

2008年8月12日

独立行政法人 理化学研究所

骨代謝にかかわる破骨細胞の分化を阻害する物質を発見

- 破骨細胞の機能解明や新たな骨疾患治療薬の開発に期待 -

破骨細胞は、骨を溶解（吸収）する細胞として、骨を作る骨芽細胞とともに、生体内で正常な骨組織の発達や血中のカルシウム値の制御を担っています。血液細胞の単球・マクロファージ系の前駆細胞から、単核の破骨細胞に分化したのち、それらが融合して多核の巨細胞へと成熟していきます。

破骨細胞の骨吸収機能が亢進すると、骨粗しょう症やがんの骨転移など、さまざまな骨疾患を引き起こすことが知られています。破骨細胞の働きを抑えるような薬の開発が、いまだ謎の多い破骨細胞の機能を明らかにし、骨の代謝疾患の治療薬の創製を可能にします。

理研基幹研究所ケミカルバイオロジー研究領域化合物バンク開発研究グループは、理研天然化合物バンク「RIKEN NPDepo」で保管している24,000個の化合物から破骨細胞の機能を阻害する分子量304の低分子化合物「メチルゲルフェリン」を発見しました。さらに、研究グループが独自に開発した光親和性低分子固定化技術を使って、この物質が細胞内で解毒代謝関連酵素の1つである「グリオキサラーゼI」を標的にして破骨細胞の分化を抑制していることを突き止めました。X線結晶構造解析を行い、メチルゲルフェリンがグリオキサラーゼIと相互作用する様子を分子レベルで明らかにしました。

破骨細胞の分化メカニズムや機能の解明に重要な鍵を得たことになるとともに、骨代謝にかかわる疾患の治療薬の開発へ貢献することが期待されます。

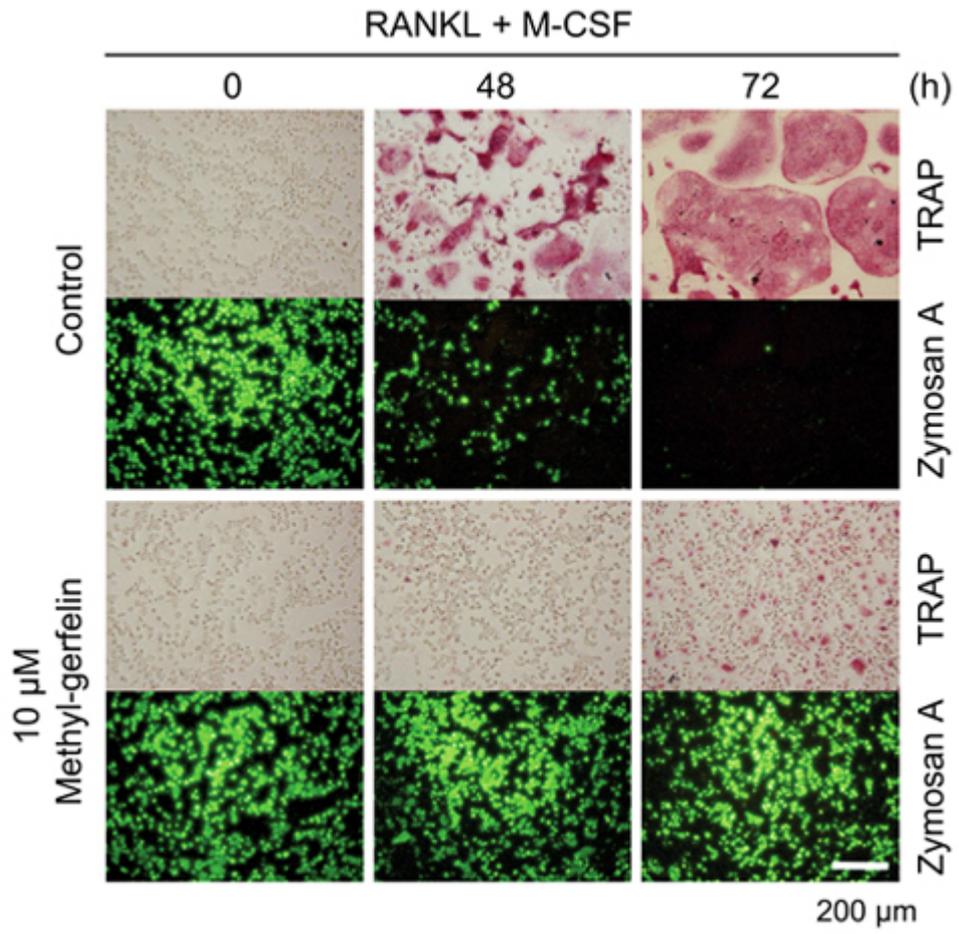


図 破骨細胞の分化に対するメチルゲルフェリンの効果

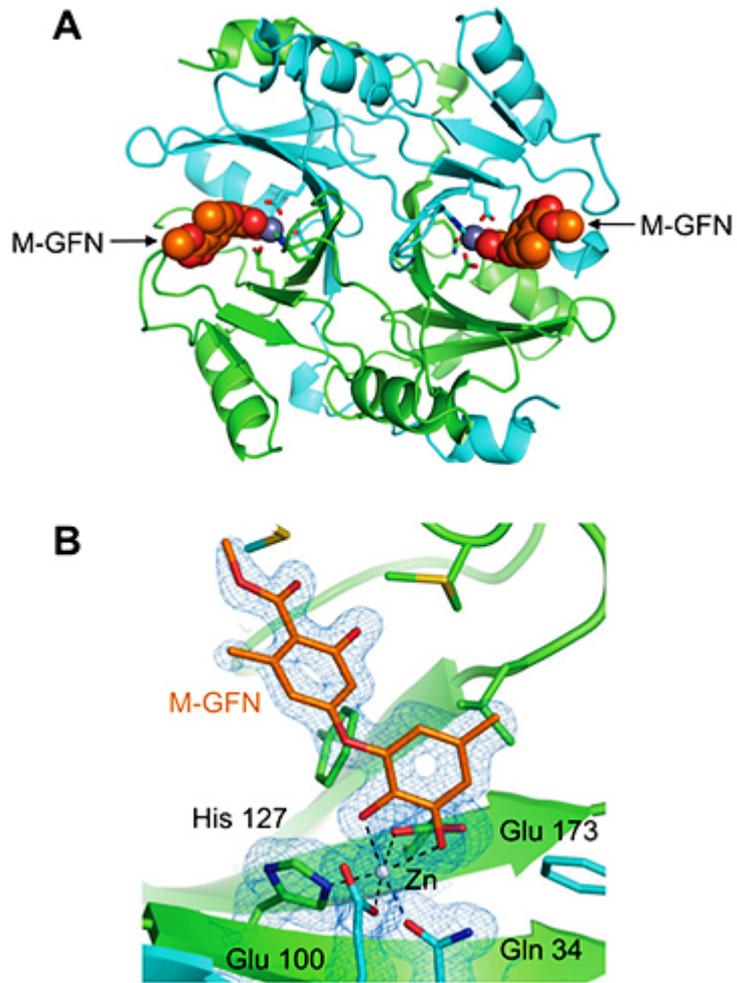


図 メチルゲルフェリン/マウスグリオキサラーゼ I 複合体の立体構造 (下)

2008年8月12日
独立行政法人 理化学研究所

骨代謝にかかわる破骨細胞の分化を阻害する物質を発見

- 破骨細胞の機能解明や新たな骨疾患治療薬の開発に期待 -

◇ポイント◇

- 理研天然化合物バンクを駆使し、破骨細胞機能阻害物質「メチルゲルフェリン」を同定
- 解毒代謝関連酵素「グリオキサラーゼI」との結合で阻害機能を発揮
- X線結晶構造解析により標的タンパク質との相互作用を分子レベルで解明

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、低分子化合物メチルゲルフェリン^{*1}が破骨細胞の働きを阻害することを発見し、その作用メカニズムを明らかにしました。これは、基幹研究所（玉尾皓平所長）ケミカルバイオロジー研究領域化合物バンク開発研究グループの長田裕之グループディレクター、川谷誠協力研究員、奥村英夫基礎科学特別研究員が、先端技術基盤部門バイオ解析チームの堂前直チームヘッド、慶應義塾大学工学部井本正哉教授らとの共同研究により得た成果です。

破骨細胞は、単球・マクロファージ系の前駆細胞から分化する骨溶解（吸収）能をもった細胞で、骨粗鬆症やがんの骨転移などのさまざまな疾患の発症や進行に深くかかわっていることが知られています。研究グループは、理研天然化合物バンク（RIKEN NPDepo）^{*2}で保管している化合物などから、破骨細胞の機能を阻害する物質を探索し、分子量304の低分子化合物メチルゲルフェリンが破骨細胞の分化を阻害することを発見しました。さらに、研究グループが独自に開発した光親和性低分子固定化技術^{*3}を使って、メチルゲルフェリンが細胞内で解毒代謝関連酵素の1つであるグリオキサラーゼI^{*4}を標的とし、その働きを抑えることで破骨細胞の分化を抑制していることを突き止めました。また、研究チームは、大型放射光施設SPring-8^{*5}の理研ビームライン（BL26B2）を利用して、メチルゲルフェリン-グリオキサラーゼI複合体のX線結晶構造解析を行い、メチルゲルフェリンがグリオキサラーゼIと相互作用する様子を分子レベルで明らかにしました。新たな破骨細胞機能阻害物質を発見し、その作用メカニズムを解明できたことから、今後破骨細胞の機能の一端が明らかとなり、骨代謝疾患治療薬の開発に貢献をもたらすと期待できます。

今回の研究成果は、文部科学省科学研究費補助金（学術創成及び若手B）の助成を活用して行なったもので、米国科学アカデミー紀要『*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: PNAS*』8月11日の週にオンライン掲載されます。

1. 背景

破骨細胞は、骨を溶解（吸収）する細胞で、単球・マクロファージ系の前駆細胞から分化する多核の巨細胞です。破骨細胞への分化では、まず単核破骨細胞が形成され、それらが融合して多核の破骨細胞へと成熟していきます。生体内では、骨を吸収する破骨細胞が、骨を形成する骨芽細胞と協調的に働いて、正常な骨組織の発

達や血中カルシウム値の制御を担っています。しかし、破骨細胞の骨吸収機能が亢進すると、社会的に大きな問題となっている骨粗鬆症やがんの骨転移などを発症、進行させる原因となることが知られています。そのため、破骨細胞の働きを抑えるような薬剤の開発は、いまだ未解明な点の多い破骨細胞の機能を明らかにするだけでなく、骨代謝疾患に対する治療薬の創製につながると考えられます。そこで、研究グループは、多種多様な低分子化合物を収集し、現在 24,000 化合物を保管している理研天然化合物バンク（RIKEN NPDepo）を活用し、破骨細胞の機能を阻害する化合物を探索しました。

2. 研究手法と成果

(1) 破骨細胞機能阻害物質の探索

マウス骨髄マクロファージ細胞に、破骨細胞の分化誘導に必須なサイトカイン RANKL^{*6}とM-CSF^{*6}を添加して 2~3 日間培養すると、培養プレート上で単核の破骨細胞へと分化します。引き続き培養していくと、単核破骨細胞が融合し、多核で巨大な成熟破骨細胞が形成されていきます。96 穴培養プレート上で、これら 2 種類のサイトカインとともに、化合物バンクに保管されている試験化合物を培養液中に添加し、破骨細胞の分化あるいは生存を阻害する活性を指標にして、活性化合物のスクリーニングを行いました。その結果、カビ由来の天然低分子化合物ゲルフェリン（分子量 290）およびその合成誘導体メチルゲルフェリン（分子量 304）が、破骨細胞の分化を阻害することを発見しました（図 1）。ゲルフェリンに比べて、メチルゲルフェリンの方が数十倍強い破骨細胞の分化阻害活性を示しました。また、これらの化合物で処理した細胞は、分化の際に失われるマクロファージ細胞としての形質（貪食能）を維持したままでした（図 1）。これは、破骨細胞への分化が阻害されたことを裏付けています。

