

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592784

研究課題名(和文)骨特異的転写因子Osterixによる骨形成制御の新たな分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Osx regulates osteoblast differentiation through association with coactivators

## 研究代表者

中島 和久(Nakashima, Kazuhisa)

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：90252692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では骨芽細胞特異的転写因子Osxと結合して、その転写活性を調節する候補分子群から2種類の候補因子Osx coactivator1 (OSC1)とOsx coactivator2 (OSC2)の解析を進めた。

OSC1とOSC2は完全長Osxタンパク質の転写活性を相乗的に促進した。その作用は既知の結合タンパク質のよりも強力であった。OSC1とOSC2はOsxの転写活性を担うN末端領域の中央部分と最も顕著に相互作用を示した。一方、骨芽細胞分化に関わるRunx2、Nfatc1の作用をOSC1とOSC2は促進しなかった。即ち、OSC1とOSC2は潜在的なOsxの転写共役因子であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Osteoblast differentiation is a multistep pathway in which multipotential mesenchymal cells differentiate into osteoblasts. The transcription factor Osterix (Osx) regulates osteoblast differentiation and bone-specific gene expression. However, Osx expression is detected not only in osteogenic tissue but also in chondrogenic tissues, suggesting the presence of molecules required to control osteogenesis by Osx. In the current studies, we have analyzed possible Osx partner molecules Osx coactivator 1 (OSC1) and Osx coactivator 2 (OSC2). The results suggest that the two molecules associate with Osx as a coactivator during osteoblast differentiation. Expression of OSC1 is induced during osteoblast differentiation in vitro. OSC1 and OSC2 directly interact with Osx and promote Osx-dependent transcriptional activity, suggesting that OSCs act as a transcriptional coactivator for Osx. Our results provide new insights into a transcriptional regulation of osteoblast differentiation by Osx.

研究分野：分子生物学

キーワード：骨芽細胞 転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の骨形成過程には内軟骨性骨形成と内膜性骨形成の2つの異なる過程がある。両過程において骨芽細胞が骨基質の産生と石灰化を担う。加えて骨芽細胞は骨基質を溶解する破骨細胞の分化を制御する。骨芽細胞と破骨細胞の機能的平衡状態が破綻すると、骨粗鬆症、骨硬化症あるいは癌細胞の骨転移などの骨格病変を引き起こす。従って、骨芽細胞は脊椎動物の骨形成と骨代謝の制御に中心的な役割を果たす細胞である。

1997年、分子生物学的かつ遺伝学的アプローチから、転写因子 Runx2 が骨芽細胞分化と骨形成に必要であることが判明した。研究代表者は、間葉系細胞が特異的な表現型を獲得する細胞分化のメカニズムには複数の組織特異的転写因子が関与することに着目して、骨組織に発現する新規転写因子 Osterix (Osx) を同定した。Osx 遺伝子を破壊した Osx ホモ欠損マウスでは内軟骨性骨形成も内膜性骨形成も進行せず、間葉系細胞から骨芽細胞への分化が完全に停止することから、Osx は Runx2 の下流で作用する骨芽細胞分化ならびに骨形成に必須な転写因子であることが判明した。Osx ホモ欠損マウスでは Runx2 を発現する間葉系細胞集団は軟骨細胞の分子マーカーを発現した。従って Runx2 を発現する間葉系細胞は多機能性を有しており、Osx が最終的に骨芽細胞への分化を決定づけることが明らかとなった。

以上の観察は遺伝子欠損マウスの解析より得られたものである。最近、劣性骨形成不全症を示すヒトのゲノム解析から、Osx の C 末端欠損変異体が見いだされた。この事実は Osx が劣性骨形成不全症の原因遺伝子の一つであること、即ち、野生型 Osx はヒトの骨芽細胞分化と骨形成に必要な不可欠な転写因子であることを示している。従って、Osx は脊椎動物の骨形成に普遍的に必要な転写因子であると考えられる。

マウス Osx は N 末端に転写活性化領域を持ち、C 末端に3つの zinc finger モチーフを持つ 428 アミノ酸から成る転写因子である。Osx の N 末端領域と Gal4 との連結タンパク質を作成して転写活性化能を解析すると、Osx の転写活性化能は Sp3 や Klf4 などに比べて極めて弱いことが判明した。ところで Osx 遺伝子欠損マウスの解析から、Osx は様々な分化程度を示す骨芽細胞、即ち、未分化な Runx2 発現細胞、細胞外基質産生を司る骨芽細胞、ならびに細胞外基質産生が低下した骨細胞、いずれの多様な機能も制御する事が判明した。しかし Osx ヘテロ欠損マウスでは骨格に表現型が得られない事から、発現量の変動による Osx の活性制御機構では Osx の多様な作用は説明しがたいと考えられる。そこで研究代表者は、骨芽細胞の分化制御には Osx の機能が質的に変動することが必要であり、その質的変動は Osx の N 末端転写活性化領域を介したタンパク質相互作用に依存すると仮説をたてた。近年、Osx と相互作用するタンパク質として NO66 と NFATc1 の2因子が報告されている。Osx を含む転写因子複合体の解析から転写関

連因子 NO66 が Osx の N 末端転写活性化領域と結合して、Osx 依存的転写を抑制すると報告された。一方、転写因子 NFATc1 は Osx と相乗的に作動して骨形成を促進する。しかし、NFATc1 は Osx の N 末端転写活性化領域から外れた領域に結合することから、その作用機構の詳細は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では骨芽細胞特異的転写因子 Osx と結合して、その転写活性を調節する分子の同定とその機能解析を目指す。

## 3. 研究の方法

2種類の候補因子 Osx coactivator1 (OSC1) と Osx coactivator1 (OSC2) と Osx の相互作用を解析する為に、以下の実験を行った。Osx と OSC1/OSC2 との結合が Osx のどの領域に依存するかを検討する。同様に、タグ標識変異 OSC1/OSC2 と Osx を共発現させた後にタグ抗体にて免疫沈降を行い、Osx の動態をイムノプロット法で追跡することによって Osx との結合が OSC1/OSC2 のどの領域に依存するかを検討した。Osx と OSC1/OSC2 の相互作用を仲介する最小ペプチド領域を同定した。

上記の実験と平行して、タグ標識 Osx タンパク質と OSC1/OSC2 を共発現させてレポーター遺伝子の発現レベルの変動を解析した。上記実験から得られた情報をもとに Osx 全長 cDNA 並びに OSC1/OSC2 全長 cDNA から相互作用を仲介する最小ペプチド領域を除いた変異 cDNA を構築して、変異タンパク質の転写活性を測定することにより相互作用のタンパク質化学的性質を解析した。

## 4. 研究成果

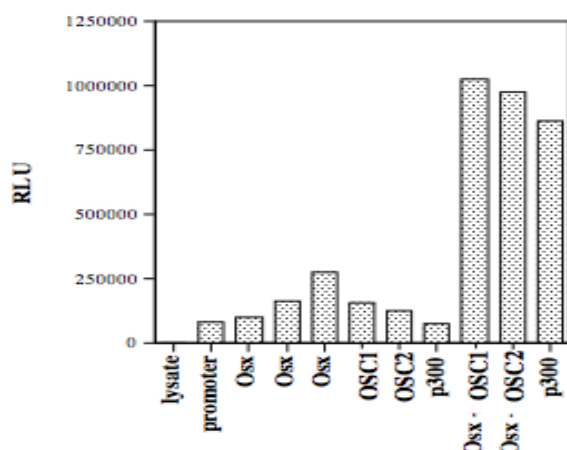
研究代表者は Osx ペプチドを利用した Yeast two hybrid スクリーニングを既に実施して、いくつかの Osx 結合タンパク質の候補を得た。モチーフ検索から、特異的モチーフを持つ一群の転写調節因子を選択して2種類の候補因子 Osx coactivator1 (OSC1) と Osx coactivator1 (OSC2) の解析を進めた。

2種類の候補因子 OSC1 と OSC2 の発現を調べると、いずれも培養骨芽細胞株と骨組織に発現していた。培養骨芽細胞では、骨芽細胞の分化レベルの亢進に伴って、OSC1 の発現レベルは上昇した。加えて、PTH、cAMP などの骨芽細胞分化の促進によって細胞を処理すると、細胞分化の進行に伴って OSC1 の発現レベルが上昇した。

OSC1 と OSC2 の機能解析する為に、Osx の標的遺伝子と考えられる、I 型コラーゲンアルファ1鎖のプロモーター領域から Osx に応答する特異的領域の選別を試みた。I 型コラーゲンアルファ1鎖構造遺伝子上流 2.3kb は骨特異的な発現を調節する領域である。この領域を断片化して解析したところ、上流 400bps を含む領域が、Osx に応答した。この

領域を用いて OSC1 と OSC2 の機能解析を行うと、OSC1 と OSC2 のみではレポーター遺伝子の発現を促進しないが、Osx との共発現によってOsx と相乗的にレポーター遺伝子の発現を活性化 (Osx 単独のさらに 8 倍) した。この相乗作用は既に報告されている転写共役因子、例えば、代表的な転写共役因子 p300 よりもさらに高い活性を示した。

この分析系を用いて、骨芽細胞分化に関わる重要な転写因子群 Runx2 と Nfatc1 の作用、ならびに、OSC1 と OSC2 との相互作用を測定すると、Runx2 と Nfatc1 は OSC1 と OSC2 と相乗的作用を示さなかった。従って、OSC1 と OSC2 と Osx の相互作用は特異的であると考えられる(図参照)。



OSC1、OSC2 と Osx のが相互作用して転写活性を促進することから、相互作用を仲介すペプチド領域の決定を試みた。Osx ペプチド断片と Gal4 DNA 結合領域の融合タンパク質の発現ベクターと Gal4 結合領域を持つレポーターを作成して転写活性可能を測定した。この解析系では Osx の N 末端領域のみが転写活性を促進する。この解析系にて OSC1 と OSC2 の作用を測定すると、OSC1 と OSC2 は Osx の N 末端領域の転写活性を極めて強く促進した。OSC1 と OSC2 は特に Osx の N 末端領域の中央部分と最も顕著に相互作用を示した。この領域を除くと、全く相互作用が見られなくなった。これらの結果は Osx の N 末端領域の中央部分が OSC1、OSC2 の結合に関わる領域であることを示唆している。

機能的な相互作用を裏付ける為に、OSC1/OSC2 と Osx を共発現させた後にタグ抗体にて免疫沈降を行うと、両者はともに沈降することが判明した。

以上の結果から、OSC1 と OSC2 は潜在的な Osx の転写共役因子であると考えられた。

## 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 7 件)全ての論文に査読有り。

Wada S, Ideno H, Shimada A,

Kamiunten T, Nakamura Y, Nakashima K, Kimura H, Shinkai Y, Tachibana M, Nifuji A: H3K9MTase G9a is essential for the differentiation and growth of tenocytes in vitro. *Histochem Cell Biol.* Jul;144(1):13-20. doi: 10.1007/s00418-015-1318-2. Epub 2015 Mar 27.

Kamiunten T, Ideno H, Shimada A, Nakamura Y, Kimura H, Nakashima K, Nifuji A: Coordinated expression of H3K9 histone methyltransferases during tooth development in mice. *Histochem Cell Biol.* 2015 Mar;143(3):259-66. doi: 10.1007/s00418-014-1284-0. Epub 2014 Oct 8.

Shimada A, Wada S, Inoue K, Ideno H, Kamiunten T, Komatsu K, Kudo A, Nakamura Y, Sato T, Nakashima K, Nifuji A: Efficient expansion of mouse primary tenocytes using a novel collagen gel culture method. *Histochem Cell Biol.* 2014 Aug; 142(2): 205-15. doi: 10.1007/s00418-014-1191-4. Epub 2014 Feb 11.

Komatsu K, Shimada A, Shibata T, Wada S, Ideno H, Nakashima K, Amizuka N, Noda M, Nifuji A: Alendronate promotes bone formation by inhibiting protein prenylation in osteoblasts in rat tooth replantation model. *J Endocrinol.* 2013 Oct 4; 219(2): 145-58. doi: 10.1530/JOE-13-0040. Print 2013 Nov.

Ideno H, Shimada A, Imaizumi K, Kimura H, Abe M, Nakashima K, Nifuji A: Predominant expression of H3K9 methyltransferases in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes during mouse growth plate cartilage development. *Gene Expr Patterns.* 2013 Mar-Apr; 13(3-4):84-90. doi: 10.1016/j.gep.2013.01.002.

Shimada A, Komatsu K, Nakashima K, Pöschl E, Nifuji A: Improved methods for detection of  $\beta$ -galactosidase (lacZ) activity in hard tissue. *Histochem Cell Biol.* 2012 Jun; 137(6): 841-7. Epub 2012 Feb 28. doi: 10.1007/s00418-012-0936-1.

Ono N, Nakashima K, Schipani E, Hayata T, Ezura Y, Soma K, Kronenberg HM, Noda M: Constitutively active PTH/PTHrP receptor specifically expressed in osteoblasts enhances bone formation

induced by bone marrow ablation. J Cell Physiol. 2012 Feb; 227(2):408-15. doi: 10.1002/jcp.22986.

〔学会発表〕(計 27 件)

上運天太一、出野尚、島田明美、中島和久、中村芳樹、二藤彰、歯の発生分化におけるヒストンメチル化酵素の発現と機能 第 37 回日本分子生物学会年会 横浜パシフィコ 2014 年 11 月 27 日 (神奈川県横浜市)

島田明美、和田悟史、出野尚、上運天太一、小松浩一郎、工藤明、中村芳樹、中島和久、二藤彰 Annexin A5 欠損マウスは咀嚼筋肥大、歯の咬耗、口腔顔面の骨肥大を呈する 第 37 回日本分子生物学会年会 横浜パシフィコ 2014 年 11 月 27 日 (神奈川県横浜市)

出野尚、島田明美、上運天太一、和田悟史、小松浩一郎、荒木良子、立花誠、中村芳樹、安倍真澄、中島和久、二藤彰 間葉系細胞の増殖・分化過程におけるヒストンメチル化酵素 G9a の機能 第 32 回日本骨代謝学会学術集会 大阪国際会議場 2014 年 7 月 24 日 (大阪府大阪市)

上運天太一、島田明美、出野尚、中村芳樹、木村宏、立花誠、中島和久、二藤彰 ヒストン 3 リジン 9 メチル化酵素群 (G9a, Glp, Suv39h1, Prdm2) のマウス歯牙発生における発現と機能 第 32 回日本骨代謝学会学術集会大阪国際会議場 2014 年 7 月 24 日 (大阪府大阪市)

和田悟史、島田明美、出野尚、立花誠、中村芳樹、中島和久、二藤彰 ヒストンメチル化酵素 G9a による腱細胞の分化制御 第 32 回日本骨代謝学会学術集会大阪国際会議場 2014 年 7 月 26 日 (大阪府大阪市)

島田明美、和田悟史、出野尚、上運天太一、小松浩一郎、工藤明、中村芳樹、中島和久、二藤彰 効率的で安定的なマウス腱細胞の初代培養法 第 32 回日本骨代謝学会学術集会大阪国際会議場 2014 年 7 月 26 日 (大阪府大阪市)

上運天太一、出野尚、島田明美、中島和久、中村芳樹、二藤彰 歯の発生分化におけるヒストンメチル化酵素の発現と機能 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 福岡国際会議場 2014 年 9 月 26 日 (福岡県福岡市)

和田悟史、出野尚、島田明美、上運天太一、中島和久、中村芳樹、二藤彰 腱細胞の発生分化におけるヒストンメチル化酵素 G9a の機能 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会福岡国際会議場 2014 年 9 月 26 日 (福岡県福岡市)

出野尚、島田明美、上運天太一、和田悟史、小松浩一郎、中村芳樹、安倍真澄、

中島和久、二藤彰 ヒストンメチル化酵素 G9a による間葉系細胞の増殖と分化の調節 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 福岡国際会議場 2014 年 9 月 26 日 (福岡県福岡市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 和久 (Kazuhisa Nakashima)  
鶴見大学・歯学部・非常勤講師  
研究者番号：90252692

### (2) 研究分担者

二藤 彰 (Akira Nifuji)  
鶴見大学・歯学部・教授  
研究者番号：00240747