

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

FOP の治療を目指した BMP シグナル抑制因子 Zranb2 の同定と機能解析

研究分担者 片桐岳信 埼玉医科大学ゲノム医学研究センター病態生理部門 教授  
研究協力者 大手 聡 埼玉医科大学ゲノム医学研究センター病態生理部門 助教

研究要旨 進行性骨化性線維異形成症 (FOP) は、骨形成を促す BMP 受容体の 1 種 ALK2 の活性型変異によると考えられる。BMP の骨形成作用を伝達する転写因子 Smad の新規制御因子を探索し、Zinc-finger, RAN-binding domain-containing protein 2 (Zranb2) を同定した。Zranb2 は R-Smad に結合し、Smad 複合体の標的遺伝子の転写活性を抑制した。従って、Zranb2 は FOP のような BMP 活性による骨形成を伴う疾患に対する新しい創薬標的分子になる可能性が示唆された。

A. 研究目的

進行性骨化性線維異形成症 (Fibrodysplasia ossificans progressiva, FOP) は、主に筋組織の中で異所性骨化が進行する遺伝性疾患で、2006 年、ヒト 2 番染色体上の BMP 受容体をコードする ACVR1/ALK2 が責任遺伝子として同定された。これまでに我々は、国内 FOP 症例の 1 例を除く全ての症例において ALK2 タンパク質の 206Arg が His 残基に変わる典型的な変異を有することを報告し、さらに、この変異体 ALK2 がリガンド非依存的に BMP の転写因子 Smad を介した細胞内情報伝達系を活性化することを明らかにした。そこで本研究では、FOP の治療法への応用を目指して、BMP の骨形成作用を伝達する Smad の新規制御因子を探索した。その結果、R-Smad と結合する Zranb2 を同定することに成功すると共に、Zranb2 が Smad の転写活性抑制因子であることを明らかにした。

B. 研究方法

HEK293T 細胞に FLAG-タグを付加したマウス Smad1 を過剰発現させ、抗 FLAG 抗体を

用いて細胞内で Smad1 と複合体を形成する分子を免疫沈降法で濃縮した。Smad 複合体の構成成分を SDS-PAGE で分画した後、各タンパク質を LC-MS/MS 解析で同定した。その中に、本研究で解析した Zinc-finger, RAN-binding domain-containing protein 2 (Zranb2) が見出された。マウス筋芽細胞 C2C12 から調整した cDNA を用いて、Myc タグを付加した Zranb2 をクローニングし、発現ベクターを構築した。

Zranb2 と Smad の結合は、抗 Myc 抗体と抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降とウエスタンブロット法で解析した。Zranb2 の BMP 活性に対する作用は、C2C12 細胞の骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリホスファターゼ (ALP) 活性、BMP 初期応答遺伝子の Smad 結合配列を含む Id1 ルシフェラーゼレポーター (Id1WT4F-luc) アッセイで定量化した。さらに、Zranb2 の細胞内局在は、抗 Myc 抗体を用いた免疫染色法で検出した。Zranb2 のリン酸化 Smad レベルに対する作用は、ウエスタンブロット法と抗リン酸化 Smad1/5/8 抗体を用いた免疫染色法で解析した。Smad の DNA 結合能は、ビオチン化し

た Id1 の Smad 結合配列を 4 個タンデムに配置した標的 DNA を用いて、ストレプトアビジンビーズを用いた沈降-ウエスタンブロット法で解析した。

(倫理面での配慮)

なし。

### C. 研究結果

FLAG-Smad1 と相互作用する分子を HEK293T 細胞を用いて探索した結果、ZNRANB2 と一致するシグナルが同定された (図 1 A)。Myc タグを付加した Zranb2 は、BMP 受容体によってリン酸化される Smad1 (図 1B)、Smad5、Smad8 と結合したが (data not shown)、Smad4 との結合はほとんど認められなかった (図 1B)。Zranb2 と Smad1 の結合は、BMP-4 刺激の有無で変化しなかった (図 1 C)。

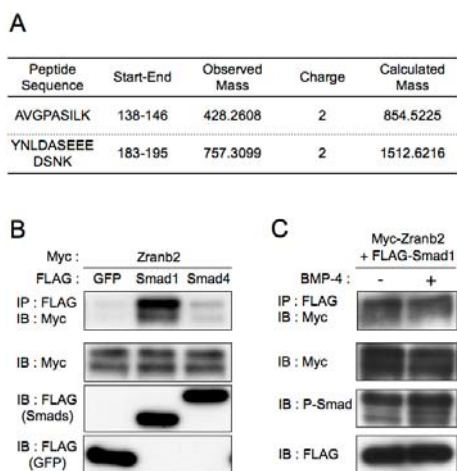


図 1. Zranb2 の同定と Smad との結合能

マウス筋芽細胞 C2C12 を用いて、BMP シグナルに対する Zranb2 の効果を検討した。Zranb2 の過剰発現は、BMP 受容体の構成的活性型変異体である BMPR-IA(Q233D) (図 2A) および ALK2(R206H) と Smad1 の共発現で誘導される ALP 活性 (data not shown)、

