

ふりがな	アリ・エムディ・モクセツト
氏 名	ALI MD MOKSED
学 位	博 士 (学術)
学 位 記 番 号	新大院博 (歯) 第 25 号
学位授与の日付	平成 19 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博 士 論 文 名	PIASx β is a key regulator of osterix transcriptional activity and matrix mineralization in osteoblasts (PIASx β は骨芽細胞においてオステリックスの転写活性ならびに石灰化の制御因子として主要な役割を果たす)
論文審査委員	主査 教 授 川島 博行 副査 教 授 織田 公光 教 授 網塚 憲生

博士論文の要旨

背景と目的: 我々は、マウス頭蓋冠培養系において、メカニカルストレスが間葉系細胞の骨芽細胞への分化促進と骨形成を促すことを報告し、その際に発現量が大幅に変動する遺伝子について検討してきた。メカニカルストレス負荷後早期に発現量が増加する遺伝子群の中でも、PIASx β は特に注目に値する。PIASx β は STAT 阻害活性をもつ PIAS タンパクファミリーの一員で、最初は E3 SUMO ligase として発見されたが、その後の研究により SUMO 化を介することなく作用することも可能であり、しかも転写促進にも抑制にも作用し得るという極めて多彩な作用を有することが明らかにされた。しかし、この分子の骨代謝における役割は全く知られていない。骨芽細胞の分化と石灰化に対する PIASx β の役割について明らかにするのが本研究の目的である。

方法: マウス頭蓋冠培養系へのメカニカルストレス負荷はバネにより、また細胞培養系にたいしては FlexerCell システムを用いた。骨芽細胞の分化マーカーや PIASx β 等の遺伝子発現量の測定には RT-PCR およびサザンハイブリダイゼーション法を、石灰化の測定には Alizarin Red 染色法、遺伝子発現を抑制するために siRNA 法、転写活性の測定には二重ルシフェラーゼレポーターアッセイ法を用いた。

結果と考察: マウス頭蓋冠培養系においてメカニカルストレス負荷後 6 時間で PIASx β の発現量は 5 倍に増加した。培養細胞を用いて詳細に調べたところ、PIASx β の発現量の増加は一過性でアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性上昇や osterix の発現増加と並行した。siRNA を用いて PIASx β の発現増加を抑制したところ、ALP, osterix および osteocalcin (OCN)の発現上昇、ならびに、石灰化は抑制されたが、Runx2 の発現には変化が認められなかった。また、一過性に PIASx β の発現量を増加させるとメカニカルストレス負荷と同様に ALP,osterix,OCN の発現が増加したが、Runx2 の発現量是不変であった。レポーターアッセイの結果、osterix は自身のプロモーター活性を促進すること、PIASx β は osterix のプロモーター活性を促進すること、NFATc1 および NFATc3 は、それぞれ単独では無効だが、PIASx β による osterix プロモーター活性促進効果をさらに高めることがわかった。PIASx β は Runx2 の転写活性には影響しなかった。これらの効果

は SUMO 化 (sumoylation) 活性を欠いた変異体では認められなかった。以上の結果から、PIASx β は、Runx2 の下流、osterix の上流に作用して SUMO 化依存的に osterix の転写を高めることがわかった。

結論: PIASx β は、SUMO 化依存性に osterix の転写活性を高めることにより骨芽細胞の分化と石灰化を促進する。

審査結果の要旨

本研究は、PIAS (細胞内シグナル伝達分子として重要な役割を持つ STAT の活性を抑制するタンパク) ファミリーの一員である PIASx β について以下のことを始めて明らかにした。

- ① PIASx β は、骨芽細胞の分化を促進し石灰化に寄与すること
- ② メカニカルストレス負荷による骨芽細胞の分化促進にも同じ機序が働いていること

その機序として

- ③ 転写因子 osterix のプロモーター活性を高めること
- ④ SUMO 化が必須であること
- ⑤ SUMO 化される分子の候補として NFAT や STAT の可能性を示唆したこと

さらに、osterix の転写に関する新しい知見として

- ⑥ osterix のプロモーター活性は osterix 自身によって活性化されること

これらの成果は、骨芽細胞における PIASx β の重要性を明らかにしたばかりでなく、PIAS タンパクの生理学的役割の多様性と細胞内シグナル伝達における重要性を改めて示したことにより、関連の研究を活性化することが期待される。また、PIASx β は骨形成促進薬創製のための標的分子として役立つことも期待される。以上の点において、本研究は学位論文として十分な価値があると認め、また、以下の項目について十分な理解が得られたので合格と認める。

1. 骨芽細胞の分化過程における各 PIAS の発現レベルについて
2. メカニカルストレスで PIASx β 以外に発現が上昇する遺伝子について
3. 骨芽細胞の ALP 発現における PIASx β の作用について
4. PIASx β の sumoylation-dependent, -independent manner について
5. Osterix による osterix gene-promoter への結合領域について
6. PIASx β の NFATc1, c3 の sumoylation を介した osterix 発現調節機序について
7. PIASx β 以外の PIAS が骨芽細胞の分化に関与する可能性について
8. Stat のシグナリングと PIAS1, PIAS3, PIASx α による sumoylation について