

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30日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390491

研究課題名（和文） 分子進化学から探る酸性リン蛋白質による生体内石灰化機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the mechanism of biomineralization with acidic phosphoprotein from molecular evolution studies

研究代表者

豊澤 悟 (TOYOSAWA SATORU)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：30243249

研究成果の概要（和文）：酸性リン蛋白質である dentin matrix protein 1 (DMP1) の分子進化学的研究から、カゼインキナーゼ (CK) によりリン酸化されることが DMP1 機能に重要であることが推測される。すなわち、CK によりリン酸化された DMP1 はマイナス荷電体となり、Ca²⁺結合能を介して骨の石灰化に関与すると考えられる。本研究では、骨組織や骨芽細胞培養系において DMP1 の Ser がリン酸化していること、さらに骨芽細胞由来の CK が DMP1 のリン酸化に関与することが示唆された。次に、骨芽細胞培養系に CK 阻害剤を添加してリン酸化を阻害すると石灰化が抑制された。従って、骨組織で DMP1 は CK によりリン酸化されてマイナス荷電体となり、Ca²⁺結合能を有して骨の石灰化促進に関与すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Dentin matrix protein 1 (DMP1), which is a one of the acidic phosphoproteins composed of the bone. Molecular evolution study of DMP1 indicated that phosphorylation by casein kinase (CK) might be related to the DMP1 function. Highly phosphorylated DMP1 by CK has a large number of acidic domains. Because of its highly acidic nature, it is supposed that negative-charged DMP1 can bind to calcium, thereby regulating matrix mineralization. In this study, we found that Ser residues of DMP1 were phosphorylated in the bone and cultured osteoblast and that osteoblast-derived CK might phosphorylate DMP1. Culture experiment with CK inhibitor indicated that mineralization was controlled by inhibition of the CK activity. Therefore, it was supposed when DMP1 was phosphorylated by CK, and did negative-charged DMP1 promoted mineralization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

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：分子進化、生体内石灰化、リン酸化、酸性リン蛋白質、カゼインキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

骨の非コラーゲン性酸性リン蛋白質である dentin matrix protein 1(DMP1)は、骨芽細胞では産生されず、骨基質に埋まった骨細胞で産生される。産生された DMP1 は強力なマイナス荷電体となり、強い Ca^{2+} 結合能を介して骨の石灰化に関与すると考えられているが、その石灰化機構の詳細は明らかではない。我々は、哺乳類、鳥類、爬虫類の DMP1 遺伝子をクローニングし、その分子進化を検討した。その結果、「機能にとって重要な分子の性質や部位は長い進化過程において変化しない」という分子の進化的性質から、機能に重要と考えられる様々な生物種の DMP1 に共通するアミノ酸配列の特徴を見出した。これらの特徴の1つは、カゼインキナーゼ・アイソフォーム II (CKII) によるリン酸化という翻訳後修飾であり、DMP1 が機能するのに必要であると考えられた。実際に、骨組織には CKII 活性が認められ、骨細胞周囲で CKII 活性が高いことが報告されていることから、DMP1 が CKII によりリン酸化されていることが予測される。

2. 研究の目的

骨組織において、酸性リン蛋白質の1つである DMP1 は、カゼインキナーゼ (CK) によりリン酸化されて負に荷電し、強い Ca^{2+} 結合能を介して骨の石灰化に関与すると考えられている。本研究では、DMP1 翻訳後修飾の中でも DMP1 に特徴的なリン酸化が骨の石灰化に重要であることを実証し、DMP1 などの酸性リン蛋白質による生体内石灰化機構を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 骨組織中で DMP1 をリン酸化するカゼインキナーゼ (CK) のアイソフォームを明らかにし、骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) を用いた石灰化過程におけるその発現量の変化をリアルタイム PCR にて検討する。また、CK の骨組織中における発現分布を免疫染色にて明らかにする。
- (2) 骨組織の骨基質のリン酸化の存在を明らかにするために骨基質蛋白質のセリンがリン酸化を受けたリン酸化セリンの存在・分布を、リン酸化セリンに特異的な抗体を用いて免疫染色にて検討する。次に骨基質中の酸性リン蛋白質である DMP1 のセリンがリン酸化されていることを明らかにするために、共焦点レーザー顕微鏡にて、骨組織における DMP1 分布とリン酸化セリンの分布を蛍光 2 重染色により検討する。
- (3) 培養細胞の石灰化過程においても DMP1 のセリンがリン酸化されていることを

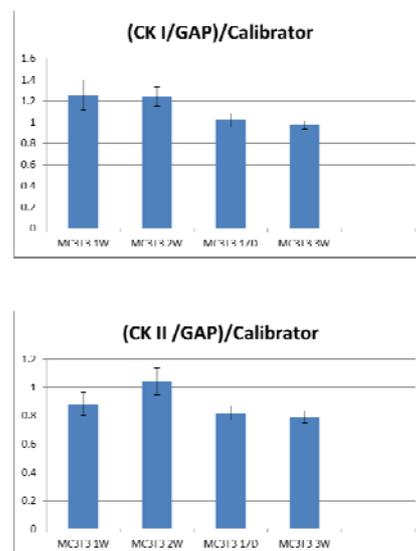
明らかにするために、MC3T3-E1 細胞を用いた石灰化培養系における DMP1 分布とリン酸化セリンの分布を蛍光 2 重染色により検討する。

- (4) MC3T3-E1 細胞を用いた石灰化培養系において、CKII の特異的阻害剤 (Tetrabromocinnamic acid : TBCA) を用いて、CKII による DMP1 のリン酸化を抑制して、骨芽細胞培養系の石灰化に及ぼす影響を検討する。
- (5) CK の触媒サブユニットの過剰発現用レンチウイルスベクターを作製する。レンチウイルスベクターにて骨芽細胞系細胞株に CK の触媒サブユニットを過剰発現させて、骨芽細胞培養系の石灰化に及ぼす影響を、石灰化レベルをアリザリンレッド染色にて評価して検討した。

4. 研究成果

- (1) 骨組織から抽出した RNA の RT-PCR により、骨組織にはカゼインキナーゼ・アイソフォーム I (CKI) とアイソフォーム II (CKII) の両アイソフォームの発現が認められた。また、骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞株) を石灰化培地で培養して石灰化過程における両アイソフォームの発現を検討した結果、CKI と CKII ともに培養 1 週目～石灰化が認められる 3 週目までほぼ定常的に発現していることが分かった (図 1)。

図 1 : 石灰化過程における CKI と CKII 発現
(骨芽細胞用細胞株 : MC3T3-E1 細胞株)



以上の骨組織や骨芽細胞株 (MC3T3-E1 細胞株) の石灰化過程には、CKI と CKII の両アイソフォームの定常的発現があるが、既に骨基質のリン酸化に関与する可能性の高いと報告されている CKII を研究対象として実験を進めた。

次に CKII 特異的な抗体を用いて、骨組織における CKII 分布を検討した結果、CKII 分布は主に骨芽細胞に認められた。

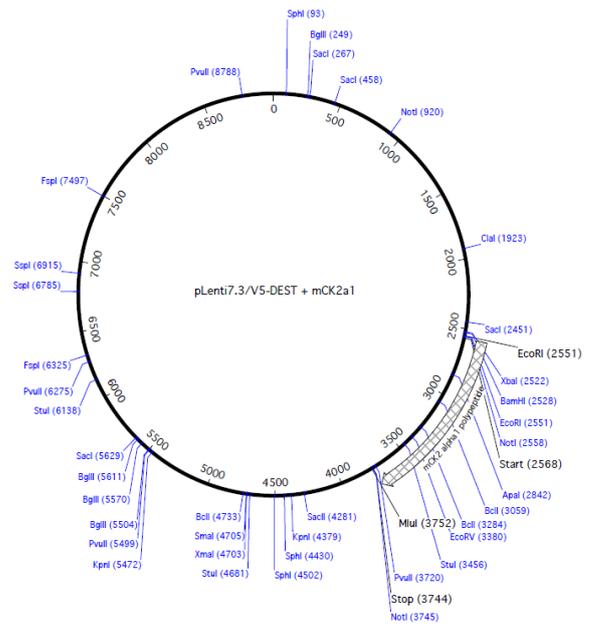
- (2) 骨組織中で骨基質蛋白質中のセリンがリン酸化されたリン酸化セリンの存在・分布を免疫染色にて検討した結果、骨表層や骨細胞周囲の骨基質にリン酸化セリンの存在・分布を認めた。また、切片を脱リン酸化して免疫染色を行うとリン酸化セリンに対する免疫反応が減弱し、この免疫反応の特異性が確認できた。

次に、骨基質蛋白質の DMP1 のセリンがリン酸化を受けている事が推測されるため、蛍光 2 重染色にて、骨組織における DMP1 分布とリン酸化セリンの分布を検討した結果、DMP1 とリン酸化セリンの分布は一部で重なり、DMP1 中のセリンがリン酸化されていることが示唆された。

- (3) MC3T3-E1 細胞株を用いた石灰化過程においても同様に、石灰化物における DMP1 分布とリン酸化セリンの分布を検討した結果、DMP1 とリン酸化セリンの分布は一部で重なり、DMP1 中のセリンがリン酸化されていることが示唆された。
- (4) MC3T3-E1 細胞を用いた石灰化培養系において、CKII を特異的に阻害することにより、CKII による DMP1 のリン酸化を抑制して、骨芽細胞培養系の石灰化に及ぼす影響を検討した。CKII の特異的阻害剤 (Tetrabromocinnamic acid: TBCA) が MC3T3-E1 細胞の細胞増殖に影響を及ぼさない濃度を設定し、TBCA を培地に添加して培養したところ、石灰化抑制傾向が認められた。
- (5) マウス CKII の触媒サブユニットの過剰発現用レンチウイルスベクターを製作した (図 2)。

次に、このレンチウイルスベクターを用いてマウス CKII 触媒サブユニットを MC3T3-E1 細胞株に過剰発現させることを試みたが、CKII 触媒サブユニット特異抗体を用いたウエスタンブロットにて過剰発現を確認できなかった。

図 2 : CKII 触媒サブユニット過剰発現用ベクター



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 6 件)

- ① Toyosawa S, Sato S, Kagawa R, Komori T, Ikebe K. Role of SIBLINGs on Matrix Mineralization: Focus on Dentin Matrix Protein 1 (DMP1). 査読有. J Oral BioSci 54:30-36, 2012.
- ② Yoshida CA, Komori H, Maruyama Z, Miyazaki T, Kawasaki K, Furuichi T, Fukuyama R, Mori M, Yamana K, Nakamura K, Liu W, Toyosawa S, Moriishi T, Kawaguchi H, Takada K, Komori T. SP7 inhibits osteoblast differentiation at a late stage in mice. PLoS One. 査読有. 7:e32364. 2012.
- ③ Qiu Y, Wang ZL, Jin SQ, Pu YF, Toyosawa S, Aozasa K, Morii E. Expression level of pre-B-cell leukemia transcription factor 2 (PBX2) as a prognostic marker for gingival squamous cell carcinoma. J Zhejiang Univ Sci B. 査読有. 13:168-75. 2012.
- ④ Takedachi M, Oohara H, Smith BJ, Iyama M, Kobashi M, Maeda K, Long CL, Humphrey MB, Stoecker BJ, Toyosawa S, Thompson LF, Murakami S. CD73-generated adenosine promotes osteoblast differentiation. J Cell Physiol. 査読有. 227:2622-31. 2012.

- ⑤ 豊澤 悟. 骨組織における DMP1 の発現分布の検討.
The BONE. 査読無. 28:3-7. 2011.
- ⑥ Yoneda T, Hagino H, Sugimoto T, Ohta H, Takahashi S, Soen S, Taguchi A, Toyosawa S, Nagata T, Urade M. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: position paper from the Allied Task Force Committee of Japanese Society for Bone and Mineral Research, Japan Osteoporosis Society, Japanese Society of Periodontology, Japanese Society for Oral and Maxillofacial Radiology, and Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons.
J Bone Miner Metab. 査読有. 28:365-83. 2010.

〔学会発表〕(計 8 件)

- ① Oya Y, Sato S, Usami Y, Ishida K, Takeshige F and Toyosawa S. Marker discrimination of transitional cell stages during osteocytogenesis.
The 59th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research. International Conference Center Hiroshima, October 8-9, 2011.
- ② 石田 健、佐藤 淳、宇佐美 悠、大家香、岸野万伸、小川裕三、豊澤 悟、骨組織における骨基質のリン酸化の検討、第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会、長良川国際会議場、9 月 30 日～10 月 2 日、2011.
- ③ Yamamoto Y, Sato S, Foster BK, Takada T, Somerman M and Toyosawa S. Effects of Inorganic Phosphate on the Dento-alveolar complex, In Situ and In Vitro. American Society for Bone and Mineral Research. Annual Meeting. October 15-19, 2010.
- ④ 豊澤 悟、佐藤 淳、石田健、新谷誠康、小守壽文、骨基質石灰化における S I B L I N G s の役割: DMP 1 を中心に、第 52 回歯科基礎医学会学術大会・総会、タワーホール船堀、9 月 20 日～9 月 22 日、2010.
- ⑤ Yamamoto Y, Sato S, Ogawa Y and Toyosawa S. Effects of inorganic phosphate on The Periodontal Cells. The 2nd Meeting of the IADR PAPF 1st Meeting of the IADR APR Shangri-La Hotel. Wuhan, Hubei, china, September 22-24, 2009.
- ⑥ 山元有理、佐藤 淳、藤田源太郎、石橋美樹、岸野万伸、小川裕三、豊澤 悟、歯周組織構成細胞におけるリン酸の影響、第 51 回歯科基礎医学会学術大会・総会、
- 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター、9 月 9 日～11 日、2009.
- ⑦ 山元有理、佐藤 淳、香川良介、豊澤 悟、リン酸による歯周組織を構成する細胞への影響、第 27 回日本骨代謝学会学術集会、大阪国際会議場、7 月 23 日～25 日、2009.
- ⑧ 香川良介、山元有理、佐藤 淳、池邊一典、豊澤 悟、DMP1 のリン酸化と石灰化促進能に関する研究、第 27 回日本骨代謝学会学術集会、大阪国際会議場、7 月 23 日～25 日、2009.

〔図書〕(計 2 件)

- ① 豊澤 悟、他、大阪大学出版会、ビスフォスフォネートの有用性と顎骨壊死、21-23、33-36、2010.
- ② 豊澤 悟、他、わかば出版、エナメル質-形成、構造、再生、起源と進化-、113-128、2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊澤 悟 (TOYOSAWA SATORU)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 30243249

(2) 研究分担者

中野 貴由 (NAKANO TAKAYOSHI)
大阪大学・大学院工学系研究科・教授
研究者番号: 30243182
(H23 年度: 連携研究者)

佐伯 万騎男 (SAEKI MAKIO)
大阪大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号: 30273692

佐藤 淳 (SATO SUNAO)
大阪大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号: 70335660

岸野 万伸 (KISHINO MITUNOBU)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 60346161

(3) 連携研究者

香川 良介 (KAGAWA RYOUSUKE)
大阪大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号: 40448147