

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18390563  
 研究課題名（和文） 歯周組織再生を制御する転写因子と骨シアロタンパク質の  
 発現調節機構  
 研究課題名（英文） Mechanism of gene expression of bone sialoprotein 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：骨シアロタンパク質（BSP）は、アパタイト結晶形成能を有することから、歯周組織再生に重要な役割を果たすと考えられる。骨芽細胞様細胞を副甲状腺ホルモン（PTH；10 nM）で刺激すると、3 時間後に BSPmRNA、タンパク質量が増加した。ヒト BSP 遺伝子プロモーターの転写活性は PTH 刺激（10 nM、3～6 時間）で上昇し、プロモーター中の 2 つの CRE 配列への核内タンパク質の結合は、PTH（10 nM）刺激 3 時間後に増加した。以上の結果は、PTH が BSP の遺伝子発現を増加させ、歯周組織再生を増強する可能性を示唆すると思われる。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2007年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：遺伝子プロモーター、転写調節、石灰化、骨芽細胞、遺伝子発現、転写因子、成長因子、ホルモン

## 1. 研究開始当初の背景

骨代謝において PTH は重要なホルモンであることから、BSP の転写に対する PTH の影響、特に転写調節機構を検索することを当初の目的として検索を行った。

## 2. 研究の目的

骨シアロタンパク質（Bone sialoprotein; BSP）は、リン酸化および硫酸化を受けた糖タンパク質で、石灰化初期に石灰化結合組織特異的に発現し、アパタイト結晶形成能を有することから、初期の石灰化において重要な役割を果たすと考えられている

副甲状腺ホルモン（parathyroid hormone; PTH）は、分子量約 9,600 の、84 個のアミノ酸から成るペプチドホルモンで、生体内でのカルシウム調節に関与する。血中カルシウム

レベルが低下すると、PTH は骨吸収を促進し、血中カルシウムを上昇させる。腎臓では遠位尿管でのカルシウムの再吸収を促進する。間接的に小腸に作用し、カルシウムの吸収を促進する。PTH は、骨芽細胞の PTH 受容体に結合し、骨芽細胞の分化を誘導する一方で、骨芽細胞への作用を介して間接的に破骨細胞による骨吸収を促進する。さらに、骨芽細胞の増殖を促進し、骨量および新生骨を増加させる。骨芽細胞に存在する PTH 受容体は、7 回膜貫通型の G 結合蛋白質で、1-3 型の 3 種類の受容体が存在する。PTH の N 末端から 34 位までのアミノ酸部分が受容体に結合し、アデニル酸シクラーゼを活性化して細胞内 cAMP 濃度を上昇させる。さらに、ホスホリパーゼ C を増加させ、プロテインキナーゼ C を介する経路が報告されている。

ヒト、ラットおよびマウス BSP 遺伝子のプロモーター領域の塩基配列は、非常に相同性が高く、転写開始位置より 370 塩基対上流までは約 75 %の相同性を示す。BSP 遺伝子のプロモーター領域にはホルモンや成長因子に応答する遺伝子配列が存在し、ヒト BSP 遺伝子のプロモーター領域には、逆方向の TATA 配列 (-28 ~ -23 塩基対上流)、逆方向の CCAAT 配列 (-54 ~ -50 塩基対上流)および 2 つの CRE 配列 (CRE1; -79 ~ -72 塩基対上流、CRE2; -674 ~ -667)が存在する。さらに FGF2 応答配列 (FRE; -96 ~ -89 塩基対上流)、3 つの AP1 配列 (AP1(1); -149 ~ -142 塩基対上流、AP1(2); -483 ~ -477 塩基対上流、AP1(3); -797 ~ -791 塩基対上流)が存在する。

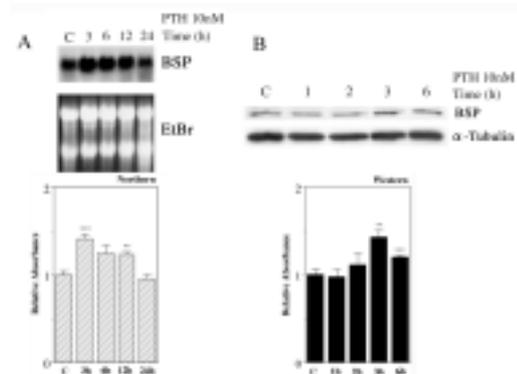
本研究では、骨代謝において重要なホルモンである PTH を用い、BSP 遺伝子発現に対する PTH の影響、特に転写調節機構を検索することを目的に解析を行った。

