

機関番号：34315

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2010

課題番号：22890216

研究課題名（和文） Filamin A の骨格組織における役割

研究課題名（英文） The role of Filamin A in skeletalgenesis.

研究代表者

藤田 隆司 (FUJITA TAKASHI)

立命館大学・薬学部・准教授

研究者番号：30319793

研究成果の概要（和文）: Filamin A の骨格組織における役割

核内転写因子 Runx2 の結合因子として見いだした Filamin A は細胞質に存在し、Runx2 とではなく Cbfb と直接相互作用することがわかった。また Filamin A は Runx2 の転写活性に影響を与えず、軟骨細胞分化を抑制することがわかった。

研究成果の概要（英文）: The role of Filamin A in skeletalgenesis.

I previously identified Filamin A as a Runx2-binding factor. Current study focused on Filamin A action on skeletalgenesis. Filamin A failed to influence to Runx-dependent transcriptional activity, while inhibited chondrocytes differentiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,260,000	378,000	1,638,000
年度			
総計	1,260,000	378,000	1,638,000

研究分野：ライフサイエンス(共通基礎研究)

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：Filamin A、Runx2、骨芽細胞/軟骨細胞、細胞分化、相互作用、Cbfb

1. 研究開始当初の背景

骨格形成担当細胞において Runx2 はきわめて重要な働きがある。Runx2 の欠損は骨芽細胞の形成をほぼ完全に阻害し、ヒトの頭蓋鎖骨異形成症の原因遺伝子としても同定されている。Runx2 は転写因子であることから核の中に存在し、これを調節することは Runx2 そのものの転写調節によること他に、制御が困難である。一方、リガンドを有

する核内受容体型の転写因子のように、外来的にその活性を制御できるものもある。

多くの転写因子同様、Runx2 もまた核内で相互作用する因子をたくさん持っている。一例を挙げると、エストロゲン受容体とも相互作用可能であるので、エストロゲンは間接的に Runx2 の活性を制御していることになる。すなわち、Runx2 の相互作用可能な因子には、創薬標的となる分子を含む可能性が

あり、本研究の遂行は、現在市販されている骨代謝調節薬に、「積極的な骨形成促進薬」という新しいコンセプトの薬を生み出す可能性を持つものと考えた。本研究プロジェクトから、生体における Runx2 相互作用因子探索を行い、Filamin A を同定した。そこで、Filamin A の骨格形成における役割を調べた。

2. 研究の目的

Filamin A の骨格形成過程での役割を明らかにし、骨形成に重要な Runx2 の調節を可能とするメカニズム解明を試みた。

3. 研究の方法

【細胞】

培養細胞は、ATDC5, C3H10T1/2, C2C12, MC3T3-E1, 10T1/2 (以上、RIKEN CELL BANK, Tsukuba Science City, Japan), ROS17/2.8 (gifted from Dr. Rodan, Merck), MLO-Y4 および MLO-A5 (from Dr. Bonewald, Texas health science center) 野生型および Runx2 ノックアウトマウス由来軟骨細胞, Cbfb ノックアウトマウス由来骨芽細胞を用いた。パッケージング細胞 plat-E (from Dr. Kitamura, Tokyo university, Japan), 293 細胞をそれぞれレトロウイルス, アデノウイルス調製に用いた。レトロウイルスの調製は、組換えを行った pMXs-neo あるいは pMXs-puro vector (from Dr. Kitamura) を plat-E 細胞に導入し、ウイルスを調整後、各細胞に感染させた。感染成立後、G418 (400 μ g/ml) と puromycin (8 μ g/ml) によって 1 重、或いは 2 重の薬剤選別により感染細胞を選別した。

【プラスミド】

N 端に Flag タグ化したマウス Runx2 は pMXs-neo にサブクローン化した。HA-Filamin A は一過性発現ベクターとして福井大学医学部、八木秀司博士より提供いただいた。GFP-Cbfb は pEGFP-C1 (Takara, Shiga, Japan) にサブクローン化して用いた。Filamin A 遺伝子に対する shRNA コンストラクトは、pSIREN-RetroQ (Takara) にサブクローン化し、レトロウイルスを調製して実験に用いた。PCR をベースとしたコンストラクトについては、キャピラリーシーケンサー (ABI3100, applied biosystems, Tokyo, Japan) を用いて塩基配列を確認した。培養細胞への遺伝子導入は、Fugene 6 (Roche Diagnostics Japan, Tokyo, Japan) を用い、添付文書に従い操作を行った。Filamin A shRNA は puromycin による薬剤耐性により、導入細胞を選別した。

