

原 著

骨シアロタンパク質 (BSP) 遺伝子の転写に対する
アンドロゲン受容体の効果高井英樹^{*1} 小方頼昌^{*1,2}^{*1}日本大学松戸歯学部歯周治療学講座^{*2}口腔科学研究所

(受付日: 2006年12月25日 受理日: 2007年1月10日)

Effect of Androgen Receptor on Bone Sialoprotein Gene Transcription

Hideki Takai^{*1} and Yorimasa Ogata^{*1,2}Departments of Periodontology ^{*1} and Research Institute of Oral Science^{*1,2},

Nihon University School of Dentistry at Matsudo.

(Received : December 25, 2006 Accepted : January 10, 2007)

Abstract : Bone sialoprotein (BSP) is a phosphorylated and sulfated noncollagenous protein that has been shown to have the ability to mediate cell attachment through an Arg-Gly-Asp (RGD) sequence and to bind hydroxyapatite through polyglutamic acid sequences. The restricted distribution and temporal changes in the expression of BSP mRNA and the ability of BSP to nucleate hydroxyapatite crystals indicate the potential role of this protein in the initial mineralization of bone.

Androgens are steroid hormones that are essential for skeletal development. The androgen receptor (AR) is a transcription factor and a member of the steroid receptor superfamily that plays an important role in male sexual differentiation and prostate cell proliferation.

In this study, we analyzed the effects of androgens and the AR on the expression of the BSP using osteoblast-like cells (ROS17/2.8 cells). Increase in AR protein levels was observed with androgen receptor (AR) overexpression in ROS17/2.8 cells. The BSP mRNA levels were also increased by AR overexpression. However, the endogenous and overexpressed BSP mRNA levels were not affected by DHT (10^{-8} M, 24 h). While the luciferase activities in all constructs, including a short construct (nts-116 to +60), were increased by AR overexpression, the basal and luciferase activities enhanced by AR overexpression were not affected by DHT (10^{-8} M, 24 h). The effect of AR overexpression was abrogated by 2 bp mutations in either the cAMP response element (CRE) or the activator protein 1/glucocorticoid response element (AP1/GRE). Gel shift analyses showed that AR overexpression increased binding to the CRE and AP1/GRE elements. Notably, the CRE-protein complexes were supershifted by phospho-CREB antibody, and CREB and AR antibodies disrupted the formation of the complexes. The AP1/GRE-protein complexes were supershifted by c-Fos antibody, and c-Jun and AR antibodies disrupted the formation of the complexes. These studies demonstrate that AR stimulates BSP gene transcription by targeting the CRE and AP1/GRE elements in the promoter of the rat BSP

連絡先: 高井英樹

〒 271-8587 松戸市栄町西 2-870-1

日本大学松戸歯学部歯周治療学講座

Hideki Takai

Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

2-870-1 Sakaecho-nishi, Matsudo, 271-8587, Japan

E-mail takai.hideki@nihon-u.ac.jp

gene. Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi (J Jpn Periodontol) 49 : 27-36, 2007.

Key words : androgen, androgen receptor, bone sialoprotein, cAMP response element; AP1, osteoblasts, transcription

要旨 : 骨シアロタンパク質 (BSP) は、リン酸化及び硫酸化をうけた非コラーゲン性タンパク質で、その配列中の Arg-Gly-Asp (RGD) 配列で細胞に接着し、グルタミン酸連続配列でハイドロキシアパタイトに結合する。石灰化初期に石灰化結合組織特異的に BSPmRNA は発現し、アパタイト結晶形成能を有することから、BSP は初期の石灰化において重要な役割を果たすと考えられる。

アンドロゲンは骨の発達に重要なステロイドホルモンである。アンドロゲン受容体 (AR) は、ステロイド受容体スーパーファミリーの一員であり、転写因子としても作用し、男性生殖器の分化や前立腺での細胞増殖に関与する。

本研究では、BSP の転写調節機構を検索する目的で、ラット骨芽細胞様細胞である ROS17/2.8 細胞を用いてアンドロゲンおよび AR が BSP の転写に及ぼす影響について検索した。AR を過剰発現させるベクターを ROS17/2.8 細胞に導入すると、AR タンパク量は核内および細胞質内で増加した。AR を ROS17/2.8 細胞で過剰発現させると、BSP mRNA 量は増加したが、AR を過剰発現せずに、ROS17/2.8 細胞を 10^{-8} M のアンドロゲン (5 α -dihydrotestosterone; DHT) で 24 時間刺激しても、過剰発現後に DHT で刺激しても、BSPmRNA は変化しなかった。ルシフェラーゼアッセイの結果、-116 塩基対上流までの BSP プロモーターを含む pLUC3 とそれよりも長いプロモーター配列を含むルシフェラーゼコンストラクトの転写活性は、AR 過剰発現により上昇したが、DHT の影響を受けなかった。2 塩基対ずつの変異を挿入したミューテーションプラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイの結果、AR の作用は、cAMP 応答配列 (CRE) およびアクチベータープロテイン 1 と重複したグルココルチコイド応答配列 (AP1/GRE) の 2 つの応答配列を介すると考えられた。ゲルシフトアッセイの結果、AR を過剰発現させると、CRE および AP1/GRE への核内タンパク質の結合量が増加した。CRE に結合するタンパク質は、抗リン酸化 CREB 抗体で結合バンドの位置が高分子領域へ移動 (スーパーシフト) し、抗 CREB および AR 抗体で結合量が減少した。一方、AP1/GRE へ結合するタンパク質は、抗 c-Fos 抗体で結合バンドの位置がスーパーシフトし、抗 c-Jun および AR 抗体で結合量が減少した。以上の結果から、AR は CRE および AP1/GRE 配列を介して BSP の転写を調節し、CRE 配列には CREB, c-Fos, c-Jun および AR の複合体が、AP1/GRE 配列には、c-Fos, c-Jun および AR の複合体が結合していると考えられた。

キーワード : アンドロゲン, アンドロゲン受容体, 骨シアロタンパク質, cAMP 応答配列, AP1, 骨芽細胞, 転写調節

緒 言

アンドロゲンは、男性生殖器官の形成や発育を誘発する男性ステロイドホルモンであり^{1,2)}。アンドロゲンの欠乏は、性腺機能低下による骨量の低下および骨吸収促進による骨欠損の増加などの様々な骨代謝異常を引き起こす³⁾。骨代謝に対してアンドロゲンは重要な役割を果たすが、骨芽細胞に対するアンドロゲンの作用の多くは不明である^{4~8)}。