骨芽細胞分化に重要な転写因子 Osterix の発現を抑制した (図 2B)。さらに、Zranb2 の過剰発現により、BMP-4 刺激で誘導される Smad 標的遺伝子のルシフェラーゼレポーター活性も抑制された (図 2C)。

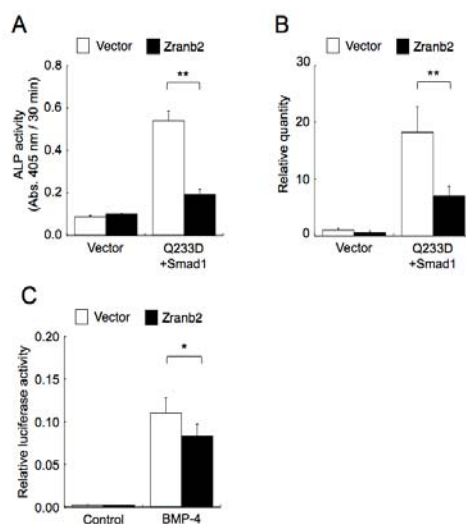


図 2. Zranb2 による BMP 活性の抑制

欠失変異体の作成により、Zranb2 の BMP シグナル抑制作用に重要なドメインを解析した (図 3A)。細胞内の局在は、Zranb2 内の 2 つの Zn フィンガーや Glu ドメインを欠失させても、野生型と同様に核内に認められた (図 3B)。一方、C 末端側に位置する Ser-Arg (SR) リッチドメインを欠失させると細胞質に局在し、SR リッチドメインだけを発現させると核内に集積することが判明した (図 3B)。

これらの変異体を用いて、BMPR-IA(Q233D) と Smad1 の共発現で誘導した ALP 活性に対する作用を検討すると、核内に局在した Zranb2 変異体は全て ALP を抑制したが、細胞質に局在した ΔSR 変異体はむしろ ALP 活性を促進した (図 3C)。

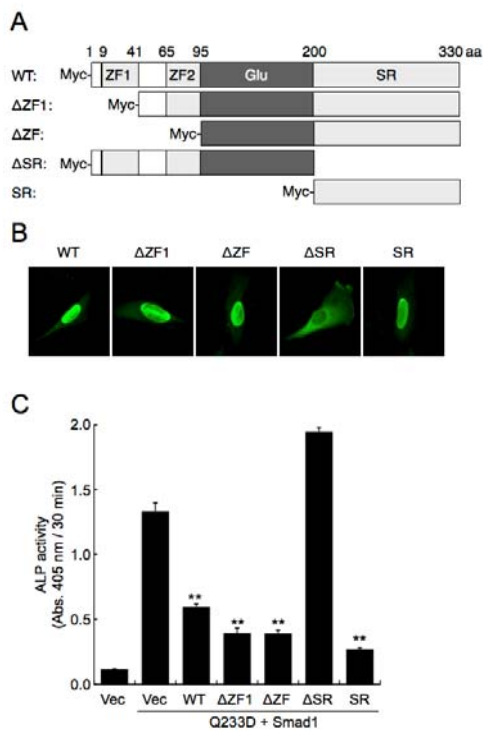


図3. Zranb2の活性ドメインの解析

Zranb2 の作用機序を解明するため、リン酸化 Smad に対する影響を検討した。その結果、Zranb2 を過剰発現しても、Smad1 のリン酸化レベルや (図 4A)、細胞内の核への集積には変化が認められなかった (図 4B)。

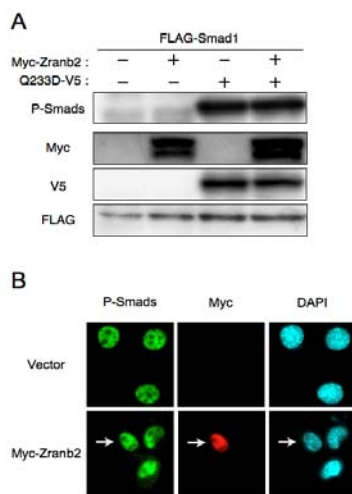


図4. Zranb2のリン酸化Smadへの影響

そこで、Zranb2 に対する siRNA を用いて、ノックダウンによる Smad の DNA 結合能を検討した。2 種類の異なる siRNA は、いずれも内在性 Zranb2 のタンパク質レベルを減少させた。この条件下で Smad1 の DNA 結合能を解析すると、scramble RNA を導入したコントロール群と差が認められないことが判明した (図 5A)。一方、Zranb2 siRNA の導入により、BMP-4 刺激で誘導される Id1WT4F-luc の活性が上昇した (図 5B)。

