

109. SOX9 翻訳後修飾による骨格形成制御機構の解析

乾 雅史

*国立成育医療研究センター研究所 システム発生・再生医学研究部

Key words : SOX9, 翻訳後修飾, 内軟骨性骨化, SUMO 化

緒言

哺乳類の発生過程において骨の形が正確に規定されるメカニズムは不明である。*Sox9* 遺伝子は軟骨分化のマスター転写因子であり、間充織凝集から軟骨組織の形成に重要な役割を果たす¹⁾。*Sox9* 遺伝子のヘテロ変異マウスやトランスジェニックマウスが骨格に異常を示すことから、正常な骨格形成のためには SOX9 の活性が定量的に厳密に制御されていなければならないことが示唆されており^{2,3)}、これまでに転写、microRNA、翻訳後修飾など様々な制御機構が報告されている⁴⁾。しかしながらこれらの制御機構の知見は培養細胞等を用いたものであり、その生体内での役割については明らかではない。本研究において我々は CRISPR/Cas9 システムを用いてマウス受精卵ゲノムの *Sox9* 遺伝子に点変異を導入し翻訳後修飾標的のアミノ酸 K396 を R に改変することでこのアミノ酸を介した翻訳後修飾が起らない SOX9K396R マウスを作製し、骨格形成における K396 を介した翻訳後修飾の役割を検証した。

方法、結果および考察

1. SOX9K396R マウスの作製

マウス受精卵に *Sox9* 遺伝子の exon3 を認識する gRNA、Cas9 mRNA 及び鋳型となる ssODN を顕微注入することにより SOX9K396R マウスを作製した⁵⁾。

2. SOX9K396R マウスの骨格の観察

出生後 1 日目の SOX9K396R マウスの骨格を観察するためにアリザリンレッド及びアルシアンブルーを用いて染色を行った。その結果、SOX9K396R マウスにおいて内軟骨性骨化の遅延（アルシアンブルー陽性領域の拡大・アリザリンレッド陽性領域の減少）が観察された（図 1A-D）。また、四肢及び尾部においてアリザリンレッド陽性領域の数を計測したところ K396R ヘテロ変異マウスでも中間的な表現型が見られたことから SOX9 の量依存的に骨格形成に表現型が観察されることが確認された。また、6 ヶ月齢の成体の骨組織を microCT により観察したところ、SOX9K396R マウスにおいて大腿骨や骨盤の形状が変化していることが観察された（図 1E-H）。これらの表現型は SOX9 の機能亢進を示唆するため、SOX9 の K396 に対する翻訳後修飾は抑制性であることが示された。また、SOX9 ヘテロ変異マウスに置いて見られる骨格異常が K396R アレルにより改善されることから K396R 変異は SOX9 の機能亢進であることが確かめられた。

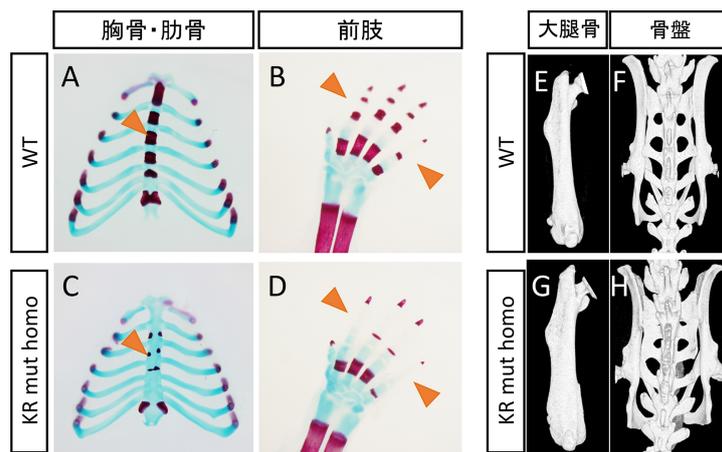


図1. SOX9K396R マウスの骨格の解析

A-D) 出生後1日目の骨格のアリザリンレッド/アルシアンブルー染色。野生型の胸骨 (A) や前肢 (B) と比較して SOX9K396R マウス (C, D) ではアリザリンレッド陽性の骨化した領域 (矢頭) が減少している。

E-H) 6ヶ月齢の成体骨組織の microCT 観察。野生型の大腿骨 (E) や骨盤 (F) と比較して SOX9K396R マウス (G, H) では大腿骨が太くなり椎骨の癒合が見られる。

3. SOX9K396R 変異による SOX9 機能亢進メカニズムの解析

SOX9 の K396 に対する翻訳後修飾についてその分子の実体及び作用機序を検討した。まず SOX9K396R マウスの軟骨において SOX9 タンパク質の発現量は野生型と大きく変化しておらず、またいずれもプロテオソーム阻害剤により安定化したことから K396 に対する修飾は分解性ではないことが示された (図 2A)。野生型及び K396R 変異形 SOX9 の翻訳後修飾を比較した結果、K396R 変異により SUMO 化は著しく減少した一方でユビキチン化には大きな変化がなかったことから K396 に対する翻訳後修飾は主に SUMO 化であることが示唆された (図 2B-D)。

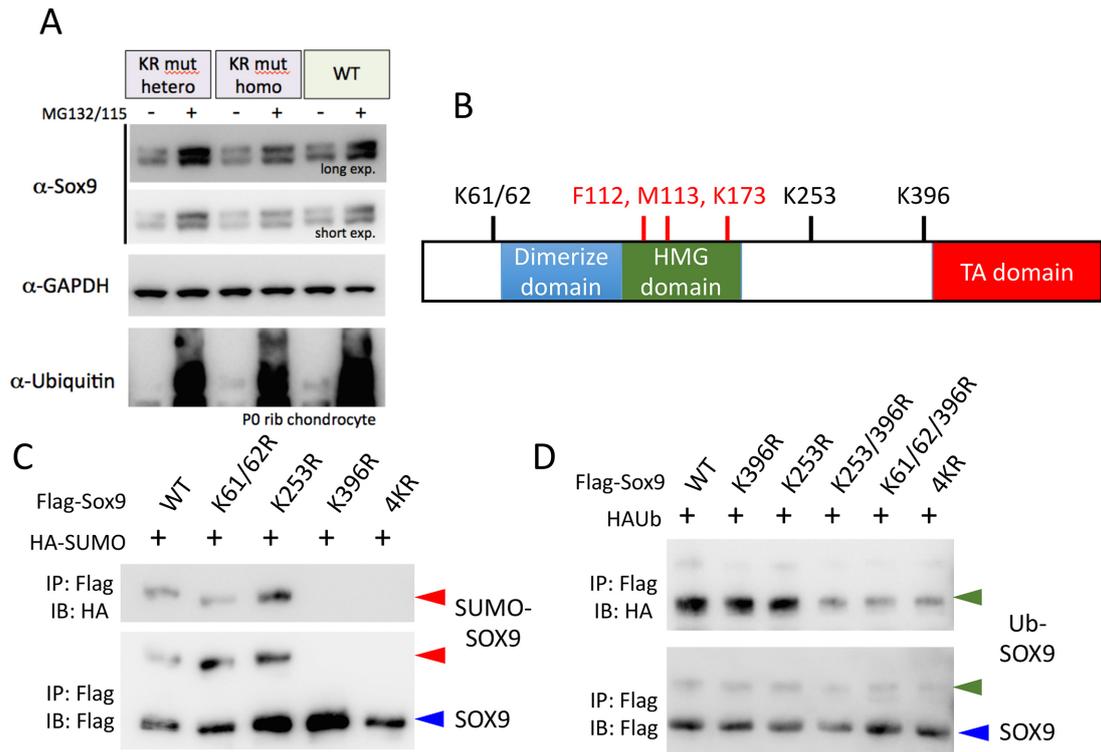


図 2. SOX9K396R 変異による SOX9 タンパク質の解析

- A) SOX9K396R マウスの軟骨における SOX9 タンパク質発現のウェスタンブロット解析。SOX9K396R マウスの軟骨でも SOX9 タンパク質の発現レベルは野生型と同様であり、また MG132/115 処理により安定化する。
- B) マウス SOX9 タンパク質のドメイン構造と変異標的のアミノ酸。SOX9 タンパク質の各機能ドメインを青、緑、赤色で示し、ユビキチン化・SUMO 化の標的となるリジンを黒字で、DNA 結合を阻害する変異標的のアミノ酸を赤字で示す。
- C) リジン点変異 SOX9 タンパク質の SUMO 化。K396 に変異が入ると SUMO 化は抑制されるが他のリジンの変異では変化がない。
- D) リジン点変異 SOX9 タンパク質のユビキチン化。いずれのリジンの変異でもユビキチン化の顕著な抑制は見られないが複数のリジンの変異で減少する。

SUMO を C 末端に in-frame に融合させた SUMO-SOX9 をマウス軟骨細胞に過剰発現させると *Collagen type II* (*Col2a1*) や *Aggrecan* (*ACAN*) などの SOX9 標的遺伝子の発現を抑制することが見出された (図 3A-E)。また、SOX9 の DNA 結合ドメインにミスセンス変異があり DNA 結合能が失われた SOX9 では SUMO 化が観察されなかったことから SUMO 化は DNA 結合によって引き起こされるネガティブフィードバック機構であることが示唆された (図 3F, G)。

