

ティックに探索する世界初の実験的スクリーニング系を開発・運用することに成功した。今後は、これまでの研究成果を踏まえて、マイクロ RNA の標的遺伝子がどのようにしてリウマチ性疾患の発症に関わっているのかについて明らかにする。リウマチ性疾患特異的マイクロ RNA である miR-146a の標的遺伝子のうち IKBKG は、NF- κ B の活性化に関わる因子や細胞増殖に関わる因子であり、miR-424 の標的遺伝子(群)は、TGF- β シグナルの抑制因子である。これらの標的遺伝子とマイクロ RNA の関係を詳細に調べ、マイクロ RNA の発現が上昇することによって上記シグナル伝達系にどのような影響を与え、結果としてどのような変化が起こるのかについて明らかにする。

F. 健康危機情報

(総括研究報告書に記載)

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担報告書

研究分担者 吉鷹輝仁 国立成育医療センター研究所 研究員

「関節疾患病態モデル、自己免疫疾患モデルマウスを用いたマイクロ RNA の阻害核酸の治療効果の検討」に関する研究

研究要旨

リウマチ性関節炎とそれに伴う関節破壊には、現在の生物製剤治療では治癒できない症例も多く、既存の医薬品とは異なった作用機序による新しい治療法の開発が期待される。

従来の抗リウマチ生物製剤は、炎症反応に関与するサイトカインの機能を阻害して炎症反応を緩和することを目的とした抗体医薬であった。一方、我々が見出したリウマチ性関節炎に関連したマイクロ RNA はリウマチ性関節炎の発症において重要な役割を果たしていると考えており、このマイクロ RNA の機能を阻害したり、または、高めたりすることによって、リウマチ性関節炎の治療に応用する可能性が考えられた。そこで、本研究では、マイクロ RNA を分子標的とした新しい治療法を開発するための基盤研究を推進するため、関節炎モデルマウスを使った予備検討と本実験のための実験系の構築を行った。

研究分担者

柳谷隆宏 国立成育医療センター研究所
研究員

佐藤可野 国立成育医療センター研究所
研究員

研究協力者

井上 敦 国立成育医療センター研究所
共同研究員

連マイクロ RNA の疾患発症における役割について明らかにするため、また、新規治療ターゲットとしての可能性について探るため、関節炎モデルマウスにマイクロ RNA のアンチセンスオリゴや過剰発現用アデノウイルスベクターを導入した時の効果についての検討を行うための基盤研究を行った。

B. 研究方法

マイクロ RNA のアンチセンスオリゴ導入による関節炎への影響 6 週齢の雄性 DBA/1 マウスに抗 II 型コラーゲン抗体カクテル(chondrex)を 200 μ l 尾静脈投与し、2 日後に腹腔内に LPS 投与を行うことで関節炎モデルを作製した。この 2 日後、アパーチン麻酔下にて膝の皮切開を行い、目視下で確認した関節包内に LNA 付加した miR-146a の相補配列、antisense-miR-146a を 10 μ g インジェクションして、炎症状態における miR-146a の抑制作用を検討した。なお、対照群には miR-146a の seed 配列に変異を加えたアンチセンス鎖を同様に作成して関節内投与を行った。1 週後、マウスを頸椎脱臼により

A. 研究目的

リウマチ性関節炎に対する生物製剤は、炎症反応に関与する TNF- α や IL6 などのサイトカインやサイトカインレセプターに対する抗体を用いて、サイトカインの機能を阻害することにより炎症反応を緩和するものであった。しかし、これらの医薬品では治癒できない症例もあり、また、抗体医薬自体が非常に高価なものであることから、新しい作用機序に基づく、安価で安全な医薬品の開発が望まれている。一方、我々は、リウマチ性疾患に関連したマイクロ RNA を見出すことに成功しており、このマイクロ RNA を分子標的とした新規治療法へ応用することが期待された。そこで、疾患関

安楽死させて膝関節を採取した。4%パラホルムアルデヒドにて固定して、45%ギ酸と20%クエン酸ナトリウム液を等量混合した脱灰液で脱灰を行い、脱水・透徹後、パラフィン包埋して膝関節矢状断の組織切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色、サフラニン O 染色により滑膜を中心とした関節構成体への影響を検討した。

コラーゲン惹起関節炎モデル作製 6週齢の雄性 DBA/1J 系マウスを使用し、II 型コラーゲン誘導関節炎モデルを作製した。ウシ II 型コラーゲン (chondrex) を 0.05M 酢酸に溶解し (2mg/ml)、等量のプロイント完全アジュバント (SIGMA) で乳化したエマルジョンを 100 μ l 尾根部皮内に注射して初回免疫を行った。3 週後、同様に調整したウシ II 型コラーゲンをプロイント不完全アジュバントで乳化し腹腔内に投与することで追加免疫を行った^{1,2}。初回免疫から約 4 週後で関節炎症状が見られ、7 週から 8 週後に症状はピークとなる。

1) 安倍 千之: 1. 関節炎モデル. VI. 炎症の実験動物モデル. 炎症と抗炎症戦略 (室田 誠逸, 柏崎 禎夫 編) 医薬ジャーナル社. 東京. 1997. p469-482

2) Hirano S., Wakazono K. et al: Effects of cytogenin, a novel anti-arthritis agent, on type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice and adjuvant arthritis in Lewis rats. *Int. J. Tiss. React.* 16: 155-162, 1999

アデノウイルスベクターの作製
ViraPower™ アデノウイルス発現システム (Invitrogen) により、miR-146a 発現アデノウイルスを構築した。なお、miR-146a の seed 配列に変異を加えた配列を対照として同様に作製する。ベクター pAd/CMV/V5-DEST™ は CMV プロモーターを有しており、増殖細胞および非増殖細胞のいずれにも感染して目的遺伝子を高レベルで一過性に発現させることが可能である。pAd/CMV/V5-DEST™ に LR recombination 反応にて目的配列の挿入を

行った後、293A 細胞に遺伝子導入して数回増幅を行う。得られたウイルス液は塩化セシウムによる密度勾配法にて精製を行った後、感染価の確認を行った上で以降の接種実験に用いた。

ベクター接種・解析 アパーチン麻酔下にてマウス膝関節を皮切開し、目視で確認した関節包内に miR-146a 発現アデノウイルスベクターをインジェクションして遺伝子導入を行った。1 週後、マウスを頸椎脱臼により安楽死させて膝関節を採取した。4%パラホルムアルデヒドにて固定し、45%ギ酸と 20%クエン酸ナトリウム液を等量混合した脱灰液で脱灰を行った。脱水・透徹の後、パラフィン包埋して膝関節矢状断の組織切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色、サフラニン O 染色により miR-146a の関節内強制発現が滑膜や軟骨に及ぼす影響について検討した。また *in situ hybridization* や炎症性細胞の免疫染色により、miR-146a の発現部位の確認を行った。

