

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：16101
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21791805
 研究課題名（和文）歯胚特異的転写因子 Sp6 の活性-構造相関の解明と相互作用分子の同定
 研究課題名（英文）Relationship between transcriptional activity and structure of tooth specific transcription factor Sp6 and identification of its interaction molecules

研究代表者
 三好 圭子（MIYOSHI KEIKO）
 徳島大学・大学院ヘルスパイオサイエンス研究部・講師
 研究者番号：20304537

研究成果の概要（和文）：歯胚特異的転写因子 Sp6 の活性-構造相関を探るため、発現誘導系を構築する過程で、SP6 タンパク質がユビキチン非依存性のプロテアソーム分解系を介した短命なタンパク質であることを発見し、その性質を利用して発現誘導系を構築し、歯原生上皮細胞分化における新たな標的遺伝子候補を同定した。また転写因子として核に局在し、転写活性化能を有するには、完全長の立体構造が必要であり、かつ相互作用する分子の存在が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Through the generation of SP6 inducible system, we found that SP6 is the short lived protein and degrades via ubiquitin-independent proteasome system. We further established inducible SP6 expression system and identified some candidate genes of SP6 target by microarray analysis. Furthermore, it is suggested that the full length of SP6 and its structure may be important to regulate the subcellular localization and transcriptional activity of SP6.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

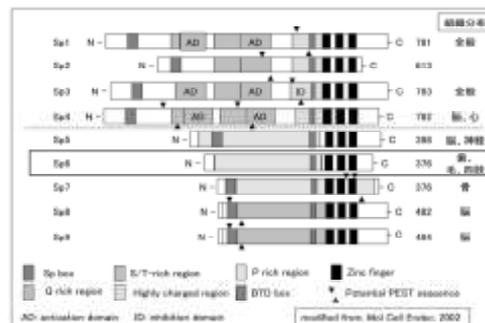
科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：転写因子、SP6、機能ドメイン、転写活性、細胞内局在、標的配列、活性-構造相関、相互作用分子

1. 研究開始当初の背景

Sp6 は転写因子 Sp ファミリーメンバー（Sp1-Sp9）の1つであり、C末側に3つの Zinc finger ドメイン(DNA 結合)と Btd box (機能不明)を共有するが、他のメンバーと異なり、N末側に Sp box がなく、一般的に分子間相互作用のインターフェイスとして知られるプロリン・リッチ領域を持つ (図1)。

Sp ファミリーは long type と short



type に大別でき、前者は比較的ユビキタスに発現し、Sp1 や Sp3 のようにその構造-活性相関の研究が進んでいるが、後者は Sp6 (別名 epiprofin、歯、毛包、四肢に局在) や Sp7 (別名 osterix、骨に局在) のように組織特異性が高く、その機能は該当組織の発生分化と密接な関係が示唆されている (Mol. Cell. Endo., 2002)。

図 1 Sp ファミリーのドメイン構造

私達はこれまでに、エナメル芽細胞の分化・成熟機構の研究過程で Sp6 抗体を作製し、タンパク質レベルでその局在を確認するとともに、Sp6 過剰発現細胞株を作製し、gain-of-function による機能解析を行い、Sp6 による下流遺伝子の発現調節をマイクロアレイにより網羅的にスクリーニングした。その結果、BMP アンタゴニストであるフォリスタチンの発現を Sp6 が抑制制御することを発見した (J Med Invest. 2008)。フォリスタチンが BMP シグナルの制御を通してアメロジェネシスをコントロールしていることから (Eur J Oral Sci. 1999, Dev. Cell 2004)、私達は「Sp6→フォリスタチンを抑制→BMP シグナル→アメロジェネシス」というモデルを提唱している (J Med Invest. 2008)。一方国外では、2つのグループが loss-of-function による Sp6 欠失マウスの表現型を報告し (Dev. Dyn, 2008; JBC, 2008)、歯数、位置、形態形成の制御において重要な役割を果たす事を報告しているが、その分子メカニズムは未解明である。

Sp6 の構造については他の Sp ファミリーメンバーと異なる N 末領域には、他のタンパク質との相互作用の局面となり得る 7つのプロリン・リッチ領域 (PxxP) やリン酸化の候補部位 15 個があり、C 末 zinc finger 部の前後には 2つの核移行シグナル様配列や 8 個のリン酸化候補部位、その他修飾を受けやすいリジンも存在する (未発表)。

