

平成21年 3月31日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19791346

研究課題名 (和文) PKR による骨石灰化調節機構の解明

研究課題名 (英文) The role of PKR in the regulation of bone calcification

研究代表者

吉田 賀弥 (YOSHIDA KAYA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師

研究者番号：60363157

## 研究成果の概要：

PKR による石灰化制御機構を転写因子 STAT1 に着目し分子レベルで追求した。骨芽細胞において STAT1 蛋白質が SLIM 依存的にユビキチン化され代謝されていることが判明した。また、このような正常な STAT1 蛋白質の代謝に PKR が必要であることが明らかとなった。しかし、PKR がどのような機序で SLIM の機能を調節して、STAT1 の発現を制御するのかは、今回明らかに出来なかった。今後は、PKR が SLIM の機能を制御する機構を追及するとともに、そのような SLIM 制御が骨芽細胞の分化・石灰化にどの程度の影響を及ぼすかを判定していく必要がある。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	390,000	3,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔解剖学 (含組織学・発生学)、石灰化

## 1. 研究開始当初の背景

(1) PKR は2本鎖 RNA やインターフェロンによって活性化され、ウイルス感染時の生体防御に関与する蛋白質リン酸化酵素として同定された。その後 PKR はサイトカイン、成長因子及び LPS によっても活性化され、細胞の増殖や分化、アポトーシス、抗腫瘍作用など広範囲な生命現象に関与することが明らかになった。しかし、骨代謝における PKR の役割及びその機序はほとんどわかっていな

い。

(2) これまでに私は PKR 変異型の骨芽細胞株を樹立し、PKR が骨代謝に与える影響について研究してきた。その結果、PKR 変異細胞では骨芽細胞の分化能が低く、石灰化しないことがわかった。このような PKR 変異細胞では、骨の石灰化に必須である転写因子 Runx2 の活性が低下する一方で、骨形成を負に制御する転写因子 STAT1 の発現が著しく亢進していた。また、PKR 変異細胞において RNAi によ

り STAT1 の発現を抑制すると、Runx2 の活性が回復した。

(3) 以上の結果は、骨の石灰化に PKR が必須であること、PKR が STAT1 と連携して石灰化を調節する可能性を示唆しているが、その詳細な分子機構は依然として不明である。

## 2. 研究の目的

PKR による石灰化制御機序を STAT1 に着目して細胞及び分子レベルで解明する。

## 3. 研究の方法

(1) PKR による STAT1 の発現亢進が蛋白質レベルであるか？

① PKR 変異細胞と野生型細胞を 5 日間培養後、ウエスタンブロット法により STAT1 蛋白質の発現量を比較解析する。同時に、量細胞より RNA を抽出し、RT-PCR 及びリアルタイム PCR により、STAT1 mRNA 発現量を比較する。

② 両細胞に翻訳阻害剤シクロヘキシミドを作用させ蛋白質新合成を阻害した後、細胞を回収しウエスタンブロットを行い、STAT1 蛋白質の量を比較する。

(2) PKR が STAT1 蛋白質の安定性に関与するか？

PKR 変異細胞と野生型細胞におけるユビキチン化の違いを、ユビキチンアッセイにより判定する。

(3) PKR による STAT1 の発現亢進に、STAT1 のユビキチンリガーゼである SLIM (STAT-interacting LIM protein) が関与しているか？

① PKR 変異細胞と野生型細胞を 5 日間培養し RNA を抽出した後、RT-PCR 及びリアルタイム PCR により、SLIM mRNA 発現量を比較する。

② カバーガラスを入れたシャーレ上で、Flag タグした SLIM を導入した野生型と PKR 変異型の骨芽細胞を 5 日間培養する。培養 5 日後の細胞をホルマリンで固定し、メタノールによる透徹後、抗 Flag 抗体を用いて免疫染色を行う。両細胞における SLIM の局在を蛍光顕微鏡下で観察する。

③ 野生型細胞において、RNAi により SLIM をノックダウンする。その時の STAT1 蛋白質発現量やユビキチン化状態を、免疫沈降法やウエスタンブロット法を用いて判定する。

## 4. 研究成果

(1) PKR による STAT1 の発現亢進が蛋白質レベルであるか？

① PKR 変異細胞と野生型細胞における STAT1 の発現量について

両細胞における JAK/STAT シグナル経路の主要なメンバーの蛋白質発現量を、ウエスタンブロット法により解析した。PKR 変異細胞において STAT1 蛋白質の発現が著しく亢進していたが、他のメンバーの発現量に差はなかった (図 1)。

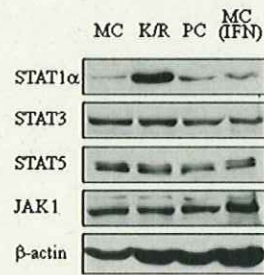


図1

両細胞における STAT1 mRNA の発現量をリアルタイム PCR により解析した。PKR 変異細胞における STAT1 mRNA の発現量は、野生型細胞に比較して約 2.5 倍亢進していた (図 2)。

