

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20856

研究課題名(和文)骨粗鬆症治療の分子基盤に関する研究

研究課題名(英文)Understanding of the molecular basis of therapy for osteoporosis

研究代表者

斎藤 将樹 (Saito, Masaki)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50400271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：副甲状腺ホルモン(PTH)製剤は種々の骨粗鬆症治療薬の中で唯一、骨芽細胞分化を誘導し骨形成を促進する。しかし、PTHによる骨芽細胞分化と骨形成の分子機構には不明な点が多く残されており、解明が必要とされていた。本研究によって、PTH受容体に結合するタンパク質4.1GとTctex-1は、PTH受容体を介するGs/アデニル酸シクラーゼ/サイクリックAMP(cAMP)シグナルを、それぞれ抑制と亢進することが見出された。一方、4.1Gはアスコルビン酸/α-グリセロリン酸誘導性の骨芽細胞分化を亢進することから、cAMP産生制御とは異なる分子機構によって、骨芽細胞分化を制御することが示された。

研究成果の概要(英文)：Parathyroid hormone (PTH) is the only medicine, which promotes osteoblast differentiation and osteogenesis. However, mechanisms of the differentiation and osteogenesis have been unclear. In the present study, I found that 4.1G and Tctex-1, both of which were identified as interacting proteins to PTH receptor, suppressed and increased PTH receptor-mediated Gs/adenylyl cyclase/cyclic AMP (cAMP) signaling pathway, respectively. On the other hand, I also found that 4.1G promoted osteoblast differentiation induced by ascorbic acid/α-glycerophosphate, suggesting that 4.1G regulates osteoblast differentiation by different mechanisms from the suppression of cAMP production.

研究分野：分子薬理学

キーワード：副甲状腺ホルモン受容体 4.1Gタンパク質 Tctex-1 骨芽細胞分化 アデニル酸シクラーゼ サイクリックAMP

### 1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は、骨形成を司る骨芽細胞の活性と骨吸収を司る破骨細胞の活性のバランスが崩れることで発症する。日本では現在約1,100万人程度の患者がいるが、高齢化が進む昨今においては、より有効な治療法が求められている。副甲状腺ホルモン (PTH) は2010年にアナボリック骨粗鬆症治療薬として承認された。すなわち、パルス的に PTH を投与すること (間欠投与) によって骨芽細胞が分化し、骨形成効果が現れる (パルス療法)。PTH は種々の骨粗鬆症治療薬のなかで唯一骨形成を促進する作用があることから、近年非常に注目を集めている製剤である。

PTH は、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) である PTHR に作用する。PTHR は三量体 G タンパク質 Gs および Gq と共役し、それぞれアデニル酸シクラーゼ (AC)/サイクリック AMP (cAMP) シグナル、および細胞内 $[Ca^{2+}]$ シグナルを惹起する。特に骨芽細胞では、Gs/AC/cAMP シグナルを介して分化誘導する。研究代表者は、PTHR を介した Gs/AC/cAMP シグナルの分子制御機構に新展開を見出し、かつ薬物標的分子を新たに見出すことが、パルス療法を含めた将来の骨粗鬆症治療には大切だと考えている。

その目的のため、代表者はこれまで、PTHR に結合するタンパク質として 4.1G と t-complex testis expressed-1 (Tctex-1) を同定し、それらの生理的役割について以下の発見をしてきた。細胞膜裏打ちタンパク質 4.1G は、PTHR の細胞表面局在と Gq シグナルの増強 (Saito *et al.*, *Biochem. J.*, 2005)、および Gs シグナルの抑制 (Goto and Saito *et al.*, *Cell. Signal.*, 2013) にそれぞれ関与する。一方、微小管に沿った細胞内輸送を制御する細胞質ダイニンの軽鎖 Tctex-1 は、アゴニスト依存的な PTHR の細胞内内在化に関与する (Sugai and Saito *et al.*, *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, 2003)。

### 2. 研究の目的

本研究では、PTH 製剤のパルス療法による骨粗鬆症治療の効果発現機構を理解することを目的として、PTHR を介した Gs/AC/cAMP シグナルおよび骨芽細胞分化の分子調節機構を、4.1G と Tctex-1 に注目して解明する。

