

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592804

研究課題名(和文)骨代謝制御における未知の分子基盤を解き明かす新規分子の機能解明

研究課題名(英文) Study on a novel mechanism of bone metabolism implicating the function of a signaling molecule, PRIP

研究代表者

松田 美穂 (Matsuda, Miho)

九州大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40291520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：情報伝達分子PRIPの遺伝子欠損(PRIP-KO)マウスでは骨量の顕著な増加が認められたため、PRIPの骨代謝における役割を解明することで骨代謝制御の新分子基盤を見いだす事を目指して本研究を行った。その結果PRIPが、骨形成を担う骨芽細胞の分化に重要な骨形成因子BMPシグナルの抑制分子の制御に関わる事、また、骨吸収を担う破骨細胞の分化に重要なホスファターゼ calcineurinの発現/機能調節に促進的に働く事が分かった。これらの結果、骨芽細胞分化が促進し破骨細胞分化が抑制されPRIP-KOマウスで骨量の増加に至ることが判明し、PRIPが関わる未知の骨代謝制御機構の一端が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This study revealed the following:(i) PRIP, an inositol 1,4,5-trisphosphate binding and signaling molecule, is positively involved in the regulation of a signaling molecule, Smad6 which inhibits BMP signaling through the binding to BMP receptors or the interference of Smad1/5 phosphorylation. (ii) PRIP functions as a regulator of osteoclast differentiation at early stage, probably through the regulation of the expression and/or activity of a serin/threonine phosphatase, calcineurin.

It was indicated that the deficiency of these functions cause the increased bone mineral density and trabecular bone volume in PRIP knockout mice.

研究分野：医歯薬学

キーワード：骨代謝 骨形成 BMP 骨吸収 M-CSF PRIP

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、イノシトール 1,4,5-三リン酸 [Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>] の新規結合性蛋白質として PRIP (PLC-related but catalytically inactive protein) 分子を見いだした (JBC, 267, 6518, 1992)。Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 結合性であることから Ca<sup>2+</sup> シグナリングにおける役割を解明する研究を行うとともに (BJ, 349, 357, 2000; JCP, 202, 422, 2005)、PRIP と結合する分子を探索し、PP1 (protein phosphatase-1) と GABARAP (GABA<sub>A</sub> receptor-associated protein) の 2 分子を同定した。これらの結合分子が GABA<sub>A</sub> 受容体機能への関わりを示唆したので PRIP-遺伝子欠損 (KO) マウスを作製し、GABA<sub>A</sub> 受容体機能に関わる PRIP の役割について検討してきた (EMBO J, 21, 1004, 2002; JBC, 281, 22180, 2006; JNS, 27, 1692, 2007)。また最近、PRIP がイノシトールリン脂質との結合を通して開口分泌に関わることも分かってきた (JBC, 287, 10565, 2012; JBC, 288, 7769, 2013)。ホスファターゼである PP1, PP2A との結合を確認し、特定分子のリン酸化制御への PRIP の関与を明らかにした (Biochemistry, 51, 3394, 2012)。

PRIP-KO マウスの表現型を観察していく過程で、野生型に比べて出産頻度や 1 回当たりの出産仔数、総出産仔数が少ないなどの生殖に関わる異常を見いだした。PRIP-KO マウスにおける生殖異常は、雌に起因することが分かり、黄体形成ホルモン及び卵胞刺激ホルモンの血中濃度が野生型に比べ恒常的に高濃度であること、一方でエストロゲン、プロゲステロンの血中濃度は、PRIP-KO マウスで減少していることなどが明らかとなった (Biol Reprod, 81, 681, 2009)。

これらのホルモンアンバランスから、骨組織への影響が予想されたため、本 KO マウスにおける骨組織の解析を始めたが、予想に反して骨密度及び海綿骨の骨量が増大していた。PRIP 欠損による骨量の増大が、骨形成の亢進と骨吸収の低下に起因することが示唆されたので、その分子メカニズムの解析に着手した。

## 2. 研究の目的

PRIP の骨代謝における役割を解明することにより、骨代謝制御機構の新たな分子基盤を見いだすことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### ① PRIP の有無が及ぼす骨芽細胞、破骨細胞分化への影響とそのメカニズム

・野生型、PRIP-KO マウスの頭蓋骨および大

腿骨から調製した骨芽細胞前駆細胞及び破骨細胞前駆細胞を用いて、各々の細胞分化に重要な情報伝達機構 (BMP シグナリング、RANK/RANKL シグナリング等) について PRIP の有無が及ぼす影響を分子レベルで解析した。具体的には、BMP4 や Wnt、M-CSF、RANKL 等による分化誘導を行い、分化状態を ALP 活性や TRAP 活性、pit assay、マーカー分子の免疫染色等で解析した。また、各シグナリング経路を担うキー分子 (Smad や Erk、Runx2、RANK、TRAF6、NFATc1 など) の発現量やリン酸化状態、阻害剤等の薬剤刺激に対する変化を経時的に追跡することで、それらのシグナリング調節への関与を検討した。

・骨芽細胞及び破骨細胞において受容体などの膜分子 (BMP 受容体、RANK/RANKL 等) の発現量や局在を FACS や免疫染色等で検討した。

### ② 骨芽細胞分化過程における PRIP の関わり

・上述の結果から、骨芽前駆細胞が BMP 刺激を受容する前後において PRIP の関与が示唆されたので、BMP 刺激前後における受容体、Smad6、Smad1/5 等関与する分子の局在やリン酸化等を、野生型及び PRIP-KO 細胞にて比較検討した。

### ③ 破骨細胞分化及び骨吸収機能への PRIP の関わり

・骨芽細胞前駆細胞と破骨細胞前駆細胞の共存培養を行い、野生型及び PRIP-KO マウスそれぞれにおける骨芽細胞の破骨細胞分化誘導へのポテンシャルや破骨細胞前駆細胞の分化能を生化学的手法にて検討した。

・破骨細胞分化に関わる種々の分子 (インテグリン、M-CSF 受容体、RANK 等) および骨吸収機能に関わる分子 (Cathepsin K、プロトンポンプ、matrix metalloproteinase-9 等) について、その発現量をウエスタンブロッティングやリアルタイム PCR 法にて経時的に検討した。また、これらの分子が関与するシグナリングについても、PRIP の関与の有無を分子生物学的手法にて解析した。上述の解析で得られた結果と合わせて、破骨細胞分化及び骨吸収機能への PRIP の関与を追究した。

## 4. 研究成果

### \* 骨芽細胞分化制御における PRIP の機能

・野生型、PRIP-KO マウスの頭蓋骨から調製した骨芽細胞前駆細胞 (preosteoblast, POB) を用いて、血中の骨代謝マーカーや

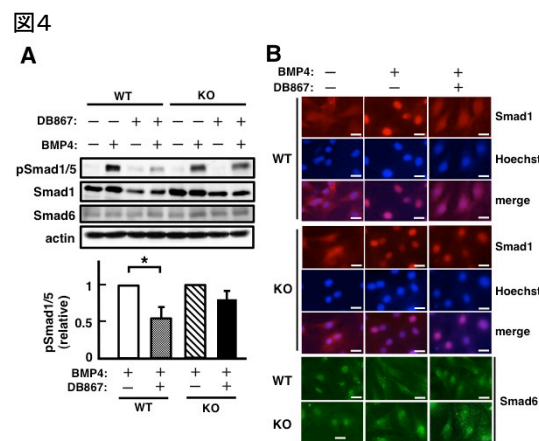
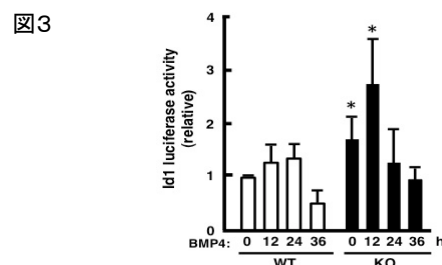
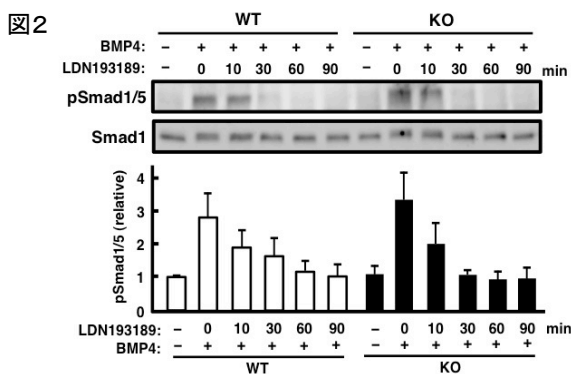
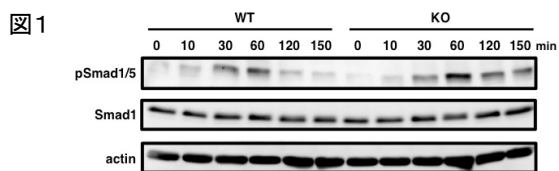
関連ホルモン（アルカリホスファターゼ (ALP)、TRAP、オステオカルシン、オステオポンチンなど)について、分泌量をELISA法で、または発現量をリアルタイムPCRで検討した。その結果は、これまでの解析結果 (PRIP-KO マウスにおける海面骨の骨量、骨密度の増加、分化した骨芽細胞、破骨細胞の細胞数の増加、骨吸収活性の低下など) を支持するものであった。

・POBを用いて骨芽細胞分化に重要なBMPシグナリングについて、ALP活性やSmad、ERK等のシグナル分子の発現量やリン酸化程度などを経時的に追った。BMP刺激に応じたSmad分子のリン酸化上昇後、野生型由来の骨芽細胞では低下するのに対しKO由来ではリン酸化状態が持続した(図1)。

・そこで脱リン酸化や他の関連分子のリン酸化や転写活性について検討した。リン酸化Smad1/5/8の脱リン酸化程度に違いはなく(図2)、BMP刺激による転写活性はPRIP-KOでより上昇したが(図3)、Smad4や6など他の細胞内分子の発現量やリン酸化程度に差は見られなかった。Wnt刺激による骨芽細胞分化においても両者に有意差はなかった。

・これまでの結果から、PRIP欠損により、BMP受容体の機能周辺に何らかの変化を来しているものと考えられたが、受容体の発現量等にも変化がなく、他の可能性を模索していた。最近の報告から、メチル基転移酵素PRMT1がBMPRI1A上のSmad6をメチル化することによりSmad6はBMPRI1Aから解離しBMPRI1AはSmad1をリン酸化(活性化)するということが判明したので(*Mol Cell*, 51, 5, 2013)、この過程へのPRIPの関与を検討した。PRMT1の阻害剤であるDB867を用いて、Smad1のリン酸化程度について検討した。POBをDB867処理後、BMP4刺激30分で回収し、ウェスタンブロッティングを行った。その結果、BMP4刺激のみに比べDB867処理後のBMP4刺激では、野生型ではSmad1のリン酸化レベルは減少するが、PRIP-KOでは減少は少なかった(図4A)。また、同様の条件下で免疫染色によりSmad1の局在を追跡したところ、両遺伝子型でBMP4刺激後の核移行像が認められたが、PRIP-KOではDB867処理後のBMP4刺激でも核移行が認められた。また、PRIP-KOではBMP刺激によるSmad6の核外への移行が減少していた(図4B)。

以上の結果から、PRIP不在下ではSmad6がBMPにตอบสนองして核外へ移行し難いため、細胞膜付近で抑制的な作用をするSmad6量が減少してBMPシグナリングが進行しやすくなっていると考えられた。



#### \* 破骨細胞分化制御におけるPRIPの機能

・野生型、PRIP-KOマウスの大腿骨及び頭蓋骨より調製した骨髄細胞(BMC)及びPOBを用いて共存培養を行ったところ、分化した破骨細胞数が有意に減少するのはKOマウス由来のBMCを用いた場合である事が分かった(図5)。

・そこで、破骨細胞分化に必須のM-CSF及びRANKLの受容体(CD115、RANK)についてその膜発現をFACSにて解析したところ、RANK/CD115陽性細胞数が、PRIP-KO細胞でM-CSFのみの刺激で減少していた(図6)。

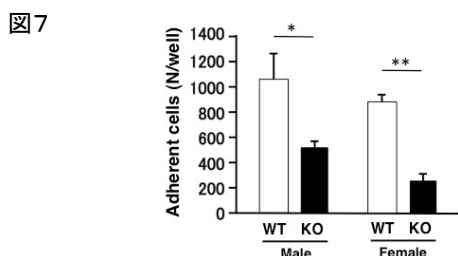
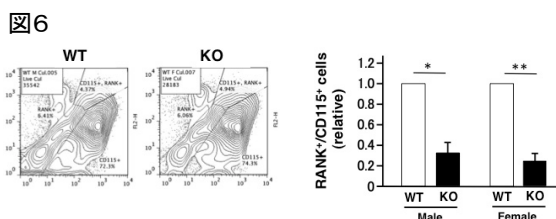
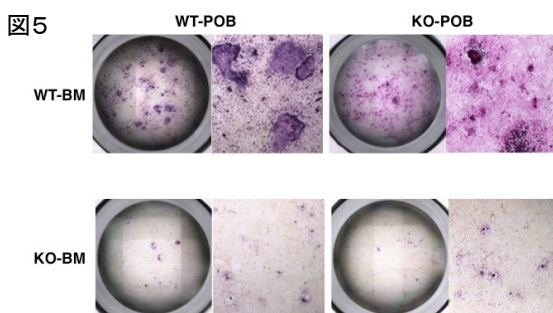
・破骨細胞分化及び機能に関わる種々の分子群についてreal-time PCR解析を行ったところ、RANKを始めNFATc1や $\alpha$ v $\beta$ 3インテ

