

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18591675

研究課題名（和文） 破骨細胞応答性を調節する受容体安定性調節機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of receptor regulation and stabilization, and its effects on osteoclast response

研究代表者

和田 誠基 (WADA SEIKI)

城西国際大学・薬学部・教授

研究者番号：10301467

研究成果の概要：

破骨細胞前駆細胞の蛋白を抽出したところ CTR mRNA 3' 非翻訳領域 (CTR 3' UTR) 配列 RNA プローブと結合性を持つ蛋白が確認された。結合蛋白の分子量は 40-45kDa で AUF-1、HuR 関与の可能性を検討した。HA-tag 付加 AUF1 を NIH3T3 細胞に導入し、抽出蛋白と 3' UTR RNA を相互作用させたところ結合性が確認できた。抗 HA 抗体を利用した免疫沈降で蛋白 RNA 複合体を集め、結合 RNA を RT-PCR 法で解析したところ、CTR 3' UTR に設定したプライマーで特異的に増幅された。RNA 認識部位を変異させると 3' UTR 配列との結合性は見られず、蛋白 RNA 結合特性に依存していると思われ、この現象が受容体制御と関連している可能性が考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,900,000	0	1,900,000
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	480,000	3,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・骨軟骨代謝学

キーワード：破骨細胞、受容体制御、脱感作

## 1. 研究開始当初の背景

一過性のカルシトニン (CT) 処理後にカルシトニン受容体 (CTR) mRNA が持続的に低下することが、標的細胞におけるリガンド刺激からの不応性と関連する可能性が想定されていた。我々の研究結果からは、CT 処理が CTR 遺伝子転写機構を抑制せず、CTR mRNA の不安定化を招く可能性が考

えられた。最近の研究では mRNA 3'非翻訳領域 (UTR) に結合して mRNA 安定性に影響を及ぼす因子とメカニズムの一端が明らかとされつつあり、我々の実験系における AU rich element (ARE) 結合蛋白の関与などが考えられてきた。

## 2. 研究の目的

ある種のリガンドは細胞膜受容体に作用して標的臓器で効果を発揮するが、持続刺激はホルモン特異的効果に対する不応性をもたらす。我々はその機序として標的細胞での受容体のリン酸化と受容体数減少の関与を報告してきた。受容体蛋白の量的変化は遺伝子発現の調整機構が必要であるが、受容体数の減少は通常知られている負の転写調節機構よりも受容体 mRNA 不安定化が関与する実験的証左を得ていた (Endocrinology 145: 1730, 2004、Mol Endocrinol 18: 2255, 2004)。我々は従来からこの機序の検討を進め、不応性の獲得には、骨での標的細胞である破骨細胞での特異的機構の存在が重要であることを考えてきた。本研究では、受容体 mRNA 3' UTR に結合する蛋白群 (trans-activating factors) と認識配列 (cis element) を同定し、カルシトニンに対する破骨細胞での脱感作機構の詳細解明を目指した。

### 3. 研究の方法

マウス cDNA library から nested PCR でクローニングした CTR 遺伝子 3' UTR 配列を pGEM3Zf+ vector に挿入。T7 RNA ポリメラーゼを用い CTR 3' UTR 配列のプロンプ RNA を作製した。AU rich 配列に対する結合特異性を確認するため AUUA5 回繰り返し配列 (5'-GGA TCC TTA TTT ATT TAT TTA TTT ATT TAG AT-3') を pSG5 ベクターに挿入 (pSG5-AU5) した。AUF1 の 4 つのアイソフォームそれぞれと HuR をクローニングし HA-tag を付加した上で pSG5 ベクターに挿入した。また AUF1 および HuR の RNA 結合ドメイン (RBD) の Phe を Ala に置換させた変異 AUF1 を Site-Directed Mutagenesis System により作製した。破骨細胞は ddy マウスの骨芽細胞と骨髓細

胞の共存培養系で作成し、その他破骨細胞前駆細胞である RAW264.7、骨芽細胞 MC3T3E1、線維芽細胞 NIH3T3 を回収し、超音波破碎後に遠心して既報に準じて抽出液を蛋白調整した。

