

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18786

研究課題名(和文)トポロジー変換による頂底極性決定に伴うエナメル芽細胞分化制御機構の解明

研究課題名(英文)The mechanism of ameloblast differentiation associated with apicobasal polarity induced by topological conversion.

研究代表者

宮崎 佳奈子 (Miyazaki, Kanako)

九州大学・歯学研究院・特別研究員 (RPD)

研究者番号：30778840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯はその形状の複雑さから再生は未だ困難だが、器官特異的な形態変化のメカニズムを解明できれば歯の再生に近づくことができると考えられる。これまでの研究で、デスモゾーム構成因子である Plakophilin 1 (Pkp1) を抑制すると、器官培養において歯のサイズが小さくなること、歯の初期発生において PKP1 が核内に局在することを明らかにしたが、核内での機能は不明であった。本研究では、PKP1 が、そのN末端側の核移行シグナル配列を介して核内移行し、転写共役因子として TCF/LEF を介して c-Myc の転写制御を行い、細胞増殖を調節することで、歯の大きさに影響を及ぼしていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯を含む口腔の器官再生は歯科医学の最終目的と言えるが、歯はその形状の複雑さから発生メカニズムの解明やその再生が未だ困難である。本研究によって外胚葉異形成症の原因遺伝子の1つである Pkp1 が歯原性上皮細胞の分化の初期段階において核内で転写共役因子として細胞増殖に関与し、歯のサイズに関与している可能性を発見した。この成果は、歯の発生における歯原性上皮幹細胞の新たな機能解明の進展が期待される。歯の分化メカニズムの厳密な制御が可能となれば、将来的に歯の再生やエナメル質形成を可能にすると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Regeneration of teeth is still difficult because of their complex shape. However, clarifying the mechanism of organ-specific morphological changes would be able to bring us closer to tooth regeneration. Previous studies showed that suppression of the desmosomal protein Plakophilin 1 (PKP1) induces smaller tooth size in ex vivo culture method, and PKP1 localizes into the nucleus during the early tooth development stage. However, it remains unclear about the function in the nucleus. In this study, we showed that PKP1 translocates to the nucleus via its own N-terminal nuclear localization sequence. We also identified that PKP1 regulates c-Myc transcription via TCF/LEF, which regulating cell proliferation and tooth size.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯 細胞間接着因子 細胞増殖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯原性上皮細胞はエナメル芽細胞へと分化する過程で、その形態を球状から立方体、そして円柱状へと変化させる。我々はこれまでの研究で、接着関連タンパク質 Plakophilin 1 が、歯原性上皮細胞において ZO-1 と共局在し、細胞の形態に影響を与えることを明らかにしてきた。一方で、歯原性上皮細胞の分化過程で核内から細胞膜へその局在を変化させることを発見し、その局在変化は Wnt 刺激によって惹起される可能性を示してきた。しかしながら、核内に移行した PKP1 が歯の上皮細胞の分化課程においてどのような役割を果たしているかの詳細は未だ不明である。

2. 研究の目的

PKP1 が核内移行するメカニズムおよび核内移行後の転写制御メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1)PKP1 が核内移行するメカニズム、(2)核内での転写制御メカニズム、の解明を目的として解析を行った。以前の研究で、申請者は PKP1 の発現ベクターを用いて様々なコンストラクトを作成し解析をしたところ、核内移行には PKP1 の N 末端側が重要であることを解明したため、PKP1 のアミノ酸配列と結合タンパク質に着目し、以下の解析を行った。

(1)PKP1 の N 末端側 (アミノ酸配列 161-270)が核移行シグナルに関与する

内因性の PKP1 の影響を排除するため、歯原性上皮細胞株 M3H1 細胞において CRISPR/Cas9 システムを用いて Pkp1 遺伝子欠損細胞株 (PKP1-KO)を作製した。M3H1 細胞は恒常的に幹細胞マーカーを発現し、カルシウム添加によって幹細胞が減少し、長期培養によってエナメル芽細胞へと分化する (Han et al., *JBC*, 2018, Tian et al., *Scientific reports*, 2022)。

PKP1 の N 末端側のアミノ酸配列 161-270 が核移行シグナル (nuclear localization signal/sequence; NLS)に関与する可能性があるためアミノ酸配列を変異させたコンストラクトを作製し、細胞内局在の変化およびその配列について解析を行った。

PKP1 と核移行シグナルに必要な輸送タンパクとの結合を液体クロマトグラフ質量分析法 (Liquid Chromatograph-Mass Spectrometry: LC-MS/MS) および免疫沈降法にて同定した。

(2)PKP1 が転写共役因子として転写制御へ関与する

PKP1 はその構造に armadillo repeat domain を有しており、TCF/LEF を介した転写調節に関与する可能性が考えられる。そのため、PKP1 と TCF/LEF が結合することを TOP Flash/FOP Flash 活性を用いて解析した。

PKP1 が TCF/LEF を介して細胞増殖を行っている標的遺伝子を ChIP 解析にて同定すると共に、プロモーターアッセイにて検証を行った。

4. 研究成果

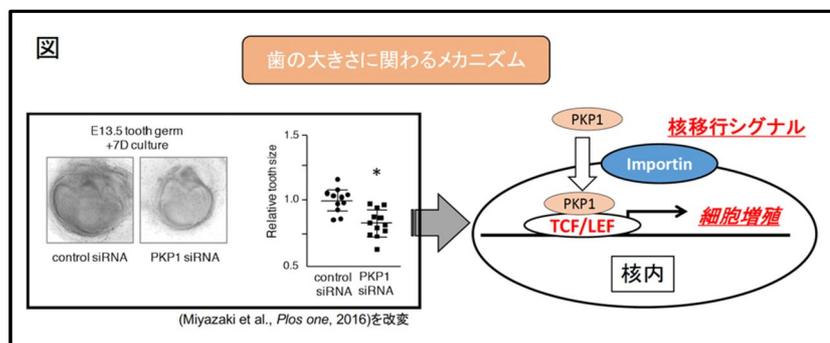
(1) PKP1 は N 末端側に NLS を有し、核内移行を行う

PKP1-KO M3H1 細胞株を樹立し、シーケンスおよび免疫染色法および western blotting 法にて確認を行い、PKP1 が欠失していることを確認した。また、cNLS Mapper (Kosugi et al., *PNAS*, 2009) といったアルゴリズムを利用し、PKP1 の N 末端側に NLS に関与すると考えられる塩基性アミノ酸クラスターを予測した。PKP1 の N 末端側および C 末端側を欠損させたコンストラクトや、さらに予測されるアミノ酸クラスターを置換した変異コンストラクトに GFP 融合させた発現ベクターを作製し、PKP1-KO M3H1 細胞にて核内移行について検証した。その結果、アミノ酸を置換したコンストラクトでは核内移行を生じず、予測したアミノ酸クラスターが核内移行に関与することが示された。さらに LC-MS/MS および免疫沈降法を用いて核輸送タンパク質である importin と PKP1 が結合することを確認した。

(2) 核内に移行した PKP1 は TCF/LEF を介して c-Myc の転写制御を行う

Wnt シグナル経路は β -catenin 依存性である canonical pathway と非依存性の non canonical pathway に大別される。PKP1 は、 β -catenin 分解酵素である GSK3 β の阻害剤 lithium chloride (LiCl) によって核内移行するため、TOP Flash/ FOP Flash レポーターアッセイシステムを用いて TCF/LEF のプロモーター活性の有無について検証した。その結果、M3H1 細胞株に LiCl を添加し上昇したレポーター活性は、PKP1-KO M3H1 細胞では減少することを確認した。さらに TCF/LEF の下流の標的遺伝子として、細胞増殖に関与する c-Myc の可能性が示唆されたため、c-Myc のプロモーター領域に PKP1 が結合することをクロマチン免疫沈降法にて検証した。その結果、PKP1 と c-Myc のプロモーター領域の結合が確認された。このことから、PKP1 は TCF/LEF を介して c-Myc のプロモーター領域に転写共役因子として結合し、細胞増殖を制御している可能性が示唆された

