

機関番号：12602

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20689007

研究課題名（和文） 骨破壊性疾患における非ヒストンタンパク質のメチル化修飾の意義

研究課題名（英文） The methylation of non-histone proteins in bone diseases

研究代表者

古賀 貴子 (KOGA TAKAKO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・客員助教

研究者番号：90451905

研究成果の概要（和文）：

本研究ではタンパク質アルギニンメチル化酵素 PRMT5 の遺伝子欠損マウスを作成し、解析を実施した。その結果、全身で当該遺伝子を欠損するマウスは胎生期、極初期の発生段階が障害され、PRMT5 が個体発生に必須の役割を果たすことを明らかにした。また PRMT5 のヘテロノックアウトマウスにはその成長段階にともなって、顕著な腫瘍形成が見られ、生体内の PRMT5 の量的制御が重要である可能性が示唆された。さらに、破骨細胞特異的に PRMT5 を欠損するマウスは、骨組織には異常が見られず、同 Type II PRMT ファミリーに属する PRMT7 が相補的な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We generated and analyzed PRMT5 conventional knockout (KO) mice and osteoclast-specific conditional KO (cKO) mice. PRMT5 homo KO mice died in uterus at the very early stage of embryo development. PRMT5 hetero KO mice spontaneously developed tumor in various organs. These suggested that PRMT5 had role a non-redundant role in development and tumorigenesis. On the other hand, osteoclast-specific PRMT5 cKO mice exhibited normal skeletal development and bone volume, suggesting that other member of Type II PRMT family, PRMT7 may compensated the lack of PRMT5 in osteoclastogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2009年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	19,600,000	5,880,000	25,480,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：生体分子医学

## 1. 研究開始当初の背景

歯や骨などの硬組織は咀嚼や運動機能に必須の組織であり、人間らしい生活を営むために重要な要素である。高齢化が進む現代においては歯周病による咀嚼機能低下や関節

リウマチ (RA)、骨粗鬆症、骨腫瘍などの運動器疾患を制御する治療法への要求は益々高まりつつある。しかし、歯周病や RA の治療法として疼痛や炎症を抑える薬剤の開発は進んできたが、現在までに骨破壊を確実に

予防できる治療法は確立していないことが問題として挙げられる。骨破壊性疾患の原因となる破骨細胞の分化は、破骨細胞分化因子 receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) と生存因子 macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) の二つのサイトカインを必要とする。申請者は RANKL による破骨細胞分化シグナルを分子レベルで詳細に解明してきた。まず、破骨細胞分化のマスターレギュレーターとして nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1) を同定し、分化シグナルの解明にブレークスルーを開いた (研究業績 13、**Dev. Cell**, 2002)。更に申請者は、破骨細胞分化には RANKL 受容体と M-CSF 受容体だけでなく、破骨細胞上の免疫受容体を介した RANKL 共刺激シグナルが第 3 の分化シグナルとして必須であることを発見し、この分野に大きく貢献してきた (**Nature**, 2004)。RANKL と免疫受容体シグナルの下流で選択的に誘導される NFATc1 が固有の自己増幅機構により高発現することが、破骨細胞の終末分化を特徴付けるシグナル伝達の鍵であることが明らかとなった (**J. Exp. Med.** 202, pp1261, 2005、**Dev. Cell**, 2002)。この NFATc1 特異的な制御機構によって、NFATc1 だけが破骨細胞分化において代替不能の役割を担う。

しかし NFAT ファミリーは免疫系細胞において重要な転写因子として精力的に解析されてきたが、このような破骨細胞特異的な NFATc1 の制御メカニズムは解明されていない。そこで、申請者は破骨細胞分化に特異的な NFATc1 の未知の制御メカニズムを解明するために、新たな NFATc1 結合タンパク質を同定した。Flag 及び HA タグを用いた NFATc1 のダブル免疫沈降法により結合タンパク質を精製し、マススペクトルメトリー (MS) 解析を実施した結果、新規 NFATc1 結合タンパク質として protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) を得た。PRMT は 1996 年に初めて同定された新しい翻訳後修飾酵素であり (**J. Biol. Chem.** 271 pp12585, 1996、**Mol. Cell. Biol.** 16, pp3668, 1996)、その機能はヒストンのメチル化による転写調節だけでなく、転写因子や転写共益因子のメチル化を介した転写制御や RNA プロセッシング、DNA 修復、さらに最近では増殖因子やサイトカインの受容体のメチル化を介したシグナル伝達をも調節することが報告されている (**Mol. Cell**, 18, pp263, 2005)。しかし、それらの分子メカニズムやメチル化の意義に関しては不明であった。

