

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20576

研究課題名(和文)メカニカルストレス刺激時の骨芽細胞におけるエピジェネティックな骨形成機構の解明

研究課題名(英文)epigenetic mechanism of osteoblastic bone formation in mechanical stress

研究代表者

解良 洋平(KERA, YOUHEI)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：90647950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Osterix遺伝子は骨芽細胞遺伝子を活性化することで、前骨芽細胞から骨芽細胞への分化を促す、骨芽細胞分化に必須の転写因子である。本研究ではマウス骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1細胞)における転写因子Smad3並びにMAT11によるOsterix遺伝子発現制御メカニズムを解析した。Smad3ならびにMAT11は相互作用しながら、Osterix遺伝子発現を抑制的に制御していることが示された。MAT11はヒストンメチル化に関与する酵素であることから、この複合体によるヒストンメチル化を機序としたエピジェネティック制御の可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Osterix is essential transcription factor for osteoblast differentiation which promotes differentiation from preosteoblast to mature osteoblast by activation of several osteoblastic genes. In this study, we investigated mechanism of Osterix expression by Smad3 and MAT11 in mouse preosteoblastic cell line(MC3T3-E1 cell). Smad3 and MAT11 interact with each other and repress expression of Osterix. MAT11 is enzyme which has relation to transmethylation reactions involving histones, so these findings may suggest that this complex regulates Osterix through the mechanism including histone methylation.

研究分野：矯正歯科

キーワード：エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

歯科矯正治療において、これまで矯正力および筋機能を利用して 歯の移動および顎骨のコントロールが行われてきた。歯はエナメル質、象牙質、セメント質の3種類の硬組織と、結合組織である歯髄から構成されており、歯根膜および骨組織は咀嚼に伴う咬合力や矯正力などのメカニカルストレスにตอบสนองし、リモデリングすることで維持される。歯根膜に矯正力による伸展刺激が作用する時、圧迫される「圧迫側」と、引っ張られる側である「牽引側」が生じる。このうち牽引側において歯根膜細胞は骨芽細胞に分化することが知られているが、骨芽細胞が骨形成を生じさせる分子制御機構については不明な点が多い。伸展刺激を受けた骨芽細胞が引き起こす分子メカニズムを解明することで、歯を円滑に移動させることが可能になる。歯科矯正治療において円滑な歯の移動が行えることは経済的、身体的にも患者の生活の質を向上させる。そのため、効果的な歯の移動方法の開発は患者および術者から切望されている。

細胞は細胞内外の様々なシグナルにตอบสนองする。この細胞応答性が変化する仕組みの一つとして、DNA のメチル化及び、ヒストンテールのアセチル化やメチル化といった翻訳後修飾がある。これらの修飾により遺伝子のクロマチン構造が変化した結果ゲノムのシグナル応答性が変化するというエピジェネティック機構が注目されている (Strahl BD. et al. Nature.2000)。特にヒストンメチル化は遺伝子の促進及び抑制に関与している。エピジェネティック制御の例として、ヒストン H3K4 のアセチル化及びトリメチル化 (H3K4me3) は転写の活性化に関わり、ヒストン H3K9 ジメチル化 (H3K9me2) は遺伝子抑制に関わっている (Bing Li. et al. Cell.2007)。これまでに、ヒストンアミノ酸残基特異的なメチル化酵素やアセチル化酵素が多数同定され、それぞれの機能が解明されつつある。このように、様々な遺伝子発現にエピジェネティック修飾の変化が伴うことから、骨芽細胞が骨を形成する遺伝子発現メカニズムを解明する上で、この機構に着目することは、重要であると考えられる。

骨芽細胞分化には様々な因子が関与するが、分化に必須の転写因子として Osterix がある。Osterix は骨芽細胞遺伝子である I 型コラーゲン COL1A1 遺伝子、骨シアロタンパク質遺伝子やオステオカルシン遺伝子を活性化することで、前骨芽細胞から骨芽細胞への分化を促す。また Osterix 遺伝子発現制御には Runx2 や Dlx5 などの転写因子の関与が知られており、プロモーター領域には Smad3、Sox9、VDRE、Runx2、Dlx5、Sp1 など多数の転写因子予測結合配列が存在する。Osterix プロモーター領域に結合領域が存在する Smad3 はこれまで AP-1、c-Jun、Sp1、Runx などの様々な転写因子やヒスト

ンアセチル化酵素 p300 やヒストン脱アセチル化酵素複合体 c-Ski、ヒストンメチル基転移酵素 Setdb1、Suv39h1 などと相互作用することが報告されており、パートナータンパク質により標的遺伝子発現の促進もしくは抑制に働く。申請者が行った実験ではマウス骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1 細胞) において、エピゲノム制御に根幹的な役割を担うヒストンメチル化反応のメチル基供与体である S-アデノシルメチオニン合成酵素 (MATII) が Smad3 とタンパク質間相互作用を持ちながら、Osterix 遺伝子プロモーター領域に動員され、Osterix 遺伝子発現を抑制的に制御している可能性が示された (未発表データ)。MATII はヒストンメチル化修飾に関わることから、特異的なメチル基転移酵素と相互作用していることが予想される。

