

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592330

研究課題名（和文）PKR, オステリックス, カルシニューリンの相互作用による
骨形成機構の解明

研究課題名（英文）The role of PKR, Osterix, and Calcineurin in osteogenesis

研究代表者

羽地 達次 (HANEJI TATSUJI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：50156379

研究成果の概要（和文）：

PKR 変異型細胞を RANKL で刺激すると TRAP 陽性の大型の多核細胞は認められなかったが、野生型細胞と pc 導入細胞においては TRAP 陽性多核細胞の形成が認められた。PKR は破骨細胞の形成に関与し、NF- κ B や STAT1 の発現を介してその形成を調節していると考えられる。また、PKR 阻害軟骨細胞では軟骨基質形成が抑制され、STAT1, Osterix, Collagen II の発現様式に違いが生じていた。よって、軟骨幹細胞から軟骨細胞への分化は PKR の活性により調節される。

研究成果の概要（英文）：

A dominant-negative mutant PKR cDNA, in which the amino acid lysine at 296 was replaced with arginine, was transfected into RAW264.7 cells. RANKL stimulated the TRAP-positive multinuclear cell formation in RAW264.7 cells. However, TRAP-positive multinuclear cells were not formed in the PKR-K/R mutant cells even when the cells were stimulated with higher doses of RANKL. A specific inhibitor of PKR, 2-aminopurine, also suppressed the RANKL-induced osteoclast differentiation in RAW264.7 cells. Immunohistochemical study shows that PKR localized in osteoclasts of metatarsal bone of newborn mouse.

ATDC-5 cells differentiated into chondrocytes by the insulin-treatment and the cells produced Alcian blue-positive cartilage matrix. When the cells were treated with 2-aminopurine, formation of cartilage matrix decreased in a dose dependent manner. Protein expression of STAT1, Osterix, and Sox-9 showed different manners during chondrogenesis. We also showed that PKR localized in a marginal region of mandibular condyle cartilage in mouse embryo.

Our findings suggest that PKR plays important roles in the differentiation of osteoclasts and chondrocytes by modulating STAT1, OSX, and Sox-9 expressions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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：蛋白質脱リン酸化, 蛋白質リン酸化, 破骨細胞, 骨吸収, 軟骨細胞, PKR

1. 研究開始当初の背景

PKR はインターフェロンや2本鎖 RNA 等により活性化され、細胞の防御機構に関与する蛋白質リン酸化酵素である。PKR は自己リン酸化により活性化し、転写調節因子 eIF-2 α をリン酸化してシグナルを伝達する。我々は、PKR の触媒部位の 296 番目に位置するリジンをアルギニンに変異した cDNA を作製し、ヒトおよびマウス骨芽細胞に導入して PKR 不活性型骨芽細胞株を樹立した。変異型マウス骨芽細胞では PKR 自己リン酸化能の欠如、ALP 活性の低下、骨関連蛋白質発現の減少および *in vitro* における石灰化能の欠如等骨芽細胞としての特性を失っていた。また、この細胞株では骨形成のマスター遺伝子である Osterix の発現が低下し、逆に Stat1 の発現が増加していた。よって我々は、PKR は Osterix と Stat1 の活性を介して骨形成を制御すると考えた。

2. 研究の目的

PKR (double-stranded RNA-dependent protein kinase) が Stat1, Osterix, NF- κ B 等の転写因子を調節するという新たな発想から骨形成機構を解明する。また、カルシニューリンと Osterix の結合を調べ、Osterix のリン酸化・脱リン酸化と骨形成の関係を明らかにする。具体的には、以下の4項目に焦点を当てた。

1. PKR 変異細胞を用いて、PKR と Stat1 の関係および PKR と Osterix との関係を調べ、これらの因子が骨形成をどの段階でどのように調節しているかを明らかにする。
2. PKR 変異細胞をオカダ酸で処理し、PKR, Osterix およびその下流の I κ B と NF- κ B のリン酸化とその生理活性を調べ、オカダ酸/PKR の骨形成制御機構を明らかにする。
3. Osterix 分子内のカルシニューリン結合部位とリン酸化部位を決定し、Osterix のリン酸化と脱リン酸化に関与する酵素を同定する。
4. カルシニューリン結合部位を変異させた

