

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：30118

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01805

研究課題名(和文)骨代謝と糖代謝をつなぐシグナル蛋白質オステオカルシンの構造と機能

研究課題名(英文) Structure and function of a signal protein osteocalcin connecting bone metabolism and carbohydrate metabolism

研究代表者

河野 敬一 (Kawano, Keiichi)

千歳科学技術大学・理工学部・特別研究員

研究者番号：10136492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨の形成に役立つタンパク質として知られていたオステオカルシン(OC)が、糖代謝の制御、脂質代謝、男性ホルモンの産生、等多様な活性をもつホルモンであることがわかってきた。骨を刺激すれば健康と若返りが可能と言われている。その重要性にもかかわらず分子メカニズムは不明な点が多い。この研究では、OCは酸性で活性化されることから、酸性でのOCの立体構造をCD、NMR、X線結晶解析で検討した。その結果、OCは酸性でも構造を維持しており、そのため不活性型にならずにホルモン活性を維持できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Osteocalcin (OC), which was known as a protein useful for the formation of bone, has been found to be a hormone with various activities such as control of sugar metabolism, lipid metabolism, production of testosterone. Stimulation of bones is known as a key of health and rejuvenation. Despite its importance, a little of molecular mechanisms are known. Since OC is activated in an acidic environment, the three-dimensional structures of OC in acidic state were examined by CD, NMR and X-ray crystallography. As a result, it was revealed that OC is able to maintain structure and hormonal activity even in acidic environment.

研究分野：構造生物学

キーワード：オステオカルシン 多臓器関連 糖代謝 骨形成 立体構造解析 NMR X線結晶解析 活性型

1. 研究開始当初の背景

オステオカルシン (OC) は γ カルボキシグルタミン酸 (Gla) を含む蛋白質として 1975 年、骨中に発見された。Gla は、当初、血液凝固系の蛋白質に発見されたが、側鎖にカルボキシル基を 2 組もつアミノ酸であり、カルシウムイオンに配位することから、リン酸カルシウム (ハイドロキシアパタイト ; HA) から成る骨や歯等の硬組織にも存在することが予想され、間もなく骨中に存在が証明された (Hauschka, PNAS 1975; Price, PNAS 1976)。ヒトでは 49 残基からなる分子量 5900 の蛋白質であり、1 分子に 3 残基の Gla を含む。2003 年、X 線結晶解析によってブタ OC の構造が解かれた (Hoang, Nature 2003)。3 本の α ヘリックスからなり、疎水性コア構造と、3 個の Gla を含む酸性残基の集まる表面部位が示された。

OC の機能は、HA 表面に吸着して結晶成長をコントロールすることであると考えられてきた。骨芽細胞によって骨組織は作られ、破骨細胞によって吸収されるが、OC は唯一の骨芽細胞特異的に産生される蛋白質であり、骨形成に重要な分子として認識されてきた。一方、OC は破骨細胞を誘導する走化性をもっていることから (Chenu, J Cell Biol 1994)、骨吸収においても重要な働きをしていると考えられている。

最近、骨代謝と糖代謝には、双方向性の関係が存在する可能性が注目されている (Katsnelson, Nature 2010)。すなわち、骨芽細胞が産生する OC が膵臓の β 細胞を刺激し、インスリンの分泌や感受性などの調節に関与し、血糖値の調節や脂肪の蓄積、さらには脂質代謝、動脈硬化などを制御していることが提案されている。逆に、 β 細胞からのインスリンシグナルが骨由来のホルモンである OC を活性化することにより糖・エネルギー代謝を調節している。また、 β 細胞の OC 受容体は GPRC6A であることが有力視されている (Pi, J Bone Miner Res 2011)。更に OC が男性ホルモンの産生を制御することも最近提案されている (Karsenty, Nature 2012)。このように、骨は標的臓器としてのみならずホルモン産生臓器としても機能し、他臓器を調節しうることが明らかとなっており、臓器連関の観点からもこの領域の研究は脚光を浴びてきている。

GPRC6A は細胞外アミノ酸、OC、2 価カチオンと結合するクラス C GPCR の一種であるが、ノックアウトすることにより、骨減少、雌性化、メタボリックシンドロームを惹き起こす (Pi, 2008 PLoS ONE)。OC を介して骨代謝と糖代謝、生殖能を結びと予想されているが (Karsenty, Nature 2012)、構造情報はほとんどない。

