

骨芽細胞における  
活性型コラーゲンジペプチド (Pro-Hyp) による  
Foxo1, Foxg1 を介した Runx2 発現誘導機構の解明

主研究指導教員：真野 博 教授  
副研究指導教員：岡崎 真理 教授  
副研究指導教員：杉田 義昭 教授

主査：須永 克佳 教授  
副査：井上 裕 教授  
副査：畑中 朋美 教授

城西大学 薬学研究科 薬科学専攻 食品機能学講座  
GKD1801 野村 佳歩

## 目次

本論文で使用した略語一覧 .....	3
総論の部 .....	5
緒言 .....	6
第1章 Pro-Hyp の細胞への取り込み機構の解析と Pro-Hyp が Foxg1, Foxo1, Runx2 の骨芽細胞内局在に与える影響 .....	14
第1節 骨芽細胞における Pro-Hyp の取り込みの検討 .....	17
第2節 Pro-Hyp 添加による Foxg1, Foxo1, Runx2 の細胞内局在の評価 .....	21
第3節 Pro-Hyp と Foxg1, Foxo1 の結合試験 .....	23
第4節 本章の小括 .....	27
第2章 Pro-Hyp が Foxg1, Foxo1, Runx2 タンパク質相互作用に与える影響 .....	30
第1節 Pro-Hyp 添加による Foxo1-Runx2 相互作用の評価 .....	32
第2節 Pro-Hyp 添加による Foxg1-Runx2 相互作用の評価 .....	34
第3節 原核細胞を用いた Foxg1-Runx2 結合領域の同定 .....	36
第4節 本章の小括 .....	40
第3章 Pro-Hyp による Foxg1, Foxo1, Runx2 を介した Runx2 P1 プロモーター の転写活性機構の解明 .....	42
第1節 mRunx2 P1 プロモーターレポータープラスミドの構築 .....	45
第2節 mRunx2 P1 プロモーター内の Pro-Hyp レスpons領域の同定 .....	47
第3節 mRunx2 P1 プロモーター内の Pro-Hyp レスpons領域に結合する Foxg1, Foxo1, Runx2 の同定 .....	51
第4節 本章の小括 .....	53
第4章 考察 .....	56
総括 .....	65
謝辞 .....	68
実験の部 .....	69
方法 .....	70
引用文献 .....	82

## 本論文で使用した略語一覧

a.a. : Amino acid  
Alp : Alkaline phosphatase  
Amp : Ampicillin  
Atf4 : Activating transcription factor 4  
Bmp : Bone Morphogenetic Protein  
Bsp : Bone sialo-protein  
CBF  $\beta$  : Core-Binding Factor Subunit Beta  
ChIP: Chromatin immunoprecipitation  
CollA1 : Collagen Type I Alpha 1 Chain  
CP : Collagen peptide  
DTT : Dithiothreitol  
EDTA : Ethylenediaminetetraacetic Acid  
F : Forward  
FITC : Fluorescein isothiocyanate  
Fox : Forkhead box  
Forkhead box c2 : Foxc2  
Foxg1 : Forkhead box g1  
Foxo1 : Forkhead box o1  
G4B : Glutathione Sepharose 4B  
GST : Glutathione S-transferase  
Histidine: His  
Hyp : Hydroxyproline  
Hyp-Gly : Hydroxyproline – Glycine  
INBA : Inhibin, beta A  
IP : Immunoprecipitation  
IPTG : Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside  
LB broth : Lactose Bouillon broth  
MMP : Matrix metalloproteinase  
MT : Mutation  
NLS : Nuclear localization domain  
Nt : nucleotide

OD : Optical density  
Opn : Osteopontin  
Osx : Osteoblast-specific transcription factor  
Pro : Proline  
PBS : Phosphate buffered saline  
Pro-Hyp : Prolyl - Hydroxyproline  
Pro-Hyp-Gly : Prolyl - Hydroxyproline - Glycine  
PVDF : PolyVinylidene DiFluoride  
QOL : Quality of life  
R : Reverse  
Runx2 : Runt-related Transcription Factor 2  
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis  
SERM : Selective estrogen receptor modulator  
siRNA : Small interfering RNA  
Slc15a : Solute Carrier 15a  
s POT : Proton-dependent oligopeptide transporter  
Smad 3: Small Phenotype Mothers Against Decapentaplegic 3  
Smad 4: Small Phenotype Mothers Against Decapentaplegic 4  
TBS : Tris Buffered Saline  
TBS-T : Tris Buffered Saline with Tween 20  
TLC : Thin Layer Chromatography  
WT : Wild type

## 総論の部

## 緒言

我が国は、超高齢社会に突入しており、特に平均寿命と健康寿命の差が大きいことが問題となっている。平成 25 年度の国民生活基礎調査によると、女性の健康寿命は 74.21 歳、男性の健康寿命は 71.19 歳である。一方で平均寿命は、女性は 86.61 歳、男性は 80.21 歳であることが報告されている。平均寿命と健康寿命の差が拡大すれば、高齢者の Quality of life (QOL) の低下や、医療費や介護給付費の増大が懸念される。したがって、疾病予防と健康増進により健康寿命と平均寿命の差の短縮を図ることが急務であると考えられる。健康寿命の終わり、すなわち介護が必要となる原因の約 20%が関節疾患や骨折等の骨格系疾患であることが報告されている<sup>1)</sup>。健康寿命の延伸には骨格系疾患の予防・改善は必須であると考えられる。

骨組織はリン酸カルシウムの結晶であるヒドロキシアパタイトが I 型コラーゲンを主体とする骨基質タンパク質に沈着し、石灰化した硬組織である。骨基質タンパク質の 9 割が I 型コラーゲンである。非コラーゲン性骨基質タンパク質にはオステオカルシンやオステオポンチンが存在する<sup>2)</sup>。骨組織は骨吸収と骨形成を営むことにより、常に再構築 (リモデリング) を繰り返している。骨形成時には、骨芽細胞は骨基質である I 型コラーゲンやオステオカルシンを分泌し、骨形成の中心的な役割を果たしている<sup>3)</sup>。骨吸収の際には、破骨細胞はヒドロキシアパタイトを分解する酸 ( $H^+$ ) と、骨基質タンパク質を分解する Matrix metalloproteinase (MMP) やカテプシン K などのプロテアーゼを分泌する<sup>4)</sup>。これらの酸 ( $H^+$ ) や MMP-1, MMP-13 のコラーゲン分解酵素により、骨基質タンパ

ク質が分解されることで体内においてコラーゲンペプチド (CP) は産生される<sup>5, 6)</sup>。したがって、骨代謝は血中に排出された CP を測定することで評価することができる。骨代謝の評価に用いられる CP には I 型コラーゲン N-テロペプチド (NTX)<sup>7)</sup>や血液中の I 型プロコラーゲン-N-プロペプチド (PINP)<sup>8)</sup>がある。NTXは N 末端側の I 型コラーゲンの分解物で血中や尿中で検出される骨吸収マーカーである。PINP は、I 型プロコラーゲンから I 型コラーゲンが生成される際に N 末端側 I 型プロコラーゲンが切断された際に、産生されるポリペプチドである。PINP は早期の骨形成の評価に用いられる。また近年では、コラーゲン由来ジペプチドの主成分である Prolyl Hydroxyproline (Pro-Hyp) が血清や尿から検出されており、骨代謝マーカーとして有用であると考えられている<sup>9, 10)</sup>。

骨形成と骨吸収の平衡関係は、骨形成に携わる骨芽細胞と骨吸収に携わる破骨細胞との間の機能的共役 (カップリング) の上に成り立っている。機能的共役は、骨吸収を調節する PTH (parathyroid hormone) や、骨形成を調節する IGF (Insulin-like growth factors) I などのカップリングファクターにより厳密に制御されている<sup>11)</sup>。このようにカップリングファクターが骨形成と骨吸収のバランスを均衡に保つことで正常な骨代謝は維持される。

しかし、加齢に伴い様々な骨組織疾患を発症するリスクが高くなる。高齢者の骨疾患は主に骨組織と軟骨組織の異常に分類される。代表的な骨組織疾患に骨粗鬆症がある。閉経によりエストロゲンの分泌量の低下により骨吸収は亢進し骨量は減少する。これを 1 型骨粗鬆症という。また、2 型骨粗鬆症はリモデリング代謝が低下し正常時より骨量が減少することで引き起こされる<sup>12)</sup>。骨粗鬆症を発症することで寝たきりとなるリスクが 1.8 倍になることが報告されている

13)。したがって、骨粗鬆症の予防は健康寿命の延伸に重要であると言える。骨粗鬆症の治療薬は骨吸収抑制薬のビスホスホネート薬や SERM (Selective estrogen receptor modulator)、骨形成促進薬の副甲状腺ホルモン薬や骨細胞が産生するスクロステチンに対する中和抗体のロモソズマブ、腸管からのカルシウム吸収を促す活性型ビタミン D<sub>3</sub> 薬など多数の骨粗鬆症治療薬が存在する<sup>14)</sup>。しかし、骨代謝を維持・改善する機能性表示食品は有効成分の β-クリプトキサンチンを含むミカンが 11 件 (2021 年 1 月現在) 登録されているが数は多くない。

高齢者に多く発症する軟骨組織の骨疾患には変形性膝関節症がある。変形性膝関節症は膝関節の軟骨同士がぶつかり合うことで、膝軟骨や半月板のかみ合わせが緩み変形や断裂を起こす。一次性の明確な発症要因は、筋力低下、加齢、肥満などのきっかけであると考えられている。二次性の発症要因として関節リウマチや膝の外傷などが原因となることがある。中でも、前十字靭帯を断裂したことのある人はそうでない人に比べ、変形性膝関節症を発症するリスクが 3.62 倍になることが報告されている<sup>15)</sup>。これらの骨疾患を予防・改善するためには、栄養、運動そして薬物療法など多方面からのアプローチが必要であると考えられる。薬の開発は盛んに行われているが、分子作用メカニズムが明らかとなっている骨格系疾患を予防・改善効果を示す機能性食品成分は報告されていない。

本研究では、骨格系疾患に対して予防・改善効果を示す CP に着目した。ヒト介入試験において、CP を経口摂取することで骨組織において骨密度改善<sup>16)</sup>や変形性膝関節症患者の症状軽減効果<sup>17)</sup>が示されている。さらに、骨格系以外にも皮膚の水分量維持<sup>18)</sup>、動脈硬化予防作用<sup>19)</sup>、褥瘡改善効果<sup>20)</sup>など様々な器官に対して CP が有用であることが報告されている。CP は機能性食品として利用さ



れている<sup>21, 22)</sup>。現在 CP を用いた機能性表示食品は Wellnex 肌。(ウェルネックス はだまる) (ニッタバイオラボ株式会社) や天使の健康 おいしいコラーゲンドリンク (森永製菓株式会社) が販売されている。しかし、現在のところ CP が骨代謝に寄与することを示した機能性表示食品は現在存在しない。

CP は、3 重らせん構造を形成する繊維状タンパク質のコラーゲンを加水分解することで生成される<sup>23)</sup>。工業的には、豚皮や魚の鱗に多く含まれているコラーゲンを、熱水抽出し精製したものを酵素で分解することで生成される<sup>24)</sup>。ヒト I 型コラーゲンは、[Glycine (Gly)-X-Y] の繰り返し配列が 360 units 存在する<sup>25)</sup>。X には Proline (Pro) 、Y には Hydroxyproline (Hyp) が当てはまることが多く、コラーゲンの一次構造の中に含まれる Pro-Hyp、Hyp-Gly の配列の多さは顕著である。360 units 中 Pro-Hyp 配列は、49 units また、Hyp-Gly 配列は 127 units 存在する。この Hyp を含むペプチド結合はプロテアーゼで切断されにくい<sup>26)</sup>。

サプリメントや食事から摂取した CP は消化・吸収され、様々なペプチドとなり、血中に検出される<sup>27)</sup>。Hyp は分量が小さいことからペプチド内において Hyp は他のアミノ酸に隠れる構造をとるため、タンパク質分解酵素が作用しにくい。したがって、Pro-Hyp や Hyp-Gly の Hyp を含むジペプチドは、血中に検出されることが確認されている<sup>28)</sup>。特に Pro-Hyp は CP を摂取した際に (0.385 g/kg 体重) ヒト血中に数百  $\mu\text{M}$  オーダー ( $C_{\text{max}} = 0.06 \pm 0.005 \text{ mM}$ ) と高濃度で検出される<sup>29)</sup>。これらの Pro-Hyp と Hyp-Gly は生理活性機能を有する活性型 CP であることが報告されている<sup>30, 31)</sup>。このように、サプリメントや食事由来から摂取した CP を外因性 CP と呼ぶ。一方、骨組織で破骨細胞によりコラーゲンが分解されることにより産生される CP を内因性 CP という。このように、CP は外因

性 CP と内因性 CP に分類される特徴的なペプチドである。本研究では、活性型 CP である Pro-Hyp の骨芽細胞分化誘導作用<sup>32)</sup>に着目した。

骨芽細胞の分化は、多数の転写調節因子により制御されている<sup>33)</sup>。中でも Runt-related transcription factor 2 (Runx2) は、骨芽細胞分化の指標となる遺伝子の Alkaline phosphatase (Alp), Collagen Type I,  $\alpha$  1 chain, オステオカルシンの発現を制御する骨形成のマスター遺伝子として知られている<sup>34, 35)</sup>。Runx2 の発現は、2 つの異なるプロモーターによって制御されている。遠位の P1 プロモーターは II 型 Runx2 (MASNS 型、Runx2 p57/P1) を産生し、近位の P2 プロモーターは I 型 (MRIPV 型、Runx2 p56/P2) を産生する<sup>36-39)</sup>。I 型 Runx2 は主に T 細胞に発現するが、II 型 Runx2 は骨特異的に発現する<sup>40)</sup>。したがって、本研究では II 型 Runx2 の発現を制御機構に着目した。II 型 Runx2 は Runx2 P1 プロモーターへ結合し転写を抑制するオートレギュレーション機構が存在する<sup>41)</sup>。また、骨形成ホメオドメインや Hox タンパク質により Runx2 P1 プロモーターの活性が誘導されることで II 型 Runx2 の発現は厳密に制御されている<sup>42, 43)</sup>。近年の研究では、Runx2 と Core-Binding Factor Subunit Beta (CBF  $\beta$ ) の相互作用を小分子の 2-Pyridyl benzimidazole AI-4-57 が抑制することで、Runx2 と *Inhibin, beta A (INHBA)* および *MMP1* プロモーターの結合を阻害することで標的遺伝子の転写を抑制することが報告されている<sup>44)</sup>。

そのほかの骨芽細胞分化調節因子として Forkhead box o1 (Foxo1) が知られている<sup>45-47)</sup>。Foxo1 は、Forkhead ファミリーに属する転写調節因子である<sup>48)</sup>。Foxo1 (残基 360-456 アミノ酸)は Runx2 (残基 242-258 アミノ酸)と結合する。その結果、Foxo1 はオステオカルシンプロモーターから Runx2 を解離させ、オステオカル

シンの転写を抑制することが報告されている<sup>49)</sup>。さらに、小分子の *N*-Heterocycle を有する合成化合物は Foxo1 による glucose -6-phosphatase の mRNA 発現誘導を抑制し、糖代謝制御を阻害することが報告されている<sup>50)</sup>。また、Forkhead ファミリーに属する Forkhead box c2 (Foxc2) も骨芽細胞分化を促進することが報告されている<sup>51)</sup>。

Pro-Hyp が骨芽細胞分化を誘導するメカニズムとして、君羅らは、Pro-Hyp が Runx2 や Osterix (Osx) の遺伝子発現を誘導し、骨芽細胞分化の指標である Alp を活性化することを報告している<sup>32)</sup>。そして、谷内らは骨芽細胞粗抽出液から Pro-Hyp 結合因子を網羅的に探索した結果、転写調節因子である Forkhead box g1 (Foxg1) を同定した<sup>52)</sup>。骨芽細胞内の Foxg1 の発現を Foxg1 siRNA を用いて抑制すると、Pro-Hyp による Runx2 さらに、Osx 遺伝子の発現誘導が見られなくなり、骨芽細胞分化も誘導されなかった。以上の結果から、Foxg1 は骨芽細胞分化誘導因子であると報告した<sup>53)</sup>。Foxg1 は Forkhead ファミリーに属する転写調節因子として知られている<sup>54)</sup>。マウス Foxg1 の残基 172-263 アミノ酸は、DNA が結合する領域であることが報告されている<sup>55)</sup>。また、Foxg1 は神経細胞の分化抑制<sup>56)</sup>や、大脳皮質の形成<sup>57,58)</sup>、内耳形成<sup>59)</sup>などの正常な器官の形成や発達に、Foxg1 の発現が必須であることが報告されている。このように Foxg1 は様々な器官の形成に必要な転写調節因子であることが知られているが、前述した報告以外に Foxg1 が骨芽細胞分化に関与する報告はない。

また、Foxg1 は Foxo1 と複合体を形成することで Cdkn1a や p21Cip1 の転写活性を制御することが報告されている<sup>60, 61)</sup>。Foxg1 と Foxo1 を含む Fox 転写調節

因子は、Fox コア配列である 5'-(A/C)AA(C/T)A-3'の配列を認識し、DNA へ結合することが報告されている<sup>62,63</sup>。

以上の報告から Foxo1-Runx2 および Foxg1-Foxo1 の複合体の形成は転写制御を行う上で重要であることが分かる。しかし、Foxg1 と Runx2 が複合体を形成するかは明らかになっていない。Foxg1 は Runx2 と複合体を形成し、この複合体の形成に Pro-Hyp 関与することで、Runx2 P1 プロモーターの活性化に関与するのではないかと推測した。

本研究では、Pro-Hyp による骨芽細胞分化誘導作用機構を明らかにすることで CP 分子作用メカニズムの一つを解明することを目的とした。第一章では、Pro-Hyp の細胞内取り込み機構と Pro-Hyp が Foxg1, Foxo1 および Runx2 の骨芽細胞内局在に与える影響について検討した。第二章では、Pro-Hyp が Foxg1, Foxo1 および Runx2 タンパク質相互作用に与える影響を明らかにすることを目的とした。最後に、第三章では Runx2 P1 プロモーターにおける Pro-Hyp レスポンスエレメントの探索を行った。そして Pro-Hyp 依存的に Pro-Hyp レスポンスエレメントに結合する転写調節因子の同定を行うことで、Pro-Hyp による分子レベルの Runx2 転写活性化機構を解明に行った (Fig. 1)。

◆ : Pro-Hyp

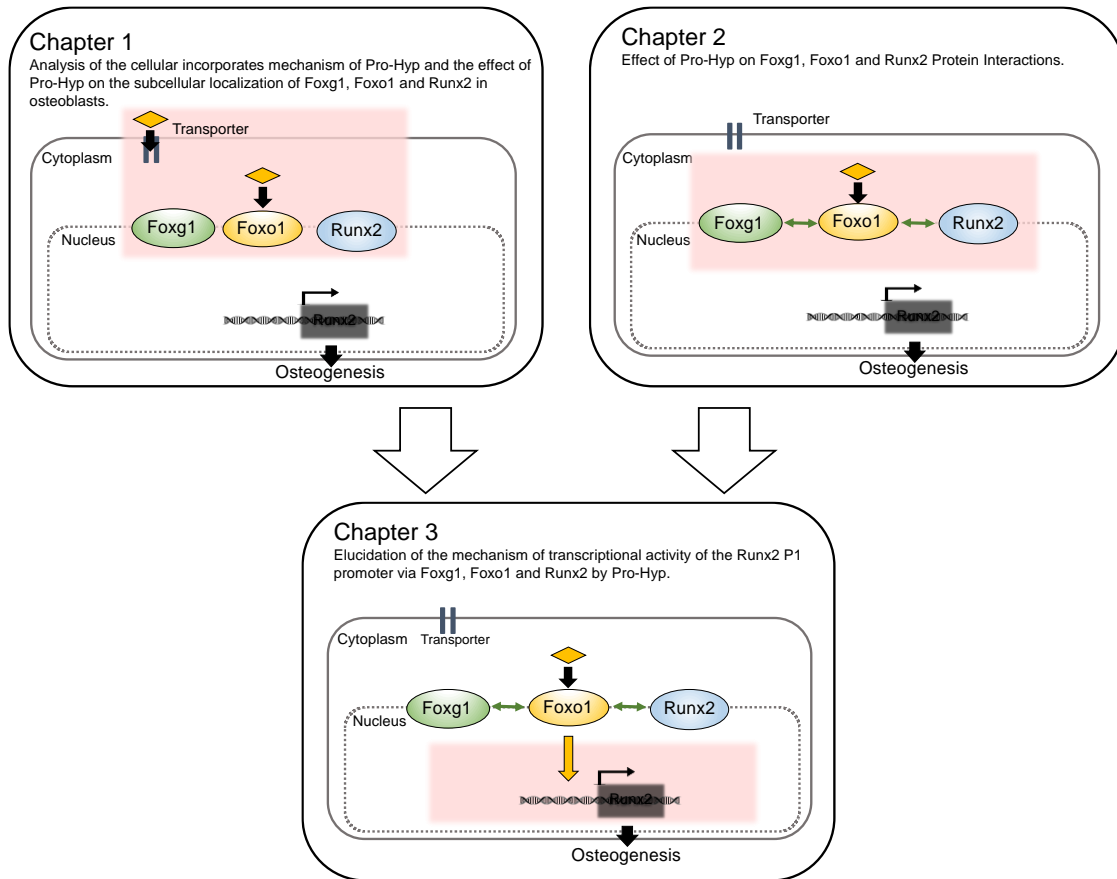


Figure1. Schematic representation of the purpose in this study.

The research content of each chapter is shown in pink.