まず、4.1G は Gs/AC/cAMP シグナルを抑制するため (Goto and Saito *et al.*, *Cell. Signal.*, 2013)、4.1G による AC 活性抑制の分子機構を解明する。また、Gs/AC/cAMP シグナルにおける Tctex-1 の役割は不明であり解明する。さらに、骨芽細胞分化における 4.1G の役割を解明する。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞培養：ヒト胎児腎臓細胞株 (HEK293細胞) は、10%ウマ胎児血清 (FBS) 含有 DMEM 培地中で培養した。一方、マウ

ス骨芽前駆細胞株 (MC3T3-E1 細胞) は、10%FBS 含有 MEM $\alpha$  (10% FBS-MEM $\alpha$ ) 培地中で培養した。MC3T3-E1 細胞の分化誘導には、分化誘導培地 (250  $\mu$ M アスコルビン酸/10 mM  $\beta$ -グリセロリン酸 (AA/ $\beta$ GP) 含有 10% FBS-MEM $\alpha$ ) 中で 20 日間培養した。プラスミド DNA のトランスフェクションには、Lipofectamine2000、FuGENE HD および電気穿孔法を用いた。

(2) 安定発現細胞の樹立: HA-PTH $\alpha$  および GFP-AC6 の cDNA を導入された HEK293 細胞を G418 存在下に培養し、目的タンパク質を安定発現する細胞のみを選別した。

(3) *in vitro* pull-down assay: AC6 の細胞内ドメイン (N 末端、C1 ループ、および C2 ループ) には、それぞれの N 末にマルトース結合タンパク質 (MBP) を融合した。4.1G の N 末端に FLAG タグを付加した。Tctex-1 は、N 末端にグルタチオン S-転移酵素 (GST) を融合した。それぞれのタンパク質は大腸菌で産生した。各タンパク質を混合し 4°C でインキュベーションした後、アミロースビーズを用いて MBP 融合タンパク質を、あるいはグルタチオン担体ビーズを用いて GST 融合タンパク質を、それぞれ精製した。精製産物中に含まれるタンパク質の有無は、ウェスタンブロット法にて解析した。

(4) 細胞内共免疫沈降法: GFP-AC6 を安定発現した HEK293 細胞を氷上に静置した。細胞を TBS (20 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl) で 2 回洗浄した後、Lysis buffer (0.5% NP-40, 0.5% deoxycholic acid, 0.05% SDS, 1 mM EGTA, 5% glycerol, 1x protease inhibitor cocktail, 1 mM PMSF 含有 TBS) で可溶化した。細胞可溶化物を 26G シリンジに 5 回以上通し、遠心した上清を実験に用いた。抗 GFP 抗体を用いて GFP-AC6 を免疫沈降し、結合する内因性 4.1G を、抗 4.1G 抗体を用いたウェスタンブロット法にて検出した。

(5) 免疫染色法: 目的タンパク質を発現した細胞をカバーガラス上に播種し、4%パラホルムアルデヒドで 10 分間、室温にて固定した。その細胞を 0.1% BSA, 0.25% Triton X-100 含有 PBS で 30 分間 (室温) ブロッキングした後、1 次抗体および蛍光標識 2 次抗体でそれぞれ 60 分間 (室温) および 45 分間 (室温) インキュベートした。最後に、DAPI 含有封入剤を用いてスライドガラス上にマウンティングした。観察には共焦点蛍光顕微鏡 LSM-780 (Zeiss) を使い、ZEN2011 ソフトウェア (Zeiss) にて解析した。

(6) cAMP 産生量測定 (AlphaScreen 法): HA-PTH $\alpha$  を安定発現した HEK293 細胞を、ホスフォジエステラーゼ阻害薬 IBMX 存在下、PTH-(1-34) あるいは AC 活性化薬フォルスコリンで 10 分間、37°C にて刺激した。2.5%過塩素酸に置き換えることで反応を停止した。細胞上清に含まれる cAMP 量は AlphaScreen 法 (PerkinElmer) にて測定し、検出には PHERAstar (BMG Labtech) を用いた。

