

## 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 4月 1日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792100

研究課題名（和文） 石灰化組織特異的である骨シアロタンパク質の細胞内局在とその分泌経路の検討

研究課題名（英文） Examination of intracellular localization and transport pathway of bone sialoprotein.

研究代表者

加藤 直子 (KOTO NAOKO)

日本大学・松戸歯学部・兼任講師

研究者番号：70434090

研究成果の概要（和文）：骨の石灰化初期に重要なタンパク質であると期待されている骨シアロタンパク質(BSP)の石灰化機構の解明を目的とした。そのために転写調節機構だけでなく、その後どのように分泌されるかという細胞内動態を解明することを試みた。研究期間内に筋芽細胞である C2C12 細胞が骨誘導因子(BMP-2)によって BSP の転写調節が上昇するメカニズムと実際に BSP がタンパク質として発現することを明らかにした。現在ひきつづき細胞内動態という輸送経路の詳細な解析を続けている。

研究成果の概要（英文）：Bone sialoprotein (BSP) is expected one of the important protein for calcification of bone. In order to clear the mechanisms of it through BSP, we investigated regulation of BSP transcription and transport pathway of BSP proteins in cell. Here, after stimulation with bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) of C2C12 cells which were myoblast, we showed that Smad1 bound to HOX domain in BSP promoter sequence and that Smad1 and Runx2 bound to FRE domain. And also we detected that C2C12 cells expressed BSP protein to induce calcification. Now, we are observing intracellular localization in the cells by electron microscopy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬系

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯学，歯周病，石灰化，骨シアロタンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

再生療法が注目されている昨今、歯周治療においても GTR 法やエムドゲインによる歯槽骨の再生が行われている。これらの骨再生療法はすでに臨床応用されているにもかかわらず、どの成分が骨を誘導するの

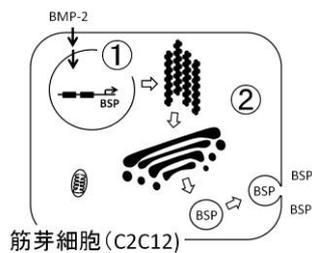
か？どのような転写因子が活性化するのか？そしてそうやって骨ができるのか？といったメカニズムの詳細については不明なところが多い。申請者の所属する研究室ではこれまで骨シアロタンパク質(BSP)が石

灰化初期に特異的に発現するため、転写調節機構を解明することが石灰化機構の解明の糸口になるのではないかと考え、検討を進めてきた。

## 2. 研究の目的

BSP が細胞外マトリックスであるため、骨の再生には石灰化を促進する刺激やその転写調節機構を解明するだけでなく刺激後どのようにして分泌されるかを解明することである。さらには骨芽細胞そのものを誘導する必要があると考えてきた。そこでまず注目したのが筋肉の中に石灰化物が形成されるという筋の異所性骨化である。ここから筋細胞が骨に分化する能力を秘めている可能性を考え、筋芽細胞から骨細胞への誘導を試みた。そこで本研究では以下の2項目について検討を加えた。

- ① 筋芽細胞から骨芽細胞誘導機構の解明
- ② BSP の細胞外分泌経路の解明



## 3. 研究の方法

### 1) 細胞培養

筋芽細胞様細胞(C2C12 細胞)の培養は 10% FCS, 100 unit/ml, 100  $\mu$ l/ml ストレプトマイシン含有 D

-MEM 培地を用い, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で行った。

### 2) Real-time PCR

全 RNA(1  $\mu$ g)を使用し, ExScript RT reagent Kit を用いて cDNA を合成した。Real-time PCR 反応には Thermal Cycler Dice™ Real

Time System(Takara)を用いた。100  $\mu$ g の cDNA より PCR 反応は 95°C 10 sec, 1 サイクルの後, 95°C 5 sec, 60°C 30 sec を 40 サイクル行った。発現量の補正には GAPDH を用いた。

### 3) ルシフェラーゼアッセイ

BSP 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), pLUCB は BSP プロモーターを含まないプラスミドを使用した。細胞へのプラスミドの導入効率を補正する目的で,  $\beta$ -Gal プラスミドと共にリポフェクタミンを用いて細胞内に導入した。

### 4) ゲルシフトアッセイ

核内タンパク質とラット BSP プロモーター配列との結合を検索する目的で, ゲルシフトアッセイを行った。抽出したタンパク質は[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P-ATP]で標識した合成オリゴヌクレオチドと反応させた後, 5%アクリルアミドゲルにて電気泳動を行い, ゲル乾燥後, フジ BAS2000 イメージングアナライザーにて解析を行った。

### 5) ウェスタンブロッティング

BMP-2 刺激した C2C12 細胞から 0.1% Triton X-100 含有 Lysis buffer にて Lysate を調整した。泳動, 転写後, immune biognostik 社製の抗 BSP モノクローナルおよび, ポリクローナル抗体を, 2 次抗体には HRP-anti IgG を使用した。検出には ECL plus を用いた。

### 6) 共焦点レーザー顕微鏡

BMP-2 刺激した C2C12 細胞は 10% フォルマリンにて固定した。膜の可溶化には 0.1% Triton X-100 を, ブロッキングには BSA および IgG を用いた。各 1 次抗体にはモノクローナル抗体, およびポリクローナル抗

体を使用し、二次抗体にはAlexa488標識IgGを用いた。細胞膜の染色にはDiI(GE Healthcare)を使用した。蛍光は共焦点レーザー顕微鏡, LSM-510(Carl Zeiss)にて検出した。

#### 7) アルカリホスファターゼ活性

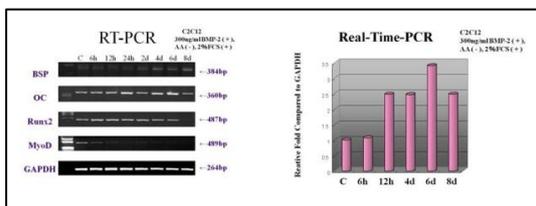
BMP-2処理したC2C12細胞を各時間培養後、PBSにて3回、TBSで1回洗浄した。染色液A(20 mg/ml 2-β-ナフテルリン酸, 1 M Tris-HCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>)と染色液B(1 mg/ml ジアゾニウム塩, 25 g アゾ色素)を等量ずつ加え、遮光下で反応させた。

### 4. 研究成果

#### ① 筋芽細胞から骨細胞誘導機構の解明

##### 1) 骨誘導因子(BMP-2)刺激によるBSPの発現

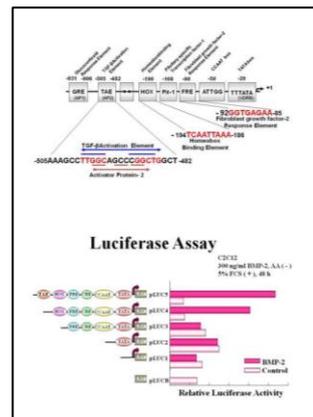
C2C12細胞は、300 ng/ml BMP-2で刺激を行った。2日目からBSP mRNAの発現は増加し、石灰化の指標であるオステオカルシンOC mRNAの発現は、BMP-2刺激24時間後と6日後に増加した。骨形成の転写因子Runx2 mRNAは、その発現が12時間後最大となり、その後減少した。一方、筋細胞のマーカーであるMyoD mRNAは、コントロールで検出され、BMP-2刺激6時間以降は発現が抑制された。Real-time-PCR法でBSPの発現を検出したところ、BMP-2刺激後、12時間後より経時的にその発現の増加が検出された。



##### 2) BSP転写配列の検索

各長さに調節したBSP遺伝子プロモーターを筋芽細胞様細胞であるC2C12細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った

結果を示した。pLUCBは、BSPプロモーターを含まないルシフェラーゼプラスミドを使用した。BMP-2刺激により、pLUC4およびそれよりも長いコンストラクトにおいて、転写の上昇が認められた。pLUC4および5にBMP-2により応答する配列が存在すると考えられ、この配列中の特異的な配列にはホメオボックス応答配列(HOX), TGF-β応答配列(TAE)などが存在した。



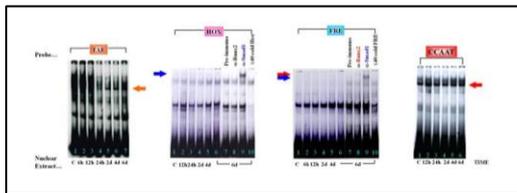
##### 3) BMP-2応答転写因子の検索

BMP-2に応答する転写因子を検索する目的で、ゲルシフトアッセイを行った。アイソトープ標識したTGF-β応答配列(TAE)をプローブとして用いるとTAE配列に結合する核内タンパク質の結合状態は6時間、12時間、24時間、2日目、4日目、6日目に経時的に減少した。ホメオボックス応答配列(HOX)をプローブとして用いると、HOX配列に結合する核内タンパク質の結合状態は2日目、4日目、6日目に経時的に増加し、40倍量の無標識のミューテーションHOX配列を加えても競合されなかった。HOXに結合する転写因子を検索する目的で、抗体を用いたゲルシフトアッセイを行った結果、Cbfa1抗体では変化がなく、抗Smad1抗体を用いると結合バンドが高分子領域へ移動(スーパーシフト)した。

FGF2応答配列(FRE)をプローブとして用

いと、FRE 配列に結合する核内タンパク質の結合状態は6時間、12時間、2日目、4日目、6日目に経時的に増加し、無標識のミューテーションFRE配列を40倍量加えても競合されなかった。FRE に結合する転写因子を検索する目的で、抗体を用いたゲルシフトアッセイを行った結果、抗 Cbfa1 抗体および抗 Smad1 抗体を用いると結合バンドが高分子領域へ移動（スーパーシフト）した。

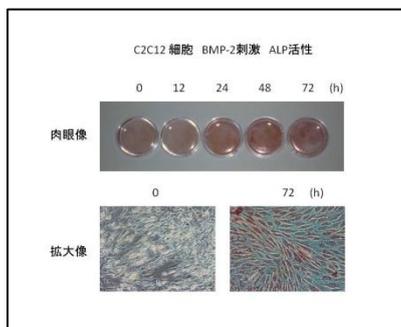
逆方向 CCAAT 配列をプローブとして用いると、CCAAT 配列に結合する核内タンパク質の結合状態では、BMP-2 刺激後の経時的な変化は検出できなかった。



② BSP の細胞外分泌経路の解明

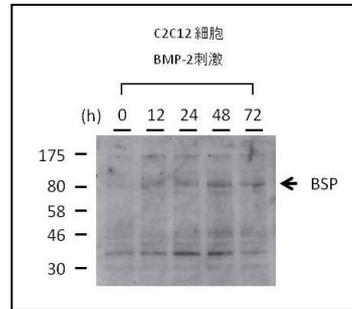
4) BMP-2 刺激によるアルカリホスファターゼ活性の上昇

C2C12 細胞を BMP-2 刺激すると骨形成能をもつようになるのかを確かめるため、アルカリホスファターゼ活性を測定した。BMP-2 刺激後、24 時間よりアルカリホスファターゼ活性を示す茶褐色に細胞が染まった。光学顕微鏡下で観察すると、細胞が染色されていることが明らかとなった。



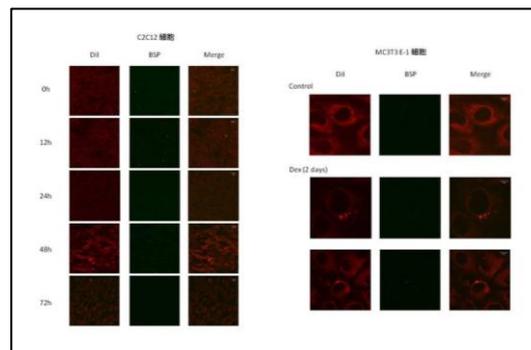
5) 筋芽細胞における BSP の発現

C2C12 細胞を BMP-2 処理し、0, 12, 24, 48, 72 時間後に 1% Triton X-100 を使用して Lysate を調整した。15% SDS-PAGE にて泳動分離し、転写後、抗 BSP 抗体を用いて検出した。BSP 抗体に染まるバンドが BMP-2 刺激 48 時間で検出された。



6) 筋芽細胞における BSP の細胞内局在

C2C12 細胞を BMP-2 処理し、0, 12, 24, 48, 72 時間後に細胞を固定した。BSP の局在を（緑）で、細胞膜を（赤）で示した。骨芽細胞 MC3T3 E-1 細胞をデキサメタゾン処理した細胞を対照として用いた。対照群ではデキサメタゾン処理 2 日後、BSP 抗体に染まる顆粒様の細胞内構造物が観察された。一方、BMP-2 処理群では 24 時間後より細胞の形態が乱れ、BSP 抗体に染まる点状の構造物が観察された。



7) まとめ

筋芽細胞様細胞 C2C12 細胞は骨誘導因子 BMP-2 により 筋芽細胞への転写因子である MyoD の発現を抑制し、代わって骨シア

ロタンパク質 BSP を発現した。発現調節は転写因子である Smad1, Runx2 が BSP プロモーター配列に存在する HOX 配列,あるいは FRE 配列に結合することによって制御されていることが明らかとなった。

これらの結果は筋芽細胞様細胞 C2C12 細胞が骨誘導因子 BMP-2 により骨芽細胞に分化したことを示している。しかしながら BSP の細胞内局在は現在のところ明確には断定できていない。今後、電子顕微鏡観察による詳細な細胞内局在の検討を加えていきたい。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

Naoko Kato and Yorimasa Ogato  
Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)  
Regulation of Bone Sialoprotein Gene  
Transcription  
96th Annual Meeting of the American  
Academy of Periodontology  
2010, Oct.30 (Honolulu, HI)

Naoko Kato and Yorimasa Ogato  
Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)  
Regulation of Bone Sialoprotein Gene  
Transcription  
9th Asian Pacific Society of  
Periodontology Meeting  
2011, Sep. 9-10

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

加藤 直子 ( KATO NAOKO )  
日本大学・松戸歯学部・兼任講師  
研究者番号：70434090

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：