

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861324

研究課題名(和文)破骨細胞分化成熟過程における小胞体膜タンパク質Lumanの機能解析

研究課題名(英文)Luman, an ER membrane-bound transcription factor, is involved in osteoclastogenesis

研究代表者

金本 聡自 (Kanemoto, Soshi)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：90611913

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)：Lumanは通常、小胞体膜上に局在し、活性化されると切断を受け、N末端断片が転写因子として機能する。破骨細胞は骨吸収することで骨を新しく作り変えることを促す細胞である。Lumanが破骨細胞分化過程で発現上昇し、破骨細胞融合因子DC-STAMPの発現を誘導することを見出した。破骨細胞分化時にLumanが機能しないと、破骨細胞同士の融合による多核化が阻害されることを明らかにした。また、LumanとDC-STAMPの両者が結合することを見出し、この複合体形成が両者の細胞内局在とタンパク質安定性を制御していることを見つけた。この両者間の結合によって破骨細胞の分化・成熟を調節している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Luman is a type II transmembrane transcription factor belonging to the OASIS family that localizes to the endoplasmic reticulum (ER) membrane under normal conditions. In response to ER stress, OASIS family members are processed, and cleaved N-terminal fragments translocate to the nucleus and function as a transcription factor. In this study, it was revealed that Luman is induced and activated during osteoclast differentiation. ShRNA-mediated knockdown of Luman prevents the formation of multinucleated osteoclasts, concomitant with the suppression of DC-STAMP, a protein essential for cell-cell fusion in osteoclastogenesis. N-terminus of Luman leads to up-regulation of DC-STAMP expression. Moreover, Luman interacts with DC-STAMP, and controls its stability and localization. These results suggest that Luman regulates the multinucleation of osteoclasts by promoting cell fusion of mononuclear osteoclasts through DC-STAMP induction and intracellular distribution during osteoclastogenesis.

研究分野：生化学

キーワード：破骨細胞 小胞体 転写因子 分化 細胞融合

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は、生体内において骨吸収機能を持つ唯一の細胞と考えられており、その分化成熟過程において破骨前駆細胞同士の細胞間融合・多核化による劇的な形態変化を見せる。また、機能面においても、骨吸収能を発揮するために骨マトリクスを分解する各種プロテアーゼの産生亢進や骨吸収窩を酸性化するプロトンポンプの機能亢進が起こる。この際、大量のタンパク質合成を伴うことから、膜タンパク質及び分泌タンパク質の成熟化の場として働く小胞体の機能も亢進していると考えられる。

小胞体では、新たに合成されたタンパク質の折りたたみや修飾が行われている。ところが、細胞がその恒常性維持に不利な刺激を受けると、新規合成タンパク質の正常な折りたたみが障害され、不良タンパク質として小胞体内腔に蓄積していく。この状態を小胞体ストレスと呼ぶ。細胞は小胞体ストレス状態を解除するための応答機構として小胞体ストレス応答を発動する。小胞体ストレス応答は従来、不良タンパク質の除去機構としてとらえられてきたが、近年細胞や組織の分化・成熟にも関与していることが明らかになってきた。

破骨細胞が分化成熟する際のシグナルクロストークの詳細は近年明らかにされつつあるものの、破骨細胞の分化制御機構の全容については未だ解明に至っていない。特に、その分化制御機構に、小胞体から発信されるシグナルが関与するかどうかはこれまでほとんど検討されていなかった。

2. 研究の目的

破骨細胞の分化・機能制御の全貌を明らかにするために、細胞内オルガネラ(本研究においては小胞体)からのシグナルがどのように関わるか解明する。

本研究では、小胞体膜上に局在する膜貫通型転写因子のひとつ *Luman* に着目した。*Luman* は樹状細胞の成熟に関与することが報告されているが、機能については完全には明らかとなっていない。破骨細胞は、樹状細胞と同じく単球/マクロファージの細胞系譜から分化することが知られている。そこで、破骨細胞の分化・成熟過程に *Luman* が関与するか検討する。

3. 研究の方法

マウス脛骨の骨髄から骨髄マクロファージを単離し、サイトカインを用いて破骨細胞へ分化させる。その際に、*Luman* の発現量に変化が生じるか、mRNA およびタンパク質レベルで検討する。また、分化誘導の際に *Luman* に対する shRNA を骨髄マクロファージに遺伝子導入し、破骨細胞への分化に影

響が生じるか調べる。

Luman は転写因子として働くことが知られている。破骨細胞分化時の *Luman* の標的遺伝子を *Luman* のノックダウンおよび過剰発現系を用いて同定する。

4. 研究成果

「実施内容」

C57BL/6 マウスの脛骨から単離した骨髄マクロファージに対し、サイトカイン M-CSF および RANKL を作用させ破骨細胞分化を促した。破骨細胞への分化開始後 1 日毎の total mRNA を回収し、*Luman* mRNA の発現量を RT-PCR で解析した。その結果、サイトカイン刺激後 *Luman* mRNA の発現量が経時的に増加した(図 1)。Real-time PCR を用いて定量化したところ、RT-PCR の結果と同じく、*Luman* mRNA の発現量が分化開始後から増加した。タンパク質レベルでの *Luman* の発現量変化を調べるために、ウェスタンブロッティングを行った。その結果、タンパク質レベルにおいても、*Luman* の発現が経時的に増加していくことが明らかとなった。

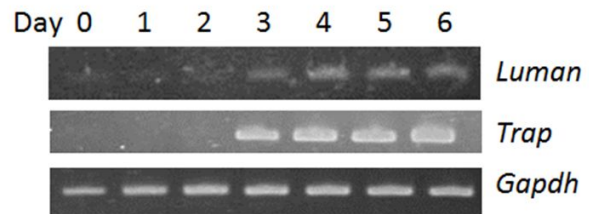


図 1:破骨細胞分化過程の RT-PCR 解析. 分化が進むにつれて破骨細胞のマーカである *Trap* と同様に *Luman* の発現量が増加している。

Luman が破骨細胞の分化過程で誘導されることが分かったので、破骨細胞における *Luman* の機能を調べる目的で *Luman* のノックダウン実験を行った。*Luman* に対する shRNA を発現するレトロウイルスを骨髄マクロファージに感染させ、*Luman* をノックダウンした。*Luman* のノックダウン後、M-CSF および RANKL 処理によって骨髄マクロファージを破骨細胞へ分化させた。サイトカイン刺激後の細胞を TRAP 染色したところ、*Luman* をノックダウンした細胞では破骨細胞の多核化が顕著に阻害された(図 2)。

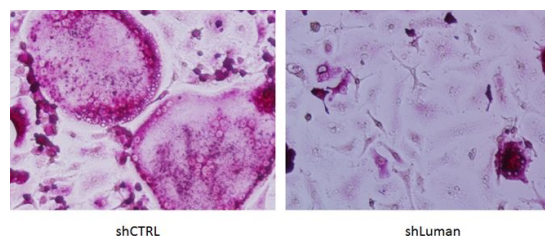


図 2:破骨細胞の TRAP 染色. コントロール shRNA 或いは *Luman* に対する shRNA を導入後、

M-CSF および RANKL で処理して3日目の細胞を TRAP 染色した。コントロール shRNA を導入した細胞では、細胞融合を起こし、多核化した破骨細胞が観察される(左図の赤色の巨大細胞)。Luman をノックダウンした細胞では細胞融合が阻害される(右図)。

Luman のノックダウンによる破骨細胞の多核化阻害のメカニズムを明らかにするために、Luman ノックダウン細胞とコントロール細胞における破骨細胞分化関連遺伝子の遺伝子発現パターンを Real-time PCR で解析した。その結果、破骨細胞の多核化(細胞融合)に関わる遺伝子のうち、DC-STAMP および OC-STAMP と呼ばれる破骨細胞の細胞融合時に必須のタンパク質 2 分子の遺伝子発現が有意に減少していた。そこで次に、骨髄マクロファージに Luman を過剰発現させた後、破骨細胞分化関連遺伝子の遺伝子発現パターンについて Real-time PCR で解析した。Luman の導入によって、DC-STAMP の発現量が有意に上昇した(図 3)。一方、OC-STAMP は Luman を導入しても発現量の上昇は見られなかった(図 3)。このことから、Luman が DC-STAMP の発現を調節している可能性が考えられた。また、Luman ノックダウンによる OC-STAMP の発現量低下は二次的な影響によるものと推察された。

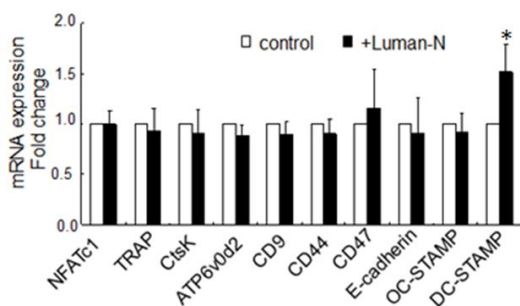


図 3 : Luman を過剰発現させた骨髄マクロファージにおける破骨細胞分化関連遺伝子の発現量解析。骨髄マクロファージに対し転写因子として機能する活性型 Luman を遺伝子導入し、破骨細胞の分化時に発現誘導される遺伝子の発現パターンを Real-time PCR で解析した。Luman の導入によって DC-STAMP の発現量が有意に上昇する。

Luman が DC-STAMP の発現を調節する可能性が考えられたため、Luman による DC-STAMP の発現制御メカニズムを解析した。Luman は転写因子として機能することが知られているため、DC-STAMP 遺伝子のプロモーター領域を用いてプロモーターアッセイを行った。マウス DC-STAMP プロモーター領域のおよそ 200bp をクローニングし、ホタルルシフェラーゼ遺伝子上流領域

につなぎ、DC-STAMP プロモーターによってドライブされるレポーターコンストラクトを作成した。DC-STAMP プロモーター領域について転写因子結合サイトのモチーフサーチを行ったところ、プロモーター領域およそ 200bp 内に、Luman が結合すると推定される cyclicAMP response element (CRE) 配列が 2 か所存在することが分かった。

マウスマクロファージ系細胞株 RAW264 細胞に対し、DC-STAMP プロモーターレポーターコンストラクトと Luman の発現プラスミドを遺伝子導入し、レポーター活性を測定したところ、コントロールプラスミド(MOCK)を同時導入した際のレポーター活性に比べて約 50 倍の活性上昇が見られた(図 4)。この結果から、Luman が DC-STAMP のプロモーター領域に作用して発現を調節していることが示唆された。

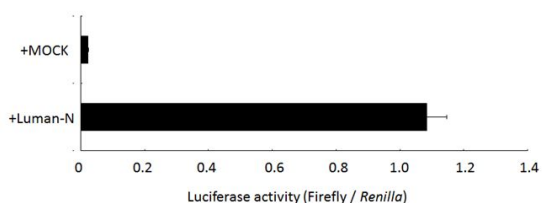


図 4 : DC-STAMP プロモーター領域を用いたプロモーターアッセイ。コントロール(MOCK)に比べて Luman の導入によって DC-STAMP のプロモーター活性が約 50 倍上昇する。

Luman は DC-STAMP と相互作用することが以前に報告されている。そこで、Luman と DC-STAMP の相互作用の様式、および意義について詳細に検討した。ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞に対し、Luman および DC-STAMP の発現プラスミドを遺伝子導入した後、細胞溶解液を回収し、免疫沈降実験を行った。その結果、Luman と DC-STAMP が結合することを確認した。そこで、Luman が DC-STAMP 分子内のどの領域に結合するか明らかにするために、様々な領域を欠失させた変異型 DC-STAMP を数種類デザインし、Luman との結合能を調べ、Luman が結合する領域をつきとめた。さらに、Luman と DC-STAMP の細胞内局在を調べたところ、両者を同時に HeLa 細胞へ遺伝子導入すると、小胞体に加えてゴルジ体へ局在することが分かった(図 5 A 上段)。次に、Luman が結合する領域を欠失させた変異型 DC-STAMP と Luman を同時に遺伝子導入すると、Luman の細胞内局在は小胞体のみにとどまることが分かった(図 5 A 下段、図 5 B 下段)。そして、Luman と結合できない変異型 DC-STAMP はプロテアソーム系で速やかに分解されることが示唆された(図 5 A 下段、図 5 B 下段)。以上の結果は、Luman が DC-STAMP と結合し、DC-STAMP の発現安定性に関わり、さらに両者の結合が、ゴルジ体への局在に重要であることを示している。

図5 A (MG132 未処理)

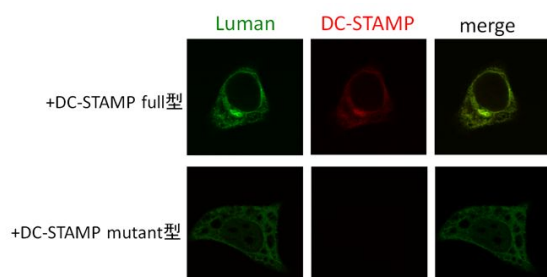


図5 B (MG132 処理)

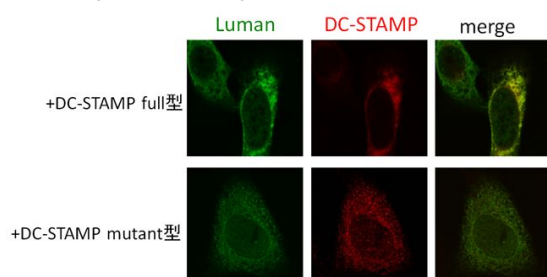


図5 : Luman および DC-STAMP の細胞内局在解析 .野生型あるいは変異型 DC-STAMP と Luman を HeLa 細胞へ遺伝子導入し、免疫染色法により両者の局在を調べた。(A)野生型 DC-STAMP と Luman の導入細胞(上段)では、プロテアソーム阻害剤を作用させなくても安定的に発現する。また、局在パターンは細胞質に網目状に局在する小胞体パターンを示すとともに、核周辺に集積したゴルジ体パターンを示す。変異型 DC-STAMP と Luman の導入細胞(下段)では、変異型 DC-STAMP のシグナルは観察されない。Luman の局在は網目状の小胞体パターンのみである。(B)プロテアソーム阻害剤 MG132 を作用させると、変異型 DC-STAMP の発現が観察される(下段)。

「得られた成果のインパクト」

本研究により、通常小胞体膜上に局在している分子 Luman が破骨細胞分化時に活性化されて転写因子として機能するとともに、破骨細胞の細胞融合に必須のタンパク質である DC-STAMP の安定性に寄与し、さらに DC-STAMP のゴルジ体へのソーティングにも関与することが明らかとなった。

このことから、破骨細胞の分化・機能制御に小胞体から発信されるシグナルが重要であることが示された。

「今後の展望」

今回、培養細胞系において小胞体膜局在転写因子 Luman が破骨細胞の分化、特に多核化形成に重要な機能を果たしていることを明らかにした。今後は、生体内においても同様に Luman が破骨細胞の分化および機能の制御に関与しているか明らかにするために、Luman ノックアウトマウスを作成し *in vivo* レベルで検討を進める予定である。

<引用文献>

Eleveld-Trancikova D, et al. DC-STAMP interacts with ER-resident transcription factor LUMAN which becomes activated during DC maturation. *Mol Immunol*, vol. 47, 2010, pp1963-1973.

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5件)

1. **Kanemoto S.** : Targeting the endoplasmic reticulum in prion disease treatment: breakthroughs and challenges. *Research and Reports in Biochemistry*, 査読有, Vol. 5, 2015, pp31-38,.
2. Hino K, Saito A, Kido M, **Kanemoto S.**, Asada R, Takai T, Cui M, Cui X, Imaizumi K. : Master Regulator for Chondrogenesis, Sox9, Regulates Transcriptional Activation of the ER Stress Transducer BBF2H7/CREB3L2 in Chondrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 査読有, Vol. 289, 2014, pp13810-13820.
3. **Kanemoto S.**, Griffin J, Markham-Coultes K, Aubert I, Tandon A, George-Hyslop PS, Fraser PE. : Proliferation, differentiation and amyloid- β production in neural progenitor cells isolated from TgCRND8 mice. *Neuroscience.*, 査読有, Vol. 261, 2014, pp52-59.(doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.12.021.)
4. Hino K, Saito A, Asada R, **Kanemoto S.**, Imaizumi K. : Increased Susceptibility to Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in the Endoplasmic Reticulum Stress Transducer OASIS Deficient Mice. *PLoS One*, 査読有, Vol. 9, 2014, e88048.
5. Saito A, **Kanemoto S.**, Zhang Y, Asada R, Hino K, Imaizumi K. : Chondrocyte Proliferation Regulated by Secreted Luminal Domain of ER Stress Transducer BBF2H7/CREB3L2. *Molecular Cell*, 査読有, Vol. 53, 2014, pp1-13.

[学会発表](計5件)

1. **金本聡自**, 小林 泰浩, 山下 照仁, 宮本健史, 高橋 直之, 今泉和則. 小胞体膜局在転写因子 Luman による破骨細胞分化制御機構の解明, 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 15 日 18 日, 国立京都国際会館(京都府京都市)
2. **Soshi Kanemoto**, Yasuhiro Kobayashi,

Teruhito Yamashita, Takeshi Miyamoto, Naoyuki Takahashi, Kazunori Imaizumi. Luman, an ER membrane-bound transcription factor, is involved in osteoclastogenesis., 11th Meeting of Bone Biology Forum, 22-23 Aug 2014, 富士教育研修所(静岡県裾野市)

3. **金本聡自**、小林 泰浩、山下 照仁、宮本健史、高橋 直之、今泉和則 . 小胞体膜局在転写因子 Luman は破骨細胞分化制御に関与する、第 32 回日本骨代謝学会学術集会、2014 年 7 月 24 日 - 26 日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)
4. **Soshi Kanemoto**, Atsushi Saito, Yasuhiro Kobayashi, Teruhito Yamashita, Takeshi Miyamoto, Naoyuki Takahashi, Kazunori Imaizumi. Luman, an ER stress transducer, regulates osteoclastogenesis through the modulation of DC-STAMP expression., The 23rd ANZBMS Annual Scientific Meeting, 8-11 Sep 2013, Melbourne (Australia)
5. **金本聡自**、齋藤敦、小林 泰浩、山下 照仁、宮本健史、高橋 直之、今泉和則 . 小胞体膜ストレスセンサーLuman は破骨細胞分化制御に関与する、第 31 回日本骨代謝学会学術集会、2013 年 5 月 30 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/imaizumi/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

金本 聡自 (KANEMOTO SOSHI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：90611913