

博士（歯学） 小林 美智代

学位論文題名

Developmental profiles of phosphorylated and unphosphorylated CREBs in murine calvarial MC3T3-E1 cells

(骨芽細胞様細胞株(MC3T3-E1)の石灰化過程における非磷酸化CREBと磷酸化CREBの発現量および活性の変化)

、 学位論文内容の要旨

緒言

近年、転写因子の一グループであるleucine zipper family の異常発現による種々の骨形成異常が報告されており、leucine zipper familyが骨の正常な発育にとって欠くことのできないものであることが示唆されている。これらの主要なグループのひとつであるCREB/ATF(cAMP-responsive element binding protein/activating transcription factors) family はparathyroid hormone、prostaglandin E<sub>2</sub>などの応答に重要な役割を果たすことが報告されているが、骨の発育分化過程との関係については不明な点が多い。本研究は骨の正常な発育分化過程とCREBの発現および活性化との関係を明かにする目的で、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1細胞を用い、増殖期、分化期ならびに石灰化期のCREBの発現量、磷酸化の程度および活性の変化を検討した。

材料と方法

MC3T3-E1細胞はα-MEMを用い通法に従い培養した。培養開始後3、7、9、14、21、28、34、42日目におけるMC3T3-E1細胞の全細胞蛋白質を抽出し、Western blotting にて各回収時期でのCREBの発現量、およびCREBの磷酸化の程度の比較を行った。さらに各回収時期での核蛋白質を回収し、gel shift assay によりconsensus/CRE配列 (-TGACGTCA-) に対するそれら核蛋白質の結合能の比較、およびCREB、ATF-1に対する特異的な抗体を用いたconsensus/CRE配列に結合する蛋白

質の同定を行った。さらに数種のCRE様配列を用いて、CREB複合体のそれらの配列に対する結合能を検討した。

### 結果と考察

MC3T3-E1細胞の増殖、分化、石灰化の過程におけるCREBとその磷酸化の状態を知るために、CREBそのものを認識する抗体と磷酸化CREBのみを認識する抗体を用いてWestern blottingを行った。47kDaに検出されたCREBはすべての時期に発現が認められたが、特に増殖期の4日目で最も強く認められた。磷酸化CREBは増殖期の4日目と石灰化前期である21日目にもっとも強く認められた。使用した抗磷酸化CREB抗体は磷酸化ATF-1も認識することが確認されており、38kDaにbandが認められたことから、この細胞中に磷酸化ATF-1の存在も示唆された。

次に、MC3T3-E1細胞におけるCRE配列に対する結合能を調べるために、consensus/CRE配列 (-TGACGTCA-)を用いてgel shift assayを行った。主に二つの特異的なbandが認められ、そのうちの一つは、抗CREB抗体を使用したsuper shift assayにより、主にCREBの複合体を含むことが示唆された。同様に抗ATF-1抗体を使用したsuper shift assayにより、consensus/CREに結合する複合体中にATF-1も存在することが示唆された。

次に増殖期、分化期、石灰化前期においてconsensus/CRE配列に結合するCREBの量、およびその磷酸化の状態を調べるために、培養4日目、14日目、21日目のMC3T3-E1細胞の核蛋白質および抗CREB抗体と抗磷酸化CREB抗体を用いてgel shift assayを行った。その結果をデンシトメーターを用いて解析した結果、consensus/CRE配列に結合する磷酸化CREBのCREB全体に対する割合は、増殖期で63%、分化期で95%、石灰化前期で96%であった。CREB複合体を含むbandの強さは増殖期と石灰化前期においてほぼ同じ程度であったにもかかわらずCREB全体に対する磷酸化CREBの割合は、石灰化前期の方が高いことが認められた。

c-fos、IGF-I および rat osteocalcin プロモーター領域にCRE様配列があることが報告されている。そこで、これらの異なったCRE様配列にCREB複合体が結合するか否かを検討した。非標識のオリゴヌクレオチドを過剰にいれる競合実験において、CREB複合体はそれらCRE様配列には結合していないことが示唆された。しかし、も

う一つのconsensus/CRE配列に結合する複合体であるbandはこれらCRE様配列によって競合されたことから、これらのCRE様配列に結合する共通した因子が存在する可能性が示唆された。

以上の結果より、CREBは増殖期、分化期、石灰化期のすべての時期を通じて発現し、特に増殖期で強く見られること、磷酸化CREBは増殖期と石灰化前期で強く発現していることが認められた。さらにMC3T3-E1細胞中には他のCREB/ATF familyの一つである、ATF-1が発現していることが示唆された。

磷酸化CREBによる転写の活性化と細胞増殖との関連について多数報告されていることから、骨芽細胞においても増殖期におけるCREBの活性化と細胞増殖とのあいだに関連のあることが考えられる。また、石灰化前期における、bone sialoprotein や、osteocalcin といった細胞外マトリックスのmRNAの発現は、cAMPの上昇に伴って生じることが報告されている。CREBの磷酸化は細胞内のcAMP濃度の上昇に伴って生じるものであり、石灰化前期にリン酸化CREBの割合が高くなることを考えあわせると、磷酸化CREBが骨芽細胞の分化および石灰化に対して何らかの役割を果たしていることが考えられる。

こうした細胞内cAMP濃度の上昇には元来、parathyroid hormone などの生理活性因子による刺激が不可欠とされてきた。しかしながら、本実験においてホルモン、サイトカインなどの刺激なしに、増殖期と石灰化前期において磷酸化CREBの増加が認められたことは大変興味深い点である。このことは増殖から石灰化にいたる過程において、何らかのPTH様蛋白質などが合成され、それらがオートクライン、パラクライン的に作用してcAMPの細胞内濃度を上昇させたのではないかと考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 松本 章

