

## 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 22 日現在

機関番号：33602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791781

研究課題名（和文） SUMO化修飾の阻害による骨芽細胞分化促進機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of osteoblastic differentiation enhanced by inhibition of SUMOylation.

研究代表者

雪田 聡 (YUKITA AKIRA)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80401214

研究成果の概要（和文）：間葉系幹細胞は骨形成タンパク質（BMP）による刺激に反応して骨芽細胞へと分化する。これまでに、BMP 応答に重要な転写因子である Smad4 が SUMO タンパク質と結合する（SUMO 化修飾）ことで骨芽細胞の分化が制御されていることが分かってきた。本研究では、SUMO 化修飾の阻害により発現が変化する遺伝子を網羅的に解析し、骨芽細胞分化に重要であることが期待される遺伝子を複数同定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Osteoblastic differentiation is enhanced by Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). Recently, we reported that SUMOylation of Smad4 which is a transcriptional factor involved in the BMP signaling inhibits osteoblastic differentiation induced by BMPs. In this study, I performed a global analysis of gene expression by cDNA microarray analysis, and identified several genes encoding the transcriptional factors those are expected to be important for osteoblastic differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：再生医療・骨芽細胞・分化制御・SUMO化修飾

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 幹細胞を用いた再生医療は現在最も研究が盛んな分野の1つであり、歯科領域においても歯および歯周組織の再生へ向けた研究が進んでいる。しかし、細胞の癌化をはじめとする課題も多く残されており、より安全な再生医療の実現に向け、幹細胞の分化機構の解明が強く求められている。研究が進むにつれ、細胞内シグナル伝達による標的遺伝子

の転写調節の他に、メチル化やアセチル化、ユビキチン化に代表されるタンパク質修飾によるエピジェネティックな制御が細胞の分化機構に深く関わっていることが明らかになってきた。

Small Ubiquitin-related Modifier (SUMO) 化修飾はユビキチンに類似したタンパク質翻訳後修飾の1つであり、SUMO化修飾により標的タンパク質の活性や細胞内の局在など

が変化することが報告されている。SUMO 化修飾は細胞周期の調節や、発生段階における形態形成、細胞の癌化などに重要な役割を担っていることが明らかにされつつあるが、骨をはじめとする硬組織の形成や細胞の分化に対する SUMO 化修飾の役割については殆ど分かっていなかった。

(2) 歯周組織の再生をはじめとした再生医療への応用に向けて、骨芽細胞の分化機序を解明する事は非常に重要である。私は本研究課題開始当初までに、タンパク質翻訳後修飾の1つである SUMO 化修飾の阻害が BMP 応答による骨芽細胞分化を大幅に促進することを明らかにしていた。

## 2. 研究の目的

私がこれまでに得た知見をさらに発展させ、本研究課題は SUMO 化修飾が担う骨芽細胞分化の調節機構を解明し、SUMO 化修飾の制御を介した効率的な骨芽細胞分化誘導系の開発を目的とした。そのために、

(1) SUMO 化修飾の阻害と BMP 添加とを組み合わせた独自の条件下で遺伝子発現の変化を網羅的に検討し、それらの遺伝子について機能面から分類することで、SUMO 化修飾の阻害によりどのような機能をもつ遺伝子群の発現が変化しているのかを明らかにする。

(2) (1) で発現に変化がある遺伝子について骨芽細胞分化に関与し得るのかを検討し、SUMO 化修飾の阻害による骨芽細胞分化促進の作用機序を解明する。

(3) ①野生型 Smad4 と SUMO 化修飾を受けない変異型 Smad4 の細胞内局在、②疑似的な SUMO 化 Smad4 過剰発現による BMP 応答能、③ SUMO タンパクの過剰発現による BMP 応答能、について検討することにより、Smad4 の SUMO 化修飾による影響をさらに詳細に解明する。

以上の3点を本研究課題の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) マイクロアレイを用いた網羅的な発現解析

