

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：16301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22791409
 研究課題名（和文） 革新的蛍光分子プローブを駆使したRANKL-RANK相互作用のインビボ解析
 研究課題名（英文） In vivo analysis of the interaction between RANK and RANKL by using innovative fluorescent probes
 研究代表者
 疋田 温彦 (HIKITA ATSUHIKO)
 愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：60443397

研究成果の概要（和文）：相補的な蛍光タンパク質の一部同士が結合して蛍光を発する系（BiFC）を利用して、骨破壊を担う細胞である破骨細胞の形成に必要なタンパク質であるRANKおよびRANKLの相互作用を検出する系を確立するための遺伝子を作製した。これらの遺伝子を細胞に導入した実験では、RANKとRANKLが結合し得る条件下において蛍光が検出された。

研究成果の概要（英文）：By utilizing a fluorescence detection system by binding of complementary parts of a fluorescent protein (BiFC), the genes needed for the detection of the interaction of RANK and RANKL, proteins necessary for the formation of osteoclasts which have a central role in bone resorption, were constructed. In a preliminary experiment in which these two genes were introduced into cells, fluorescence was detected under the condition when RANK and RANKL could bind together.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：RANKL・RANK・破骨細胞・インビボ蛍光イメージング・BiFC

1. 研究開始当初の背景

生体内において、骨量は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成という相反する2つの作用のバランスにより維持されている。破骨細胞の形成、活性化および生存には骨芽細胞系の細胞膜に存在する膜タンパク質 receptor activator of NF- κ b ligand (RANKL)が破骨細胞およびその前駆細胞の細胞膜上に発現する受容体 receptor activator

of NF- κ b (RANK)に結合し、RANK 下流シグナル系が活性化することが必須である。RANKL は膜タンパク質として合成されるが、Matrix metalloproteinase (MMP) 14 などによる切断を受けて可溶性 RANKL となる。破骨細胞形成にはその前駆細胞と骨芽細胞の直接の接触が必要であること、および MMP14 を欠損した骨芽細胞では膜型 RANKL が増加し、破骨細胞形成支持能が亢進しているといった知見からは、RANKL は切断により活性が減

少すると考えられる。しかし可溶性 RANKL が膜型 RANKL に比べ活性が低いことの理由についてははまだ解明されていない。また、膜型 RANKL の切断によって生じた可溶性 RANKL の生体における意義は不明である。その解明には生体内における RANKL-RANK の相互作用についての解析が必須と考えられるがこれまでにそのような報告は無い。

申請者は最新的手法であるインビボイメージング技術を駆使することにより、生きたマウスの骨髄内において RANKL-RANK 相互作用や RANK 下流シグナルが活性化される部位およびその強度、また時間経過による変化を蛍光観察し、生体内において RANKL 切断が破骨細胞分化に与える影響を明らかにできると考えた。

2. 研究の目的

この研究の目的は、破骨細胞分化、活性化および生存に必須の分子である膜タンパク質 RANKL の切断により RANKL-RANK の相互作用および RANK 下流シグナル活性が制御され、破骨細胞分化が調節されていることをマウス生体内で明らかにすることである。

3. 研究の方法

革新的蛍光分子プローブを開発し、最新のインビボイメージング技術を用いることにより、RANKL-RANK 相互作用および RANK 下流シグナル活性を蛍光にて検出する。膜型 RANKL およびその切断の結果生じる可溶性 RANKL による蛍光の変化を生きたマウスの骨髄内において経時的かつ空間的に観察し比較検討することにより、RANKL 切断が破骨細胞分化に及ぼす影響を明らかにする。

4. 研究成果

(1) BiFC法によるタンパク質相互作用検出系の確立

それぞれ相補的な蛍光タンパク質の一部同士が結合し、蛍光タンパク質を形成して蛍光を発することによりタンパク質同士の相互作用を検出する系である bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 系を確立するため、ある種のタンパク質が二量体を形成する際の結合ドメインである Leucine-zipper にそれぞれ monomeric Kusabira-Green の N 端側部分 (mKG-N) あるいは C 端側部分 (mKG-C) を融合させたタンパク

質を発現するコンストラクトを作製し、ヒト胎児腎細胞由来細胞株 HEK 293 細胞に同時にトランスフェクションした。Leucine-zipper 同士の相互作用の結果再構成された蛍光タンパク由来と考えられる 蛍光の検出は可能であった。しかし、HEK293 細胞は高い遺伝子導入効率を持つことが知られているが、それにも関わらず実際に蛍光を発している細胞が 50% 以下と少なかった。また観察された蛍光強度にもばらつきがあった。

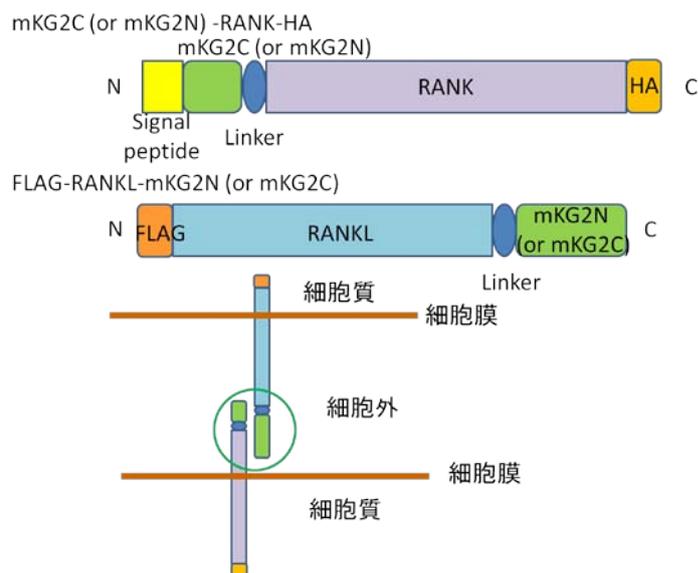


図1: RANKおよびRANKLとmKG2NおよびCの融合タンパクのシェーマ

(2) mKG2-C/NおよびRANK/RANKL融合タンパク質発現コンストラクトの作製

上記のLeucine-zipperおよびmKG-C/N融合タンパク質発現コンストラクトを用いた検討からは、インビボにおけるタンパク質相互作用を蛍光によって検出するためにはより強い蛍光強度が必要であると考えられた。そこで、mKG-C/Nを用いた系に対しリンカー部位の変更などの工夫を加える事により効率を高めた monomeric Kusabira-Green2 (mKG2) を用いた系に切り替え、RANKおよびRANKLにそれぞれ mKG2 の N 端側部分 (mKG2-N) あるいは C 端側部分 (mKG2-C) のいずれかを融合させたタンパク質を発現するコンストラクトについてそれぞれ複数のパターンでデザインした (図1)。RANK および RANKL と mKG2 の N 端側と C 端側の組み合わせは 2 通り考えられたが、そのうちの 1 つの組み合わせについて作製したそれぞれのコンストラクトを HEK293 細胞にトランスフェクションし、RANK および RANKL と mKG2-C および

Nの融合タンパク質の発現をウエスタンブロッティングで確認したところ、予想される位置にバンドを検出可能であった(図2)。また、それぞれのコンストラクトを別々のHEK293細胞にトランスフェクションしたのちにそれらの細胞を混合して培養する実験を行ったところ、RANKとRANKLが結合し得る条件下においてのみ緑色の蛍光を検出することが可能であった。

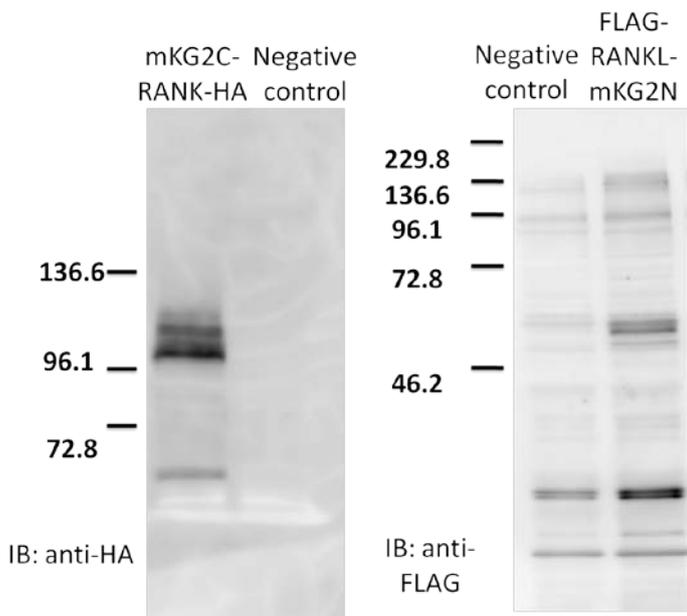


図2: mKG2C-RANK-HAおよびFLAG-RANKL-mKG2Nのウエスタンブロッティングによる検出

(3) RANK 下流シグナル検出系の確立

RANK に RANKL が結合すると NF- κ B 系などの RANK 下流シグナル系が活性化され、その結果様々な遺伝子の発現が亢進する。このシグナル系活性化を検出するために、Tartrate-resistant acid phosphatase、Cathepsin K などといった破骨細胞特異的に発現される遺伝子のプロモーター活性に依存して Red Fluorescent Protein 遺伝子が発現するようなレトロウイルスベクターを製作する予定であったが、Cathepsin K 活性を特異的に検出する蛍光プローブである CatK680 (ViSen 社) を培養破骨細胞あるいはマウスに投与することにより、より簡便に破骨細胞分化シグナルの活性化が検出可能になると考えた。そこで CatK680 を実際にマウスおよび培養破骨細胞に投与してみたが、破骨細胞前駆細胞であるマクロファージに強い蛍光が見られた一方、成熟破骨細胞には蛍光が見られず、使用できないことが分かった。そこで、Cathepsin K プロモーター活性依存

的に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウス、CAG プロモーターと蛍光タンパク質 Venus をコードした配列の間に loxP 配列に挟まれたストップ配列が挿入された遺伝子を持つトランスジェニックマウスを入手し、RANK 下流シグナルが活性化した破骨細胞特異的に蛍光を発するマウスを作出すべくこれら 2 種のマウスの掛け合わせに着手した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Bone analysis by in vivo optical imaging.
Takeshi Imamura T, Atsuhiko Hikita, Mari Sasaki, Naoki Honkura.
Clin Calcium. 2011 Jul;21 (7):1036-40. (査読なし)

[学会発表] (計 3 件)

1. Intravital imaging of cell cycle progression of cancer cells in bone marrow microenvironment
Atsuhiko Hikita, Aki Hanyu, Naoki Honkura, Takeshi Imamura
第 34 回日本分子生物学会年会 ワークショップ 生体イメージングで明らかになる生活習慣病の分子メカニズム
2011 年 12 月 14 日
パシフィコ横浜

2. 骨髄微小環境におけるがん細胞の細胞周期の *in vivo* イメージング
疋田 温彦 第 29 回日本骨代謝学会学術集会 若手シンポジウム
2011 年 7 月 30 日
大阪国際会議場

3. In vivo Imaging of osteoblast Recruitment after bone resorption by osteoclast
Atsuhiko Hikita, Aki Hanyu, Yasumichi Inoue and Takeshi Imamura
3rd International Conference on Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems
2010 年 6 月 22 日
Nomikos Conference Center. Fira, Santorini, Greece

6. 研究組織

(1) 研究代表者

疋田 温彦 (HIKITA ATSUHIKO)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：60443397