

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 13 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：19K10112

研究課題名(和文)好中球における新規Rabタンパク質の機能と歯周病での役割

研究課題名(英文)Function of a novel Rab protein in neutrophils and its role in periodontal disease

研究代表者

雪竹 英治 (Yukitake, Hideharu)

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：30380984

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)：好中球は細菌を貪食し、サイトカインを分泌して生体防御の第一線で機能している。我々は独自の研究から、破骨細胞の分化過程で増大する新規遺伝子Rab44を発見し、さらにRab44が好中球にも発現していることを見出した。本研究では、好中球の前駆体細胞である骨髄細胞でのRab44の発現量と細胞内局在について解析を行った。さらに骨髄細胞から分化する好中球、マクロファージ、樹状細胞などの代表的な免疫細胞のRab44の発現量について比較解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は世界に先駆けて新規遺伝子Rab44を破骨細胞で同定したが、Rab44が好中球にも発現していた。Rab44が関与する破骨細胞と好中球の機能が異常になれば、歯周病の感受性が変化することは容易に予測される。本研究では破骨細胞や好中球に特異的に発現しているRab44の役割について解析を進めた。本研究によるRab44の分子基盤の解明は破骨細胞の骨吸収機構や好中球の分泌機構、貪食・殺菌機構の解明にとって有益な情報となるだけでなく、新しい骨代謝治療薬あるいは歯周病治療薬への手掛かりになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Neutrophils phagocytose bacteria, secrete cytokines, and function at the forefront of biological defense. From our own research, we discovered a novel gene, Rab44, that increases during osteoclast differentiation, and found that Rab44 is also expressed in neutrophils. In this study, we analyzed the expression levels and intracellular localization of Rab44 in bone marrow cells, which are precursor cells of neutrophils. Furthermore, we comparatively analyzed the expression levels of Rab44 in some immune cells such as neutrophils, macrophages, and dendritic cells that differentiate from bone marrow cells.

研究分野：口腔病原微生物学

キーワード：Rabタンパク質 好中球 歯周病

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) リソソームに局在する新規遺伝子 Rab44 の発見

我々は破骨細胞におけるリソソーム機能を制御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 マイクロアレイ解析を行なった。その結果、全く論文報告されていない Rab44 遺伝子を同定することができた。Rab44 遺伝子は破骨細胞の分化成熟化過程で発現レベルが増大する。

#### (2) Rab44 の特徴的構造

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。Rab44 遺伝子はヒトで 1021 個、マウスで 725 個のアミノ酸から構成される。一般的な Rab タンパクは 210 個前後であることを考えると、Rab44 は大きいタンパク質であることが分かる。Rab44 の構造的特徴は、他の Rab タンパク質にはない、オルガネラの係留に関与する Coiled-coil ドメイン、他のタンパク質と結合に関わるプロリンリッチドメイン (PRD)、カルシウム結合領域である EF ハンドモチーフを持つことである。これらのドメインの機能は未だわかっていない。

### 2. 研究の目的

我々は Rab44 が好中球の前駆細胞である骨髄顆粒球前駆細胞や成熟した好中球にも発現していることを見出した。本研究は我々が初めて機能を見出した Rab44 について、破骨細胞だけではなく、好中球における新しい機能について明らかにすることを目的としている。我々は既に Rab44 ノックダウン破骨細胞が巨大化・多核化し、マーカー遺伝子の発現レベルが上昇して、破骨細胞が活性化することを見出した。Rab44 が好中球にも発現していることは、Rab44 が免疫応答に深く関与することを示唆する。Rab44 は一般的な Rab1 ~ 43 のように低分子量タンパク質ではなく、N 末端にいくつかの機能ドメインを包含する独特の構造を有する。Rab44 は 1 つの分子上に Ca<sup>2+</sup> センサードメインを持ち、独自で活性を制御している可能性がある。

好中球はアズール顆粒等を脱顆粒させることにより、サイトカインや炎症性メディエーターを放出し、炎症性免疫応答を惹起する。また、好中球は主に生体内に侵入してきた細菌類を貪食・殺菌を行うことで、感染を防ぐ役割を果たす。貪食された細菌類は、リソソームと融合してスーパーオキシドにより殺菌され、リソソーム性加水分解酵素により分解される。Rab44 が好中球での膜輸送に関与するとすれば、Rab44 は好中球でのサイトカインや炎症性メディエーターの分泌もしくは、細菌の貪食や殺菌の分子機構に関与していると予測される。

### 3. 研究の方法

#### 骨髄細胞、好中球、マクロファージの採取

組織はマウス (C57BL/6) 8 週齢から採取し、骨髄細胞はマウス脛骨、大腿骨より骨髄を採取し使用した。初代培養としてマウス由来骨髄細胞を用い、マクロファージへの分化には M-CSF を、樹状細胞への分化には GM-CSF を用いた。好中球は 4% チオグリコレートのマウスの腹腔内に注射し、14 時間後に回収、2 時間インキュベーションし、非接着細胞を好中球として使用した。解析方法は定量性 real-time PCR (QPCR) 法、Western blot 法、免疫組織化学染色法、蛍光免疫染色法を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 骨髄細胞での Rab44 の発現量と細胞内局在

Rab44 は骨髄で強く発現し、免疫関連組織ではわずかに発現することが明らかとなった (図 1)。具体的には mRNA レベルでは、Rab44 は骨髄で高度に発現し、精巣上体、肺、皮膚、脾臓、胸腺、卵巣、子宮、および肝臓でわずかに発現した。Rab44 の発現は、胃、小腸、大腸、心臓、腎臓、大脳、小脳、膵臓ではほとんど検出されなかった。Rab44 タンパク質の発現を調べるために、ウエスタンブロッティングを行った。骨髄中の Rab44 タンパク質は、分子量が約 75 kDa と 100 kDa の 2 つの形態として検出された。しかしながら、脾臓および胸腺からの Rab44 タンパク質は、約 150 kDa の分子量を有することが検出された。これらのバンドは、Rab44 ノックアウトマウスの骨髄または他の組織では検出されなかったため、これらのバンドは Rab44 特異的である (図 2)。

骨髄における Rab44 陽性細胞をさらに詳しく解析するため、造血幹細胞マーカーである CD117、Sca-1 を用いて蛍光免疫染色を行ったところ、Rab44 の発現は CD117 陽性細胞と一致したが、Sca-1 陽性細胞では検出できなかった。CD117 陽性かつ Sca-1 陽性細胞は骨髄顆粒球前駆細胞であることを示しており、顆粒球の前駆細胞、すなわち、好中球、好酸球、好塩基球、マスト細胞、単球 (マクロファージ) 等の分化前の細胞に多く発現していることが明らかとなった。

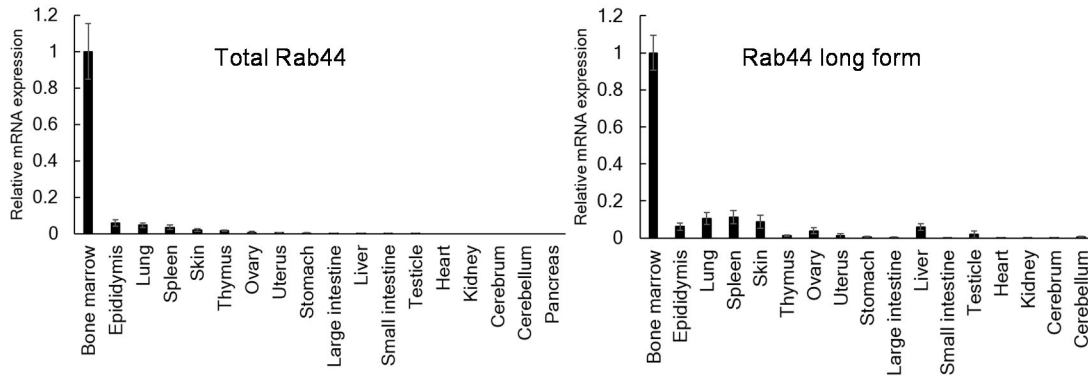
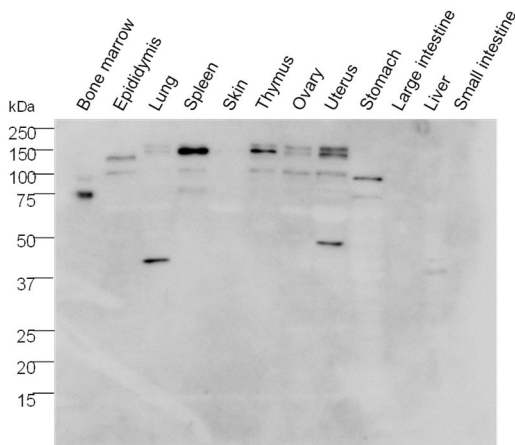


