

論文の内容の要旨

論文題目 骨形成に関連した転写共役因子 **Cbfb** の **Runx2** による蛋白安定化
に関する研究

指導教員 高戸毅教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 中島慶治

Cbfb (core binding factor- β)、**Runx2** (Runt-related transcription factor 2) はともに骨形成に必須の遺伝子である。**Cbfb** ノックアウトマウスは造血機能がなく、胎生致死であったが、造血機能のみレスキューされた **Cbfb** トランスジェニックマウスが作製された結果、誕生したマウスは骨形成がほとんどされなかった。また、**Runx2** ノックアウトマウスにおいても骨芽細胞の分化障害により、完全な骨欠損を呈した。**Runx2** ノックアウトマウスの骨形成予定領域である骨殻には、間葉細胞の凝集は見られず、軟骨基質マーカー遺伝子の発現もみられなかった。ノックアウトマウスにおけるその強烈的な骨欠損の表現型から **Runx2** やその共役因子である **Cbfb** の解析は骨形成の分子メカニズムの更なる解明において多大な貢献をもたらすと考えられる。

Runx1 蛋白が **Cbfb** 蛋白と複合体を形成して蛋白分解経路であるユビキチンプロテアソーム系から安定化されるという報告がある。また、同様に **Runx2** 蛋白も **Cbfb** を導入することで安定化されることも示されている。逆に **Runx2** 蛋白によって **Cbfb** 蛋白がユビキチンプロテアソーム系から安定化されるのかは未だ解明が進んでいない。そこで、引き続きこれらを解明することが、効率的な骨再生のための基礎研究になりうると考え本研究をおこなうこととした。

本研究の目的は、骨形成に必須である **Cbfb**、**Runx2** 蛋白の安定化がどのようなメカニズムでおこなわれるか解明することである。第 1 章では **Cbfb** 蛋白がいかにかしてユビキチン化され、プロテアソーム系で分解されるのかについて解析した。次に **Cbfb** 蛋白のうち、ユビキチン化の標的部位の同定をおこなった。第 2 章では **Cbfb** 蛋白がいかにかして **Runx2** 蛋白により安定化されるのかについて解析した。安定化のためには **Cbfb** 蛋白、**Runx2** 蛋白のどのドメインが必要かについての検討もおこなった。最後に **Runx2** ノックアウトマウスを用いることにより、*in vivo* においても **Cbfb** 蛋白が **Runx2** 蛋白により安定化されるか免疫組織学的染色によって検討をおこなった。

第1章 Cbfb 蛋白がユビキチンプロテアソーム系で分解されるかの検討とユビキチン化における標的残基の同定

1-1 Cbfb 蛋白がユビキチンプロテアソーム系で分解されるかの検討

Cbfb 蛋白がプロテアソームで分解されるかを検討するために各種プロテアーゼインヒビターを作用させ、Cbfb 蛋白発現の比較をおこなった。NIH3T3 細胞培養系において、Cbfb を過剰発現させ、4 種のプロテアーゼインヒビターで処理したのち、36 時間後に蛋白を抽出し、Western blotting をおこなった。その結果、プロテアソームインヒビターである、ALLN、MG-132、Lactacystin で処理した群でのみコントロールに比べて蛋白発現が増加した。また、次に Cbfb 蛋白がユビキチン化されるかを検討するために免疫沈降を行った。その結果、Cbfb を過剰発現させて抗タグ抗体で免疫沈降したレーンにおいてポリユビキチンバンドとみられるラダー状のバンドの発現が認められた。また、これにプロテアソームインヒビターである MG132 を作用させたレーンではさらにポリユビキチンバンドの発現の増加が認められた。

以上より Cbfb 蛋白がユビキチン化されることと、プロテアソームで分解されることの両方が示唆された。

1-2 Cbfb 蛋白におけるユビキチン化標的残基の検討

ユビキチン化の標的はリジン残基との報告がある。そこで Cbfb 蛋白における 5 か所のリジンに着目し、アミノ酸配列をアルギニン酸に変換した変異体 (M1-5) を作製した。Western blotting をおこない、蛋白発現を比較することでどのリジン残基が標的になっているのかを検討した。その結果、5 か所すべての変異体 (M1-5) の蛋白発現が Wt と比較して増加し、5 種類の各変異体間で蛋白発現に差が認められなかった。よって 5 か所のリジン残基が同じ程度ユビキチン化の標的となっているであろうことが示唆された。

1-3 Cbfb 変異体 (M1-5) の機能解析

Runx2 蛋白が Cbfb 蛋白によって安定化されるという報告がある。ここでは、Cbfb の Wt と変異体 (M1-5) 間において Runx2 蛋白の安定化に差があるかを検討した。Runx2 と共に Cbfb の Wt と M1-5 を強制発現させて Runx2 蛋白発現を比較したところ、M1-5 のほうが Wt より Runx2 蛋白発現を増加させた。