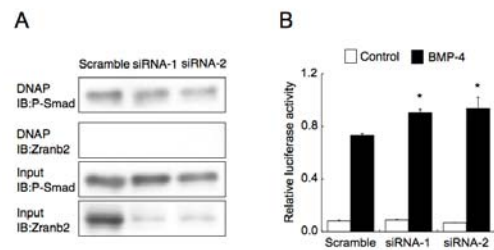


図5. Zranb2 siRNAの影響

#### D. 考察

FOP は、BMP 受容体の 1 種である ALK2 の活性化によって引き起こされる。これまでの我々の研究から、BMP 受容体の下流で骨形成促進作用を伝達するのは、主に転写因子 Smad を介した細胞内情報伝達経路であることが判明している。そこで、Smad の活性を制御する新規分子を探索する目的で、FLAG-Smad1 を用いて結合分子を解析した結果、Zranb2 を同定した。

Zranb2 は、Zn フィンガーを介して RNA に結合することで、ある種の RNA のスプライシングに関与する可能性が報告されている。我々の解析結果から、Zranb2 は BMP 活性を抑制することが明らかとなったが、この抑制活性に Zn フィンガー領域は必須ではなかった。このことから、Zranb2 は従来の報

告のような RNA のスプライシングを介して BMP 活性を抑制するのではなく、別の機序で BMP 活性を抑制すると考えられた。

Zranb2 を過剰発現させても、Smad のリン酸化レベルや各集積には影響せず、標的遺伝子の転写が抑制された。また、Zranb2 は Smad 複合体の DNA への結合にも影響しなかった。これらの結果より、Zranb2 は DNA に結合した Smad 複合体の転写活性を抑制するものと予想された。Smad の転写活性には p300 などのコアクチベータが必要であることから、Zranb2 はこれらと Smad の相互作用を阻害するか、転写活性を抑制するコリプレッサーをリクルートする可能性が考えられる。

#### E. 結論

Zranb2 は、BMP の骨形成作用を抑制する新規 Smad 結合因子であった。Zranb2 の発現を促進するような化合物は、FOP のような BMP シグナルを介した異所性骨化の新しい創薬標的分子となる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記載。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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*, in press.

2) Ohte S, Shin M, Sasanuma H, Yoneyama K, Akita M, Ikebuchi K, Jimi E, Maruki Y, Matsuoka M, Nanba A, Tomoda H, Okazaki Y, Ohtake A, Oda H, Owan I, Yoda T, Furuya H, Kamizono J, Kitoh H, Nakashima Y, Susami T, Haga N, Komori T and Katagiri T. (2011) A novel mutation of ALK2, L196P, found in the most benign case of fibrodysplasia ossificans progressiva activates BMP-specific intracellular signaling equivalent to a typical mutation, R206H. *Biochem Biophys Res Commun* 407:213-218.

3) Kaplan FS, Shore EM, Pignolo RJ (eds), Katagiri T and The International Clinical Consortium on FOP (2011) The medical management of fibrodysplasia ossificans progressiva: current treatment considerations. *Clin Proc Intl Clin Consort FOP* 4:1-100.

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.

##### 2. 学会発表

1) Katagiri T: Heterotopic bone formation and muscle regeneration. 第 32 回日本炎症・再生医学会 シンポジウム (2011 年 6 月 3 日、京都)

### 3. その他

なし。

2) Katagiri T, Ohte S, Sasanuma H, Shin M, Yoneyama K, Kokabu S, Fukuda T, Suzuki S, Tsukamoto S and Sato Y: Characterization of mutant forms of ALK2 found in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva. Gordon Research Conference on Bones and Teeth. (2011年6月19-24日、Les Diablerets, Switzerland)

3) 片桐岳信：筋芽細胞骨化する難病・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 シンポジウム (2011年7月30日、大阪)

4) 大手聡、古株彰一郎、家村俊一郎、福田亨、笹沼寛樹、米山克美、進正史、福田亨、片桐岳信：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)

5) 片桐岳信：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 (2011年10月1日、岐阜)

6) 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)

### 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。