

分解するモデルである。この場合、分解と逆行輸送は強く共役していると考えられる (図 2 (i))。第二に、逆行輸送と分解は分離可能で、サイトゾルの中間体を経て分解されるモデルである (図 2 (ii))。我々は試験管内アッセイ系によって、Ste6*がユビキチン化、Cdc48/p97 (AAA ATPase)、そして ATP に依存して、分解される前にサイトゾルへ逆行輸送されることを証明した。この結果は、構造が複雑な複数回膜貫通型基質もサイトゾルへ逆行輸送されること、そして逆行輸送と分解が分割できる反応であること (第二のモデル) を示す。我々の報告の後で、Hmg2 (酵母 HMGCoxA-reductase, 8 回膜貫通タンパク質) も、その「全長」がユビキチン化と Cdc48 に依存してサイトゾルへ逆行輸送されることが示された¹⁶⁾。動物細胞において、細胞内のプロテアソームの活性を阻害すると、ユビキチン化された膜タンパク質がサイトゾルでアグリソームという構造を形成することが知られている。これらの結果は、アグリソームが逆行輸送を経て形成される構造であることを示唆する¹⁰⁾。逆行輸送された膜タンパク質がどのような因子と相互作用しているのか、retrotranslocon は必要なのか、そしてプロテアソームへの輸送経路などが今後の検討課題である。

4. 最 後 に

小胞体膜を反応場とした分解系に ERAD という名称がつけられてから、約 13 年になる。この間、主に酵母の遺伝学的解析などによって、関与する因子が次々に同定されてきた。ごく最近になって、試験管内再構成系による解析やプロテオーム解析が始まり、いよいよ反応の全体像が明らかにされつつある。しかしながら、基質の認識や逆行輸送に関わる因子とメカニズム、レトロトランスロコンの実体、基質がユビキチン化された後の経路、個体レベルにおける ERAD の生理的意義など、多くの基本的な問題が未解決のまま残されている。これらの問題を解決することは、最終的に ERAD を制御する技術の開発にもつながっていくと考えられる。

謝辞

本稿の執筆の機会を下さいました先生方、ならびに内容に関するアドバイスを下さいました Jeffrey L. Brodsky 教授に御礼申し上げます。また、字数の制限から、多くの重要な論文を引用できなかったことをお詫びいたします。

1) Mori, K. (2000) *Cell*, 101, 451-454.

- 2) Nakatsukasa, K. & Brodsky, J.L. (2008) *Traffic*, 9, 861-870.
- 3) Vember, S.S. & Brodsky, J.L. (2009) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 944-957.
- 4) Carvalho, P., Goder, V., & Rapoport, T.A. (2006) *Cell*, 126, 361-373.
- 5) Nishikawa, S.I., Kato, Y., Fewell, S.W., Brodsky, J.L., & Endo, T. (2001) *J. Cell Biol.* 153, 1061-1070.
- 6) Quan, E.M., Kamiya, Y., Kamiya, D., Denic, V., Weibezahn, J., Kato, K., & Weissman, J.S. (2009) *Mol. Cell*, 32, 870-877.
- 7) Clerc, S., Hirsch, C., Oggier, D.M., Deprez, P., Jakob, C., Sommer, T., & Aeby, M. (2009) *J. Cell Biol.*, 184, 159-172.
- 8) Hirao, K., Natsuka, Y., Tamura, T., Wada, I., Morito, D., Natsuka, S., Romero, P., Sleno, B., Tremblay, L.O., Herscovics, A., Nagata, K., & Hosokawa, N. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 9650-9658.
- 9) Vashist, S. & Ng, D.T. (2004) *J. Cell Biol.*, 165, 41-52.
- 10) Nakatsukasa, K., Huyer, G., Michaelis, S., & Brodsky, J.L. (2008) *Cell*, 132, 101-112.
- 11) Friedlander, R., Jarosch, E., Urban, J., Volkwein, C., & Sommer, T. (2000) *Nat. Cell Biol.*, 2, 379-384.
- 12) Sekijima, Y., Wiseman, R.L., Matteson, J., Hammarström, P., Miller, S.R., Sawkar, A.R., Balch, W.E., & Kelly, J.W. (2005) *Cell*, 121, 73-85.
- 13) Ravid, T. & Hochstrasser, M. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 679-690.
- 14) Ploegh, H.L. (2007) *Nature*, 448, 435-438.
- 15) Schelhaas, M., Malmström, J., Pelkmans, L., Haugstetter, J., Ellgaard, L., Grünewald, K., & Helenius, A. (2007) *Cell*, 131, 516-529.
- 16) Garza, R.M., Sato, B.K., & Hampton, R. Y. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 14710-14722.

中務 邦雄

(名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻)

Mechanisms of recognition and retrotranslocation of misfolded proteins in the ER-associated degradation
Kunio Nakatsukasa (Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8602, Japan)

骨芽細胞分化と JNK シグナル

1. は じ め に

全身の骨量は、骨芽細胞 (osteoblast) による骨マトリックス産生と、破骨細胞 (osteoclast) による骨吸収のバランスによって調節されることが知られる。骨芽細胞は骨細胞へと分化する過程で種々のマトリックスタンパク質を分泌し、骨組織の石灰化を誘導する。また分化した骨芽

細胞は、各種刺激に反応して細胞表面に RANK ligand (RANKL) を発現し、破骨細胞の持つ RANK を介したシグナルで破骨細胞の分化・活性化を促す。よって、骨芽細胞は骨代謝調節の中心となる細胞であり、その分化機構の解明の意義は大きい。ノックアウト (KO) マウスなどの解析により、骨芽細胞の分化には RUNX2, Osterix (OSX), activating transcription factor 4 (ATF4) などの転写因子が必須の働きをすることが明らかになった。一方、骨芽細胞分化に関わる細胞質内シグナル伝達経路については、まだ不明な点が多い。最近我々は、mitogen activated protein kinase (MAPK) の一種である c-Jun N-terminal kinase (JNK) が骨芽細胞分化後期で重要な役割を果たしていることを見だし、報告した¹⁾。その所見を中心に、骨芽細胞分化機構の概説を行いたい。

2. 骨芽細胞分化の分子機構

骨芽細胞は間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell) から分化すると考えられている。間葉系幹細胞は、骨芽細胞以外にも、軟骨細胞、筋細胞、脂肪細胞などにも分化する。骨芽細胞への分化は、bone morphogenetic proteins (BMPs), insulin-like growth factor 1 (IGF-1), fibroblast growth factor 2 (FGF-2), parathyroid hormone (PTH), tumor necrosis factor- α (TNF- α) などのホルモン・サイトカインや、Wnts,

細胞外マトリックスなどの刺激によって誘導される。間葉系幹細胞から、骨前駆細胞 (osteoprogenitor cell), 前骨芽細胞 (preosteoblast), 骨芽細胞 (osteoblast) と順に分化していき、成熟した骨芽細胞が最終的に骨細胞 (osteocyte) へと変化していく。成熟骨芽細胞はオステオカルシン (OCN) を多量に分泌するようになり、細胞外マトリックスの石灰化による強固な骨マトリックスが形成される (図 1)。

骨芽細胞分化では、各分化段階でタンパク質発現パターンが変化していくのが特徴で、骨分化のマーカーとしても利用されている。骨芽細胞分化前・中期にはアルカリホスファターゼ (ALP) やオステオポンチン (OPN) の発現量が増加し、分化後期には OCN の他、骨シアロタンパク質 (bone sialo-protein: BSP) の発現が誘導される (図 1)。骨芽細胞分化の進行は各種転写因子の働きが重要であることが知られ、RUNX2, OSX, ATF4, Fos などとその代表として挙げられる²⁾。

3. MAPK シグナル伝達と JNK

細胞内シグナル伝達分子の代表的存在である MAPK は、主に extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 キナーゼ, JNK の三つのセリン・スレオニンキナーゼファミリーより構成され、様々な細胞種において、増殖、分化、

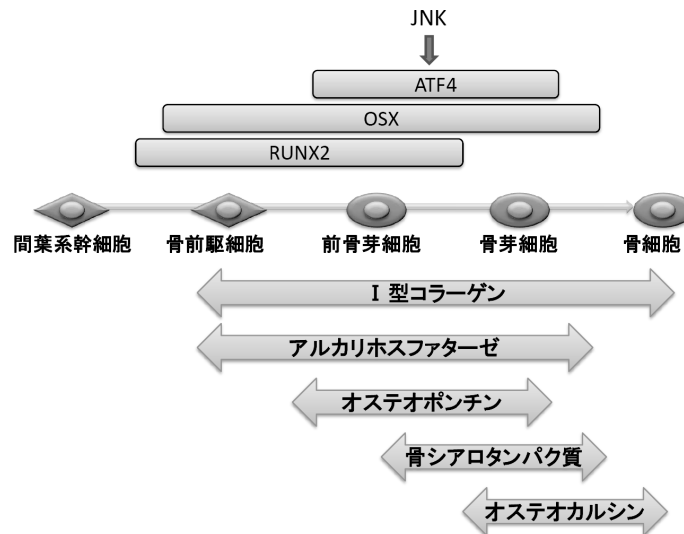


図 1 骨芽細胞分化

各種刺激によって間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化が誘導される。分化各段階で誘導されるタンパク質は骨分化マーカーと呼ばれる (下段)。骨芽細胞分化に必須の幾つかの転写因子が知られる (上段)。JNK シグナルは ATF4 の発現を介して骨芽細胞分化に関与する。

アポトーシスなどの重要な細胞機能の調節を司る。MAPK のキナーゼ活性調節機構は三つのファミリーに共通しており、MAPK 分子の活性化ループに存在するチロシンとスレオニンの二つのアミノ酸残基のリン酸化によってキナーゼの活性化が誘導される。MAPK の活性化を誘導する上流のキナーゼ群を MAPK kinase (MKK) と呼び、それぞれの MAPK ファミリーに優先的に働く数種類の MKK が知られている。一方、MAPK のリン酸化されたアミノ酸を脱リン酸化してそのキナーゼ活性を不活化するホスファターゼ群が知られ、MAPK ホスファターゼ (MKP) と呼ばれる。その基質特異性は様々であり、三つの MAPK ファミリーを広範囲に脱リン酸化するものから、それぞれに特異性の強いものなどが存在する。我々が以前報告した MKP isolated from macrophages (MKP-M/MKP-7/DUSP16) は、JNK に強い基質特異性を示す MKP である³⁾。

JNK には 1/2/3 の三つのアイソフォームが知られる⁴⁾。JNK3 は脳、精巣、心臓などに発現が限られるため、骨組織には JNK1/2 の二つが発現している。JNK1/2 には C 端側の選択的スプライシングによって p46 と p54 の分子量の異なる 2 型が存在する。両者は異なる C 端領域を持ち、その機能的差の可能性にも最近注目が集まっている。

4. JNK と骨芽細胞分化

骨芽細胞分化における JNK シグナルの役割を検討するにあたって、我々はアスコルビン酸とβグリセロリン酸による *in vitro* の骨芽細胞分化実験系を用いた。骨芽細胞の培養モデルとして、マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1、およびマウス新生仔頭頂骨より単離した初代培養骨芽細胞を用いた。

まず MC3T3-E1 に Tet-On システムを導入し、テトラサイクリン刺激により JNK 特異的 MKP である MKP-M の発現を誘導したところ、コントロールと比べて、細胞外マトリックスにおける石灰化結節（アリザリンレッド染色により赤色小粒状に染まり、骨芽細胞最終分化の指標となる）の形成が有意に抑制された（図 2A）。次に JNK の特異的阻害剤である SP600125 で処理を行ったところ、MC3T3-E1 と初代培養骨芽細胞の両系において、阻害剤の濃度依存的に石灰化結節形成の抑制を認めた（図 2B, C）。これらの所見より、JNK 活性が骨芽細胞分化に重要な役割を果たすことが示唆された。

さて、前述のように、骨芽細胞は分化過程でマトリックスタンパク質を始めとする様々なタンパク質を発現していくことから、これらは骨芽細胞分化マーカーとして利用さ

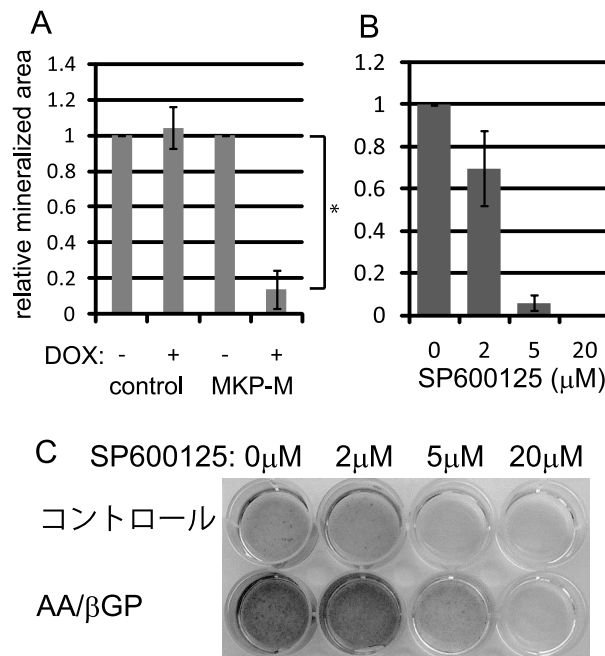


図 2 JNK 活性の抑制による骨芽細胞分化抑制

MC3T3-E1 細胞株を用いた実験系で、Tet-On（ドキシサイクリン添加で発現誘導をかける）による MKP-M の発現誘導 (A) および JNK 特異的阻害剤 SP600125 (B, C) という二つの異なる方法による JNK 活性の抑制によって、骨芽細胞分化を示す石灰化結節形成が抑制された。A, B は石灰化エリヤ面積の定量的解析を、C はアスコルビン酸+βグリセロリン酸 (AA/βGP) 未処理と処理後の実際のアリザリンレッド染色所見を示す。DOX はドキシサイクリン。

れている。JNK 活性が骨芽細胞分化のどの段階で重要であるかを検討する目的で、SP600125 処理による骨分化マーカーの発現パターンの変化を解析した。骨芽細胞分化前・中期に認められる ALP 活性亢進や OPN の遺伝子発現誘導は、MC3T3-E1 と初代培養骨芽細胞の両系において SP600125 処理によって抑制されなかったが、分化後期のマーカーである BSP と OCN の発現誘導は著明に抑制された（図 3A, B）。これらの所見から、JNK 活性は骨芽細胞分化前期でなく、分化後期において必須であることが示唆された。

5. 骨芽細胞分化に関わる転写因子と JNK

次に JNK 活性が骨芽細胞分化に関与する分子機構を解明する目的で、骨芽細胞分化に必須の転写因子の発現量に JNK 活性抑制が与える影響について検討した。骨芽細胞分化に必須の転写因子として最もよく知られるものに RUNX2 と OSX の二つの因子がある。これらの転写因子