アンドロゲン受容体 (AR) は、ステロイド受容体スーパーファミリーのメンバーであり、その多くはリガンド依存性の転写調節因子である⁹⁾。一方、AR は、アンドロゲンの作用により C2C12 筋芽細胞における MyoD ファミリーのマイオジェニンの発現を促進し筋分化を促進した¹⁰⁾。AR トランスジェニックマウス

では、骨芽細胞および破骨細胞関連遺伝子の発現量が減少するが、雄でのみオステオプロテジェリン (OPG) mRNA の発現が増加した¹¹⁾。AR は骨髄間葉系細胞¹²⁾、肥大軟骨細胞¹³⁾、破骨細胞および骨芽細胞等の多くの細胞種で発現するが¹⁴⁾、骨芽細胞での AR の発現は、骨がアンドロゲンの標的組織であることを示し、アンドロゲンの作用は直接または間接的である^{1,2)}。

骨シアロタンパク質 (BSP) は Small Integrin Binding Ligand, N-linked Glycoprotein (SIBLING) ファミリーのメンバーで、そのアミノ酸配列中のグルタミン酸連続配列でハイドロキシアパタイトに結合し、Arg-Gly-Asp (RGD) 配列で細胞に接着する^{15,16)}。また、BSP は石灰化初期に発現し、生理的なカルシウム、リン濃度の準安定溶液中でアパタイト結晶の誘導能を持ち、初期の石灰化に関与すると考えられている^{17,18)}。さらに、骨に転移を生じる乳ガンおよ

び前立腺ガン病巣でBSPの発現が認められる事から、BSPはガンの骨転移に関与すると考えられている¹⁹⁾。マウス、ラットおよびヒトBSPのプロモーター領域は非常に相同性が高く、転写開始位置より370塩基対上流までは約75%の相同性を示す^{20~23)}。BSP遺伝子の上流域(プロモーター領域)には、ホルモン、サイトカインおよび成長因子に応答する遺伝子配列が存在し、その配列中には逆配列のTATA配列²⁴⁾と重複したビタミンD応答配列(VDRE)²⁵⁾、逆方向のCCAAT配列(-50~-46塩基対上流)^{26,27)}、cAMP応答配列(CRE;-75~-68塩基対上流)^{28~30)}、FGF2応答配列(FRE;-92~-85塩基対上流)^{29~34)}、下垂体特異的転写因子結合配列(Pit-1;-111~-105塩基対上流)^{32,35)}、ホメオボックス応答配列(HOX;-199~-192塩基対上流)^{34,36,37)}、TGF- β 応答配列(TAE;-499~-485塩基対上流)^{33,37,38)}およびグルココルチコイド応答配列(GRE;-920~-906塩基対上流)³⁹⁾と重複したアクチベータープロテイン1結合配列(AP-1;-921~-915塩基対上流)⁴⁰⁾などが報告されている。

そこで、骨代謝に密接に関係すると考えられるアンドロゲンおよびARのBSPの転写に対する影響を解析することを目的に本研究を行った。

材料および方法

1. 細胞培養

ラット骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞であるROS17/2.8細胞³⁹⁾は37°C、5%CO₂インキュベーター内で培養した。培養液は10%ウシ胎児血清(FCS: Invitrogen社)および抗生物質(100 unit/ml ペニシリンおよび100 μ g/ml ストレプトマイシン: Invitrogen社)を含むAlpha-minimal essential培地(α -MEM: Invitrogen社)を用いた。アンドロゲン(5 α -dihydrotestosterone: DHT: 和光純薬工業)およびARの作用を検索するために、AR発現プラスミド(PCMV-AR: Dr Chawnsang Changより供与)⁴¹⁾を導入する1日前にROS17/2.8細胞を60mm培養シャーレー(Corning社)に播種した。細胞が40~60%コンフルエントの状態では、PCMV-ARを、リポフェクタミン(Invitrogen社)を用いて細胞内に導入した。その後、10%FCSを含む α -MEM培地中で36時間細胞培養し、無血清のフェノールレッド不含 α -MEMで12時間培養後、10⁻⁸MのDHTで24時間刺激し、細胞を回収した。

2. ウェスタンブロット

PCMV-ARを導入する1日前に、ROS17/2.8細胞

を100mm培養シャーレーに播種した。細胞が40~60%コンフルエントの状態では、PCMV-ARを、リポフェクタミンを用いて細胞内に導入した。その後、10%FCSを含む α -MEM培地中で36時間細胞培養し、無血清のフェノールレッド不含 α -MEMで12時間培養後、10⁻⁸MのDHTで24時間刺激し、細胞を回収した。回収後、核内タンパク質および細胞質タンパク質を抽出し³¹⁾、10%SDSポリアクリルアミド電気泳動にて分離後、PVDF(polyvinylidene difluoride)膜に転写し、ブロックエース(大日本住友製薬株式会社)にてブロッキングを行った。一次抗体として抗ARモノクローナル抗体(441: Santa Cruz Biotechnology社)を3時間作用させ、膜を洗浄後、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体を作用させた後、ECL chemiluminescence's reaction kit (ECL Kit: Amersham Pharmacia Biotech社)を用いてARを検索した。

3. ノーザンハイブリダイゼーション法

ROS17/2.8細胞からグアニジンチオシアネート法(和光純薬工業)で全RNAを抽出し、20 μ gを1.2%アガロースゲルで電気泳動後、Hybond N plus ナイロンメンブレン(Amersham Pharmacia Biotech社)に転写した⁴¹⁾。次に紫外線照射によりRNAを膜上に固定し、 α -³²P-dCTP(GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社)で標識(ランダムプライム法)したラットBSPおよびglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)cDNAをプローブとしてハイブリダイゼーション後、メンブレンを0.1%SDSを含む2 \times SSC(30mM酢酸ナトリウム, 0.3M塩化ナトリウム, pH7.0)で25°C, 30分間2回洗浄し、さらに55°Cで30分間洗浄した。次に、0.1%SDSを含む0.1 \times SSCで55°C, 30分間2回洗浄した後、フジBAS2000イメージングプレートに約12時間コンタクトさせた。ハイブリダイゼーションの結果は、フジBAS2000イメージングアナライザーにて解析を行なった。

4. Real-time PCR

ROS17/2.8細胞より、グアニジンチオシアネート法にて全RNAを抽出し、1 μ gの全RNAからExScript RT reagent Kitを用いてcDNAを合成した。alkaline phosphatase(ALP)およびGAPDHのプライマーは以下の通りである。

ALP forward, 5'-TTGAATCGGAACAACCTGACTGAC-3';

ALP reverse, 5'-GATGGCCTCATCCATCTCCAC-3';

GAPDH forward, 5'-GACAACCTTGGCATCGTGA-3';

GAPDH reverse, 5'-ATGCAGGGATGATGTTCTGG-3'.

Real-time PCR反応は、Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa社)を用いて以下の様に行っ

た。SYBR ExScript RT-PCR Kit 中の 2 × SYBR Premix Ex Taq (12.5 μ l), 50 μ M PCR Forward Primer (0.1 μ l), 50 μ M PCR Reverse Primer (0.1 μ l), H₂O (11.3 μ l)および 100ng cDNA (1 μ l)を混和後、増幅反応を行った。PCR 反応は 95 $^{\circ}$ C, 10 秒を 1 サイクル, 95 $^{\circ}$ C, 5 秒; 60 $^{\circ}$ C, 30 秒を 1 サイクルとして 40 サイクル行った。ALP の発現量は GAPDH の発現量で補正を行った。

5. プラスミドの調整

ルシフェラーゼプラスミドを制限酵素, *Hind* III および *Sal* I で切断し, 様々な長さに調節したラット BSP プロモーター配列を挿入した。作製したコンストラクトの配列は, 作成したコンストラクトは, pLUC3 (-116 ~ +60 塩基対), pLUC4 (-425 ~ +60 塩基対) および, pLUC5 (-801 ~ +60 塩基対) で, pLUCB は BSP プロモーターを含まないルシフェラーゼプラスミドである。また, Quickchange Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene 社) を用いてミューテーションルシフェラーゼプラスミドを作製した。作製した全てのミューテーションプラスミドはその塩基配列の確認を行った。

6. ルシフェラーゼアッセイ

ルシフェラーゼプラスミドを細胞に導入する 24 時間前に, ROS17/2.8 細胞を 35mm ディッシュに播種した。細胞が 40 ~ 60 % コンフルエントの状態, ROS17/2.8 細胞はルシフェラーゼプラスミド, コントロールである β ガラクトタシダーゼ (β -Gal) プラスミド (pSV- β -Galactosidase Control Vector : Promega 社) および AR 発現プラスミド (PCMV-AR) をリポフェクタミンにて細胞に導入し, プラスミドが導入された ROS17/2.8 細胞は, 10 % FCS を含む α -MEM 培地で 36 時間培養し, 無血清のフェノールレッド不含 α -MEM で 12 時間培養後, 10⁻⁸M の DHT で 24 時間刺激した。その後, 細胞は PBS で 2 回洗浄し, 細胞溶解液 (125 μ l) に溶解後, 12,000 × g で 1 分間遠心し, 上清を活性の測定に用いた。20 μ l の上清と 100 μ l のルシフェラーゼ基質 (東洋インキ株式会社) を混合し, ルミノメーターにて活性の測定を行った。プラスミドの導入効率を補正する目的で, 60 μ l の上清と 66 μ l の β -Gal 基質を混合し, 37 $^{\circ}$ C で 12 時間インキュベート後, 420 nm で吸光度を測定し, 活性値の補正に用いた。

7. ゲルシフトアッセイ

核内タンパク質と BSP 遺伝子プロモーター配列との結合を検索する目的でゲルシフトアッセイを行なった。ラット BSP プロモーター配列中の CRE (nts, -84 to -59, 5' -CCCACAGCCTGACGTCGCACCGCCG) および AP1/GRE (nts, -925 to -898, 5' -TAGCTGAGTCA

CTAGGACCTGGGCAACA)配列を合成して使用した。合成オリゴヌクレオチドは相補鎖同士がそれぞれ終濃度 10 pmol になるように調整し, 100 $^{\circ}$ C で 5 分間煮沸後, 室温に放置して 2 本鎖にするためのハイブリダイズを行った。2 本鎖オリゴヌクレオチドは 2 pmol に希釈し, T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて, [γ -³²P] ATP にて標識を行った。ROS17/2.8 細胞に PCMV-AR 発現ベクターを導入し, 10⁻⁸M の DHT を 24 時間作用させ, 核内タンパク質の抽出を行った。核内タンパク質とプロモーター配列との結合は, 以下の反応バッファー中で (CRE buffer : 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.04% Nonidet P-40, 5% glycerol, 0.5% EDTA), (GRE buffer : 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 1% Nonidet P-40, 10% glycerol, 1 mM EDTA) 3 μ g の核内タンパク質と, 1 μ g/ μ l polydI-dC, および γ -³²P-ATP 標識した合成オリゴヌクレオチド (2 pmol) を 20 分間反応後, 5% アクリルアミドゲルで電気泳動し, 乾燥後, フジ BAS2000 イメージングアナライザーにて解析を行なった。

8. 免疫沈降法

ROS17/2.8 細胞に PCMV-AR を過剰発現させ, 核内タンパク質の抽出を行った。核内タンパク質を RIPA buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 500mM NaCl, 0.5% NP-40, 10% BSA) にて溶解し, 抗 CREB 抗体 (C-21 : Santa Cruz Biotechnology 社) または抗 c-Fos 抗体 (K-25 : Santa Cruz Biotechnology 社) と共に 4 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベート後, Protein A/G agarose (20 μ l) (Santa Cruz Biotechnology 社) を 12 時間作用させた。遠心により回収した Protein A/G agarose beads を洗浄後, 10% SDS ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し, 抗 AR および c-Fos 抗体, または抗 AR および CREB 抗体を使用してウェスタンブロットを行った。免疫反応は ECL kit を用いて可視化した。

9. 検定

ルシフェラーゼアッセイの結果は, Student's *t* test を用いて有意差の検定を行った。

結 果

1. 核内および細胞質内タンパク質における AR の発現量の変化

ROS17/2.8 細胞から抽出した核内および細胞質内タンパク質における AR の発現量をウェスタンブロットにて検索した。AR は核内に多く発現し, PCMV-AR を細胞内で発現させると, 核内および細

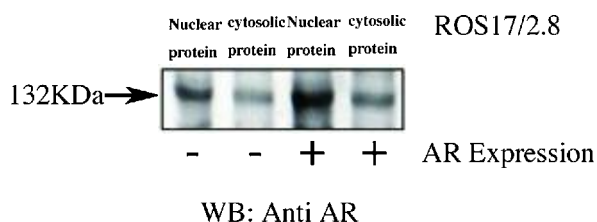


図1 アンドロゲン受容体 (AR) の過剰発現による AR タンパク質発現量の変化

ROS17/2.8 細胞に AR を過剰発現させ、核内および細胞質内タンパク質を抽出した。抗 AR 抗体を使用してウエスタンブロットを行った結果、核内および細胞質内の AR のタンパク質量が増加した。

胞質内の AR のタンパク質量が増加した (図1)。

2. BSP および ALP mRNA 量の変化

BSP mRNA 発現に対する DHT (10^{-8} M) および AR の影響を検索した。ROS17/2.8 細胞を DHT (10^{-8} M, 24h) で刺激しても BSP mRNA の発現は変化しなかった。細胞内に AR を過剰発現させると、BSP mRNA 量は増加したが、AR の過剰発現前後に、DHT (10^{-8} M, 24h) で刺激しても BSP mRNA 量に変化は認められなかった (図2)。次に、DHT の ALP mRNA 発現に対する効果を Real-time PCR 法にて検索した結果、AR の過剰発現により、ALP mRNA の発現は約 1.7 倍増加し、DHT (10^{-8} M, 24h) 刺激により完全に抑制された (結果は示していない)。

3. BSP の転写活性に対する影響

ラット BSP 遺伝子プロモーター配列の長さを変化させたルシフェラーゼプラスミド (pLUC3 ~ pLUC6) を ROS17/2.8 細胞に導入し、DHT (10^{-8} M) にて 24 時間刺激を行ったところ、BSP の転写活性は変化しなかった。ROS17/2.8 細胞内に AR を過剰発現させると、pLUC3 およびそれより長い BSP プロモーター配列を含むルシフェラーゼコンストラクト (pLUC3, 4, 5 and 6) で転写活性が上昇した。プロモーターの長さを -938 塩基対上流 (pLUC6) から -801 塩基対 (pLUC5) 上流までに短くすると、AR による転写活性の上昇は部分的に抑制された。さらに DHT (10^{-8} M) で刺激しても、AR 過剰発現により上昇した転写活性は変化しなかった (図3)。以上の結果から、ROS17/2.8 細胞において、AR 過剰発現により BSP の転写は促進され、その転写調節は、ラット BSP 遺伝子プロモーターの -116 塩基対上流および、-936 と -801 塩基対上流までの間のプロモーター配列中に存在すると考えられた。

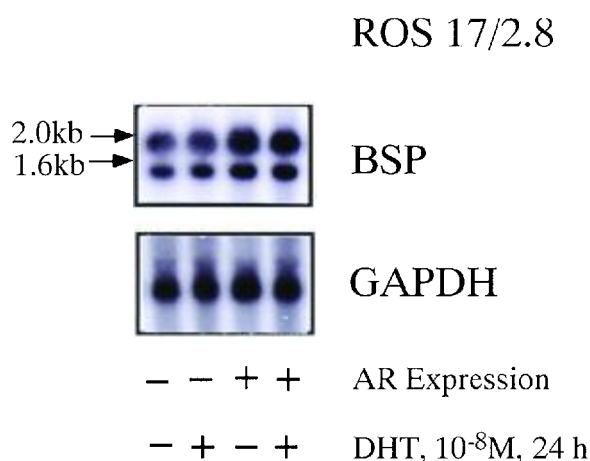


図2 アンドロゲン (DHT) およびアンドロゲン受容体 (AR) による BSP mRNA 発現の変化

ROS17/2.8 細胞において DHT (10^{-8} M, 24h) 刺激および AR 過剰発現後、全 RNA を抽出し、BSP および GAPDH mRNA 量の変化をノーザンハイブリダイゼーションで検索した結果、AR の過剰発現により、BSP mRNA 量は増加したが、DHT 刺激前後で、BSP mRNA に変化は認められなかった。

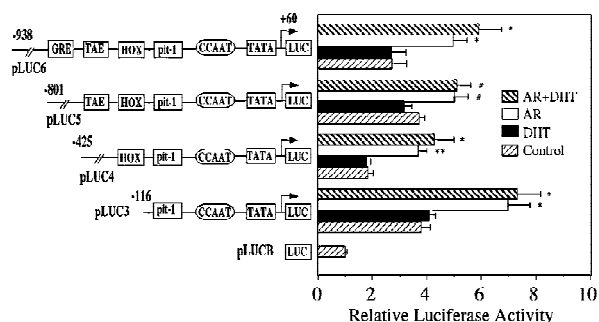


図3 DHT および AR によるラット BSP プロモーターの転写活性に対する効果

pLUCB (BSP プロモーターを含まないルシフェラーゼプラスミド)、pLUC3 (-116 ~ +60 塩基対)、pLUC4 (-425 ~ +60 塩基対)、pLUC5 (-801 ~ +60 塩基対)、pLUC6 (-936 ~ +60 塩基対) の 5 種類のルシフェラーゼプラスミドを ROS17/2.8 細胞に導入し、DHT (10^{-8} M, 24h) 刺激および AR 過剰発現後の転写活性の変化をルシフェラーゼアッセイにて検索した結果、AR を過剰発現させると、pLUC3 およびそれより長い BSP プロモーター配列を含むルシフェラーゼコンストラクト (pLUC3, 4, 5 および 6) で転写活性が上昇したが、DHT 刺激前後で、転写活性に変化は認められなかった。コントロールに対する有意差; ** ($P < 0.05$); * ($P < 0.1$); # ($P < 0.2$)。

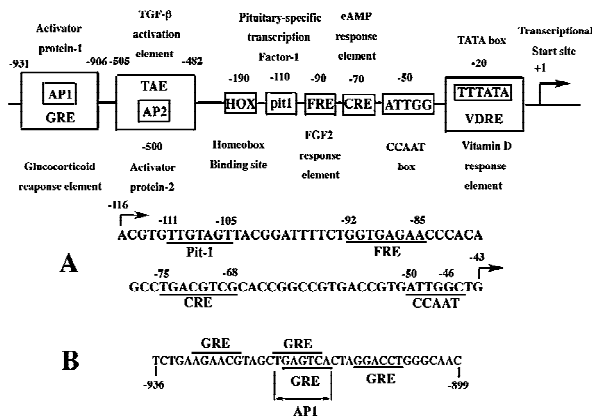


図4 ラット BSP 遺伝子プロモーターの模式図

パネル上部は、ラット BSP 遺伝子プロモーターの転写開始点から -931 塩基対上流までの転写因子結合配列の模式図を示した。A: ラット BSP 遺伝子プロモーターの -116 ~ -43 塩基対上流までの塩基配列。下部は、逆方向の CCAAT 配列 (-50 ~ -46 塩基対), cAMP 応答配列 (CRE; -75 ~ -68 塩基対), FGF2 応答配列 (FRE; -92 ~ -85 塩基対), 下垂体特異的転写因子結合配列 (Pit-1; -111 ~ -105 塩基対) が存在する。B: ラット BSP 遺伝子プロモーターの -936 ~ -899 塩基対上流までの塩基配列。2つのグルココルチコイド応答配列と同配列に重複した AP1 配列が存在する。

4. AR 応答配列の同定

ラット BSP 遺伝子プロモーターの -116 ~ -43 塩基対上流までの配列中には、逆方向の CCAAT 配列 (-50 ~ -46 塩基対上流), cAMP 応答配列 (CRE; -75 ~ -68 塩基対上流), FGF2 応答配列 (FRE; -92 ~ -85 塩基対上流), 下垂体特異的転写因子結合配列 (Pit-1; -111 ~ -105 塩基対上流) が存在し、-936 ~ -899 塩基対上流の間にはグルココルチコイド応答配列と同配列に重複したアクチベータープロテイン 1 応答配列 (AP1/GRE) が存在する (図4)。AR に応答すると考えられる -116 塩基対上流までのプロモーター配列をさらに短く調節してルシフェラーゼアッセイを行った結果、-60 塩基対までを含むコンストラクトでは転写活性に変化はなかったが、-84 塩基対上流および、それよりも長いプロモーター配列を含むコンストラクトで、AR による転写活性の増加が認められた (結果は示していない)。このことから、転写開始位置より -60 塩基対上流から -84 塩基対上流までの間に AR に応答する配列が存在すると考えられた。次に、BSP プロモーターの -116 塩基対上流までに存在する転写因子結合配列である逆方向の CCAAT, CRE お

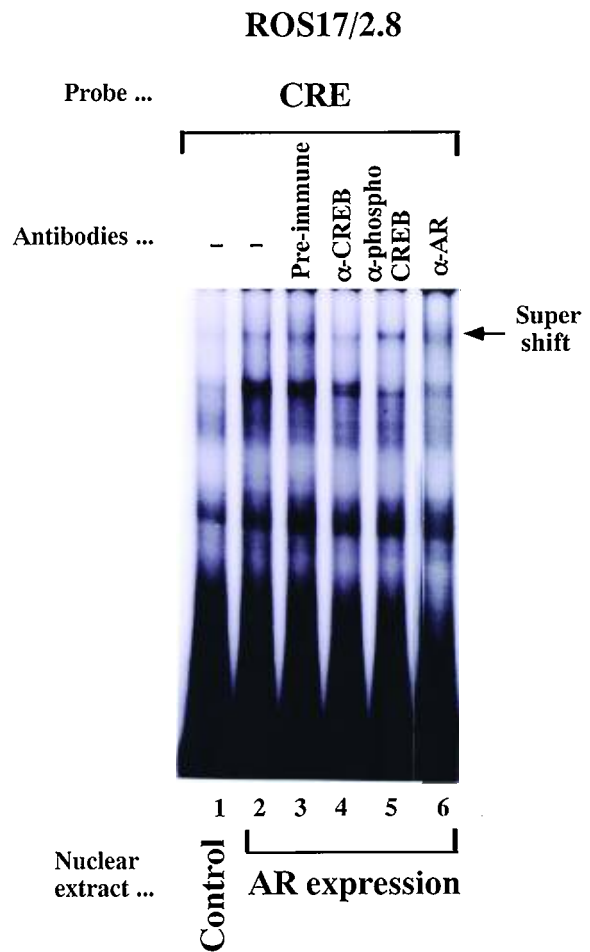


図5 CRE 配列に結合する核内タンパク質 (転写因子) の検索

アイソトープ標識した CRE と、コントロール (無刺激; レーン 1) および AR 過剰発現 (レーン 2~6) 後の ROS17/2.8 細胞から抽出した核内タンパク質との結合をゲルシフトアッセイにて検索した結果、コントロールと比較して AR 過剰発現後に CRE 配列に結合する核内タンパク質は増加した。さらに CRE 配列に結合する転写因子を検索するために、抗 CREB, 抗リン酸化 CREB および抗 AR 抗体を使用した結果、抗リン酸化 CREB 抗体では、近接した上部バンドがスーパーシフトし、抗 CREB および抗 AR 抗体では、2本のバンドの結合が減少した。

よび FRE 配列の 1 カ所に 2 塩基ずつのミューテーションを導入した pLUC3 ミューテイションプラスミドと -936 ~ -899 塩基対上流の間に存在する AP1/GRE 配列に 2 塩基のミューテーションを導入した pLUC6 ミューテイションプラスミドを作製した。