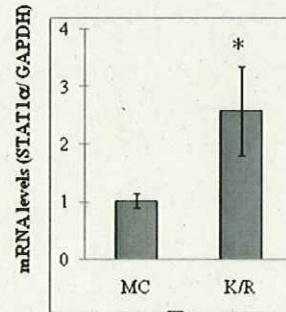


図2

以上の結果より、PKR は JAK/STAT シグナル経路において STAT1 蛋白質を特異的に発現亢進させることが明らかになった。また PKR 変異細胞において、STAT1 mRNA の発現量はわずかに 2.5 倍にとどまったのに対し、蛋白質の発現量が著明に亢進していることから、PKR が蛋白質分解や安定性維持を介して、STAT1 の発現を調節しているのではないかと予想された。

② PKR が STAT1 蛋白質の安定性へ及ぼす影響について

翻訳阻害剤シクロヘキシミド (CHX) を作用させ蛋白質新合成を阻害した両細胞において、STAT1 蛋白質の発現量を比較した。野生

型細胞では CHX の作用時間に比例して STAT1 蛋白質の発現量が減少したが、PKR 変異細胞ではこのような現象は認められなかった (図 3)。

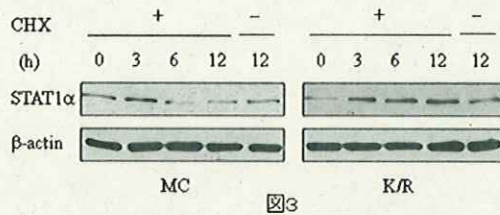


図3

同様の結果は、野生型細胞に PKR の薬理的な阻害剤 2-AP を作用させた場合にも認められた (図 4)。

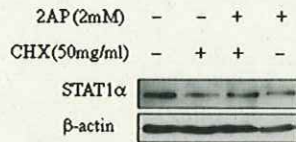


図4

以上の結果は、PKR が STAT1 蛋白質の安定性を維持するのに必須な因子であることを示している。

## (2) PKR が STAT1 蛋白質の安定性に関与するか?

現在までに STAT1 蛋白質は、ユビキチン化を受けた後、プロテアソームを介して分解されることが分かっている。そこで両細胞における STAT1 蛋白質のユビキチン化状態を比較検討した。両細胞のライセートから STAT1 蛋白質を免疫沈降させた後、抗ユビキチン抗体を用いてユビキチン化された STAT1 蛋白質を検出した。プロテオソーム阻害剤である MG-132 を作用させた野生型細胞では STAT1 蛋白質はユビキチン化されているのに対して、PKR 変異細胞ではこのようなユビキチン化は認められなかった (図 5)。

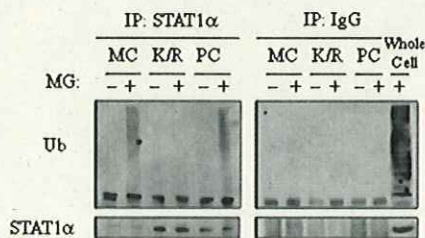


図5

また His タグをしたユビキチンを両細胞に発現させ、MG-132 作用下で抗 His 抗体を用いて免疫沈降し、抗 STAT1 抗体を用いてウエスタンブロットを行い、ユビキチンと STAT1 蛋白質が結合しているかを検討した。野生型細胞では STAT1 蛋白質とユビキチンが結合していたのに対し、PKR 変異細胞では両者の結合は認められなかった (図 6)。

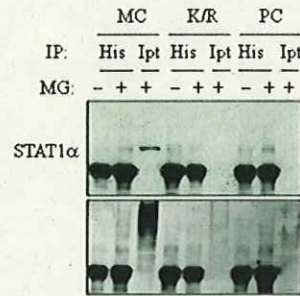


図6

以上の結果より、STAT1 蛋白質のユビキチン化に PKR が必須であることが明らかになった。また、PKR 変異細胞ではユビキチン化が起こらず STAT1 蛋白質の分解が抑制されている結果、STAT1 蛋白質の発現が亢進していると考えられた。

## (3) PKR による STAT1 の発現亢進に、STAT1 のユビキチンリガーゼである SLIM が関与しているか?

### ① PKR 変異細胞と野生型細胞における SLIM mRNA の発現量について

両細胞における SLIM mRNA の発現量を、RT-PCR 及びリアルタイム PCR により解析した。どちらの方法によっても、両細胞における SLIM mRNA の発現量に有意な差は見られなかった (図 7)。

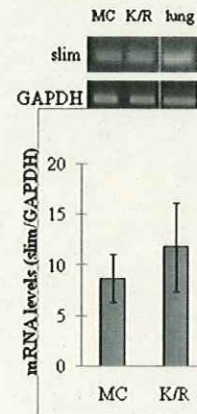


図7

② PKR 変異細胞と野生型細胞における SLIM の局在について

SLIM の局在を検出するために、両細胞に Flag-SLIM を導入した後、抗 Flag 抗体を用いて免疫染色を行い蛍光顕微鏡下で観察した。SLIM は細胞骨格である F-actin 上に局在していた。両細胞における SLIM の局在に差はなかった (図 8)。

