

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15553

研究課題名(和文)革新的イメージングとKOマウスを駆使した骨代謝におけるArkadiaの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of Arkadia in bone metabolism using innovative imaging technique and KO mice

研究代表者

今村 健志(Takeshi, Imamura)

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70264421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Arkadia を制御するcofactor を同定し、その分子メカニズムを解明することを目的に、Arkadia 結合タンパク質のスクリーニングを行い、候補遺伝子を得た。Arkadiaの新規標的タンパク質Smad6を同定し、Arkadiaが骨芽細胞分化後期過程においてBMPシグナルを優位に活性化することで分化を促進し、BMPシグナルを選択的に抑制するSmad6をユビキチン化し分解へと導く研究成果については論文発表を行った。Arkadia の解析の比較対象として準備していたBMPシグナルを負に制御するE3 ユビキチンリガーゼSmurf2のノックアウトマウスで著明な異常が見出された。

研究成果の概要(英文)：To identify the cofactor controlling Arkadia and to elucidate its molecular mechanism, screening of Arkadia binding protein was performed to obtain a candidate gene. Smad6 was identified as a new Arkadia target protein, Arkadia promotes differentiation by predominantly activating BMP signal during the late stage differentiation of osteoblasts, and ubiquitinates Smad6 which selectively suppresses BMP signal leading to degradation. A marked abnormality was found in the knockout mouse of E3 ubiquitin ligase Smurf 2 that negatively regulates the BMP signal prepared as a comparison target of Arkadia analysis.

研究分野：骨代謝

キーワード：バイオテクノロジー シグナル伝達 遺伝子 タンパク質 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

近年、PTH 製剤の台頭により、骨形成を促進する骨粗鬆症治療に注目が集まっている。骨形成因子 (BMP; bone morphogenetic protein) は、骨芽細胞分化を促進する因子であるが、全身的投与が難しく、副作用もあり、骨粗鬆症治療薬としては期待できない。また、BMP は、その時空間的制御機構が複雑なために、骨代謝におけるシグナル調節機構の全貌は明らかでなく、BMP 関連因子に関する創薬は遅れている。申請者はこれまでに BMP シグナル伝達研究において、世界に先駆けてレセプターや Smad などのシグナル伝達分子の発見からその機能解析 (PNAS, 1995; Nature, 1997) に成功し、シグナル調節から骨・軟骨代謝における役割の解明に至るまで世界をリードした研究成果 (Nat Genet, 1998; Cell, 2000; JCB, 2001; EMBO J, 2004; MCB, 2006) を挙げてきた。特に、ユビキチン・プロテアソーム系については、BMP シグナルを負に制御する E3 ユビキチンリガーゼ Smurf1/2 の機能解析 (JBC, 2001; JBC, 2002; JBC, 2003; MBC, 2003; JCB, 2004; JBC, 2008) で大きな成果を挙げている。さらに、BMP シグナルを正に制御する因子として、Arkadia が E3 ユビキチンリガーゼであることを世界に先駆けて報告し (EMBO J, 2003)、その骨芽細胞における役割を明らかにした (Bone, 2000)。以上の結果は、BMP 依存的骨芽細胞分化における Smurf1/2 と Arkadia の時空間的制御機構が明らかになり、特に Arkadia を制御するファクターとその分子メカニズムが解明されれば、骨形成を促進する新規骨粗鬆症治療薬開発に繋がる可能性を示唆する。

2. 研究の目的

申請者自らが開発した多光子励起顕微鏡を用いた革新的生体蛍光イメージング法、先端的質量分析システム、さらに遺伝子改変マウスを駆使し、BMP シグナルを制御する E3 ユビキチンリガーゼ Smurf1/2 と Arkadia の骨芽細胞分化における時空間的な役割・作用点とその分子メカニズムを明らかにし、新たな骨粗鬆症の治療薬へ繋がる基礎的知見を得る。Smurf1/2 と Arkadia に対する骨特異的ノックアウトマウスと BMP シグナル蛍光イメージングマウスを作製し、*in vitro* と *in vivo* で、Smurf1/2 と Arkadia の loss of function を解析し、BMP 依存的骨芽細胞分化における Smurf1/2 と Arkadia の時空間的制御機構を明らかにする。さらに Smurf1/2 と Arkadia を制御する cofactor を同定し、その分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

BMP シグナルを制御する E3 ユビキチンリガーゼ Smurf1/2 と Arkadia の骨芽細胞分化における時空間的な役割・作用点とその分子メカニズムを明らかにし、新たな骨粗鬆症の

治療薬へ繋がる基礎的知見を得るために、*in vitro* 実験に関しては、質量分析法を用いて Arkadia 結合タンパク質をスクリーニングして、その機能解析を cofactor としての作用に焦点を絞って解析する。一方、*in vivo* 実験に関しては、Smurf1/2 と Arkadia の KO マウスを作製し、その骨形態計測を行う。さらに、申請者が開発し、高度化した新規補償光学型長波長 2 光子励起顕微鏡を用いて、BMP シグナルイメージングマウスで、骨芽細胞分化における BMP シグナル伝達の時空間的变化をイメージングし、Arkadia の BMP シグナルに対する時空間的な役割・作用点を明らかにする。

4. 研究成果

最先端の分子生物学的手法、細胞生物学的手法と申請者自らが開発した多光子励起顕微鏡を用いた革新的生体蛍光イメージング法を駆使し、BMP シグナルを制御する E3 ユビキチンリガーゼ Smurf1/2 と Arkadia の骨芽細胞分化における時空間的な役割・作用点とその分子メカニズムを明らかにし、新たな骨粗鬆症の治療薬へ繋がる基礎的知見を得ることを目的に研究を行った。

