

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K18196

研究課題名(和文) G9aによるosteogenic frontの増殖と分化の制御

研究課題名(英文) Regulation of differentiation and proliferation at osteogenic front by G9a

研究代表者

出野 尚 (Hisashi, Ideno)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：40435699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はヒストンメチル化酵素G9aが細胞増殖関連遺伝子の統合的な発現制御機構を明らかにする事を目的とした。その結果、G9a欠損細胞ではRunx2発現が変動せず、Runx2制御のFgfrs(増殖関連遺伝子)、Osteocalcin(分化マーカー遺伝子)の発現が抑制される事、Fgfrs、Osteocalcinの転写調節領域にG9aとRunx2が共に結合する事、内在性のG9aとRunx2が結合する事、G9aがRunx2の転写活性化能を亢進する事、が明らかになった。以上から、G9aが前駆骨芽細胞の増殖・分化に関わる遺伝子の転写調節をつかさどるRunx2の転写制御複合体の一員である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒストンメチル化酵素G9aは元来、ヒストン H3、9番目リジン残基(H3K9)のモノメチル化(me1)とジメチル化(me2)を担うヒストン修飾酵素として同定された。さらにヒストン以外の機能性タンパク質のメチル化を担う事も報告されてきた。本研究では、G9aがRunx2による転写複合体に含まれており機能的な役割を担う、ヒストン修飾酵素以外の新たな点が示唆された。

研究成果の概要(英文)： In this study, we aimed to elucidate how histone methyltransferase G9a integrally regulates the expression of proliferation-related genes in osteoblast progenitors at the osteogenic front. We found that the expression of Runx2 was not altered, but the expression of Runx2-regulated Fgfrs (proliferation-related genes) and Osteocalcin (differentiation marker genes) was repressed in G9a-deficient cells. Both G9a and Runx2 bound to the transcriptional regulatory regions of Fgfrs and Osteocalcin, and endogenous G9a bound to Runx2, indicating that G9a enhanced the transcriptional activation of Runx2. These results suggest that G9a may be a member of the transcriptional regulatory complex of Runx2, which regulates transcription of genes involved in proliferation and differentiation of progenitor osteoblasts.

研究分野：分子生物学

キーワード：G9a Runx2 骨芽細胞分化 osteogenic front

1. 研究開始当初の背景

頭蓋冠は Osteogenic front と呼ばれる未分化間葉系骨芽細胞集団が増殖、増殖停止、骨芽細胞分化という秩序だてて進行によって形成される。一連の細胞機能の変化に関わる分子は、例えば Fgfr2 は前駆骨芽細胞増殖を、Fgfr1 は主に骨芽細胞の分化を調節する。Runx2 は骨芽細胞系譜特異的な遺伝子発現を誘導し骨芽細胞分化を調節する転写因子として知られる。Runx2 遺伝子の片アリルに生じた変異は頭蓋骨の頭頂部形成不全を示す。これに加えて Runx2 が CDK インヒビター-p21 の発現を調節する事から、Runx2 は細胞増殖へ抑制的に働く側面も持つ (Cancer Res 2003)。一般に、細胞増殖停止は細胞分化のみならず Senescence や Apoptosis の分岐点である。p21 の発現量の増加は細胞増殖停止からの Senescence への誘導を促進するとの報告からも、増殖から分化に至る過程では増殖停止に関わる遺伝子の発現量調節が重要と考えられる (EMBO Rep 2014)。即ち、細胞分化の進行には Senescence や Apoptosis を抑制する機構が必要であると考えられるが、Runx2 に Senescence を抑制する働きがあるかは不明である。また、Osteogenic front における骨芽細胞の増殖から分化にスイッチするダイナミックな分子制御機構は十分に明らかではない。エピジェネティック修飾の一つであるヒストン H3、9 番目リジン残基 (H3K9) のメチル化は遺伝子発現制御に関わる重要な修飾である。G9a は H3K9 のモノメチル化 (me1) とジメチル化 (me2) を担い、さらにはヒストン以外の機能性タンパク質のメチル化を担う事が報告されている。最近の報告では G9a とヘテロ二量体を形成し、G9a と相溶性の高い GLP が顎顔面異形成を伴う遺伝性疾患 Kleefstra 症候群の原因遺伝子である事が示された (Dev Biol 2014)。また、研究代表者は G9a が長管骨成長板の前肥大軟骨から骨化部位にかけて顕著な発現局在を示す事を報告している (Gene Exp patt 2013)。クロマチン構造を変化させ広範な遺伝子発現を統合的に調節するエピジェネティック修飾と発生や分化に関する知見は増えつつあるが、骨芽細胞分化における知見は少ない。研究代表者はこれまでの基礎的データからヒストンメチル化酵素 G9a が骨組織形成中に重要な役割を果たすと考えた。

2. 研究の目的

本研究ではヒストンメチル化酵素 G9a が Osteogenic front の骨芽細胞の増殖と分化を制御するとの仮説に基づき、前駆骨芽細胞が分化へ至る過程で G9a が細胞周期関連遺伝子の発現を統合的に制御する仕組みを明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

【実験 1】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 (WT-pOB) と G9a 欠損骨芽細胞 (KO-pOB) を作出した後、分化誘導培地にて 7 日間培養した各々の細胞における骨分化マーカー遺伝子および細胞増殖関連遺伝子の発現解析をリアルタイム PCR 法ならびに RT2 Profiler PCR Array (QIAGEN) を用いておこなった。

【実験 2】G9a 欠損マウスの作出とその頭蓋冠における遺伝子発現解析

G9a flox/flox; Sox9-Cre (cKO) マウスと G9a flox/+; Sox9-Cre (control) マウスを作出し、胎生 17.5 日胚の頭部冠状切片を用いた in situ hybridization (ISH) によって in vivo での発現解析をおこなった。

【実験 3】ゲノム上の Runx2 と G9a の局在解析

野生型マウスより作出した pOB を増殖培地で数日培養し、コンフルエントになる前でクロマチン抽出液を調製し、抗 G9a 抗体、抗 Runx2 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法 (ChIP) をおこなった。続いて、得られた DNA 断片に対して、Runx2 結合部位を挟むよう設計したプライマーで PCR (ChIP-PCR) をおこなった。

【実験 4】Runx2 と G9a による複合体形成の解析

内在性の分子同士が結合するか否かを調べるため間葉系幹細胞株 10T1/2 細胞を用いて、抗 G9a 抗体および抗 Runx2 抗体を使った共免疫沈降法 (co-IP) による解析をおこなった。

【実験 5】Runx2 の転写活性化能へ与える G9a の機能の検討

10T1/2 細胞を用いて、Runx2 による転写活性化が知られている 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。

4. 研究成果

【実験 1】

作出した WT-pOB と KO-pOB 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 の発現は KO-pOB 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。さらに、増殖関連遺伝子の中でも Runx2 が正に制御する Fgfr1、Fgfr2、Fgfr3 (Fgfrs) の発現を調べたところ、Fgfrs の発現は KO-pOB で抑制された。このことから、Oc や Fgfrs の上位に存在しそれらの発現制御に関わる Runx2 の機能が G9a 欠損により破綻する事が示唆された。

【実験 2】

E17.5 の cKO マウスと control マウスの頭部冠状切片を用いた ISH によって Oc、Fgfr2、Runx2 の発現を調べたところ、Osteogenic front を含む頭蓋冠での Oc、Fgfr2 の発現レベルが cKO マウスで低減した一方で、Runx2 の発現レベルには変動を認めず、*in vitro* と同様の結果が得られた。

【実験 3】

Oc や Fgfrs の発現制御領域に存在する Runx2 結合部位への G9a と Runx2 の結合を ChIP-PCR にて調べたところ、Runx2 の結合が認められた同じ部位にて G9a の結合も認められた。*in vitro* サンプル (E17.5 のマウス頭部冠) を用いた ChIP-PCR にも取り組んできたが、サンプリングできるクロマチン量が十分ではなく、少量クロマチンを用いる ChIP のプロトコールの確立が至らなかったため、cKO マウス頭部冠と control マウス頭部冠での比較はおこなえなかった。

【実験 4】

増殖培地で培養した 10T1/2 細胞から抽出した核タンパク質画分に対して、a) 抗 G9a 抗体による co-IP および b) 抗 Runx2 抗体による co-IP で得たタンパク質複合体を SDS-PAGE で解析した。a) で得たタンパク質複合体には Runx2 が、b) で得たタンパク質複合体には G9a が認められた。このことから、内在性の G9a と Runx2 は複合体を形成していることが示唆された。

【実験 5】

10T1/2 細胞に Runx2 と共に導入した Osteocalcin promoter-Luc の活性は、G9a を co-transfection する事でさらに増強された。一方、G9a mRNA を標的とした siRNA を co-transfection する事で Oc pro-Luc の活性が抑制された。このことから、Runx2 が転写活性化能を発揮するためには G9a が必要である事が示唆された。

これらの結果をまとめると、ヒストンメチル化酵素 G9a は、前駆骨芽細胞の増殖および分化のステップで多くの遺伝子の転写調節をつかさどる転写因子 Runx2 と直接結合して複合体を形成し、Runx2 による転写制御を調節する因子である可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ideno Hisashi, Nakashima Kazuhisa, Komatsu Koichiro, Araki Ryoko, Abe Masumi, Arai Yoshinori, Kimura Hiroshi, Shinkai Yoichi, Tachibana Makoto, Nifuji Akira	4. 巻 137
2. 論文標題 G9a is involved in the regulation of cranial bone formation through activation of Runx2 function during development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115332 ~ 115332
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bone.2020.115332	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 出野 尚、小松浩一郎、中島和久、新井嘉則、木村 宏、眞貝洋一、立花 誠、二藤 彰
2. 発表標題 G9aはRunx2の活性化を介してマウス頭蓋の骨形成を制御する
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 出野 尚、小松浩一郎、中島和久、新井嘉則、立花 誠、木村 宏、二藤 彰
2. 発表標題 G9aはRunx2の機能を調節してマウス頭蓋の骨形成を制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 出野 尚、小松浩一郎、中島和久、新井嘉則、立花 誠、木村 宏、二藤 彰
2. 発表標題 ヒストンメチル化酵素G9aによる骨芽細胞分化におけるRunx2の転写活性化能の制御
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 出野 尚、上運天太一、島田明美、寺島達夫、中島和久、友岡康弘、中村芳樹、木村 宏、立花 誠、二藤 彰
2. 発表標題 ヒストンメチル化酵素G9aはマウス歯胚の増殖と分化を制御する
3. 学会等名 第35回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ideno H., Kamiunten T., Shimada A., Terashima T., Nakashima K., Tomooka Y., Nakamura Y., Kimura H., Tachibana M., Nifuji A.
2. 発表標題 H3K9MTase G9a regulates tooth development in mice
3. 学会等名 第39回米国骨代謝学会 (ASBMR) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ideno H., Komatsu K., Shimada A., Arai Y., Nakashima K., Tachibana M., Kimura H., Nifuji A.
2. 発表標題 Histone methyltransferase G9a is essential for osteoblastic differentiation and skull bone formation during development
3. 学会等名 第57回米国細胞生物学会議 (ASCB) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------