

2001003-11

---

平成 13 年度

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

---

高齢者の骨軟骨疾患の発症病理及び再生医学的治療に  
関する研究

## 研究報告書

主任研究者 渡辺 研

平成 13 年度

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

## 研 究 報 告 書

高齢者の骨軟骨疾患の発症病理及び再生医学的治療  
に関する研究

平成 14 年 3 月

主任研究者 渡辺 研

平成 13 年度 研究報告書 目次

<b>1. 総括研究報告書</b>	-----	1
高齢者の骨軟骨疾患の発症病理及び再生医学的治療 に関する研究	-----	2
国立療養所中部病院 長寿医療研究センター 老年病研究部 運動・感覚機能研究室長		渡辺 研
<b>2. 分担研究報告書</b>	-----	7
1)加齢と幹細胞からの骨軟骨組織分化及び再生 に関する研究	-----	8
国立療養所中部病院 長寿医療研究センター 老年病研究部 運動・感覚機能研究室長		渡辺 研
2)骨軟骨組織形態形成における骨形成因子の 作用機構に関する研究	-----	13
東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子細胞生物学 教授		澁谷 浩司
3)骨軟骨形成異常マウスの解析及び骨格系組織の 形成機構に関する研究	-----	19
神戸大学医学部 医動物学講座 教授		南 康博
(発表論文)	-----	23

# 1. 総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
総括研究報告書

高齢者の骨軟骨疾患の発症病理及び再生医学的治療に関する研究

主任研究者 渡辺 研  
国立療養所中部病院長寿医療研究センター  
老年病研究部 運動・感覚機能研究室長

研究要旨

高齢者の骨軟骨疾患の原因の一つである組織再生不良に着目し、細胞分化とシグナル伝達機能について研究を進めている。本年度では、加齢ドナーからの骨髄幹細胞ならびに間葉系幹細胞活性化に関する知見(渡辺)、骨形成因子(Bone Morphogenetic Protein: BMP)のシグナル伝達調節に関する新規遺伝子の発見(澁谷)、及び軟骨疾患動物モデルから、病態責任遺伝子であるチロシンキナーゼ受容体のシグナル伝達機構と病態との関わり(南)についての成果があった。

