原	著
---	---

Differential Display 法を用いた Osteogenic Protein-1 (OP-1) の骨形成作用に伴う細胞内シグナル伝達に関与する遺伝子の解析

小 山 治 彦

東京医科歯科大学歯学部口腔外科学第二講座 (主任・指導: 榎本昭二教授)

(1997 年 1 月 8 日 受付)

Analysis of Genes Implicated in Osteogenic Signaling by Osteogenic Protein-1 (OP-1) using Differential Display Method

Haruhiko Koyama

The Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Faculty of Dentistry,
Tokyo Medical and Dental University
(Chief and Director : Prof. Shoji Enomoto)

Bone morphogenetic proteins (BMPs), members of a transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily, are growth and differentiation factors which induce ectopic bone formation *in vivo*. Although many studies on osteoinductive properties of BMPs have been conducted, little is known about the downstream components in the signal transduction machinery, beyond the mechanism of BMP receptor activation.

In this study, the osteogenic effects by osteogenic protein-1 (OP-1, BMP-7) on osteoblastic cell line MC3T3-E1 and murine stromal cell line ST2 were investigated, especially focusing on differentially expressed genes induced by OP-1 using the differential display method.

The major findings were as follows :

- 1) Alkaline phosphatase specific activities of both MC3T3-E1 and ST2 increased in a dose-dependent manner by OP-1 stimulation.
- 2) Northern analysis showed a significant increase of osteocalcin mRNA after 7 days of OP-1 treatment.
- 3) 77 genes, which were differentially expressed in MC3T3-E1 and ST2 cells, were detected on differential display fingerprints after 16-hour treatment of OP-1.
- 4) Some of these clones showed high levels of identical to known genes.
- 5) One clone called ST3v, down-regulated in ST2 cells by OP-1 stimulation, was confirmed with quantitative RT-PCR.

I. 緒 言

骨形成タンパク質 (Bone Morphogenetic Pro-

tein, BMP) は, *in vivo* において異所性に骨形成を誘導するタンパク性因子として, 1965 年に Urist によりその存在が提唱された¹⁾. 1988 年に

Wozney らによりその遺伝子がクローニングされて以来²⁾, 現在までに類似の骨形成タンパク質である BMP-1 から BMP-13 までが同定されているが, BMP-1 を除く BMP-2 から BMP-13 は, 細胞の増殖や分化に関与する TGF- β (Transforming Growth Factor- β) スーパーファミリーの一員であり, 骨の発生や成長に重要な役割を果たすと同時に, 初期胚における中胚葉誘導や体軸の決定など, 多様な生物学的作用を有する因子である。BMP の骨形成作用に着目すると, 異所性骨形成活性を有するリコンビナント BMP は, BMP-2, BMP-4, そして Osteogenic Protein-1(OP-1, BMP-7) を含めて合計 6 種が存在し³⁾, 臨床においても骨折や骨欠損の治療, および顎骨再建への応用をはじめとして, リコンビナント BMP の口腔領域での臨床応用が期待されている。しかし, 近年 BMP に関する数多くの研究結果が報告されているにもかかわらず⁴⁾, その作用機序についてはいまだ解明されていない部分が多い。

BMP は TGF- β スーパーファミリーの各因子に共通する, セリン/スレオニンキナーゼ型の受容体を介して, 細胞内の核へシグナルを伝達していることが知られている⁵⁾。最近, ショウジョウバエにおける BMP-2 および BMP-4 の相合体である, decapentaplegic (dpp) の下流で機能しているタンパク質をコードする遺伝子として, 転写活性を有する Zn フィンガードメインを持つ転写因子をコードする *schurri* や⁶⁾, I 型受容体の下流でリン酸化され, 核内において機能するタンパク質をコードする *mothers against dpp* (*Mad*) などの遺伝子の存在が報告されている^{7,8)}。また, 骨芽細胞とその始原細胞を共有すると考えられる, 筋肉系の細胞の分化を制御する転写因子として, ヘリックス-ループ-ヘリックス (HLH) 型転写因子である Id⁹⁾, MyoD¹⁰⁻¹³⁾が知られているが, 骨芽細胞の分化を制御するような, 同様の転写調節因子はまだ確認されていない。BMP の作用機序を解明するためには, これらの転写因子をはじめとして, BMP 受容体の下流で機能し, カスケードを構成している各因子を同定することが重要である。

そこで著者は, このような転写因子やカスケードの各因子をコードする遺伝子をスクリーニングする目的で, Differential Display 法¹⁴⁾を用いた遺伝子のスクリーニングを行った。Differential Display 法は, 異なる種類または異なる状態の細胞の RNA から, アンカープライマーと任意プライマーを用いた RT-PCR (RT: reverse transcription, PCR: polymerase chain reaction)を行い, 細胞間における mRNA 発現の違いをシークエンスゲル上のパターン(フィンガープリント)によって比較する方法である。この方法は, 鋳型 cDNA の任意の位置にアニーリングするように設計された, 任意配列のプライマーを用いて PCR を行うことにより, およそ 100~500 bp の cDNA 断片を同時に増幅することが可能で, シークエンスゲルに電気泳動して展開することで得られたフィンガープリントのパターンは, 細胞に発現している mRNA とプライマーの組み合わせによって特異的であるとされている。このフィンガープリントのパターンを, 異なる遺伝子発現を示す複数の細胞間で比較することにより, 細胞間で発現量の異なる mRNA を検出し, さらにこれをプローブとして用いることによって, 遺伝子全長のクローニングを行うことが可能である。

従来このように特異的な発現パターンを指標にして遺伝子をクローニングする方法としては, 主としてサブトラクション法¹⁵⁾をはじめとするディファレンシャルスクリーニングが用いられてきたが, サブトラクション法は手技的に煩雑であり, ある程度熟練した技術を要する方法であった。Differential Display 法の利点としては, PCR という比較的単純かつ簡便な方法を用いることにより, 1 回の実験で数 100 種類の mRNA をフィンガープリントとして視覚化できることである。

本実験ではマウスの頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞株である MC 3 T 3-E 1 細胞と, マウスの骨髄ストローマ細胞株である ST 2 を培養細胞として用い, この細胞に OP-1 (BMP-7) を作用させたときに, 骨芽細胞のマーカーである alkaline phosphatase (ALPase) 活性, および osteocalcin

(オステオカルシン) mRNA 発現量が増加することを示した。次に Differential Display 法を用いて、OP-1 を作用させたときにこれらの細胞で発現量の変化する mRNA を検出することによって、BMP の骨形成作用に伴う細胞内シグナル伝達経路に関与する可能性のある遺伝子の解析を行った。

II. 材料および方法

1. 細胞の培養

マウス骨芽細胞様細胞株 MC 3 T 3-E 1 細胞は、小玉博明博士より供与されたものを使用した。マウス骨髄ストローマ細胞株 ST 2 細胞は、理化学研究所セルバンクより購入した細胞 (cell No. RCB 0244) を使用した。

培養細胞を 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL) および抗生物質としてペニシリン G カリウム (100 U/ml, 明治製菓), ストレプトマイシン (100 μ g/ml, Gibco BRL) を添加した α -Minimum Essential Medium (α -MEM, Gibco BRL) 培地を用いて、直径 10 cm のシャーレ (Falcon) に 2×10^4 cells/cm² の割合にて播種し、37°C, 5% CO₂ の条件で培養を行った。培地は 3, 4 日に 1 回の割合で交換し、細胞が 80% の飽和密度になった時点で継代培養を行った。

2. Alkaline phosphatase (ALPase) 活性の測定

12 穴プレート (住友ベークライト) に播種した培養細胞が、それぞれ 90% の飽和密度になった時点で、培地を完全に交換し、50% ethanol/0.1% trifluoroacetic acid に溶解したりコンビナント OP-1 (T. K. Sampath 博士より供与された) を、それぞれ最終濃度が、0, 5, 10, 50, 100, 200 ng/ml になるよう添加し、培養を行った。7 日目に培地を完全に除き、4°C に冷却した tris buffered saline 溶液 (TBS 溶液: 10 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) にて 2 回洗った後、1% Triton X-100 を含む TBS 溶液を 500 μ l 添加し、ピペッティングによりホモジナイズを行った。4°C, 15,000 rpm にて 5 分間遠心分離を行った後、上清を酵素溶液とした。

各試料の ALPase 活性については、p-nitro-phenyl phosphate (PNPP) を基質として、上記酵素溶液によって生成された p-nitrophenol (PNP) の量を 405 nm における吸光度を測定することにより表した。試料中のタンパク質量は、BCA Protein Assay kit (Pierce) により、536 nm の吸光度を測定した後、ウシ血清アルブミン (BSA, Sigma) を用いて作成した標準曲線からタンパク質量を求めた。ALPase 活性は、上記の測定値を用い、各試料についてタンパク質量当たり 1 分間で生成された PNP モル量に換算することによって算出した¹⁶⁾。

3. ノーザンブロッティングによるオステオカルシン発現量の分析

1) RNA の抽出

2 枚の 10 cm シャーレに播種した培養細胞が、それぞれ 90% の飽和密度になった時点で、培地を完全に交換した後、OP-1 を 100 ng/ml の濃度で実験群の細胞に添加し、7 日間培養を行った。また OP-1 を含まない溶解液のみを添加したものを対照群として培養を行った。

培養細胞からの total RNA の抽出は、AGPC 法¹⁷⁾に従い、RNA 抽出液として RNAsol B (Biotecx laboratories) を用いて行った。得られた total RNA は、diethyl pyrocarbonate (DEPC) で処理した超純水 (ミリ Q 精製水, Millipore) に溶解した。分光光度計 (Beckman, DU-64) を用い、この RNA 溶解液の 260 nm, および 280 nm における吸光度を測定し、総 RNA 量と RNA の純度の算出を行った。

2) ³²P 標識プローブの調製

³²P 標識プローブは、Ready-to-go DNA Labeling Kit (Pharmacia) を用い、マルチプライム法により調製を行った¹⁸⁾。調製した反応液は、Sephadex G-50 (Pharmacia) スピニングカラム (Boehringer mannheim) にてろ過を行い、³²P 標識されたプローブを精製した。

3) ノーザンブロッティング

OP-1 を 7 日間作用させた細胞と対照群の細胞からそれぞれ抽出した RNA 20 μ g ずつを、1.2%

アガロースゲル上に電気泳動した後、ナイロンメンブレン (Biorad, zeta-probe membrane) に 16 時間ブロッティングを行った。メンブレンを UV クロスリンカー (Spectronics) にて UV 処理し、RNA の固定を行った。ハイブリダイゼーション溶液は、50% formamide, 0.12 M Na_2HPO_4 (pH 7.2), 0.25 M NaCl, 7% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM EDTA を混合して調製した。43℃ にて 16 時間プレハイブリダイゼーションを行った後、 ^{32}P 標識プローブを添加したハイブリダイゼーション溶液に交換し、43℃ にて 16 時間振盪しながらハイブリダイゼーションを行った。メンブレンを 2×standard saline citrate (SSC: 0.3 M NaCl, 0.03 M クエン酸ナトリウム)/0.1% SDS 溶液、続いて 0.5×SSC/0.1% SDS 溶液にて洗浄を行った後、0.1×SSC/0.1% SDS 溶液にてそれぞれ 15 分間洗浄を行った。メンブレンを BAS-III 富士イメージング・プレート (富士写真フイルム) に対して室温で 6 時間露光を行い、バイオイメージングアナライザー BAS 2000 (富士写真フイルム) にて解析した後、X 線フィルム (Kodak, XRP-1) に -80℃ にて 16 時間露光し、現像を行った。

4. Differential Display 法によるスクリーニング

1) RNA の調製

OP-1 を 16 時間作用させた細胞および対照群の細胞から、先に示した方法によって抽出した total RNA を用いた。また、DNase I (GenHunter, MessageClean kit) によって、RNA 抽出の過程で混入した染色体 DNA の消化を行った。

2) アンカープライマーを用いた cDNA の合成

Differential Display 法は、原法を改良した RNA map kit (GenHunter) を用いて行った¹⁹⁾。

4 本の 0.2 ml/PCR チューブ (Perkin Elmer) に ミリ Q 精製水を 9.4 μl , 5×reverse transcription buffer を 4 μl , 250 μM dNTP を 1.6 μl , total RNA (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 2 μl を混合した反応液を用意し、各チューブに 4 種類の 10 μM anchored

primer (アンカープライマー, T_{12}MN オリゴ dT プライマー, T_{12}MG , T_{12}MA , T_{12}MT , T_{12}MC ; M は A, G, C の混合物) 2 μl をそれぞれ添加した。サーマルサイクラー (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 9600) を用いて、65℃ を 5 分, 37℃ を 60 分, 95℃ を 5 分に設定し、37℃ で 10 分経過した時点で 1 μl の MMLV 逆転写酵素を各チューブに添加し、逆転写反応を行った。

3) 任意プライマーとアンカープライマーによる PCR

次に上記の逆転写反応液を鋳型として、鋳型 cDNA の任意の位置にアニーリングする arbitrary primer (任意プライマー, AP プライマー) を用いて、 $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]$ -dATP の存在下で PCR を行うことにより、3'側ポリ A 末端からおおよそ 100~500 bp の種々の長さの cDNA 断片を増幅すると同時に、アイソトープ標識を行った。

0.2 ml/PCR チューブに ミリ Q 精製水を 9.2 μl , 10×PCR buffer を 2 μl , 25 μM dNTP を 1.6 μl , 任意プライマーを 2 μl , 逆転写反応液を 2 μl , 10 μM アンカープライマー (逆転写反応液と同じ種類のプライマーの組み合わせで用いた) を 2 μl , $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]$ -dATP (1,200 Ci/mmol) を 1 μl , そして Taq DNA polymerase (宝酒造) 0.2 μl を混合し、PCR 反応液を調製した。反応液をサーマルサイクラー (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400) を用いて 94℃ を 30 秒, 40℃ を 2 分, 72℃ を 30 秒を 1 サイクルとして計 40 サイクル反応を行った。

4) シークエンスゲルを用いた電気泳動

PCR を行った各試料のうち 3.5 μl に 2 μl の loading dye (GenHunter) を添加し、80℃ で 2 分間処理した後、6% シークエンスゲル (Gibco BRL, Gel-Mix 6) 上にシークエンシング電気泳動装置 (OWL, model # S 3 S) を用いて 1,200 V 定電圧にて約 3 時間電気泳動を行った。

シークエンスゲルはろ紙を貼付してゲルドライヤー (Biorad, model 538) を用いて乾燥し、BAS-III 富士イメージング・プレートに対して室温にて 16 時間露光を行った。イメージング・プレートを

BAS 2000 にて解析した後, X 線フィルムに -80°C にて 72 時間露光し, オートラジオグラフを行った。

5) cDNA 断片の抽出と増幅

乾燥したシーケンスゲルから, 対照群と実験群を比較して明らかに差異を認めるバンドを切り抜き, マイクロチューブ中で $100\ \mu\text{l}$ のミリ Q 精製水に 10 分間浸した後, 15 分間煮沸し, 抽出を行った。3 M sodium acetate (NaOAc), 10 mg/ml glycogen, および 100% ethanol にてエタノール沈殿を行った後, $10\ \mu\text{l}$ のミリ Q 精製水に溶解した。