次に、Wt と M1-5 間において Runx2 の転写活性に差が出るかを検討するためにルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったところ、M1-5 のほうが Wt より Runx2 転写活性をより亢進させた。

以上よりユビキチン化を抑制された M1-5 のほうが Runx2 蛋白の安定化を促

進し、Runx2 の転写活性を亢進させることが示唆された。

第 2 章 Runx2 による Cbfb 蛋白安定化の検討

2-1 Runx2 による Cbfb 蛋白安定化の検討

Cbfb の導入により Runx1 蛋白と同様に Runx2 蛋白も安定化されるという報告がある。ここでは逆に Runx2 が Cbfb 蛋白をユビキチンプロテアソーム系による分解から保護しているのではないかと考え、検討を行った。Western blotting を用い、Runx2, Cbfb を共に強制発現させた際の Cbfb 蛋白発現の比較をおこなった。その結果、内因性の Cbfb 蛋白発現が大きい MC3T3-E1 細胞では Runx2 を導入すると内因性の Cbfb 蛋白発現が増加した。また、NIH3T3 細胞では Runx2, Cbfb を共に強制発現させると Cbfb 蛋白発現が増加し、他の Runx ファミリーである Runx1, 3 によっても Cbfb 蛋白発現が増加した。

2-2 ドメイン変異体を用いた Cbfb, Runx2 それぞれの蛋白安定化ドメインの同定 Runx2 による Cbfb 蛋白安定化という現象において、お互いのどのドメインが重要なのかを明らかにするための検討を行った。Cbfb はおおまかに 3 つの領域に区切ってドメイン変異体を作製した。Runx2 については Runx1, 3 においても Cbfb 蛋白の安定化が認められたことから、Runx family の共通部位である runt domain と C 末端の VWRPY motif を中心にドメイン変異体を作製した。Western blotting を用い、Cbfb, Runx2 ドメイン変異体を組み合わせて蛋白発現の比較をおこなったところ、Runx2 による Cbfb 蛋白安定化には Cbfb 側では Cbfb (90-120), Cbfb (60-90) が、Runx2 側では Runx family の共通部位である runt domain が重要であることが示唆された。

2-3 ポイント変異体を用いた Cbfb, Runx2 それぞれの蛋白安定化ポイントの同定 先行研究からポイント変異体を作製し、Western blotting を用い、Cbfb, Runx2 ポイント変異体を組み合わせて蛋白発現の比較をおこなった。その結果 Runx2 による Cbfb 蛋白安定化には Cbfb-Runx2 蛋白複合体形成が重要であり、Cbfb 側では Cbfb (60-90) 内の 64 番目と Cbfb (90-120) 内の 104 番目の 2 か所のアミノ酸が、Runx2 側では runt domain 内の 145 番目のアミノ酸が蛋白複合体形成に関与していることが示唆された。

2-4 Runx2 ノックアウトマウス細胞を用いた Cbfb 蛋白発現解析

より生体内に近い条件下においても Runx2 による Cbfb 蛋白安定化が再現されるかを検討するために Runx2 ノックアウトマウスから採取した細胞において内因性の Cbfb 蛋白発現の比較をおこなった。Cbfb^{-/-} 細胞においてアデノウィルスを用いて Cbfb をレスキューすると、内因性の Runx2 蛋白発現は Wt と同程度に

回復した。Runx2^{-/-} 細胞においてアデノウィルスを用いて Runx2 をレスキューすると内因性の Cbfb 蛋白発現は増加した。in vivo に近い条件下においても Runx2 蛋白安定化のためには Cbfb が、Cbfb 蛋白安定化のためには Runx2 が必要であることが示唆された。

2-5 Runx2 の各遺伝子型におけるタイプ X コラーゲン、Runx2 蛋白、Cbfb 蛋白発現の比較

in vivo 条件下においても Runx2 による Cbfb 蛋白安定化が再現されるかを検討するために、胎生 18.5 日の Runx2 ノックアウトマウスから脛骨を取り出し、免疫染色を用いることにより、Cbfb 蛋白発現の比較を行った。Runx2 の免疫染色では Wt の前骨芽・骨芽細胞では染色性が認められたが、Runx2^{+/-} では染色性が著しく低下していた。同様に Cbfb の免疫染色でも Wt の前骨芽・骨芽細胞では染色性が認められたが、Runx2^{+/-} では染色性が著しく低下していた。以上より in vivo の条件下においても Cbfb 蛋白発現には Runx2 蛋白発現が重要であることが示唆された。

<結論>

先行研究により、Cbfb を導入することでユビキチンプロテアソーム系から Runx2 蛋白が安定化されることが明らかになっているが、本研究によって、逆の Runx2 を導入することによる Cbfb 蛋白安定化も示された。また、より生体内条件に近い in vivo においても Cbfb 蛋白が Runx2 蛋白により安定化される結果を示すことができた。