PRMT ファミリーを構成する 9 個の分子のうち、遺伝子改変マウスが作成されたものは世

界において *PRMT1* と *PRMT4* に限られており、これらの欠損マウスについても胎生致死であるために生体レベルにおける PRMT の意義を明らかにすることは困難である。そこで、申請者は全身で *PRMT5* を欠損するマウスおよび破骨細胞特異的に *PRMT5* を欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作成し、解析する。

## 2. 研究の目的

生体内のタンパク質は膨大な数の遺伝子から厳密な転写・翻訳制御により発現した後、さまざまな翻訳後修飾を介することでより複雑な細胞内情報伝達を可能にし、生命現象を司る。破骨細胞の細胞内情報伝達の中心として nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1) が必須の役割を果たすことが明らかになってきたが、破骨細胞分化に特異的な他の NFAT ファミリーでは代替不能な NFATc1 の役割を説明する制御機構は不明であった。本申請は、タンパク質の翻訳後修飾のひとつであるタンパク質メチル化機構がその制御に関与している可能性を見出したことを契機に、タンパク質アルギニンメチル化酵素 protein arginine methyltransferase (PRMT) の欠損マウスを作製・解析して、PRMT によるメチル化修飾を介した細胞内シグナル伝達制御を分子・個体レベルで明らかにし、非ヒストンタンパクのメチル化修飾の意義を解明するとともに、骨破壊性疾患の制御法を開発する分子基盤を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) *PRMT5* 欠損マウスの作成と解析  
PRMT ファミリーはメチル化反応様式の違いにより Type I と Type II の 2 つ PRMT に分類される。siRNA を用いた発現抑制実験から、Type II PRMT を構成する PRMT5 と PRMT7 が特に破骨細胞分化に必要であることを見出したので、*PRMT5* および *PRMT7* を標的とした *PRMT* 欠損マウスを Cre-Flox システムによりそれぞれ作成する。PRMT Flox マウスと  $\beta$ -actin Cre マウスとの掛け合わせにより、全身で PRMT を欠損するマウスを作成した。また、コンディショナル *PRMT* 欠損マウスは破骨細胞分化前期 (RANK Cre) および後期 (Ctsk Cre) に発現する Cre Tg マウスと掛け合わせにより得られた。これらの欠損マウスの骨形態の異常を解析し、PRMT の機能を明らかにした。

(2) NFATc1 の転写活性制御におけるタンパク質メチル化の意義の解明

*PRMT5* は破骨細胞特異的な遺伝子に対する NFATc1 の転写活性を増強させる。また、破

骨細胞前駆細胞に強制発現させた NFATc1 は、分化過程においてメチル化される。そこで、破骨細胞分化における NFATc1 のタンパクメチル化が PRMT5 に依存するか否かを明らかにした。また NFATc1 の転写活性に対するメチル化の意義を証明した。

### (3) 全身性PRMT5欠損マウスの解析

$\beta$ -actin Cre Tg マウスとの掛け合わせにより、全身で PRMT5 を欠損する KO マウスを作成し、PRMT5 の生理的意義を明らかにした。

昨年度は、PRMT5を全身で欠損するマウスの作成を試みたが、PRMT5<sup>-/-</sup>マウスは誕生しないことから、PRMT5はマウスの発生に必須の役割を果たすことを見出した。そこで胎生期のどの過程で死に至るのかを詳細に解析し、胎生期E12.5胚で致死に至ることを見出した。

E12.5以前の胚の組織切片を作成し、発生のどの段階で致死に至るのかについて解明を進めてきた。一方、PRMT5<sup>-/-</sup>マウスの致死性を回避するために、昨年度に作成したPRMT5 Flox マウスと破骨細胞や骨芽細胞特異的にCreリコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスとの交配を行い、コンディショナルノックアウトマウス(cKO)の作成を進めてきた。破骨細胞特異的にPRMT5を欠損させるために、PRMT5 Floxマウスと破骨細胞マーカー遺伝子 CtskやRANKのプロモーター活性に依存して Creを発現するマウスと交配し、破骨細胞特異的PRMT5コンディショナルノックアウトマウスの作成に成功した。このマウスの骨組織を解析した結果、破骨細胞形成初期に発現するRANKに依存してPRMT5遺伝子を欠損するマウスでは、破骨細胞形成遅延が認められ、このマウス由来の骨髄細胞からの破骨細胞分化は低下することを明らかにしたが、生体レベルでの骨量に影響を与える程度ではなかった。一方、骨芽細胞特異的遺伝子OsxやClo1a1に依存してPRMT5を欠損するマウスも同時に作成し、解析を試みている。現在までに、骨芽細胞の骨形成は、PRMT5欠損によって低下し、コンディショナルノックアウトマウスは骨量低下を示すことが示唆された。骨芽細胞においてもNFAT転写因子は必須の役割を果たすので、骨芽細胞におけるNFATに対するアルギニンメチル化に着目して研究を進める計画に到達した。

