

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 25 年 4 月 18 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2012～2014

課題番号：22592319

研究課題名（和文）歯周組織再生を制御する細胞外マトリックスと転写因子の発現調節機構

研究課題名（英文）Mechanism of transcriptional regulation of extracellular matrix and transcription factors which control periodontal regeneration.

研究代表者

小方 頼昌（OGATA YORIMASA）

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：90204065

研究成果の概要（和文）：プロタミンは、ラットBSPの遺伝子プロモーターに存在するcAMP応答配列(CRE)、FGF2応答配列(FRE)およびホメオボックス応答配列(HOX)を介してBSPの転写を調節した。さらに、リン酸化CREB、c-Fos、c-Jun、JunD、Fra2、Dlx5、Msx2、Runx2およびSmad1は、プロタミンによるBSPの転写調節に関わる転写因子であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Protamine induced BSP transcription by targeting CRE, FRE and HOX sites in the proximal promoter of the rat BSP gene. Moreover, phospho-CREB, c-Fos, c-Jun, JunD, Fra2, Dlx5, Msx2, Runx2 and Smad1 transcription factors appear to be key regulators of protamine effects on BSP transcription.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	3,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯周治療系歯学

キーワード：転写調節、転写因子、骨芽細胞、石灰化、細胞外マトリックス、歯周組織再生

1. 研究開始当初の背景

プロタミンは、アルギニンを多く含む分子量の小さい核内タンパク質であり、精子形成の半数体細胞後期にヒストンと置き換わり、精子頭部の濃縮とDNAの安定化に関与する。プロタミンは、数々の生物学的活性を有し、造血、免疫反応、神経系および骨代謝に関与することが報告されている。

2. 研究の目的

サケ由来の硫酸プロタミンの石灰化および骨芽細胞の分化に対する効果を検討する目的で、骨芽細胞様細胞を培養し、プロタミ

ンを添加後細胞を回収し、石灰化関連転写因子および初期の石灰化に重要な役割を果たすと考えられている、骨シアロタンパク質(BSP)の転写に対する影響を検討した。

3. 研究の方法

1) 細胞培養

骨芽細胞様細胞として ROS17/2.8 細胞を用いた。10%ウシ胎児血清(FCS)を含むα-MEM培地を用い、60 mm培養ディッシュ中で、細胞がコンフルエントになるまで培養し、無血清のα-MEM培地で12時間培養した。ROS17/2.8細胞は、各種濃度のプロタミン

(7.135、71.35 および 713.5 ng/ml) で 12 時間刺激後に細胞を回収した。プロタミン刺激後の BSP mRNA 発現量の経時的変化を検索するために、71.35 ng/ml のプロタミンにて刺激後、3、6、12、24 時間後に細胞を回収し、ノーザンハイブリダイゼーション法またはリアルタイム PCR にて検索した。

2) ノーザンハイブリダイゼーション

回収した ROS17/2.8 細胞からグアニジンチオシアネート法で全 RNA を抽出し、20 μ g の全 RNA を 1.2% アガロースゲルで電気泳動後、ナイロンメンブレンに転写し、紫外線照射でメンブレンに固定した。BSP、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の cDNA を、ランダムプライム法で [α - 32 P] dCTP で標識し、ハイブリダイズ後、フジ BAS 2000 イメージングアナライザーで解析した。

3) リアルタイム PCR

全 RNA (1 μ g) から Exscript RT reagent Kit を用いて cDNA を合成した。リアルタイム PCR 反応は、Runx2、および GAPDH のプライマーを使用し、TP800 thermal cycler dice real time system (Takara 社) で行った。SYBR Exscript RT-PCR Kit を使用し、2 \times SYBR Premix Ex Taq (12.5 μ l)、0.2 μ M の Forward および Reverse プライマー、cDNA (100 ng) を混和後、増幅反応を行った。PCR 反応は、初期変性として 95 $^{\circ}$ C、10 秒を 1 サイクル行ない、次に 95 $^{\circ}$ C、5 秒、60 $^{\circ}$ C、30 秒を 1 サイクルとして 40 サイクル行った。Runx2 発現量は GAPDH の発現量で補正を行った。