(7) アリザリンレッド染色：分化誘導した MC3T3-E1 細胞は、室温で 30 分間 10%ホルマリンを用いて固定した。固定細胞は、45 分間室温、暗所にてアリザリンレッド染色液中でインキュベートし染色した。細胞を蒸留水で 4 回洗浄し、さらに PBS 1 mL に置き換え 1 時間振とうした。その後、予め調整した 10 mM cetylpyridinium を 1 mL 加え、1 時間振とうした。上清をマイクロプレートリーダー Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific) を用い、562 nm で測定した。

(8) アルカリホスファターゼ (ALP) 活性測定：Protein Assay Bicinchoninate Kit (ナカライ) を用いてタンパク質の定量を行い、サンプルの濃度を一定にした。Assay buffer (50 mM glycine) に溶解した 10 mM pNPP 溶液 160  $\mu$ L 中に、サンプル 40  $\mu$ L を加え、37  $^{\circ}$ C にて 30 分インキュベートした。その後、250 mM NaOH 50  $\mu$ L を加え反応を停止し、マイクロプレートリーダー Multiskan GO にて 405 nm で測定した。

(9) RT-qPCR 法：分化誘導した MC3T3-E1 細胞を、TRIzol (Thermo Fisher Scientific) に可溶化した。抽出された総 RNA から、SuperScript RT reagent Kit (Takara) を用いて、mRNA を逆転写した。4.1G mRNA 量は、特異的プライマーおよび SYBR Premix Ex Taq II (Takara) を用い、ABI7500 リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) にて定量解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 4.1G による AC 活性の抑制機構

申請者はこれまで、細胞膜裏打ちタンパク質 4.1G が、AC 活性を抑制することを見出した。本研究ではまず、4.1G と AC の直接結合の有無を検討した。4.1G は Headpiece、FERM ドメイン、スペクトリン-アクチン結合ドメインおよび C 末端よりなる。一方、AC の細胞内領域には N 末端、C1 ループおよび C2 ループがある。AC の代表として AC6 を用いたところ、4.1G-FERM と AC6-N が直接相互作用することが *in vitro* pull-down assay によって見出された。

AC6 と 4.1G の細胞内結合を検討するため、GFP-AC6 を HEK293 細胞に安定発現した。細胞内共免疫沈降法を行った結果、GFP-AC6 は内因性 4.1G と結合することが示された。

ERM タンパク質との結合に関与するアミノ酸配列として、3 連続する塩基性アミノ酸 (リジン、アルギニン) が知られている (Yonemura *et al.*, J Cell Biol., 1998)。AC6-N には 3 連続のアルギニン配列 R<sup>29</sup>RR<sup>31</sup> が存在することから、それらを全てアラニンに置換した変異体 AC6-N-3A を作製した。*in vitro* pull-down assay の結果、AC6-N-3A では 4.1G-FERM との結合が顕著に減少した。

HEK293 細胞に GFP-AC6-N を発現すると、GFP-AC6-N は細胞膜に強く分布した。また、4.1G をノックダウンするとその細胞膜

分布は抑制された。すなわち、AC6-N は 4.1G との結合を介して細胞膜に分布することが示された。

GFP-AC6-N の過剰発現によって内因性 4.1G と AC6 の結合を抑制すると、フォルスコリン誘導性の cAMP 産生が増強した。GFP-AC6-N-3A の過剰発現は cAMP 産生を増強しなかった。すなわち、4.1G が AC6 に結合することにより、AC6 活性が抑制されることが示された。

AC6 と 4.1G の結合が PTHR を介した cAMP 産生において果たす役割を検討する目的で、HA-PTHrP を安定発現する HEK293 細胞 (HA-PTHrP-HEK293 細胞) を作製した。PTHrP(1-34) で細胞を刺激したところ、cAMP 産生は GFP-AC6-N の過剰発現によって増加した。以上の結果から、PTHrP を介した AC6/cAMP シグナルにおいて、4.1G は AC6 に直接結合しその活性を抑制することが見出された。

##### (2) Gs/AC/cAMP シグナルにおける Tctex-1 の役割

HA-PTHrP-HEK293 細胞において、PTHrP(1-34) 誘導性の cAMP 産生は、Tctex-1 のノックダウンによって抑制し、一方、Tctex-1 の過剰発現によって増加した。すなわち、PTHrP を介した cAMP 産生に対して Tctex-1 が増強に関与することが示された。

HEK293 細胞に内在性に発現する  $\beta$ 2 アドレナリン受容体をイソプロテレノールで刺激し、cAMP 産生を誘導した。Tctex-1 ノックダウンはその cAMP 産生を抑制したことから、Tctex-1 は GPCR 非特異的に cAMP 産生を増強することが示された。

フォルスコリン誘導性 cAMP 産生は、Tctex-1 のノックダウンによって抑制し、一方、Tctex-1 の過剰発現によって増加した。すなわち、Tctex-1 が AC 活性を増強することによって、GPCR の Gs/AC/cAMP シグナルを亢進することが示された。

##### (3) 骨芽細胞分化における 4.1G の役割

MC3T3-E1 細胞を AA/ $\beta$ GP 存在下に 20 日間培養したところ、骨分化マーカーである ALP 活性とアリザリンレッド染色がそれぞれ時間依存的に亢進した。

分化過程における 4.1G タンパク質の量的変化をウェスタンブロット法にて解析したところ、4.1G タンパク質は 4 日目までは不変だったが、それ以降は時間依存的に減少し、12 日目以降で有意となった。一方、4.1G の mRNA 量は期間中では変化しなかった。ことから、分化に伴い 4.1G のタンパク質分解が亢進したことが考えられた。

4.1G タンパク質が発現している 4 日目までにおいて、骨芽細胞分化における 4.1G の役割を検討するため、4.1G をノックダウンした MC3T3-E1 細胞を AA/ $\beta$ GP 処理をした。その結果、ALP 活性は 4.1G ノックダウンに

よって顕著に減少したことから、4.1G が分化誘導の促進に関わることが示された。

#### 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 6 件)

- (1) Masaki Saito<sup>#,\*</sup>, Kensuke Sakaji<sup>#</sup>, Wataru Otsu, Ching-Hwa Sung (<sup>#</sup>; equally contributed, <sup>\*</sup>; corresponding author), Ciliary assembly/disassembly assay in non-transformed cell lines, *Bio-protocol*, **8**, e2773 (2018) 査読有  
DOI: 10.21769/BioProtoc.2773
- (2) Yuanshu Zhou, Masaki Saito, Takafumi Miyamoto, Pavel Novak, Andrew I Shevchuk, Yuri E Korchev, Takeshi Fukuma, Yasufumi Takahashi, Nanoscale imaging of primary cilia with scanning ion conductance microscopy, *Analytical Chemistry*, **90**, 2891-2895 (2018) 査読有  
DOI: 10.1021/acs.analchem.7b05112
- (3) Masaki Saito<sup>\*</sup>, Wataru Otsu, Kuo-Shun Hsu, Jen-Zen Chuang, Teruyuki Yanagisawa, Vincent Shieh, Taku Kaitsuka, Fan-Yan Wei, Kazuhito Tomizawa, Ching-Hwa Sung<sup>\*</sup> (<sup>\*</sup>; corresponding authors), Tctex-1 controls ciliary resorption by regulating branched actin polymerization and endocytosis, *EMBO reports*, **18**, 1460-1472 (2017) 査読有  
DOI: 10.15252/embr.201744204
- (4) 齋藤 将樹, 高齢社会病の予防・治療薬の開発を指向した創薬基盤研究, *東北医学雑誌*, **129**, 49 (2017) 査読無
- (5) Nobuto Arashiki<sup>#</sup>, Masaki Saito<sup>#</sup>, Ichiro Koshino, Kotoe Kamata, John Hale, Narla Mohandas, Sumie Manno, Yuichi Takakuwa (<sup>#</sup>; equal contribution), An unrecognized function of cholesterol: regulating the mechanism controlling membrane phospholipid asymmetry, *Biochemistry*, **55**, 3504-3513 (2016) 査読有  
DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00407
- (6) 齋藤 将樹, 神経前駆細胞の分化制御機構に関する新展開, *東北医学雑誌*, **128**, 87 (2016) 査読無

