

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592808

研究課題名(和文)ステロイドによって誘導される膜タンパク質の細胞生物学的解析

研究課題名(英文)Cell biological analysis of membrane protein induced by glucocorticoid

研究代表者

岡元 邦彰 (OKAMOTO, Kuniaki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授

研究者番号：10311846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーが起こるときには多くのリソソーム酵素の遺伝子発現が上昇する。それを制御している転写因子Transcription Factor EB(以下TFEB)はステロイドによってその発現が上昇するタンパク質dexamethasone-induced transcript(以下DEXI)の発現も上昇させる。このDEXIの機能を探るため、全長の遺伝子を取得し、骨芽様細胞MC3T3-E1細胞へ導入した。またリソソームターゲットシグナルのDXXLV配列のD, L, Vに変異を加えた。同時にTFEBの遺伝子も取得し、同様に骨芽様細胞MC3T3-E1細胞へ導入した。

研究成果の概要(英文)：Transcription Factor EB (TFEB) is a master gene that activates the formation of autophagosomes, and upregulates the expression of lots of lysosomal enzymes. Among them, dexamethasone-induced transcript (DEXI) is also one of proteins that the expression increases. It is reported that DEXI is a glucocorticoid-induced gene upregulated in Emphysema. However, it is not unknown about its localization or functions. Therefore, to examine the localization of DEXI, we amplified full length gene of DEXI from mouse cDNA by using polymerase chain reaction and constructed DEXI expression vector fused with GFP. Although transfected this construct in MC3T3-E1 and HeLa cells, no or only few expression of DEXI was observed by western blot. The reason why DEXI did not express may be that the protein is very small compared with GFP protein. Then, we changed GFP into FLAG tag. At the same time, we also amplified TFEB gene from mouse and constructed TFEB expression vector fused with FLAG tag.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：ステロイド エンドソーム・リソソーム オートファジー 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

我々は以前より、エンドソーム・リソソーム系酵素について研究しており、その中の一つの酵素カテプシン E の欠損マウスを作製し、アトピー性皮膚炎との関わりを明らかにしてきた(Tsukuba T., Okamoto K., et al., J. Biochem. 2003; Yanagawa M, Tsukuba T., Okamoto K., et al., J. Biol. Chem. 2007)。そのアトピー性皮膚炎の急性期に使用される治療薬はステロイドである。また我々は、最近の研究でカテプシン E 欠損マウスを用いて、カテプシン E が破骨細胞形成および活性化に影響を与えることを示してきた。エンドソーム・リソソームの異常は骨の形成にも影響を与えているのである。代表的な骨疾患の一つに慢性関節性リウマチがある。ステロイドは抗炎症作用を期待して治療薬として使用されてきたが、最近リウマチの進行を抑える作用もあることが明らかになってきた。これらのことから、我々はエンドソーム・リソソーム系疾患の治療薬としてステロイドに焦点を当てることにした。

最近、リソソーム遺伝子の多くが転写因子 Transcription factor EB (TFEB)によって制御されていることが報告された(Sardiello M. et al., Science, 2009)。HeLa細胞にTFEBを過剰発現させると、様々なタンパク質の発現上昇が認められるが、その中でも、リソソームの中に含まれるタンパク質だけでなく、その生合成や輸送、および機能に関連したタンパク質の発現が上昇していた。そこで、我々はTFEBの過剰発現によって上昇するタンパク質分子の中から、リソソームに関連する可能性を有し、歯科領域の組織にその発現を認め、薬理的観点からも興味の惹かれる因子をいくつかピックアップした。その中の一つの因子が dexamethason-induced transcript (DEXI) である。

