

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19780077

研究課題名（和文）骨形成・代謝におけるcGMPシグナリングの解析

研究課題名（英文）Studies of cGMP signaling in bone formation and metabolism.

研究代表者

湯浅 恵造（YUASA KEIZO）

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・助教

研究者番号：70363132

研究成果の概要：

骨形成および骨代謝に cGMP シグナリングが重要な役割を果たしていることが知られている。本研究では、cGMP 結合タンパク質である cGK II および cGK I の情報伝達系の解明を試み、以下の成果を得た。

1. 酵母two-hybrid法によって、cGK IIと特異的に相互作用するタンパク質として小胞輸送制御因子Rab11を同定した。cGK II-Rab11複合体はcGMP依存的に中心小体から細胞膜へと移行した。
2. cGK Iα結合タンパク質としてrhoエフェクタータンパク質であるrhotekinを同定した。cGK Iαとrhotekinの特異的な結合は、cGMPによるcGK Iαの活性化に伴って解離することが明らかとなった。また、cGK Iαはrhotekinの92番目Serを特異的にリン酸化したことから、そのリン酸化の生理意義について解析中である。
3. cGK Iの候補基質としてcyclin-dependent protein kinase (CDK) ファミリーに属するPCTAIRE protein kinase 3 (PCTK3) を同定した。部位特異的変異導入実験によってcGK IαはPCTK3の12番目Serを特異的にリン酸化することが明らかとなった。現在、リン酸化によるkinase活性や細胞内局在の変動などについて解析中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：情報伝達

## 1. 研究開始当初の背景

骨は、軟骨細胞による骨形成と、骨をつくる骨芽細胞と骨を壊す破骨細胞が営む骨リモデリングにより維持されている。この骨形成・

代謝のどちらにも細胞内セカンドメッセンジャーの1つであるサイクリック GMP

(cGMP) が重要な役割を果たすことが知られている。ナトリウム利尿ペプチドあるいは一

酸化窒素(NO)によって産生されたcGMPは、主にcGMP依存性プロテインキナーゼ(cGK)の活性化を介してそのシグナルを伝達し、様々な生理機能に關与する。cGKには、I $\alpha$ 、I $\beta$ 、II型の計3種類が存在し、細胞や組織によって、また、時期によってそれぞれの発現パターンが異なり、複雑に細胞内シグナル伝達を制御している。

細胞膜に局在するII型cGK(cGK II)は、その欠損マウスがdwarfismを呈することから軟骨分化において必須であることが明らかとなっている。免疫組織化学染色により増殖および肥大化軟骨細胞層にその発現が認められることから、増殖から肥大化への分化における分子スイッチであることが示唆されている。しかしながら、軟骨形成におけるcGMP/cGKシグナリングの分子レベルでの解析はほとんどなされておらず、未だcGK IIの直接的な標的タンパク質、すなわち基質の同定には至っていない。また、I型cGK(cGK I)と異なり、アンカリングタンパク質などの調節タンパク質も同定されていない。

一方、cGK Iは骨芽細胞や破骨細胞で発現が認められ、特に破骨細胞においてはcGK選択的阻害剤を用いた解析からNO/cGMP/cGKシグナリングが骨吸収の抑制に關与することが報告されている。また、別の報告では、NO/cGMPシグナルによって破骨細胞分化が阻害されることが明らかとなっている。しかしながら、いずれの作用もcGK I以降のシグナル伝達経路について明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

(1)リン酸化反応を仲介する細胞内シグナル伝達はプロテインキナーゼの基質特異性のみによって決定付けられているのではなく、キナーゼと標的分子との相互作用によっても左右され、これらは直接的あるいはアンカリングタンパク質などを介して間接的に行われる。cGK IIに關して調節因子であるアンカリングタンパク質や基質などはほとんど同定されておらず、cGK IIが介するシグナル伝達経路については不明のままである。そこで、cGK IIが介するシグナル伝達経路の解明を目的として、cGK IIと相互作用するタンパク質の同定を行う。

(2)細胞質に存在するcGK Iはその局在場所がシグナル伝達機構の解明に重要とされている。そして、cGK Iの局在場所は特異的な結合タンパク質によって決定されている。例えば、筋細胞においてcGK IはトロポニンTとの相互作用を介して基質タンパク質であるトロポニンIの近傍に局在し、細胞内cGMP

レベルの上昇に伴って迅速かつ正確にトロポニンIのリン酸化を触媒することが明らかにされている。破骨細胞や骨芽細胞においてはそのようなcGK I結合タンパク質が未だ同定されていない。そこで、酵母two-hybrid法によりcGK Iと特異的に相互作用するタンパク質の同定を試みる。

(3)破骨細胞分化におけるcGMP/cGK Iシグナルの役割を阻害剤やRNAiなどにより確認する。また、cGMP分解酵素であるホスホジエステラーゼ(PDE)の阻害剤を用いて分化に及ぼす影響を調べる。

(4)FGFR3活性型変異体がMAPキナーゼの活性化を介して軟骨細胞の増殖および分化を抑制するのに対して、cGMP/cGK IIシグナルは活性化されたMAPキナーゼ経路を抑制することが明らかにされている。そこで、FGF刺激した軟骨細胞およびその刺激直前にcGMPを前処理した細胞からタンパク質をそれぞれ抽出し、cGKのリン酸化コンセンサス配列を認識するリン酸化部位特異的抗体を用いてcGK II基質タンパク質の精製およびその同定を行う。また、マウス骨芽細胞3T3-E1細胞を用いてcGMP処理によってリン酸化されるタンパク質についても同様に同定する。

## 3. 研究の方法

(1)酵母two-hybrid法によりcGK IIと特異的に相互作用するタンパク質の同定を行った。マウスcGK IIのN末端側アミノ酸274残基の領域をベイトとしてマウスcDNAライブラリーをスクリーニングした。得られた陽性クローンについてDNAシーケンス解析を行った。陽性クローンを動物細胞発現ベクターにクローニングし、動物細胞内における相互作用を免疫沈降によって調べた。また、免疫蛍光細胞染色によって細胞内局在を調べた。

(2)酵母two-hybrid法によりcGK I $\alpha$ と特異的に相互作用するタンパク質の同定を行った。cGK I $\alpha$ のN末端側アミノ酸416残基の領域をベイトとしてマウスcDNAライブラリーをスクリーニングした。得られた陽性クローンについてDNAシーケンス解析を行った。陽性クローンを動物細胞発現ベクターにクローニングし、動物細胞内における相互作用を免疫沈降によって調べた。また、in vitro kinase解析およびcGKのリン酸化コンセンサス配列を認識するリン酸化部位特異的抗体(抗phospho-RRXS\*/T\*抗体)を用いたイムブロットング解析によりリン酸化実験を行った。

(3)破骨細胞分化モデルとしてマウスマクロファージ様細胞Raw264細胞を用いた。この細胞は、骨芽細胞に発現している膜貫通タン

パク質 RANKL の細胞外ドメイン (可溶性 RANKL) によって処理すると多核の破骨細胞に分化する。破骨細胞は酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) を特異的に発現しており、酒石酸存在下でフォスファターゼ染色 (TRAP 染色) を行うと、破骨細胞は赤色に染色され、破骨細胞への分化が確認できる。NO 刺激による破骨細胞分化への影響を調べるために、TRAP 染色後、分化した破骨細胞の総数をカウントした。

#### (4) 増殖軟骨細胞としてラット

chondrosarcoma (RCS) 細胞を用いた。FGF 刺激またはその刺激直前に膜透過性 cGMP を前処理した RCS 細胞からタンパク質を抽出し、これを PKA および cGK のコンセンサスリン酸化配列を認識するリン酸化部位特異的抗体 (抗 phospho-RRXS\*/T\*抗体) を用いて免疫沈降した。免疫沈降物について同抗体を用いたイムノブロッティング解析を行った。また、膜透過性 cGMP 処理したマウス骨芽細胞 3T3-E1 細胞についても同様に解析した。さらに、プロテインアレイを用いて cGK I の基質の同定を行った。

### 4. 研究成果

(1) cGK II と相互作用するタンパク質として低分子量 G タンパク質である Rab11b を同定した。Rab11 ははじめとする Rab ファミリーは細胞内のエンドソームと呼ばれる輸送小胞に局在し、様々なエフェクター因子と相互作用することによってタンパク質のリサイクルを制御している。その中でも Rab11 はリサイクルエンドソームに局在し late-recycling pathway の制御を行っている。cGK II は Rab11b 以外にも Rab11a と特異的な相互作用を示したが、Rab11 の制御するタンパク質リサイクルと関連性の高い他の Rab ファミリー (Rab4a, Rab5a, Rab7a) との相互作用は認められなかった。また、Rab11 は cGK Iα とは結合を示さず、cGK II と Rab11 の相互作用は特異的であることが明らかとなった。さらに、cGK II は Rab11b の野生型や GTP 結合型である constitutively active 変異体とは相互作用を示さず、GDP 結合型である dominant negative 変異体と強い相互作用を示した。これより cGK II は Rab11b が GDP と結合した状態の時のみに相互作用を示すことが明らかとなった。

次に、cGK II と Rab11b の細胞内局在や共発現させた際の局在の変化について検討した。単独で発現させた cGK II は細胞膜に局在したが、GDP 結合型 Rab11b と共発現することによって cGK II は細胞膜から細胞質へと移行し、核周辺部 (中心小体) で GDP 結合型 Rab11b

と共局在した。また、cGK II は初期エンドソームに局在し Early-recycling pathway に関与する Rab4a や膜タンパク質の細胞膜から初期エンドソームの輸送に関与する Rab5a と細胞内の一部で共局在を示したが、初期エンドソームからリソソームへの輸送に関与し後期エンドソームに局在する Rab7a とは局在が一致しなかった。これらの結果より、cGK II は Rab4 や Rab5 と間接的に相互作用することが考えられた。また、cGK II と GDP 結合型 Rab11b を共発現させた細胞を膜透過性 cGMP により処理したところ、処理前では cGK II は中心小体に局在するのに対して cGMP によって Rab11b とともに細胞膜へと移行した。

cGK II の候補基質である CFTR などは cGK II によるリン酸化によって機能調節を受ける一方、Rab11 と相互作用し細胞膜に輸送されることにより機能していることが報告されている。今回得られた結果と考え合わせると、cGK II は CFTR などの候補基質の直接的なリン酸化による機能調節に関与するだけではなく、Rab11 の機能調節を介して基質タンパク質の機能を調節していることが推測された。また、cGK II-Rab11 複合体は cGMP 依存的に中心小体から細胞膜へと移行することから、cGK II の未だ同定されていない基質が細胞内輸送を制御していることが考えられ、現在、細胞内輸送に関わる cGK II 基質の同定を試みている。

(2) cGK Iα 結合タンパク質として rho エフェクタータンパク質である rhotekin を同定した。rhotekin は cGK Iβ とも強い相互作用を示した。また、in vitro 結合実験により cGK Iα D502A (kinase-dead 変異体) および cGK Iα I63T (constitutively active 変異体) とは結合を示したが、cGK Iα I19A/L40A (ロイシンジッパー構造の機能を無くした変異体) とは相互作用を示さなかった。この結果より、cGK Iα と rhotekin の相互作用は cGK Iα の N 末端領域ロイシンジッパー構造を介して行われていること、また、この結合には cGK Iα の活性化に伴う立体構造の変化は関与しないことが示された。動物細胞においても cGK Iα と rhotekin の相互作用は認められたが、膜透過性 cGMP 処理による cGK Iα の活性化に伴って cGK Iα と rhotekin が解離することが明らかとなった。cGK は N 末端にある cGMP 結合領域に cGMP が結合すると立体構造が変化し、活性が上昇する。in vitro 結合実験において、立体構造変化を起こしている constitutively active cGK Iα 変異体が rhotekin と結合することと考え合わせると、cGMP による cGK Iα と rhotekin の解離は cGMP の結合による cGK Iα の立体構造の