## 第1章 Pro-Hyp の骨芽細胞への取り込み機構の解析と Pro-Hyp が Foxg1,

### Foxo1, Runx2 の骨芽細胞内局在に与える影響

活性型 CP の Pro-Hyp は、骨芽細胞分化を誘導することが報告されている<sup>32)</sup>が、詳細な分化誘導の分子作用メカニズムは明らかとなっていない。細胞レベルの分子作用メカニズムの一部として、すでに Pro-Hyp による骨芽細胞分化のマスター遺伝子である Runx2 の発現誘導に Foxg1 の発現が必須であることを報告している<sup>53)</sup>。Pro-Hyp は骨芽細胞に取り込まれ、Foxg1 に結合し Runx2 P1 プロモーターを活性化すると予想した。ペプチドの取り込みにはしばしばペプチドトランスポーターが関与する<sup>64)</sup>ことから、Pro-Hyp の骨芽細胞内への取り込みにはペプチドトランスポーターが関与することが考えられた。

ペプチドトランスポーターである Solute Carrier 15a (Slc15a) は、Proton-dependent oligopeptide transporter (s POT) ファミリーともよばれ、4 種類のメンバーとして Slc15a1 (PEPT1), Slc15a2 (PEPT2), Slc15a3 (PEPT3, PHT2), および Slc15a4 (PEPT4, PHT1) が含まれる。Slc15a ファミリーは共通してジペプチドとトリペプチドを輸送する<sup>65)</sup>。そして、Histidine peptide transporter である Slc15a3 および Slc15a4 は、ヒスチジンのようなアミノ酸輸送能も有する。特に Slc15a4 は、酸 (H<sup>+</sup>) を共役イオンとして、Histidine (His)、カルノシン ( $\beta$ -Ala-His)、および特定のオリゴペプチドを細胞質へと輸送することが報告されている<sup>66)</sup>。一方で、Slc15a1 や Slc15a2 はアミノ酸を一切輸送しない。

Pro-Hyp を添加した骨芽細胞のセルライゼートを LC/MS を用いて分析したところ、Pro-Hyp は骨芽細胞に取り込まれることが明らかとなっている<sup>67)</sup>。しかし、Pro-Hyp の取り込み機構や、骨芽細胞内における Pro-Hyp の分布は不明であ

る。小腸上皮細胞において、Pro-Hyp は Slc15a1 を介して細胞内に取り込まれることが報告されている<sup>68)</sup>。また、活性型 CP の Hyp-Gly は Slc15a4 を介して筋芽細胞内に取り込まれることが報告されている<sup>69)</sup>。そしてケラチノサイトに発現する Slc15a2 はオリゴペプチドの取り込みに関与することが報告されている<sup>70)</sup>。これらの報告から活性型 CP である Pro-Hyp は Slc15a ファミリーを介し骨芽細胞内に取り込まれると予想した。

第一節の実験では、Fluorescein isothiocyanate (FITC) を Pro-Hyp に標識した、FITC-Pro-Hyp を骨芽細胞に添加し、骨芽細胞内での FITC-Pro-Hyp の局在を検討した。次に、Pro-Hyp は Slc15a ファミリーのいずれかを介して骨芽細胞内に取り込まれていると推測したことから、骨芽細胞内に発現する Slc15a ファミリーの mRNA 発現を RT-PCR を用いて確認した。次に Pro-Hyp の取り込みに関与すると想定された、Slc15a4 の阻害剤であるヒスチジン<sup>70)</sup> を FITC-Pro-Hyp と同時に骨芽細胞に添加し、FITC-Pro-Hyp の骨芽細胞への取り込みが阻害されるか観察した。最後に、Slc15a4 をノックダウンした骨芽細胞に FITC-Pro-Hyp を添加し、FITC-Pro-Hyp の骨芽細胞への取り込みが生じるか観察した。

第二節では、Pro-Hyp を添加した骨芽細胞に発現する Foxg1, Foxo1 および Runx2 を免疫細胞染色し、骨芽細胞内に取り込まれた Pro-Hyp が転写調節因子である Foxg1, Foxo1 および Runx2 の骨芽細胞内局在に与える影響を明らかにした。

第三節では、FITC-Pro-Hyp 添加時において FITC-Pro-Hyp と Foxg1 の骨芽細胞内局在が一致したことから、Pro-Hyp は Foxg1 に結合すると推測された。そこで、(Pro-Hyp-Gly)<sub>5</sub> 連結磁気ビーズと Foxg1 リコンビナントタンパク質を用いて Binding assay を行った。さらに Pro-Hyp と Foxg1 の結合の特異性を明らかにす

るため、大量の非標識 Pro-Hyp を添加し、Competition assay を行った。Foxg1 と同族の Foxo1 も同様に Competition assay を行った。最後に、Pro-Hyp が結合した Foxg1 の立体構造の変化を Protease digest assay を用いて確認した。



## 第1節 骨芽細胞における Pro-Hyp の取り込みの検討

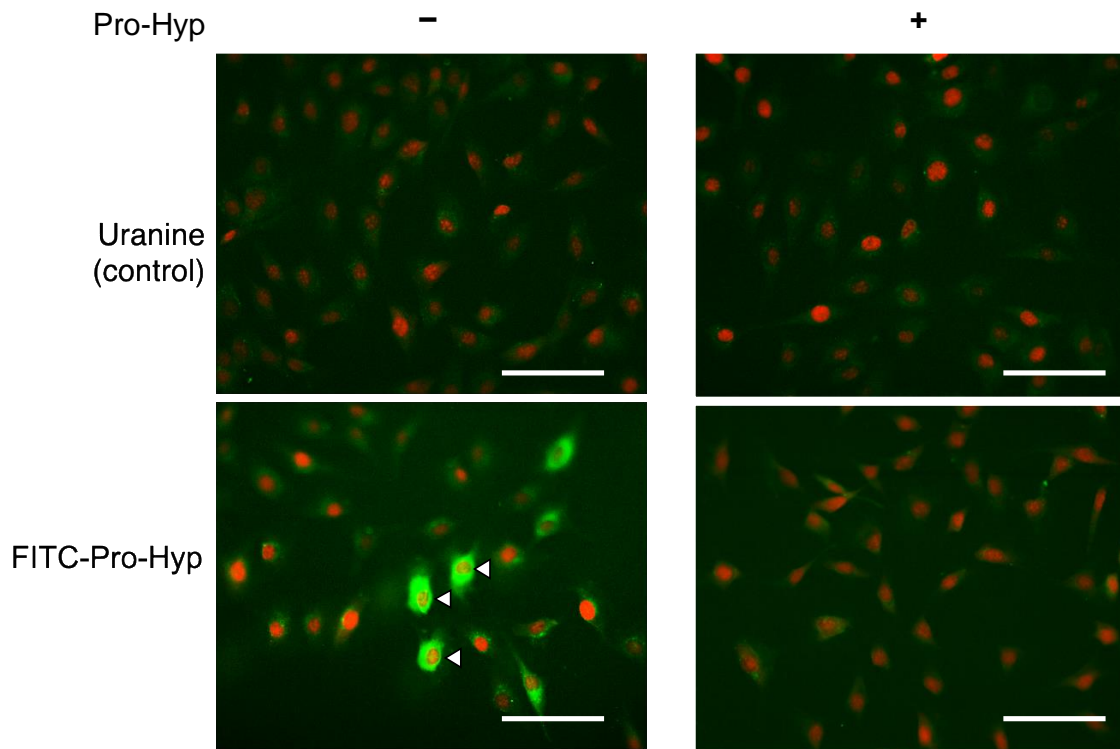
骨芽細胞内での Pro-Hyp の局在を明らかにするため、核酸や抗体やタンパク質などの蛍光ラベルに汎用される FITC を Pro-Hyp にラベルした FITC-Pro-Hyp を作製した。作製した FITC-Pro-Hyp 10  $\mu$ M を骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 に添加し観察した。また、コントロールとしてフルオレセインナトリウムであるウラニンを MC3T3-E1 に添加した。FITC-Pro-Hyp 及びウラニンはいずれも緑色蛍光を発する。核は赤色蛍光を発する Propidium iodide (PI) で染色した。

蛍光染色像を Fig. 2 に示す。すべての染色像において赤色蛍光で示された核が同程度の数存在することが確認できた。したがって、各染色像の細胞数がおおよそ一致していることが確認された。FITC-Pro-Hyp を MC3T3-E1 に添加したところ、細胞質と核に FITC-Pro-Hyp は分布した。大量の非標識 Pro-Hyp でコンペティションを実施すると、骨芽細胞への FITC-Pro-Hyp の取り込みは阻害された。コントロールのウラニンを添加したところ、非標識 Pro-Hyp によるコンペティションの有無にかかわらず、細胞内においてウラニンの緑色蛍光はほぼ確認されなかった。以上のことから、FITC-Pro-Hyp は骨芽細胞に取り込まれ、骨芽細胞内の細胞質と核内に FITC-Pro-Hyp が存在することを明らかにした。

次に、Pro-Hyp の骨芽細胞への取り込み機構を調べるために、MC3T3-E1 におけるペプチドトランスポーター遺伝子である Slc15a ファミリーの 1 から 4 の mRNA 発現を RT-PCR 法で測定した。結果を Fig. 3A に示す。MC3T3-E1 では、Slc15a4 mRNA のみ増幅された。この結果から、ペプチドトランスポーターの Slc15a4 を介して Pro-Hyp は骨芽細胞内に取り込まれていると予想した。

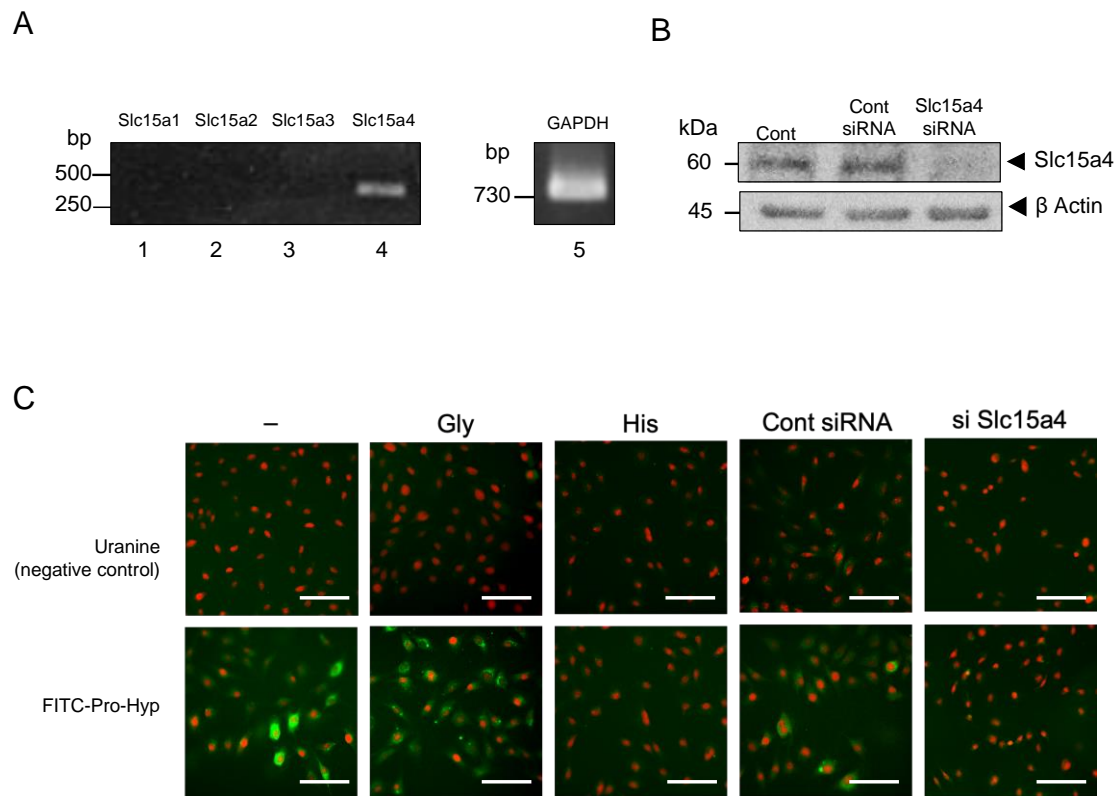
そこで、Slc15a4 の阻害剤であるヒスチジン 50 mM およびコントロールのアミノ酸としてグリシン 50 mM を FITC-Pro-Hyp 10  $\mu$ M と同時に添加した。Slc15a4 の阻害剤であるヒスチジンを FITC-Pro-Hyp と同時添加した場合は、MC3T3-E1 内において緑色蛍光は観察されなかった。一方、グリシンと FITC-Pro-Hyp を添加した場合は MC3T3-E1 内において緑の蛍光が観察され MC3T3-E1 の細胞全体に FITC-Pro-Hyp は存在していた。

最後に、MC3T3-E1 内の Slc15a4 をノックダウンし、MC3T3-E1 に FITC-Pro-Hyp を添加した。ウエスタンブロッティングを用いて Slc15a4 がノックダウンされたことを確認した (Fig. 3B)。結果、MC3T3-E1 でコントロールノックダウン処理を施した MC3T3-E1 において、FITC-Pro-Hyp の緑色蛍光は骨芽細胞内で観察されたが、Slc15a4 ノックダウンでは FITC-Pro-Hyp の緑色蛍光は観察されなかった (Fig. 3C)。また、コントロールのウラニンを MC3T3-E1 に添加したところいずれの条件においてもウラニンの緑色蛍光は観察されなかった。



**Figure 2. Pro-Hyp is incorporated into osteoblastic cell.**

MC3T3-E1 cells were treated with Uranine (green) as a control (upper panel) or fluorescein isothiocyanate-labeled Pro-Hyp (green) (lower panel) for 48 hr with or without Pro-Hyp. After incubation, cells were stained with propidium iodide (PI) (red), and representative images are shown. Images were captured using a fluorescent microscope. Scale bar, 100  $\mu$ m. The data are representative of 3 independent experiments.



**Figure 3. Pro-Hyp is incorporated into osteoblastic cell via Slc15a4.**

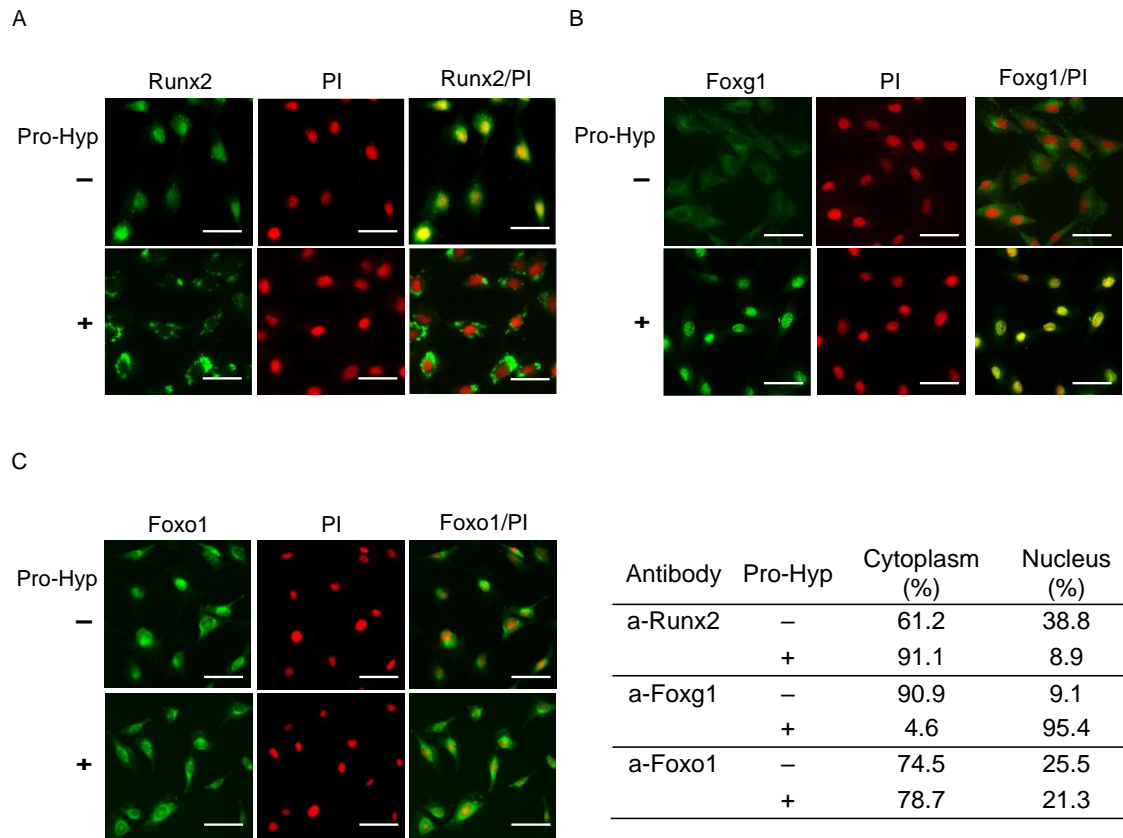
(A) We confirmed the Slc15 family as peptide transporter mRNA expression of osteoblastic cell using a reverse transcriptase polymerase chain reaction. (B) Slc15a4 was knocked down in MC3T3-E1 cells, which were then cultured for 3 days. After incubation, cell lysates were collected and expression levels of Slc15a4 was analyzed via western blotting. (C) MC3T3-E1 cells were treated with Uranine as a control (upper panel) or fluorescein isothiocyanate-labeled Pro-Hyp (lower panel) for 48 hr with or without glycine, or histidine. After incubation, cells were stained with propidium iodide (PI), and representative images are shown. Images were captured using a KEYENCE fluorescent microscope. Scale bar, 100  $\mu$ m. The data are representative of 3 independent experiments.

## 第2節 Pro-Hyp 添加による Foxg1, Foxo1, Runx2 の細胞内局在の評価

次に、骨芽細胞に取り込まれた Pro-Hyp が Foxg1、Foxo1、Runx2 の骨芽細胞内局在へ影響を与えるか免疫細胞染色を用いて調べた。

Pro-Hyp 非存在下では、Runx2 は細胞内に全体的に分布していた。Pro-Hyp の存在下では、Runx2 は主に細胞質で検出された (Fig. 4A)。Pro-Hyp 非存在下では、Foxg1 は主に細胞質で検出された。Pro-Hyp の存在下では、Foxg1 は主に核内で検出された (Fig. 4B)。また、Pro-Hyp より Foxo1 全体に存在し細胞内局在は変化しなかった (Fig. 4C)。

Fig. A-C の画像を ImageJ を用いて数値化した (Fig. 4D)。Pro-Hyp 非存在下では、検出された Runx2, Foxg1, Foxo1 は、それぞれ 61.2%, 90%, 74.5% が細胞質に局在していた。Pro-Hyp を添加することにより細胞質の Runx2 の細胞質局在は 91.1% に増加したことから、Pro-Hyp 添加により Runx2 の核内局在は減少することが明らかとなった。Foxg1 細胞質局在は 4.6% に減少し、検出した Foxg1 の 95.4% が核内で検出された。Pro-Hyp 添加により Foxg1 の核内局在は増加することが明らかとなった。Pro-Hyp 非添加時と比較して Pro-Hyp 添加時の Foxo1 の細胞内局在の割合に変化はなかった。



**Figure 4. Pro-Hyp promotes the translocation of Foxg1, Foxo1 and Runx2 in osteoblastic cell.**

Immunofluorescence staining of Runx2 (A), Foxg1 (B), and Foxo1 (C) in osteoblastic cell treated with or without Pro-Hyp. The immunolabeling was done with anti-Runx2 (green), anti-Foxg1 (green), anti-Foxo1 (green), and the nuclei were stained with propidium iodide (PI) (red) and representative images are shown. Scale bar, 50  $\mu$ m. The data are representative of 3 independent experiments. (D) Quantification of images. The rate of fluorescence intensity of transcription factor which localized to nuclei and cytoplasm.

### 第3節 Pro-Hyp と Foxg1, Foxo1 の結合試験

FITC-Pro-Hyp は Slc15a4 を介し骨芽細胞の核内と細胞質に存在した。Pro-Hyp を添加することで Foxg1 は細胞質から核内に移行し、FITC-Pro-Hyp と同様に核内に局在することから、Pro-Hyp は Foxg1 に結合すると推測した。そこで Pro-Hyp は Foxg1 に結合するかを明らかにするため、Ligand binding assay を行った。

Foxg1 は (Pro-Hyp-Gly)<sub>5</sub> 連結磁気ビーズに結合した (Fig. 5A lane 2)。Foxg1 と (Pro-Hyp-Gly)<sub>5</sub> 連結磁気ビーズの結合は、Pro-Hyp の添加により濃度に依存して解離した (Fig. 5 A lanes 2-4)。

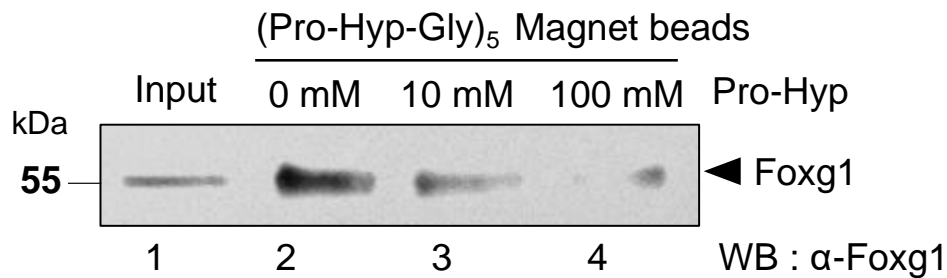
Foxg1 と同族の Foxo1 も同様に Ligand binding assay を行った。Foxo1 と (Pro-Hyp-Gly)<sub>5</sub> 連結磁気ビーズは結合した (Fig. 5B lane 6)。Foxo1 と (Pro-Hyp-Gly)<sub>5</sub> 連結磁気ビーズは、Pro-Hyp の添加により濃度に依存して解離した (Fig. 5B lanes 7 and 8)。

Pro-Hyp が Foxg1 に結合することで、Foxg1 のコンフォメーションに影響を及ぼすか明らかにするために、Protease digestion assays を行った。大腸菌を用いて調製した GST-Foxg1 をトリプシンで消化し、ウエスタンブロッティングを用いて消化断片を検出した。Pro-Hyp 非存在下および存在下における GST-Foxg1 のトリプシン感度を調べた。トリプシン未処理の GST-Foxg1 は 75 (kDa) の位置に検出された (Fig. 6 lane 1)。GST-Foxg1 にトリプシン処理を行うと Pro-Hyp 非存在下で 75 (kDa) バンドは完全に消失し、50 (kDa) がわずかに検出された (Fig. 6 lane 2)。さらに、Pro-Hyp 存在下では、同様にトリプシン未処理の GST-Foxg1 は 75 (kDa) の位置に検出された (Fig. 6 lane 3)。そしてトリプシン処理により GST-Foxg1 の 75 (kDa) バンドは消失するものの、50 (kDa) の GST-Foxg1 トリプシン

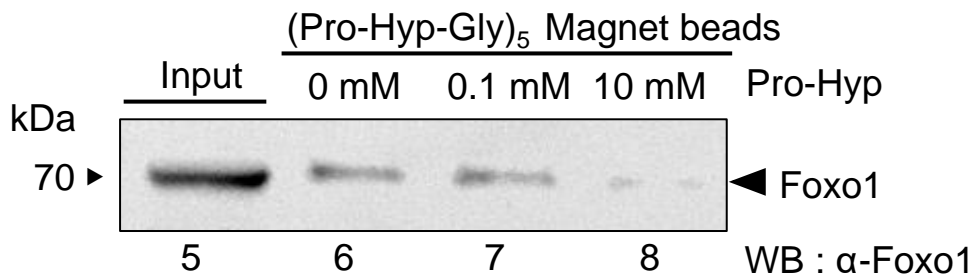
消化断片のバンドが強く検出された。さらに、薄くではあるが 30 (kDa) の GST-Foxg1 のトリプシン消化断片が検出できた (Fig. 6 lane 4)。



A

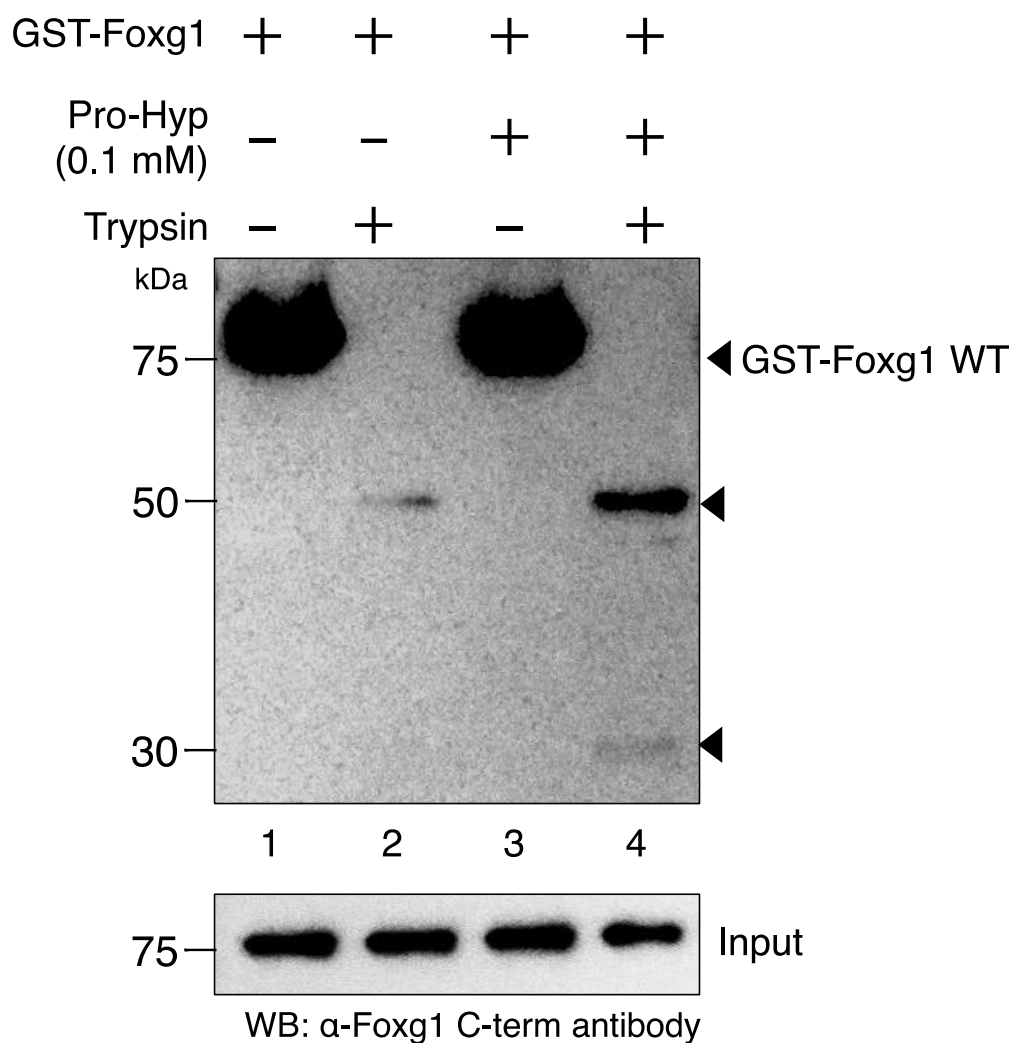


B



**Figure 5. Pro-Hyp binds to Foxg1 and Foxo1.**

Ligand binding assay. The equivalent of 0.1  $\mu$ g of cell extracts was used as input (lanes 1 and 5). Foxg1 and Foxo1 binding to (Pro-Hyp-Gly)<sub>5</sub> magnetic beads in a Pro-Hyp specific manner. Pro-Hyp was not added to lanes 2 or 6. Foxg1 or Foxo1 recombinant protein was mixed with (Pro-Hyp-Gly)<sub>5</sub> magnetic beads. (A) An excess amount of Pro-Hyp was added at a concentration of 10 mM (lane 3), and 100 mM (lane 4). (B) MC3T3-E1 extracts were mixed with (Pro-Hyp-Gly)<sub>5</sub> magnetic beads. An excess amount of Pro-Hyp was added at a concentration of 0.1 mM (lane 7), and 10 mM (lane 8). Ligand binding assay was performed, followed by Western blot analysis for Foxg1 and Foxo1.



**Figure 6. Pro-Hyp induces a Foxg1 conformational change.**

Purified GST-Foxg1 fusion protein was incubated at 37°C for two consecutive 10 min and 1 min periods of time. For the first period, Pro-Hyp was added to 0.1 mM, respectively, to lanes 3 and 4. An equal volume of water was added to lanes 1 and 2. For the second period, trypsin was added to 0.1 μg. Foxg1 was digested with trypsin and analyzed by Western blot analysis (lanes 2 and 4). Detailed methods are described in this report.

#### 第 4 節 本章の小括

第 1 章では、Pro-Hyp の骨芽細胞への取り込み機構の解析と Pro-Hyp が Foxg1, Foxo1 および Runx2 の骨芽細胞内局在に与える影響を明らかにした。本章の概要を Fig. 7 に示す。

第一節では、Pro-Hyp はペプチドトランスポーターである Slc15a4 を介して骨芽細胞に取り込まれ、核内や細胞質に存在することを明らかにした。

第二節では、骨芽細胞内に取り込まれた Pro-Hyp が Foxg1, Foxo1, Runx2 の細胞内局在に影響を与えるか免疫細胞染色で検討した。結果、Pro-Hyp は Foxg1 の細胞質から核への移行を促進した。また、Pro-Hyp は Runx2 の核から細胞質へと移行を促進した。一方、Pro-Hyp は Foxo1 の細胞内局在に影響を与えず、Foxo1 は一定数核内と細胞質に局在することを明らかにした。骨芽細胞に取り込まれた Pro-Hyp は核内と細胞質に局在した。さらに Pro-Hyp 添加により、Foxg1 は核内に移行することから、Pro-Hyp は Foxg1 に結合するのではないかと推測した。

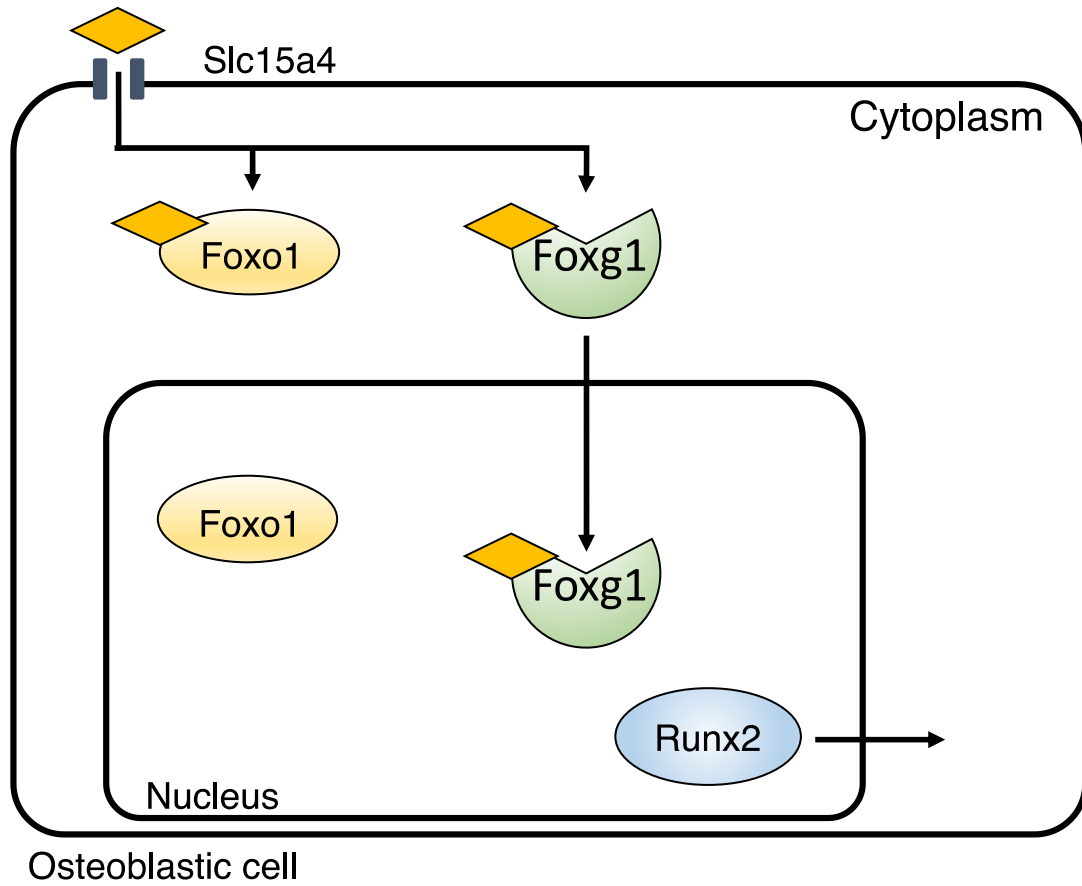
第三節では、Ligand binding assay を用いて Pro-Hyp が Foxg1 に結合するか検討した。結果、Foxg1 と (Pro-Hyp-Gly)<sub>5</sub> 連結磁気ビーズは結合し、大量の非標識 Pro-Hyp でコンペティションを実施することで (Pro-Hyp-Gly)<sub>5</sub> 連結磁気ビーズから Foxg1 は解離することから、Pro-Hyp は Foxg1 に結合することを明らかにした。Foxg1 と同族の Foxo1 も同様に Ligand binding assay を行ったところ、Foxo1 と (Pro-Hyp-Gly)<sub>5</sub> 連結磁気ビーズは結合し、大量の非標識 Pro-Hyp でコンペティションを実施することで (Pro-Hyp-Gly)<sub>5</sub> 連結磁気ビーズから Foxo1 は解離したことから、Pro-Hyp は Foxo1 特異的に結合することを明らかにした。

さらに、Foxg1 に対するトリプシンの感度を Foxg1 の C 末端側を認識する抗体

を用いて検出したところ、Pro-Hyp 存在下においてトリプシンの差動感度は低下したことから Pro-Hyp は Foxg1 の C 末端側の立体構造を変化させることが示唆された。

以上の結果から、本章では Pro-Hyp は Slc15a4 を介し骨芽細胞内に取り込まれ、Pro-Hyp が転写調節因子の Foxg1、Runx2 の細胞内局在を直接調整することを示した。特に、Foxg1 は Pro-Hyp が結合することで C 末端側の立体構造が変化することから、Pro-Hyp が Foxg1 の核内移行を惹起したと推測される。この Pro-Hyp による Foxg1、Runx2 の細胞内局在の調整が Foxg1、Foxo1、Runx2 のタンパク質相互作用に影響すると考えた。2 章では、タンパク質相互作用に Pro-Hyp が影響を及ぼすか検討した。

◆ : Pro-Hyp



**Figure 7. Schematic representation of that Foxg1, Foxo1 and Runx2 were translocated by Pro-Hyp in the osteoblastic cell.**

## 第2章 Pro-Hyp が Foxg1, Foxo1, Runx2 タンパク質相互作用に与える影響

骨芽細胞分化の初期段階において、Foxo1 は Runx2 に直接結合することで、Runx2 とオステオカルシンプロモーターとの結合を解離させ、オステオカルシンの転写を阻害することが報告されている<sup>49)</sup>。また、前立腺がん細胞において Foxo1 と Runx2 の結合が解離することで、オステオカルシン、オステオポンチンそして MMPs の転写活性化を誘導する<sup>71)</sup>。Foxo1 と Runx2 の結合領域は Foxo1 の C 末端領域の 360-456 アミノ酸と Runx2 の NLS (nuclear localization domain) の 242-258 アミノ酸の領域であることが報告されている<sup>49)</sup>。HaCaT 細胞では、Foxg1 は Foxo1-Smad に結合し、p21Cip1 の転写活性を抑制する<sup>72)</sup>。しかし、Foxg1 と Runx2 が直接的に相互作用する報告はない。

最近の研究では、2-Pyridyl benzimidazole AI-4-57 や *N*-Heterocycle などの小分子が転写調節因子の相互作用を調整することで転写を制御することが多数報告されている<sup>44, 50)</sup>。したがって、Runx2 の転写制御機構を解明するためには、小分子である Pro-Hyp が転写調節因子の相互作用を調整するか明らかにすることが重要であると考えた。骨芽細胞内に取り込まれた Pro-Hyp は Foxg1 と Foxo1 に結合することで、Foxg1 と Runx2 および Foxg1 と Foxo1 のタンパク質相互作用に影響を及ぼすと予想した。

第一節では、既に相互作用することが報告されている Foxo1 と Runx2 のタンパク質の相互作用<sup>49)</sup>に Pro-Hyp が影響を及ぼすか検討した。大腸菌と動物細胞を用いて作製したリコンビナントタンパク質でタンパク質間相互作用に Pro-Hyp が影響するか GST-pull down assay と Immunoprecipitation (IP) を用いて検討した。

第二節では、Foxg1 は Runx2 と相互作用はいまだに報告されていない。したが

って Foxg1 は Runx2 と相互作用するか GST-pull down assay と IP を用いて検討した。さらに、Pro-Hyp は Foxg1 と Runx2 の相互作用に影響を与えるか検討した。

第三節では、Foxg1 が Runx2 に結合することを初めて明らかにしたので、Foxg1 と Runx2 の結合領域を同定した。Runx2 における Foxg1 の結合領域を同定するために GST タグを付加した Runx2 のドメイン欠失変異体と Foxg1 リコンビナントタンパク質を作製し GST-pull down assay を行った。最後に Foxg1 における Runx2 結合領域を同定するために GST タグを付加した Foxg1 のドメイン欠失変異体と Runx2 リコンビナントタンパク質を作製し GST-pull down assay を行った。

## 第1節 Pro-Hyp による Foxo1-Runx2 相互作用への影響

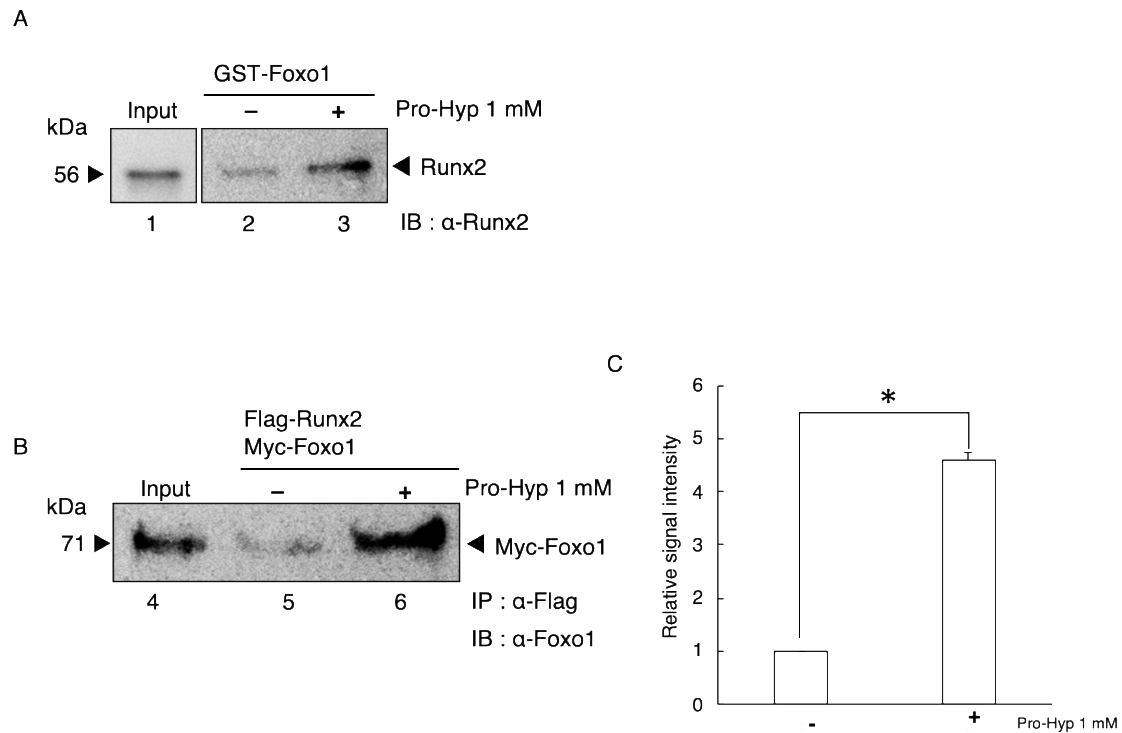
Foxo1 と Runx2 のリコンビナントタンパク質を大腸菌、および、動物細胞を用いて作製し Foxo1-Runx2 の相互作用と Pro-Hyp の影響について調べた。

Fig. 8A に示したように、GST-Foxo1 は Pro-Hyp が非存在下では、Runx2 と弱い結合を示した (Fig. 8A lane 2)。Pro-Hyp 存在下では GST-Foxo1 と Runx2 の結合は増強した (Fig. 8A lane 3)。

次に、動物細胞の核タンパク質やそのほかの細胞内タンパク質存在下において Pro-Hyp が Foxo1 と Runx2 の相互作用に影響を与えるか検討するため、トランスフェクション効率の高い HEK293T に Flag-Runx2 と Myc-Foxo1 を過剰発現した。細胞を回収し細胞抽出液を調製し Pro-Hyp の非存在下あるいは存在下において抗 Flag 抗体を用いて IP を行い、免疫複合体を回収した。回収した免疫複合体からウエスタンブロッティングを用いて Foxo1 を検出することで Pro-Hyp により Runx2 と Foxo1 の相互作用に変化が生じるか検討した。

結果、Fig. 8B に示したように、Pro-Hyp が存在しない場合、Flag-Runx2 は Myc-Foxo1 と弱い結合を示した (Fig. 8B lane 5)。Pro-Hyp の存在下では、Myc-Foxo1 と Flag-Runx2 の結合が有意に促進された (Fig. 8B lane 6, 8C)。





**Figure 8. Pro-Hyp promotes the interaction between Foxo1 and Runx2.**

(A) GST-Foxo1 with Runx2 were mixed (lanes 2 and 3). At that time, Pro-Hyp was added at a concentration of 1 mM (lane 3) and then analyzed using Western blot with the anti-Runx2 antibody. Runx2 recombinant protein extracts were used as the input (lane 1). (B) Immunoprecipitation assay (IP) assays using cell extracts from HEK293T cells overexpressing Flag-Runx2 and Myc-Foxo1 (lanes 5 and 6). At that time, Pro-Hyp was added at a concentration of 1 mM (lane 6) and then analyzed using Western blot with the anti-Foxo1 antibody. HEK293T cells overexpressing Flag-Runx2 and Myc-Foxo1 extracts were used as the input (lane 4). (C) The amount of immunoprecipitated Myc-Foxo1 was evaluated using Image J software. Data are presented as means  $\pm$  SD (n = 3). \* $p < 0.05$ .

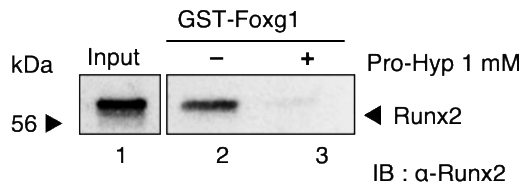
## 第2節 Pro-Hyp 添加による Foxg1-Runx2 相互作用の評価

リコンビナントタンパク質を大腸菌、および、動物細胞を用いて作製し Foxg1-Runx2 の相互作用と Pro-Hyp の影響について調べた。

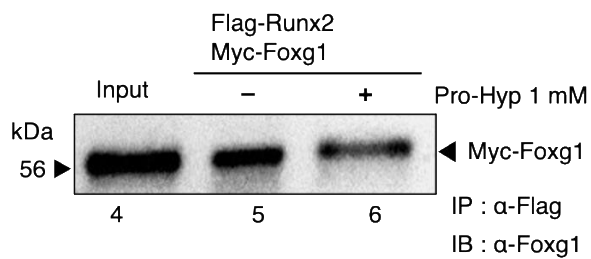
Fig. 9A に示したように、Pro-Hyp が非存在下では、GST-Foxg1 は Runx2 と強く結合した (Fig. 9A lane 6)。Pro-Hyp 存在下では、GST-Foxg1 と Runx2 の結合は減弱した (Fig. 9A lane 7)。

次に、動物細胞の核タンパク質やそのほかの細胞内タンパク質存在下において Pro-Hyp が Foxg1 と Runx2 の相互作用に影響を与えるか検討するため、HEK293T に Flag-Runx2 と Myc-Foxg1 を過剰発現した。細胞を回収し細胞抽出液を調製し Pro-Hyp の非存在下あるいは存在下において抗 Flag 抗体を用いて IP を行い、免疫複合体を回収した。回収した免疫複合体からウエスタンブロッティングを用いて Foxg1 を検出することで Pro-Hyp により Runx2 と Foxg1 の相互作用に変化が生じるか検討した。結果、Fig. 9B に示したように、Pro-Hyp 非存在下において、Flag-Runx2 と Myc-Foxg1 は強く結合した (Fig. 9B lane 5)。Pro-Hyp 存在下では、Myc-Foxg1 と Flag-Runx2 の結合は有意に減弱された (Fig. 9B lane 6, 8C)。

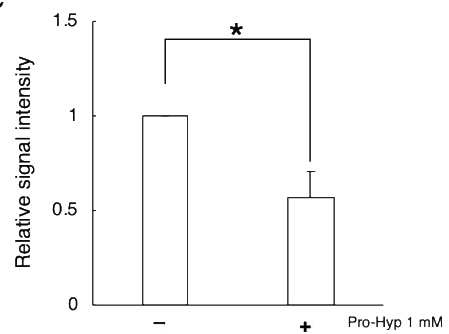
A



B



C



**Figure 9. Pro-Hyp inhibits the interaction between Foxg1 and Runx2.**

(A) GST-Foxg1 with Runx2 were mixed (lanes 2 and 3). At that time, Pro-Hyp was added at a concentration of 1 mM (lane 3). Runx2 recombinant protein extracts were used as the input (lane 1). (B) Immunoprecipitation assay (IP) assays using cell extracts from HEK293T cells overexpressing Flag-Runx2 and Myc-Foxg1 (lanes 5 and 6). At that time, Pro-Hyp was added at a concentration of 1 mM (lane 6). HEK293T cells overexpressing Flag-Runx2 and Myc-Foxg1 extracts were used as the input (lane 4). (C) The amount of immunoprecipitated Myc-Foxg1 was evaluated using Image J software. Data are presented as means  $\pm$  SD (n = 3). \* $p < 0.05$ .

