

## 課題番号 25

# 新規 BMP 下流候補遺伝子 SPATA5 の発現調節機構及び相互作用分子の解析

### [1] 組織

代表者：工藤 忠明

(東北大学大学院歯学研究科)

対応者：岡村 大治

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

渡辺 亮 (京都大学)

岡山 啓昌 (東北大学大学院歯学研究科)

清水 良央 (東北大学大学院歯学研究科)

金高 弘恭 (東北大学大学院医工学研究科)

林 治秀 (東北大学大学院歯学研究科)

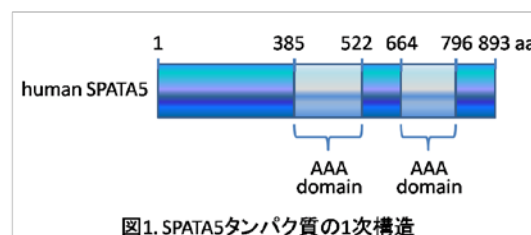
研究費:物件費 19 万円, 旅費 0 円

### [2] 研究経過

Bone morphogenetic protein (BMP)シグナル伝達経路は、骨組織や歯牙組織を含む硬組織形成のみならず、初期発生や神経発生などヒトの発生過程において極めて重要な役割を担うシグナル経路の一つである(Hoganら, 1996)。BMP下流の応答遺伝子としては、Id1, Id2, Id3, Smad6, Smad7遺伝子がよく知られているが(Miyazinoら, 2002)、その他多くの下流応答遺伝子については十分な検討がされていない。われわれはこれまでの解析により、複数の新規BMP下流候補遺伝子を特定しており、SPATA5もそれら遺伝子の一つである。

SPATA5 (Spermatogenesis associated 5)は、AAAドメインを複数有するタンパク質分子である。AAAとは、ATPase-associated various cellular activitiesを指し、小胞輸送・タンパク質分解・膜融合といった、様々な細胞機能を担うタンパク質に広く分布するATPase活性をもつドメインである。SPATA5は893アミノ酸からなり、膜貫通領域のない水溶性タンパク質と推測される(図1)。本年度の研究では、SPATA5のBMPシグナル経路との関係につき主にリアルタイムPCR法による解析を実施した。以下、研究活動概要を記す。

これまで、HEK293ヒト線維芽細胞株の派生株(F



T293-BMPRII)にBMP2を作用させ、早期に発現量が変動する遺伝子をDNAマイクロアレイ法により解析し抽出を行った。これによりSpermatogenesis associated 5 (SPATA5) 遺伝子を含む、BMPにより調節される可能性がある多数の遺伝子グループが得られている(図2)。

SPATA5タンパク質の細胞における生理的役割はほぼ不明である。本年度の共同研究では、HEK293細胞をはじめとする各種哺乳動物細胞株をBMP2で処理後、それらの細胞株におけるSPATA5遺伝子発現量の経時的変化をリアルタイムPCR法にて検討した。この際、Id1遺伝子の発現変動をコントロールとした。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

われわれがこれまでのマイクロアレイ解析(図2)

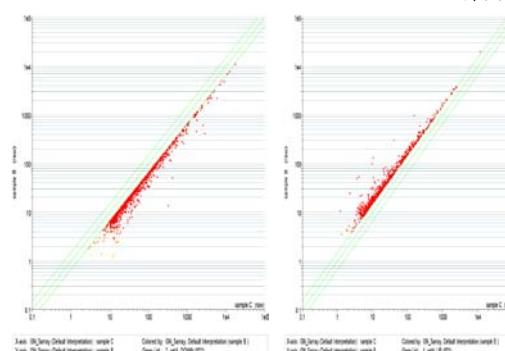


図2. BMP2により調節を受ける遺伝子グループの散布図

BMP2処理後の発現レベルがコントロールよりも2倍以上高い遺伝子グループ(833遺伝子)の散布図(左図)、BMP2処理後の発現レベルがコントロールよりも2倍以上低い遺伝子グループ(932遺伝子)の散布図(右図)を示す。