以上の学術的背景から、本研究では未解明である Sp6 の構造と機能の相関を明らかにし、相互作用する分子を同定することは、重要かつ急務であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、Sp6 の構造と活性の相関を明らかにし、歯の発生分化における Sp6 の役割を明らかにするとともに、Sp6 タンパク質の発現調節機構を解明することを目的とし、将来の歯胚再生 (歯の再建) へと発展させるための基礎研究と位置づける。

3. 研究の方法

(1) 種々の Sp6 short form 発現ベクターの構築

アミノ酸配列から想定される種々の機能ドメインを持つ Sp6 の short form を rat molar total RNA より RT-PCR にてクローニングし、CMV プロモータ発現ベクターに組み込んだ。検出用に FLAG tag を付加した。

(2) 遺伝子導入

COS7 cells または歯原性上皮細胞 G5 cells に、種々の Sp6 発現ベクターをリポフェクション法により導入した。

(3) 免疫細胞染色

遺伝子導入して 24 時間および 48 時間後 SP6 の細胞内局在を、FLAG tag 抗体及び蛍光標識 IgG 抗体を用いて検出した。

(4) SP6 過剰発現株 C9 細胞を用いた SP6 誘導系の構築

SP6 過剰発現株 C9 細胞 (HA tag を付加した SP6 の恒常発現株) を用いて MG132 (Proteasome 阻害剤) による SP6 の発現誘導系を構築した。

(5) SP6 タンパク質の検出

HA tag 抗体を用いて Western blot 法により SP6 タンパク質を検出した。

(6) SP6 の半減期とプロテアソーム活性の測定

半減期はシクロヘキシミドで処理した C9 細胞を経時的に回収し、western blot 法にて解析した。プロテアソーム活性は 20S proteasome activity assay kit (Cayman) を用いて測定した。

(7) 免疫沈降法

C9 細胞のタンパク質抽出液を HA 抗体により SP6 タンパク質を免疫沈降法にて回収し、SP6 の翻訳後修飾 (ユビキチン化、SUMO 化等) を検討した。

(8) SP6 の標的遺伝子の探索

C9 cells をあらかじめ Sp6 特異的 SiRNA によりノックダウンしておき、MG132 により SP6 の発現誘導を行うことで in vitro の SP6 発現レベルをコントロールし、その細胞を回収、全 RNA を抽出してマイクロアレイ (アフィメトリクス) により標的遺伝子候補を探索した。

(9) 標的遺伝子候補の発現レベルの確認

RT-PCR または qRT-PCR にて各遺伝子の発現レベルを確認した。

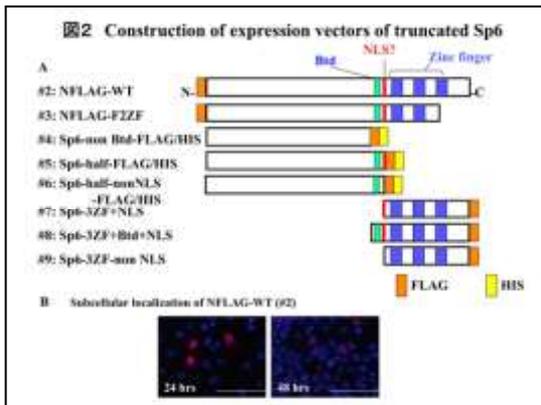
(10) SP6 転写活性の検討

アメロチンプロモーターを in silico 解析し、レポーターベクターを構築した。また、SP6 結合配列といわれている GC-box および GT-box のレポーターベクターも構築した。転写活性化能はルシフェラーゼアッセイにより測定した。

4. 研究成果

(1) アミノ酸配列に基づく SP6 機能ドメインの想定と SP6 short form 発現ベクターの構築

未解明である Sp6 の構造と機能の相関を解明するため、アミノ酸配列をもとに想定される核移行シグナルを含む機能ドメインまたはモチーフをもつ種々の長さの Sp6 (Sp6 全長、C 末 Zn フィンガーのみ (± Btd ドメイン)、N 末プロリン・リッチ領域のみ (± Btd ドメイン) に FLAG タグを付与した発現ベクターを作製した (図 2 A)。



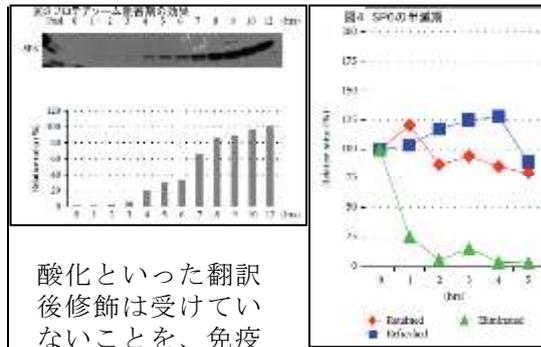
これらの発現ベクターを Cos7 細胞および当研究室で樹立した歯原性上皮細胞クローン (G5) に遺伝子導入し、各 Sp6 の部分欠失型タンパク質を発現させ、FLAG タグ抗体にて細胞内局在およびタンパク質発現レベルを検討したところ、全長 Sp6 に比べ、C 末側のみまたは N 末側のみで Btd ドメインをもつ部分欠失型 Sp6 は発現レベルが顕著に低下していた。また、全長 Sp6 は核に局在しているにもかかわらず、作製した部分欠失型 Sp6 はいずれも細胞質に局在していた。以上のことから Sp6 が転写因子として機能するために核に局在するためには全長の立体構造が必要であることが示唆された (未発表データ)。

また、発現誘導 24 時間後と 48 時間後ではタンパク質の発現レベルがことなることから (図 2 B)、タンパク質の安定性の問題が示唆された。

(2) SP6 の安定性と標的遺伝子

SP6 タンパク質の安定性については相互作用分子を同定する際に用いる細胞材料の条件選択に重要な意味を持つことから、SP6 の安定性の制御機構について、すでに当研究室で構築済みの SP6 過剰発現株 C9 細胞 (HA tag を付加した SP6 の恒常発現株) を用いて検討した。その結果、SP6 の半減期が短く (T_{1/2}=40 分)、プロテアソーム分解系を介して SP6 の発現レベルを調整していることを見出した (図 3、4)。

また、プロテアソーム分解系ではユビキチン依存性及び非依存性の両経路が存在しているが、SP6 はユビキチン化、SUMO 化、リン



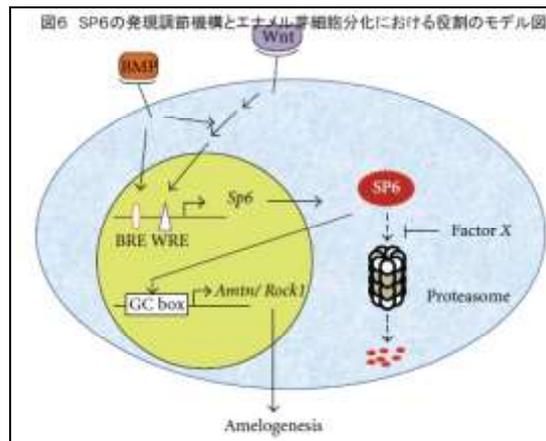
酸化といった翻訳後修飾は受けていないことを、免疫沈降法により解明した。さらに同時にプロテアソーム阻害剤と siRNA を組み合わせることにより新たな in vitro SP6 誘導システムを構築し、マイクロアレイにより新たな SP6 のターゲット遺伝子候補を解析し、エナメル芽細胞分化との関連が報告されているアモロチン (Amtn) と Rock1 を同定した (図 5)。

図5 マイクロアレイの結果(一部抜粋)

Downregulation by Sp6-siRNA	Array results	
	24 hrs (%)	48 hrs (%)
<i>Amtn</i>	44.8	9.3
<i>Pcm1</i>	53.3	39
<i>Rock1</i>	44.1	50

Upregulation by Sp6-siRNA	Array results	
	24 hrs (%)	48 hrs (%)
<i>Car3</i>	283.5	154.2
<i>Fst</i>	230.4	454.3
<i>Osr2</i>	141.7	238.5

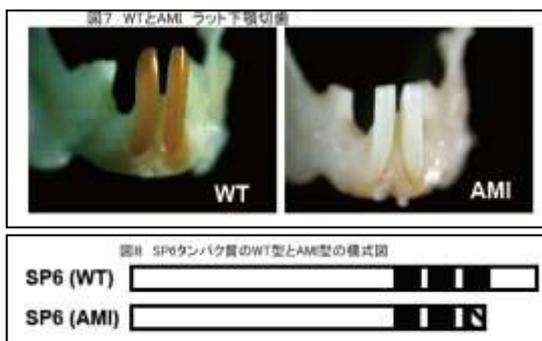
以上のことから、転写因子 SP6 は半減期が短く、SP6 タンパク質の安定性により歯の発生分化における転写制御を行っている可能性が示唆された。これらの結果は *J Biomed Biotech.*, 2011 (Article ID: 320987) に報告した (図 6)。



(3) SP6 の構造-活性相関

エナメル質形成不全症 (AI) のモデル動物の一つに、AMI ラットがある (Lab Anim Sci, 1990)。常染色体劣性遺伝様式をとる AI 表現型の原因遺伝子は不明のままであった。最近、私たちはこの AMI の原因遺伝子が Sp6 であ

