総 説 (学会賞受賞)

軟骨に対する副甲状腺ホルモン関連ペプチド (PTHrP) の 二極性の作用機序について

網 塚 憲 生

新潟大学大学院医歯学総合研究科 顎顔面再建学講座 硬組織形態学分野

The Bipartite Action of Parathyroid Hormone-related Peptide on Cartilage

Norio Amizuka

*Division of Anatomy and Cell Biology of the Hard Tissue,
Department of Tissue Regeneration and Reconstruction, Course for Oral Life Science,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences,
5274, 2-Bancho, Gakkocho-dori, Niigata 951-8514, Japan*

はじめに

軟骨の研究は、骨代謝研究のなかでも発生生物学的なアプローチの視点から急速に進歩してきた領域の1つである。軟骨細胞の分化増殖、さらに軟骨内骨化に対する調節因子の研究は、基礎的な細胞生物学ばかりでなく先天異常を含めた遺伝子疾患の解明にも及び、その必要性が再認識されている(図1)。そのなかで副甲状腺ホルモン関連ペプチド(parathyroid hormone-related peptide: PTHrP)は、軟骨の分化増殖に最も重要な因子であり、多くの研究者によってその詳細が明らかにされている。PTHrPについては、すでに1950年代にAlbrightが、悪性腫瘍から産生される副甲状腺ホルモン(PTH)様の物質でありhumoral hypercalcemia of malignancyの高カルシウム血症の起因物質としてその存在を提唱していた。しかしながら、実際にそのアミノ酸・遺伝子配列の同定が明らかにされたのは1980年代後半になってからである¹⁻³⁾。Albrightの予想は見事に的中しており、PTHrPはN末端アミノ酸がPTHのそれと高い相同配列を示すため、PTHと共有のPTH/PTHrPレセプターに結合することで副甲状腺機能亢進症様の活性を示すことが知られている。このような歴史的な歩みから、PTHrPは病理学的因子として扱われており、現在でも悪性腫瘍に併発する高カルシウム血症ならびに腫瘍細胞の増殖に及ぼすPTHrPの作用などが精力的に検討さ

れている。ところがPTHrPは、oncoproteinとしての反面、胎生期のさまざまな正常組織で産生されていることから個体発生や器官形成の局所因子として解釈されるようになってきた。PTHrPは胎生期の哺乳類の多くの組織、たとえば、栄養膜、子宮間膜、子宮脱落膜、咽頭嚢、歯胚の発生初期、皮膚の毛嚢、鼻腔の膜迷路の上皮細胞、肺の気管支細胞、腎臓、心筋、胃、脾臓、小腸、軟骨、骨などのさまざまな組織で産生されている^{4,5)}。また、魚類や両生類でもその発現が確認されており、それらの腎臓、鰓、脳下垂体、脊椎、顎、歯、皮膚、骨格筋に局在することが述べられている⁶⁾。

PTHrPをコードする遺伝子に関して、ヒトはマウスやラットと比べて複雑な遺伝子構造を示しており^{7,8)}、特にcoding regionに相当するexon IVよりC末端側にさらに3つのexon V, VI, VIIが存在し、それぞれのexonを含むalternative splicingにより139, 141, 173個のアミノ酸からなる3つのisoformが形成される。またPTHと同様にsignal sequenceを有しており、PTHrPは粗面小胞体・ゴルジ体を経由する過程で成熟型のPTHrPとなり細胞外分泌される。PTHrPのcoding regionのアミノ酸配列においては、PTHとPTHrPでは1-13位までのうち8個が相同であるが、他の部位でのアミノ酸配列はまったく相同性を示さない。3'端にはAUUUAモチーフが存在しほかのサイトカインやoncogene産物のように半減期の短い急速回転型の物質であることが推測される。一方、Massachusetts General

図 1 軟骨および軟骨細胞の分化とそれに対応させた調節因子の模式図。

Hospital の Jüppner により 1991 年に cloning された PTH/PTHrP レセプターは G タンパク共役性レセプターであり、細胞膜を 7 回貫通する α -helix 構造を示しており⁹⁾、PTHrP は PTH が同等の親和性でこのレセプターに結合することで、cAMP および inositol phosphate の産生を介したシグナルを伝達する。