【免疫沈降およびウエスタンブロット解析】
Flag-Runx2 安定強発現細胞に HA-Filamin A を一過性に発現させ、遺伝子導入後 48 時間で細胞を 1ml の lysis buffer [50mM Tris

(pH7.5), 250mM NaCl, 0.1% NP-40, 5mM EDTA, 10mM NaF, 0.1mM sodium vanadate, complete® (Roche Diagnostics Japan)] に可溶化した。これを試料として、lysis buffer は sepharose-4B でプレクリアの操作を入れ、その後 30 μ l の Flag-agarose-beads (Sigma Chemical Co., Saint Luis, MO) で免疫沈降を行った。ローテータを用いて 4 時間で数時間インキュベートした後、lysis buffer で 5 回洗浄して、その後 1mg/ml の Flag peptide (Sigma Chemical Co.) を 200 μ l 加え氷上で混和し、溶出反応を行った。溶出液はフィルターデバイス (VIVASPIN 500, 10,000 MWCO PES, Sartorius, Germany) により濃縮させ、検出標的が 100kDa 以上のものは 6% SDS-PAGE に、それ以下のものは 10% SDS-PAGE により分離して検出した。検出には、PO 共役の二次抗体を用い、ケミルミワンプラス (Nakarai tesque, Kyoto, Japan) により検出した。一次抗体には HA 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) Filamin A (Santa Cruz), Runx2 (MBL Co. Ltd., Nagoya, Japan) を用い、F-actin 抗体 (Santa Cruz) を発現量の補正のため解析に用いた。

【GST 融合タンパクの調製とアフィニティークロマトグラフィー】

組換え GST-Runx2 および GST-Cbfb は、pGEX-2T ベクター (GE healthcare, Tokyo, Japan) に Runx2 あるいは Cbfb をコードする mouse cDNA をサブクローン化し、glutathione-sepharose-4B (GE healthcare) を用いてアフィニティークロマトグラフィーにより調製した。組換え GST-Runx2 あるいは GST-Cbfb を結合させた sepharose-4B に、E. coli T7 S30 Extract System for Circular DNA (Promega, Madison, WI) を用いたベクター由来の Filamin A タンパク質をロードし、相互作用を調べた。予備実験の結果、Runx2 のコード領域を含む GST 融合タンパク質は回収が非常に困難であったため、ウエスタンブロット解析による抗体を用いた相互作用の検出を行った。GST-Cbfb は非常に安定であったため、ゲルの CBB 染色により検出することも行った。

【免疫細胞化学的解析】

培養細胞はチャンバースライド (Nalge Nunc International, Naperville, IL) に播種し、定法に従い免疫細胞化学反応法により細胞内タンパクの局在検出を行った。Filamin A 抗体、Runx2 抗体および FITC 共役または Texas-red 共役の二次抗体を用いた免疫蛍光化学的検出は、共焦点レーザー顕微鏡により検出した。蛍光の検出には、fluorescence mounting medium (DAKO corporation, Carpinteria, CA) を用いてマウント操作を行

った。GFP-Cbfbの局在は、アルコール固定する前に生細胞を用いて蛍光位相差顕微鏡により検鏡観察した。GFPの局在はGFP抗体(Abcam, Tokyo, Japan)によっても調べた。

【転写活性測定】

Runx 特異的 DNA 結合配列をタンデムに連結し, Runx2 の転写活性を特異的に検出する系を準備し (p60SE2-luc を用いた), ルシフェラーゼの活性を測定した。遺伝子導入効率の補正には, pRL-CMV(Promega)を共導入して Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega)を用いて定量解析を行った。なお, Runx 結合配列である OSE2 を含む bglap プロモーターを含むコンストラクト (p1470CN-luc), Ihh プロモーターを含むコンストラクト (p1112Ihh-luc) を用いた解析も行った。

【ALP 染色, アルシアンブルー染色とサフラニン O 染色, von Kossa 染色および定量】

培養細胞は初期分化誘導のためにはアスコルビン酸 (50 μ g/ml) を添加し, 後期分化までの誘導が必要な際は更に α -グリセロリン酸 (1mM) を添加した。定法により ALP 染色, von Kossa 染色を行い, それぞれ ALP の発現とカルシウム沈着を定性的に評価した。また, ALP 活性は ALP labo assay (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan), calcium E test Wako (Wako) によりそれぞれ定量的に評価した。アルシアンブルー染色とサフラニン O 染色は基質産生の指標として, 定性的に評価した。またコラーゲン産生は, シリウスレッドおよびファストグリーン法により定量測定した。

【リアルタイム PCR 解析】

骨格形成担当細胞の分化マーカー遺伝子の発現をリアルタイム PCR 解析により調べた。Isogen 法により total RNA を抽出後, 1 μ g を逆転写反応に供した。各プライマーは既報と同じ配列のものを用いた (gapdh (GAPDH), Runx2, col1a1, osteopontin (Opn), bglap (Ocn), Ihh, PTHrP, PTHrP-R, col21a1, col10a1)。

(骨芽細胞・軟骨細胞共通)

GAPDH-F 5' - TGCACCACCAACTGCTTAG-3'
GAPDH-R 5' -GGATGCAGGGATGATGTTTC-3'
Runx2-F 5' -CTTCGTCAGCATCCTATCAGTTC-3'
Runx2-R5' -TCAGCGTCAACACCATCATTTC-3'

(骨芽細胞分化マーカー)

Col1a1-F 5' -CCCAAGGAAAAGAAGCACGTC-3'
Col1a1-R 5' -ACATTAGGCGCAGGAAGGTCA-3'
Opn-F 5' -GCAGAATCTCCTTGCGCCA-3'
Opn-R 5' -CGAGTCCACAGAATCCTCGC-3'
Ocn-F 5' -CGCTCTGTCTCTCTGACCTC-3'

Ocn-R 5' -GACTGAGGCTCCAAGGTAGC-3'

(軟骨細胞分化マーカー)

Ihh-F 5'-TTCAAGGACGAGGAGAACACG-3'
Ihh-R 5'-TTCAGACGGTCTTGCAGC-3'
PTHrP-F 5'-GGCGTTCCGGTGGAGGGGCTT-3'
PTHrP-R 5'-CAGATGGTGGAGGAAGAAAC-3'
PTHrP-R-F 5'- GCTGCTCAAGGAAGTTCTGCG -3'
PTHrP-R-R 5'-TCTCTTTAGACTCGGGGTAG-3'
Col2a1-F 5'-TGTCCCTCGGAAAAACTGGT-3'
Col2a1-R 5'-AGCCACCGTTCATGGTCTCT-3'
Col10a1-F 5'-AGAACGGCAGCCTACGAT-3'
Col10a1-R 5'-AGGTAGCCTTTGCTGTACTATCAT-3'

4. 研究成果および考察

【Filamin A の発現と Runx2 との相互作用検出】

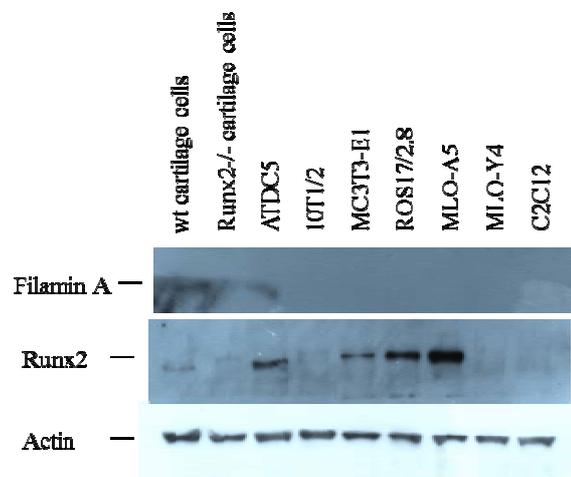


Fig.1 Expression of Filamin A and Runx2 in skeletal cells. Filamin A was not expressed in mesenchymal 10T1/2, immature osteoblastic clone MC3T3-E1, mature osteoblastic clone ROS17/2.8, pre-osteocytic cells MLO-A5, osteocytic MLO-Y4 and myogenic C2C12 cells, while cartilaginous cells including wild type or Runx2-KO-derived chondrocytes, ATDC5 cells. Runx2 expressions were detected in wild type chondrocyte, ATDC5, MC3T3-E1, ROS17/2.8 and MLO-A5. Similar levels of protein concentration were monitored by Actin.

Filamin A の骨格系細胞における発現をいくつかの細胞株およびマウス胎仔の長官骨より調製した初代培養軟骨細胞および Runx2 ノックアウトマウスより調製した初代培養軟骨細胞を用いてウエスタンブロット解析を行った (Fig.1)。検討の結果, Filamin A は骨格形成担当細胞において軟骨細胞に限定的に発現していることがわかった。また, Runx2 ノックアウトマウス細胞由来の軟骨細胞 (Runx2-/-) において, 野生型 (wild type:

wt)と同程度のFilamin A発現量を検出したことから、Filamin AはRunx2により制御されていないことが推察された。

次に、Filamin Aの生化学的特性をIP-WB(免疫沈降-ウエスタンプロット解析)により調べた。Flag-Runx2を強制発現させたATDC5よりFlag-agarose beadsを用いたIP-WBを行った結果、Filamin A、Runx2の2つの因子の相互作用は検出された。同様にCbfbノックアウトマウス由来の骨芽細胞にHA-Filamin Aを一過性に強制発現させた条件で行うと、2つの因子の相互作用は検出されなかった。加えて、GST-Runx2とE. coli T7 S30 Extract System for Circular DNAにより調製したFilamin Aを用いたcell-freeの条件では2つの因子の相互作用が検出されなかったことから、Filamin AとRunx2の相互作用は直接的ではないことがわかった。次に、GST-Cbfbを用いてFilamin AとCbfbの相互作用を調べた。GST-Cbfbを結合したglutathione-sepharose-4Bにin vitro合成タンパクとして調製したFilamin Aを混合すると、CBB染色ではやや見えにくいものの、ウエスタンプロット解析を行うと明確に相互作用が観察された。従って、Filamin AはRunx2の共役因子であるCbfbと直接相互作用することがわかった。

【分子の局在についての解析】

免疫細胞化学的解析によってタンパクの局在を調べた結果、Filamin Aが細胞質に局在し、GFP-CbfbおよびRunx2は核内に局在することがわかった。内在性のCbfbもまた細胞質にはほとんど検出されなかった。またGFP-Cbfbの局在は、未分化なC3H10T1/2やC2C12、さらにはHEK293においても同様に核において検出された。HEK293をはじめRunx2および他のRunxファミリータンパクを発現しない。これらの成績から、細胞質でのFilamin AとCbfbの相互作用はごく短時間であるか、Filamin Aがセクレターゼによりタンパク分子内に分断が生じ、核に移行するなど、別のメカニズムが生じない限り、細胞質における相互作用はほぼないと思われる。

【Runx 依存的な転写活性】

Flag-Runx2を強制発現するATDC5にp60SE2-lucおよびpRL-CMVと、HA-Filamin Aを一過的に共導入し、Filamin AのRunx 依存的な転写活性に及ぼす影響を調べた。Filamin Aが存在、あるいは非存在下においてどちらもほぼ同等のレポーター活性を認めた。P1470CN-luc、p11121hh-lucを用いた解析においても同様に、Filamin Aの有無はレポーター活性に影響を与えなかった。

【Filamin Aに対するshRNAの効果】

Filamin Aに対するshRNAを発現するレトロウイルスを調製し、ATDC5に安定強発現させた細胞を作成した。作成した細胞はウエスタンプロット解析よりFilamin Aを発現しないことがわかった。Runx2およびCbfbの局在は変わらず、これらのタンパク発現量も影響されなかった。またp60SE2-lucを用いたRunx 依存的なレポーター解析においても、Filamin Aノックダウンは影響を及ぼさなかった。次に、Filamin Aノックダウンによる細胞分化に及ぼす影響を調べた。Micromassシステムを用いて調べた結果、Filamin Aノックダウンは、対照コントロールとしたGFP shRNA導入細胞に比べて、アルシアンブルー陽性、サフラニンO陽性の細胞外基質の産生蓄積を認めた。リアルタイムPCR解析の結果、Filamin AノックダウンはPTHrPの発現には影響を及ぼさなかったものの、他のすべての分化マーカー発現時期を早めた。すなわちFilamin Aは軟骨分化を阻害する機能があることがわかった。ATDC5の基質産生能および細胞分化、研究当初は、Filamin AをRunx2の共役因子として見だし、Filamin Aの変異によりヒトにおいて骨格異常が認められる報告があった。よってCbfbを含めたこれらの因子の相互作用により複合体が正常に形成できないと骨格形成に異常を来すと考え、研究を進めた。しかしながら、Runx2の転写活性に際立った影響がFilamin Aのノックダウンにより観察されなかった。Runx2の機能に影響する以外のメカニズムから、Filamin Aの骨格形成系での重要性を見いだせると考えた。

*未公表データにつきそれぞれのデータは掲載しません。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔その他〕ホームページ等

<http://www.ritsumei.ac.jp/pharmacy/fujita-tk/Site/6F905C26-3A3E-424A-A57A-F C928CA0EDA2.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤田 隆司 (FUJITA TAKASHI)

立命館大学・薬学部・准教授

研究者番号：30319793