総 説

[Nippon Nôgeikagaku Kaishi Vol. 75, No. 2, pp. 111~119, 2001]

生理活性物質を用いた骨代謝細胞の分化と機能発現の解析[†]

(2000 年度日本農芸化学会功績賞受賞)

永 井 和 夫

(東京工業大学大学院生命理工学研究科)

Key words: bone metabolism; osteoblast; osteoclast; molecular probes; cell fusion

はじめに

全世界的に先進国では高齢化が進んでおり、それに伴いいわゆる生活習慣病に対する関心が深まりつつある。なかでもわが国は世界でもトップレベルの平均寿命を誇るとともに高齢者人口の増加が顕著であり、高齢者の健康な生活をいかに保障するかが重要な課題となっている。特に、高齢化とともに増加する骨粗鬆症は骨の強度が低下するために骨折に至り、かつ回復に長時間を要することから寝たきりとなることも多く、本人の生活の質 (QOL) はもちろん、家族をはじめ社会的な負担も大きいことからその予防ならびに治療法の確立についての期待は極めて大きいといえよう。

骨は支持組織としての機能とカルシウム貯蔵庫としての機能を担っており、血液中のカルシウム濃度が低下すると副甲状腺ホルモン (PTH) などのカルシウム調節ホルモンの作用により骨からのカルシウムの溶出 (骨吸収) が行われ、また逆に血液中のカルシウム濃度が高くなると骨への集積 (骨形成) が行われる。したがって、成長期を終わった個体においても骨では活発に代謝回転が繰り返されているのであり、これを骨のリモデリング (remodeling) という。

骨組織の破壊・吸収に関与する細胞は破骨細胞 (osteoclast)、新たな骨組織の形成に関与する細胞は骨芽細胞 (osteoblast) と呼ばれ、これら細胞の機能により骨量とその構造が維持されている。骨粗鬆症は、

破骨細胞による骨吸収機能が骨芽細胞の骨形成機能を上回ることにより骨密度が低下し発症するのである。

最近、破骨細胞の分化、融合、機能発現に至る過程と骨芽細胞の関与が分子レベルで明らかにされてきており、それに伴い、その過程に作用する生理活性物質の探索ならびに機能発現機構の解析が可能になってきた⁽¹⁾。ここでは、筆者らの研究室での結果を中心としてこれら生理活性物質とその作用機構についての最近の知見を述べる。

1. 試験管内での破骨細胞の形成

破骨細胞は骨髓中の造血幹細胞に由来する細胞で、単球-マクロファージと共通と思われる前駆細胞が分化・融合してできる多核の巨大な細胞である^(2,3)。他方、骨芽細胞は単核の細胞で未分化の間葉系細胞から分化する。マウス骨髓細胞または脾臓細胞と新生児マウス頭蓋骨由来の骨芽細胞との共存培養系に後述する骨吸収因子を添加すると破骨細胞が形成される⁽⁴⁾ (図 1, 2)。骨吸収因子は骨芽細胞に作用し破骨細胞分化因子を生産させる。可溶性の因子および細胞間接触を介して骨芽細胞からの刺激を受けた破骨細胞前駆細胞は酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 陽性の単核破骨細胞 (pOC) に分化し、pOC はさらに融合して多核の破骨細胞様の細胞 (OCL) となる。こうして形成された OCL は骨片上で培養すると活性化した成熟破骨細胞と同様に明帯の部分で骨組織に密着して閉鎖空間を作り、形成された波状縁からプロトンおよびタンパク質分解酵素などを放出することにより骨表面を破壊・吸収し吸収窩 (pit) を形成する能力をもっている^(5,6) (図 1)。

最近、破骨細胞分化因子 (osteoclast differentiation factor: ODF, receptor activator of nuclear factor- κ B ligand: RANKL, osteoprotegerin ligand: OPGL, TNF-related activation-induced cytokine:

[†] Application of Molecular Probes for Studying the Process of Differentiation and Expression of Biological Functions of the Cells Participating in Bone Metabolism

Kazuo NAGAI (Department of Bioengineering, Tokyo Institute of Technology)

図1 破骨細胞の分化、融合、成熟過程における骨芽細胞の関与

破骨細胞は骨髄中の造血幹細胞に由来するマクロファージ系の細胞が、骨吸収因子により活性化した骨芽細胞の発現する M-CSF, RANKL などの活性化因子の刺激を受けて、破骨細胞前駆細胞, TRAP 陽性単核前破骨細胞、融合による多核破骨細胞化、アクチンリング形成を経て成熟化する。成熟破骨細胞は骨面に接着し形成された空間に波状縁からプロトン、タンパク質分解酵素などを放出することにより骨組織を分解、吸収する。四角で囲った化合物は本研究によりこれら過程に作用することが明らかにされたものである。

TRANCE などの名前でも呼ばれる。ここでは統一名として以下 RANKL を用いる) として得られた RANKL が骨吸収因子の作用により骨芽細胞の膜上に発現されることが明らかとなった。RANKL は腫瘍壊死因子 (TNF) ファミリーに属する膜結合型因子である。同じく骨芽細胞から放出されるマクロファージ・コロニー刺激因子 (M-CSF) の作用により RANKL に対する受容体 (receptor activator of nuclear factor- κ B: RANK) を発現した破骨細胞前駆細胞は、細胞間接触を介して骨芽細胞からの RANKL の刺激を受け TRAP 陽性の pOC へと分化しさらに融合して多核細胞 (MNC) となる⁽⁵⁻⁷⁾。

破骨細胞形成を阻害する可溶性因子として得られたオステオプロテゲリン (OPG) (破骨細胞形成抑制因子 osteoclastogenesis inhibitory factor: OCIF と同一物質) は骨芽細胞を含む各種細胞より産生され RANKL のデコイリセプターとして機能することに

より RANKL-RANK の相互作用を阻止し破骨細胞の形成を抑制することが明らかにされている^(5, 6, 8) (図 1)。

2. 骨芽細胞内カルシウム濃度上昇による RANKL mRNA 発現の誘導

筆者らは、この骨髄細胞と骨芽細胞との共存培養系を用いて、上記のような既知の骨吸収因子以外で破骨細胞形成を促進する活性物質があるか探索を行った。その結果 Ca-ATPase の阻害物質として知られるシクロピアゾン酸 (CPA)、カルシウムイオノフォアとして知られるイオノマイシン (IOM) などが骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させるとともに破骨細胞形成を促進し、同様な効果は培養液中のカルシウムを高濃度にした際も観察されることを見いだした⁽⁹⁾。この際骨芽細胞の RANKL および OPG に対応する mRNA 発現を促進することも認められた⁽¹⁰⁾。また、プロテインキナーゼ C (PKC) を活性化するホルボール 12-ミリス

図2 骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞との共存培養系による破骨細胞の形成

マウス新生児から調製した頭蓋骨由来の細胞（骨芽細胞を含む）と成熟マウス大腿骨由来の骨髓細胞とを骨吸収因子（活性型ビタミンD₃など）の存在下で6日間ほど共存培養すると多数の単核破骨細胞が融合した多核細胞（MNC）が形成される。TRAP陽性部分は赤く染色されている。

チン酸13-アセテート（PMA）もRANKLの発現を促進することにより共存培養系での破骨細胞の形成を促進する。

細胞内カルシウムをキレートする1,2-ビス(o-アミノフェノキシ)エタン-N,N,N',N'-テトラ酢酸-テトラ（アセトキシメチル）エステルおよびPKCの阻害剤であるカルフォスチン、スタウロsporinなどはそれぞれIOMおよびPMAにより誘導される共存培養系での破骨細胞の形成ならびに骨芽細胞中でのRANKLおよびOPGのmRNA発現を抑制した。これら共存培養系にOPGを添加するとCPA, IOM, PMAなどによる破骨細胞形成促進効果がなくなることから、骨芽細胞によるRANKLの発現が破骨細胞形成の律速過程になっていると考えられる⁽¹⁰⁾。

cAMPシグナルの活性化物質であるフォルスコリンもこの共存培養系での破骨細胞形成を促進し、骨芽細胞中のRANKL mRNA発現を促進させるがOPG mRNAの発現は抑制した⁽¹⁰⁾。