C. 研究結果

今回、行ったアンチセンスオリゴを用いた miR-146a の機能阻害によるリウマチ性関節炎に対する影響を調べた検討では、安定した結果が得られず、最終的な結論を得ることは出来なかった。一方、miR-146a 過剰発現実験のためのアデノウイルス発現ベクター、およびコントロールベクターはすでに構築が完了しており (図 1)、現在、II 型コラーゲン誘導関節炎モデルマウスを用いた検討を開始している。今年度中での結論は得られなかったものの、来年度における研究計画での最重点課題として位置づけ、研究を進める。

D. 考察

miR-146a のアンチセンスオリゴを抗 II 型コラーゲン抗体カクテル惹起マウスの関節に導入した実験では、安定した結果が得られず結論を得ることは出来なかった。そ

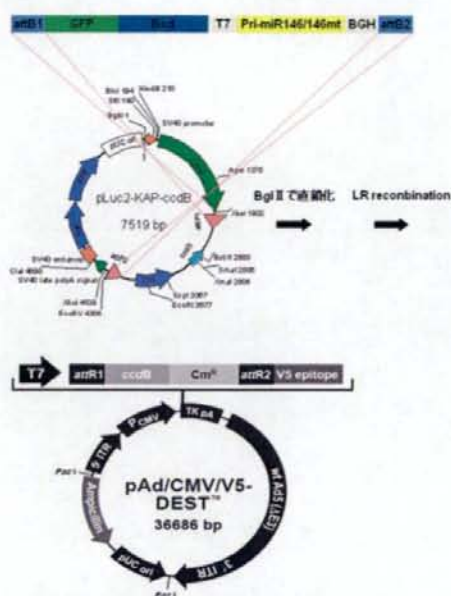


図1 miR-146aの過剰発現実験用のアデノウイルスベクター。同様の方法でmiR-424の発現ベクターも構築した。

の理由として、1) 抗II型コラーゲン抗体カクテル誘導による関節炎は体内でのT細胞・B細胞の免疫反応をスキップしているため、関節リウマチに見られるような免疫反応の関与が少ない炎症反応のみが主体のモデルであり、2) 関節炎症状もピークを過ぎると急激に低下することから、急性炎症を反映するモデルであったためであると考えられる。そこで、以後、より関節リウマチに発生機序の近いコラーゲン惹起関節炎モデルを用いて実験を進めることとした。また、今後の研究では、慢性炎症状態だけでなく正常滑膜を始めとする関節構成体へのmiR-146aの作用を検討するため、miR-146aを発現するアデノウイルスベクターを用いた関節内での強制発現実験を進める。また、miR-424に関しても、同様の

実験を進める予定である。miR-424の過剰発現用アデノウイルスベクターおよびコントロールベクター(miR-424のseed配列部分に変異をいれたもの)の構築は完了しており、来年度中に一定の成果を得ることを目標としている。

E. 結論

今回の検討では、疾患モデルマウスの作成方法に欠点があったため、miR-146aのアンチセンスオリゴによる機能阻害と関節炎への影響については、結論を見出すことが出来なかった。今後は、コラーゲン惹起関節炎モデルマウスを作成して、このマウスに対するmiR-146aの過剰発現実験やアンチセンスオリゴの導入実験を行い、miR-146aの疾患発症における役割についての解析や治療ターゲットとしての可能性についての検討を行う。また、同様の検討を、miR-424に関しても行う。

F. 健康危機情報

(総括研究報告書に記載)

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

「マイクロ RNA を検出するための蛍光 DNA プローブの設計と解析」
に関する研究

研究要旨

マイクロ RNA は、遺伝子発現の制御を司る 22 塩基程度の小さな RNA である。これまでに 700 種類以上のマイクロ RNA が発見され、発生や分化において時期特異的・空間特異的に発現していることが示唆されているが、生理活性を担うマイクロ RNA を測定する簡便な技術がないため、詳細なマイクロ RNA の解析が行なえていないのが現状である。従来利用されてきた蛍光プローブでは、マイクロ RNA を検出することは可能であったが、目的マイクロ RNA の長さをリアルタイムで判別することができないという問題点があった。我々はこれまでに、蛍光消光現象を利用して前駆体 RNA と成熟 RNA を区別して検出できるプローブを開発しており、この高機能プローブを用いて、RNA 研究だけではなく診断薬としても利用できるシステムを確立する。

A. 研究目的

2004 年にヒトゲノムの概要が発表され、タンパク質をコードする遺伝子の数は従来の予想よりも遥かに少ない 2 万 2 千個程度である事がわかった。タンパク質をコードしない「ノンコーディング領域」はゲノムの 98% を占めており、さらにこのノンコーディング領域の割合は、生物の複雑さに応じて高くなることが明らかとなった。すなわち、ノンコーディング領域に、高次生命現象の鍵が眠っていることになる。特に近年、ノンコーディング RNA として最も注目されているのが、マイクロ RNA である。マイクロ RNA は 22 塩基程度の小さな RNA であり、生体の発生段階で時期・組織特異的に発現し、細胞の運命を左右することが分かってきた。また、癌や糖尿病、肝炎など様々な疾病にマイクロ RNA が関与していることが明らかになってきており、近い将来、治療や診断の対象分子となる可能性が高い。

本研究プロジェクトの主軸は、小児リウマチ性疾患や自己免疫疾患におけるマイク

ロ RNA を新規に同定・解析し、これらのマイクロ RNA を診断や治療に役立てていくことにある。現在までに、自己免疫疾患に関与するマイクロ RNA として、miR-146 の機能を評価しており、将来的に新たな診断法へと展開して行くことが期待されている。しかしながら、検出の対象とするマイクロ RNA は 22 塩基程度の小さな RNA であり、研究対象として確立された技術がほとんどないため、従来の分子生物学的な手法が適用できない場面に遭遇することもある。

一般的には、様々な疾病に対する分子レベルでの知見が蓄積されてきたことにより、従来最先端研究で用いられてきた分子の検出技術が、診断に用いられるようになってきた。身近なところでは、インフルエンザの診断キットが、抗体を利用してウイルス粒子を検出しており、タンパク質実験に不慣れた医師でも 15 分程度で結果の確認をすることができる。また、妊娠初期の尿中に含まれる hCG ホルモンを抗体で検出する妊娠検査薬などは、一般市民でも利用できるほどに簡便化され、街角の薬店で市販さ

れている。

このように抗体を用いたタンパク質の検出は身近になる一方で、核酸 (DNA/RNA) を直接検出する手法が一般的に用いられている例は少ない。マイクロアレイ法などに代表される近年の遺伝子発現の網羅的な解析を通じて、疾病に特徴的な遺伝子の発現パターンを理解することはできるようになってきた。しかしながら実際の診断では、検査対象として同定された遺伝子 (DNA/RNA) そのものよりも、遺伝子産物であるタンパク質を検出の対象分子とする場合が多く、いわゆるオンサイト(現場)診断には、技術的な障壁が立ちはだかっているのが現状である。

そこで本分担研究では、マイクロ RNA を対象とした診断へと将来的に応用できるような新規マイクロ RNA 検出法の開発を行なう。マイクロ RNA のような低分子核酸を取り扱うには、原子レベルでの構造を考慮した核酸化学の研究が不可欠となってくる。我々がこれまで培ってきた核酸化学の知見を活かし、新規蛍光 DNA プローブや新規蛍光色素の構築を通じて新しい分子診断システムへと展開する。

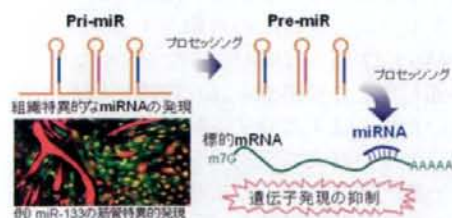


図1 発生や分化における miRNA の役割。時期・組織特異的に転写された miRNA 前駆体 (Pri-miR および Pre-miR) がプロセッシングを受けて短い RNA が生じる。miRNA は塩基配列依存的に標的 mRNA と相互作用して遺伝子の発現を抑制する。

B. 研究方法

マイクロ RNA に限らず、新規ノンコーディング RNA の作用機序解明のためには、発

現プロファイルを調べる必要があるが、小さな RNA の検出法に関しては、まだ研究がスタートしたばかりであり、確立されている技術も少ない。迅速、簡便に小さな RNA の検出を行う技術が確立されれば、ライフサイエンス研究だけではなく、診断薬の分野でも利用される可能性が高い。

実際のマイクロ RNA 研究現場では、ノーザンブロット法や、マイクロアレイ法などが利用されている。RT-PCR 法は一般的な RNA 検出法であり、組合せによってマイクロアレイ法や qPCR にも用いられるが、マイクロ RNA 解析には利用されにくい。その理由は、マイクロ RNA が 20 塩基程度と短いために、2 本のプライマーが結合するのが難しいためである。そのため、マイクロ RNA に付加配列を酵素的に連結する等の前処理が不可欠になる。

RNA を直接検出する方法として、in situ ハイブリダイゼーション法を用いた RNA の局在の可視化は魅力的な方法論である。しかし in situ ハイブリダイゼーション法のためのプローブを設計する際、成熟したマイクロ RNA に相補的な配列を利用すれば、そのようなプローブは、同時に、前駆体マイクロ RNA とハイブリダイゼーションしてしまう。すなわち、成熟したマイクロ RNA だけの細胞内局在を通常の in situ ハイブリダイゼーション法で決定することはできないという問題に直面する (図2)。

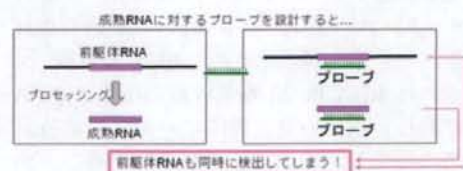


図2 成熟 RNA 検出のためのプローブの問題点。成熟 RNA と塩基対形成するプローブを設計すると、前駆体 RNA にも結合してしまい、区別できない。

そこで我々は、Molecular Beacon 法を改良し、塩基対形成に基づいて蛍光色素が消光

する現象 (Kurata S. et al.2001) を利用し、前駆体マイクロ RNA とは塩基対を形成して消光するが、成熟マイクロ RNA とは塩基対を形成しないことにより蛍光を生じるプローブを設計した。そして、この蛍光プローブを用いることにより、成熟マイクロ RNA とその前駆体とを識別でき、成熟マイクロ RNA のみを検出できることを見いだした (文献1/特許出願)。また、この手段はマイクロ RNA だけではなく、選択的プロセスに関わる RNA や SNP の検出などにも利用できる。

Molecular Beacon 法は、1996 年に Tyagi らによって開発された核酸分子検出技術であり、目的分子がハイブリダイズした場合にのみ蛍光を発する核酸分子に基づく手法である。ステム-ループ構造を有する核酸分子の一方の末端に蛍光分子を連結し、他方の末端に、その蛍光色素を消光する分子を連結する。ループ部分は標的分子とハイブリダイズする配列を含み、プローブ分子のみの場合には、蛍光分子が消光され、蛍光を発しない。標的分子と塩基対形成すると、蛍光分子と消光分子が離れ、蛍光を発するようになる (図3左)。

我々は、この Molecular Beacon 法と、核酸塩基による蛍光消光現象を組み合わせ、成熟した RNA だけを検出し、前駆体の RNA は検出しないようなプローブを考案した。すなわち、前駆体 RNA とプローブ分子がハイブリダイズする場合には、前駆体 RNA に含まれる核酸塩基が、プローブに結合している蛍光色素を消光して蛍光を発さず、成熟した短い RNA とプローブ分子がハイブリダイズした場合にのみ蛍光を発する仕組みである (図3右)。さらに、プローブ分子だけの場合にはステムループ構造を形成し、ステム部位に連結された蛍光色素が、塩基対によって近接する消光分子 (核酸塩基) によって蛍光を発しないため、蛍光検出時のバックグラウンドが極めて低くなる。本法は、Molecular Beacon 法の概念をさらに発展させ、成熟した短い RNA を検出するだけ

でなく、前駆体 RNA によって蛍光分子を消光して区別することから、“Molecular Spotter 法”と名付けた。グアニン残基自体が消光分子 (Quencher) として機能するため、従来の Molecular Beacon プローブに不可欠であった Dabcyl 基の様な消光分子を必要としない。

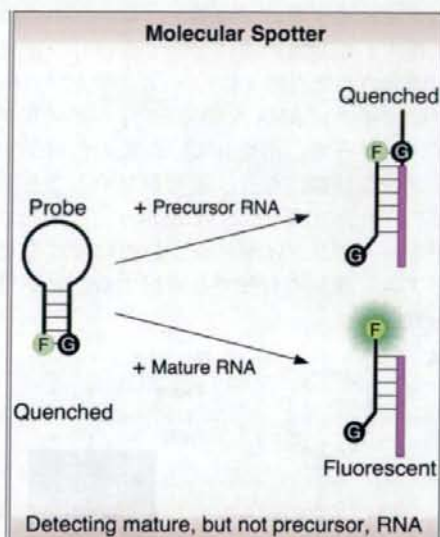


図3 新規蛍光プローブ。Molecular Spotter 法。プローブ分子だけの場合には蛍光消光により光らず、ターゲット分子との結合に伴って光る。今回新規に開発した Molecular Spotter 法では、前駆体 RNA と成熟 RNA を区別して検出することができる。

他の RNA 検出法とは異なり、酵素をまったく用いずに標的 RNA を検出することができること、および、ハイブリダイゼーション後に蛍光プローブ分子の洗浄の必要性がないことが、生細胞における検出のアドバンテージとなっている。本研究課題では、新規蛍光プローブの組み合わせによる検出系の最適化を行う。