(2) メチルゲルフェリンの細胞内標的分子の同定

メチルゲルフェリンと結合するタンパク質を特定するため、研究グループが独自に開発した光親和型低分子固定化技術を用いて作製したメチルゲルフェリンアフィニティービーズを使用しました。これは、特殊なビーズ（樹脂）表面にメチルゲルフェリンを光照射で固定化したもので、細胞の抽出液と混ぜ合わせるとメチルゲルフェリンに結合するタンパク質を釣り上げることができます。このようにして釣り上げたタンパク質を分析したところ、メチルゲルフェリンは、解毒代謝関連酵素の 1 つであるグリオキサラーゼ I に結合していることがわかりました。さらに、種々の分子生物学的手法を駆使して解析した結果、メチルゲルフェリンは、グリオキサラーゼ I に結合してその働きを抑え、破骨細胞の分化を抑制していることが判明しました。

(3) メチルゲルフェリン-グリオキサラーゼ I 複合体の立体構造解析

メチルゲルフェリンがグリオキサラーゼ I とどのように結合しているのかを分子レベルで解明するために、メチルゲルフェリンとグリオキサラーゼ I の共結晶を作製し、大型放射光施設 SPring-8 の理研ビームライン（BL26B2）を利用して X 線結晶構造解析を行いました。その結果、メチルゲルフェリンは、グリオキサラ

ーゼIの活性部位(基質が結合する領域)に存在する亜鉛イオンとの配位結合^{*7}を介して、グリオキサラーゼIと結合していることがわかりました(図2)。

3.今後の期待

今回、研究グループは、破骨細胞の機能を阻害する新規の低分子化合物メチルゲルフェリンを発見し、その細胞内標的分子がグリオキサラーゼIであることを突き止めました。これにより、メチルゲルフェリンが、グリオキサラーゼIの機能や破骨細胞の分化メカニズムを解明する重要な鍵となるだけでなく、今後、薬剤開発へと進めば、破骨細胞の骨吸収亢進がかかわる疾患に対する治療薬として、臨床応用も期待できます。また、メチルゲルフェリンとグリオキサラーゼIの相互作用を分子レベルで明らかにしたことから、薬剤開発において、例えばメチルゲルフェリンよりも強力な破骨細胞の機能阻害作用を持つ分子設計が可能になります。

近年、化学物質を出発点として生命現象の解明を目指す研究分野、「ケミカルバイオロジー」が注目されています。研究グループでは、ケミカルバイオロジー研究で重要となる化合物バンクの整備や、化合物-タンパク質複合体の検出手法の開発などを進めており、今後ケミカルバイオロジー研究が、生命科学研究や創薬研究をますます進展させるものと期待されます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

基幹研究所 ケミカルバイオロジー研究領域

化合物バンク開発研究グループ

グループディレクター 長田 裕之(おさだ ひろゆき)

Tel : 048-467-9541 / Fax : 048-462-4669

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

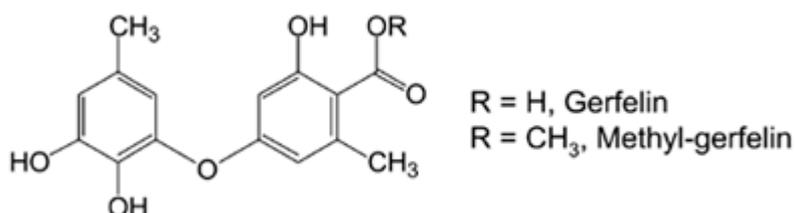
Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 メチルゲルフェリン

慶應義塾大学工学部井本正哉教授らが2003年に、真菌 *Beauveria felina* QN22047株から単離したゲルフェリンの合成誘導体。



※2 理研天然化合物バンク(RIKEN NPDepo)

理研基幹研究所 ケミカルバイオロジー研究領域 化合物バンク開発研究グループの長田抗生物質研究室が中心となって整備・運営している化合物バンク。2007年に完成し、通称ケミカルバンクとして機能している。放線菌の2次代謝産物をはじめとする天然物の収集・保管、機器分析スペクトルのデータベース化、これらを提供するシステムの整備などを進めている。現在、およそ24,000化合物を保管している。

※3 光親和型低分子固定化技術

スライドガラスやアガロースなどの固相担体上に導入された光反応性基（アリールジアジリン基）の光分解により発生するカルベンを介して、低分子化合物を固相担体上に固定化する方法（Kano, N. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 5584-5587 (2003)、Kano, N. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44: 3559-3562 (2005)）。本手法は、低分子化合物側に特定の官能基を必要とせず、官能基、部位非特異的に固定化されるため、多様な構造を有する低分子化合物を一律に固定化することができる。