以上の背景のもと、申請者らは、骨芽細胞のメカニカルストレス応答機構におけるエピジェネティックによる遺伝子発現制御の解明のため、世界で初めての試みである、骨形成に重要な役割を果たす Osterix 遺伝子のエピジェネティックな分子メカニズムの解析を、メチオニンアデノシル転移酵素 MATII に注目して行うことを着想するに至った。

2. 研究の目的

歯の移動にとって重要な骨の形成および恒常性の維持機構を、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構の観点から明らかにするため、骨芽細胞のマスター調節遺伝子である Osterix 遺伝子の発現制御機構をエピジェネティックな機序に着目して解析する。マウス骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1 細胞) を使用し、Osterix 遺伝子の発現制御に関わる転写因子、ヒストン修飾酵素の検索を行い、Osterix 遺伝子のエピジェネティックな発現制御メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

マウス骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1 細胞) を用いて以下の実験を行った。

(1) MATII が Osterix 遺伝子発現を抑制しているか検討

MATII 阻害剤であるシクロロイシン (東京化成工業) を上述の細胞培養液に添加し、濃度を 25mM および 50mM に調整した。MC3T3-E1 細胞に対してシクロロイシン 0mM および 25mM、50mM による刺激を行い 24 時間後に全 RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法を用いて Osterix mRNA 量を定量した。

(2) Smad3 が Osterix 遺伝子発現を抑制しているか検討

Smad3 遺伝子の発現をノックダウンするために、siRNA を MC3T3-E1 細胞 1×10^5 個あたり 20pmol の割合で、Neon transfection system (Invitrogen) を用いて、エレクトロポレーション法 (1300V, 20mA, 2pulse) にて導入した。導入後の細胞を 34.8mm マルチウェルプレートにて培養した。遺伝子導入をおこなった 24 時間後に全 RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法を用いて Osterix mRNA 量を定量した。

(3) MAT11 と Smad3 が複合体を形成しているか検討

Pierce Co-Immunoprecipitation(Co-IP) Kit(Thermo Fisher SCIENTIFIC)を用いて添付のプロトコールに従い実験を行った。マウス前骨芽細胞様細胞株(MC3T3-E1)をキット付属の細胞溶解用バッファ-IP Lysis/Wash Buffer で溶解した。回収したサンプルを Smad3 抗体が固定されたレジンビーズとともに、ローテーター(Taitec)を用いて4にて一晩回転混和した。その後、IP Lysis/Wash Buffer にて5回ウォッシュを行った。キット付属の溶出用バッファ-Elution Buffer にてレジンビーズから結合しているタンパク質を溶出した。回収したタンパク質サンプルにキット付属の 5xLane Marker Sample Buffer を加え、95、5分間加熱した。サンプルの解析はウェスタンブロッティング法を用いて行った。

また使用した抗体は抗 Smad3 抗体(ab28379, abcam)、抗 MAT11 抗体(ab77471, abcam)、ネガティブコントロールとして Mouse IgG(ab37355, abcam)を用いた。

(4) MAT11、Smad3 の Osterix 遺伝子転写制御領域への動員について検討

SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit Magnetic beads(CST)を用いて添付のプロトコールに従い、実験を行った。

培養皿の MC3T3-E1 細胞に、Pierce 16% ホルムアルデヒド(Thermo Fisher SCIENTIFIC)を最終濃度が1%になるよう添加し、25、穏やかに振盪させながら10分間クロスリンクさせた。この反応を1.25M グリシン溶液2mlを添加し、25、穏やかに振盪させながら5分間で架橋反応を停止させた。停止後、培養皿の上清を除去し、PBS(SIGMA) 20ml による洗浄を2回行った。培養皿に2mlの回収用リン酸緩衝液(プロテアーゼ阻害剤カクテル、PBS)を添加し、細胞をスクレーパーを用いてこすり落とし15ml 遠沈管に回収した。その後1500rpm、4、5分間の遠心分離し、上清を除去した。以降の操作で使用する Micrococcal Nuclease(CST)が核膜を通過できるようにするためキット付属の Buffer A を添加し、氷上で10分インキュベートした。その後1500rpm、4、5分間の遠心分離し、上清を除去した。さらに Micrococcal Nuclease が機能するための補因子を追加するためキット付属の Buffer B を添加し、さらにその後1500rpm、4、5分間の遠心分離し、上清を除去した。その後核ペレットを Buffer B で再懸濁し、Micrococcal Nuclease を添加し、ブロックインキュベーター(ASTEC)で37、20分間のインキュベートを行い、150-900bp 程のクロマチンに断片化した。その後0.5M EDTAにより消化反応を止め、13000rpm、4、1分間遠心し、細胞核を沈殿させ、上清を除去した。付属の ChIP Buffer で再懸濁し、10分間、氷上でインキュベートしたのち、ホモジナイザー