SUMO 化修飾を阻害した C2C12 細胞と無処理の C2C12 細胞とを BMP 添加条件下で培養した。培養後に細胞を回収して mRNA を抽出し、Cy3 蛍光色素を用いてラベルした後、マウスオリゴマイクロアレイチップ (G4121B, Agilent 社) を用い G2565BA マイクロアレイスキャナーシステム (Agilent 社) にて各遺伝子の発現量を決定した。

(2) 候補遺伝子の絞り込み

発現量の変化については、解析ソフト GeneSpring 11 (Agilent 社) を用いて解析した。

無処理の場合と比較して発現量が2倍以上変化した遺伝子群について、発現量の変化の大きさおよび機能面に着目して分類した。

(3) 候補遺伝子の骨芽細胞分化に対する機能解析

SUMO 化修飾を阻害し、BMP を添加して培養した条件下での発現量が他の条件下の場合よりも2倍以上大きく、転写因子をコードしている遺伝子について siRNA を作製した。siRNA を C2C12 細胞に導入してノックダウンした後、BMP を添加して骨芽細胞分化を誘導し、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性を指標に候補遺伝子群のノックダウンが骨芽細胞分化に与える影響を検討した。

(4) Smad4 の細胞内局在の検討

FLAG タグを付した野生型および SUMO 化修飾を受けるリジン残基をアルギニンに置換した変異型 Smad4 を C2C12 細胞に過剰発現させ、抗 FLAG 抗体を用いて蛍光免疫法により局在を検討した。

(5) 疑似的に SUMO 化修飾された Smad4 の作製と BMP 応答能の検討

SUMO 化修飾を受ける2か所のリジン残基をアルギニンに置換して修飾を受けなくした変異型 Smad4 の N 末端側に SUMO-1 を融合したタンパク質を C2C12 細胞に発現させ、BMP 刺激に対する応答能を (5) と同様の手法により野生型および SUMO 化修飾を受けない変異型 Smad4 と比較した。

(6) SUMO 過剰発現条件下での BMP 応答能の検討

Ubc9 をノックダウンした C2C12 細胞に *SUMO-1, 2, 3* および *Id1* レポーター遺伝子を導入した後、BMP 刺激に対する応答能をルシフェラーゼ活性の測定により検討した。

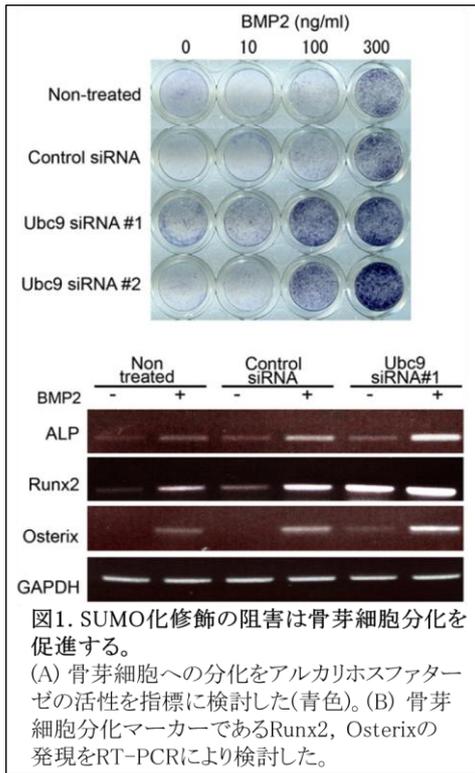
## 4. 研究成果

(1) C2C12 細胞において、SUMO 化修飾の阻害は BMP 刺激による骨芽細胞分化を促進し、筋分化を抑制する。

私は、今までの研究から、マウス筋芽細胞由来細胞株 C2C12 細胞において、*Ubc9* をノックダウンして SUMO 化修飾を阻害すると、BMP 刺激によるアルカリホスファターゼ (ALP) の活性および *Runx2* など既知の骨芽細胞分化マーカーの発現が上昇することを明らかにした (図 1)。

この骨芽細胞分化を効率的に促進させる条件下で、遺伝子発現がどのように変化しているのかを DNA マイクロアレイを用いて網羅的に検討し、発現の変化を Gene Ontology 解析により機能面に着目して比較した。

他の条件下で培養した場合と比較し、SUMO 化



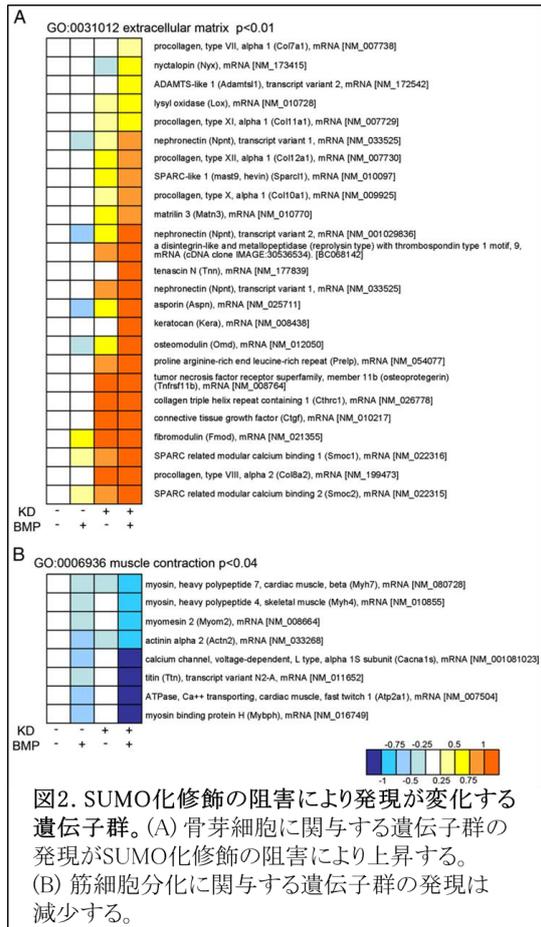
修飾を阻害した上で BMP を添加した場合においてのみ 2 倍以上発現が変化した遺伝子群を機能別に分類した結果、*Osteoprotegerin* や *Osteomodulin* など骨芽細胞へ分化するにしたがって発現が上昇する遺伝子が複数上昇している一方で、筋分化に関与する遺伝子群の発現は有意に低下していた(図 2)。現在までに、BMP シグナルは C2C12 細胞において骨芽細胞分化を促進し、筋分化を阻害することが報告されている。本研究結果から、SUMO 化修飾の阻害が BMP による細胞分化の制御を増強していることが示唆された。

### (2) SUMO 化修飾の阻害により発現が変化する転写因子群の骨芽細胞分化における役割の解明

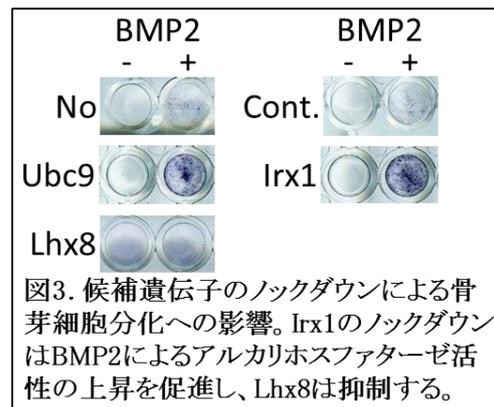
マイクロアレイにより発現が変化的ことが判明した遺伝子群のうち、発現量の変化が大きく、転写因子として機能するタンパクをコードしている遺伝子に着目した。それら候補遺伝子群のうち、*Lhx8* および *Irx1* について、siRNA を用いてノックダウンし、C2C12 細胞における BMP 添加による骨芽細胞分化誘導に影響を与えるか検討した。

その結果、*Lhx8* ノックダウンは BMP による骨芽細胞分化を強く抑制し、*Irx1* のノックダウンは逆に分化誘導を促進した(図 3)。さらにタンパクの局在を免疫組織学的に検討した結果、*Lhx8* は骨芽細胞に局在が認められたことから、骨組織形成に関与することが強く示唆された。

これらの転写因子が骨形成に関与すると



いう知見は今までに無く、本研究で実施した SUMO 化修飾に着目したスクリーニングとそれに続く機能解析によって、骨芽細胞分化に重要な役割を担っている可能性をはじめて明らかにした。



### (3) SUMO 化修飾による Smad4 の機能制御機構の解明

現在までに TGF  $\beta$  および BMP シグナルにおいて転写因子として機能する Smad4 が SUMO 化修飾を受けることは知られているが、SUMO 化修飾が BMP シグナルに対してどのように影響するかは未解明であった。そこで、SUMO 化修飾をうけるリジン残基をアルギニンに置

換して SUMO 化修飾を受けない Smad4 変異体を作製し、野生型 Smad4 と細胞内における局在および BMP 応答能について比較した。

C2C12 細胞に FLAG タグを付した野生型および変異体 Smad4 を過剰発現させ、細胞内局在を検討した結果、どちらも主に細胞質に局在し、野生型と変異体に差は認められなかった。このことから、Smad4 の SUMO 化修飾は細胞内局在に影響を与えないことが示唆された。

*Id-1* プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイの結果、SUMO 化修飾を受けない変異型 Smad4 は野生型と比較して高い BMP 応答能を示す(図 4, K113/158R)。変異体が高いつ高い応答能が SUMO 化修飾によるものであるかを確認するため、変異型 Smad4 の N 末端側に SUMO タンパクが融合した融合タンパクを作製し、同様に BMP 応答能を検討した結果、SUMO タンパクの融合により変異体 Smad4 の応答能が減少した(図 4(SUMO-K113/158R))。このことから、Smad4 の SUMO 化修飾が BMP 応答能を抑制的に調節していることが示唆された。

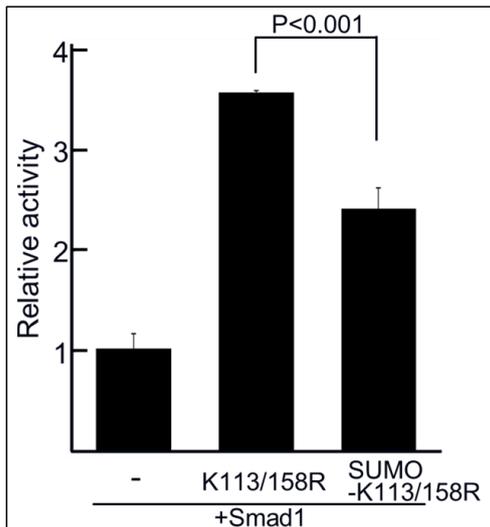


図4. Smad4変異体およびSUMO融合タンパクの過剰発現によるBMP応答能の検討。  
SUMO化修飾を受けないSmad4(K113/158R)はSmad1との共発現によりBMPの応答能は有意に上昇するが、K113/158RにSUMOを融合させて疑似的にSUMO化修飾させた場合はBMP応答能が減少する。

SUMO 化修飾が BMP シグナルを抑制的に調節していることをさらに確認するため、*Ubc9* のノックダウンによる BMP シグナル伝達の促進が SUMO タンパク質の過剰発現によりレスキューされるかを検討した。C2C12 細胞において *Ubc9* のノックダウンにより BMP 応答能は有意に上昇するが、この上昇は *SUMO-1, 2, 3* それぞれの過剰発現により有意に減少する(図 5)。このことから、SUMO 化修飾が BMP シグナルの伝達を抑制的に調節していることがさらに強く示唆された。

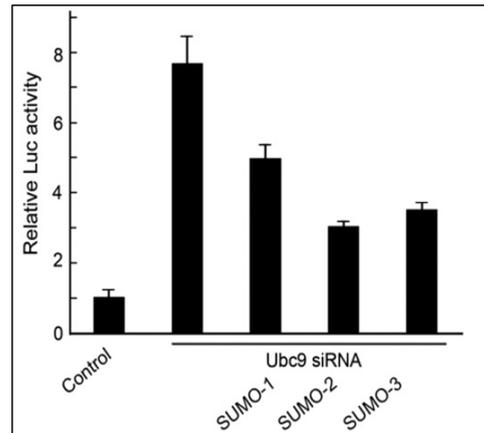


図5. SUMO過剰発現によるレスキュー実験。  
*Ubc9*のノックダウンによりBMPシグナル伝達は促進されるが、SUMO-1,2,3の過剰発現によりレスキューされる。

#### (4) 本研究成果のまとめと今後の展望

本研究課題の遂行により

- ①SUMO 化修飾は BMP による細胞分化制御を抑制的に調節している。
- ②SUMO 化修飾の阻害により発現が変化する遺伝子群のスクリーニングにより転写因子 *Lhx8* および *Irx1* が骨芽細胞分化に重要な役割を担う可能性がある。
- ③SUMO 化修飾は BMP シグナル伝達を抑制的に調節しており、その調節機構の 1 つの標的タンパク質は Smad4 である。

以上 3 点が明らかになった。現在までに骨組織形成に対する SUMO 化修飾の役割は殆ど分かっておらず、本研究によって得られた SUMO 化修飾により骨芽細胞分化が抑制的に制御されているという知見は、効率的な骨芽細胞誘導に応用できると期待される。

そのためには、今後、本研究で関与が明らかになった *Lhx8* や *Irx1* などの転写因子の詳細な機能解析や、SUMO 化修飾因子の生体内での骨組織形成における機能をさらに解析すること、および、他の候補遺伝子群においてもスクリーニングを行う事によって、骨芽細胞分化における SUMO 化修飾による制御機構をさらに解明することが課題であると考えられる。

#### 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 3 件)

①Nakamura H, Yukita A, Ninomiya T, Hosoya A, Hiraga T, Role of heparan sulfate proteoglycans surrounding osteoblast lineage cells, *J Oral Biosci.*, 2012, 54(1):43-47, 査読有

②Yukita A, Hosoya A, Ito Y, Katagiri T, Asashima M, Nakamura H, *Ubc9* negatively

regulates BMP-mediated osteoblastic differentiation in cultured cells, Bone, 2012, 50(5):1092-1099, 査読有

③Hosoya A, Hiraga T, Ninomiya T, Yukita A, Yoshida K, Yoshida N, Takahashi M, Ito S, Nakamura H, Thy-1-positive cells in the subodontoblastic layer possess high potential to differentiate into hard tissue-forming cells, Histochem Cell Biol., 2012. [Epub ahead of print], 査読有

〔学会発表〕(計3件)

①雪田 聡、SUMO 化修飾による BMP 応答能の制御、第18回BMP研究会、2011年7月31日、大阪大学 中ノ島センター

②雪田聡、細矢明宏、片桐岳信、中村浩彰、BMPによる分化制御機構におけるSUMO化修飾の役割、第52回歯科基礎医学会学術大会・総会、2010年9月21日、東京都江戸川区タワーホール船堀

③雪田聡、細矢明宏、片桐岳信、中村浩彰、骨芽細胞分化におけるSUMO化修飾の役割、第28回日本骨代謝学会学術集会、2010年7月21日、東京都新宿区京王プラザホテル

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mdu.ac.jp/faculty/course/kai bou2.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

雪田 聡 (YUKITA AKIRA)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80401214