C. 研究結果

提案者が考案した新規プローブは、目的 RNA と混ぜるだけで検出できる。始めの実

験として、マイクロ RNA に対する蛍光プローブ分子を作製し、モデル実験を行った(図5)。蛍光プローブ分子だけの溶液では、蛍光色素が、隣接するグアニン残基によって消光され、蛍光を示さない(図4 A)。ここに、マイクロ RNA 前駆体を加えると、ハイブリダイズはするが、マイクロ RNA 前駆体に含まれるグアニン残基とプローブ中の蛍光色素が塩基対形成によって近接し、蛍光が消光された(図4 B)。一方、蛍光プローブにマイクロ RNA を加えると、ハイブリダイズに伴って、消光していた蛍光色素がオープンな状態になり、蛍光を発することが確認された(図4 C)。したがって、目的分子をハイブリダイゼーションだけではなく、グアニン残基の有無でも選択することが可能となる。

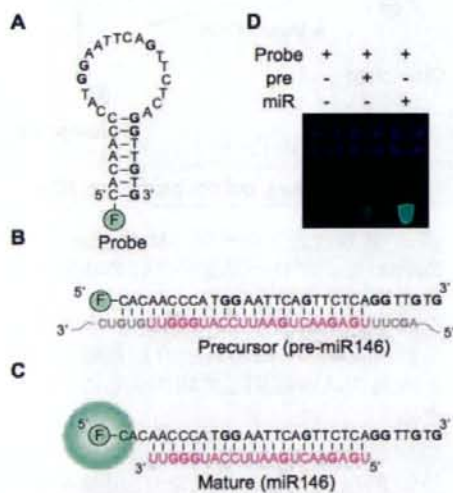


図4 Molecular Spotter Probe の設計。

A : プローブ分子だけの場合には消光される。B : 前駆体 RNA と結合しても消光される。C : 成熟 RNA と結合した場合にだけ蛍光を発する。D : 実験例。200 nM のプローブとターゲット核酸を混合し、UV 光で検出した。

本研究で用いられる蛍光 DNA プローブは、酵素を利用しないため、室温で反応させることが可能である。実際に、どの程度

の温度範囲で蛍光 DNA プローブが使用できるのかを調べるため、蛍光 DNA プローブの融解温度曲線を求めた。蛍光 DNA プローブは、そのステム(二本鎖領域)の長さが長いほど、高温で反応することが可能であ

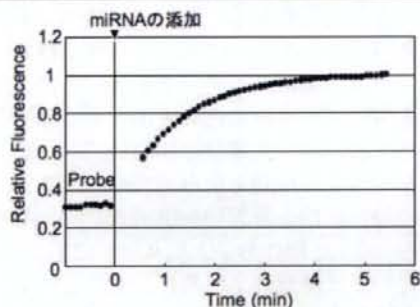
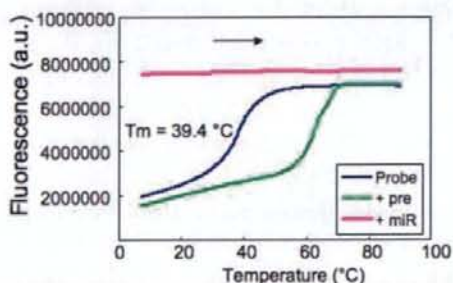


図5 蛍光 DNA プローブの融解温度曲線および反応時間。

るが、一方で、反応時間が長くなる蛍光にある。ステム長を4塩基対、5塩基対、6塩基対、7塩基対および8塩基対において条件検討を行ったところ、7塩基対の場合に最も効率的にマイクロ RNA を検出できることが明らかとなった。そこで、7塩基対のステムを持つ蛍光 DNA プローブの融解温度曲線を求めたところ、39.4°Cとなり、室温では確実にマイクロ RNA の有無を区別できることが明らかとなった(図5)。

次に、目的のマイクロ RNA を検出するためのどれくらいの時間を要するのかを計測した。今回、7塩基対のステムを有する蛍光 DNA プローブにおいて、マイクロ RNA と混合後にどれくらいでハイブリダイゼーションが起きるのかを調べたところ、ほぼ

5分以内にハイブリダイゼーションがプラトーに達することが明らかとなった(図5)。一般的なマイクロアレイやノーザンブロット法ではハイブリダイゼーションに10時間以上の時間をかけるのが通常であるが、これらの方法では、固相と液相の界面で行なわれるハイブリダイゼーションであるために時間がかかってしまう。一方で、今回の研究で使用される蛍光 DNA プローブは液相でハイブリダイゼーションが行なわれるため、非常に速やかに DNA/RNA 鎖の塩基対が形成される。

さらに蛍光 DNA プローブの感度を向上させるため、蛍光 DNA の構造について検討を行った。本研究で用いている蛍光色素は BODIPY-FL であり、蛍光値に関しては十分な強度が得られている一方で、グアニン残基による蛍光消光が完全ではないためにバックグラウンドの蛍光が存在し、全体的な感度に影響を及ぼしている。そこで、より蛍光消光されやすいような蛍光 DNA の構造の探索を行なった。現在利用しているプローブの化学修飾は、3' 末端にアミノリンカーを介した DNA に BODIPY-FL をコンジュゲートしたものである。原理としては、グアニン残基に蛍光色素が近接したほうが、蛍光消光の効率が高いと予想されるため、シトシン残基の5位に BODIPY-FL をリンクさせる方法を検討した。また、グアニンとシトシンの塩基対結合力向上のために、G-クランプと呼ばれる修飾塩基を用い、さらなる効率化を図った。その結果、G-クランプのアミノ基に BODIPY-FL で修飾した蛍光 DNA プローブは、グアニン残基が近傍に無い場合にも蛍光強度がほとんど見られず、この構造が利用できないことが明らかとなった。シトシン残基の5位に BODIPY-FL を修飾した場合には、グアニン残基が近傍に無い場合にも蛍光強度感度が減少してしまい、全体的な感度を向上させることができなかった。一方で、3' 末端にアミノリンカーを介して BODIPY-FL を結合させ、5' 末端に Dabcyl 基を導入させた場合には、バ

ックグラウンドを限りなく減らせることが明らかとなった。

D. 考察

これまでの研究において、我々が考案した Molecular Spotter 法について様々な条件検討を行ってきた。特に、バックグラウンドの蛍光を減らすため、構造化学的な見地から、新たな材料となる蛍光 DNA を創製し、その有効性を評価した。さらなるバックグラウンド蛍光を減らすためには、LNA (Linked Nucleic Acid) などの修飾核酸を導入することが有効であると考えられる。

一方、現段階の Molecular Spotter 法では、標的分子と検出分子(プローブ)との対応が1対1であるため、RIを用いたノーザンブロット法や、鋳型を増幅してシグナルを得る RT-PCR 法などの他法には感度の点で劣る。実際プレートリーダー装置を用いた方法では、3オーダーの直線性のある検量線が得られたが、検出限界は数 nM 程度であり、マイクロ RNA の検出には 10^6 程度の細胞数が必須となる。ただし、プレートリーダー装置の光源が水銀ランプであり青色光の出力が弱いことを考慮すると、半導体レーザーの使用により検出感度が高くなることが期待される。また本年度中に、マイクロ RNA を選択的に検出する別の方法を独自に考案しており、妥当性の評価を来年度以降の実験として計画している。

年々、臨床における遺伝子発現検査の比重が高まってきているが、その多くは、抗体を用いたタンパク質の定量化になっている。しかし、今後は RNA を検査する方向にシフトし、提案者の方法が活用できる場面が増えてくると想像している。その理由の一つが、RNA 安定化剤の開発である。Ambion 社 RNAlater 試薬、QIAGEN 社 RNAlater 試薬など、臨床サンプル中に含まれる RNA の分解を防ぐ試薬が開発され、簡単な前処理だけで、検査会社へサンプル輸送することが容易になると考えられる。検査会社は安定化されたサンプルから RNA を抽出精製して、RT-PCR やその他の

検査に使用することができる。

この RNA 安定化剤の組成は、クエン酸や EDTA などの金属イオンキレート剤と pH 5.2 のバッファーである。ほとんどの酵素がこの条件で不活性化されるので、RNA の分解を防ぐことができるようになる。当然この条件下では、PCR などのポリメラーゼも働かなくなるが、提案者の方法はこの条件下でも使用できる。つまり、RNA 安定化剤の中で蛍光プローブの検出を行うことができるので、迅速かつ安心して検査することが可能である。もちろん、検査残りの RNA は抽出用にまわして、再検査してもよい。

抗体から RNA 検査にシフトする第 2 の理由は、蛍光測定器の小型化とコストダウンである。抗体検査では発色により、可視光（肉眼）で結果を判断することができるが、RNA をベースとした検査法では、蛍光検出が欠かせない。この点が、RNA 検査におけるネックになっていたと思われる。ところが、近年の発光ダイオードの発展で、レーザー光を手軽に利用できるようになってきた。高い出力の光源が得られれば、それだけ蛍光プローブの感度も向上する。本研究で用いた蛍光色素は、BODIPY-FL である。フルオレセインと波長特性は同等であり、極大吸収波長を 488 nm に持ち、510 nm の蛍光を発する。多くの蛍光検出器がフルオレセイン用の蛍光フィルターを有しているため、BODIPY-FL を利用すれば、多くの研究者が利用することができる。高度検査と簡易検査の二極化が進む中、両方に対応できるツールとして本法が活用できれば、と期待している。

E. 結論

我々は、核酸塩基が隣接すると蛍光が消光するという蛍光色素を利用し、RNA の長さを区別して短い RNA を検出するという新しいタイプの蛍光プローブを設計して、特許を出願している。Molecular Spotter 法として報告したこの方法は、標的 RNA とハイブリダイゼーションした場合のみ蛍光を

発する仕組みになっており、マイクロアレイ法等に必要な洗浄操作が必要ない。また、液相での反応のため、ハイブリダイゼーションに時間がかからず、30 秒程度で結果が判断できる。さらに、酵素反応を用いないことから、SDS や EDTA など RNA 分解酵素の阻害剤を含んだ状態で検出することが可能で、検体から RNA を抽出・精製する必要がないという利点がある。また、この手段はマイクロ RNA だけではなく、SNP の検出などにも利用できる。マイクロ RNA が関与する遺伝子制御ネットワークの解明によって、これまでその実用化が困難であった医療産業応用への加速化が期待できる。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書に記載)

G. 研究発表

1. 論文発表

Yoshio Kato (2008) An efficient fluorescent method for selective detection of mature miRNA species. *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.*, 52, 71-72.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

加藤義雄ほか、「新規蛍光標識核酸」特許公開 2008-86296 (出願日 2006.10.5)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
関敦仁	上腕・肘関節・前腕構造と機能	越智隆弘	最新整形外科学大系14	中山書店	東京都	2008	1-20
川合眞一	薬効群別副作用・非ステロイド抗炎症薬	監修：高橋隆一	医薬品副作用ハンドブック第1版	日本臨床社	東京	2008	110-113
楠夏子, 川合眞一	治療薬剤：(1)非ステロイド抗炎症薬(NSAIDs)	宮坂信之編集	新しい診断と治療のABC⑧ 関節リウマチ [改訂第2版]	最新医学社	東京	2008	176-184
川合眞一		単著	ササッとわかる最新「関節リウマチ」治療法	講談社	東京	2008	
橋口正行, 井上幸恵, 田中孝典, 高木賢治, 川合眞一, 望月眞弓	メトトレキサートのよる関節リウマチ個別化療法の確立のための臨床薬理学的研究		臨床薬理の進歩2008 NO.29	発行：財団法人臨床薬理研究会	東京	2008	143-153
川合眞一	1. ステロイド内用剤とは？	宮坂信之編集	正しいステロイド剤の使い方 1. 内用剤編	医薬ジャーナル社	大阪	2008	8-11
川合眞一	薬効群別副作用・鎮痛薬 [1] 非ステロイド性抗炎症薬	8. 伊藤澄信編	頻用薬・常用薬上手に使っていますか？ 日常診療でよく使う薬の使い方とそのポイント	日本医事新報社	東京	2009	176-179
川合眞一	フェルティ症候群	山口徹, 北原光夫, 福井次矢 総編集	今日の治療指針2009年版	医学書院	東京	2009	619-620
川合眞一	診療ガイドライン・19. 関節リウマチの診療マニュアル 診断のマニュアルとEBMに基づく治療ガイドライン (2004)	山口徹, 北原光夫, 福井次矢 総編集	今日の治療指針2009年版	医学書院	東京	2009	1644-1648

川合眞一	8. 免疫抑制薬	編集：水島裕 編集協力・執筆：浦部晶夫、島田和幸、川合眞一	今日の治療薬 解説と便覧 2009	医学書院	東京	2009	232-234
川合眞一	9. 副腎皮質ステロイド	編集：水島裕 編集協力・執筆：浦部晶夫、島田和幸、川合眞一	今日の治療薬 解説と便覧 2009	医学書院	東京	2009	241-251
川合眞一	10. 非ステロイド抗炎症薬、鎮痛・解熱薬、総合感冒薬	編集：水島裕 編集協力・執筆：浦部晶夫、島田和幸、川合眞一	今日の治療薬 解説と便覧 2009	医学書院	東京	2009	267-275
川合眞一	11. 抗リウマチ薬	編集：水島裕 編集協力・執筆：浦部晶夫、島田和幸、川合眞一	今日の治療薬 解説と便覧 2009	医学書院	東京	2009	300-305
川合眞一	12. 消炎酵素	編集：水島裕 編集協力・執筆：浦部晶夫、島田和幸、川合眞一	今日の治療薬 解説と便覧 2009	医学書院	東京	2009	313
川合眞一	45. 副腎皮質ステロイド	矢崎義雄 監修／松澤佑次、奥村勝彦、永井良三、千葉勉、伊藤貞嘉 編集	治療薬 Up-to-Date 2009	メデッセカ ー社	東京	2009	464-468
川合眞一	46. 非ステロイド抗炎症薬(NSAIDs)	矢崎義雄 監修／松澤佑次、奥村勝彦、永井良三、千葉勉、伊藤貞嘉 編集	治療薬 Up-to-Date 2009	メデッセカ ー社	東京	2009	479-482

2. 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Higashiyama R, Miyaki S, Sasho T, Takahashi K, Lotz M, Asahara H.	Correlation between MMP-13 and HDAC7 expression in human knee osteoarthritis.	Mod Rheumatol.			Submitted
Yamashita S, Andoh M, Ueno-Kudoh H, Satoh T, Miyaki S, Asahara H.	Sox9 directly promotes Bapx1 gene expression to repress Runx2 in chondrocytes.	Exp Cell Res.			in press
Miyaki S, Nakasa T, Otsuki S, Grogan SP, Higashiyama R, Inoue A, Kato Y, Sato T, Lotz M, Asahara H.	MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates Il-1 responses.	Arthritis Rheum.			in press
Yamasaki K, Nakasa T, Miyaki S, Ishikawa M, Deie M, Adachi N, Yasunaga Y, Asahara H, Ochi M.	Expression of microRNA-146 in osteoarthritis cartilage.	Arthritis Rheum.	60(4)	1035-1041	in press
Furumatsu T, Ozaki T, Asahara H.	Smad3 activates the Sox9-dependent transcription on chromatin.	Int J Biochem Cell Biol.	41(5)	1198-1204	in press
Manabe H, Nasu Y, Komiyama T, Furumatsu T, Kitamura A, Miyazawa S, Ninomiya Y, Ozaki T, Asahara H, Nishida K.	Inhibition of Histone Deacetylase Down-Regulates the Expression of Hypoxia-Induced Vascular Endothelial Growth Factor by Rheumatoid Synovial Fibroblasts.	Inflamm Res.	57(1)	4-10	2008
Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, Hashimoto M, Nishida K, Ochi M, Asahara H.	Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue.	Arthritis Rheum.	58(5)	1284-1292	2008
Nishino J, Tanaka S, Matsui T, Mori T, Nishimura K, Eto Y, Kanako A, Saisho K, Yasuda M, Chiba N, Yoshinaga Y, Saeki Y, Seki A, Tohma S.	Prevalence of joint replacement surgery in rheumatoid arthritis patients: cross-sectional analysis in a large observation cohort in Japan.	Mod Rheumatol.			in press
関敦仁	RA手指に必要な機能解剖	関節外科	27	20-27	2008

Kitahara K, Kusunoki N, Kakiuchi T, Suguro T, <u>Kawai S.</u>	Adiponectin stimulates IL-8 production by rheumatoid synovial fibroblasts.	Biochem Biophys Res Commun.	378(2)	218-223	2009
Kusunoki Yamazaki <u>Kawai S.</u>	Pro-apoptotic effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on synovial fibroblasts.	Mod Rheumatol.	18(6)	542-551	2008
Akimoto K, Kusunoki Y, Nishio S, Takagi K, <u>Kawai S.</u>	Safety profile of tacrolimus in patients with rheumatoid arthritis.	Clin Rheumatol.	27(11)	1393-1397	2008
<u>Kawai S.</u> , Tanaka K, Ohno I, Utsunomiya K, Seino Y.	Safety of long-term tacrolimus therapy for rheumatoid arthritis: an open-label uncontrolled study in non-elderly patients.	Mod Rheumatol.	18(4)	345-353	2008
Kitahara K, Takagi K, Kusunoki Y, Nishio S, Nozaki T, Inomata H, Takei M, Sawada S, <u>Kawai S.</u>	Clinical value of second and third generation assays of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis.	Ann Rheum Dis.	67(7)	1059-1060	2008
<u>Kato Y.</u>	An efficient fluorescent method for selective detection of mature miRNA species.	Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).	52	71-72	2008
Paiboonskuwong K, <u>Kato Y.</u>	Detection of active microRNA species using fluorescent DNA probe.	Miami Winter Symp Ser Short Rep.	19	T22	2008

3. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得	加藤義雄ほか, 「新規蛍光標識核酸」特許公開2008-86296 (出願日2006.10.5)
2. 実用新案登録	なし
3. その他	なし

IV. 研究成果の刊行物・別刷



available at www.sciencedirect.com

www.elsevier.com/locate/yexcr



Research Article

Sox9 directly promotes *Bapx1* gene expression to repress Runx2 in chondrocytes

Satoshi Yamashita^a, Masataka Andoh^b, Hiroe Ueno-Kudoh^a, Tempei Sato^{a,c},
Shigeru Miyaki^d, Hiroshi Asahara^{a,d,*}

^aDepartment of Systems BioMedicine, National Research Institute of Child Health and Development, Tokyo 157-8535, Japan

^bNew National IT Strategy Business Promotion Division, NEC Corporation, Tokyo 108-8001, Japan

^cSchool of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo 113-8510, Japan

^dDepartment of Molecular and Experimental Medicine, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA 92037, USA

ARTICLE INFORMATION

Article Chronology:

Received 20 January 2009

Revised version received

13 March 2009

Accepted 14 March 2009

Keywords:

Sox9

Bapx1

Runx2

Chondrocyte

Chondrogenesis

shRNA

ABSTRACT

The transcription factor, Sry-related High Mobility Group (HMG) box containing gene 9 (Sox9), plays a critical role in cartilage development by initiating chondrogenesis and preventing the subsequent maturation process called chondrocyte hypertrophy. This suppression mechanism by Sox9 on late-stage chondrogenesis partially results from the inhibition of Runx-related transcription factor 2 (Runx2), the main activator of hypertrophic chondrocyte differentiation. However, the precise mechanism by which Sox9 regulates late chondrogenesis is poorly understood.

In the present study, the transcriptional repressor vertebrate homolog of *Drosophila* bagpipe (*Bapx1*) was found to be a direct target of Sox9 for repression of Runx2 expression in chondrocytes. We identified a critical Sox9 responsive region in the *Bapx1* promoter via a luciferase reporter assay. Analysis by chromatin immunoprecipitation and electrophoretic mobility shift assays indicated that Sox9 physically bound to this region of the *Bapx1* promoter. Consistent with the notion that *Bapx1* and Sox9 act as negative regulators of chondrocyte hypertrophy by regulating Runx2 expression, transient knockdown of Sox9 or *Bapx1* expression by shRNA in chondrocytes increased Runx2 expression, as well as expression of the late chondrogenesis marker, *Col10a1*. Furthermore, while over-expression of Sox9 decreased Runx2 and *Col10a1* expressions, simultaneous transient knockdown of *Bapx1* diminished that Sox9 over-expressing effect.

Our findings reveal that the molecular pathway modulated by *Bapx1* links two major regulators in chondrogenesis, Sox9 and Runx2, to coordinate skeletal formation.

© 2009 Published by Elsevier Inc.

Introduction

Chondrogenesis is executed in multiple steps during endochondral ossification. Mesenchymal cells first proliferate, condense, become immature chondroblasts, transform into prehypertrophic

chondrocytes, and differentiate into hypertrophic chondrocytes [1]. In immature chondroblasts (i.e., during early chondrogenesis), extracellular matrix (ECM) proteins such as type II collagen alpha 1 (Col2a1), type XI collagen alpha 2 (Col11a2), and aggrecan 1 (Agc1) are specifically expressed. On the other

* Corresponding author. 2-10-1 Okura, Setagaya, Tokyo, 157-8535, Japan. Fax: +81 3 3417 2498.

E-mail address: asahara@nch.go.jp (H. Asahara).

Abbreviations: *Bapx1*, vertebrate homolog of *Drosophila* bagpipe; *Col10a1*, type X collagen alpha 1; *Col2a1*, type II collagen alpha 1; Gapdh, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; KD, knockdown; Runx2, runt-related transcription factor 2; Sox9, Sry-related High Mobility Group box containing gene 9

hand, in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes (i.e., during late chondrogenesis), expression of these proteins is decreased, while type X collagen alpha 1 (Col10a1), Indian hedgehog (Ihh), and osteopontin expression is increased [2]. In addition, Sox9 is dominantly expressed in early chondrogenesis, whereas Runx2 dominates as the critical transcription factor in late chondrogenesis [2,3].

The transcription factor Sox9 is a critical regulator of chondrocyte-specific proteins, such as Col2a1, Col11a2, and Agc1, during cartilaginous development [4-6]. Analyses in genetically modified mice revealed that Sox9 promotes the early stage, but suppresses the late stage, of chondrogenesis [7-9]. On the contrary, the transcription factor Runx2 is a critical enhancer of chondrocyte maturation and osteoblast differentiation [10-14]. Although the relationship between Sox9 and Runx2 in chondrogenesis is poorly understood, Sox9 directly binds to Runx2 and inhibits its function [15].

Another transcription factor, Bapx1 (also known as Nkx3.2), plays a critical role during cartilage development [16-18]. Bapx1 is a transcriptional repressor known to regulate Runx2 expression [19]. Interestingly, a recent study revealed that forced expression of Bapx1 throughout the cartilage template blocked chondrocyte hypertrophy, mirroring the Sox9 over-expression phenotype [20]. Furthermore, experiments using chicken somatic explants in culture have shown that Bapx1 and Sox9 are able to induce the expression of each other [21].

While Bapx1 is known to be a transcription factor crucial for chondrogenic differentiation [22], little is known about its transcriptional targets. Recently, Runx2 has been reported to be a target gene of Bapx1 [19], representing a critical transcription factor for osteoblast differentiation and also promoting hypertrophic chondrocyte differentiation in endochondral ossification [10-14,23]. Furthermore, Sox9 promotes the early stage, but suppresses the late stage, of chondrogenesis [9]. These results suggest that Bapx1 potentially links the two major regulators of chondrogenesis, Sox9 and Runx2.

In the present study, Bapx1 expression was up-regulated by Sox9 in chondrocytes, and luciferase reporter assays revealed that Sox9 activated the Bapx1 promoter. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and electrophoretic mobility shift assays (EMSA) demonstrated that Sox9 physically bound to the Bapx1 promoter in chondrocytes. Additionally, our gain- and loss-of-function experiments showed that the expression of Runx2 and its target, Col10a1,

was repressed by Sox9, coincident with increased Bapx1 expression. These data collectively demonstrate that Bapx1 is a direct Sox9 target in chondrocytes. Moreover, our findings strongly suggest that Sox9 represses Runx2 through Bapx1 regulation, resulting in suppression of hypertrophic chondrocyte differentiation.

Materials and methods

Antibodies

Anti-Sox9 antibody (Chemicon) was used in western blots and electrophoretic mobility shift assays (EMSA). Anti-Bapx1 antibody (Abcam) was used in western blots. Anti-actin antibody (Sigma) was used as a control for quantitative determination of western blots. As secondary antibodies for western blots, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) and anti-mouse IgG (Sigma) were used. Normal rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology Inc.) was used as a negative control in chromatin immunoprecipitation (ChIP) and EMSA experiments.

Cell culture

C3H10T1/2 cells were maintained in DMEM containing 10% FBS at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂. To induce chondrogenesis, 10 μl aliquots of a suspension containing 10⁷ cells/ml were plated into wells of a 24-well plate containing culture medium. After 2 h, 100 ng of human bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) (PeproTech)/ml was added to the culture. Media was changed every 2 days.

Ribs from embryonic day 16.5 mice were used in the preparation of chondrocytes by digestion with collagenase. Murine chondrocytes were maintained in DMEM containing 10% FBS at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂.

Western blot

Cells were lysed with NP-40 lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 3 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 50 mM NaF, 1 mM β-glycerophosphate, 5 mM Na₂P₂O₇ · 10 H₂O, 1 mM Na₃VO₄, 10 μg/ml PMSF) containing a Complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan). Protein concentrations were measured using the DC Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories,

Table 1 – Primer sequences.

Gene name	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
<i>a) Sequence for each primer set used in qualitative and quantitative RT-PCR</i>		
Sox9	5'-TACGACTGGACGCTGGTCC-3'	5'-CCGTCTCCACCGACTCTCTCC-3'
Col2a1	5'-TCATCGAGTACCGATCACAGA-3'	5'-GTTCGGGGTTTTACAGAAG-3'
Bapx1	5'-CCACTGCAGCCCTCTACTA-3'	5'-GTGTCAAGTCCCAGCAGGAT-3'
Runx2	5'-GGACGAGGCAAGAGTTTAC-3'	5'-CCAGAGGCAGAAAGTCAGAGG-3'
Col10a1	5'-GTCCAAGAGGTGAACCTGGA-3'	5'-TCTGTGAGCTCCATGATTC-3'
Gapdh	5'-CCTGGTCCACCGGCTGC-3'	5'-CGCTCTGGAAGATGGTGATG-3'
<i>b) Sequence for each primer set used in chromatin immunoprecipitation (ChIP)-PCR</i>		
Col2a1	5'-GGGAGACCTCAGTCTCTT-3'	5'-GGAGGCTGTGCATTGTGG-3'
Amh	5'-GCTCAGCCTCTGCAGTAT-3'	5'-GGGTGGCCCTCTTATATGT-3'
Bapx1	5'-GAGACGAATACCCAGCTCCA-3'	5'-GAGCCAGAGTCGAAAGAACA-3'

138 CA, USA), and equal amounts of protein were subjected to SDS-
139 polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Separated proteins
140 were electrically transferred to PVDF membrane, blocked with
141 TBST (Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20) containing
142 5% skim milk, washed with TBST, and then incubated with
143 primary antibody (appropriately diluted with blocking buffer) for
144 either 1.5 h at room temperature (RT) or overnight at 4 °C.
145 Subsequently, blots were washed with TBST, incubated with
146 secondary antibody (diluted in blocking buffer) for 1 h at RT, and
147 washed with TBST. Proteins were detected using a chemilumines-
148 cence kit (Nacalai, Kyoto, Japan).

