

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
研究期間：2007～2008  
課題番号：19592117  
研究課題名（和文）シスタチン C の結合タンパクの検索と骨形成における機能解析  
研究課題名（英文）Effect of Cystatin C on bone metabolism and characterization of interaction proteins

研究代表者  
城戸 瑞穂（KIDO MIZUHO）  
九州大学・大学院歯学研究院・准教授  
研究者番号：60253457

## 研究成果の概要：

骨吸収性疾患である骨粗鬆症の罹患は年々増加しているがゆえに、失われた骨を再生することが急務であるが適切な薬剤はみつかっていない。システインプロテアーゼインヒビターの一つとしてよく知られておりシスタチン C は、骨に骨吸収を抑制すること等が報告されている。我々は、シスタチン C の骨の組織での作用とその作用機構について明らかにすることを目的として、Yeast Two hybrid 法によりシスタチン C の結合タンパクの検索をおこなった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：シスタチン C、Two-Hybrid 法、骨芽細胞、破骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

骨吸収性疾患である骨粗鬆症の罹患は国民のうち 1000 万人とも言われ、骨折・転倒などにより寝たきりなる人は年々増加している。ゆえに、失われた骨を再生することが急務である。しかし、安全性が高く、また安価で大量に多くの国民が手軽にとれるような適切な薬剤はみつかっていない。そこで、その一つの候補となるタンパクとしてシスタチン C に着目し研究を行った。

シスタチン C は、非糖鎖性のアミノ酸 120 残基からなる分子質量 13.359 ダルトンの一本鎖のポリペプチドで、タンパク分解酵素であるシステインプロテアーゼインヒビターの一つとしてよく知られている。細胞外に分泌されるシスタチン C は、唾液や乳汁、尿、脳脊髄液にも多く含有されている。近年、シスタチン C が ES 細胞から神経幹細胞への分化を促進することや、海馬の細胞の増殖因子として働くとの報告もされ、再生療法を目指した研究においても有望な分子として着目されつつある。

骨に対するシスタチン C の研究は少ないものの、シスタチン C が破骨細胞の骨吸収能を抑制することや、破骨細胞の分化を抑制すること、骨芽細胞様細胞の MC3T3-E1 細胞において培養中期と後期でシスタチン C の mRNA が上昇することが、報告されている。最近我々のグループでは培養骨芽細胞にヒト尿から精製したシスタチン C を添加した条件下で培養すると、骨芽細胞の分化が進み、骨様の硬組織形成が多くなることを見出した。

## 2. 研究の目的

そこで我々は、シスタチン C の骨の組織での作用とその作用機構について明らかにすることを目的として、シスタチン C の結合タンパクの検索をおこなうというアプローチを行った。

## 3. 研究の方法

シスタチン C と結合する候補タンパクの探索には Yeast Two-Hybrid 法を用いた。この Yeast Two-Hybrid 法は蛋白質間相互作用を調べる手法の一つで、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞の中で相互作用するタンパクのスクリーニングをおこなうものである。この方法を用いたのは、酵母の細胞を用いる、つまり真核生物の細胞内での作用をみることで、試験管内で純粋に二種の蛋白質のみ存在する条件化で相互作用を検討する場合に比べ、より生体内に近い条件での相互作用が検討できると考えられているからである。

マウスのシスタチン C 全長 cDNA を bait (釣り餌) として prey (餌食) となる融合タンパクを検索した。

実験には Clontech 社の Matchmaker™ Two-Hybrid System を用いた。Bait コンストラクトは、マウスの骨の cDNA ライブラリーより PCR (polymerase chain reaction) 法にシスタチン C をクローニングし、pLexA Vector に EcoRI と XhoI の制限酵素サイトを用いて subcloning した。その後 DNA シークエンスにより塩基配列が設計どおりであることを確認した。GAL4 転写活性化領域をコードするベクター pB42AD にはマウスの脳の cDNA ライブラリーをクローニングした。そ

してあらかじめ pLacZ により形質転換をさせた酵母株 EGY48 に pLexA と pB42AD を導入してアミノ酸選択培地で培養を行った。その後、培地表面にベルベットシートをおいてレプリカをとり X-gal (5-ブromo-4クロロ-3-インドリル-b-D-ガラクトピラノシド) を含んだ培地で培養して、LacZ アッセイをおこなった。陽性反応を示した酵母コロニーからプラスミド DNA を調整した。酵母から取り出したプラスミド DNA は大腸菌に移し替えを行い、調整して、DNA シークエンスを行った。

陽性クローンの解析には、シスタチン C および相互作用候補遺伝子をそれぞれ

pGEX-6P に EcoRI および Not I サイトにサブクローニングを行い、

glutathione-S-transferase(GST)融合タンパク質として発現をさせた。融合タンパクの発現には大腸菌 BL21 株に導入し、大量に精製を行った後、glutathione-Sepharose レジンに結合をさせた。その後レジンに結合したタンパクをマウス脳組織からのタンパク質サンプルおよびマウス骨組織からのタンパク質サンプルに加え、イムノブロットイングによって共沈したタンパク質を同定した。対照群として、GST のみを発現・精製したものをグルタチオンセファロースレジンに結合させ、目的タンパク質が共沈しないことを確認した。

#### 4. 研究成果

われわれはシスタチン C が骨芽細胞の分化を促進させ、硬組織形成を向上させることを以前に報告している。そこで、シスタチン C の機能を明らかにするために Yeast Two hybrid 法により binding protein を解析した。その結果約 200 万クローンのスクリーニングで LacZ アッセイにより陽性となったコロニーは 200 個あまりであった。その中で青色の

濃いクローンを 48 個選び、再度形質転換をさせたところ 22 個のクローンが得られた。それらの酵母からプラスミド DNA を調整し、大腸菌に移し替えて、プラスミド DNA を調整して、DNA シークエンスを行ったところ、9 個の既知の候補タンパクを見出した。その中で、複数の独立したクローンとしてとれてきた S100B タンパクとの関係を検索した。S100B は、単量体 (S100 $\beta$ ) 分子質量 10.7kDa のポリペプチドで、helix-loop-helix(EF-hand)を 2 つ有し Ca イオンとの結合能を持っている。そして、水中においては主に 2 量体 (S100B) として存在していることが知られている。

S100B は神経膠細胞で高発現していることが報告されており、神経細胞の伸展、細胞増殖、分化、アポトーシスなどに関するさまざまな機能が報告されているが、骨代謝における役割については知られていない。本研究課題により、骨芽細胞においてシスタチン C が S100B と発現していることを RT-PCR および Western blotting、免疫細胞化学により確認した。さらに相互作用の有無を GST-pull down assay によりマウス骨および脳組織で確認することができた。今後これらの相互作用がどのような機能に関わっているのかを解析する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

1. 檀上敦、山座孝義、城戸瑞穂、下平大治、田中輝男 シスタチン C は骨髄由来間葉系幹細胞の骨への分化を促進する 第 5 回再生歯科医学会 2007.9.22-23, 東京
2. 檀上敦、山座孝義、下平大治、西嶋克司、城戸瑞穂、田中輝男 シスタチン C のマウス骨髄間葉系細胞

における骨形成促進効果 第49回歯  
科基礎医学会学術大会 北海道  
2007. 8.29-31 J Oral Biosci. 49  
Suppl. 2007:1111

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

特許の名称：骨折修復促進剤

発明者：城戸瑞穂、渡辺敏之、檀上敦、  
田中輝男、上辻大輔、小野愛子、芹澤  
篤。

出願人：国立大学法人九州大学及び雪  
印乳業株式会社

出願日：2008年11月18日

出願番号 特願 2008-294445

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

城戸 瑞穂 (KIDO MIZUHO)

九州大学・大学院歯学研究院・准教授

研究者番号：60253457

### (2) 研究分担者

渡邊 敏之 (WATANABE TOSHIYUKI)

九州大学・大学院歯学研究院・学術研究員

研究者番号：70367522

檀上 敦 (DANJO ATSUSHI)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：80452712