2. 研究の目的

これまで、Gla が脱炭酸して Glu になったオステオカルシン誘導体 (Glu 型 OC) が血中

に存在し、その濃度が骨代謝のマーカーとして臨床的に広く用いられてきた。この Glu 型 OC のホルモンとしての重要性がにわかには脚光を浴びることとなったが、その由来は長く不明であった。一部は骨芽細胞で作られた Glu 型 OC が翻訳後修飾を受ける前に血中に放出されると考えられるが、大部分は骨吸収の過程で骨組織から放出されると考えられている。Gla 型 OC が脱炭酸して Glu 型 OC となる反応は、酸性状態で起きることが *in vitro* で知られていたが、破骨細胞の作る pH4.5 の環境で脱炭酸することが最近示され (Ferron, Cell 2010)、骨吸収の過程で活性ホルモンである Glu 型 OC の作られることが示唆された。この反応過程を詳細に明らかにするため、Gla 型 OC の酸性条件下の構造を NMR、CD および X 線結晶解析を用いて明らかにすることを目的とした。

骨由来ホルモンとして重要な Glu 型 OC であるが、これまで溶液中では構造をもたないと考えられてきた。最近、X 線結晶解析により、Glu 型 OC の構造が Ca 配位 Gla 型 OC とほぼ同じであることが示された (Dowd, Biochemistry 2013)。しかし、Glu 型 OC の構造については、その重要性にもかかわらず、この 1 報しか存在しない。Glu 型 OC の誘導体を含めて、構造活性相関を明らかにしていく必要がある。

新しいホルモンとして急激に注目されてきた OC 中の Glu 残基の Gla 化と脱炭酸が、ホルモン活性化のオン/オフを担う特異な機構を構造面から解明しようとする。

3. 研究の方法

CD スペクトルから、溶液中では Glu 型 OC は構造をもたないと長く信じられてきた。しかし、最近、X 線結晶解析により Glu 型 OC の構造が Ca 配位 Gla 型 OC と同じであることが示された (Dowd, Biochemistry 2013)。彼らは、CD が溶液の濁りや塩濃度の影響を受けて正しくない結果を与えることがあるとしているが、X 線結晶解析では結晶場の束縛によって構造が変化する可能性があり、CD 測定を再検討する必要がある。

本研究では千歳科学技術大学設置のペルチェ式恒温セルホルダ付日本分光社製 J-820 型円二色性分散計を用いた。OC は弱酸性で等電点沈殿を生じるため、希薄な溶液で 1cm セルを用いることで正確な測定を行うことが出来た。

Glu 型 OC (bovine, 全長) と Glu 型 OC (bovine, 短縮) はトランスサイレチンの C 末端に融合させて大腸菌で発現した。ベクターは pQE30 を用いた。トランスサイレチンの N 末端に付加した His-tag を利用して Ni-NTA で精製した。トランスサイレチンとオステオカルシンの間に付加した TEV プロテアーゼ切断サイトを用いてトランスサイレチンを分離し、その後 HPLC で精製した。SDS-PAGE と MALDI-TOF-MS で純度と分子量を確認した。

X線結晶解析のデータ収集はフotonファクトリーのビームラインを利用して行った。NMRの測定には、富山大学のAvance 800を用いた。

4. 研究成果

Glu型OCのCDスペクトルのpH変化測定のためのシステム構築を行った。過去の論文では酸性の測定例が存在せず、等電点沈殿のためデータが得られなかったことが考えられる。今回、pHを8から2まで連続的に変化させてCDを測定することに成功した(図1)。中性では α ヘリックスが少なく、緩い構造をとっていると思われ、X線結晶解析とは一致しない。一方、酸性では2次構造を形成しており、活性型(全長)Glu型OCの分解を防いでいる。

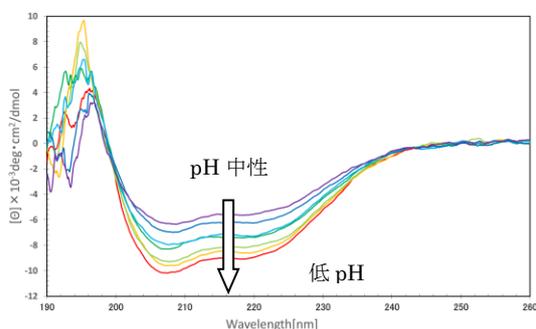


図1 Glu型OC (murine, 全長)のCDスペクトルのpH変化

安定同位体標識したGlu型OCを用いて多核多次元NMRを測定することにより溶液中での立体構造解析を目指した。Glu型OC全長の大腸菌による発現系を構築した。得られた $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル体を用いて、帰属に必要な以下のスペクトルを測定した。

$^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC、CBCANH、CBCACONH、HNCACO、HNCO。

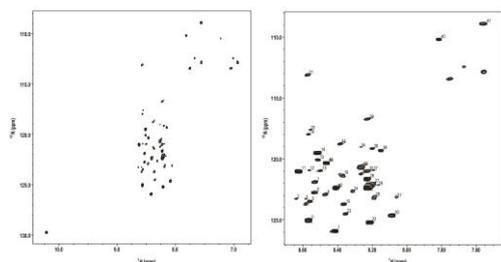


図2 Glu型OC (bovine, 全長)のHSQCスペクトル (pH2.4、10°C、右は拡大図)

図2のHSQCを見る限り、 α ヘリックスリッチなタンパク質であり、中性のGla型OC、Glu型OCと同じ構造をとっている。

スペクトルが必ずしも良質ではなかったため、これまでの構造解析で構造をとっていないことがわかっているN端領域を削除したOC(短縮Glu型OC)の発現系を構築し、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル体を得た。このNMR測定をpH2.4の条件で行ったところ、スペクトルは各段に改善されたが、アミノ酸残基の個数よりも多く

のシグナルが観測された。pH2.4ではmultiple conformationsになっている可能性がある。

X線結晶解析でも全長のGlu型OCでは良い結晶が得られなかったため、短縮Glu型OCの結晶調製を試みたところ、pH8.5の緩衝液から良い結晶が得られた(図3)。

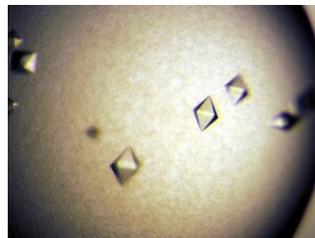


図3 Glu型OC (bovine, 短縮)の結晶 (pH8.5 緩衝液)

この結晶をpH2.0の溶液に浸漬し、X線回折測定を行った。測定に供する前にグリセリン、硫酸で抗凍結化した。7種類の結晶を作成したが、そのうちの3種類からは非常に高精度なデータ(分解能1.4Å程度)が得られた。

中性と酸性のX線結晶解析の結果から、両者の主鎖構造はほぼ同じであったが、E40の電子密度図に違いがあることがわかった(図4)。中性結晶ではシングルコンフォメーションであったが、酸性結晶では複数のコンフォメーションが存在していた。この違いはE40のプロトン化状態の違いを反映しているかもしれない。E40は分子表面上に位置しており、機能的に重要かは今後検討していく。

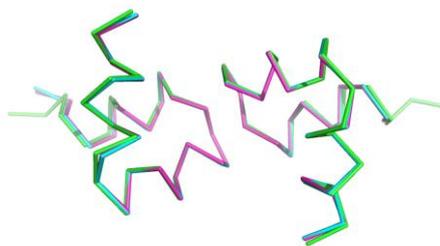


図4 図3の結晶をpH2の緩衝液にソーキングしたものの回折パターンから得た構造と中性結晶の構造の重ね合わせ

これまでのCDや抗体結合による研究では、Glu型OCの立体構造はCa配位Gla型OCの構造とは異なると信じられてきたが(Delmas, Biochemistry 1984)、X線結晶解析によりGlu型OCの構造がCa配位Gla型OCと同じであることが示された(Dowd, Biochemistry 2013)。これを確認する報告はその後発表されていないが、今回の結果は少なくともN端領域以外は両者が同じ構造であることを示している。

破骨細胞による骨吸収の際には、HAを溶解するために酸が分泌される。遊離したGla型OCがしばらく骨組織中の酸性環境に留ま

れば、脱炭酸が進み、ホルモンとして活性な Glu 型 OC が作られ血中に吸収される。血中のオステオカルシンは低カルボキシル化オステオカルシン (ucOC) と呼ばれ、Glu 型 OC、Gla 型 OC、破骨細胞の酵素によって Arg19-Arg20 の間が切断されたフラグメント、等の混合物であるが、ホルモン活性があるのは Glu 型 OC であるとされている。Ca 配位 Gla 型 OC では Arg19-Arg20 周辺はヘリックス構造をとっており、加えて酸性の Gla 型 OC が同様の構造をとっていることが判明したことから、酸性環境ではペプチドの切断が困難な状況が推定される。その結果切断フラグメントではなく、活性型ホルモンである全長の Glu 型 OC の血中濃度が上昇することになる。

これは、「翻訳後修飾を受ける前に血中に放出される活性型 OC は少なく、大部分は骨吸収の過程で骨組織から放出される」とする仮説を支持する結果といえる。

明らかになりつつある骨代謝と糖代謝の関連から、骨粗鬆症薬が OC の産生量を変化させ、血糖値やインスリン耐性に影響する可能性が考えられ、 β 細胞上の OC の受容体蛋白質として想定されているクラス C GPCR の一種である GPRC6A と OC の相互作用を明らかにすることは、副作用のない、あるいは複数の臓器に対して同時に有効な新薬の開発にとって重要な課題である。

