

平成22年 4月14日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19791361
 研究課題名（和文） 破骨細胞系譜におけるABCトランスポーターの時空間的定量解析
 研究課題名（英文） Identification of expression and localization of osteoclast-specific ABC transporters
 研究代表者
 中川 大（NAKAGAWA HIROSHI）
 東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教
 研究者番号：40397039

研究成果の概要（和文）：

骨粗鬆症等の骨疾患に関与する破骨細胞において、48種類中9種類のABCタンパク質の発現が上昇し、4種類のABCタンパク質の発現が低下することを明らかにした。一方、破骨細胞に発現が認められたABCタンパク質の一つABCG2の発現量と細胞内分布が個人差を規定する因子やタンパク質に付加される糖鎖等によって制御されることも明らかにした。この研究成果は、国際学会において高く評価された（Special ABC2010 Poster Recognition Award受賞）。

研究成果の概要（英文）：

The expression of nine and four of 49 ABC transporters were found to be up- and down-regulated during osteoclastogenesis, respectively. It was also found that the expression levels and distribution of ABCG2 were regulated by single nucleotide polymorphisms and posttranslational modifications, which was awarded the Special ABC2010 Poster Recognition Award.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	510,000	3,610,000

研究分野：細胞生物学・生化学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：口腔生化学、破骨細胞、ABCトランスポーター

1. 研究開始当初の背景

近年、マクロファージと樹状細胞におけるABCトランスポーターの発現と機能に関する知見が蓄積されつつある。また、ABCA1, ABCB1, ABCB2の発現がTNF α , LPS, IFN- γ によって制御されていることもマクロファージを用

いた研究において明らかにされている。本研究の対象である破骨細胞は、マクロファージと樹状細胞とは近縁の細胞であり、共に造血幹細胞を起源とする。そして、破骨細胞系譜の分化及び融合・骨吸収機能は、TNF α , LPS, IFN- γ による制御を受ける。破骨細胞の発生

に必須であるサイトカイン RANKL は、TNF α や LPS と共通のシグナル伝達経路を活性化するので、破骨細胞系譜の分化に伴い ABC トランスポーターが発現し、破骨細胞系譜の機能に関与していることが十分に考えられる。しかしながら、破骨細胞系譜における ABC トランスポーターの発現と機能に関しては何一つ明らかになっていない。

2. 研究の目的

ABC トランスポーターの視点から破骨細胞系譜の生命現象を解明する。具体的には、以下の二つの課題を本研究において定めた。

- (1)破骨細胞系譜に発現する ABC トランスポーターの同定
- (2)破骨細胞系譜に発現する ABC トランスポーターの発現を制御する因子の同定

3. 研究の方法

(1)破骨細胞系譜に発現する ABC トランスポーターの同定

- ①破骨細胞系譜の調製と total RNA の抽出、cDNA 合成

Mochizuki らの方法 (Mochizuki et al. J. Immunol., 177, 4360-4368, 2006) に従って、マウス骨髄細胞からマクロファージ、樹状細胞、破骨細胞共通の前駆細胞 (BMM) を調製する。BMM の調整後及び BMM を M-CSF, RANKL, TGF- β 存在下で培養してから 24 時間毎に High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Ltd.) を用いて total RNA を抽出し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて逆転写反応を行い、total RNA を cDNA に変換する。

- ②PCR プライマーの設計

遺伝子データベース GenBank より ABC トランスポーターの mRNA 配列を入手し、Primer Express® (Applied Biosystems), Primer3 及び Amplify3, BLAST を使用してプライマーの設計を行う。

- ③RT-PCR 及び定量 PCR、Western blotting による解析遺伝子の絞り込み

破骨細胞系譜に発現している ABC トランスポーターを RT-PCR によって同定し、破骨細胞系譜間における発現量の差を定量 PCR によって評価する。

(2)破骨細胞系譜に発現する ABC トランスポーターの発現を制御する因子の同定

- ①ABC トランスポーター安定発現株の樹立

破骨細胞系譜に発現が認められた ABC トランスポーター遺伝子の cDNA を購入し、当該 ABC トランスポーターを安定発現する Flp-In-293 細胞 (Invitrogen Corp.) を樹立させる。

- ②ABC トランスポーターの SNP バリエーション

作成及び安定発現株の樹立

NCBI の SNP データベースから当該 ABC トランスポーター遺伝子における一塩基多型に関する情報を入手し、site-directed mutagenesis 法を駆使して一塩基多型を有する当該 ABC トランスポーター遺伝子の cDNA を作成する。そして、この遺伝子を安定発現する Flp-In-293 細胞 (Invitrogen Corp.) を樹立させる。

- ③ABC トランスポーターの翻訳後修飾変異体の作成及び安定発現株の樹立

NCBI の PubMed から当該 ABC トランスポーターにおける翻訳後修飾に関する情報を入手し、site-directed mutagenesis 法を駆使して翻訳後修飾を欠失する当該 ABC トランスポーター遺伝子の cDNA を作成する。そして、この遺伝子を安定発現する Flp-In-293 細胞 (Invitrogen Corp.) を樹立させる。

- ④Flp-In-293 細胞における ABC トランスポーターの発現解析

ABC トランスポーターを安定発現する Flp-In-293 細胞から total RNA 及び cell lysate を調製し、定量 PCR 及び Western blotting を駆使して各 Flp-In-293 細胞が発現する ABC トランスポーターの量を mRNA とタンパク質の点から定量的に解析し、細胞間で比較する。