回収した cDNA を鋳型として, 最初に用いたものと同じ組み合わせのプライマーを用いて PCR 反応を行い, cDNA 断片を増幅した。

5. cDNA 断片のサブクローニングと塩基配列決定

Takara DNA ligation kit (宝酒造) を用い, クローニングベクター pBluescript SK(+) (T vector) の EcoR V 部位に cDNA 断片を組み込んだ。すなわちマイクロチューブに T vector を $0.5\ \mu\text{l}$, 再 PCR によって増幅した試料を $2.5\ \mu\text{l}$, ligation kit A 液を $10\ \mu\text{l}$, B 液を $2.5\ \mu\text{l}$, そして $5\times$ ligation buffer (500 mM Tris-HCl pH 7.6, 25 mM MgCl_2) を $3.9\ \mu\text{l}$ ずつ調製し, 16°C にて 12 時間反応を行った。

cDNA 断片の挿入されたプラスミド DNA を用いて, 塩化カルシウム法²⁰⁾にて作成した大腸菌株 JM 109 のコンピテント細胞に形質転換 (transformation) を行い, LB (Luria-Bertani medium)-Agar プレート上の白色の陽性クローンを採取し, 2 ml の LB 培地にて 37°C , 12 時間培養を行った後, アルカリ法²¹⁾にてプラスミド DNA の少量調製を行った。プラスミド DNA は, 制限酵素 EcoR I および Hind III にてインサートを切断した後, 4.5% ポリアクリルアミドゲルに展開し, サブクローニングした cDNA 断片の大きさを元の PCR 試料の大きさと比較, 検証を行った。

シーケンスゲルから回収し, サブクローニングされた cDNA 断片の塩基配列は, インサートの

入ったプラスミド DNA を, A. L. F. DNA Sequencer (Pharmacia) を用いて解析することによって決定した。

6. ノーザンブロッティングによる検証

サブクローニングした cDNA 断片を用い, 上記の方法によって, ^{32}P 標識プローブの調製を行った。

また, 上記の方法では標識の効率が低く, 困難な場合は, PCR を用いて ^{32}P 標識プローブを調製した²²⁾。すなわち, 0.2 ml PCR チューブに cDNA 試料を $1\ \mu\text{l}$ ($1\ \text{ng}/\mu\text{l}$), $10\times$ PCR buffer を $2\ \mu\text{l}$, プライマーを各 $0.5\ \mu\text{l}$, 4 mM dATP/dTTP/dGTP mixture を $1\ \mu\text{l}$, Taq DNA polymerase を $0.2\ \mu\text{l}$, そして $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ を $14.8\ \mu\text{l}$ ($150\ \mu\text{Ci}$) 取り, 94°C を 1 分, 55°C を 1 分, 72°C を 3 分を 1 サイクルとして, 計 35 サイクルの PCR を行った。PCR 後の反応液は, Sephadex G-50 スピナラムにてろ過を行い, ^{32}P 標識されたプローブを精製した。

ノーザンブロッティングは, 対照群の細胞および OP-1 を 16 時間作用させた実験群の細胞から抽出された total RNA を用いて行った。また polyA Tract mRNA isolation systems (Promega) を用いて total RNA から抽出した mRNA を用い, 同様にノーザンブロッティングを行った。

7. 定量的 RT-PCR を用いた mRNA 発現量の比較

1) cDNA テンプレートの合成

Superscript Preamplification System (Gibco BRL) を用い, oligo (dT) 12~18 mer によって cDNA の合成を行った。まず対照群と実験群から抽出した total RNA $5\ \mu\text{g}$ に, oligo (dT) 12~18 mer ($0.5\ \text{mg}/\mu\text{l}$) を $1\ \mu\text{l}$ 添加し, DEPC 処理蒸留水にて全量 $12\ \mu\text{l}$ として, 70°C にて 10 分間放置した後, 氷上 (4°C) にて急冷を行った。 $10\times$ PCR buffer を $2\ \mu\text{l}$, 25 mM MgCl_2 を $2\ \mu\text{l}$, 10 mM dNTP を $1\ \mu\text{l}$, 0.1 M DTT を $2\ \mu\text{l}$ を混合し, 上記のサンプルに添加し, 42°C にて 5 分間放置した後, Superscript II RT reverse transcriptase を

1 μ l (200 units) 添加し、42℃にて 50 分間放置した。70℃にて 15 分間放置した後、氷上 (4℃) にて 5 分以上放置してから、RNase H を 1 μ l 加え、37℃にて 20 分間放置し、RNA を分解した。

2) プライマーの設計と合成

プライマーの設計は、先に決定した塩基配列から、GC 含有量と Tm 値を考慮し、また極端なヘアピン構造やプライマーどうしのアニーリングを避け、およそ 200 から 300 bp の DNA フラグメントを合成しうるような塩基配列を選択して、20 塩基のセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーを設計した。

設計したオリゴヌクレオチドは、サワディー・テクノロジーに合成を依頼し、入手した。

3) PCR による DNA 合成

上記に従って合成された cDNA テンプレート、センスプライマーおよびアンチセンスプライマー、および Taq DNA polymerase (5,000 U/ml, Pharmacia Biotech) を用いて、サーマルサイクラーにて 94℃を 30 秒、55℃を 30 秒、72℃を 30 秒を 1 サイクルとして計 25 サイクルの PCR 反応を行った。

PCR 産物は DNA 分子量マーカー (宝酒造) と

ともに、Tris-borate, EDTA buffer (TBE) を泳動バッファーとする 4.5~10%ポリアクリルアミドゲル上に、100 V 定電圧で 30 分間電気泳動を行った。

泳動を行ったゲルは、0.5 μ g/ml の ethidium bromide にて染色を行った後、蒸留水にて脱色し、紫外線を用いて PCR 産物の分子量を確認した。

III. 結 果

1. ALPase 活性およびオステオカルシン mRNA 発現量

本研究で用いた 2 種類の培養細胞の ALPase 活性に対する OP-1 の作用を図 1 に示す。図 1-A に示すごとく、MC 3 T 3-E 1 細胞の ALPase 活性は OP-1 の濃度依存的に上昇し、160 ng/ml の濃度で対照群に比較して約 4 倍の活性を示した。同様に図 1-B は、ST 2 細胞の ALPase 活性を調べた結果を示すが、ST 2 細胞の ALPase 活性は、OP-1 を作用させることにより濃度依存的に増加し、200 ng/ml の濃度で対照群に比較して約 10 倍の活性値まで上昇した。

次に ALPase 活性と同じく骨組織のマーカー

図 1 MC 3 T 3-E 1 細胞と ST 2 細胞の ALPase 活性に対する OP-1 の作用

A : MC 3 T 3-E 1 細胞の ALPase 活性, B : ST 2 細胞の ALPase 活性 (平均値 $\pm$ S. D., n=4,

* : $p < 0.05$)

として知られるオステオカルシンについて、mRNA の発現を調べた。図 2-A は MC 3 T 3-E 1 細胞に OP-1 を作用させた実験群および対照群について、オステオカルシン cDNA をプローブとしたノーザンブロットングを行った結果を示す。対照群に比較して、実験群ではオステオカルシンの mRNA 量が顕著に増加していることがわかった。同様に図 2-B は、ST 2 細胞についてノーザンブロットングによる分析を行った結果を示すが、実験群のオステオカルシンの mRNA 発現量は、対照群に比較して明らかに増加していた。

2. Differential Display 法による mRNA 発現量の比較

MC 3 T 3-E 1 細胞および ST 2 細胞の 2 種類の細胞について、対照群と OP-1 を 16 時間作用させた実験群から total RNA を抽出した。これらの RNA について、アンカープライマーを用いて逆転写を行った後、アンカープライマーを 4 種類、

図 2 オステオカルシン RNA のノーザンブロットングによる分析

A : MC 3 T 3-E 1 細胞, B : ST 2 細胞について、対照群および 100 ng/ml の OP-1 を 7 日間作用させた細胞から抽出した total RNA を用いた。

左のレーン：対照群の細胞から抽出した total RNA によるブロットング

右のレーン：OP-1 を作用した細胞から抽出した total RNA によるブロットング

任意プライマーを 20 種類用いることによって、合計 320 とおりの組み合わせで PCR 反応を行い、cDNA 断片として増幅した。図 3 はこれらの 100~500 bp の種々の長さの PCR 産物をシーケンスゲル上に展開し、フィンガープリント上の各バンドとして展開したものを示す。図 3-A, -C には、OP-1 を添加した細胞に特異的に発現しているバンド、図 3-B, -D には対照群の細胞に発現しているが、OP-1 を添加することにより、その発現量が減少または消失するバンドをそれぞれ矢頭で示した。

これらのバンドを露光したフィルム上で詳細に解析、比較を行った結果、MC 3 T 3-E 1 細胞について 66 種類、ST-2 細胞について 11 種類の計 77 種類のバンドに関して、明らかに差異を認めた。表 1 はこれらのバンドの PCR プライマーの組み合わせ、および OP-1 を作用したときに up-regulate される (mRNA 発現が増加する) バンドか、down-regulate される (mRNA 発現が減少する) バンドであるかについてまとめたものである。合計 77 種類のバンドのうち、約 1/3 が OP-1 を添加したときに発現の減少するバンドであった。

3. cDNA 断片の塩基配列とホモロジー検索

Differential Display 上で差異を認めるバンドをゲルから抽出し、最初に用いたものと同じプライマーの組み合わせで PCR によって再増幅を行った。いくつかのサンプルでは十分な増幅が得られなかったため、2 回目の再増幅を行った。5% ポリアクリルアミドゲル上で、再増幅された cDNA 断片の長さとの元のバンドの長さを比較し、同一の cDNA 断片が合成されていることを確認した。

再増幅した cDNA 断片を T vector の EcoR V サイトに挿入し、大腸菌に形質転換することによってサブクローニングを行った。その際、再増幅の段階で増幅量の少ないもの、cDNA 断片の長さが短いものは T vector によるサブクローニングが困難であったが、繰り返し施行することにより、すべての試料についてサブクローニングを行うことができた。

図3 シークエンスゲルに展開した cDNA 断片

A: MC 3 T 3-E 1 細胞について OP-1 の作用で発現が増加するバンド, B: 同じく発現が減少するバンドを示す。

C: ST 2 細胞について OP-1 の作用で発現が増加するバンド, D: 同じく発現が減少するバンドをそれぞれ示す。なお, ST 2 細胞については再現性のないバンドを除外するため, 二重に PCR 反応を行った。

表1 Differential Display 法で差異を認めた cDNA 断片

A: MC 3 T 3-E 1 細胞において差異を認めた cDNA 断片

B: ST 2 細胞において差異を認めた cDNA 断片

sample: cDNA 試料に付けたサンプル名, T₁₂MN: アンカープライマーの種類 (T₁₂MG, T₁₂MT, T₁₂MC, T₁₂MA の 4 種類), AP: 任意プライマーの種類 (AP-1~20), up/down: OP-1 の作用によって発現が増加するもの (up-regulate) および減少するもの (down-regulate) を表す。

A. MC 3 T 3-E 1

	sample	T ₁₂ MN	AP	up/down
1	MC 4	T ₁₂ MG	7	up
2	MC 5	T ₁₂ MG	7	up
3	MC 6 v	T ₁₂ MG	8	down
4	MC 7 v	T ₁₂ MG	8	down
5	MC 8 v	T ₁₂ MG	8	down
6	MC 9 v	T ₁₂ MG	8	down
7	MC 10 v	T ₁₂ MG	8	down
8	MC 11 v	T ₁₂ MG	8	down
9	MC 12 v	T ₁₂ MG	10	down
10	MC 13 v	T ₁₂ MG	10	down
11	MC 14 v	T ₁₂ MG	10	down
12	MC 15 v	T ₁₂ MG	10	down
13	MC 16	T ₁₂ MG	10	up
14	MC 17	T ₁₂ MG	10	up
15	MC 18	T ₁₂ MG	10	up
16	MC 19 v	T ₁₂ MT	6	down
17	MC 20	T ₁₂ MT	6	up
18	MC 21 v	T ₁₂ MT	8	down
19	MC 22 v	T ₁₂ MT	8	down
20	MC 23 v	T ₁₂ MT	8	down
21	MC 24	T ₁₂ MT	8	up
22	MC 25	T ₁₂ MT	8	up
23	MC 26	T ₁₂ MT	8	up
24	MC 27 v	T ₁₂ MT	9	down
25	MC 28 v	T ₁₂ MT	9	down
26	MC 29	T ₁₂ MT	9	up
27	MC 30	T ₁₂ MT	9	up
28	MC 31 v	T ₁₂ MT	10	down
29	MC 32	T ₁₂ MT	10	up
30	MC 33	T ₁₂ MT	10	up
31	MC 34 v	T ₁₂ MC	6	down
32	MC 35	T ₁₂ MC	6	up
33	MC 36	T ₁₂ MC	6	up
34	MC 37	T ₁₂ MC	7	up
35	MC 38	T ₁₂ MC	7	up
36	MC 39	T ₁₂ MC	7	up
37	MC 40 v	T ₁₂ MC	8	down
38	MC 41 v	T ₁₂ MC	8	down
39	MC 42 v	T ₁₂ MC	8	down

40	MC 43 v	T ₁₂ MC	8	down
41	MC 44	T ₁₂ MC	8	up
42	MC 45	T ₁₂ MC	9	up
43	MC 46	T ₁₂ MC	9	up
44	MC 47	T ₁₂ MC	9	up
45	MC 48	T ₁₂ MC	9	up
46	MC 49	T ₁₂ MC	9	up
47	MC 50	T ₁₂ MC	10	up
48	MC 51	T ₁₂ MC	10	up
49	MC 52	T ₁₂ MC	10	up
50	MC 53 v	T ₁₂ MA	6	down
51	MC 54	T ₁₂ MA	6	up
52	MC 55	T ₁₂ MA	6	up
53	MC 56	T ₁₂ MA	6	up
54	MC 57	T ₁₂ MA	6	up
55	MC 58	T ₁₂ MA	6	up
56	MC 59	T ₁₂ MA	6	up
57	MC 60	T ₁₂ MA	6	up
58	MC 61	T ₁₂ MA	6	up
59	MC 62	T ₁₂ MA	6	up
60	MC 63	T ₁₂ MA	6	up
61	MC 64	T ₁₂ MA	8	up
62	MC 65	T ₁₂ MA	8	up
63	MC 66 v	T ₁₂ MA	9	down
64	MC 67	T ₁₂ MA	9	up
65	MC 68	T ₁₂ MA	9	up
66	MC 69 v	T ₁₂ MA	10	down

B. ST 2

	sample	T ₁₂ MN	AP	up/down
1	ST 1	T ₁₂ MG	5	up
2	ST 2	T ₁₂ MT	5	up
3	ST 3 v	T ₁₂ MG	6	down
4	ST 4	T ₁₂ MA	6	up
5	ST 5	T ₁₂ MT	9	up
6	ST 6	T ₁₂ MC	6	up
7	ST 7	T ₁₂ MC	7	up
8	ST 8	T ₁₂ MG	11	up
9	ST 9 v	T ₁₂ MG	15	down
10	ST 10 v	T ₁₂ MA	11	down
11	ST 11	T ₁₂ MT	19	up

このようにして得られたプラスミド DNA を用いて, cDNA 断片の塩基配列が決定した。図 4 に 77 種類のクローンの塩基配列のうちの一部を示す。斜体部分は Differential Display 法に用いた任意プライマーの塩基配列を, 下線は定量的 RT-

PCR を行うために設計したプライマーの位置を表す。

次に今回得られた cDNA 断片が, 現在までに報告されている既知の DNA 配列と一致するか, あるいは高い相同性を示す塩基配列が存在するかを

AP-6

ST3v 5' *GCAATCGATG* GCTACACCACTGTGGATTTGGGCGCAAGATATAAAACC
(298 bp) CAACTTGCGGGTAAAGCAGTCACGCTCAAAGGGGTGATTGCTAACGTCAC
CGATAAAGACTACTGGTCATCGGTGGGCGGTTATGAAAATACGGCAGGTG
ACAACGGTGCAGGTTATCTTACCTTAGGTGAGCCACGCACATTGAAGCTG
TCAGCGACCTTTGATTTTTAATTTTACCCATTGTTATCGTTTGCCATCGG
ATAAAGCTTGCTTTGTCCGATTTTTATTTGAGACTGCCAAAAAAAAAAAAA 3'