Osterix を発現する骨芽細胞株を樹立し、骨形成におけるカルシニューリンと Osterix の役割を解明する。

3. 研究の方法

骨代謝調節における PKR, Stat1, Osterix, カルシニューリンの機能を細胞生物学的に調べる。また、カルシニューリンと Osterix の結合と相互作用を調べ、Osterix のリン酸化・脱リン酸化と骨芽細胞の分化と石灰化の関係を分子細胞生物学的に調べる。

(1) PKR 変異細胞における Stat1 と Osterix の発現を Real-time PCR, ウェスタンブロット法で調べ、野生型細胞と比較する。両細胞株で Stat1 と Osterix のゲルシフト分析とルシフェラーゼ分析を行い、PKR が Stat1 と Osterix の転写活性を制御しているか否か、オカダ酸処理によりこれらの転写活性が調節されるか否かを調べる。さらに、Stat1 に RNAi を行い、Osterix 発現の変化を調べる。骨芽細胞の分化の各段階でこれらの実験を行い、PKR が骨形成をどの段階でどのように調節しているかを明らかにする。野生型細胞と PKR 変異細胞をオカダ酸で 25 日間培養後 von Kossa 染色により両細胞の石灰化能を判定する。

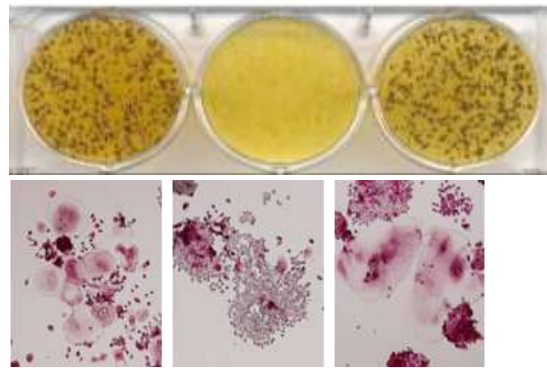
(2) 我々が樹立した PKR 変異ヒト骨芽細胞をオカダ酸で処理し、Osterix とその下流の NF- κ B のリン酸化と転写活性を調べ、それぞれのリン酸化部位を決定する。オカダ酸で処理した PKR 変異細胞より蛋白質溶液を調製後、PKR, Osterix, I κ B α , NF- κ B の抗体およびそれらのリン酸化抗体を用いてそれぞれの蛋白質の発現とリン酸化を調べ、リン酸化されるアミノ酸部位を決定する。我々はこの方法を用いオカダ酸による I κ B α と NF- κ B のリン酸化部位の一部を決定した。オカダ酸以外の蛋白質脱リン酸化酵素阻害剤(カリクリン A, ミクロシスチン) で同様の実験を行ない、蛋白質のリン酸化とリン酸化部位に差があるか否かを検討する。オカダ酸は NF- κ B の 536 番目のセリンをリン酸化し、NF- κ B の転写活性を促進するので、GFP-NF- κ B 遺伝子の 536 番目のセリン (TCC) をアラニン (GCC) に変異させたプラスミドを作製し、MG63 細胞に導入して安定発現系の細胞株を樹立する。

変異型 PKR 遺伝子とリン酸化部位変異 IκB (Y42F, S32A, S36A) 遺伝子を GST 融合ベクターに組み込み、リコンビナント蛋白質を得る。リコンビナント IκB と野生型および PKR 変異型細胞から抽出した蛋白溶液を [γ - 32 P]-ATP 存在下で反応させ *in vitro* リン酸化を行なう。さらにリコンビナント IκB とリコンビナント PKR および変異型 PKR も同様に反応させ、*in vitro* リン酸化を行ない、IκB のセリンおよびチロシンリン酸化部位と PKR の関係を調べる。

4. 研究成果

PKR が骨芽細胞の分化と破骨細胞の形成に必須であるという我々のこれまでの成果を発展させ、本研究で、骨形成と骨吸収における PKR の役割を細胞生物学的に解明し、動物実験で確認した。また、PKR は Osterix, STAT1, IκB, NF-κB 等の因子を調節するという観点から骨芽細胞の分化機構を解明した。さらに、Osterix は PP2B により脱リン酸化されることが分かっているので、Osterix と PP2B との結合部位を確定し、PKR と PP2B による Osterix のリン酸化状態と骨形成の関係を明らかにした。

我々は骨芽細胞の分化における蛋白質のリン酸化と脱リン酸化について解析し、オキサリ酸とカリクリン A が PKR の活性と Osterix, STAT1, NF-κB の発現とリン酸化を介して骨芽細胞の分化を誘導することを明らかにした (Okamura et al, 2011)。PKR はインターフェロンや 2 本鎖 RNA により活性化され、細胞の防御機構に関与する蛋白質リン酸化酵素である。我々は、PKR の触媒部位の 296 番目に位置するリジンをアルギニンに変異した cDNA を作製し、マウス骨芽細胞 (MC3T3-E1) とマウス破骨前駆細胞 (RAW264.7) に導入して PKR 不活性型細胞 (PKR-K/R) を樹立した。PKR 変異骨芽細胞では ALP 等骨関連蛋白質の発現が減少し *in vitro* における石灰化能も欠如し、骨芽細胞としての特性を失っていた (Yoshida et al, 2009)。下図に PKR 変異細胞の von Kossa 染色像と RANKL の刺激による PKR 変異破骨前駆細胞の破骨細胞形成が阻害像を示す (Teramachi et al, 2010)。



PKR 変異骨芽細胞では Osterix の発現が低下している (Yoshida et al, 2009)、PKR は Osterix を介して骨形成を制御すると考えられる。我々は、免疫沈降法によりマウス骨芽細胞から Osterix と結合する蛋白質を得た。MALDI-TOF-MS 質量分析を用いて、複数の Osterix 結合分子の中に PP2B (カルシニューリン) を同定した (Okamura et al, 2009)。Osterix は 2 本のバンドとして検出され、λ-ホスファターゼ処理により、上方にシフトしたバンドが消失することから、Osterix は細胞内でリン酸化を受けていると考えられる。

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 21 件)

1. Haneji T, Teramachi J, Hirashima K, Kimura K, Morimoto H

Interaction of protein phosphatase 1δ with nucleophosmin in human osteoblastic cells, *Acta Histochemica et Cytochemica*, 45, 1-7, 2012, doi:10.1267/abc.11041 (査読有)

2. Susilowati H, Okamura H, Hirota K, Shono M, Yoshida K, Murakami K, Tabata A, Nagamune H, Haneji T, Miyake Y

Intermedilysin induces EGR-1 expression through calcineurin/NFAT pathway in human cholangiocellular carcinoma cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 404, 57-61, 2011, doi:10.1016/j.bbrc.2010.11.057 (査読有)

3. Okamura H, Yoshida K, Ochiai K, Haneji T

Reduction of protein phosphatase 2A Cα enhances bone formation and osteoblast differentiation through the expression of bone-specific transcription factor Osterix *Bone*, 49, 368-375, 2011, doi:10.1016/j.bone.2011.06.004 (査読有)

4. Inagaki Y, Yoshida K, Ohba H, Seto H, Kido J,

Haneji T, Nagata T

High glucose levels increase osteopontin production and pathologic calcification in rat dental pulp tissues, *Journal of Endodontics*, 36, 1014-1020, 2010, doi:10.1016/joen.2010.03.018 (査読有)

5. Teramachi J, Morimoto H, Baba R, Doi Y, Hirashima K, Haneji T
Double stranded RNA-dependent protein kinase is involved in osteoclast differentiation of RAW264.7 cells in vitro, *Experimental Cell Research*, 316, 3254-3262, 2010, doi:10.1016/j.yexcr.2010.08.006 (査読有)