### 第3節 原核細胞を用いた Foxg1-Runx2 結合領域の同定

Foxg1 と Runx2 が結合することを本研究で初めて見出したため、第3節では Foxg1 と Runx2 の結合領域を同定した。

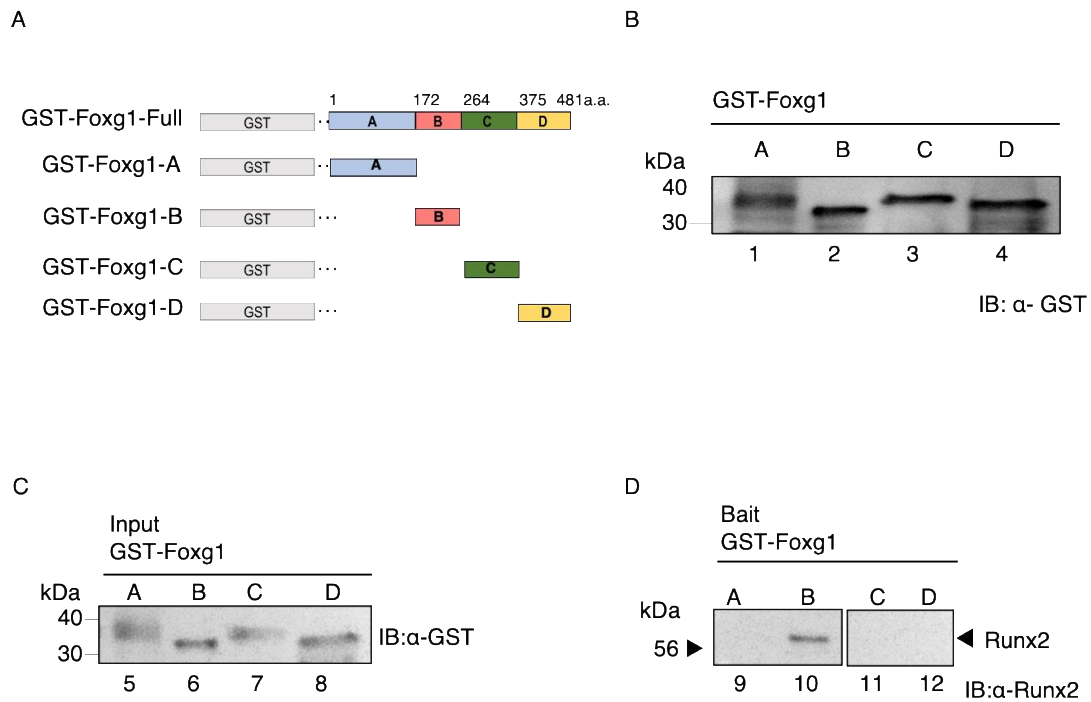
GST-Foxg1 欠失変異体組換えタンパク質 (Foxg1-A : アミノ酸 1-171、Foxg1-B : アミノ酸 172-263、Foxg1-C : アミノ酸 264-375、Foxg1-D : アミノ酸 376-481) を調製した (Fig. 10A)。ウエスタンブロットを用いて、GST-Foxg1 欠失変異体組換えタンパク質リコンビナントタンパク質の発現を確認した (Fig. 10B)。Fig. 10C に Prey として使用した GST-Foxg1 欠失変異体組換えタンパク質のインプットを示した。

Bait の GST-Foxg1 欠失変異体組換えタンパク質に Prey として Runx2 リコンビナントタンパク質をコンタクトした。GST に特異的に結合する Glutathione Sepharose 4B (G4B) ビーズを用いて GST-Foxg1 欠失変異体組換えタンパク質を回収し、Runx2 リコンビナントタンパク質が共沈されるか検討した。その結果、DNA 結合領域である GST-Foxg1-B に Runx2 が結合した (Fig. 10D lane 10)。一方で、Runx2 は GST-Foxg1-A, C および D には結合しなかった (Fig. 10D lanes 9, 11 and 12)。

次は、Runx2 における Foxg1 の結合領域を同定した。Prey に Fig. 11A に示した GST-Runx2 欠失変異体組換えタンパク質、Bait に Foxg1 リコンビナントタンパク質を用いた。GST-Runx2 欠失変異体組換えタンパク質 (Runx2-A : アミノ酸 1-93、Runx2-B : アミノ酸 94-243、Runx2-C : アミノ酸 243-360、Runx2-D : アミノ酸 361-514) の発現をウエスタンブロットを用いて確認した (Fig. 11 B)。

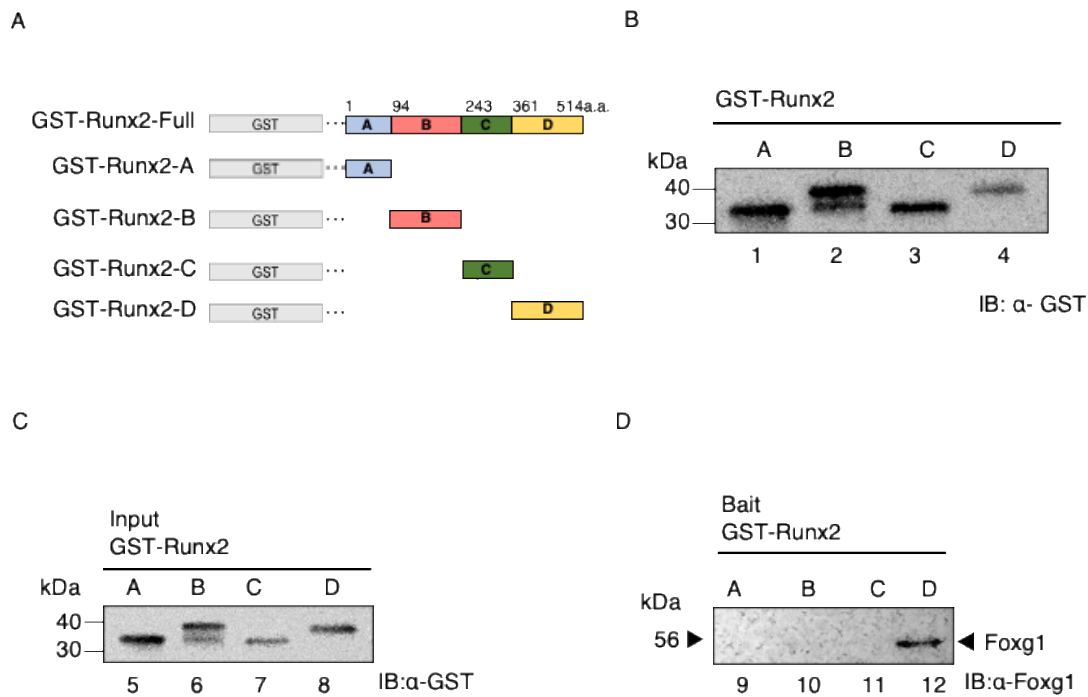
Fig. 11C に Prey として使用した GST-Runx2 欠失変異体組換えタンパク質のインプットを示した。

Bait の GST-Runx2 欠失変異体組換えタンパク質に Prey として Foxg1 をコンタクトした。その結果、C 末端の GST-Runx2-D に Foxg1 は結合した (Fig. 11D lane 10)。一方で、GST-Runx2-A, B および C に Foxg1 は結合しなかった (Fig. 11D lanes 9, 11 and 12)。



**Figure 10. Foxg1 DNA binding region interacts to Runx2.**

(A) Schematic showing the region structure of Foxg1 and the truncated mutants. The amino acid numbers of each mutant are labeled. (B) Foxg1 was divided as follows (Foxg1-A: amino acid 1–171, Foxg1-B: amino acid 172–263, Foxg1-C: amino acid 264–374, and Foxg1-D: amino acid 375–481) and GST tag was added, and *E. coli* produced a recombinant protein. We produced various GST-Foxg1 truncated mutants (GST-Foxg1-A 43 kDa (lane 1) GST-Foxg1-B 36 kDa (lane 2) GST-Foxg1-C 37 kDa (lane 3) and GST-Foxg1-D 36 kDa (lane 4) followed by immunoblot for GST. (C) The Foxg1 truncated mutant protein extracts were used as the input (lanes 5-8). (D) GST pull-down assay. The Foxg1 truncated mutants with Runx2 were mixed (lanes 9-12). They were then analyzed using Western blot analysis using the anti-Runx2 antibody.



**Figure 11. Runx2 c-terminal interacts to Foxg1.**

(A) Schematic showing the region structure of Runx2 and the truncated mutants. The amino acid numbers of each mutant are labeled. (B) Runx2 was divided as follows (Runx2-A: amino acid 1–93, Runx2-B: amino acid 94–243, Runx2-C: amino acid 243–360, and Runx2-D: amino acid 361–514) and GST tag was added, and *E. coli* produced a recombinant protein. We produced various GST- Runx2 truncated mutants (GST- Runx2-A 43 kDa (lane 1) GST- Runx2-B 36 kDa (lane 2) GST- Runx2-C 37 kDa (lane 3) and GST- Runx2-D 36 kDa (lane 4) followed by immunoblot for GST. (C) The Runx2 truncated mutant protein extracts were used as the input (lanes 5-8). (D) GST pull-down assay. The Runx2 truncated mutants with Foxg1 were mixed (lanes 9-12). They were then analyzed using Western blot analysis using the anti-Foxg1 antibody.

#### 第4節 本章の小括

第2章では Pro-Hyp が Foxg1, Foxo1 および Runx2 タンパク質相互作用に与える影響について明らかにした。概要を Fig. 12 に示す。

第一節では、Pro-Hyp は Foxo1 と Runx2 の結合を増強することを明らかにした。Pro-Hyp による相互作用の増強作用は、核および細胞タンパク質の有無は影響しなかった。この結果から、骨芽細胞内において(Pro-Hyp)-Foxo1-Runx2 の複合体が形成されると推測される。

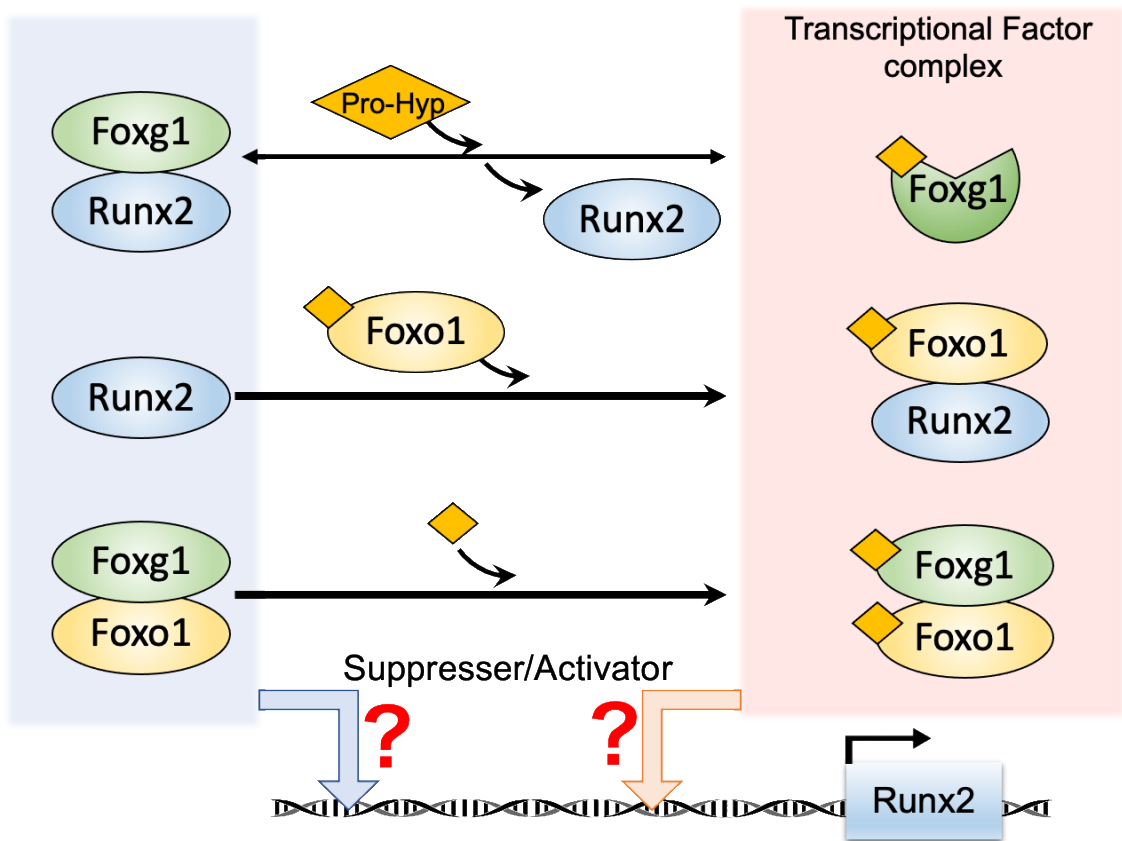
第二節では、Foxg1 と Runx2 が相互作用することを本研究で初めて見いだした。そして、Pro-Hyp は Foxg1 と Runx2 の結合を減弱することを明らかにした。Pro-Hyp による相互作用の減弱作用は、核および細胞タンパク質の有無は影響しなかった。この結果から、骨芽細胞内において(Pro-Hyp)-Foxg1-Runx2 の複合体が形成されると推測される。

第三節では、Foxg1 と Runx2 の結合領域を同定した。Foxg1 の DNA 結合ドメインと Runx2 の C 末端領域であることを初めて明らかにした。

また、1章では Pro-Hyp が Foxo1、Foxg1 に結合することを明らかにしている。したがって、骨芽細胞内に取り込まれた Pro-Hyp は、(Pro-Hyp)-Foxg1 および (Pro-Hyp)-Foxo1 の複合体を形成している可能性もあると推測される。

以上の結果から Slc15a4 を介して Pro-Hyp が骨芽細胞に取り込まれると、(Pro-Hyp)-Foxg1, (Pro-Hyp)-Foxo1 および (Pro-Hyp)-Foxo1-Runx2 が骨芽細胞内で形成されることが予想された。これらの複合体が Runx2 の転写に関与していると予想されたので第3章の研究に取り組んだ。





**Figure 12. Schematic representation of Pro-Hyp regulates protein-protein interaction.**

### 第3章 Pro-Hyp の Foxg1, Foxo1, Runx2 を介した Runx2 P1 プロモーターの転写活性機構の解明

第2章では、Pro-Hyp は Foxg1 と Runx2 の結合を抑制し、反対に Foxo1 と Runx2 の結合を促進することを明らかにした。これらの結果から Pro-Hyp 添加により骨芽細胞内で形成されたと予想される複合体を Fig. 12 に示した。これらの複合体が Pro-Hyp 依存的に Runx2 P1 プロモーターに結合することで、Runx2 の転写を活性化していると予想した。

Runx2 は、タイプ I とタイプ II の2つのアイソフォームが存在することが報告されている (Fig. 13)。タイプ I Runx2 (MRIPV 型、Runx2 p56/P2) は P2 プロモーターにより制御される。タイプ I Runx2 は主に T-cell に発現していることが報告されている<sup>36-39)</sup>。一方で、タイプ II Runx2 (MASNS 型、Runx2 p57/P1) は P1 プロモーターにより制御されて、骨芽細胞に特異的に発現する<sup>40)</sup>。P1 プロモーターはタイプ II Runx2 によりオートギュレーションされることが報告されている<sup>41)</sup>。本研究では骨芽細胞における Runx2 発現制御機構を明らかにするため、マウス Runx2 P1 プロモーターを用いて実験を実施した。

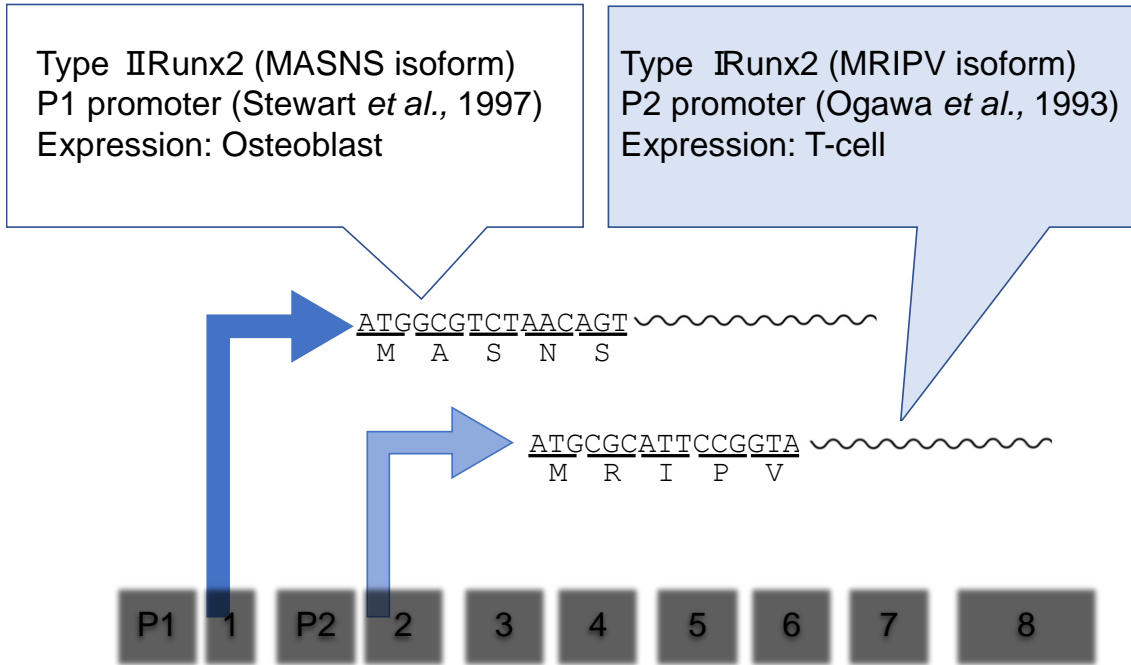
第三章では、Pro-Hyp の Foxg1, Foxo1 および Runx2 を介した Runx2 プロモーターの転写活性機構の解明を行なった。

第一節ではレポーターアッセイを行うために必要な、Runx2 P1 プロモーターをルシフェラーゼ発現用ベクターに組み込んだ、Runx2 P1 プロモーターレポータープラスミドを構築した。

第二節では構築した Runx2 P1 プロモーターレポータープラスミドを用いて Runx2 P1 プロモーターにおける Pro-Hyp 応答領域を同定した。

第三節では、クロマチン免疫沈降 qPCR を用いて Pro-Hyp 応答領域に Pro-Hyp 依存的に結合する転写調節因子の同定を行い、Foxg1, Foxo1 および Runx2 を介した Runx2 転写活性機構の解明を行なった。

## Runx2 isoform



**Figure 13. Schematic representation of Runx2 isoform.**

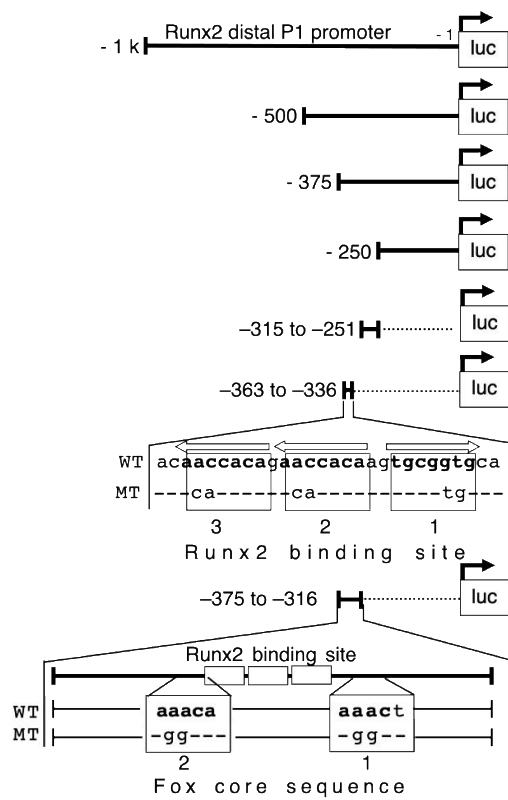
## 第1節 mRunx2 プロモーターレポータープラスミドの構築

本章では、マウス Runx2 P1 プロモーターにおける Pro-Hyp 応答エレメントを決定するために、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行う。

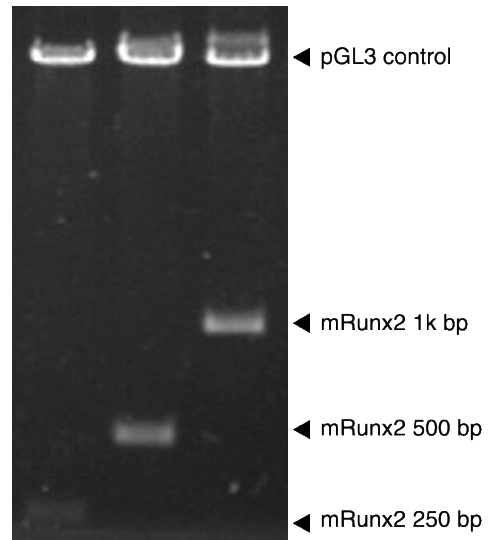
第一節では Runx2 P1 プロモーターレポータープラスミドを構築するため、MC3T3-E1 ゲノムから Runx2 P1 プロモーター(-1~-1000 bp)を増幅した。これをテンプレートに 500 bp, 375 bp および 250 bp の長さの 5'欠失変異体 Runx2 P1 プロモーターを増幅した。このフラグメントをルシフェラーゼ発現用ベクターである pGL3 cont ベクターに挿入し、Runx2 プロモーターレポータープラスミドを構築した (Fig. 14A)。作製した各プラスミドは、制限酵素を用いてフラグメントとベクターのサイズを確認後、macrogen JAPAN でシーケンス解析を行なった (Fig. 14B)。

作製したレポータープラスミドと Foxo1 および Runx2 を骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 にトランスフェクションした。その後 Pro-Hyp を骨芽細胞に添加し、ルシフェラーゼの発光量を測定した。各領域での Pro-Hyp 添加による P1 プロモーターが応答の差を測定し Runx2 P1 プロモーター 内の Pro-Hyp 応答領域を探索しました。

A



B



**Figure 14. Construction of plasmid for reporter assay.**

A, Schematic illustration of the luciferase expression vector with the Runx2 distal P1 promoter in each region inserted. Boldface nucleotides represent the Foxo consensus sequence (WT) and the Runx2-binding sequence (WT). The nucleotides surrounded by the square represent mutations introduced into the mutant variant (MT). B, Confirmation of plasmid size using restriction enzymes.

## 第2節 mRunx2 P1 プロモーター内の Pro-Hyp レスポンス領域の同定

ルシフェラーゼの発現は、1 mM Pro-Hyp 処理群では、Pro-Hyp 非存在下と比較して、-375 bp および-500 bp でそれぞれ約 2.79 倍および 3.57 倍有意に増加した ( $p < 0.05$ , Fig. 15A)。-250 bp と-1k bp では Pro-Hyp レポーター応答は変化しなかった。これらの結果から、Runx2 P1 プロモーターにおける Pro-Hyp レスポンスエレメントは、Runx2 P1 プロモーターの nt -375 から-250 間に存在すると予想した。

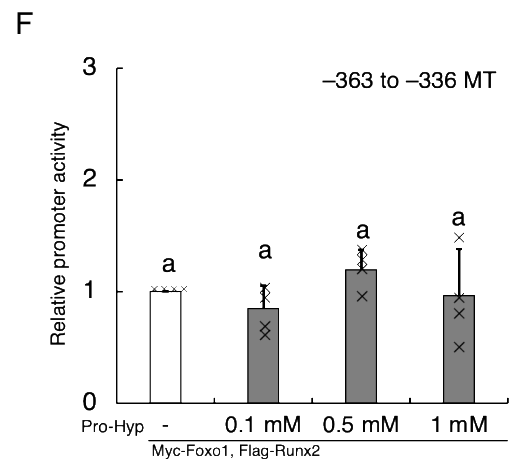
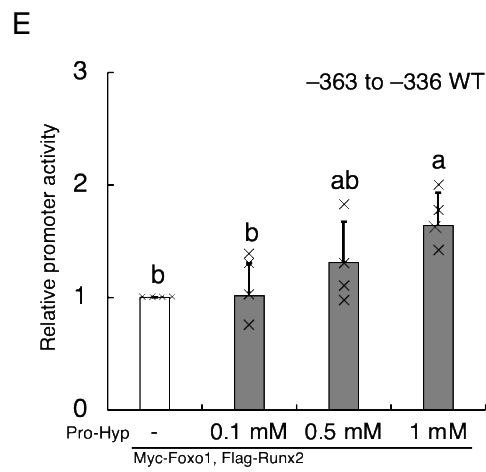
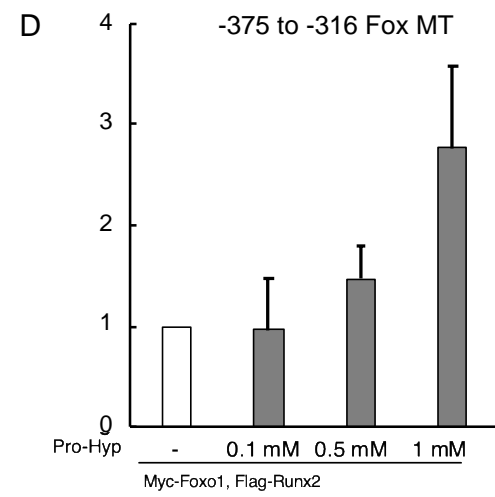
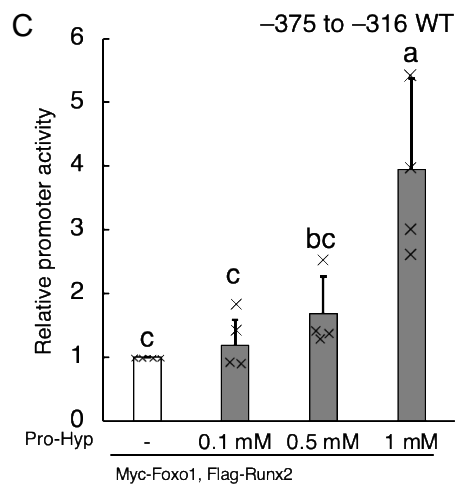
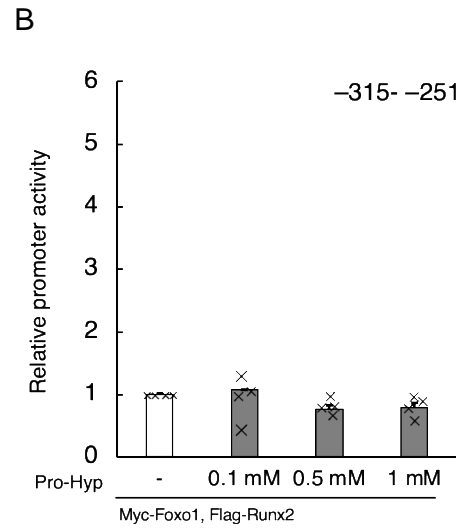
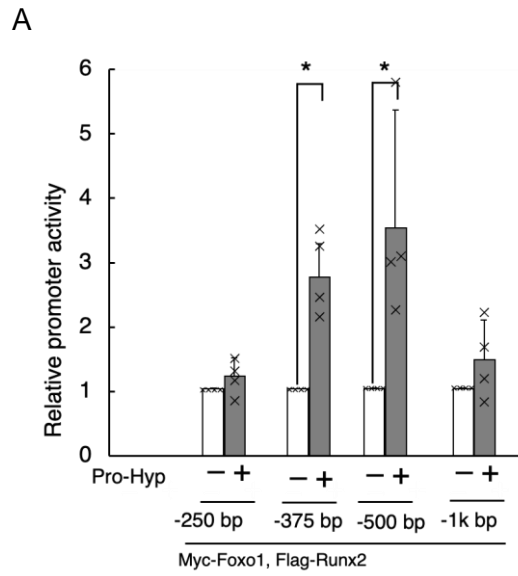
そこで、Runx2 遠位 P1 プロモーターにおける nt -375 から-250 を nt -375 から-316 と nt -315 から-251 に分け、同様にレポーターアッセイを行った。nt -315～-251 では Pro-Hyp によるレポーター応答は変化しなかった (Fig. 15B)。レポーター応答は、nt -375 から-316 のみで有意に増加した ( $p < 0.05$ , Fig. 15C)。Runx2 P1 プロモーターnt -375 から-316 には、Runx2 結合部位 (-362 から-356、-354 から-349、-344～から-332) および Fox コアシーケンス (-365 から-361、-337 から-332) が存在する (Fig. 14A)。この Runx2 結合部位と Fox コアシーケンスが Pro-Hyp による Runx2 プロモーター活性化に関与していると予想した。そこで、Fox コンセンサス配列にミューテーションを導入した nt -375 から-316 Runx2 プロモーターを、ルシフェラーゼレポータープラスミド pGL3-control に挿入し、pGL3-control -375-316 Runx2 promoter (MT)を構築した(Fig. 14A)。作製したプラスミドを用いて、レポーターアッセイを行った。その結果、Pro-Hyp によるレポーター応答は WT と比較して減少した (Fig. 15D)。

次に、Runx2 結合部位 (Runx2 binding site 1-3) をホタルルシフェラーゼレポータープラスミド pGL3-control に挿入し、pGL3-control -363-336 Runx2

promoter (WT) を構築した。このレポーターコンストラクションに 3 点突然変異 (MT) を導入し、コンセンサスの Runx2 結合配列を破壊した pGL3-control -363-336 Runx2 promoter (MT) も構築した (Fig. 15A)。これらを用いてレポーターアッセイを行った。

その結果、pGL3-control -363-336 Runx2 promoter (WT) において、1 mM の Pro-Hyp で処理した細胞のルシフェラーゼ発現は、Pro-Hyp が存在しない場合と比較して約 1.6 倍に増加した ( $p < 0.05$  Fig. 15E)。重要なことに、この増加は、pGL3-control -363-336 Runx2 promoter (MT) においては観察されなかった ( $p < 0.05$  Fig. 15F)。





**Figure 15. Identification of Pro-Hyp response element in the proximal region of the Runx2 distal P1 promoter.**

MC3T3-E1 cells were transfected with 0.1  $\mu\text{g}$  of pGL3-Runx2 distal P1 promoter DNA and 1 ng pNL DNA. Then, 48 hr later, they were treated for 48 hr with Pro-Hyp, as indicated (A-F). Luciferase activity was measured and normalized to the activity of nano luciferase.

Identification of Pro-Hyp response element of Runx2 distal P1 promoter in the proximal region (A). Mutations of the Fox core sequence in the Runx2 distal P1 promoter in the proximal region decreased the promotion of Runx2 distal P1 promoter activity by Pro-Hyp (C and D). Mutations of the Runx2 binding site in the Runx2 distal P1 promoter in the proximal region inhibits the promotion of Runx2 distal P1 promoter activity by Pro-Hyp (E and F). Significance was calculated using a Student's t-test (A) and Tukey post hoc test (B-F) with the mean error bars represent  $\pm$  standard deviation. For clarity, not all the significant differences are indicated.

### 第3節 mRunx2 P1 プロモーター内の Pro-Hyp レスポンス領域に結合する Foxg1, Foxo1, Runx2 の同定

最後に Chromatin immunoprecipitation (ChIP)を用いて、Pro-Hyp 依存的に Runx2 プロモーターに結合する転写因子を同定した。

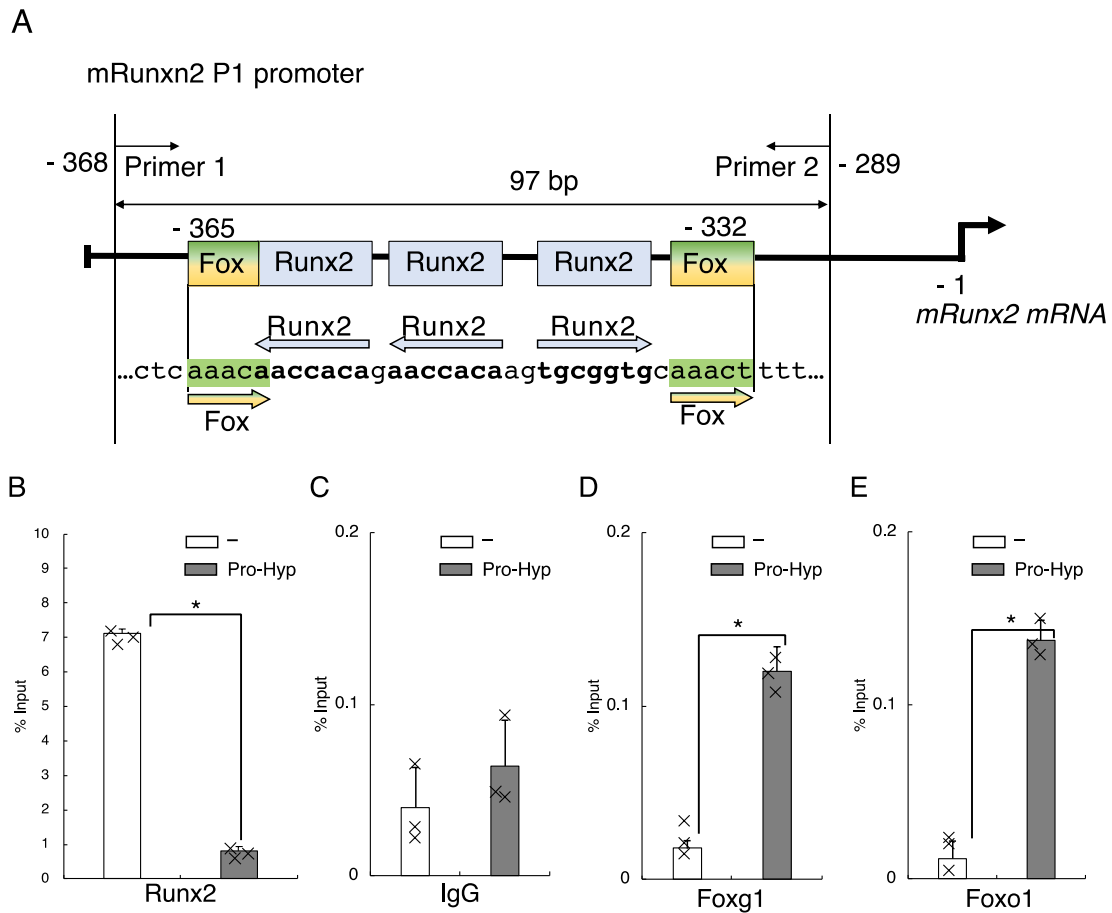
Table 1 は、ChIP DNA のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)に使用したプライマーの位置および配列を示す。Fig. 16A に増幅した Runx2 binding site と Fox コアシークエンスを二箇所含む DNA 領域の模式図を示した。

Pro-Hyp を添加した MC3T3-E1 のセルライゼイトを調製した。抗 Foxg1 抗体、抗 Foxo1 抗体、抗 Runx2 抗体、抗 IgG 抗体、を用いて免疫沈降した。そこに結合した DNA をテンプレートに Primer 1 および Primer 2 を用いて qPCR を行い、Runx2 P1 プロモーターに Foxg1、Foxo1、Runx2 が結合するか検討した。

結果、a-Runx2 抗体の免疫沈降物を用いた qPCR では、Pro-Hyp 非存在下と比較して Pro-Hyp 存在下では DNA の増幅量は有意に減少した(Fig. 16C)。a-Foxo1 抗体及び a-Foxg1 抗体の免疫沈降物を用いた qPCR では、Pro-Hyp 非存在下と比較して Pro-Hyp 存在下では DNA の増幅量は有意に増加した(Fig. 16D and E)。ネガティブコントロールの a-IgG 抗体を用いた免疫沈降物を用いた qPCR では DNA はほとんど増幅しなかった(Fig. 16B)。

Table 1  
PCR primers used in ChIP assay

Oligonucleotide name	Sequence
Primer 1	gaatgcttcattcgctcac
Primer 2	aaccatttaaacgccagagc



**Figure 16. Complex of Pro-Hyp, Foxg1, and Foxo1 binding to the proximal region of Runx2 distal P1 promoter.**

Verification of the Pro-Hyp response element in the Runx2 distal P1 promoter, including the Runx2-binding site. A, schematic representation of relevant regions of the *Runx2 distal P1 promoter* gene. P1, P2 indicate PCR primers used to analyze chromatin immunoprecipitation-quantitative polymerase chain reaction (ChIP-qPCR). The positions of these primers and the size of the fragments they amplify are indicated at the top of the figure. Chromatin immunoprecipitation-quantitative polymerase chain reaction analysis of the Runx2 distal P1 promoter in MC3T3-E1 cells. Cells were incubated with and without 1 mM Pro-Hyp for the 48 hr, followed by ChIP-qPCR analysis using a control Rabbit IgG antibody (B), Foxo1 antibody (C), Foxo1 antibody (D) or Runx2 antibody (E). Experiments were repeated three times with similar results. Data are presented as means  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ),  $*p < 0.05$ . Significance was calculated using a Student's t-test.

#### 第4章 本章の小括

本章の概要を Fig. 17 に示す。第3章では、Pro-Hyp の Foxg1, Foxo1, Runx2 を介した Runx2 プロモーターの転写活性機構の解明を行なった。

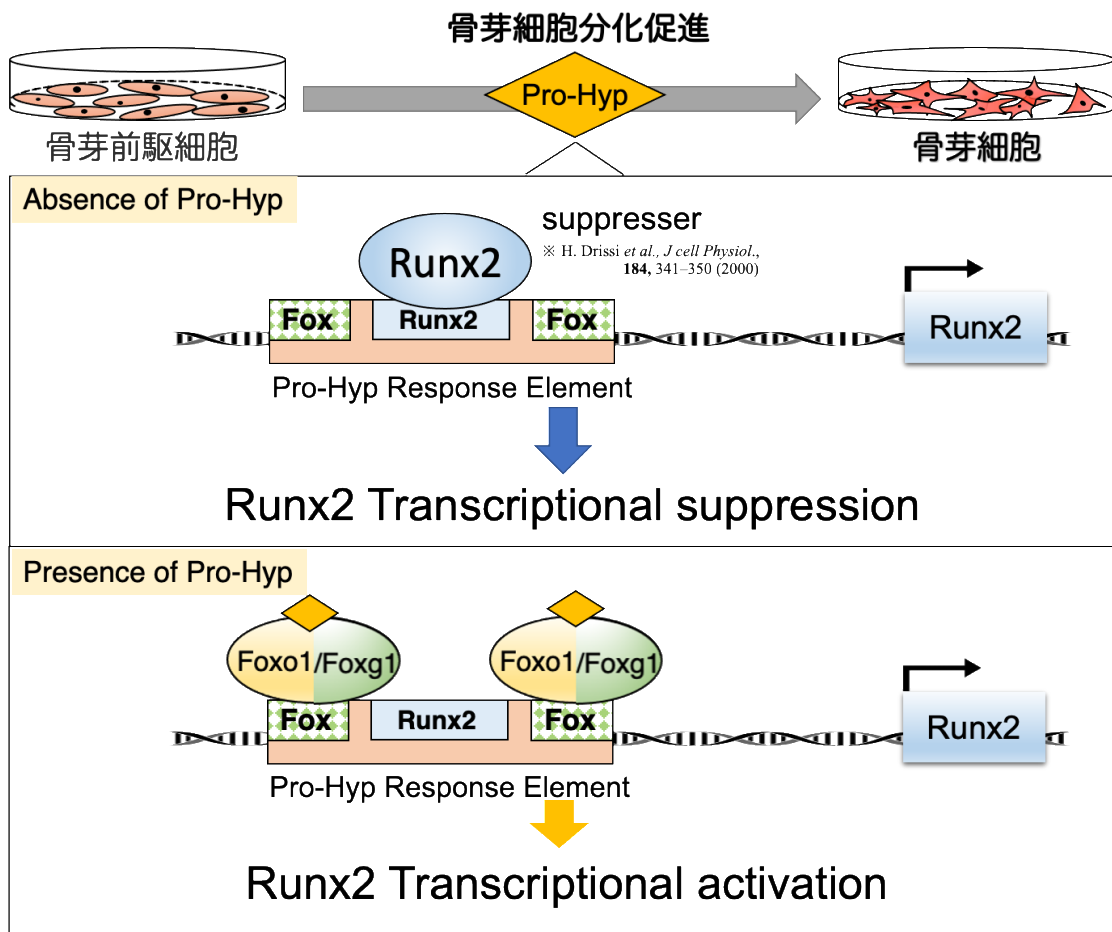
第一節ではルシフェラーゼレポーターアッセイを行うにあたり必要なレポータープラスミドを構築した。

第二節では、Runx2 P1 プロモーターの nt -365 から-332 を Pro-Hyp 応答領域として同定した。この Pro-Hyp 応答領域は、Runx2 結合部位と Fox コア配列が含まれることが明らかとなった。Runx2 結合部位には Runx2 が結合し、転写を抑制することが報告されている<sup>43)</sup>。Pro-Hyp が Runx2 と Runx2 P1 プロモーターの結合を阻害していると予想した。

第三節では Pro-Hyp 依存的に Pro-Hyp 応答領域に結合する転写因子を ChIP-qPCR 解析を用いて同定した。結果、Pro-Hyp の非存在下では Runx2 は、Runx2 P1 プロモーター内の Pro-Hyp 応答部位に結合することを明らかにした。この Runx2 と Runx2 P1 プロモーター内 Pro-Hyp 応答領域の結合は Pro-Hyp により阻害されることが明らかとなった。一方で、Foxg1 と Foxo1 は Pro-Hyp 非存在下において Runx2 P1 プロモーターに結合しなかった。Pro-Hyp 存在下において Foxg1 と Foxo1 は Runx2 P1 プロモーターの Pro-Hyp 応答部位に結合することを明らかにした。

これらの結果から、骨芽細胞における Pro-Hyp の Runx2 レポーター応答のメカニズムとして Pro-Hyp がサブプレッサーとして Runx2 P1 プロモーターの nt -365 から-332 の領域に結合している Runx2 を解離することにより、転写抑制を阻害する。さらに、Pro-Hyp は Runx2 P1 プロモーターの nt -365 から-332 の領

