

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06311・19K21398

研究課題名(和文) Rab44による破骨細胞分化制御の分子メカニズムおよび個体レベルでの機能解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of Rab44 regulation of osteoclast differentiation and function elucidation in vivo.

研究代表者

山口 優 (YAMAGUCHI, Yu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：50823308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：1. Rab44結合タンパク質の同定：Rab44過剰発現細胞を用いて、結合候補分子を2つ同定した。また、Rab44の野生型、EFハンドモチーフ欠損型はダイニンとも結合することも明らかになった。2. Rab44のカルシウム感受性の解析：カルシウムイオノフォアであるML-SA1刺激による野生型、恒常的活性型、恒常的不活性型のRab44の局在の変化は観察されなかった。EFハンドモチーフ欠損型でもRab44の局在に変化はなかった。3. Rab44遺伝子欠損マウスの作製および骨組織・骨代謝解析：マイクロCT解析の結果、Rab44遺伝子欠損マウスでは海綿骨の骨梁に変化が現れる傾向が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

破骨細胞は骨の吸収を行う細胞で、骨表面ヘリソソーム酵素やプロトンを放出するといった極性を持った小胞輸送を行う。この独特な極性小胞輸送に関する研究は、分化調節因子やシグナルの研究に焦点が当てられてきたため、あまり進んでいない。Rab44はこの小胞輸送を司る遺伝子であり、これまでに破骨細胞分化を制御することを明らかにしてきた。さらにRab44がどのような分子と相互作用するのか、またRab44が個体レベルで骨組織に影響を及ぼすことを明らかにした。小胞輸送関連因子の分子レベルでの機能解明と個体レベルでの骨形成、吸収に対する影響を明らかにすることは、骨疾患治療への新しい切り口となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：1. Identification of Rab44 binding protein: Two binding candidate molecules were identified using Rab44 overexpressed cells. It was also revealed that the wild type of Rab44 and the EF hand motif deletion type also bind to dynein.

2. Analysis of calcium sensitivity of Rab44: No change was observed in the localization of wild-type, constitutively active or dominant negative Rab44 by ML-SA1 stimulation of calcium ionophore. The localization of Rab44 was not changed even in the EF hand motif deletion type.

3. Preparation of Rab44 knockout mice and analysis of bone tissue and bone metabolism: As a result of micro-CT analysis, changes in the trabecular bone were observed in Rab44 knockout mice.

研究分野：常態系口腔科学

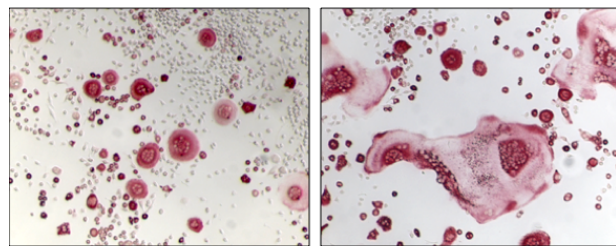
キーワード：Rab44 破骨細胞 カルシウム感受性 Rab GTPase

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らはこれまでに破骨細胞の分化成熟過程に関与する遺伝子群の解析を行い、その過程で *Rab44* 遺伝子を新規に発見した (引用文献①)。破骨細胞は骨分解を担う多核細胞であり、骨表面に向けてリソソーム酵素やプロトンを放出するといった極性を持った小胞輸送を行う。破骨細胞に特異的な極性輸送に関する研究は、分化調節因子やシグナルに焦点が当てられていることから、現在までのところあまり進んではない。

研究業績1より、*Rab44* をノックダウンすると破骨細胞の巨大化・多核化 (図1) および破骨細胞マーカー遺伝子群の発現レベル上昇などが観察され、*Rab44* が欠損すると破骨細胞分化が活性化し、過剰発現で分化が抑制されることが明らかになった。しかしながら、なぜ *Rab44* ノックダウンによって破骨細胞が巨大化・多核化するのか、その分子メカニズムは明らかではない。



コントロール

Rab44ノックダウン

図1 : Rab44 による破骨細胞分化制御

2. 研究の目的

この研究では、まず *in vitro* 解析として *Rab44* と結合するタンパク質を同定する。結合するタンパク質が既知のものであれば、極性小胞輸送が破骨細胞分化をどのようなメカニズムで制御しているのかが明らかになる。次に、*in vivo* 解析として同遺伝子ノックアウトマウスを用いて骨格形成と骨組織の解析を行う。このことによって *Rab44* が制御する極性小胞輸送が個体レベルの骨形成・吸収に及ぼす影響が解明でき、骨疾患治療や予防研究のための基礎的なデータの蓄積が期待できる。

3. 研究の方法

(1) *Rab44* 結合タンパク質の同定

Rab44 タンパク質に結合するエフェクタータンパク質を同定し、その機能を解明する。破骨細胞内在性のタンパク質について免疫沈降法、質量分析法を用いて結合候補分子を同定する。次に *Rab44* 過剰発現細胞を用いて *Rab44* プルダウンアッセイを行い、結合タンパク質を質量分析法により同定する。同様に恒常的活性型、恒常的不活性型の *Rab44* を発現させた細胞で実験を行い、結合タンパク質の差異を検証する。

(2) *Rab44* のカルシウム感受性の解析

Rab44 遺伝子はヒトではカルシウム結合領域である EF ハンドモチーフを持つがマウスでは欠損している。したがって、ヒト遺伝子型とマウス遺伝子型でカルシウム感受性の違いを検討する。また恒常的活性型、恒常的不活性型も用いカルシウムイオノフォアによるリソソーム酵素分泌量の変化を比較し、カルシウムを介した *Rab44* の機能を明らかにする。

(3) *Rab44* 遺伝子欠損マウスの作製および骨組織・骨代謝解析

Rab44 遺伝子欠損マウスを作製し、個体レベルでの解析を行う。*Rab44* 遺伝子欠損の胎生期マウスあるいは生後数日のマウスの透明骨格標本作製し、マウス個体レベルでの硬骨形成程度の比較を行う。さらに成長したマウスに対しては大腿骨、椎骨などの X 線解析を行い、固定後脱灰パラフィン切片や非脱灰樹脂切片を作製し、HE 染色、TRAP 染色を行い、骨形成を比較する。また非脱灰樹脂標本作製し骨組織形態計測を行う。骨量、海綿骨数などの計測にはマイクロ CT 解析を用いる。

4. 研究成果

(1) *Rab44* 結合タンパク質の同定

Rab44 過剰発現細胞を用いて *Rab44* プルダウンアッセイを行い、結合候補分子を質量分析法により同定した。結合候補タンパクに対してコントロールを GFP 発現細胞 (図2 : ctrl1)、対象を GFP-*Rab44* 野生型発現細胞 (図2 : Rab44) を用いて免疫沈降実験を行なった。結果、*Rab44* と候補タンパクとの結合が確認された (図2)。現在は、同定された2つの結合タンパクに関して過剰発現細胞を作製している段階である。この細胞を用いて、*Rab44* との結合確認実験を行う。*Rab44* は *Rab45*、*CRACR2a* と同様に高分子 Rab GTPase に分類される。*Rab45* 及び *CRACR2a* はダイニン、ダ

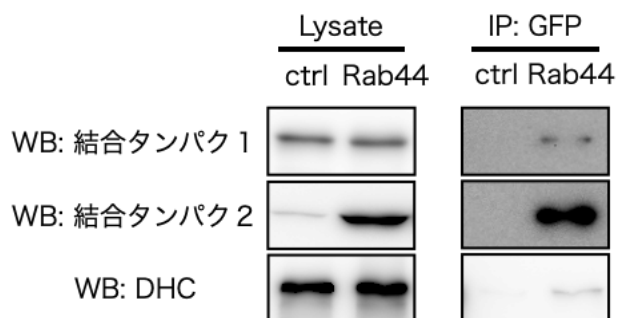


図2 : 結合候補タンパクとの免疫沈降実験

イナクチン複合体と結合することによって微小管依存性の移動を制御していることが明らかになっている。このことから、ダイニンと複合体を形成するかのプルダウンアッセイを行った。Rab44 の野生型、EF ハンドモチーフ欠損型はダイニン (図 2 : DHC) と結合することが明らかになった (図 2)。

