

骨形成における新しい遺伝子制御メカニズムとその進化的意義

骨形成に必須の転写制御因子 Sp7/osterix の作動様式が明らかに

1. 発表者：

大庭 伸介（東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻 特任准教授）

2. 発表のポイント：

- ◆骨が作られるためには必須の遺伝子のスイッチである Sp7/osterix 蛋白質が遺伝子発現を制御する様子を、マウスを用いてゲノム全域で検出した。
- ◆これまで、ゲノムに直接結合して作用すると考えられていた Sp7/osterix 蛋白質の作動様式とは異なる様式を明らかにし、その進化的な意義を提唱した。
- ◆ゲノム変異と骨格系の変性疾患・先天疾患の理解、それらの治療や骨格再生におけるゲノム創薬への貢献が期待される。

3. 発表概要：

ヒトの骨は、骨芽細胞という細胞によって作られています。骨が作られるためには、Sp7/osterix という遺伝子発現のスイッチとして働く蛋白質が正常に機能して、骨芽細胞の形成に関わる遺伝子を正しく発現させることが必要です。これまでの研究によって、Sp7/osterix が遺伝子発現を制御する機構は、一部のゲノム領域において明らかとなっていました。ゲノム全領域での振る舞い等は不明なままでした。

東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻の大庭伸介特任准教授と南カリフォルニア大学エリ・アンド・イディス Broad-CIRM 再生医療・幹細胞研究所の北條宏徳研究員、アンドリュー・マクマホン教授の共同研究グループは、Sp7/osterix による遺伝子発現制御の様子を骨芽細胞のゲノム全域にわたって調べました。その結果、これまでは Sp7/osterix が直接特定のゲノム領域（GC ボックス）に結合することによって、遺伝子発現を制御していると考えられていましたが、別の蛋白質と結合して間接的にゲノム領域に結合する機構が存在することを明らかにしました。加えて、Sp7/osterix 蛋白質と今回新たに発見した機構は脊椎動物に特徴的であることが分かり、進化の過程で骨芽細胞が現れたことに伴って獲得された機構であることが示唆されました。

これらの知見は、ゲノム変異がもたらす骨格系の変性疾患・先天疾患の理解、それらの治療や骨格再生におけるゲノム創薬へ貢献することが期待されます。本研究成果は、2016年5月9日に米国科学雑誌「Developmental Cell」で発表されます。

4. 発表内容：

胎児期の骨格の発生において、骨を作る骨芽細胞は骨形成に必須です。Sp 転写因子ファミリーに属する Sp7/osterix は骨芽細胞及びその前駆細胞に強く発現しており、この因子を欠失させたマウスでは全身の骨が全く形成されません。そのため Sp7/osterix が正常に機能して、骨芽細胞の形成に関わる遺伝子を正しく発現させることが骨の形成には必要だと考えられていました。これまでの研究によって、Sp7/osterix が骨の基質となる蛋白質のアミノ酸配列をコードする遺伝子の転写に関わることを示されてきましたが、Sp7/osterix が骨芽細胞のゲノム全域にわたっ

てどのような遺伝子発現に関わるか、またどのような作動様式を介して機能するかについては十分に明らかになっていませんでした。

東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻の大庭伸介特任准教授と南カリフォルニア大学エリ・アンド・イディス Broad-CIRM 再生医療・幹細胞研究所の北條宏徳博士およびアンドリュー・マクマホン教授の研究グループは、Sp7/osterix による遺伝子発現制御の様子を骨芽細胞のゲノム全域にわたって検出することで、これまで考えられていたものとは異なる作動様式で Sp7/osterix が遺伝子の転写にはたらくことを見出しました。さらに、Sp7/osterix に相同する遺伝子は、骨を形成する脊椎動物にのみ存在することが分かりました。

研究グループはまず、発生工学的手法（注1）で Sp7/osterix を標識したマウスの骨芽細胞において、Sp7/osterix に対するクロマチン免疫沈降シーケンス（ChIP-seq、注2）を行い、ゲノム DNA 上で Sp7/osterix が作用する領域を 2,112 箇所同定しました。次に、RNA シーケンス（RNA-seq、注3）によって、Sp7/osterix を発現する骨芽細胞で高発現する遺伝子群を同定しました。

これまで、Sp7/osterix は、他の Sp 転写因子ファミリーと同様に、ゲノム DNA に存在する GC ボックス（注4）という配列に直接結合して、遺伝子の転写を制御すると考えられてきました。しかし、今回の解析で同定した Sp7/osterix 作用領域には GC ボックスが有意に存在せず、代わりにホメオボックス転写因子（注5）の結合配列が有意に存在することが分かりました。生化学的解析においては、Sp7/osterix のホメオボックス転写因子結合配列への直接的な結合は確認されませんでした。そこで、Sp7/osterix はホメオボックス転写因子との複合体形成を介して、間接的に骨芽細胞のゲノム DNA に作用する可能性がありました。