図1：（左）Rab44 の mRNA 発現量（Long form と Short form の総量）及び（右）Long form の mRNA 発現量



さらに骨髄細胞由来のマクロファージでの Rab44 はリソソームに局在していた。具体的には Rab44 は顆粒状コンパートメントに局在し、リソソームマーカーである LAMP1 と部分的に共局在していた。しかし、初期エンドソームマーカーである EEA1、ゴルジ体マーカーである GM130、小胞体マーカーである KDEL とは共局在しなかった。これに対して、以前の研究ではマウス・マクロファージ RAW-D で過剰発現させると、Rab44 は主にゴルジ複合体とリソソームに両方に局在していたので若干局在様式が異なっていることが分かった。

図2：Rab44 のタンパク質発現量（ウエスタンブロットティング）

（2）免疫系細胞での Rab44 発現量と機能

次に、骨髄細胞から分化する好中球、マクロファージ、樹状細胞などの代表的な免疫細胞の Rab44 の発現量を解析した（図3）。RT-PCR 分析により、好中球の Rab44 発現量は骨髄細胞の約 10%であることが明らかになった。同様に、骨髄マクロファージの Rab44 発現量は約 10%であるが、樹状細胞の発現量は約 15%であった。従って、好中球、マクロファージ、樹状細胞の Rab44 のレベルは、骨髄細胞と比較して非常に低いことが分かった。現在、Rab44 ノックアウトマウスを用いて種々の炎症誘導によって遊走される好中球数の差異について解析を行っている。

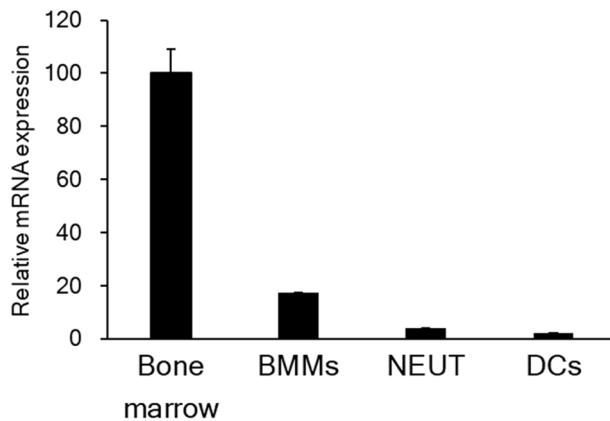


図3：Rab44 の mRNA 発現量

Bone marrow: 骨髄細胞、BMMs: 骨髄由来マクロファージ、NEUT: 好中球、DCs: 樹状細胞

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15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 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 Yukitake H, Shoji M, Sato K, Handa Y, Naito M, Imada K, Nakayama K.	4. 巻 10
2. 論文標題 PorA, a conserved C-terminal domain-containing protein, impacts the PorXY-SigP signaling of the type IX secretion system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 21109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-77987-y	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1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

〔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)	生化学実験
研究 分担者	門脇 知子  (Tomoko Kadowaki)  (70336080)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授   (17301)	細胞生物学実験

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