

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890151

研究課題名（和文）Sp6分子構造の機能解析

研究課題名（英文）Structure and function of Sp6

研究代表者

萩田 浩子 (HAGITA HIROKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・技術員

研究者番号：30512123

研究成果の概要（和文）：

Sp6は歯胚特異的に発現する転写因子であり、Sp6欠損は過剰歯やエナメル質形成機転の異常をもたらすと報告されている。Sp6分子の構造と機能の解析は歯胚形成機序の解明、さらに将来の再生の臨床応用に重要な知見となると考えられ、Sp6の翻訳後修飾の有無を確認した本研究の成果はその一助となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Sp6 is a transcription factor that is specifically expressed in the tooth germ. It is reported that Sp6 deficiency causes supernumerary teeth and the abnormality in amelogenesis. However, the molecule mechanism remains unclear. The results of the present study demonstrating that the post-translational modification influences the Sp6 activity may become the basic knowledge for the clinical application of the tooth regeneration therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,340,000 | 402,000 | 1,742,000 |
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,540,000 | 762,000 | 3,302,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：機能系基礎歯科学

キーワード：Sp6 SUMO化 翻訳後修飾 メチル化 歯胚特異的

1. 研究開始当初の背景

Sp6は2004年に初めて報告された新規のSp型転写因子ファミリー（Sp1-Sp9）の1つである。当初、Sp6について明らかにされた事柄は歯特異的発現遺伝子同定による遺伝子構造とin situ hybridization解析による発現の時期（胎児期）と部位（歯）であった。

近年においては、歯の形成に関わる転写因子Sp6について重要な以下の2つの研究成果（1）及び2）が報告されている。

1) Loss of function 解析：

Sp6遺伝子ノックアウトマウスは、機能的な歯の欠損、無毛症、四肢の形成異常、肺の

形成異常を示すことが示された(Nakamura T *et al.*, J Biol Chem. 283, 4825-4833, 2008; Hertveldt V *et al.*, Dev Dyn. 237, 883-892, 2008)。

2) Gain of function 解析:

歯原性上皮細胞におけるSp6遺伝子の過剰発現はfollistatin遺伝子の発現抑制を介して、歯の発生・分化の促進に働いていることが示唆された(Ruspita *et al.*, J. Med. Invest. 55, 87-98, 2008)。

以上の研究の推移から現時点において、転写因子Sp6は歯芽組織を始めとした上皮間葉相互作用によって形成される外胚葉性上皮組織・臓器の発生・分化の調節において極めて重要な分子であるという認識がなされ、その機能解明に熱い視線が注がれている。そこで分子構造を入念に調べ以下の点に注目した。

3) 翻訳後修飾の可能性

Sp6分子の構造的特徴を分析し、*in silico* 解析したところ翻訳後に種々の修飾を受け、転写因子としての活性制御を受けると考えられるドメイン構造の存在を見出した。

Sp6分子のアミノ酸配列の中に、リン酸化、アセチル化、SUMO化、ユビキチン化などの修飾を受ける可能性が見出された。その中で、SUMO化コンセンサス配列(Ψ KxE)が2カ所認められた。Sp6と遺伝子ファミリーを構成するSp/KLF転写因子ファミリーのうちSp3やKLF5がSUMO化を受けることが報告されている事から相同性の高いファミリーメンバーの一つであるSp6においてもSUMO化修飾を受け、転写因子としての活性に影響を与えている事が示唆された。

2. 研究の目的

Sp6分子内の構造とノックアウトマウスの表現型との機能的相関については、何ら明らかにはなっていない。この点を明らかにする事は転写因子Sp6の生理的意義を明らかにする事になる重要な課題と考えられた。そこで以下の図1のように、

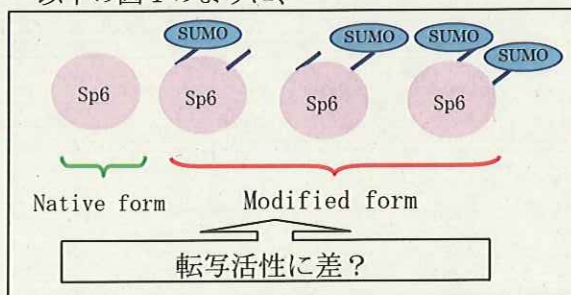


図1 Sp6分子のSUMO化修飾と活性調節

Sp6は翻訳後修飾を受ける事で、活性制御を調節しているという仮説を想定し、検証する研究計画を立てた。このSp6分子構造とその修飾による活性制御の機能的解明は、歯の発生・分化制御機構の解明の一端に寄与することが考えられる。さらに歯科医学の観点から、将来の歯の再生のための臨床応用に重要な知見を提供することが期待されると考えた。そこで、この2年間の研究課題は、「Sp6分子構造の機能解析」とした。

3. 研究の方法

1) 発現ベクターの作成

ヒト皮膚繊維芽細胞のfull-length cDNAからSUM2-Forward primer(5' -ctcgagccatgtatccatatgatgttccagattatgctgcccagcaaaaagcccaaggaa-3')/SUM2-Revers primer(5' -TCTAGACTAacctcccgtctgctgttgaacac-3')SUM03-Forward primer(5' -ctcgagccatgtatccatgatgttccagattatgcttccgaggagaagcccaaggag-3')/SUM03-Reverse primer(5' -tctagactaacctcccgtctgctgtggaacacgctc-3') [二重下線:XhoI /XbaI site, 下線 HAtag] を用いてprime star GXL polymerase (TaKaRa)にてPCR増幅した。得られたPCR断片をXhoI、XbaIにて酵素処理をし、pCI-neo Mammalian Expression Vector (Promega)へ挿入しシークエンスにて塩基配列を確認後、発現ベクターとして用いた。

2) tranfection

Cos7細胞を10% fetal bovine serum (FBS; JRH Biosciences, Lenexa, KS)入りのDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Nissui, Tokyo, Japan)で培養を行いtransfectionのサンプルとした。Lipofectamine plus reagent (Invitrogen)をInvitrogenプロトコルに従い①空ベクター②N-Flag-HA-Sp6③N-Flag-HA-Sp6/HA-SUMO1/HA-UBC9④N-Flag-HA-Sp6/HA-SUMO2/, HA-UBC9⑤N-Flag-HA-Sp6/HA-SUMO3/HA-UBC9をそれぞれcos7細胞へtransfectionして24時間後に細胞のharvestを行った。

3) ウェスタンブロット

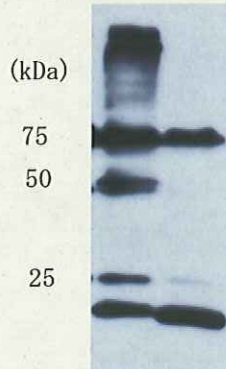
発現を確認するために上記共発現サンプルを2×sample buffer(12.5mM Tris-HCl(pH6.8) 20%Glycerol 4%SDS)に溶解した。蛋白量はBCA Protein Assay kit (Pierce, Rockford, IL)にて測定を行い、total 15ug蛋白量を用いた。12.5%SDS-polyacrylamide gelsにて泳動した後PVDF membrane(ImmobilonTm-P:Millipore, Bedford, MA)に転写し、HA抗体

(1:5000;sc-805;Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) Flag抗体 (1:5000 ; SIGMA F3165) にて発現を確認した。

4. 研究成果

研究開始年度において、HA-SUMO1 active form、HA-Ubc9、HA-Sp6発現ベクターをCos7細胞に共発現させHA抗体でウエスタンブロットを行った結果、SUMO1 active form存在下でSDS-PAGE上の移動度が遅いバンドとadditionalなバンドが検出された (図2)。

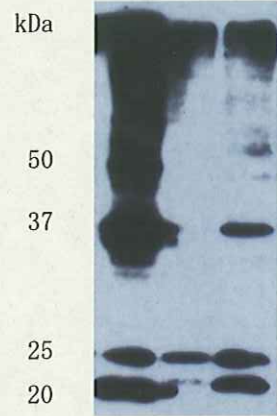
| | | |
|--------------------------------|---|---|
| Sp6 (WT)/C-HA/pCI-neo | + | + |
| Ubc9/pCGN-HA | + | + |
| SUMO1GG/pCGN-HA (activeform) | + | - |
| SUMO1G/pCGN-HA (inactive form) | - | + |



(図2 HA抗体による検出)

このことから、共発現させている細胞の中でSUMO化が起こっていることを確認した。検出されたバンド群内にSUMO化したSp6を含んでいるかどうかを確認するために、HA-Sp6の発現ベクターの5'末端にFlagのタグ3'にHisタグをつけ、Flag抗体・His抗体によって発現を確認したところ、バンドの移動・additionalなバンド共に確認されなかった。さらに、SUMOたんぱく質はSUMO1、SUMO2、SUMO3が存在する。SUMO2・SUMO3における発現を確認するために、HAタグを付加した発現ベクターを作成し、発現をSDS-pageにて確認したが、Sp6がSUMO化したバンド確認されなかった (図3, 4)。

| | | | |
|------------------------------|---|---|---|
| N-FlagSp6-C-His/pCI-neo | + | + | + |
| Ubc9/pCGN-HA | + | + | + |
| SUMO1GG/pCGN-HA (activeform) | + | - | - |
| SUMO2-HA/ pCI-neo | - | + | - |
| SUMO3-HA/ pCI-neo | - | - | + |



(図3 HA抗体による検出)

| | | | |
|------------------------------|---|---|---|
| N-FlagSp6-C-His/pCI-neo | + | + | + |
| Ubc9/pCGN-HA | + | + | + |
| SUMO1GG/pCGN-HA (activeform) | + | - | - |
| SUMO2-HA/ pCI-neo | - | + | - |
| SUMO3-HA/ pCI-neo | - | - | + |

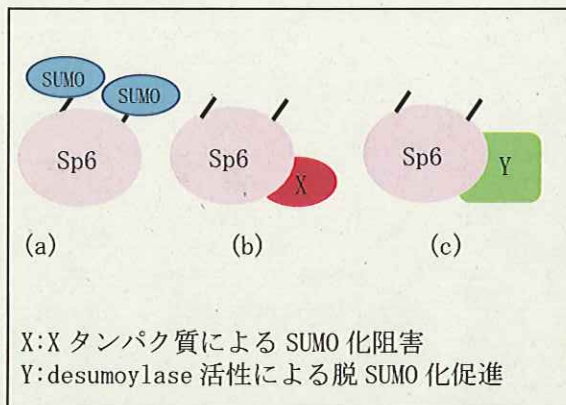


(図4 Flag抗体による検出)

(結論)

以上の実験結果から現在までのところ、Sp6分子がSUMO化される直接的な証拠は検出できなかった。現時点でのSUMO化修飾の可能性として、以下の3点が考えられた。

- 1) Sp6分子上の2カ所のSUMO化部位は機能していない。
- 2) 評価システムに用いている細胞宿主が歯原性上皮細胞ではないことからSUMO化修飾が受けにくい状況になっている。
- 3) Sp6の修飾にはNFkB/IkBのコピキチン化による活性制御例のように、別の分子Xを介して相互作用が必要である。
- 4) Sp6のSUMO化修飾を消去する酵素(desumoylase)活性が使用した宿主細胞に強く存在した。
- 5) これらの点を踏まえ、図5のような作業仮説モデルを構築した。



(図5細胞性因子X、YによるSUMO化制御モデル)

今後の課題

結論で述べた作業仮説モデルを検証するため今後の取り組みとして、細胞性の修飾制御の可能性を除去する実験系として *in vitro* でSUMO化酵素カスケードを用いてイソペプチド結合を介したターゲットタンパク質上の特定のリジン残基に対するSUMO化修飾の有無を検討する必要がある。

又、SUMO1、2もしくは3のC末端との共有結合により、Sp6分子に対するSUMO化が直接的に生じるかどうかその有無を確認することも必要である。

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0件)

[学会発表] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩田 浩子 (HAGITA HIROKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・技術員

研究者番号：30512123