

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11617

研究課題名(和文) Supt3の骨格形成における機能とRunx2プロモーターとの相互作用の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the function of Supt3 in skeletal formation and its interaction with Runx2 promoter.

研究代表者

松尾 友紀 (MATSUO, Yuki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・技術職員

研究者番号：40792601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Supt3は、ヒストンアセチル転移酵素活性を有するアセチラーゼ複合体の構成成分の一つで、転写を制御する共役因子である。Runx2は、骨芽細胞の分化および軟骨細胞の後期分化に必須の転写因子であり、遠位と近位の2つのプロモーターで発現が制御されている。Supt3のプロモーター及びエクソン1、2は、Runx2の遠位と近位プロモーターの間に位置し、これらのプロモーターは相互作用しRunx2の発現を調節していると報告されている。Supt3ノックアウト(KO)マウスでは、胎生10.5日で死亡し、極度に矮小化していた。さらにSupt3 KOマウスでは細胞増少の低下、アポトーシスの亢進が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Supt3の生理的機能を明らかにすることは、転写制御機構の解明に大きく貢献する。また、骨形成に必須の転写因子であるRunx2およびSupt3プロモーターの相互作用が、Runx2の発現及び骨格形成にどのような作用を発揮するか明らかにできれば、骨粗鬆症および変形性関節症の治療薬開発に大きく寄与する。

研究成果の概要(英文)：Supt3 is a component of the SPT-TAF9-GCN5 acetyltransferase complex having histone acetyltransferase activity. Runx2 is the transcription for osteoblast differentiation and latter term of chondrocyte differentiation, and expression is controlled in two promoters of distal (P1) and proximal (P2). Promoter of Supt3 and Exon 1, 2 are located between P1 and P2 promoter of Runx2 and are reported when Supt3 and Runx2 interact and regulate expression of Runx2. The Supt3 knockout (KO) mice became embryonic lethal at 10.5days and were extremely dwarfed. Furthermore, in the Supt3 KO mice, cell proliferation was decreased and apoptosis was enhanced.

研究分野：細胞生物学、骨代謝学

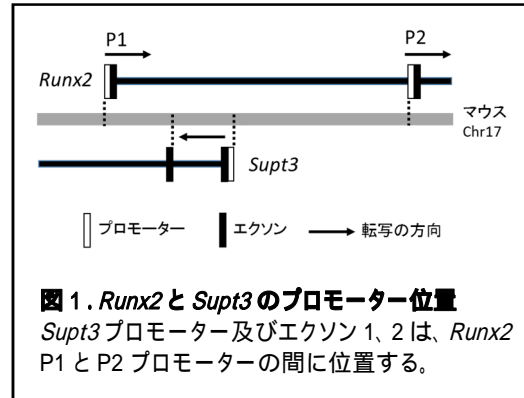
キーワード：Supt3 Runx2 造血 骨形成

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Supt3 は、ヒストンアセチル転移酵素活性(HAT 活性)を有する SPT-TAF9-GCN5 アセチラーゼ複合体 (STAGA) の構成成分の一つで<sup>(1)</sup>、転写を制御する共役因子である。Runx2 は、骨芽細胞の分化および軟骨細胞の後期分化に必須の転写因子であり<sup>(2)(3)</sup>、遠位(P1)と近位(P2)の2つのプロモーターで発現が制御されている。Supt3 のプロモーター及びエクソン 1、2 は、Runx2 の P1 と P2 プロモーターの間に位置し(図 1)、この2つの遺伝子座の関係は海綿生物からヒトまで広く保存されている。

我々は、骨形成の分子機構の解明を目的とし、Runx2 P2 プロモーター上流 200kb の広範囲の生理的な発現パターンを再現できる GFP トランスジェニック (tg) マウスを作製、Runx2 の骨芽細胞及び軟骨細胞での発現を規定するエンハンサーの探索を行った。この結果、Runx2 の骨芽細胞での発現を規定する骨芽細胞特異的エンハンサーを特定した<sup>(4)</sup>。同一染色体上の異なる部位のプロモーター及びエンハンサー領域の相互作用を検出する chromosome conformation capture (3C) analysis により、Runx2 P1 プロモーター



と Supt3 プロモーターは、骨芽細胞の分化促進に伴い相互作用する頻度が上昇すること、Runx2 P1 プロモーターのレポーター活性が、Supt3 プロモーターを同時に導入すると骨芽細胞分化に伴い活性が上昇することから、Supt3 プロモーターは Runx2 P1 プロモーターと相互作用し、Runx2 発現を調節していると報告された<sup>(5)</sup>。我々が以前行った 3C 解析でも、Runx2 P1 プロモーターと Supt3 プロモーターの相互作用が検出されている。そこで我々は、Runx2 P1 プロモーターと Supt3 プロモーターの相互作用による骨形成への影響を明らかにするために、CRISPR/Cas9 システムで Supt3 の KO マウスを作製した。まず、骨格形成を調べるために、胎生 16.5 日で解析したが、Supt3 KO マウスは得られなかった。胎生 10.5 日では、心臓の拍動が認められる Supt3 KO マウスは存在したが、極度の矮小化を認めた。すでに死亡している Supt3 KO マウスも多く、胎生 10.5 日付近で致死に至ると考えられた。卵黄嚢での胎児型造血は認められたが、野生型マウスと比較すると、卵黄嚢での血管は少なく、低下していると考えられた。また、心筋層は菲薄であり、この両者により致死に至ると推定された。肢芽の形成は認められたが、肢芽を形成する間葉系細胞の密度は低下していた。したがって、Supt3 は、造血や心臓形成だけでなく、骨格形成にも重要な役割を果たすことが示唆された。

### 2. 研究の目的

Supt3 は、HAT 活性を有する転写共役因子であり、そのプロモーターは、Runx2 プロモーターと相互作用することが報告されている。Supt3 ノックアウト(KO)マウスは、著明な矮小化を示し胎生 10.5 日付近で死亡した。胎児型造血の減少、心臓発生異常、間葉系細胞の減少が認められた。本研究では、これらの異常から Supt3 の機能を明らかにするとともに、Supt3 と Runx2 の相互作用による骨格形成へ及ぼす影響も明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) Supt3 KO マウスの組織学的解析

Supt3 ヘテロ(Ht)変異マウスの交配による妊娠 10.5 日目のマウスより、野生型及び Supt3 KO マウスを作出し、パラホルムアルデヒドで固定したパラフィン切片を用いて、ヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色を行った。さらに、Supt3 ヘテロ(Ht)変異マウスの交配後、妊娠 9.5 日目のマウスに BrdU を投与し、1時間後に胎児を取り出し、パラホルムアルデヒドで固定した。野生型と Supt3 KO マウスのパラフィン切片を用いて、BrdU 染色により細胞増殖を比較した。

#### (2) FACS 解析

胎生 9.5 日の野生型と Supt3 KO マウスについて、赤血球分化マーカー CD71、Ter119 抗体、マクロフ

マージマーカー-CD45、CD16/32 抗体、血管内皮細胞マーカーCD31、CD45 抗体での FACS 解析を行った。

### (3)ChIP-seq 解析

胎生 9.5 日目の野生型マウスと *Supt3* KO マウスの卵黄嚢、心臓、体幹をホルムアルデヒド固定、ダウンス型ホモジナイザーで一細胞化し、超音波破碎装置で DNA を断片化し、抗 H3K27ac 抗体で免疫沈降し、沈降した DNA のライブラリーを作製、次世代シーケンサーにて ChIP-seq 解析を行った。

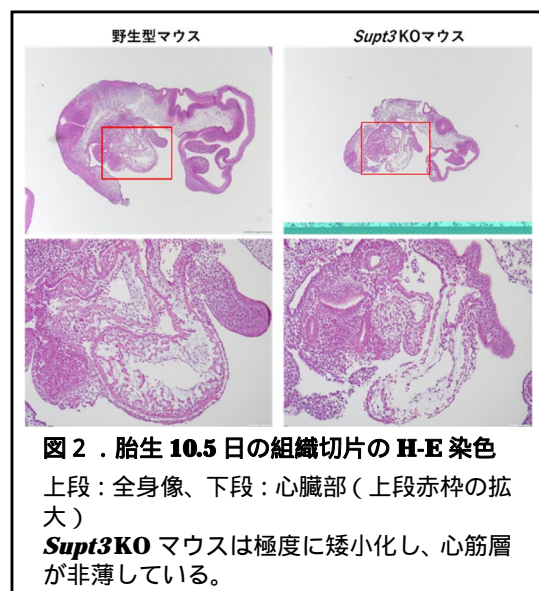
### (4) *Supt3* Ht 変異マウス/*Runx2* Ht 変異マウスの作製

*Supt3* Ht 変異マウスと *Runx2* Ht 変異マウスとの交配により、胎生 15.5 日の野生型マウス、*Supt3* Ht 変異マウス、*Runx2* Ht 変異マウス、*Supt3* Ht/*Runx2* Ht 変異マウスを作出し、99%エタノールで固定後、アルシアンブルーとアリザリンレッド染色により骨格標本作製した。

## 4. 研究成果

### (1) *Supt3* KO マウスの組織学的解析

*Supt3* KO マウスは胎生 10.5 日付近で死亡し、極度の矮小化、卵黄嚢の血管の減少がみられた。*Supt3* KO マウスの表現型を、胎生 9.5-10.5 日のパラフィン切片を作製し、各組織について野生型と *Supt3* KO マウスを比較した。*Supt3* KO マウスでは、極度に矮小化し心筋層が非薄していた(図2)。BrdU ラベルにより細胞増殖を比較した。TUNEL 染色により、肢芽を形成する間葉系幹細胞のアポトーシスを比較した。野生型と比較し、*Supt3* KO マウスでは、細胞増殖が低下し、アポトーシスが亢進していることがわかった。さらに、体節数の測定により、*Supt3* KO マウスでは体節数が少なく発生段階が遅延していることがわかった。



### (2)FACS

胎生 9.5 日の野生型と *Supt3* KO マウスについて、赤血球分化マーカーCD71、Ter119 抗体、マクロファージマーカー-CD45、CD16/32 抗体、血管内皮細胞マーカーCD31、CD45 抗体で FACS 解析を行い、卵黄嚢での胎児型造血を比較した。*Supt3* KO マウスでは、前赤芽球から赤芽球への分化段階で遅延があることがわかった。マクロファージおよび血管内皮細胞では、野生型と *Supt3* KO マウスでは差は見られなかった。

### (3)ChIP-seq 解析

胎生 9.5 日の野生型マウスと *Supt3* KO マウスの卵黄嚢、心臓、体幹を用いて、抗 H3K27ac 抗体で免疫沈降し、回収した DNA 断片について ChIP-seq 解析を行った。しかし、*Supt3* KO マウスは極度に矮小化しているため、ChIP-seq 解析に十分なサンプルを収集できなかった。このため交配数を増やし、ChIP-seq 解析に十分なサンプル量の収集に時間を要した。ChIP-seq 解析の結果、野生型マウスと比較し *Supt3* KO マウスでは、造血に関連する転写因子および共役転写因子のプロモーターおよびエンハンサー領域のピークが低下していた。

### (4) *Supt3* Ht 変異マウス/*Runx2* Ht 変異マウスの作製

*Supt3* Ht 変異マウスと *Runx2* Ht 変異マウスとの交配により、胎生 15.5 日の野生型マウス、*Supt3* Ht 変異マウス、*Runx2* Ht 変異マウス、*Supt3* Ht/*Runx2* Ht 変異マウスを作出し、骨格標本作製した。野生

型マウスと比較し *Supt3* Ht 変異マウスでは骨格形成に明らかな変化は認められなかったが、*Runx2* Ht マウスと比較して *Supt3* Ht/*Runx2* Ht 変異マウスでは、頭蓋骨、下顎骨、肋骨に明らかな骨化の遅延が認められた。

< 引用文献 >

- (1) Martinez E et al. J. Biol. Chem. 273 : 23781-23785, 1998
- (2) Komori T et al. Cell 89 : 755-764, 1997
- (3) Yoshida CA et al. Genes Dev. 18 : 952-963, 2004
- (4) Kawane T et al. J. Bone Miner. Res 29 : 1960-1969, 2014
- (5) Barutcu AR et al. Nucl Acids Res 42 : 10360-10372, 2014

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小守 壽文  (KOMORI Toshihisa)  (00252677)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授   (17301)	
研究分担者	宮崎 敏博  (MIYAZAKI Toshihiro)  (10174161)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授   (17301)	
研究分担者	森石 武史  (MORIISHI Takeshi)  (20380983)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教   (17301)	