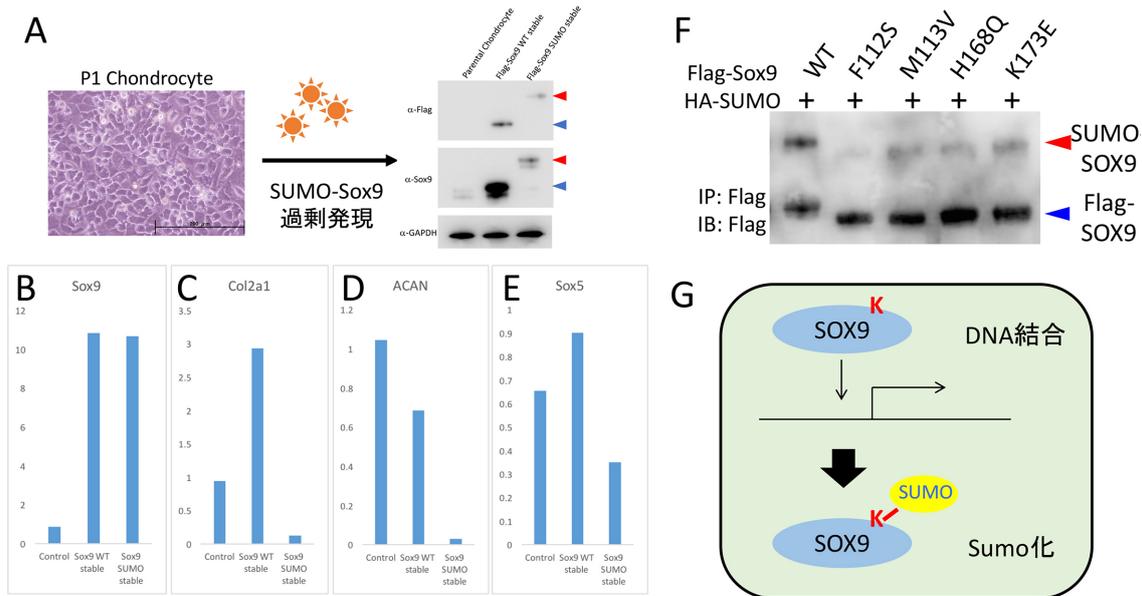


図3. SUMO化SOX9によるSOX9機能のネガティブフィードバック

A) マウス軟骨細胞におけるSUMO-SOX9の過剰発現の模式図。マウス出生1日目の肋軟骨にレトロウイルスを用いてSOX9あるいはSUMO-SOX9タンパク質を発現させ、ウェスタンブロッティングで確認した(矢頭)。

B-E) SOX9あるいはSUMO-SOX9を過剰発現させた軟骨における標的遺伝子の発現。レトロウイルスの感染によりSUMO-SOX9の発現が誘導され(B)、その結果Col2a1(C)、ACAN(D)、Sox5(E)の発現が抑制された。

F) DNA結合ドメイン点変異SOX9タンパク質のSUMO化。DNA結合ドメイン中に変異が入るとSUMO化が抑制された。

G) SOX9のSUMO化によるネガティブフィードバックの模式図。SOX9は標的遺伝子の発現を制御するためにDNAに結合するとSUMO化され機能が抑制される。

以上の結果より、SOX9タンパク質はK396に対するSUMO化によって機能が抑制されること、このSUMO化はネガティブフィードバック機構であり、発生中の軟骨細胞でこれが失われると骨格異常が起こることから骨格の正確性に寄与するものであることが示唆された。

文献

- 1) Lefebvre V, Dvir-Ginzberg M. SOX9 and the many facets of its regulation in the chondrocyte lineage. *Connect Tissue Res.* 2017 Jan;58(1):2-14. doi: 10.1080/03008207.2016.1183667. Epub 2016 Apr 29. PubMed PMID: 27128146; PubMed Central PMCID: PMC5287363.
- 2) Bi W, Huang W, Whitworth DJ, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jun 5;98(12):6698-703. Epub 2001 May 22. PubMed PMID: 11371614; PubMed Central PMCID: PMC34415.
- 3) Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang R, Zhang Z, Deng JM, Taketo MM, Nakamura T, Behringer RR, McCrean PD, de Crombrughe B. Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev.* 2004 May 1;18(9):1072-87. PubMed PMID: 15132997; PubMed Central PMCID: PMC406296.

- 4) Kawakami Y, Rodriguez-León J, Izpisua Belmonte JC. The role of TGFbetas and Sox9 during limb chondrogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2006 Dec;18(6):723-9. Epub 2006 Oct 16. Review. PubMed PMID: 17049221.
- 5) Inui M, Miyado M, Igarashi M, Tamano M, Kubo A, Yamashita S, Asahara H, Fukami M, Takada S. Rapid generation of mouse models with defined point mutations by the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep.* 2014 Jun 23;4:5396. doi: 10.1038/srep05396. PubMed PMID: 24953798; PubMed Central PMCID: PMC4066261.