

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792083

研究課題名 (和文) 歯牙移動による歯槽骨リモデリング機構における新規分子の役割

研究課題名 (英文) Role on novel protein in alveolar bone remodeling mechanism of tooth movement

研究代表者

村上 絢子 (AYAKO MURAKAMI)

九州大学・歯学研究院・医員

研究者番号：10432923

研究成果の概要 (和文)：

これまで、PRIP-1 の組織特異的な遺伝子発現の制御機構の解明を目的として研究を行ってきた。そこで、比較的ユビキタスに発現している PRIP-2 遺伝子の構造の解析を行った。その結果、PRIP-2 の転写開始点は複数認められ、転写産物はいくつかあることが示唆された。

矯正力による歯牙移動のメカニカルストレスにおける PRIP 蛋白質の役割についての解析を行うことにした。歯牙移動マウスとコントロールマウスでの PRIP-1、PRIP-2 および GABA_A 受容体の各サブユニットの発現量の解析を行った結果、有意差は認められなかった。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we investigated the gene structure of PRIP-2, which exhibited an ubiquitous expression. We found several transcriptional start sites of PRIP-2 gene. This result indicates that PRIP-2 gene produces some transcripts.

To examine the role of PRIP molecule on the alveolar bone remodeling mechanism of tooth movement, we carried out Real-time PCR using tooth movement mice by orthodontic force. There was no significantly difference of the expression level of PRIP-1, PRIP-2 and each subunit of GABA_A receptor in brain, between the tooth movement mice and the control.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1900000	570000	2470000
2010年度	1400000	420000	1820000
年度			
年度			
年度			
総計	3300000	990000	4290000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 矯正・小児系歯学

キーワード：PRIP 転写 スプライシング 歯牙移動 骨リモデリング

1. 研究開始当初の背景

矯正治療は、顎顔面の骨格および歯列・咬合の形態的不正を整え、咀嚼、嚥下、発音、呼吸などの機能改善を図ることを目的として行われる。また、正常な咬合は、機能面だけではなく、精神面での健康をもたらす、Quality of Life, (QOL) の維持のためには重要であるといえる。

GABA をトランスミッターとする抑制性神経伝達はヘテロ 5 量体よりなる受容体 (GABA_A 受容体) のクロライドチャンネルの開口を介してもたらされ、不眠、不安、緊張、けいれん、てんかん、記憶などの複雑な脳・精神機能を形成する分子基盤の重要な一角をなし、精神面での健康の維持に重要な働きをしている。つまり、GABA_A 受容体の機能異常は複雑な脳・精神機能、すなわち「人の心」の健康に障害をもたらすことを意味する。

また、ラットでは、Clozapine や Haloperidol 等の抗精神病薬の長期投与により vacuous chewing 等の不随意顎運動が生じることから、顎運動の key ニューロンである三叉神経中脳路核ニューロンでの GABA_A 受容体の働きを考慮することの意義は大きい。

当研究室では、細胞内情報伝達の一つであるイノシトールリン脂質 (PI) 情報伝達系において、新規の Ins(1, 4, 5)P₃ 結合蛋白質を見いだした。(Kanematsu et al., 1992 J. Biol. Chem. 267, 6518-6525, Kanematsu et al., 2002 EMBO J. 21, 1004-1011.) 本分子は、phospholipaseC- d (PLC- d) と類似のドメイン構造 (PH ドメイン、EF ハンドモチーフ、酵素活性 X および Y ドメイン、C2 ドメイン) を持ちながら PLC の酵素活性は有していなかった。

また後に、タイプ 2 とも言える類似の分子が発見され (Otsuki et al., 1999 B. B. R. C. 266, 97-103. Takenaka et al., 2003 Mol. Cell. Biol. 7329-7338)、我々はこれらを PRIP (PLC-Related Catalytically Inactive Protein, PRIP-1 と PRIP-2) と名付けた。比較的普遍的な発現様式を持つ PRIP-2 に対し、PRIP-1 は脳特異的に発現しており、特に大脳では海馬や皮質の神経細

胞に、小脳ではプルキンエ細胞や小脳核に発現していた。我々は、PRIP-1 が、抑制性シナプス情報伝達に重要な GABA_A 受容体に結合し受容体のクラスターリングを促進すると言われる GABARAP (GABA_A Receptor Associated Protein) に結合することや、GABARAP の GABA_A 受容体γ-サブユニットへの結合において競合的に拮抗することなどを明らかにした。

さらに PRIP-1 のノックアウトマウスを複製し、その解析の過程で、GABA 受容体の亜鉛イオンに対する感受性が PRIP-1 ノックアウトマウスで完全に喪失し、ベンゾジアゼピン系薬剤の感受性に異常が生じていることを明らかにした。これらのことから、PRIP-1 は脳における抑制性シナプス情報伝達機構に、重要な役割を担っている事が示唆される。さらに PRIP-1 遺伝子の脳特異的な発現調節の機構が明らかになれば、PRIP-1 の機能解明につながるだけでなく、抑制性シナプス構築の分子メカニズムの解明の一端をも担うと考えられる。

そこで、PRIP-1 の組織特異的な遺伝子発現の制御機構の解明を目的として研究を行ってきた。PRIP-1 遺伝子については殆ど何も分かっていなかったのので、まず遺伝子構造や転写開始点等を明らかにした上で、制御機構について、特定の制御領域や転写因子の関与等、様々な要素を検討しつつ解析を進めてきた (Murakami et al., gene 382 (129-139) 2006)。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、PRIP-2 の発現調節機構についての研究も進めていくことで、厳密な発現の組織特異性を強いられている PRIP-1 遺伝子の発現調節のメカニズムについてさらに詳しく解析していく。

(2) また、矯正力によるメカニカルストレスにより、歯根膜腔の未分化間葉細胞が骨芽細胞へと分化し、種々の因子を発現することで歯槽骨のリモデリングが活性化され、

歯が移動する。骨芽細胞において、Ca レセプター (CasR) を介し、PLC 活性が調節される。そこで、矯正力による歯牙移動のメカニカルストレスと、PRIP 蛋白質の関係についての解析を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) PRIP-2 遺伝子構造の決定

脳の mRNA を鋳型とし、PRIP-2 特異的なプライマーを用いて、5'RACE 法や primer extension 法を行い、ヒト或いはマウスの PRIP-2 遺伝子の転写開始点を決定する。

PRIP-2 は PRIP-1 に比べ比較的ユビキタスに発現しているため、組織或いは培養細胞の RNA を用いて、逆転写反応により cDNA を作製し、クローニングを行い、その全塩基配列を決定する。

また、PRIP-1 では選択的スプライシングが行われおり、複数の転写産物が同定されていたため、PRIP-2 についても調査する。RT-PCR 解析を行い、その増幅物のシーケンス解析をする。

(2) メカニカルストレスと PRIP 蛋白質との関係性の解明

① 歯牙移動マウスの作製

マウスの臼歯部を固定源として、オープンコイルを用いて、前歯部を前方移動させる。または、マウスの臼歯部をエラストックで歯間分離させる。

一定期間マウスを様々な条件下で飼育した後、各組織のサンプルをとり、分析に用いる。

② 矯正力を加えたマウスにおける PRIP-1 および PRIP-2 の発現量の解析

得られたサンプルを用いて、ウエスタンブロッティング法や、RT-PCR 法で、PRIP1 及び 2 の発現量を調査する。また GABA_A 受容体の各サブユニットにおいても同様の解析を行う。さらには定量的 PCR による解析も行っていく。

③ PRIP-1 ノックアウトマウスでの解析

PRIP-1 ノックアウトマウスでも (1) と同様の方法でマウスの歯牙を移動させ、組織のサンプルを採取し、解析を行っていく。

4. 研究成果

これまで、PRIP-1 の組織特異的な遺伝子発現の制御機構の解明を目的として研究を行ってきた。脳に特異的に発現している PRIP-1 に比べ PRIP-2 は比較的ユビキタスに発現している。

そこで、PRIP-2 遺伝子の構造の解析を行った。組織或いは培養細胞の RNA を用いて、逆転写反応により cDNA を作製し、クローニングを行い、その全塩基配列を決定した。

転写開始点を決定するために、脳の RNA を鋳型として、PRIP-2 特異的なプライマーを用いて、5'RACE 法やキャップサイティング法を行った。その結果、PRIP-2 の転写開始点は複数みとめられ、転写産物はいくつかあることが示唆された。

また PRIP-1 では選択的スプライシングが行われていたため、PRIP-2 の転写産物についても RT-PCR 解析を行い、その間のシーケンス解析をした。しかしながら、今回の研究では、PRIP-2 においては、選択的スプライシングによる転写産物を検出することができなかった。

矯正力によるメカニカルストレスにより、歯根膜腔の未分化間葉細胞が骨芽細胞へと分化し、種々の因子を発現することで歯槽骨のリモデリングが活性化され、歯が移動する。骨芽細胞において、Ca レセプター (CasR) を介し、PLC 活性が調節されるといわれている。

そこで、矯正力による歯牙移動のメカニカルストレスと、PRIP 蛋白質の関係についての解析を行うことにした。

12 週齢の雄マウスの前歯部を固定源として、ニッケルチタンオープンコイルを用いて、約 10g の矯正力を加え、1 週間、粉餌で飼育し、臼歯部を後方移動させ、歯牙移動マウスを作製した。歯牙移動マウスとコントロール

マウスでのPRIP-1およびPRIP-2の発現量をリアルタイム PCR 法を用いて解析を行った結果、両者に有意差は認められなかった。

さらに、GABA_A受容体の各サブユニット(α 1、 β 2/3、 γ 2)の発現量も調べたが、有意差は認められなかった。

これらの結果より、矯正力による歯牙移動のメカニカルストレスにおいて、PRIP は GABA_A受容体を介したシナプス情報伝達系やイノシトールリン脂質 (PI) 情報伝達系からだけではなく、別の系で関与している可能性が示唆された。

現在、我々の研究室では、PRIP 欠損マウスにおいて、野生型に比べ破骨細胞・骨芽細胞が共に多く、海綿骨の骨量が増加しているということが解明され、そのことから骨代謝の亢進により骨量が増加していると考えられている。これまでの GABA_A受容体を介したシナプス情報伝達系やイノシトールリン脂質 (PI) 情報伝達系からだけではなく、骨のリモデリングの系からの解析も行っていく予定である。

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)

[学会発表] (計 1 件)

Ayako Murakami, Miho Matsuda, Koushirou Tsutsumi, Masato Hirata, and Ichiro Takahashi

Studies on characterization of the gene structure and transcriptional regulation of a novel inositol 1,4,5-trisphosphate binding protein, possibly involved in bone metabolism

The 5th International Symposium on Dental and Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration: A View from Stem Cell Research, 2010.2.5

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 絢子 (AYAKO MURAKAMI)

九州大学 歯学研究院 医員

研究者番号 : 10432923

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :