

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18459

研究課題名（和文）Rab44の破骨細胞分化制御機構及び骨組織に対する影響の解明

研究課題名（英文）Elucidating the regulatory mechanism of osteoclast differentiation of Rab44 and its effects on bone tissue

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：極性小胞輸送がどのように破骨細胞分化制御に関わっているかを明らかにするため、膜輸送関連因子であるRab44と結合するタンパク質の同定を行った。その結果、アクチン結合タンパク質の一種であるCoronin1Cを同定した。Coronin1Cは不活性型のRab44と主に結合していることも明らかになった。また、マウス骨髄由来破骨細胞前駆細胞内でもRab44とCoronin1Cの共局在性が認められた。Rab44ノックアウトマウスを用いての骨形態解析の結果、ノックアウトマウスでは海綿骨の骨梁間隔の拡大傾向が認められた。骨髄由来破骨細胞の解析ではノックアウトマウスで破骨細胞分化促進が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

破骨細胞は骨吸収を担う細胞で、骨表面へと極性を持った小胞輸送を行うことでその機能を発揮する。この独特な極性小胞輸送を調節する因子に関する研究は、分化調節因子やシグナルの研究に重点が置かれてきたため、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。この研究ではRab44がCoronin1Cと相互作用すること、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。極性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に対する影響を明らかにすることは、新たな骨疾患治療へのアプローチとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：To elucidate how polar vesicle trafficking is involved in the regulation of osteoclast differentiation, we identified proteins that bind to Rab44, a membrane trafficking-related factor. We identified Coronin1C, an actin-binding protein that primarily binds to the inactive form of Rab44. Bone morphology analysis of Rab44 knockout mice revealed a trend toward increased trabecular bone spacing in the knockout mice. Analysis of bone marrow-derived osteoclasts showed enhanced osteoclast differentiation in knockout mice.

研究分野：常態口腔科学

キーワード：Rab44 Rab GTPase 破骨細胞 Rab44ノックアウトマウス 骨組織・骨代謝解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は骨の吸収を行う細胞で、骨表面へ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。そこで研究代表者らは小胞輸送を司る遺伝子群に着目し、*Rab44* 遺伝子が破骨細胞分化制御に関与することを発見した(引用文献①)。*Rab44* をノックダウンすると破骨細胞の巨大化・多核化および破骨細胞マーカー遺伝子群の発現レベル上昇が観察され、過剰発現させるとその逆の結果が得られた(図1)。従って、*Rab44* が破骨細胞分化を負に制御している事が見出された。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。

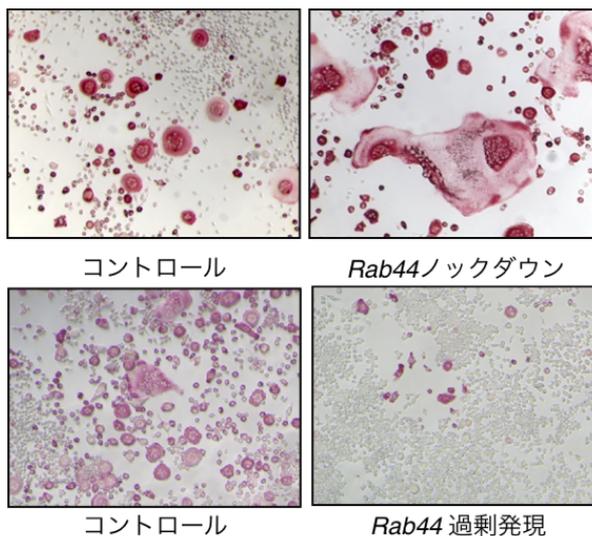


図1 : *Rab44* による破骨細胞分化制御

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 と結合するタンパク質を同定することによって、極性小胞輸送がどのように破骨細胞分化制御に関わっているかを明らかにする。

① 結合候補分子のプロテオーム解析

Rab44 タンパク質に結合するタンパク質を同定し、骨吸収における小胞輸送の機能を解明する。*Rab44* 過剰発現細胞を用いて結合している分子を検索するため、免疫沈降法を行う。*Rab44* とともに沈降してきたタンパク質を質量分析器にかけ、結合候補分子を同定する。この方法により、今までのところ、2つの候補分子を同定した。

② 同定したタンパク質との共免疫沈降実験

同定したタンパク質と結合するかを共免疫沈降法にて確認する。まず *Rab44* 変異体発現細胞を用いて、どの機能ドメインと結合するのかを調べる。また、作製した *Rab44* 変異体の中には活性型、不活性型のものもあるので、活性の有無による結合能も調べる。次に、結合候補分子の野生型、および変異体発現細胞を作製し、*Rab44* との結合ドメインを明らかにする。

③ 同定したタンパク質の破骨細胞内での機能

同定したタンパク質を siRNA 法により細胞内でノックダウンすることによって破骨細胞に及ぼす影響を確認するために TRAP 染色、マーカー遺伝子群のリアルタイム PCR を行う。

(2) *Rab44* ノックアウトマウスの骨組織・骨代謝解析

Rab44 ノックアウトマウスを解析することによって、小胞輸送による破骨細胞分化制御機構の個体レベルでの骨形成・吸収に及ぼす影響を明らかにする。骨組織形成の異常を詳細に解析するためにマイクロ CT による撮影を行う。また解析用ソフトウェアを用いて、骨内部の海綿骨、および骨周囲部の皮質骨の解析を行う。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を作製し骨組織形態計測を行う。

さらに骨髄からマクロファージを回収し、プライマリーな細胞での破骨細胞分化に及ぼす影響を調べるために TRAP 染色、マーカー遺伝子群のリアルタイム PCR を行う。

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、アクチン結合タンパク質の一種である Coronin1C を質量分析法により同定した。Rab44 の属する Rab タンパク質は活性の有無により、その結合する相手の分子にも変化があるため、GFP 発現細胞、GFP-Rab44 野生型発現細胞、GFP-Rab44 活性型発現細胞、GFP-Rab44 不活性型発現細胞（それぞれ図 2 : ctrl, WT, CA, DN）を用いて GFP 抗体での免疫沈降実験を行った。結果、Rab44 は主に不活性型で Coronin1C と結合し活性型では結合しないことが確認された（図 2）。さらに不活性型での発現量が最も多く、活性型では発現量が低下することも明らかになった。

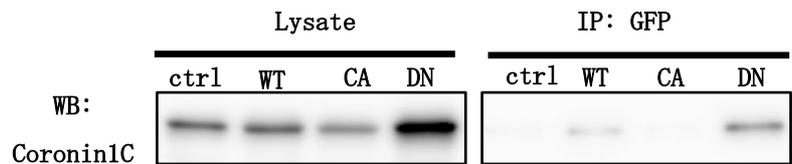


図 2 : Rab44 と Coronin1C の結合

次にマウス骨髄由来破骨細胞前駆細胞を用いて Coronin1C と Rab44 の蛍光免疫染色を行った。共焦点顕微鏡下で観察すると二つの分子が細胞内で共局在することが明らかになった（図 3）。このことはプライマリーな細胞内でも結合性があることを示唆している。また Coronin1C をノックダウンさせた細胞では破骨細胞の分化が抑制された。

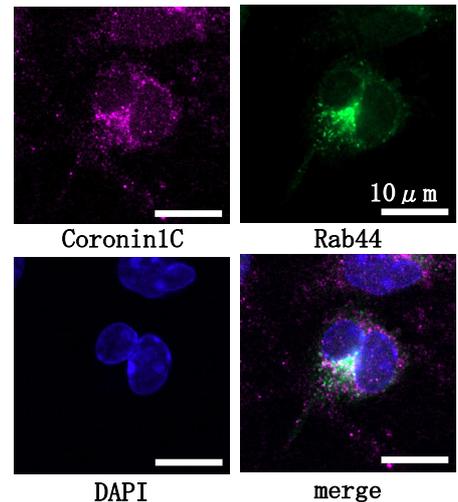


図 3 : Rab44 と Coronin1C の局在

(2) Rab44 ノックアウトマウスの骨組織解析
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間隔の拡大傾向が認められた（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 TRAP 染色を行うと、Rab44 遺伝子欠損マウスで巨大化が認められた（図 5）。

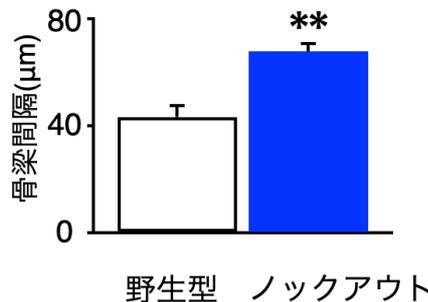
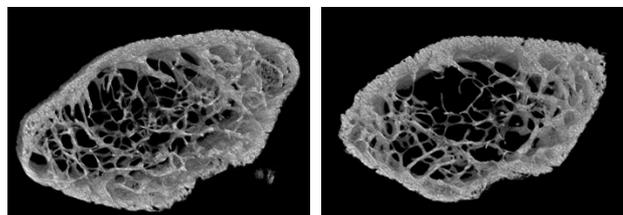


図 4 : マイクロ CT による海綿骨観察

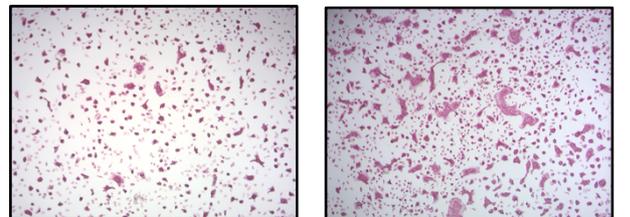


図 5 : ノックアウトマウスにおける破骨細胞分化活性化

<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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------