

平成 22 年 3 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 年～2008 年
 課題番号：19592370
 研究課題名（和文） セメント質形成細胞の発現する骨シアロ蛋白質（BSP）の機能的な役割について
 研究課題名（英文） Transcriptional regulation of BSP gene mediated by cementoblast like cell in vitro
 研究代表者
 山内 雅人（YAMAUCHI MASATO）
 神奈川歯科大学・歯学部・助教
 研究者番号：30230311

研究成果の概要：

本研究の目的はセメント質形成細胞の発現する骨シアロ蛋白質（BSP）の機能的役割を知ることである。その端緒として、セメント質形成細胞の BSP 遺伝子の組織特異性を歯肉由来線維芽細胞と比較するため、クローニングした転写制御領域の活性化試験を行った。セメント質形成細胞は転写開始点上流約 7kb 付近に転写活性化領域を持ち、転写因子 Runx2 によるクロマチン制御を受けていた。その線維芽細胞との相違は BSP 遺伝子発現の組織特異性を担うものである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：歯科矯正学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：骨シアロ蛋白質・セメント質形成細胞・転写制御・Runx2・アメロジェニン

1. 研究開始当初の背景

成人矯正治療の需要が増加している近年においては、不可逆的な歯根吸収のリスクは高まっている。矯正力による歯根吸収を予知し予防し治療が可能ならば、進化する矯正治療が安全で確実になる事は明確である。そのためには歯根吸収の発症とその修復機構を解明することが喫緊の課題である。セメント質形成細胞が発現する骨シアロ蛋白質（BSP）が歯根発生、生理的セメント質の機能維持、歯根吸収とその後のセメント質修復に重要な役割を果たしており、さらにそのマラッセ上皮残遺細胞由来のアメロジェニンによる制

御がセメント質の組織特異性を維持しているとする作業仮説を本研究の学術的背景とした。

2. 研究の目的

本研究の目的はセメント質形成細胞が発現する骨シアロ蛋白質（BSP）がアメロジェニンと協調して歯根の恒常性を保つ機構を知る事である。その端緒としてセメント質形成細胞の BSP 遺伝子発現に及ぼすアメロジェニンの影響を検討し、さらにはクローニングした BSP 遺伝子転写制御領域を用いた転写活性化試験により、アメロジェニン応答性領域を同定

する。さらには転写因子 Runx2 による転写制御との関連性を骨芽細胞や線維芽細胞との比較を通じて、セメント質形成細胞がいかにか組織特異的に BSP の転写制御をおこなっているかを検討する。

3. 研究の方法

1) 翻訳後修飾を受けた遺伝子組み換えアメリロジェニンスプライシング変異体蛋白質を作製する目的で、昆虫由来細胞 SF9 を用いたバキュロウイルス蛋白質発現系のシャトルベクターに全長 cDNA をクローニングする。その後同 SF9 に組み換え蛋白質を発現させ精製する。培養した不死化マウス歯小囊由来セメント芽前駆体細胞に作製した組み換えアメリロジェニンスプライシング変異体蛋白質を添加して、RT-PCR 法を用いて BSP の mRNA 発現量の増減を半定量する。

2) マウス genomic library からクローニングしたマウス骨シアロ蛋白質(BSP)の遺伝子転写制御領域の転写開始点上流 9.0kb を長さの異なる遺伝子断片をルシフェラーゼ発現ベクターにサブクローニングする。培養した不死化マウス歯小囊由来セメント芽前駆体細胞にリポフェクトアミンを利用して、上述の断片化 BSP 遺伝子発現ベクターを遺伝子導入する。その転写活性の変化はデュアルルシフェラーゼレポーターシステムにて評価検討する。同セメント芽前駆細胞と歯肉線維芽細胞を比較して、BSP の遺伝子転写制御領域の転写活性に相違があるかを検討する。また、1) で作製した組み換えアメリロジェニンスプライシング変異体蛋白質を添加する事により転写活性の変化が生ずるかどうかを検討する。さらに申請者らが同定しつつある BSP 遺伝子中の骨芽細胞特異的転写因子 Runx2 の結合領域の転写制御がセメント芽前駆体細胞でも生じているかどうか、また組み換えアメリロジェニンスプライシング変異体蛋白質の添加がその調節に影響を及ぼすかどうかを検討する。

3) マウス骨シアロ蛋白質(BSP)の遺伝子転写制御領域の転写開始点上流 9.0kb の転写活性化領域では高次クロマチン構造が開いて緩いヌクレオソーム構造を呈していると考えられる。さらに組織特異的転写因子の DNA 結合に伴ってヌクレオソームを構成するヒストンはアセチル化を受けているはずである。それらの現象を応用したクロマチン免疫沈降法は生細胞(in vivo)の特定転写因子のクロマチン上での局在を解析し、その転写制御機構を明らかにできる。さらに申請者らはすでに抗アセチル化ヒストン抗体、抗メチル化ヒストン抗体、抗 Runx2 抗体を作製しており、クロマチン免疫沈降法を用いて

BSP 遺伝子の転写制御領域のクロマチン構造の微細な変化を検討する。

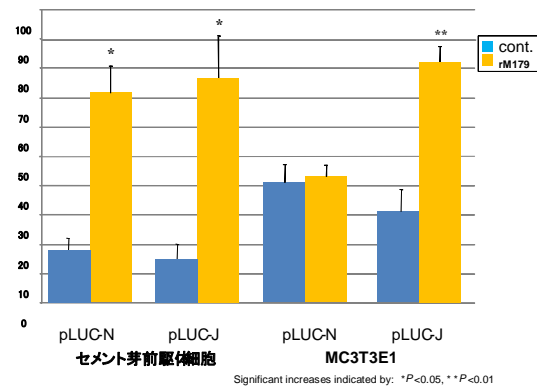
4. 研究成果

1) 昆虫由来細胞 SF9 を用いたバキュロウイルス蛋白質発現系により抽出し、粗精製したアメリロジェニンスプライシング変異体蛋白質(rM59)は抗アメリロジェニン抗体を用いたウェスタン解析により細胞外基質分画に約 5kD のややブロードな反応物として検出された。その生理活性を検討するために骨肉腫細胞 ROS17/2.7 細胞の接着試験を行った。陽性対照として大腸菌蛋白質発現系により精製したマウス全長アメリロジェニン(rM179)を用いた。その結果、rM179 に比べると著しく低い接着活性を rM59 は示した。しかしながら、1.0 μ g/ml の組み換え蛋白質を添加した後 24h の細胞群から全 RNA を抽出し、Osteocalcin の発現量を RT-PCR にて半定量したところ、rM179 で約 5 倍、rM59 では約 3 倍の発現上昇が認められた。バキュロウイルス蛋白質発現系から得られた rM59 が大腸菌由来 rM179 に接着比較して活性や骨基質蛋白質誘導能が低いのは、rM59 の精製過程に問題があると考えられるため、現在でも改良、検討中である。そのため以下の研究では、主に rM179 を用いて行った結果のみを報告する。培養した不死化マウス歯小囊由来セメント芽前駆体細胞と前骨芽細胞株 MC3T3E1 に 1.0 μ g/ml の rM179 を添加した後 24h の細胞群から全 RNA を抽出し、骨シアロ蛋白質(BSP)の発現量を RT-PCR にて半定量した。その結果、BSP の mRNA 発現量は rM179 により、不死化マウス歯小囊由来セメント芽前駆体細胞で約 2 倍、MC3T3E1 約 1.7 倍の発現上昇が認められた。

2) マウス genomic library からクローニングしたマウス骨シアロ蛋白質(BSP)の遺伝子転写制御領域の転写開始点上流 9.0kb を 9.0kb、5.2kb と 0.8kb の 3 種類の長さの異なる断片をルシフェラーゼ発現ベクターにサブクローニングした。さらに 9.0kb を 13 部位に断片化した平均長 0.5kb のマウス BSP 遺伝子転写制御領域と同転写開始点上流プロモーター領域 725bp を結合させたキメラ遺伝子をルシフェラーゼ発現ベクターにサブクローニングした。サブコンフルエントに達した不死化マウス歯小囊由来セメント芽前駆体細胞と MC3T3E1、さらに歯肉線維芽細胞に無血清用培地下で上述のキメラコンストラクトをリポフェクトアミンにより遺伝子導入を行い、3 時間後に 1.0 μ g/ml の rM179 を培養液中に直接投与した。45 時間後細胞を回収し、その転写活性を比較した。その結果、非添加群に比較して不死化マウス

