

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791567

研究課題名（和文）頭蓋顎顔面の形態形成における転写因子 TWIST1 の役割に関する研究

研究課題名（英文）Role of the transcription factor TWIST1 in craniofacial morphogenesis

研究代表者

大隈 瑞恵（OHKUMA MIZUE）

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：60456209

研究成果の概要（和文）：転写因子 TWIST1 は神経堤由来間葉細胞に発現し、頭蓋顎顔面の形態形成において重要な役割を果たすと同時に、頭蓋縫合部の未分化間葉組織に発現し、膜性骨化の過程を制御することが知られている。本研究では、間葉系細胞における TWIST1 の発現制御機構の解明を足がかりに、頭蓋顎顔面の発生過程における TWIST1 の役割を理解すること目的とした。ヒト骨肉種由来骨芽細胞様細胞株 MG63 およびマウス未分化間葉細胞 C3H10T1/2 を用いてクロマチン免疫沈降法を行った結果、TWIST1 プロモーターに転写因子 CREB が結合することが明らかとなった。これらの細胞に CREB を過剰発現させると、TWIST1 プロモーター活性の上昇がみられ、間葉系細胞における TWIST1 の発現における転写因子 CREB の関与が示唆された。また、Yeast Two Hybrid screening を行った結果、TWIST1 と相互作用し間葉系細胞の特性に関与する因子として複数のユビキチン関連酵素を特定した。

研究成果の概要（英文）：Transcription factor TWIST1 is expressed in the cranial neural crest-derived mesenchyme, and plays a crucial role in craniofacial morphogenesis. We examined molecular basis of transcriptional regulation of the TWIST1 gene in mesenchymal cells. Chromatin immunoprecipitation assays and luciferase reporter assays demonstrated that the TWIST1 promoter was associated with the transcription factor CREB in mesenchymal cells. In yeast two-hybrid assays using TWIST1 N-terminus and HLH domain as the bait, we identified two ubiquitination-associated enzymes as TWIST1-interacting proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2008 年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2009 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 矯正・小児系歯学

キーワード：間葉系細胞 転写調節 TWIST1

## 1. 研究開始当初の背景

頭蓋縫合は分娩時に狭い産道の通過を可能にし、脳の成長に自由を与えるなどの多くの機能を持っており、そのほとんどは成人になるまで完全に癒合しないことが知られている。頭蓋縫合早期癒合症は、膜性骨化の過程に異常をきたすことにより、早期に頭蓋縫合が癒合し、結果として頭蓋顔面領域の形態異常とそれに伴う機能異常を生じる疾患である。Basic helix-loop-helix型転写因子をコードするTWIST1遺伝子の変異が頭蓋縫合早期癒合症を伴う Saethre-Chotzen syndromeの原因であり、逆に、TWIST1の遺伝子座を含む部分トリソミー患者には頭蓋縫合の開存が認められている。これらの報告より、頭蓋縫合部におけるTWIST1の発現は厳密に制御される必要があると考えられている。頭蓋の発生において、TWIST1は第一第二鰓弓由来の間葉組織全体に強く発現するが、しだいに頭蓋縫合部の未分化間葉組織に局限して発現するようになる。TWIST1は「上皮間葉移行」において重要な役割を果たすとともに、間葉系細胞の分化を抑制し、TWIST1の発現が間葉系細胞の特性の維持に関与する可能性が示唆されているが、TWIST1自身が受ける発現制御機構に関する報告は少ない。

これまでに、TWIST1遺伝子プロモーター解析の結果から、プロモーター内の-102/-74の領域に位置する28bpの領域が間葉系細胞におけるTWIST1の発現に必須であり、この領域内のCCT反復配列が転写因子Sp1/Sp3と *in vitro* で結合することを示した。

## 2. 研究の目的

本研究では、TWIST1遺伝子の発現に関わるシグナル系とそれを受けるTWIST1プロモーター上のエレメントを特定することにより、間葉細胞におけるTWIST1の発現制御機構を明らかにするとともに、頭蓋顔面領域の発生過程におけるTWIST1の役割を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1)①研究代表者はこれまでにTWIST1プロモーター転写開始点上流102bpより74bpの領域が間葉系細胞におけるTWIST1発現の維持に必須であることを明らかにしている。本研究では本領域に存在する転写調節配列の詳細を明らかにするため、転写因子結合の候補配列に対する抗体(Sp1, Sp3, CREB, ATF4, EN1)を用いてクロマチン免疫沈降法(ChIP)を行った。