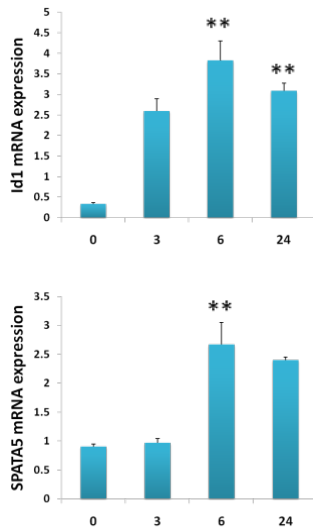


図3. HEK293細胞株における、BMP2のSPATA5遺伝子発現量への影響

HEK293細胞株に100 ng/mlのBMP2を0, 3, 6および24時間処理したのち、RNAを回収してRT-PCRを実施した。**\*\*P < 0.01 vs 0 h**

により抽出したSPATA5遺伝子は、リアルタイムPCR解析により、HEK293線維芽細胞株において、BMP2を処理した後6時間をピークにその発現量が亢進することが示された(図3)。

さらにリアルタイムPCR解析により、SPATA5遺伝子発現量のBMP2による影響を他の各種哺乳動物細胞株においても検討したところ、予想外にも、ヒト子宮頸癌由来Hela細胞、マウス骨芽細胞様MC3T3細胞、およびマウス骨髄由来間葉系幹細胞ST2細胞では、SPATA5遺伝子の発現量はBMP2依存的に亢進しなかった。しかし一方で、これらの細胞株では、代表的なBMPシグナルの下流遺伝子であるId1の発現量は、BMP2処理によりいずれも亢進した(図4)。

### (3-2) 波及効果と発展性など

以上の結果より、HEK293細胞において、BMPシグナルがSPATA5遺伝子発現を亢進させることがリアルタイムPCR法においても確認できた。このことは、HEK293細胞において、SPATA5がBMPシグナルを介した細胞機能の調節に関与していることを示唆する。さらに、その発現調節機構は同細胞に特異的なものであることが示唆された。BMP下流のシグナル伝達経路としてはSmad経路やp38経路が知られている。今後はHEK293細胞を対象を絞って、Spat5の遺伝子発現を亢進させる主要な経路を本格的に検討することが主な課題である。

本研究に関して、東北大学大学院医工学研究科奥

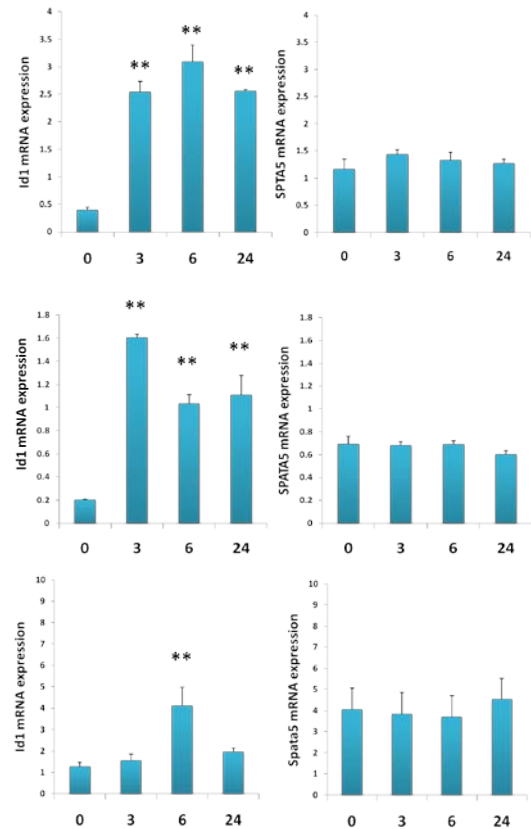


図4. 各種哺乳動物細胞株における、BMP2のSPATA5またはId1遺伝子発現量への影響(一部抜粋)(上: MC3T3, 中: Hela, 下: PC12細胞株)

各種哺乳動物細胞株に100ng/mlのBMP2を0, 3, 6および24時間処理したのち、RNAを回収してRT-PCRを実施した。\*P < 0.05、\*\*P < 0.01 vs 0 h 処理。

本文子さんに感謝の意を表します。

### [4] 成果資料

- (1) 工藤忠明、清水良央、金高弘恭、林治秀. SPATA5遺伝子のBMPシグナルによる遺伝子発現制御機構の解析. 第52回歯科基礎医学会学術大会.