

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10092

研究課題名(和文)破骨細胞における新規輸送因子の同定と機能解明

研究課題名(英文) Identification and functional elucidation of a novel transport factor in osteoclasts

研究代表者

福間 裕 (Fukuma, Yutaka)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・技術職員

研究者番号：50253688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞は骨吸収時に波状縁というユニークな膜構造からリソソームのプロトンやタンパク質分解酵素を放出する。私達はこのユニークな膜構造を持つ破骨細胞への成熟化が進むと発現が増大する遺伝子の中から新規タンパク質であるRab44を同定した。本研究ではさらにRab44の分子機構を探るため、in vitro 解析としてRab44と結合するエフェクター分子の同定を行った。さらにin vivoでの解析としてRab44のノックアウトマウスを作製し、骨組織・骨代謝の変化を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Rab44は細胞内の膜輸送を制御する分子スイッチであると考えられる。Rabはエフェクターと呼ばれる結合分子と協調的に働くことで小胞輸送やオルガネラの動態を制御する。この解明により、なぜ破骨細胞ではリソソームがRab44依存的に分泌されるのかの分子基盤が解明される。さらにRab44の破骨細胞の多核化のメカニズムを膜輸送や小胞輸送という切り口から明らかにできる可能性がある。また遺伝子異常により、破骨細胞機能が活性化されることから、歯周病やリュウマチなど骨代謝疾患の新しい病態の解明に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Osteoclasts release lysosomal protons and proteolytic enzymes from a unique membrane structure called "ruffled border" during bone resorption. We identified a novel protein, Rab44, from among the genes whose expression increases as maturation into osteoclasts with this unique membrane structure progresses. In this study, in order to further explore the molecular mechanisms of Rab44, we identified effector molecules that bind to Rab44 as an in vitro analysis. Furthermore, as an in vivo analysis, we prepared Rab44-knockout mice and analyzed changes in bone tissue and bone metabolism in wild and Rab44-knockout mice.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：Rabタンパク質 破骨細胞 新規輸送因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 新規遺伝子 Rab44 の同定

破骨細胞は多核細胞であり、骨を分解する機能を持つ。骨吸収時に波状縁とよばれるユニークな細胞膜を形成し、この膜からミネラルを溶解するプロトンや有機質成分を分解するタンパク質分解酵素が放出する。我々は破骨細胞での輸送機構する新規遺伝子を同定するため、分化前のマクロファージと破骨細胞との mRNA を抽出し、逆転写~DNA マイクロアレーを行い、新規の Rab44 遺伝子を同定した。Rab44 は破骨細胞の分化成熟化過程で発現レベルが増大する遺伝子である。Rab44 遺伝子はヒトで 1021 個のアミノ酸、マウスで 725 個のアミノ酸から構成される。一般的な Rab タンパク質は 210 個前後であるので、Rab44 は大きいタンパク質である。Rab44 の構造的特徴はオルガネラの係留に關与する Coiled-coil ドメインと他のタンパク質と結合することができるプロリンリッチドメイン (PRD) を持つ。さらにヒト Rab44 にはカルシウム結合領域である EF ハンドモチーフが存在するのに対して、マウスでは欠落している。Rab44 をノックダウンすると破骨細胞の巨大化、多核化し、骨吸収能の増大を示した。過剰発現によって全く逆の結果が得られたことから、Rab44 は破骨細胞の分化を負に制御していると推測した。

(2) 結合分子同定の重要性

一般的に Rab タンパク質の細胞内での基本的な役割は細胞内の特定の膜領域に局在し、そこで必要な機能分子 (エフェクター分子) を相互作用して、この複合体で機能する。Rab の活性化と不活性化は、Rab 活性化因子であるグアニンヌクレオチド交換因子 (Rab guanine-nucleotide exchange factor, GEF) と Rab 不活性化因子である GTP アーゼ活性化タンパク質 (Rab GTPase activating protein, GAP) によって制御されている。さらにグアニンヌクレオチド解離阻害因子 (GDP dissociation inhibitor, GDI) との結合が上昇し細胞膜から解離させ、Rab を細胞質中へ戻す。この 3 つの制御因子以外に Rab タンパク質と相互作用するタンパク質は SNARE 分子、膜に適切に融合させるための膜係留因子である HOPS (Homotypic fusion and vacuole protein sorting) 複合体やエキソシスト (Exocyst) 複合体、小胞を動かすモーター分子であるキネシンやミオシンなどの機能分子が含まれる。従って、Rab タンパク質の機能を明らかにするためには、その Rab がどのようなオルガネラに局在し、どのような分子と相互作用して複合体で機能するのかを決めることが重要である。