※4 グリオキサラーゼ I

細胞内でグリオキサラーゼ II とともにグリオキサラーゼシステムにかかわる酵素。主に、解糖系の副産物として生じるメチルグリオキサールを、乳酸に変換する解毒機構にかかわる。グリオキサラーゼ I は、メチルグリオキサールがグルタチオンと非酵素的に反応して生成したヘミチオアセタールを、ラクトイルグルタチオンに変換する活性を持つ。

※5 大型放射光施設 SPring-8

理研が所有する、兵庫県播磨科学公園都市にある世界最高の放射光を作り出す施設。放射光とは、電子を光とほぼ等しい速度まで加速し、電磁石によって進行方向を曲げたときに発生する強力な電磁波のことである。放射光を利用すると、タンパク質などの微細な構造を分子レベルで明らかにすることが可能となる。

※6 RANKL、M-CSF

RANKL (receptor activator of NF- κ B) は、TNF (tumor necrosis factor) ファミリーの一員で、破骨細胞の分化に必須なサイトカインである。M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) は、単球・マクロファージ系の増殖因子で、破骨細胞分化において RANKL とともに必須因子として作用する。

※7 配位結合

結合を形成する2つの原子の一方だけが、結合電子を分子軌道に提供する化学結合。

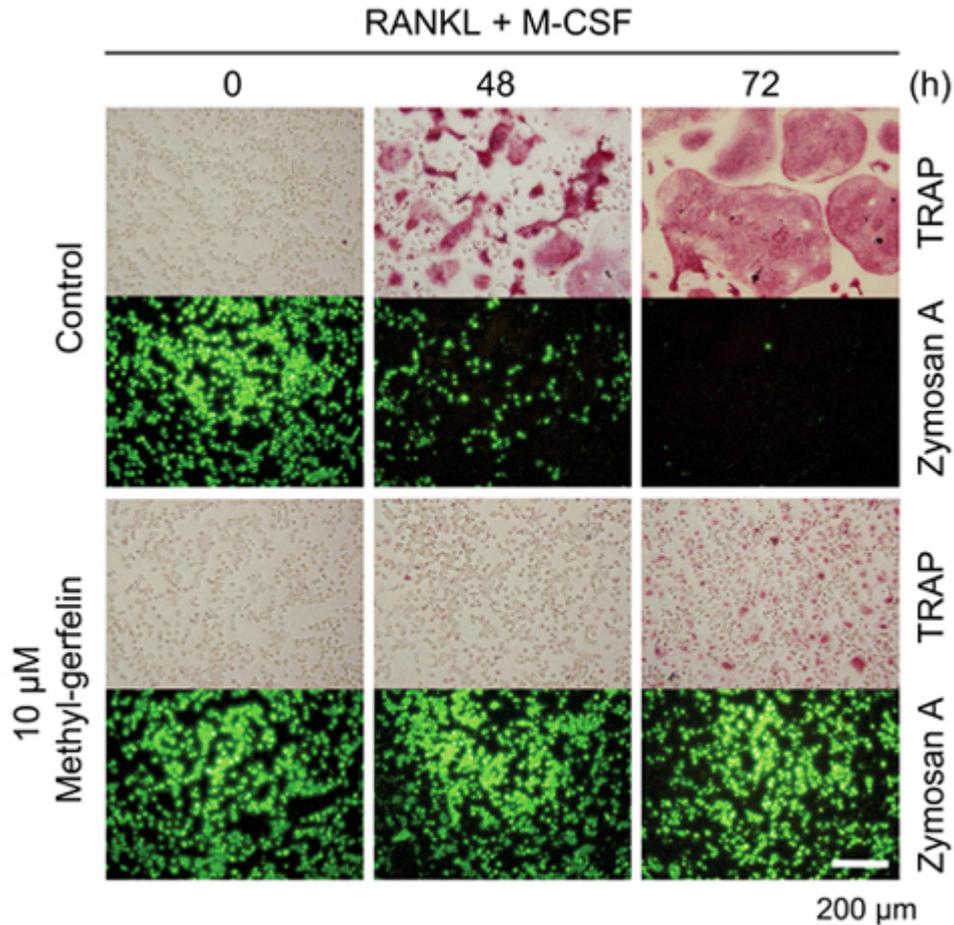


図1 破骨細胞の分化に対するメチルゲルフェリンの効果

骨髄マクロファージ細胞に RANKL と M-CSF を添加し、破骨細胞の指標として TRAP 染色（赤色、1、3 段目パネル）を、またマクロファージ細胞の指標として貪食能による蛍光標識ザイモサン A の細胞内取り込み（緑色、2、4 段目パネル）を測定した。

コントロールでは、マクロファージ細胞に RANKL と M-CSF を添加すると、48 時間後に TRAP 陽性の単核破骨細胞が形成され、72 時間後にはそれらの細胞が融合し、多核で巨大な成熟破骨細胞が形成される（1 段目のパネル）。このように分化した細胞では、マクロファージ細胞としての貪食能が失われる（2 段目のパネル）。

メチルゲルフェリンを添加したマクロファージ細胞では、RANKL と M-CSF によって誘導される破骨細胞分化が強く阻害される（3 段目のパネル）。このとき、メチルゲルフェリン処理細胞は、マクロファージ細胞としての貪食能を維持している（4 段目のパネル）。

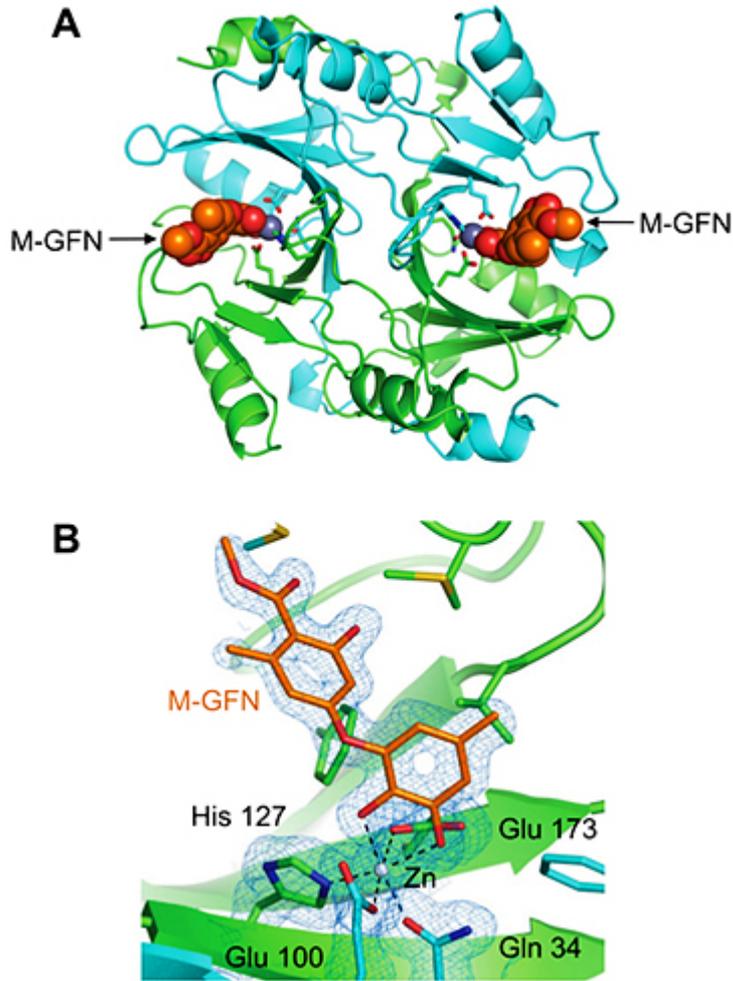


図2 メチルゲルフェリン-マウスグリオキサラーゼI複合体の立体構造

- A: メチルゲルフェリン-マウスグリオキサラーゼI複合体の全体像。グリオキサラーゼIはホモ2量体をなし(緑と青)、2つの基質結合領域を形成する。メチルゲルフェリン(橙色の球、M-GFN)は、その領域にそれぞれ1分子ずつ結合する。灰色の球は亜鉛イオンを示す。
- B: 基質結合領域におけるメチルゲルフェリンの結合像。メチルゲルフェリンの2つの水酸基が、グリオキサラーゼIの基質結合領域に存在する亜鉛イオンと配位結合する。