[学会発表](計 13 件)

- (1) 齋藤 将樹, 大津 航, 柳澤 輝行, Ching-Hwa Sung, 細胞質ダイニン Tctex-1 は分枝アクチン形成とエンドサイトーシスを介して一次繊毛短縮を促

進する, 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 (2017 年)

- (2) 齋藤 将樹, 一次繊毛による正常細胞の増殖機構 ~一次繊毛の短縮が必須である~, 東北大学大学院生命科学研究科セミナー (招待講演) (2017 年)
- (3) 齋藤 将樹, 大津 航, 柳澤 輝行, Ching-Hwa Sung, 一次繊毛は分枝アクチン形成とエンドサイトーシスを介して短縮する, 第 68 回 日本薬理学会北部会 (2017 年)
- (4) 阪路 健祐, 齋藤 将樹, 佐藤 岳哉, 柳澤 輝行, 微小管結合性セリン-スレオニンキナーゼ MAST4 は一次繊毛短縮を介して細胞周期再駆動を促進する, 第 68 回 日本薬理学会北部会 (2017 年)
- (5) 齋藤 将樹, 平野 稔菜, 助川 淳, 佐藤 岳哉, 柳澤 輝行, 一次繊毛を介した骨芽細胞分化における細胞膜裏打ちタンパク質 4.1G の役割, 第 16 回 生命科学研究会 (2017 年)
- (6) Masaki Saito, Marina Hirano, Jun Sukegawa, Takeya Sato, Teruyuki Yanagisawa, Membrane scaffold protein 4.1G promotes osteoblast differentiation through formation of a primary cilium, 第 90 回日本薬理学会年会 (2017 年)
- (7) Masaki Saito, Takeya Sato, Teruyuki Yanagisawa, Actin dynamics and endosome formation are essential for transduction of primary cilium-derived signaling, The 2017 Japan-NIH joint Symposium (2017 年)
- (8) 齋藤 将樹, 平野 稔菜, 助川 淳, 佐藤 岳哉, 柳澤 輝行, 細胞膜裏打ちタンパク質 4.1G は骨芽細胞分化を促進する, 第 67 回日本薬理学会北部会 (2016 年)
- (9) 齋藤 将樹, Ching-Hwa Sung, 柳澤 輝行, 増殖刺激による一次繊毛の短縮は分枝アクチンとクラスリン依存性エンドサイトーシスを介する, 第 89 回日本薬理学会年会 (2016 年)
- (10) 平野 稔菜, 齋藤 将樹, 崔 林然, 助川 淳, 柳澤 輝行, 骨芽細胞のアデニル酸シクラーゼ活性における膜裏打ちタンパク質 4.1G の抑制作用, 第 89 回日本薬理学会年会 (2016 年)
- (11) 齋藤 将樹, Ching-Hwa Sung, 柳澤 輝行, 一次繊毛短縮を制御するアクチン再構成系・膜輸送系の役割, 第 6 回繊毛研究会 (2015 年)
- (12) 齋藤 将樹, 崔 林然, 平野 稔菜, 助川 淳, 柳澤 輝行, PTH を用いた骨粗鬆症治療に関わる分子基盤研究, 第 66 回日本薬理学会北部会 (2015 年)
- (13) 齋藤 将樹, Ching-Hwa Sung, 柳澤 輝行, 細胞質ダイニン軽鎖 Tctex-1 を介した一次繊毛短縮機構の解析, 第 14 回生命科学研究会 (2015 年)

〔その他〕

- (1) プレスリリース「細胞増殖を調節するアンテナ『一次繊毛』の仕組みを解明」  
(2017年7月11日)  
<http://www.med.tohoku.ac.jp/news/3487.html>
- (2) 新聞報道「細胞のアンテナ『一次繊毛』が細胞増殖を調節する分子機構を解明」(長陵新聞, 2017年10月31日発行)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

斎藤 将樹 (SAITO Masaki)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50400271