp/genome/Div04_PPhysiol/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片桐 岳信 (KATAGIRI TAKENOBU)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：8 0 2 4 5 8 0 2

(2) 研究分担者

大手 聡 (OHE SATOSHI)
埼玉医科大学・医学部・助教
研究者番号：0 0 5 4 7 9 7 9
笹沼 寛樹 (SASANUMA HIROKI)
埼玉医科大学・医学部・研究員
研究者番号：3 0 5 7 1 7 0 7
米山 克美 (YONEYAMA KATSUMI)
埼玉医科大学・医学部・助手
研究者番号：2 0 5 7 1 5 7 4
進 正史 (SHIN MASASHI)
埼玉医科大学・医学部・研究員
研究者番号：7 0 5 4 9 2 6 1

(3) 連携研究者

()
研究者番号：