4. 研究成果

ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターの視点から破骨細胞系譜の生命現象を解明するために、破骨細胞における ABC トランスポーターの発現解析を行った。そして、破骨細胞の発生に不可欠であるサイトカイン RANKL のシグナル依存的に 48 種類中 9 種類の ABC トランスポーターの発現が上昇し、4 種類の ABC トランスポーターの発現が低下することを定量 PCR 解析において明らかにした。これら 13 種類中 6 種類の ABC トランスポーターの mRNA 量は、破骨細胞の発生に伴って変化した。さらに、13 種類中 2 種類の ABC トランスポーターに関しては、当該 ABC トランスポーターのタンパク質量が破骨細胞の発生に伴って変化することを明らかにした。これらの結果は、破骨細胞系譜の生命現象に影響を及ぼす ABC トランスポーターが存在することを示唆する重要な知見である。

一方、本研究では、破骨細胞に発現が認められた ABCG2 を題材として、その時空間分布が一塩基多型と翻訳後修飾によって制御されることも明らかにしてきた (Nakagawa et al., Biochemical J., 2008; Nakagawa et al., FEBS J., 2009)。これらの研究成果は、国際学会 (The FEBS-ABC2010 - 3rd FEBS Special Meeting on ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to

Genetic Diseases) において高い評価を受けた (Special ABC2010 Poster Recognition Award 受賞)。この評価は、申請者が推進する研究プロジェクトが当該分野において世界的な注目を集めていることを意味すると言える。

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)

- ① Nakagawa, H., Wakabayashi-Nakao, K., Tamura, A., Koshiba, S., Toyoda, Y., and Ishikawa, T., Disruption of N-linked glycosylation enhances ubiquitin-mediated proteasomal degradation of human ATP-binding cassette transporter ABCG2.、FEBS J.、276、7237-7252、2009、査読有り
- ② Wakabayashi-Nakao, K., Tamura, A., Furukawa, T., Nakagawa, H., and Ishikawa, T., Quality control of human ABCG2 protein in the endoplasmic reticulum: Ubiquitination and proteasomal degradation.、Advanced Drug Delivery Reviews、61、66-72、2009、査読有り
- ③ Furukawa T, Wakabayashi K, Tamura A, Nakagawa, H., Morishima Y, Osawa Y, and Ishikawa T.、Major SNP (Q141K) Variant of Human ABC Transporter ABCG2 Undergoes Lysosomal and Proteasomal Degradations.、Pharm. Res.、26、469-479、2009、査読有り
- ④ Nakagawa, H., Tamura, A., Wakabayashi, K., Hoshijima, K., Komada, M., Yoshida, T., Kometani, S., Matsubara, T., Mikuriya, K., and Ishikawa, T.、Evidence for ubiquitin-mediated proteasomal degradation of non-synonymous SNP Variants.、Biochemical J.、411、623-631、2008、査読有り

[学会発表] (計8件)

- ① Nakagawa, H., Wakabayashi-Nakao, K., Tamura, A., Koshiba, S., Toyoda, Y., Furukawa, T., and Ishikawa, T., The impacts of posttranslational modifications and non-synonymous SNPs on the protein stability of human ABC transporter ABCG2 protein in culture cells, The FEBS-ABC2010 - 3rd FEBS Special Meeting on ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases, 2010年、2月27日-3月5日、インスブルック (オーストリア)
- ② Nakagawa, H., Wakabayashi-Nakao, K.,

Tamura, A., Koshiba, S., Toyoda, Y., and Ishikawa, T., Monomeric non-glycosylated form of human ATP-binding cassette transporter ABCG2 is the most fragile in culture cells, 日本分子生物学会、2009年12月12日、横浜

③ Nakagawa, H., Wakabayashi, K., Tamura, A., Koshiba, S., Toyoda, Y., and Ishikawa, T., N-linked glycosylation stabilizes the de novo synthesized human ABC transporter ABCG2 protein, 日本癌学会、2009年10月3日、横浜

④ Nakagawa, H., Wakabayashi-Nakao, K., Tamura, A., Koshiba, S., Toyoda, Y., and Ishikawa, T., The impact of N-linked glycosylation on the protein stability of human ABC transporter ABCG2 protein, 2nd DKFZ-NCC Workshop on Cancer Research Tokyo, 2009年7月8日、東京

⑤ 古川朋佳, 若林香菜子, 田村藍, 中川大, 石川智久, Impact of Major Non-synonymous SNP (Q141K) on Proteolysis of Human ABC Transporter ABCG2 via Lysosomal and Ubiquitin-mediated Proteasomal Degradation Pathways, 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会 (BMB2008)、2008年12月9日、神戸

⑥ 中川大, 若林香菜子, 田村藍, 小柴梢子, 豊田優, 石川智久, Disruption of N-linked glycosylation enhances ubiquitin-mediated proteasomal degradation of human ATP-binding cassette transporter ABCG2, 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会 (BMB2008)、2008年12月9日、神戸

⑦ Wakabayashi, K., Tamura, A., An, R., Hoshijima, K., Nakagawa, H., and Ishikawa, T., Genetic polymorphisms of human ABCG2 and ER-associated degradation (ERAD) pathway, 2nd FEBS Special Meeting Co-sponsored by FEMS ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases, 2008年3月3-6日、インスブルック (オーストリア)

⑧ Nakagawa, H., Tamura, A., Wakabayashi, K., and Ishikawa, T., Evidence for ubiquitination and degradation of non-synonymous SNP proteins of human ATP-binding cassette transporter ABCG2, 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会 (BMB2007)、2007年12月14日、横浜

⑨ 中川大, 若林香菜子, 田村藍, 星島一幸, 石川智久, ヒト ABC トランスポーター ABCG2 のタンパク質品質管理と細胞内分解機構: 一塩基多型と翻訳後修飾の影響、トランスポーター研究会関東支部会、2007年12月10日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 大 (NAKAGAWA HIROSHI)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
助教
研究者番号：40397039

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし