

PRIP欠損マウスにおける骨芽細胞の分化制御に関する研究

小谷, 美穂

<https://doi.org/10.15017/1441141>

出版情報：九州大学, 2013, 博士（歯学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済

区分	Ⓐ 乙
----	-----

論文題目 PRIP 欠損マウスにおける骨芽細胞

の分化制御に関する研究

氏名 小谷 美穂

論文内容の要旨

PRIP (phospholipase C-related but catalytically inactive protein, PRIP-1 と PRIP-2 の2つのサブタイプが存在) はイノシトール 1, 4, 5-三リン酸と結合するタンパク質として発見された分子である。PRIP 欠損 (KO) マウスでは骨密度および海綿骨の骨量、類骨幅、骨形成速度、骨石灰化度、および骨芽細胞分化に関連する遺伝子の発現が亢進することを報告した。これらの結果は、骨形成制御における PRIP の関与を示唆している。

そこで、骨形成を担う骨芽細胞を用いて実験を行った。野生型 (WT) マウスおよび KO マウスの新生マウスの頭蓋骨より調製した骨芽前駆細胞を用いて BMP 刺激を行ったところ、骨芽細胞分化の指標であるアルカリホファターゼで染色された細胞数および活性の増加が見られ、KO マウスから得た骨芽前駆細胞で、より著明な変化が認められ、骨芽細胞の分化能が亢進した。ここで用いた BMP は骨形成を誘導する骨誘導因子 (BMP, bone morphogenetic protein) である。そこでまず、BMP の初期応答遺伝子である Id1 のプロモーター活性を調べたところ、KO 細胞で亢進していた。

これらの結果から、PRIP が BMP シグナル経路に作用している可能性が示唆されたため、PRIP がこの経路のどこに効いているのか見当をつけるため、Smad1/5/8 のリン酸化以降の経路への PRIP の関与について調べた。常時活性型の変異 Smad1 を用いてルシフェラーゼ活性測定を行ったところ、Id-1 を指標としたその転写活性は両遺伝子型細胞で差がなかった。このことから、PRIP は Smad1/5/8 のリン酸化以降の経路に関与していないことが示唆された。

そこで、Smad1/5/8 がリン酸化されるまでの過程に PRIP が関与しているかどうか調べるために、Smad1/5/8 のリン酸化を WT と KO で比較したところ、KO の細胞においてリン酸化レベルがより高く、リン酸化状態が長く持続した。PRIP の以前の解析からフォスファターゼの機能調節に関わることがわかっていたので、KO における Smad1/5/8 のリン酸化状態の持続は PRIP がないことによってフォスファターゼの活性調節が上手くいかなくなり、脱リン酸化が低下したのではないかと考えられた。そこで、BMP の除去と受容体キナーゼの阻害剤の添加で Smad1/5/8 の脱リン酸化動態を観察したが両者に差がなかった。

これらの結果から、KO 細胞における Smad1/5/8 リン酸化の持続はフォスファターゼでもなく、Smad のリン酸化以降の影響でもないため、Smad のキナーゼである受容体について調べた。その結果、BMP 受容体の発現量も mRNA ならびにタンパク質レベルで両者に差がなかった。

BMP シグナル経路以外で、骨形成に関与するシグナル伝達経路として古典的 Wnt 経路がある。また、古典的

Wnt である Wnt3a と BMP は相互作用して骨芽細胞分化を誘導するという報告もある。そこで、古典的 Wnt 経路が KO マウスにおける骨芽細胞分化に影響しているかどうか、WT および KO の骨芽前駆細胞のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、Wnt3a を添加すると WT でも KO でも転写活性は上昇し、有意差は見られなかった。また、骨芽前駆細胞を用いて、Wnt3a を含む培地で BMP4 と共に 3 日間培養し、ALP 活性を測定したが、BMP4 のみを添加した場合は KO で ALP の活性がより高くなったが、Wnt3a を加えた場合の ALP の活性に差はなかった。このことから、PRIP は Wnt 経路に作用していないことが示唆された。

以上の結果から、PRIP-KO マウスでは骨芽細胞の分化誘導が促されるが、BMP シグナリング経路における Smad のリン酸化レベル調節、とりわけ脱リン酸化ではなく、リン酸化過程の制御によることが示唆された。