さて、PTHrP は signal sequence を有する分泌型タンパクであるにもかかわらず、87 位から 107 位までのアミノ酸配列をみるとその両端には塩基性アミノ酸が存在し、Human Immunodeficiency Virus type I (HIV-I) である HIV-1 Tat と HIV-1 Rev, Human T-Cell Leukemia Virus type I (HTLV-I) Rex に認められる核小体内局在 (nucleolar targeting signal: NTS) 様の配列を有する (図 2)。もし、PTHrP が細胞外へ分泌され PTH と共有のレセプターに結合する一方、細胞内の核小体へ局在しそこで何らかの機能を営むとすれば、PTHrP は粗面小胞体・ゴルジ系を経て細胞外分泌される経路と細胞内にて合成され核小体へと移行する経路の双極性を示すことになる。本総説では、PTHrP の作用について PTHrP 遺伝子欠損マウスの異常、PTHrP および PTH/PTHrP レセプターの局在を紹介し、最近、注目されつつある PTHrP の核小体移行とそのメカニズムについて解説したい。

図 2 PTHrP の分泌と核小体移行の模式図。下に核小体移行シグナル配列を有する他の物質との比較を示した。

PTHrP 遺伝子欠損マウスにおける軟骨・骨の異常

PTHrP はもともと上皮細胞系の産物であったために、それまで骨格組織に対する影響はほとんど注目されていなかった。ところが、1994 年に gene targeting 法により PTHrP 遺伝子を欠損するマウスが開発されたことで、その重要性が明らかとなった¹⁰⁻¹²⁾。PTHrP 遺伝子欠損 homozygous マウスは、生後数時間で死亡するため、出生前の胎生期 18-19 日齢の homozygous マウスを観察すると、肉眼的な異常として四肢の短縮、下顎骨の低形成に伴う舌の突出、さらには角張った頭蓋骨を示

図 3

A: 胎生 18 日齢の正常 (左) と PTHrP 遺伝子欠損マウス (右) の肉眼所見。それらマウスの脛骨近心骨端の組織 (B: 正常, C: PTHrP 欠損マウス)。矢印は増殖能を有する軟骨細胞の領域を示す。文献 11 より改変。

す (図 3)。組織学的には軟骨の著しい形成不全が認められ、いわゆる軟骨異形成症様を呈する¹¹⁾。すなわち、骨端軟骨が軟骨細胞の分化段階に従って、静止細胞層、増殖細胞層、肥大化細胞層と大きく分類されるなかで、PTHrP 遺伝子欠損マウスでは細胞増殖を行う静止細胞層・増殖細胞層の軟骨細胞数が減少していた。また、軟骨細胞の³H-thymidine の取り込みを統計学的に検討したところ、この変異型マウスの軟骨細胞は増殖低下を示すことがわかった。このことから、PTHrP は軟骨細胞の増殖を正に調節していることが考えられる。また興味ある所見として、PTHrP 欠損マウスの肥大化細胞層では静止細胞層や増殖細胞層の軟骨細胞が混在しており、正常マウスとは異なり、いっせいに肥大化細胞へと分化するタイミングが揃わない (図 4)。それに対する推測の 1 つとして、軟骨細胞の肥大化がプログラムされているとすれば、細胞増殖、すなわち細胞周期に影響を及ぼす PTHrP の欠如が、同調した軟骨細胞の肥大化にも影響を及ぼす可能性は高い。さらに、肥大化細胞層に存在しながらも、肥大化を示さない軟骨細胞は周囲の軟骨基質を石灰化することはできない。したがって、軟骨内骨化

図 4 正常 (A) と PTHrP 欠損マウス (B) の肥大化細胞層の組織像。正常ではすべての細胞が肥大化しているが、PTHrP 欠損マウスでは肥大化しない軟骨細胞 (矢頭) が存在する。アリザリンレッド陽性を示す石灰化基質 (矢印) の配列も PTHrP 欠損マウスでは形成が悪い。文献 11 より改変。

で形成される一次骨梁の足がかりとなる石灰化軟骨基質の形成が抑制されてしまい、引き続き起こる骨組織形成も抑制されてしまう。以上の成績から、PTHrP は軟骨細胞の増殖ならびに分化に重要な因子であることが *in vivo* にて証明され、それを機会に PTH/PTHrP レセプター欠損マウス¹³⁾や Jansen 型¹⁴⁾および Blomstrand 型^{15,16)}の chondrodysplasia の解析へと発展してゆく。

PTHrP と PTH/PTHrP レセプターの局在

PTHrP と PTH/PTHrP レセプターの骨や軟骨組織における局在を明確にすることは PTHrP の作用を解明するうえで重要である。まず、軟骨においては PTHrP は特に胎生期あるいは分化初期の軟骨細胞で比較的多く産生されている (図 1 参照)。一方、PTH/PTHrP レセプターは、増殖能を有する静止細胞層と増殖細胞層の軟

骨細胞、および肥大化細胞層のごく上層の軟骨細胞に局在していることから、PTHrP はそのレセプターを介して autocrine/paracrine 的に作用することが考えられる。骨組織では骨芽細胞系細胞が PTHrP を産生することが報告されており、PTH/PTHrP レセプターも骨芽細胞系細胞に広範囲に存在することが、radioautography, 免疫組織化学, *in situ* hybridization, Northern blotting により一致した見解を得ている¹⁷⁻²¹⁾。PTHrP と PTH/PTHrP レセプターの二重標識の *in situ* hybridization を行うと^{17,18)}, PTHrP の発現は骨基質上の骨芽細胞に局限していたのに対し、PTH/PTHrP レセプターを有する細胞は骨芽細胞ならびに前骨芽細胞と広く局在する(図 5)。また、古典的な手法であるが、¹²⁵I-PTH を用いた電顕 radioautography では骨芽細胞およびそれらと血管の間に存在する骨芽細胞の前駆細胞(前骨芽細胞)の両方に PTH の binding が認められる^{19,20)}。これらの前骨芽細胞は細胞突起を成熟した骨芽細胞などに延ばし細胞接触を行う。この前骨芽細胞はまったく未分化な細胞とは考えられず、Rodan が提唱するように骨芽細胞に対して何らかの調節を行う可能性が推測される。

副甲状腺ホルモン関連ペプチドの核小体移行

PTHrP は PTH/PTHrP レセプターを介して作用することを前提に多くの研究がなされてきたが、一方ではいくつかの疑問点を残している。すなわち、PTHrP は多くの細胞に僅かであるが ubiquitous に存在していることから、PTH/PTHrP レセプターを介した作用ばかりでなく細胞機能の根本にいたる何らかの作用が指摘されている。それを念頭におき、PTHrP に特異的なレセプターと、PTHrP のレセプターを介さない作用が検討されている。後者における発想は、PTHrP は signal sequence を有する分泌型タンパクであるにもかかわらず、87 位から 107 位までのアミノ酸配列をみるとその両端には塩基性アミノ酸が存在し、Human Immunodeficiency Virus などに認められる核小体内局在 (NTS) 様の配列を有することに端を発している(図 2)。われわれは、1995 年に PTHrP の核小体移行シグナルの機能を明らかにするために、full length の PTHrP cDNA および signal sequence を欠く PTHrP cDNA を COS cell に transfection したところ、両者ともに PTHrP の核小体局在を観察している²²⁾。さらに NTS(87-107)を除去した PTHrP cDNA を transfection した場合は、PTHrP タンパクは核小体内移行を示さないことから、この 87-107 位に存在する核小体移行シグナルは実際に

図 5 PTHrP と PTH/PTHrP レセプターの二重標識 *in situ* hybridization。PTHrP は digoxigenin で PTH/PTHrP レセプターは³⁵S にて標識した probe で hybridization を行っている。レセプターの発現は骨芽細胞 (OB) ばかりでなく前骨芽細胞 (矢印) にも認められる。文献 17 より引用。

機能することが示唆された。生体内においても、骨芽細胞の核小体に PTHrP が観察され(図 6)、また、Yale 大学のグループからは、平滑筋細胞では PTHrP が分泌ばかりではなく、核・核小体にも局在することが報告されており、その場合の PTHrP の機能として平滑筋細胞の増殖を亢進することが述べられている²³⁾。

われわれは、signal sequence を有する PTHrP がなぜ核小体に局在するか、その細胞メカニズムの解明の一助として、PTHrP の signal sequence に注目し開始メチオニンをコードする AUG 以外から翻訳される可能性を検討した^{24,25)}(図 7)。その背景としては、human basic FGF の翻訳が non-AUG コドンすなわち CUG コドンからも開始される報告を受けることから^{26,27)}、もしかしたら PTHrP の場合も、メチオニンをコードする AUG の下流にある CUG コドンからも翻訳される可能性があるのではないか、また、そのような alternative translation によって作られるシグナルペプチドが不完全なため、内在する核小体移行シグナルによって核・核小体へと移行するのではないかという仮説をたてた。まず、イヌの臍臓由来の reticulocyte lysate を用いた *in vitro* translation では、microsome free の状態では pre-pro region が付加されている 25 kd PTHrP が検出された。ところが、microsome の存在下で行った場合、21 kd PTHrP ばかりでなく 25 kd PTHrP も認められ、microsome への

図 6 培養骨芽細胞 (A) ならびに *in vivo* の骨芽細胞 (B) の核小体における PTHrP の局在。B では電子密の核小体 (Nu) に PTHrP の金粒子が局在する (矢印)。文献 22 より引用。

移行がきわめて非効率的であることが考えられた (図 8)。そこで、さまざまな rat PTHrP cDNA を設計し、CHO cell に transfection して PTHrP タンパクの局在を検討した。rat PTHrP cDNA の開始メチオニンをコードする AUG から翻訳が始まった場合には、PTHrP タンパクは細胞外分泌を示唆するゴルジ体、および核小体の両方に局在した (図 9)。一方、AUG の下流に存在する 4 つの CUG コドンから翻訳できるように設計した cDNA では、細胞内に翻訳された PTHrP を認めることができ、その場合、PTHrP タンパクは核・核小体に局在するが、分泌経路には観察することができなかった (図 10)。このことは、PTHrP は non-AUG すなわち CUG コドンからも翻訳されうること、また PTHrP タンパクは核小体移行シグナルによって核小体へと局在することを意味している。ところが、4 つあるすべての CUG を同じくロイシンをコードするが翻訳開始部位になりえない UUG に変異させることで、AUG のみからの翻訳を誘導した場合でも、PTHrP は細胞外分泌と核小体局在の両方の局在を示した。この結果は、PTHrP は AUG・CUG コドンの両方から翻訳が行われ、そのどちらでも核小体に移行することを示している。したがって、核小体移行のメカニズムは、当初、われわれが考えた alternative translation によるものではなく、別の機構を考えなくてはならない結果となった。可能性としては、PTHrP の signal sequence 自体の機能性に問題があり、たとえば ribosome/mRNA complex と粗面小胞体などの会合の

図 7 rat PTHrPcDNA の signal sequence と coding region を示した図。ロイシンをコードする CUG (CTG) が ATG の下流に 4 つ存在する。下図は、おのおのの CTG を含むように設計した cDNA 4 種類、CTG を TTG に変異させた cDNA、核小体移行シグナル (NTS) を除去した cDNA、さらに signal sequence (ss) を除去し ATG を付加したもの、またはしなかった cDNA の模式図を示している。文献 24 より引用。

図 8 reticulocyte lysate を用いた *in vitro* translation を行った所見。microsome 存在下 (ms+) でも 25 kd PTHrP が検出される。CHO cell への transfection を行った場合でも同様に 21 kd と 25 kd の PTHrP が検出される。文献 24 より引用。

機序などに及んで考慮する必要性が生じる。また、メチオニンをコードする AUG から翻訳された場合でも PTHrP が核小体に局在する事実は、いちど細胞外分泌された PTHrP が、細胞膜上の PTH/PTHrP レセプターに結合し internalize したために生じる可能性もある。しかしながら、PTH/PTHrP レセプターを発現させた細胞に PTHrP を作用させても、PTH/PTHrP レセプタータンパクはゴルジ体などの領域へと internalization を示すが、核・核小体への局在は観察されず、また、その場合の PTHrP は核小体に認められなかった。このことから、PTHrP の核小体移行は PTH/PTHrP レセプターを介するものではないと思われる (図 11)。

一方、PTHrP の翻訳が AUG コドン以外からも開始することは興味深い現象であり、たとえば、Kozak の context によると、AUG コドンがすぐに必要十分条件になるのではなく、開始コドンの -3 に A, +4 に G が位置することにより開始コドンの機能効率が上昇することが述べられている²⁸⁾。したがって Kozak の説によると、PTHrP の開始メチオニンをコードする AUG はこの条件を満たしてはいない。すなわち、40 S ribosome は開始コドンの 5' 側に結合し開始コドンまで scan すると 60 S ribosome が結合し複合体を形成することが記載されて