本研究グループの RNA-seq 解析において、ホメオボックス転写因子のうち、骨芽細胞で高く発現していた Dlx3、Dlx5、Dlx6 が Sp7/osterix のパートナーとして考えられました。ChIP-seq および分子生物学的解析から、骨芽細胞のゲノム DNA では Sp7/osterix が作用する領域の約 80% が Dlx5 結合領域と共通しており、Sp7/osterix と Dlx の蛋白質同士が結合することが明らかとなり、骨芽細胞において Dlx 蛋白の量を低下させると、Sp7/osterix のゲノム DNA への作用が減少しました。以上より、研究グループは、Sp7/osterix が Dlx を介して間接的にゲノム DNA に作用することで、骨芽細胞の分化に関わる遺伝子の発現を調節するという新たな作動様式を提唱しました（図）。

さらに、Sp7/osterix では、他の Sp 転写因子ファミリーが共通に有するアミノ酸の配列の一部が異なっており、このアミノ酸の違いが GC ボックスへの結合能を消失させていることが分かりました。そこで、この構造的特徴に由来する Sp7/osterix の生物学的作用の進化的な意義を検証するために、脊索動物（注6）において、哺乳類の Sp7/osterix に相同する遺伝子が存在するか調べました。すると、骨を形成する脊椎動物のみが Sp7/osterix と相同する遺伝子をもっていました（図）。したがって、脊椎動物の進化において、Sp ファミリー転写因子群とは異なる作動様式をもつ Sp7/osterix は、骨を形成する骨芽細胞の出現に伴って獲得されてきたことが示唆されました。

本研究成果は、骨形成に必須の転写制御因子である Sp7/osterix の挙動を骨芽細胞のゲノム全域にわたって検出することで、Sp7/osterix の作動様式とその進化的な意義を提唱するものです。また、同研究グループは 2015 年に、軟骨形成に必須の転写因子である Sox9 が、軟骨形成の際に遺伝子発現を調節する作動様式についてもゲノム全域で明らかにしています*。一連の知見は、ゲノム変異がもたらす骨格系の変性疾患・先天疾患の理解、それらの治療や骨格再生におけるゲノム創薬へ貢献することが期待されます。

*研究成果については東京大学大学院工学系研究科 2015 年 7 月 3 日プレスリリース、及び下記論文参照：

Ohba S, He X, Hojo H, McMahon AP: Distinct transcriptional programs underlie Sox9 regulation of the mammalian chondrocyte. *Cell Rep* 12(2):229-243, 2015, doi: 10.1016/j.celrep.2015.06.013

5. 発表雑誌：

雑誌名：Developmental Cell (volume 37, issue 3 : 5 月 9 日)

論文タイトル：Sp7/Osterix is restricted to bone-forming vertebrates where it acts as a Dlx co-factor in osteoblast specification

著者：Hironori Hojo, Shinsuke Ohba, Xinjun He, Lick Pui Lai, Andrew P. McMahon

DOI 番号：10.1016/j.devcel.2016.04.002

6. 問い合わせ先：

東京大学 大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻
特任准教授 大庭 伸介

南カリフォルニア大学 Broad-CIRM Center for Regenerative Medicine and Stem Cell Research
特任研究員 北條宏徳

7. 用語解説：

(注 1) 発生工学的手法

初期胚に対する実験操作を指す。本研究では、マウスの初期胚において Sp7/osterix 領域の遺伝子进行操作し、あるペプチドで標識された Sp7/osterix 蛋白質を作るような遺伝子配列を有する個体を作成した。

(注 2) クロマチン免疫沈降シーケンス

目的とする蛋白質が結合している DNA 領域をゲノム全域で探索的・網羅的に、かつ定量的に解析できる手法。細胞内の蛋白質と DNA の結合を架橋固定により保存したのちに断片化し、目的とする蛋白質に対する抗体を用いた免疫沈降により蛋白質-DNA 複合体を精製する。精製物中の DNA の配列を次世代型シーケンサーで解析し、得られた配列データをゲノム配列と比較する。取得した配列が多い領域が結合領域として検出される。

(注 3) RNA シーケンス

RNA の発現レベルを上記の次世代シーケンサーにより解析する手法。シーケンサーにより得られた細胞内の RNA の配列データをゲノム配列と比較し、取得した配列の数に基づいて発現レベルを算出する。

(注 4) GC ボックス

DNA の 5'から 3'に向かって、GGCGGG の配列を有するゲノム領域を指す。

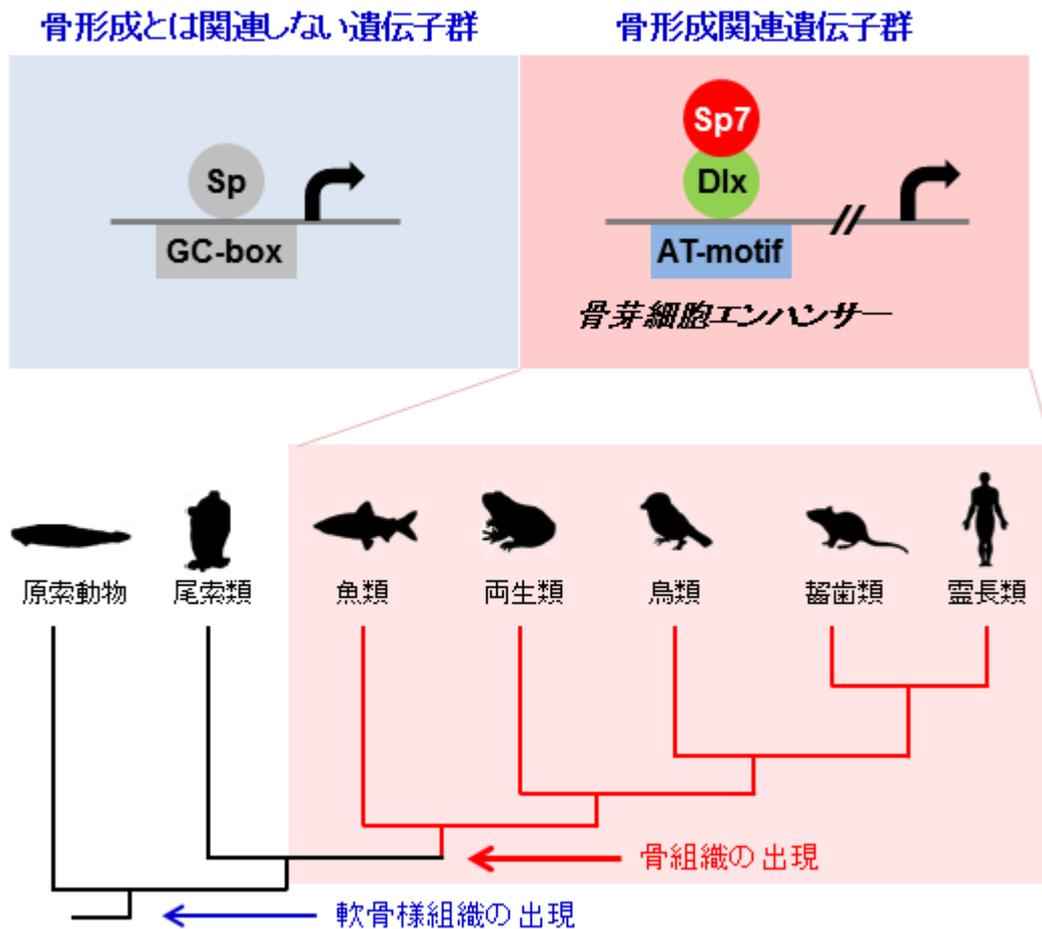
(注5) ホメオボックス転写因子

ホメオボックスとよばれる DNA 配列を有する転写因子。ホメオボックスの配列は、動物から植物・菌類にわたって相同性が高く、DNA に結合する蛋白質ドメインをコードする。

(注6) 脊索動物

脊椎動物と原索動物を合わせた分類。発生段階において、神経索である神経管とそれに近接して脊索を持つ。脊椎動物では神経管から中枢神経系が作られ、脊索は背骨に置き換わる。

8. 添付資料：



(図) 骨芽細胞分化の遺伝子発現制御における Sp7 の作動様式と生物進化における Sp7 の意義

Sp7/osterix は Sp 転写因子ファミリーに属しており、骨形成に必須である。過去の報告では、Sp7/osterix は他のファミリーメンバーと同様に、DNA 上の特異的な配列 (GC ボックス) に直接結合して、遺伝子の転写を制御すると考えられていた。しかしながら本研究により、Sp7 はホメオボックス転写因子群と複合体を形成することで、間接的に DNA に作用して遺伝子の転写を制御する可能性が示された。さらに、生物種間の比較ゲノム解析により、Sp7 の出現は骨組織を有する脊椎動物の進化と密接に関連する可能性も示唆された。(© 2016 Hironori Hojo.)