歯小囊由来セメント芽前駆体細胞では、pLUC9.0k で 6 倍、pLUC5.2k で 3 倍、pLUC0.8k で約 2.2 倍の転写活性の増加が認められた。同じく MC3T3E1 では pLUC9.0k で 4 倍、pLUC5.2k で 2 倍、転写活性の増加が認められた。pLUC0.8kb では転写活性の変化は認められなかった。さらに歯肉線維芽細胞では pLUC9.0k で 0.5 倍、pLUC5.2k で 0.8 倍、転写活性の抑制が認められた。pLUC0.8kb では転写活性の変化は認められなかった。以上の結果はアモロジェニン rM179 の BSP 遺伝子転写活性化領域がプロモーター上流 5.0kb~9.0kb に存在する事を示している。報告者は牛由来精製アモロジェニン蛋白質でも同様の結果を得ており、研究に用いるアモロジェニン蛋白質の由来や精製法の相違にかかわらず再現性がある。さらに歯肉線維芽細胞では同部位では BSP 遺伝子の転写抑制が生じており、わずかであるが MC3T3E1 よりも不死化マウス歯小囊由来セメント芽前駆体細胞で高い転写活性の促進が生じていることから、同部位のアモロジェニン反応性に組織特異性が推察される。平均長 0.5kb のマウス BSP 遺伝子転写制御領域と同転写開始点上流プロモーター領域 725bp を結合させたキメラ遺伝子のコンストラクト 13 種のうち 7 種(pLUC-P : nts -9255 ~ nts -8209, pLUC-O : nts -8228 ~ -7297, pLUC-N : nts -7317 ~ nts -6255, pLUC-M : nts -6243 ~ nts -6070, pLUC-L : nts -6089 ~ nts -5670, pLUC-K : nts -5689 ~ nts -5539, pLUC-J : nts -5394 ~ nts -4815)がプロモーター上流 5.0kb~9.0kb を網羅している。上述の遺伝子導入条件でアモロジェニン rM179 の不死化マウス歯小囊由来セメント芽前駆体細胞と MC3T3E1 の BSP 遺伝子転写活性に及ぼす影響を検討した。その結果、不死化マウス歯小囊由来セメント芽前駆体細胞では、pLUC-N で 3 倍、pLUC-J で 4 倍の転写活性の増加が認められた。同じく MC3T3E1 では pLUC-J で 2 倍の転写活性の増加が認められた。一方、pLUC-N では転写活性の変化は認められなかった (右上図参照)。以上の結果から pLUC-N の領域では歯小囊由来セメント芽前駆体細胞に特異的な BSP 遺伝子の転写制御機構が存在することが強く示唆された。また、pLUC9.0k で認められた不死化マウス歯小囊由来セメント芽前駆体細胞の MC3T3E1 より高い転写活性の促進は pLUC-N の領域の組織特異的なアモロジェニン反応性が起因となっている事が推察される。BSP 遺伝子転写制御領域の転写開始点上流 nts -7317 ~ nts -6255 には、推定される 3 部位の Runx2 結合領域(OSE)や推定される 2 つの Sp-1 結合領域が存在する。不死化マウス歯小囊由来セメント芽前駆体細胞においてアモロジェニン rM179 による

BSP 遺伝子の転写促進が転写開始点上流 nts -7317 ~ nts -6255 のどの領域を介して生ずるかは、さらに同領域を断片化して検討する必要がある。



3) BSP 遺伝子転写制御領域の転写開始点上流 nts -7317 ~ nts -6255 に推定される 3 部位の Runx2 結合領域(OSE)が存在する事から、アモロジェニン rM179 による転写促進が転写因子 Runx2 を介して行われ、クロマチン構造の変化を引き起こしている可能性があるとの示唆される。そこで Runx2 モノクローナル抗体を用いたクロマチン免疫沈降法を用いて、同領域のクロマチン構造に及ぼす、アモロジェニン rM179 の影響を検討した。pLUC9.0k を遺伝子導入した後、アモロジェニン rM179 を添加して、コンフルエントに達した不死化マウス歯小囊由来セメント芽前駆体細胞を 1% formaldehyde で固定し、密閉式超音波細胞破碎装置を用いて可溶性クロマチン分画(平均長 500~600bp のヌクレオソームを得た。50%ProteinA/G Sepharose で前処理した各分画に mouse anti-mouse Runx2 モノクローナル抗体あるいは normal rabbit 血清を加えて免疫沈降を行った。洗浄後、0.3M NaCl 溶液下で 65°C にて 4 時間加熱し、分子間架橋を外し、クロマチンに結合していた DNA 部位の精製を行う。さらにその定量は RT-PCR により行った。その結果、同領域における Runx2 によるクロマチン構造の活性化はアモロジェニン rM179 の添加により促進されていた。共同研究者の松澤はアモロジェニン rM179 が細胞内の BMP-SMAD 経路を刺激すると報告している。一方、Runx2 は細胞内の SMAD1 と SMAD4 に結合するという報告もある。今後、rM179 の刺激が SMAD を介して Runx2 に伝達され、その結果 BSP 遺伝子転写制御領域の転写開始点上流 nts -7317 ~ nts -6255 のクロマチン構造を活性化して転写活性化を行うカスケードをさらに詳細に検討する

必要があろう。

5. 主な発表論文

(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)

