

平成 21年 5月 28日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19890273

研究課題名（和文） 破骨細胞分化誘導時のカルシウム動態制御機構の解明

研究課題名（英文） The clarification of the regulatory mechanism of calcium dynamics during osteoclastogenesis

研究代表者

黒田 有希子（ KURODA YUKIKO ）

独立行政法人理化学研究所・発生神経生物研究チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号：70455343

研究成果の概要：

申請者はIP<sub>3</sub>R結合タンパク質の一つであるIRBITをロックダウンすると破骨細胞分化因子RANKLによって誘導されるカルシウムオシレーションの始まるタイミングが早まる傾向があることを見いだした。この結果より、IRBITが破骨細胞分化誘導時のカルシウム動態に深く関わっている分子であることが明らかとなった。そこで、破骨細胞分化時、および未分化時にそれぞれ特異的にIRBITに結合するタンパク質のスクリーニングを行い、現在はその中の候補タンパク質の一つであるE3 ユビキチンリガーゼに注目し、研究を進めている。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：生理学一般、分子生物学

科研費の分科・細目：医歯薬学・生理学一般

キーワード：シグナル伝達、発生・分化、破骨細胞、カルシウムシグナル

## 1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症患者は高齢化が進むにつれ増加傾向にあり、現在日本の骨粗鬆症人口は1,000万人以上であるといわれる。このような骨粗鬆症をはじめとする骨疾患は現代社会の大きな問題であり、早期の骨疾患の原因究明・新規治療薬の開発が望まれている。そのため、

近年、骨形成機構の分子レベルでの解析が盛んに行われてきた。その一端として、

1) 破骨細胞分化因子（RANKL: receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand）による破骨細胞分化誘導時においてカルシウムオシレーションが観察される

2) 破骨細胞の分化にはNF-AT c1 (nuclear factor of activated T cells)の活性が必要かつ十分であることが報告され (Takayanagi et al. (2002) Dev. Cell 3, 889-901)、骨吸収活性をもつ破骨細胞の分化や活性化に細胞内カルシウム動態が深く関わっていることが明らかとなってきた。

一方、申請者が所属する研究室でクローニングし、長年研究を行ってきたイノシトール3リン酸受容体 (IP<sub>3</sub>R) は細胞内カルシウム動態に深く関与することが様々な現象で明らかにされている。カルシウムオシレーションはIP<sub>3</sub>R が関与する現象であること、また、NF-AT c1 の活性化にはIP<sub>3</sub>R を介した小胞体からのカルシウム放出が関与することがXenopus の実験系で示されている (Saneyoshi et al. (2002) Nature. 417, 295-9) ことから、申請者は骨形成においてIP<sub>3</sub>R が重要な機能を担っている可能性は非常に高いと考えた。そこで申請者は博士課程の4年間、骨形成における細胞内カルシウムシグナルカスケードとその役割を、IP<sub>3</sub>R の機能を中心として解明することを目的として研究を行ってきた。

その結果、申請者はIP<sub>3</sub>R ノックアウトマウス由来の破骨細胞はカルシウムオシレーションが無く、細胞融合に異常があること、さらに生体内では現在までに報告されていたカルシウム依存的破骨細胞分化メカニズムに加え、全く報告のなかったカルシウム非依存的な破骨細胞分化メカニズムが存在することを発見した。加えて、IP<sub>3</sub>R ノックアウトマウスにおいて内軟骨性骨化に異常があること (未発表データ) も発見している。

## 2. 研究の目的

破骨細胞分化におけるカルシウムシグナル制御機構の解明は破骨細胞の分化制御機構の解明において非常に重要な課題である。申請

者は破骨細胞分化誘導時に観察されるカルシウムオシレーションにIP<sub>3</sub>Rが必須であることを明らかとしたが、その特徴的なカルシウムオシレーションの分子機構は全く未知であり、非常に興味深い。一般的な培養細胞等で観察されるカルシウムオシレーションは、IP<sub>3</sub>R のリガンドであるIP<sub>3</sub> が産生されると、その直後からカルシウムオシレーションが観察され、IP<sub>3</sub>の産生が無くなるとオシレーションも観察されなくなる。これに対し、破骨細胞分化誘導時に観察されるカルシウムオシレーションは、以下のような特徴を持つ。

1) IP<sub>3</sub>R を活性化するIP<sub>3</sub>はRANKL 添加直後に産生されているにも関わらず、IP<sub>3</sub>Rを介したカルシウムオシレーションはRANKL添加後24時間以降にしか観察されない。