(BRANSON)にて超音波処理を行い核膜を粉碎した。10000rpm、4、10分間の遠心分離を行い、上清を1.5ml サンプルチューブに移した。その後サンプルごとにChIP Bufferで500µlになるよう調整した。この調整液から10µlを採取し、別の1.5ml チューブに分注し、2%input サンプルとして使用するまで-20で保管した。サンプルごとに抗体を添加し、ローテーター(Taitec)を用いて4にて一晩回転混和した。これらのサンプルに付属のChIP-Grade Protein G(CST)磁気ビーズを各30µlずつ添加し、4、2時間回転混和した。次に磁石が装備された回収装置 Magnetic Separation Rack(CST)にサンプルの入った1.5ml チューブを装着して上清を完全に除去した。サンプルごとにChIP Buffer 1ml を用いて3回洗浄を行い、さらに5M NaClを70µl添加したChIP Buffer 1ml で一回洗浄した。その後上清を除去し、付属の Elution Buffer を入れ65、30分間インキュベートし、磁気ビーズから抗体-タンパク質複合体を溶出させた。その後、各サンプルごとに20mg/ml Proteinase K(NEB)を2µl、5M NaClを2µl添加し、65で一晩インキュベートし脱クロスリンクを行った。脱クロスリンク後のDNAはQIA quick PCR Purification Kit(QIAGEN)を用いて精製した。その後データはRT-PCRで解析した。

4. 研究成果

(1) MAT11 の Osterix 遺伝子発現への影響
MAT11 がマウス Osterix 遺伝子発現に及ぼす影響を調べるために、マウス前骨芽細胞様細胞株(MC3T3-E1)において、MAT11 阻害剤であるシクロロイシン刺激を行いMAT11の機能を減弱させ24時間後に定量RT-PCR法を用い Osterix mRNA 量を定量した。シクロロイシン濃度が25mMではOsterix 遺伝子発現が変化しなかったが、50mMにおいてOsterix mRNAの発現が約1.7倍に増加した。

(2) Smad3 の Osterix 遺伝子発現への影響
Smad3 の Osterix 遺伝子発現への影響を調べるため、マウス前骨芽細胞様細胞株(MC3T3-E1)においてSmad3 siRNAを導入し24時間後に定量RT-PCR法を用いSmad3 mRNA量を定量した。Smad3 ノックダウンによりOsterix mRNA量は2.5倍に増加した。

(3) MAT11 と Smad3 のタンパク質間相互作用

MAT11 と Smad3 が互いに結合しているか共免疫沈降実験を行い調べた。マウス前骨芽細胞様細胞株(MC3T3-E1)の細胞抽出物に対して、Smad3 の抗体を用いて、共免疫沈降実験を行った。抗 Smad3 抗体で Smad3 と相互作用しているタンパク質複合体を回収し、その後SDS-PAGE後、抗 MAT11 抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、コントロールと比較して抗 Smad3 抗体で免疫沈降を行ったサンプルにおいて MAT11 のバンドが認められた。Smad3 と MAT2A のタンパク質間相互作用の可能性が示唆された。

(4) Smad3 の Osterix 遺伝子制御領域への動員

マウス Osterix 遺伝子プロモーター領域には Smad3 コンセンサス配列が存在する。Smad3 が Osterix 遺伝子プロモーター上へ直接動員されるか調べるため、クロマチン免疫沈降実験を行った。

マウス前骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1) において、Smad3 抗体を用いクロマチン免疫沈降を行ったところ、Smad3 コンセンサス配列 (-AGAC-) が存在しない -2kb に位置するプロモーター領域ならびに +7kb に位置するイントロンと比較して、Smad3 コンセンサス配列を含む領域の DNA の増幅が有意に多かった。Smad3 はコンセンサス配列へ特異的に動員されていることが判明した。

(5) MAT2A の Osterix 遺伝子制御領域への動員

MAT2A が Osterix 遺伝子プロモーター上の Smad3 結合領域に直接動員されるか調べるため、クロマチン免疫沈降実験を行った。

マウス前骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1) において、MAT2A 抗体を用いクロマチン免疫沈降を行ったところ、IgG 抗体を用いた場合と比較して Smad3 コンセンサス配列 (-AGAC-) を含む領域の DNA の増幅が有意に多かった。MAT2A は Smad3 コンセンサス配列へ動員されていることが判明した。

5. 主な発表論文等 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

解良 洋平 (KERA, YOUHEI)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師 研究者番号：90647950

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

山本照子 (YAMAMOTO, TERUKO)

東北大学・大学院歯学研究科・名誉教授
研究者番号：00127250

伊藤 新 (ITO, ARATA)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師
研究者番号：10805914

(4) 研究協力者

該当なし