キーワード： BMP, FGF, Wnt, 骨芽細胞分化、間葉系細胞、  
骨折モデル、疾患モデル動物

渡辺 研 国立療養所中部病院  
長寿医療研究センター  
老年病研究部  
運動・感覚機能研究室長

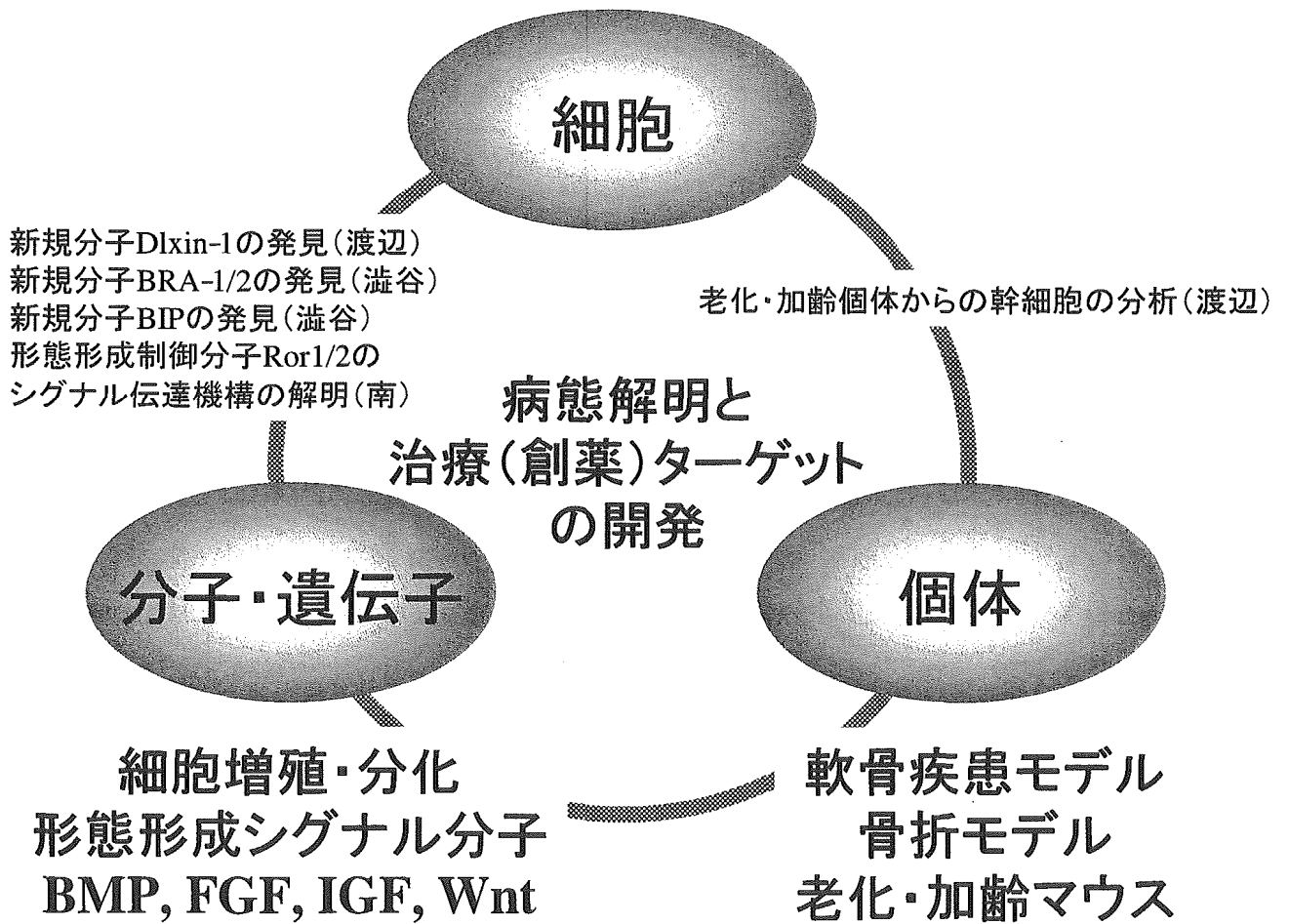
澁谷浩司 東京医科歯科大学  
難治疾患研究所  
分子細胞生物学  
教授

南 康博 神戸大学 医学部  
医動物学講座  
教授

A. 研究目的

21世紀を迎える現在、我が国はすでに先進各国の中でもいち早く超高齢者社会へと突入しつつある。そういった中で、高齢者の運動能力を著しく阻害する骨軟骨疾患は、「寝たきり」の引き金であり、また、臥床状態の持続はさらに骨軟骨の構造的かつ機能的減衰を助長し、最悪のシナリオを作り出す原因であると考えられる。このような現状で、効果的な

間葉系幹細胞分化  
骨芽細胞分化  
軟骨細胞分化



新規分子BRA-1/2の個体・形態形成における機能解析(澁谷)  
新規分子BIPの個体・形態形成における機能解析(澁谷)  
Ror1/2ノックアウトマウスの解析(南)  
軟骨疾患モデルと骨折モデルと再生過程に関する知見(南)

骨軟骨組織の機能維持・回復技術の開発により、高齢患者が完全社会復帰とは言わずとも、「寝たきり」から脱却し、家庭生活に復帰できる状態にまで回復させることは、とりもなおさず超高齢者社会において極めて重要な課題の一つであるといえる。本研究では、骨粗鬆症や変形性関節症、ならびに骨折治癒遅延等、高齢者のかかえるさまざまな骨軟骨疾患が、加齢に伴う骨軟骨形成および再生能力の低下を特徴的な病理・病態とする点で共通していることに着目する。また、酵素阻害剤等の機能抑制系が中心である薬物療法の体系において、機能回復・機能賦活化を作用とする治療法の開発は新しいカテゴリーに属し、それだけに網羅的かつ高度な分子メカニズムの理解なくして実用性は望めない。そのため、本研究課題においては、分子レベルの基礎研究に重点を置くことにより、細胞分化から組織再生に至る分子基礎についてできるだけ多くの知見を得ることをめざす。そこで、組織形態形成・再生に関する分子機構の解明を *in vitro* から *in vivo* にわたる研究体制によって進めることにより、高齢者の骨軟骨疾患の病理・病態に対する分子レベルでの理解ならびに組織機能維持・回復に関する知見を得ることを目的とする。渡辺は骨格