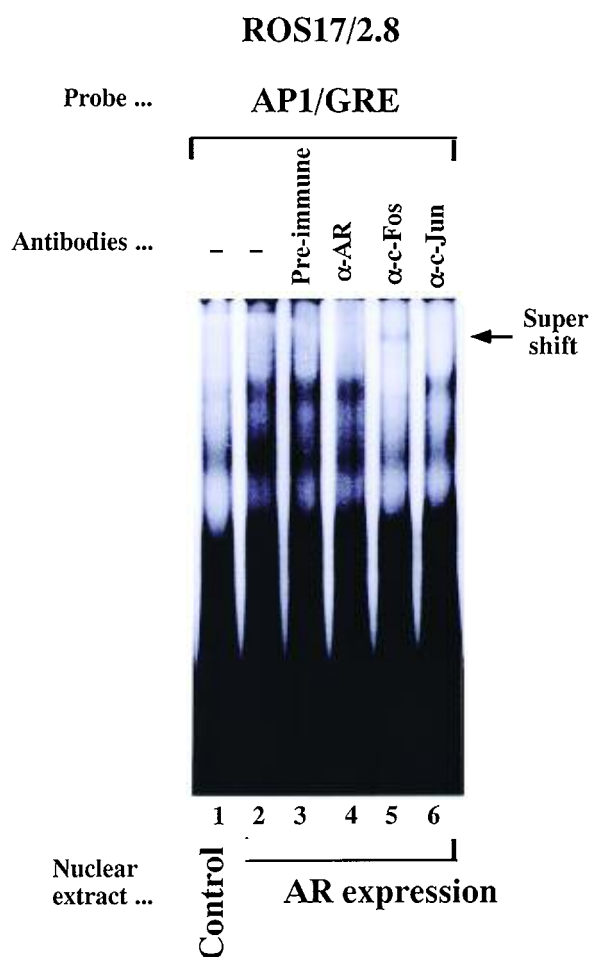


図6 AP1/GRE 配列に結合する核内タンパク質 (転写因子) の検索

アイソトープ標識した AP1/GRE と、コントロール (無刺激; レーン 1) および AR 過剰発現 (レーン 2~6) 後の ROS17/2.8 細胞から抽出した核内タンパク質との結合をゲルシフトアッセイにて検索した結果, コントロールと比較して AR 過剰発現後に AP1/GRE 配列に結合する核内タンパク質は増加した。さらに, AP1/GRE 配列に結合する転写因子を検索するために, 抗 AR, 抗 c-Fos および抗 c-Jun 抗体を使用した結果, 抗 c-Fos 抗体では, 上部バンドがスーパーシフトし, 抗 c-Jun および AR 抗体では, 核内タンパクの結合量が減少した。

さらに CRE 配列に 1 カ所, CRE と AP1/GRE 配列の 2 カ所にミューテーションを導入した pLUC6 ミューテーションプラスミドを作製した。pLUC3 および pLUC6 の CRE ミューテーションでは, AR による転写活性の上昇が部分的に抑制され, AP1/GRE ミュー

テーションでも, 転写活性の上昇が部分的に抑制された (結果は示していない)。CRE と AP1/GRE のダブルミューテーションで, AR による転写の上昇が完全に抑制されたことから (結果は示していない), CRE および AP1/GRE 配列が AR に応答する配列であると考えられた。

5. 核内タンパク質とプロモーター配列との結合

ルシフェラーゼアッセイの結果から, AR による転写調節に関与する DNA 配列はラット BSP プロモーター中の CRE および AP1/GRE 配列であると考えられた。そこでこれらの結合配列と ROS17/2.8 細胞の核内タンパク質および細胞質内タンパク質の結合を検索した。CRE および AP1/GRE 配列と ROS17/2.8 細胞から抽出した核内タンパク質との結合をゲルシフトアッセイにて検索したところ, CRE および AP1/GRE 配列への核内タンパク質の結合は, コントロールおよび DHT (10^{-8} M, 24 h) 刺激に比べて AR を発現させた核内タンパク質で増加し, AP1/GRE では 2 本のバンドが認められた (結果は示していない)。CRE および AP1/GRE 配列に結合する転写因子を検索する目的で, 各種抗体を用いたゲルシフトアッセイを行った。CRE 配列への結合は非常に近接した 2 本のバンドが認められた。抗リン酸化 CREB 抗体を使用すると, 上のバンドが高分子領域へ移動 (スーパーシフト) し (図 5, lane 5), 抗 CREB 抗体を用いると, 上下 2 本のバンドの結合量が減少した (図 5, lane 4)。また, 抗 AR 抗体を用いると, 2 本のバンドの結合は消失した (図 5, lane 6)。AP1/GRE 配列に対する核内タンパク質の結合は, 抗 c-Fos 抗体で上のバンドがスーパーシフトし (図 6, lane 5), 抗 c-Jun 抗体および抗 AR 抗体を用いると, 結合が減少した (図 6, lane 4, 6)。

6. 転写因子の相互作用

ゲルシフトアッセイの結果から, AR による BSP の転写の調節に関係している転写因子は CREB, c-Fos, c-Jun および AR であると考えられた。そこで, これらの転写因子の相互作用を検索する目的で免疫沈降法を行った。核内タンパク質を抗 CREB 抗体で沈降させ, 抗 AR 抗体または抗 c-Fos 抗体でウェスタンブロットをすると, CREB と AR, CREB と c-Fos は共沈し, AR の過剰発現により増加した。このことから, CRE 配列には CREB と AR, CREB と c-Fos が複合体を形成して結合していると考えられた。次に, 核内タンパク質を抗 c-Fos 抗体で沈降させ, 抗 AR 抗体および抗 CREB 抗体でウェスタンブロットを行った結果, c-Fos と AR は共沈し, c-Fos と CREB の沈降量は非常に少なかった。さらに, AR の過剰発現前後でそれらの沈降量は変化しなかった。そのことから,

API/GRE 配列には c-Fos と AR の複合体が結合すると考えられた (結果は示していない)。

考 察

性ステロイドホルモンは、骨格の発達と維持に重要であり、骨成長期に成長プレートの成熟および閉鎖を制御している³⁾。また、皮質骨および海綿骨での骨形成を調節し、骨量を増加させる。アンドロゲンは、骨芽細胞に対して TGF- β 産生の亢進、IGF- II 受容体数の増加、FGF への感受性亢進などの作用を示し、骨形成を促進する。さらに、PGE2 および IL-6 の分泌を抑制し、骨吸収を抑制する^{3,42)}。ステロイドホルモン受容体は標的遺伝子プロモーターのステロイドホルモン受容体応答配列に作用して、直接または間接的に遺伝子発現を調節している。これらのことから、アンドロゲンおよび AR は、骨形成および骨の恒常性の維持に重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、初期の石灰化に重要な役割を果たしていると考えられる BSP の転写調節に対するアンドロゲンおよび AR の影響を検索した。

ROS17/2.8 細胞において、DHT (10^{-8} M, 24h) 刺激および AR 過剰発現後の BSP mRNA 量の変化について検討した結果、AR の過剰発現により BSP mRNA 量は増加した (図 2)。しかし、DHT 刺激前後で、BSP mRNA に変化は認められなかった。ルシフェラーゼアッセイの結果、pLUC3 (-116 ~ +60 塩基対) およびそれよりも長いプロモーター配列を含むルシフェラーゼコンストラクト pLUC4, 5, 6 において転写活性の上昇が認められ、プロモーターの長さを -938 塩基対上流 (pLUC6) から -801 塩基対 (pLUC5) 上流までに短くすると、AR による転写活性の上昇が部分的に抑制された (図 3)。さらにミューテイションプラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイの結果、CRE および API/GRE 配列が AR に応答する配列であると考えられた。ゲルシフトアッセイの結果、ROS17/2.8 細胞において、AR 過剰発現後に CRE 配列および API/GRE 配列と核内タンパク質の結合が増加したことから、CRE 配列および API/GRE 配列が AR に応答する配列であると考えられた。抗体を用いたゲルシフトアッセイおよび免疫沈降の結果、CRE 配列には CREB, c-Fos, c-Jun と AR の複合体が結合し、API/GRE 配列には AR, c-Fos および c-Jun の複合体が結合していると考えられた (図 5, 6)。以上の結果から、AR は、核内および細胞質内に内因性に存在するが、その発現量は少なく、AR を細胞内で過剰発現させると、リガンド非依存的に CREB と c-Fos

および c-Jun の複合体である API 転写因子は AR と複合体を形成し、CRE および API/GRE 応答配列に結合して BSP の転写を調節していると考えられた。エストロゲンレセプター β (ER β) は、API 応答配列を介してリガンド非依存的にマウス性腺刺激ホルモンプロモーターを活性化することが報告されている^{43,44)}。今回の結果から、AR は、アンドロゲンの作用を受けずに BSP の遺伝子発現を調節することができると考えられた。オスとメスのラット腰椎から得た骨芽細胞様細胞に、合成ステロイドホルモンであるデキサメタゾン作用させると、オスとメスの両方の骨芽細胞様細胞で石灰化結節の形成が増加し、プロゲステロンでは、メスでのみ石灰化結節の形成の促進が認められた。一方、テストステロンでは、オスとメスの両方の骨芽細胞様細胞で、石灰化結節の形成が認められなかった⁴⁵⁾。以上の結果から、アンドロゲンの石灰化促進作用はデキサメタゾンやプロゲステロンに比較して、弱いと考えられた。今後、AR と AR に結合する転写因子との相互作用、さらに石灰化に対する効果についての検討が必要であると思われる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に対してご協力と励ましをいただきました歯周治療学講座の皆様には厚く御礼申し上げます。

本研究の一部は平成 18 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (B) 課題番号 18390563) および (萌芽研究 課題番号 No.18659625) の補助を受けて行った。

文 献

- 1) Kang H, Lin H, Hu Y, Yeh S, Huang K, Chang C: From transforming growth factor- β signaling to androgen action: Identification of Smad3 as an androgen receptor coregulator in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci*, 98:3018-3023, 2001.
- 2) Kang H, Cho C, Huang K, Wang J, Hu Y, Lin H, Chang C, Huang K: Nongenomic androgen activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 19:1181-1190, 2004.
- 3) Orwoll ES, Klein RF: Osteoporosis in men. *Endocrine Reviews*, 16 :87-116, 1995.
- 4) Anderson FH, Francis RM, Peaston RT, Wastell HJ: Androgen supplementation in eugonadal men with osteoporosis: effects of six months' treatment on markers of bone formation and resorption. *J Bone Miner Res*, 12 :472-478, 1997.

- 5) Behre HM, Kliesch S, Leifke E, Link TM, Nieschlag E: Long-term effect of testosterone therapy on bone mineral density in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metabol*, 82:2386-2390, 1997.
- 6) Finkelstein JS, Neer RM, Biller BMK, Crawford JD: Osteopenia in men with a history of delayed puberty. *New Eng J Med*, 326:600-604, 1992.
- 7) Katznelson L, Finkelstein JS, Schoenfeld DA, Rosenthal DI, Anderson EJ, Klibanski A: Increase in bone density and lean body mass during testosterone administration in men with acquired hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metabol*, 81:4358-4365, 1996.
- 8) Ongphiphadhanakul B, Rajatanavin R, Chailurkit L, Piaseu N, Teera-rungsikul K, Sirisriro R, Komindr S, Puavilai G: Serum testosterone and its relation to bone mineral density and body composition in normal males. *Clin Endocrinol*, 43:727-733, 1995.
- 9) Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM: The nuclear receptor superfamily; the second decade. *Cell*, 83: 835-839, 1995.
- 10) Lee DK: Androgen receptor enhances myogenin expression and accelerates differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 294: 408-413, 2002.
- 11) Wiren KM, Zhang X, Toombs AR, Kasparcova V, Gentile MA, Harada S, Jepsen KJ: Targeted overexpression of androgen receptor in osteoblasts: Unexpected complex bone phenotype in growing animals. *Endocrinol*, 145: 3507-3522, 2004.
- 12) Bellido T, Jilka RL, Boyce BF, Girasole G, Broxmeyer H, Dalrymple SA, Murray R, Manolagas SC: Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of the androgen receptor. *J Clin Invest*, 95:2886-2895, 1995.
- 13) Abu EO, Horner A, Kusec V, Trifitt JT, Compston JE: The localization of androgen receptors in human bone. *J Clin Endocrinol Metabol*, 82: 3493-3497, 1997.
- 14) Mizuno Y, Hosoi T, Inoue S, Ikegami A, Kaneki M, Akedo Y, Nakamura T, Ouchi Y, Chang C, Orimo H: Immunocytochemical identification of androgen receptor in mouse osteoclast-like multinucleated cells. *Calcif Tissue Int*, 54: 325-326, 1994.
- 15) Oldberg Å, Franzén A, Heinegård D: The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein. *J Biol Chem*, 263: 19430-19432, 1988.
- 16) Ganss B, Kim RH, Sodek J: Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med*, 10: 79-98, 1999.
- 17) Chen J, Shapiro HS, Sodek J: Developmental expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues. *J Bone Miner Res*, 7: 987-997, 1992.
- 18) Hunter GK, Goldberg HA: Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 8562-8565, 1993.
- 19) Waltregny D, Bellahcène A, Leval X, D, Florquin B, Weidle U, Castronovo V: Increased expression of bone sialoprotein in bone metastases compared with visceral metastases in human breast and prostate cancers. *J Bone Miner Res*, 15: 834-843, 2000.
- 20) Li JJ, Sodek J: Cloning and characterization of the rat bone sialoprotein gene promoter. *Biochem J*, 289: 625-629, 1993.
- 21) Kerr JM, Fisher LW, Termine JD, Wang MG, McBride OW, Young MF: The human bone sialoprotein gene (IBSP): genomic localization and characterization. *Genomics*, 17: 408-415, 1993.
- 22) Kim RH, Shapiro HS, Li JJ, Wrana JL, Sodek J: Characterization of the human bone sialoprotein (BSP) gene and its promoter sequence. *Matrix Biol*, 14: 31-40, 1994.
- 23) Benson MD, Aubin JE, Xiao G, Thomas PE, Franceschi RT: Cloning of a 2.5kb murine bone sialoprotein promoter fragment and functional analysis of putative *Osf2* binding sites. *J Bone Miner Res*, 14: 396-405, 1999.
- 24) Li JJ, Kim RH, Sodek J: An inverted TATA box directs downstream transcription of the bone sialoprotein gene. *Biochem J*, 310: 33-40, 1995.
- 25) Kim RH, Li JJ, Ogata Y, Yamauchi M, Freedman LP, Sodek J: Identification of a Vitamin D3-response element that overlaps a unique inverted TATA box in the rat bone sialoprotein gene. *Biochem J*, 318: 219-226, 1996.
- 26) Kim RH, Sodek J: Transcription of the bone sialoprotein gene is stimulated by v-Src acting through an inverted CCAAT box. *Cancer Res*, 59: 565-571, 1999.
- 27) Shimizu E, Ogata Y: Activation of bone sialoprotein gene transcription by flavonoids is mediated through an inverted CCAAT box in ROS 17/2.8 cells. *J Cell Biochem*, 86: 35-44, 2002.
- 28) Samoto H, Shimizu E, Matsuda-Honjyo Y, Saito R, Yamazaki M, Kasai K, Furuyama S, Sugiyama H, Sodek J, Ogata Y: TNF- α suppresses bone sialoprotein (BSP) expression in ROS 17/2.8 cells. *J Cell Biochem*, 87: 313-323, 2002.
- 29) Samoto H, Shimizu E, Matsuda-Honjyo Y, Saito R,

