

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861562

研究課題名(和文) ESETとG9aによるrunx2を介した骨芽細胞分化制御

研究課題名(英文) Modulation of osteoblastic differentiation by G9a and ESET

研究代表者

出野 尚 (Ideno, Hisashi)

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号：40435699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はヒストンメチル化酵素であるG9aまたはESETが、骨芽細胞分化に重要な転写因子であるRunx2の機能を調節する仕組みを明らかにする事を目的とした。その結果、G9aとESETがRunx2の転写活性化を亢進する事、in vitroで作出したG9a欠損細胞ではRunx2発現は変動せず、Runx2制御下にあるosteocalcinの発現が抑制される事、G9aのC端側にRunx2と結合しその転写活性化亢進に必要な部位が存在する事、が明らかになった。このことから、骨芽細胞分化過程においてG9aがヒストンメチル化酵素の機能に加え、転写制御因子としての機能を持つ可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate role of G9a and ESET, both histone methyltransferases, during osteoblastic differentiation. Especially we focused on how they regulate the function of Runx2, which is a critical transcription factor for osteoblastic differentiation. We found that G9a and ESET enhanced transcriptional activity of Runx2. In G9a-knockout osteoblasts, we observed decreased expression of osteocalcin mRNA, while expression of Runx2 was not affected. Moreover, we found that the C-terminal region of G9a was necessary for binding with Runx2 and enhancement its transcription activation. These results suggest that G9a is required for proper function of Runx2 during osteoblastic differentiation.

研究分野：基礎歯科学

キーワード：エピジェネティクス ヒストンメチル化 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、遺伝子の発現制御にはクロマチン (ヒストンタンパク質に DNA が巻きついた状態) 構造の変化が重要な役割を果たす事が示されている。さらに、このクロマチン構造の変化はヒストンおよび DNA に対する修飾 (メチル化やアセチル化) が関わるとされている。ヒストン修飾の一つであるヒストン H3 の 9 番目のリジン (H3K9) のメチル化 (me) は発生、分化、癌化などに関わる重要な修飾である。H3K9 のメチル化には me1、me2、me3 の 3 種類が存在し、それらのメチル化を担う酵素は哺乳類では少なくとも 5 種類存在する。そのうち G9a は H3K9me1 と me2 のメチル化を、ESET (Setdb1) は H3K9me3 のメチル化を担っており、それぞれの欠損マウスは胎生 10.5 日前という発生初期で致死となるため、発生と分化に極めて重要な分子であると考えられているが、各組織における機能は不明であり、その詳細なメカニズムの解析が望まれている。最近では、四肢の間葉組織で ESET を欠損させると、長管骨の成長不全と Osteocalcin 発現の低下を伴った骨化の減少が認められるとの報告がある。さらに、我々は G9a と ESET が長管骨の成長板部位で肥大軟骨細胞から骨化部位にかけての発現局在が顕著に認められる事を報告した (*Gene Exp patt* 2013, 13)。これらのことは骨格系組織の形成にヒストンメチル化酵素が重要な役割を果たす事を示唆する。

2. 研究の目的

本研究では 2 つのヒストンメチル化酵素が Runx2 の発現あるいは機能を調節し骨芽細胞分化を制御する仕組みを明らかにすることを目的とする。

具体的には、(1) Runx2 がターゲットとする遺伝子の発現制御を G9a と ESET が調節するか、(2) Runx2 に G9a と ESET が結合する事で Runx2 の機能を調節するか、という 2 つの間に答える。

3. 研究の方法

【実験 1】Runx2 の転写活性化能に与える G9a、ESET の機能の検討

Runx2 による転写活性化が知られている Runx2 promoter や Osteocalcin promoter が挿入された Luciferase 発現ベクターを用いてレポーターアッセイによる解析をおこなった。

【実験 2】G9a 欠損骨芽細胞の作出とその遺伝子発現解析

G9a flox/flox マウスを作出し、頭蓋冠由来初代培養骨芽細胞 (pOB) を得た。この細胞にコントロールアデノウイルス、Cre 発現アデノウイルスを各々感染させ、野生型骨芽細胞

(WTpOB) と G9a 欠損骨芽細胞 (G9aKOpOB) を作出した。さらに、分化誘導培地にて培養した各々の細胞における骨分化マーカー遺伝子発現解析をリアルタイム PCR 法にておこなった。

【実験 3】Runx2 と G9a による複合体形成の解析

Runx2 発現ベクター、G9a 発現ベクターを co-transfection した 293 細胞を用いて、抗 Runx2 抗体による共免疫沈降法をおこなった。さらに、内源性分子同士の結合を調べるため 10T1/2 細胞を用いて、抗 Runx2 抗体を使った共免疫沈降法により解析をおこなった。

【実験 4】G9a の部分欠損変異体の作製とその機能解析

G9a の N 端欠損変異体、C 端欠損変異体を作製した。これらの変異体を用いて、【実験 1】のプロモーターアッセイと【実験 3】の免疫沈降法をおこない、どの部位が必要かを解析した。

4. 研究成果

【実験 1】293 細胞や 10T1/2 細胞に Runx2 と共に導入した Runx2 promoter-Luc および Osteocalcin promoter-Luc の活性は、G9a または ESET を co-transfection する事によってさらに増強された。このことから、G9a、ESET が Runx2 の転写活性化能を亢進する機能を持つ事が示唆された。

【実験 2】作出した WTpOB と G9aKOpOB を分化誘導培地で培養後 7 日の RNA で骨分化マーカーとして知られる alkaline phosphatase (Alp)、Osteocalcin (Oc)、Runx2 の発現を調べたところ、Alp と Oc の発現が KOpOB で抑制された一方で、Runx2 の発現には変動が認められなかった。このことから、G9a 欠損により Oc の発現を調節する Runx2 の機能が損なわれる事が示唆された。

【実験 3】まず、Runx2 と G9a を強制発現させた 293 細胞から、核タンパク質画分と細胞質タンパク質画分に分けて各分子の局在を調べたところ、Runx2 は速やかに核内へ移行する一方で、G9a は両画分に存在することが明らかになった。そこで、Runx2 発現ベクター、G9a 発現ベクターを co-transfection した 293 細胞の核タンパク質画分に対して、抗 Runx2 抗体による共免疫沈降法をおこなったところ、G9a と Runx2 の結合が認められた。また、10T1/2 細胞の核タンパク質画分に対しておこなった抗 Runx2 抗体による共免疫沈降法においても、G9a と Runx2 の結合が認められた。このことから、Runx2 と G9a が核内で複合体を形成していることが示唆された。

【実験 4】G9a の C 末端側には、ヒストンのメチル化修飾に必要な活性部位(SET ドメイン)がコードされている。そこで、G9a の N 端欠損変異体、C 端欠損変異体を作製し、Runx2 と結合するか、Runx2 の転写活性化能に影響をおよぼすか、を調べたところ、Runx2 との結合部位と転写活性化亢進に必要と考えられる領域が同じである事が明らかになった。

これらの結果をまとめると、ヒストンメチル化酵素 G9a は、骨芽細胞分化過程で重要な役割を持つ転写因子 Runx2 に結合し複合体を形成し、転写制御を調節する因子である可能性が示唆される。また、ESET については、当初 G9a flox/flox マウスと同時期に作出を目指していたが達成できなかったため、G9a の機能解析に注力してきた。しかし【実験 1】で G9a と同じく Runx2 の転写活性化亢進が認められており、今後も ESET の解析を続ける予定である。

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 6 件)

Kamiunten T, Ideno H, Shimada A, Arai Y, Terashima T, Tomooka Y, Nakamura Y, Nakashima K, Kimura H, Shinkai Y, Tachibana M, Nifuji A. Essential roles of G9a in cell proliferation and differentiation during tooth development. *Experimental Cell Research*, 2017,357(2):202-210, 査読有 doi:10.1016/j.yexcr.2017.05.016.

Ideno H, Nakashima K, Nifuji A. Roles of the histone methyltransferase G9a in the development and differentiation of mesenchymal tissues. *The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine*, 2015, 4(5):357-362, 査読有 doi:10.7600/jpfsm.4.357

Kamiunten T, Ideno H, Shimada A, Nakamura Y, Kimura H, Nakashima K, Nifuji A. Coordinated expression of H3K9 histone methyltransferases during tooth development in mice. *Histochemistry and Cell Biology*. 2015, 143(3):259-266. 査読有 doi: 10.1007/s00418-014-1284-0

[学会発表](計 10 件)

Hisashi Ideno, Koichiro Komatsu, Akemi Shimada, Yoshinori Arai,

Kazuhisa Nakashima, Makoto Tachibana, Hiroshi Kimura, Akira Nifuji, Histone methyltransferase G9a is essential for osteoblastic differentiation and skull bone formation during development, 2017 The American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2017 年

出野 尚、小松浩一郎、島田明美、新井嘉則、中島和久、荒木良子、安倍真澄、立花 誠、木村 宏、二藤 彰、ヒストンメチル化酵素 G9a の骨芽細胞分化における機能、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年

出野 尚、上運天太一、島田明美、中村芳樹、中島和久、木村 宏、立花 誠、二藤 彰、Essential roles of H3K9MTase G9a during tooth development、第 34 回日本骨代謝学会学術集会、2016 年

Hisashi Ideno, Koichiro Komatsu, Akemi Shimada, Taichi Kamiunten, Yoshinori Arai, Kazuhisa Nakashima, Ryoko Araki, Yoshiki Nakamura, Masumi Abe, Makoto Tachibana, Hiroshi Kimura, Akira Nifuji, Histone methyltransferase G9a is essential for osteoblastic differentiation and proliferation in vitro, and skull bone formation in vivo, 2015 The American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2015 年

Hisashi Ideno, Koichiro Komatsu, Akemi Shimada, Taichi Kamiunten, Yoshinori Arai, Kazuhisa Nakashima, Ryoko Araki, Yoshiki Nakamura, Masumi Abe, Makoto Tachibana, Hiroshi Kimura, Akira Nifuji, Deletion of G9a, histone methyltransferase, causes impaired bone formation, 2015 Australia and New Zealand Bone & Mineral Society, 2015 年

出野 尚、小松浩一郎、島田明美、上運天太一、新井嘉則、中島和久、荒木良子、中村芳樹、安倍真澄、立花 誠、木村 宏、二藤 彰、ヒストンメチル化酵素 G9a 欠損マウスは骨形成障害を示す、第 33 回日本骨代謝学会学術集会、2015 年

出野 尚、島田明美、上運天太一、和田悟史、小松浩一郎、立花 誠、荒木良子、中村芳樹、安倍真澄、中島和久、二藤 彰、ヒストンメチル化酵素 G9a による間葉系細胞の増殖と分化の調節、第 56 回歯科基礎医学会学術大会、2014 年

〔その他〕

ホームページ等

<https://rams.manage.spcloud.jp/perfman/teachers/profile/1382?code2=D01110&ref1=dental&ref2=find>

6．研究組織

(1)研究代表者

出野 尚 (IDENO, HISASHI)

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号：40435699