

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592998

研究課題名(和文)ヌクレオホスミンにより転写後発現制御される遺伝子の軟骨における役割の解析

研究課題名(英文)The post-transcriptional regulatory system of gene expression of in chondrocytes by nucleophosmin

研究代表者

椋代 義樹 (Mukudai, Yoshiki)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：50325099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：NPMに結合するmRNAをクローニングした。すなわち、マウス軟骨細胞株であるATDC5細胞においてこれを鋳型にcDNAマイクロアレイ法にて、特異的遺伝子を単離する。単離されたmRNAがNPMタンパクと実際に結合することをRNAゲルシフト法(REMSA)によって確認した後、発現調節がなされているかをレポーターアッセイ、RNA分解アッセイ、および細胞分画アッセイで精査した。一方、この遺伝子のmRNAおよび翻訳後のタンパクの発現をin vitroおよびin vivoで検索した。

研究成果の概要(英文)：We successfully cloned mRNA, which bound to NPM protein in ATDC5 cells (a mouse chondrosarcoma cell line). The gene was found to bind to NPM by REMSA assay, and furthermore, to regulate the growth and differentiation of chondrocytes in vivo, utilizing a gene expression and knock-down techniques.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 外科系歯学

キーワード：軟骨 骨 mRNA ヌクレオホスミン 転写後制御 RNA安定性

1. 研究開始当初の背景

骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞などの骨代謝に關与する細胞の分化・増殖は多くの遺伝子によって厳格に制御されている。さらに、細胞における遺伝子の発現は、様々な段階(転写、転写後調整、翻訳、翻訳後調整など)で、様々なタンパクによって調節されていることが報告されている。細胞核内のゲノム DNA から mRNA への転写制御機構は、軟骨細胞などを含む様々な細胞で、数多く報告されてきた。さらに、最終的な遺伝子発現は、転写以降の段階でも巧妙に制御されている。すなわち、核内あるいは細胞質における mRNA の輸送、安定性調節などの転写後制御および、リボゾーム(ポリゾーム)におけるタンパク-核酸複合体結合制御や翻訳制御などである。しかし、骨芽細胞や軟骨細胞などの硬組織系細胞では、この制御機構がほとんど明らかにされていない。

申請者らはこれまで、内軟骨性骨化制御において重要な役割を果たす成長因子の因子群である CCN2(結合組織成長因子; CTGF)および、CCN1(cyr61、CEF-10)遺伝子は、転写後制御を受けており(Kubota *et al.* DNA Cell Biol. 2001, Mukudai *et al.* Biol Chem. 2003, Mukudai *et al.* J Biol Chem. 2005, Kubota *et al.* FEBS Lett. 2005, Kondo *et al.* Oncogene, 2006. Kondo *et al.* Mol Cancer Ther. 2006, Mukudai *et al.* J. Cell. Biochem. 2010 in press)、さらに、核/細胞質シャトルタンパクの一つであるヌクレオホスミン/B23(NPM)が *ccn2* の mRNA の 3' 非翻訳領域(3' -untranslated region; 3' -UTR)に存在する AU-rich element (ARE)に特異的に結合し、*ccn2* 遺伝子の転写後制御、特に mRNA の安定性の制御に重要な役割を果たしていることを明らかにした(Mukudai *et al.* Mol Cell Biol. 2008)。

2. 研究の目的

骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞などの骨代謝に關与する遺伝子発現の調整機構は不明な点が多く、特に mRNA の転写後調節に關しては、ほとんど研究がなされていない。近年、申請者はヌクレオホスミン/B23(NPM)が新たな mRNA の転写後調節因子タンパクであることを報告した(Mukudai *et al.* Mol Cell Biol. 2008)。そこで本研究計画では、軟骨細胞株より、抗体アフィニティークロマトグラフィー法と RNA マクロアレイ法により、NPM に結合しうる RNA をスクリーニングし、骨・軟骨細胞に特異的に発現する、あるいは特異的な機能を持つ新規 RNA 結合タンパクを同定し、この遺伝子の骨・軟骨代謝における機能を検討する。本研究計画は、mRNA の転写後制御という点において、骨・軟骨代謝の制御機構の解明のための独創的な研究であると考えられる。

3. 研究の方法

本研究計画の第一目標は *ccn2* 以外の NPM に結合する mRNA をクローニングすることである。すなわち、マウス軟骨細胞株である ATDC5 細胞に、V5 抗原タグつきマウス NPM を強制発現させ、NPM と結合した mRNA を抗 V5 抗体で免疫沈降し、G タンパクアフィニティークロマトグラフィー法で RNA を精製し、これを鋳型に cDNA マイクロアレイ法にて、特異的遺伝子を単離する。単離された mRNA が NPM タンパクと実際に結合することを RNA ゲルシフト法(REMSA)によって確認した後、発現調節がなされているかをレポーターアッセイ、RNA 分解アッセイ、および細胞分画アッセイで精査した。一方、この遺伝子の mRNA および翻訳後のタンパクの発現を *in vitro* および *in vivo* で検索する。さらに、この遺伝子が骨芽細胞・軟骨細胞の増殖および分化にどのような影響を及ぼし

ているかを検索するために、強制発現ベクターで強制発現、あるいは、siRNA によってノックダウンし、増殖および分化に対する各種マーカーをアッセイ、および(免疫)組織化学法で検討した。

4. 研究成果

ア. アフィニティクロマトグラフィー法による NPM 結合 RNA の精製、および cDNA マイクロアレイ

サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター下流に、マウス NPM の cDNA の 5' 末端(アミノ酸配列の C 末端)に V5 抗原および 6xHis タグを付与したキメラタンパク質をコードする哺乳類発現ベクター(インビトロゲン社)を作成し、これをインスリン・トランスフェリン・亜セレン酸ナトリウムで成熟軟骨細胞に分化させたマウス軟骨細胞株 ATDC5 細胞にトランスフェクションする。トランスフェクション 48 時間後に、細胞を RIPA バッファーで回収、4%ホルムアルデヒドで、タグ付き強制発現 NPM-RNA 複合体を架橋固定し、抗 V5 抗体で免疫沈降させる。この溶液をプロテイン G カラムに通し、カラム洗浄後、塩濃度勾配法にて抗体特異的 NPM-RNA 複合体を溶出させる。SDS-DTT 存在下の過熱還元反応により、RNA-NPM 間の架橋結合を破壊、ただちに酸性フェノール法にて RNA を精製し、これを NPM 結合 RNA ライブラリー原液として保存した。精製された RNA を鋳型として、メーカーのプロトコールに従い cDNA に逆転写し、DNA マイクロアレイ (GeneChip、アフィメトリクス社)にて遺伝子発現を解析する。コントロール群(空ベクター導入群)と比較して、特異的に上昇している RNA を解析すべきターゲット遺伝子とする。ターゲット遺伝子が複数存在することが十分予想されるが、この場合は、骨・軟骨代謝に関して興味深いものと考察される遺伝子を選択した。

イ. 単離された遺伝子の mRNA と NPM の相互作用の解析

以下の実験を行った。

- A. REMSA
- B. レポーターアッセイ
- C. RNA 分解アッセイ
- D. 細胞分画アッセイ

ウ. 単離された遺伝子の内軟骨性骨化における軟骨細胞の増殖・分化に対する影響の検討

ATDC5 細胞をインスリン・トランスフェリン・亜セレン酸ナトリウムで増殖~肥大化~終末分化軟骨細胞に分化誘導し、それぞれの分化ステージで、単離された遺伝子がどのように発現しているかを real time RT-PCR および、細胞分画 western blotting 法で検討する。

なお、骨・軟骨の増殖の検索には、MTT アッセイを用い、分化マーカーの検索には、アルカリホスファターゼ活性測定、硫酸化 GAG 定量などの生化学的アッセイを行った。さらに、TUNEL 染色、アルカリホスファターゼ活性染色、アリザリンレッド S 染色、トルイジンブルー染色などの細胞組織化学染色法も同時に行った。

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. Kondo, S., Mukudai, Y., Soga, D., Nishida, T., Takigawa, M., Shirota, T. Differential expression of vascular endothelial growth factor in high- and low-metastasis cell lines of salivary gland adenoid cystic carcinoma. **Anticancer Res.** 34(2): 671-7. 2014.
2. *Mukudai, Y., Kondo, S., Koyama, T., Li C., Banka, S., Kogure, A., Yazawa, K., Shintani, S. Potential anti-osteoporotic effects of herbal extracts on osteoclasts, osteoblasts and chondrocytes in vitro. **BMC Complement Altern Med.** 14: 29. 2014.

3. *Mukudai, Y., Kondo, S., Shiogama, S., Koyama, T., Li, C., Yazawa, K., Shintani, S.. The root bark extracts of Juncus effusus and Paeonia suffruticosa protect salivary gland acinar cells from apoptotic cell death induced by cis-platinum (II) diammine dichloride. **Oncol Rep.** 30:2665-71. 2013.

4. *Mukudai, Y., Kondo, S., Fujita, A., Yoshihama, Y., Shiota, T., Shintani, S. Tumor protein D54 is a negative regulator of extracellular matrix-dependent migration and attachment in oral squamous cell carcinoma-derived cell lines. **Cellular Oncol.** 36: 233-245. 2013.

〔学会発表〕(計6件)

1. 椋代義樹、近藤誠二、小山智之、Chunnan Li、矢澤一良、新谷悟：灯心草および牡丹皮エキスはシ正常唾液腺房細胞をシスプラチンによるアポトーシスから保護する 第55回歯科基礎医学会学術大会、岡山、2013年9月21日

2. 椋代義樹、近藤誠二、新谷悟：苦楝皮、醋延胡索、および白薇抽出液の骨粗鬆症治療への基礎的研究 第31回日本骨代謝学会、神戸、2013年5月30日

3. 椋代義樹、近藤誠二、小山智之、Chunnan Li、矢澤一良、新谷悟：新たな骨粗鬆症治療薬となりうる生薬エキスの検索、昭和大学歯学部文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業平成24年度シンポジウム、東京、2013年3月23日

4. 椋代義樹、近藤誠二、藤田温志、新谷悟：新規癌特異的遺伝子 TPD54 は口腔扁平上皮癌細胞の細胞外基質依存性遊走能を抑制する 第35回日本分子生物学会、福岡、2012年12月14日

5. 椋代義樹、近藤誠二、小山智之、Li chunnan、矢澤一良、新谷悟：新たな骨粗鬆症治療薬となりうる生薬エキスの探索 第49回日本口

腔組織培養学会学術大会、広島、2012年11月17日

6. 椋代義樹、近藤誠二、藤田温志、吉濱泰斗、代田達夫、新谷悟：新規癌特異的遺伝子 TPD54 は口腔扁平上皮癌細胞の細胞外基質依存性遊走能を抑制する 第57回日本口腔外科学会総会・学術大会、横浜、2012年10月20日

〔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
なし

6. 研究組織
(1)研究代表者
椋代 義樹 (Yoshiki Mukudai)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号：50325099

(2)研究分担者
新谷 悟 (Satoru Shintani)
昭和大学・歯学部・教授
研究者番号：80294429

近藤 誠二 (Seiji Kondo)
昭和大学・歯学部・准教授
研究者番号：10432634

(3)連携研究者

該当なし