

Title	歯根膜特異的分子PLAP-1の機能解析
Author(s)	友枝, 美樹
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47576">https://hdl.handle.net/11094/47576</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	ともえだみき 友枝美樹
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 21076 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学位論文名	歯根膜特異的分子 PLAP-1 の機能解析
論文審査委員	(主査) 教授 村上 伸也 (副査) 教授 川端 重忠 助教授 永田 英樹 助教授 岡橋 暢夫

### 論文内容の要旨

#### (研究目的)

当教室では、これまでにヒト歯根膜組織遺伝子発現プロファイル解析により、歯根膜に高頻度かつ特異的に発現している新規分子 PLAP-1 (periodontal ligament associated protein-1) を単離・同定することに成功した。さらに *in situ* ハイブリダイゼーションおよびノザンプロット解析の結果 PLAP-1 が歯根膜組織特異的に発現していることを確認した。また PLAP-1 の歯根膜細胞における制御機構の検討の結果、PLAP-1 の発現は、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化過程において上昇し、且つ BMP-2 刺激によってもその発現が促進することが明らかとなった。そこで本研究では、歯根膜細胞における PLAP-1 の機能の検討を、硬組織形成細胞への分化、特に BMP-2 誘導性の歯根膜細胞分化に与える影響という観点から行うと共に、その機能発現機序をタンパクレベルで解析した。

#### (材料および方法)

1) マウス PLAP-1 遺伝子強発現 MPDL22 株の作製と同株における BMP-2 誘導性 ALPase 活性の検討: ①当教室において樹立したマウス培養歯根膜細胞株 MPDL22 にマウス PLAP-1 タンパクコード領域を組み込んだ発現ベクターを遺伝子導入し、G418 存在下にて選択培養を行い、PLAP-1 強発現株を得た。②PLAP-1 強発現株および発現ベクターのみを遺伝子導入した対照株を BMP-2 (100 ng/ml) で 24、48、72 時間刺激し、Bessey 法によりアルカリフォスファターゼ (ALPase) 活性を測定した。2) 内在性 PLAP-1 遺伝子抑制 MPDL22 株の作製と同株における BMP-2 誘導性 ALPase 活性および石灰化関連遺伝子 bone sialoprotein (BSP)・osteocalcin (OC) の発現の検討: ①MPDL22 に PLAP-1 特異的 siRNA 発現ベクターを導入し、ハイグロマイシン存在下にて選択培養し、内在性 PLAP-1 抑制株を得た。④内在性 PLAP-1 抑制株およびコントロール siRNA 発現ベクターを導入した対照株を、BMP-2 (100 ng/ml) で 24、48、72 時間刺激後、ALPase 活性を測定し、BSP・OC の発現を RT-PCR 法により解析した。3) 大腸菌由来リコンビナント PLAP-1 タンパクの作製と BMP-2 誘導性 ALPase 活性に与える影響: ①マウス PLAP-1 タンパクコード領域を組み込んだ大腸菌発現ベクター (pET29a) を構築し、大腸菌由来 S タグ融合 PLAP-1 タンパクを作製した。②同 PLAP-1 タンパクと BMP-2 をあらかじめ室温で 1 時間インキュベートした後、同混合溶液にて MPDL22 を刺激し、24、48 時間後に ALPase 活性を測定した。4) カイコ由来リコンビナント PLAP-1 タンパク作製と BMP-2 との免疫共沈: ①マウス PLAP-1 タンパクコード領域を His タグ付きプラスミドベクター: pSYNGCH\_Th に組み込み、昆虫培養細胞での相同組み換えにより PLAP-1 発現バキュロウイルスを作製した。そして、同ウイルスをカイコ