これまで、破骨細胞の形成を促進するいわゆる骨吸収因子として、活性型ビタミンD₃ (1 α ,25(OH)₂D₃)、プロスタグランジンE₂ (PGE₂)、副甲状腺ホルモン

(PTH)、インターロイキン11(IL-11)、IL-6/可溶性IL-6受容体(sIL-6R)複合体などが知られており、活性型ビタミンD₃は細胞内受容体と結合することにより⁽¹¹⁾、PTHおよびPGE₂は細胞内cAMP濃度を上昇させてプロテインキナーゼA(PKA)を活性化することにより^(12,13)、IL-11、IL-6/sIL-6R複合体はgp130を介したシグナル伝達⁽¹⁴⁾によりそれぞれ最終的に骨芽細胞中のRANKL mRNA発現を促進し、RANKLを介した破骨細胞の形成を促進すると考えられていた。上記細胞内カルシウム濃度上昇によるRANKL mRNAの発現促進効果はこれらのいずれとも異なる第4の破骨細胞形成誘導シグナルといえよう(図1)。

3. 単核破骨細胞(pOC)の調製

前述の共存培養系で用いた骨髓細胞は免疫系細胞をはじめとする多数種の細胞を含んでおり、その中のマクロファージ系の細胞群が骨吸収因子の刺激で活性化し骨芽細胞が生産するM-CSFの作用で分化増殖するとともに膜上にRANKL受容体(RANK)を形成する。さらにこの破骨細胞前駆細胞は骨芽細胞との接触によりRANKLの刺激を受けてTRAP陽性の単核破骨細胞(pOC)となる⁽¹⁵⁾。したがって、共存培養系には

pOCs: 単核前破骨細胞**MNC: 多核破骨細胞**

図3 共存培養系からの単核破骨細胞の調製

図2で示した共存培養系で3日間ほど経過するとTRAP陽性の単核前破骨細胞(pOC)が出現する(写真左)。pOCは骨芽細胞やすでに融合してできたMNCに比べてプレート表面への接着が弱いので、静かにピペッティングするとこの共存培養系からpOCに富んだ細胞(写真右)を分離することができる。細胞をTRAP染色後観察したもの。

破骨細胞ばかりではなく骨芽細胞をはじめとする各種細胞が混在しており、その後の破骨細胞の融合、成熟過程を解析することが困難であった。筆者らは共存培養系から骨芽細胞の混在のないpOCに富む画分を調製する簡便な方法を確立することに成功した⁽¹⁷⁾(図3)。

分離した細胞を用いることによりpOCの多核OCLへの融合過程、多核OCLの形態形成と機能発現などの各過程を詳細に検討することが可能となった。その結果、pOCは骨芽細胞あるいは骨芽細胞の発現する支持因子を添加しないと12時間程度で死滅してしまうこと、M-CSFはpOCの生存を支持し、融合もさせるが骨吸収能をもつ成熟破骨細胞の形成までには至らないこと、成熟破骨細胞の形成には活性化した骨芽細胞か、RANKL, IL-1 β , あるいはTNFなどのサイトカインの存在が必要であることが明らかとなった^(18, 19)。

4. リポポリサッカライド(LPS)によるpOCの融合

グラム陰性細菌の内毒素であるLPSは骨吸収を促進する活性をもつことが知られている^(20, 21)。単離したpOCをLPS処理するとpOCは生存が保障され、さらに融合して多核化することが見いだされた(図1)。この活性は、OPGおよびIL-1受容体拮抗物質の存在下でも観察され、TNF受容体欠損マウスから得たpOCにおいても認められた。したがって、LPSによるpOCの融合促進活性はRANKL, IL-1, およびTNFを介さない経路により発現していると考えられる。LPSの受容体とされるtoll-like receptor 4 (TLR4)⁽²²⁾の機能に欠陥をもつC3H/HeJマウス由来の破骨細胞では生存が支持されなかったことから、このLPSの効果はTLR4を介したものであろう。また、LPSで処理したpOCではNF- κ Bの活性化を抑制しているI κ B

の分解が認められ、かつ I κ B の分解に関与するプロテアソームの活性を阻害するラクタシスチンの存在下では LPS の pOC 融合促進効果が見られないことから、この過程には NF- κ B の活性化が関与していると結論された。以上から、LPS は宿主内に誘導した IL-1, TNF⁽²³⁾ と共同して破骨細胞を活性化することにより骨吸収効果をもたらす歯周病などの原因になると考えられる⁽²⁴⁾。

5. コンパクチンによる破骨細胞の形成および機能発現の阻害

骨髄細胞と骨芽細胞の共存培養系および上記のように調製した pOC から OCL 形成の過程に作用する生理活性物質の探索を行ったところ、コンパクチン (図 4) が pOC からの多核 OCL 形成を阻害することが見いだされた。pOC からの多核 OCL 形成阻害は骨芽細胞存在下ばかりでなく IL-1 β , M-CSF, RANKL により誘導した際にも同様に観察された。さらに、調製した多核 OCL に対するコンパクチンの効果を検討したところ、pOC の融合ならびに多核 OCL の骨組織吸収活性 (pit 形成) を抑制する濃度で細胞周縁にあるアクチンリングの崩壊と細胞の形態変化が認められた (図 5)。また、IL-1 β , 活性型ビタミン D₃, PTH などで刺激された骨組織からのカルシウム溶出もコンパクチンは可逆的に抑制した⁽²⁵⁾。

コンパクチンは、メバロン酸合成の鍵酵素である 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-コエンザイム A (HMG-CoA) 還元酵素を選択的に阻害することにより、コレステロール合成ならびにタンパク質のプレニル化を阻止することが知られている^(26, 27)。そこでコンパクチン存在下でメバロン酸ラクトンあるいはプレニル転移酵素の基質であるファルネシルピロリン酸 (FPP), ゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) などを添加したところその阻害効果は有意に軽減されたが、スクアレンでは効果がなかった⁽²⁵⁾。

GTP 結合タンパク質のプレニル化は細胞骨格の形成に必須であり、破骨細胞の機能発現にプレニル化を要する Rho, Rab などの G タンパク質の関与が報告⁽²⁸⁾されていることから、コンパクチンによるこの効果はプレニル化に必要な GGPP や FPP の生成阻害に由来すると思われる。コンパクチンの骨吸収阻害活性については、HMG-CoA 還元酵素の阻害によるアポトーシス誘導が原因であるとする報告⁽²⁹⁾もあるが、上記条件下ではアポトーシスに伴う核の凝縮、カスパーゼの活性化は認められず、かつ作用が可逆的であることから、骨組織吸収阻害は pOC の融合抑制および成熟破骨細胞のアクチンリング崩壊誘導による機能発現抑制が原因と考えられる。なお、同様な機構は骨粗鬆症の治療薬として臨床応用もされているアレンドロネー

図 4 破骨細胞の分化、成熟過程に作用する化合物

図5 コンパクチンによる細胞形態の変化とアクチンリングの破壊

共培養系により形成された多核破骨細胞様細胞 (A, C) をコンパクチン ($7\mu\text{M}$, 24 時間) 処理した (B, D). A, B は TRAP 染色, C, D はアクチン染色したもの. 矢印は破骨細胞, 矢尻は正常なアクチンリングの所在を示す. バーは $100\mu\text{m}$.

トについても報告されている^(30, 31).

6. デストラキシン類の破骨細胞細胞骨格に対する作用

共存培養系ならびに分離した pOC の融合系を用いた生理活性物質探索過程で、液胞型 H^+ -ATPase (V-ATPase) 阻害活性をもつことが知られているデストラキシン類 (図4)⁽³²⁾ が見いだされた. これらは骨髄細胞における TRAP の発現過程や pOC の融合過程および破骨細胞の生存には影響を与えずに、V-ATPase 阻害によって細胞内オルガネラの酸性化を阻害する濃度の $1/20$ 以下において成熟破骨細胞のアクチンリング構造体の形成を阻害し (図6), また既成のアクチンリングの崩壊を誘導することにより骨組織吸収活性の発現を抑制する. この阻害は可逆的である. 比活性で

はデストラキシン E の方が B より約 20 倍強力に作用する.

V-ATPase は多数の亜粒子からなる酵素であるが、最近マウス V-ATPase の V_0 亜粒子 a に 3 種のアイソフォーム a1, a2, a3 があることが明らかにされた. その中で a3 亜粒子は破骨細胞の分化に伴い誘導され、破骨細胞内の細胞質膜ならびに細胞質中の繊維状構造体と一致する部位に分布することが示されている⁽³³⁾. また、破骨細胞の活性化の過程で V-ATPase が細胞内のアクチン繊維と会合することも報告⁽³⁴⁾されていることから、デストラキシンはこれらの相互作用に関与することにより破骨細胞の形態形成さらには機能発現に影響を及ぼしている可能性も考えられる⁽³⁵⁾.

図6 デストラキシンおよびリペロマイシンによる破骨細胞の形態変化

A および B: 共培養により得られたアクチンリング形成過程の多核破骨細胞様細胞をアクチン染色した。A は対照, B はデストラキシン B, 2 μ M, 8 時間処理したもの。デストラキシン処理によるアクチンリングの崩壊が認められる。矢印は正常なアクチンリングを指す。

C および D: 共培養により得られた多核破骨細胞様細胞を TRAP 染色した。C は対照, D はリペロマイシン A, 1 μ M, 12 時間処理したもの。矢尻は核を指す。リペロマイシン処理により核および細胞の凝縮が認められる。バーは 100 μ m を示す。

7. V-ATPase 阻害物質による骨吸収の抑制

活性化した成熟破骨細胞は骨組織成分と接着因子を介して骨面に接着し、形成された閉鎖空間にプロトンを放出することにより骨組織中のミネラル部分を可溶化する。この際プロトンの放出に関与するのは上述の V-ATPase である。筆者らは、免疫系の研究過程で V-ATPase のプロトン転移活性を阻害することを見いだしたプロディギオシン⁽³⁶⁾を成熟破骨細胞による骨吸収反応系に添加したところ、液胞型オルガネラの酸性化を抑制するとともに pit 形成を有意に減少させることを観察した⁽³⁷⁾。

8. 破骨細胞のアポトーシスを誘導するリペロマイシン

リペロマイシン A (図 4) は、上皮細胞成長因子 (EGF) で刺激された Balb/MK 細胞のチミジン取込を抑制する活性を指標として得られた物質であり⁽³⁸⁾、その後ガン遺伝子 *src* の発現によるガン化 (トランスフォーメーション) を抑制する活性⁽³⁹⁾、抗ガン活性^(39, 40) などをもつことが報告されている。

筆者らは本物質が通常の各種培養細胞に対して生育阻止活性を示す濃度の 1/100 以下の濃度で成熟破骨細胞にアポトーシスを誘導し、骨組織吸収活性を阻止することを見いだした。興味深いことに pOC や活性化していない破骨細胞にはアポトーシスを誘導しな

い、このアポトーシスの過程ではミトコンドリアからのチトクローム *c* の放出とカスパーゼ 3 の活性化が認められる⁽⁴¹⁾。リベロマイシン A が成熟破骨細胞に選択的に作用する理由は今のところ明らかでないが、その機構が解明できれば臨床への応用によりヒントを与えることができるかもしれない。

おわりに

天然物に由来する各種生理活性物質は、骨代謝における細胞特に破骨細胞の分化、成熟、機能発現というレベルにおいても多彩な作用を有することが認められた。これら活性物質の作用機構の解明は、遺伝子破壊による特定遺伝子産物の機能解析と同様に、分化した細胞に特徴的な生理・反応を明らかにする極めて有用なプローブとなり、かつそれらの生理・反応系はまた新たな有効物質の探索にも応用することが可能である。こうして得られた物質が臨床応用への新たなリード化合物となることを期待したい。

本論文は、2000 年度日本農芸化学会功績賞の授賞対象となった「生理活性物質を用いた免疫系および骨代謝系細胞の分化と機能発現機構の解析」のうち後半部分についてまとめたものであります。紙面の都合でこのようになりましたが、前半部分は文献 42 および 43 をご参照願えれば幸いです。

本研究は筆者が東京大学農学部農芸化学科に在籍中に開始されたものであり、研究推進にあたりご指導ご鞭撻いただきました東京大学名誉教授 田村學造先生、同 山崎眞狩先生に心より感謝いたします。また種々の実験につきご指導いただきました篠原信賢（北里大）先生、近藤俊三（三菱化学生命研）博士、須田立雄（昭和大学）先生、高橋直之（昭和大学）先生に感謝いたします。本研究は、東京大学農学部ならびに東京工業大学生命理工学部において、馬替純二、和地正明、片岡孝夫、禹 濟泰、高見正道の各博士、高田綾子さんをはじめ多くの在籍者の協力により遂行されたもので、ここに深甚なる謝意を表します。

- (1) 禹 濟泰, 永井和夫: バイオサイエンスとインダストリー, **56**, 11-16 (1998).
- (2) T. Suda, N. Takahashi, and T. J. Martin: *Endocr. Rev.*, **13**, 66-80 (1992).
- (3) T. Suda, N. Udagawa, I. Nakamura, C. Miyaura, and N. Takahashi: *Bone*, **17**, 87S-91S (1995).
- (4) N. Takahashi, T. Akatsu, N. Udagawa, T. Sasaki, A. Yamaguchi, J. M. Moseley, T. J. Martin, and T.

- Suda: *Endocrinology*, **123**, 2600-2602 (1996).
- (5) 高橋直之, 宇田川信之, 須田立雄: 生化学, **71**, 241-253 (1999).
- (6) T. Suda, N. Takahashi, N. Udagawa, E. Jimi, M. T. Gillespie, and T. J. Martin: *Endocr. Rev.*, **20**, 345-357 (1999).
- (7) N. Takahashi, N. Udagawa, and T. Suda: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **256**, 449-455 (1999).
- (8) T. Suda, N. Udagawa, and N. Takahashi: *Dentistry in Japan*, **36**, 42-46 (2000).
- (9) M. Takami, J.-T. Woo, N. Takahashi, T. Suda, and K. Nagai: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **237**, 111-115 (1997).
- (10) M. Takami, N. Takahashi, N. Udagawa, C. Miyaura, K. Suda, J.-T. Woo, T. J. Martin, K. Nagai, and T. Suda: *Endocrinology*, **141**, 4711-4719 (2000).
- (11) S. Takeda, T. Yoshizawa, Y. Nagai, H. Yamato, S. Fukumoto, K. Sekine, S. Kato, T. Matsumoto, and T. Fujita: *Endocrinology*, **140**, 1005-1008 (1999).
- (12) S. K. Lee and J. A. Lorenzo: *Endocrinology*, **140**, 3552-3561 (1999).
- (13) T. Suzawa, C. Miyaura, M. Inada, T. Maruyama, Y. Sugimoto, F. Ushibuki, A. Ichikawa, S. Narumiya, and T. Suda: *Endocrinology*, **141**, 1554-1559 (2000).
- (14) C. A. O'Brien, I. Gubrij, S. C. Lin, R. L. Saylor, and S. C. Manolagas: *J. Biol. Chem.*, **274**, 19301-19308 (1999).
- (15) E. Jimi, K. Nakamura, H. Amano, Y. Taguchi, T. Turukai, N. Tamura, N. Takahashi, and T. Suda: *Endocrinology*, **137**, 2187-2190 (1996).
- (16) G. Weselowski, L. Duong, P. T. Lakkakorpi, R. M. Nagy, K. Tezuka, H. Tanaka, G. A. Rodman, and S. B. Rodan: *Exp. Cell Res.*, **219**, 679-686 (1995).
- (17) M. Takami, J.-T. Woo, and K. Nagai: *J. Bone Miner. Metab.*, **16**, 151-157 (1998).
- (18) M. Takami, J.-T. Woo, and K. Nagai: *Cell Tissue Res.*, **298**, 327-334 (1999).
- (19) J.-T. Woo, M. Kato, M. Takami, and K. Nagai: *Cyto-technology*, **33**, 203-211 (2000).
- (20) S. P. Nair, S. Meghji, M. Wilson, K. Redi, P. White, and B. Henderson: *Infect. Immun.*, **64**, 2371-2380 (1996).
- (21) Y. Sakuma, K. Tanaka, M. Suda, A. Yasoda, K. Natsui, I. Tanaka, F. Ushibuki, S. Narumiya, E. Segi, Y. Sugimoto, A. Ichikawa, and K. Nakao: *J. Bone Miner. Res.*, **15**, 218-227 (2000).
- (22) K. Hoshino, O. Taguchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Igawa, Y. Takeda, K. Takeda, and S. Akira: *J. Immunol.*, **162**, 3749-3752 (1999).
- (23) J. Schletter, H. Heine, A. J. Ulmer, and E. T. Riet-schel: *Arch. Microbiol.*, **164**, 383-389 (1995).
- (24) 須田幸治, 禹 濟泰, 永井和夫: 日本農芸化学会 2000 年度大会講演要旨集, p. 352 (2000).