4) プラスミドの作製

ルシフェラーゼプラスミドを、制限酵素 HindIII および Sal I で切断し、種々の長さで調節したラット BSP 遺伝子プロモーター配列を挿入した。作製したコンストラクトは、pLUC1 (-18~+60 塩基対)、pLUC2 (-43~+60 塩基対)、pLUC3 (-116~+60 塩基対)、pLUC4 (-425~+60 塩基対)、pLUC5 (-801~+60 塩基対)、pLUC6 (-938~+60 塩基対) で、pLUCB は、プロモーター配列を含まないルシフェラーゼプラスミドである。次に、pLUC 3 および pLUC 4 に含まれるプロモーター配列の長さを調節し、pGL3Basic に挿入して -43BSPLUC (-43~+60 塩基対)、-60BSPLUC (-60~+60 塩基対)、-84BSPLUC (-84~+60 塩基対)、-108BSPLUC (-108~+60 塩基対)、-116BSPLUC (-116~+60 塩基対)、-280BSPLUC (-280~+60 塩基対) を作製した。さらに、Quickchange Site-directed Mutagenesis Kit を用いて、ラット BSP プロモーターの -116~+60 塩基対上流まで (pLUC3) のプロモーター配列に 2 塩基ずつ変異を挿入したミューテーションルシフェラーゼプラスミドを作製した。全てのミューテーションプラスミドは、塩基配列のシーケンスを実施し、塩基配列を確認

した。

5) ルシフェラーゼアッセイ

ルシフェラーゼプラスミドを細胞に導入する 1 日前に、ROS17/2.8 細胞を 35 mm ディッシュに播種し、細胞が 40~70% コンフルエントの状態に達した。ルシフェラーゼプラスミド (1 μ g) とコントロールとして β -Gal プラスミド (2 μ g) を、リポフェクタミンを用いて細胞に導入した。プラスミドを導入した ROS17/2.8 細胞は、10% FCS を含む α -MEM 培地で 2 日間培養後、無血清培地で 12 時間培養し、プロタミン (71.35 ng/ml) で 12 時間刺激後細胞を回収した。細胞は、細胞溶解液 (125 μ l) にて溶解後、遠心し、上清を活性の測定に用いた。20 μ l の上清と 100 μ l のルシフェラーゼ基質を混合し、ルミネッセンスリーダー AccuFLEL Lumi 400 (アロカ社) にてルシフェラーゼ活性の測定を行った。プラスミドの導入効率を補正する目的で、60 μ l の上清と 66 μ l の β -Gal 基質を混合し、37 $^{\circ}$ C で 12 時間インキュベート後、420 nm で吸光度を測定し、活性値の補正に用いた。

6) ゲルシフトアッセイ

BSP 遺伝子プロモーター中の転写因子結合配列と推定される配列部分を合成し、[γ - 32 P] ATP で標識を行った。ROS17/2.8 細胞をプロタミン (71.35 ng/ml) で経時的に刺激後、核内タンパク質を抽出した。核内タンパク質には、緩衝液 (10 mM Tris-HCl、50 μ M KCl、1 μ M DTT、0.04% NonidetP-40、5% glycerol、0.5 μ M EDTA、pH 8.0) と 1 μ g/ μ l polydI-dC を加え、アイソトープ標識したオリゴヌクレオチドを添加し、20 分間室温でインキュベート後、5% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行った。ゲルを乾燥後、イメージングプレートに 12 時間コンタクトし、イメージングアナライザー (BAS 2000 富士写真フィルム) にて解析を行った。