### 3 . 研究の方法

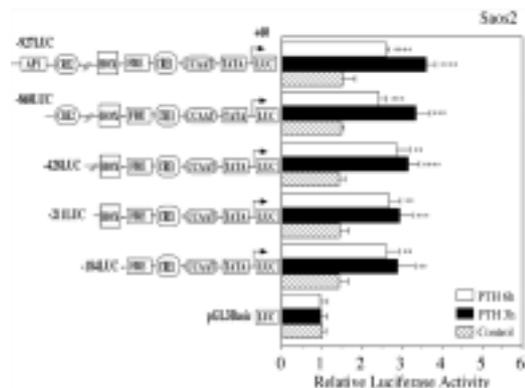
PTH (10 nM) で Saos2 細胞を刺激し、ヒト BSP mRNA およびタンパク質の発現量の変化をノーザンおよびウエスタンブロット法で検索した。次に、ヒト BSP プロモーターを種々の長さに調節したルシフェラーゼコンストラクトを Saos2 細胞に導入し、PTH (10 nM) にて 3 および 6 時間刺激後、細胞を回収して、ルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼアッセイの結果から、PTH に応答すると考えられる DNA 配列を合成し、PTH (10 nM) で刺激した Saos2 細胞から、経過的に核内タンパク質を抽出し、プロモーター配列と核内タンパク質との結合量の変化を検索するために、ゲルシフトアッセイを行った。以上の結果を総合して、PTH に応答する配列の検索を行った。

### 4 . 研究成果

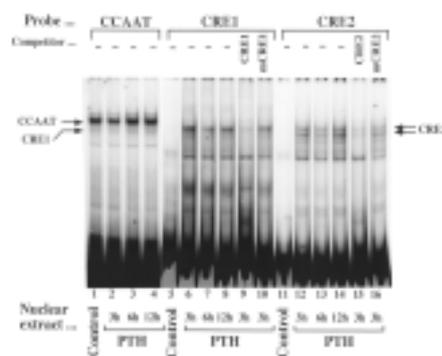
Saos2 細胞を PTH (10 nM) で刺激し、ヒト BSP mRNA およびタンパク質の発現量の変化をノーザンおよびウエスタンブロット法で検索を行った結果、PTH 刺激 3 時間から BSP mRNA およびタンパク質の発現が増加した。



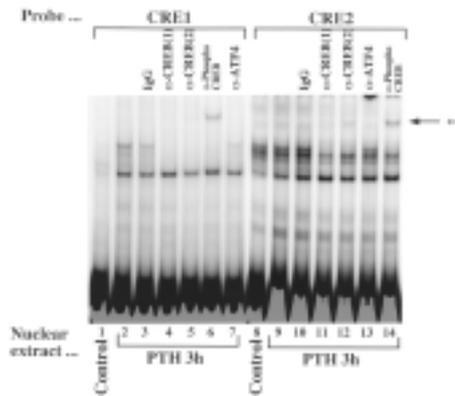
次に、ヒト BSP プロモーターを種々の長さに調節したルシフェラーゼコンストラクトを Saos2 細胞に導入し、PTH (10 nM) にて 3 および 6 時間刺激した結果、ルシフェラーゼプラスミド (-184、-211、-428、-868 および -927 Luc) 全ての転写活性が上昇した。



転写開始点から -927 塩基対上流までのプロモーター配列中には、2 つの cAMP 応答配列 (CRE) が存在するため、CRE1 (-79 ~ -72) および CRE2 (-673 ~ -666) に注目して検索を行った。



逆方向の CCAAT 配列と核内タンパク質との結合は変化しなかった。アイソトープ標識した CRE1 配列と核内タンパク質との結合は、PTH (10 nM) 刺激 3 時間後から増加した。CRE2 配列においても、PTH 刺激 3 時間後から核内タンパク質との結合が増加した。CRE1 配列と核内タンパク質の結合は 1 本のバンドで確認されたが、CRE2 配列では 2 本のバンドが認められた。CRE1 および CRE2 への核内タンパク質の結合の特異性を検索するため、アイソトープ標識していない 40 倍濃度のオリゴヌクレオチドと 2 塩基対の変異を導入したミュレーション CRE1 および CRE2 配列を 40 倍濃度で用いて競合実験を行った。CRE1 配列と核内タンパク質との結合は、アイソトープ標識していない CRE1 配列にて競合されたが、無標識のミュレーション CRE1 配列では競合されなかった。CRE2 配列と核内タンパク質の結合は、アイソトープ標識していない 40 倍濃度の CRE2 配列で競合され、無標識のミュレーション CRE2 配列では競合されなかった。次に、CRE1 および CRE2 配列に結合する転写因子を検索する目的で、各種抗体を用いたゲルシフトアッセイを行った。CRE1 配列では、抗リン酸化 CREB1 抗体で結合バンドが高分子領域へ移動(スーパーシフト)し、抗 CREB1 抗体で結合バンドが消失した。CRE2 配列においても、抗リン酸化 CREB1 抗体で結合バンドがスーパーシフトし、抗 CREB1 抗体で結合バンドが消失した。



以上の結果から、ゲルシフトアッセイで認められた核内タンパク質の結合の変化は、細胞の分化段階により異なると考えられた。また、これらの応答配列に結合する転写因子の相互作用については今後の検討課題である。

## 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)

[雑誌論文](計10件)

M. Mezawa, S. Araki, H. Takai, Y. Sasaki, S. Wang, X. Li, D. Kim, Y. Nakayama, Y. Ogata. Regulation of human bone sialoprotein gene transcription by platelet-derived growth factor-BB. *Gene* 435, 80-87, 2009. 査読有

S. Araki, M. Mezawa, Y. Sasaki, L. Yang, Z. Li, H. Takai, Y. Nakayama, Y. Ogata. Parathyroid hormone regulation of the human bone sialoprotein gene transcription is mediated through two cAMP response elements. *J. Cell. Biochem.* 106, 618-625, 2009. 査読有

佐々木庸子, 荒木正大, 目澤優, Zhitao Wang, 金子博寿, 小方頼昌 骨シアロタンパク質 (BSP) の転写調節に対する CO2 レーザーの効果 *日本歯周誌* 50, 176-184, 2008. 査読有

H. Takai, S. Araki, M. Mezawa, D. Kim, X. Li, L. Yang, Z. Li, Z. Wang, Y. Nakayama and Y. Ogata. AP1 Binding Site is Another Target of FGF2 Regulation of Bone Sialoprotein Gene Transcription. *Gene* 410, 97-104, 2008. 査読有

Y. Ogata. Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism. *J Perio Res* 43, 127-135, 2008. 査読有

H. Takai, Y. Nakayama, D. Kim, M. Arai, S. Araki, M. Mezawa, Y. Nakajima, N. Kato, H. Masunaga and Y. Ogata. Androgen Receptor stimulates Bone Sialoprotein (BSP) Gene Transcription via cAMP response element and activator protein 1/glucocorticoid response elements. *Journal of Cellular Biochemistry* 102, 240-251, 2007. 査読有

D. Kim, H. Takai, M. Arai, S. Araki, M. Mezawa, Y. Kawai, K. Murota, J. Terao and Y. Ogata. Effects of Quercetin and Quercetin

3-Glucuronide on the Expression of Bone Sialoprotein Gene. Journal of Cellular Biochemistry 101, 790-800, 2007. 査読有

高井英樹, 小方頼昌 骨シアロタンパク質 (BSP) 遺伝子の転写に対するアンドロゲン受容体の効果 日本歯周誌 49; 27-36, 2007. 査読有

大橋顕二郎, 鈴木桃子, 今莊雅秀, 小山朱美, 齋藤綾一朗, 若林健史, 増永浩, 小方頼昌 プレストロンを用いた口臭と臨床パラメーターの関係について 日本歯周誌 49; 191-197, 2007. 査読有

M. Arai, Y. Shibata, K. Pugdee, Y. Abiko and Y. Ogata. Effects of Reactive Oxygen Species (ROS) on Antioxidant System and Osteoblastic Differentiation in MC3T3-E1 cells. IUBMB Life 59; 27-33, 2007. 査読有

[学会発表](計 5 件)

H. Takai, Y. Nakayama, D. Kim, S. Araki, M. Mezawa, N. Kato, Y. Ogata. Androgen Receptor Regulates Bone Sialoprotein Gene Expression. IADR General Session, July 2-5, 2008, Toronto, Canada.

D. Kim, H. Takai, N. Kato, Y. Sasaki, S. Wang, Y. Nakayama, Y. Ogata cAMP Regulates BSP Expression in Human Breast Cancer Cells. IADR General Session, July 2-5, 2008, Toronto, Canada.

Y. Nakayama, N. Kato, H. Takai, D. Kim, M. Arai, S. Araki, M. Mezawa, Y. Ogata. Insulin-like growth Factor-1 regulates bone sialoprotein gene expression. 4-8 Nov 2007 9th International Conference of Chemistry and Biology of Mineralized Tissues. Austin USA.

M. Mezawa, S. Araki, D. Kim, H. Takai, Z. Wang, X. Li, N. Kato, Y. Nakayama, Y. Ogata. Regulation of human bone sialoprotein gene transcription by platelet-derived growth factor. 4-8 Nov 2007 9th International Conference of Chemistry and Biology of Mineralized Tissues. Austin USA.

Y. Ogata, Y. Nakajima, L. Yang, Z. Li, Z. Wang, X. Li, M. Mezawa, S. Araki, Y. Nakayama, S. Oida, M. Fukae. Regulation of BSP Gene Transcription by Amelogenins and Sheath proteins. 4-8 Nov 2007 9th International Conference of Chemistry and Biology of Mineralized Tissues. Austin USA

6. 研究組織

(1) 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: 9 0 2 0 4 0 6 5

(2) 研究分担者

中尾 寿美 (NAKAO SUMI)  
日本大学・松戸歯学部・助手  
研究者番号: 2 0 1 0 2 5 7 7

増永 浩 (MASUNAGA HIROSHI)  
日本大学・松戸歯学部・講師  
研究者番号: 4 0 2 2 0 3 8 1

(3) 連携研究者

中山 洋平 (NAKAYAMA YOHEI)  
日本大学・松戸歯学部・講師  
研究者番号: 3 0 4 3 4 0 8 8

高井 英樹 (TAKAI HIDEKI)  
日本大学・松戸歯学部・助教  
研究者番号: 3 0 4 5 3 8 9 8