2. 研究の目的

デキサメサゾンはいずれもステロイドの中でも比較的長時間作用型に分類され、様々なタンパク質の発現に関与していることが知られている。DEXIはこのデキサメサゾンによって発現誘導されるタンパク質である。肺気腫によって発現が上昇する因子を探究している際に見つけれ、ヒトとマウスでクローニングが行われた(Edgar A.J., et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol 2001)。構造上、転写因子に多く含まれるロイシンジッパードメインを持つが、膜貫通ドメインを持っているので、核タンパク質ではないであろうこと、心臓、脳、肝臓、胎盤、肺、で発現していること、肺気腫の患者からのDEXI mRNAの発現が健常者からの発現に比較して高いこと、などが報告されている。しかしながら、それ以降全くDEXIに関する報告はされておらず、まして、口腔内領域に関しては皆無である。興味の引かれることに、NCBI Unigene EST profile による遺伝子発現解析では、

DEXIは心臓や肺より唾液腺や硬組織、舌に多く発現していることが示されている。そこで今回の研究期間中に、DEXIの細胞生物学的解析とデキサメサゾンとの関連性について探究したい。

3. 研究の方法

#1 DEXI と GFP の融合タンパク質作製

今回の融合タンパク質の発現には、Gateway Systemを用いる。これは、いったんエンタリーベクターを作製し、これを利用して、様々なタグのついた発現クローンを作製することのできるシステムである。まず、マウス Dexi の cDNA を American Type Culture Collection (ATCC)より購入し、これをテンプレートとしてPCRでDEXIの遺伝子を増幅する。この際、目的の遺伝子発現に必要なコザック配列とクローニングベクターに挿入する際必要な CACC という配列をフォワードプライマーの5'末端に付加しておく。増幅に用いるDNAポリメラーゼには両端が平滑末端となるようPrime STARを用いる。これをTOPOベクター(pENTR™/D-TOPO)へ挿入する。トポイソメラーゼの働きで、方向性をもったエンタリークローンを作製できる。塩基配列を確認した後、発現クローンの作製を行う。発現ベクターはpcDNA-DEST47を用いる。これはDEXIのC末端側にGFPが融合するように設計されたベクターである。エンタリークローンでは目的の遺伝子の両端にattL1とattL2という配列が、発現ベクターにはattB1とattB2という配列が設計されており、この領域で組換えが起こることで、目的遺伝子が発現ベクターに挿入される。塩基配列を確認した後、この発現クローンを以下の実験で用いる。

#2 Dexi の細胞内局在

#1で作製した発現クローンを用いて、これを培養細胞株として頻繁に使用されるHeLa細胞とHEK293細胞に遺伝子導入しその局在をGFPを指標に蛍光顕微鏡で調べる。具体的には、発現クローンをリポフェクション法(Gene PORTER 3000)を用いて細胞へ導入する。本システムには導入した遺伝子をGFPにより生きたまま倒立蛍光顕微鏡で観察できるという利点がある。まずは遺伝子導入後48時間後に倒立蛍光顕微鏡で観察を行う。しかしながら、以前坂井が行った時には、発現量が少ないためかGFPの蛍光が非常に薄かったという経験があった。そこで、同様の結果の場合には、4%パラホルムアルデヒドにて固定を行い、トライトンX-100で処理後、一次抗体としてGFP抗体を用いる。二次抗体を作用させた後、スライドガラスに包埋し、正立蛍光顕微鏡で局在を確認する。リソソーム・エンドソーム様局在では斑点状の像を呈するので、この像と、リソソーム酵素であるLAMP1やLAMP2、あるいは細胞

膜を自由に通過し、酸性オルガネラ内に濃縮される LysoTracker プローブなどと共染色をすることでその局在を確認する。また同時に、恒常的に発現する細胞を作製するため、G418 で選別することで、目的のクローン細胞を得る。

#3 DEXI の一次構造解析

#1 で作製したエントリーベクターをテンプレートにして、Site-direct Mutagenesis 法を用いて、遺伝子改変を行い、#2 と同様の手法を用いて、細胞内局在に変化が認められないかを調べる。