まず、Arkadia を制御する cofactor を同定し、その分子メカニズムを解明することを目的に、Arkadia 結合タンパク質のスクリーニングを行い、その機能解析のために基盤整備を行った。具体的には、293 細胞に FLAG-tag のついた野生型 Arkadia とリガーゼ活性を喪失した変異型 Arkadia の遺伝子を導入し、免疫沈降後に、質量分析法を用いて Arkadia 結合タンパク質をスクリーニングした結果から、候補タンパク質の選別し、そのドメインや機能を考慮して、FLAG と 6xMyc などの epitope-tag 付きタンパク質用のプラスミドのコンストラクションを行い、一部のタンパク質については機能解析を完了した。

Arkadia の新規標的タンパク質 Smad6 を同定し、Arkadia が骨芽細胞分化後期過程において BMP シグナルを優位に活性化することで分化を促進し、BMP シグナルを選択的に抑制する Smad6 をユビキチン化し分解へと導く研究成果については論文発表を行った (JB, 2015)。

in vivo の先進的遺伝子改変マウスを用いた実験については、単純な Arkadia KO マウスは胎生致死なので、Cre-lox コンディショナルノックアウト法を利用した Arkadia に対する骨特異的ノックアウトマウスの作製が必要である。作製した Arkadia flox マウスは、hypomorphic phenotype であったので、ヘテロマウスを解析したが、骨のフェノタイプは認められなかった。そこで、新たな Arkadia flox マウス作製のデザインとその genotyping 等の基盤整備を完了した。

さらに、BMP シグナルのイメージングのために、BMP 特異的プロモーターの下流で蛍

光タンパク質が発現する Tg マウスのデザインを完了し、*in vitro*でのプロモーターの特異性の検討を完了した。

Arkadia の解析の比較対象として準備していた BMP シグナルを負に制御する E3 コピキチンリガーゼ Smurf2 のノックアウトマウスの骨形態計測を行ったところ、著明な異常が見出されたので、その骨代謝解析を *in vitro*と *in vivo*で進めた。

蛍光顕微鏡を用いて、より広範囲に骨の蛍光イメージング解析を行うための新しい手法として、透明化の手法を取り入れ、透明化骨の蛍光イメージングに条件検討を完了した。

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 4件)

Yamamoto S, Oshima Y, Saitou T, Watanabe T, Miyake T, Yoshida O, Tokumoto Y, Abe M, Matsuura B, Hiasa Y, Imamura T. Quantitative imaging of fibrotic and morphological changes in liver of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) model mice by second harmonic generation (SHG) and auto-fluorescence (AF) imaging using two-photon excitation microscopy (TPEM). *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2016, 8, 277-283 doi: 10.1016/j.bbrep.2016.09.010 (査読あり)

Saitou T, Imamura T. Quantitative imaging with Fucci and mathematics to uncover temporal dynamics of cell cycle progression. *Dev Growth Differ*. 2016 Jan;58(1):6-15. doi: 10.1111/dgd.12252. (査読あり)

Tsubakihara Y, Hikita A, Yamamoto S, Matsushita S, Matsushita N, Oshima Y, Miyazawa K, Imamura T. Arkadia enhances BMP signaling through ubiquitylation and degradation of Smad6. *The Journal of Biochemistry* (2015) Jul;158(1):61-71. doi: 10.1093/jb/mvv024 (査読あり)

Hikita A, Imamura T, Oshima Y, Saitou T, Yamamoto S, Imamura T. Analyses of bone modeling and remodeling using *in vitro* reconstitution system with two-photon microscopy. *Bone*. 2015 Jul;76:5-17. doi: 10.1016/j.bone.2015.02.030. Epub 2015 Mar 12. (査読あり)

[学会発表](計 5件)

発表者名: 今村健志
発表標題: 先端的バイオイメージング技術

の薬理学応用

学会名: 第 69 回日本薬理学会西南部会

発表年月日: 2016, 11, 16

発表場所: 愛媛県松山市、松山大学

発表者名: 今村健志

発表標題: 骨・軟骨イメージングのための顕微鏡開発

学会名: 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会

発表年月日: 2016, 10, 13~14

発表場所: 福岡市、福岡国際会議場

発表者名: 今村健志

発表標題: 脳神経外科手術応用を目指した革新的バイオイメージング技術開発

学会名: 第 16 回日本術中画像情報学会

発表年月日: 2016, 7, 9

発表場所: 愛媛県松山市、松山全日空ホテル

発表者名: Takeshi Imamura

発表標題: *In vivo* cancer imaging by advanced multi-photon laser excitation microscopy

学会名: The 41st Naito Conference on Cancer Heterogeneity and Plasticity: Relevance to Therapeutic Resistance

発表年月日: 2016, 7, 5~8

発表場所: 札幌市、シャトレ・ゼガトーキングダムサッポロ

発表者名: Takeshi Imamura

発表標題: Development and application of advanced intravital imaging technique in oncology and lymphology

学会名: The 40th Annual meeting of the Japanese Society of Lymphology

発表年月日: 2016, 6, 24~25

発表場所: Ito International Research Center, The University of Tokyo

[図書](計 0件)

無し

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

無し

取得状況(計 0件)

無し

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/imaging/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

今村 健志 (Imamura, Takeshi)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70264421

(2)研究分担者
無し

(3)連携研究者
無し

(4)研究協力者
無し