CTR mRNA 3' UTR の RI プロンプと上記各種細胞蛋白抽出物を混和し、10% SDS-PAGE で電気泳動し、ゲルを乾燥させた後 FMBIO II Fluoroimager で画像解析した。

pSP64poly(A) ベクターに CTR 遺伝子 3' UTR 配列を断片化して挿入し、SP6 RNA polymerase で poly(A) を付加した CTR mRNA 3' UTR の RNA を合成する。in vitro 転写産物を Oligotex-dT30 によって精製し、HA-tag を挿入した AUF1 アイソフォーム、変異 AUF1 と HuR 蛋白それぞれを発現させた NIH3T3 細胞、RAW264.7 細胞、破骨細胞の抽出液と CTR 3' UTR RNA を反応液中で混和。HA-tag に対する抗体を用いた免疫沈降法で蛋白 RNA の複合体を分離し RNA を抽出した後に CTR mRNA 3' UTR に対する特異的プライマー (nucleotides 2058-2083 and 3678-3707; GenBank accession No. U18542) を用いて RT-PCR で解析した。

破骨細胞を共存培養系 (JBMR 9: 1705, 1994) あるいは RAW264.7 細胞を soluble receptor activator of nuclear factor kB ligand (sRANKL) と macrophage colony stimulating factor (M-CSF: 森永乳業より供与) で刺激し樹立した。CT あるいは PKA 活性化促進剤、PKC 活性化促進剤で処理し一定時間の後に蛋白抽出を行った。蛋白を 10% SDS-PAGE で泳動した後、Hybond-C membrane に 15V、overnight で転写。Hybond-C membrane を 5% non fat milk を含む PBS で洗浄し、rabbit polyclonal anti-AUF1 antibody や mouse monoclonal anti-HuR antibody で解析し、発現強度を

調べた。

破骨細胞を共存培養系あるいは RAW264.7 細胞を sRANKL と M-CSF で刺激することで樹立し、カルシトニン、PKA 活性化促進剤、PKC 活性化促進剤で処理し RNA を抽出。random hexanucleotides をプライマーとして逆転写し cDNA を得た。AUF1 と HuR の特異的配列を利用して PCR を行い、PCR 産物を 1.0%アガロースゲルを用いて泳動し CT あるいは PKA 活性化促進剤、PKC 活性化促進剤などの影響を解析した。

#### 4. 研究成果

マウス破骨細胞をサケ CT、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)、Forskolin で 12 時間刺激した後に、核・細胞質蛋白を抽出した。これら抽出物と CTR 3' UTR 転写産物を反応させたところ、CT 処理の有無に関係なく転写産物は分解された。CTR の RNA 分解活性は 95°C、15 分間の加熱処理により消失した。破骨細胞で認められた分解活性は初代マウス骨芽細胞、MC3T3E1、腎および脳組織では認められなかった。CTR 3' UTR の代わりに GAPDH を用いた場合でも同様に破骨細胞抽出物で分解され、破骨細胞に存在する何らかの因子により、非特異的に RNA が分解されている可能性が推測された。

破骨細胞の前駆細胞モデルである RAW264.7 や NIH3T3、MC3T3E1 細胞では 3' UTR 転写産物と結合する因子が確認できた。分子量 40Kd 前後であり mRNA 安定性調節蛋白として報告されている ARE binding/degrading factor (AUF-1) の関与を考えた。AUF-1 の p45, p42, p40, p37 を導入した NIH3T3 細胞の蛋白抽出物と CTR 3' UTR および AUUUA5 回繰り返し配列を持つ RNA probe (AU5) との結合性を調べた。遺伝子導入していない細胞では認められな

