

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670870

研究課題名(和文)破骨細胞性骨吸収におけるc-Src下流分子の探索

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of osteoclastic bone resorption by c-Src

研究代表者

松原 琢磨 (Matsubara, Takuma)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：00423137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞による骨吸収の機能メカニズムを理解することは骨粗鬆症や歯周病などの代謝性骨疾患や矯正学的な歯の移動を制御できる新たな治療方法の開発につながると期待できる。c-Srcは破骨細胞のアクチン細胞骨格を制御し波状縁と呼ばれる破骨細胞特異的であり、骨吸収に重要な構造を形成が、c-Srcのアクチン制御機構には不明な点が多く残されている。本研究ではc-Srcと他のSrcファミリー遺伝子の機能を比較検討することにより、c-SrcのSH3およびキナーゼドメインが波状縁形成に重要であることを示した。さらに、質量分析法によりc-Srcの下流でアクチンを制御する新規分子の候補としてPPP1r18を同定した。

研究成果の概要(英文)：A tyrosine kinase c-Src is necessary for ruffled border formation, the important structure in osteoclastic bone resorption. The ruffled border is actin accumulated structure and needed for adhesion to bone matrix. The mechanism of actin organization in osteoclasts(OCLs) by c-Src is still unclear. c-Src deficient mice have phenotypes only in bone tissue, although c-Src is ubiquitously expressed. This suggests the importance of c-Src in osteoclasts and compensate by other Src family kinases (SFKs) in other tissues. Thus I compared the role of c-Src with other SFKs in OCLs. c-Src was not only highly expressed but also had unique role in OCLs. In addition, the unique role of c-Src originated from SH3 domain and kinase domain.

I also looked for the novel protein that worked as actin regulation protein downstream of c-Src and found a candidate, "PPP1r18". PPP1r18 was localized in actin ring in OCLs and the unique actin dot structure, podosomes formed by activated c-Src in fibroblasts.

研究分野：歯学

キーワード：骨吸収 破骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

矯正治療における歯の移動は圧迫側における骨吸収と牽引側における骨形成の絶妙なバランスの上に成り立っている。例えば、歯周病など炎症性骨吸収が生じていると、破骨細胞の骨吸収機能が亢進し、矯正治療のコントロールが難しい。そこで、破骨細胞の機能を制御できればより効率的で有害性の少ない矯正治療法の開発につながると期待できる。

- (1) チロシンキナーゼ c-Src はほぼ全ての臓器・組織において発現しているにもかかわらず、遺伝子欠損マウスの表現系は破骨細胞の機能不全による大理石骨病のみである (P. Soriano et al; Cell, 1991)。この結果は構造および機能が c-Src によく似た Src ファミリーキナーゼ (SFK) が破骨細胞でのみ c-Src の機能を補完できないことを示唆している。
- (2) c-Src は破骨細胞のアクチン細胞骨格制御により、骨組織と破骨細胞の間を密封し酸性環境を構築する際に必須の分子であることが知られている。現在までに c-Src 下流でアクチンを制御する分子として Pyk2 や Cortactin などが同定されているが、いずれの遺伝子改変マウスにおいても表現型が弱いため、現在までに知られていないアクチン細胞骨格制御に関与する分子の存在が示唆される。

## 2. 研究の目的

- (1) SFKs の中で c-Src だけが破骨細胞において重要な役割を持つ理由を分子生物的手法を用いて解明する。申請者は以前の研究により SFKs の中で Lyn は c-Src 遺伝子欠損マウス脾臓より分化させた破骨細胞内で野生型のものより発現量が高く維持されていることを見出している。そこで、特に Src と Lyn の一次構造を比較することにより、その機能を明らかにする。
- (2) c-Src 下流で破骨細胞のアクチン細胞骨格

