

小守 寿人 論文内容の要旨

主 論 文

Dlx5 and Mef2 Regulate a Novel Runx2 Enhancer for Osteoblast-Specific Expression

Dlx5 と Mef2 は、新規 Runx2 エンハンサーを制御し骨芽細胞特異的発現を誘導する

川根徹也*、小守寿人*、Wenguang Liu、森石武史、宮崎敏博、森雅子、松尾友紀、高田美生、和泉伸一、Qing Jiang、西村理行、河井洋祐、小守壽文
(川根徹也*,小守寿人*:same contribution)

Journal of Bone and Mineral Research 2014 (in press)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：小守壽文教授)

緒 言

Runx2 は、骨芽細胞分化および軟骨細胞後期分化に必須な転写因子である。Runx2 発現の時間的空間的制御は骨格形成に重要であるが、Runx2 遺伝子の転写調節機構は、いまだ十分に解明されていない。Runx2 は、2つのプロモーター(P1, P2)によって、転写制御されている。そして、Runx2 の発現は、骨芽細胞ではその分化早期から検出され未熟骨芽細胞で上昇、軟骨細胞では未熟軟骨細胞では低く、その成熟とともに上昇する。本研究の目的は、骨芽細胞における Runx2 遺伝子発現制御領域を特定し、その活性化機構を明らかにすることである。

対象と方法

Runx2 遺伝子発現制御領域を特定するため、Runx2 ゲノム領域を含んだ 200kb の DNA 断片および 200kb を順次欠失させた DNA 断片を用い、GFP レポーターマウスを作製、胎生 16.5 日で GFP 発現パターンを解析した。特定した Runx2 エンハンサーを用い、ルシフェラーゼアッセイを行った。cDNA ライブラリーのスクリーニング、リアルタイム RT-PCR、ChIP アッセイ、EMSA、プルダウンアッセイを行い、エンハンサー活性化機構を解析した。

結 果

Runx2ゲノム領域200kbのDNA断片を用いたGFPレポーターマウスを作製、Runx2の発現パターンを再現できた。次に、200kbのDNA断片で、P1プロモーター上流を順次

欠失させたGFPレポーターマウスを作製、骨芽細胞での発現を欠落させる領域を特定した。この領域で様々な種間で塩基配列の相同性を検索、相同性の高い1.3 kb領域を見だし、その領域のGFPレポーターマウスを作製した。凍結切片でGFP発現パターンを解析、GFPは骨芽細胞のみに検出され、軟骨細胞や骨以外の組織では検出されなかった。さらに1.3kbを順次欠失させたDNA断片を用いたレポーターアッセイを行ったが、343 bpでも転写活性化能が維持された。この343 bpを用いたGFPレポーターマウスでも、骨芽細胞特異的にGFP発現を検出した。343bpを用いたレポーターアッセイでcDNAライブラリーのスクリーニングを行い、Cttnb1、Smad1、Sox5、Sox6、SP7をエンハンサー活性化分子として特定した。343 bp中の89bpでも高いレポーター活性を示し、これを用いたGFPレポーターマウスでも、骨芽細胞にGFP発現を検出した。この89bpにはホメオボックスモチーフとMef2結合配列が存在し、Dlx5とMef2は、343bpレポーターベクターを強く活性化、EMSAでDNA結合が確認された。プルダウンアッセイで、Tcf7、Cttnb1、Sp7、Smad1、Sox6は、Dlx5あるいはMef2に結合した。したがって、Dlx5とMef2は直接DNAに結合、蛋白-蛋白相互作用によって結合するTcf7、Cttnb1、Sp7、Smad1、Sox6とenhanceosomeを形成、エンハンサーを活性化していた。また、このホメオボックスモチーフとMef2結合配列の変異は、レポーター活性を強く抑制するだけでなく、GFPレポーターマウスの骨芽細胞での発現を消失させた。一方、初期培養骨芽細胞を用いて、ChIP法にて343bp領域に結合している転写因子、共役因子を同定した。Dlx5、Dlx6、Msx2、Mef2、Tcf7、Cttnb1、Smad1、Sox5、Sox6、SP7、p300、CBPが343bpエンハンサー領域に結合していた。未分化間葉系細胞では、ホメオボックスモチーフにMsx2が結合、エンハンサー活性を抑制、骨芽細胞ではDlx5に置き換わり、エンハンサーが活性化されていた。また、343bp領域では、エンハンサー特徴的クロマチン修飾（H2A.Z, H3K4me1, H3K4me2, H3K27ac）が検出された。

考 察

P1プロモーター上流20kbまでのDNA断片を用いたレポーターマウスを作製したが、骨芽細胞での発現を誘導することはできなかった。したがって、プロモーター領域以外に骨芽細胞発現を制御する領域が存在すると考えられた。今回特定した343bpは、骨芽細胞特異的発現を誘導し、Runx2の骨芽細胞特異的エンハンサーと考えられた。343bpのうち89 bpがコア配列で、Dlx5とMef2は直接DNAに結合し、蛋白-蛋白相互作用によって結合するTcf7、Cttnb1、Sp7、Smad1、Sox6とenhanceosomeを形成、骨芽細胞でのRunx2発現を制御すると考えられた。89bpのGFPレポーターマウスでは軟骨細胞に発現しなかったが、89bpを4個つなげたGFPレポーターマウスでは軟骨細胞に発現した。したがって、89bpのコアシークエンスに加え、他のエンハンサー要素が軟骨細胞でのRunx2発現に必要と考えられた。

(備考) ※日本語に限る。2000字以内で記述。A4版。