149 RT-qualitative and quantitative PCR

150 Total RNA was extracted with ISOGEN (Nippon Gene) according to
151 the manufacturer's protocol. Total RNA was reverse transcribed
152 with Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare)
153 with oligo-dT. To analyze gene expression, first strand cDNA was
154 amplified via PCR, using gene-specific primer sets (Table 1) and
155 PrimeStar™ HS DNA Polymerase (Takara), followed by agarose gel
156 electrophoresis.

157 Quantitative gene expression analysis was performed via
158 real-time PCR, using TaqMan Universal Master Mix reagents
159 with TaqMan Probes or SYBR Green PCR master mix reagents
160 (Applied Biosystems) with gene-specific primer sets (Table 1)
161 on an ABI PRISM® 7900HT thermal cycler (Applied Biosystems).
162 *Col2a1*, *Runx2*, *Col10a1*, and *Gapdh* mRNAs were measured using
163 mouse TaqMan probes Mm00491889_m1, Mm00501578_m1,
164 Mm00487041_m1, and Mm99999915_g1, respectively (Applied
165 Biosystems). In each experiment, expression data was normal-
166 ized to *Gapdh* expression.

167 Lentivirus production and transduction

168 Oligonucleotide sequences for short hairpin RNA (shRNA) target-
169 ing Sox9, Bapx1, or LacZ as a control were cloned into the plenti4/
170 BLOCK-iT™-DEST vector (Invitrogen), and Sox9 cDNA was cloned
171 into the plenti6 vector (Invitrogen). Each vector and ViraPower
172 packaging vector (Invitrogen) were transfected to 293FT cells, and
173 lentivirus was produced. Lentivirus was transduced into cells with
174 10 µg/ml polybrene. The following oligonucleotide sequences were
175 cloned into the plenti4/BLOCK-iT™-DEST vector:

176 LacZ (5'-AAATCGCTGATTGTGAGTCGAGACGACTACACAAAT-
177 CAGCGA-3'),
178 Sox9 (5'-GCGACAACCTTACCAGTTCCAGAACTGAACTGG-
179 TAAAGTTGTCGC-3'),
180 Sox9-2 (5'-CCGACGTCATCTCCAACATTGCGAACAATGTTGA-
181 GATGACGTCGC-3'),
182 and Bapx1 (5'-GAGATGTCAGCCAGCGTTTCACGAAT-
183 GAAACCTCGCTGACATCTC-3').

184 Luciferase reporter assay and transfections

185 pGL4.12-Luc vector (Promega) including the indicated cloned
186 genomic regions and thymidine kinase (TK) promoter was
187 transfected into cultured cells. A *Renilla* luciferase reporter pRL-
188 TK (Promega) was co-transfected as a control for evaluating
189 transfection efficiency. Transfections were performed with Lipo-
190 fectamine 2000 or LTX (Invitrogen) according to the manufac-

turer's instructions. After 24 h, cells were washed before
191 measuring firefly and *Renilla* luciferase activities using the Dual-
192 Glo™ Luciferase Assay System (Promega). In each experiment,
193 firefly luciferase activity was normalized to *Renilla* luciferase
194 activity. 195

Mutagenesis

196 Mutations were introduced using QuikChange® Site-Directed
197 Mutagenesis (Stratagene) according to the manufacturer's
198 instruction. 199

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

200 Cells were cross-linked with 1% formaldehyde for 10 min at RT,
201 followed by addition of glycine to a final concentration of 0.125 M.
202 Next, cells were washed with PBS, collected, washed with cell lysis
203 buffer (5 mM PIPES pH 8.0, 85 mM KCl, 0.5% NP-40, and 10 µg of
204 PMSF/ml) containing protease inhibitors, and resuspended in
205 nuclear lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.1, 10 mM EDTA, 1% SDS,
206 and 10 µg of PMSF/ml) containing protease inhibitors. Chromatin
207 was sheared to approximately 200–1000 bp by sonication, prior to
208 a 1/5 dilution in ChIP dilution buffer (16.7 mM Tris-HCl pH 8.1,
209 167 mM NaCl, 1.2 mM EDTA, 0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, and 10 µg
210 of PMSF/ml) containing protease inhibitors. Then, the chromatin
211 solution was incubated with the indicated antibody and Dyna-
212 beads® M-280 sheep anti-rabbit IgG (DynaL Biotech) overnight at
213 4 °C. Beads were washed three times with ChIP wash buffer
214 (50 mM HEPES-KOH (pH 7.0), 0.5 M LiCl, 1 mM EDTA, 0.7% sodium
215 deoxycholate, and 1% NP-40). Immunocomplexes were eluted
216 from beads with ChIP elution buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0),
217 10 mM EDTA, and 1% SDS) for 1 h at 65 °C. Eluates were then
218 incubated overnight at 65 °C to reverse cross-linking, prior to the
219 addition of 0.5 mg of protease K/ml for 2 h at 55 °C. DNA was
220 purified using the MinElute PCR purification kit (QIAGEN) and
221 analyzed using the site-specific primer pair sets described in Table
222 1. Also, whole cell extract (WCE) was analyzed by PCR. 223

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

224 DNA-protein binding was assayed with DNA probes that had been
225 ³²P-labeled by end-filling with Klenow fragment and Sox9 in the
226 presence or absence of anti-Sox9 antibody or rabbit IgG. Anti-Sox9
227 antibody or rabbit IgG was pre-incubated with Sox9 for 30 min at
228 25 °C before addition of radiolabeled probes. Reactions were
229 performed in binding buffer [20 mM HEPES (pH 7.9), 10% glycerol,
230 50 mM KCl, 0.05% NP-40, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, and 1 mM
231 PMSF] in the presence of 0.5 µg of poly (dG-dI), a nonspecific
232 competitor, for 30 min at 25 °C. Products of the binding reactions
233 were separated by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) on a
234 4% gel for 3 h at 100 V. 235

Results

Bapx1 is expressed in early chondrogenesis, and its expression is up-regulated by Sox9 in chondrocytes

236 The temporal sequence of Sox9 and Bapx1 expression in 240
237 chondrogenesis was first examined by a well-established *in vitro* 241