域に、Foxg1、Foxo1 を結合させることで Runx2 レポーター応答を活性化することを明らかにした。



**Figure17. Schematic representation of mechanism that Pro-Hyp regulates Runx2 P1 promoter.**

## 第4章 考察

我が国は、超高齢社会に突入しており、特に平均寿命と健康寿命との差が大きいことが問題となっている。平均寿命と健康寿命の差が拡大すれば、高齢者のQOLの低下や、医療費や介護給付費の増大が懸念される。したがって、疾病予防と健康増進により健康寿命と平均寿命の差の短縮を図ることが急務であると考えられる。特に、介護が必要となる原因の約20%が関節疾患や骨折等の骨格系疾患であることから、骨格系疾患の予防・改善を行うことで健康寿命の延伸に寄与したいと考えた。本研究では骨格系疾患を予防・改善効果を示すCPに着目した。CPの骨格系疾患を予防・改善する分子作用メカニズムは明らかとなっていないことから、活性型CPであるPro-Hypによる骨芽細胞分化誘導作用機構を明らかにすることを目的とした。

Pro-Hypは0.1-1 mMの濃度において骨芽細胞分化のマスター遺伝子であるRunx2の発現を誘導することで骨芽細胞分化を誘導する<sup>32)</sup>。また、0.2 mM Pro-Hypは骨芽細胞の石灰化を約1.4倍促進する<sup>68)</sup>。さらに、約1.2 mM CP化合物は、CP化合物非添加時と比べ、骨芽細胞の石灰化を約2.75倍促進する<sup>76)</sup>。主にコラーゲンはPro-Hypに分解されることが明らかになっている<sup>28)</sup>。実際、CPを経口摂取(0.385 g/kg 体重)すると血中にPro-Hypが約0.1 mMと高濃度で検出されることが報告されている<sup>75)</sup>。以上の報告から0.1-1 mM Pro-Hypは骨芽細胞分化を誘導する濃度であると判断し、なおかつ体内でも存在し得る濃度であると考えた。したがって本研究ではPro-Hypは0.1-1 mMの濃度で使用した。



ラットを用いた研究では、経口摂取した $[^{14}\text{C}]$ Pro-Hyp は、骨芽細胞や破骨細胞に分布することが明らかとなっている<sup>77)</sup>。この報告から経口摂取した CP は Pro-Hyp に分解され、骨芽細胞に取り込まれることで骨芽細胞の分化を誘導すると考えられる。したがって、Pro-Hyp は骨芽細胞内に取り込まれ骨形成を誘導するカップリングファクターとして機能するのではないかと考えた。しかし、Pro-Hyp の取り込みに用いられるトランスポーターは明らかとなっていない。そこで第1章では、Pro-Hyp の細胞への取り込み機構の解析と Pro-Hyp が Foxg1, Foxo1 および Runx2 の骨芽細胞内局在に与える影響を明らかにした。

Pro-Hyp は Slc15a4 を介して骨芽細胞に取り込まれ、骨芽細胞の核内と細胞質に局在することを明らかにした。小腸上皮細胞では、Pro-Hyp は Slc15a1 を介して細胞内に取り込まれることが報告されている<sup>65)</sup>。これらの結果から、Pro-Hyp を細胞内に取り込むために用いられるトランスポーターは、標的細胞に依存することが示唆された。骨組織において、破骨細胞は酸 ( $\text{H}^+$ ) やペプチダーゼを分泌し、コラーゲンをはじめとする骨基質タンパク質を分解する。この際に Pro-Hyp は産生される。Slc15a4 はプロトン駆動性ペプチドトランスポーターであることから、破骨細胞が分泌した  $\text{H}^+$  が、Slc15a4 を介した Pro-Hyp の骨芽細胞への取り込みを誘導するのではないかと推測した。

近年の研究では、小分子が転写調節因子の複合体形成を抑制することで、標的遺伝子の転写を制御することが多数報告されている<sup>63, 64)</sup>。これらの報告から、骨芽細胞内に取り込まれた Pro-Hyp が Runx2 の転写に関与する Foxo1 と Runx2 の相互作用を調整することで Runx2 の転写を制御する小分子として機能する可能性があるかと推測した。

そこで、骨芽細胞における Foxg1、Foxo1 および Runx2 の細胞内局在に Pro-Hyp が影響を与えるか検討した。その結果、Pro-Hyp は Foxg1 の細胞質から核内への移行を誘導した。そして Pro-Hyp 添加時の Foxg1 の立体構造が変化するか検討したところ、Pro-Hyp は Foxg1 に結合することで Foxg1 の C 末端側の立体構造が変化することを見出した<sup>78)</sup>。アミノ酸置換により引き起こされる Foxg1 の立体構造変化は、Foxg1 を核内に凝集することが報告されている<sup>79)</sup>。よって、Pro-Hyp が Foxg1 に結合することにより引き起こされる Foxg1 の C 末端側の立体構造の変化は、骨芽細胞内での Foxg1 の局在に影響を与えた可能性があると考えられる。核内に局在する Foxg1 は転写調節因子として働くが、細胞質に局在する Foxg1 は不活性型であり、プロテオソーム分解を受けることが報告されている<sup>80)</sup>。よって、Pro-Hyp により核内に移行された Foxg1 は Runx2 の転写制御に関与していると考えた。

Pro-Hyp は、Runx2 の核から細胞質への移行を誘導した。Runx2 はリン酸化されることにより、核外へ移行することが多数報告されている<sup>81, 82)</sup>。Pro-Hyp が Runx2 をリン酸化するか否かは、今後さらなる検討が必要であると考えられる。Pro-Hyp は Foxo1 の細胞内局在に影響を与えず、Foxo1 は骨芽細胞の核内と細胞質の両方に局在していた。これらの結果から、Pro-Hyp は Foxg1、Runx2 の骨芽細胞内局在を調節し Runx2 転写を誘導するのではないかと予想した。

第 2 章では、骨芽細胞内に取り込まれた Pro-Hyp が Foxg1, Foxo1, Runx2 タンパク質相互作用に与える影響について検討した。本章では Pro-Hyp が Foxg1 と Runx2 の結合を抑制することを明らかにした。これは、Pro-Hyp が Foxg1 に結合することにより生じる Foxg1 の C 末端側の立体構造の変化により、Foxg1 と

Runx2 の結合を解離させた可能性がある」と推察される。また、Foxg1 と Runx2 の結合領域は Foxg1 の DNA 結合ドメインと Runx2 の核マトリックスターゲティングシグナル (NMTS) を含む C 末端領域であることを明らかにした。Runx2 の NMTS は、核内で他の転写調節因子と結合することで、Runx2 を核内に留めることが報告されている<sup>82)</sup>。この報告から、Pro-Hyp が Runx2 と Foxg1 の結合を解離することは、Runx2 の核内から細胞質への移行を誘導すると考えられる。この仮説は、第 1 章で得られた骨芽細胞に取り込まれた Pro-Hyp が Runx2 の核から細胞質への移行を誘導する知見と一致する。また、Pro-Hyp が Runx2 を Foxg1 の DNA 結合ドメインから解離することは、Foxg1 の DNA への結合を容易にする」と推測される。

Pro-Hyp は Foxo1 と Runx2 の結合を促進することを明らかにした。Drissi ら<sup>41)</sup> は、Runx2 タンパク質が Runx2 P1 プロモーターに結合することで Runx2 の転写活性を抑制することを報告している。また、Foxo1 は Runx2 に結合し、Runx2 とオステオカルシンプロモーターの結合を解離することで、オステオカルシンの転写を抑制することが明らかとなっている<sup>49)</sup>。これらの報告から Pro-Hyp による Foxo1 と Runx2 の結合の増強は、Runx2 P1 プロモーターから Runx2 の解離を引き起こし Runx2 タンパク質のオートレギュレーションを排除した可能性があると考えられた。以上の結果から、Pro-Hyp は Foxg1 と Runx2 の結合を解離し、反対に Foxo1 と Runx2 の結合を促進することで Foxg1, Foxo1 および Runx2 転写因子の Runx2 P1 プロモーターへの結合を調整し、Runx2 の転写を活性化していると予想した。

第3章では、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、Runx2 P1 プロモーターの Pro-Hyp 応答領域の同定を行った。以前、Pro-Hyp は Foxg1 を介して骨芽細胞の分化を促進することを報告している<sup>52)</sup>。その際、Pro-Hyp は Foxg1 mRNA 発現を約3倍に増加することを見出した。一方で Pro-Hyp は Foxo1 mRNA 発現には影響を与えないことを明らかにした。そこで、ルシフェラーゼレポーターアッセイでは Pro-Hyp を介した Foxg1, Foxo1 および Runx2 の Runx2 P1 プロモーターへの影響を明らかにするために、Myc-Foxo1 と Flag-Runx2 を骨芽細胞に過剰発現させ、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。結果、Pro-Hyp 応答領域として Runx2 P1 プロモーターの nt -365 から -332 を同定した。

同定した Runx2 P1 プロモーターの Pro-Hyp 応答領域には、三ヶ所の Runx2 結合部位 (オートレギュレーションサイト) と二ヶ所の Fox コア配列が含まれていた。この Runx2 結合部位にミューテーションを挿入すると完全に Pro-Hyp レスポンスが見られなくなった。この結果は、Pro-Hyp レポーター応答に Runx2 P1 プロモーターから Runx2 が解離するステップが非常に重要であることを示している。また Fox コアシークエンスにミューテーションを挿入すると Pro-Hyp レスポンスが減弱することから Pro-Hyp レポーター応答には Fox コアシークエンスの存在も重要であると考えられる。そして、同定した Pro-Hyp 応答領域はマウスとヒトの両方に完全に保管されている。したがって、骨代謝制御を行う上でこの Pro-Hyp 応答領域の配列は重要であると推察された。

次に Pro-Hyp 依存的に Pro-Hyp 応答領域に結合する転写因子を ChIP-qPCR 解析を用いて同定した。結果、Pro-Hyp の非存在下では Runx2 は、Runx2 P1 プロモーター内の Pro-Hyp 応答部位に結合し、Foxg1 と Foxo1 は Runx2 P1 プロモ-

ター内の Pro-Hyp 応答部位に結合しないことを明らかにした。Pro-Hyp 存在下では、反対に Pro-Hyp は Runx2 を Runx2 P1 プロモーターの Pro-Hyp 応答領域から解離させ、Pro-Hyp は Foxg1 と Foxo1 の Pro-Hyp 応答領域への結合を促進した。Foxo1 は Runx2 に結合することで、オステオカルシンプロモーターに結合する Runx2 をプロモーターから解離することが報告されている<sup>49)</sup>。本研究では、Pro-Hyp が Foxo1 と Runx2 の結合を促進することを明らかにした。さらに Pro-Hyp は Runx2 を Runx2 P1 プロモーターから解離させることを見出した。これらの結果を統合すると、Pro-Hyp が核内に局在している Foxo1 とオートレギュレーションしている Runx2 の結合を促進することで、Runx2 のオートレギュレーションを排除したと考えられた。その後、Pro-Hyp は Foxg1 と Foxo1 を Pro-Hyp 応答領域の Fox コアシーケンスへ結合させることで Runx2 の転写を活性化すると考えられる。

本研究では、活性型 CP である Pro-Hyp による骨芽細胞分化誘導の分子作用メカニズムを明らかにした。Pro-Hyp は、骨芽細胞において Foxg1 と Foxo1 を介して Runx2 P1 プロモーターを活性化することで、Runx2 の転写を誘導することを明らかにした。内因性および外因性 Pro-Hyp は、骨芽細胞を誘導するカップリングファクターとして機能しているのではないかと推察した。また、活性型 CP である Hyp-Gly は破骨細胞を抑制することが報告されている<sup>84)</sup>。したがって、Pro-Hyp は骨形成を誘導し、Hyp-Gly は骨吸収を誘導することで骨形成と骨吸収のバランスを保っていると予想される。この結果は、活性型 CP は骨代謝において重要な役割を果たしており、骨代謝制御の調節を解明する上で重要な知見となる可能性がある。

Pro-Hyp をはじめとする活性型 CP は、生体内の骨組織、皮膚、腱などに多く含まれるコラーゲンが分解されることにより産生され、種々の細胞へ分化・増殖を促すシグナルを送るホルモンのような作用を有する。体内で活性型 CP の産生が不足した場合は、サプリメントとして補完することにより活性型 CP に分解され必要な組織に到達し、分化や増殖が必要な細胞へシグナルを送ることができる。このように CP は栄養素のような一面を持ち分化や増殖が必要な組織や器官において有益な効果を示すと考えられる。

CP はカルシウムやビタミン D<sub>3</sub> と同時に摂取することで CP 単独摂取群と比較して骨密度の減少を有意に抑制することが報告されている<sup>85)</sup>。したがって、骨密度が減少傾向である対象者に対して CP 摂取を推奨する際には、管理栄養士の視点からカルシウムを多く含む乳製品、骨ごと食べられる小魚、大豆製品やビタミン D<sub>3</sub> を多く含むサケ・マグロ・サバなどの魚、牛のレバー・バター・チーズ、きのこ類の摂取を提案する必要があると考えた。また、食事からの摂取が困難であればサプリメントから摂取するように提案したい。

以前は摂取した CP は生体の器官再生の材料になると考えられていたこともあったが、近年の研究により特定の活性型 CP に分解され、生体内でシグナル分子として機能することが明らかとなった。CP は骨芽細胞分化誘導作用以外に血糖値の上昇抑制作用<sup>85)</sup>、筋芽細胞分化促進作用<sup>66)</sup>することが報告されている。さらに、Pro-Hyp は褐色脂肪細胞分化誘導する<sup>91)</sup>ことが報告されている。

CP 摂取することで先述した生理機能を全てに作用することはなく、不調が生じている器官に対して有益な効果をもたらすことから、目的の器官において活

性型 CP がシグナル分子として機能するか否かを決定するメカニズムについてはさらなる研究が必要である。

本研究では、ジペプチドの Pro-Hyp が Foxo1 や Foxg1 を介して転写制御を行うことを明らかにした。この Pro-Hyp による転写制御は骨代謝制御の他の器官にも起こりうると予想される。

例えば、Foxo1 は膵β細胞の新生、増殖、分化そして脱分化を調節することでインスリンの代謝作用の重要な役割を担っている<sup>87)</sup>。また、Foxo1 は糖新生や解糖に関わる酵素の発現も制御しており、全身の糖代謝や脂質代謝を制御している<sup>87)</sup>。また、脂肪組織において Foxo1 は、白色脂肪細胞の分化調節に加えて、褐色脂肪細胞におけるエネルギー代謝も調節している<sup>89)</sup>。さらに骨格筋細胞の分化調節や骨格筋萎縮にも深く関与している<sup>90)</sup>。Pro-Hyp が Foxo1 および Foxg1 を介して転写制御することで骨代謝を調整するように、Pro-Hyp が Foxo1 を介して転写制御することで糖代謝、脂質代謝そして骨格筋細胞分化を調整すると推測される。実際に、Pro-Hyp とわずかに類似している構造である Foxo1 阻害剤が glucose-6-phosphatase の mRNA 発現誘導を抑制し、糖代謝制御を阻害することが報告されている<sup>50)</sup>。また、Pro-Hyp が PGC1α プロモーターを活性化することで褐色脂肪細胞分化を誘導することが示唆されている<sup>91)</sup>。

したがって、ジペプチドによる転写制御は骨代謝にとどまらず、糖代謝や脂質代謝、筋代謝制御にも関与するのではないかと考えられる。そして、Foxo1 を軸にした Pro-Hyp による転写制御で臓器間の代謝ネットワークの異常を改善することが可能となれば、CP を用いて日本人の多くが罹患する糖尿病や肥満症そし

てロコモティブシンドロームの発症予防に寄与し、健康寿命の延伸に貢献できるのではないか期待される。



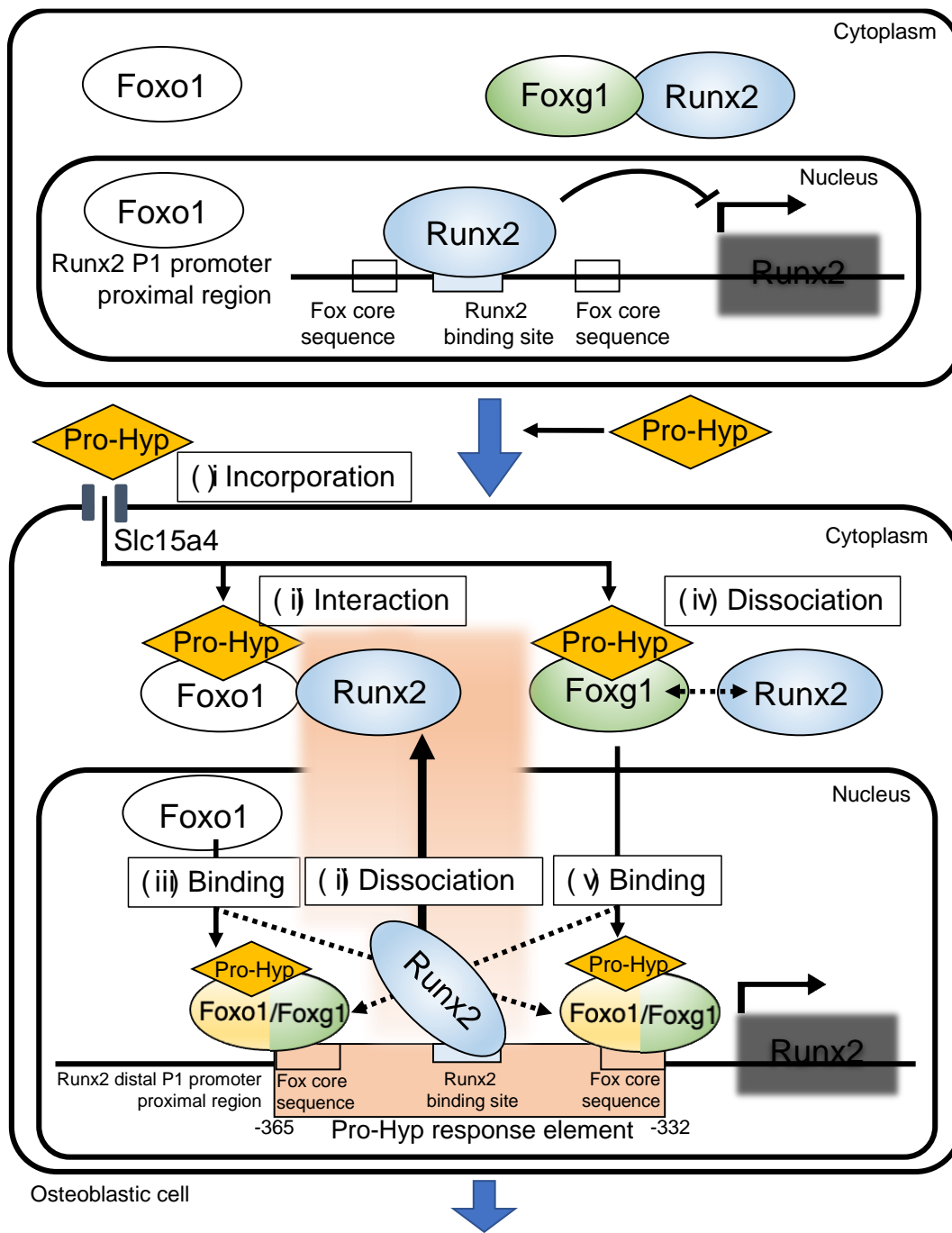
## 総括

Fig. 18 に骨芽細胞の分化過程における Pro-Hyp の Runx2 発現誘導の分子作用メカニズムを示した。骨芽細胞において、活性型コラーゲン由来ジペプチド Pro-Hyp の非存在下では、Runx2 は Runx2 遠位 P1 プロモーター近位領域に結合し、Runx2 mRNA の発現を抑制する。そして、Foxg1 は細胞質に局在し、Runx2 と Foxo1 は細胞質と核の両方に局在する。

内因性及び外因性の CP は Pro-Hyp に分解される。骨組織に到達した Pro-Hyp は、(i) Slc15a4 を介して骨芽細胞に取り込まれ核内と細胞質に局在する。(ii) Pro-Hyp は Foxo1 に結合し、Runx2 P1 プロモーターに結合する Runx2 と結合することで、Runx2 を Runx2 プロモーターから解離させる。形成された Runx2-Foxo1 ヘテロ二量体は細胞質に局在する。(iii) 核内に局在する Foxo1 は Runx2 P1 プロモーターの Pro-Hyp 応答領域に結合する。(iv) Pro-Hyp は Foxg1 に結合し立体構造を変化させることで、Foxg1 と Runx2 の相互作用を解離する。(v) 解離した Foxg1 は細胞質から核に移動し、Runx2 P1 プロモーターの Pro-Hyp 応答領域に結合する。その結果、Runx2 プロモーター活性が誘導される。

以上が本研究により解明した Pro-Hyp による Foxg1 および Foxo1 を介した Runx2 mRNA 発現誘導機構である。正常な骨代謝が行われると破骨細胞により骨基質のコラーゲンが分解され CP が産生される。産生された活性型 CP はカップリングファクターとして働き、Pro-Hyp は骨芽細胞分化を誘導し、Hyp-Gly は破骨細胞を抑制すると考えられる。加齢などの原因により骨吸収が低下する

と CP の産生量が低下し、結果的に骨代謝が低回転化するのではないかと考えられる。そこで骨組織で不足する CP をサプリメントから補完することで、**Pro-Hyp** をはじめとする活性型 CP が骨組織に到達し骨代謝回転を促し、骨形成を誘導するのではないかと推察された。この結果は、骨代謝調節の制御を解明する上で重要なものとなる可能性がある。活性型 CP は骨代謝に重要な役割を果たしていると考えられる。



**Figure 18 Molecular model of Pro-Hyp regulates Runx2 expression.**

Schematic illustration of the mechanism that Pro-Hyp promotes Runx2 P1 promoter activity through Foxg1 and Foxo1.

## 謝辞

本研究に際し、素晴らしいテーマを与えていただくと共に、終始ご指導ならびにご鞭撻を賜りました城西大学大学院 薬学研究科 医療栄養学専攻 食品機能学講座 真野 博先生に深甚なる謝意を表します。

本論文の審査過程において、ご閲覧とご教示を賜りました城西大学大学院薬学研究科 薬品作用学講座 岡崎 真理先生、城西大学大学院薬学研究科 生物有機化学研究室講座 杉田 義昭先生に謹んで感謝申し上げます。

本学位論文作成にあたり、ご閲覧とご教示を賜りました城西大学大学院薬学研究科 薬物療法学講座 須永 克佳先生、城西大学大学院薬学研究科 栄養治療学講座 井上 裕先生、並びに、城西大学大学院薬学研究科 生化学講座 畑中 朋美先生に謹んで感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、丁寧かつ熱心なご指導ならびにご鞭撻を賜りました東京農業大学 武山 健一先生に厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、有益なご助言並びにご激励賜りました城西大学薬学部医療栄養学科食品機能学講座 君羅 好史先生、大澤 吉弘先生、城西大学大学院薬学研究科医療栄養学専攻食毒性学講座 清水 純先生、城西大学薬学部薬科学科機能性食品科学講座 中谷 祥恵先生に感謝の意を表します。

本研究に際し、有益なご助言並びにご激励賜りました新田ゼラチン株式会社 杉原 富人様、小泉 聖子様、井上 直樹様、松下 綾様に感謝の意を表します。

ご協力いただきました、城西大学薬学部医療栄養学科食品機能学研究室の方々、城西大学大学院薬学研究科医療栄養学専攻の方々感謝致します。

最後に、終始温かく見守って下さった城西大学大学院薬学研究科医療栄養学専攻食品機能学講座関連諸氏並びに、大学院博士課程へ進学する機会を与えてくださり、9年間支えていただいた家族のご理解の下で本研究を遂行できましたことを厚く御礼申し上げます。

## 実験の部

# 実験の部

## 第1章

### 細胞培養

マウス頭蓋冠由来細胞 (MC3T3-E1) を、10%ウシ胎児血清 (Gibco) と 100 U/mL ペニシリンを添加した  $\alpha$ -modified Eagle's medium (a-MEM) 培地を用いて 37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。

### FITC 標識 Pro-Hyp の調製

Pro-Hyp (Bachem) (20 mg) を 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> 溶液 1 mL に溶解した。1 mL の *N,N*-ジメチルホルムアミド中の 40 mg の FITC を Pro-Hyp 溶液に加えた。混合物をアルミ箔で遮蔽し、室温で 2 時間保持し、薄層クロマトグラフィー (T.L.C.) を用いて反応を観察した。FITC 標識 Pro-Hyp は、クロロホルム : メタノール : 酢酸 (3:1:0.1) 溶媒系を用いた分取 T.L.C.プレートをを用いて精製した (収率 42.1 mg, 79.9%)。FITC 標識 Pro-Hyp の構造を <sup>1</sup>H-および <sup>13</sup>C-NMR により同定した。

### 競合阻害アッセイ

Pro-Hyp が骨芽細胞内に取り込まれるか検討を行うため、Slc15a4 の阻害剤であるヒスチジンをを用いて競合阻害アッセイを行った。培養した MC3T3-E1 細胞に、FITC 標識 Pro-Hyp (10 $\mu$ M) または、ネガティブコントロールとしてウラニン(東京化成工業株式会社、東京) (10 $\mu$ M) を添加した。同時に、Pro-Hyp (50

mM)、グリシン (Sigma) (50 mM)、ヒスチジン (Sigma) (50 mM)、または 48 時間滅菌水 (コントロール) を、MC3T3-E1 に処理した。PBS (-) (ニッスイ) で 3 回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで固定した。固定後、核はヨウ化プロピジウム (東京化成工業株式会社) (1:1000) を用いて染色した。細胞は、蛍光顕微鏡 (KEYENCE) を用いて観察した。

### RT-PCR

MC3T3-E1 からの RNA 抽出は、RNeasy Mini Kit (Qiagen) をもちいて製造者マニュアルに従い行った。得られた total RNA から PrimeScript RT Master Mix (タカラバイオ) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。cDNA をテンプレートとして、PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (Takara) を用いて、Slc15a1-4 の mRNA 発現量を測定した。RT-PCR 解析装置は、GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) を使用した。DNA の増幅に用いたプライマー配列は Table 2 に示した。

Table 2 Primers used for RT-PCR.

	Forward (5'→3')	Reverse (3'→5')
Slc15a1	CTGGCGAAAAGCAGTACACA	CAGAAGCAATGAGGCAAACA
Slc15a2	GGATGACAGCCATCAGGTTT	TGCTAGATGGTGCCTGAGAA
Slc15a3	CTGTGATGGTGACCCTGTG	GGGATCTGCCACCAGATAGA
Slc15a4	GCCTTGGAGTCTTTCAGCAA	AGAACATCCCCACAGCAATC
GAPDH	CCCATCACCATCTTCCAGGA	TGTCATACCAGGAAATGAGC

### MC3T3-E1 への siRNA 導入

MC3T3-E1 細胞を 8 well チャンバープレートに播種し 10%FBS を含む  $\alpha$ -MEM 中で培養した。リポフェクタミン試薬 (ライフテクノロジーズ社) を用い

て Slc15a4 またはコントロール siRNA (10 nM) を一過性にトランスフェクトした後、FITC-Pro-Hyp (10  $\mu$ M) または Uranine (10  $\mu$ M) (ネガティブコントロール) で培養した。

### 免疫細胞染色

MC3T3-E1 を 48 時間 0.1 mM Pro-Hyp を含む培地で培養した。4%パラホルムアルデヒドで 5 分間固定した後、細胞を Anti-FOXG1 抗体 (ab18259) (abcam)、Anti-Runx2 (cat. no. 12556), FoxO1 (C29H4) Rabbit mAb (cat. no. 2880) (Cell Signaling Technology) の一次抗体を 4°Cで一晩インキュベートした。その後、4°Cで抗 and Anti-Alexa Fluor® 488 (cat. no.4412) (Cell Signaling Technology)を一晩インキュベートした。核は、さらにヨウ化プロピジウム (1:1000) を用いて染色した。骨芽細胞は蛍光顕微鏡 (KEYENCE、大阪、日本) を用いて観察した。染色面積は、画像解析ソフト (ImageJ) を用いて算出した。

### Western blotting

各項目に記述した調整したサンプルを用いて SDS-PAGE を行った。電気泳動後、ゲルを Trans blot (Bio Rad) に転写し、5%スキムミルク溶液を用いてブロッキング処理 (室温、1 時間) を施した。一次抗体には、SLC15A4 Antibody (NBP1-87279) (NOVUSBIO)、Anti-FOXG1 抗体 (ab18259) (abcam), FoxO1 (C29H4) Rabbit mAb (cat. no. 2880) (Cell Signaling Technology) を用いた。二次抗体反応には、Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (#7074) (Cell Signaling Technology)を用いた。反応後、ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare)で発光した。撮影は WSE-



5200 (Atto) を用いて行った。

### リコンビナントタンパク質の調製

作製した GST-Foxg1 プラスミドをタンパク質発現用大腸菌である BL21(Bio Labs) に形質転換し、濁度が 0.6 (OD 600) になるまで 37°C で振とう培養 (180 rpm) した。IPTG (0.4 mM) を添加し、28°C の LB 培地で 3 時間振とう培養 (180 rpm) し、タンパク質の発現誘導を行った。タンパク質を含む大腸菌を回収後、PBSP バッファー (137 mM NaCl、10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、2.7 mM KCl、1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10% Glycerol、1 mM DTT、プロテアーゼ阻害剤、1 mM PMSF) で大腸菌を溶解し、超音波ホモジナイザーを用いて細胞を破碎した。Tritone 20 を加え、4°C で 30 分間転倒混和した。転倒混和後、5 分間遠心分離後 (7500 rpm)、上清を回収し組換えタンパク質を回収した。調製した組換えタンパク質 5 µl にレムリーバッファーを 5 µl 添加し、5 分間 98°C で煮沸した。このサンプルをウエスタンブロットに供した。

### Ligand binding assay

(Pro-Hyp-Gly)<sub>5</sub> 連結磁気ビーズ (玉川精機) を、結合緩衝液 (150 mM KCl、10 mM HEPES [pH = 7.8]、1 mM EDTA [Dojindo]、10% グリセロール [Sigma]、1 mM DTT [Wako]、プロテアーゼ阻害剤錠タブレット [Roche]) で平衡化し、Foxg1 もしくは Foxo1 リコンビナントタンパク質 2 mg を含有する粗抽出液と、遊離の Pro-Hyp を 0.1 mM、1 mM または 10 mM の濃度で添加し、攪拌しながら、4°C で一晩インキュベートした。インキュベート後、結合緩衝液で 3 回

洗浄した後、(Pro-Hyp-Gly)<sub>5</sub> 連結磁気ビーズに結合したタンパク質にレムリーバッファーを 5  $\mu$ l 添加し、5 分間 98°C で煮沸した。このサンプルをウエスタンブロットに供した。

#### Protease digestion assays

精製した 2 mg の GST-Foxg1 にトリプシン (豚膵臓由来質量分析グレード, Wako) を 0.1  $\mu$ g 加え、37°C で 1 分間インキュベートした。この時、終濃度 0.5 mM となるよう Pro-Hyp を添加した。速やかに氷上にて酵素反応を停止した。その後、10  $\mu$ L のレムリーバッファーを添加し、5 分間 98°C で煮沸して反応を終了させた。その後、消化断片の検出はウエスタンブロッティングに供した。

## 第 2 章

### リコンビナントタンパク質の調製

リコンビナントタンパク質は 1 章と同様に行なった。GST-Foxo1, GST-Foxg1, GST-Runx2、Foxg1 を A-D の 4 つの領域に分けた GST-Foxg1A-D、Runx2 を A-D の 4 つの領域に分けた GST-Runx2A-D を調製した。GST-Foxg1A-D と GST-Runx2A-D の領域構造は Fig. 10A、Fig. 11A 示した。

### GST-pull down assay

GST-pull down assay を行うために Bait と Prey のリコンビナントタンパク質を調整した。Bait は GST タグを付加したリコンビナントタンパク質を使用した。Bait と Prey を混和した後、GST に特異的に結合する G4B ビーズを用いて Bait を回収し、沈降物中に Prey が存在するか明らかにすることで Bait と Prey 間の相互作用の有無を明らかにした。本実験で使用した Bait と Prey の組み合わせを Table 3 に示した。Bait と Prey を混和し 4°C で 2 時間インキュベートした。同時に、Pro-Hyp を終濃度 1 mM となるよう添加し、タンパク質間相互作用に及ぼす Pro-Hyp の影響を検討した。インキュベート後、G 4 B ビーズ(GE Health care) を混和し 4 °C で穏やかに攪拌することで Bait を回収した。回収後、レジンを PBSP バッファーで 3 回洗浄した。その後レムリーバッファーを 10 µl 添加し 95°C で 10 分間煮沸することにより Bait と Prey を溶出した。これを沈降サンプルとし、ウエスタンブロットティングに供した。

Table 3 Recombinant protein as Bait and Prey used for GST-pull down assay.

Bait	Prey
GST-Foxo1	Runx2
GST-Foxg1	Runx2
GST-Foxg1-A	Runx2
GST-Foxg1-B	Runx2
GST-Foxg1-C	Runx2
GST-Runx2-A	Foxg1
GST-Runx2-B	Foxg1
GST-Runx2-C	Foxg1
GST-Runx2-D	Foxg1

### Immunoprecipitation

HEK293 細胞に pRK7-Myc-Runx2 と pRK7-Flag-Foxo1 または pRK7-Flag-Foxg1 をコトランスフェクションし、Myc-Runx2 と Flag-Foxo1、または Flag-Foxg1 を過剰発現した。48 時間後、細胞抽出バッファー (15 mM KCl、10 mM HEPES[pH = 7.8]、1 mM EDTA [Dojindo]、10%グリセロール [Sigma]、1 mM DTT [Wako]、0.25 mM PMSF [Wako]、プロテアーゼ阻害剤錠タブレット [Roche]) を用いて細胞内タンパク質を抽出した。その細胞抽出液を 15,000 rpm、4 °C で 5 分間遠心分離した。得られた上清と Anti-FLAG M2 affinity Gel (Sigma Aldrich) を混和し 4 °C で穏やかに攪拌させることで反応させた。反応後、レジンを細胞抽出バッファーで 3 回洗浄し、レムリーバッファーを 20 µl 添加し 95°C で 10 分間煮沸することにより免疫沈降物を溶出させた。これを免疫沈降サンプルとし、ウエスタンブロッティングに供した。

### Western blotting

ウエスタンブロッティング は一章と同様に行った。抗体は、一次抗体に、

Anti-FOXG1 抗体 (ab18259) (abcam)、Anti-Runx2 (cat. no. 12556), anti-Foxo1 (cat. no. 2880) (Cell Signaling Technology) を使用し、二次抗体反応には、HRP 標識抗ラビット IgG 抗体 (Cell Signaling Technology) を用いた。GST の検出には Anti-GST HRP Conjugate (GE health care) を使用した。

#### 統計解析

全てのデータは、平均値 (mean) ± 標準誤差 (SD) で示した。統計解析は 2 群間の比較に t-検定を行い、 $P < 0.05$  で有意差ありとした。

### 第3章

#### 遺伝子のプロモーター配列のクローニング

MC3T3-E1 の cDNA をテンプレートに Table 4 に示したプライマーを用いて各 Runx2 プロモーター遺伝子のプロモーター配列を増幅した。pGL3 cont-Runx2 promoter -315 to -251 と pGL3 cont-Runx2 promoter -363 to -336 のフラグメントは、Table 5 に示したオリゴをアニーリングし作製した。In-Fusion® HD Cloning Kit (TAKARA) を利用し、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を有する pGL3 control ベクター (Promega) へ挿入した。各プロモーターフラグメントは、Xho I と Sma I で処理した pGL3 control ベクターを用いた。In-Fusion® HD Cloning の反応は、製造者マニュアルに従って行った。

クローニングしたプラスミドを、ヒートショック法にて 5-alpha Competent *E. coli* (NEB) に形質転換した。形質転換した Competent High *E. coli* DH5a を LB 寒天培地 (5 g/L Bacto Yeast Extract (DIFCO)、10 g/L Bacto Tryptone (BD)、15 g/L Bacto Agar (BD)、10 g/L 塩化ナトリウム、50 mg/L アンピシリン)、37°Cにて一晩培養した。寒天培地中のアンピシリンにより選択形成されたコロニーを、185µL の LB 培地 (5 g/L Bacto Yeast Extract DIFCO)、10 g/L Bacto Tryptone (BD)、10 g/L 塩化ナトリウム、50 mg/L アンピシリン) に移し、37°Cで一晩培養した。培養後、45 µL の 80%グリセロール水溶液を添加し、グリセロールストックとして保存した。作製した全てのプラスミドは、シーケンシングを行い、想定された DNA が挿入されたことを確認した。この実験は城西大学組換え DNA 実験安全委員会による研究計画の審査に基づく学長の承認 (第 2018-4 号) を得て実施した。

Table 4 Primers used for PCR.

	Forward (5'→3')	Reverse (3'→5')
pGL3 cont-Runx2 promoter -250	TAGCCCGGGCTCGAGagtcagtgagtgctctaa	ATCGCAGATCTCGAGcagatagaactgtgccc
pGL3 cont-Runx2 promoter -315	TAGCCCGGGCTCGAGcaagaaggctctggcggtt	ATCGCAGATCTCGAGcagatagaactgtgccc
pGL3 cont-Runx2 promoter -500	TAGCCCGGGCTCGAGgcagtcaccttacttt	ATCGCAGATCTCGAGcagatagaactgtgccc
pGL3 cont-Runx2 promoter -1000	TAGCCCGGGCTCGAGgcaccacactcagttga	ATCGCAGATCTCGAGcagatagaactgtgccc

Table 5 Oligo used for PCR.

pGL3 cont-Runx2 promoter -315 to -251	Sense (5'→3')	TACGCGTGCTAGCCcttgcctcaacaGGcaaccacagaaccacaagtgcggtgcaGGtttctccaggaagactgTCGAGATCTGCGATC
	Antisense (3'→5')	GATCGCAGATCTCGAcagttctctggagaagAAtgaccgcaactgtggttctgtgttgAAtgtgagcgaaGGGCTAGCACGCGTA
pGL3 cont-Runx2 promoter -375 to -316_WT	Sense (5'→3')	TACGCGTGCTAGCCcttgcctcaacaaccacagaaccacaagtgcggtgcaaaactttctccaggaagactgTCGAGATCTGCGATC
	Antisense (3'→5')	ATGCGCACGATCGGGcagttctctggagaagttgaccgcaactgtggttctgtgtgtgtgagcgaaAGCTCTAGACGCTAG
pGL3 cont-Runx2 promoter -375 to -316_MT	Sense (5'→3')	TACGCGTGCTAGCCcttgcctcaacaGGcaaccacagaaccacaagtgcggtgcaGGtttctccaggaagactgTCGAGATCTGCGATC
	Antisense (3'→5')	GATCGCAGATCTCGAcagttctctggagaagAAtgaccgcaactgtggttctgtgttgAAtgtgagcgaaGGGCTAGCACGCGTA
pGL3 cont-Runx2 promoter -363 to -336_WT	Sense (5'→3')	TACGCGTGCTAGCCcaaccacagaaccacaagtgcggtgcaTCGAGATCTGCGATC
	Antisense (3'→5')	GATCGCAGATCTCGAtgccacgcaactgtggttctgtgtgtGGGCTAGCACGCGTA
pGL3 cont-Runx2 promoter -363 to -336_MT	Sense (5'→3')	TACGCGTGCTAGCCcaaccacagaaccacaagtgcggtgcaTCGAGATCTGCGATC
	Antisense (3'→5')	GATCGCAGATCTCGAtgccacgcaactgtggttctgtgtgtGGGCTAGCACGCGTA

### MC3T3-E1 細胞へのトランスフェクション

MC3T3-E1 細胞  $5 \times 10^3$  cells を 96 well plate (Coster) へ播種し、24 時間培養した。24 時間培養後の MC3T3-E1 細胞に、精製後のプラスミド DNA 0.1  $\mu$ g, Myc-Foxo1 および Flag-Foxg1 を 0.01 $\mu$ g、トランスフェクションした。トランスフェクションには Lipofectamine 2000 Regent (Thermo Fisher Scientific) を 0.2  $\mu$ l 及び  $\alpha$ -MEM 培地 10  $\mu$ l を用いた。補正用の Nano Luc®シフェラーゼ遺伝子を有する pNL1.1.TK [Nluc/TK] ベクターを 1 ng も同時にトランスフェクションした。

### レポーター遺伝子アッセイ

トランスフェクションから 48 時間後の細胞を、ONE-Glo EX Regent (Promega) 80  $\mu$ l を用いて溶解した。溶解したサンプルに、Nano DLR Stop & Regent 80  $\mu$ l を加え、3 分静置後、1 秒間ホタルルシフェラーゼ活性の測定を行った。その後、Stop and Glo 溶液 80  $\mu$ l を加え、10 分静置後、0.1 秒 Nano Luc®シフェラーゼ活性の測定を行った。活性測定には、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いた。計測値から、ホタルルシフェラーゼ活性と Nano Luc®シフェラーゼ活性の比をとり、導入効率および細胞数による影響を補正した値を用いた。

### ChIP assay

MC3T3-E1 を 100 mm dish に播種し、1 日間培養した。その後、1 mM Pro-Hyp もしくは PBS (-) を加えた  $\alpha$ -MEM 培地で 48 時間培養した。培養した MC3T3-E1 細胞を用いてクロマチン免疫沈降-定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (ChIP-qPCR) 解析を行い、Runx2 遠位 P1 プロモーターに結合する骨芽細胞分化転写調節因子を同定した。ChIP 実験は、MC3T3-E1 細胞を用いて、Anti-FOXG1 抗体 (ab18259) (abcam)、RUNX2 (D1L7F) Rabbit mAb (cat. no. 12556), anti-Foxo1(cat. no. 2880) (Cell Signaling Technology)、Normal Rabbit IgG (#2729) (Cell Signaling Technology) を用いて、製造者マニュアル (Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit、Millipore) に従って行った。培養した MC3T3-E1 に 1%ホルムアルデヒドを加え 37°C で 15 分間架橋した後、細胞を PBS (-) で洗浄し、細胞を回収した。次いで、回収した細胞を、プロテアーゼ阻



害剤を含む SDS 溶解バッファーで溶解し、DNA を 200~1000bp のサイズに断片化するように超音波処理した。超音波処理した試料を、2  $\mu$ g の抗ラビット Runx2 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗ラビット Foxo1 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗ラビット Foxg1 抗体 (abcam) または抗ノーマルラビット IgG 抗体 (Cell Signaling Technology) を加え 4°C で一晩インキュベートした。抗体-タンパク質-DNA 複合体は、ChIP グレードのタンパク質 A/G-アガロースビーズを混合して 4°C で 1 時間でインキュベーションすることにより濃縮した。タンパク質に結合した DNA は、キットのマニュアルに従って精製した。免疫沈降したゲノム DNA 断片をテンプレートに、qPCR を使用して Runx2 P1 プロモーター (-368 to -289 bp) の増幅量を定量化した。

#### 統計解析

全てのデータは、平均値 (mean)  $\pm$  標準誤差 (SD) で示した。統計解析は 2 群間の比較に t-検定を行い、 $P < 0.05$  で有意差ありとした。それ以外の実験においては、Tukey-kramer 検定で各群間の比較検定を行い、 $P < 0.05$  で有意差ありとした。

## 引用文献

1. 平成 28 年度国民生活基礎調査 厚生労働省 (2018)
2. Karsenty G. Transcriptional Control of Skeletogenesis. *Annu Rev Genom Hum Genet.* 2008;**9**(1):183-196. doi:10.1146/annurev.genom.9.081307.164437
3. Jensen ED, Gopalakrishnan R, Westendorf JJ. Regulation of gene expression in osteoblasts. *BioFactors.* 2010;**36**(1):25-32. doi:10.1002/biof.72
4. Han X, Xu Y, Wang J, *et al.* Effects of cod bone gelatin on bone metabolism and bone microarchitecture in ovariectomized rats. *Bone.* 2009;**44**(5):942-947. doi:10.1016/j.bone.2008.12.005
5. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *J Biol Chem.* 2010;**285**(33):25103-25108. doi:10.1074/jbc.R109.041087
6. Cremer MA, Rosloniec EF, Kang AH. The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J Mol Med.* 1998;**76**(4):275-288. doi:10.1007/s001090050217
7. Fujita T, Ohue M, Fujii Y, Miyauchi A, Takagi Y. The effect of active absorbable algal calcium (AAA Ca) with collagen and other matrix components on back and joint pain and skin impedance. *J Bone Mineral Metab.* 2002;**20**(5):298-302. doi:10.1007/s007740200043
8. Pal S, Maurya SK, Chattopadhyay S, *et al.* The osteogenic effect of liraglutide involves enhanced mitochondrial biogenesis in osteoblasts. *Biochem.* 2019;**164**:34-44. doi:10.1016/j.bcp.2019.03.024
9. Mazzi G, Fioravanzo F, Burti E. New marker of bone resorption: hydroxyproline-containing peptide High-performance liquid chromatographic assay without hydrolysis as an alternative to hydroxyproline determination: a preliminary report. *Journal of Chromatography B: J Biomed Sci.* 1996;**678**(2):165-172. doi:10.1016/0378-4347(95)00473-4
10. Prockop DarwinJ, Keiser HarryR, Sjoerdsma A. Gastrointestinal absorption and

