

博士論文

パーキンソン病病態と関連した破骨細胞分化を促進する

新たな脱ユビキチン化経路の同定

千葉 満生

令和3年度提出

東北大学

目次

要約.....	3
緒言.....	5
材料および方法.....	10
1. 細胞培養.....	10
2. Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) 染色.....	11
3. 遺伝子発現解析.....	11
4. ウェスタンブロット解析.....	12
5. 免疫沈降法.....	13
6. <i>UCHL1</i> ノックアウト細胞株の作製.....	14
7. <i>UCHL1</i> 自然変異型 <i>gad</i> マウスからの破骨細胞培養.....	15
8. マウス骨形態計測.....	16
9. <i>UCHL1</i> 結合タンパク質の同定.....	16
10. RAW-D 細胞内ユビキチン化タンパク質の同定.....	16
11. 実験データの統計的処理.....	17
結果.....	18
1. <i>gad</i> マウス骨組織解析.....	18
2. <i>gad</i> マウス由来骨髄前駆細胞を用いた破骨細胞分化誘導解析.....	18
3. <i>gad</i> マウス由来骨髄前駆細胞における破骨細胞マーカー発現解析.....	19
4. <i>UCHL1</i> ノックアウト RAW-D 細胞の作製と破骨細胞分化誘導解析.....	19
5. <i>UCHL1</i> ノックアウト RAW-D 細胞における破骨細胞分化マーカー発現解析.....	20
6. <i>UCHL1</i> と相互作用する破骨細胞分化関連タンパク質の探索.....	20
7. <i>gad</i> マウス由来骨髄前駆細胞ならびに <i>UCHL1</i> ノックアウト RAW-D 細胞における Akt リン酸化状態の解析.....	21
8. <i>UCHL1</i> 依存的な Akt1 不活性化に寄与する脱ユビキチン化の解析.....	22

考察.....	23
図および解説.....	28
参考文献.....	36
謝辞.....	39

要約

歯科領域における骨再生分野では歯周組織を対象とした様々な医療技術が開発されている一方、骨吸収の詳細な分子メカニズムについては不明な点が多く残されている。本研究では、パーキンソン病と易骨折性の相関に着目し、新たな骨リモデリングシステムの解明を目的としてパーキンソン病原因遺伝子である *UCHL1* を解析の対象とした。*UCHL1* 遺伝子産物である UCHL1 タンパク質は、脱ユビキチン化酵素のひとつとして知られている。タンパク質のユビキチン化を介するタンパク質恒常性の維持は様々な生命現象を制御する主要な細胞内プロセスであり、骨代謝関連シグナル伝達にも重要である。本研究では、UCHL1 脱ユビキチン化酵素による破骨細胞分化制御の可能性について、*UCHL1* 欠損マウスと *UCHL1* ノックアウト破骨細胞前駆細胞を用いて解析した。

本研究で得られた知見を以下に示した。(1) *UCHL1* 欠損パーキンソン自然発症型のモデルマウスである *gad* マウスの骨組織解析から、破骨細胞数の上昇に伴う骨吸収の促進が認められた。(2) *UCHL1* ノックアウト破骨細胞前駆細胞 RAW-D 細胞株および、*gad* マウス由来骨髄前駆細胞から破骨細胞を分化誘導し、多核化した破骨細胞数を計測した結果、多核化巨細胞の割合が増加していた。このことから、UCHL1 の欠失が多核化破骨細胞分化を促進することが示唆された。

(3) *UCHL1* ノックアウト RAW-D 細胞ならびに *gad* マウス由来細胞において、破骨細胞分化誘導後に高い破骨細胞分化マーカー遺伝子の発現が観察された。

(4) UCHL1 基質探索を目的としたプロテオーム解析から、基質候補タンパク質として Akt1 に着目し解析した。*gad* マウス由来細胞および *UCHL1* ノックアウト RAW-D 細胞で、RANKL 依存的な Akt1 活性の増大および Akt 下流シグナルの誘導が確認されたほか、UCHL1 が Akt1 タンパク質脱ユビキチン化を介して

Akt の活性を負に調節することが示唆された。これらの知見は、過剰な骨吸収を伴う骨疾患発症機序を解明し、破骨細胞の分化抑制を主軸とした骨再生療法を確立していくうえで、UCHL1 機能欠損に伴い活性化する骨吸収促進シグナルが重要な治療標的の一つとなり得ることを示している。

緒言

骨再生は歯周組織の再生に関連した歯科における重要な研究課題の一つである。骨形成不全症などの骨代謝異常や免疫異常症などでは重度の歯周組織の破壊が生じることが知られており、これら疾患をモデルとして歯科分野においても骨再生に必要な様々な医療技術の開発が行われてきた。今回我々は骨粗鬆症とパーキンソン病との相関の可能性に着目し、パーキンソン病を対象とした疾患モデルの解析を通じて、歯科再生から、さらには全身疾患としての骨粗鬆症発症分子メカニズムの解明を目的とした解析を行うこととした。

パーキンソン病は黒質ドーパミン神経細胞の変性を主体とする神経変性疾患で、安静時振戦、筋強剛、無動・寡動、姿勢反射障害を4大症状とする。また運動機能不全により転倒の機会の増加、それに伴う骨折の可能性も高くなっている。注目すべき点として、1回の転倒に対する骨折確率が一般人と比較して、パーキンソン病患者で高いことが分かっている (Pouwels et al., 2013)。その原因の一つとして運動不全に伴う続発性骨粗鬆症の可能性が考えられるが、その一方で運動障害のあまり見られないパーキンソン病患者においても易骨折性が指摘されている (Malochet-Guinamand et al., 2015)。このことから、パーキンソン病の病態と骨粗鬆症に何らかの共通因子があることが統計的に示唆されているが、その分子メカニズムは明らかでない。推測される骨密度の低下の原因としては、(1) 破骨細胞の数の増加・破骨細胞の活性上昇による骨吸収の亢進と、(2) 骨芽細胞数の減少・骨芽細胞の活性低下による骨形成の減少などが考えられるが、現在のところその詳細は不明である。このような背景から、今回我々は、パーキンソン病患者で観察される骨粗鬆症様の症状の予防や、骨折の治癒、そして最終的には骨再生への応用を目的として解析を進めることとした。これまで報告のあ

るパーキンソン病関連遺伝子群の中から、骨代謝制御に関与する分子を見出すため、骨組織の形成や機能に相関することが示唆されている分子として、UCHL1 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1) に着目した。UCHL1 は脳の可溶性タンパク質の約 1-5% を占める神経細胞マーカーとして知られ、パーキンソン病患者のニューロンに沈着する Lewy 小体にユビキチンと共に沈着していることが報告されている (Choi et al., 2004; Maraganore et al., 2004; Wilkinson et al., 1989; Xia et al., 2008)。これまでの報告から、UCHL1 は脱ユビキチン化酵素に分類されているが (Bishop et al., 2016; Larsen et al., 1998)、遺伝性のパーキンソン病患者の家系では、UCHL1 のミスセンス変異 (I93M) がパーキンソン病の原因の一つと考えられており、I93M 変異に伴った UCHL1 脱ユビキチン化酵素活性の低下が観察されている (Leroy et al., 1998)。

タンパク質ユビキチン化はユビキチン・プロテアソーム系 (Ubiquitin-proteasome system : UPS) を介して制御されており、代謝・免疫・細胞増殖など様々な細胞機能に関わっている (Komander and Rape, 2012)。UPS は、E1 (ユビキチン活性化酵素)、E2 (ユビキチン連結酵素)、E3 (ユビキチンリガーゼ) の 3 種類の酵素のカスケード反応により構成されており、標的タンパク質に小分子タンパク質ユビキチンを付加することで、ユビキチン化基質タンパク質の分解促進や、活性・局在を調節に関与し、タンパク質恒常性維持や細胞内シグナル伝達調節に寄与している (Hershko and Ciechanover, 1998)。多彩な生命現象に関わる UPS のユビキチン修飾は、様々な分子メカニズムにより精巧に制御されているが、その調節機構の一つとして、標的タンパク質に付加されるポリユビキチン鎖の多様性が UPS 細胞機能調節に重要であることが報告されている (Mevissen and Komander, 2017)。ユビキチンは分子中の異なる 7 つのリジン残基及び 1st メチオニン (K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63、M1) を介して連結し鎖状に伸長

することから、8種類のポリユビキチン鎖重合様式が存在する。ユビキチン結合タンパク質のいくつかはデコーダー分子として機能し、それら異なるユビキチン鎖への選択的な結合を介して、ユビキチン化タンパク質の運命や機能を決定する。主要なポリユビキチン修飾様式として K48 結合型と K63 結合型が知られており (Mevisse and Komander, 2017)、K48 結合型は修飾を受けたタンパク質の分解を促進する一方で、K63 結合型はタンパク質の活性や局在調節によるシグナル伝達調節に重要である。UPS はその機能の重要性から、関連分子の異常が、がんや神経変性疾患、免疫疾患など様々な病態の要因となっており、創薬の標的としても注目されている (Huang and Dixit, 2016)。UPS 関連シグナル制御の試みとして、E1/E2/E3 それぞれを選択的に阻害する低分子化合物の開発が行われている一方で、タンパク質分解を担当するプロテアソームの活性を直接阻害する化合物が UPS 研究に汎用されており、臨床応用も進められている (Park et al., 2018)。

E3 リガーゼにより触媒されるユビキチン化は、脱ユビキチン化酵素依存的なユビキチン鎖加水分解反応によりユビキチン鎖修飾を受けたタンパク質からユビキチン鎖を除去する可逆反応である (Clague et al., 2019)。脱ユビキチン化酵素はヒトゲノム上に約 90 種類が報告されているが、その異常が様々な疾患に関わっていることが近年明らかになりつつあるなかで、それら脱ユビキチン化酵素の活性阻害を目的とした分子標的薬の開発が進められている (Clague et al., 2019; Harrigan et al., 2018)。脱ユビキチン化酵素は、プロテアーゼドメイン構造から Ubiquitin-specific protease (USP)、Ubiquitin C-terminal hydrolase (UCH)、Otubain protease (OTU)、Machado-Joseph disease protease (MJD)、JAMM (JAB1/MPN/Mov34 metalloenzyme) の 5 つのファミリーに分類される (Nijman et al., 2005)。UCH ファミリーに分類される UCHL1 は、脳で特に高い発現が認められる脱ユビキチン化

酵素であるが、その生理機能に関する詳細は未解明な点が多く、UCHL1 の基質認識に関する生化学的な知見も乏しい。このような背景から、生理的な基質の同定が進められており、UCHL1 機能解明の手がかりとなることが期待されている (Bishop et al., 2016)。

本研究で着目したパーキンソン病は、神経難病指定疾患の中ではアルツハイマー病に次いで多い疾患である。パーキンソン病と骨代謝との相関については、前述のように臨床的に易骨折性や骨粗鬆症との関連が示唆されてきているが (Malochet-Guinamand et al., 2015; Pouwels et al., 2013)、その分子的な基盤は明らかとされていない。遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子としては、UCHL1 を含めおよそ 18 種類が報告されている (Klein and Westenberger, 2012)。特にヒトの分子病態を支持する疾患モデルとして、UCHL1 を欠失する *gracile axonal dystrophy* (GAD) マウスが知られている。本マウスは、ポジショナルクローニングにより 5 番染色体上の *Uchl1* が責任遺伝子として同定された常染色体潜性遺伝の逆行性神経軸索変性モデルマウスであり、パーキンソン病自然発症型モデルとして解析に用いられている (Saigoh et al., 1999)。注目すべきことに、*gad* マウス骨形態解析から、本マウスの骨密度が有意に減少していることが報告され (Shim et al., 2008)、UCHL1 が骨代謝制御に関与している可能性が示唆されている。しかし骨組織における UCHL1 の役割に関する知見はこれまで全く得られていないことから、本研究では、UCHL1 の骨組織における役割と骨粗鬆症発症への関与を分子レベルで解明することを目的として、以下 3 つの実験項目を設定した。

(1) *UCHL1* 欠損パーキンソン病自然発症型モデルマウス (*gad* マウス) の骨の組織学的解析を行う。(2) UCHL1 の脱ユビキチン化活性が破骨細胞分化に及ぼす影響を解析する。(3) 破骨細胞分化プロセスに関与する UCHL1 の基質を同定し、破骨細胞分化関連細胞内シグナル経路を明らかとする。これらの解析か

ら、*in vivo* レベルで得られた表現型を分子レベルで俯瞰し、UCHL1 がどのようにして骨代謝を制御するか、その詳細な分子メカニズムの解明に取り組んだ。

材料および方法

1. 細胞培養

ヒト胎児腎細胞株 293T 細胞、マウスマクロファージ由来細胞株 RAW-D 細胞 (Kukita et al., 2004; Watanabe et al., 2004) は、10%ウシ胎児血清 Fetal Bovine Serum (FBS、Equitech-Bio、160418-03)、100 U/mL Penicillin-100 mg/ml Streptomycin (Nacalai tesque、09367-34) 添加 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Nacalai tesque、08459-64) を用いて 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。破骨細胞分化誘導実験では、RAW-D 細胞を 3.0×10^4 cells/well となるように 96 well plate に播種し、50 ng/mL Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) 添加培地で 3 日間培養することで破骨細胞分化を誘導した。遺伝子導入は Polyethylenimine (PEI) 法を用いた (Longo et al., 2013)。細胞は遺伝子導入当日に 50~70%コンフルエントになるように 6 cm ディッシュに前日播種した。無血清 DMEM 700 μ L にプラスミド DNA 3 μ g と PEI (1 μ g/mL in water) 9 μ g を添加ののち混和、15 分間静置し、細胞培養液中に滴下した。細胞は 48 時間培養したのち回収し、各種解析に供した。HA-UCL1 遺伝子導入用レンチウイルスパッケージングの際の遺伝子導入には PEI 法を、パッケージング細胞には 293T 細胞を用いた。ウイルストランスファープラスミド 2 μ g、VSVG エンベロープ発現プラスミド 1 μ g、Gag/Pol パッケージングプラスミド (Δ 8.9) 2 μ g と PEI 15 μ g を無血清 DMEM 1 mL 中で混和、15 分間静置し、293T 細胞培養液中に滴下した。遺伝子導入 24 時間後からウイルス含有培養上清を 24 時間おきに 72 時間後まで計 3 回、回収した。培養上清はその後、0.45 μ m フィルターを通して浮遊細胞等を除去し、感染実験に用いた。レンチウイルスによる標的細胞への遺伝子移入は、12 時間のウイルス含有培養上清処理を 2 サイクル繰り返し、その際 Polybrene (0.8 mg/mL) を終濃度 4 μ g/mL となるようにウイルス液に添加した。感染終了後に細胞を完

全培地中で 24 時間培養した。その後 Hygromycin 含有の選択培地に播種し、3 日から 2 週間培養することで、HA-UCHL1 安定発現株を作製した。

2. Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) 染色

マウス骨髄由来細胞と RAW-D 細胞を用いて、破骨細胞マーカー TRAP の活性染色を指標とした破骨細胞分化の評価を行った。はじめに細胞を生理食塩水で洗浄し、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (Wako) で 5 分間固定した。その後、再度生理食塩水で洗浄し、エタノール/アセトン (50:50 v/v) で透過処理した細胞を再び洗浄、TRAP 染色液を加えて染色した。染色は、TRAP Buffer ; 40 mM Sodium Acetate, 50 mM Sodium Tartrate (pH 5.0)、Naphthol AS-MX Phosphate 、N,N-Dimethylformamide、Fast Red Violet LB Salt を組成とする染色液を用いた。

3. 遺伝子発現解析

Total RNA は RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて回収および抽出を行った。逆転写反応には、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO, FSQ-301) を用いて、以下の手順で行った。Total RNA 1 μg を 65 °C で 5 分間変性後、氷上で急冷し、Master Mix を加えて 37°C で 15 分間逆転写反応を行い、cDNA を合成した。反応液は 98°C で 5 分間加熱して酵素を失活させ、定量的 Real-time (RT)-PCR 反応の鋳型として使用した。逆転写反応液を SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems, 4472908)、PCR プライマーと混合し、RT-PCR (Applied Biosystems 7500 RT PCR システム) により解析の対象とする mRNA 発現の検出および定量を行った。PCR 反応の設定条件は 50°C 2 分 1 cycle、90°C 2 分 1 cycle、(95°C 15 秒および 60°C 1 分) 40 cycle とした。使用したプライマーの配列を以下に示した。

<i>GAPDH (Human and mouse)</i>	<i>Forward primer</i>	<i>TCCTGCACCACCAACTGCTTA</i>
	<i>Reverse primer</i>	<i>AGTGATGGCATGGACTGTGGT</i>
<i>Acp5(TRAP) (Mouse)</i>	<i>Forward primer</i>	<i>CACTCCCACCCTGAGATTTGT</i>
	<i>Reverse primer</i>	<i>CATCGTCTGCACGGTTCTG</i>
<i>Ctsk (Mouse)</i>	<i>Forward primer</i>	<i>GAAGAAGACTCACCAGAAGCAG</i>
	<i>Reverse primer</i>	<i>TCCAGGTTATGGGCAGAGATT</i>
<i>Mmp9(Mouse)</i>	<i>Forward primer</i>	<i>CTTCTGGCGTGTGAGTTTCCA</i>
	<i>Reverse primer</i>	<i>ACTGCACGGTTGAAGCAAAGA</i>

4. ウェスタンブロット解析

遺伝子導入または薬剤処理した細胞を、プロテアーゼ阻害剤 (Complete : Roche, 11873580001) と脱リン酸化酵素阻害剤 (PhoSTOP ; Roche, 04906837001) を添加した EBC Lysis Buffer (50 mM Tris pH 7.5, 120 mM NaCl, 0.5% NP-40) で回収した。細胞溶解液を遠心 (15,000rpm, 4°C, 15 分) して不溶性画分を分離し、上清を回収した。サンプルタンパク質定量には、ブラッドフォードタンパク質アッセイ (Bio rad, 5000006JA) を用いた。細胞溶解液 40-80 µg を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 用ゲル中で、120V 定電圧で 80 分間泳動し、展開したタンパク質を PVDF メンブレン (Millipore, 162-0184) 上に 500 mA 定電流で 150 分間転写した。転写後のメンブレンは 5% スキムミルク/TBST (10 mM Tris pH8.0, 138 mM NaCl, 0.05% Tween20) 中でブロッキングした後、各種 1

次抗体溶液に浸し、4°Cで一晩振盪した。TBST で 10 分間 4 回洗浄し、5% スキムミルク/TBST 中に調製した 2 次抗体溶液 (Sigma-Aldrich, HRP 標識抗マウス 2 次抗体 A-4416, HRP 標識抗ラビット 2 次抗体 A-4914, 1:4000) を用いて、室温で 1 時間振盪した。TBST で 10 分間 4 回の洗浄を行い、Immobilon (Millipore, WBKLS0500) 化学発光検出試薬でメンブレンを処理し、ケミルミイメーキングシステム (Vilber Lourmat, FUSION-FX6.EDGE) を用いてメンブレン上のタンパク質を検出した。使用した一次抗体を以下に示した。

Anti-UCHL1(Rabbit)	14730-1-AP	Proteintech
Anti-GST	2625S	Cell Signaling Technology
Anti-AKT1	2920S	
Anti-p-AKT1 T308	13038S	
Anti-p-AKT1 S473	4060S	
Anti-p-FOXO1/O3a	9464S	
Anti-Vinculin	sc-73614	
Anti-HA (mouse)	sc-7392	
Anti-HA (rabbit)	sc-805	
Anti-Flag (mouse)	018-22381	Wako Pure Chemical Industries
Anti-Flag (rabbit)	PM020	MBL
Anti-Myc	562	
Anti-Tubulin	T9026-2ML	SIGMA

5. 免疫沈降法

遺伝子導入 48 時間後の 293T 細胞を 200 μ L の EBC Lysis Buffer で回収し、15000 rpm \cdot 15 分の遠心により不溶性画分を除去した後、細胞溶解液上清のタンパク質定量を行った。サンプルを 1 mg/600 μ L になるように EBC Lysis Buffer で調整し、8 μ L のアガロースビーズ (Wako pure Chemical Industries, 抗 DYKDDDDK [Flag])

抗体ビーズ 012-22781, 抗 HA 抗体ビーズ 014-23081) を添加し、ローテーターを用いて 4°C で約 12 時間攪拌した。攪拌後は、6000 rpm・15 秒の遠心によりアガロースビーズを沈降させたのち、氷冷したビーズ洗浄用バッファー (20 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40) 1 mL を加えて洗浄し、遠心後、上清のみ吸引した。計 5 回の洗浄操作後、1× SDS サンプルバッファー 50 μL を加え、95°C で 5 分間加熱してタンパク質をビーズから溶出させ、ウエスタンブロット解析によりタンパク質相互作用の評価を行った。

6. *UCHL1* ノックアウト細胞株の作製

ノックアウト細胞株の作製には、CRISPR-Cas9 システムを用いた。*UCHL1* ノックアウト用ガイド RNA は Optimized CRISPR Design (<http://crispr.mit.edu>) のアルゴリズムを利用して設計した。合成したオリゴ DNA をアニーリングののち、pLentiCRISPRv2-Puromycin ベクターの制限酵素サイトに挿入した。ノックアウトプラスミド遺伝子導入には PEI 法を用いた。RAW-D 細胞を遺伝子導入当日に 50% コンフルエントになるように 10 cm ディッシュに前日播種した。無血清 D-MEM 700 μL にプラスミド 7 μg と PEI (1 μg/mL in water) 21 μg を添加ののち混和、15 分間静置し、細胞培養液中に滴下した。12 時間後に培養液を完全培地に交換し、48 時間培養した。その後、*UCHL1* ノックアウト細胞株は Puromycin (2 μg/mL) 含有の選択培地中で 1 週間培養したのち、96 well プレートに 0.8 cell/well になるように Puromycin を含まない培地に播種して Single cell をクローニングし、ウエスタンブロット解析により KO 細胞株を選別した。

7. UCHL1 自然変異型 *gad* マウスからの破骨細胞培養

Uchl1 遺伝子を欠損した自然変異型 *gad* マウス (*gad/gad*) (国立精神・神経医療研究センター 神経研究所、和田圭司先生より譲受) はヘテロマウスの状態でラインを維持し、ヘテロ同士の交配で得られたホモマウスを解析に用いた。コントロールには、同腹の野生型マウスを用いた。動物の飼育は、東北大学動物実験委員会が定める動物実験規定に従った。マウス *genotyping* に用いたプライマーの配列を以下に示した。

<i>UCHL1</i>	Forward Primer	ATCCAGGCGGCCCATGACTC
	Reverse Primer1	GAGCTCGTACAGATGGCCGT
	Reverse Primer2	AGCTGCTTTGCAGAGAGCCA

gad マウスからの骨髄由来細胞の採取と培養は以下の手順に従った。生後 6-8 週齢のマウス 3 匹から脛骨および大腿骨を切り出し、表面を PBS で洗浄した後、10 mL の α -MEM 培地に浸し 25 G の注射針で培地を骨髄内側に注入し細胞を採取した。40 μ M セルストレイナーを通した培地を 50 mL チューブ中に採集し、1500 rpm で 5 分間遠心して細胞を沈殿させ、上清を取り除き Red cell lysis buffer を 5 mL 添加して 5 分間静置し、赤血球を溶解した。1500 rpm で 5 分間遠心して上清を除去した後、再度新鮮な培地 10 mL を加えて Non-treated 10 cm プレートに 100 ng/mL となるように M-CSF を添加して細胞を播種し、2 日間培養した。培養 2 日後に培地を除去した 10 cm プレートを PBS で洗浄した後、1 mM EDTA PBS を 5 mL 加えて、37°C で 20 分間インキュベートした。培地 5 mL を加え、セルリフターで細胞を剥離し 50 mL 遠心管に採取した。1500 rpm で 5 分遠心したのち、培地を吸引して新しい培地を添加し、 1.0×10^5 cells/mL の細胞濃度に希釈した。RANKL を 50 ng/mL、M-CSF を 30 ng/mL となるように添加し、各種プレートに播種し 3~4 日間培養することで細胞を増殖させ分化誘導実験に用いた。

8. マウス骨形態計測

生後 12 週齢のマウス 6 匹から脛骨を切り出し、筋組織および結合組織を除去した後 70% エタノール中に一晚 4°C で振盪させ浸漬固定を行った。翌日エタノールを交換し 1 週間浸漬固定を行った後、脛骨二次海綿骨の前額断により連続切片を作成し、骨形態の解析を行った。

9. UCHL1 結合タンパク質の同定

レンチウイルスベクターを用いて作製した HA-UCHL1 安定発現 RAW-D 細胞を 10 cm プレートで 80%コンフルエントになるように播種し、EBC Lysis Buffer で回収した。コントロール細胞には Empty vector 導入細胞を用いた。15000 rpm・15 分間の遠心による不溶性画分の除去後、細胞溶解液上清のタンパク質濃度を定量した。細胞溶解液サンプルを 1 mg/mL となるように EBC Lysis Buffer で調整し、15 μ L のアガロースビーズ (Sigma 抗 HA 抗体ビーズ 014-23081) を 1 mL の細胞溶解液に添加し、ローテーターを用いて 4°C で約 12 時間攪拌した。攪拌後は 6000 rpm・15 秒間の遠心によりアガロースビーズを沈降させたのち、氷冷したビーズ洗浄用バッファー (TBST) 500 μ L を加えて洗浄し、遠心後、上清のみを吸引した。計 3 回の洗浄操作後、50 mM Tris-HCl pH8.0 100 μ L で 2 回洗浄後、同バッファー 100 μ L で置換した。その後ビーズ上の UCHL1 結合タンパク質を、液体クロマトグラフ質量分析計 (Liquid Chromatograph - Mass Spectrometry: LC-MS/MS: かずさ DNA 研究所) を用いて同定した。

10. RAW-D 細胞内ユビキチン化タンパク質の同定

UCHL1 ノックアウト RAW-D 細胞を 10 cm プレート 2 枚に播種し、50 ng/mL の RANKL で 24 時間処理したのち、80%コンフルエントの状態の細胞をプロテ

アーゼ阻害剤と脱ユビキチン化酵素阻害剤を含む EBC Lysis Buffer で回収した。コントロール細胞には RANKL 処理済みの野生株 RAW-D 細胞を用いた。遠心による不溶性画分の除去後、細胞溶解液上清のタンパク質定量を行った。サンプルを 1 mg/ 600 mL になるように EBC Lysis Buffer で 2 本のチューブに調整し、それぞれに 50 μ L のユビキチン鎖結合用アガロースビーズ (UBI-Capture-Q matrix: ENZO Life Sciences) を添加し、ローテーターを用いて 4°C で 4 時間攪拌した。攪拌後に 6000 rpm \cdot 15 秒間遠心し、アガロースビーズを沈降させたのち、氷冷した 1 mL の PBS を加えて洗浄し、遠心後、上清のみを吸引した。計 2 回の洗浄操作後、ビーズ状に結合したユビキチン化タンパク質を 100 μ L の 1% SDS-PBS で室温 10 分間振盪させ溶出した。その後ユビキチン化タンパク質を、液体クロマトグラフ質量分析計 (Liquid Chromatograph - Mass Spectrometry: LC-MS/MS: かずさ DNA 研究所) を用いて同定した。

11. 実験データの統計的処理

すべての実験においてコントロール/実験群に独立した 3 つ以上のサンプルを用いて実験を行い、得られた結果を Student's t-test、One-way ANOVA with multiple comparison test を用いて統計処理し、 p 値 0.05 以下を有意な差とした。

結果

1. *gad* マウス骨組織解析

UCHL1 の生体内における骨形成への寄与を解析することを目的として、UCHL1 欠損パーキンソン自然発症型 *gad* マウスを用いて骨形態計測を行った。*gad* マウスは約 14 週齢以降に振戦が観察されるに伴い運動量が著しく低下することから、本症状に伴う物理的要因が骨代謝に及ぼす影響を排除するため、振戦が観察される前の 12 週齢の雌雄マウスから頸骨を採取し、骨形態計測に供した。解析の結果、*gad* マウスにおいて骨密度、骨梁幅、骨梁数の減少と骨梁間隔、破骨細胞面、破骨細胞数の増加が認められた一方で、骨芽細胞に関連したパラメーターに有意な差は見られなかった (Figure 1)。

2. *gad* マウス由来破骨細胞前駆細胞を用いた破骨細胞分化誘導解析

破骨細胞は、骨髄に存在する造血幹細胞由来の単球・マクロファージ系の前駆細胞が分化し、細胞融合することにより形成される。*gad* マウス骨組織解析データから UCHL1 の変異により骨量の減少が示唆されたことから、UCHL1 の欠損が破骨細胞形成に及ぼす影響を評価するため、*gad* マウス骨髄より破骨細胞前駆細胞を単離・抽出し、RANKL と M-CSF を加えて 72 時間培養することで破骨細胞を誘導した。はじめに UCHL1 タンパク質がコントロールマウスでのみ検出可能であることを破骨細胞前駆細胞抽出液よりウエスタンブロット解析で確認した (Figure 2A)。次に、UCHL1 の欠損が破骨細胞形成に与える影響を評価した結果、*gad* マウス由来細胞で破骨細胞分化の亢進が観察された (Figure 2B)。破骨細胞分化マーカーである TRAP の染色像から、多核化 TRAP 陽性細胞数を、核数 3 個以下 10 個未満、10 個以上 20 個未満、20 個以上に分けて計測した結果、多核巨細胞の割合が *gad* マウス由来骨髄細胞で増加していることが確認された

(Figure 2C)。このことから、UCHL1 を欠失した骨髄前駆細胞では、より多核化した破骨細胞へ分化が促進されることが示唆された。

3. *gad* マウス由来破骨細胞前駆細胞における破骨細胞マーカー発現解析

UCHL1 欠損マウスの骨髄由来前駆細胞の多核化破骨細胞への易分化性が示されたことから、分化誘導前後の骨髄由来細胞より RNA を抽出し、破骨細胞分化マーカー遺伝子の mRNA 発現量を qPCR により定量することで、破骨細胞分化効率の数値化を試みた。解析の結果、コントロールマウスと比較して、*gad* マウス由来細胞において、分化誘導後に高い破骨細胞分化マーカーの発現が観察され (Figure 3)、*gad* マウス由来骨髄前駆細胞の破骨細胞分化促進を分子レベルで確認することができた。

