

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11639

研究課題名(和文) 骨芽細胞の一次繊毛を介したメカニカルストレス応答の分子機構解明

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanism of the mechanical stress response in osteoblasts through primary cilia

研究代表者

柿原 嘉人 (Kakihara, Yoshito)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：40379938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨形成に關与する骨芽細胞がどのように外界のストレスを感知し、応答しているのかについて検討を行った。分子シャペロンは様々なストレス応答に關与することが知られており、そのひとつであるPontin-Reptinシャペロンに焦点を当てて解析を行った。本研究によってPontin-Reptinシャペロンが骨芽細胞の細胞周期と一次繊毛形成を仲介していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

繊毛病(ciliopathy)は、繊毛形成因子の欠損によって生じ、腎嚢胞、胆管異常、内臓逆位、多指症、脳梁低形成、網膜色素変性症、頭蓋・骨格異常、糖尿病など多岐にわたる症状を呈する。本研究は、骨形成において重要な働きを担う骨芽細胞における一次繊毛機能の解析を行った。本研究成果は、一次繊毛の機能解明と繊毛病の発症メカニズムの解明やその治療法の開発に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated how osteoblasts, which are involved in bone formation, perceive and respond to external stress. Molecular chaperones are known to be involved in a variety of stress responses. We focused our research on Pontin-Reptin chaperone, which is one of the emerging molecular chaperone. Our results suggest that the Pontin-Reptin mediates between cell cycle and primary cilia formation in osteoblasts.

研究分野：分子生物学

キーワード：骨芽細胞 一次繊毛 シャペロン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Pontin-Reptin は、AAA+ (ATPases Associated with diverse cellular Activities)ファミリータンパク質に属し、細胞内の様々な生命現象に関わるヘテロ六量体のストレス応答性シャペロンである( )。シャペロンとは、言わば”介添え人”であり、自分自身でフォールディングできないタンパク質や、複合体形成できないタンパク質の手助けをする。申請者らは、これまで、真核生物モデルの出芽酵母やヒト培養細胞系を用いて Pontin-Reptin の新規ターゲットの同定とその作用機序を解明してきた( )。近年、報告した論文では、Pontin-Reptin を含む新規複合体 (R2TP) が栄養飢餓ストレスに応答し、細胞増殖を制御するモデルを提唱した( )。また、別グループからは、Pontin が繊毛病のひとつである原発性線毛機能不全症候群 (PCD) の原因遺伝子 LRRC6 と直接結合し、繊毛形成に必須な機能を持つことが報告された( )。

一次繊毛は、細胞周期が停止すると、微小管形成中心である中心体から伸張する。逆に、細胞周期が回り始めると、中心体から消失する。Pontin-Reptin は細胞周期を制御し、かつ、一次繊毛形成にも関与することが示唆されていることから、Pontin-Reptin が、両者を巧妙に制御している可能性が考えられた。また、骨芽細胞や骨細胞の一次繊毛は、機械的刺激 (メカニカルストレス) を感知するセンサーとしての役割を持つことが明らかになりつつある。近年、一次繊毛形成に関与する因子が次々と同定され、それらが繊毛形成以外のプロセスにも関わることから、その形成メカニズムは非常に巧妙に制御されていることが示唆されている( )。

### 2. 研究の目的

繊毛形成因子の欠損によって生じる繊毛病 (ciliopathy) は、腎嚢胞、胆管異常、内臓逆位、多指症、脳梁低形成、網膜色素変性症、頭蓋・骨格異常、糖尿病など多岐にわたる症状を呈する。そのため、様々な脊椎動物モデルが使われ、腎臓、網膜視細胞、神経細胞における一次繊毛の機能解析が精力的に行われている。本研究では、骨芽細胞の一次繊毛を介したメカニカルストレス応答において、Pontin-Reptin シャペロンがどのように細胞周期と一次繊毛形成を機能を制御しているのかについて解析し、その複雑な制御メカニズムを分子レベルで解明し、生理学的意義を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では、分子生物学、生化学、細胞生物学、プロテオミクス等のアプローチによって、骨芽細胞におけるメカニカルストレスによる Pontin-Reptin の動態変化を明らかにすると共に Pontin-Reptin がどのような因子と相互作用しているのかについて解明する。さらに、ケミカルライブラリーをスクリーニングし、一次繊毛形成を制御する化合物を同定する。

### 4. 研究成果

#### (1) Pontin-Reptin の相互作用因子の同定

マウス由来の前駆骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞における Pontin-Reptin 相互作用因子の同定を試みた。MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化誘導前後において抗 Pontin 抗体と抗 Reptin 抗体による免疫沈降を行った。共免疫沈降したタンパク質を質量分析解析したところ、既知の Pontin-Reptin 相互作用因子である PIH1D1 と RPAP3、さらにそのアダプター因子である TELO2 の結合が示唆された。ウェスタンブロットにより、それらのタンパク質の相互作用が確認され、マウス骨芽細胞においても Pontin-Reptin-PIH1D1-RPAP3-TELO2 のコンプレックス (R2TP-TELO2 コンプレックス) が形成されていることが明らかになった。さらに、細胞圧縮ストレスによる Pontin-Reptin とそれらのタンパク質の結合の変化を調べたが、R2TP 間において顕著な相互作用の変化は観察されなかった。