系組織構築に必須である骨芽細胞の分化について、分子レベル・細胞レベルについて解析を行うとともに、加齢動物をもちいて、加齢と幹細胞の増殖・分化に関する知見を得ることを目的とする。澁谷は、骨軟骨組織形態形成に必須である骨形成因子（BMP）のシグナル伝達機構の解明により組織構成細胞分化の分子メカニズムを明らかにする。南は、新規の骨軟骨形態形成疾患モデルならびに骨折モデルの病理・病態解析を行い、組織形態形成に関する情報を得る。骨折モデルを用いた組織修復機構の研究は、組織再生から機能回復を導くといった新しい再生医学の基礎となることが期待される。本研究では、骨軟骨組織維持機構の解明は、予防医学的にも有効であると考えられ、超高齢社会を迎えて、高齢者の生活・医療・福祉に貢献するものと考えられる。

## B. 研究方法

### ①骨芽細胞分化に関する研究

加齢マウス（25-28 カ月齢）より骨髓細胞を採取し、分化能について CFU-F, CFU-OB 等の検討を行った。Msx2 脱分化誘導活性を制御し、*in vitro* で分子機構を解析するための機能発現制御システムを構築した。また、Dlxin-1 を bait とした yeast two

hybrid screening を行い、Praj1 を単離し、共発現系で機能解析を行った。

### ②BMP シグナルに関する研究

BMP 受容体に結合し、BMP シグナル調節に関わっていると考えられる BRAM1 に結合する新規分子を yeast two hybrid screening により単離した。ヒト、アフリカツメガエルならびに線虫の相同遺伝子の解析ならびに発現部位検索を行った。また、線虫において個体レベルでの BIP の機能について解析を行った。

### ③軟骨組織形態形成に関わる因子に関する研究

受容体型チロシンキナーゼである Ror2 について yeast two hybrid screening を行い、Ror シグナルに関わる因子の同定を行い、骨軟骨形態形成ならびに骨代謝を深く関わりのある Wnt シグナル伝達系とのクロストークについて共発現系等を用いて解析を行った。

(倫理面への配慮)

平成 12 年度の本研究課題では、ヒトあるいはヒト由来の組織を用いた研究を行っていない。また、動物実験は、各所属施設の動物実験施設指針等に則り、組織材料ならびにモデル等、動物愛護上の配慮をもって行った。

## C. 研究結果と考察

骨芽細胞分化に関する研究では、加齢個体 (25-28 カ月齢マウス) より骨髓を取りだし、接着性細胞分画 (間葉系幹細胞をふくむ細胞群) の分化能を調べたところ、対照群に比べ、骨芽細胞分化能がある細胞 (CFU-OB) または、多分化能を有する細胞 (CFU-F) の両方の値で顕著な低値を示し、Seed 側の問題として、幹細胞となる多分化能を有した細胞群の絶対数が加齢で減少していること、また、in vitro での増殖能が減弱していることを見だし、分化・増殖能の再生に Msx2 の利用を考えた。

BMP シグナルに関する研究では、今までまったく未知であった受容体直下で行われるシグナル制御機構について、昨年度の本研究で発見された Bra1/2 のほ乳類ホモログ BRAM1 の機能制御が、その結合因子 BIP により行われている可能性を、in vitro ならびに in vivo の解析から明らかにした。

軟骨組織形態形成に関わる因子に関する研究では、軟骨形態形成シグナル分子 Ror2 が Wnt シグナルにおいて重要な役割を担う CKIe や Dvl と結合し、クロストークを行っている可能性を見だし、さらに、Wnt5a ノックアウトマウスの解析および in vitro でのシグナル伝達系の解析より、Ror2 と Wnt5a が協調的に JNK の活



性化に関わることを明らかにした。

#### **D. 結論**

骨軟骨形態形成過程において極めて重要であると考えられている BMP シグナル及び Wnt シグナルについて、新規シグナル調節因子 BIP の発見ならびに両シグナルのクロストークに関する新知見を得た。また、加齢マウスの検討では、加齢個体の間葉系幹細胞の in vitro での増殖・分化能の後退を見いだした。