②Sp1, Sp3に関しては、その発現ベクターおよびSp1, Sp3に対するsiRNAの遺伝子導入によるプロモーター活性への影響について、TWIST1レポータープラスミド(pTWIST1-700bp-luc)を用いたレポーターアッセイにより検討した。さらに、Sp1, Sp3に対するsiRNAを間葉系細胞に遺伝子導入し、RT-PCR法によりTWIST1の発現の変化を観察した。

③CERBに関しては、その発現ベクターおよびセリン133をアラニンに置換しリン酸化を受けないようにしたドミナントネガティブ変異体の導入によりプロモーター活性への影

響を調べた。さらに、CRE の 2 塩基置換変異プロモーターを作製し、そのプロモーター活性の変化を検討した。

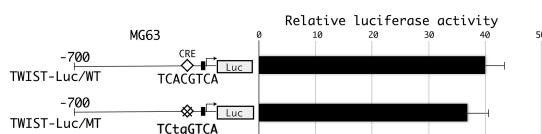
(2) TWIST1 と相互作用し、間葉系細胞の特性に関与する因子の同定を目的として、TWIST1 の N 末端および HLH ドメインの配列を bait として用いた Yeast Two Hybrid Screening を行った。

#### 4. 研究成果

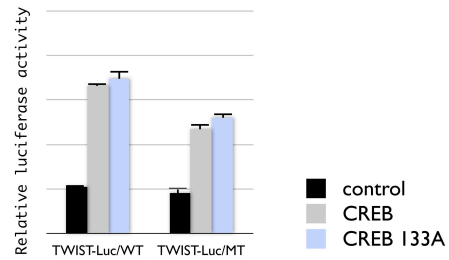
(1) ①ヒト骨芽細胞様細胞株 MG63 およびマウス未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2 を使ったクロマチン免疫沈降法 (ChIP) を行った結果、TWIST1 プロモーターへの転写因子 Sp1, Sp3, CREB の結合を確認した。

②Sp1, Sp3 に対する siRNA を MG63 に遺伝子導入し、RT-PCR 法により TWIST1 の発現の変化を観察したが、明らかな発現の減少は認められなかった。また、siRNA および Sp1/Sp3 阻害剤による TWIST1 プロモーター活性の明らかな減少は認めなかった。

③CREB 発現ベクターの遺伝子導入により、MG63 細胞における TWIST1 プロモーター活性の上昇を認めた。また、その結合配列 CRE の 2 塩基置換変異プロモーターでは、CREB 過剰発現によるプロモーター活性の上昇が抑制された。しかし、CREB133A によっても同様に活性の上昇が認められ、CREB による TWIST1 の転写制御に関しては、他の実験系を用いてさらなる検討を行う必要がある。



CRE の変異による TWIST1 プロモーター活性の変化



CREB による TWIST1 プロモーター活性の変化

最近、他グループから、TWIST1 プロモーターの -102bp から -74bp の領域内に、低酸素により活性化される Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) が結合し、TWIST1 プロモーターを活性化することが報告された。今後は、今回特定した転写因子と HIF-1 $\alpha$  の関連についても検討を加え、間葉系細胞における TWIST1 の発現制御の詳細を明らかにして行く予定である。

(2) TWIST1 の N 末端および bHLH ドメインを bait とした Yeast Two Hybrid Screening を行った結果、それぞれに対して異なる種類のユビキチン関連酵素を同定した。これらの候補因子との相互作用の詳細については今後の検討課題である。

最近、頭蓋顎顔面の形態形成において、TWIST1 は頭蓋縫合部のみならず、前頭鼻部の形態形成においても重要な働きがあることが報告されており、TWIST1 自身の発現制御への注目も増している。本研究により間葉系細胞における TWIST1 の発現制御機構の一部に関して明らかにすることができたが、今後はさらなる生理的意義を付け加えるよう検討が必要である。

#### 5. 主な発表論文

(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 1 件）

- ① Murakami, M., Ohkuma, M., Nakamura, M.  
Molecular mechanism of transforming  
growth factor-beta-mediated  
inhibition of growth arrest and  
differentiation in a myoblast cell line.  
Dev. Growth. Differ. 50, 121-130 (2008),  
査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大隈 瑞恵 (OHKUMA MIZUE)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：60456209

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし