

機関番号：32622

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792129

研究課題名 (和文) 骨形成における細胞外マトリックスタンパク質 POEM の機能の解明

研究課題名 (英文) Clarification of the function of extracellular matrix protein POEM in the osteogenesis

研究代表者

宮園 あがさ (MIYAZONO AGASA)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：00514936

研究成果の概要 (和文) : 細胞外マトリックスタンパク質 POEM(pre-osteoblast epidermal growth factor-like repeat protein with meprin, A5 protein, and receptor protein-tyrosine phosphatase μ domain) の遺伝子発現が TGF- β により抑制され、その制御には ERK1/2 および JNK を介していることを明らかにした。さらに詳細な骨芽細胞における発現制御機構と、POEM の骨形成における機能の解析を行うために、POEM 遺伝子の転写開始点の決定を 5' -RACE (Rapid Amplification of cDNA End) 法によって決定した。

研究成果の概要 (英文) : POEM(pre-osteoblast epidermal growth factor-like repeat protein with meprin, A5 protein, and receptor protein-tyrosine phosphatase μ domain) gene expression was suppressed by TGF- β via ERK1/2 and JNK. To investigate function of POEM in osteoblasts and bone formation, we determined start point transcription.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,240,000

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：歯周免疫機能学

1. 研究開始当初の背景

(1)細胞接着分子 POEM の骨芽細胞における発現について

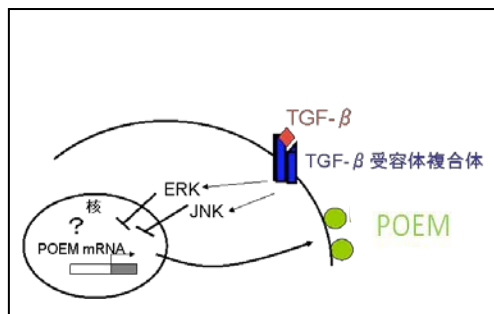
細胞接着分子 POEM は正常マウス頭蓋冠由来骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞から単離された分泌型タンパク質である。POEM は5つの EGF-like リピート、 $\alpha_8\beta_1$ インテグリンと相互に作用する RGD 配列および強力な細胞接着力を有する MAM ドメインで構成され、細胞-細胞間あるいは、細胞-細胞外マトリックス間の相互作用において非常に重要な役割を担っていると考えられている [Morimura N et al. *J.Biol.Chem.* 276(45):42172-42181(2001)]

(2)POEM の生体における役割について

POEM は Nephronectin と呼ばれ、腎臓において $\alpha_8\beta_1$ インテグリンのリガンドとして見つかったが [Brandenberger R et al. *J.Cell Biol.* 154(2):447-458(2001)]、この $\alpha_8\beta_1$ インテグリンと POEM の相互作用が、腎臓の初期発生において重要であることが明らかとなっている [Linton JM et al. *Development.* 134(13):2501-2509(2007)]。このように POEM は様々な組織や器官の発達と機能に関わっていることが示唆される。

(3)本研究課題に至った背景

申請者はこれまでに POEM の発現制御機構において、次のような実験結果を得



ている。

①POEM 遺伝子発現制御因子の検討

MC3T3-E1 細胞において POEM 遺伝子の発現は TGF-β によって強力に抑制されることが明らかになった [Miyazono A et al. *FEBS Letters* 581:5321-5326(2007)]。

②POEM 遺伝子発現制御機構の解明

TGF-β による POEM の発現抑制は MAPK 経路阻害剤のうち ERK1/2 阻害剤および JNK 阻害剤によって阻害された。このことより、TGF-β による POEM の発現抑制は ERK1/2 および JNK 経路の関与が明らかになった [Miyazono A et al. *FEBS Letters* 581:5321-5326(2007)]

2. 研究の目的

POEM はその分子構造により、細胞接着、伸展、生存活性において重要な役割を担っていると考えられている。

[Morimura N et al. *J.Biol.Chem.* 276(45):42172-42181(2001)]。このことから、POEM は骨形成の初期における未分化間葉系細胞の凝集や、骨芽細胞が nodule を形成していく過程で重要である可能性が示唆される。しかしながら POEM に関してはその制御機構および骨における生理作用を含めてその詳細は全く明らかになっていない。そこで申請者は POEM の骨芽細胞における発現制御機構および骨形成における機能の解明していくことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)TGF-β による POEM の発現制御におけるプロモーター解析による検討

1)POEM 遺伝子の転写開始点の決定を 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA End) 法によって決定する。

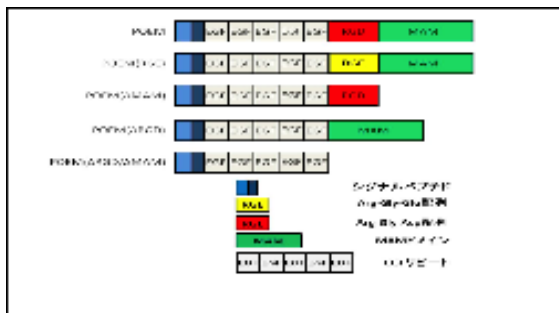
2)1)で決定した転写開始点上流のプロモーター領域をルシフェラーゼベクターに

挿入する。そのプラスミドベクターを骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞にトランスフェクションし、TGF-βによる POEM 遺伝子プロモーター活性の抑制を検討する。

3)さらに、種々の長さの POEM プロモーターをルシフェラーゼベクターに挿入したレポーターコンストラクトを用い、プロモーター解析を行う。この結果から、TGF-βによる POEM 遺伝子を抑制する制御領域が明らかになり、TGF-βの骨芽細胞への作用によって活性化された POEM 遺伝子発現を制御する転写因子も明らかとなる。

(2)POEM リコンビナントタンパク質の精製および POEM リコンビナントタンパク質を用いた機能解析

発現ベクターを用いて、動物細胞で POEM を発現させ、カラムクロマトグラフィーにより POEM リコンビナントタンパク質の精製を行う。ここで精製した POEM リコンビナントタンパク質を、骨芽細胞に作用させ、骨芽細胞の分化に対する影響を Alkaline phosphatase(ALP)染色・活性測定および種々の骨芽細胞分化マーカーで検討する。



4. 研究成果

(1)POEM 遺伝子の転写開始点の決定

POEM の骨形成における機能の解析を行うために、POEM 遺伝子の転写開始点の決定を 5' -RACE (Rapid Amplification of cDNA End) 法によって決定した。

ここで決定した転写開始点上流のプロモーター領域をルシフェラーゼベクターに挿入し、そのプラスミドベクターを骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞にトランスフェクションし、TGF-βによる POEM 遺伝子プロモーター活性の抑制を検討した。さらに、種々の長さの POEM プロモーターをルシフェラーゼベクターに挿入したレポーターコンストラクトを用い、プロモーター解析を行った。プロモーター解析の結果、有意な差がでなかったが、転写開始点の決定ができたので、今後さらに、重要な配列を検討していく。

(2)POEM リコンビナントタンパク質の精製

種々の発現ベクターを用いて、動物細胞で POEM を発現させ、培養上清中に分泌されると予想される種々の POEM 変異体を精製した。COS 細胞からタンパクを精製し、Western Blot 法にて、その発現を確認した。また、培養上清を用いて骨芽細胞分化を ALP 染色および ALP 活性を測定したが、有意な差がでなかったことから、上清中には POEM タンパクが発現しなかったことが推測される。POEM は細胞接着因子として機能し、細胞から分泌後直ちに細胞表面に、α8β1 インテグリンを介して接着するために、分泌型タンパク質ではあるものの、培養上清中には多量に存在していないことが考えられる。

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)

[学会発表] (計 5 件)

(1) 宮園 あがさ, 須澤 徹夫, 山本松男, 上條 竜太郎 : エナメル芽細胞における Caspase-14 の役割. Journal of Oral Sciences, p139, 2009 (第 51 回歯科基礎医学会, 新潟, 2009 年 8 月)

(2) 臼井通彦, 宮園 あがさ, 山本松男 :
リゾリン脂質・LPA(lysophosphatidic acid)
の破骨細胞前駆細胞株 Raw264.7 に対する影
響. 口腔組織培養学会誌, 19 : 49-50, 2009

(3) 臼井通彦, 宮園 あがさ, 山本松男 :
リゾリン脂質・Lysophosphatidic acid (LPA)
の歯肉上皮細胞株 Ca9-22 への影響.
(第 130 回日本歯科保存学会春季学術大会,
札幌, 2009 年 6 月)

(4) 臼井通彦, 宮園 あがさ, 府川有紀子, 林
幸恵, 山本松男 :
LPA(lysophosphatidic acid)の歯肉扁平上皮
癌細胞株 Ca9-22 に対する影響.
(第 27 回日本骨代謝学会, 大阪, 2009 年 7
月)

(5) 宮園 あがさ, 須澤 徹夫, 山本 剛, 小野
美樹, 相澤 怜, 臼井通彦, 立川哲彦, 榎
宏太郎, 山本松男, 上條竜太郎 エナメル芽
細胞の分化に伴う Caspase-14 の発現を TGF-
 β が促進する. Journal of Oral
Sciences, p121, 2009 (第 52 回歯科基礎医学
会, 船堀, 2010 年 9 月)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮園 あがさ (MIYAZONO AGASA)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号 : 00514936

(2) 連携研究者

上條 竜太郎 (KAMIJO RYUTARO)
昭和大学・歯学部・教授
研究者番号 : 70233939

山田 篤 (YAMADA ATSUSHI)
昭和大学・歯学部・講師
研究者番号 : 50407558