The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	分泌型キナーゼ Fam20C によるリン酸化を介した骨形成制御
Author(s)	廣瀬, 勝俊; 豊澤, 悟
Citation	大阪大学歯学雑誌. 2021, 65(2), p. 1-3
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/84535
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

阪大歯学誌　65(2)：1～3，2021

分泌型キナーゼ Fam20C によるリン酸化を介した骨形成制御

廣瀬　勝俊*，豊澤　悟*

（令和 3 年 3 月 31 日受付）

はじめに

骨や歯の硬組織形成では，I 型コラーゲンにリン酸カルシウムが沈着して石灰化が起こるが，軟組織の I 型コラーゲンでは無差別に石灰化は起こらない。このことから，硬組織に特異的に存在する osteopontin（OPN），bone sialoprotein（BSP），dentin matrix protein 1（Dmp1）等の SIBLINGs ファミリー蛋白質に属する酸性リン蛋白質の役割が着目されてきた[1,2]。これらの蛋白質は，翻訳後修飾過程でキナーゼにより多数のリン酸基が付加されて高度な負荷電体となり，Ca^{2+} 結合能を獲得して，石灰化前線で石灰化核（nucleus）として石灰化制御に関与すると考えられている[1,2]。しかし，生体硬組織における酸性リン蛋白質のリン酸化の生物学的意義は未だ明らかではない。

Family with sequence similarity 20 member C（Fam20C）は，核や細胞質に局在する既知のキナーゼとは異なり，近年発見された分泌蛋白質のセリン残基のリン酸化を担うキナーゼである[3-6]。我々は，酸性リン蛋白質は分泌過程のゴルジ装置内で Fam20C によりリン酸化されることを以前に報告した[7]。Fam20C の機能は，Fam20C 機能不全患者（Raine 症候群）や Fam20C 欠失マウスが骨軟化症様の骨変化を示すため，骨形成に重要であると考えられている[8-14]。しかし，本疾患患者や欠失マウスでは fibroblast growth factor 23（FGF23）の血中濃度が高くなり，腎臓におけるリン排泄亢進による低リン血症を発症する[10,12-15]。低リン血症は全身的な骨形成に有意に影響するため，骨形成局所における Fam20C によるリン酸化の役割を検討することは困難であった。

本研究で作製した骨芽細胞／骨細胞特異的な Fam20C 過剰発現（Fam20C-Tg）マウスでは，血中リン濃度は正常であった。そこで，全身的なリン濃度異常の影響を受けない Fam20C-Tg マウスの骨組織の解析から，骨形成局所における Fam20C によるリン酸化の役割を検討した。

骨組織におけるリン酸化状態の検討

骨芽細胞／骨細胞特異的な Fam20C 過剰発現による骨のリン酸化状態を解析した。セリン残基のリン酸化状態を検討するため，リン酸化セリン特異抗体を用いた免疫染色を行った。その結果，Fam20C-Tg マウスの骨組織では，野生型マウスに比較して，骨細管構造に沿った骨基質に強い陽性反応が認められたため，骨細胞が産生する Dmp1 等の酸性リン蛋白質が高度にリン酸化されていることが示唆された。また，骨のリン酸化蛋白質の網羅的解析では，1,504 種類のリン酸化ペプチドについて 2 試料間の計量比較情報が得られ，Fam20C-Tg マウスの骨では，酸性リン蛋白質を含む様々な蛋白質のリン酸化亢進が確認された（図 1）。リン酸化亢進が認められた蛋白質の機能を調べるために，DAVID を用いて Gene ontology 解析を行った結果，mineral tissue development や osteoblast differentiation に関与する蛋白質のリン酸化が亢進していることが明らかとなった。

＊　大阪大学大学院歯学研究科　顎口腔病因病態制御学講座（口腔病理学教室）

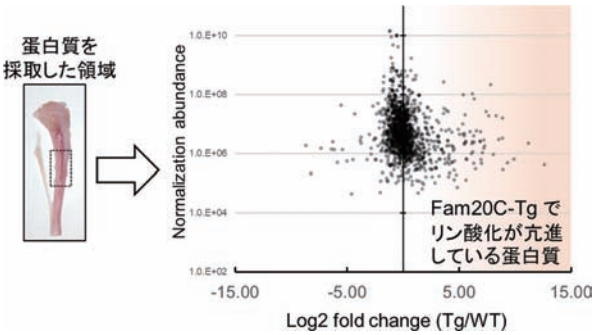

図１　網羅的リン酸化解析（本論文より改変）
Fam20C-Tg マウス由来ペプチド［Tg］，野生型マウス由来ペプチド［WT］の２試料間の計量比較情報が得られ，各リン酸化ペプチドにおける［Tg］/［WT］比の倍数値（Fold）と検出強度を用いて作成した散布図。Fam20C-Tg マウスの骨組織では，様々な種類の蛋白質のリン酸化が亢進している（橙色領域の黒点）。

リン酸化による骨組織への影響の検討

次に，Fam20C によるリン酸化が亢進した骨組織の変化について解析を行った。Fam20C-Tg マウスの大腿骨皮質骨では，野生型マウスと比較して，骨量（bone volume），類骨面（Ps.OS/BS），骨石灰化面（MS/BS），骨石灰化速度（MAR），骨形成速度（BFR/BS）は有意に増加していた（図 2A–C）。また，Fam20C-Tg マウスと野生型マウス由来の骨芽細胞の初代培養を用いた石灰化実験では，野生型マウス由来のものと比較して，Fam20C-Tg マウス由来の骨芽細胞培養で石灰化亢進が認められた。以上の結果より，骨組織における Fam20C によるリン酸化は，石灰化を介した骨形成に関与することが明らかとなった。

一方，μCT や骨形態計測，骨代謝マーカーにより，Fam20C-Tg マウスでは皮質骨と海綿骨における破骨細胞性骨吸収が促進していることが明らかとなった（図 2B 矢印，D）。この破骨細胞性骨吸収の促進は，骨芽細胞／骨細胞が産生したリン酸化分泌蛋白質を介した現象である事が考えられた。

おわりに

本研究は，骨芽細胞／骨細胞の分泌蛋白質のリン酸化は，生体において石灰化制御を介した骨形成や，破骨細胞性骨吸収に関与することを示したものである。その後の象牙質の研究により，Fam20C の過剰発現は象牙質特異的な SIBLINGs ファミリー蛋白質である dentin sialophosphoprotein（DSPP）のリン酸化を亢進するとともに，象牙質の石灰化亢進に寄与することが明らかとなった。硬組織の酸性リン蛋白質をリン酸化するキナーゼは長らく不明であったことや，硬組織におけるリン酸解析が困難であることから，生体における硬組織のリン酸化の意義はよく分かっていなかったが，本研究成果が，石灰化異常の病因解明にも寄与することを期待したい。

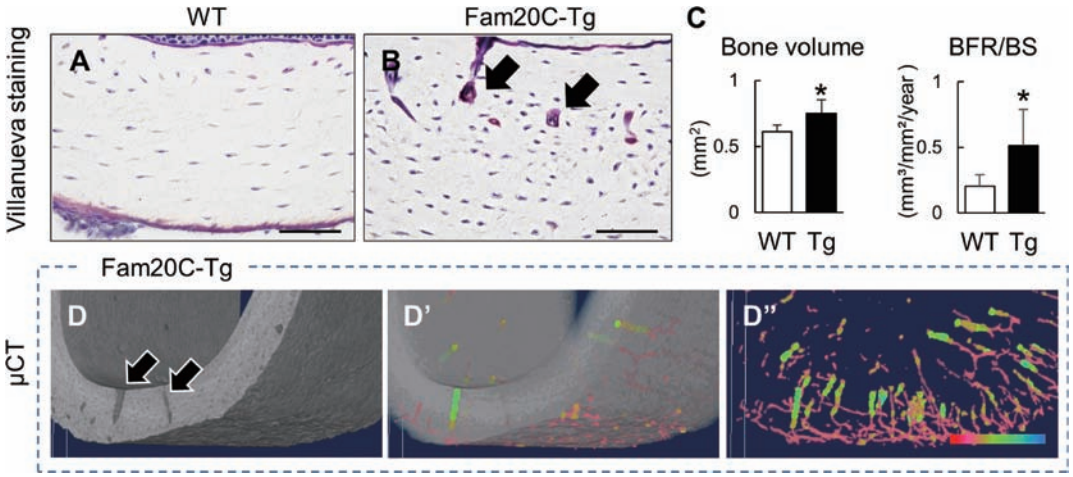

図２　皮質骨解析（本論文より改変）
野生型（WT）マウスと比較して，Fam20C-Tg マウスでは，骨量（bone volume）の増加，および石灰化亢進に起因する骨形成速度（BFR/BS）の増加が認められた（A–C）。また，骨吸収亢進を示す多孔領域が有意に増加しており（B　矢印），高解像度 μCT 解析により多孔領域は連続性のあるハバース管様の構造であることが明らかとなった（D-D″ にかけて透過性が上昇）。

謝辞

本稿を終えるにあたり，本研究の遂行に対して，お時間を惜しみなく費やしてくださった豊澤悟教授に心より感謝申し上げます。また，ご指導頂きました長崎大学の小守壽文教授，大阪大学工学研究科の中野貴由教授，石本卓也准教授，口腔病理学教室の先生方に厚く御礼申し上げます。

文献

1）George, A. and Veis, A.（2008）: Phosphorylated proteins and control over apatite nucleation, crystal growth, and inhibition. *Chem Rev*, **108**, 4670–4693.
2）Qin, C., Baba, O. and Butler, W.T.（2004）: Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*, **15**, 126–136.
3）Hao, J., Narayanan, K., Muni, T., Ramachandran, A. and George, A.（2007）: Dentin matrix protein 4, a novel secretory calcium-binding protein that modulates odontoblast differentiation. *J Biol Chem*, **282**, 15357–15365.
4）Wang, X., Hao, J., Xie, Y., Sun, Y., Hernandez, B., Yamoah, A.K., Prasad, M., Zhu, Q., Feng, J.Q. and Qin, C.（2010）: Expression of FAM20C in the Osteogenesis and Odontogenesis of Mouse. *J Histochem Cytochem*, **58**, 957–967.
5）Tagliabracci, V.S., Engel, J.L., Wen, J., Wiley, S.E., Worby, C.A., Kinch, L.N., Xiao, J., Grishin, N.V. and Dixon, J.E.（2012）: Secreted kinase phosphorylates extracellular proteins that regulate biomineralization. *Science*, **336**, 1150–1153.
6）Tagliabracci, V.S., Pinna, L.A. and Dixon, J.E.（2013）: Secreted protein kinases. *Trends Biochem Sci*, **38**, 121–130.
7）Oya, K., Ishida, K., Nishida, T., Sato, S., Kishino, M., Hirose, K., Ogawa, Y., Ikebe, K., Takeshige, F., Yasuda, H., Komori, T. and Toyosawa, S.（2017）: Immunohistochemical analysis of dentin matrix protein 1（Dmp1）phosphorylation by Fam20C in bone: implications for the induction of biomineralization. *Histochem Cell Biol*, **147**, 341–351.
8）Raine, J., Winter, R.M., Davey, A. and Tucker, S.M.（1987）: Unknown syndrome: Microcephaly, hypoplastic nose, exophthalmos, gum hyperplasia, cleft palate, low set ears, and osteosclerosis. *J Med Genet*, **26**, 786–788.
9）Simpson, M.A., Hsu, R., Keir, L.S., Hao, J., Sivapalan, G., Ernst, L.M., Zackai, E.H., Al-Gazali, L.I., Hulskamp, G., Kingston, H.M., Prescott, T.E., Ion, A., Patton, M.A., Murday, V., George, A. and Crosby, A.H.（2007）: Mutations in FAM20C are associated with lethal osteosclerotic bone dysplasia（Raine syndrome）, highlighting a crucial molecule in bone development. *Am J Hum Genet*, **81**, 906–912.
10）Faundes, V., Castillo-Taucher, S., Gonzalez-Hormazabal, P., Chandler, K., Crosby, A. and Chioza, B.（2014）: Raine syndrome: an overview. *Eur J Med Genet*, **57**, 536–542.
11）Whyte, M.P., McAlister, W.H., Fallon, M.D., Pierpont, M.E., Bijanki, V.N., Duan, S., Otaify, G.A., Sly, W.S. and Mumm, S.（2017）: Raine Syndrome（OMIM #259775）, Caused By FAM20C Mutation, Is Congenital Sclerosing Osteomalacia With Cerebral Calcification（OMIM 259660）. *J Bone Miner Res*, **32**, 757–769.
12）Wang, X., Wang, S., Li, C., Gao, T., Liu, Y., Rangiani, A., Sun, Y., Hao, J., George, A., Lu, Y., Groppe, J., Yuan, B., Feng, J.Q. and Qin, C.（2012）: Inactivation of a Novel FGF23 Regulator, FAM20C, Leads to Hypophosphatemic Rickets in Mice. *PLoS Genet*, **8**, e1002708.
13）Vogel, P., Hansen, G.M., Read, R.W., Vance, R.B., Thiel, M., Liu, J., Wronski, T.J., Smith, D.D., Jeter-Jones, S. and Brommage, R.（2012）: Amelogenesis Imperfecta and Other Biomineralization Defects in Fam20a and Fam20c Null Mice. *Vet Pathol*, **49**, 998–1017.
14）Liu, P., Ma, S., Zhang, H., Liu, C., Lu, Y., Chen, L. and Qin, C.（2017）: Specific ablation of mouse Fam20C in cells expressing type I collagen leads to skeletal defects and hypophosphatemia. *Sci Rep*, **7**, 3590.
15）Tagliabracci, V.S., Engel, J.L., Wiley, S.E., Xiao, J., Gonzalez, D.J., Nidumanda, Appaiah, H., Koller, A., Nizet, V., White, K.E. and Dixon, J.E.（2014）: Dynamic regulation of FGF23 by Fam20C phosphorylation, GalNAc-T3 glycosylation, and furin proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**, 5520–5525.