AP-8

MC10v 5' *GGATTGTGCG* TCTACTGGTGGGAGAATGTGAGGACCCCAGGGTGCAGT
(169 bp) GTTCCTGGCCCAGATGGCCCCTGCTGGCTATTGGGTTTTAGTTTGCAGTC
ATGTGTGCTTCCCTGTCTTATGGCTGTATCCTTGTTATCAATAAAATAT
TTCCTGGGCCAAAAAAAAAAAAA 3'

MC12v 5' AACACCAGTGTTAGCTTACTCTTAATAATGTCTGGTGTGTTGTCATGGTGA
(294 bp) AACTATAACTATCGCAGTGCAGGAGAACGCGCGGACGTTCTCAGAACGCG
CCTCTGTGCTTTCTTGTCATGTTATGCAGTGAAAATATTTTTAAGGTCTA
ATCAAGTGATTTTTTCCCCCCTTCCGTTTCGCTAAGGAATTATTT
CGCACACGGACATTCTTAGCAGTTTCCTCAGTGDTGGAATATTCATGAA
TGTGAGGTAATTATGTAGCCGTCGTACATTGAGCAAAAAAAAAAAAA 3'

AP-6

MC34v 5' *GCAATCGATG* TGGAGCAGGGGCGAGACCAGGACCTTCCTGCTGGACGGC
(249 bp) GATGAAGTCATCATAACAGGTCACTGCCAGGGGGACGGCTACCGTGTTGG
CTTTGGCAGTGTGCTGGGAAAGTGTGCTGCCTGCCCTTTCACCAGCCTGAAG
CTCCGGAAGTCACAAGACACACCCTTGCTTATGAGGATCATGCTACCAC
TGCATCAGTCAGGAATGAATAAAGCTACTTTGATTGTGGGAAAAAAAAAAAA
A 3'

図 4 得られたクローンの塩基配列

斜体部分は任意プライマーの塩基配列を示す。ST 3v については, 下線部に RT-PCR のプライマーの設計に用いた部位を示す。

表2 得られた cDNA クローンと高い相同性を示す既知の遺伝子
DNA データベース検索は GENETYX-MAC/CD version 24.0.0, データベースは EMBL-GDB Rel. 37 による。

cDNA クローン	DNA データベースから検出された相同体 (アクセッション番号)	塩基配列の相同性
MC 10 v	Mouse mRNA for ubiquitin like protein (D 10918)	99.3%
MC 12 v	Rat mRNA for 14-3-3 protein gamma subtype (D 17447)	93.7%
MC 34 v	M. musculus mRNA for fumarylacetoacetase (S 45631)	99.2%
ST 4	Mouse fumarylacetoacetate hydrolase mRNA (M 84145)	99.0%

調べるため、DNA データベース検索ソフトである GENETYX-MAC(version 24.0.0, SDC ソフトウェア開発)を用いて塩基配列のホモロジー検索を行った。その結果、4 種類の既知の遺伝子と高い相同性を示す塩基配列を含む cDNA が存在した(表2)。しかし、ほかのほとんどの塩基配列については、現在までに報告されていない未知のものであった。

4. 得られた cDNA 断片の検証

Differential Display 法のフィンガープリント上で差異を示す cDNA 断片について、実際に対照群と実験群の細胞において mRNA の発現量に差異があることを確認するために、ノーザンブロッティングによる分析を行った。ただし、77 種類すべてについてノーザンブロッティングを実施するのは困難であるため、今回は得られた試料のうち、ST 2 細胞の試料については 11 種類全部、MC 3 T 3-E 1 細胞については、フィンガープリント上で大きな差異を認める 12 種類について検証を行った。cDNA 断片の³²P 標識を行う際に、大きさが 100~300 bp 程度の cDNA 断片で、マルチプライム法では効率が極端に低下する場合があったため、PCR を用いた標識法を併用した。また、total RNA を用いたノーザンブロッティングでは検出できなかったものについては、mRNA を用いて検証を行った。その結果検証した試料のうち、ほとんどが mRNA の発現の水準に明らかな差異を認めなかった(図 5-A)。一部の試料についてはやや差異を認めるか、または不鮮明なバンドとなり、

ノーザンブロッティングでは検出することが困難であった(図 5-B)。

そこでこれらの試料のうち、ST 2 細胞から得られたクローンの全種類、および MC 3 T 3-E 1 細胞から得られたクローンのうち、特にフィンガープリント上で顕著な差異を認め、ノーザンブロッティングによる分析によって判別することのできなかったものについて、RT-PCR 法を用いた mRNA の定量的比較²³⁾を試みた。使用するプライマーは、試料の cDNA 塩基配列から、特異的な cDNA 断片を増幅しうるように設計を行った。また PCR のサイクル数は増幅がプラトーに達しない 20~30 サイクルの範囲に設定した。その結果ほとんどの試料では mRNA の発現量に差異を認めなかったが(図 6-B)、ST 2 細胞から得られた試料 ST 3 v について、明らかに差異を認めるデータを得ることができた(図 6-A)。このデータは ST 2 に OP-1 を作用した際に、mRNA の発現量が減少することを示していた。確認のために GAPDH を増幅するプライマーを用いて、同条件で同じ鋳型 cDNA を増幅した結果、対照群と実験群の GAPDH の mRNA 量に差異を認めなかった。

IV. 考 察

1. OP-1 の作用により発現量の変化する遺伝子

BMP は *in vivo* において異所性の骨形成を誘導する因子として知られている³⁾。その骨誘導作用は、細胞膜の受容体に BMP が結合し、細胞内の核にシグナルが伝達されることによって発現し、

図5 ノーザンブロッティングによる mRNA 発現量の比較

A: MC12v をプローブとして, MC3T3-E1 細胞について対照群と 100 ng/ml の OP-1 を 16 時間作用させた細胞の total RNA を用いた。

B: ST3v をプローブとして, ST2 細胞について対照群と 100 ng/ml の OP-1 を 16 時間作用させた細胞の total RNA を用いた。

左のレーン: 対照群の細胞から抽出した total RNA によるブロッティング

右のレーン: OP-1 を作用した細胞から抽出した total RNA によるブロッティング

図6 定量的 RT-PCR による mRNA 発現量の比較

A: ST3v および GAPDH のプライマーを用いた PCR

B: ST4 のプライマーを用いた PCR

左端のレーン: サイズマーカー, ϕ X 174/HAE III digest

中央のレーン: 対照群の mRNA にて RT-PCR を行ったもの

右端のレーン: 100 ng/ml の OP-1 を 16 時間作用した ST2 細胞の mRNA にて RT-PCR を行ったもの

未分化間葉系細胞を骨芽細胞に分化誘導すると考えられている²⁾。本研究ではこれらの過程のうち、特に受容体以降のシグナル伝達に注目し、それに関与する可能性のある遺伝子の解析を行った。

1) OP-1 の作用による骨芽細胞の形質発現の誘導

本研究で用いた培養細胞である MC3T3-E1 細胞は、マウスの頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞である。この細胞は、Vukicevic ら²⁴⁾により osteogenin (BMP-3) に反応して骨芽細胞の形質発現が誘導されることが示され、その後リコンビナント BMP-2 によって、骨芽細胞のマーカーで

あるアルカリフォスファターゼ (ALPase) 活性が顕著な増加を示す細胞であることが報告された²⁵⁾。また ST2 細胞は、マウスの骨髄由来のストローマ細胞であり、Yamaguchi らによってリコンビナント BMP-2, BMP-4, および BMP-6 を作用させることにより骨芽細胞の形質が発現することがつい最近報告された²⁶⁾。

本研究では、これらの細胞に対して異なる種類の BMP サブタイプである OP-1 (BMP-7) が同様の作用を有するかについて検討を行った。その結果、図 1 および 2 に示すように、MC3T3-E1 細胞と ST2 細胞は OP-1 の作用により、骨芽細胞

胞のマーカーである ALPase 活性が対照群に比較して明らかに上昇するとともに、成熟型の骨芽細胞に特異的に発現するとされているオステオカルシン²⁷⁾の発現量が、対照群に比較して顕著に増加した。これにより、OP-1 は MC 3 T 3-E 1 細胞と ST 2 細胞に作用して、骨芽細胞の形質発現を誘導することがわかった。また図 1 の結果から、MC 3 T 3-E 1 細胞では対照群の細胞でも、ある程度の ALPase 活性値を示しているが、ST 2 細胞では対照群の細胞はほとんど ALPase 活性を示さなかった。このことは、MC 3 T 3-E 1 細胞の骨芽細胞への分化程度がやや高いことを示しており、また ST 2 細胞については骨髄由来のストローマ細胞としての性質から考えても²⁶⁾、MC 3 T 3-E 1 細胞に比較してより未分化な細胞であると考えられる。したがって OP-1 は、すでに骨芽細胞に分化している細胞の骨芽細胞としての形質発現を増強するばかりでなく、より未分化な細胞に対しても骨芽細胞への分化を促進するものと思われる。

2) OP-1 の骨形成作用に伴う細胞内シグナル伝達

OP-1 はほかの BMP サブタイプと同様、TGF- β スーパーファミリーの一員として、細胞の分化、特に骨芽細胞の分化に密接に関連しており、骨組織の発生や成長に重要な役割を果たしている²⁸⁾。骨形成を誘導する BMP の作用機序の解明に関連して、特に BMP 受容体については、すでに解析が進行していた TGF- β およびアクチビンのセリン/スレオニンキナーゼ型受容体を基に相同体がクローニングされ、その解析が進んでおり²⁹⁾、TGF- β 受容体と同様 I 型と II 型のサブユニットが存在することがわかっているが³⁰⁾、受容体からのシグナルを伝達する経路については解明が進展しておらず、いまだに未知の部分が多い。

最近になって、ショウジョウバエにおける BMP-2 と BMP-4 の相同体であり、その初期胚の背腹軸を決定する因子として知られる、decapentaplegic (dpp) のシグナル伝達経路の下流で機能しているタンパク質をコードする遺伝子

として、転写活性を有する Zn フィンガードメインを持つ転写因子をコードする *schurri* や、I 型受容体の下流でリン酸化され、核内移行する転写活性化因子をコードする *mothers against dpp* (*Mad*) が同定され、TGF- β スーパーファミリー受容体のシグナル伝達経路を解明する端緒となりうるものとして注目されている。特に *Mad* に関しては、ヒトの相同体である hSmad 1 について、BMP-2 と BMP-4 の作用で特異的にリン酸化されることが示され、BMP のシグナルを特異的に仲介する *Mad* タンパク質であることが報告されている³¹⁾。またリン酸化された *Mad* は核移行した後、核内で転写因子ヘシグナルを伝達している可能性が示唆されている³²⁾。

骨芽細胞とその始原細胞を共有すると思われる、筋肉系の細胞の分化を制御する転写因子としては、basic helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子である MyoD を中心とする MyoD ファミリー、および塩基性ドメインを欠損する HLH 型転写因子であり、MyoD の転写活性を阻害する Id が知られている³³⁾。骨芽細胞ではこのうち Id が発現することが明らかになっているほか、BMP によって一過性にその発現が促進されることが報告されているが^{34,35)}、骨形成作用との関連は明らかでない。著者は、細胞の分化形質を担う遺伝子の発現を調節する転写因子のうち、骨芽細胞の骨形成作用においてもこれらの HLH 型転写因子が重要な役割を担っていると推測し、OP-1 を作用させてから 16 時間という比較的早い時間で発現量に変化する遺伝子の解析を行った。

その結果、表 2 に示すごとく、現在までに報告のある既知の遺伝子と高い相同性を示す相同体として 3 つの遺伝子を検索することができた。これら遺伝子のうち、14-3-3 タンパク質はチロシンおよびトリプトファン加水分解酵素を活性化する因子として知られているほか³⁶⁾、細胞の増殖と分化のシグナル伝達を担うと考えられている MAP (mitogen-activated protein) キナーゼカスケードにおいて、MAPKKK (MAP kinase kinase) である Raf 1 を活性化することが報告さ

れている³⁷⁾。最近、クローニングされた新規 MAP-KKK である TAK 1 (TGF- β activated kinase 1) は、TGF- β と BMP の少なくとも一部のシグナルを伝達していることが明らかにされているが³⁸⁾、今回得られた遺伝子が OP-1 のシグナル伝達になんらかの役割を演じているものと推察される。また、MC 3 T 3-E 1 細胞と ST 2 細胞の両方で検出された fumarylacetoacetate hydrolase (Fah) は、チロシンを加水分解する経路の最終段階に位置する酵素であるが³⁹⁾、骨芽細胞の分化過程において、14-3-3 タンパク質などとともに、細胞内のアミノ酸代謝に関連している可能性も考えられる。ubiquitin like protein は、マウスの神経系の細胞でマウスの脳の発生に伴って発現の減少するタンパク質であり⁴⁰⁾、現在のところ BMP のシグナルとの関連は確認されていないが、14-3-3 タンパク質、Fah とともに、骨芽細胞における役割について、今後さらに検討を行う必要があるものと思われる。

また、今回の検索においては、上記の MyoD, Id のような転写調節に直接関連する因子のホモログは現在のところ見つかっていないが、未知のクローンのなかにも骨形成の分化を誘導する重要な機能を担う遺伝子が含まれている可能性があるため、今後のさらなる検証が必要であると思われる。

3) OP-1 の作用により発現量の減少する遺伝子

本研究ではディファレンシャルスクリーニング法として、Differential Display 法を用いることによって、ST 2 細胞において OP-1 が作用したときに発現が減少する遺伝子、ST 3 v を発見することに成功した。DNA データベースの検索の結果、ST 3 v は既知の遺伝子のなかにホモロジーを示す相同体が存在しなかったが、この遺伝子は、OP-1 を添加してから 16 時間の時点でその mRNA 発現量が減少しており、ALPase 活性やオステオカルシン産生の増加といった、骨芽細胞の形質発現を誘導する細胞内シグナル伝達経路のカスケードに、なんらかの形で関与している可能性が示唆

された。

ST 3 v の機能としては、その発現が減少することで別の遺伝子発現を抑制または促進する因子であると推測される。この遺伝子の細胞内シグナル伝達経路における機能の解明とその位置づけについては、得られた cDNA をプローブとし、遺伝子全長のクローニングを行うことによってアミノ酸配列を決定し、その構造を解析することをはじめとして、詳細な研究が必要であると思われる。

2. Differential Display 法について

Differential Display 法は、1992 年に Liang らによって原法が発表されて以来¹⁴⁾、簡便なディファレンシャルスクリーニング法として、わずか 3, 4 年の間に多くの研究者によって応用されているが⁴¹⁻⁴³⁾、そのなかでいくつかの問題点が指摘されてきており、また種々の改良法が報告され⁴⁴⁾、現在に至っている。

本法の利点としては、従来の代表的なディファレンシャルスクリーニング法であるサブトラクション法に比較して、手技的に簡便であり、また感度も高く、希少なものと微妙な変化を示す mRNA を検出できる可能性があることなどが挙げられる。欠点としては、その原理上、転写された mRNA の全体を網羅するためには、1 種類の細胞につき 80 とおり以上の PCR 反応を行わねばならず、全体で数 100 とおりの反応を要すること、また得られる cDNA 断片は鋳型 cDNA の 3' 末端の 100~500 bp の範囲であり、多くの場合非翻訳領域にとどまるため生物学的情報に乏しく、ホモロジー検索で得られる情報が限られることなどである。

本研究では、1992 年に発表された原法を改良した GenHunter 社のキットを用いて Differential Display 法を行い、合計 77 種類の遺伝子のクローンを得たが、その後のスクリーニングによって、OP-1 の作用に対し発現または抑制の見られた遺伝子は、わずか 1 種類であった。しかしながら細胞に分化成長因子を作用させ、分化の誘導が起こる過程ではこれ以外にも複数の遺伝子がかかわっていると考えられ、それらの遺伝子は今回の実験