図 9

A : PTHrP 遺伝子を CHO 細胞に発現し、PTHrP タンパクの局在を免疫組織化学的に示した所見。PTHrP の局在はゴルジ体 (G) と核小体 (Nu) に認められる。N : 核
B : 発現した PTHrP の細胞内局在を免疫電顕観察した所見。細胞質および核小体 (矢印) に免疫局在が観察される。文献 24 より引用。

いるが (scanning theory), AUG コドンが 40 S ribosome の scanning の停止部位に確実になり得るかが問題となる²⁹⁾。いずれにしても、PTHrP の翻訳が AUG コドン以外からも行われていることは、Karaplis のグループによっても報告されており、おおむね一致した見解を得ている³⁰⁾。また、PTHrP を基本的に進化論的に原始的なタンパクであると解釈する研究者も多く、タンパク機能が分化していない多機能を有する物質ととらえる見方もある³¹⁾。その観点に沿えば、コード領域ばかりでなく signal sequence においても未分化、すなわち非効率なのかもしれない。

PTHrP の核小体移行のメカニズムに関して、他の研究グループによっていくつかの点が明らかにされている。Gillespie のグループは、PTHrP の核小体移行が細胞周期の G1 期に認められ、cyclin E/p 33^{cdk2}, cyclin A/

図 10 truncated PTHrP cDNA を transfection した後の PTHrP タンパクの局在。

A: 4つの CTG から truncated した cDNA を transfection した場合, PTHrP タンパクは核 (N)・核小体 (Nu) に認められた。B: CTG を TTG に変異させることで translation の initiation site にならないようにした場合, PTHrP は分泌を示唆するゴルジ体 (G) と核小体 (Nu) の両方の局在を示した。C: NTS を除去した場合は PTHrP はゴルジ体 (G) のみに観察された。D: signal sequence を除去し ATG を付加した場合は PTHrP は核小体 (Nu) に認められた。文献 24 より引用。

p33^{cdk2}, cyclin B/p34^{cdc2}によってリン酸化される G2/M 期では PTHrP は細胞質内に局在することを報告している³²⁾。また Gillespie らは, PTHrP が importin β によって核周囲まで輸送されることを述べている³³⁾。また, Aarts らは PTHrP の₈₇GXKKXXK₉₃アミノ酸配列が RNA と結合する可能性を指摘しており, そのために ribosome RNA の合成の場である核小体に移行する機序を推察している³⁴⁾。

その一方で, 核小体の PTHrP の生物学的機能に関しては, それほど解析が進んでいないのが現状である。われわれは, PTHrP 遺伝子欠損マウスで最も異常を示したのが軟骨細胞であることから, ラット正常前軟骨細胞に由来する CFK2 cell を用いて PTHrP cDNA を transfection する実験を行った。コントロール CFK2 cell を無血清培地で長期間培養すると, 核の凝集や DNA laddering が検出されることからアポトーシス様の細胞死を示した。ところが, 上述の truncated PTHrP cDNA を CFK2 cell に transfection したところ, full length の PTHrP や signal sequence を欠如した PTHrP は核小

体内への移行を示し, それら細胞はアポトーシスに対する抵抗性を示した²²⁾。この結果は, PTHrP は軟骨細胞に対してその増殖ばかりでなく, 細胞周期や細胞の寿命に影響を与える可能性を示唆しているのかもしれない。

副甲状腺ホルモン関連ペプチド特有の レセプターの可能性

MGH の Jüppner のグループは, PTHrP に特異的に結合する第3のレセプターである PTHrP レセプター type III (PTH3R) を zebrafish から cloning している^{35,36)}。Jüppner らは, zebrafish の M6/7 と M7 exon をもとに PTH/PTHrP レセプター (PTH1R と略) と PTH3R の部分的な genomic DNA を作製し, さらに, transmembrane domain である TM3 から TM6 までの約 450 bp の partial sequence を求め, 引き続き 5'-RACE, 3'-RACE 法により full length の PTH1R と PTH3R を決定している。新しく得られた PTH3R は, Usdin らが報告した PTH に特異的な PTH レセプ