変化に伴う解離ではなく、cGK I $\alpha$ の活性化に伴い rhotekin が受けた影響、つまりリン酸化によって解離が引き起こされることが考えられた。そこで、cGK I $\alpha$ による rhotekin のリン酸化について検討した結果、cGK I $\alpha$ はcGMP依存的に rhotekin の93番目のセリン残基をリン酸化することが明らかとなった。現在、そのリン酸化の生理的意義について詳細な解析を進めている。

(3) RAW264細胞を用いて破骨細胞分化におけるcGMPの影響について検討した。NOドナーとしてSNAPとSIN-1を添加した場合、可溶性RANKLによって誘導された破骨細胞分化が抑制された。また、可溶性グアニルサイクラーゼ(sGC)活性化剤であるYC-1を添加した場合も破骨細胞分化は抑制された。これらの結果より、NOドナーおよびsGC活性化によって細胞内cGMP濃度が上昇し、破骨細胞分化が抑制されることが明らかとなった。次に、cGMPの破骨細胞分化抑制効果がcGKを介していることを確認するために、RAW264細胞におけるcGKの発現を調べたが、cGK I、cGK IIともに発現が認められなかった。そこで、他のcGMP結合タンパク質であるcGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2)の発現を調べた結果、その発現が確認された。PDE2はN末端側にGAFドメインを有し、それにcGMPが結合すると、cAMPおよびcGMP分解活性が上昇し、結果として細胞内cGMPおよびcAMPレベルの低下を引き起こす。cAMPはRANKLと相乗作用して破骨細胞分化を誘導することが知られていることから、cGMPはPDE2の活性化を介して細胞内cAMPレベルを低下させ、破骨細胞分化を抑制することが考えられた。一方、骨芽細胞ではcGK Iの発現は高く、また、cGMPによって破骨細胞分化に必須なRANKLの遺伝子発現が調節されることを明らかにした。

(4) RCS細胞および3T3-E1細胞を用いてcGMPによって変動するリン酸化タンパク質の同定を試みた。PKAおよびcGKのリン酸化コンセンサス配列を認識するリン酸化部位特異的抗体(抗phospho-RRXS\*/T\*抗体)を用いたイムノブロットング解析により、RCS細胞では約100、110、120、130kDaのタンパク質が、3T3-E1細胞では約110kDaのタンパク質がそれぞれcGMPによってリン酸化される

ことが明らかとなった。

また、プロテインアレイ解析よりcGK I $\alpha$ の候補基質としてPCTAIRE-motif protein kinase 3 (PCTK3)を同定した。部位特異的変異導入実験によってcGK I $\alpha$ はPCTK3の12番目のセリン残基を特異的にリン酸化することが明らかとなった。現在、リン酸化によるキナーゼ活性や細胞内局在の変動などについて解析中である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① Keizo Yuasa, Shin Yamagami, Masami Nagahama and Akihiko Tsuji: Trafficking of cGMP-dependent protein kinase II via interaction with Rab11. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **374**, 522-526 (2008) 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① 山上真, 湯浅恵造, 長浜正巳, 辻明彦: cGMP依存性プロテインキナーゼと相互作用する因子の検索, 第80回日本生化学会大会・第30回日本分子生物学会年会合同大会, 2007年12月(横浜市)
- ② 湯浅恵造, 山上真, 長目健, 長浜正巳, 辻明彦: II型cGMP依存性プロテインキナーゼと小胞輸送制御因子Rab11bとの相互作用の解析, 第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会, 2008年12月(神戸市)
- ③ 長目健, 湯浅恵造, 山上真, 長浜正巳, 辻明彦: cGMP依存性プロテインキナーゼとRhoエフェクターRhotekinとの相互作用の解析, 第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会, 2008年12月(神戸市)
- ④ 湯浅恵造, 長目健, 山上真, 長浜正巳, 辻明彦: cGMP依存性プロテインキナーゼ結合タンパク質の同定および機能解析, 日本農芸化学会2009年度大会, 2009年3月(福岡市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

湯浅 恵造 (YUASA KEIZO)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・助教

研究者番号: 70363132