では検出できなかったものと思われる。また、研究が進行する過程で、本法の実際面におけるいくつかの問題点も明らかとなった。そこで本法を実施するうえでのこれらの問題点について考察を行った。

本法を実施する過程で最も顕著であった問題は、再現性の低い増幅を認めたため、フィンガープリント上では差異を認めるが、ノーザンブロットングにて分析を行うと差異を認めない、すなわち false positive (偽陽性) が多いという問題であった。

再現性については、本法の原著には増幅された cDNA 断片のおよ 95% に再現性があったとしている¹⁴⁾。再現性がないバンドのパターンが見られる原因としては、比較的條件の緩いアニーリング温度 (40℃) を用いて、サイクル数の多い (40 サイクル) PCR を行っているためであると考えられ、これを改善するために任意プライマーの長さを 22 mer とし、PCR の最初の数サイクルのみ 40℃ にて反応することで鋳型 cDNA を合成し、その後は 60℃ で 20 サイクル以内の増幅を行う enhanced differential display 法が報告されている⁴⁵⁾。

また false positive が生ずる原因については、ピベッティングの誤差、抽出した RNA の精製度の問題、RNA への染色体 DNA の混入などの主として手技的な要因が考えられるが、フィンガープリント上で 1 本に見えるバンドには実際には複数のバンドが含まれている場合があり、再増幅、サブクローニングの段階で違うバンドを positive として拾ってしまう可能性も否定できない。本研究では最初に MC 3 T 3-E 1 細胞にて本法を行った際に、得られた試料をノーザンブロットングを用いて確認した結果、明らかな差異を認めなかったため、66 種類の試料のうち多くが再現性のない false positive である可能性があると考え、ST 2 細胞を用いる際には、同じ組み合わせの PCR 反応液について二重に調製してシークエンスゲルに電気泳動を行い、PCR 時に生ずるエラーを低減する方法を試みた結果、再現性のないバン

ドをかなり除外することができた。

また、フィンガープリント上では明らかに差異を認めるが、ノーザンブロットングではあまり差異を認めないか、不鮮明なバンドとなってしまい、判別することが困難な例が多く見られたことについては、今回のスクリーニングが主として total RNA を用いて行われたことから、発現量の少ないものは検出できないことが推測された。mRNA を用いたノーザンブロットングをすべての試料について行うことにより、今回 false positive とした試料のなかに差異を認めるものを検出できる可能性があると考えられる。また同様の例において、より感度の高い RNase プロテクション・アッセイを用いることで検証を行い、差異を示すことを確認した例が報告されており⁴⁶⁾、今後の研究に応用することで、より詳細な解析を行うことができると思われる。本研究では定量的 RT-PCR を併用することにより検証を行い、1 種類のクローン ST 3 v について明らかに差異を認めるクローンとして確認することができた。

本研究では骨芽細胞様細胞である MC 3 T 3-E 1 細胞と、より未分化な細胞と考えられる ST 2 細胞を用いたが、OP-1 による骨芽細胞への誘導の過程で、発現量に差異を示す mRNA を検出するという目的においては、より未分化な細胞のほうが明確な差異を示すと考えられるため、より適切な選択であると思われる。また骨組織のマーカーである ALPase 活性は OP-1 の濃度依存的に上昇したことから、より高濃度の OP-1 を用いることで、より明確な差異を示すバンドが得られることが推測された。

また、BMP のシグナル伝達に関与する初期の因子である Mad タンパク質は、細胞内に遍在して発現しており、リガンドの添加による発現量の変化は認められない。したがってこのような遺伝子のスクリーニングには Differential Display 法は適していないといえる。しかし Mad のシグナルによって発現し、さらに下流の遺伝子発現を調節することで、骨芽細胞の分化を制御する役割を果たしている初期遺伝子を検索することは、BMP

の作用機序を解明するうえで重要な課題であり、そのために Differential Display 法は今後も有効な手段の 1 つであると考えられる。

V. 結 論

異所性に骨形成を誘導する因子である, BMP の作用機序を解明する目的で, OP-1 (BMP-7) の骨形成作用に伴うシグナルに反応して, 発現量の変化する遺伝子を解析するために, マウスの骨芽細胞様細胞株である MC 3 T 3-E 1 細胞と, マウスの骨髓ストローマ細胞株である ST 2 細胞を培養細胞として用い, Differential Display 法による解析を行った。

1. MC 3 T 3-E 1 細胞と ST 2 細胞に OP-1 (BMP-7) を 7 日間作用させた結果, 骨芽細胞のマーカーである alkaline phosphatase (ALPase) 活性は, 濃度依存的に顕著な増加を示した。

2. ノーザンブロッティングによる分析の結果, OP-1 を 7 日間作用させた後に, これらの細胞の osteocalcin (オステオカルシン) の mRNA 発現量は, 顕著な増加を示すことがわかった。

3. MC 3 T 3-E 1 細胞と ST 2 細胞について Differential Display 法を用いることにより, OP-1 を 16 時間作用させた実験群, および対照群の細胞から, mRNA 発現量に差異を認める合計 77 種類の遺伝子を得た。

4. これらの遺伝子には, 14-3-3 タンパク質, fumarylacetoacetate hydrolase など, 既知の遺伝子と高い相同性を示すものが含まれていた。

5. 定量的 RT-PCR によって検証した結果, ST 2 細胞から得られた遺伝子 ST 3 v について, OP-1 を作用させたときに mRNA 発現量が減少することを確認した。

以上により, 本研究では Differential Display 法を用いることで, OP-1 の作用により骨芽細胞の形質発現を誘導する, シグナル伝達に関与している可能性のある遺伝子, ST 3 v を得ることができた。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 懇切なるご校閲を賜りました口腔外科学第二講座 榎本昭二教授に深甚なる謝意を表すとともに, 直接懇切なるご教示, ご指導をいただきました本学歯学部生化学講座助手 大井田新一郎博士ならびに口腔外科学第二講座助手 朝比奈泉博士に深い謝意を表します。また本学歯学部生化学講座において本研究を遂行する機会を与えてくださり, ご指導を賜りました東京医科歯科大学 佐々木哲名誉教授, ならびに終始懇切なるご校閲を賜りました本学歯学部生化学講座 柳下正樹教授に謹んで感謝の意を表します。

さらに貴重なご助言をいただきました本学歯学部生化学講座 下川仁弥太博士, また終始基礎的な研究手法に関する貴重なご教示をいただきました本学大学院生体機能制御歯科学系発生機構制御学講座 飯村忠浩博士, 顎顔面外科学講座 武田弘資博士, 口腔外科学第二講座 丸岡 豊博士に心より感謝申し上げますとともに, 終始温かいご支援をいただきました本学歯学部生化学講座, 口腔外科学第二講座の皆様にも心より感謝いたします。

なお本研究の要旨の一部は, 第 49 回口腔科学会 (1995 年 4 月, 岐阜) において発表した。

文 献

- 1) Urist, M. R. : Bone : Formation by autoinduction. *Science* 150 : 893-899, 1965.
- 2) Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitsock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M. and Wang, E. A. : Novel regulators of bone formation ; molecular clones and activities. *Science* 242 : 1528-1534, 1988.
- 3) Hogan, B. L. M. : Bone morphogenetic proteins ; multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes & dev.* 10 : 1580-1594, 1996.
- 4) Wozney, J. M. : The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol. reproduct. develop.* 32 : 160-167, 1992.
- 5) Rosenzweig, B. L., Imamura, T., Okadome, T., Cox, G. N., Yamashita, H., ten Dijke, P., Heldin, C. H. and Miyazono, K. : Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 7632-7636, 1995.