## 4. 研究成果

①PRMT5 を全身で欠損するマウスの作成と解析。PRMT5 を全身で欠損するマウスは、胎生の極初期 (E6.5) で 75%が死亡することを明らかにし、PRMT5 がマウスの発生に必須の役

割を果たすことを見出した。また PRMT5 ヘテロ KO マウスはその成長に伴って、頻発して腫瘍を形成し、12か月令程度で死ぬことを明らかにした。これらにより、Type II PRMTファミリーにはPRMT5, 7, 9が存在するものの、個体発生や腫瘍形成においてはPRMT5が他とは重複しない重要な役割を担っていることが明らかとなった。

②破骨細胞特異的遺伝子に対するNFATc1の転写活性をPRMT5が相乗的に亢進させること、及びPRMT特異的な阻害剤が骨髄細胞からの破骨細胞分化を阻害することを見出している。また、PRMT5と同じサブタイプに属するPRMT7はNFATc1の転写活性を正に制御することをレポーターアッセイにより明らかにした。

③PRMTファミリーを構成する個々のPRMTに対するshRNAを用いた実験により、Type II PRMTに属するPRMT5とPRMT7の発現抑制により破骨細胞分化は阻害された。これらのことはPRMTがNFATc1の転写活性を制御することで破骨細胞分化に重要な役割を果たすことを示唆している。一方、PRMTタンパクファミリーは2つのサブクラスに分類できるため、その機能を比較解析することを目的とし、PRMT5とは異なるサブクラス (Type I PRMT) に属するPRMT4の破骨細胞分化における役割を検討した結果、PRMT4発現をノックダウンしても破骨細胞分化に影響が見られないことから、Type I PRMTが破骨細胞分化に特異的に機能していることを明らかにした。

④PRMT5の破骨細胞分化過程における細胞内局在を検討した結果、核にも存在するが、細胞質にも存在していることが見出された。このことは、PRMT蛋白の機能として同定されているヒストンタンパクやRNAポリメラーズのメチル化といった核内での役割のほか、細胞質における非ヒストンタンパクがメチル化によって制御される可能性を示唆している。

⑤破骨細胞分化過程におけるNFATc1のメチル化を同定するために、cKOマウス由来骨髄細胞を用いてメチル化NFATc1の存在を検討したが、メチル化の大きな減少は見られなかった。

⑥PRMT5 cKOマウスの骨構造解析を単純X線撮影とマイクロCTを用いて行った。しかしながら、PRMT5単独のcKOマウスはその骨形態に以上を示さないことが明らかになり、上記結果を考慮すると、骨組織においては、PRMT5以外のType II PRMTに属するPRMT7がPRMT5の欠損を代替している可能性が示唆された。

⑦今後、NFATc1のPRMT5によるメチル化アミノ酸の同定とメチル化が及ぼす破骨細胞分化への影響について、PRMT7の関与も考

慮して解明する必要がある。また、破骨細胞分化における PRMT5 依存性メチル化タンパク質を網羅的に同定することによって、細胞制御におけるメチル化の意義解明に努める。⑧NFATc1 は破骨細胞分化もメインに制御する因子であるが、免疫細胞において必須の役割を果たす転写因子として知られているものである。本研究で作成した PRMT5 Flox マウスを様々な組織特異的 Cre Tg マウス、特に免疫系細胞特異的に Cre を発現するマウスと掛け合わせることによって、破骨細胞にとどまらず他の臓器細胞での PRMT5 の意義役割を明らかにすることが可能となった。