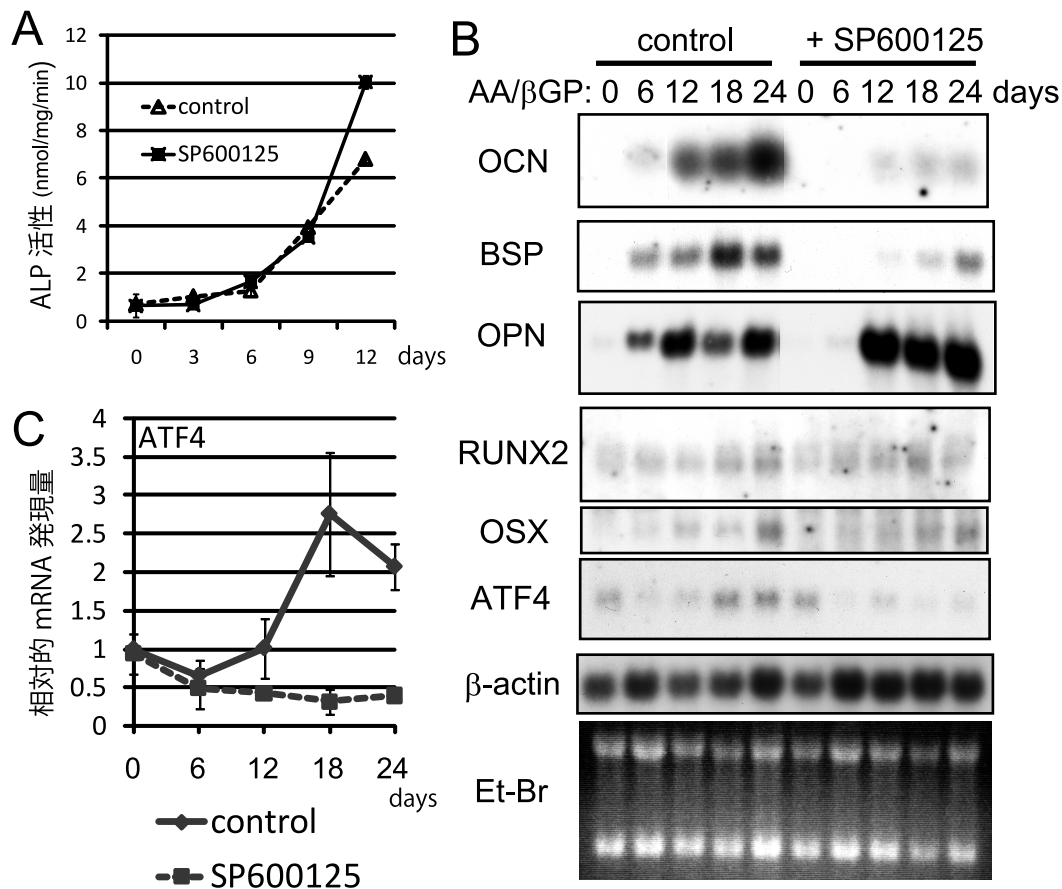


図3 JNK 阻害剤が骨分化マーカーおよび転写因子の発現に与える影響

マウス頭頂骨由来初代培養骨芽細胞を用いた分化誘導実験で、SP600125 処理が ALP 活性(A)と、骨分化マーカーおよび転写因子の遺伝子発現量(B)に及ぼす影響を示す。ATF4 の mRNA の定量的解析をグラフで示した(C)。MC3T3-E1 細胞株を用いた実験でも同様の結果が得られた。

は骨芽細胞分化の比較的早期より発現が認められ、それぞれの遺伝子 KO マウスでは、骨芽細胞分化不全によって骨が形成されない^{5,6)}。我々の行った実験で、JNK の特異的阻害剤による処理では、MC3T3-E1 と初代培養骨芽細胞の両系において、RUNX2、OSX 共にその発現量に変動は見られなかった(図 3B)。

骨芽細胞分化に重要な他の転写因子として ATF4 がある。ATF4 は塩基性ロイシンジッパー構造を含む ATF/CREB ファミリーに属するタンパク質で、その KO マウスは著明な骨石灰化の欠陥と海綿骨の形成不全を示す⁷⁾。ATF4 欠損マウスにおける RUNX2、OSX の発現量に異常はなく⁷⁾、ATF4 の働きはこれらの転写因子を介したものでないことが分かる。ATF4 を欠損した骨芽細胞においては、早期の骨分化マーカーの発現には異常が見られないが、BSP や OCN などの後期の骨分化マーカーの発現は著

明に低下していた⁷⁾。よって、RUNX2 や OSX と異なり、ATF4 は骨芽細胞分化後期に特異的に働く転写因子と考えられる。我々の実験系において、ATF4 発現量は MC3T3-E1 と初代培養骨芽細胞の両系で骨芽細胞分化中期に亢進し、JNK 特異的阻害剤による処理で著明に抑制されることを見いだした(図 3B, C)。以上の所見から、JNK 活性は、骨芽細胞分化中期の ATF4 発現誘導を介して、それ以降の骨芽細胞分化に重要な役割を果たすという構図が考えられた(図 1)。

6. 骨芽細胞分化に関わる JNK のアイソフォーム

前述のように、骨芽細胞における JNK には、JNK1/2 および p46/p54 の異なったアイソフォームが存在する。RT-PCR 法による解析で、マウス骨芽細胞では p46JNK1 と p54JNK2 の 2 型が主体で、他に少量の p46JNK2 が発現

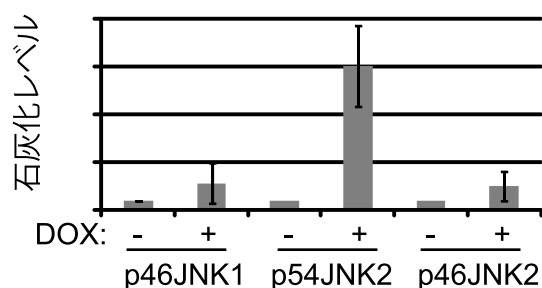


図4 各 JNK アイソフォームの強発現誘導が骨芽細胞分化に与える影響

MC3T3-E1 細胞株を用いた分化実験系で、Tet-On(ドキシサイクリン添加で発現誘導をかける)による各 JNK アイソフォームの強発現誘導が、アスコルビン酸+β グリセロリン酸(AA/βGP)処理による石灰化結節形成に与えた影響を定量的に示した。

していることを確認した。p54JNK1 は検出限界以下であった¹⁾。骨芽細胞に発現する三つの JNK アイソフォームの骨芽細胞分化への関与の違いを検討するために、Tet-On 発現誘導システムを用いて、MC3T3-E1 に p46JNK1, p54JNK2, p46JNK2 のそれぞれの強発現を誘導し、石灰化結節形成への影響を解析した。図4に示すように、p54JNK2 強発現によって骨芽細胞分化は促進したが、他のアイソフォームによる影響は認められなかった。よって p54JNK の C 端のアミノ酸配列が骨芽細胞分化に重要な役割を果たしている可能性が示唆され、現在その詳細なメカニズムについて検討中である。

7. 骨芽細胞分化と ERK シグナル

ERK シグナルの骨芽細胞分化における役割については、幾つかの研究室によって検討されているが、その評価は一定していない。例えば、MC3T3-E1 や MLO-A5 といった骨芽細胞株の分化は ERK シグナルの特異的阻害剤で促進されるとの報告がある⁸⁾。一方、恒常的活性型 ERK1 の強発現は、*in vitro*, *in vivo* 両系において骨芽細胞の分化を促進するとされた⁹⁾。我々の実験系でも、ERK シグナルの特異的阻害剤である U0126 は、MC3T3-E1 細胞株の石灰化結節形成を促進したが、逆に初代培養骨芽細胞の石灰化は著明に抑制された。これらの一定しない結果の理由は現時点で不明であるが、ERK シグナルの骨芽細胞分化に関わる役割が、骨芽細胞分化の各段階で異なっている可能性も考えられ、今後のより詳細な検討が必要になると思われる。

8. おわりに

高齢化社会に伴い、骨粗鬆症、慢性関節リウマチ、歯周病などの慢性の骨代謝異常を呈する疾患のコントロールの重要性が増している。骨代謝のキープレイヤーである骨芽細胞の機能調節に関わる治療標的分子の同定は、今後臨床医学における重要性を増すと考えられる。同時に、骨芽細胞分化の分子機構のよりよい解明は、再生医療の観点からも注目される領域といえる。このミニレビューが今後の骨芽細胞研究発展の一助にでもなれば幸いである。

- 1) Matsuguchi, T., Chiba, N., Bandow, K., Kakimoto, K., Masuda, A., & Ohnishi, T. (2009) *J. Bone Miner. Res.*, 24, 398-410.
- 2) Komori, T. (2008) *Front. Biosci.*, 13, 898-903.
- 3) Matsuguchi, T., Musikachoen, T., Johnson, T.R., Kraft, A.S., & Yoshikai, Y. (2001) *Mol. Cell. Biol.*, 21, 6999-7009.
- 4) Waetzig, V. & Herdegen, T. (2005) *Trends Pharmacol. Sci.*, 26, 455-461.
- 5) Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S., & Kishimoto, T. (1997) *Cell*, 89, 755-764.
- 6) Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., & de Crombrughe, B. (2002) *Cell*, 108, 17-29.
- 7) Yang, X., Matsuda, K., Bialek, P., Jacquot, S., Masuoka, H.C., Schinke, T., Li, L., Brancorsini, S., Sassone-Corsi, P., Townes, T.M., Hanauer, A., & Karsenty, G. (2004) *Cell*, 117, 387-398.
- 8) Kono, S.J., Oshima, Y., Hoshi, K., Bonewald, L.F., Oda, H., Nakamura, K., Kawaguchi, H., & Tanaka, S. (2007) *Bone*, 40, 68-74.
- 9) Ge, C., Xiao, G., Jiang, D., & Franceschi, R.T. (2007) *J. Cell. Biol.*, 176, 709-718.

松口 徹也

(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科口腔生化学講座)

JNK signaling in osteoblast differentiation

Tetsuya Matsuguchi (Department of Oral Biochemistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8544, Japan)