#### **E. 健康危険情報**

本年度、主任および分担研究者において該当なし。

#### **F. 研究発表**

本項目に関しては、分担研究報告と重複するため、分担研究報告および添付した発表論文を参照されたい。

#### **G. 知的所有権の取得状況**

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 2. 分担研究報告書

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

加齢と幹細胞からの骨軟骨組織分化及び再生に関する研究

主任研究者 渡辺 研  
国立療養所中部病院長寿医療研究センター  
老年病研究部 運動・感覚機能研究室長

研究要旨

本年度においては、老化個体における再生能について細胞レベルの解析を行った。骨髄細胞より基質接着性により分離した間葉系細胞について、骨芽細胞分化能についてコロニー法（CFU-F, CFU-OB）により評価を行った。加齢（24～28ヵ月齢）マウス骨髄由来細胞は、CFU-F 及び CFU-OB いずれにおいても低値を示し、また、骨髄間葉系細胞の増殖能も著しく低下していた。これらの問題に対して、分化細胞の脱分化及び増殖を誘導する Msx2 の活性に注目し、その再活性化に関する知見を得るため、Msx2 機能発現調節系を構築した。また、前年度報告した新規分子 Dlxin-1 の機能制御に関わる知見を得た。

A. 研究目的

高齢者の骨軟骨疾患、とりわけ骨粗鬆症と変形性関節症は、骨代謝ならびに軟骨代謝異常であり、組織再生不良がその大きな要因と考えられる。このような疾患に対する再生医療を考える場合、ドナー細胞（Seed）とレシピエントの環境（Soil）がいかに関与し、組織再生に対応しうるかが一つの大きな問題と考えられる。しかしながら、実際は培養条件や BMP 添加などで骨芽細胞誘導がなされているものの、Seed/Soil

を考えるとより効果的な誘導条件の情報が必要であり、その元となる骨芽細胞の分子機構をより詳細に解明・記述することが、基礎研究として重要と考える。本研究では、骨芽細胞分化とそれを誘引するシグナルの分子レベルの基礎研究に重点を置くことにより、分化誘導の分子基礎についてできるだけ多くの知見を得ることをめざしている。本年度においては、加齢マウスから、骨芽細胞や筋肉細胞などの幹細胞である間葉系幹細胞が含まれる骨髄間葉系

細胞を調製し、増殖・分化を検討するとともに、未分化間葉系細胞の増殖を誘導する Msx2 の活性調節システムの樹立、ならびに昨年度本研究により単離された新規因子 Dlxin-1 の機能制御に関する研究を行った。

## B. 研究方法

1. 加齢動物からの骨髄細胞の解析  
加齢マウスより骨髄を取り出し、6 ウェルプレートにウェルあたり  $1.5 \times 10^7$  細胞 (CFU-F) もしくは  $2.5 \times 10^7$  細胞 (CFU-OB) を撒きこみ、15%FCS 及び 1 mM Asc-2-P を含む Phenol Red-free  $\alpha$ MEM 培地で培養した。培地は 5 日毎に交換し、培養 10 日目に alkaline phosphate 活性染色 (CFU-F) を行い、ALP 陽性コロニー数をカウントした。また、培養 28 日目に Alizarin Red 染色を行い、陽性コロニー数をカウントし、CFU-OB とした。
2. Dlxin-1 の機能制御に関する研究  
昨年度、本研究により得られた骨芽細胞分化に関わる因子 Dlx5 及び Msx2 に会合する新規分子 Dlxin-1 について、yeast two hybrid screening を行い、クローンを得た。そのうち、mouse praj1 に相当する分子について、発現ベクターを作製し、タンパクレベルの研究、とりわけ、ubiquitin 化に関して実験を行った。
3. 細胞分化制御因子 Msx2 の機能検

## 索系の構築

mouse Msx2 に tamoxifen にのみ活性化される Estrogen Receptor  $\alpha$  のリガンド結合部位 (ER<sup>TM</sup>) を融合させた Msx2ER を発現するベクターを構築した。また、その ERTM 融合タンパクを効率よく発現させるベクター (pLPCXER) を puromycin 耐性で選択可能なレトロウイルスベクター上に作製し、さまざまな因子の活性調節システムを確立した。

(倫理面への配慮)

ヒトあるいはヒト由来の組織等を用いた研究は現在のところ行っていない。また動物実験は長寿医療研究センター動物実験指針に基づいて行っている。

## C. 研究結果

加齢マウスからの骨髄細胞における CFU-F 及び CFU-OB は 12 ヶ月齢未満の個体より得られた CFU より著しく低下しており、骨髄中の幹細胞数が低下している可能性が考えられた。また、ALP 陽性コロニーと陰性コロニーの比は対照群と有為な差を認めないことから、加齢マウスから得られた骨髄間葉系細胞は長期培養において増殖が低下しており、分化能そのものより増殖能が低下している可能性も考えられた。そこで、間葉系細胞の脱分化ならびに細胞増殖を誘導する活性をもつ Msx2 の作用に着目し、その脱分化な

らびに増殖活性化の分子メカニズムを解析するため、Msx2 による脱分化誘導系を構築した。エストロゲン受容体 (ER) のリガンド結合ドメインはリガンド非存在下では細胞質で Hsp 群と結合し不活性型となっているが、リガンド存在下では Hsp 群と解離し、核内へ移行して活性型となることが知られている。その性質を利用して、Msx2 の C 末端に ER のリガンド結合ドメインに変異を加え、tamoxifen (TMX) にのみ活性化される ER<sup>TM</sup> を融合させ、Msx2 の活性制御するベクターを作製し、骨芽細胞に発現させた。Msx2ER は、TMX 非存在下では細胞質に存在しているが、TMX 処理により迅速に核内へと移行する。その核内移行誘導系で宿主の骨芽細胞の分化指標となる Alkaline Phosphatase (ALP) 活性でモニターしたところ、対照群 (pLPCXER) では TMX 処理で変化がなかったが、Msx2ER 発現細胞において ALP 活性低下が観察された。また、昨年度の本研究課題で得られた Dlxin-1 が Praja1 と会合し、また、共発現により Dlxin-1 タンパク発現量の低下が観察された。Praja1 は RING finger 領域を有すことから、ubiquitin ligase 活性をもつ可能性が考えられたので、共発現系において、proteasome inhibitor (MG132) を加えると、Dlxin-1 の ubiquitin 化され

た高分子量タンパクが見られた。この ubiquitin 化は、Praja1 の RING finger 領域に ubiquitin ligase 活性を失う変異を入れたものでは見られなかったことから、Dlxin-1 は Praja1 により ubiquitin 化されることにより機能調節されている可能性が示された。

#### D. 考察

本年度の研究から、加齢個体からの骨形成を担う骨芽細胞の幹細胞を含む骨髄間葉系細胞が骨髄中で低下しており、また、増殖能が低い事が明らかとなった。これは、加齢個体と若齢個体での移植実験での加齢動物をドナーとする実験において、加齢個体を多く利用するか、継代数を増やす必要性が認められた。そのため、幹細胞にのみ頼るのではなく、分化細胞を用いた系を利用する事、及び間葉系細胞分化の分子メカニズムを解析するために、最近、分化細胞を脱分化させる活性が報告された Msx2 の作用に着目し、Msx2ER 融合タンパクを用いて、機能探索系を構築した。今後、この系を用いて、遺伝子発現変化から下流遺伝子の検討、ならびにこれらの下流因子の脱分化・分化への関与について解析を行う予定である。また、昨年度本研究により単離した Dlxin-1 が Praja1 の ubiquitin ligase 活性によるタンパク質安定化制御により機能調節されている可能性を示した。

これは、Dlxin-1 が単純に遺伝子発現のみで機能調節されているわけではなく、他の分子との会合などによりタンパク質レベルで活性制御されている事を示しており、今後、リン酸化を含めた分子上の修飾においても検討を深める予定である。また、個体レベルでのDlxin-1 分子機能の理解に結びつけるため、Dlxin-1 のノックアウトマウスを作製を行っている。

#### E. 結論

加齢マウスからの骨髄間葉系細胞の増殖能が低いことから、マウス個体数または継代数を増やす必要があることがわかった。また、その増殖能・分化能を高めるため、Msx2 の利用を考え、機能制御系を確立した。その Msx2 に結合する新規分子 Dlxin-1 の機能制御が Praja1 による ubiquitin 化により行われている可能性を示した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Sasaki, A., Masuda, Y., Ohta, Y., Ikeda, K., & Watanabe, K. Filamin associates to Smads and regulates the receptor mediated signaling. *J. Biol. Chem.* (2001) 276:17871-17877.

Sato, T., Shibata, T., Ikeda, K., & Watanabe, K. Generation of bone-resorbing osteoclasts from B220-positive cells: its role in accelerated osteoclastogenesis due to estrogen deficiency. *J. Bone Miner. Res.* (2001) 16:2215-2221.