- (25) J.-T. Woo, S. Kasai, P. H. Stern, and K. Nagai: *J. Bone Miner. Res.*, **15**, 650-662 (2000).
- (26) A. Endo, M. Kuroda, and Y. Tsuchiya: *J. Antibiot.* (Tokyo), **29**, 1346-1348 (1976).
- (27) W. W. Stark, M. A. Blaskovich, B. A. Johnson, Y. Qian, A. Vasudevan, B. Pitt, A. D. Hamilton, S. M. Sebt, and P. Davis: *Am. J. Physiol.*, **275**, L55-L63 (1998).
- (28) D. Zhang, N. Udagawa, I. Nakamura, H. Murakami, S. Saito, K. Yamazaki, Y. Shibasaki, N. Morii, S. Narumiya, N. Takahashi, and T. Suda: *J. Cell Sci.*, **108**, 2285-2292 (1995).
- (29) S. P. Luckman, D. E. Hughes, F. P. Coxon, R. G. G. Russel, and M. J. Rogers: *J. Bone Miner. Res.*, **13**, 581-589 (1998).
- (30) J. M. Halsy, G. A. Rodan, and A. A. Reszka: *J. Bone Miner. Res.*, **23**, S552 (1998).
- (31) Y. Koshihara, S. Kodama, H. Ishibashi, Y. Azuma, T. Ohta, and S. Karube: *J. Bone Miner. Res.*, **17**, 98-107 (1999).
- (32) M. Muroi, N. Shiragami, and A. Takatsuki: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **205**, 1358-1365 (1994).
- (33) T. Toyomura, T. Oka, C. Yamaguchi, Y. Wada, and M. Futai: *J. Biol. Chem.*, **275**, 8760-8765 (2000).
- (34) B. S. Lee, S. L. Gluck, and L. S. Holliday: *J. Biol. Chem.*, **274**, 29164-29171 (1999).
- (35) 中川 大, 高見正道, 禹 濟泰, 永井和夫: 日本農芸化学会 2000 年度大会講演要旨集, p. 208 (2000).
- (36) T. Kataoka, S. Muroi, T. Ohkuma, T. Waritani, J. Magae, S. Kondo, S. Yamasaki, and K. Nagai: *FEBS Lett.*, **359**, 53-59 (1995).
- (37) J.-T. Woo, Y. Ohba, K. Tagami, K. Sumitani, T. Kataoka, and K. Nagai: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 400-402 (1997).
- (38) H. Osada, H. Koshino, K. Isono, H. Takahashi, and G. Kawanishi: *J. Antibiot.* (Tokyo), **44**, 259-261 (1991).
- (39) H. Takahashi, H. Osada, H. Koshino, M. Sasaki, R. Onose, M. Nakakoshi, M. Yoshihama, and K. Isono: *J. Antibiot.* (Tokyo), **45**, 1414-1419 (1992).
- (40) H. Takahashi, Y. Yamashita, H. Takaoka, J. Nakamura, M. Yoshihama, and H. Osada: *Oncol. Res.*, **9**, 7-11 (1997).
- (41) 加藤正徳, 禹 濟泰, 長田裕之, 永井和夫: 日本農芸化学会 2000 年度大会講演要旨集, p. 208 (2000).
- (42) K. Nagai and T. Kataoka: in "Bioprobosc," ed. by H. Osada, Springer-Verlag, Tokyo, 2000, pp. 97-123.
- (43) 片岡孝夫, 永井和夫: 化学と生物, **37**, 177-184 (1999).