を制御し、破骨細胞性骨吸収に必須の構造である明帯および波状縁形成に関与する分子を探索する。

## 3. 研究の方法

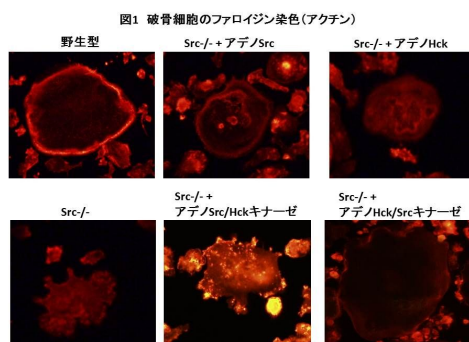
- (1) c-Src 遺伝子欠損マウス脾臓より分化誘導した破骨細胞は破骨細胞特異的な細胞骨格構造であるアクチンリングを有さない。アデノウイルスを用いて c-Src あるいは SFKs を c-Src 遺伝子欠損マウス由来破骨細胞に遺伝子導入し、アクチンリング形成への影響を検討する。さらに、c-Src と SFKs とのキメラタンパク質を作成し、同様の実験を行うことにより c-Src の機能ドメインを検索する。
- (2) c-Src 遺伝子欠損細胞である SYF 細胞に恒常活性型 c-Src を導入すると破骨細胞のアクチンリング形成に重要な細胞骨格構造であるポドソームを形成する。すなわち、c-Src のキナーゼ活性はポドソーム形成に重要であり、この実験系によって c-Src 下流でアクチン細胞骨格を制御している新規分子の発見につながると考えられる。そこで、恒常活性型 c-Src を遺伝子導入した SYF 細胞よりタンパク質抽出を行い、c-Src を標的とした免疫沈降により精製を行う。精製した抽出物を質量分析法により解析することにより新規タンパク質の検索を行う。その後、文献的検索、一次構造の解析および破骨細胞における発現検索によるスクリーニングを行い、破骨細胞の細胞骨格制御に新規タンパク質を同定する。

## 4. 研究成果

- (1) c-Src 遺伝子欠損マウス由来破骨細胞の mRNA を抽出してリアルタイム PCR にて SFKs の発現量を検索した結果、c-Src 遺伝子欠損マウス由来破骨細胞では Hck と Lyn の発現量が、野生型破骨細胞における c-Src の発現量と同等以上まで増加した。他の SFKs の発現量は変わらないか減少していた。その結果より、Hck と Lyn は破骨細胞のアクチン

リング形成にほとんど関与していないことが推測された。そこで、c-Src と Hck あるいは Lyn とのキメラタンパク質を作成することにより、破骨細胞アクチンリング形成に関する重要な c-Src のドメインを検索した。c-Src (SFKs) には Unique、SH3、SH2 およびキナーゼの 4 つのドメインが存在し、Unique は SFKs の細胞内局在、SH3 と SH2 は他のタンパク質との結合、キナーゼドメインは c-Src のキナーゼとしての役割に大きく関与する。

まず、Hck と c-Src のキナーゼドメインを交換した。その結果、驚くべきことに c-Src に Hck のキナーゼドメインを結合したタンパク質を c-Src 遺伝子欠損マウスに遺伝子導入してもアクチンリング形成を回復しなかった。一方、Hck の導入では c-Src 遺伝子欠損破骨細胞のアクチンリング形成回復はしなかったが、Hck に c-Src のキナーゼドメインを結合したタンパク質はアクチンリング形成を回復した。Hck 単独の遺伝子欠損マウスでは破骨細胞をはじめとした骨組織に異常を認めないが、c-Src と Hck の二重欠損マウスは c-Src 遺伝子欠損マウスより重篤な大理石骨病となることが報告されている。以上の結果をまとめると、c-Src と Hck は同じような作用を有しているがキナーゼの作用が異なるため Hck は破骨細胞のアクチンリング形成への影響が少ないことが示唆された。つまり、c-Src のキナーゼドメインはアクチンリング形成に関し特異的な機能を持つことが示唆された(図 1)。



また、Lyn と c-Src についても検討した。Lyn の過剰発現は c-Src 遺伝子欠損破骨細胞のアクチンリング形成を回復できない。さらに、Lyn の Unique、SH3、SH2、キナーゼドメインのどれを c-Src のものと入れ替えても c-Src 遺伝子欠損破骨細胞のアクチンリング形成を回復しなかった。この結果は c-Src と Lyn は同じ Src ファミリー遺伝子で構造は似ているが、アクチンリング形成に関する役割は全く違うものであると示唆された。一方、c-Src に Lyn の SH2 ドメインを結合させたものは c-Src のアクチンリング形成能を維持させていたが、他の Unique、SH3 およびキナーゼドメインの交換は c-Src のアクチンリング形成能を欠失させた。以上の結果より、c-Src の Unique、SH3 およびキナーゼドメインはアクチンリング形成に関して特異的な役割を有することが示唆された。

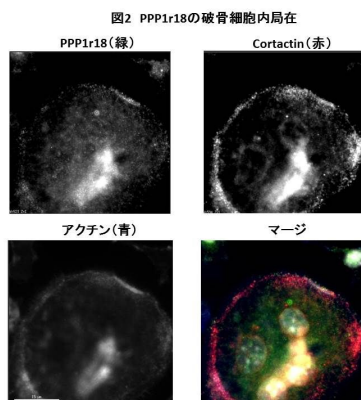
以上の結果は論文投稿準備中である。本研究結果により、c-Src のアクチンリング形成に関する重要な部位が特定された。今後その重要な部位を詳細に解析することにより、破骨細胞性骨吸収における c-Src の分子的役割が明らかになると期待できる。

(2)SYF 細胞に恒常活性型 c-Src をステイブルトランスフェクションし、常に恒常活性型 c-Src を発現する細胞株を作成した。この細胞株は線維芽細胞に特異的な細胞骨格構造であるストレスファイバーをほとんど形成せず、細胞内部に Podosome を形成した。この細胞を大量培養した後にタンパクを抽出し、c-Src 特異的認識抗体で精製した。コントロールとして、何もトランスフェクションしていない SYF 細胞を用いた。精製した抽出液を質量分析(LC-MAS/MAS)によって分析した。その結果、c-Src と結合し、破骨細胞アクチンリング形成に関与することが知られている Cortactin がデータ上に見いだされた。すなわち、本実験は手技的に問題がな

いことが示唆された。質量分析の結果には様々な遺伝子があったが、一次構造や文献的検索によりスクリーニングを行った。さらに、破骨細胞における発現を RT-PCR 法により検索した。その結果、c-Src によるアクチンリング形成制御に關与する候補遺伝子として3つに絞り込まれた。さらに、それらの候補遺伝子の破骨細胞における細胞内局在を蛍光染色法により検索した結果、破骨細胞のアクチンリング上のポドソームに局在する分子 PPP1r18 を見出した。PPP1r18 はアクチン結合ドメインと PP1(Protein phosphatase1)結合ドメインを有するタンパク質で、アクチンファイバー伸長に關与することが報告されているが、文献数も少なく(4報)、その機能に關してはほとんど知られていないタンパク質である。

まず、c-Src と PPP1r18 の結合を GST 融合 c-Src を用いて行った結果、結合量は少ないが c-Src との結合を認めた。一方、恒常型 c-Src の過剰発現により、c-Src による PPP1r18 を検討したが、リン酸化は認めなかった。

また、他の既知のアクチンリング形成に關与するタンパク質との局在關係を蛍光染色法により検索した結果、Cortactin との局在の一致を認めた(図 2)。



以上の結果より、新規分子 PPP1r18 は破骨細胞の骨吸収において c-Src や Cortactin と複合体を形成しアクチン形成を制御している可能性が示唆された。

今後の研究により PPP1r18 の詳細な機能を明らかにしたい。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松原 琢磨 (Matsubara, Takuma )  
東北大学 大学病院 助教  
研究者番号 : 00423137