#### (2) Pontin-Reptin の細胞内動態変化とその機能

マウス由来の前駆骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞における Pontin-Reptin、さらに PIH1D1、RPAP3、TELO2 の細胞内局在を免疫蛍光染色法によって調べた。Pontin-Reptin は、細胞全体に局在し、特に核内において多く存在することが明らかとなった。PIH1D1、RPAP3 は主に細胞質に局在し、TELO2 は主に核内に局在することが観察された。細胞圧縮ストレスによるこれらのタンパク質局在変化を調べたところ、顕著な局在変化は観察されず、一次繊毛の構成因子であるアセチル化チューブリンとの共局在も見られなかった。また、MC3T3-E1 細胞において、Pontin または Reptin のノックダウンを行ったところ、細胞の増殖抑制が見られた。さらに、それらの細胞において、一次繊毛が顕著に伸張している細胞が観察されたことから、Pontin-Reptin が細胞周期と一次繊毛形成を仲介していることが示唆された。

#### (3) 一次繊毛形成を制御する化合物のスクリーニング

マウス由来の前駆骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を用いて、一次繊毛形成を制御する化合物のスクリーニングを行ったところ、一次繊毛を伸張させる化合物として ROCK 阻害剤が単離された。ROCK 阻害剤はアクチンストレスファイバーの形成を抑制することが知られているため、MC3T3-E1 細胞においてもその影響を調べたところ、同様に ROCK 阻害剤によってストレスファイバーの消失が観察された。また、ROCK 阻害剤存在下において骨芽細胞分化誘導を行い、

2 週間後にアリザリンレッド S 染色によって石灰化を調べたところ、顕著な亢進が見られた。このことから、ROCK タンパク質は骨芽細胞分化を負に制御していることが明らかとなった。

#### ( 4 ) Pontin-Reptin と ROCK タンパク質の相互作用

同様の系を用いて Pontin-Reptin と ROCK タンパク質の相互作用について共免疫沈降法を用いて調べた。抗 ROCK1 抗体、抗 ROCK2 抗体を用いて免疫沈降を行い、Pontin もしくは Reptin の相互作用について調べたところ、分化誘導前の前駆骨芽細胞において ROCK2 と Pontin の顕著な相互作用が観察された。今後、圧縮ストレス存在の有無による両者の結合変化について解析を進めていく。また、当初予定していた Pontin-Reptin のメカニカルストレス下における生体内での挙動について、過剰咬合ストレスモデルでは結果の再現性を得ることが困難であったことから、矯正学的な歯の移動モデルを構築したので、この系を用いて Pontin-Reptin-ROCK2 のメカニカルストレス応答に対する生体内での動態変化を検討する。

#### < 引用文献 >

Kakihara Y, Houry WA. The R2TP complex: discovery and functions. *Biochim Biophys Acta*. 1823 (1): 101-107. 2012.

Kakihara Y, Kiguchi T, Ohazama A, Saeki M. R2TP/PAQosome as a promising chemotherapeutic target in cancer. *Jpn Dent Sci Rev*. 56 (1): 38-42. 2020.

Kakihara Y, Makhnevych T, Zhao L, Tang W, Houry WA. Nutritional status modulates box C/D snoRNP biogenesis by regulated subcellular relocalization of the R2TP complex. *Genome Biol*. 15 (7): 404. 2014.

Zhao L, Yuan S, Cao Y, Kallakuri S, Li Y, Kishimoto N, DiBella L, Sun Z. Reptin/Ruvbl2 is a Lrrc6/Seahorse interactor essential for cilia motility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30;110 (31):12697-12702. 2013.

Nabais C, Pereira SG, Bettencourt-Dias M. Noncanonical Biogenesis of Centrioles and Basal Bodies. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 82:123-135. 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakata Juri, Akiba Yosuke, Nihara Jun, Thant Lay, Eguchi Kaori, Kato Hiroko, Izumi Kenji, Ohkura Mariko, Otake Masanori, Kakihara Yoshito, Saito Isao, Saeki Makio	4. 巻 -
2. 論文標題 ROCK inhibitors enhance bone healing by promoting osteoclastic and osteoblastic differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.03.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 柿原嘉人, 中田樹里, Lay Thant, 齋藤 功, 佐伯万騎男
2. 発表標題 効率的な歯の移動を目的とした骨代謝促進薬のスクリーニングとその解析
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中田樹里, 柿原嘉人, 丹原惇, 大倉麻里子, 佐伯万騎男, 齋藤功
2. 発表標題 ROCK阻害剤の実験的歯の移動への効果
3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中田樹里, 秋葉陽介, 江口香里, 丹原惇, 齋藤功, 柿原嘉人, 佐伯万騎男
2. 発表標題 ROCK阻害剤の骨代謝への影響とその作用機序の解析
3. 学会等名 第35回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakata J, Akiba Y, Eguchi K, Nihara J, Saito I, Kakihara Y, Saeki M
2. 発表標題 The effect of ROCK inhibitor on bone remodeling
3. 学会等名 2017 ASBMR Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 歯牙移動促進剤及び矯正歯科治療用キット	発明者 佐伯 万騎男、齋藤 功、柿原 嘉人、中 田 樹里、秋葉 陽介	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-012950	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	佐伯 万騎男  (Saeki Makio)  (30273692)	新潟大学・医歯学系・教授   (13101)	
研究 分 担 者	加来 賢  (Kaku Masaru)  (30547542)	新潟大学・医歯学系・准教授   (13101)	
研究 分 担 者	鍵和田 晴美  (Kagiwada Harumi)  (40443204)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員   (82626)	