今後、Glu 型 OC のレセプターと考えられている GPRC6A との共結晶を作成し、Glu 型 OC の多臓器間ホルモン活性の発現機構を解析していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

① Tsuchiya S, Sakai KI, Kawano K, Nakane Y, Kikuchi T, Akutagawa T., Color Changes of a Full-Color Emissive ES IPT Fluorophore in Response to Recognition of Certain Acids and Their Conjugate Base Anions. *Chemistry - A European Journal* (査読有), 24, 5868-5875, 2018.
DOI:10.1002/chem.201705622

② Kobayashi S, Kawano K, Aizawa T, Mizokami A, Karthaus O, Hirata M., Conformation of Carboxylated and Uncarboxylated Osteocalcin in the Bone Resorbing Niche. *Peptide Science 2016* (査読有), 1, 79-80, 2017.
<https://www.prf.or.jp/psb.html>

③ Tsutsumi M, Muto H, Myoba S, Kimoto M, Kitamura A, Kamiya M, Kikukawa T, Takiya S, Demura M, Kawano K, Kinjo M, Aizawa T., *In vivo* Fluorescence Correlation Spectroscopy Analyses of FMBP - 1, a Silkworm Transcription Factor. *FEBS Open Bio.* (査読有), 6, 106-125. 2016.
DOI:10.1002/2211-5463.12026

④ Baek MH, Kamiya M, Kushibiki T, Nakazumi T, Tomisawa S, Abe C, Kumaki Y, Kikukawa T, Demura M, Kawano K, Aizawa T., Lipopolysaccharide-bound Structure of the Antimicrobial Peptide Cecropin P1 Determined by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. (査読有), *J Pept Sci.*, 22, 214-221. 2016.
DOI:10.1002/psc.2865

⑤ Kawano K, Kobayashi S, Aizawa T, Karthaus O, Hirata M, Solution Structure of Carboxylated and Uncarboxylated Osteocalcin. *Peptide Science 2015* (査読有), 1, 141-142, 2016.
<https://www.prf.or.jp/psb.html>

⑥ Tomisawa S, Sato Y, Kamiya M, Kumaki Y, Kikukawa T, Kawano K, Demura M, Nakamura K, Ayabe T, Aizawa T., Efficient Production of a Correctly Folded Mouse α -Defensin, Cryptdin-4, by Refolding during Inclusion Body Solubilization. *Protein Expr Purif.*, 112, 21-28, 2015.
DOI:10.1016/j.pep.2015.04.007

〔学会発表〕 (計 3 件)

① Kobayashi S, Kawano K, Aizawa T, Mizokami A, Karthaus O, Hirata M., Conformation of Carboxylated and Uncarboxylated Osteocalcin in the Bone Resorbing Niche. 17th Chitose International Forum on Photonics Science and Technology, 2016 年 11 月 14 日~11 月 15 日、千歳科学技術大学 (北海道千歳市) .

② Kobayashi S, Kawano K, Aizawa T, Mizokami A, Karthaus O, Hirata M., Conformation of Carboxylated and Uncarboxylated Osteocalcin in the Bone Resorbing Niche. 第 53 回ペプチド討論会、2016 年 10 月 26 日~10 月 28 日、京都テルサ (京都府京都市) .

③ Kawano K, Kobayashi S, Aizawa T, Karthaus O, Hirata M., Solution Structure of Carboxylated and Uncarboxylated Osteocalcin. 第 52 回ペプチド討論会、2015 年 11 月 16 日~11 月 18 日、平塚市中央公民館 (神奈川県平塚市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 敬一 (KAWANO, Keiichi)

千歳科学技術大学・理工学部・特別研究員
研究者番号: 10136492

(3) 連携研究者

Karthaus Olaf (カートハウス, オラフ)

千歳科学技術大学・理工学部・教授
研究者番号：80261353

木村 廣美 (KIMURA, Hiromi)
千歳科学技術大学・理工学部・教授
研究者番号：00574857

(4) 研究協力者

小林 翔太 (KOBAYASHI, Shota)
相沢 智康 (AIZAWA, Tomoyasu)
水口 峰之 (MIZUGUCHI, Mineyuki)
横山 武司 (YOKOYAMA, Takeshi)
鍋島 裕子 (NABESHIMA, Yuko)
平田 雅人 (HIRATA, Masato)