Shibata, T., Shira-ishi, A., Sato, T., Masaki, T., Sasaki, A., Masuda, Y., Hishiya, A., Ishikura, N., Higashi, S., Uchida, Y., Saito, M., Ito, M., Ogata, E., Watanabe, K., & Ikeda, K. Vitamin D hormone inhibits osteoclastogenesis in vivo by decreasing the pool of osteoclast precursors in bone marrow. *J. Bone. Miner. Res.* (2002) *in press*

##### 2. 学会発表等

新鞍陽平、菱谷彰徳、佐々木文、池田恭治、渡辺 研 コラーゲン受容体 DDR2 のシグナル伝達機構 第 19 回日本骨代謝学会年会 8 月 8～11 日 名古屋

佐々木文、増田芳子、池田恭治、渡辺 研 Dlx5 の転写機能は RING finger 蛋白 praja1 によって制御される 第 19 回日本骨代謝学会年会 8 月 8 日～11 日 名古屋

Hishiya A, Mizuno K, Niikura Y, Sasaki A, Ikeda K and Watanabe K.

DDR2, a collagen receptor, interacts with Jab-1 and activates MMP1 promoter through AP-1. The 23rd annual meeting, American Society for Bone & Mineral Research. 10月12日～16日 Phoenix, Arizona, USA.

Sasaki A, Ikeda K and Watanabe K. The transcription function of Dlx5 is regulated by a RING-finger protein praja-1 through ubiquitin-dependent degradation of Dlxin-1, a Dlx/Msx-interacting protein. The 23rd annual meeting, American Society for Bone & Mineral Research. 10月12日～16日 Phoenix, Arizona, USA.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

骨軟骨組織形態形成における骨形成因子の作用機構に関する研究

分担研究者 澁谷 浩司

東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授

### 研究要旨

yeast two-hybrid スクリーニングにより，BMP receptor associated molecule (BRAM)に結合する因子，BRAM interacting protein (BIP)をクローニングした。BIP は human, *Xenopus*, *C. elegans* においてよく保存され、*C. elegans* BIP は *C. elegans* BRAM ホモログ BRA-1, BRA-2 と結合することが明らかとなった。また、その結合部位は BRA-1, BRA-2 および human BRAM で極めて高い相同性を示す C 末端側であった。*C. elegans* BIP の発現部位は咽頭筋，hypodermis，尾部神経であり，これらは BRA-1, BRA-2 の発現部位と一致することから，*in vivo* においても BIP は BRA-1, BRA-2 の両者と相互作用するものと考えられた。さらに *C. elegans* BIP の機能欠失で体長が短くなる *Sma* の表現型を示し、*sma* 経路のシグナル伝達分子とのエピスタシス解析の結果から，BIP は *sma* 経路に参与して体長を調節しているものと考えられた。

#### A. 研究目的

生物の発生過程においては，多種多様の成長因子や細胞内シグナル伝達因子がダイナミックに機能して生物固有の形や器官の構造を形成していることが分かってきた。なかでも TGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する TGF- $\beta$ , activin, BMP などは，細胞増殖，分化誘導，背腹軸決定，骨形成

など多彩な生理活性を有している。

TGF- $\beta$ スーパーファミリーの作用機構は線虫，ショウジョウバエ，アフリカツメガエル，ホ乳類などで詳細に研究されており，その基本経路は種を越えて良く保存されていることが明らかとなっている。TGF- $\beta$ シグナル伝達を担う分子は，細胞外にあるリガンド，細胞膜上に存在する type



I および type II の2種類の受容体、そして受容体によって活性化されてシグナルを核内へ伝達する Smad 分子である。これらのように種を越えて共通に使われるシグナル伝達分子の他に、最近ではシグナル特異性を決定するような修飾分子や種特異的な分子もクローニングされており、シグナル伝達系の全貌が明らかになりつつあるとともに、種間の多様性を議論することも可能になりつつある。本年度は TGF- $\beta$ シグナル伝達に関わる新規分子を取得することを目的として、yeast two-hybrid スクリーニングにより BMP receptor associated molecule (BRAM)に結合する因子、BRAM interacting protein (BIP)をクローニングした。元来 BRAM は BMP type IA 受容体の細胞内ドメインおよび TAB1 (TAK1 binding protein 1)に結合するシグナル伝達因子であり、これに結合する因子は TGF- $\beta$ シグナル伝達系に関与することが予想された。そこで本研究では BIP の線虫相同遺伝子を単離し、解析を進め、このシグナル機構を明らかにし、TGF- $\beta$ シグナル伝達機構の詳細な解明を目指した。