図 11 PTH/PTHrP レセプターを発現させた CHO cell に PTHrP を作用させた場合の所見。
A : CHO cell は通常は PTH/PTHrP レセプターを発現しておらず, PTH/PTHrP レセプター-cDNA を transfection すると, B のように細胞膜に一致した局在を示す (矢頭: 緑色)。C : それらの細胞に PTHrP を過剰発現する CHO cell の培養上澄を加えると, PTH/PTHrP レセプターは internalization により細胞質内に局在するが (矢印), 核小体には移行しない。D : 同様の場合の PTHrP タンパクの局在を示した所見。PTHrP の核小体局在は認められない。核はエチジウムブロマイドで赤く染色してある。文献 24 より引用。

ター-type II (PTH 2 R)³⁷⁾よりも, PTH 1 R に類似しており, たとえば, zebrafish から得られた PTH 1 R (zPTH 1 R) は human PTH 1 R との間では 76% の相同性を示している。さらに彼らは, zPTH 1 R, zPTH 3 R および human PTH 1 R を COS cell に transfection して, PTH, PTHrP によるレセプターの活性を検索している。その結果, zPTH 3 R は PTHrP により cAMP の蓄積を最も強く示したが, PTH に対しては PTHrP の 22 分の 1 しか活性をもたない。また, zPTH 3 R は PTHrP および PTH の両方に対して inositol phosphate の産生をほとんど示さないという。このように, zebrafish において PTHrP に高親和性を示すレセプターが cloning されており, 今後, mammalian における PTH 3 R の研究が期待される。

おわりに

以上, PTHrP は従来の PTH/PTHrP レセプターを介する作用が主流と考えられながらも, PTHrP の核小体移行について新たな知見が発表されつつあり, また, 後述した PTHrP に特異的な第 3 の受容体の cloning にも期待が寄せられる。ここでは, 軟骨の研究を中心に述べたが, PTHrP は上皮細胞・腫瘍細胞においてもきわめて重要な因子であり, 国際的には骨代謝研究に限らず広く研究されている因子である。今後の研究の新展開に期待したい。

本研究内容は, 第 42 回歯科基礎医学会賞受賞講演にて発表した内容を中心にまとめました。歯科基礎医学会賞の受賞に

あたり、加藤有三理事長および選考委員の先生方、またご支援いただきました多くの先生方に厚く御礼を申し上げます。また、本研究テーマを遂行するにあたり、多大なご助言・ご指導をいただきました新潟大学大学院医歯学総合研究科 顎顔面再建学講座 硬組織病態生化学分野の織田公光教授、硬組織形態学分野の佐々木朝代博士、昭和大学歯学部生化学講座の入江真理子博士、ならびに松本歯科大学・総合歯科医学研究所長小澤英浩教授に心から御礼申し上げます。