- renal excretion of hydroxyprolinr peptides. *The Lancet*. 1962;**280**(7255):527-528.  
doi:10.1016/S0140-6736(62)90400-2
11. Matsuo K, Irie N. Osteoclast–osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys*. 2008;**473**(2):201-209. doi:10.1016/j.abb.2008.03.027
12. Sozen T, Ozisik L, Calik Basaran N. An overview and management of osteoporosis. *Eur J Rheumatol*. 2017;**4**(1):46-56. doi:10.5152/eurjrheum.2016.048
13. Kadowaki, E., Tamaki, J., Iki, M., Sato, Y., Chiba, Y., Kajita, E., Kagamimori, S., Kagawa, Y. and Yoneshima, H. Prevalent vertebral deformity independently increases incident vertebral fracture risk in middle-aged and elderly Japanese women: The Japanese Population-based Osteoporosis (JPOS) Cohort Study. *Osteoporos Int*. 2010;**21**(9):1513-1522. doi:10.1007/s00198-009-1113-9
14. 骨粗鬆症の予防と治療のガイドライン作成委員会 (日本骨粗鬆症学会 日本骨代謝学会 骨粗鬆症財団) 骨粗鬆症の予防と治療のガイドライン 2015 年版
15. Paschos NK. Anterior cruciate ligament reconstruction and knee osteoarthritis. *WJO*. 2017;**8**(3):212. doi:10.5312/wjo.v8.i3.212
16. Elam ML, Johnson SA, Hooshmand S, *et al*. A Calcium-Collagen Chelate Dietary Supplement Attenuates Bone Loss in Postmenopausal Women with Osteopenia: A Randomized Controlled Trial. *J Med Food*. 2015;**18**(3):324-331.  
doi:10.1089/jmf.2014.0100
17. Kumar S, Sugihara F, Suzuki K, Inoue N, Venkateswarathirukumara S. A double-blind, placebo-controlled, randomised, clinical study on the effectiveness of collagen peptide on osteoarthritis: Effect of collagen peptide on arthritis. *J Sci Food Agric*. 2015;**95**(4):702-707. doi:10.1002/jsfa.6752
18. Lee H-J, Jang H-L, Ahn D-K, *et al*. Orally administered collagen peptide protects against UVB-induced skin aging through the absorption of dipeptide forms, Gly-Pro and Pro-Hyp. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2019;**83**(6):1146-1156.  
doi:10.1080/09168451.2019.1580559
19. Igase M, Kohara K, Okada Y, *et al*. A double-blind, placebo-controlled, randomised clinical study of the effect of pork collagen peptide supplementation on atherosclerosis in

- healthy older individuals. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2018;**82**(5):893-895. doi:10.1080/09168451.2018.1434406
20. Sugihara F, Inoue N, Venkateswarathirukumara S. Ingestion of bioactive collagen hydrolysates enhanced pressure ulcer healing in a randomized double-blind placebo-controlled clinical study. *Sci Rep.* 2018;**8**(1):11403. doi:10.1038/s41598-018-29831-7
21. Choi FD, Sung CT, Juhasz MLW, Mesinkovsk NA. Oral Collagen Supplementation: A Systematic Review of Dermatological Applications. *J Drugs Dermatol.* 2019;**18**(1):9-16.
22. Koizumi S, Inoue N, Sugihara F, Igase M. Effects of Collagen Hydrolysates on Human Brain Structure and Cognitive Function: A Pilot Clinical Study. *Nutrients.* 2019;**12**(1):50. doi:10.3390/nu12010050
23. Van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *Faseb J.* 1991;**5**(13):2814-2823.
24. Cremer MA, Rosloniec EF, Kang AH. The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J Mol Med.* 1998;**76**(4):275-288. doi:10.1007/s001090050217
- 25 Gelse K. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;**55**(12):1531-1546. doi:10.1016/j.addr.2003.08.002
26. Klein LR, Weiss PH. Induced connective tissue metabolism in vivo: reutilization of pre-existing collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1966;**56**(1):277-284. doi:10.1073/pnas.56.1.277
27. Yazaki M, Ito Y, Yamada M, *et al.* Oral Ingestion of Collagen Hydrolysate Leads to the Transportation of Highly Concentrated Gly-Pro-Hyp and Its Hydrolyzed Form of Pro-Hyp into the Bloodstream and Skin. *J Agric Food Chem.* 2017;**65**(11):2315-2322. doi:10.1021/acs.jafc.6b05679
28. Sugihara F, Inoue N, Kuwamori M, Taniguchi M. Quantification of hydroxyprolyl-glycine (Hyp-Gly) in human blood after ingestion of collagen hydrolysate. *J Biosci Bioeng.* 2012;**113**(2):202-203. doi:10.1016/j.jbiosc.2011.09.024

29. Weiss PH, Klein L. The quantitative relationship of urinary peptide hydroxyproline excretion to collagen degradation. *J Clin Invest*. 1969;**48**(1):1-10. doi:10.1172/JCI105957
30. Shigemura Y, Iwai K, Morimatsu F, et al. Effect of Prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp), a Food-Derived Collagen Peptide in Human Blood, on Growth of Fibroblasts from Mouse Skin. *J Agric Food Chem*. 2009;**57**(2):444-449. doi:10.1021/jf802785h
31. Ohara H, Ichikawa S, Matsumoto H, et al. Collagen-derived dipeptide, proline-hydroxyproline, stimulates cell proliferation and hyaluronic acid synthesis in cultured human dermal fibroblasts. *The Journal of Dermatology*. 2010;**37**(4):330-338. doi:10.1111/j.1346-8138.2010.00827.x
32. Kimira Y, Ogura K, Taniuchi Y, et al. Collagen-derived dipeptide prolyl-hydroxyproline promotes differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;**453**(3):498-501. doi:10.1016/j.bbrc.2014.09.121
33. Otto F, Thornell AP, Crompton T, et al. Cbfa1, a Candidate Gene for Cleidocranial Dysplasia Syndrome, Is Essential for Osteoblast Differentiation and Bone Development. *Cell*. 1997;**89**(5):765-771. doi:10.1016/S0092-8674(00)80259-7
34. Mundlos S, Otto F, Mundlos C, et al. Mutations Involving the Transcription Factor CBFA1 Cause Cleidocranial Dysplasia. *Cell*. 1997;**89**(5):773-779. doi:10.1016/S0092-8674(00)80260-3
35. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. *Cell*. 1997;**89**(5):747-754. doi:10.1016/S0092-8674(00)80257-3
36. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, et al. Canonical WNT Signaling Promotes Osteogenesis by Directly Stimulating Runx2 Gene Expression. *J Biol Chem*. 2005;**280**(39):33132-33140. doi:10.1074/jbc.M500608200
37. Xiao ZS, Liu S-G, Hinson TK, Quarles LD. Characterization of the upstream mouseCbfa1/Runx2 promoter. *J Cell Biochem*. 2001;**82**(4):647-659. doi:10.1002/jcb.1192
38. Drissi H, Pouliot A, Stein JL, van Wijnen AJ, Stein GS, Lian JB. Identification of novel protein/DNA interactions within the promoter of the bone-related transcription

- factor Runx2/Cbfa1. *J Cell Biochem.* 2002;**86**(2):403-412. doi:10.1002/jcb.10238
39. van der Deen M, Akech J, Lapointe D, *et al.* Genomic Promoter Occupancy of Runt-related Transcription Factor RUNX2 in Osteosarcoma Cells Identifies Genes Involved in Cell Adhesion and Motility. *J Biol Chem.* 2012;**287**(7):4503-4517. doi:10.1074/jbc.M111.287771
40. AO Research Institute Davos, Clavadelerstrasse 8, CH-7270 Davos Platz, Switzerland, Bruderer M, Richards R, Alini M, Stoddart M. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *eCM.* 2014;**28**:269-286. doi:10.22203/eCM.v028a19
41. Drissi H, Luc Q, Shakoori R, *et al.* Transcriptional autoregulation of the bone related CBFA1/RUNX2 gene. *J Cell Physiol.* 2000;**184**(3):341-350. doi:10.1002/1097-4652(200009)184:3<341::AID-JCP8>3.0.CO;2-Z
42. Lee M-H, Kim Y-J, Yoon W-J, *et al.* Dlx5 specifically regulates Runx2 Type II expression by binding to homeodomain-response elements in the Runx2 distal promoter. *J Biol Chem.* 2005;**280**(42):35579-35587. doi:10.1074/jbc.M502267200
43. Gross S, Krause Y, Wuelling M, Vortkamp A. Hoxa11 and Hoxd11 regulate chondrocyte differentiation upstream of Runx2 and Shox2 in mice. *PLoS One.* 2012;**7**(8):e43553. doi:10.1371/journal.pone.0043553
44. Carlton AL, Illendula A, Gao Y, *et al.* Small molecule inhibition of the CBF $\beta$ /RUNX interaction decreases ovarian cancer growth and migration through alterations in genes related to epithelial-to-mesenchymal transition. *Gynecol Oncol.* 2018;**149**(2):350-360. doi:10.1016/j.ygyno.2018.03.00
45. Rached M-T, Kode A, Xu L, *et al.* FoxO1 Is a Positive Regulator of Bone Formation by Favoring Protein Synthesis and Resistance to Oxidative Stress in Osteoblasts. *Cell Metab.* 2010;**11**(2):147-160. doi:10.1016/j.cmet.2010.01.001
46. Siqueira MF, Flowers S, Bhattacharya R, *et al.* FOXO1 modulates osteoblast differentiation. *Bone.* 2011;**48**(5):1043-1051. doi:10.1016/j.bone.2011.01.019
47. Iyer S, Ambrogini E, Bartell SM, *et al.* FOXOs attenuate bone formation by suppressing Wnt signaling. *J Clin Invest.* 2013;**123**(8):3409-3419. doi:10.1172/JCI68049

48. Carlsson P, Mahlapuu M. Forkhead Transcription Factors: Key Players in Development and Metabolism. *Dev Biol.* 2002;**250**(1):1-23. doi:10.1006/dbio.2002.0780
49. Yang S, Xu H, Yu S, *et al.* Foxo1 Mediates Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1)/Insulin Regulation of Osteocalcin Expression by Antagonizing Runx2 in Osteoblasts. *J Biol Chem.* 2011;**286**(21):19149-19158. doi:10.1074/jbc.M110.197905
50. Langlet F, Haeusler RA, Lindén D, *et al.* Selective Inhibition of FOXO1 Activator/Repressor Balance Modulates Hepatic Glucose Handling. *Cell.* 2017;**171**(4):824-835. doi:10.1016/j.cell.2017.09.045
51. Park SJ, Gadi J, Cho K-W, *et al.* The forkhead transcription factor Foxc2 promotes osteoblastogenesis via up-regulation of integrin  $\beta$ 1 expression. *Bone.* 2011;**49**(3):428-438. doi:10.1016/j.bone.2011.05.012
52. 谷内 友梨 : コラーゲンペプチドの作用発現機構の分子レベルでの解明の試み 平成 26 年度 城西大学大学院薬学研究科医療栄養学専攻 修士論文
53. Kimira Y, Odaira H, Nomura K, *et al.* Collagen-derived dipeptide prolyl-hydroxyproline promotes osteogenic differentiation through Foxg1. *Cell Mol Biol Lett.* 2017;**22**(1):27. doi:10.1186/s11658-017-0060-2
54. Ostrow AZ, Kalhor R, Gan Y, *et al.* Conserved forkhead dimerization motif controls DNA replication timing and spatial organization of chromosomes in *S. cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017;**114**(12):E2411-E2419. doi:10.1073/pnas.1612422114
55. Jolma A, Yan J, Whittington T, *et al.* DNA-Binding Specificities of Human Transcription Factors. *Cell.* 2013;**152**(1-2):327-339. doi:10.1016/j.cell.2012.12.009
56. Frullanti E, Amabile S, Lolli MG, *et al.* Altered expression of neuropeptides in FoxG1-null heterozygous mutant mice. *Eur J Hum Genet.* 2016;**24**(2):252-257. doi:10.1038/ejhg.2015.79
57. Miyoshi G, Fishell G. Dynamic FoxG1 Expression Coordinates the Integration of Multipolar Pyramidal Neuron Precursors into the Cortical Plate. *Neuron.* 2012;**74**(6):1045-1058. doi:10.1016/j.neuron.2012.04.025
58. Brancaccio M, Pivetta C, Granzotto M, Filippis C, Mallamaci A. Emx2 and Foxg1 Inhibit Gliogenesis and Promote Neuronogenesis. *STEM CELLS.* 2010;**28**(6):1206-1218.

doi: 10.1002/stem.443

59. Higuchi S, Sugahara F, Pascual-Anaya J, Takagi W, Oisi Y, Kuratani S. Inner ear development in cyclostomes and evolution of the vertebrate semicircular canals. *Nature*. 2019;**565**(7739):347-350. doi:10.1038/s41586-018-0782-y

60. Vezzali R, Weise SC, Hellbach N, Machado V, Heidrich S, Vogel T. The FOXG1/FOXO/SMAD network balances proliferation and differentiation of cortical progenitors and activates *Kcnh3* expression in mature neurons. *Oncotarget*. 2016;**7**(25):37436-37455. doi:10.18632/oncotarget.9545

61 . Ariani F, Hayek G, Rondinella D, *et al.* FOXG1 Is Responsible for the Congenital Variant of Rett Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 2008;**83**(1):89-93.

doi:10.1016/j.ajhg.2008.05.015

62. Nakagawa S, Gisselbrecht SS, Rogers JM, Hartl DL, Bulyk ML. DNA-binding specificity changes in the evolution of forkhead transcription factors. *Proc Natl Acad Sci India Sect B Biol Sci.* 2013;**110**(30):12349-12354. doi:10.1073/pnas.1310430110

63. Obsil T, Obsilova V. Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. *Oncogene*. 2008;**27**(16):2263-2275. doi:10.1038/onc.2008.20

64. Sun D, Wang Y, Tan F, *et al.* Functional and Molecular Expression of the Proton-Coupled Oligopeptide Transporters in Spleen and Macrophages from Mouse and Human. *Mol Pharmaceutics*. 2013;**10**(4):1409-1416. doi:10.1021/mp300700p

65. Kottra G, Daniel H. The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. *J Physiol.* 2004;**447**(5):610-618. doi:10.1007/s00424-003-1101-4

66. Yamashita T, Shimada S, Guo W, *et al.* Cloning and Functional Expression of a Brain Peptide/Histidine Transporter. *J Biol Chem.* 1997;**272**(15):10205-10211.

doi:10.1074/jbc.272.15.10205

67. Taga Y, Kusubata M, Ogawa-Goto K, Hattori S, Funato N. Collagen-derived X-Hyp-Gly-Type tripeptides promote differentiation of MC3T3-E1 pre-osteoblasts. *J Funct Foods*. 2018;**46**:456-462. doi:10.1016/j.jff.2018.05.017

68. Aito-Inoue M, Lackeyram D, Fan MZ, Sato K, Mine Y. Transport of a tripeptide, Gly-



- Pro-Hyp, across the porcine intestinal brush-border membrane. *J Pept Sci.* 2007;**13**(7):468-474. doi:10.1002/psc.870
69. Kitakaze T, Sakamoto T, Kitano T, *et al.* The collagen derived dipeptide hydroxyprolyl-glycine promotes C2C12 myoblast differentiation and myotube hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;**478**(3):1292-1297. doi:10.1016/j.bbrc.2016.08.114
70. Kudo M, Katayoshi T, Kobayashi-Nakamura K, Akagawa M, Tsuji-Naito K. H<sup>+</sup>/peptide transporter (PEPT2) is expressed in human epidermal keratinocytes and is involved in skin oligopeptide transport. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;**475**(4):335-341. doi:10.1016/j.bbrc.2016.05.093
71. Zhang H, Pan Y, Zheng L, *et al.* FOXO1 Inhibits Runx2 Transcriptional Activity and Prostate Cancer Cell Migration and Invasion. *Cancer Res.* 2011;**71**(9):3257-3267. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2603
72. Seoane J, Le H-V, Shen L, Anderson SA, Massagué J. Integration of Smad and Forkhead Pathways in the Control of Neuroepithelial and Glioblastoma Cell Proliferation. *Cell.* 2004;**117**(2):211-223. doi:10.1016/S0092-8674(04)00298-3
73. Prockop DJ, Sioerdsma A. Significance of urinary hydroxyproline in man. *J Clin Invest.* 1961;**40**(5):843-849. doi:10.1172/JCI104318
74. Zhang N, Zhu Q, Gong M. Rapid determination of free prolyl dipeptides and 4-hydroxyproline in urine using flow-gated capillary electrophoresis. *Anal Bioanal Chem.* 2017;**409**(30):7077-7085. doi:10.1007/s00216-017-0666-2
75. Ichikawa S, Morifuji M, Ohara H, Matsumoto H, Takeuchi Y, Sato K. Hydroxyproline-containing dipeptides and tripeptides quantified at high concentration in human blood after oral administration of gelatin hydrolysate. *Int J Food Sci Nutr.* 2010;**61**(1):52-60. doi:10.3109/09637480903257711
76. Liu J, Zhang B, Song S, *et al.* Bovine Collagen Peptides Compounds Promote the Proliferation and Differentiation of MC3T3-E1 Pre-Osteoblasts. *PLoS ONE.* 2014;**9**(6):e99920. doi:10.1371/journal.pone.0099920
77. Kawaguchi T, Nanbu PN, Kurokawa M. Distribution of Prolylhydroxyproline and Its Metabolites after Oral Administration in Rats. *Biol Pharm Bull.* 2012;**35**(3):422-427. doi:10.1248/bpb.35.422
78. Nomura K, Kimura Y, Osawa Y, Shimizu J, Kataoka-Matsushita A, Mano H. Collagen-

derived dipeptide prolyl hydroxyproline directly binds to Foxg1 to change its conformation and inhibit the interaction with Runx2. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2019;**83**(11):2027-2033. doi:10.1080/09168451.2019.1642099

79. Guen TL, Fichou Y, Nectoux J, *et al.* A missense mutation within the fork-head domain of the forkhead box G1 Gene (FOXG1) affects its nuclear localization. *Hum Mutat.* 2011;**32**(2):E2026-E2035. doi:10.1002/humu.21422

80. Genin EC, Caron N, Vandenbosch R, Nguyen L, Malgrange B. Concise Review: Forkhead Pathway in the Control of Adult Neurogenesis: Forkhead Pathway and Adult Neurogenesis. *Stem Cells.* 2014;**32**(6):1398-1407. doi:10.1002/stem.1673

81. Pierce AD, Anglin IE, Vitolo MI, *et al.* Glucose-activated RUNX2 phosphorylation promotes endothelial cell proliferation and an angiogenic phenotype. *J Cell Biochem.* 2012;**113**(1):282-292. doi:10.1002/jcb.23354

82. Artigas N, Ureña C, Rodríguez-Carballo E, Rosa JL, Ventura F. Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK)-regulated Interactions between Osterix and Runx2 Are Critical for the Transcriptional Osteogenic Program. *J Biol Chem.* 2014;**289**(39):27105-27117. doi:10.1074/jbc.M114.576793

83. Inoue N, Suzuki Y, Yokoyama K, Karube I. Novel Fluorescent Probe for Analysis of Hydroperoxides Based on Boron Dipyrromethane Fluorophore. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 2009;**73**(5):1215-1217. doi:10.1271/bbb.80899

84. Nakatani S, Kobata K, Nakajima H, *et al.* Transcriptome of ATDC5 Cultured with Glucosamine Hydrochloride and Collagen Hydrolysate Indicates a New Candidate Gene for the Differentiation of Chondrocytes. *Journal of Chitin and Chitosan Science.* 2014;**2**(3):233-237. doi:10.1166/jcc.2014.1070Sugihara

85. Elam ML, Johnson SA, Hooshmand S, *et al.* A Calcium-Collagen Chelate Dietary Supplement Attenuates Bone Loss in Postmenopausal Women with Osteopenia: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Medicinal Food.* 2015;**18**(3):324-331. doi:10.1089/jmf.2014.0100

86. F, Inoue N, Venkateswarathirukumara S. Ingestion of bioactive collagen hydrolysates enhanced pressure ulcer healing in a randomized double-blind placebo-controlled clinical study. *Sci Rep.* 2018;**8**(1):11403. doi:10.1038/s41598-018-29831-7

87. Nakae J, Biggs WH, Kitamura T, *et al.* Regulation of insulin action and pancreatic  $\beta$ -cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1.

*Nat Genet.* 2002;**32**(2):245-253. doi:10.1038/ng890

88. Gross DN, van den Heuvel APJ, Birnbaum MJ. The role of FoxO in the regulation of metabolism. *Oncogene.* 2008;**27**(16):2320-2336. doi:10.1038/onc.2008.25

89. Nakae J, Cao Y, Oki M, *et al.* Forkhead Transcription Factor FoxO1 in Adipose Tissue Regulates Energy Storage and Expenditure. *Diabetes.* 2008;**57**(3):563-576. doi:10.2337/db07-0698

90. Kawano Y, Nakae J, Watanabe N, *et al.* Loss of Pdk1-Foxo1 Signaling in Myeloid Cells Predisposes to Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance. *Diabetes.* 2012;**61**(8):1935-1948. doi:10.2337/db11-0770

91. 小林 亮介：コラーゲン由来ジペプチド Prolyl hydroxyproline (Pro-Hyp) は間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 の褐色脂肪細胞分化を加速する 平成 30 年度 城西大学大学院薬学研究科医療栄養学専攻 修士論文