まず、リソソームターゲットシグナルの可能性のある配列 DXXLV の中で、下線で示した D,L,V が重要であると考えられるので、このアミノ酸をアラニン(A)に置換したエントリーベクターを作製する。その後、#2 と同様にして発現クローンを得る。このクローンを HeLa 細胞と HEK293 細胞に導入し、その局在を #2 の結果と比較する。どのアミノ酸がターゲットに重要であるかを調べる。また、同時にタンパク質の C 末端側にロイシンジッパードメインが存在している。これは二量体を作る可能性の高いドメインなので、これを欠損させた発現ベクターを作製することで、この領域の役割を明らかにすることができると思われる。

#4 リアルタイム PCR やウエスタンブロットを用いた発現量の比較

ヒトでの DEXI の組織発現は報告されているものの、マウスではまだ解析されていない。そこで、上述と平行して、マウスの各組織から total RNA を採取し、リアルタイム PCR を用いて、その発現量を定量し比較する。また、タンパク質レベルでも調べる。このときには、先の GFP 抗体を用いるが、現在 DEXI の一次構造より探索したアミノ酸配列を元に抗体を作製している。必要に応じて、両抗体を使い分ける。

4. 研究成果

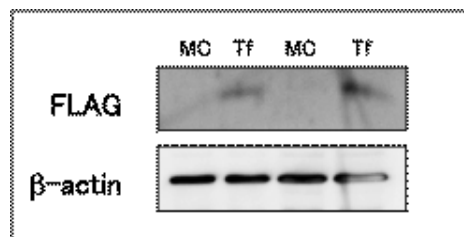
#1 DEXI と GFP の融合タンパク質作製および #2 Dexi の細胞内局在

DEXI にの一時構造から Gateway System を用いて融合タンパク質を作製した。まず、マウスの DEXI の cDNA を American Type Culture Collection (ATCC) より購入し、これを鋳型にして PCR で DEXI の遺伝子を増幅した。これをまず TOPO ベクター (pENTR1M/D-TOPO) へ挿入した (エントリーベクター)。塩基配列を決定し、確認した後、発現ベクター (pcDNA-DEST47) へ組換えにより DEXI 遺伝子を挿入した。ここで塩基配列の確認を行った。この DEXI 発現ベクターを HeLa 細胞と MC3T3-E1 細胞へ導入し、G418 で選別を行った。ウエスタンブロット解析で HeLa 細胞のみ DEXI 発現クローンが得られたが、発現量が少なく、蛍光顕微鏡で細胞内局在を観察す

ることはできなかった。一つ問題として、DEXI タンパク質は 10kDa、GFP は 30kDa なので、発現タンパク質に対して Tag が大きすぎる。それを考慮して、FLAG Tag の作製を行うことにした。

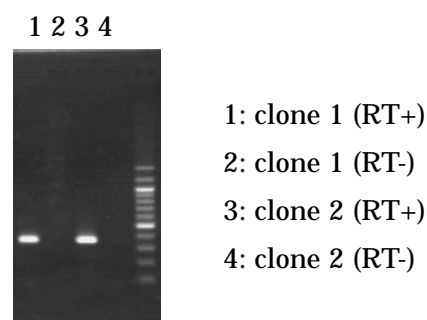
発現ベクター-pcDNA3 の XhoI 制限酵素部位に FLAG Tag の付加されたベクターを以前子作製していたので、このベクターのマルチクローニングサイトの EcoRI-XhoI 部位に PCR で増幅した DEXI 遺伝子を挿入した。前回と同じく、HeLa 細胞と MC3T3-E1 細胞へ導入し、G418 で選別を行った。しかしながら、今回も発現量の少ないクローンしか FLAG の抗体で検出することはできなかった (図 1)。発現ベクターが導入されていないかどうかを確認するため、選別で用いるネオマイシン耐性遺伝子が発現しているかどうかを total RNA を採取し確認したところ、発現ベクターの導入は確認できた (図 2)。何らかの抑制機構が働いているのかもしれない。

図 1



MC: MC3T3-E1, Tf: DEXI

図 2



Primer: neo-cassette primer

#3 DEXI の一次構造解析

リソソームターゲットシグナルの可能性のある配列 DXXLV の中で、下線で示した D,L,V が重要であると考えられたので、このアミノ酸をアラニン(A)に置換したエントリーベクターを作製した。

#4 リアルタイム PCR やウエスタンブロットを用いた発現量の比較

マウスの各臓器より total RNA を採取し、RT-PCR にて DEXI の発現を調べた。腎臓、心臓、脾臓、大腸、肺、肝臓で DEXI の発現が

認められた。一方、小腸、胃、胸腺、膀胱ではほとんど発現は認められなかった。

TFEB 過剰発現系の確立

DEXI の発現をコントロールしていると考えられる転写因子 TFEB の過剰発現系の確立を行った。TFEB は最近オートファジーが起こる際に、大量のリソソーム酵素を発現させなければならないが、リソソーム酵素のプロモーター配列に CLEAR 配列があると、そこへ TFEB が結合し、多くのリソソーム酵素を発現させる転写因子である。そこでまず初めに、ATCC よりマウス TFEB cDNA を購入し、それを鋳型にして TFEB 遺伝子の増幅を行った。この際、増幅のためのプライマーの両端に制限酵素部位 *EcoRI* と *XhoI* の切断部位をもうけることで、発現ベクターへの挿入を可能にした。発現ベクターには DEXI と同様に FLAG Tag 付きの pcDNA3 を用いた。これを、骨芽細胞様細胞株の MC3T3-E1 細胞へ導入し、G418 で選別を行い、いくつかのクローンを得た。リアルタイム PCR にて TFEB の発現量を調べたところ、約 2.5 倍しか上昇しておらず、そのためか DEXI の発現量にも有意な差は認められなかった。

一方、MC3T3-E1 細胞は、アスコルビン酸 (AA) と β -glycerophosphate (β G) を添加すると、骨芽細胞へ分化する。その指標の一つがアルカリフォスファターゼ染色である。非常におもしろいことに、TFEB を過剰発現させた MC3T3-E1 細胞は AA と β G を添加しなくても骨芽細胞へ分化することが明らかとされた。このことについて、他の骨芽細胞マーカー遺伝子についても同様の結果が得られた。

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 6 件)

1. Yamaguchi Y, Sakai E, Sakamoto H, Fumimoto R, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T: Inhibitory effects of tert-butylhydroquinone on osteoclast differentiation via up-regulation of heme oxygenase-1 and down-regulation of HMGB1 release and NFATc1. *J. Appl. Toxicol.*, 34(1), 9-56, 2014 (査読有)
2. Sakai E, Shimada-Sugawara M, Yamaguchi Y, Sakamoto H, Fumimoto R, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T: Fisetin Inhibits Osteoclastogenesis Through Prevention of RANKL-Induced ROS Production by Nrf2-Mediated Upregulation of Phase II Antioxidant Enzymes. *J Pharmacol Sci.*, 121(4), 288-298, 2013 (査読有)
3. Sakamoto H, Sakai E, Fumimoto R, Yamaguchi Y, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T: Deltamethrin inhibits osteoclast differentiation via regulation of

heme oxygenase-1 and NFATc1. *Toxicol. in Vitro*, 26, 817-822, 2012 (査読有)

4. Fumimoto R, Sakai E, Yamaguchi Y, Sakamoto H, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T: The Coffee Diterpene Kahweol Prevents Osteoclastogenesis via Impairment of NFATc1 Expression and Blocking of Erk Phosphorylation. *J. Pharmacol. Sci.*, 118(4), 479-486, 2012 (査読有)
5. Narahara S, Matsushima H, Sakai E, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T: Genetic backgrounds and redox conditions influence morphological characteristics and cell differentiation of osteoclasts in mice. *Cell. Tissue Res.*, 348(1), 81-94, 2012 (査読有)
6. Okamoto K, Okamoto Y, Kawakubo T, Iwata J, Yasuda Y, Tsukuba T, Yamamoto K: Role of the transcription factor Sp1 in regulating the expression of the murine cathepsin E gene. *J. Biochem.*, 151(3), 263-272, 2012 (査読有)

[学会発表](計 24 件)

1. 坂井詠子, 山口優, 福間裕, 菅原めぐみ, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Nrf2 遺伝子欠損マウスにおける酸化ストレスと骨代謝 第 87 回日本生化学会大会, 国立京都国際会館(京都), 10 月 18 日, 2014
2. 菅原めぐみ, 坂井詠子, 福間裕, 西下一久, 岡元邦彰, 福田光則, 泉哲郎, 吉田教明, 筑波隆幸: Rab27A は破骨細胞の多核化とリソソーム機能を制御する 第 87 回日本生化学会大会, 国立京都国際会館(京都), 10 月 17 日, 2014
3. 岩竹真弓, 岡元邦彰, 筑波隆幸: 破骨細胞における膜動態と細胞骨格制御に關与するタンパク質の解析 第 87 回日本生化学会大会, 国立京都国際会館(京都), 10 月 16 日, 2014
4. 八島由佳, 岡元邦彰, 坂井詠子, 西下一久, 筑波隆幸: コバルトプロトポルフィリンの破骨細胞分化および活性化に対する影響 Effects of cobalt protoporphyrin on osteoclastogenesis, 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 福岡国際会議場(福岡), 9 月 27 日, 2014
5. 坂井詠子, 福間裕, 菅原めぐみ, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Nrf2 遺伝子欠損マウスにおける酸化ストレスと破骨細胞分化 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 福岡国際会議場(福岡), 9 月 27 日, 2014
6. 岩竹真弓, 坂井詠子, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: 破骨細胞の分化抑制に關するエラジタンニン類の作用メカニズムの解明 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 福岡国際会議場(福岡), 9 月 27 日, 2014
7. 岩竹真弓, 岡元邦彰, 筑波隆幸: 破骨細胞におけるポドソームの形成に關与するタンパク質の同定とその機能解析 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 福岡国際会議

- 場(福岡), 9月26日, 2014
8. 菅原めぐみ, 坂井詠子, 福間裕, 西下一久, 岡元邦彰, 吉田教, 筑波隆幸: 破骨細胞の多核化とリソソーム機能を制御するrabタンパク質の同定 第56回歯科基礎医学会学術大会, 福岡国際会議場(福岡), 9月26日, 2014
 9. 財津有未, 岩竹真弓, 坂井詠子, 岡元邦彰, 佐藤啓子, 中山浩次, 筑波隆幸: 歯周病細菌によるヒト肝細胞株への細胞侵入と脂肪滴形成への影響 第19回日本病態プロテアーゼ学会, 千里ライフサイエンスセンター(大阪), 8月8日, 2014
 10. 岩竹真弓, 岡元邦彰, 筑波隆幸: 破骨細胞における細胞骨格を制御するタンパク質の同定と機能の解明 第19回日本病態プロテアーゼ学会, 千里ライフサイエンスセンター(大阪), 8月8日, 2014
 11. Sakai E, Iwatake M, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tanaka T, Tsukuba T: Chemical constituents of *Sanguisorba officinalis* inhibits osteoclastogenesis. 第87回日本薬理学会, 仙台国際センター(仙台), 3月21日, 2014
 12. Yashima Y, Okamoto K, Sakai E, Nishishita K, Tsukuba T: Cobalt protoporphyrin prevents osteoclastogenesis via blocking of I κ B phosphorylation. 第87回日本薬理学会, 仙台国際センター(仙台), 3月19日, 2014
 13. 福間裕, 坂井詠子, 菅原めぐみ, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: カフェストールによる破骨細胞分化抑制作用 第66回日本薬理学会西南部会, 福岡大学薬学部(福岡), 11月16日, 2013
 14. 岩竹真弓, 坂井詠子, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: 破骨細胞の分化抑制に関するザクロポリフェノールの作用メカニズムの解明 第55回歯科基礎医学会学術大会, 岡山コンベンションセンター(岡山), 9月22日, 2013
 15. 坂井詠子, 岩竹真弓, 西下一久, 福間裕, 岡元邦彰, 筑波隆幸: *Sanguisorba officinalis* 由来化学成分の破骨細胞分化に対する影響 第55回歯科基礎医学会学術大会, 岡山コンベンションセンター(岡山), 9月22日, 2013
 16. 内野加穂, 岡元邦彰, 坂井詠子, 福間裕, 岩竹真弓, 西下一久, 筑波隆幸: リクイリチゲニンの破骨細胞形成への効果 第55回歯科基礎医学会学術大会, 岡山コンベンションセンター(岡山), 9月21日, 2013
 17. Iwatake M, Sakai E, Okamoto K, Yoneshima E, Zaitzu Y, Tanaka T, Tsukuba T: Suppressive effects of an oak extract on osteoclast formation and bone resorption. 第86回日本生化学会

- 大会合同大会, パシフィコ横浜(横浜), 9月13日, 2013
18. 坂井詠子, 福間裕, 菅原めぐみ, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Nrf2欠損は破骨細胞分化を促進する 第86回日本生化学会大会合同大会, パシフィコ横浜(横浜), 9月11日, 2013
 19. Yoneshima E, Okamoto K, Sakai E, Yoshida N, Tsukuba T: Up-regulation mechanisms of endosomal/lysosomal proteins during osteoblast differentiation. 第86回日本薬理学会, 福岡国際会議場(福岡), 3月22日, 2013
 20. Fukuma Y, Sakai E, Sugawara Megumi, Yoneshima E, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T: Cafestol prevents osteoclastogenesis via impairment of NFATc1 expression and blocking of Erk phosphorylation. 第86回日本薬理学会, 福岡国際会議場(福岡), 3月22日, 2013
 21. 岡元邦彰, 岩田淳一, 坂井詠子, 西下一久, 山本健二, 筑波隆幸: p53はカテプシンE遺伝子の発現を制御する 第85回日本生化学会大会合同大会, 福岡国際会議場(福岡), 12月16日, 2012
 22. 坂井詠子, 菅原めぐみ, 福間裕, 西下一久, 岩竹真弓, 米嶋枝里香, 岡元邦彰, 筑波隆幸: フィセチンはRANKLを介したROSの産生とNFATc1の発現を抑制することで破骨細胞分化を阻害する 第85回日本生化学会大会合同大会 福岡国際会議場(福岡), 12月16日, 2012
 23. 福間裕, 坂井詠子, 菅原めぐみ, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Cafestolの破骨細胞形成と骨吸収活性への影響, 第54回歯科基礎医学会学術大会 奥羽大学記念講堂(福島), 9月16日, 2012
 24. 坂井詠子, 菅原めぐみ, 福間裕, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Fisetinの破骨細胞形成と骨吸収活性への影響 第54回歯科基礎医学会学術大会, 奥羽大学記念講堂(福島), 9月16日, 2012

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡元 邦彰 (OKAMOTO, Kuniaki)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
准教授
研究者番号：10311846

(2) 研究分担者

筑波 隆幸 (TSUKUBA, Takayuki)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
教授
研究者番号：30264055
西下 一久 (NISHISHITA, Kazuhisa)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
助教
研究者番号：20237697
坂井 詠子 (SAKAI, Eiko)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
助教
研究者番号：10176612

(3) 連携研究者

()

研究者番号：