(2) Rab44 のカルシウム感受性の解析
Rab44 遺伝子はカルシウム結合領域である EF ハンドモチーフを持つ。カルシウムイオンフォアである ML-SA1 刺激による野生型、恒常的活性型、恒常的不活性型の Rab44 の局在の変化は観察されなかった。EF ハンドモチーフ欠損型でも Rab44 の局在に変化はなかった。また、粒子径の変化、時間依存性の変化も認められなかった (図 3)。

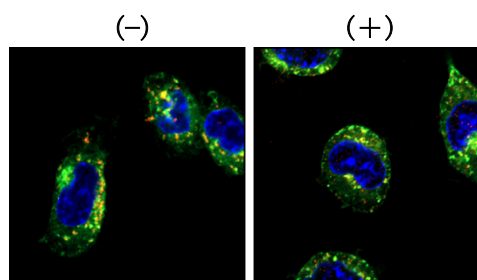


図 3 : ML-SA1 添加による野生型 Rab44 の局在

(3) Rab44 遺伝子欠損マウスの作製および骨組織・骨代謝解析
Rab44 遺伝子欠損マウスを用いて、大腿骨、脛骨のマイクロ CT 解析を行った。また固定後脱灰パラフィン切片や凍結切片を作製し、TRAP 染色、蛍光免疫染色をそれぞれ行った。マイクロ CT 解析の結果、Rab44 遺伝子欠損マウスでは海綿骨の骨梁に変化が現れる傾向が認められた (図 4)。一方、パラフィン切片での TRAP 染色では破骨細胞の顕著な変化は認められなかった。ただし、骨髄から採取したマクロファージを破骨細胞に分化させると、Rab44 遺伝子欠損マウスで巨大化が認められた (図 5)。

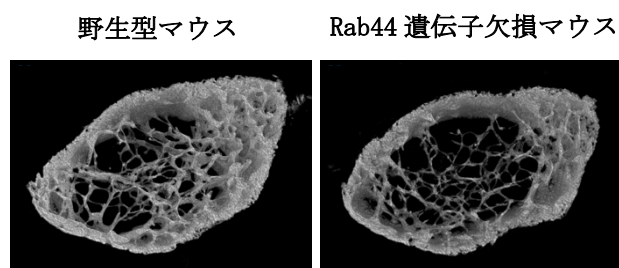


図 4 : マイクロ CT による海綿骨観察

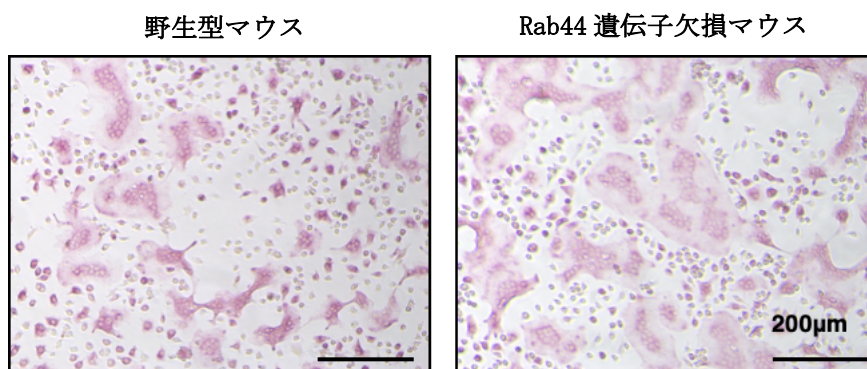


図 5 : Rab44 遺伝子欠損マウスにおける破骨細胞の巨大化

<引用文献>

① [Yamaguchi Y](#), Sakai E, Okamoto K, Kajiya H, Okabe K, Naito M, Kadowaki T, Tsukuba T.: Rab44, a novel large Rab GTPase, negatively regulates osteoclast differentiation by modulating intracellular calcium levels followed by NFATc1 activation. *Cell Mol Life Sci.* 75, 33-48 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----