4. *UCHL1* ノックアウト RAW-D 細胞の作製と破骨細胞分化誘導解析

gad マウス由来骨髄前駆細胞における破骨細胞分化能の亢進が示唆されたことから、次に、マウスマクロファージ様の破骨細胞前駆培養細胞株から *UCHL1* ノックアウト細胞株を作製し、同様に破骨細胞分化誘導実験を行うこととした。一般に RAW264.7 細胞が破骨細胞分化誘導のモデルとして汎用されているが、今回は、効率的な破骨細胞形成実験施行のため、RAW264.7 の亜株で、破骨細胞易分化細胞株として単離された RAW-D 細胞を解析に用いた (Kukita et al., 2004; Watanabe et al., 2004)。UCHL1 ノックアウト RAW-D 細胞株の樹立には CRISPR/Cas9 システムを用いた。得られた細胞株を用いて、RANKL 刺激 3 日間で破骨細胞を誘導し、TRAP 染色を用いて破骨細胞数を計測したところ、前述のマウス骨髄前駆細胞の解析結果と同様に *UCHL1* ノックアウト細胞株において多核化破骨細胞への分化亢進が確認された (Figure 4A-4C)。このことから、株化破骨前駆細胞においても、UCHL1 が破骨細胞分化抑制に重要であることが示唆

された。

5. *UCHL1* ノックアウト RAW-D 細胞における破骨細胞分化マーカー発現解析

TRAP 染色の結果、*UCHL1* ノックアウト RAW-D 細胞においても多核化破骨細胞への分化促進が示された。このことから、マウス由来骨髄前駆細胞の解析と同様に、分化誘導前後のコントロール、*UCHL1* ノックアウト細胞両細胞株より RNA を抽出して、破骨細胞分化マーカー遺伝子の発現を調べた。その結果、前述の TRAP 染色細胞の計測結果と一致して、*UCHL1* ノックアウト細胞株において、破骨細胞分化マーカー遺伝子群の発現が亢進していた (Figure 5)。このことから、株化破骨細胞前駆細胞においても、*UCHL1* の欠損が破骨細胞分化を促進することが確認された。

6. *UCHL1* と相互作用する破骨細胞分化関連タンパク質の探索

gad マウス由来骨髄前駆細胞と *UCHL1* ノックアウト RAW-D 細胞株を用いた破骨細胞形成実験から、*UCHL1* を欠損したマクロファージにおいて、多核化と巨細胞化を伴う破骨細胞分化能の亢進が観察された (Figures 2 and 4)。次に、*UCHL1* の脱ユビキチン化酵素機能と破骨細胞分化抑制との関連を分子レベルで解析するため、プロテオーム解析を用いた *UCHL1* 基質タンパク質の同定を試みた。はじめに、*UCHL1* と相互作用するタンパク質を網羅的に同定するため、HA タグ化 *UCHL1* タンパク質安定発現細胞株を RAW-D 細胞を用いて作製し、HA-*UCHL1* 免疫沈降産物を質量分析解析に供した (グループ A)。さらに、*UCHL1* ノックアウト細胞では *UCHL1* 脱ユビキチン化活性が欠損していることから、ノックアウト細胞株で *UCHL1* 基質のユビキチン化が亢進していることを想定し、コントロール細胞と *UCHL1* ノックアウト細胞からポリユビキチン化タンパク質を精製し、質量分析解析により *UCHL1* ノックアウト細胞でユビキチン化が亢

進しているタンパク質をリスト化した（グループ B）。これにより、検出した結合タンパク質から、基質候補タンパク質の絞り込みを試みた。両グループのタンパク質リスト上位 200 から重複する 48 タンパク質を抽出し、破骨細胞関連タンパク質の選抜を試みた。これまでの報告から、PI3K/Akt シグナルが破骨細胞分化促進に重要であること (Jang et al., 2013; Moon et al., 2012)、Akt ファミリーメンバーの Akt2 が UCHL1 結合タンパク質であるとの知見が得られていることから (Luo et al., 2018)、タンパク質リン酸化酵素 Akt1 を解析に用いることとした (Figure 6)。

7. *gad* マウス由来骨髄前駆細胞ならびに *UCHL1* ノックアウト RAW-D 細胞における Akt リン酸化状態の解析

Akt1 はマクロファージ内で RANKL 刺激により活性化され、破骨細胞分化を促進することが報告されている (Jang et al., 2013; Moon et al., 2012)。このことから、*gad* マウス由来骨髄前駆細胞における Akt1 の活性化状態を調べるため、Akt 活性化の指標となる Ser473 および Thr308 のリン酸化を認識する抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。その結果、*gad* マウスにおいて僅かながら Akt1 リン酸化の上昇が認められた (Figure 7A)。次に、*UCHL1* ノックアウト RAW-D 細胞でも同様に Akt1 の活性化が見られるか確認するため、RANKL 刺激 24 時間から 72 時間までの Akt1 のリン酸化の状態を調べた。その結果、コントロール細胞と比較して、*UCHL1* ノックアウト細胞において Akt1 の活性が上昇している傾向が認められた (Figure 7B)。さらに、Akt1 により直接リン酸化が誘導される FOXO タンパク質のリン酸化も同様に亢進していることが確認された。以上の結果から、*UCHL1* 欠損細胞において、RANKL 刺激に依存した Akt1 活性化と下流シグナル伝達の亢進が示唆された。

8. UCHL1 依存的な Akt1 不活性化に寄与する脱ユビキチン化の解析

Akt1 は Thr308、Ser473 のリン酸化により活性化されるが、Akt へのユビキチン修飾が Akt のリン酸化と活性化に重要であることが報告されている (Yang et al., 2009)。Akt1 のユビキチン化は Akt1 タンパク質の安定性には影響を及ぼさず、Akt 酵素活性の増大ならびに下流シグナル活性化に寄与することから、Akt ユビキチン化の修飾様式は K48 結合型ではなく、K63 結合型であることが明らかとなっている (Yang et al., 2010)。ユビキチン化依存的な Akt 活性化分子メカニズムとして、K63 ポリユビキチン鎖の付加が、Akt1 の細胞膜への移行と膜近傍での活性化を促進し、キナーゼ活性を上昇させることが示されている。そこで、UCHL1 による Akt1 活性調節の分子機序解明の観点から、はじめに UCHL1 と Akt1 の結合を調べた。293T 細胞内に UCHL1 と HA-Akt1 を共発現させて免疫沈降を行った結果、UCHL1 と Akt1 の細胞内での相互作用が確認された (Figure 8A)。次に、UCHL1 が Akt1 脱ユビキチン化を誘導することを確認するため、UCHL1 と Akt1 を HA タグ化ユビキチンと共に 293T 細胞内に発現させ、HA 免疫沈降ののち、HA-ユビキチン免疫沈降複合体に含まれるユビキチン化 Akt1 の量を Akt1 抗体によるプロットを用いたウエスタンブロット解析により検出することで、Akt ユビキチン化の誘導の有無を観察した。解析の結果、UCHL1 の共発現細胞において、K63 結合型ポリユビキチン鎖修飾を含む Akt1 のユビキチン化の減少が認められた (Figure 8B)。このことから、UCHL1 は、Akt1 との相互作用を介して Akt1 の脱ユビキチン化を誘導し、Akt 活性を負に調節するモデルが示唆された。

考察

骨粗鬆症様の症状の予防・骨折治癒のための新規アプローチの開発は、骨再生療法の中でも最優先の課題である。興味深い報告の一つとして、パーキンソン病の病態と骨粗鬆症の間に何らかの共通因子があることが統計的に示唆されている (Malochet-Guinamand et al., 2015; Pouwels et al., 2013)。このことから、その背景にある分子メカニズムの解明が、パーキンソン病関連骨粗鬆症の予防や治癒・治療、骨再生への将来的な応用につながるのではないかと考えた。本研究では、パーキンソン病原因遺伝子 *UCHL1* に着目し、分子遺伝学的解析により以下の知見を得た。; (1) *UCHL1* 欠損パーキンソン病自然発症型モデルマウス (*gad* マウス) の骨の組織学的解析から、*gad* マウス脛骨における破骨細胞数の増加を確認した (Figure 1)。さらに、*gad* マウスより骨髄前駆細胞を単離して破骨細胞分化を誘導したところ、*gad* マウス由来細胞において多核化破骨細胞への分化亢進が認められた (Figure 2B, C)。 (2) *UCHL1* の機能が破骨細胞分化に及ぼす影響を検討するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて *UCHL1* ノックアウト RAW-D マクロファージ細胞株を樹立し、RANKL 刺激による破骨細胞分化誘導を行ったところ、*UCHL1* の欠損により多核化破骨細胞の分化が効率的に誘導されることが確認された (Figure 4B, C)。 (3) *UCHL1* の脱ユビキチン化酵素としての破骨細胞制御のメカニズム解析のため、プロテオミクス解析により、*UCHL1* に結合するタンパク質を網羅的に同定することで、新規 *UCHL1* 基質の同定を試みた。さらに、*UCHL1* ノックアウト RAW-D 細胞でユビキチン化が誘導される分子を網羅的に同定することで、*UCHL1* 基質候補分子の絞り込みを行い、*UCHL1* の破骨細胞分化における役割を分子レベルで解析する手がかりとした。これらの解析の結果、Akt1 を *UCHL1* 相互作用分子として同定した (Figure 6)。

パーキンソン病患者における易骨折性の報告から、その原因については病態による転倒が主な要因と考えられてきた。特にパーキンソン病の病態と骨粗鬆症との相関については、これまでの臨床的統計データにより関連が示唆されていたが、パーキンソン病-骨代謝の連関が骨組織そのものの異常によるものなのか、中枢神経系の関与によるものなのか、その分子的基盤については明らかでなかった。UCHL1 変異に伴いパーキンソン病を発症する *gad* マウスを用いた解析は、神経疾患の表現型に限定されており (Day and Thompson, 2010)、UCHL1 機能欠損に伴う骨代謝への影響に関する分子メカニズムの報告はない。そこで本研究では、分子遺伝学的アプローチにより、パーキンソン病の原因遺伝子の一つである脱ユビキチン化酵素 UCHL1 がどのように骨代謝調節に関与しているのか解析した。その結果、UCHL1 が骨吸収を担う破骨細胞の分化制御を負に制御していることを示唆する興味深いデータを得ることができた。このことは、パーキンソン病患者の易骨折性が、遺伝学的な骨形成シグナルの変化に伴う骨の脆弱化に起因している可能性を示唆している。

UCHL1 が属する脱ユビキチン化酵素の機能に関しては、これまでにいくつかのファミリー分子が破骨細胞分化に重要な役割を担っていることが報告されている。TRAF6 は破骨細胞分化に重要な NF κ B シグナルの上流に位置する調節分子であるが、脱ユビキチン化酵素 CYLD は TRAF6 の脱ユビキチン化を介して NF κ B シグナルを減弱させ、破骨細胞形成を抑制する (Jin et al., 2008)。同様に、ubiquitin-specific protease 34 (USP34) も NF κ B の負の調節因子として、破骨細胞分化を抑制することが報告されている (Li et al., 2020)。その分子メカニズムとして、USP34 が、NF κ B 阻害分子である I κ B α を脱ユビキチン化して I κ B α を安定化することで、NF κ B 核移行を抑制することが示されている。本解析においても UCHL1 が CYLD と同じく TRAF6/NF κ B シグナルの上流に位置する可能性につ

いて検討したが、明確なデータは得られなかった。その一方で、プロテオミクス解析を用いたアプローチから、UCHL1 の脱ユビキチン化活性が破骨前駆細胞において、Akt シグナルの抑制を介して破骨細胞分化を負に調節する機構を提示することが出来た。本解析では、免疫沈降と質量分析法により UCHL1 と Akt1 の相互作用を同定した。また、本解析と同じくプロテオミクスのアプローチにより、UCHL1 結合タンパク質相互作用分子をヒト乳がん細胞株 MCF7 で網羅的に探索することで、Akt2 が UCHL1 結合分子として同定されている (Luo et al., 2018)。その報告の中で、UCHL1 は Akt2 と相互作用することで Akt2 活性化に寄与する可能性を示唆するデータが示されているが、UCHL1 が Akt2 の脱ユビキチン化を介してその活性を調節しているのか、活性非依存的な制御によるものか、詳細な分子メカニズムは不明である。本解析の Akt1 と既報の Akt2 との間の活性化機序の相違については、アイソフォーム特異的な制御機構による可能性が考えられるほか、破骨細胞と乳がん細胞との間の組織特異性によることも考えられ、今後の検討課題である。また、いくつかのがん細胞株において、UCHL1 が Akt 下流シグナル伝達を促進することが報告されている (Frisan et al., 2012; Hussain et al., 2013; Hussain et al., 2010; Kim et al., 2009)。本解析では、破骨細胞の分化の過程で UCHL1 は Akt シグナル抑制に働くことが示唆されたことから、UCHL1/Akt の相互作用は細胞の種類や状況に応じて異なる作用機序を有することが考えられる。

本研究において、UCHL1 欠損の伴う破骨細胞の増大に Akt シグナルが関与している可能性を示唆する結果が得られた。これまでの報告から、Akt は RANKL 依存的な IKK/NF κ B 経路の活性化、ならびに GSK3 抑制による NFATc1 経路の活性化に寄与することで、破骨細胞分化促進に重要であることが示されている (Moon et al., 2012; Sugatani and Hruska, 2005)。さらに Akt シグナル抑制分子であ

る PTEN、及び SHIP が破骨細胞の分化を抑制することから、Akt が破骨細胞分化の促進因子であることが確認されている (Jang et al., 2013; Moon et al., 2012)。また、Akt1 欠損マウスでは骨量、骨形性能の減少が観察されており、骨芽細胞分化異常に伴う RANKL 発現量の減少が骨髄前駆細胞の細胞自律的な破骨細胞分化・生存に負の影響を及ぼすことが示唆されている (Kawamura et al., 2007)。本解析では、UCHL1 の欠損に伴い、Akt1 のリン酸化が上昇し、それに伴い下流標的分子 FOXO のリン酸化が誘導された。FOXO タンパク質はアポトーシス誘導因子 Bim の遺伝子発現を誘導する転写因子であり、Akt による FOXO リン酸化は FOXO 依存的 *Bim* 遺伝子転写活性を減衰させる (Zhang et al., 2011)。この知見をもとに、本解析において UCHL1 欠損 RAW-D 細胞で *Bim* 遺伝子発現を定量 PCR により調べた結果、UCHL1 の欠損と *Bim* 遺伝子の発現量の間には明確な相関は見られなかった。UCHL1/Akt シグナルがどのように破骨細胞形成を調節しているのかに関して、その分子機構の詳細を明らかにしていくことが次の重要な課題である。本研究において、Akt シグナル下流に位置し、破骨細胞分化誘導に重要な因子である NFATc1 についても解析を試みている。これまでの予備的な解析から、*UCHL1* 欠損破骨前駆細胞における NFATc1 タンパク質量に変化は認められていないが、今後、転写活性を負に調節する NFATc1 タンパク質リン酸化の状態や NFATc1 核内移行などの細胞内局在、さらにレポーターアッセイによる転写活性化の計測についても解析を進めていく必要があると思われる。また、今回の実験では組織解析において骨芽細胞パラメーターに有意な変化は認められなかったが、破骨細胞の分泌する RANK と骨芽細胞上の RANKL が相互作用することで骨形成が調節されることから、マウス骨形態計測において、さらに解析数を増やすことで解析結果の精度を上げていくことが必要である。また、パーキンソン病患者の骨形成能について、UCHL1/Akt シグナル伝達解析を含めた分子

遺伝学的な視点からのアプローチも今後必要である。

本研究では、パーキンソン病患者の易骨折性に注目することで、UCHL1の機能と破骨細胞形成の間の相関について分子レベルで解析した。その結果、UCHL1は破骨細胞分化を抑制することで骨代謝に関与していることが示唆された。このことは、UCHL1の機能を欠損したパーキンソン病患者のほか、UCHL1関連シグナルの異常に起因する骨代謝異常を呈する疾患に対して、UCHL1ならびにその関連分子や下流シグナルが、治療標的候補となり得ることを示している。また、破骨細胞分化の分子基盤解明の観点からも、UCHL1を骨代謝関連因子として同定できたことは、学術的にも意味のある結果であると考えられる。破骨細胞分化を制御する細胞内シグナルにおける本分子の位置付けを明らかにしていくことが今後の検討課題であり、さらなる詳細な解析が必要である。

図および解説

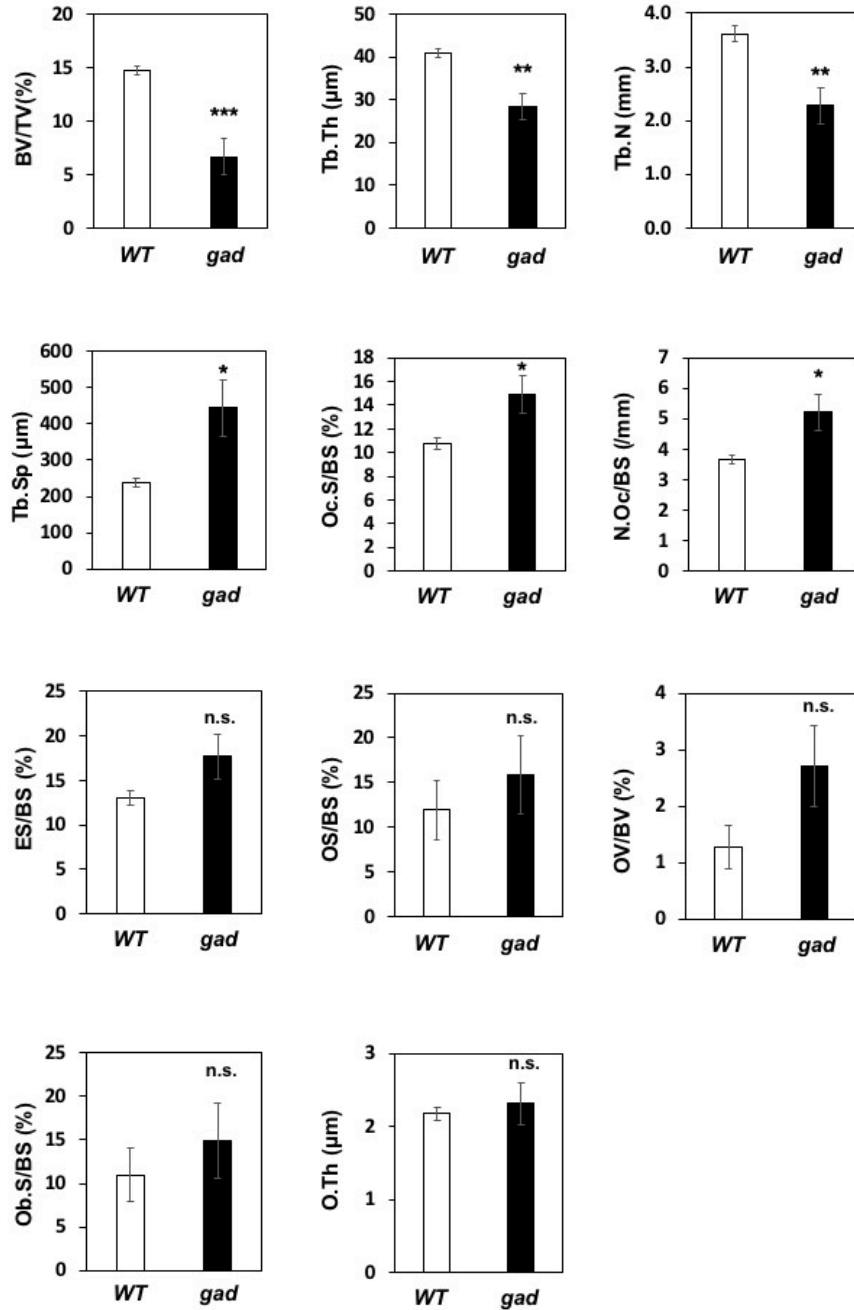


Figure 1 : *gad* マウス骨組織解析

生後 12 週齢の雌雄コントロール・*gad* マウスより右側脛骨を採取し、骨構造を解析した。(BV/TV : 骨量、Tb.Th : 骨梁幅、Tb.N : 骨梁数、Tb.Sp : 骨梁間隔、Oc.S/BS : 破骨細胞面、N.Oc/BS : 破骨細胞数、ES/BS : 侵食面、OS/BS : 類骨面、OV/BV : 類骨量、Ob.S/BS : 骨芽細胞面、O.Th : 類骨幅)、mean ± SD (n = 6)、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、Student's t-test.

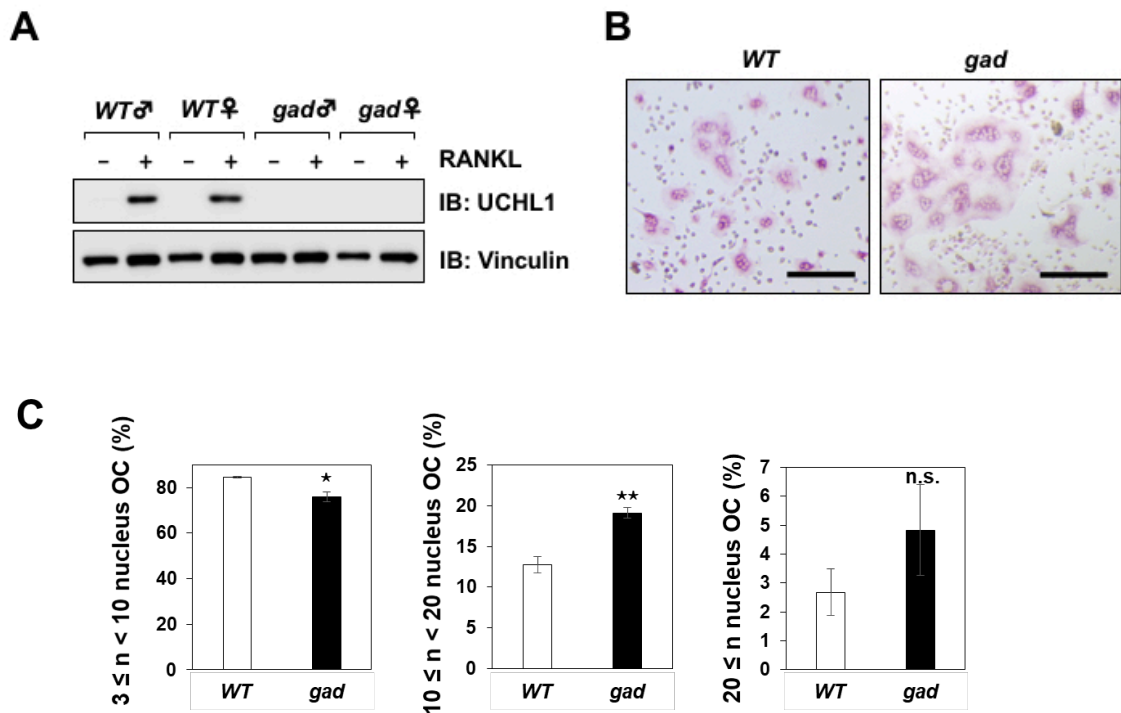


Figure 2 : *gad* マウス由来骨髄前駆細胞を用いた破骨細胞分化誘導解析

(A) 生後 6 - 8 週齢のコントロール・*gad* マウスの大腿骨及び脛骨骨髄から骨髄前駆細胞を採取し、M-CSF (100 ng/mL) 単独処理下で 2 日間培養後、M-CSF (30 ng/mL)・RANKL (50 ng/mL) 同時処理下 3 日間の培養により破骨細胞分化を誘導した。破骨細胞分化誘導後の細胞を回収し、UCHL1 タンパク質量をウェスタンブロット法により解析した。

(B) 破骨細胞分化誘導後の細胞をホルマリン固定し、TRAP 染色法により破骨細胞を染色した。Scale bar、20 μ m.

(C) 多核化破骨細胞数を計測し、その割合を比較した。計測に際し、核数が 3 個以上 10 個未満、10 個以上 20 個未満、20 個以上、の 3 群に分類し、それぞれの細胞数の割合を比較した。mean \pm SD (n = 3)、** $p < 0.01$ 、n.s.: not significant、Student's t-test.

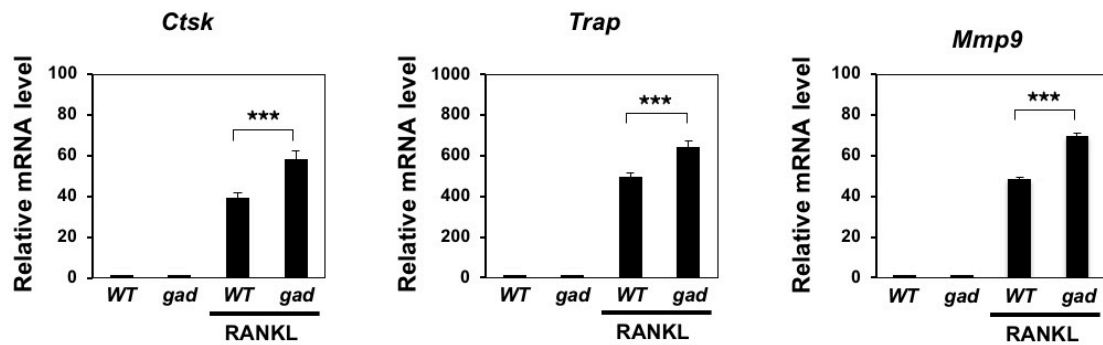


Figure 3 : *gad* マウス由来骨髄前駆細胞における破骨細胞マーカー発現解析
 分化誘導前のマウス骨髄前駆細胞および分化誘導後の破骨細胞から RNA を回収し、破骨細胞分化マーカーである *Ctsk*、*TRAP*、*Mmp9* の mRNA 発現量を定量 RT-PCR 法を用いて解析した。破骨細胞分化誘導前後で、それぞれコントロール・*gad* マウスの 2 群間を比較した。mean ± SD (n = 3)、*** $p < 0.001$ 、Student's t-test.

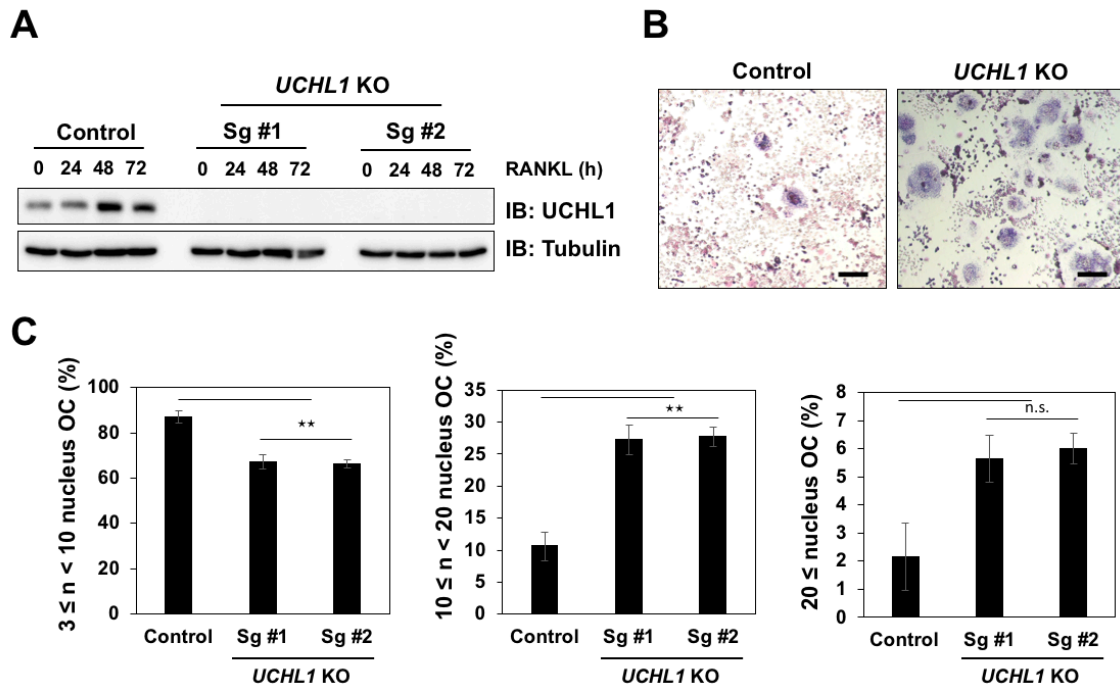


Figure 4 : UCHL1 ノックアウト RAW-D 細胞の作製と破骨細胞分化誘導解析
(A) マウス破骨細胞易分化マクロファージ細胞株 RAW-D 細胞を用いて、UCHL1 ノックアウト細胞 (Sg #1、Sg #2) を CRISPR/Cas9 システムにより作製した。コントロール細胞 (親株)、ノックアウト細胞株をそれぞれ RANKL (50 ng/mL) で 0, 24, 48, 72 時間処理し、破骨細胞分化誘導を行った後回収し、UCHL1 タンパク質量をウェスタンブロット法で定量した。
(B) 分化誘導後 3 日目の細胞をホルマリン固定し、TRAP 染色により破骨細胞を染色した。Scale bar、20 μ m。
(C) 多核化破骨細胞数を計測し、その割合をコントロール・ノックアウト細胞間で比較した。計測に際し、核数が 3 個以上 10 個未満、10 個以上 20 個未満、20 個以上、の 3 群に分類し、それぞれの細胞数の割合を比較した。mean \pm SD (n = 3)、** $p < 0.01$ 、n.s.: not significant、One-way ANOVA with multiple comparison test.

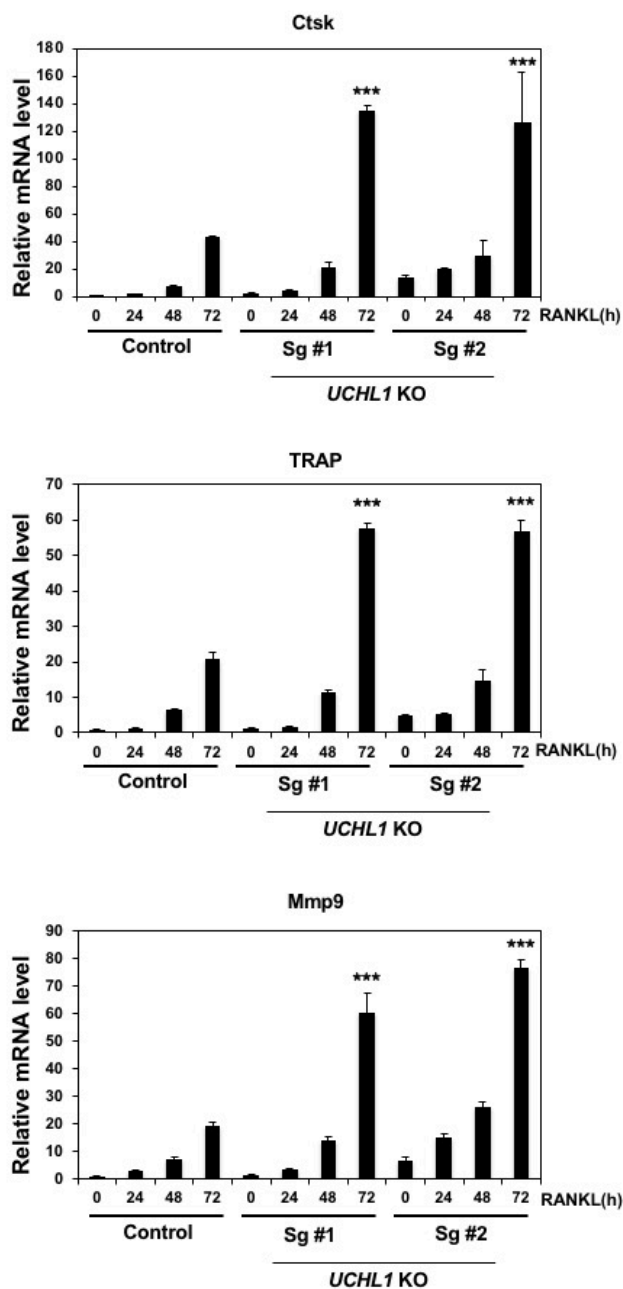
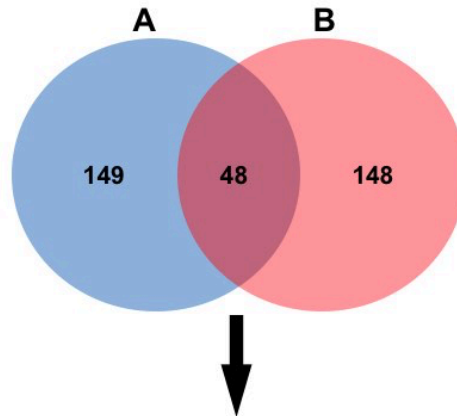


Figure 5 : *UCHL1* ノックアウト RAW-D 細胞における破骨細胞マーカー発現解析

RAW-D 細胞コントロール細胞 (親株) 及び *UCHL1* ノックアウト細胞株 (Sg #1、Sg #2) それぞれを RANKL (50 ng/mL) で 0、24、48、72 時間処理後、破骨細胞マーカーの mRNA 発現量を定量 RT-PCR 法を用いて解析した。誘導 72 時間後のコントロール細胞との比較で統計解析を行った。mean ± SD (n = 3)、*** $p < 0.001$ 、n.s.: not significant、One-way ANOVA with multiple comparison test.

A : Blue: Proteins with enhanced poly-ubiquitination in *UCHL1* KO RAW-D cells
B : Red: *UCHL1* interacting proteins detected in RAW-D cells



Overlap proteins between A and B

Pgls Psmc6 Prrc2a Cand1 Hspa5 Pkm Srpra Ktn1 Dlat Rpl23 Tfrc Rpl5 Hsp90ab1 Akt1
 Actg1 Qars Rpl3 Rps14 Cul1 Eif4a1 Glis Serbp1 Srrm2 Naa15 Blvra Eif3c Cdc37 Eef2 Lyar
 Hspa8 Naca Tln1 Trim28 Arpc2 Aifm1 Cdc5l Usp14 Chtop Arrb2 Lmna Csk Ipo7 Mcm6
 Cyfip1 Vcp Actb Acat1 Fasn



Select Akt1 for further analysis

Figure 6 : *UCHL1* と相互作用する破骨細胞分化関連タンパク質の探索

レンチウイルスベクターを用いて作製した HA-*UCHL1* 安定発現 RAW-D 細胞を、RANKL (50 ng/mL) で 24 時間処理した後、抗 HA 抗体を用いた免疫沈降法により *UCHL1* と結合するタンパク質を回収した。さらに質量分析法によりそれら結合タンパク質を網羅的に同定した (グループ A)。一方、コントロール細胞 (RAW-D 親株)、*UCHL1* ノックアウト RAW-D 細胞それぞれを RANKL で 24 時間処理した後、細胞を回収し、ポリユビキチン鎖捕捉アガロースビーズを用いて、ポリユビキチン化タンパク質を精製した。ユビキチン化タンパク質を SDS バッファーでビーズから溶出させ、回収したポリユビキチン化タンパク質を質量分析法により網羅的に同定し、ノックアウト細胞で検出頻度の高い分子を選定した (グループ B)。それぞれのグループで検出頻度順にリスト化した上位 200 タンパク質から、ベン図解析により重複するタンパク質を同定した。

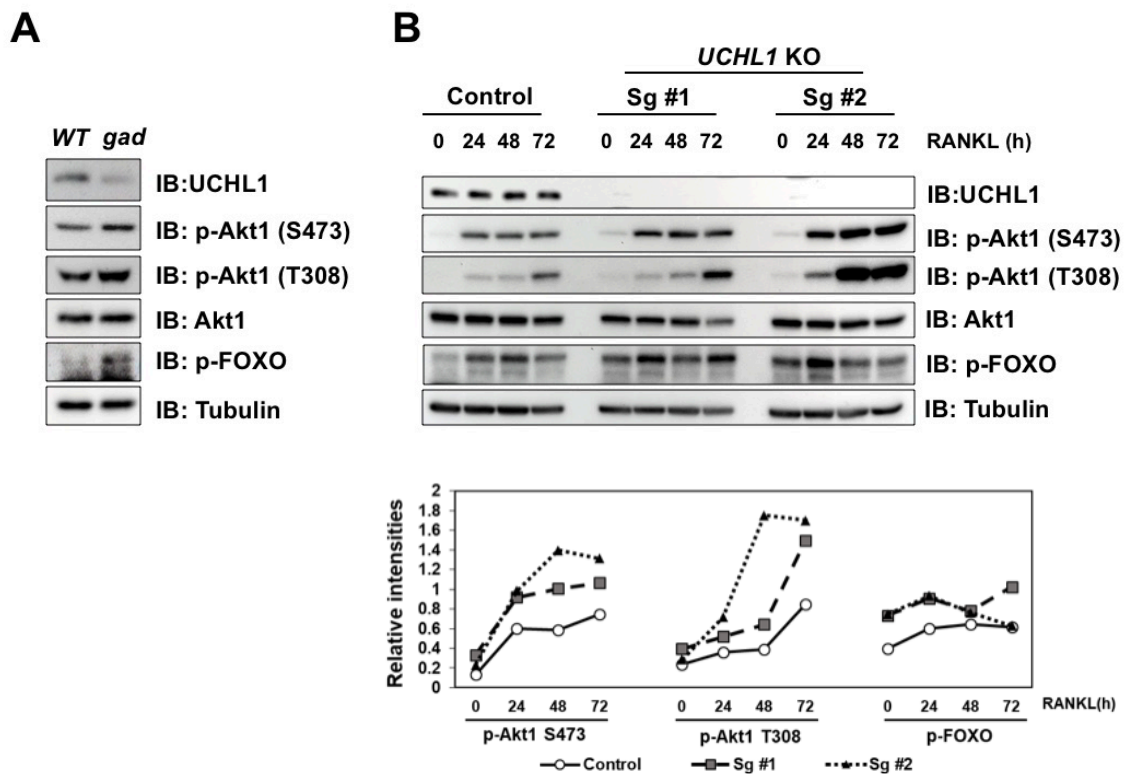


Figure 7 : *gad* マウス由来骨髄前駆細胞ならびに *UCHL1* ノックアウト RAW-D 細胞における Akt リン酸化状態の解析

(A) 生後 6 - 8 週齢のコントロール・*gad* マウスの大腿骨及び脛骨骨髄から骨髄前駆細胞を採取し、M-CSF (30 ng/mL) 単独処理下で 2 日間培養後の細胞を回収した。ウェスタンブロット解析により Akt1 タンパクリン酸化を評価した。

(B) RAW-D 細胞コントロール細胞 (親株) 及び *UCHL1* ノックアウト細胞株 (Sg 1、Sg #2) それぞれを RANKL (50 ng/mL) で 0、24、48、72 時間処理により破骨細胞分化誘導を行った後、各タイムポイントで細胞を回収し、ウェスタンブロット法を用いて Akt1 タンパク質および Akt1 基質タンパク質 FOXO のリン酸化を、バンド濃度を定量化することで評価した。

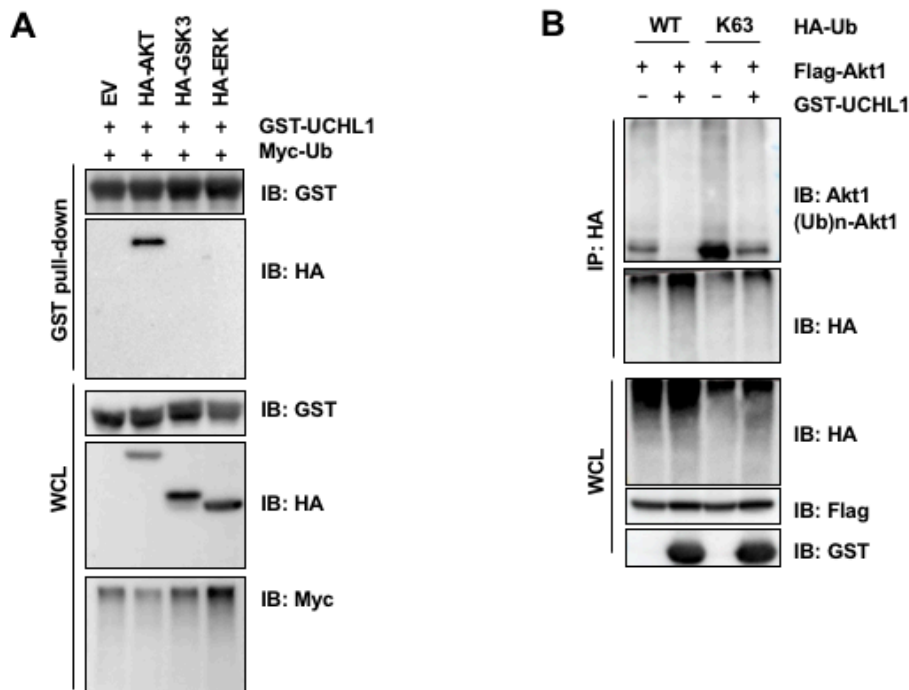


Figure 8 : UCHL1 依存的 Akt1 脱ユビキチン化の解析

(A) 293T 細胞に GST-UCHL1、HA-Akt1、HA-GSK3、HA-ERK、ユビキチン (Myc-Ub) 発現プラスミドを一過性に過剰発現させ、GST pull-down により UCHL1・Akt1 間の相互作用を解析した。