#### 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 7 件)

- ① □ Masayuki Onishi, Takako Koga, Aiko Hirata, Taro Nakamura, Haruhiko Asakawa, Chikashi Shimoda, Jürg Bähler, Jian-Qiu Wu, Kaoru Takegawa, Hiroyuki Tachikawa, John R. Pringle, and Yasuhisa Fukui. Role of septins in the orientation of forespore-membrane extension during sporulation in fission yeast. *Mol. Cell. Biol.* 2010, 30 (8):2059-2074 査読有り
- ② □ Yuu Taguchi, Jin Gohda, Takako Koga, Hiroshi Takayanagi, Jun-ichiro Inoue. A unique domain in RANK is required for Gab2 and PLC $\gamma$ 2 binding to establish osteoclastogenic signals. *Genes Cells.* 2009 Nov;14(11):1331-1345. 査読有り
- ③ □ Takako Negishi-Koga, Hiroshi Takayanagi. Ca<sup>2+</sup>-NFATc1 signaling is an essential axis of osteoclast differentiation. *Immunological Reviews*, 2009 Sep;231(1):241-256 査読有り
- ④ □ Baohong Zhao, Masamichi Takami, Atsushi Yamada, Xiaogu Wang, Takako Koga, Xiaoyu Hu, Tomohiko Tamura, Keiko Ozato, Yongwon Choi, Lionel B Ivashkiv, Hiroshi Takayanagi & Ryutaro Kamijo. Interferon regulatory factor-8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis. *Nature Medicine.* 2009 Sep;15(9):1066-1071 査読有り
- ⑤ □ Takako Negishi-Koga, Hiroshi Takayanagi. Mysteries in Ca<sup>2+</sup> signaling during osteoclast differentiation. (Articles). *IBMS BoneKEY.* 2009 Aug;6(8):301-306. 査読有り
- ⑥ □ Mori Y, Tsuji S, Inui M, Sakamoto Y, Endo S, Ito Y, Fujimura S, Koga T, Nakamura A, Takayanagi H, Itoi E, Takai T. Inhibitory immunoglobulin-like receptors LILRB and

PIR-B negatively regulate osteoclast development. *J Immunol.* 2008 Oct 1;181(7):4742-4751. 査読有り

- ⑦ □ Masahiro Shinohara, Takako Koga, Kazuo Okamoto, Shinya Sakaguchi, Kimiko Arai, Hisataka Yasuda, Toshiyuki Takai, Tatsuhiko Kodama, Tomohiro Morio, Raif S. Geha, Daisuke Kitamura, Tomohiro Kurosaki, Wilfried Ellmeier, Hiroshi Takayanagi. Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals. *Cell.* 2008 Mar 7;132(5):794-806. 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

- ① Takako Negishi-Koga, Hans-Jürgen Gober, Toshiyuki Takai & Hiroshi Takayanagi. The regulation of osteoclastogenesis by Fc $\gamma$  receptors 3<sup>rd</sup> International Conference on Osteoimmunology, Santorini, Greece, June 24, 2010
- ② Kaori Tsuji, Takako Koga, Takahiro Maeda, Pier Paolo Pandolfi, Keiji Moriyama, Hiroshi Takayanagi. Transcriptional repressor, LRF regulates NFATc1 expression in osteoclastogenesis. 3<sup>rd</sup> International Conference on Osteoimmunology, Santorini, Greece, June 24, 2010
- ③ Takako Koga, Masahiro Shinohara, Hiroshi Takayanagi. Tec kinases form an osteoclastogenic signaling complex with SLP adaptor proteins 13<sup>th</sup> APLAR, Yokohama, September 26<sup>th</sup>, 2008,
- ④ 根岸 - 古賀貴子 Fc 受容体による破骨細胞制御 第 28 回日本骨代謝学会 東京、2010 年 7 月 23 日
- ⑤ 田口祐, 合田仁, 古賀貴子, 高柳広, 井上純一郎 破骨細胞形成に必要な持続的 RANK シグナルの伝達機構 BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸ポートアイランド、2008 年 12 月 12 日
- ⑥ 古賀貴子, 篠原正浩, 高柳広 Tec ファミリーチロシンキナーゼによる破骨細胞分化制御 BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸ポートアイランド、2008 年 12 月 11 日

[図書] (計 1 件)

古賀貴子 高柳広、科学評論社出版、「骨免疫学研究の歴史と up to date」『リウマチ科』、第 40 巻第 2 号、p 105-111、2008

[その他]  
ホームページ等  
<http://homepage.mac.com/osteimmunology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古賀 貴子 (KOGA TAKAKO)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・客員助教

研究者番号 : 90451905

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :