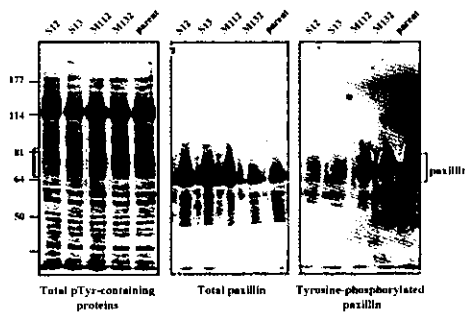


なり大量の細胞溶出液と抗体カラムを用いて精製を行うことが必要であることが明らかになった。

チロシンリン酸化蛋白質解析の手法の確認のため、手始めに細胞の転移能の異なる同系の骨肉腫細胞株についてのチロシンリン酸化の相違を上記手法も使って解析している。転移性の骨肉腫細胞において著明にチロシンリン酸化が亢進している 70kD の蛋白質 (図 6 パネル左) は解析の結果パキシリンであった。パキシリンは発現レベルチロシンリン酸化レベルとも亢進していた (図 6 パネル中央、右)。またパキシリンと共に Src キナーゼの基質として知られる Cas 蛋白質もチロシンリン酸化の亢進した蛋白質としてリン酸化が亢進していた。これらの蛋白質は、破骨細胞機能などの制御因子としても Src とともに重要でありいかにも述べるような幾つかの方法で、機能解析を行っている。

図 6 骨肉腫細胞株におけるパキシリンのチロシンリン酸化レベル



### (3) Cas ノックアウト細胞のマイクロアレイによる解析

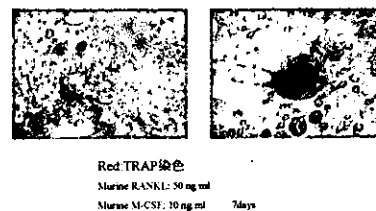
前述したように Cas は Src チロシンキナーゼの主要な基質であり、破骨細胞においても高い発現レベルを持つばかりか、常時チロシンリン酸化をしていることが報告されている。Src チロシンキナーゼはそもそもノックアウトマウスが骨大理石病を示すことから、破骨細胞の活性化や生存に重要であることが早くから示されてきた。Src-Cas 経路は固形腫瘍など他の細胞系では Src の活性化を伝えるメイ

ンの経路であることが証明されてきていることから破骨細胞においてもその機能や存続維持のための主要な経路である可能性が考えられる。Src-Cas 経路の下流分子を明らかにする目的で Cas を欠損する細胞と、それにさらに Cas 蛋白質を発現させ直した細胞の間での遺伝子発現の違いをマイクロアレイ法により解析した。Cas 欠損細胞では Caveolin-1 の発現が顕著に減少する一方、Procollagen 1 $\alpha$ 1、3 $\alpha$ 1、11 $\alpha$ 1、Elastin、Periostin の発現が著明に上昇していた。このなかで特に Periostin は別名 OSF-2(osteoblast-specific factor)と呼ばれ、Src の欠損によっても著明に発現量が上がることなどから、Src-Cas のシグナルから Periostin/OSF-2 の発現制御に至るシグナル伝達経路が、骨代謝に関わる可能性が示唆される。Cas 欠損マウスの発生過程の諸段階での骨組織の Periostin 抗体による免疫染色などによる解析が進行中である。また広島大学の本田浩章先生と共同研究で Cas のコンディショナルノックアウトマウスの作成も進んでおり、骨代謝における機能解析の道具として期待が持てる。

### (4) 破骨細胞系細胞の調整法の確立

現在 2 種類の方法で破骨細胞の調整を行っている。一つは前駆細胞であるマウス RAW 細胞を破骨細胞分化因子 RANKL による刺激で破骨細胞様細胞に分化させる方法である。図 7 に示したように RANKL 刺激後 1 週間で多くの細胞が破骨細胞のマーカーである TRAP の発現を

図 7 RAW細胞のRANKL刺激による破骨細胞様細胞への分化



示す。ただしこの方法では未分化細胞がかなりの比率で混入してしまい生化学的解析に限界がある。そのため、純粋な箱湯細胞の調整にはラットからの初代培養細胞の調整を行っている。どちらの方法も蛋白質精製に必要な細胞数の確保にかなりの手間がかかり、ベクターや精製条件が整った現在これらの材料を使ったメインの実験が進行中である。

#### D. 考察

本研究は、主に蛋白質を標的として解析を進めてきており、さらにシグナル伝達という複雑な蛋白質の動きについても、蛋白質の局在と複合体形成の両面から情報を得ようとする点が、単なる発現解析から一歩進んだものであると考えられる。しかもそのような作業をできるだけ網羅的に行うことを試みてきているが、ここまでのところ試料の大量調整の技術的問題もあり、骨肉腫細胞などのモデル系を使った技術開発と特定のコントロール分子の検出による実験手法の確認が中心になっているのが残念な点である。腫瘍細胞における蛋白質のチロシンリン酸化の変化を検出して、質量分析によって網羅的に同定する新しい手技・手法の開発については、抗リン酸化チロシン抗体を用いた二段階の親和性カラムによる精製でリン酸化チロシン残基を含む蛋白質群を、高い収率と高い特異性をもった方法を開発することに成功した。例としてあげた Cas、Paxillin などは分子量からリン酸化蛋白質も推定も比較的容易であったため、特異抗体を用いてリン酸化の変化も容易に確認することができたが、絶対量の少ない新規のシグナル伝達分子などは、質量分析に十分な量を集めるために大量の細胞溶出液と、抗体カラムを要する。その中でも量的に比較的豊富なチューブリンなどは現時点でも少量の試料から同定可能であることが今回示され、また質量分析の感度は更に高くなりつつあるので

この問題は軽減する可能性がある。

刺激による細胞の分化や初代培養などのアプローチでから必要な蛋白質を得るにはかなりの労力を必要とするが、現在までの条件検討により挑戦しうる段階に来ていると考えられる。一方、引き続きいくつかの骨芽細胞系、破骨細胞分化系の細胞株について生理的機能を反映するものを検討している。

#### E. 結論

細胞機能を制御するリン酸化蛋白質群の網羅的解析は、通常のマイクロアレイ法や 2 次元スポット解析だけでは手の届かない分野であり、また治療薬開発の面でも、実際の標的となる蛋白質を発現解析からだけでなく、リン酸化などの修飾とそれによる複合体形成の変化などの解析から正確に理解することはきわめて重要なことであると考えられる。細胞内シグナル伝達分子の分子間結合を阻害することにより破骨細胞の機能やアポトーシスに関わるシグナルを選択的にブロックすることや、骨芽細胞の増殖を刺激するようなことが可能になると考える。現在、Src のチロシンキナーゼ阻害剤を用いた研究などは始まっているが、細胞内のシグナル媒介・調節分子によるチロシンキナーゼシグナルの制御はその特異性においてはるかに優れており、実用的な面でも副作用の少ない薬剤を開発できる可能性がある。

#### F. 発表

##### 1. 論文発表

【英文原著】

1. Huang J, Asawa T, Takato T, Sakai R: Cooperative roles of Fyn and cortactin in cell migration of metastatic murine melanoma *J Biol Chem* 278, 48367-48376, 2003

##### 2. 学会発表

【国際学会】

1. Sakai R, Miyake I, Hakomori Y, Asawa T: Activation of the anaplastic lymphoma kinase in Neuroblastoma cells. German-Japanese Cancer Workshop on modification of signaling cascades in cancer. Tokyo (2003.1.8-11)
2. Sakai R: Roles of Src-binding molecules in the control of cancer progression. The eighteenth workshop on France-Japan cooperative cancer research program, Osaka, Japan (2003.10.28-11.1)
3. Tanaka M, Kamata R, Sakai R: "Involvement of Eph receptor tyrosine kinase and ephrin ligand in the regulation of cell-to-cell adhesion by interaction with claudins" 6th Joint Conference of the American Association for Cancer Research

and the Japanese Cancer Association, Waikoloa, Hawaii (2004.1.25-29)

【国内学会】

1. 黄錦鴻、浅輪珠恵、高戸毅、堺隆一 : マウス高転移性メラノーマ細胞の細胞運動における Fyn と cortactin の協調的役割 (2003.9.25-27) 第 62 回日本癌学会総会 (名古屋)
2. 東浩太郎、堀江公仁子、井上聡、大内尉義、堺隆一 : 細胞膜近傍におけるエストロゲン受容体  $\alpha$  の機能解析 (2003.9.25-27) 第 62 回日本癌学会総会 (名古屋)
3. 田中正光、鎌田礼子、堺隆一 : Eph 受容体/Ephrin による細胞接着制御の解析 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Urano T, Shiraki M, Ezura Y, Fujita M, Sekine E, Hoshino S, Hosoi T, Orimo H, Emi M, Ouchi Y, Inoue S	Association of a single nucleotide polymorphism in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density.	<i>J Bone Miner Metab</i>	<i>in press</i>		2004
Ikeda K, Ogawa S, Tsukui T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kato S, Muramatsu M, Inoue S	Protein phosphatase 5 is a negative regulator of estrogen receptor-mediated transcription.	<i>Mol Endocrinol</i>	<i>in press</i>		2004
Ikeda K, Inoue S, Muramatsu M	RING finger-B box-coiled coil (RBCC) proteins as ubiquitin ligase in the control of protein degradation and gene regulation.	<i>Zinc finger proteins: from atomic contact to cellular function</i>	<i>in press</i>		2004
Tabb MM, Sun A, Zhou C, Grun F, Errandi JL, Romero KM, Pham H, Inoue S, Mallick S, Lin M, Forman BM, Blumberg B	Vitamin K2 regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor, SXR.	<i>J Biol Chem</i>	278	43919-43927	2003
Ezura Y, Nakajima T, Kajita M, Ishida R, Inoue S, Yoshida H, Suzuki T, Shiraki M, Hosoi T, Orimo H, Emi M	Association of molecular variants, haplotypes, and linkage disequilibrium within the human vitamin D-binding protein (DBP) gene with postmenopausal bone mineral density.	<i>J Bone Miner Res</i>	18	1642-1649	2003
Omasu F, Emi M, Ezura Y, Kajita M, Ishida R, Kodaira M, Yoshida H, Suzuki, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Orimo H	Association of genetic variation of gene encoding LIM domain protein (RIL) with low bone mineral density in postmenopausal Japanese women.	<i>J Hum Genet</i>	48	342-345	2003
Ishida R, Ezura Y, Emi M, Kajita M, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Ito H, Orimo H	Association of a promoter haplotype (-1542G/-525C) in the tumor necrosis factor receptor associated factor-interacting protein gene with low bone mineral density in Japanese women.	<i>Bone</i>	33	237-241	2003
Tsurusaki T, Aoki D, Kanetake H, Inoue S, Muramatsu M, Hishikawa Y, Koji T	Zone-dependent expression of estrogen receptor alpha and beta in human benign prostatic hyperplasia.	<i>J Clin Endocrinol Metab</i>	88	1333-1340	2003
Takahashi S, Urano T, Tsuchiya F, Fujimura T, Kitamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S	EBAG9/RCAS1 expression and its prognostic significance in prostatic cancer.	<i>Int J Cancer</i>	106	310-315	2003

Aoki T, Inoue S, Imamura H, Fukushima J, Takahashi S, Urano T, Hasegawa K, Ogushi T, Ouchi Y, Makuuchi M	EBAG9/RCAS1 expression in hepatocellular carcinoma: Correlation with tumour dedifferentiation and proliferation.	<i>Eur J Cancer</i>	39	1552-1561	2003
Horie K, Urano T, Ikeda K, Inoue S	Estrogen-responsive RING finger protein controls breast cancer growth.	<i>J Steroid Biochem Mol Biol</i>	85	101-104	2003
Murayama A, Kim M, Yanagisawa J, Takeyama K, Kato S	Ligand-induced transrepression by a nuclear receptor mediated by a bHLH-type activator through co-regulator switching.	<i>EMBO J</i>	<i>in press</i>		2004
Sato T, Matsumoto T, Kawano H, Watanabe T, Uematsu Y, Sekine K, Fukuda T, Aihara K, Krust A, Yamada T, Nakamichi Y, Yamamoto Y, Nakamura T, Yoshimura K, Yoshizawa T, Metzger D, Chambon P, Kato S	Brain masculinization requires androgen receptor function.	<i>Proc Natl Acad Sci USA</i>	101	1673-1678	2004
Kitagawa H, Fujiki R, Yoshimura K, Mezaki Y, Uematsu Y, Matsui D, Ogawa S, Unno K, Okubo M, Tokita A, Nakagawa T, Ito T, Ishimi Y, Nagasawa H, Matsumoto T, Yanagisawa J, Kato S	Promoter targeting of a nuclear receptor with an ATP-dependent chromatin remodeling complex related to Williams syndrome.	<i>Cell</i>	113	905-917	2003
Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriyama Y, Kato S	Modulation of estrogen receptor signalin by an association with the activated dioxin receptor.	<i>Nature</i>	423	545-550	2003
Kawano H, Sato T, Yamada T, Matsumoto T, Sekine K, Watanabe T, Nakamura T, Fukuda T, Yoshimura K, Yoshizawa T, Aihara K, Yamamoto Y, Nakamichi Y, Metzger D, Chambon P, Nakamura K, Kawaguchi H, Kato S	Suppressive function of androgen receptor in bone resorption.	<i>Proc Natl Acad Sci USA</i>	100	9416-9421	2003
Endo I, Inoue D, Mitsui T, Umaki Y, Akaike M, Yoshizawa T, Kato S, Matsumoto T	Deletion of vitamin D receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors.	<i>Endocrinology</i>	144	5138-5144	2003

Fukuda A, Tokonabe S, Hamada M, Matsumoto M, Tsukui T, Nogi Y, Hisatake K	Alleviation of PC4-mediated transcriptional repression by the ERCC3 helicase activity of general transcription factor TFIID.	<i>J Biol Chem</i>	278	14827-14831	2003
Huang J, Asawa T, Takato T, Sakai R	Cooperative roles of Fyn and cortactin in cell migration of metastatic murine melanoma.	<i>J Biol Chem</i>	278	48367-48376	2003





20030352

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。