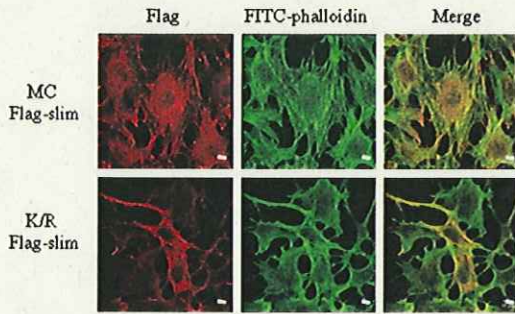


図8

③ SLIM が STAT1 蛋白質のユビキチン化に及ぼす影響について

野生型細胞において、RNAi により SLIM をノックダウンした。設計したオリゴが SLIM mRNA の発現量を有意に抑制していることを、リアルタイム PCR により確認した (図 9)。

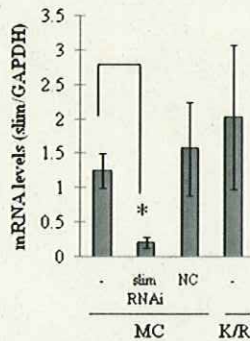


図9

このような SLIM 発現抑制下で、ユビキチン化アッセイを行った。野生型細胞で認められる STAT1 蛋白質のユビキチン化は、SLIM を RNAi することで抑制された (図 10)。

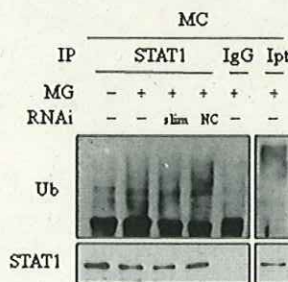


図10

また、SLIM RNAi により STAT1 蛋白質のユビキチン化が抑制された場合、実際に STAT1 蛋白質の発現が増加することを、ウエスタンブロット法で確認した (図 11)。

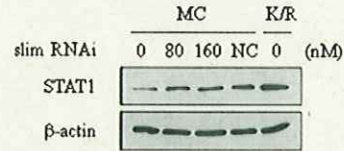


図11

以上の結果より、骨芽細胞において STAT1 蛋白質は SLIM 依存的にユビキチン化されることが明らかになった。

本研究課題を遂行し、骨芽細胞において STAT1 蛋白質が SLIM 依存的にユビキチン化され代謝されていることが判明した。また、このような正常な STAT1 蛋白質の代謝に PKR が必要であることが明らかとなった。これらの知見は、PKR が蛋白質の代謝を介して転写因子の機能を調節する可能性を示唆する点で斬新であり、学術雑誌で報告された (Exp Cell Res, in press)。しかし、PKR がどのような機序で SLIM の機能を調節して、STAT1 の発現を制御するのかは、今回明らかに出来なかった。図 7、図 8 の結果から、PKR は SLIM の発現や局在自体に関与するのではなく、転写翻訳レベルよりも下流で、その機能を調節する可能性があると考えられる。今後は、PKR が SLIM の機能を制御する機構を追及するとともに、そのような SLIM 制御が骨芽細胞の分化・石灰化にどの程度の影響を及ぼすかを判定していく必要がある。

\*今回報告書に記載した図は、  
Yoshida K, Okamura H, Amorim BR, Hinode D, Yoshida H, Haneji T. PKR-mediated degradation of Stat1 regulates osteoblast differentiation. Exp Cell Res (in press). から転載した。

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 3 件)

- ① Yoshida K, Okamura H, Amorim BR, Hinode D, Yoshida H, Haneji T. PKR-mediated degradation of Stat1 regulates osteoblast differentiation. Exp Cell Res (in press). 査読有

② 吉田賀弥

骨芽細胞の分化における PKR の役割について、  
四国歯学会雑誌、20 (2)、223-227、2008. 査  
読有

③ Yoshida K

The role of double-stranded RNA-dependent  
protein kinase in osteoblasts. J Oral  
Biosci 49:155-162, 2007. 査読有

[学会発表] (計3件)

① 吉田賀弥、岡村裕彦、羽地達次  
PKRによるSTAT1の発現調節機構の解明、  
第50回歯科基礎医学会学術大会ならび  
に総会、2008年9月25日、TOC有明コンベン  
ション ホール (東京都)

② 吉田賀弥

PKRと骨代謝、電気学会 光・量子デバ  
イス研究会、2008年5月7日、京都大学  
宇治キャンパス (京都府)

③ 吉田賀弥、岡村裕彦、羽地達次

PKRがSTAT1の発現や機能に及ぼす影響につ  
いて、第49回歯科基礎医学会総会、2007年8  
月31日、北海道大学 (札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 賀弥 (YOSHIDA KAYA)

徳島大学、大学院・ヘルスバイオサイエン  
ス研究部・講師

研究者番号：60363157