

骨組織特異的Zinc-Finger型 転写因子Osterixの機能解析

八田 光世 [北海道大学大学院歯学研究科/助手]

背景・目的

組織器官形成において細胞分化の方向性は様々なシグナル因子により誘導され、組織特異的遺伝子の発現へと進んでいく。最近、骨組織特異的に発現するZinc-Finger型転写因子Osterixがクローニングされ、マウス個体における骨形成に必須であることが報告された。しかしながら、骨芽細胞の核内環境での分子機能についての詳細はまだまだ明らかにされていない。

本研究はOsterixの転写因子機能の解析および発現制御遺伝子群の検索を進め、Osterixを介した骨芽細胞分化、骨形成分子メカニズムの解明を目指す。

内容・方法

【Osterix転写活性化領域の同定】

mouse Osterix遺伝子(cDNA)をクローニングし、Osterix full lengthおよびPCR法による各種deletion変異体をGAL4-DNA-binding domainと接続させた発現plasmidを作製した。Osterix発現plasmidとGAL4-binding sitesと接続させたルシフェラーゼレポーターplasmidを培養細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイによりOsterixの転写活性化最小領域を解析した。

【Osterixにより発現制御される遺伝子群の検索】

Osterix遺伝子をstableに過剰発現するSaOS2 細胞を樹立、親株細胞との発現遺伝子パターンを比較をRT-PCR法および網羅的遺伝子発現解析により検討した。

【Osterix相互作用因子の探索】

FLAG-tagを付加したOsterix発現plasmidを培養細胞に導入、αFLAG抗体を用いた免疫沈降法により核内Osterix複合体を解析した。

結果・成果

【Osterix転写活性化領域の同定】

マウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1 total RNAを用いてmouse Osterix遺伝子(cDNA)をRT-PCR法によりクローニングした。Osterix全長(a.a. 1-429) およびPCR法による各種deletion変異体(OST-A (a.a.1-141), OST-B (a.a. 140-280), OST-C (a.a. 280-429), OST-B1 (a.a. 140-210), OST-B2 (a.a. 210-280), OST-B3 (a.a. 170-250), OST-B4 (a.a. 140-250), OST-B5 (a.a. 170-280))をGAL4-DNA-binding domainと接続させた発現plasmidを作製した。GAL4-binding sitesと接続

させたルシフェラーゼreporter plasmidと各種発現plasmidを骨系培養細胞 (MG-63) に導入し、ルシフェラーゼアッセイにより転写活性化能を検討した。Osterix全長を3分割したOST-A, OST-B, OST-C領域を比較したところ、middle領域のOST-Bに強力な転写活性化能が確認された。さらに、OST-B領域をOST-B1からB5までのdeletion変異体を用いて解析したところ、プロリンリッチなOST-B1領域が転写活性化最小領域であることが明らかとなった。

さらにOST-B1領域の転写活性化能は各種組織由来動物細胞 (HeLa, 293T, HepG2, MG-63)および酵母細胞において機能することが確認された。

【Osterixにより発現制御される遺伝子群の検索】

G418耐性遺伝子を有したOsterix発現plasmidを作製し、薬剤選択によりOsterix遺伝子をstableに過剰発現するSaOS2 細胞 (f-Osterix SaOS2)を樹立した。f-Osterix SaOS2と親株SaOS2細胞(SaOS2)からRNAを抽出、発現遺伝子パターンの比較をおこなった。RT-PCR法により骨芽細胞特異的遺伝子群の発現について検討したところ、Osterix導入によりオステオカルシンmRNAの亢進が確認できたが、アルカリ性ホスファターゼmRNAの発現には影響がみられなかった。さらに網羅的遺伝子発現解析では、Osterix導入により発現亢進また抑制される遺伝子が多数検出された。

【Osterix相互作用因子の探索】

FLAG-tagを付加したOsterix発現plasmidを培養細胞に導入、αFLAG抗体を用いた免疫沈降法により相互作用因子の探索をおこなった。癌抑制遺伝子、核内構造変換因子が新規相互作用因子として確認された。

今後の展望

今後さらなる解析により、骨芽細胞の分化におけるOsterixの役割、分子機能範囲を明らかにしていきたい。細胞分化・特異的遺伝子発現はエピジェネティクに制御されている点からも、細胞核内(クロマチン)環境と発現遺伝子群の関連を統合的に解析することは基礎的な観点からも重要であり、興味深い知見が得られるものと考えられる。また、高齢化とともに問題となってきた骨粗鬆症、口腔領域では口蓋裂など先天性疾患や歯周病による歯槽骨の吸収など骨に影響を及ぼす疾患は数多く、骨再生による治療法の開発が望まれている。このような再生治療を目指すためにも、骨芽細胞分化、骨形成分子メカニズム理解は重要であり、本研究の意義、可能性もそこにあると考ええる。