## B. 研究方法

yeast two-hybrid スクリーニングによってアフリカツメガエルの cDNA

ライブラリーから BIP をクローニングし、データベースよりアフリカツメガエル BIP の線虫相同遺伝子を見出し、その遺伝子を得た。次に GFP 融合遺伝子を構築し、発現領域を観察した。また、BIP 遺伝子に対して二重鎖 RNA 阻害実験 (dsRNAi) を行った。

(倫理面への配慮)

ヒトあるいはヒト由来の組織等を用いた研究は現在のところ行っていない。また動物実験は東京医科歯科大学動物実験指針に基づいて行っている。

## C. 研究結果

yeast two-hybrid スクリーニングによってアフリカツメガエルの cDNA ライブラリーからクローニングした BIP の配列をもとに相同タンパクを検索したところ、BIP ホモログはヒト、アフリカツメガエル、線虫 *C. elegans* に存在していた。*C. elegans* においては既に BRAM ホモログとして BRA-1, BRA-2 がクローニングされており、*C. elegans* BIP がこれらと相互作用することが期待されたので、*C. elegans* をモデル動物として BIP の機能解析を行うこととした。*C. elegans* BIP は 733 アミノ酸をコードし、シグナル配列は持たないことから細胞内タンパクであると推定された。*C. elegans* BIP

と BRAM の線虫ホモログである BRA-1, BRA-2 の相互作用を検討するために免疫沈降とウェスタンブロットティングを行ったところ, *C. elegans* BIP は BRA-1, BRA-2 の両者と結合することが明らかとなった。BRA-1, BRA-2 の結合部位は C 末端側であり, この部分は human も含め BRAM ホモログで相同性が高い部分であることから, BIP が BRAM ホモログの C 末端側と結合することは種を越えて保存されているものと考えられた。次に *C. elegans* BIP の組織発現を検討した。BIP プロモーター領域に GFP 遺伝子を結合させたプラスミドを構築し, 野生型の線虫に強制発現させたところ, 咽頭筋と hypodermis で強い発現が見られたほか, 尾部の神経細胞にも発現が認められた。尾部神経での発現は, 線虫の *daf* シグナル伝達経路の type I 受容体である DAF-1 およびそれに結合する BRA-1 の発現部位とオーバーラップするものであり, また, 咽頭筋と hypodermis での発現は, *sma* シグナル伝達経路の type I 受容体である SMA-6 およびそれと相互作用すると考えられる BRA-2 の発現部位と重なっている。前述の BIP と BRA-1 および BRA-2 が結合するという結果と, 組織発現がオーバーラップするという結果から, *C. elegans* BIP は BRA-1 あるいは

BRA-2 を介して *daf* 経路あるいは *sma* 経路に関与している可能性が考えられた。

次に *C. elegans* BIP の機能解析のため, double stranded RNA interference (dsRNAi) という手法を用いて BIP の機能欠失(loss of function)を検討した。野生型の線虫に BIP dsRNA をインジェクションし, F1 を観察したところ体長の短い個体が認められた。測定の結果, 野生型の体長は  $1.18 \pm 0.09$  mm (平均 $\pm$ 標準偏差) であるのに対し, BIP dsRNA をインジェクションした群では  $1.00 \pm 0.09$  mm と, BIP の機能欠失によって体長の短い *Sma* (small) の表現型を示すことが明らかとなった。このことから BIP は BRA-2 と相互作用して *sma* 経路を調節している可能性が示唆された。そこで次に, BIP が *sma* 経路に関与していることを確かめるためにエピスタシス解析を行った。*sma* 経路のリガンドである DBL-1 の過剰発現変異体 *dbl-1(++)* に対する BIP dsRNAi の作用を検討したところ, *dbl-1(++)* の体長は 1.53mm であるが, これに BIP dsRNAi をインジェクションした群では, 体長が 1.24mm まで短くなり野生型と同程度になる個体が認められた。このことは, リガンドの過剰発現によってシグナル伝達が過剰になった *sma* 経路に対して BIP の発現を dsRNAi で抑

制したためにシグナルが正常に戻って野生型と同じ体長を示す個体が出現したことを意味している。さらに、*sma* 経路の標的遺伝子の1つである *lon-1* の機能欠失変異体について dsRNAi を行ったが、この変異体に対しては作用が全く認められなかったことから、*C. elegans* BIP は *sma* 経路においてリガンド DBL-1 より下流かつ標的遺伝子である LON-1 より上流に位置することが確認された。

#### D. 考察

先に述べたように BIP が BRA-2 と結合することと、type I 受容体である SMA-6 および BRA-2 と組織発現が一致することを考えると、BIP は BRA-2 に作用して *sma* 経路をポジティブに調節するか、あるいは SMA-6 が細胞内シグナル伝達因子である SMA-2, SMA-3, SMA-4 を活性化する過程をポジティブに調節している可能性が高いと思われる。今後のさらなる課題としては遺伝学的解析および分子生物学的解析による *C. elegans* BIP の作用メカニズムの詳細な検討、oxysterol binding protein 様モチーフの機能の解明および *daf* 経路における BIP の役割などを明らかにしていくことが重要であると考えられた。

#### E. 結論

BIP の詳細な作用点解明には BIP と細胞内シグナル伝達分子との相互作用を遺伝学的あるいは分子生物学的に明らかにすることが必要と考えられるが、BIP が BRA-2 と結合することと、BRA-2 および SMA-6 と組織発現が一致すること、そしてエピスタシス解析の結果から考えると、(1) *sma* 経路をネガティブに調節している BRA-2 の作用を抑制することで *sma* 経路をポジティブに調節している可能性 (2) type I 受容体である SMA-6 が細胞内シグナル伝達因子である SMA-2, SMA-3, SMA-4 を活性化する過程をポジティブに調節している可能性などが考えられる。今後のさらなる課題としては *C. elegans* BIP の作用メカニズムの詳細な検討、oxysterol binding protein 様モチーフの機能および *daf* 経路における BIP の役割などを解明してゆくことが重要であるとともに、human BIP の機能解析にも興味を持たれる。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Masuda, Y., Sasaki, A., Shibuya, H., Ueno, N., Ikeda, K. and Watanabe, K. (2001). Dlxin-1, a novel protein that binds Dlx5 and regulates its

transcriptional function. **J. Biol. Chem.** 276, 5331-5338.

Ohnishi, J., Ohnishi, E., Jin, M., Hirano, W., Nakane, D., Matsui, H., Kimura, A., Sawa, H., Nakayama, K., Shibuya, H., Nagashima, K. and Takahashi, T. (2001). Cloning and characterization of a rat ortholog of MMP-23 (Matrix metalloproteinase-23), a unique type of membrane-anchored matrix metalloproteinase and conditioned switching of its expression during the ovarian follicular development. **Mol. Endocrinol.** 15, 747-764.

Morita, K., Shimizu, M., Shibuya, H. and Ueno, N. (2001). A DAF-1-binding protein BRA-1 is a negative regulator of DAF-7 TGF- $\beta$  signaling. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 98, 6284-6288.

Sugawara, K., Morita, K., Ueno, N. and Shibuya, H. (2001). BIP, a BRAM-interacting protein involved in TGF- $\beta$  signaling, regulates body length in *C. elegans*. **Genes Cells** 6, 599-606.

Shirakabe, K., Terasawa, K., Miyama, K., Shibuya, H. and Nishida, E. (2001).

Regulation of the activity of the transcription factor Runx2 by two homeobox proteins, Msx2 and Dlx5. **Genes Cells** 6, 851-856.

Yanagisawa, M., Nakashima, K., Takeda, K., Ochiai, W., Takizawa, T., Ueno, M., Takizawa, M., Shibuya, H. and Taga, T. (2001). Inhibition of BMP2-induced, TAK1 kinase-mediated neurite outgrowth by Smad6 and Smad7. **Genes Cells** 6, 1091-1099.

Hyodo-Miura, J., Urushiyama, S., Nagai, S., Nishita, M., Ueno N. and Shibuya, H. (2002). Involvement of NLK and Sox11 in neural induction in *Xenopus* development. **Genes Cells** *in press*.

## 2. 学会発表

なし。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし。

### 2. 実用新案登録

なし。