6. Sato N, Morimoto H, Baba R, Nakamata J, Doi Y, Yamaguchi K
Functional expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase in rat intestinal epithelial cells, *Journal of Cellular Biochemistry*, 110, 104-111, 2010, doi:10.1002/jcb.22513 (査読有)

7. Okamura H, Amorim BR, Wang J, Yoshida K, Haneji T
Calcineurin regulates phosphorylation status of transcription factor osterix, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379, 440-444, 2009, doi:10.1016/j.bbrc.2008.12.094 (査読有)

8. Yoshida K, Okamura H, Amorim BR, Hinode D, Yoshida H, Haneji T
PKR-mediated degradation of STAT1 regulates osteoblast differentiation, *Experimental Cell Research*, 315, 2105-2114, 2009, doi:10.1016/j.yexcr.2009.02.003 (査読有)

9. Okamura H, Yoshida K, Haneji T
Negative regulation of TIMP1 is mediated by transcription factor TWIST1, *International Journal of Oncology*, 35, 181-186, 2009, doi:10.3892/ijo_00000327 (査読有)

[学会発表] (計 25 件)

1. 羽地達次, 寺町順平, 中島義基, 森本景之
破骨細胞の形成と PKR 活性, 2012 年 3 月 27 日, 第 117 回日本解剖学会総会, 甲府市 (山梨大学)

2. 羽地達次, 寺町順平, 中島義基, 森本景之
PKR 活性阻害と破骨細胞形成, 2011 年 10 月 2 日, 第 53 回歯科基礎医学会総会, 岐阜市 (長良川国際会議場)

3. 羽地達次, 寺町順平
破骨細胞形成における PKR, 2011 年 9 月 24 日, 第 52 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 金沢市 (金沢大学)

4. Okamura H, Haneji T
Calcineurin regulates phosphorylation status of Osterix at Serine73 site, 2011 年 3 月 29 日, 第 116 回日本解剖学会総会, 横浜市 (パシフィコ横浜)

5. 森本景之, 寺町順平, 羽地達次
PKR 活性阻害が軟骨細胞分化に及ぼす影響, 2010 年 9 月 21 日, 第 52 回歯科基礎医学会総会, 船橋市 (タワーホール船堀)

6. 羽地達次, 寺町順平, 木村幸司, 平島寛司, 森本景之, 土肥良秋
蛋白質脱リン酸化酵素 PP1δ と B23 の細胞内局在およびアポトーシス細胞における B23 の分解, 2010 年 9 月 4 日, 第 51 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 東京都 (秋葉原コンペティションホール)

7. 羽地達次, 寺町順平, 岡村裕彦, 吉田賀弥, 森本景之
PKR 変異型骨芽細胞株における蛋白質脱リン酸化酵素阻害剤によるアポトーシス誘導と IκB の発現 2009 年 9 月 11 日, 第 51 回歯科基礎医学会総会, 新潟市 (白鷺メッセ)

8. 羽地達次, 田中宏明, 岡村裕彦, 吉田賀弥, 森本景之
カリクレリン A による MG63 細胞のアポトーシス誘導, IκB の分解, NF-κB リン酸化, 2009 年 8 月 2 日, 日本 Cell Death 学会 第 18 回学術集会, 長崎市 (長崎大学)

[図書] (計 2 件)

1. 羽地達次, 寺町順平 (分担)
培養細胞の免疫蛍光抗体法, 組織細胞化学 2009, pp. 19-24, 日本組織細胞化学会 中西印刷, 京都市, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽地 達次 (HANEJI TATSUJI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号: 50156379

(2) 研究分担者

寺町 順平 (TERAMACHI JYUMPEI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号: 20515986
(H21、H22 研究分担者)

中島 義基 (NAKASHIMA YOSHIKI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号: 30593082
(H23 研究分担者)

(3) 連携研究者

森本 景之 (MORIMOTO HIROYUKI)
産業医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 30335806