以上より、PKP1 は歯の発生初期では、NLS を介して importin と結合して核内移行を行うことが判明した。さらに、転写共役因子として TCF/LEF を介して c-Myc の転写制御に関与し細胞増殖を調節することで、歯のサイズに影響を及ぼしている可能性が示された (図)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tian Tian, Miyazaki Kanako, Chiba Yuta, Funada Keita, Yuta Tomomi, Mizuta Kanji, Fu Yao, Kawahara Jumpei, Han Xue, Ando Yuna, Funada Ami, Yamada Aya, Iwamoto Tsutomu, Nakamura Seiji, Takahashi Ichiro, Fukumoto Satoshi, Yoshizaki Keigo	4. 巻 12
2. 論文標題 An ex vivo organ culture screening model revealed that low temperature conditions prevent side effects of anticancer drugs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-06945-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Chiba Y., Yoshizaki K., Tian T., Miyazaki K., Martin D., Saito K., Yamada A., Fukumoto S., Genomics and Computational Biology Core	4. 巻 101
2. 論文標題 Integration of Single-Cell RNA- and CAGE-seq Reveals Tooth-Enriched Genes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 542 ~ 550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/00220345211049785	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 宮崎 佳奈子, 吉崎 恵悟, 傅 堯, 鮎田 啓太, 湯田 智美, 田 甜, 水田 敢士, 川原 純平, 福本 敏, 高橋 一郎
2. 発表標題 デスモゾーム構成因子 Plakophilin 1 は核内移行シグナルを介して細胞増殖を制御する
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 傅 堯, 宮崎 佳奈子, 吉崎 恵悟, 田 甜, 鮎田 啓太, 湯田 智美, 水田 敢士, 川原 純平, 花田 彩圭, 高橋 一郎
2. 発表標題 GPI アンカー型タンパク質Lypd1は歯の発生において象牙芽細胞分化を制御する
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田 甜, 吉崎 恵悟, 宮崎 佳奈子, 鮎田 啓太, 湯田 智美, 水田 敢士, 傅 堯, 川原 純平, 福本 敏, 高橋 一郎
2. 発表標題 低温器官培養法を用いた抗癌剤シクロホスファミドによる歯胚形成阻害回避モデルの構築
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水田 敢士, 吉崎 恵悟, 宮崎 佳奈子, 鮎田 啓太, 湯田 智美, 田 甜, 傅 堯, 川原 純平, 福本 敏, 高橋 一郎
2. 発表標題 基底膜分子NephronectinはRGD領域を介してエナメル芽細胞の分化制御に関与する
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 傅 堯, 宮崎 佳奈子, 吉崎 恵悟, 田 甜, 鮎田 啓太, 湯田 智美, 水田 敢士, 川原 純平, 花田 彩圭, 高橋 一郎
2. 発表標題 GPIアンカー型タンパク質Lypd1は歯の発生において象牙芽細胞分化を制御する
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会学術大会&第5回国際会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田 甜, 吉崎 恵悟, 宮崎 佳奈子, 安藤 優那, 鮎田 啓太, 湯田 智美, 水田 敢士, 傅 堯, 川原 純平, 高橋 一郎
2. 発表標題 抗がん剤シクロホスファミドの歯胚に与える影響と副作用回避法の検索
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会学術大会&第5回国際会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水田 敢士, 吉崎 恵悟, 宮崎 佳奈子, 田 甜, 鮎田 啓太, 湯田 智美, 傅 堯, 川原 純平, 高橋 一郎
2. 発表標題 基底膜分子Nephronectinは歯の発生においてRGD配列を介してエナメル芽細胞分化を制御している
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会学術大会&第5回国際会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎 佳奈子, 吉崎 恵悟, 傅 堯, 鮎田 啓太, 湯田 智美, 田 甜, 水田 敢士, 川原 純平, 花田 彩圭, 高橋 一郎
2. 発表標題 外胚葉異形成症原因遺伝子Plakophilin 1は転写共役因子として上皮形成を促進する
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会学術大会&第5回国際会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 湯田 智美, 吉崎 恵悟, 田 甜, 宮崎 佳奈子, 鮎田 啓太, 水田 敢士, 傅 堯, 川原 純平, 花田 彩圭, 高橋 一郎
2. 発表標題 歯胚器官培養法を用いた温度刺激による器官形成制御法の確立
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会学術大会&第5回国際会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mizuta K, Yoshizaki K, Yuta T, Miyazaki K, Funada K, Tian T, Fu Y, Chiba Y, Takahashi I, Fukumoto S
2. 発表標題 A basement membrane protein Nephronectin plays important roles in tooth development
3. 学会等名 A special symposium celebrating the 50th anniversary of the Protein Data Bank (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mizuta K, Yoshizaki K, Miyazaki K, Funada K, Yuta T, Tian T, Fu Y, Kawahara J, Takahashi I
2. 発表標題 The role of basement membrane protein Nephronectin in tooth development.
3. 学会等名 Kyudai Oral Bioscience & OBT Research Center 5th Joint International Symposium 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	吉崎 恵悟 (Yoshizaki Keigo) (10507982)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------