り、その2塩基挿入により AI 表現型を引き起こしていることを、シーケンス及びリンケージ解析から明らかにし、*Orphanet J Rare Dis.* (in press) に報告した (図7、8)。



そこで SP6 の転写因子としての機能に影響を及ぼす領域の同定を行った。GC-box, GT-box を挿入したレポーターベクターと種々の長さの SP6 発現ベクターを歯原性上皮細胞 G5 に導入し、レポーターアッセイにより転写活性化能に及ぼす SP6 タンパク質の構造の影響を解析した。その結果、SP6 全長タンパク質を用いた実験では GC-box, GT-box のいずれもコントロールベクター単独でレポーター活性が高く、SP6 タンパク質の本来の活性を評価するのが困難であることが判明した。そこで、SP6 標的遺伝子の一つである、フォリスタチン(Fst)およびアメロチン(Amtn)の各プロモーターを連結したレポーターを用いて同様の解析を行った。陽性コントロールとしては SP1 発現ベクターを構築し、使用した。その結果、SP1 では Fst プロモーターで約 10 倍、Amtn プロモーターで約 1.8 倍の活性があり、全長 SP6 ではそれぞれ約 3 倍ほどの転写活性を検出した。さらに3つのジンクフィンガードメインのうち1つまたはすべて欠損させても Amtn レポーター活性に影響をほとんど与えなかったが、Fst プロモーターでは1つ欠損することでレポーター活性が強度に低下し、すべて欠損させると中程度に活性が低下した (未発表データ)。

以上のことから、1) SP6 の標的 DNA 結合配列は一般的な GC-, GT-box ではない 2) 相互作用する分子の存在、の2つの可能性が示唆された。現在、免疫沈降法により SP6 が直接結合している DNA またはタンパク質を回収し同定するためのサンプル調整を行っているが、現時点では回収量が不十分のため、方法を改良中である。

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5件)

1. Novel genetic linkage of rat *Sp6*

mutation to amelogenesis imperfecta., Muto T*, Miyoshi K*, Hagita H, Horiguchi T, Noma T. *Orphanet J Rare Dis.*, 査読有, in press (*co-first author)

2. Dynamic Changes of *Sp6* Transgene Expression in Dental Epithelial Cells during Long-term Culture., Utami TW, Miyoshi K, Hagita H, Yanuaryska RD, Horiguchi T, Noma T., *Indones J Dent Res.*, 査読有, in press.
3. Dissection of morphological and metabolic differentiation of ameloblasts via ectopic SP6 expression., Muto T, Miyoshi K, Horiguchi T, Noma T. *J Med Invest.*, 査読有, 59, 59-68, 2012
4. Possible linkage of SP6 transcriptional activity with amelogenesis by protein stabilization., Utami TW, Miyoshi K, Hagita H, Yanuaryska RD, Horiguchi T, Noma T., *J Biomed Biotech.*, 査読有, 2011, Article ID 320987, doi:10.1155/2011/320987
5. Isolation and characterization of mouse Specificity Protein 6 promoter. Wahyudi IA, Horiguchi T, Miyoshi K, Muto T, Utami TW, Hagita H, Noma T., *Indones J Dent Res.*, 査読有, 1(1), 21-34., 2010

[学会発表] (計6件)

1. Yanuaryska RD et al., Identification of SP6 target genes in rat dental epithelial cells, 第53回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2011年10月1日, 長良川国際会議場 (岐阜県)
2. Utami TW et al., SP6 stability and functional linkage during amelogenesis, 第84回日本生化学会大会, 2011年9月22日, 国立京都国際会館 (京都府)
3. Utami TW et al., Regulation of Sp6 expression and function in dental epithelial cells, 第5回日本エピジェネティクス研究会年会, 2011年5月20日, KKRホテル熊本 (熊本県)
4. Utami TW et al., Regulation of Sp6 expression and function in C9 cells, 第52回日本生化学会中国・四国支部例会, 2011年5月13日, 広島大学広仁会館 (広島県)
5. Utami TW et al., Differential regulation of Sp6 silencing in dental epithelial cells, International Joint Symposium on Oral Science, 2010年12月17日, Kuta Bali, Indonesia
6. Utami TW et al., Regulation of *Sp6* Expression in CHA9 Cells, 33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学

会大会合同大会, 2010 年 12 月 8 日, 神戸国
際展示場 (神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 圭子 (MIYOSHI KEIKO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・講師
研究者番号: 20304537