い結合性を示す蛋白が分子量 45、40Kd の位置に認められたが p42, p37 に相当する分子量では結合蛋白は認められなかった。

3' UTR 転写産物と AUF-1 p40 の結合性を検討するため HA tag 付加 AUF-1 p40 を NIH3T3 に導入し蛋白抽出した。3' UTR 転写産物を精製し蛋白抽出液と結合させ、蛋白・RNA 複合体を抗 HA 抗体で免疫沈降した。この分画から RNA を抽出し、3' UTR 転写産物に対する特異的プライマーを用いて RT-PCR を行った。また、この結合性がそれら分子間の特異的結合であるか否かを明らかにするため、RNA との結合能を欠損させた変異 AUF 1 を用いて解析した。変異 AUF 1 は AUF-1 p40 の RNA 結合ドメイン RNP1 の Phe を Ala に置換した。免疫沈降後に逆転写をした場合には 3' UTR 特異的プライマーで増幅されるバンドを認め、3' UTR 転写産物は AUF1 p40 と結合し得ると判断した。p40 蛋白と 3' UTR 転写産物で認められた結合性は変異 AUF 1 では認められなかった。

破骨細胞を用いた細胞生物学的検討では CT 処理は AUF1 の発現には大きな影響を及ぼさなかったが、同様に 3' UTR に結合することが報告されている HuR の発現を低下させた。

細胞内において CTR 3' UTR に AUF1 が結合することで mRNA の安定性がどのように変化するかを検討するため、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入したベクターを構築した。Luc mRNA 3' UTR に相当する領域に CTR 3' UTR 断片を挿入した。MCF7 細胞にこのベクター及び、CTR 3' UTR 断片を挿入していないベクターを導入し 24 時間培養した。その後ドキシサイクリンを添加し転写を停止させ、Luc mRNA 残存量を Luc 活性で検討した。その結果、CTR 3' UTR 断片を

挿入すると mRNA の半減期が短縮することが明らかとなった。

#### 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 5 件)

Ono K, Kamiya S, Akatsu T, Nakamura C, Li M, Amizuka N, Matsumoto K, Nakamura T, Kugai N, Wada S. Involvement of hepatocyte growth factor in the development of bone metastasis of a mouse mammary cancer cell line, BALB/c-MC. Bone 39:27-34, 2006. (査読あり)

安田重光, 和田誠基 カルシウム代謝の基礎 カルシトニン 内分泌・糖尿病科 23:25-30, 2006 (査読なし)

和田誠基【分子腎臓病学 分子生物学的アプローチと分子病態生理学】基礎編 腎機能調節におけるホルモンおよびペプチドの分子生物学 生合成, 代謝, 作用 カルシトニン 日本臨床 64:238-241, 2006 (査読なし)

Miura S, Kamiya S, Saito Y, Wada S, Hayashi R, Taira J, Kodama H, Yajima H, Ueki M, Fukai F. Antiadhesive sites present in the fibronectin type III-like repeats of human plasma fibronectin. Biol Pharm Bull 30:891-897, 2007. (査読あり)

Kamiya S, Nakamura C, Fukawa T, Ono K, Ohwaki T, Yoshimoto T, Wada S. Effects of IL-23 and IL-27 on osteoblasts and osteoclasts: inhibitory effects on osteoclast differentiation. J Bone Miner Metab. 25:277-285, 2007. (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

Kamiya S, Fukawa T, Nakamura C, Ono K, Yoshimoto T, Wada S. Effects of IL-12-related cytokines, IL-23 and IL-27, and activated T cells on osteoclast differentiation: possible roles on remission of rheumatoid arthritis. The

American Society for Bone and Mineral Research 28th Annual Meeting, J Bone Miner Res (Philadelphia 2006. 9)

Kamiya S, Fukawa T, Nakamura C, Yoshimoto T, Wada S. Effects of IL-12-related cytokines, IL-23 and IL-27, and activated T cells on osteoclast differentiation: possible roles on remission of rheumatoid arthritis. The American Society for Bone and Mineral Research 29th Annual Meeting (Honolulu 2007. 9)

Kamiya S, Fukawa T, Nakamura C, Yoshimoto T, Wada S. The effects of IL-27 on regulation of osteoclastogenesis by way of T cells. 30th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (Montreal 2008. 9)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 誠基 (WADA SEIKI)  
城西国際大学・薬学部・教授  
研究者番号: 10301467

(2) 研究分担者

神谷 貞浩 (SADAIHIRO KAMIYA)  
城西国際大学・薬学部・助手  
研究者番号: 10398555  
扶川 武志 (FUKAWA TAKESHI)  
城西国際大学・薬学部・助手  
研究者番号: 00439019

(3) 連携研究者