- Nakao S, Yamazaki M, Furuyama S, Suguya H, Sodek J, Ogata Y: Prostaglandin E2 stimulates bone sialoprotein (BSP) expression through cAMP and FGF2 response elements in the proximal promoter of the rat BSP gene. *J Biol Chem*, 278: 28659-28667, 2003.
- 30) Shimizu E, Nakayama Y, Nakajima Y, Kato N, Takai H, Kim D, Arai M, Saito R, Sodek J, Ogata Y: Fibroblast growth factor 2 and cyclic AMP synergistically regulate bone sialoprotein gene expression. *Bone*, 39:42-52, 2006.
- 31) Shimizu-Sasaki E, Yamazaki M, Furuyama S, Sugiyama H, Sodek J, Ogata Y: Identification of a novel response element in the rat bone sialoprotein (BSP) gene promoter that mediates constitutive and fibroblast growth factor 2-induced expression of BSP. *J Biol Chem*, 276: 5459-5466, 2001.
- 32) Shimizu E, Matsuda-Honjyo Y, Samoto H, Saito R, Nakajima Y, Nakayama Y, Kato N, Yamazaki M, Ogata Y: Static magnetic fields-induced bone sialoprotein (BSP) expression is mediated through FGF 2 response element and pituitary-specific transcription factor-1 motif. *J Cell Biochem*, 91: 1183-1196, 2004a.
- 33) Shimizu E, Saito R, Nakayama Y, Nakajima Y, Kato N, Takai H, Kim D, Arai M, Simmer J, Ogata Y: Amelogenin stimulates bone sialoprotein (BSP) expression through FGF2 response element and TGF- β 1 activation element in the promoter of the BSP gene. *J Periodontol*, 76: 1482-1489, 2005.
- 34) Nakayama Y, Nakajima Y, Kato N, Takai H, Kim D, Arai M, Mezawa M, Araki S, Sodek J, Ogata Y: Insulin-like growth factor-I increases bone sialoprotein (BSP) expression through fibroblast growth factor-2 response element and homeodomain protein-binding site in the proximal promoter of the BSP gene. *J Cell Physiol*, 208: 326-335, 2006.
- 35) Ogata Y, Nakao S, Kim RH, Li JJ, Furuyama S, Sugiyama H, Sodek J: Parathyroid hormone regulation of bone sialoprotein (BSP) gene transcription is mediated through a pituitary specific transcription factor-1 (Pit-1) motif in the rat BSP gene promoter. *Matrix Biol*, 19: 395-407, 2000.
- 36) Benson MD, Bargeon JL, Xiao G, Thomas PE, Kim A, Cui Y, Franceschi RT: Identification of a homeodomain binding element in the bone sialoprotein gene promoter that is required for its osteoblast-selective expression. *J Biol Chem*, 275: 13907-13917, 2000.
- 37) Shimizu E, Nakajima Y, Kato N, Nakayama Y, Samoto H, Ogata Y: Regulation of rat bone sialoprotein (BSP) gene transcription by enamel matrix derivative. *J Periodontol*, 75: 260-267, 2004b.
- 38) Ogata Y, Niisato N, Furuyama S, Cheifetz S, Kim RH, Sugiyama H, Sodek J: Transforming growth factor- β 1 regulation of bone sialoprotein gene transcription: identification of a TGF- β activation element in the rat BSP gene promoter. *J Cell Biochem*, 65: 501-512, 1997.
- 39) Ogata Y, Yamauchi M, Kim RH, Li JJ, Freedman LP, Sodek J: Glucocorticoid regulation of bone sialoprotein (BSP) gene expression: identification of a glucocorticoid response element in the bone sialoprotein gene promoter. *Eur J Biochem*, 230: 183-192, 1995.
- 40) Yamauchi M, Ogata Y, Kim RH, Li JJ, Freedman LP, Sodek J: AP-1 regulation of the rat bone sialoprotein gene transcription is mediated through a TPA response element within a glucocorticoid response unit in the gene promoter. *Matrix Biol*, 15: 119-130, 1996.
- 41) Yeh S, Chang C: Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:5517-5521, 1996.
- 42) Vanderschueren D, Bouillon R: Androgens and bone. *Calcif Tissu Int*, 56 :341-346, 1995.
- 43) Pak TR, Wilson CJ, Roberts JL, Handa RJ: Ligand-independent effects of estrogen receptor β on mouse gonadotropin-releasing hormone promoter. *Endocrinol*, 147: 1924-1931, 2006
- 44) Pak TR, Chung WC, Lund TD, Hinds LR, Clay CM, Handa RJ: The androgen metabolite, 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol, is a potent modulator of estrogen receptor- β 1-mediated gene transcription in neuronal cells. *Endocrinol*, 146: 147-155, 2005.
- 45) Ishida Y, Heersche JNM: Progesterone Stimulates Proliferation and Differentiation of Osteoprogenitor Cells in Bone Cell Populations Derived From Adult Female but not From Adult Male Rats. *Bone*, 20: 17-25, 1997.