グリーンなど多くの分子の発現が PRIP-KO において減少していた。これらのことから、破骨細胞分化の初期の段階で RANK 遺伝子の発現量が低下しているために分化の低下が見られることが示唆された。RANK の発現は M-CSF により促進されることから、PRIP が M-CSF シグナリングにおいて何らかの役割を担うものと考えられた。

・野生型、PRIP-KO マウス由来の BMC を M-CSF で刺激し分化初期の様子を観察したところ、KO 細胞の培養皿への接着が低下していた(図7)。

・M-CSF シグナル下流の幾つかの経路について関連分子の発現量やリン酸化を検討したところ、Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン複合体依存性の脱リン酸化酵素カルシニューリンの発現及び活性が減少していた。

以上の結果から、PRIP 欠損により破骨細胞分化初期のカルシニューリンの発現及び活性が減少することによって、その下流の NFATc1 の活性化が低下しそのターゲット遺伝子群の発現が減少するため、接着等の基本的機能が損なわれ分化不全になることが示唆された。



## 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 Kotani M., Matsuda M., Murakami A.,

Takahashi I., Katagiri T. and Hirata M.: Involvement of PRIP (phosphorylated C-related but catalytically inactive protein) in BMP-induced Smad signaling in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem.* Accepted. 査読有

② Umebayashi, H., Mizokami, A., Matsuda M., Harada, K., Takeuchi, T., Tanida, I., Hirata, M., Kanematsu, T.: Phospholipase C-related catalytically inactive protein, a novel microtubule-associated protein 1 light chain 3-binding protein, negatively regulates autophagosome formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 432: 268-274, 2013. 査読有

③ Sugiyama, G., Takeuchi, T., Kanematsu, T., Gao, J., Matsuda M., and Hirata, M.: Phospholipase C-related but catalytically inactive protein, PRIP as a scaffolding protein for phospho-regulation. *Adv Biol Regul.* 53, 331-340, 2013. 査読有

[学会発表] (計 11 件)

① 第56回歯科基礎医学会 学術大会・総会 (福岡) 標題「破骨細胞分化における PRIP の役割」松田美穂、平田雅人 2014, 9, 27

② 第36回日本分子生物学会年会 (神戸) 標題「Dysregulation of ovarian follicular development in a novel signaling molecule, PRIP deficient mice」松田美穂、平田雅人 2013, 12, 3

③ 第72回日本矯正歯科学会大会 (松本) 標題「矯正的歯の移動にともなう骨改造における新規タンパク質PRIPの役割」村上絢子、松田美穂、高橋一郎、平田雅人 2013, 10, 9

④ 第86回日本生化学会大会 (横浜) 標題「PRIPはSmadのリン酸化制御に関わる」小谷美穂、松田美穂、平田雅人 2013, 9, 12

⑤ 第11回口腔医科学フロンティア学術集会 (宮崎) 標題「PRIP欠損マウスが呈する生殖異常」松田美穂、平田雅人 2013, 3, 2

⑥ 第85回日本生化学会大会 (福岡) 標題「PRIPの骨代謝制御における機能解析」小谷美穂、松田美穂、平田雅人 2012, 12, 16

- ⑦ 第85回日本生化学会大会 (福岡) 標題「生殖機構に欠かせない卵巣の機能における新規分子PRIPの役割」松田美穂、平田雅人 2012, 12, 15
- ⑧ 第35回日本分子生物学会年会 (福岡) 標題「PRIP-KO mice exhibit the decreased tooth movement by orthodontic force」松田美穂、村上絢子、平田雅人 2012, 12, 14
- ⑨ The 22th IUBMB, 37st FEBS Congress (Sevilla, Spain) 標題「Involvement of a novel signaling molecule, PRIP in the regulation of reproduction system」松田美穂、小谷美穂、平田雅人 2012, 9, 6
- ⑩ The 22th IUBMB, 37st FEBS Congress (Sevilla, Spain) 標題「Role of a novel protein in alveolar bone remodeling mechanism of tooth movement」村上絢子、松田美穂、平田雅人 2012, 9, 6
- ⑪ 日本生化学会九州支部例会 (福岡) 標題「骨芽細胞分化におけるPRIPの機能解析」小谷美穂、松田美穂、平田雅人 2012, 5, 26

取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
松田美穂 (MATSUDA MIHO)

研究者番号：40291520

(2) 研究分担者  
なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
なし ( )

研究者番号：

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：