文 献

- 1) Strewler, G., Stern, J. P. H., Jacob, J. W., Eveloff, J. W., Klein, R. F., Leung, S. C., Rosenblatt, M. and Nissenson, R. A. : Parathyroid hormonelike protein from human renal carcinoma cells : structural and functional homology with parathyroid hormone. *J. Clin. Invest.* **80** : 1803—1807, 1987.
- 2) Burtis, W. J., Wu, T., Bunch, C., Wysolmerski, J. J., Isogna, K. L., Weir, E. C., Broadus, A. E. and Stewart, A. F. : Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *J. Biol. Chem.* **161** : 7151—7156, 1987.
- 3) Suva, L. J., Winslow, G. A., Wettenhall, R. E. H., Hammond, R. G., Moseley, J. M., Diefenbach-Jaggard, H., Rodda, C. P., Kemp, B. E., Rodriguez, H., Chen, E. Y., Hudson, P. J., Martin, T. J. and Wood, W. I. : A parathyroid hormone-related protein implicated malignant hypercalcemia : cloning and expression. *Science* **237** : 893—896, 1987.
- 4) Senior, P. V., Heath, D. A. and Beck, F. : Expression of parathyroid hormone-related protein mRNA in the rat before birth : demonstration by hybridization histochemistry. *J. Mol. Endocrinol.* **6** : 281—290, 1990.
- 5) Kramer, S., Reynolds, F. H., Jr, Castillo, M., Valenzuela, D. M., Thorikay, M. and Sorvillo, J. M. : Immunological identification and distribution of parathyroid hormone-like protein polypeptides in normal and malignant tissues. *Endocrinology* **128** : 1927—1937, 1991.
- 6) Ingelton, P. M., Hazon, N., Ho, P. M. W., Martin, T. J. and Danks, J. A. : Immunodetection of parathyroid hormone-related protein in plasma and tissues of an elasmobranch (*Scliorhinus canicula*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **98** : 211—218, 1995.
- 7) Karaplis, A. C., Yasuda, T., Hendy, G. N., Goltzman, D. and Banville, D. : Gene encoding parathyroid hormone-like peptide : Nucleotide sequence of the rat gene and comparison with human homologue. *Mol. Endocrinol.* **4** : 441—446, 1990.
- 8) Yang, K. H. and Stewart, A. F. : Parathyroid hormone-related protein : The gene, its mRNA species, and protein product. *Principle of Bone Biology*. pp. 347—362, Academic Press, San Diego, 1996.
- 9) Jüppner, H., Abou-Samra, A.-B., Freeman, M., Kong, X. M., Schipani, E., Richards, J., Kolakowski, L. F., Jr., Hock, J., Potts, J. T., Jr., Kronenberg, H. M. and Segre, G. V. : A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* **254** : 1024—1026, 1991.
- 10) Karaplis, A. C., Luz, A., Glowacki, J., Bronson, R. T., Tybulewicz, V. L. J., Kronenberg, H. M. and Mulligan, R. C. : Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev.* **8** : 277—289, 1994.
- 11) Amizuka, N., Henderson, J. E., Warshawsky, H., Goltzman, D. and Karaplis, A. C. : Parathyroid hormone-related peptide-depleted mice show abnormal epiphyseal cartilage development and altered endochondral bone formation. *J. Cell Biol.* **126** : 1611—1623, 1994.
- 12) Amizuka, N., Karaplis, A. C., Henderson, J. E., Hoshi, K., Warshawsky, H., Ozawa, H. and Goltzman, D. : Programmed cell death of chondrocytes and aberrant chondrogenesis in mice homozygous for parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) gene deletion. *Endocrinology* **137** : 5055—5067, 1996.
- 13) Lanske, B., Karaplis, A. C., Lee, K., Luz, A., Vortkamp, A., Pirro, A., Karperien, M., Defize, L. H., Ho, C., Mulligan, R. C., Abou-Samra, A.-B., Jüppner, H. and Segre, G. V. : PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* **273** : 663—666, 1996.
- 14) Schipani, E., Kruse, K. and Jüppner, H. : A constitutive active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia. *Science* **268** : 98—100, 1995.
- 15) Jobert, A. S., Zhang, P., Couvineau, A., Bonaventure, J., Roume, J., Le Merrer, M. and Silve, C. : Absence of functional receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Blomstrand chondrodysplasia. *J. Clin. Invest.* **102** : 34—40, 1998.
- 16) Karaplis, A., He, M. B., Nguyen, A., Young, I. D., Semeraro, D., Ozawa, H. and Amizuka, N. : Blomstrand chondrodysplasia caused by a missense mutation in the human parathyroid hormone receptor-1. *Endocrinology* **139** : 5255—5258, 1998.
- 17) Amizuka, N., Karaplis, A. C., Warshawsky, H., Henderson, J. E., Lipman, M. L., Matsuki, Y., Ejiri, S., Tanaka, M., Izumi, N., Ozawa, H. and Goltzman, D. : Haploinsufficiency of parathyroid hormone related peptide (PTHrP) results in abnormal post-natal bone

- development. *Dev. Biol.* **175** : 166—176, 1996.
- 18) Amizuka, N., Goltzman, D. and Ozawa, H. : The biologic action of parathyroid hormone-related peptide on bone cells. *Tissue Engineering* **2** : 277—287, 1996.
 - 19) Rouleau, M. F., Warshawsky, H. and Goltzman, D. : Parathyroid hormone binding *in vivo* to renal, hepatic, and skeletal tissues of the rat using a radioautographic approach. *Endocrinology* **118** : 919—931, 1986.
 - 20) Rouleau, M. F., Mitchell, J. and Goltzman, D. : Characterization of the major parathyroid hormone target cell in the endosteal metaphysis of rat long bones. *J. Bone Miner. Res.* **5** : 1043—1053, 1990.
 - 21) Suda, N., Gillespie, M. T., Traianedes, K., Zhou, H., Ho, P. W. M., Hards, D. K., Allan, E. H., Martin, T. J. and Moseley, J. M. : Expression of parathyroid hormone-related protein in cells of osteoblast lineage. *J. Cell Physiol.* **166** : 94—104, 1996.
 - 22) Henderson, J. E., Amizuka, N., Warshawsky, H., Biasotto, D., Lanske, B. M. K., Goltzman, D. and Karaplis, A. C. : Molecular targeting signal in parathyroid hormone-related peptide protects chondrocytes from apoptotic death. *Mol. Cell Biol.* **15** : 4064—4075, 1995.
 - 23) Miguel de, F., Massfelder, T. and Stewart, A. F. : The nuclear localization signal (NLS) in parathyroid hormone-related protein (PTHrP) is both necessary and sufficient for nuclear targeting in vascular smooth muscle. *J. Bone Miner. Res.* **15** : S 231, 2000.
 - 24) Amizuka, N., Fukushima-Irie, M., Sasaki, T., Oda, K. and Ozawa, H. : Inefficient function of signal sequence of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) for targeting to the secretory pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273** : 621—629, 2000.
 - 25) Amizuka, N., Henderson, J. E., White, J. H., Karaplis, A. C., Sasaki, T., Goltzman, D. and Ozawa, H. : Recent studies on the biological action of parathyroid hormone (PTH)-related peptide (PTHrP) and PTH/PTHrP receptor in cartilage and bone. *Histol. Histopath.* **15** : 957—970, 2000.
 - 26) Vagner, S., Gensac, M.-C., Maret, A., Bayard, F., Amalric, F., Prats, H. and Prats, A.-C. : Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes. *Mol. Cell Biol.* **15** : 35—44, 1995.
 - 27) Prats, H., Kaghad, M., Prats, A.-C., Klagsbrum, M., Lelias, V. M., Liauzun, P., Chalon, P., Tauber, J. P., Amalric, F., Smith, J. A. and Caput, D. : High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* **86** : 1836—1840, 1989.
 - 28) Kozak, M. : Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation system. *Mol. Cell Biol.* **11** : 5073—5080, 1989.
 - 29) Kozak, M. : How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA?. *Cell* **15** : 1109—1123, 1978.
 - 30) Nguyen, M., He, B. and Karaplis, A. : Nuclear forms of parathyroid hormone-related peptide are translated from non-AUG start sites downstream from the initiator methionine. *Endocrinology* **142** : 694—703, 2001.
 - 31) Mallette, L. E. : PTH and PTHrP and their receptors : Evolutionary aspects. *Principle of Bone Biology.* pp. 405—417, Academic Press, San Diego, 1996.
 - 32) Lam, M. H., Briggs, L. J., Hu, W., Martin, T. J., Gillespie, M. T., and Jans, D. A. : Phosphorylation at the cyclin-dependent kinase site (Thr³⁵) of parathyroid hormone-related protein negatively regulates its nuclear localization. *J. Biol. Chem.* **274** : 7391—7398, 1999.
 - 33) Lam, M. H., House, C. M., Tiganis, T., Mitchelhill, K. I., Sarcevic, B., Cures, A., Ramsay, R., Kemp, B. E., Martin, T. J. and Gillespie, M. T. : Importin β recognizes parathyroid hormone-related protein with high affinity and mediates its nuclear import in the absence of importin α . *J. Biol. Chem.* **274** : 18559—18566, 1999.
 - 34) Aarts, M. M., Levy, D., He, B., Stregger, S., Chen, T., Richard, S. and Henderson, J. E. : Parathyroid hormone-related protein interacts with RNA. *J. Biol. Chem.* **274** : 4832—4838, 1999.
 - 35) Rubin, D. A. and Jüppner, H. : Zebrafish express the common parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor (PTH 1 R) and a novel receptor (PTH 3 R) that is preferentially activated by mammalian and fugu fish parathyroid hormone-related peptide. *J. Biol. Chem.* **274** : 28185—28190, 1999.
 - 36) Rubin, D. A., Hellman, P., Zon, L. I., Lobb, C. J., Bergwitz, C. and Jüppner, H. : A G protein-coupled receptor from zebrafish is activated by human parathyroid hormone and not by human or teleost parathyroid hormone-related peptide. Implications for the evolutionary conservation of calcium-regulating peptide hormones. *J. Biol. Chem.* **274** : 23035—23042, 1999.
 - 37) Usdin, T. B., Cruber, C. and Bonner, T. I. : Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH 2 receptor. *J. Biol. Chem.* **270** : 15455—15458, 1995.