2. 研究の目的

(1) Rab44 欠損マウスの作製

破骨細胞や免疫細胞特異的な組織分布を示す。Rab44 の機能を生体レベルでの解析を行った。このマウスを用いて病態モデルを作製し、Rab44 の欠損による影響を調べた。

(2) Rab44 結合タンパク質の同定

本研究の目的は、我々が見出した Rab44 に結合するタンパク質を同定することである。一般的に Rab タンパク質は小胞輸送や膜輸送を調節することが知られている。Rab タンパク質は GTP が結合した活性化型と GDP が結合した不活性化型をサイクルとした分子スイッチとして機能する。それぞれの分子が特定のオルガネラに局在してエフェクターと呼ばれる特異的な結合分子を膜上にリクルートすることでそれぞれのオルガネラの機能に必要な分子を供給する。従って、Rab44 の結合分子を同定することは破骨細胞分化や骨吸収機構の解明に不可欠の分子基盤である。

3. 研究の方法

(1) Rab44 欠損マウスの作製

破骨細胞や免疫細胞特異的な組織分布を示す。Rab44 の機能を生体レベルでの解析を行った。主に理化学研究所生体ゲノム工学研究チームに作製された。図 1 に示すように受精卵に注入した sgRNA/Cas9 が標的遺伝子の片方もしくは両方のアレルを切断すると変異マウスが得られる。両アレルが破壊された場合には、欠損ホモマウスとなる。卵割したのちに Cas9 が標的配列を切断するとモザイクマウスが生まれるため区別できる。また以降で述べる様々な病態モデルを使って Rab44 の欠損による影響を調べた。

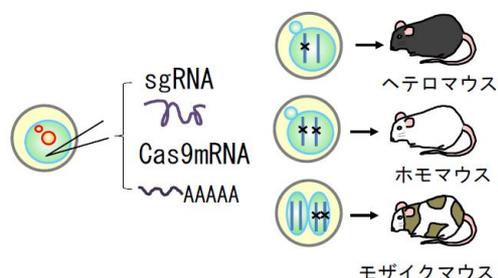


図 1 : CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集による迅速な遺伝子欠損マウスの作製

(2) Rab44 結合タンパク質の同定

免疫沈降による解析

マスト細胞を PBS で洗浄した後、架橋剤であるジチオビススクシンイミジルプロピオネート

(DSP) を用いて反応後、細胞溶解し、Rab44 抗体 (一次抗体) と反応させた。プロテイン G-セファロースビーズを用いて免疫複合体を回収し、電気泳動とウエスタンブロット分析を用いて解析した。

GDP 特異的プルダウンアッセイ

Rab44 の GDP 型に特異的に結合する分子を同定するために、GDP 特異的プルダウンアッセイを行った。Rab44 とその結合タンパク質複合体をアルカリホスファターゼ (ALP) で処理して形成を安定化させた後、GTP を添加してタンパク質複合体を溶出した。溶出されたタンパク質を SDS-PAGE で GFP のみ発現させたコントロール細胞と Rab44-GFP 発現細胞を比較して、結合分子として 4 つのバンドを検出した。その後この 4 つのタンパク質をマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 法を用いた質量分析で同定した。

4. 研究成果

(1) Rab44 欠損マウスの解析

Rab44 欠損マウスはアレルギー反応に関して顕著な差を示した。同マウスは野生型マウスに比べ、アナフィラキシー症状が半分程度減少を示した。同様に Rab44 ノックアウトマウス由来の骨髄マスト細胞は Fc RI を介したヒスタミンと β -ヘキソサミニダーゼ分泌が野生型細胞に比べて有意に減少していた (Cell Mol Immunol. 2020)。

Rab44 の骨代謝に関しては成長したマウスの大腿骨、椎骨等の μ CT 撮影により骨量、海綿骨数、海綿骨厚を測定した。しかし、若干の差異は認められるものの個体差が大きく、有意差があるかどうかを現在解析中である。

(2) Rab44 結合タンパク質の解析

免疫沈降による解析

マスト細胞で Rab44 と結合するのは VAMP8 (Vesicle-associated membrane protein 8) であることが分かった (FEBS Open Bio, 2021)。VAMP8 は小胞輸送に関与するタンパク質の 1 つである。細胞内のリソソームや分泌顆粒に局在する V-SNARE タンパク質であり、細胞膜に局在する t-SNARE 分子である MINC18b や SNAP23、STX11 と相互作用すると細胞膜が膜融合し、細胞外に分泌される。Rab44 と VAMP8 の結合は Rab44 の GDP 型と結合した (図 2)。これは Rab44 の野生型と恒常活性型とを RBL-2H3 細胞に過剰発現させると両分子ともに Rab44 と結合することを認めた (FEBS Open Bio, 2021)。