- 1) Matsuzawa M, Sheu TJ, Lee YJ, Chen M, Li TF, Holz JD, Puzas JE. Putative signaling of amelogenin utilizes the Wnt/beta-catenin pathway. *J periodontal Res*. 2009 Jun;44(3):289-96 査読あり
- 2) Saito M, Nishida E, Sasaki T, Yoneda T, Shimizu N. The KK-periome database for transcripts of periodontal ligament development. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 2009 Jul 15;312B(5):495-502 査読あり
- 3) Fujimoto T, Yorimoto S, Hatano N, Nozaki N, Sueyoshi N, Kameshita I, Mizutani A, Mikoshiba K, Kobayashi R, Tokumitsu H. Activation of SAD kinase by Ca(2+)/Calmodulin-dependent protein kinase kinase. *Biochemistry* 2008 Apr 1 ;47(13):4151-4159 査読あり
- 4) Kawase T, Ichikawa H, Ohta T, Nozaki N, Tashiro F, Ohki R, Taya Y. p53 target gene AEN is a nuclear exonuclease required for p53-dependent apoptosis. *Oncogene* 2008 Jun 19;27(27):3797-810 査読あり
- 5) Fujii S, Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Saito M, Akamine A. Investigating a clonal human periodontal ligament progenitor/stem cell line in vitro and in vivo. *J Cell Physiol*. 2008 Jun;215(3):743-9 査読あり
- 6) Tsuchiya S, Honda MJ, Shinohara Y, Saito M, Ueda M. Collagen type I matrix affects molecular and cellular behavior of purified porcine dental follicle cells. *Cell Tissue Res*, 2008 Feb;331(2):447-59 査読あり
- 7) Soneyoshi T, Wayman G, Fortin D, Davare M, Hoshi N, Nozaki N, Natsume T, Soderling TR. Activity-dependent synaptogenesis: regulation by a CaM-kinase/CaM kinase I/beta PIX signaling complex. *Neuron* 2008 Jan 10; 57(1):94-107 査読あり
- 8) Nishida E, Sasaki T, Ishikawa SK, Kosaka K, Aino M, Noguchi T, Teranaka T, Shimizu N, Saito M. Transcriptome database KK-periome for periodontal ligament development: expression profiles of the extracellular

matrix genes. *Gene*, 2007 Dec 1, 404(1-2): 70-9 査読あり

- 9) Yamada S, Tomoeda M, Ozawa Y, Yoneda S, Terashima Y, Ikezawa k, Ikegame S, Saito M, Toyosawa S, Murakami S. PLAP-1/aspirin, a novel negative regulator of periodontal ligament mineralization. *J Biol Chem*. 2007 Aug 10;282(32):23070-80 査読あり
- 10) Holtz JD, Sheu TJ, Drissi H, Matsuzawa M, Zuscik MJ, Puzas JE. Environmental agents affects skeletal growth and development. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2007 Mar; 81(1):41-50 査読あり

[学会発表] (計 10 件)

- 1) 野崎直仁 CENP-A chromatin component ICEN5/PRP16 is necessary for loading CPC to centromeres. 第31回日本分子生物学会 2008 12.9-12 神戸
- 2) 松澤光洋 アメロジェニンによる骨芽細胞分化機構の解析 (第4報) 第43回神奈川歯科大学総会 2008. 12. 06. 横須賀
- 3) 山内雅人 骨シアロ蛋白質の骨芽細胞特異的発現機構—Runx2による転写調節— 第67回日本矯正歯科学会 2008.11.16-18 福岡
- 4) Matsuzawa M Amelogenin activates the Wnt/beta-catenin pathway. 86th General Session & Exhibition of the IADR, 2008 7.2-5, Toronto Canada
- 5) 依田欣哉 CENP-A クロマチンダイナミクス解析: ICEN 構成因子を認識する抗体の作成。第30回日本分子生物学会 2007.12.11-15.横浜
- 6) 松澤光洋 アメロジェニンによる骨芽細胞分化機構の解析 (第3報 Wnt/beta-catenin シグナル伝達系について) 第42回神奈川歯科大学総会 2007. 12. 08. 横須賀
- 7) Kosaka K ADAMTSL-4 and Fibrillin-1 cooperate in the formation of oxytalan fiber during periodontal ligament development. 9th TMD, Zurich, Switzerland, 2007.9.06
- 8) 高坂一貴 ADMTSL-1 は Fibrillin-1 と協調してオキシタラン線維形成に関わる。第49回歯科基礎医学会学術大会、札幌、2007.8.31
- 9) 松澤光洋 アメロジェニンによる骨芽細胞分化機構の解析 (第2報 Wnt/beta-catenin シグナル伝達系について) 第45回日本小児歯科学会大会、東京 2007. 7.19-20.
- 10) 高坂一貴 歯根膜微小線維形成に関わる

新規マトリックス因子の解析。第 50 回春季日本歯周病学会、横須賀、2007.5.18

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 雅人 (YAMAUCHI MASATO)
神奈川歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：3230311

(3) 連携研究者

野崎 直仁 (NOZAKI NAOHITO)
神奈川歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：40215562

松澤 光洋 (MATSUZAWA MITUHIRO)
神奈川歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：60288082

齊藤 正寛 (SAITO MASAHIRO)
大阪大学・歯学研究科・講師
研究者番号：40215562