

様 式 F - 7 - 1

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成24年度）

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学
3. 研究種目名 基盤研究(C) 4. 補助事業期間 平成23年度～平成25年度
5. 課題番号

2	3	5	9	2	2	1	4
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題 破骨細胞における新規DAP12会合受容体の機能解析

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
3 0 2 9 4 2 8 4	キタガワ ノリヒロ 北川 教弘	バイオサイエンス研究科	助教

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

本申請では破骨細胞における新規DAP12会合受容体Siglec-15の骨代謝における意義、またその作用機序をin vivoおよびin vitroで明らかにすることを目標とする。Siglec-15には酵素活性領域を有していないことから、その機能には他タンパク質との会合が重要であると考えられる。実際に破骨細胞抽出液をNative-PAGEにより分離し抗Siglec-15抗体でウェスタンブロットした結果から、Siglec-15は約250kDaの複合体を形成していることが示唆された。そこでHis6タグおよびFLAGタグをタンデムにC末端に付加したSiglec-15を破骨細胞に強制発現させ、その細胞抽出液からNi-NTAレジンならびに抗FLAG抗体ビーズを用いたアフィニティー精製によりSiglec-15複合体を精製した。精製したタンパク質群を質量分析法により解析した結果、DAP12とともに新規Siglec-15会合タンパク質SBP1（仮称）の同定に成功した。Siglec-15とSBP1の会合様式について検討した結果、SBP1との会合に必要なアミノ酸配列がSiglec-15の細胞質内領域にあることを見出した。さらに本配列を欠失したSiglec-15変異体はSiglec-15遺伝子欠損マウス由来破骨細胞の表現型を回復し得ないことからSiglec-15の機能にはSBP1との会合が必要であることが強く示唆された。

10. キーワード

- | | | | |
|-------------|----------|---------|------------|
| (1) 骨・軟骨代謝学 | (2) 破骨細胞 | (3) 骨吸収 | (4) NFATc1 |
| (5) ITAM | (6) | (7) | (8) |

11. 現在までの達成度

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

本年度はSiglec-15遺伝子欠損マウスの骨代謝ならびに骨組織の解析は未だなしえていない。これはノックアウトマウス作成時に129系由来ES細胞を用いたため、得られる遺伝子改変マウスの遺伝的背景が通常解析に用いられるC57BL/6とは異なるため戻し交配を行う必要があるためであり、想定内である。また平成24年度中にほぼ十分な戻し交配を完了しており、本解析は平成25年度中に行い得る。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

1. Siglec-15の細胞外領域、内在性DAP12との会合し得ないK272A変異を持つ膜貫通領域、およびSBP1会合領域と、DAP12細胞質内領域を融合させたキメラタンパク質発現ベクターを構築する。本ベクターをまずSiglec-15遺伝子欠損マウスから調製した破骨前駆細胞に遺伝子導入し、Siglec-15の機能を代償し得るかをin vitro実験系において検討する。本キメラタンパク質がシアル酸認識能に必須なV-setドメインおよびITAM依存的にSiglec-15の機能を代償することが示された場合、破骨細胞特異的のプロモーター(catepsinK遺伝子やTRAP遺伝子)制御下で発現するトランスジェニックマウスを樹立する。

2. Siglec-15遺伝子欠損マウスの樹立を行い、骨形態計測や骨代謝マーカーの測定を行うことで、Siglec-15遺伝子の生理的条件下における意義を検討する。本マウスが骨吸収低下に伴う骨量増加を示した場合、1.で作成した、Siglec-15/DAP12キメラトランスジェニックマウスをSiglec-15遺伝子欠損マウスと交配し、これらマウスの骨代謝や骨組織を検討することにより、Siglec-15が破骨細胞における重要なDAP12会合受容体として機能するのかについて検討する。

(次年度の研究費の使用計画)

平成24年度に未使用額が生じた要因は、研究の進捗状況に合わせ予算執行計画を変更したことに伴うものである。特にSiglec-15遺伝子欠損マウスの骨形態計測ならびに骨代謝の評価するためには当マウスの遺伝的背景をC57BL/6に純化する必要があり、本解析を次年度に繰り越したことが大きな要因の一つである。

次年度の請求額と合わせての執行計画は以下のとおりである。Siglec-15遺伝子欠損マウスの骨組織および骨代謝の解析のために骨形態計測委託費や骨代謝マーカー測定キットなどの消耗品の購入、本マウス系統維持のための凍結サービスに使用する。細胞培養や生化学・分子生物学的手法における消耗品や試薬・酵素類を購入する。また研究成果発表のための雑誌投稿料ならびに学会参加費とその旅費に予算を執行する。

13.研究発表(平成24年度の研究成果)

〔雑誌論文〕計(3)件 うち査読付論文 計(3)件

著者名		論文標題【掲載確定】			
Nitta M, Imamura M, Inoue Y, Kunitomo Y, Lin ZY, Ogawa T, Yogo K, Ishida-Kitagawa N, Fukunaga N, Okano H, Sato E, Takeya T, Miyoshi J		Aberrant gene expression and sexually incompatible genomic imprinting in oocytes derived from XY mouse embryonic stem cells in vitro.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
PLoS One	有	8	2 0 1 3	-	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1371/journal.pone.0058555					

著者名		論文標題【掲載確定】			
Komeda C, Ikeda A, Kikuchi J, Ishida-Kitagawa N, Tatebe H, Shiozaki K, Akiyama M.		photo-triggerable drug carrier based on cleavage of PEG lipids by photosensitiser-generated reactive singlet oxygen.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Org Biomol Chem	有	11	2 0 1 3	2567-70	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1039/c2ob27199k					

著者名		論文標題【掲載確定】			
Ishida-Kitagawa N, Tanaka K, Bao X, Kimura T, Miura T, Kitaoka Y, Hayashi K, Sato M, Maruoka M, Ogawa T, Miyoshi J, Takeya T		Siglec-15 protein regulates formation of functional osteoclasts in concert with DNAX-activating protein of 12 kDa (DAP12).			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
J Biol Chem	有	287	2 0 1 2	17493-502	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1074/jbc.M111.324194					

〔学会発表〕計(1)件 うち招待講演 計(0)件

発表者名	発表標題【発表確定】	
北川(石田)教弘、小川拓哉	破骨細胞における新規DAP12会合受容体Siglec-15の機能解析	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本骨代謝学会	2013年07月21日	東京都新宿区

〔図書〕計(0)件

著者名	出版社		
書名	発行年	総ページ数	

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取得〕計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15.備考

A large, empty rectangular box with a black border, intended for writing preparation notes. It occupies the upper half of the page.