

平成 22 年 3 月 26 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791038

研究課題名（和文） Runx2 プロモーターにおける細胞系列及び
分化段階特異的発現制御領域の特定研究課題名（英文） Identification of the Runx2 promoter region responsible for the
tissue and stage specific expression of Runx2

研究代表者

金谷 直子 (KANATANI NAOKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教務職員

研究者番号：10380982

研究成果の概要：

Runx2(runt-related transcription factor 2)/Cbfa1(core binding factor a1)は未分化間葉系細胞からの骨芽細胞系列への分化決定と軟骨細胞の成熟を担う転写因子であり、Runx2 遺伝子自身の、時間的・空間的発現調節が、骨芽細胞・軟骨細胞分化および正常な骨格形成プログラムに必須である。Runx2 プロモーターは、エクソン 1 とエクソン 2 の上流にそれぞれ存在するが、Runx2 遺伝子の転写制御機構は未だ明らかになっていない。これを明らかにするため、Runx2 遺伝子領域の BAC クローンを用いて、GFP トランスジェニックマウスを作製し、Runx2 遺伝子の発現制御に必要な領域を明らかにした。さらに、様々な部位を欠失させたコンストラクトを用いて GFP トランスジェニックマウスを作製することにより、骨芽細胞にのみ発現を認めるトランスジェニックマウスおよび軟骨細胞にのみ発現を認めるトランスジェニックマウスをそれぞれ得た。これらのマウスは、Runx2 遺伝子の発現調節機構を解明するのに、非常に有用なツールである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	510,000	3,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：Runx2 ・プロモーター・トランスジェニックマウス・GFP・転写因子

1. 研究開始当初の背景

Runx2(runt-related transcription factor 2)/Cbfa1(core binding factor a1)は未分化間

葉系細胞からの骨芽細胞系列への分化決定と軟骨細胞の成熟を担う転写因子であり、Runx2 遺伝子自身の、時間的・空間的発現調

節が、骨芽細胞・軟骨細胞分化および正常な骨格形成プログラムに必須である。

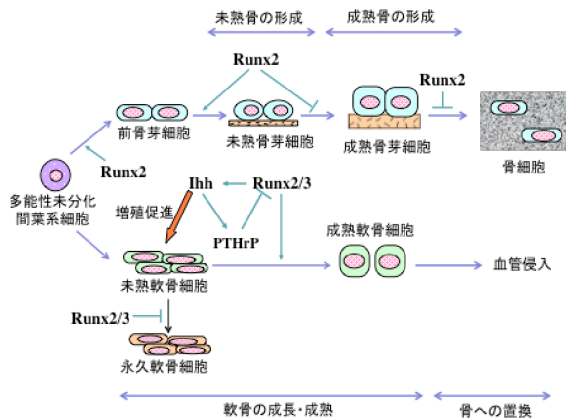


図1 骨芽細胞及び軟骨細胞の分化における Runx2 の役割

Runx2 は、エクソン1 から始まるアイソフォーム(**type II**)とエクソン2 から始まるアイソフォーム(**type I**)があり、それぞれ別のプロモーター(遠位および近位)によって転写調節されている (Komori T. and Kishimoto T. *Cbfa1 in bone development. Curr. Opin. in Genet. Dev.* 8:494-499, 1998)。そして、両方のアイソフォームが、骨芽細胞と成熟軟骨細胞に発現する (Enomoto H. et al. *Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. J. Biol. Chem.* 275(12):8695-8702, 2000)。このうち**近位プロモーター**に関する報告は全くない。**遠位プロモーター**に関しては、エクソン1 上流 1.5kb の転写調節領域が培養細胞を用いて報告されたが (Fujiwara M. et al. *Isolation and characterization of the distal promoter region of mouse Cbfa1. Biochim. Biophys. Acta* 1446:265-272, 1999)、この DNA 断片、あるいはそれにさらに上流領域を加えた最大 20kb までの様々な DNA 断片で、LacZ をレポーターとしてトランスジェニックマウスを作製して調べてきたが、骨格組織での組織特異的発現パターンを得ることはできなかった。一方、Lengner らは同領域を含む 3kb 領域が軟骨細胞の一部と精巣に発現すると報告しているが (Lengner CJ. et al. *Activation of the bone-related Runx2/Cbfa1 promoter in mesenchymal condensations and developing chondrocytes of the axial skeleton. Mech. Dev.* 114:167-170, 2002)、骨芽細胞での発現は見られず、軟骨細胞における発現も本来の Runx2 の発現パターンと全く異なっている。従って、骨芽細胞・軟骨細胞を含めた Runx2 の生理的な発現パターンに必要な塩基配列は、未だ同定されていない。これは、Runx2 遺伝子の発現調節領域が、

イントロンを含む広い範囲に存在していることを示唆している。

2. 研究の目的

Runx2 遺伝子の発現調節機構について、Runx2 遺伝子の組織特異的転写調節領域をトランスジェニックマウス作製によって生体レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

BACクローンを用いて、コンストラクトを構築 (図2)、これを用いてGFPトランスジェニックマウスを作製した。F₀マウスは3週齢で尾の先端を切断、皮膚を取り除いた後、蛍光実体顕微鏡で観察、尾骨に発現の認められたF₀マウスを選択した。選択されたF₀マウスは、F₁のマウスを用い、胎齢を追って蛍光実体顕微鏡で発現パターンを解析した。さらに、胎生16.5日、生後1週齢および4週齢で組織切片を作製、抗GFP抗体を用いて、組織におけるGFP発現パターンを解析した。次に、様々な部位を欠失させIRES-GFPにつないだコンストラクトを6種類作製し、トランスジェニックマウスを作製した。これらの、F₀マウスは3週齢で尾の先端を切断、蛍光実体顕微鏡で観察、尾骨での発現パターンを解析した。さらに、尾部に発現の認められたF₀マウスは、系統を樹立、それぞれの系統マウスで、胎齢を追って蛍光実体顕微鏡で発現パターンを解析するとともに、胎生16.5日、生後1週齢および4週齢で組織切片を作製、抗GFP抗体を用いて、組織におけるGFP発現パターンを解析した。



図2 BAC クローンをを用いた、Runx2 ゲノム領域を含んだ GFP トランスジェニックマウスの作製

4. 研究成果

作製した F₀ EGFP トランスジェニックマウスは、尾部の実態顕微鏡観察で、内在性 Runx2 と同様の発現パターンを示した (図

3)。F1の胎児の蛍光実態顕微鏡での観察では、上下肢骨、下顎骨、脊椎骨等で明瞭なGFP蛍光を認めた(図4-7)。さらに、胎生16.5日、1週齢、4週齢のトランスジェニックマウスでの抗EGFP抗体を用いた免疫組織染色で、*in situ hybridization* および抗Runx2抗体を用いた免疫組織染色で得られたRunx2の発現パターンと完全に一致した(図8)。すなわち、骨芽細胞と前肥大軟骨細胞および肥大軟骨細胞に強く発現を認めた。さらに、様々な部位を欠失させたコンストラクトを用いてトランスジェニックマウスを作製することにより、骨芽細胞にのみ発現を認めるEGFPトランスジェニックマウスおよび軟骨細胞にのみ発現を認めるEGFPトランスジェニックマウスをそれぞれ得た。これらのマウスは、Runx2遺伝子の発現調節機構を解明するのに、非常に有用なツールである。

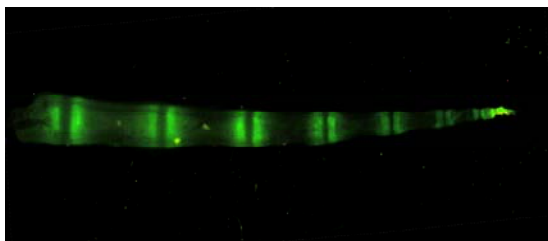


図3 Runx2の発現を再現させたGFPトランスジェニックマウスの尾部の実態蛍光顕微鏡写真

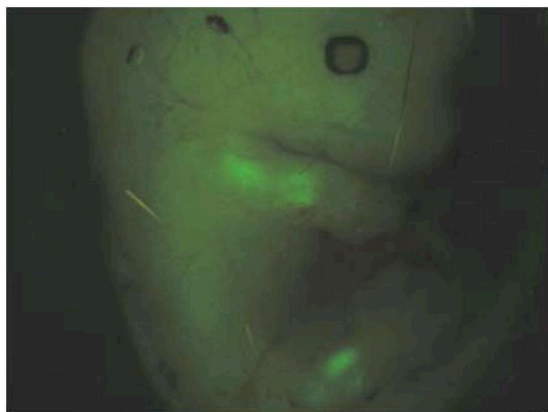


図4 胎生13.5日の実態蛍光顕微鏡写真。上腕骨、橈骨、尺骨、大腿骨、頸骨、腓骨に発現が認められる。

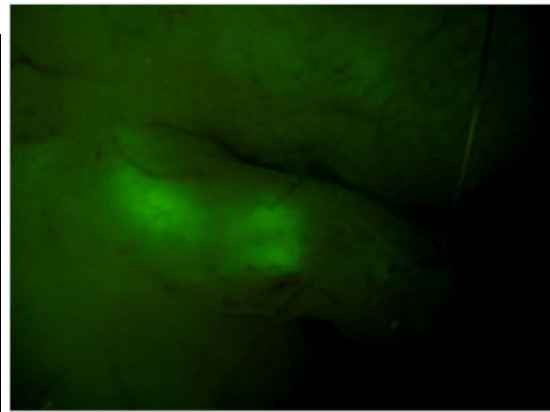


図5 胎生13.5日の上肢の拡大写真。上腕骨、橈骨、尺骨での発現が明瞭に観察される。

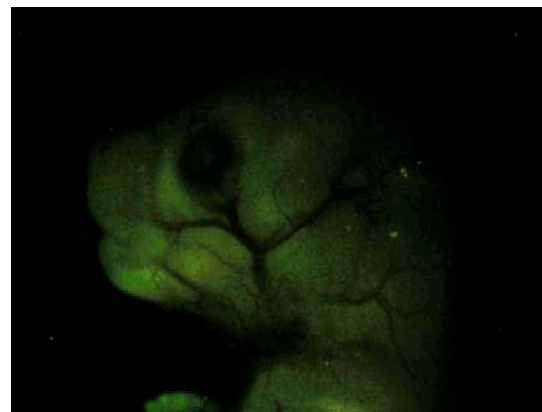


図6 胎生17.5日の実態蛍光顕微鏡写真。下顎骨、上顎骨でに発現が観察される

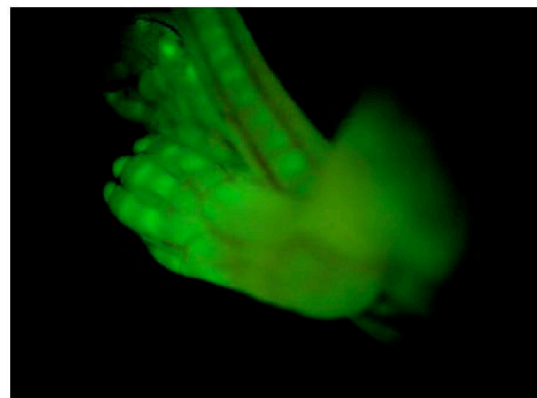
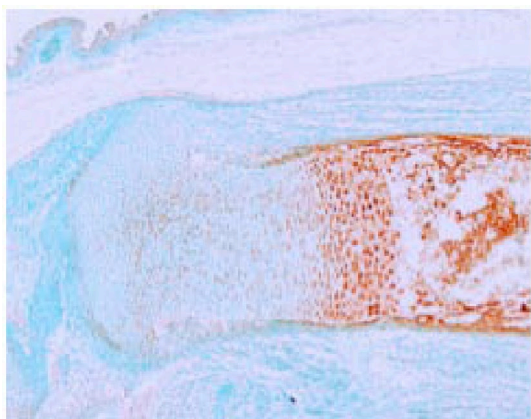


図7 胎生17.5日の実態蛍光顕微鏡写真。中足骨、基節骨、中節骨、末節骨に発現が認められる。

図8 胎生16.5日の切片を用いた免疫組織染色



色。抗 GFP 抗体で骨芽細胞、前肥大軟骨細胞、肥大軟骨細胞に発現が認められる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1 S.Rokutanda, T.Fujita, N.Kanatani, CA.Yoshida, H.Komori, W.Liu, A.Mizuno and T.Komori. Akt regulates skeletal development through GSK3, mTOR, and FoxOs. *Dev. Biol.* 328(1):78-93, 2009.

2 T.Miyazaki, N.Kanatani, S.Rokutanda, C.Yoshida, S.Toyosawa, R.Nakamura, S.Takada, and T.Komori. Inhibition of terminal differentiation of odontoblasts and their transdifferentiation into osteoblasts in Runx2 transgenic mice. *Arch.Histol.Cytol.* 71:131-146, 2008

3 Z.Maruyama, CA.Yoshida, T.Furuichi, N.Amizuka, M.Ito, R.Fukuyama, T.Miyazaki, H.Kitaura, K.Nakamura, T.Fujita, N.Kanatani, T.Moriishi, K.Yamana, W.Liu, H.Kawaguchi, K.Nakamura, and T.Komori. Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency. *Dev. Dyn.* 236(7):1876-1890, 2007.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金谷 直子

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教務職員

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者