に感染させ、カラム精製することによりカイコ由来 His タグ融合 PLAP-1 タンパクを得た。抗 His 抗体にて His タグ融合 PLAP-1 と BMP-2 の混合溶液を免疫沈降し、抗 BMP-2 抗体にて BMP-2 の共沈の有無をウエスタンブロット法にて解析した。また逆に、抗 BMP-2 抗体にて His タグ融合 PLAP-1 と BMP-2 の混合溶液を免疫沈降し、抗 His 抗体にて PLAP-1 の共沈の有無をウエスタンブロット法にて解析した。5) BMP-2 と BMP レセプター (BMPR) との結合に対する競合阻害実験：抗 BMPR 抗体にて BMPR と BMP-2 の混合溶液を PLAP-1 同時添加および非添加にて免疫沈降し、抗 BMP-2 抗体にてウエスタンブロット解析を行い BMP-2 の結合量を比較した。6) PLAP-1 遺伝子変異導入株の作製と同株における BMP-2 誘導性 ALPase 活性の検討：①PLAP-1 の leucine rich repeat 5 (LRR5) 部に point mutation を導入し、アミノ酸 196 位のグルタミン酸 (E) をリジン (K) に置換した *PLAP-1<sup>E196K</sup>* 発現ベクターを作製した。同ベクターを MPDL22 に遺伝子導入し、*PLAP-1<sup>E196K</sup>* 強発現株を樹立した。②発現ベクターのみを遺伝子導入した対照株、野生型 *PLAP-1* 遺伝子を導入した *PLAP-1<sup>WT</sup>* 強発現株および *PLAP-1<sup>E196K</sup>* 強発現株を、BMP-2 (100 ng/ml) で 24、48、72 時間刺激し ALPase 活性を測定した。7) LRR5/PLAP-1 ペプチドの作製と BMP-2 誘導性 ALPase 活性に与える影響の検討：①PLAP-1 の LRR5 を含む 26 残基の合成ペプチドを作製した。②同ペプチドと BMP-2 をあらかじめ室温で 1 時間インキュベートした後、同混合溶液にて MPDL22 を刺激し、24、48 時間後に ALPase 活性を測定した。

(結果)

1) MPDL22 に *PLAP-1* 遺伝子を強発現させた結果、BMP-2 が誘導する ALPase 活性は抑制された。2) MPDL22 において内在性 *PLAP-1* 遺伝子を抑制することにより、BMP-2 が誘導する ALPase 活性の上昇はさらに促進し、*BSP・OC* 遺伝子の発現も亢進した。3) リコンビナント PLAP-1 タンパクの添加は、MPDL22 において BMP-2 が誘導する ALPase 活性を抑制した。4) 免疫共沈降解析の結果、PLAP-1 と BMP-2 が直接的に結合する事が示された。5) 競合阻害解析の結果、PLAP-1 は BMP-2 の BMPR への結合を阻害することが明らかとなった。6) *PLAP-1<sup>E196K</sup>* 強発現株では、*PLAP-1<sup>WT</sup>* 強発現株で見られる BMP-2 誘導性の ALPase 活性の抑制は認められなかった。7) LRR5/PLAP-1 ペプチドは MPDL22 において BMP-2 が誘導する ALPase 活性を抑制した。

(結論と考察)

PLAP-1 は BMP-2 と直接的に結合することによって、BMP-2 による歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を抑制していること、その機能発現には PLAP-1 の LRR5 部が重要な役割を担っていることが示唆された。これらのことから、硬組織形成能を有しながらも生理的な条件下では軟組織として機能する歯根膜組織の恒常性維持に対して、PLAP-1 は重要な役割を担う因子の一つであると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、歯根膜細胞に特徴的に発現する PLAP-1 分子が BMP-2 誘導性の歯根膜細胞分化に与える影響と、同分子の機能発現機序をタンパクレベルで解析したものである。その結果、PLAP-1 は BMP-2 と直接的に結合することによって BMP-2 による歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を抑制していること、その機能発現には PLAP-1 の leucine rich repeat 5 (LRR5) 領域が重要な役割を担っていることが明らかとなった。本研究は、硬組織形成能を有しながらも生理的な条件下では軟組織として機能する歯根膜組織の恒常性維持において、PLAP-1 は重要な役割を担う分子のひとつであることを明らかにしたものであり、博士 (歯学) の学位に値するものと認める。