4. 研究成果

プロタミン (71.35 ng/ml) は、ROS17/2.8 骨芽細胞様細胞の BSP mRNA 量を 6 時間後に上昇させ、ROS17/2.8 細胞とラット骨髄由来未分化間葉細胞 (RBMC) に導入したラット BSP 遺伝子プロモーターコンストラクト (-116 to +60) のルシフェラーゼ活性を増加させた。このプロタミンによるルシフェラーゼ活性の増加は、プロテインキナーゼ A、チロシンキナーゼおよび ERK1/2 阻害剤の作用で抑制された。2 塩基対の変異を導入したルシフェラーゼコンストラクトを用いた検索の結果、プロタミンの効果は、BSP 遺伝子プロモーター中の CRE、FRE および HOX 結合配列を介していると考えられた。ゲルシフトアッセイの結果、プロタミン (71.35 ng/ml) は、CRE、FRE および HOX 配列への ROS17/2.8 細胞核内タンパク質の結合量を増加させた。CRE 結合タンパク

質 (CREB)、リン酸化CREB、c-Fos、c-Jun、JunDおよびFra2抗体は、CRE応答配列への転写因子の結合を阻害した。Dlx5、Msx2、Runx2およびSmad1抗体は、FRE応答配列とHOX応答配列への転写因子の結合を阻害した。以上の結果から、プロタミンはラットBSP遺伝子プロモーターに存在するCRE、FREおよびHOX結合配列を介してBSPの転写を促進すること、さらに、転写因子であるリン酸化CREB、c-Fos、c-Jun、JunD、Fra2、Dlx5、Msx2、Runx2およびSmad1は、プロタミンによるBSPの転写の調節に重要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4件)

(1) Zhou L, Ogata Y. Transcriptional regulation of human bone sialoprotein gene by fibroblast growth factor 2. *J Oral Science* 55, 2013, 63-70. 査読有

(2) Li X, Zhou L, Takai H, Sasaki Y, Mezawa M, Li Z, Wang Z, Yang L, Wang S, Matsumura H, Kaneko T, Yoshimura A, Ogata Y. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide regulates bone sialoprotein gene transcription. *J Cell Biochem* 113, 2012, 2822-2834. 査読有
Doi: 10.1002/jcb.24157

(3) Zhou L, Matsumura H, Mezawa M, Takai H, Nakayama Y, Mitarai M, Ogata Y. Protamine stimulates bone sialoprotein gene expression. *Gene*. 516, 2013, 228-237. 査読有
Doi: 10.1016/j.gene.2012.12.056.

(4) Nakayama Y, Yang L, Takai H, Kaneko H, Abiko Y, Ogata Y. Fibroblast growth factor 2 and forskolin induce mineralization-associated genes in two kinds of osteoblast-like cells. *J Oral Sci* 54, 2012, 251-259. 査読有

[学会発表] (計5件)

(1) Ogata Y, Takai H, Zhou L, Matsumura H, Li X. Transcriptional Regulation of Bone Sialoprotein Gene by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Lipopolysaccharide. IADR meeting 20~23 June 2012, Brazil.

(2) Zhou L, Matsumura H, Sasaki Y, Mezawa M, Ogata Y. Effects of Protamine on Bone Sialoprotein Gene Expression. IADR meeting 20~23 June 2012, Brazil.

(3) Matsumura H, Zhou L, Ogata Y.

Interleukin-11 Stimulates Bone Sialoprotein Gene Transcription. IADR meeting 20~23 June 2012, Brazil.

(4) Yoshimura A, Sato K, TKaneko T, Li X, H. Matsumura H, Ogata Y, Hara Y. A single nucleotide polymorphism rs11536889 in 3'-untranslated region of *TLR4* contributes to the regulation of Toll-like receptor 4 expression. International Endotoxin and Innate Immunity Society (IEIIS) meeting, 23~26 Oct 2012, Tokyo.

(5) Takai H, van Wijnen AJ, Ogata Y. Mitotic transcription factor circuits control the molecular phenotype of mesenchymal cells. JADR meeting 14~15 Dec, 2012, Niigata.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小方 頼昌 (OGATA YORIMASA)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：90204065

(2) 研究分担者

高井 英樹 (TAKAI HIDEKI)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：30453898