- 6) Grieder, N. C., Nellen, D., Burke, R., Basler, K. and Affolter, M. : Schnurri is required for Drosophila Dpp signaling and encodes a zinc finger protein similar to the mammalian transcription factor PRD II-BF1. *Cell* 81 : 791-800, 1995.
- 7) Raftery, L. A., Twombly, V., Wharton, K. and Gelbart, W. M. : Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in Drosophila. *Genetics* 139 : 241-254, 1995.
- 8) Sekelsky, J. J., Newfeld, S. J., Raftery, L. A., Chartoff, E. H. and Gelbart, W. M. : Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in Drosophila melanogaster. *Genetics* 139 : 1347-1358, 1995.
- 9) Ben Ezra, R., Davis, R. L., Lockshon, D., Turner, D. L. and Weintraub, H. : The protein Id ; a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61 : 49-59, 1990.
- 10) Weintraub, H. : The MyoD family and myogenesis ; redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 75 : 1241-1244, 1993.
- 11) Olson, E. N. : Signal transduction pathways that regulate skeletal muscle gene expression. *Mol. Endocrinol.* 7 : 1369-1378, 1993.
- 12) Olson, E. N. : MyoD family ; a paradigm for development? *Genes & Dev.* 4 : 1454-1461, 1990.
- 13) Jan, Y. N. and Jan, L. Y. : HLH proteins, fly neurogenesis, and vertebrate myogenesis. *Cell* 75 : 827-830, 1993.
- 14) Liang, P. and Pardee, A. B. : Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257 : 967-971, 1992.
- 15) Zimmermann, C. R., Orr, W. C., Leclerc, R. F., Barnard, E. C. and Timberlake, W. E. : Molecular cloning and selection of genes regulated in Aspergillus development. *Cell* 21 : 709-715, 1980.
- 16) Asahina, I., Sampath, T. K., Nishimura, I. and Hauschka, V. : Human osteogenic protein-1 induces both chondroblastic and osteoblastic differentiation of osteoprogenitor cells derived from newborn rat calvaria. *J. Cell Biol.* 123 : 921-933, 1993.
- 17) Chomczynski, P. and Sacchi, N. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 : 156-159, 1987.
- 18) Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. : A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132 : 6-13, 1983.
- 19) Liang, P., Averboukh, L. and Pardee, A. B. : Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display ; refinements and optimization. *Nucleic Acids Res.* 21 : 3269-3275, 1993.
- 20) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. : Molecular Cloning ; A Laboratory Manual ; Second Edition. New York, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.82-1.84.
- 21) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. : Molecular Cloning ; A Laboratory Manual ; Second Edition. New York, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.25-1.28.
- 22) Schowalter, D. B. and Sommer, S. S. : The generation of radiolabeled DNA and RNA probes with polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 177 : 90-94, 1989.
- 23) Hengen, P. N. : Methods and reagents. Quantitative PCR ; an accurate measure of mRNA? *Trends Biochem. Sci.* 20 : 476-477, 1995.
- 24) Vukicevic, S., Luyten, F. P. and Reddi, A. H. : Osteogenin inhibits proliferation and stimulates differentiation in mouse osteoblast-like cells (MC 3 T 3-E 1). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 166 : 750-756, 1990.
- 25) Hiraki, Y., Inoue, H., Shigeno, C., Sanma, Y., Bentz, H., Rosen, D. M., Asada, A. and Suzuki, F. : Bone morphogenetic proteins (BMP-2 and BMP-3) promote growth and expression of the differentiated phenotype of rabbit chondrocytes and osteoblastic MC 3 T 3-E 1 cells *in vitro*. *J. Bone Miner. Res.* 6 : 1373-1385, 1991.
- 26) Yamaguchi, A., Ishizuya, T., Kintou, N., Wada, Y., Katagiri, T., Wozney, J. M., Rosen, V. and Yoshiki, S. : Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST 2 and MC 3 T 3-G 2/PA 6. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 220 : 366-371, 1996.
- 27) Hauschka, P. V., Lian, J. B., Cole, D. E. and Gundberg, C. M. : Osteocalcin and matrix Gla protein ; vitamin K-dependent proteins in bone. *Phys. Rev.* 69 : 990-1047, 1989.
- 28) Dieudonne, S. C., Semeins, C. M., Goei, S. W., Vukicevic, S., Nulend, J. K., Sampath, T. K., Helder, M. and Burger, E. H. : Opposite effects of osteogenic protein and transforming growth factor beta on chondrogenesis in cultured long bone rudiments. *J. Bone. Miner. Res.* 9 : 771-780, 1994.

- 29) Letsou, A., Arora, K., Wrana, J. L., Simin, K., Twombly, V., Jamal, J., Staehling-Hampton, K., Hoffmann, F. M., Gelbart, W. M. and Massague, J. : *Drosophila* Dpp signaling is mediated by the punt gene product ; a dual ligand-binding type II receptor of the TGF beta receptor family. *Cell* 80 : 899-908, 1995.
- 30) Liu, F., Ventura, F., Doody, J. and Massague, J. : Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs) ; extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol. Cell Biol.* 15 : 3479-3486, 1995.
- 31) Hoodless, P. A., Haerry, T., Abdollah, S., Stapleton, M., O'Connor, M. B., Attisano, L. and Wrana, J. L. : MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell* 85 : 489-500, 1996.
- 32) Massague, J. : TGFbeta signaling ; receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell* 85 : 947-950, 1996.
- 33) Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J. M., Fujisawa-Sehara, A. and Suda, T. : Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J. Cell Biol.* 127 : 1755-1766, 1994.
- 34) Ogata, T. and Noda, M. : Expression of Id, a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins, is down-regulated at confluence and enhanced by dexamethasone in a mouse osteoblastic cell line, MC3T3E1. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 180 : 1194-1199, 1991.
- 35) Kawaguchi, N., DeLuca, H. F. and Noda, M. : Id gene expression and its suppression by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 in rat osteoblastic osteosarcoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : 4569-4572, 1992.
- 36) Vale, R. D., Reese, T. S. and Sheetz, M. P. : Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42 : 39-50, 1985.
- 37) Shimizu, K., Kuroda, S., Yamamori, B., Matsuda, S., Kaibuchi, K., Yamauchi, T., Isobe, T., Irie, K., Matsumoto, K. and Takai, Y. : Synergistic activation by Ras and 14-3-3 protein of a mitogen-activated protein kinase kinase kinase named Ras-dependent extracellular signal-regulated kinase kinase stimulator. *J. Biol. Chem.* 269 : 22917-22920, 1994.
- 38) Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E. and Matsumoto, K. : Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* 270 : 2008-2011, 1995.
- 39) Klebig, M. L., Russell, L. B. and Rinchik, E. M. : Murine fumarylacetoacetate hydrolase (Fah) gene is disrupted by a neonatally lethal albino deletion that defines the hepatocyte-specific developmental regulation 1 (hsdr-1) locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : 1363-1367, 1992.
- 40) Kumar, S., Tomooka, Y. and Noda, M. : Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 185 : 1155-1161, 1992.
- 41) Welsh, J., Chada, K., Dalal, S. S., Cheng, R., Ralph, D. and McClelland, M. : Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res.* 20 : 4965-4970, 1992.
- 42) Liang, P., Averboukh, L., Keyomarsi, K., Sager, R. and Pardee, A. B. : Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 52 : 6966-6968, 1992.
- 43) Guimaraes, M. J., Lee, F., Zlotnik, A. and McClanahan, T. : Differential display by PCR ; novel findings and applications. *Nucleic Acids Res.* 23 : 1832-1833, 1995.
- 44) Rohrwild, M., Alpan, R. S., Liang, P. and Pardee, A. B. : Inosine-containing primers for mRNA differential display. *Trends in Genetics* 11 : 300, 1995.
- 45) Linskens, M.H., Feng, J., Andrews, W. H., Enlow, B. E., Saati, S. M., Tonkin, L. A., Funk, W. D. and Villeponteau, B. : Cataloging altered gene expression in young and senescent cells using enhanced differential display. *Nucleic Acids Res.* 23 : 3244-3251, 1995.
- 46) Yeatman, T. J. and Mao, W. : Identification of a differentially-expressed message associated with colon cancer liver metastasis using an improved method of differential display. *Nucleic Acids Res.* 23 : 4007-4008, 1995.