2) このカルシウムオシレーションは細胞外液からRANKLを除いてから、つまりIP<sub>3</sub>産生刺激を除いてから30分以上経過した後でも観察することができる。

これらのことから、破骨細胞分化誘導時には未だ明らかにされていない様々な分子を介したIP<sub>3</sub>Rの活性制御機構が存在することが示唆され、その分子メカニズムを解明することが将来的に破骨細胞分化を制御することに繋がると考えている。

そこで、本研究ではIP<sub>3</sub>R結合タンパク質によるIP<sub>3</sub>Rの活性制御機構に重点をおいて破骨細胞分化時のカルシウム動態制御メカニズムを解明することを目的とする。特に、本研究期間内には、IP<sub>3</sub>R結合タンパク質の一つであるIRBITの機能に着目し、破骨細胞分化時のカルシウム動態制御機構の解明に挑む。IRBITは申請者が所属する研究室でクローニングされたタンパク質で、自身のリン酸化によってIP<sub>3</sub>と競合してIP<sub>3</sub>Rの活性を制御するIP<sub>3</sub>の擬似体とも言える分子である (Ando et

al. (2006) Mol Cell, 22, 795-806)。申請者はこのIRBITの破骨細胞分化誘導時の機能に注目し、現在までに、IRBITとIP<sub>3</sub>Rの結合が破骨細胞の分化状態によって異なること、および、破骨細胞内のIRBITをsiRNAによってノックダウンした結果、破骨細胞分化が著しく促進されることを発見した（未発表データ）。また、破骨細胞分化時、および未分化時にそれぞれ特異的にIRBITに結合するタンパク質をスクリーニングした結果、疾患と関連を持つ分子など非常に興味深いタンパク質が多数見つかり、今後は、これらのタンパク質とIRBIT、IP<sub>3</sub>Rが破骨細胞分化時のカルシウム動態に及ぼす影響を解析していきたいと考えている。

### 3. 研究の方法

#### (1) 破骨細胞分化および分化誘導時のカルシウムオシレーションにおけるIRBITの役割の解明

申請者は、既にIRBITとIP<sub>3</sub>Rの結合が破骨細胞の分化状態によって異なること、および、破骨細胞内のIRBITをsiRNAによってノックダウンした結果、破骨細胞分化が著しく促進されることを発見した（未発表データ）。このことから、IRBITがカルシウムシグナルに影響を与えている可能性が高いと考え、まず、IRBITが破骨細胞分化誘導時の細胞内カルシウム動態に与える影響を以下の方法で検討する。

破骨細胞のIRBITをsiRNAによってノックダウンし、破骨細胞分化誘導時の細胞内カルシウム動態を経時的に観察する。カルシウム動態はカルシウム指示薬であるfura-2を破骨細胞に取り込ませ、細胞内カルシウム動態をリアルタイムで観察する。

IRBITは自身のリン酸化状態によってIP<sub>3</sub>Rとの結合が制御されていること、およびIRBITの発現量を減少させるとIP<sub>3</sub>Rを介した

カルシウム放出量が増加することから、破骨細胞分化誘導開始からのIRBITの発現量およびリン酸化状態をRT-PCR、ウエスタンブロットティング法を用いて細かく解析し、IRBITがどのような修飾を受けた際にIP<sub>3</sub>Rを介したカルシウム動態に影響を及ぼすのかを解析する。また、生体内におけるIRBITの役割の解析も非常に興味があるので、ノックアウトマウスの作製も進める。

#### (2) IRBITによるIP<sub>3</sub>Rを介したカルシウムシグナル制御機構の解明

申請者は、既に破骨細胞分化時、および未分化時にそれぞれ特異的にIRBITに結合するタンパク質をスクリーニング（MS解析）しており、その結果、疾患と関連を持つ分子など非常に興味深いタンパク質を多数見つけている（未発表データ）。本研究では、細胞内カルシウム動態の制御機構を解明することを目的とするため、これらの候補タンパク質の中から、カルシウム動態に影響を与えることが予想される分子を以下の方法によってスクリーニングする。

MS解析の結果得られた候補分子をクロニングした後、IRBITとの結合を免疫沈降法および免疫染色法を用いて検討する。

IRBITとの結合が確認された分子を培養細胞（COS-7 cellやHeLa cell）に過剰発現し、カルシウムシグナルに影響を及ぼすかどうかを検討する。検討する際には、IP<sub>3</sub>を産生するアゴニスト刺激であるATPを使用し、IP<sub>3</sub>Rを介したカルシウム放出、カルシウムオシレーションに対して過剰発現させた候補分子がどのような影響を及ぼすのかを観察する。

IP<sub>3</sub>Rを介したカルシウムシグナルに影響を及ぼす分子が絞れたら、培養細胞に候補分子だけではなく、IRBITも共発現、もしくはノックダウンさせ、と同様の方法で細胞内カルシウム動態を観察する。ここで、IRBITの有無

によってカルシウムシグナルが変化するものを最終的な候補分子として、以後の研究を行なうことにする。このようなスクリーニングを行なうことによって、IRBITおよび $IP_3R$ を介したカルシウム動態制御機構に関わる分子に標的が絞れる確率が非常に高くなると考えられる。

### (3) 破骨細胞分化時のカルシウム動態制御機構の分子メカニズムの解明

上記の方法で選んだIRBIT結合分子、IRBIT、 $IP_3R$ の破骨細胞分化時における役割を通して、破骨細胞分化誘導時のカルシウム動態制御機構の解明を目指す。申請者の所属する研究室では長年カルシウムシグナルの制御機構に関して研究を行っており、その結果、細胞の種類によってカルシウムシグナルの制御機構は大きく異なることが分かってきている。破骨細胞分化誘導時に観察されるカルシウムオシレーションは非常に特徴的であり、他の細胞とは性質が異なると考えられるので、この段階では、マウスの初代培養破骨細胞を用いて実験を行う。さらに、申請者は生体内における破骨細胞と初代培養の破骨細胞間でも分化機構に異なる点があることを発見している。そのため、本研究で明らかとなった分子メカニズムが実際に生体内でも機能しているかどうかを調べるために、IRBITノックアウトマウスの破骨細胞についても詳しく調べることを計画している。具体的には、以下の方法で研究を進めていく。

IRBIT 結合分子の破骨細胞における発現、局在等をRT-PCR、ウエスタンブロッティング法、免疫染色法によって解析する。

IRBIT 結合分子を破骨細胞に過剰発現させ、破骨細胞の分化および分化誘導時のカルシウム動態への影響を観察する。分化への影響を確実に評価するためにはトランスフェクション効率非常に重要となることが予想さ

れるので、ここではレトロウイルスを用いて候補分子を発現させることを計画している。ここで、カルシウム動態に変化が観察されたら、IRBITおよびIRBIT結合分子がどのようにして $IP_3R$ の機能を修飾しているのかを調べるため、まずは3者の結合、発現、局在等を分化誘導後、経時的に調べる。さらには、カルシウムシグナルによって活性化される破骨細胞分化に重要な分子の発現なども併せて解析していく。

### IRBIT ノックアウトマウスの解析

生体内での破骨細胞分化におけるIRBITの機能を評価するために、IRBITノックアウトマウスの大腿骨を用いて骨切片を作製し、破骨細胞マーカーであるTRAP 染色を行ない、生体内の破骨細胞を観察する。また、生体内の破骨細胞は骨代謝による影響を強く受けることが知られているので、破骨細胞のみならず、骨形成にも注意して解析を行う。また、カルシウムシグナルは骨を吸収する破骨細胞だけではなく、骨を形成する骨芽細胞においても重要な働きをすることを念頭に入れ、IRBITの破骨細胞特異的ノックアウトマウス作製も視野に入れて解析を行いたいと考えている。

## 4. 研究成果

申請者は現在までの実験結果から $IP_3R$ 結合タンパク質の一つであるIRBITがカルシウムシグナルに影響を与えている可能性が高いと考え、IRBITの発現量をsiRNAによってノックダウンした際の細胞内カルシウム動態をリアルタイムで観察した。その結果、IRBITをノックダウンすると破骨細胞分化因子RANKLによって誘導されるカルシウムオシレーションの始まるタイミングが早まる傾向があることを見いだした(未発表データ)。このことはIRBITが破骨細胞分化誘導時のカルシウム動態に深く関わっている分子であ

ること、また、IRBITを中心に解析を進めて行くことでカルシウム動態制御機構の解明に繋がることを強く示唆する重要な実験結果である。

さらに、申請者は破骨細胞分化時、および未分化時にそれぞれ特異的にIRBITに結合するタンパク質をスクリーニング（MS解析）した。解析結果から選んだ候補タンパク質についてクローニング、IRBITとの結合の確認、相互作用部位の特定などを行ない、最初に選んだいくつかの候補タンパク質はIRBITと直接結合することが明らかとなった。本研究期間内には、最初の候補タンパク質としてN末端にカルシウム結合部位を有するE3 ユビキチンリガーゼに注目し、研究を進めてきた。本研究では、破骨細胞分化誘導時のカルシウム動態制御機構を明らかにすることが目的であるため、まずこのタンパク質がカルシウム結合部位を有するということに注目し、IRBITとの結合、および局在が細胞内カルシウム濃度によって変化するかどうかを調べた。その結果、COS-7 細胞などの培養細胞に過剰発現させた実験系では、細胞内カルシウム変化はIRBITとE3 リガーゼの結合やそれぞれの局在に大きな影響は及ぼさなかった。しかしながら、破骨細胞と培養細胞過剰発現系ではタンパク質の挙動が違うことも十分に考えられるため、現在はこのE3 リガーゼに対する抗体を作製し、破骨細胞内在性タンパク質の詳細な解析を行なっている。また、破骨細胞分化誘導後、経時的にIRBITのタンパク質発現レベルを調べた所、分化状態によってタンパク質レベルはあまり変化しなかった。このことから、E3 リガーゼがIRBITの分解に関わっているのではなく、他の標的タンパク質を分解するためにIRBITとE3 リガーゼの結合が意味をもつのか、もしくはモノユビキチン化による標的タンパク質の局在の変化が

重要な意味をもつのか、という仮説をたて、実験を進めている。このE3 リガーゼによるタンパク質の分解が破骨細胞分化誘導時に観察されるカルシウムオシレーションに重要であれば、IP<sub>3</sub>産生刺激からカルシウムオシレーションが観察されるまでの時間差を説明することができ、破骨細胞分化の新たな制御機構の発見に繋がると思われる。

また、IRBIT ノックアウトマウスについては、コンディショナルマウスを作製しており、現在、ようやく F1 マウスが産まれてきた。今後は、破骨細胞特異的 IRBIT ノックアウトマウス・全身でのトータル IRBIT ノックアウトマウスの作製にとりかかり、生体内における IRBIT の役割、特に骨形成における役割の解析に取りかかりたいと考えている。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

{ 雑誌論文 }(計 5 件)

Kiefer H, Mizutani A, Iemura S, Natsume T, Ando H, Kuroda Y, Mikoshiba K.

Inositol 1,4,5-triphosphate receptor-binding protein released with inositol 1,4,5-triphosphate (IRBIT) associates with components of the mRNA 3' processing machinery in a phosphorylation-dependent manner and inhibits polyadenylation.

J. Biol. Chem. 17;284(16):10694-705. 2009 査読有

Kawai K, Hisatsune C, Kuroda Y, Mizutani A, Tashiro T, Mikoshiba K.

80K-H interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) receptors and regulates IP<sub>3</sub>-induced calcium release activity.

J. Biol. Chem. 2;284(1):372-80. 2009 査

読有

Kuroda Y, Hisatsune C, Nakamura T, Matsuo K, Mikoshiba K.

Osteoblasts induce  $Ca^{2+}$  Oscillation-independent NFATc1 activation during Osteoclastogenesis.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 24;105(25): 8643-8. 2008 査読有

Mizutani A, Kuroda Y, Futatsugi A, Furuichi T, Mikoshiba K.

Phosphorylation of Homer3 by CaMKII regulates a coupling state of its target molecules in Purkinje Cells.

J. Neurosci. 14;28(20): 5369-82.2008 査読有

Hisatsune C, Yasumatsu K, Takahashi-Iwanaga H, Ogawa N, Kuroda Y, Yoshida R, Ninomiya Y, Mikoshiba K.

Abnormal taste perception in mice lacking the type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor.

J. Biol. Chem. 21; 282(51): 37225-31. 2007 査読有

[学会発表](計 1件)

Kuroda Yukiko

Osteoblasts induce  $Ca^{2+}$  oscillation-independent NFATc1 activation during osteoclastogenesis

Advanced Bone and Joint Science (ABJS) International Collaboration Symposium

2008年12月4日

東京医科歯科大学

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒田 有希子 ( KURODA YUKIKO )

独立行政法人理化学研究所・発生神経生物  
研究子一ム・基礎科学特別研究員

研究者番号：70455343