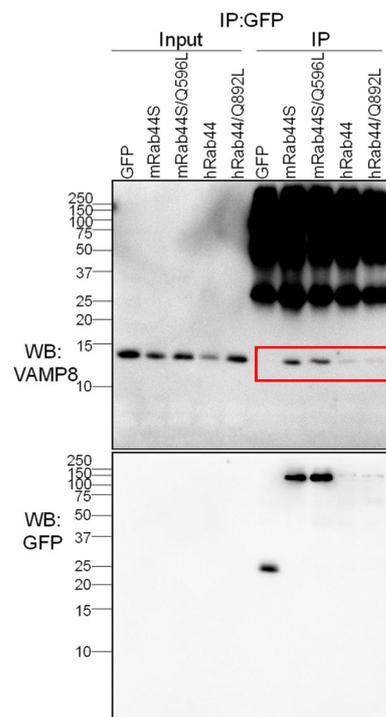
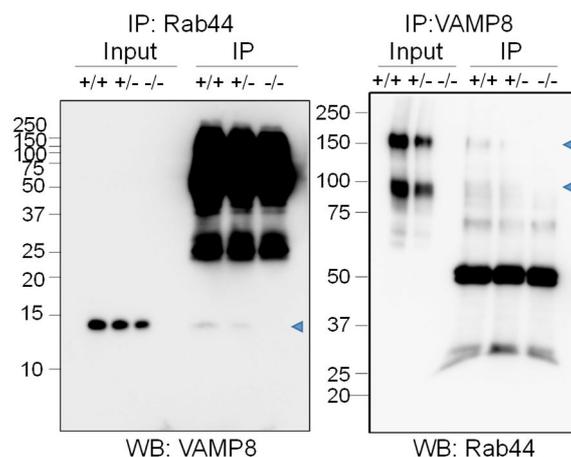


図 2 : (左) 免疫沈降による Rab44 野生型 (+/+)、Rab44 ノックアウト・ヘテロ (+/-)、Rab44 ノックアウト・ホモ (-/-) の細胞で VAMP8 の検出。野生型やヘテロでは VAMP8 は検出できるが、ホモの細胞には VAMP8 のバンドが検出できない (WB: VAMP8 の 14kDa 付近の矢頭部と WB: Rab44 の 150 および 100kDa 付近の矢頭部) (右) ヒト型、マウス型 Rab44 をラット RBL-2H3 細胞にて発現させ VAMP8 抗体で免疫沈降した。共に Rat の VAMP8 が検出できることから結合していることを示す (赤枠部分)。

GDP 特異的プルダウンアッセイ

マクロファージから破骨細胞に分化する過程で Rab44 の GDP 特異的に結合する分子として細胞骨格のアクチンとも結合できる X を同定した。この分子の名称は現在論文投稿中のため、公表

することは差し控える。この分子が Rab44 の野生型と不活性型変異体を RAW-D 細胞に過剰発現させると両分子ともに Rab44 と結合することを認めた。しかし、この分子は恒常活性型 Rab44 とは結合しないことも確認した。この分子をロックダウンすると破骨細胞分化の遅延や細胞同士の融合が遅れることなども明らかとなっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Sakai E, Sato M, Mently N, Tsukuba T, Sato C.	4. 巻 11
2. 論文標題 Liquid-phase ASEM imaging of cellular and structural details in cartilage and bone formed during endochondral ossification: Keap1-deficient osteomalacia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 5722
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-84202-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kadowaki T, Yamaguchi Y, Ogawa K, Tokuhisa M, Okamoto K, Tsukuba T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Rab44 isoforms similarly promote lysosomal exocytosis, but exhibit differential localization in mast cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1165-1185
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/211-5463.13133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tran MT, Okusha Y, Feng Y, Morimatsu M, Wei P, Sogawa C, Eguchi T, Kadowaki T, Sakai E, Okamura H, Naruse, Tsukuba T, Okamoto K.	4. 巻 21
2. 論文標題 The Inhibitory Role of Rab11b in Osteoclastogenesis through Triggering Lysosome-Induced Degradation of c-Fms and RANK Surface Receptors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 9352
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21249352.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Nishioku T, Kubo T, Kamada T, Okamoto K, Tsukuba T, Uto T, Shoyama Y.	4. 巻 41
2. 論文標題 (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis via downregulation of NFATc1 and suppression of HO-1-HMGB1-RAGE pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomed Res.	6. 最初と最後の頁 269-277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.41.269.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa K, Kadowaki T, Tokuhisa M, Yamaguchi Y, Umeda M, Tsukuba T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Role of the EF-hand and coiled-coil domains of human Rab44 in localisation and organelle formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 19149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75897-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okusha Y, Tran MT, Itagaki M, Sogawa C, Eguchi T, Okui T, Kadowaki T, Sakai E, Tsukuba T, Okamoto K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Rab11A Functions as a Negative Regulator of Osteoclastogenesis through Dictating Lysosome-Induced Proteolysis of c-fms and RANK Surface Receptors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9112384.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tokuhisa M, Kadowaki T, Ogawa K, Yamaguchi Y, Kido MA, Gao W, Umeda M, Tsukuba T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Expression and localisation of Rab44 in immune-related cells change during cell differentiation and stimulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 10728
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-67638-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishioku T, Kawamoto M, Okizono R, Sakai E, Okamoto K, Tsukuba T.	4. 巻 530
2. 論文標題 Dimethyl fumarate prevents osteoclastogenesis by decreasing NFATc1 expression, inhibiting of erk and p38 MAPK phosphorylation, and suppressing of HMGB1 release	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 455-461.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.088.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kadowaki T, Yamaguchi Y, Kido MA, Abe T, Ogawa K, Tokuhisa M, Gao W, Okamoto K, Kiyonari H, Tsukuba T.	4. 巻 17
2. 論文標題 The large GTPase Rab44 regulates granule exocytosis in mast cells and IgE-mediated anaphylaxis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Mol Immunol.	6. 最初と最後の頁 1287-1289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41423-020-0413-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato C, Yamazaki D, Sato M, Takeshima H, Mementily N, Hatano Y, Tsukuba T, Sakai E.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Calcium phosphate mineralization in bone tissues directly observed in aqueous liquid by atmospheric SEM (ASEM) without staining: microfluidics crystallization chamber and immuno-EM.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 7352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-43608-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kadowaki T, Yamaguchi Y, Kido MA, Abe T, Ogawa K, Tokuhisa M, Gao W, Okamoto K, Kiyonari H, Tsukuba T.	4. 巻 17
2. 論文標題 The large GTPase Rab44 regulates granule exocytosis in mast cells and IgE-mediated anaphylaxis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Mol Immunol.	6. 最初と最後の頁 1287-1289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41423-020-0413-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Feng Yunxia, Tran Manh Tien, Lu Yanyin, Htike Kaung, Okusha Yuka, Sogawa Chiharu, Eguchi Takanori, Kadowaki Tomoko, Sakai Eiko, Tsukuba Takayuki, Okamoto Kuniaki	4. 巻 40
2. 論文標題 Rab34 plays a critical role as a bidirectional regulator of osteoclastogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Biochemistry and Function	6. 最初と最後の頁 263 ~ 277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbf.3691	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mae Megumi, Alam Mohammad Ibtehad, Yamashita Yasunori, Ozaki Yukio, Higuchi Kanako, Ziauddin S. M., Montenegro Raudales Jorge Luis, Sakai Eiko, Tsukuba Takayuki, Yoshimura Atsutoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 The Role of Cytokines Produced via the NLRP3 Inflammasome in Mouse Macrophages Stimulated with Dental Calculus in Osteoclastogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12434 ~ 12434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222212434	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsukuba Takayuki, Yamaguchi Yu, Kadowaki Tomoko	4. 巻 22
2. 論文標題 Large Rab GTPases: Novel Membrane Trafficking Regulators with a Calcium Sensor and Functional Domains	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7691 ~ 7691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22147691	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 門脇知子、山口 優、筑波隆幸
2. 発表標題 リソソームとアレルギー疾患制御
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤主税, 杉本真也, Memtily Nassirhadjy, 山澤徳志子, 佐藤真理, 坂井詠子
2. 発表標題 大気圧走査電子顕微鏡ASEMによる組織・細胞の免疫電顕法とcryo-TEM観察
3. 学会等名 第75回日本顕微鏡学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤主税, 旗野悠里, Mentily Nassirhadjy, 佐藤真理, 坂井詠子
2. 発表標題 大気圧電顕によるリン酸カルシウムと破骨細胞の水中観察と免疫電顕
3. 学会等名 第39回日本骨形態計測学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤主税, 杉本真也, 旗野悠里, 佐藤真理, 坂井詠子
2. 発表標題 大気圧走査電子顕微鏡ASEMによる骨組織再構築の水中免疫電顕法とcryo-TEM観察
3. 学会等名 第57回日本生物物理学学会
4. 発表年 2019年

〔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
研究分担者	筑波 隆幸 (Tsukuba Takayuki) (30264055)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授 (17301)	分子生物学実験
研究分担者	坂井 詠子 (Eiko Sakai) (10176612)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教 (17301)	細胞・マウス実験

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
---------	---------