副査 教授 中村 進治

副査 教授 久保木 芳徳

## 学位論文題名

### Developmental profiles of phosphorylated and unphosphorylated CREBs in murine calvarial MC3T3-E1 cells

(骨芽細胞様細胞株(MC3T3-E1)の石灰化過程における非磷酸化CREBと磷酸化CREBの発現量および活性の変化)

審査はいずれの担当者も口頭試問により提出論文の内容とそれに関連した学問分野について行った。

現在、石灰化過程における遺伝子転写因子の役割については不明の点が多い。本研究は多くの転写因子のうち主にCREBに注目して骨の正常な発育分化過程とCREBの発現および活性化との関係を明かにする目的で、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1細胞を用い、増殖期、分化期ならびに石灰化期のCREBの発現量、磷酸化の程度および活性の変化を検討した。MC3T3-E1細胞を通法に従い培養し、培養開始後3、7、9、14、21、28、34、42日目におけるMC3T3-E1細胞の全細胞蛋白質を抽出し、Western blottingにて各回収時期でのCREBの発現量、およびCREBの磷酸化の程度の比較を行った。さらに各回収時期での核蛋白質を回収し、gel shift assayによりconsensus/CRE配列(-TGACGTCA-)に対するそれら核蛋白質の結合能の比較、およびCREB、ATF-1に対する特異的な抗体を用いたconsensus/CRE配列に結合する蛋白質の同定を行った。さらに数種のCRE様配列を用いて、CREB複合体のそれらの配列に対する結合能を検討した。その結果、MC3T3-E1細胞の増殖、分化、石灰化の過程におけるCREBは47kDaに検出され、そのCREBはすべての時期に発現が認められたが、特に増殖期の4日目で最も強く認められた。その磷酸化の状態は磷酸化CREBは増殖期の4日目と石灰化前期である21日目にもっとも強く認められた。

次に、MC3T3-E1細胞におけるCRE配列に対する結合能をconsensus/CRE配列(-TGACGTCA-)を用いて、gel shift assayで調べたところ、主に二つの特異的なbandが認められ、そのうちの一つは、抗CREB抗体を使用したsuper shift assayにより、主にCREBの複合体を含むことが示唆された。次に増殖期、分化期、石灰化前期においてconsensus/CRE配列に結合するCREBの量、およびその磷酸化の状態を調べるため

に、培養4日目、14日目、21日目のMC3T3-E1細胞の核蛋白質および抗CREB抗体と抗磷酸化CREB抗体を用いてgel shift assayを行った。その結果、consensus/CRE配列に結合する磷酸化CREBのCREB全体に対する割合は、増殖期で63%、分化期で95%、石灰化前期で96%であり、磷酸化CREBのCREB全体に対する割合は石灰化前期の方が高いことが認められた。c-fos, IGF-1 および rat osteocalcin プロモータ領域にCRE様配列があることが報告されているのでこれらの異なったCRE様配列にCREB複合体が結合するか否かを検討したところ、CREB複合体はそれらCRE様配列に結合していないことが示唆された。しかし、もう一つのconsensus/CRE様配列に結合する複合体であるbandはこれらCRE様配列によって競合されたことから、これらのCRE様配列に結合する共通した因子が存在する可能性が示唆された。

以上の結果より、CREBは増殖期、分化期、石灰化期のすべての時期を通じて発現し、特に増殖期で強く見られること、磷酸化CREBは増殖期と石灰化前期で強く発現していることが認められた。磷酸化CREBによる転写の活性化と細胞増殖との関連について多数報告されていることから、骨芽細胞においても増殖期におけるCREBの活性化と細胞増殖とのあいだに関連のあることが考えられる。また、石灰化前期における、bone sialoprotein や、osteocalcin といった細胞外マトリックスのmRNAの発現は、cAMPの上昇に伴って生じることが報告されている。CREBの磷酸化は細胞内のcAMP濃度の上昇に伴って生じるものであり、石灰化前期にリン酸化CREBの割合が高くなることを考えあわせると、磷酸化CREBが骨芽細胞の分化および石灰化に対して何らかの役割を果たしていると考えられる。こうした細胞内cAMP濃度の上昇には元来、parathyroid hormoneなどの生理活性因子による刺激が不可欠とされてきた。しかしながら、本実験においてホルモン、サイトカインなどの刺激なしに、増殖期と石灰化前期において磷酸化CREBの増加が認められたことは大変興味深い点である。このことは増殖から石灰化にいたる過程において、何らかのPTH様蛋白質などが生成され、それらがオートクライン、パラクライン的に作用してcAMPの細胞内濃度を上昇させたのではないかと考えられる。

このような趣旨の論文に対し、次のような質問がなされた。1)なぜ、CREBに注目したか 2)CREBの蛋白質としての性質について 3)磷酸化CREBが増殖期、石灰化前期に増殖することの意味、4)石灰化前期とは骨形成のどのような時期にあたるのか、5)cAMPとCREの磷酸化との関係はどのようなものか 6)CREBの機能とAP-1など他の転写因子のそれとの関係について 7)この研究の成果が将来歯科臨床にどのように役立つと考えるか、等、これらの質問に対し、申請者は概ね妥当な回答を行い、関連学問分野についても広く詳細な理解があつたことを認め合格とした。