(B) 293T 細胞に野生型ユビキチン (HA-Ub-WT) と K63 結合型でのみ重合するユビキチン変異体 (HA-Ub-K63) を、Flag-Akt1・GST-UCHL1 発現プラスミドと共に図に示す組み合わせで一過性に過剰発現させ、抗 HA 抗体を用いた免疫沈降法によりそれぞれ HA-Ub-WT・HA-Ub-K63 で修飾されたタンパク質を沈降させた。沈降させた HA 免疫複合体を Akt1 抗体でブロットすることにより、ポリユビキチン化修飾された Akt1 を検出した。

参考文献

- Bishop, P., Rocca, D., and Henley, J.M. (2016). Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1): structure, distribution and roles in brain function and dysfunction. *Biochem J* *473*, 2453-2462.
- Choi, J., Levey, A.I., Weintraub, S.T., Rees, H.D., Gearing, M., Chin, L.S., and Li, L. (2004). Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Biol Chem* *279*, 13256-13264.
- Clague, M.J., Urbe, S., and Komander, D. (2019). Breaking the chains: deubiquitylating enzyme specificity begets function. *Nat Rev Mol Cell Biol* *20*, 338-352.
- Day, I.N., and Thompson, R.J. (2010). UCHL1 (PGP 9.5): neuronal biomarker and ubiquitin system protein. *Prog Neurobiol* *90*, 327-362.
- Frisan, T., Coppotelli, G., Dryselius, R., and Masucci, M.G. (2012). Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 interacts with adhesion complexes and promotes cell migration, survival, and anchorage independent growth. *FASEB J* *26*, 5060-5070.
- Harrigan, J.A., Jacq, X., Martin, N.M., and Jackson, S.P. (2018). Deubiquitylating enzymes and drug discovery: emerging opportunities. *Nat Rev Drug Discov* *17*, 57-78.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* *67*, 425-479.
- Huang, X., and Dixit, V.M. (2016). Drugging the undruggables: exploring the ubiquitin system for drug development. *Cell Res* *26*, 484-498.
- Hussain, S., Feldman, A.L., Das, C., Ziesmer, S.C., Ansell, S.M., and Galardy, P.J. (2013). Ubiquitin hydrolase UCH-L1 destabilizes mTOR complex 1 by antagonizing DDB1-CUL4-mediated ubiquitination of raptor. *Mol Cell Biol* *33*, 1188-1197.
- Hussain, S., Foreman, O., Perkins, S.L., Witzig, T.E., Miles, R.R., van Deursen, J., and Galardy, P.J. (2010). The de-ubiquitinase UCH-L1 is an oncogene that drives the development of lymphoma in vivo by deregulating PHLPP1 and Akt signaling. *Leukemia* *24*, 1641-1655.
- Jang, H.D., Noh, J.Y., Shin, J.H., Lin, J.J., and Lee, S.Y. (2013). PTEN regulation by the Akt/GSK-3beta axis during RANKL signaling. *Bone* *55*, 126-131.
- Jin, W., Chang, M., Paul, E.M., Babu, G., Lee, A.J., Reiley, W., Wright, A., Zhang, M., You, J., and Sun, S.C. (2008). Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates RANK signaling and osteoclastogenesis in mice. *J Clin Invest* *118*, 1858-1866.
- Kawamura, N., Kugimiya, F., Oshima, Y., Ohba, S., Ikeda, T., Saito, T., Shinoda, Y., Kawasaki, Y., Ogata, N., Hoshi, K., *et al.* (2007). Akt1 in osteoblasts and osteoclasts controls bone remodeling. *PLoS One* *2*, e1058.

- Kim, H.J., Kim, Y.M., Lim, S., Nam, Y.K., Jeong, J., Kim, H.J., and Lee, K.J. (2009). Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 is a key regulator of tumor cell invasion and metastasis. *Oncogene* *28*, 117-127.
- Klein, C., and Westenberger, A. (2012). Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* *2*, a008888.
- Komander, D., and Rape, M. (2012). The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* *81*, 203-229.
- Kukita, T., Wada, N., Kukita, A., Kakimoto, T., Sandra, F., Toh, K., Nagata, K., Iijima, T., Horiuchi, M., Matsusaki, H., *et al.* (2004). RANKL-induced DC-STAMP is essential for osteoclastogenesis. *J Exp Med* *200*, 941-946.
- Larsen, C.N., Krantz, B.A., and Wilkinson, K.D. (1998). Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin C-terminal hydrolases. *Biochemistry* *37*, 3358-3368.
- Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M.J., Jonnalagada, S., Chernova, T., *et al.* (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* *395*, 451-452.
- Li, Q., Wang, M., Xue, H., Liu, W., Guo, Y., Xu, R., Shao, B., and Yuan, Q. (2020). Ubiquitin-Specific Protease 34 Inhibits Osteoclast Differentiation by Regulating NF-kappaB Signaling. *J Bone Miner Res* *35*, 1597-1608.
- Longo, P.A., Kavran, J.M., Kim, M.S., and Leahy, D.J. (2013). Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol* *529*, 227-240.
- Luo, Y., He, J., Yang, C., Orange, M., Ren, X., Blair, N., Tan, T., Yang, J.M., and Zhu, H. (2018). UCH-L1 promotes invasion of breast cancer cells through activating Akt signaling pathway. *J Cell Biochem* *119*, 691-700.
- Malochet-Guinamand, S., Durif, F., and Thomas, T. (2015). Parkinson's disease: A risk factor for osteoporosis. *Joint Bone Spine* *82*, 406-410.
- Maraganore, D.M., Lesnick, T.G., Elbaz, A., Chartier-Harlin, M.C., Gasser, T., Kruger, R., Hattori, N., Mellick, G.D., Quattrone, A., Satoh, J., *et al.* (2004). UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann Neurol* *55*, 512-521.
- Mevissen, T.E.T., and Komander, D. (2017). Mechanisms of Deubiquitinase Specificity and Regulation. *Annu Rev Biochem* *86*, 159-192.
- Moon, J.B., Kim, J.H., Kim, K., Youn, B.U., Ko, A., Lee, S.Y., and Kim, N. (2012). Akt induces osteoclast differentiation through regulating the GSK3beta/NFATc1 signaling cascade. *J Immunol* *188*, 163-169.
- Nijman, S.M., Luna-Vargas, M.P., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M., Sixma, T.K., and Bernards, R. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* *123*, 773-786.
- Park, J.E., Miller, Z., Jun, Y., Lee, W., and Kim, K.B. (2018). Next-generation proteasome

inhibitors for cancer therapy. *Transl Res* 198, 1-16.

Pouwels, S., Bazelier, M.T., de Boer, A., Weber, W.E., Neef, C., Cooper, C., and de Vries, F. (2013). Risk of fracture in patients with Parkinson's disease. *Osteoporos Int* 24, 2283-2290.

Saigoh, K., Wang, Y.L., Suh, J.G., Yamanishi, T., Sakai, Y., Kiyosawa, H., Harada, T., Ichihara, N., Wakana, S., Kikuchi, T., *et al.* (1999). Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice. *Nat Genet* 23, 47-51.

Shim, S., Kwon, Y.B., Yoshikawa, Y., and Kwon, J. (2008). Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 deficiency decreases bone mineralization. *J Vet Med Sci* 70, 649-651.

Sugatani, T., and Hruska, K.A. (2005). Akt1/Akt2 and mammalian target of rapamycin/Bim play critical roles in osteoclast differentiation and survival, respectively, whereas Akt is dispensable for cell survival in isolated osteoclast precursors. *J Biol Chem* 280, 3583-3589.

Watanabe, T., Kukita, T., Kukita, A., Wada, N., Toh, K., Nagata, K., Nomiyama, H., and Iijima, T. (2004). Direct stimulation of osteoclastogenesis by MIP-1alpha: evidence obtained from studies using RAW264 cell clone highly responsive to RANKL. *J Endocrinol* 180, 193-201.

Wilkinson, K.D., Lee, K.M., Deshpande, S., Duerksen-Hughes, P., Boss, J.M., and Pohl, J. (1989). The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Science* 246, 670-673.

Xia, Q., Liao, L., Cheng, D., Duong, D.M., Gearing, M., Lah, J.J., Levey, A.I., and Peng, J. (2008). Proteomic identification of novel proteins associated with Lewy bodies. *Front Biosci* 13, 3850-3856.

Yang, W.L., Wang, J., Chan, C.H., Lee, S.W., Campos, A.D., Lamothe, B., Hur, L., Grabiner, B.C., Lin, X., Darnay, B.G., *et al.* (2009). The E3 ligase TRAF6 regulates Akt ubiquitination and activation. *Science* 325, 1134-1138.

Yang, W.L., Wu, C.Y., Wu, J., and Lin, H.K. (2010). Regulation of Akt signaling activation by ubiquitination. *Cell Cycle* 9, 487-497.

Zhang, X., Tang, N., Hadden, T.J., and Rishi, A.K. (2011). Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1813, 1978-1986.

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導と御校閲を賜りました東北大学大学院歯学研究科口腔保健発育学講座小児発達歯科学分野 福本 敏 教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究にあたり、御指導御鞭撻を頂きました東北大学大学院歯学研究科先端再生医学研究センター 犬塚 博之 准教授に心より感謝致します。

さらに、終始御助力頂きました小児発達歯科学分野の教室員の皆様、先端再生医学研究センターの皆様に厚く御礼申し上げます。