



Title	マクロファージ/破骨細胞系にみられるRab32/38陽性オルガネラの解析
Author(s)	野田, 和也
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61644
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

学位論文

マクロファージ/破骨細胞系にみられる
Rab32/38 陽性オルガネラの解析

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学フロンティアセンター先端口腔生物学教室

分子病態口腔科学専攻 (歯周病分子病態学)

野田 和也

(指導教官: 野田 健司 教授)

目次

第1章	序論	1
第2章	材料及び方法	3
2-1.	マウス骨髄細胞単離、破骨細胞培養	3
2-2.	プラスミド及びレンチウイルス精製	3
2-3.	インフェクションによる遺伝子導入	4
2-4.	DNAマイクロアレイ法による遺伝子発現解析	5
2-5.	リアルタイムPCR法によるRNA発現解析	5
2-6.	ウェスタンプロット法に用いる細胞抽出液の調整	5
2-7.	タンパク質定量	6
2-8.	ウェスタンプロット法	6
2-9.	免疫染色法及び顕微鏡観察	7
2-10.	蛍光ビーズ及び蛍光色素取り込みによるエンドサイトーシス解析	8
2-11.	電子顕微鏡による構造解析	8
第3章	結果	10
3-1.	アクチンリング内に集積するRabタンパク質の同定	10
3-2.	破骨細胞分化の過程でRab38が発現上昇する	10
3-3.	Rab32はマクロファージ及び破骨細胞で発現し、Rab38は破骨細胞に発現する	11
3-4.	Rab32は、GTP/GDP結合サイクルに応じてゴルジ体に局在する	12
3-5.	マクロファージではRab32陽性オルガネラはエンドサイトーシス経路で一部がRab7/LAMP1陽性になる	12
3-6.	破骨細胞の成熟によりRab32/38陽性オルガネラの大部分はリソソームと別の性質を示す	13
3-7.	マクロファージでRab32陽性オルガネラは様々なオルガネラを分解している	14
第4章	考察	17
第5章	謝辞	21
第6章	参考文献	22
第7章	図表	27

第1章 序論

ヒトは約200本の骨に支えられ、日々骨のリモデリングにより古い骨から新しい骨へと代謝されることにより、そのホメオスタシスが維持されている。すなわち、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスが一定に保たれることが重要であり、何らかの理由によりこのバランスが破綻すると様々な重大な疾患へと繋がることが知られている。例えば、破骨細胞の形成異常や機能障害により骨量が増加する疾患である大理石骨病や、逆に破骨細胞の機能亢進により骨量が減少する骨粗鬆症があげられる(1)。歯科の領域においても、重度歯周病において、炎症に惹起された破骨細胞の活動による歯槽骨吸収があげられる(2)。特に骨粗鬆症や歯周病は、多数の罹患者を認め、生活習慣病の一つとして数えられる。これらの疾患の病因論の理解及びその克服へのアプローチとして破骨細胞の機能について理解を深めることが重要であると考えられる。

破骨細胞は、血球幹細胞由来のマクロファージが分化融合を繰り返し形成された多核の巨細胞である(3)。マクロファージは、ファゴサイトーシスにより死んだ細胞や細菌、ウィルスなどを取り込み分解する貪食細胞として知られ、免疫系において重要な役割を担っている(4)。分化の過程では、Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) と Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) の二つのサイトカインが重要な役割を果たす(5)。破骨細胞は成熟すると、アクチンリング構造を形成し骨表面に緊密に結合し、骨吸収を行う(6)。アクチンリングに囲まれたエリアの膜構造は波打った特殊な構造をしており、波状縁と呼ばれる(7)。破骨細胞は、波状縁から様々なプロテアーゼや酸を分泌し、コラーゲンなどの有機質や骨基質を分解する。骨吸収により形成された凹んだ部位はハウシップ窩または吸収窩と呼ばれる(8)。メンブレントラフィックとは、膜に包み込まれた物質を輸送する機構のことであり、オルガネラの移動、オルガネラ間の小胞の輸送、小胞の分泌さらにオートファジー経路を総称したものである。これら破骨細胞分化及び骨吸収の過程で、オルガネラのダイナミックな移動、及びプロテアーゼを含んだ小胞の輸送、分泌すなわちメンブレントラフィックが関与していることが想定される。さらに、マクロファージにおいて細胞外部からファゴサイトーシスにより取り込まれたものは、エドサイトーシス経路を経てリソソームへ輸送される。以上の点からマクロファージ/破骨細胞系においてメンブレントラフィックが必要不可欠であると想像される。過去の報告において、微小管モータータンパクである細胞質ダイニンと結合し輸送を制御する Lissencephaly-1 (LIS1) が Pleckstrin homology domain containing family M member 1 (Plekhn1) や Rab7 と相互作用しリソソームの輸送

を制御することや、Rab3D が細胞質ダイニンの軽鎖の構成要素である T-complex testis-expressed-1 (Tctex-1) と相互作用し分泌小胞輸送を制御するという報告がある (9、10)。一方でその細部にわたる機構に関する報告は十分でなく、いまだ未知の部分が大きいのが現状である。

メンブレントラフィックのプロセスには、SNARE や ESCRT、Rab など様々な制御因子が関与している (11-13)。その中でも、Rab タンパク質は、Ras スーパーファミリーに属する低分子量 G タンパク質でありヒトでは約 60 種類存在する (14)。Rab タンパク質は、活性化型の GTP 結合型と不活性化型の GDP 結合型をサイクルすることで分子スイッチとして機能し、活性化型の時にエフェクタータンパク質と結合し、メンブレントラフィックやオルガネラの生合成、細胞接着など様々な機能発現をする (15)。また、不活性化型から活性化型への変換には Guanine nucleotide exchange factor (GEF) が機能し、活性化型から不活性化型への変換には GTPase-activating protein (GAP) が機能している (16)。それぞれの Rab タンパク質は、特定のオルガネラに局在し機能し、主なものとしては、Rab5 はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた物質の初期エンドソームへの輸送に働き、Rab7 は後期エンドソームからリソソームへの輸送を制御している (15、17)。

Rab タンパク質の破骨細胞への関わりについていくつか報告されている。例えば、リソソームの輸送を制御する Rab7 は波状縁の形成、骨吸収に関与し、分泌小胞の輸送を制御する Rab3D KO マウスにおいては、波状縁の形成異常、骨量増加が見られる。さらに Lysosome related organelle (以下、LRO と略す) や分泌小胞の輸送に関わる Rab27A が破骨細胞分化、吸収に関与する。等、報告されている (18-21)。しかしながら、破骨細胞におけるそれぞれの Rab タンパク質遺伝子発現そのものから始まり、その機能の解明はほとんどなされていないのが現状である。そこで本研究では、Rab タンパク質に注目することで、メンブレントラフィックという観点からマクロファージ及び破骨細胞の特徴を明らかにすることを目的とした。

第2章 材料および方法

2-1. マウス骨髄細胞単離、破骨細胞培養

本研究におけるすべての動物実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認を得て行った（承認番号：動歯-26-001-0）。

8週齢雄性野生型（WT）C57BL6Jマウス（日本SLC）より大腿骨及び脛骨を採取し、骨の両端を切断し、60 μg/ml カナマイシン（Wako）含有α-MEM with L-Glutamine and Phenol Red（Wako）で骨内を洗い、骨髄細胞を回収した。4°C 1,200 rpm で5分間遠心し、上清を取り除き、赤血球溶解バッファー（150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA [pH7.4]）を加え懸濁した。再度4°C 1,200 rpm で5分間遠心をし、骨髄細胞を単離した。

細胞は37°C 5%CO₂で培養した。培地は10% FBS（Biowest）添加α-MEMに60 μg/ml カナマイシンを加えたものを用いた。3.5 cm ディッシュに10% CMG14-12由来培養上清液含有培地2 mlを加え、回収した細胞を1.5×10⁶個播種した（22）。培養3日後に0.02% EDTAを用いマクロファージを回収し、目的のサイズのディッシュに播きかえた。破骨細胞は、マクロファージを5日もしくは6日間2% CMG14-12由来培養上清液および400 ng/ml GST-RANKLにて刺激を行い、分化誘導した。

2-2. プラスミド及びレンチウイルス精製

使用したプラスミドは表1に記した。

ベクターおよびPCR增幅断片を制限酵素で切断したものをベクター：インサート=1:1になるように調整し、2×ligation mix（Takara）を加え室温で10分間ライゲーションさせた。その後、DH5αコンピテントセルをライゲーションミックスに20 μl加え、氷上で30分間静置した後、42°C 30秒間のヒートショックを行った。再び氷上に2分間静置したものに100 μlのLB培地を加え37°Cで30分間培養し、再懸濁したものを全量LB-amp（Ampicillin Sodium: 100 μg/ml）（Wako）プレートにまき、37°Cで一晩培養した。翌日コロニーをピックアップしたものを1 mlのLB-amp溶液で37°C、一晩震盪した。アルカリ抽出法で大腸菌液から目的のプラスミドDNAを抽出した。大

腸菌液を 1.5 ml マイクロチューブに移し、4°Cで 15,000 rpm 1 分間遠心した。上清を取り除き、100 μ l の solution I (25 mM Tris-HCl (pH7.5)、0.1 mM EDTA (pH8.0)、5 mM スクロース)を加え、ボルテックスした後に、200 μ l の solution II (0.2M NaOH、1% SDS) を加え転倒混和し、さらに 150 μ l の solution III (3 M 酢酸カリウム、酢酸 115 ml/H₂O) を加え転倒混和後 15 μ l の TE-RNase (Invitrogen) を加え、氷上に 3 分間静置した。10 μ l のクロロホルム (Wako) を加えよく混和し、4°Cで 15,000 rpm 3 分間遠心した。上清を 1.5 ml マイクロチューブに移し、等量のイソプロパノール (Wako) を加え混和した後に、4°Cで 15,000 rpm 10 分間遠心した。上清を取り除き、1 ml の 70%エタノールでリンスし、乾燥させた後に 50 μ l の超純水で懸濁した。

プラスミド DNA をトランスフェクションに用いる場合、150 μ l の超純水、200 μ l の 5 M NaCl、45 μ l の SiO₂ ソリューション (6 g の Silicon dioxide (Sigma) を 50 ml の超純水に懸濁しオートクレーブ) を加え、ROTATOR (TAITEC) で 15 分間転倒混和した。5,000 rpm 20 秒間遠心し、500 μ l の 70%エタノールで 2 回リンスした後に 50 μ l の超純水を加えボルテックスし、15,000 rpm 1 分間遠心し上清を回収した。さらに、140 μ l の solution III とイソプロパノール 600 μ l を加え、4°Cで 15,000 rpm 10 分間遠心し、上清を取り除き 1 ml の 70%エタノールでリンスし、乾燥させた後に 100 μ l の超純水で懸濁し、トランスフェクションに用いた。

レンチウィルス回収のために、Plat-E を用いた。Plat-E は、37°C 5%CO₂ で培養し、培地は 10% FBS (Gibco) 添加 D-MEM (High Glucose) with L-Glutamine and Phenol Red (Wako) に 1%penicillin/streptomycin (P/S) を加えたものを用いた。3.5 cm ディッシュは、1 ml の 0.01%poly L-Lysine (Sigma) でコーティングをし、5 分間室温で静置後 1 ml の超純水でウォッシュした後、乾燥したものを用いた。3.5 cm ディッシュに 1 ml の培地を加え、そこに Plat-E 細胞懸濁液を滴下し 37°Cで一晩培養した。翌日、プラスミド DNA 1 μ g、VSVG プラスミド DNA 1 μ g、Polyethylenimine (1 mg/ml) (MW 25,000 ; Polysciences) 8 μ l、Opti-MEM (Gibco) 200 μ l を混和し、室温で 20 分間静置した後に、ディッシュに滴下した。37°Cで一晩培養後、培地を取り除き、60 μ g/ml カナマイシン、10% FBS (biowest) 添加 α -MEM 1.5 ml を加え、トランスフェクション後 48 時間および 72 時間の 2 回レンチウィルスを回収した。

2-3. インフェクションによる遺伝子導入

マクロファージに遺伝子導入する場合、培養 2 日目に 3.5 cm ディッシュに対して 400 μ l のレンチウイルスを最終濃度 10 μ g/ml の Polybrane (Sigma) と共に 3 時間培養した。細胞選抜を行う場合は、一晩培養した後、最終濃度 2 μ g/ml の Puromycin (Sigma) を添加した。さらに 3 日間培養し、培地交換を行い、細胞が十分に増殖するまで培養した。

2-4. DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現解析

培養細胞から全遺伝子の抽出は、QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) を用いた。RNA 精製及び DNA マイクロアレイ解析は、大阪大学微生物病研究所感染症 DNA チップ開発センターに委託した。なお、DNA マイクロアレイ解析キットには Whole Mouse Genome DNA マイクロアレイ 4×44K Ver.2.0 (G4846A) (Agilent Technologies) を使用し、プレートスキャナには Agilent Microarray scanner G2505C を用い、スポットの数値化には Feature extraction software (Version10.7.3.1) を用い測定した。

2-5. リアルタイム PCR 法による RNA 発現解析

培養細胞からの全 RNA の抽出は、TRIsure (BIOLINE) を用いた。抽出した RNA を鑄型として、iScriptTM cDNA Synthesis Kit (Bio Rad) を用いて逆転写反応を行い、相補鎖 DNA (以下、cDNA と略す) を作製した。

Real-time PCR 法による解析は、cDNA を鑄型として、表 2 に示す各遺伝子特異的な Real-time PCR 用プライマー (Sigma) を用いて行った。PCR 反応は QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen) を用いて、StepOnePlus Real-time PCR System (Applied Biosystems) にて行った。なお各遺伝子の定量は GAPDH を内在性のコントロール遺伝子として用いて、同遺伝子の発現量に対する相対量として算出した。

2-6. ウェスタンプロット法に用いる細胞抽出液の調整

マクロファージは、6 cm ディッシュで培養し、細胞抽出液を回収した。ディッシュ上の細胞を PBS (137 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na₂HPO₄、1.76 mM KH₂PO₄、(pH7.4)) で 3 回洗浄した後、PBS を 1 ml 加えてセルリフター (日本ジェネティクス) を用いて回収した。その細胞懸濁液を 1.5 ml マイクロチューブに移し、4°C で 3,000 rpm 3 分間遠心した。上清を取り除き回収した細胞に Lysis buffer (50 mM

TrisHCl (pH7.5)、150 mM NaCl、1 mM DDT、1% TritonX-100、Protease inhibitor cocktail (Roche)) を加えて懸濁した。氷温中に 20 分間静置後、4°Cで 15,000 rpm 10 分間遠心した上清を 6×SDS サンプルバッファー (300 mM Tris-HCl (pH6.8)、12% SDS、30% グリセロール、0.006% ブロモフェノールブルー、0.6 M 2-メルカプトエタノール) に懸濁して 3 分間ボイルした。

RANKL 刺激 3 日目及び 5 日目の細胞は、48 ウェルプレートで 3 日間もしくは 5 日間 RANKL 刺激を行い培養し、細胞抽出液を回収した。ウェル上の細胞を PBS で 1 回洗浄した後、80 μ l の 1×SDS サンプルバッファー (50 mM Tris-HCl (pH6.8)、2% SDS、5% グリセロール、0.001% ブロモフェノールブルー、0.1 M 2-メルカプトエタノール) を直接ウェルに加え、1-200 μ l Pipette Tip Natural (QSP) を用い細胞抽出液を回収し、隣のウェルに移し、さらにそのウェルの細胞抽出液の回収を行った。同様の作業を繰り返し、一度に計 16 ウェルの細胞抽出液を回収した。その後、1.5 ml マイクロチューブに移し、5 分間ボイルした。

2-7. タンパク質定量

サンプル 1 μ l を 20 μ l の solution 混合溶液 (Protein Assay Bicinchonitake kit (ナカライトスク)) とよく混和し、37°Cで 30 分間反応後タンパク量を測定した。標準タンパク質溶液として 0~1.0 μ g/ μ l の BSA 溶液を用いた。タンパク質量測定には NanoDrop-1000 (Thermo) を用い、562 nm の波長にて測定した。

2-8. ウェスタンプロット法

ボイルしたサンプルを 12.5%ポリアクリルアミドゲル、ランニングバッファー (25 mM Tris-HCl (pH8.3)、191 mM glycine、0.1% SDS) を用い、SDS-PAGE にて電気泳動を行った。次に、ブロッキング装置 (NA-150 : 日本エイドー) 中で、トランスファーバッファー (25 mM Tris-HCl (pH8.3)、192 mM glycine、20%メタノール) を用いて、PVDF 膜 (GE Healthcare) に転写した (100 V、130 mA、1 時間)。PVDF 膜は 5%スキムミルク (森永乳業) を含む PBS-T (3.2 mM Na₂HPO₄、0.5 mM KH₂PO₄、1.3 mM KCl、135 mM NaCl、0.05% Tween 20 (pH 7.4)) を用いて室温で 15 分間ブロッキング処理した。一次抗体を Can Get Signal (TOYOB0) Solution I で希釈した溶液と室温で 1 時間反応させた後に、PBS-T で 15 分間洗浄を行った。その後、二次

抗体を Can Get Signal Solution II で希釈した溶液と室温で 1 時間反応させた後、PBS-T で 15 分間洗浄を行った。洗浄後、ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を反応させ、Gene Gnome 5 (Syngene) を用いてバンドを検出した。各抗体の希釈倍率は以下に示す。一次抗体 anti-Rab32 rabbit (23) : 1/1000、anti-Rab38 rabbit (23) : 1/1000、anti-Cathepsin K mouse (Abcam) : 1/1000、anti- β -actin mouse (Sigma) : 1/10000、二次抗体 anti-rabbit IgG HRP (CST) : 1/2000、anti-mouse IgG HRP (Southern biotech) : 1/10000

2-9. 免疫染色法及び顕微鏡観察

24 ウェルプレートに 13 mm カバーガラスを乗せ、細胞の培養を行った。象牙切片上で培養する場合は、48 ウェルプレートに Dentin Slice, from Ivory, Thin Type (Wako) を乗せ、細胞の培養を行った。以下の蛍光プローブを用いる場合は、固定の 2 時間前に次の濃度でそれぞれ添加した。LysoTracker Red DND-99 (Thermo) : 1 μ M、LysoSensor Blue DND-167 (Thermo) : 4 μ M、MitoTracker Red CMXRos (Thermo) : 500 nM

また、Magic Red CatB (Immunochemistry Technology, LLC) : 1/520、Magic Red CatK (Immunochemistry Technology, LLC) : 1/520 に関しては固定の 30 分前に添加した。また、オルガネラの酸性化を阻害する場合、固定の 24 時間前に Bafilomycin A1 (TORONTO RESEARCH CHEMICALS) : 50 nM もしくは、Concanamycin A1 (Sigma) : 20 nM を上記濃度で培地中に添加した。

細胞は、4% Paraformaldehyde (ナカライトスク) /PBS を加え、室温で 20 分間静置した。PBS で 3 回洗浄し、0.3% TritonX-100/PBS を用い室温で 2 分間透過処理し、ブロッキングバッファー (1% BSA、0.1% TritonX-100/PBS) で 3 回洗浄後、ブロッキングバッファー中に室温で 1 時間静置した。次に、ブロッキングバッファーで希釈した一次抗体と 4°C で一晩反応させた。0.02% TritonX-100/PBS で 3 回洗浄した後、ブロッキングバッファーで希釈した二次抗体と室温で 1 時間反応させ、0.02% TritonX-100/PBS で 3 回洗浄した。アクチン染色を行う場合、0.02% TritonX-100/PBS で 1/625 に希釈した Acti-stain 555 (Cytoskeleton, Inc) と 30 分間室温で反応させた。その後 0.02% TritonX-100/PBS で 3 回洗浄し、1/500 に希釈した DAPI (Sigma) を添加した Slow Fade (Invitrogen) を用いて、カバーガラスをスライドガラスに封入した。象牙切片の観察の場合、直径 8 mm の穴を開けた厚さ 200 μ m HEAT SHRINKING

PLA-PLATE (TAMIYA) をスライドガラスに接着し、内部に象牙切片を置き、DAPI (Sigma) を添加した Slow Fade (Invitrogen) を滴下した。カバーガラスで上部を封鎖し、共焦点レーザー顕微鏡 TSC SP8 (Leica) で観察した。対物レンズは HC PL APO CS2 63×1.40 OIL (Leica) を使用した。

各抗体の希釈倍率は以下に示す。一次抗体 anti-GM130 mouse (BD Bioscience) : 1/200、anti-LAMP1 rat (Santa Cruz: 1D4B) 1/200、anti-LAMP2 rat (DSHB) 1/100、anti-Rab32 rabbit (23) : 1/250、anti-Rab38 rabbit (23) : 1/250、anti-TOM20 mouse (Sigma) : 1/50、anti-EEA-1 rabbit (Cell Signaling) : 1/50、anti-Cathepsin K mouse (Abcam) : 1/50、anti-TRAP mouse (Santa Cruz) 1/50、二次抗体 anti-Alexa Fluor 488 anti-rabbit (Thermo)、anti-Alexa Fluor 568 anti-rabbit (Thermo)、anti-Alexa Fluor 568 anti-mouse (Thermo)、anti-Alexa Fluor 594 anti-rat (Thermo) : 1/5000

2-1-0. 蛍光ビーズ及び蛍光色素取り込みによるエンドサイトーシス解析

24 ウェルプレートに 13 mm カバーガラスを乗せ、細胞の培養を行った。蛍光ビーズを用いる場合は、固定前のそれぞれのタイムポイントで培地中に蛍光ビーズ : FluoSpheres Sulfate microspheres 1.0 μ m blue fluorescent (365/415) 2% Solids (Thermo) : 1/5000 を添加した。固定後、Slow Fade を用いて、カバーガラスをスライドガラスに封入し、共焦点レーザー顕微鏡 TSC SP8 (Leica) で観察した。蛍光色素デキストランに関しては、培地中に以下の濃度で添加し、固定後蛍光ビーズと同様に封入し、共焦点レーザー顕微鏡 TSC SP8 (Leica) で観察した。Dextran, Tetramethylrhodamine, 10,000 MW, Anionic, Fixable (Thermo) : 0.25 mg/ml

2-1-1. 電子顕微鏡による構造解析

3.5 cm グリッド付きガラスボトムディッシュ (MatTek) を用い細胞の培養を行つた。培地を除去し、PBS で 2 回洗浄後、4% Formaldehyde, methanol free, ultra pure (Polyscience, Inc) /0.1 M Phosphate buffer (19 mM NaH₂PO₄ · H₂O、81 mM Na₂HPO₄ · 7H₂O (pH7.4)) を用い 20 分間室温で固定した。その後、4% スクロース含有 0.1 M Phosphate buffer を用い、5 分間計 3 回ディッシュを洗浄した。次に、共焦点レーザー顕微鏡 TSC SP8 (Leica) で観察を行い、目的の細胞を撮影し、細胞が位置する番号を記録した。

次に、2.5% Glutaraldehyde で 60 分間前固定を行い、4% スクロース含有 0.1 M

Phosphate buffer で洗浄した後、1% Osmium tetroxide と 1.5% Potassium ferrocyanide 含有 0.1 M Sodium-phosphate buffer (pH7.4) で 60 分間後固定を行い、超純水で洗浄した。さらに、上昇アルコール系列で脱水を行い、EPON812 (TAABCO) を満たした直径 8 mm のプラスチックカップに樹脂包埋した。その後、80 nm の超薄切片に切り出し、Uranyl acetate と Citrate solution に浸したのち、超純水で洗浄し、電子染色を行った。撮影は、透過型電子顕微鏡 JEM-1011 (JEOL)、Olympus Veleta CCD カメラ (Olympus) を用い 80 kV で行った。なお、切片作成および電子顕微鏡観察は大阪大学微生物病研究所中央実験室に委託した。

第3章 結果

3-1. アクチンリング内に集積する Rab タンパク質の同定

8週齢雄性野生型マウスから採取した血球幹細胞由来のマクロファージに全55種類の GFP-Rab1-42 をそれぞれレトロウィルスベクターで遺伝子導入し安定発現させ、共焦点蛍光顕微鏡を用いて、マクロファージにおける GFP-Rab の局在性を観察した（図1）。図1にはガラス上の培養における全55種の GFP-Rab の局在性を示す。エンドソーム系オルガネラに局在する Rab4、Rab5、Rab7、Rab22 や Rab39、分泌小胞に局在する Rab3、Rab26 と Rab37 さらにリソソーム関連オルガネラに局在する Rab27、Rab32、Rab38 さらには局在に関する報告が少ない Rab42 がリング状の局在パターンを示した。その中でもリソソーム関連オルガネラに局在する Rab タンパク質は総じて、一部大きな小胞状の局在を示した。RANKL 刺激により破骨細胞に分化誘導を行い、破骨細胞での局在を観察したが、マクロファージと局在性が大きく変化する Rab タンパク質は認めなかった。

一方でガラス上での培養では、吸収窩が形成されない。そこで、破骨細胞の骨吸収において機能する可能性のある Rab タンパク質を抽出することを念頭に、象牙切片上の培養においてアクチンリング内に集積する Rab タンパク質に着目した（図2）。大部分の Rab タンパク質は、アクチンリング外に局在したが、Rab7、Rab9A、Rab13、Rab32、Rab35 及び Rab38 がアクチンリング内に集積する様子が観察された。

3-2. 破骨細胞分化の過程で Rab38 が発現上昇する

次にマウスから採取した血球幹細胞由来のマクロファージを RANKL 刺激により破骨細胞に分化誘導を行った。RANKL 刺激前のマクロファージ及び RANKL 刺激 6 日目の細胞由来の mRNA を回収し、DNA マイクロアレイ法にて全遺伝子の発現を比較した。内部標準である GAPDH や β -アクチンは分化の過程で発現量が大きく変化しなかつた一方で、破骨細胞分化にともない発現上昇することが知られている Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) やカテプシン K (CatK)、Dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP)、Calcitonin receptor (CTR) は、破骨細胞分化過程での発現上昇率と破骨細胞での発現量が極めて高い値を示すことが実際に確認された（図3-A）（24）。Rab タンパク質遺伝子の発現に着目すると、多くの Rab タンパク質が発現していたが、特に Rab38 が他の Rab タンパク質に比較すると極

めて高い約40倍程度の発現上昇率を示し、破骨細胞での発現量も大きな値を示した(図4-A、B)。他には、Rab1A、Rab7、Rab14等が破骨細胞で高い発現量を示した。一方で、メラノサイトなどの研究からRab38の機能的ホモログとされるRab32は、破骨細胞で高い発現量を認めたものの、分化の過程で発現量が約0.3倍程度に減少した。Real-time PCR法により、カテプシンK、CTR、Rab32とRab38のmRNA発現レベルを個別に確認するとDNAマイクロアレイ法の結果同様の傾向を示し、Rab38は48倍に発現量が上昇し、Rab32は約半分に低下した(図3-B、4-C)。また、Rab32及びRab38のエフェクタータンパク質としてVarpとMyosin Vcが報告されているが、Varpの発現量は分化過程で顕著な変化は認めず、Myosin Vcは発現を認めなかった(25、26)。すなわち、マクロファージ/破骨細胞系では、既知のエフェクタータンパク質以外に重要な働きを示すタンパク質が存在する可能性がある。以上の結果からRab32及びRab38(以下、Rab32/38と略す)のマクロファージ及び破骨細胞における役割の解析を進めることとした。

3-3. Rab32はマクロファージ及び破骨細胞で発現し、Rab38は破骨細胞に発現する

はじめに、RANKL刺激前後での内在性のRab32/38のタンパク質発現をそれぞれの特異抗体を用いウェスタンプロット法にて検討した(図5)。その結果、mRNAと同様にRab32はRANKL刺激の有無にかかわらず発現していたが刺激後は若干減少し、一方、Rab38はRANKL刺激前には発現が確認されず、刺激により発現が誘導された。その発現上昇は、カテプシンKは3日目で十分に上昇するのに対し、Rab38は3日目で上昇が見られるが、5日目までさらに上昇した。蛍光抗体法でそれらの局在性を調べると、内在性Rab32は点状、リング状構造を示した(図6)。これは主にマクロファージに相当する単核細胞及び分化の進行した破骨細胞に相当する多核細胞で同様であったが、多核細胞の方が発現は弱かった。内在性のRab38は、マクロファージで発現していないことと呼応し、局在は観察されなかった。一方で多核の破骨細胞では点状、リング状構造の局在が観察されたものの、単核破骨細胞では局在は観察されなかった。つづいて、GFP-Rab32とGFP-Rab38の細胞内の局在性を改めて詳細に検討した。マクロファージにGFP-Rab32/38を遺伝子導入し、RANKL刺激により破骨細胞に分化誘導を行い、GFP-Rab32/38の局在性を共焦点蛍光顕微鏡で観察を行った(図7)。ガラス上で培養するとGFP-Rab32とGFP-Rab38は共に点状及びリング状の局在パターンを示した。また、象牙切片上で培養を行った場合も、同様に点状及びリング状の局在を

示し、さらに、多核となった破骨細胞ではシグナルがアクチングリング内へ一様に集積が見られた（図 8）。GFP-Rab32 と内在性 Rab38 は破骨細胞において大部分が共局在を示したが、一部 Rab38 のみ陽性の構造も存在した（図 9）。同様に GFP-Rab38 と内在性 Rab32 は破骨細胞で大部分が共局在を示した。以上のことから、Rab32 はマクロファージ及び破骨細胞で、Rab38 は分化の進んだ破骨細胞で、何らかのオルガネラに局在することが分かった。

3-4. Rab32 は、GTP/GDP 結合サイクルに応じてゴルジ体に局在する

そこで、Rab32/38 と様々なオルガネラとの局在性の検討を行った。まず、マクロファージにおいて、GFP-Rab32 の一部はゴルジ体のマーカーである GM130 と共に局在を示した（図 10-A）。一方破骨細胞では、その共局在はあまり顕著ではなかった（図 10-B）。Rab32 の GTP 結合型である恒常的活性化型変異体 GFP-Rab32QL と GDP 結合型である恒常的不活性化型変異体 GFP-Rab32TN をマクロファージに遺伝子導入し、マクロファージ及び破骨細胞における局在性を観察した（図 11、12）。その結果、GFP-Rab32QL はマクロファージ、破骨細胞において野生型と同様の点状、リング状構造の局在性を示したものの、ゴルジ体局在は減弱した。一方で GFP-Rab32TN は、マクロファージ、破骨細胞共に細胞質中の点状、リング状構造が消滅し、核近傍のゴルジ体局在のみ示した。すなわち、Rab32 は GDP 型のときゴルジ体に局在し、GTP 型のときその他の局在を示し、それらの間をサイクルしていると考えられる。

3-5. マクロファージでは Rab32 陽性オルガネラはエンドサイトーシス経路で一部が Rab7/LAMP1 陽性になる

マクロファージにおける Rab32 陽性オルガネラとリソソームの関係性を検討するために、GFP-Rab32 とリソソームマーカーである LAMP1、LAMP2 との局在性を免疫抗体染色法にて観察した結果、LAMP1 及び LAMP2 陽性のリソソームの他に点状リング状の GFP-Rab32 陽性オルガネラがあり、そのうち一部に LAMP1 及び LAMP2 が局在した（図 13）。また、別のリソソームマーカー GFP-Rab7 もしくは RFP-LAMP1 を遺伝子導入したマクロファージと内在性の Rab32 との局在性を観察した（図 14）。その結果、GFP-Rab7 や RFP-LAMP1 と Rab32 は一部共局在を示したものの、Rab32 の多くは別の点状リング状構造として共局在を示さなかった。

次に Rab32 陽性オルガネラとエンドサイトーシス経路との関わりを検討した。マク

ロファージにおいて培地中に蛍光ビーズを添加しファゴサイトーシスにより細胞中に取り込ませ、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。蛍光ビーズは時間経過に従い初期エンドソーム、後期エンドソームの順に運ばれ、最終的には分解を受けずにリソソームに蓄積する。期待通り、エンドサイトーシスの経路を構成する初期エンドソームのマーカーRab5や後期エンドソームのマーカーRab7、リソソームのマーカーであるLAMP1内部に蛍光ビーズが局在したが、それに加えて、蛍光ビーズがGFP-Rab32陽性オルガネラ内部にも局在する様子が観察された（図15-A）。同様に、蛍光色素デキストランを添加し液相のエンドサイトーシスを観察する実験を行った場合においても、GFP-Rab32陽性オルガネラ内部にデキストランが局在した（図15-B）。Rab7内部のデキストランは明瞭な輝点ないしはリング状の局在を示すが、Rab32内部に局在するデキストランは、境界不明瞭な輝点がいくつか認め全体的に拡散した局在を示した。これらのことから、マクロファージにおいて、Rab32はエンドサイトーシス経路と関わりがあるオルガネラに位置することが示された。次に、各オルガネラマーカー陽性のオルガネラごとにその内部に局在する蛍光ビーズの割合の変化を調べた（図16）。その結果、蛍光ビーズ添加3時間まではGFP-Rab32内部に局在する蛍光ビーズの割合は、GFP-Rab7やRFP-LAMP1に局在する蛍光ビーズの割合と同様に上昇することが分かった。さらに培養時間を延長すると、取り込まれた蛍光ビーズのほぼ全てがGFP-Rab7及びRFP-LAMP1陽性となった。しかし、GFP-Rab32陽性の蛍光ビーズの割合は、3時間以降減少し、最終的に20%以下となった。このことから、Rab32は、Rab7/LAMP1陽性のオルガネラのごく一部である可能性が考えられた。マクロファージでRab38は発現していないが、GFP-Rab38でもGFP-Rab32同様の結果が得られた。

以上のことから、マクロファージにおいてRab32陽性オルガネラは、エンドサイトーシス経路で部分的にRab7/LAMP1陽性となることが示唆された。

3-6. 破骨細胞の成熟によりRab32/38陽性オルガネラの大部分はリソソームと別の性質を示す

次に、破骨細胞誘導後のRab32/38陽性オルガネラとリソソームの関係性を検討するために、GFP-Rab7を遺伝子導入した破骨細胞と内在性のRab32/38との局在性を観察した（図17）。その結果、GFP-Rab7とRab32/38は一部共局在したが、多くは共局在を示さなかった。さらに、マクロファージにGFP-Rab32/38とStrawberry(Str)-Rab7を二種類同時に遺伝子導入し、破骨細胞へ分化誘導しその局在性を観察すると、それぞれ陽性の構造があり、一部のみ共局在を示した（図18）。一方RFP-LAMP1と内在性

Rab32/38 は大部分が共局在を示した (図 19)。

続いて、RANKL 刺激開始時に蛍光ビーズを添加したのちに、破骨細胞へ分化誘導を行った (図 20)。その結果、ほぼ全ての蛍光ビーズが、Str-Rab7 と RFP-LAMP1 内部に局在を示したが、一部の蛍光ビーズが GFP-Rab32/38 陽性オルガネラ内部への局在を示したもの、大多数のサイズの大きい GFP-Rab32/38 陽性オルガネラは蛍光ビーズと共に局在しなかった。

さらに、リソームに局在し骨吸収の際、吸収窩に放出されるプロテアーゼであるカテプシン K の局在性を検討した。リソームに存在するカテプシン K の活性に応じてシグナルを発する Magic Red CatK を添加し局在を観察すると、RANKL 刺激後の単核細胞では、多くが GFP-Rab32/38 陽性オルガネラ内部に局在を認めたが、多核の破骨細胞においては大部分の GFP-Rab32/38 陽性オルガネラ内部には局在を認めなかった (図 21-A、B)。カテプシン K 抗体を用いて局在性を観察した結果、やはり多核の破骨細胞において GFP-Rab32/38 陽性オルガネラ内部にカテプシン K の局在が認められなかった (図 22)。また、Magic Red CatB を添加し局在を観察すると、Magic Red CatK の局在性と同様に RANKL 刺激後の単核細胞では、多くが GFP-Rab32/38 陽性オルガネラ内部に局在を認めた。多核の破骨細胞では一部の小さい GFP-Rab32/38 陽性オルガネラ内部に局在を示したが、大部分の GFP-Rab32/38 陽性オルガネラ内部に局在を示さなかった (図 23-A、B)。さらに、破骨細胞特異的なマーカー酵素である TRAP の局在性を観察すると同様に RANKL 刺激後の単核細胞で多くが GFP-Rab32/38 陽性オルガネラ内部に局在を認めた (図 24)。これらのことから、破骨細胞の成熟前の単核細胞では Rab32/38 陽性オルガネラは、カテプシン K やカテプシン B、TRAP を含むが、破骨細胞成熟過程でプロテアーゼが失われ、大部分がリソームとは別の存在である可能性が大いに示唆された。

以上のことから、破骨細胞が成熟するにつれて Rab32/38 陽性オルガネラの大部分は、最終的にリソームと別の性質を示すことが明らかとなった。

3-7. マクロファージで Rab32 陽性オルガネラは様々なオルガネラを分解している

マクロファージ及び破骨細胞において、初期エンドソームのマーカーである EEA-1 との局在性を観察した結果、GFP-Rab32/38 は共に共局在を示さなかった (図 25-A、B)。一方でマクロファージにおいて GFP-Rab32 陽性オルガネラ構造の内部に、別の初期エンドソームのマーカー Str-Rab5A が一部内包される様子が観察された (図 26)。ま

た、後期エンドソームのマーカーStr-Rab7が内包される像も観察された。さらにはミトコンドリアマーカーであるTOM20でさえもが一部内包されることが分かった。そこで、Correlative light and electron microscopy (CLEM)：光・電子相関顕微鏡法を用いてオルガネラ内部の微細構造を観察することとした。GFP-Rab32とStr-Rab5Aを同時に遺伝子導入したマクロファージにおいてGFP-Rab32内部にStr-Rab5Aが局在するオルガネラの構造を共焦点蛍光顕微鏡で観察し、その同一視野を透過型電子顕微鏡で観察した(図27)。その結果、一重膜構造の大きなRab32陽性オルガネラの内部に、明瞭な膜構造が認められない様々な密度のオルガネラが多数認められた。Str-Rab5A局在相当部は、矢印で示したように膜構造のはっきりしない構造物が認められ、さらに矢頭で示したラメラ状の典型的な後期エンドソーム構造物がRab32陽性オルガネラ内部に取り込まれている様子が観察された。以上の結果から、Rab32陽性オルガネラでは様々なオルガネラが取り込まれている可能性が示唆された。

次に、GFP-Rab32とStr-Rab5Aを同時に遺伝子導入したマクロファージをRANKL刺激により破骨細胞に分化誘導を行い、CLEMにてRab32陽性オルガネラ構造を観察した(図28)。その結果、多数の一重膜構造をとったRab32陽性オルガネラが観察された。マクロファージと異なり内部の密度は薄く空疎であり、矢印に示すように膜構造の残骸のような構造物が認められるのみであった。さらに、矢頭で示すGFP-Rab32内部にStr-Rab5Aが局在するオルガネラでは、オルガネラ内部の密度が高く多数の黒い点状構造物が認められた。

続いて、酸性オルガネラを染色するLysoTrackerやLysoSensorを添加しRab32陽性オルガネラの性質を検討した。GFP-Rab32を遺伝子導入したマクロファージにLysoTrackerもしくはLysoSensorを添加し、2時間後細胞を固定し、共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察した(図29、30)。その結果、Rab32陽性オルガネラ内部が染色され、酸性オルガネラの性質を持つことが示された。

そこで、V-ATPase阻害剤であるBafilomycin A1やConcanamycin A1を培地中に添加しオルガネラの酸性化を阻害した。その結果、V-ATPase阻害により蛍光顕微鏡の観察において、Rab32陽性オルガネラの数が増え、またオルガネラサイズが大きくなることが示された(図31、32)。また、ミトコンドリアマーカーTOM20が内部に局在するRab32陽性オルガネラは増加し、さらに別のミトコンドリアマーカーMitoTrackerも内部に局在を示すことが分かった(図33、34)。そこで、GFP-Rab32とStr-Rab5Aを同時に遺伝子導入したマクロファージにBafilomycin A1を24時間添加培養し、固定後Rab32陽性オルガネラ内部の構造を解析した(図35)。その結果、蛍光顕微鏡像に一致して、CLEM像で多数のRab32陽性オルガネラが認められた。矢印で示すよう

に一重膜構造のオルガネラ内部には、後期エンドソームを含む様々な形態を示す境界明瞭な膜構造を維持したオルガネラが多数認められ、しばしば多胞体構造がみられるオルガネラを認めた。中には、内包されているオルガネラ内部にさらに膜構造を維持した小胞が認められた。また、GFP-Rab32 内部の Str-Rab5A 局在相当部には矢頭で示した多数の黒い点状構造物が認められることが分かった。また、矢印で示した後期エンドソームが構造を維持した状態で Rab32 陽性オルガネラ内に認められた（図 36）。以上の結果から、Rab32 陽性オルガネラ内部では酸性化に依存して分解が行われていることが示された。

第4章 考察

本研究では、Rab タンパク質に注目することでマクロファージ及び破骨細胞の機能の理解を深めることを目指して、GFP-Rab の遺伝子導入によるその局在性の網羅的スクリーニング及び DNA マイクロアレイ法による全 Rab タンパク質遺伝子の発現を調べた。その結果、Rab38 が全 Rab タンパク質の中で破骨細胞分化時に最も高い発現上昇率を示したこと、さらに Rab38 及び Rab38 の機能的ホモログとして知られている Rab32 がアクチンリング内に集積したことから、Rab32/38 の解析を行った (27)。Rab32/38 は、メラノサイトなどでは特殊なオルガネラである LRO : リソソーム関連オルガネラに局在し、機能する Rab タンパク質として知られている (28)。LRO は、酸性の性質であることやリソソームタンパクを保持するなど既存のリソソームの性質を一部持ちながらも、細胞種特異的に特殊な機能を持つオルガネラのことである。主な LRO としては、色素細胞であるメラノサイト特異的なオルガネラであるメラソームや血小板にみられる血小板密顆粒、肺胞上皮細胞 II 型に存在するラメラ体などがあげられる (29)。破骨細胞においては、分泌型リソソームやリソソームが輸送され形成される波状縁が LRO との関連が指摘されている (30、31)。中でも最も解析が進んでいるメラノサイトでは、Rab32/38 がメラニン合成酵素の輸送を制御し、メラソームの成熟に関与し、*in vivo* に関する報告としては、自然発生の Rab38 点変異マウスであるチヨコレートマウス (*Rab38^{cht/cht} mice*) において、色素低下や出血時間延長の所見が報告されている (27、32、33)。また、ヒトのリソソームや LRO の機能障害により白皮症、出血傾向、肺纖維症などの症状を来す疾患として知られる Hermansky-Pudluk Syndrome の原因遺伝子である HPS がコードするタンパク質 Biogenesis of lysosome-related organelles complexes-3 (BLOC-3) が、Rab32/38 の GEF として機能している (34、35、36)。

メラノサイトでは、Rab32/38 は LRO に局在することで機能している。マクロファージで内在性 Rab32 や GFP-Rab32 は、共焦点蛍光顕微鏡像で特徴的な点状及びリング状構造を示し、GFP-Rab32 内部に、細胞に取り込ませた蛍光ビーズないし蛍光色素が局在したことから、Rab32 は膜構造を有するオルガネラに局在し、さらにリソソームタンパクである LAMP1 や LAMP2 が一部共局在を示し、LysoTracker や LysoSensor によりオルガネラ内部が染色され酸性オルガネラであることから、Rab32 陽性オルガネラは LRO の性質を持っていることが示された。すなわち Rab32 陽性オルガネラはマクロファージで機能する LRO に関する新規オルガネラであると考えられる (図 6、7、13、15、29、30)。またこの Rab32 陽性オルガネラは、エンドサイトーシス経路と関

わりがあることが示唆された。Rab32 陽性オルガネラ内部に局在する蛍光ビーズの割合を時間経過で観察すると、リソーム内部に局在するビーズの割合よりも増加ペースは遅れるものの 3 時間までは増加するが、さらに長時間観察すると、Rab32 陽性オルガネラ内部に局在するビーズの割合が減少し、最終的にはほぼ全ての蛍光ビーズを内包していたリソームとは異なる傾向を示すことが分かった（図 16）。以上のことから、Rab32 陽性オルガネラは、既知のリソームと関連するものの異なる働きをしている可能性が示唆された。

メラノサイトでは、Rab32 と Rab38 は重複して機能するとされている（27）。今回の結果から、マクロファージにおいては、Rab32 が主に発現することで機能し、破骨細胞において、Rab32 と Rab38 が一部共局在を示したことから重複している可能性が考えられるが、内在性 Rab38 陽性オルガネラに GFP-Rab32 が局在しない例も観察され、Rab38 がさらに特異的な機能を有する可能性も想定される（図 6、9）。特に Rab38 は RANKL 刺激後 6 日目まで発現上昇し、より後期に重要である可能性がある（図 5）。さらに分化の進行初期と考えられる単核細胞では Rab32/38 陽性オルガネラ中にカテプシン K やカテプシン B 及び TRAP が局在するが、より分化の進んだ多核の破骨細胞ではカテプシン K 及びカテプシン B は局在しないことから分化が進むことで既知のリソームとは相異なる分泌型小胞としてより特徴的な機能発現をするのかもしれない（図 21、22、23、24）。

また、Rab32 の一部はゴルジ体にも局在し、Rab32 恒常的不活性化型変異体である GFP-Rab32TN では、点状及びリング状構造の局在が消滅し、核近傍のゴルジ体局在のみ示したことから Rab32 は活性化型と不活性化型のサイクルにおいてゴルジ体と Rab32 陽性オルガネラを行き来していると考えられる（図 10、11、12）。このことはメラノサイトでも同様である（27）。また、蛍光顕微鏡像よりアクチングルーブ内に集積する様子が観察されたことから、破骨細胞において Rab32/38 陽性オルガネラは、最終的に波状縁に輸送されている可能性も考えられた（図 8）。カテプシン K が最終的に吸収窓に輸送されることもこの可能性を支持している。すなわち、Rab32/38 は、ゴルジ体から輸送され Rab32/38 陽性オルガネラを形成し、破骨細胞では波状縁へ輸送されている可能性が示唆された（図 37、38）。

それでは Rab32/38 陽性オルガネラの機能は何なのだろうか。今回の研究において、大変興味深いことに Rab32/38 陽性オルガネラ構造内部に初期エンドソーム、後期エンドソームさらにはミトコンドリアマーカーでさえもが内包される様子が観察された（図 26）。細胞内のオルガネラや物質をバルク的に分解するオートファジー現象において、オートファゴソーム内部に他のオルガネラが内包される様子が観察されることが知ら

れているが、このようにエンドソーム系のオルガネラが他のオルガネラ内部に局在する現象は非常に稀であると言える(37)。CLEMにより綿密に解析した結果、Rab32陽性オルガネラ内部に境界不明瞭な膜構造のオルガネラが多数認められ、後期エンドソームを含む様々なオルガネラが直接取り込まれている様子が観察され、Bafilomycin A1を添加しオルガネラの酸性化を阻害すると、Rab32陽性オルガネラ内部に膜構造を維持した多数のオルガネラの存在が観察されたことからRab32陽性オルガネラは様々なオルガネラを直接取り込み、内部では分解を行っていることが示された(図27、35、36)。この現象は、マクロオートファジー、すなわち一般的なオートファジー現象の可能性であることも考えられるが、Rab32陽性オルガネラ内部に様々なオルガネラが直接取り込まれていることや一重膜構造であることからミクロオートファジー現象の可能性がより高いと考えられる。このミクロオートファジー現象とは、リソソームへ直接物質を取り込み分解するシステムであり、酵母において例えペルオキシソームやミトコンドリアを分解する過程として知られている(38、39)。近年、オートファジーに関する報告は年数千報されているが、ミクロオートファジーに関する報告は年十数報しか見られない上に、哺乳類細胞に限るとその知見は極めて乏しく、その現象についてはほぼ未解明とも言える(40)。近年、マウス胚発生初期にみられる臓側内胚葉と呼ばれる細胞に存在する頂端液胞という特殊なオルガネラにおいて、ミクロオートファジー現象が起こっているという報告がされたが、その現象そのものや生理的意義のほとんどが解明されていない(41)。これらの点からも今回Rab32陽性オルガネラで発見された極めて稀な現象は、ミクロオートファジー現象の解明への足がかりになると考えている。その役割として、貪食細胞であるマクロファージは、エンドサイトーシスが活発に行われるため、通常のエンドサイトーシス経路によりリソソームへ運ぶのみでは細胞内に膜構造が増大する。これを防ぐために、ミクロオートファジーにより膜構造ごと取り込み分解を行い、膜量の恒常性の維持に働いている可能性が考えられる。また、破骨細胞では細胞中の不良オルガネラの分解に働いている可能性を考えている。それと同時に波状縁の形成にも寄与する可能性もある。

今回、見出したRab32/38陽性オルガネラは、マクロファージ/破骨細胞系における全く新規のLROの一種である可能性が高く、今後は、これらの機能を抑制することで破骨細胞の特有の機能である骨吸収能との関わりを含め、どのような表現型が現れるのか更なる解明が必要である。また、マクロファージ/破骨細胞系にみられるLRO、Rab32/38陽性オルガネラとミクロオートファジー現象の関わりについて解析していくことが必要である。それにより、ミクロオートファジー現象そのものの解明、さらにはRab32/38が関与するメンブレントラフィック制御機構の解明は、骨代謝が関与する様々な疾患治

療の新しいアプローチへとつながることが期待される。

第5章 謝辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と御高闇を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔科学フロンティアセンター先端口腔生物学教室、野田健司教授ならびに大阪大学大学院歯学研究科歯周病分子病態学講座、村上伸也教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の進行にあたり直接御指導ならびに御助言を頂きました伊藤敬先生に心より感謝申し上げます。

そして東北大学大学院生命科学研究科、福田光則教授には Rab32 及び Rab38 抗体、GFP-Rab1-42 と GFP-Rab32QL 及び GFP-Rab32TN、RFP-LAMP1、Str-Rab5A、Str-Rab7 のプラスミドの分与をはじめとした共同研究をして頂き感謝申し上げます。また、独立行政法人国立長寿医療研究センター運動器疾患研究部室長、竹下淳先生には CMG14-12 を分与して頂き感謝申し上げます。

今回、大阪大学微生物病研究所感染症 DNA チップ開発センター、奥崎大介助教には、DNA マイクロアレイの解析を行って頂き、また大阪大学微生物病研究所中央実験室、大森弘子様には CLEM 観察のための切片作成及び電子顕微鏡観察を行って頂きました。心より感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行に対して様々な御協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔科学フロンティアセンター先端口腔生物学教室の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

第 6 章 参考文献

1. Nakashima T, Hayashi M, Takayanagi H. New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms. *Trends Endocrinol Metab* 2012;23(11):582-90
2. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol* 2011;3:5304-19
3. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423(6937):337-42
4. Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 2000;113(Pt3):337-81
5. Stefater JA 3rd, Ren S, Lang RA, Duffield JS. Metchnikoff's policemen: macrophages in development, homeostasis and regeneration. *Trends Mol Med* 2011;17(12):743-52
6. Jurdic P, Saltel F, Chabadel A, Destaing O. Podosome and sealing zone: Specificity of the osteoclast model. *Eur J Cell Biol* 2006;85(3-4):195-202
7. Stenbeck G. Formation and function of the ruffled border in osteoclasts. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13(4):285-92
8. Teitelbaum SL. Bone Resorption by Osteoclasts. *Science* 2000;289(5484):1504-8
9. Pavlos NJ, Cheng TS, Qin A, Ng PY, Feng HT, Ang ES, Carrello A, Sung CH, Jahn R, Zheng MH, Xu J. Tctex-1, a Novel Interaction Partner of Rab3D, Is Required for Osteoclastic Bone Resorption. *Mol Cell Biol* 2011;31(7):1551-64
10. Ye S, Fowler TW, Pavlos NJ, Ng PY, Liang K, Feng Y, Zheng M, Kurten R, Manolagas SC, Zhao H. LIS1 Regulates Osteoclast Formation and Function through Its Interactions with Dynein/Dynactin and Plekhn1. *PLoS One* 2011;6(11):e27285
11. Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 1993;362(6418):318-24
12. Katzmann DJ, Babst M, Emr SD. Ubiquitin-Dependent Sorting into the

- Multivesicular Body Pathway Requires the Function of a Conserved Endosomal Protein Sorting Complex, ESCRT-I. *Cell* 2001; 106(2):145-55
- 1 3 . Touchot N, Chardin P, Tavitian A. Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(23):8210-4
- 1 4 . Pereira-Leal JB, Seabra MC. Evolution of the Rab Family of Small GTP-binding Proteins. *J Mol Biol* 2001;313(4):889-901
- 1 5 . Hutagalung AH, Novick PJ. Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology. *Physiol Rev* 2011;91(1):119-49
- 1 6 . Barr F, Lambright DG. Rab GEFs and GAPs. *Curr Opin Cell Biol* 2010;22(4):461-70
- 1 7 . Chavrier P, Parton RG, Hauri HP, Simons K, Zerial M. Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* 1990;62(2):317-29
- 1 8 . Pavlos NJ, Xu J, Riedel D, Yeoh JS, Teitelbaum SL, Papadimitriou JM, Jahn R, Ross FP, Zheng MH. Rab3D regulates a novel vesicular trafficking pathway that is required for osteoclastic bone resorption. *Mol Cell Biol* 2005;25(12):5253-69
- 1 9 . Zhao H, Laitala-Leinonen T, Parikka V, Väänänen HK. Downregulation of Small GTPase Rab7 Impairs Osteoclast Polarization and Bone Resorption. *J Biol Chem* 2001;276(42):39295-302
- 2 0 . Shimada-Sugawara M, Sakai E, Okamoto K, Fukuda M, Izumi T, Yoshida N, Tsukuba T. Rab27A Regulates Transport of Cell Surface Receptors Modulating Multinucleation and Lysosome-Related Organelles in Osteoclasts. *Sci Rep* 2015;5:9620
- 2 1 . Hirvonen MJ, Mulari MT, Büki KG, Vihko P, Häkkinen PL, Väänänen HK. Rab13 Is Upregulated During Osteoclast Differentiation and Associates with Small Vesicles Revealing Polarized Distribution in Resorbing Cells. *J Histochem Cytochem* 2012;60(7):537-49
- 2 2 . Takeshita S, Kaji K, Kudo A. Identification and Characterization of the New Osteoclast Progenitor with Macrophage Phenotypes Being Able to Differentiate into Mature Osteoclasts. *J Bone Miner Res*

- 2000;15(8):1477-88
- 2 3 . Ohbayashi N, Yatsu A, Tamura K, Fukuda M. The Rab21-GEF activity of Varp, but not its Rab32/38 effector function, is required for dendrite formation in melanocytes. *Mol Biol Cell* 2012;23(4):669-78
- 2 4 . Xing L, Xiu Y, Boyce BF. Osteoclast fusion and regulation by RANKL-dependent and independent factors. *World J Orthop* 2012;3(12):212-22
- 2 5 . Tamura K, Ohbayashi N, Maruta Y, Kanno E, Itoh T, Fukuda M. Varp Is a Novel Rab32/38-binding Protein That Regulates Tyrp1 Trafficking in Melanocytes. *Mol Biol Cell* 2009;20(12):2900-8
- 2 6 . Bultema JJ, Boyle JA, Malenke PB, Martin FE, Dell'Angelica EC, Cheney RE, Di Pietro SM. Myosin Vc Interacts with Rab32 and Rab38 Proteins and Works in the Biogenesis and Secretion of Melanosomes. *J Biol Chem* 2014;289(48):33513-28
- 2 7 . Wasmeier C, Romao M, Plowright L, Bennett DC, Raposo G, Seabra MC. Rab38 and Rab32 control post-Golgi trafficking of melanogenic enzymes. *J Cell Biol* 2006;175(2):271-81
- 2 8 . Cohen-Solal KA, Sood R, Marin Y, Crespo-Carbone SM, Sinsimer D, Martino JJ, Robbins C, Makalowska I, Trent J, Chen S. Identification and characterization of mouse Rab32 by mRNA and protein expression analysis. *Biochim Biophys Acta* 2003;1651(1-2):68-75
- 2 9 . Dell'Angelica EC, Mullins C, Caplan S, Bonifacino JS. Lysosome-related organelles. *FASEB J* 2000;14(10):1265-78
- 3 0 . Blott EJ, Griffiths GM. Secretory Lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(2):122-31
- 3 1 . Baron R, Neff L, Louvard D, Courtoy PJ. Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. *J Cell Biol* 1985;101(6):2210-22
- 3 2 . Loftus SK, Larson DM, Baxter LL, Antonellis A, Chen Y, Wu X, Jiang Y, Bittner M, Hammer JA 3rd, Pavan WJ. Mutation of melanosome protein RAB38 in chocolate mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(7):4471-6
- 3 3 . Anderson MG, Hawes NL, Trantow CM, Chang B, John SW. Iris

- phenotypes and pigment dispersion caused by genes influencing pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008;21(5):565-78
- 3 4 . Gerondopoulos A, Langemeyer L, Liang JR, Linford A, Barr FA. BLOC-3 mutated in Hermansky-Pudlak syndrome in a Rab32/38 guanine nucleotide exchange factor. *Curr Biol* 2012;22(22):2135-9
- 3 5 . Bultema JJ, Ambrosio AL, Burek CL, Di Pietro SM. BLOC-2, AP-3, and AP-1 Proteins Function in Concert with Rab38 and Rab32 Proteins to Mediate Protein Trafficking to Lysosome-related Organelles. *J Biol Chem* 2012;287(23):19550-63
- 3 6 . Erickson RP. Pigment, platelets, and Hermansky-Pudlak in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(17):8924-5
- 3 7 . Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011;27:107-32
- 3 8 . De Duve C, Wattiaux R. Functions of Lysosomes. *Annu Rev Physiol* 1966;28:435-92
- 3 9 . Kraft C, Reggiori F, Peter M. Selective types of autophagy in yeast. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793(9):1404-12
- 4 0 . Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* 2011;7(7):673-82
- 4 1 . Kawamura N, Sun-Wada GH, Aoyama M, Harada A, Takasuga S, Sasaki T, Wada Y. Delivery of endosomes to lysosomes via microautophagy in the visceral endoderm of mouse embryos. *Nat commun* 2012;3:1071
- 4 2 . Itoh T, Kanno E, Uemura T, Waguri S, Fukuda M. OATL1, a novel autophagosome-resident Rab33B-GAP, regulates autophagosomal maturation. *J Cell Biol* 2011;192(5):839-53
- 4 3 . Tsuboi T, Fukuda M. Rab3A and Rab27A cooperatively regulate the docking step of dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J Cell Sci* 2006;119(Pt 11):2196-203
- 4 4 . Matsui T, Itoh T, Fukuda M. Small GTPase Rab12 Regulates Constitutive Degradation of Transferrin Receptor. *Traffic* 2011;12(10):1432-43
- 4 5 . Itoh T, Satoh M, Kanno E, Fukuda M. Screening for target Rabs of TBC (Tre-2/Bub2/Cdc16) domain-containing proteins based on their Rab-binding activity. *Genes Cells* 2006;11(9):1023-37

4 6 . Kanno E, Ishibashi K, Kobayashi H, Matsui T, Ohbayashi N, Fukuda M. Comprehensive Screening for Novel Rab-Binding Proteins by GST Pull-Down Assay Using 60 Different Mammalian Rabs. *Traffic* 2010;11(4):491-507

第7章 図表

表1 本研究で使用したプラスミド

プラスミド	ベクター	インサート	制限酵素	Reference
pMRX-puro-EGFP	pMRX-IRES-puro		BamHI-NotI	42
pMRX-puro-EGFP-Rab1A	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab1A	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab1B	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab1B	BamHI-NotI	44
pMRX-puro-EGFP-Rab2A	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab2A	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab2B	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab2B	BamHI-NotI	44
pMRX-puro-EGFP-Rab3A	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab3A	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab3B	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab3B	BamHI-NotI	44
pMRX-puro-EGFP-Rab3C	pMRX-puro-EGFP	PCR fragment	BamHI-NotI	本研究
pMRX-puro-EGFP-Rab3D	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab3D	BamHI-NotI	44
pMRX-puro-EGFP-Rab4A	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab4A	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab4B	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab4B	BamHI-NotI	44
pMRX-puro-EGFP-Rab5A	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab5A	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab5B	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab5B	BamHI-NotI	44

pMRX-puro-EGFP-Rab5C	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab5C	BamHI-NotI	44
pMRX-puro-EGFP-Rab6A	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab6A	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab6B	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab6B	BamHI-NotI	44
pMRX-puro-EGFP-Rab7	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab7	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab8A	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab8A	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab8B	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab8B	BamHI-NotI	44
pMRX-puro-EGFP-Rab9A	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab9A	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab9B	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab9B	BamHI-NotI	44
pMRX-puro-EGFP-Rab10	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab10	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab11A	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab11A	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab11B	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab11B	BamHI-NotI	44
pMRX-puro-EGFP-Rab12	pMRX-puro-EGFP	PCR fragment	BamHI/BglII-NotI	本研究
pMRX-puro-EGFP-Rab13	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab13	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab14	pMRX-puro-EGFP	PCR fragment	BamHI-NotI	本研究
pMRX-puro-EGFP-Rab15	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab15	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab17	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab17	BamHI-NotI	43

pMRX-puro-EGFP-Rab18	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab18	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab19	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab19	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab20	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab20	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab21	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab21	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab22A	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab22A	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab22B	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab22B	BamHI-NotI	44
pMRX-puro-EGFP-Rab23	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab23	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab24	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab24	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab25	pMRX-puro-EGFP	PCR fragment	BamHI/BglII-NotI	本研究
pMRX-puro-EGFP-Rab26	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab26	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab27A	pMRX-puro-EGFP	PCR fragment	BamHI-NotI	本研究
pMRX-puro-EGFP-Rab27B	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab27B	BamHI-NotI	44
pMRX-puro-EGFP-Rab28	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab28	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab29	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab29	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab30	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab30	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab31	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab31	BamHI-NotI	43

pMRX-puro-EGFP-Rab32	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab32	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab33A	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab33A	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab33B	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab33B	BamHI-NotI	44
pMRX-puro-EGFP-Rab34	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab34	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab35	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab35	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab36	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab36	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab37	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab37	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab38	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab38	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab39A	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab39A	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab39B	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab39B	BamHI-NotI	44
pMRX-puro-EGFP-Rab40A	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab40A	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab40B	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab40B	BamHI-NotI	44
pMRX-puro-EGFP-Rab40C	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab40C	BamHI-NotI	44
pMRX-puro-EGFP-Rab41	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab41	BamHI-NotI	43
pMRX-puro-EGFP-Rab42	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab42	BamHI-NotI	44
pMRX-puro-EGFP-Rab32-QL	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab32-QL	BamHI-NotI	45

pMRX-puro-EGFP-Rab32-TN	pMRX-puro-EGFP	pEF-BOS-FLAG-Rab32-TN	BamHI-NotI	35
pMRX-puro-Lamp1-mRFP	pMRX-puro-mRFP	pEF-BOS-FLAG-Lamp1	BamHI-NotI	福田研
pMRX-bsr-mStr-Rab5A	pMRX-bsr-mStr	pEF-BOS-FLAG-Rab5A	BamHI-NotI	46
pMRX-puro-mStr-Rab7	pMRX-puro-mStr	pEF-BOS-FLAG-Rab7	BamHI-NotI	福田研

表2 本研究で使用した Real-time PCR 用プライマー

遺伝子	プライマー
<i>GAPDH</i>	5'-AAATGGTGAAGGTCGGTGTG-3' 5'-TGAAGGGTCGTTGATGG-3'
<i>CTSK</i>	5'-CAGCTTCCCCAAGATGTGAT-3' 5'-AGCACCAACGAGAGGGAGAAA-3'
<i>CTR</i>	5'-CGCATCCGCTTGAATGTG-3' 5'-TCTGTCTTCCCCAGGAAATGA-3'
<i>Rab32</i>	5'-TCGCCCTCAAAGTTCTCAAC-3' 5'-ATGTTGCCAAACCGTTCCCT-3'
<i>Rab38</i>	5'-CCAAAACTTCTCCTCGCACT-3' 5'-TCATGTTCCAAATCTTCTTGAC-3'

図 1-1

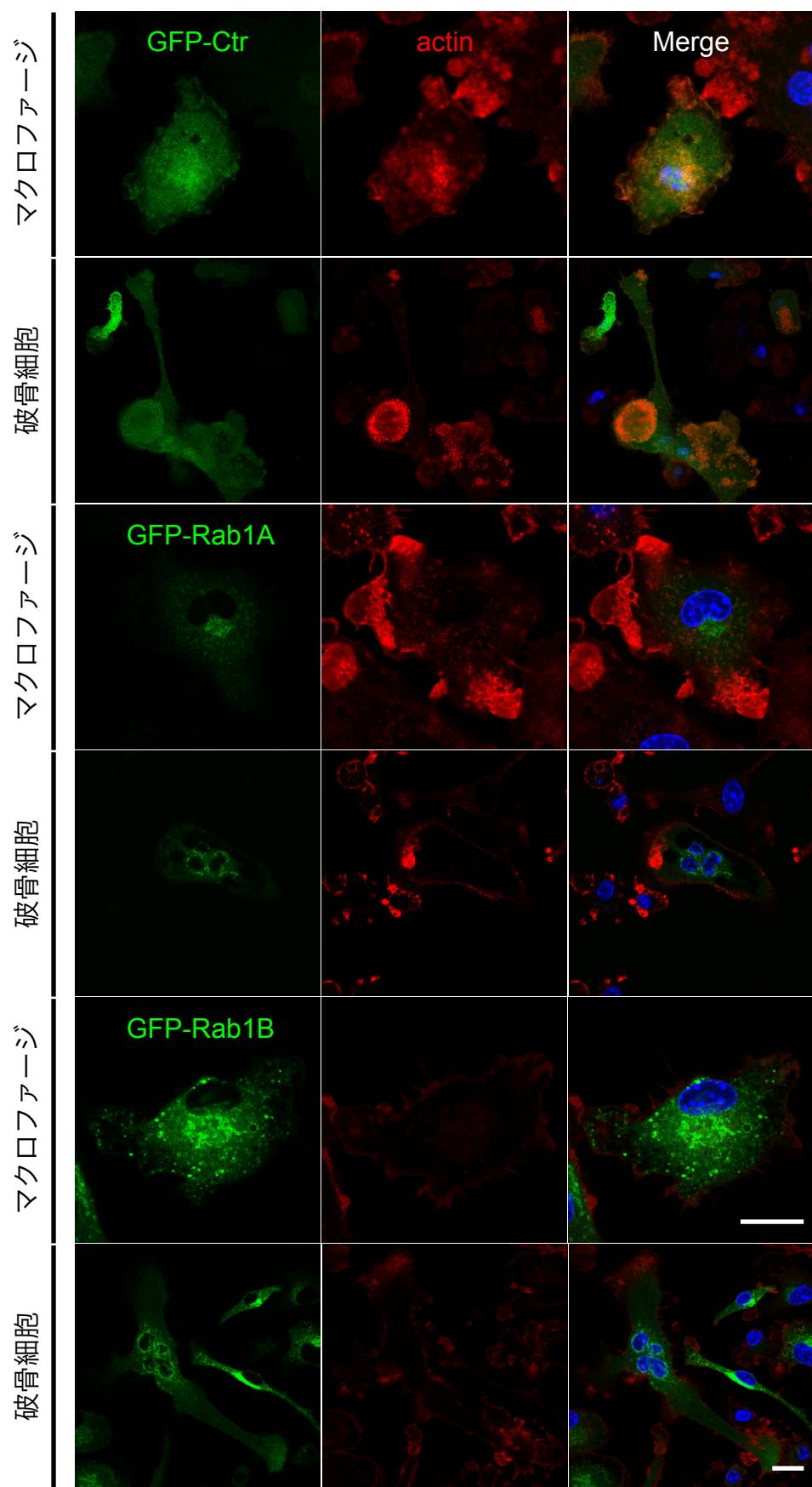


図 1-2

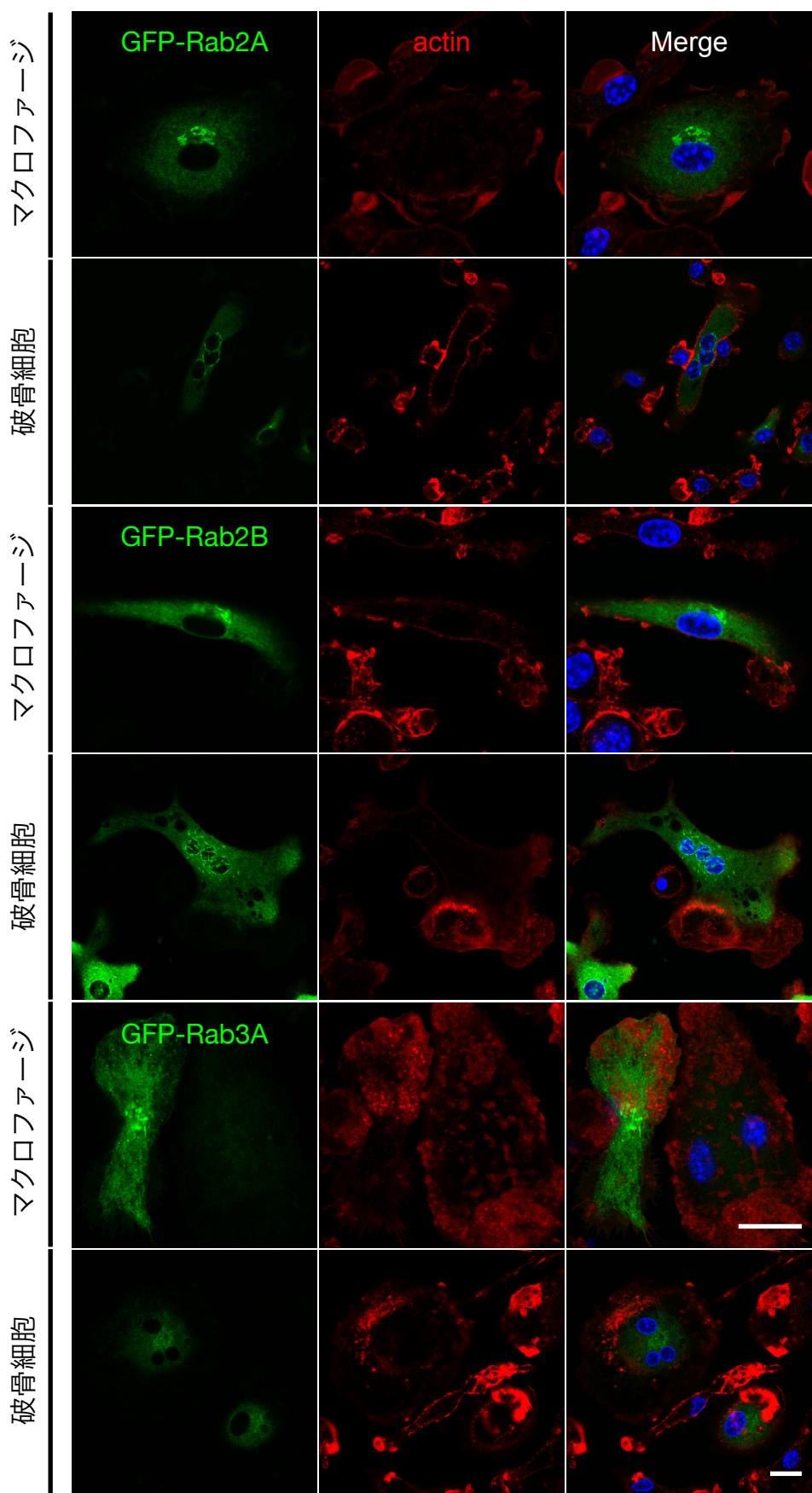


図 1-3

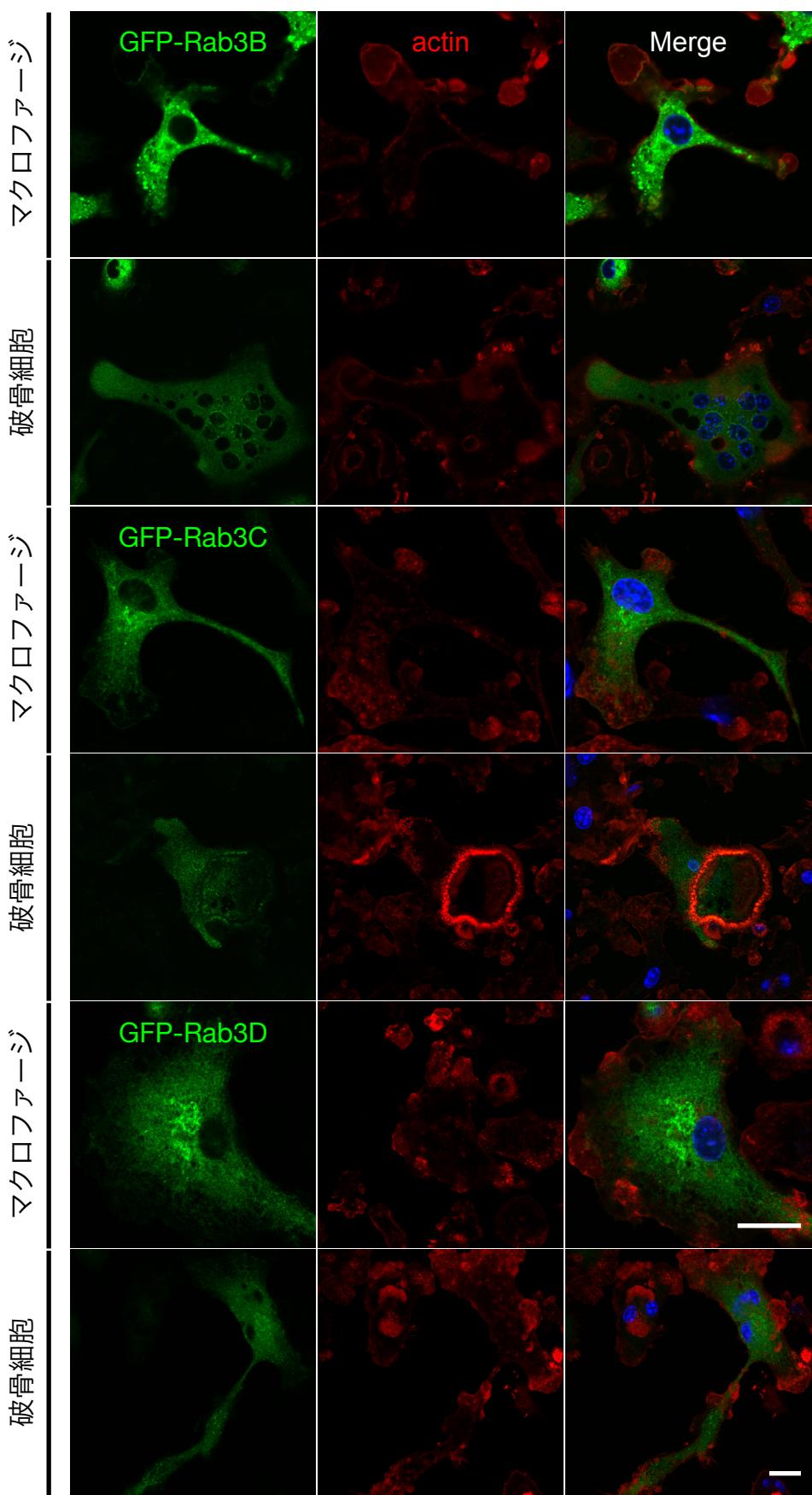


図 1-4

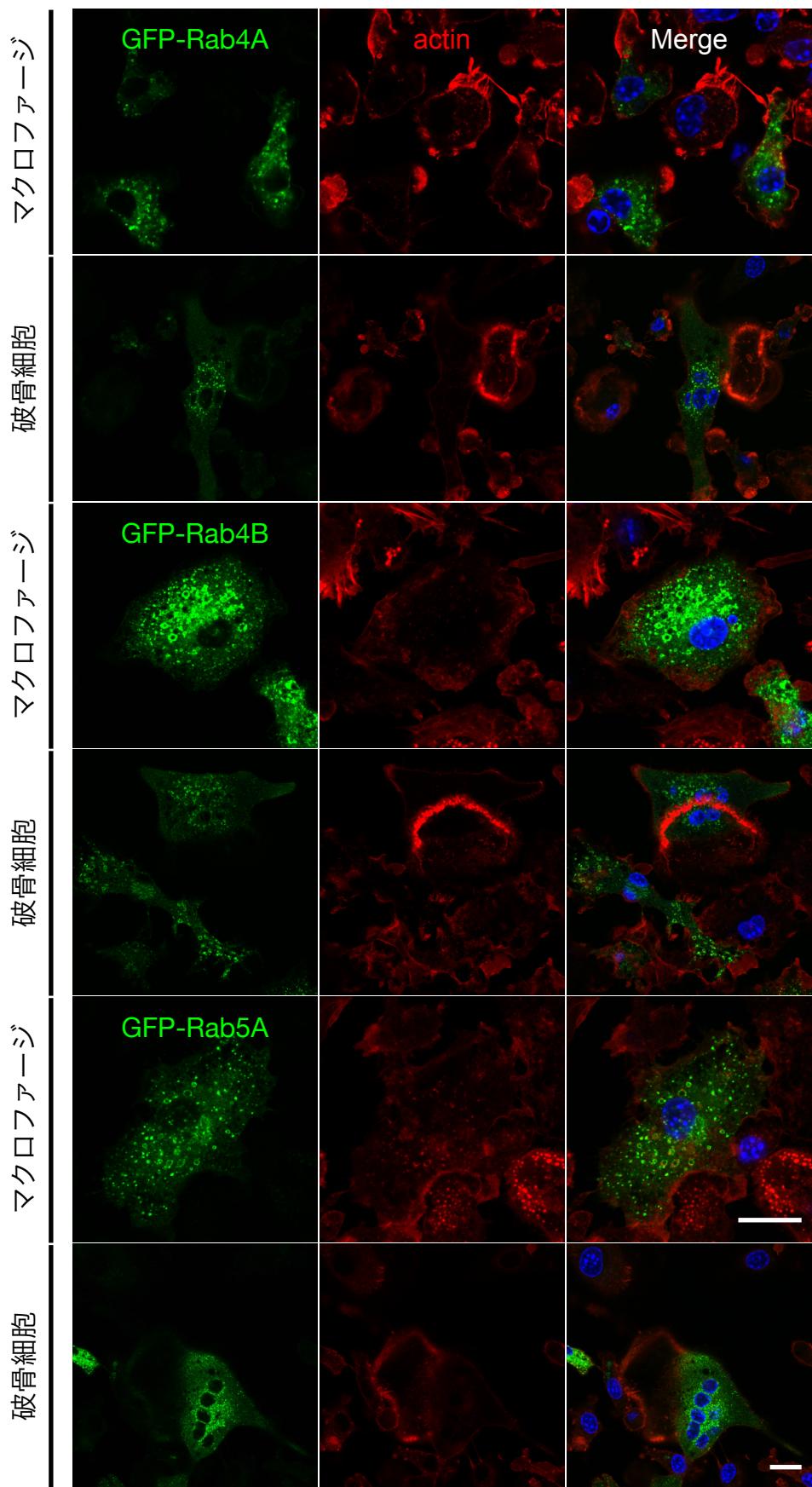


図 1-5

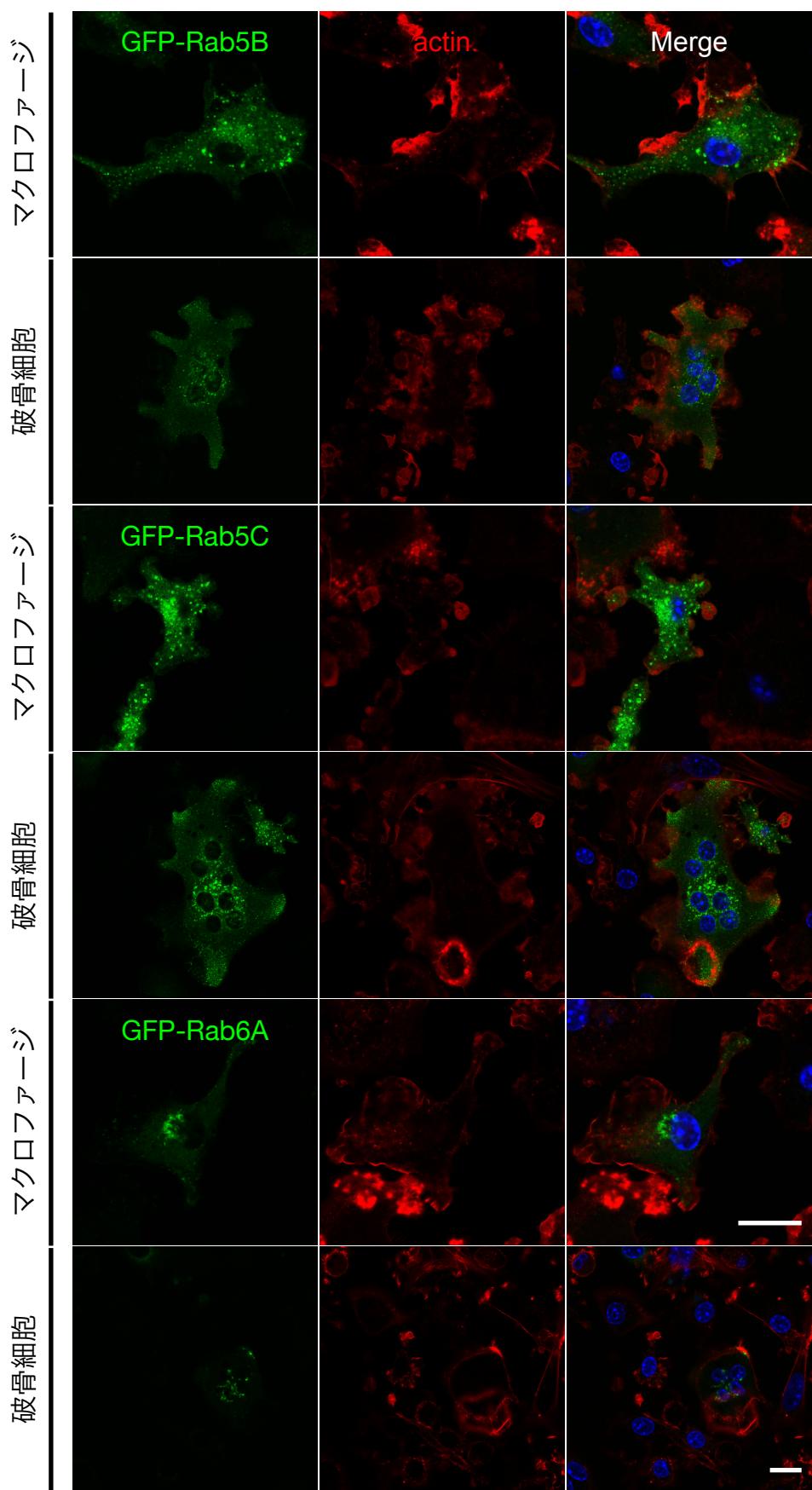


図 1-6

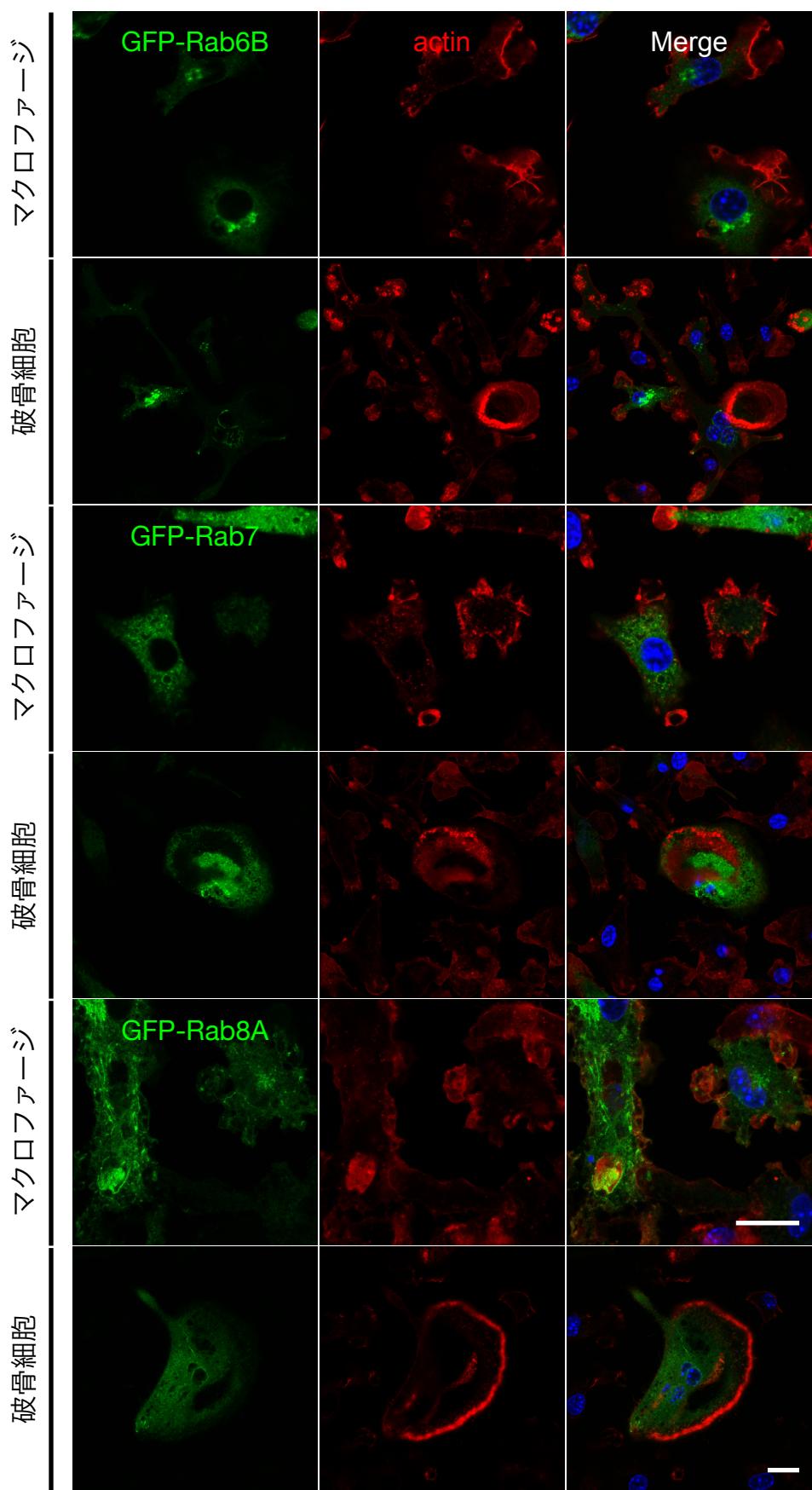


図 1-7

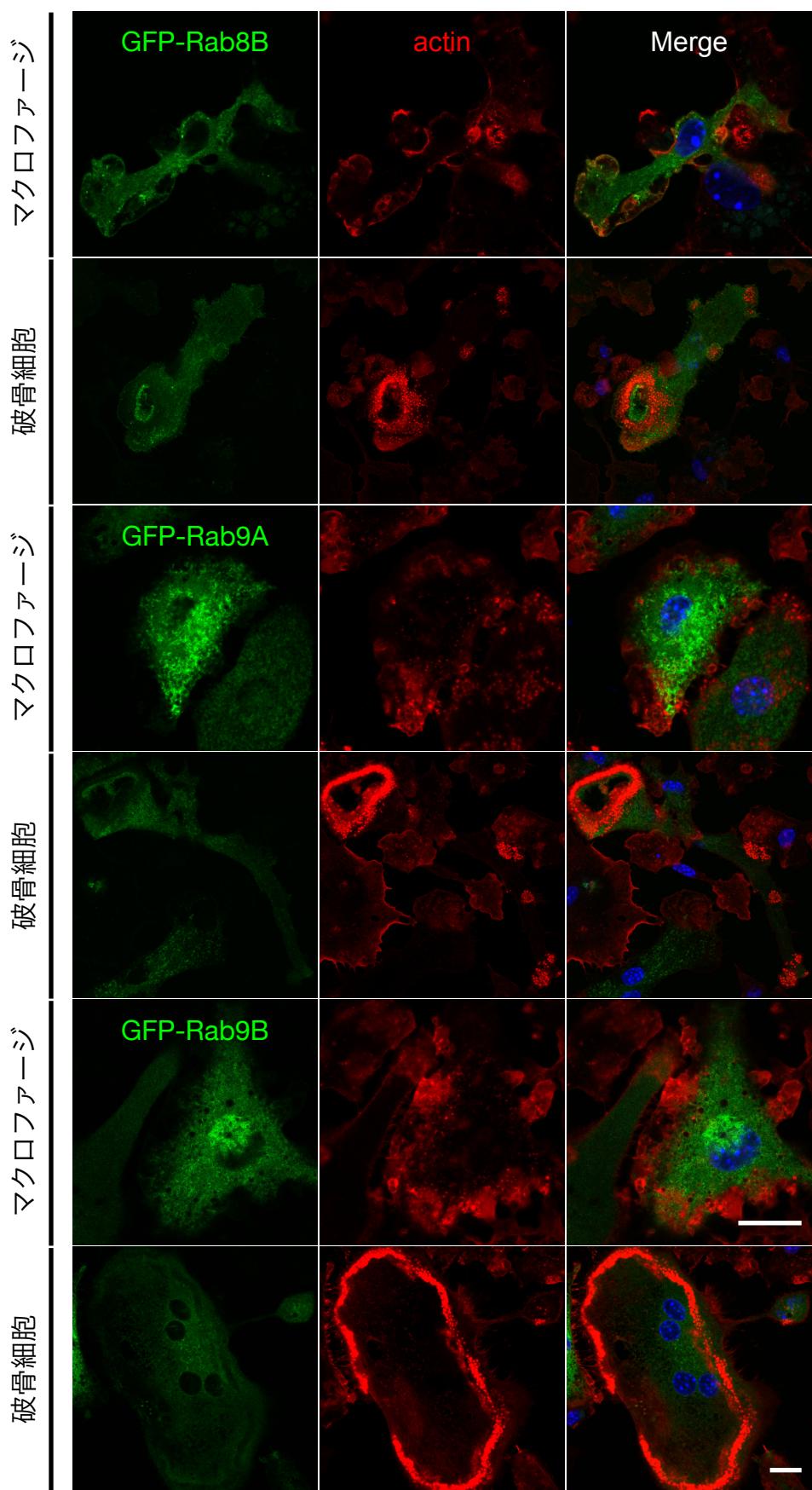


図 1-8

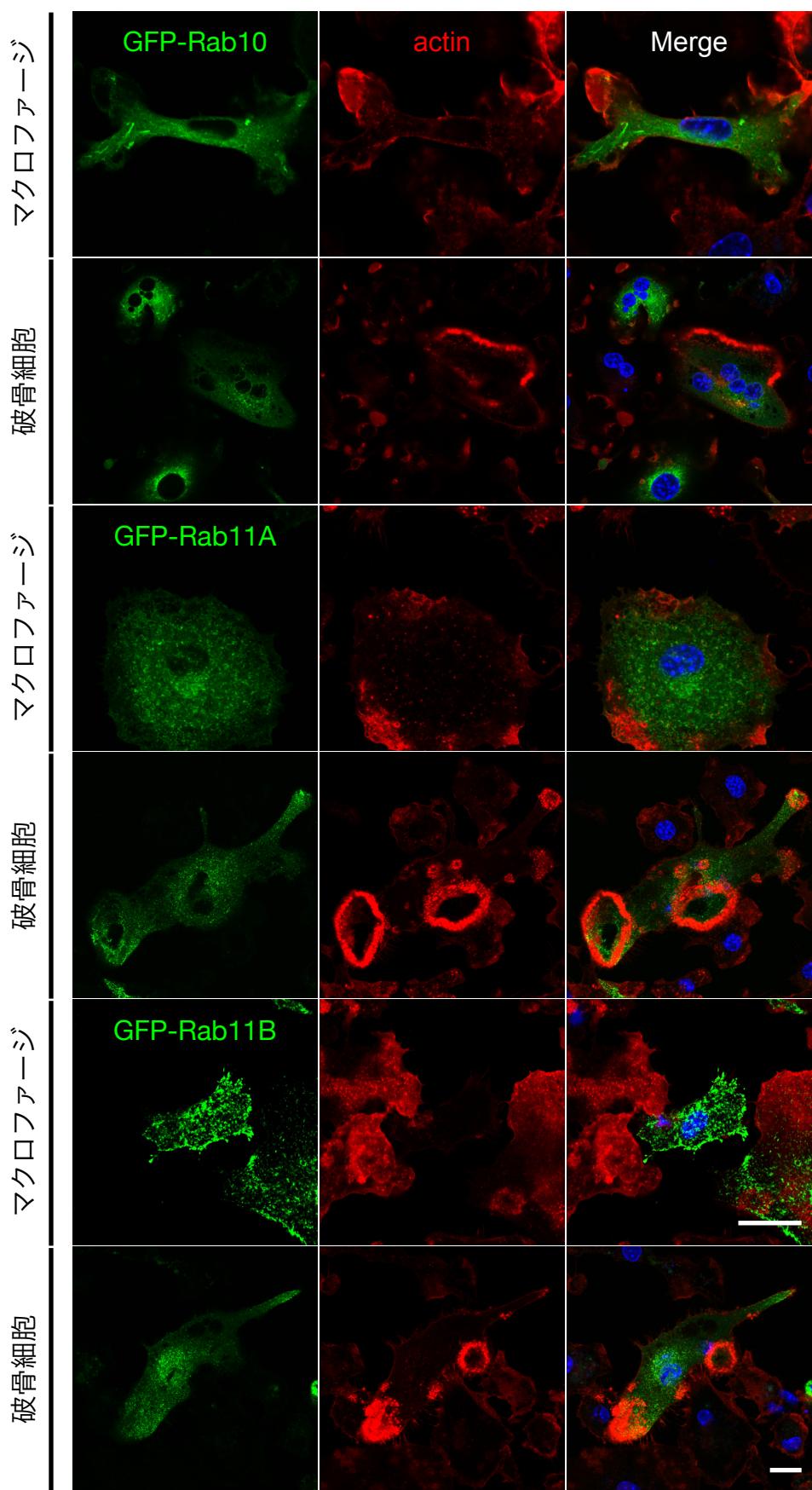


図 1-9

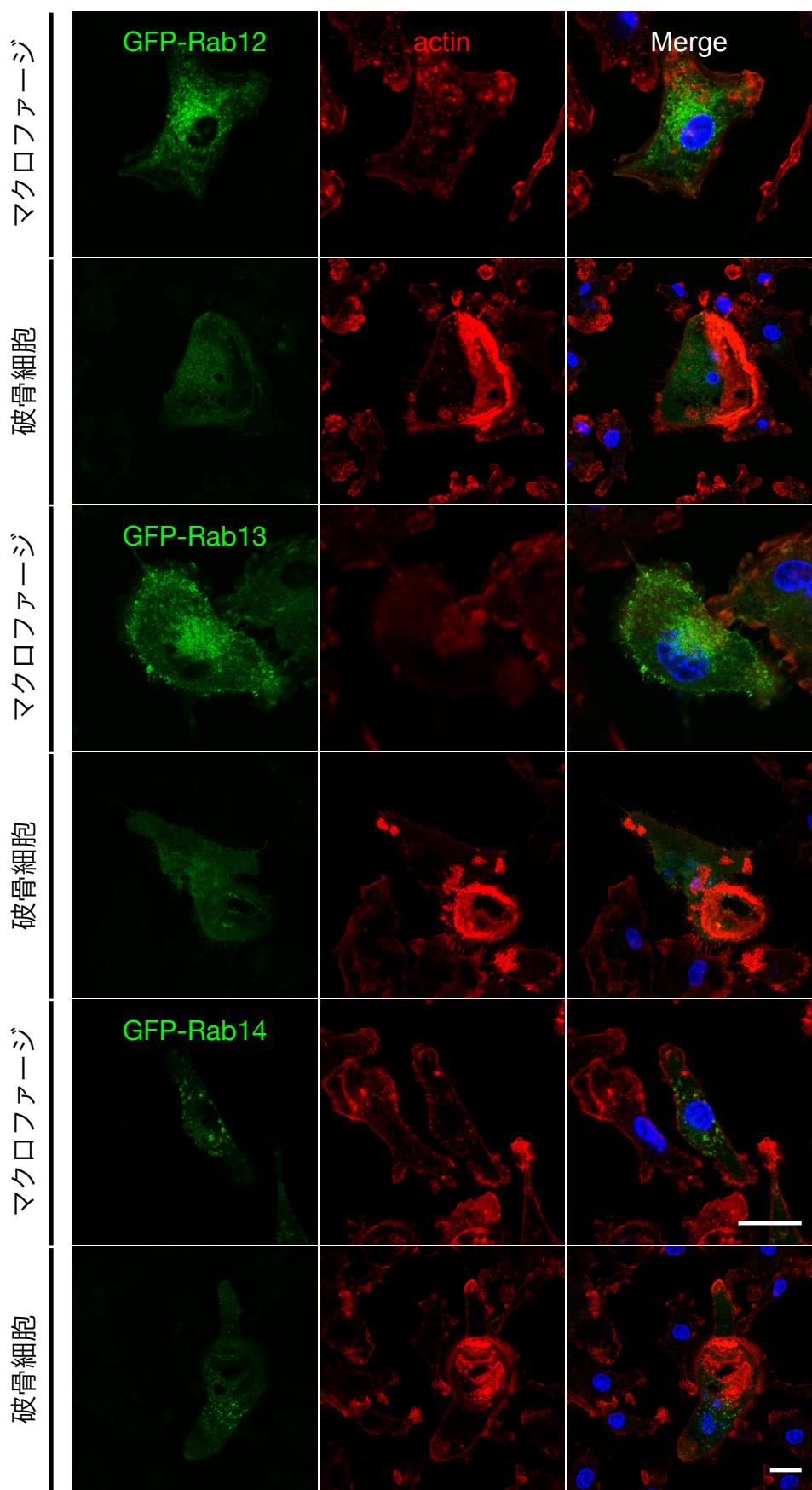


図 1-10

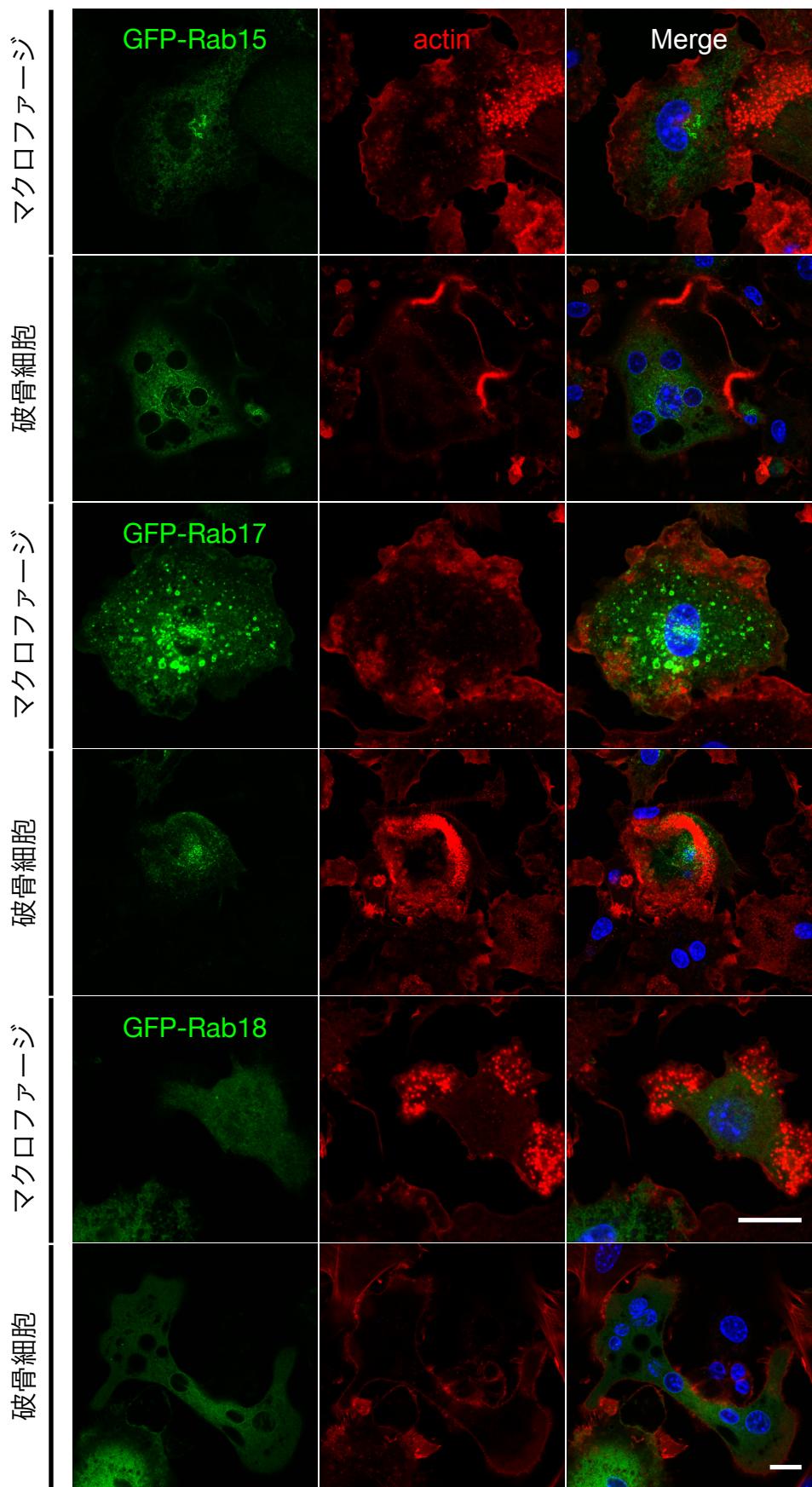


図 1-11

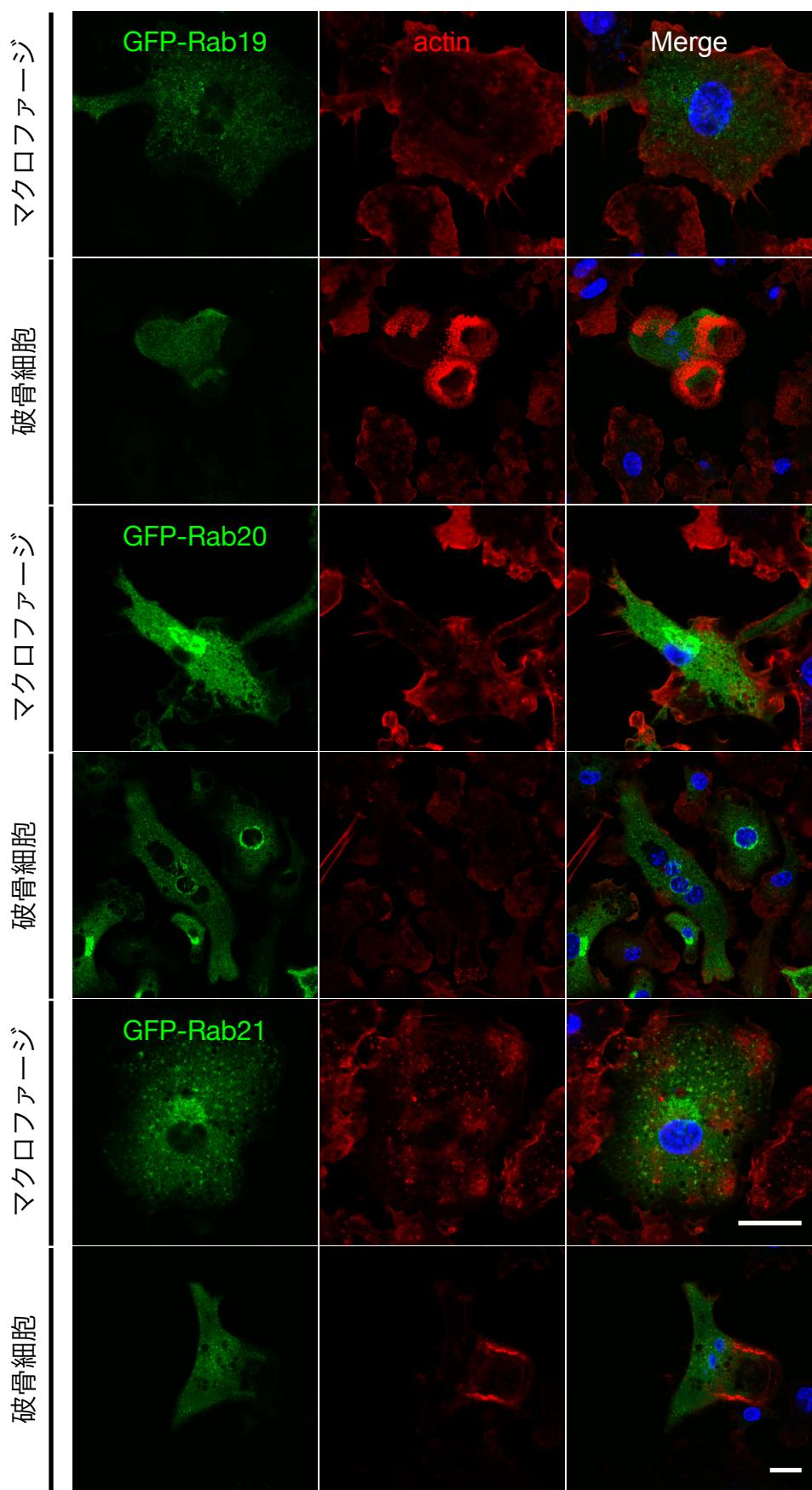


図 1-12

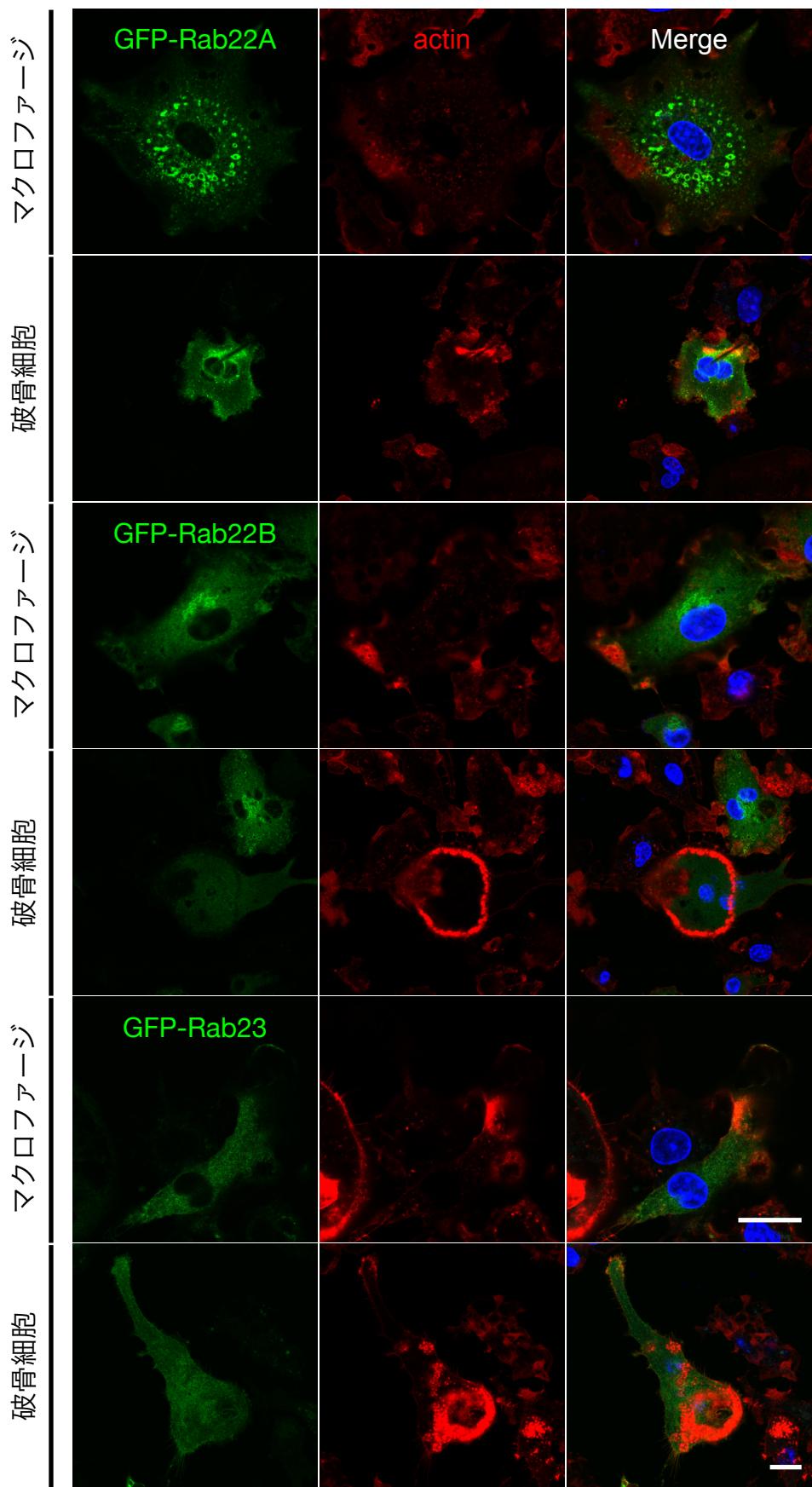


図 1-13

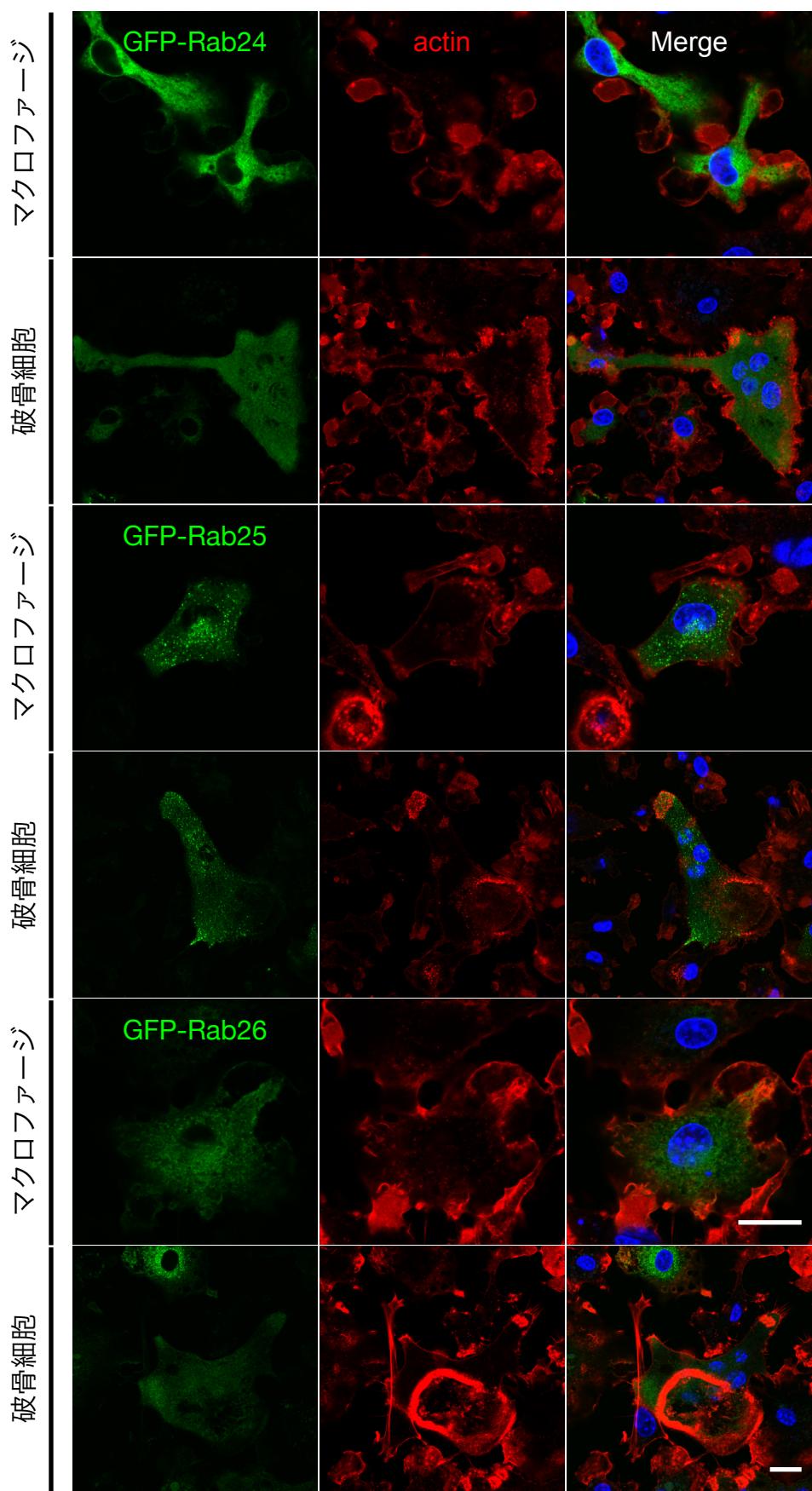


図 1-14

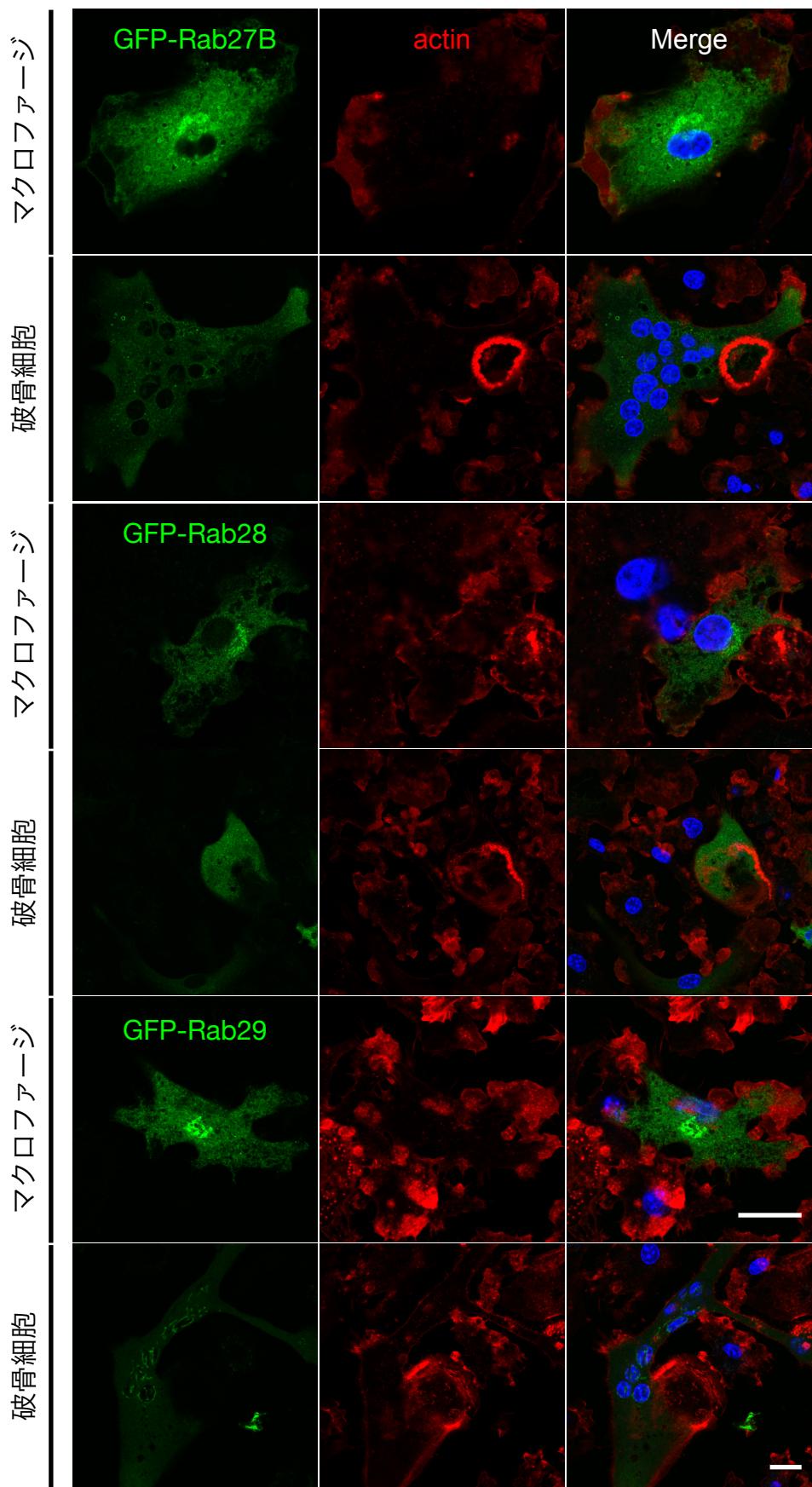


図 1-15

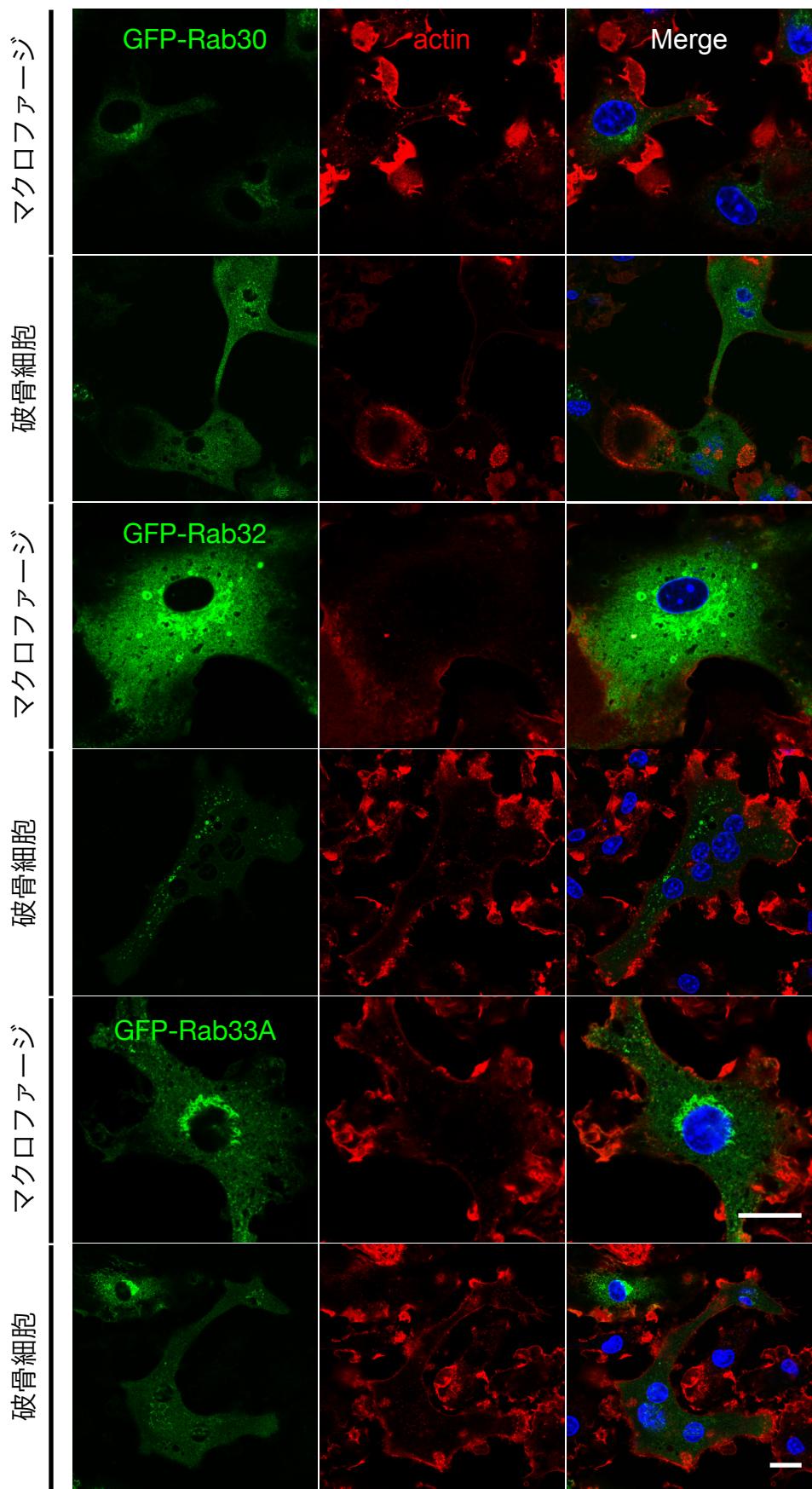


図 1-16

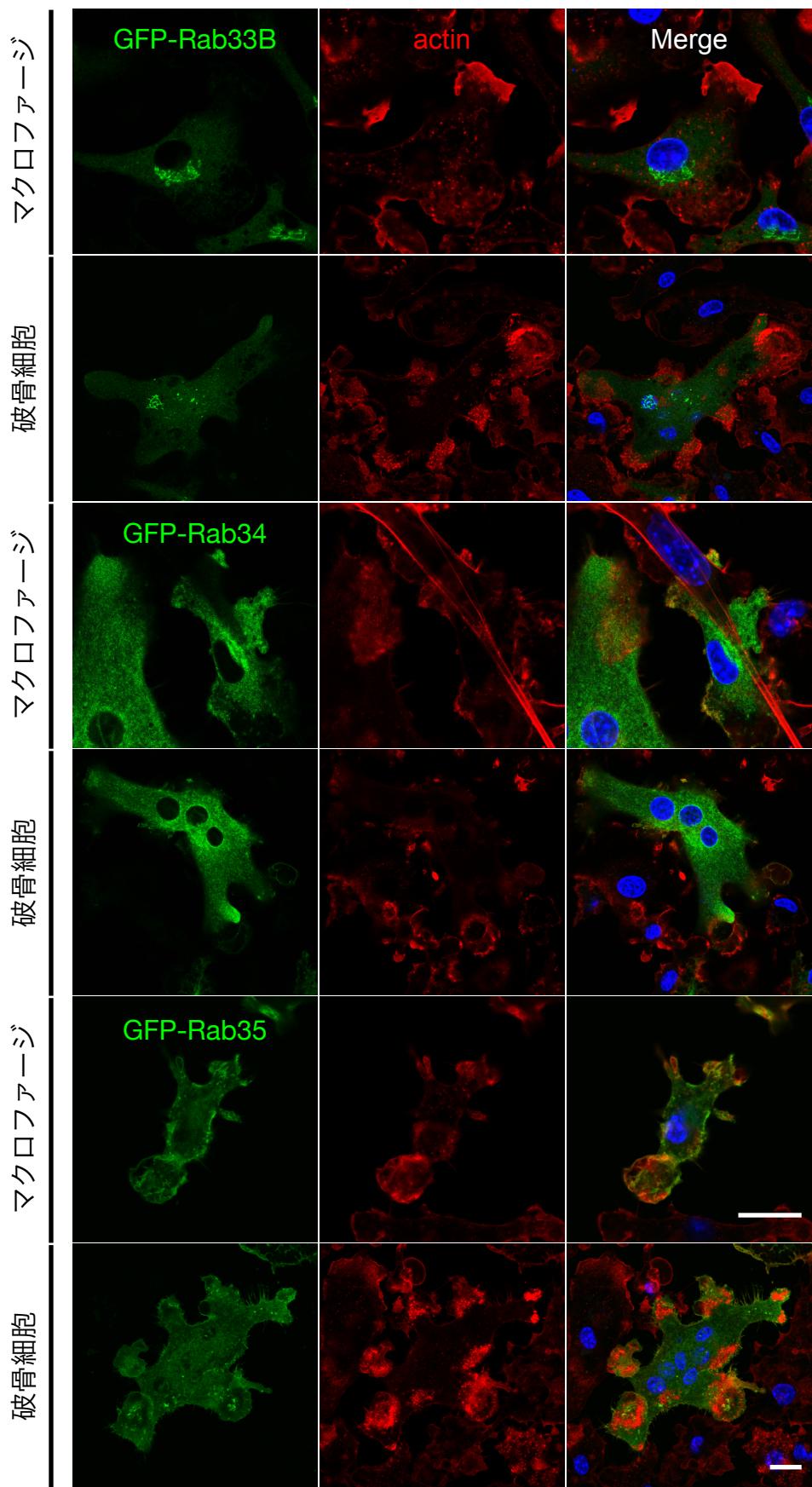


図1-17

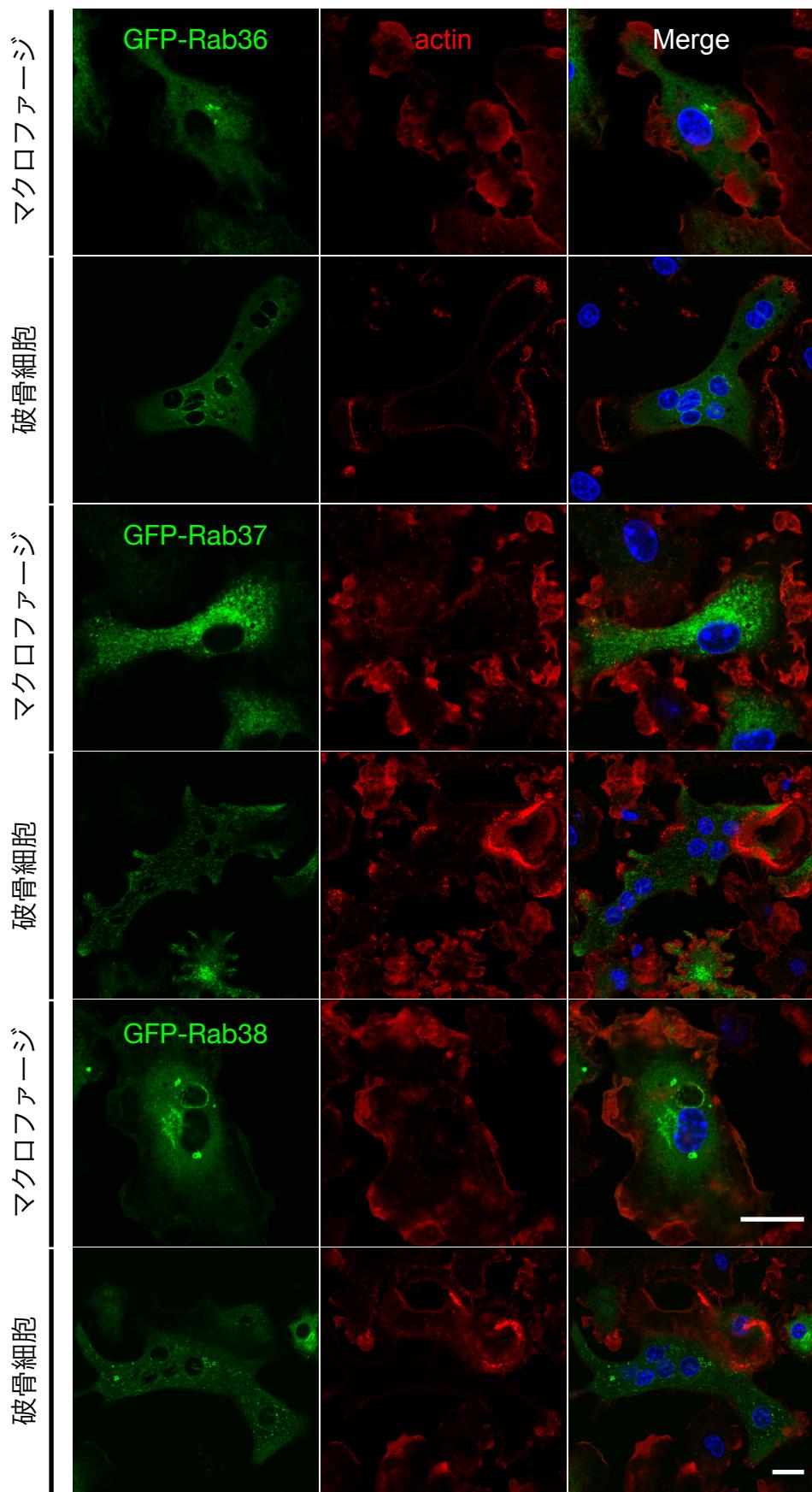


図 1-18

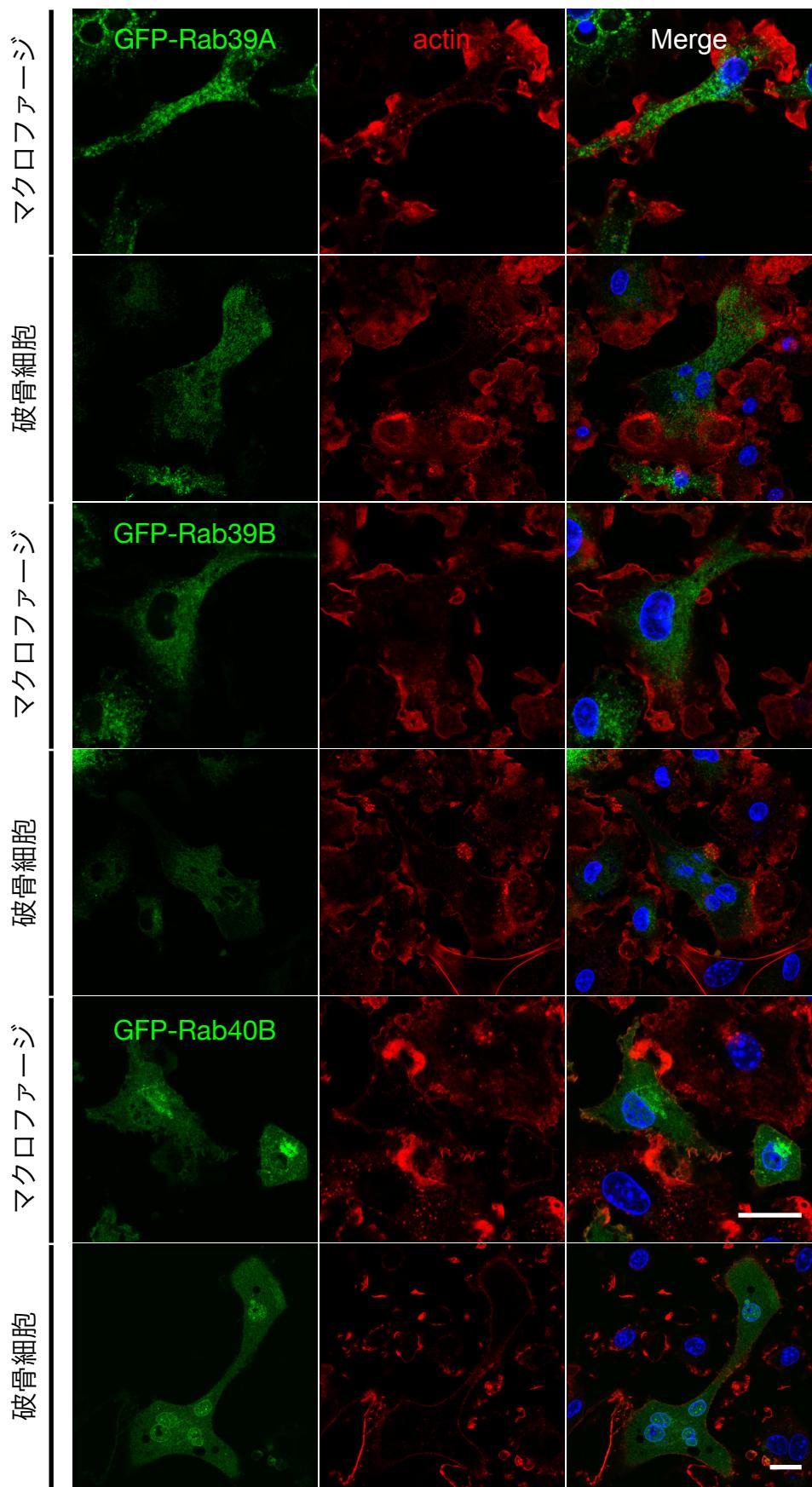
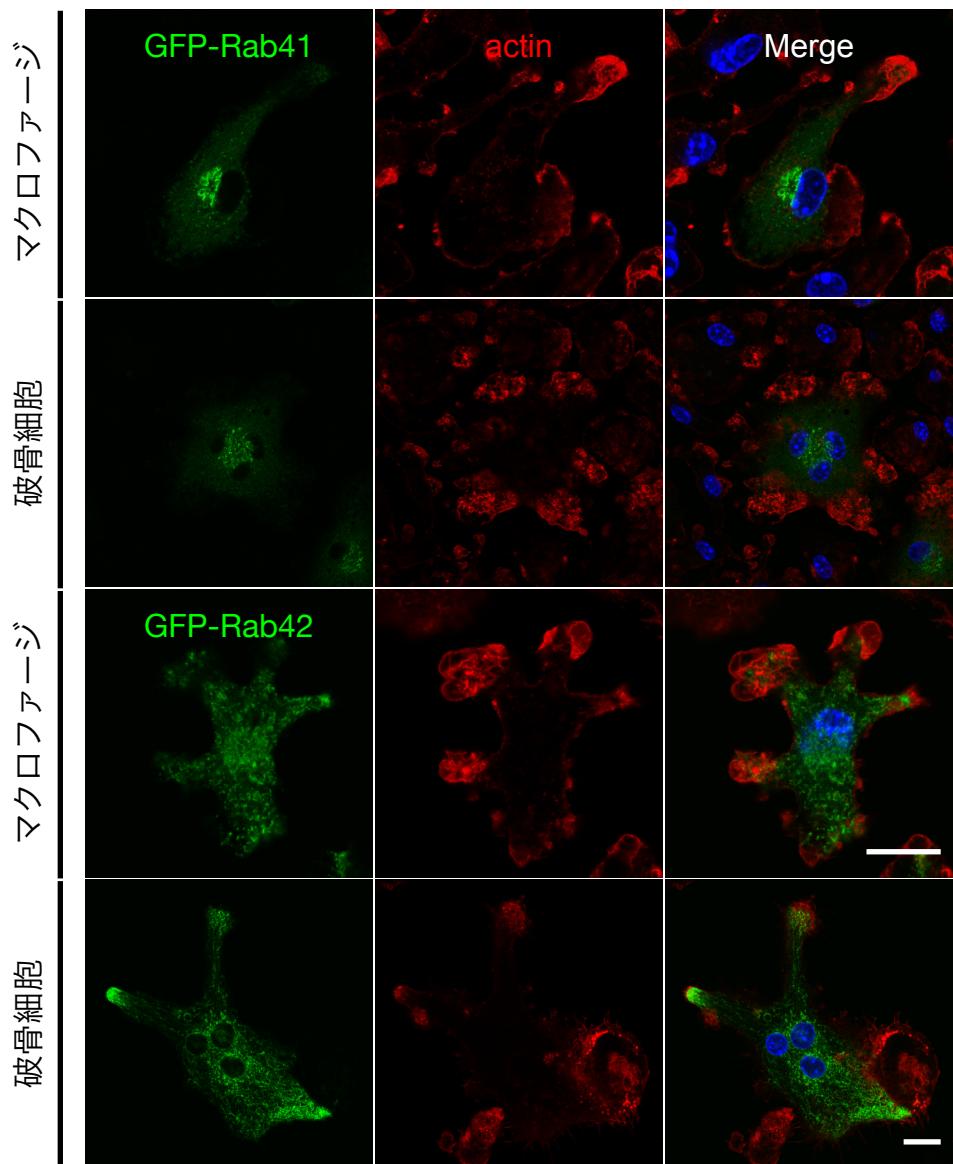


図 1-19



Rab isoform	Subcellular localization	Rab isoform	Subcellular localization
Rab1A	peri-nuclear+dot/ring	Rab18	peri-nuclear+cytoplasm
Rab1B	peri-nuclear+dot/ring	Rab19	peri-nuclear+dot/ring
Rab2A	peri-nuclear	Rab20	peri-nuclear+dot/ring
Rab2B	peri-nuclear	Rab21	peri-nuclear+dot/ring
Rab3A	peri-nuclear	Rab22A	peri-nuclear+dot/ring
Rab3B	peri-nuclear+dot/ring	Rab22B	peri-nuclear+dot/ring
Rab3C	peri-nuclear+dot/ring	Rab23	dot/ring+plasma membrane
Rab3D	peri-nuclear+dot/ring	Rab24	peri-nuclear+cytoplasm
Rab4A	dot/ring	Rab25	dot/ring
Rab4B	dot/ring	Rab26	dot/ring
Rab5A	dot/ring	Rab27A	not detected
Rab5B	dot/ring	Rab27B	peri-nuclear+dot/ring
Rab5C	dot/ring	Rab28	peri-nuclear
Rab6A	peri-nuclear+plasma membrane	Rab29	peri-nuclear
Rab6B	peri-nuclear+plasma membrane	Rab30	peri-nuclear
Rab6C	not detected	Rab32	peri-nuclear+dot/ring
Rab7	dot/ring	Rab33A	peri-nuclear+dot/ring
Rab8A	peri-nuclear+plasma membrane	Rab33B	peri-nuclear
Rab8B	peri-nuclear+plasma membrane	Rab34	peri-nuclear+plasma membrane
Rab9A	dot/ring	Rab35	dot/ring+plasma membrane
Rab9B	peri-nuclear+dot/ring	Rab36	peri-nuclear
Rab10	peri-nuclear+dot/ring	Rab37	dot/ring
Rab11A	dot/ring+plasma membrane	Rab38	peri-nuclear+dot/ring
Rab11B	dot/ring+plasma membrane	Rab39A	dot/ring
Rab12	peri-nuclear+dot/ring	Rab39B	dot/ring
Rab13	peri-nuclear+plasma membrane	Rab40A	not detected
Rab14	dot/ring	Rab40B	peri-nuclear+nuclear
Rab15	peri-nuclear	Rab40C	not detected
Rab17	peri-nuclear+dot/ring+plasma membrane	Rab41	peri-nuclear
		Rab42	dot/ring

図1-20 GFP-Rabタンパク質の局在

ガラス上に培養したマクロファージをRANKL刺激により破骨細胞へ分化誘導し、マクロファージ及び破骨細胞におけるGFP-Rabの局在性を共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは25 μm。また、GFP-Rab1-42の主な局在性を表にまとめた。

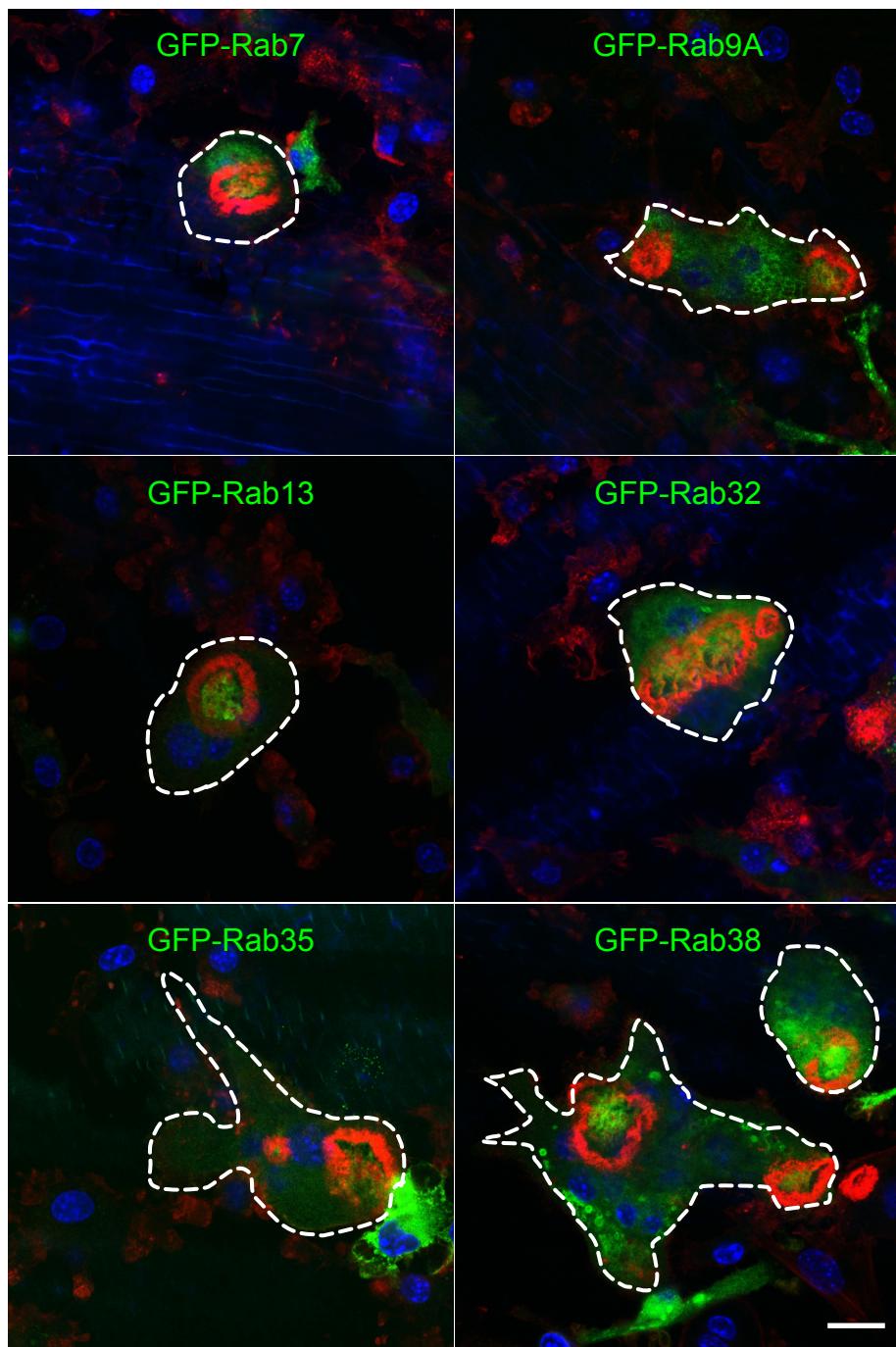
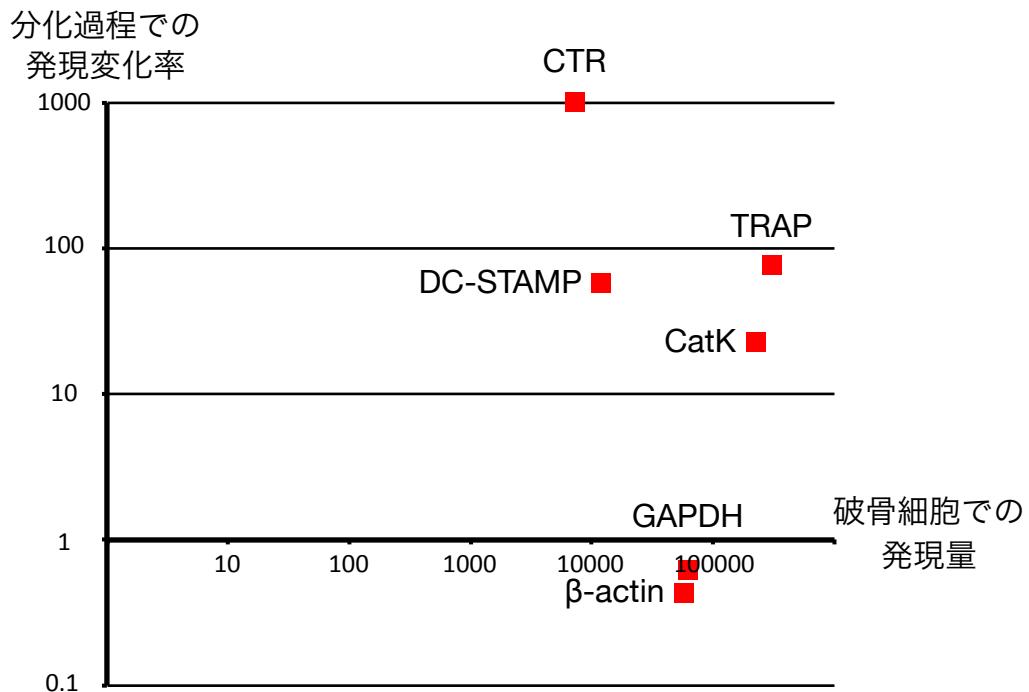


図2 アクチングリング内に集積したRabタンパク質

象牙切片上に培養したマクロファージをRANKL刺激により破骨細胞へ分化誘導し、GFP-Rabの局在性を共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは25 μm 。

A.



B.

	RANKL刺激3日目	RANKL刺激6日目
CTR	158.7	923.2
CatK	30.1	203.6

図3 破骨細胞分化マーカーは高い発現上昇率を示す

- A. マクロファージ及びRANKL刺激6日目の細胞由来mRNAを用いてDNAマイクロアレイ法にて遺伝子発現を解析した。横軸に破骨細胞での発現量、縦軸にマクロファージでの発現量を1としたときの破骨細胞での発現量。
- B. RANKL刺激3日目とRANKL刺激6日目のカルシトニンレセプター、カテプシンK遺伝子発現をReal-time PCR法で解析。マクロファージでの発現量を1としたときの発現変化率を数値化した。

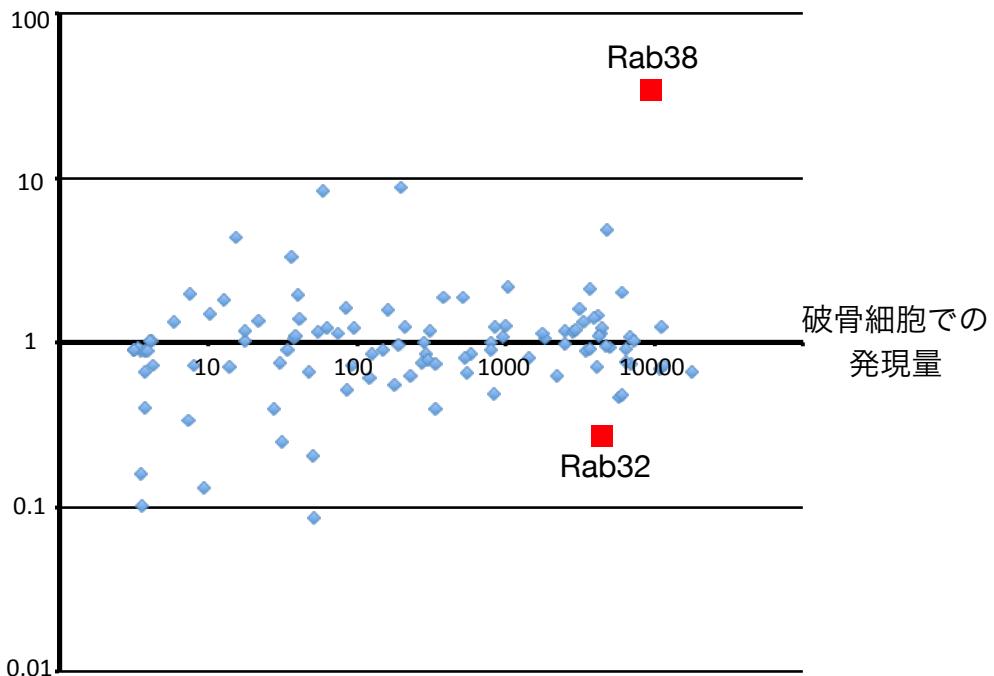
図 4-1

A.

Rab isoform	発現量	発現変化率	Rab isoform	発現量	発現変化率	Rab isoform	発現量	発現変化率
Rab1A	9956	0.496	Rab10	3976	1.385	Rab28	124	0.595
Rab1B	6504	0.897	Rab11A	6118	0.472	Rab29	3746	0.891
Rab2A	7383	0.996	Rab11B	1017	1.247	Rab30	16	4.262
Rab2B	1054	2.117	Rab12	3225	1.576	Rab32	3959	0.298
Rab3A	595	0.837	Rab13	39	1.083	Rab33A	52	0.201
Rab3B	76	1.116	Rab14	7038	0.722	Rab33B	813	0.89
Rab3C	3	0.881	Rab15	200	8.554	Rab34	4947	4.738
Rab3D	87	0.503	Rab17	10	1.47	Rab35	6578	0.754
Rab4A	978	1.056	Rab18	4307	1.066	Rab36	4	0.864
Rab4B	538	0.786	Rab19	557	0.643	Rab37	28	0.384
Rab5A	4420	1.107	Rab20	216	1.216	Rab38	8302	40.028
Rab5B	4254	1.422	Rab21	344	0.724	Rab39A	32	0.243
Rab5C	11046	0.677	Rab22A	2574	1.156	Rab39B	6	1.318
Rab6A	184	0.915	Rab22B	194	0.952	Rab40A	-	-
Rab6B	388	1.843	Rab23	65	1.202	Rab40B	61	8.192
Rab6C	-	-	Rab24	3558	0.863	Rab40C	3001	1.173
Rab7	11365	1.227	Rab25	8	0.994	Rab41	-	-
Rab8A	819	0.986	Rab26	4	0.712	Rab42	96	0.648
Rab8B	5929	0.458	Rab27A	4	0.098	Rab43	10	0.829
Rab9A	3779	2.098	Rab27B	4	0.654	Rab44	53	0.085
Rab9B	8	1.943						

B.

分化過程での
発現変化率



C.

	RANKL刺激3日目	RANKL刺激6日目
Rab32	0.422	0.532
Rab38	4.87	48.1

図4-2 Rab38は破骨細胞分化の過程で高い発現上昇率を示す

- A. DNAマイクロアレイ法の結果から、Rabタンパク質に関するデータを抽出し破骨細胞での発現量及び発現変化率を表にまとめた。
- B. DNAマイクロアレイ法の結果から、Rabタンパク質に関するデータを抽出しプロット化。横軸に破骨細胞での発現量、縦軸にマクロファージでの発現量を1としたときの破骨細胞での発現量。
- C. RANKL刺激3日目とRANKL刺激6日目のRab32、Rab38遺伝子発現をReal-time PCR法で解析。マクロファージでの発現量を1としたときの発現上昇率を数値化した。

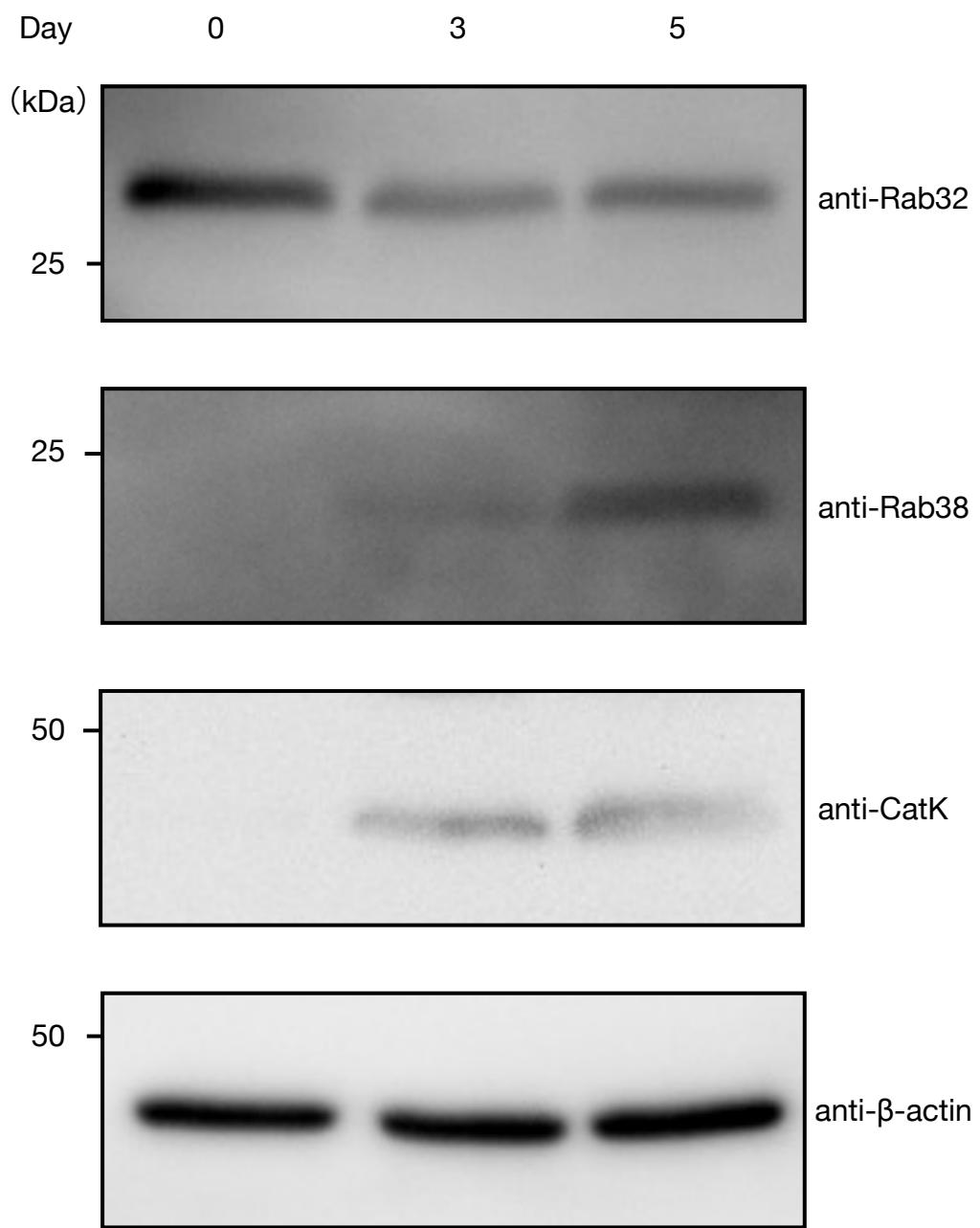


図5 Rab32とRab38は異なる発現パターンを示す
 マクロファージ（RANKL刺激0日目）、RANKL刺激3日目及びRANKL刺激5日目の細胞を回収した。細胞破碎液をそれぞれの抗体でウェスタンプロットを行い、Rab32、Rab38及びカテプシンKのタンパク質発現を確認した。

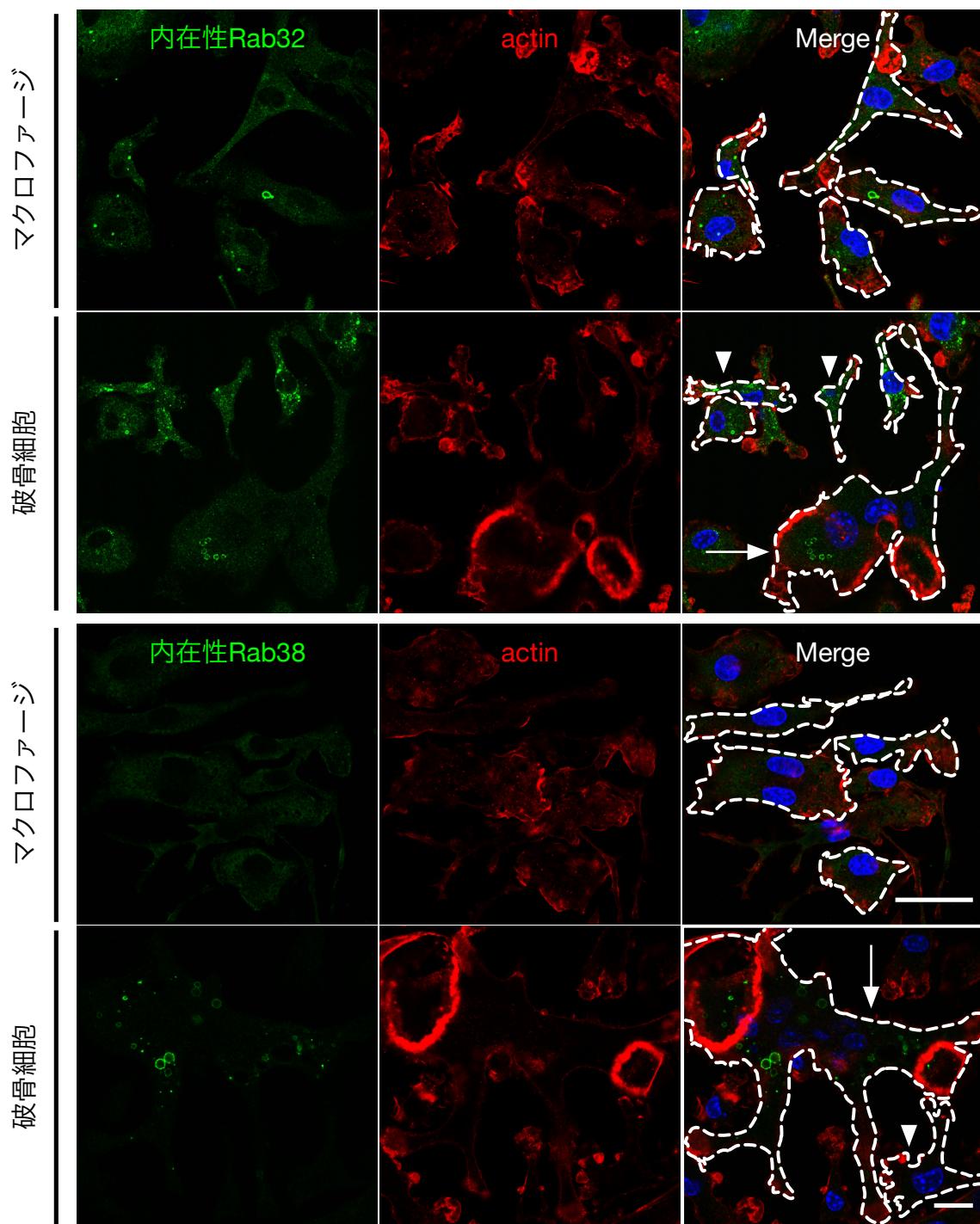


図6 内在性Rab32はマクロファージ及び破骨細胞で、内在性Rab38は破骨細胞で発現する

RANKL刺激0日目の細胞（マクロファージ）とRANKL刺激により破骨細胞へ分化誘導を行ったRANKL刺激5日目の細胞をRab32抗体、Rab38抗体で染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。矢印は多核破骨細胞、矢頭は単核破骨細胞を示す。スケールバーは25 μ m。

A.

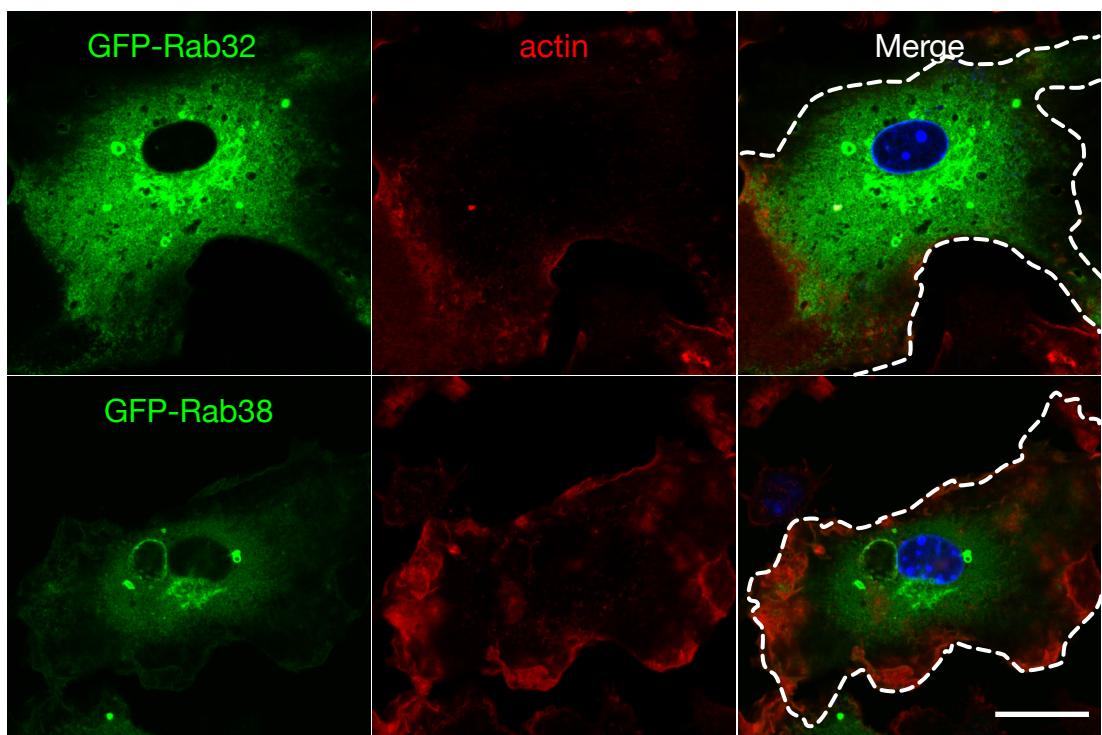
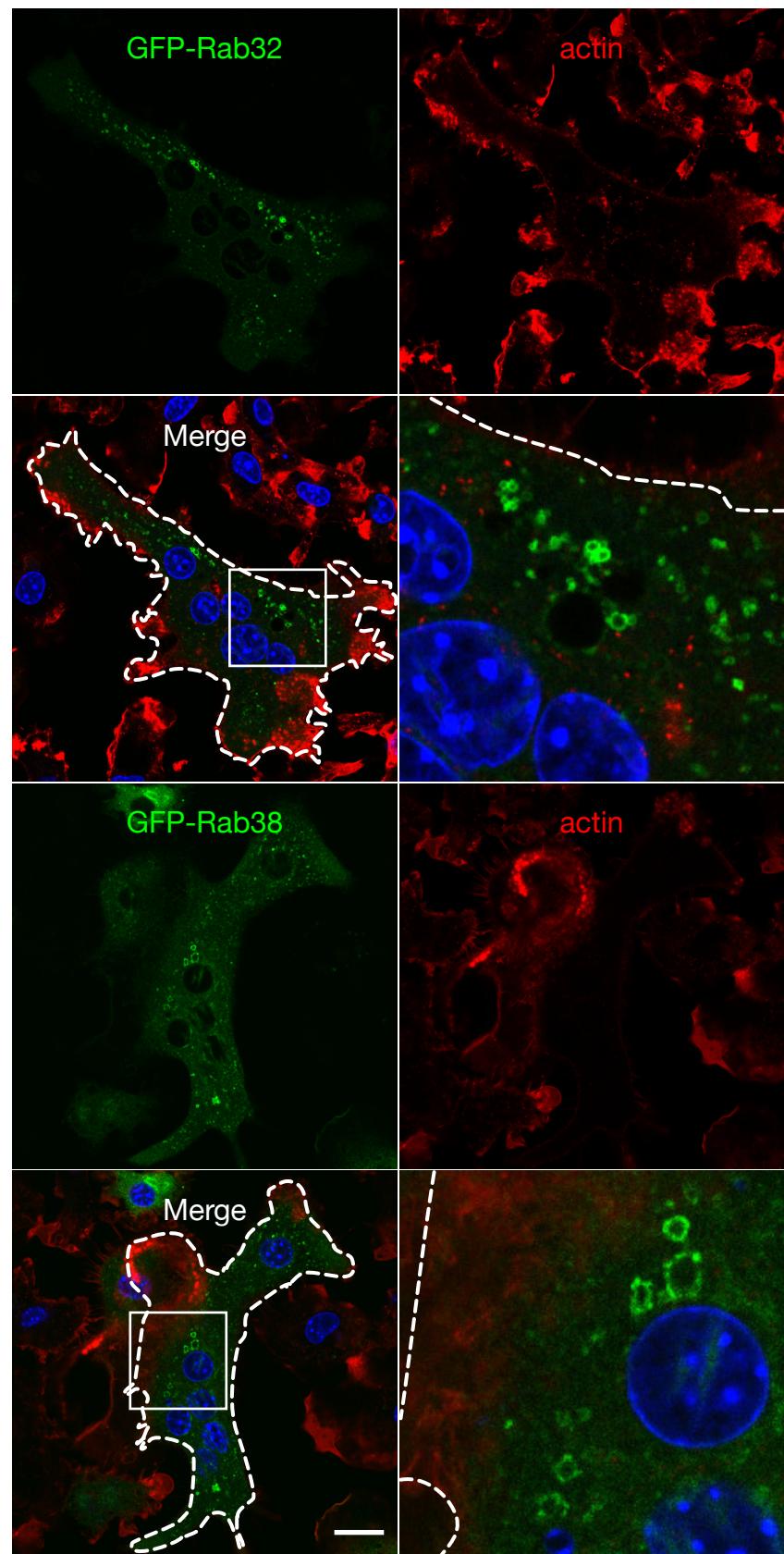


図7-1 GFP-Rab32/38は点状及びリング状の局在を示す

- A. ガラス上で培養しているマクロファージにGFP-Rab32/38をそれぞれ遺伝子導入し、固定後共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは25 μ m。
- B. ガラス上で培養しているマクロファージにGFP-Rab32/38をそれぞれ遺伝子導入し、RANKL刺激により破骨細胞へ分化誘導を行った。固定後共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは25 μ m。

図 7-2

B.



A.

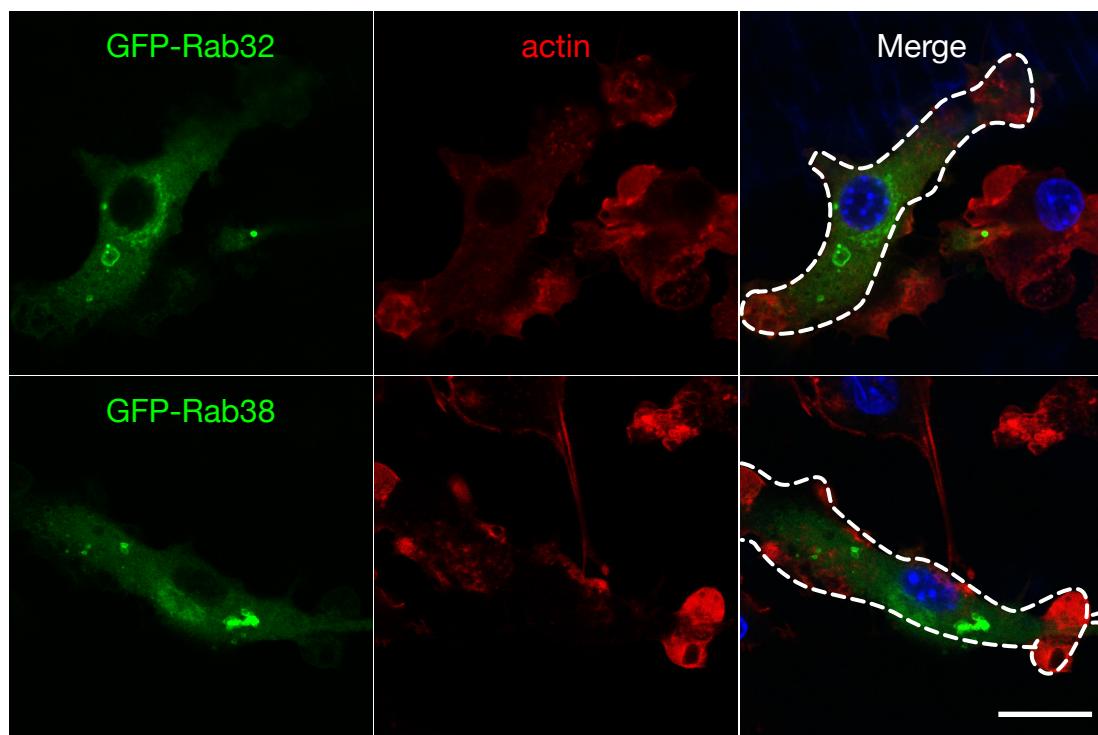
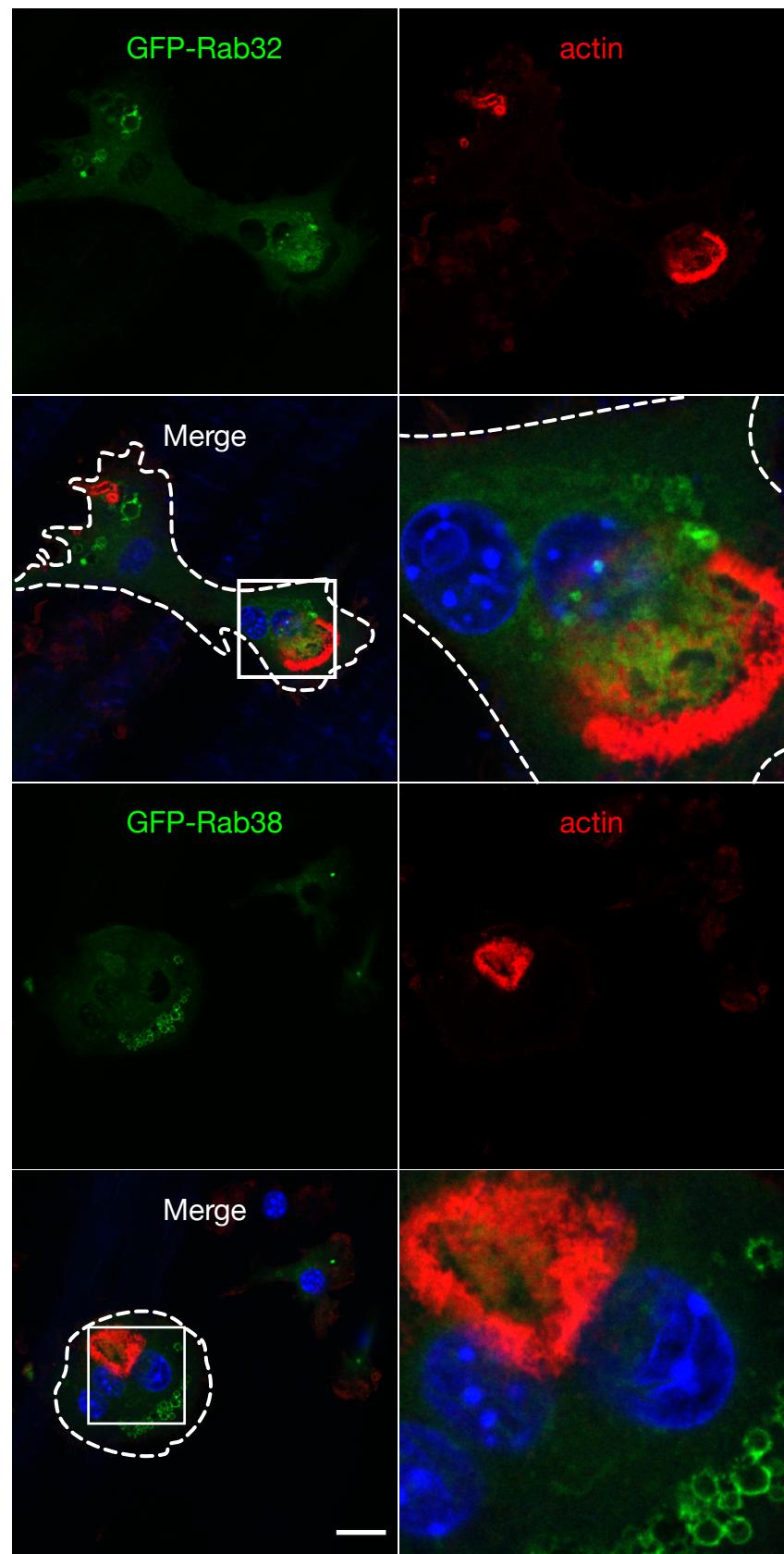


図8-1 GFP-Rab32/38は点状及びリング状の局在を示す

- A. 象牙切片上で培養しているマクロファージにGFP-Rab32/38をそれぞれ遺伝子導入し、固定後共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは25 μ m。
- B. 象牙切片上で培養しているマクロファージにGFP-Rab32/38をそれぞれ遺伝子導入し、RANKL刺激により破骨細胞へ分化誘導を行った。固定後共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは25 μ m。

図8-2

B.



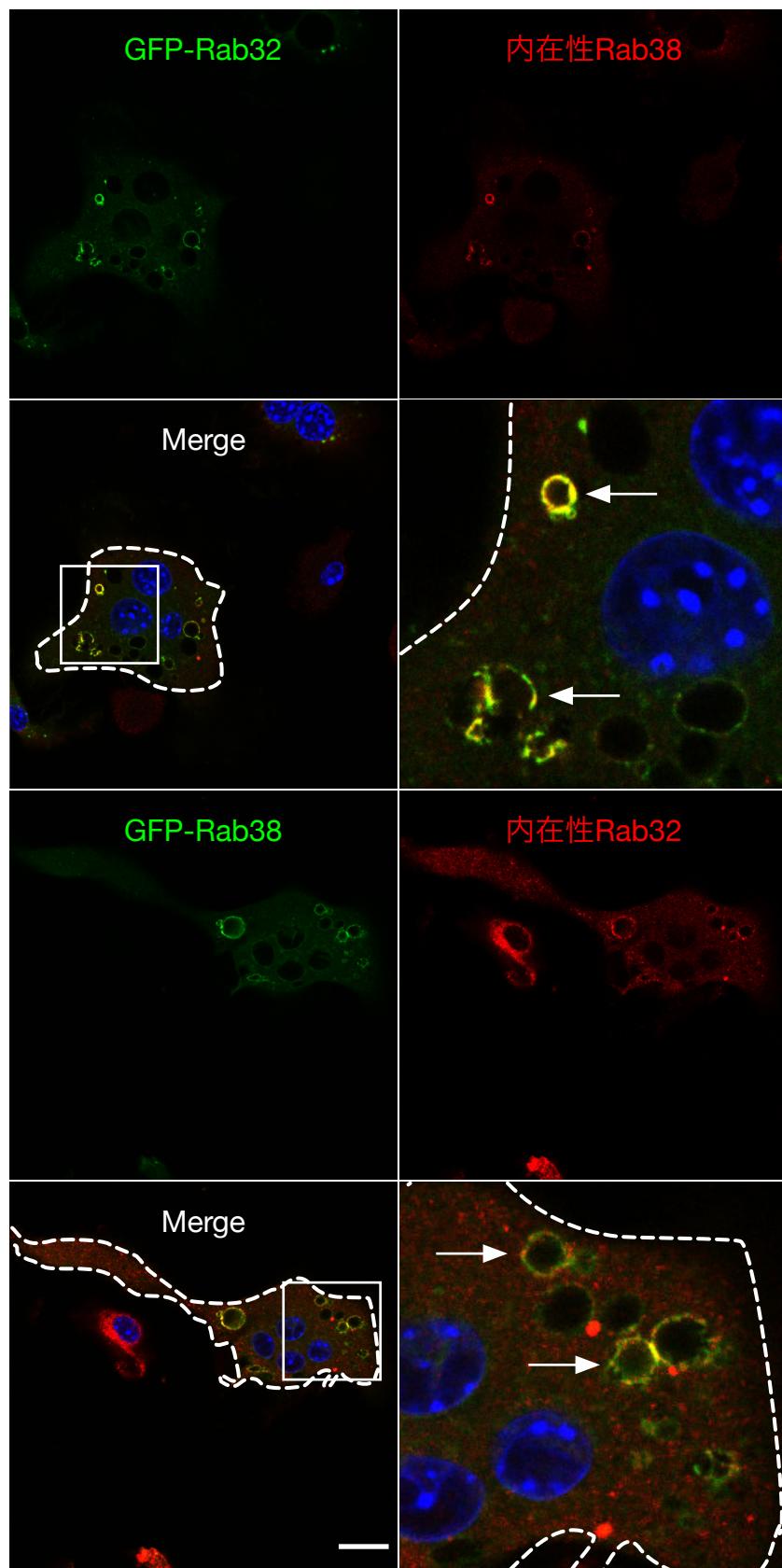


図9 破骨細胞においてRab32とRab38は大部分が共局在する

マクロファージにGFP-Rab32もしくはGFP-Rab38を遺伝子導入し、RANKL刺激により破骨細胞に分化誘導を行った。固定後、Rab38もしくはRab32抗体で染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。矢印は共局在を示す。スケールバーは25 μ m。

A.

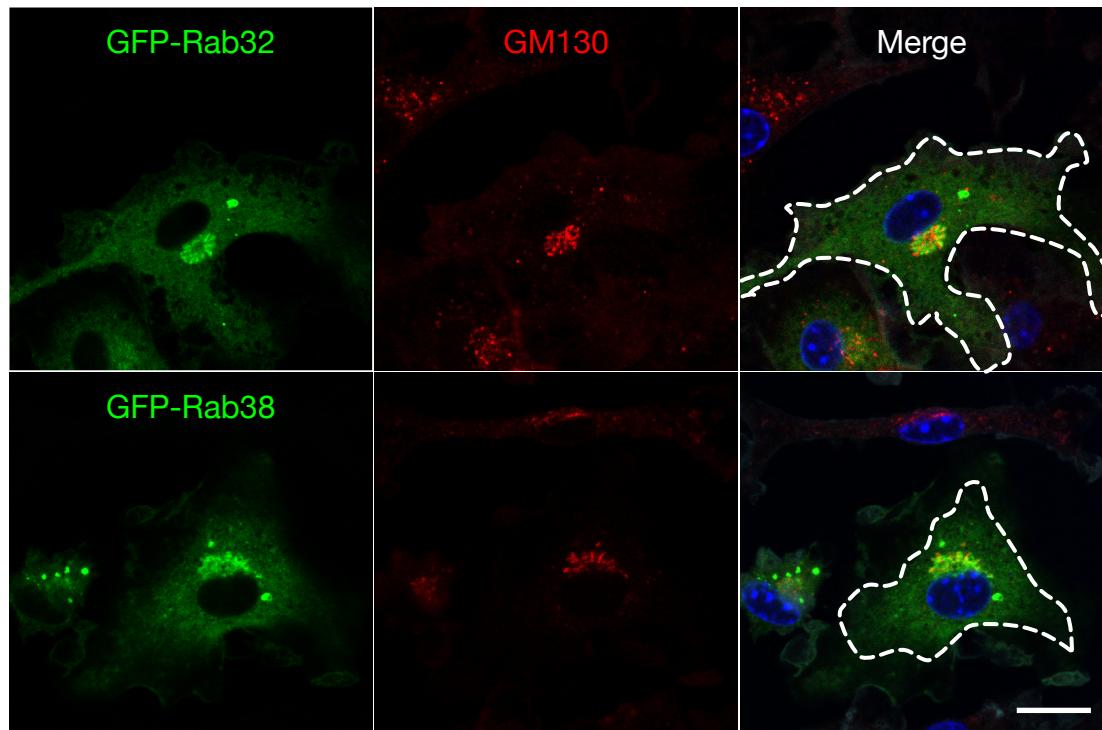


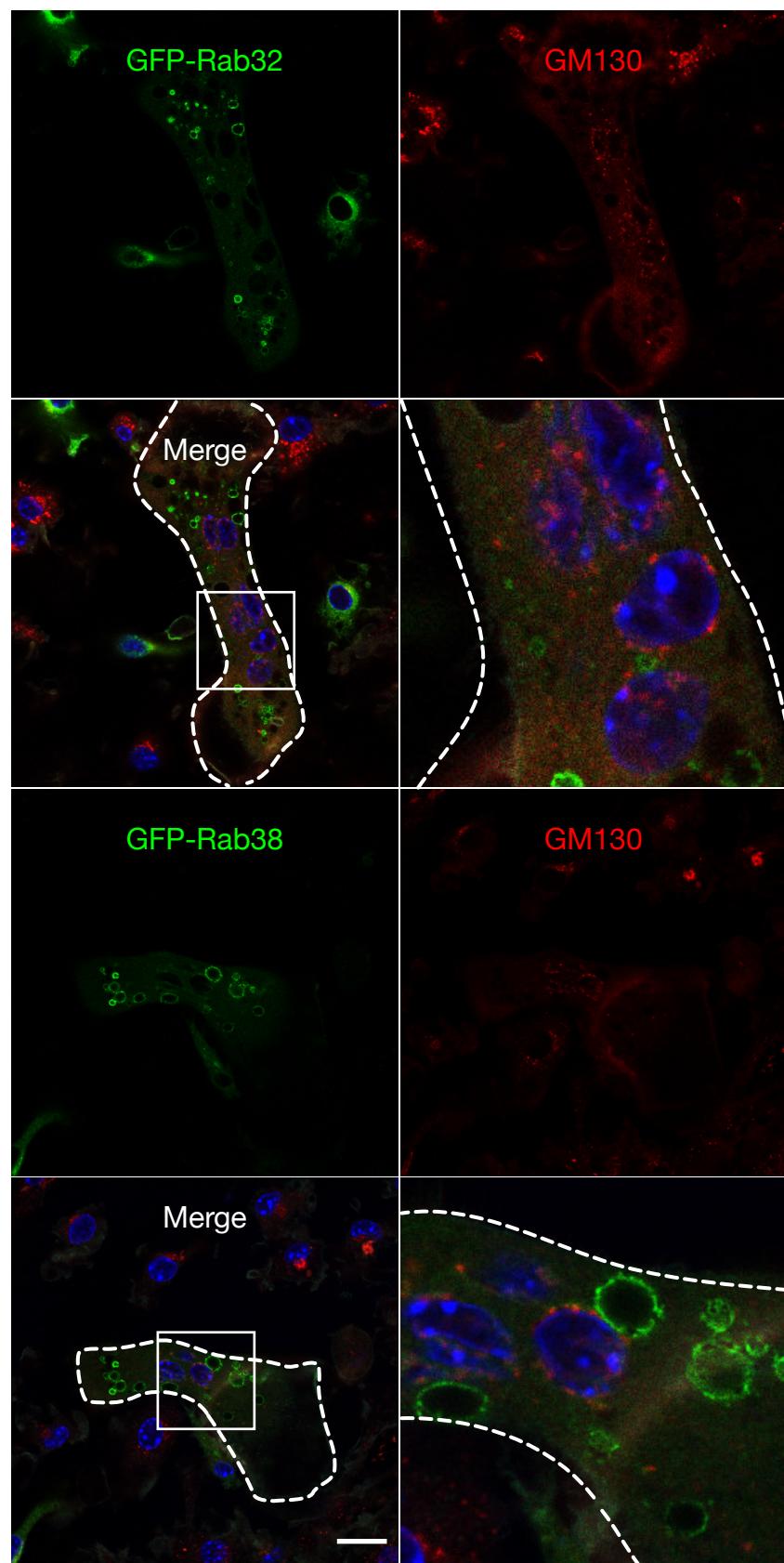
図10-1 マクロファージ及び破骨細胞においてRab32/38はゴルジ体と共に局在する

A. マクロファージにGFP-Rab32/38を遺伝子導入した。固定後、ゴルジ体マーカーであるGM130抗体で染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは25 μ m。

B. マクロファージにGFP-Rab32/38を遺伝子導入し、RANKL刺激により破骨細胞に分化誘導を行った。固定後、ゴルジ体マーカーであるGM130抗体で染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは25 μ m。

図10-2

B.



A.



B.

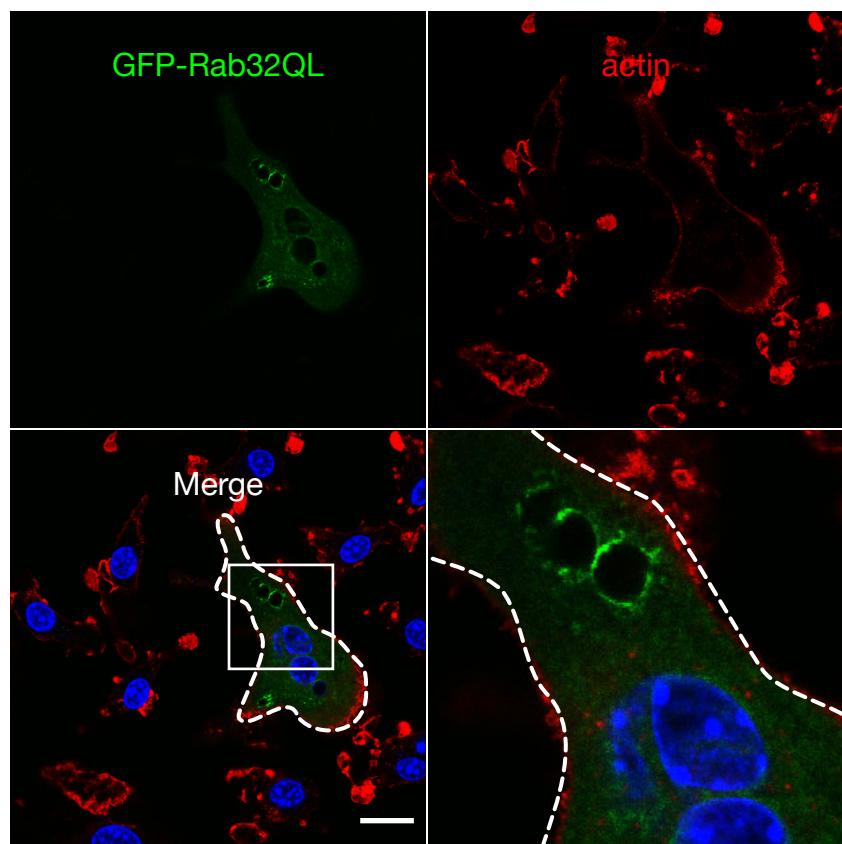


図11 Rab32恒常的活性化型変異体は、ゴルジ体及び点状、リング状局在を示す

A. マクロファージにGFP-Rab32QLを遺伝子導入した。固定後、ゴルジ体マーカーであるGM130抗体で染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは25 μ m。

B. マクロファージにGFP-Rab32QLを遺伝子導入し、RANKL刺激により破骨細胞に分化誘導を行った。固定後、アクチンで染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは25 μ m。

A.



B.

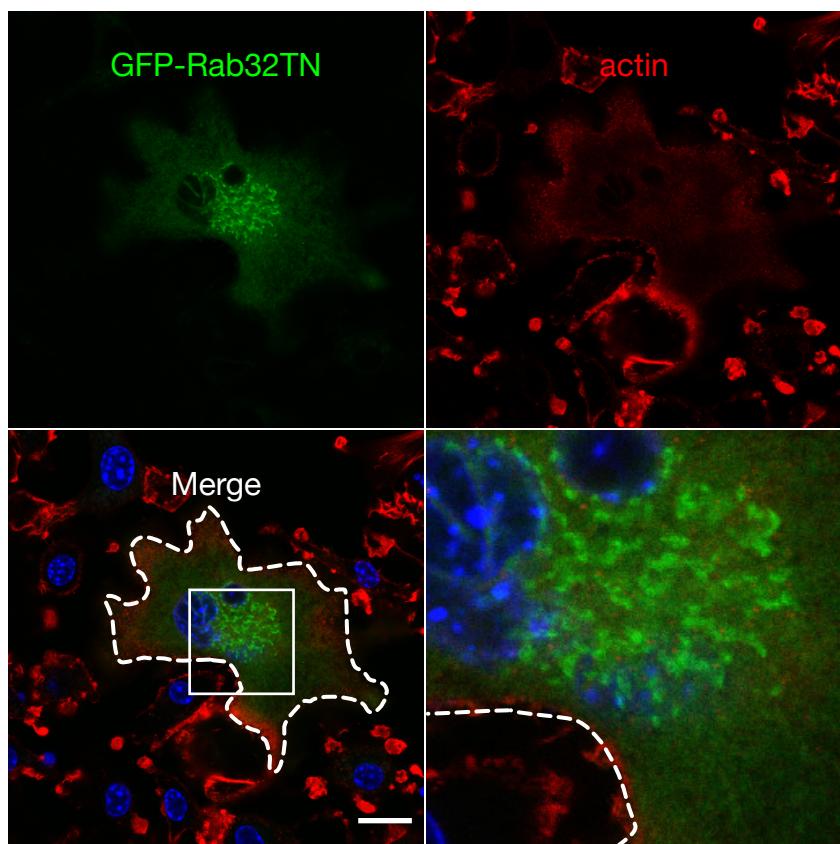


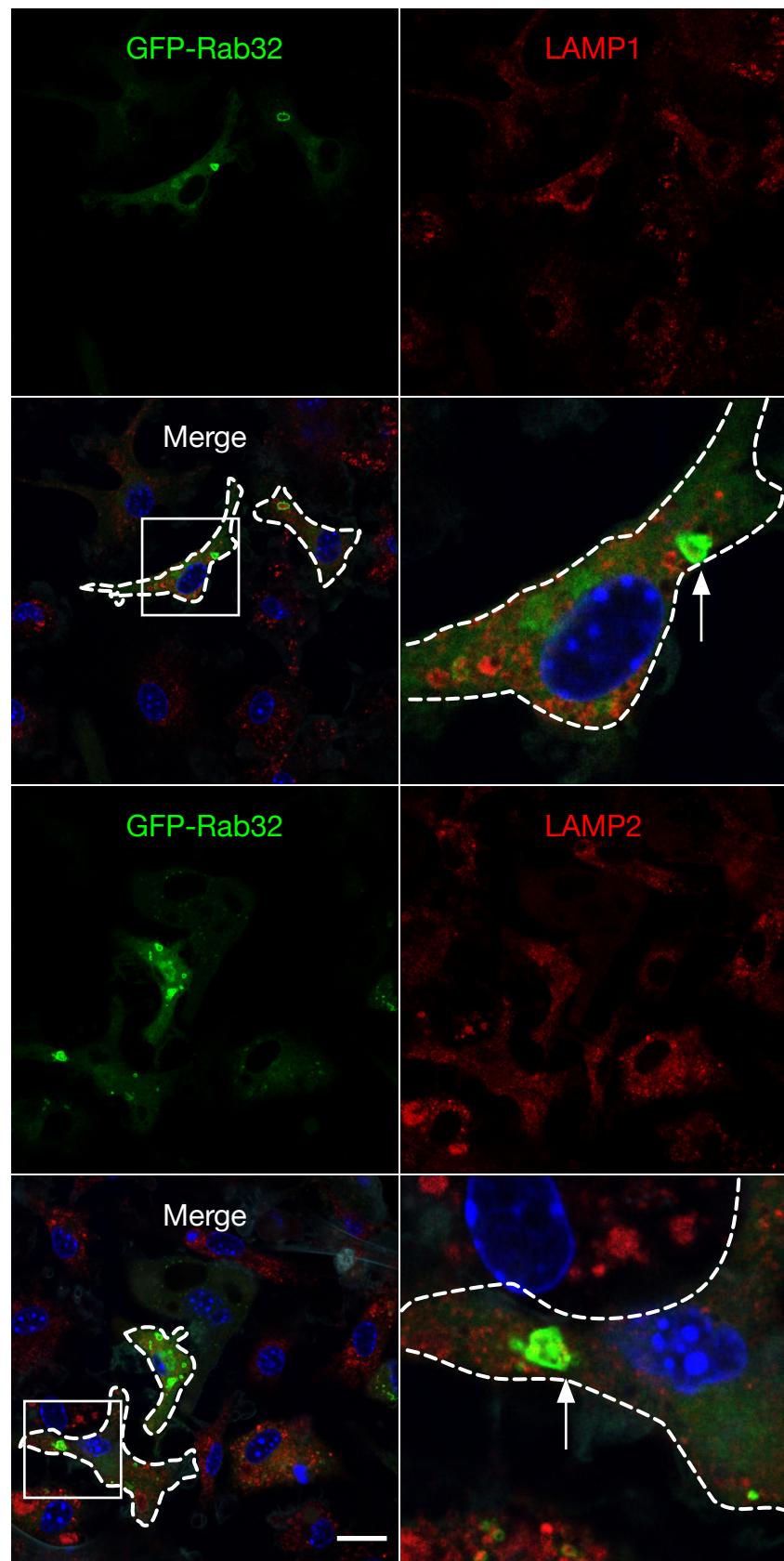
図12 Rab32恒常的不活性化型変異体では、点状及びリング状の局在が消滅する

A. マクロファージにGFP-Rab32TNを遺伝子導入した。固定後、ゴルジ体マーカーであるGM130抗体で染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは25 μ m。

B. マクロファージにGFP-Rab32TNを遺伝子導入し、RANKL刺激により破骨細胞に分化誘導を行った。固定後、アクチンで染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは25 μ m。

図13-1

A.



B.

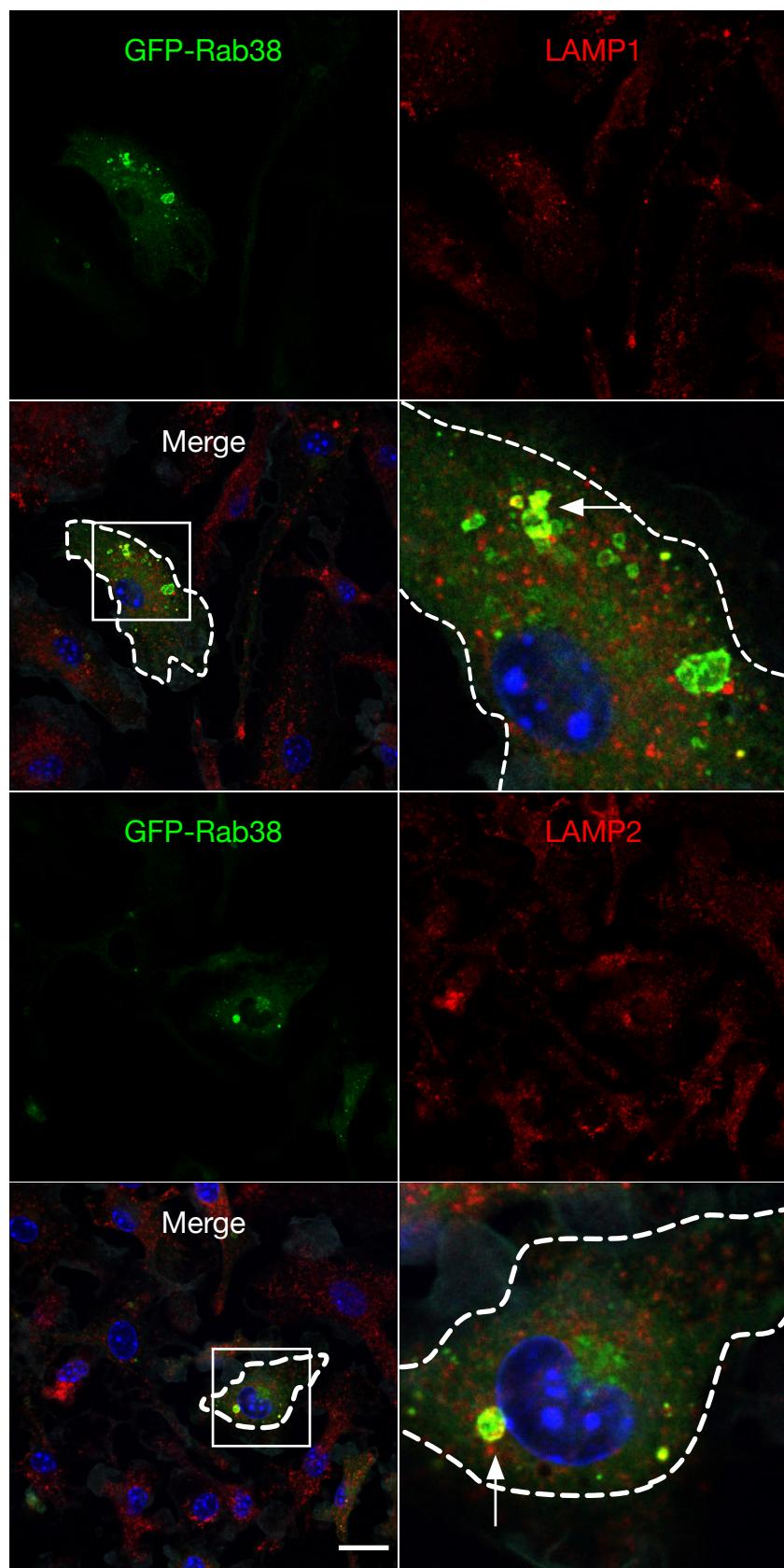


図13-2 マクロファージにおいてRab32/38とLAMP1/2は一部共局在する
マクロファージにGFP-Rab32もしくはGFP-Rab38を遺伝子導入し、固定
後、リソソームマーカーであるLAMP1もしくはLAMP2抗体で染色し、共焦点蛍
光顕微鏡で観察した。矢印は共局在を示す。スケールバーは25 μm。

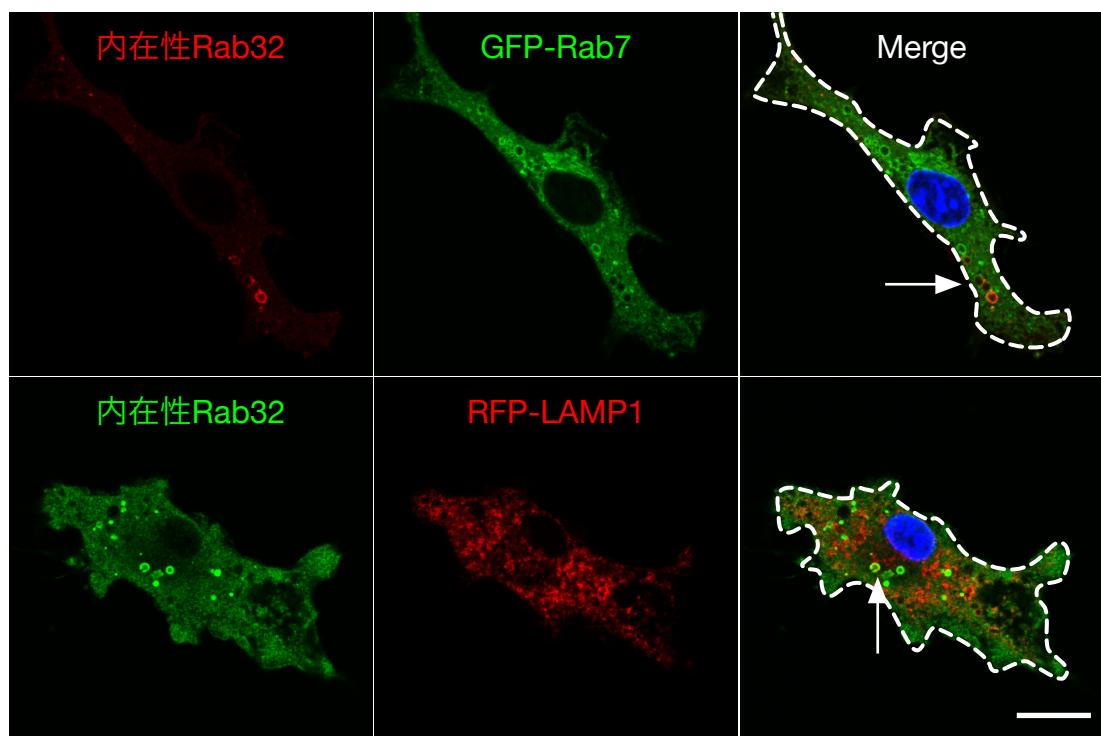
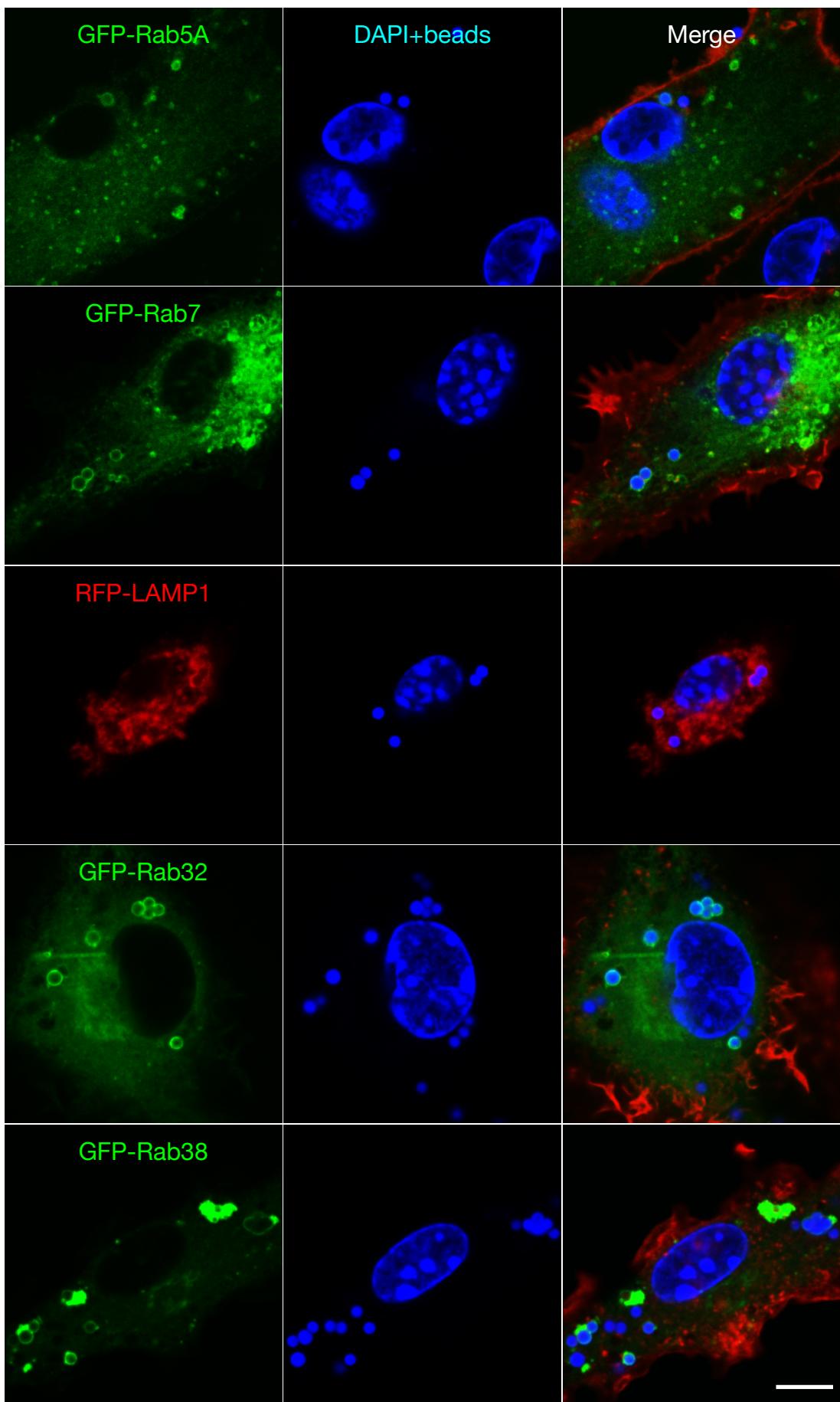


図14 マクロファージにおいて内在性Rab32はGFP-Rab7やRFP-LAMP1と一部共局在する

GFP-Rab7もしくはRFP-LAMP1を遺伝子導入したマクロファージをRab32抗体で染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。矢印は共局在を示す。スケールバーは25 μ m。

図15-1

A.



B.

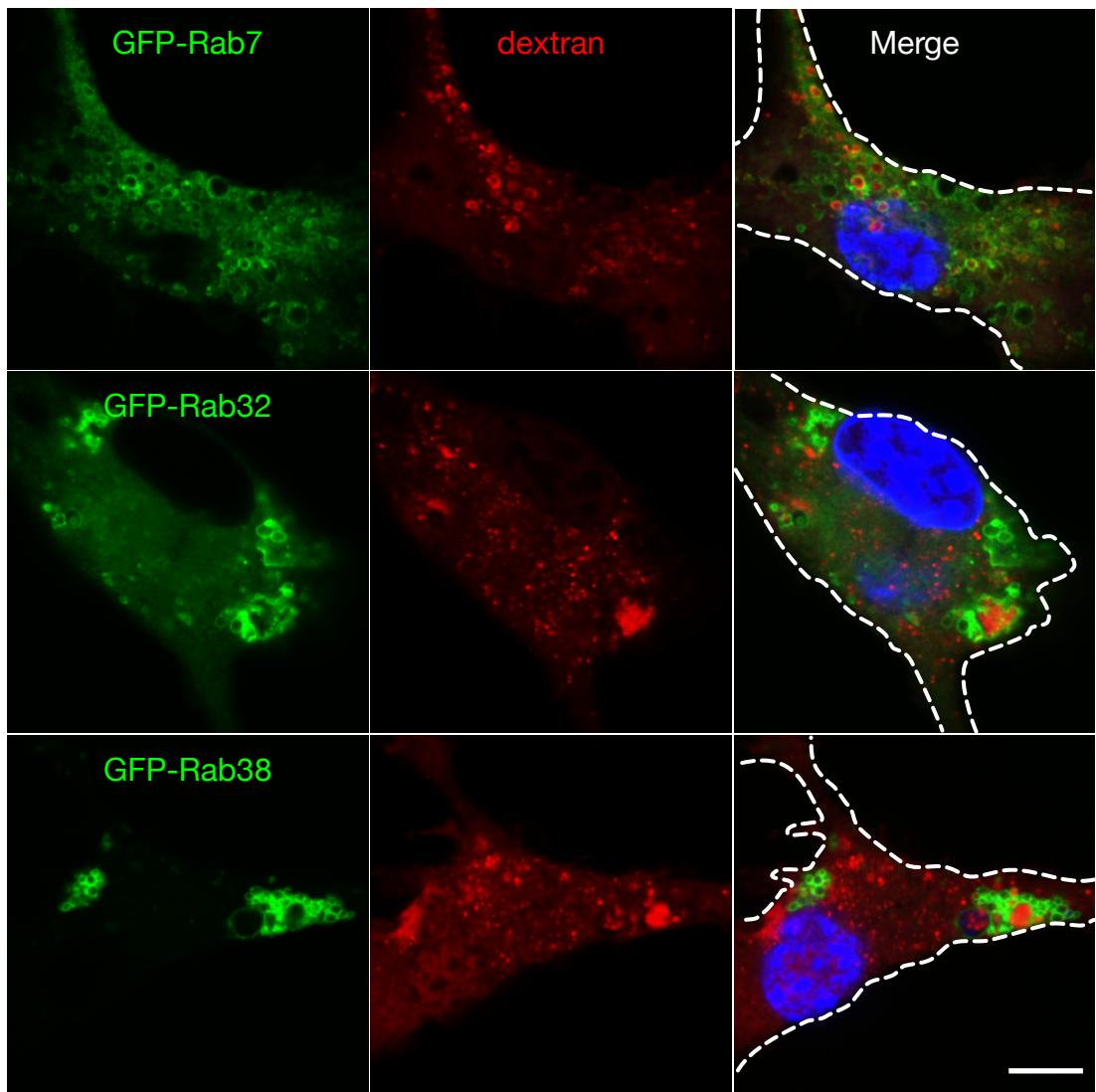


図15-2 Rab32/38陽性オルガネラ内部に蛍光ビーズ及び蛍光色素が局在する

- A. 全5種類のウィルスをそれぞれ遺伝子導入したマクロファージ培養液中に蛍光ビーズを添加し、90分後固定を行い共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは10 μ m。
- B. 全3種類のウィルスをそれぞれ遺伝子導入したマクロファージ培養液中に蛍光色素デキストランを添加し、30分後固定を行い共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは10 μ m。

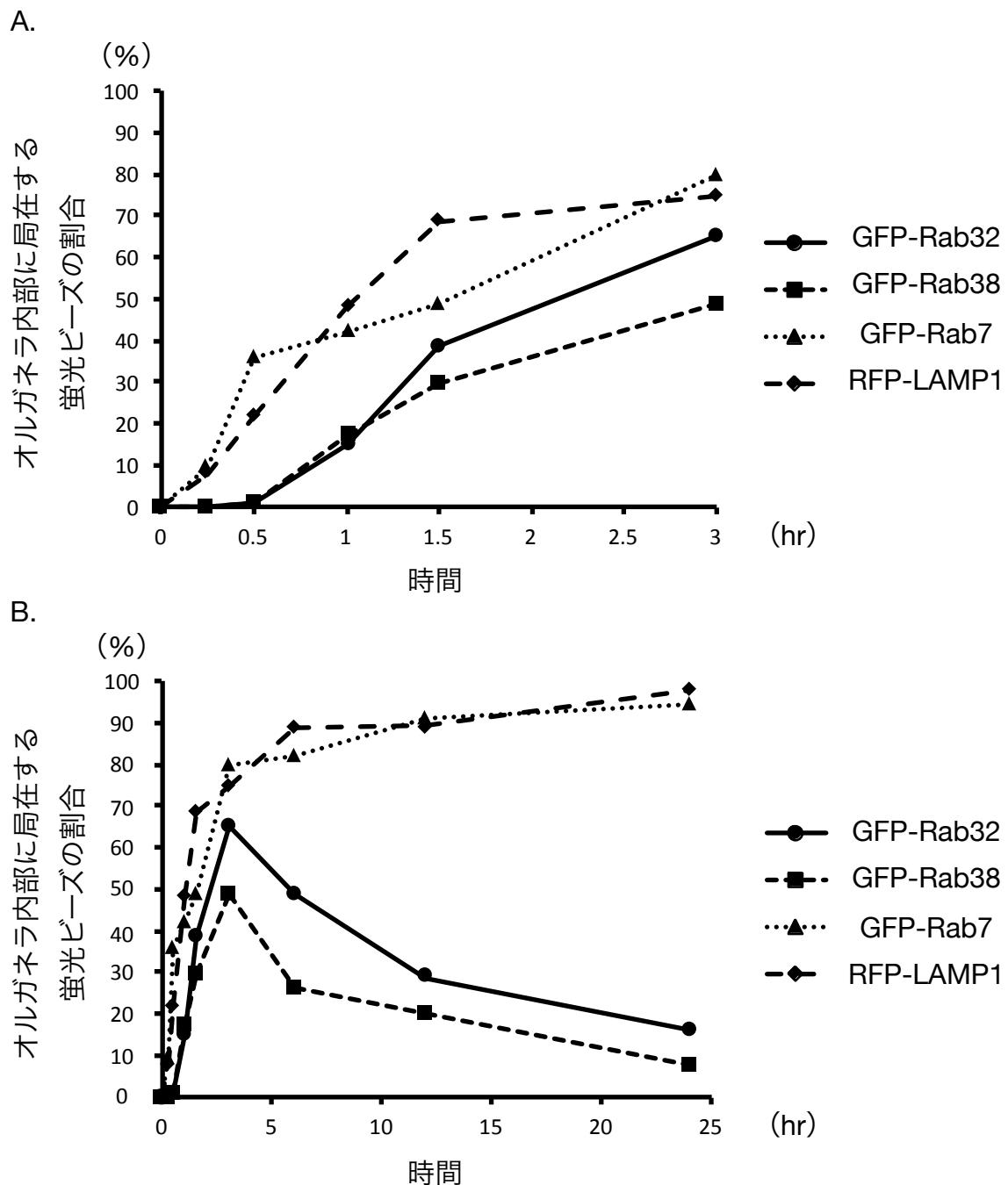


図16 Rab32/38陽性オルガネラ内部に局在する蛍光ビーズの割合は3時間以降減少する

A. B. マクロファージにGFP-Rab7、Rab32、Rab38、RFP-LAMP1をそれぞれ遺伝子導入し、固定の15、30、60、90分、3、6、12、24時間前にそれぞれ培地中に蛍光ビーズを添加した。固定後、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。それぞれ10細胞を観察した。縦軸にオルガネラ内部に局在する蛍光ビーズの割合を、横軸に時間をプロットした。

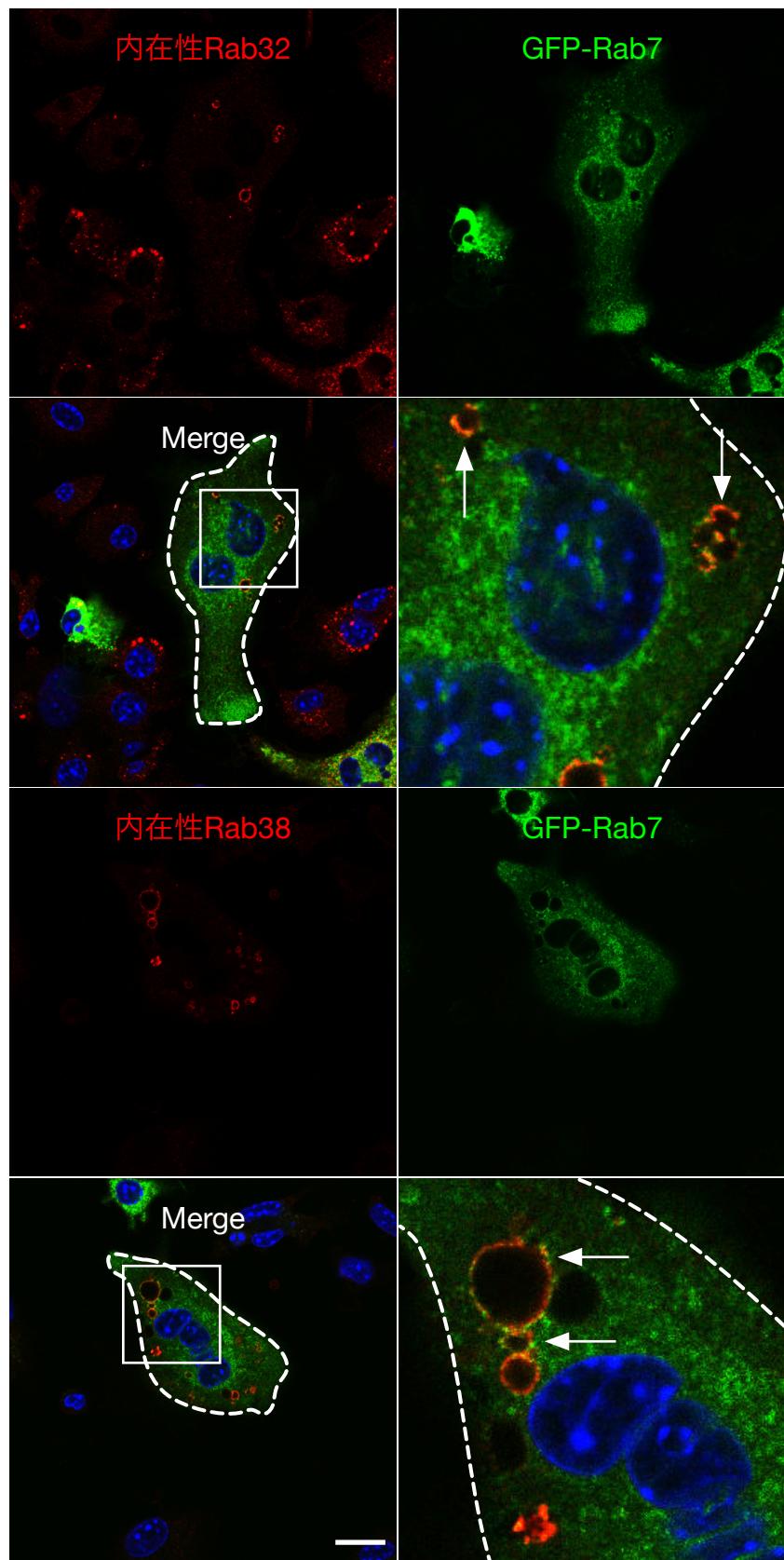


図17 破骨細胞において内在性Rab32/38はGFP-Rab7と一部共局在する
 マクロファージにGFP-Rab7を遺伝子導入し、RANKL刺激により破骨細胞に分化誘導を行った。固定後、Rab32及びRab38抗体で染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。矢印は共局在を示す。スケールバーは25 μm。

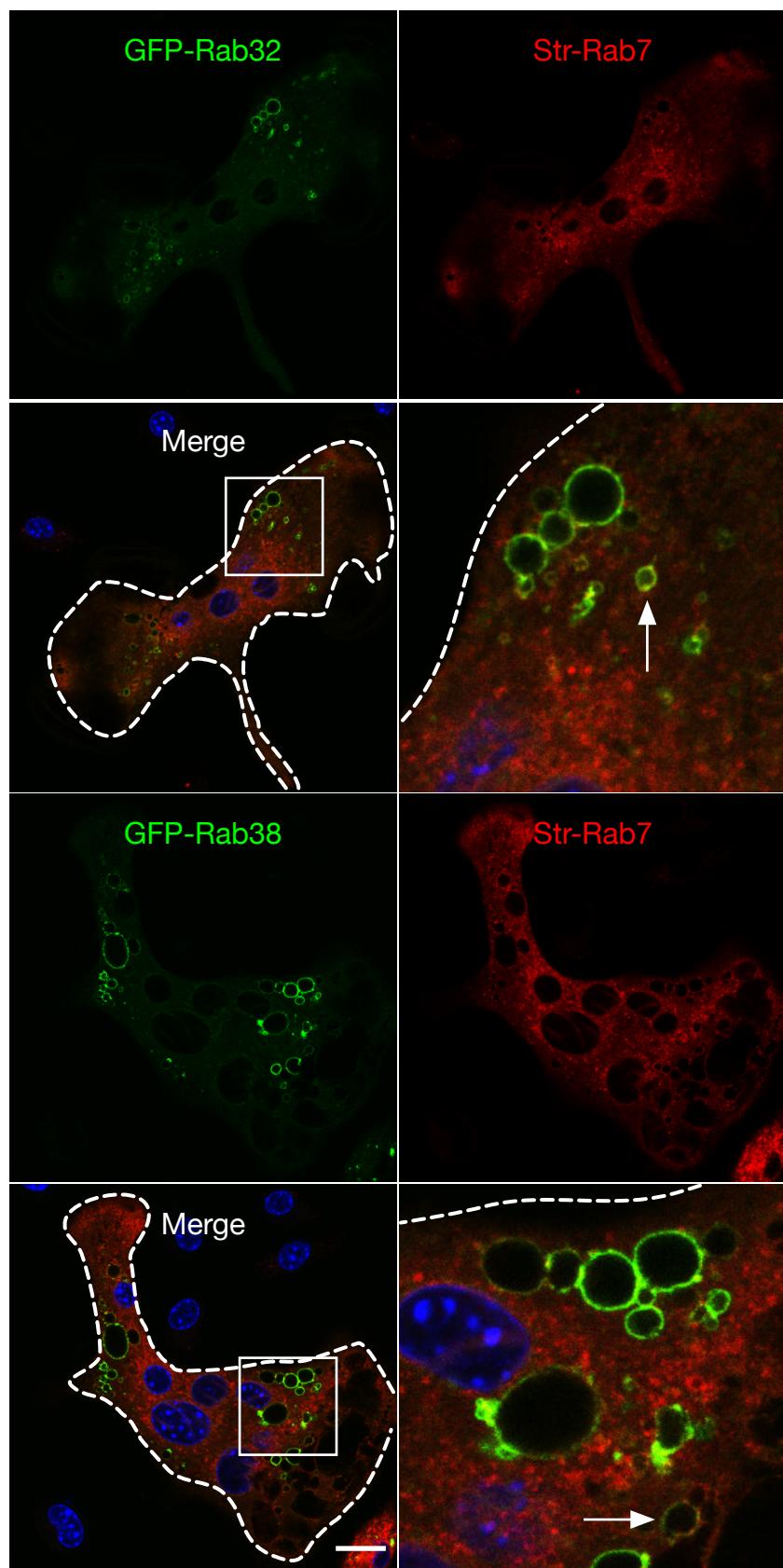


図18 破骨細胞においてGFP-Rab32/38とStr-Rab7は一部のみ共局在する
 マクロファージにGFP-Rab32/38とStr-Rab7を二種類同時に遺伝子導入し、
 RANKL刺激により破骨細胞に分化誘導を行った。固定後共焦点蛍光顕微鏡で観
 察した。矢印は共局在を示す。スケールバーは25 μm。

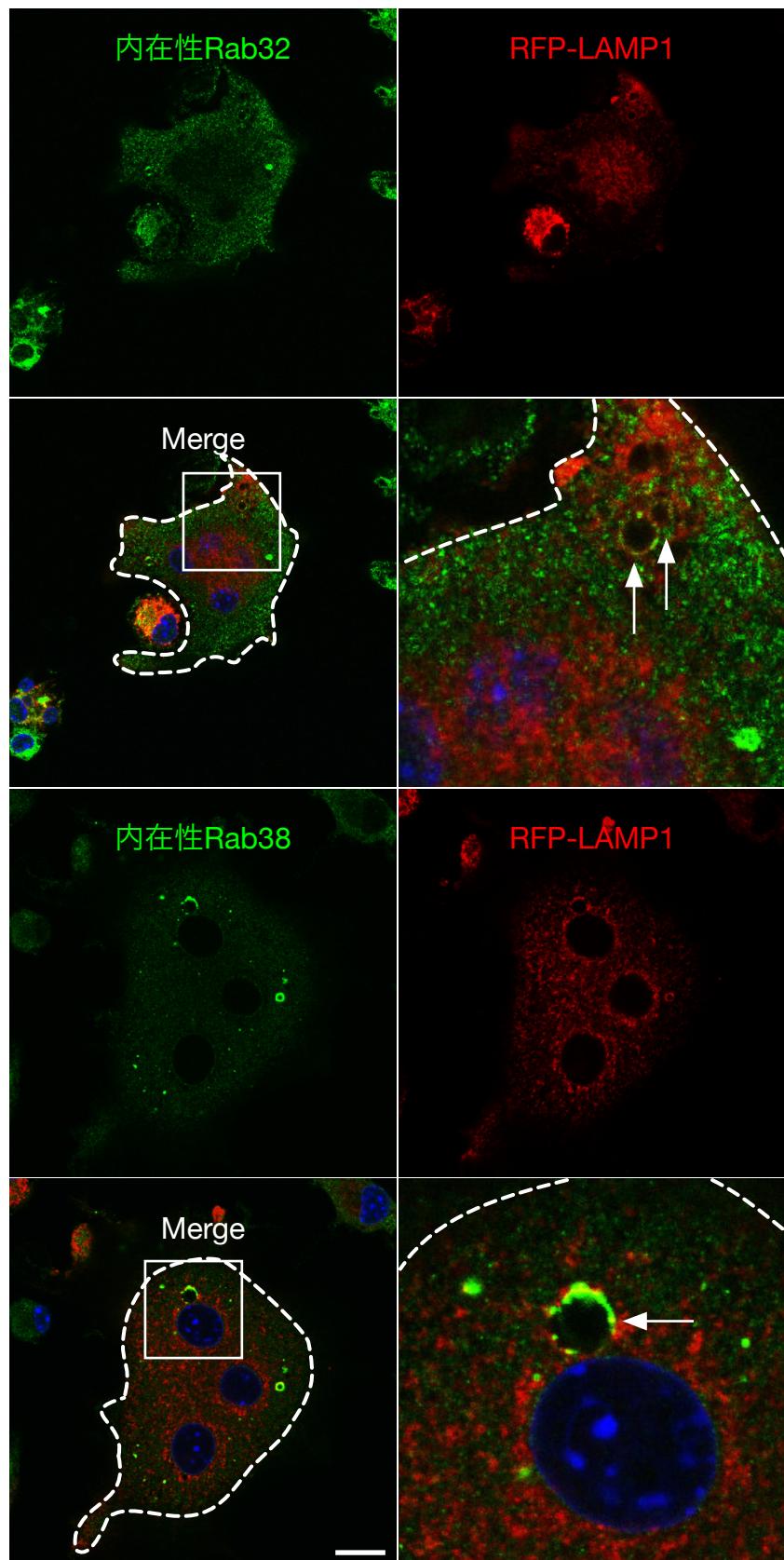
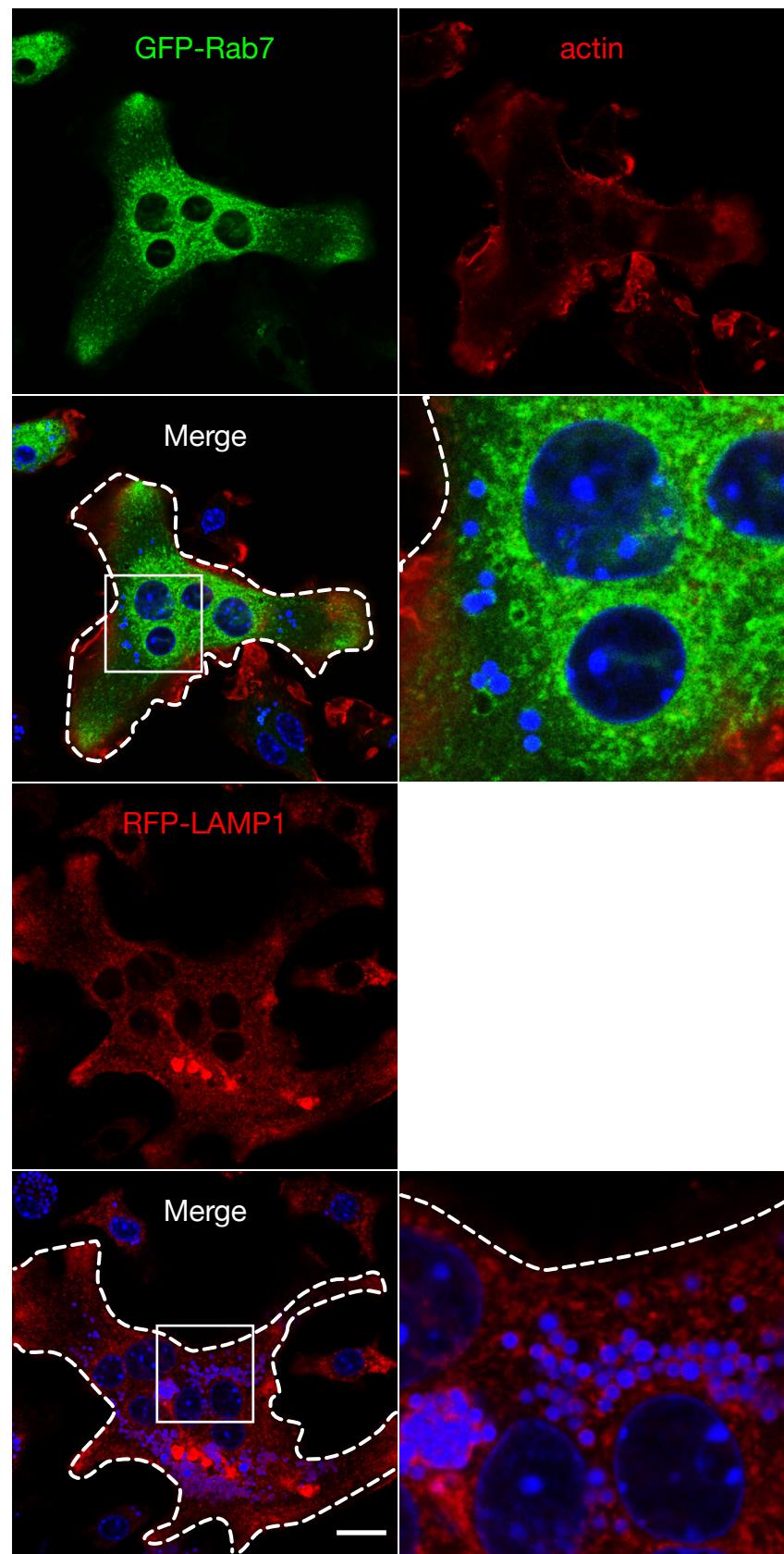


図19 破骨細胞において内在性Rab32/38はRFP-LAMP1と大部分共局在する
マクロファージにRFP-LAMP1を遺伝子導入し、RANKL刺激により破骨細胞
に分化誘導を行った。固定後、Rab32及びRab38抗体で染色し、共焦点蛍光顕
微鏡で観察した。矢印は共局在を示す。スケールバーは25 μ m。

図20-1



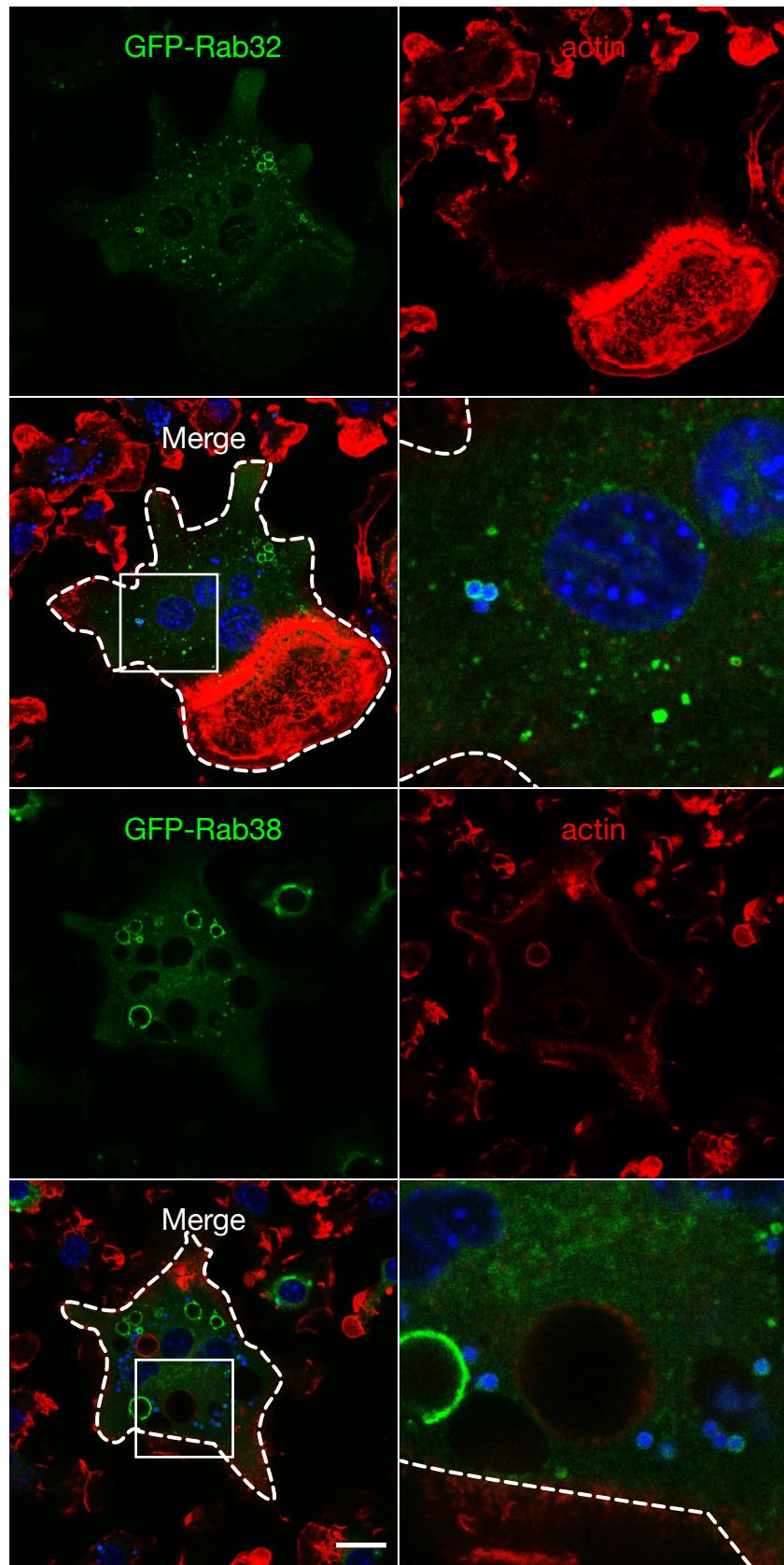


図20-2 破骨細胞で一部の蛍光ビーズがGFP-Rab32/38陽性オルガネラ内部に局在する

マクロファージに全4種類のウィルスをそれぞれ遺伝子導入し、RANKL刺激開始時に蛍光ビーズを添加した上で、破骨細胞に分化誘導した。固定後、アクチンで染色し共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは25 μm。

A. 単核破骨細胞

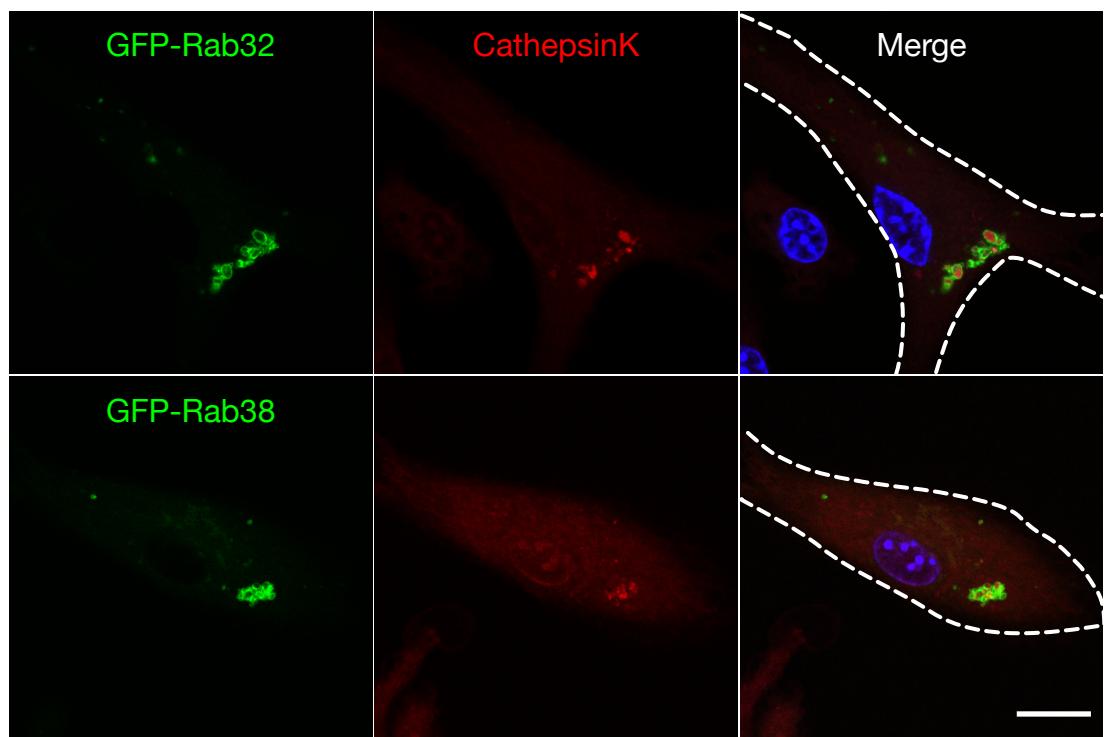
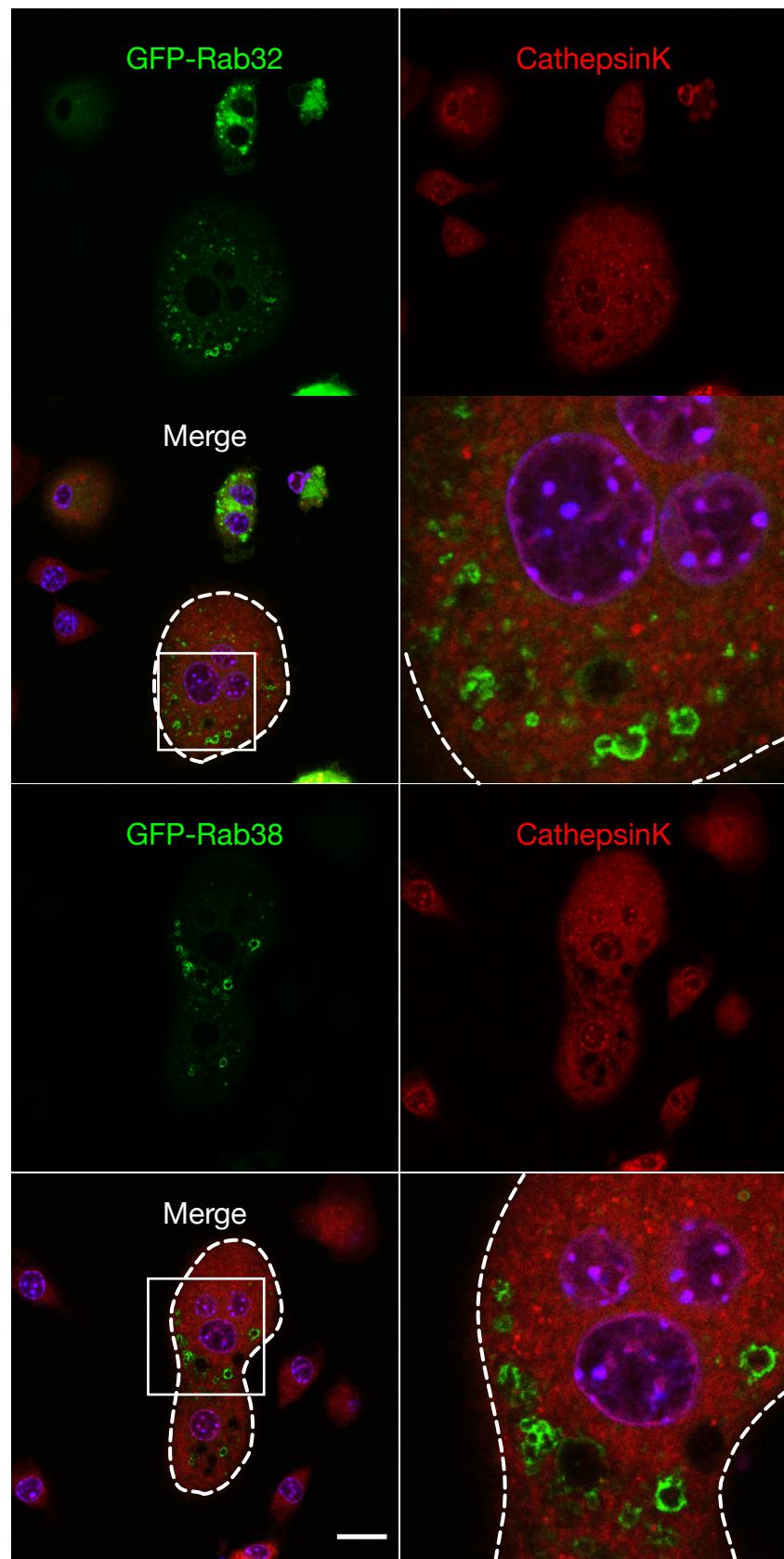


図21-1 破骨細胞誘導後のRab32/38陽性オルガネラ内部とカテプシンKの局在性

A. B. マクロファージにGFP-Rab32/38を遺伝子導入し、RANKL刺激により破骨細胞に分化誘導を行った。固定の30分前にMagic Red CathepsinKを添加し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは25 μ m。

図21-2

B. 多核破骨細胞



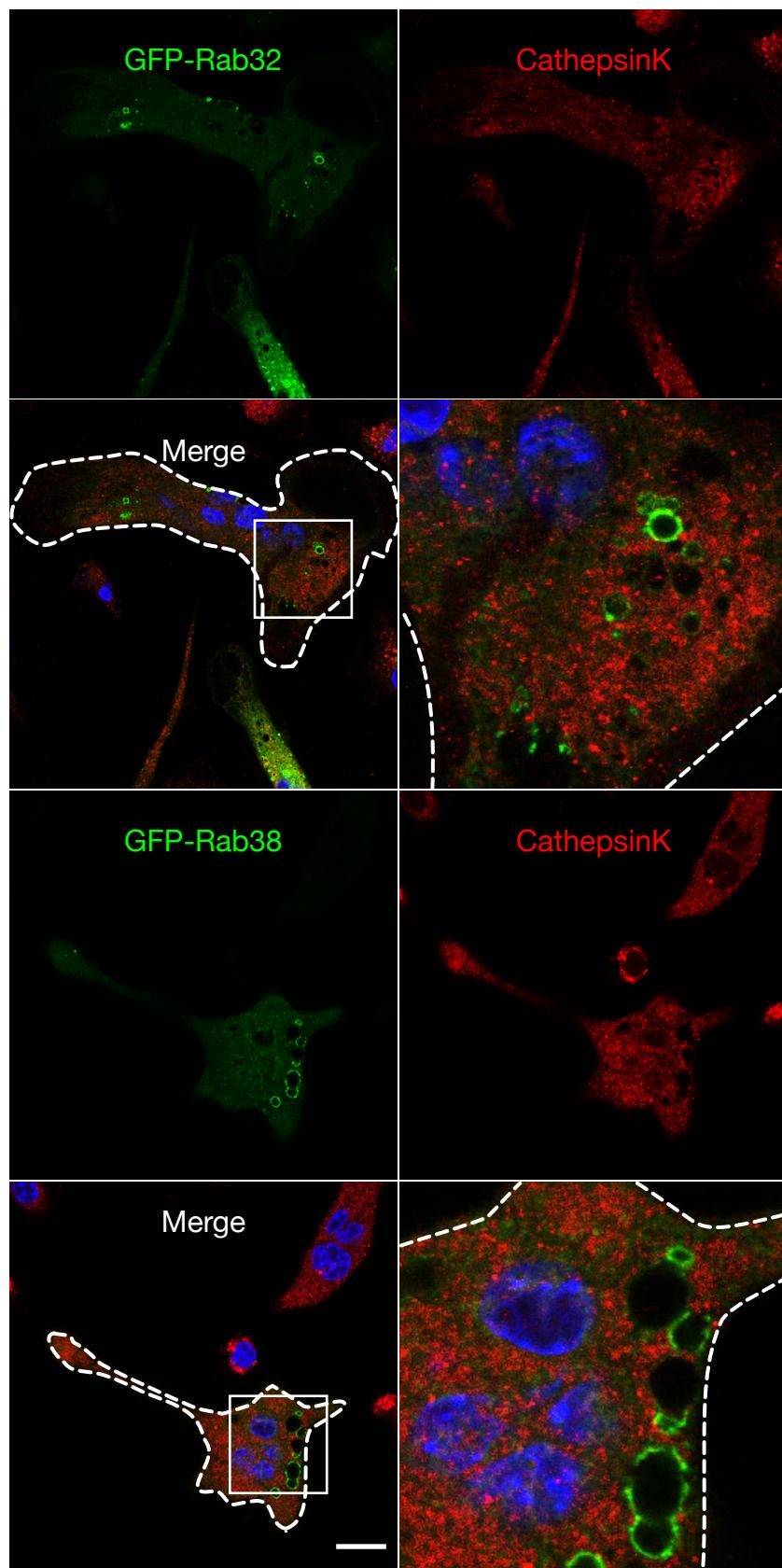


図2 2 破骨細胞において、Rab32/38陽性オルガネラ内部にカテプシンKは局在しない

マクロファージにGFP-Rab32/38を遺伝子導入し、RANKL刺激により破骨細胞に分化誘導を行った。固定後カテプシンK抗体で染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは25 μ m。

A. 単核破骨細胞

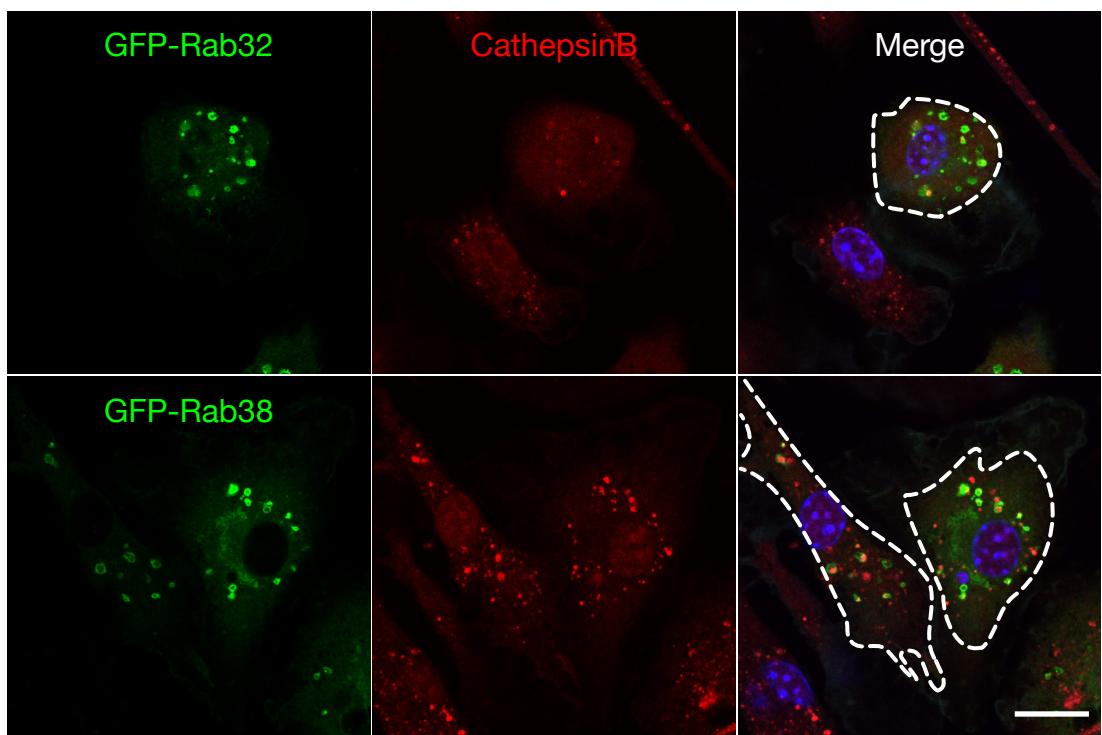
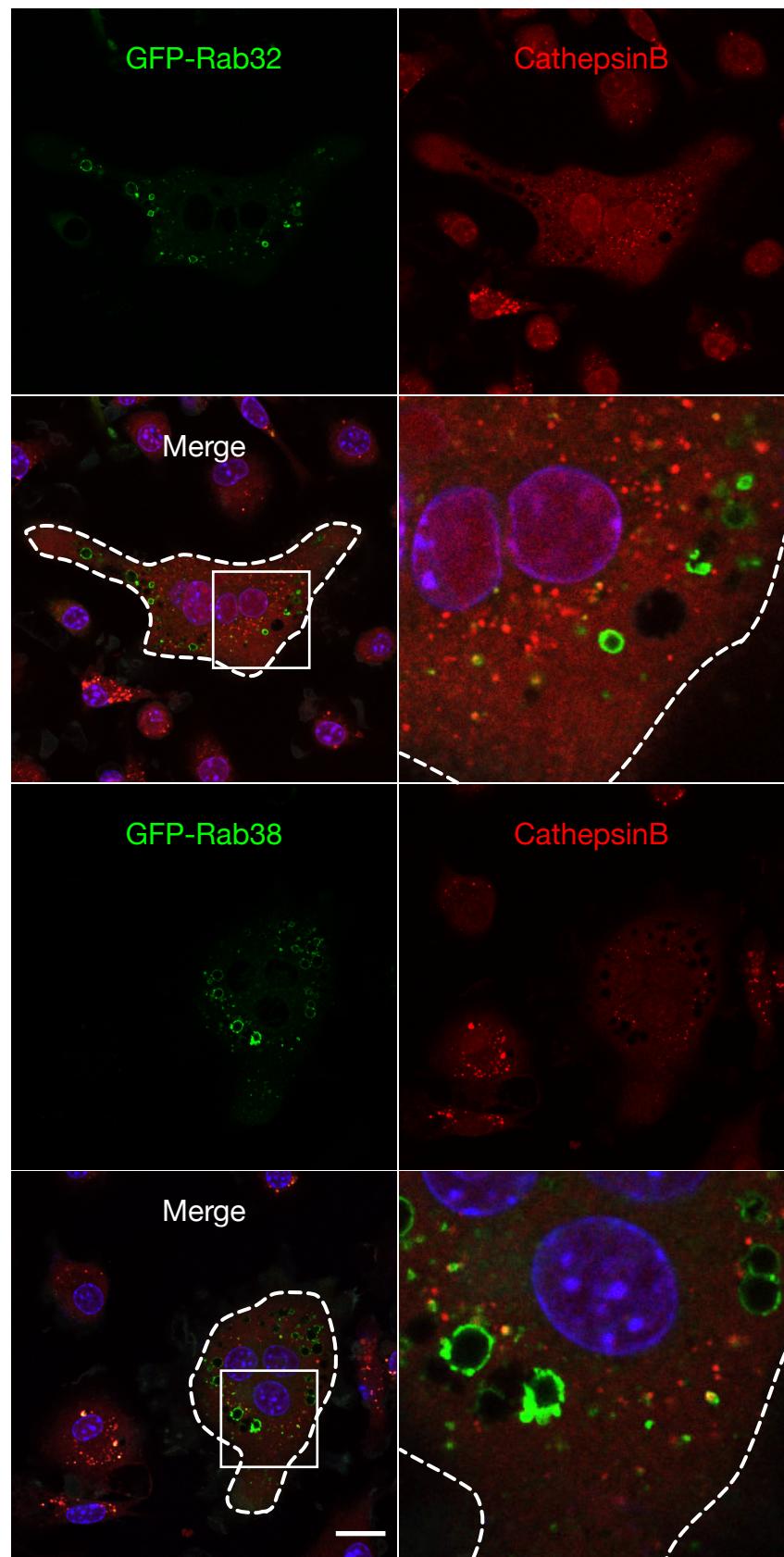


図23-1 破骨細胞誘導後のRab32/38陽性オルガネラ内部とカテプシンBの局在性

A. B. マクロファージにGFP-Rab32/38を遺伝子導入し、RANKL刺激により破骨細胞に分化誘導を行った。固定の30分前にMagic Red CathepsinBを添加し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは25 μ m。

図2 3-2

B. 多核破骨細胞



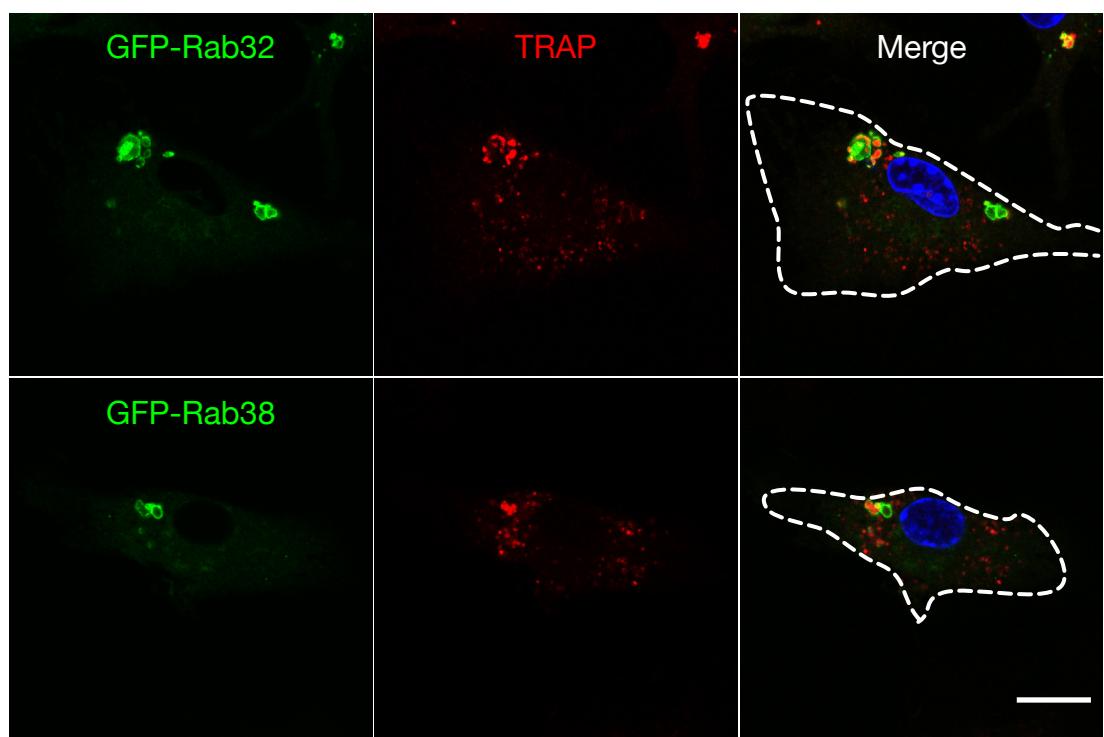


図24 RANKL刺激後のRab32/38陽性オルガネラ内部とTRAPの局在性
マクロファージにGFP-Rab32/38を遺伝子導入し、RANKL刺激を行った。固定後、TRAP抗体で染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは25 μm 。

A.

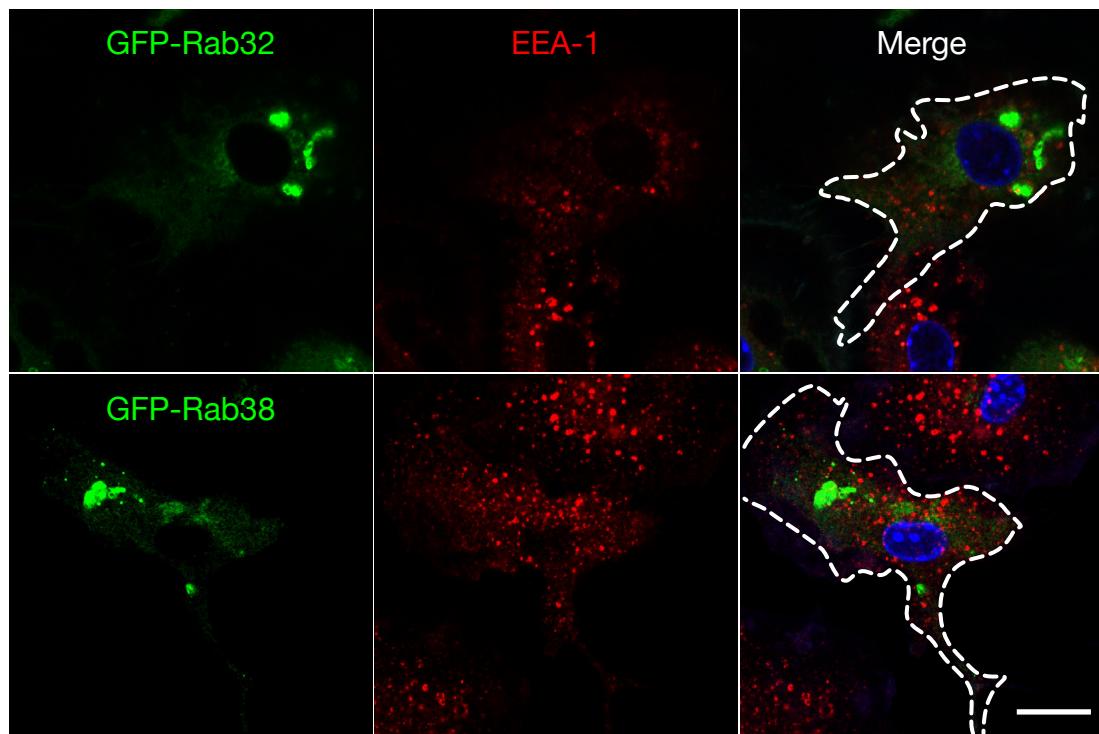


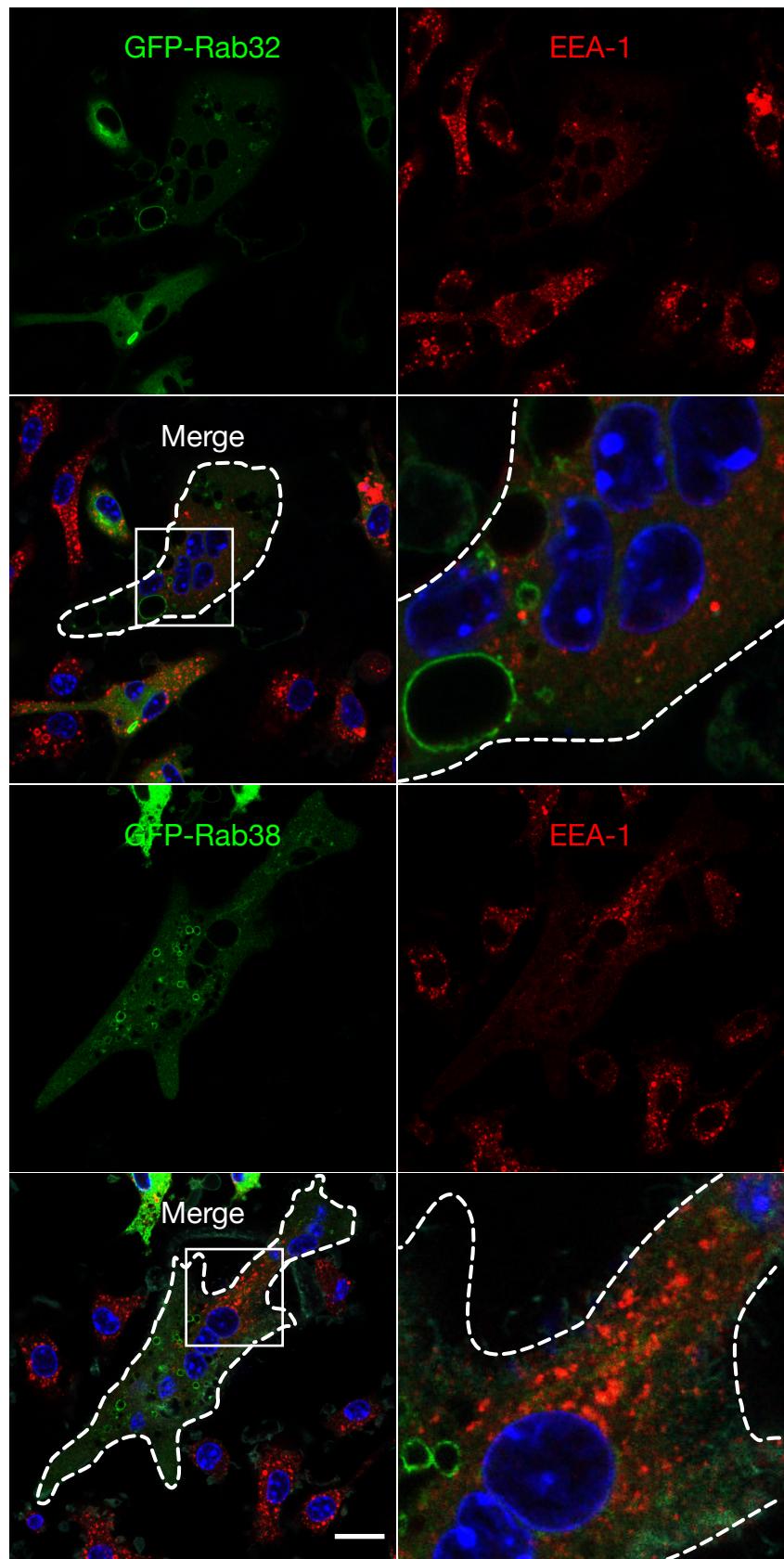
図25-1 マクロファージ及び破骨細胞において、Rab32/38は初期エンドソームと共に局在しない

A. マクロファージにGFP-Rab32/38を遺伝子導入した。固定後、初期エンドソームマーカーであるEEA-1抗体で染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは25 μ m。

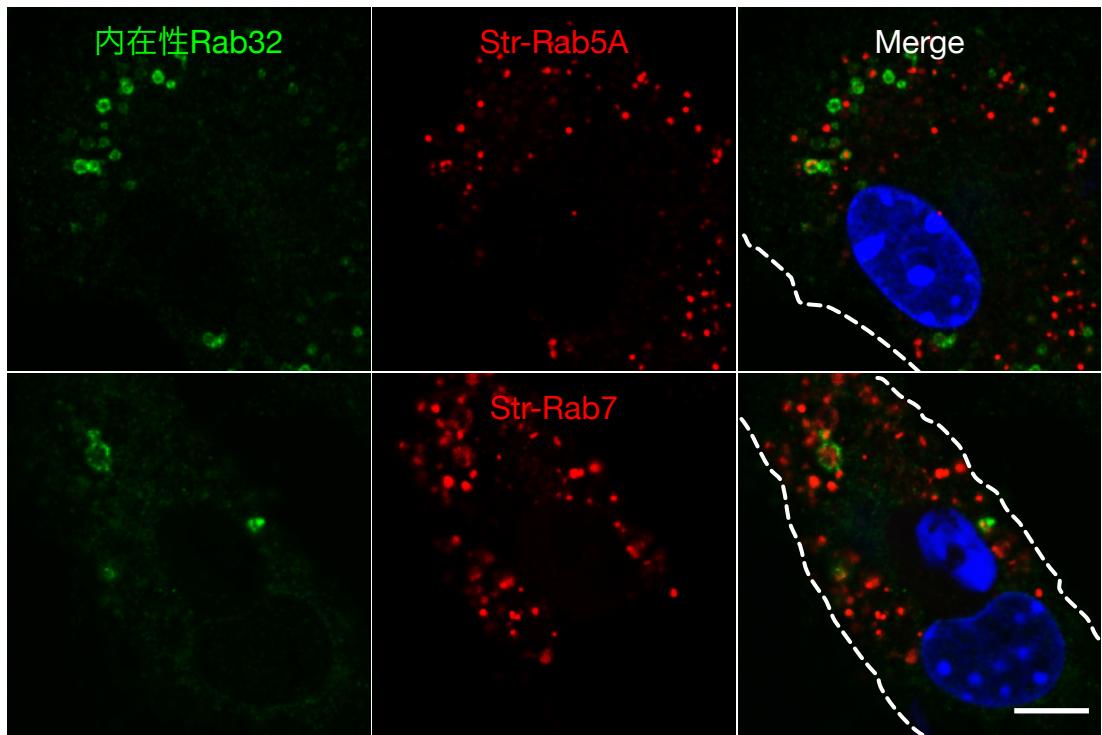
B. マクロファージにGFP-Rab32/38を遺伝子導入し、RANKL刺激により破骨細胞に分化誘導を行った。固定後、初期エンドソームマーカーであるEEA-1抗体で染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは25 μ m。

図25-2

B.



A.



B.

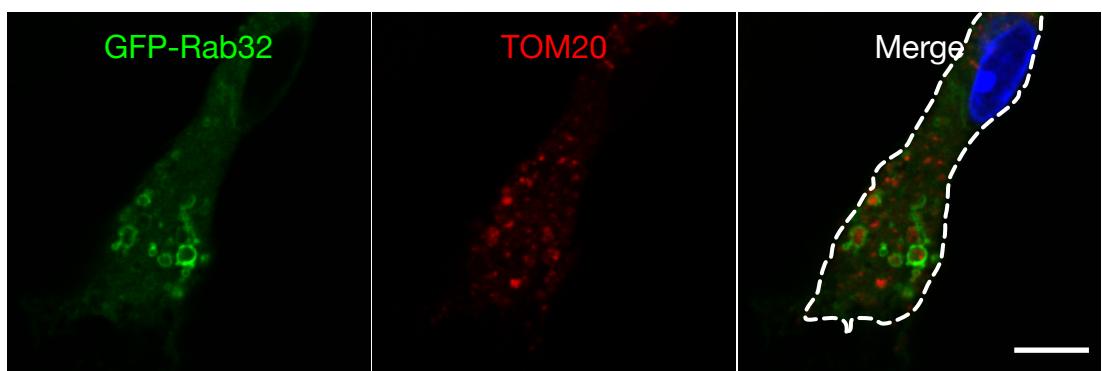
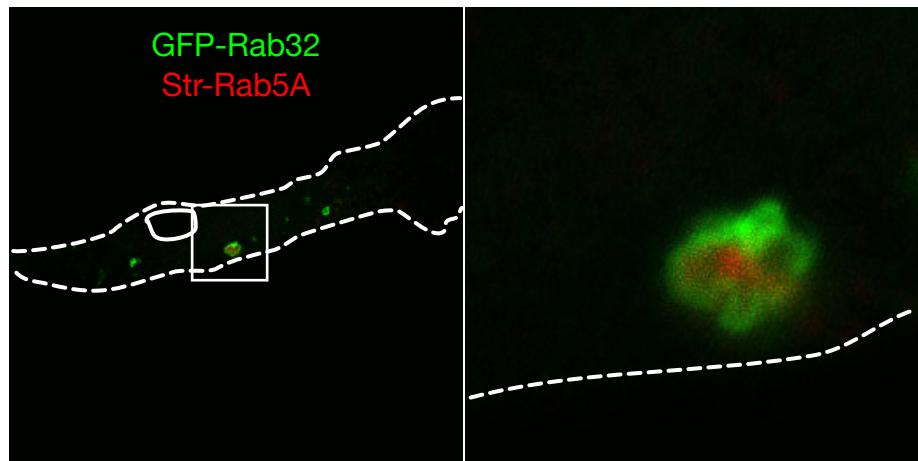


図2 6 マクロファージにおいて、Rab32陽性オルガネラ内部にエンドソーム系オルガネラ及びミトコンドリアが局在する

- A. マクロファージにStr-Rab5AもしくはStr-Rab7を遺伝子導入した。固定後、Rab32抗体で染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは10 μ m。
- B. マクロファージにGFP-Rab32を遺伝子導入した。固定後、ミトコンドリアマーカーであるTOM20抗体で染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは10 μ m。

A.

マクロファージ



B.

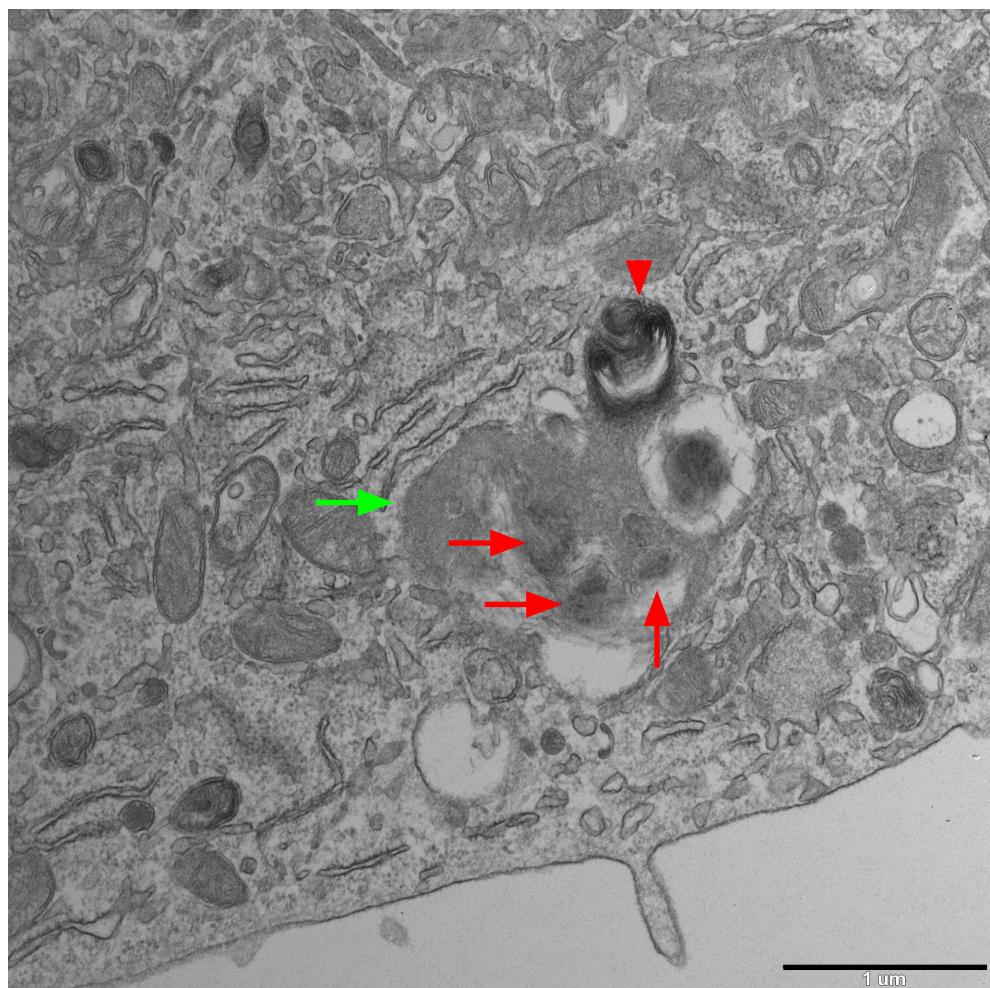
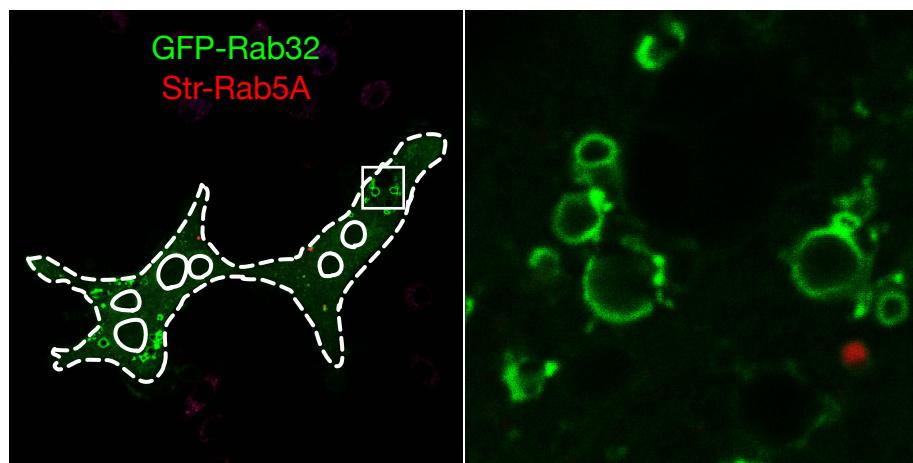


図27 Rab32陽性オルガネラ内部には様々なオルガネラが内包されている
CLEMを用いて、マクロファージに見られるRab32陽性オルガネラの内部構造を解析した。

- A. マクロファージにGFP-Rab32とStr-Rab5Aを同時に遺伝子導入した。固定後、共焦点蛍光顕微鏡で観察し、目的のオルガネラを抽出した。
- B. 目的としたオルガネラを電子顕微鏡で解析した。緑矢印はRab32陽性オルガネラ、赤矢印は内部に局在する構造物、赤矢頭は後期エンドソームを示す。スケールバーは1 μm。

A.

破骨細胞



B.

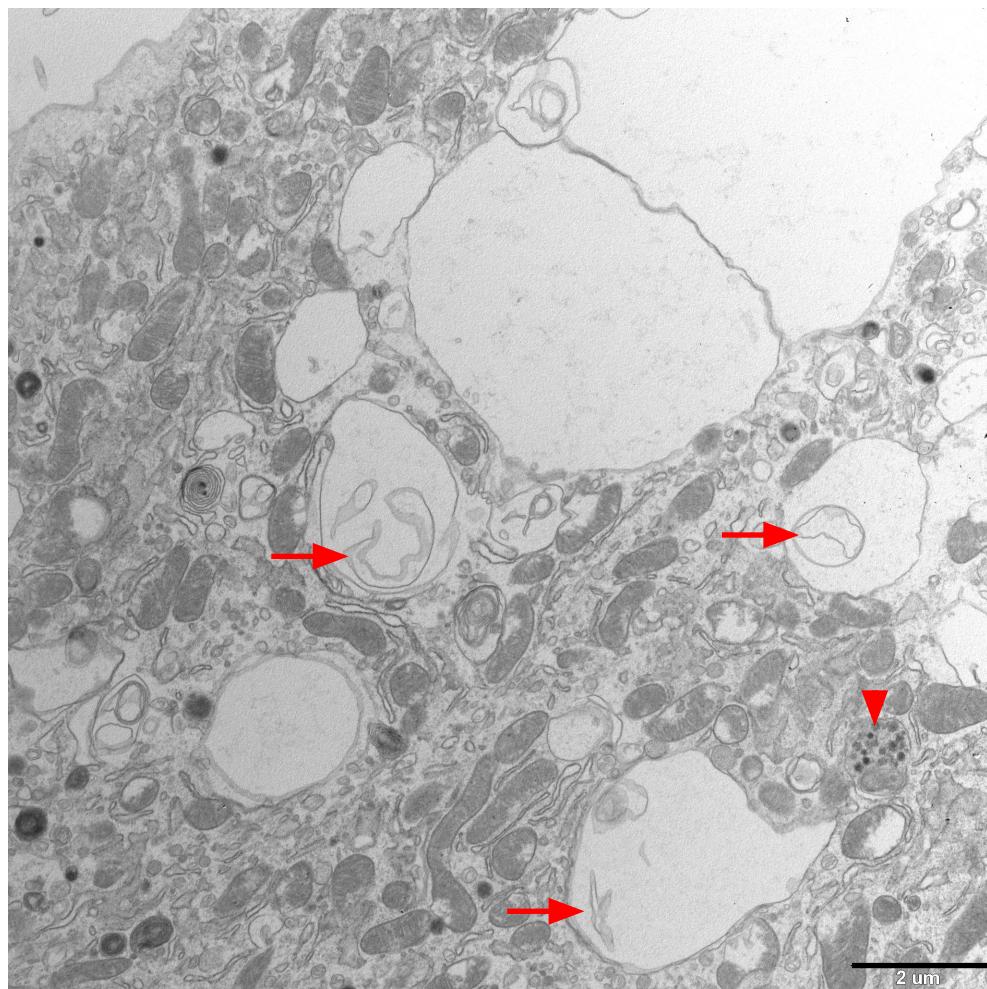


図28 Rab32陽性オルガネラ内部は空疎であり膜構造の残骸を認める

CLEMを用いて、破骨細胞に見られるRab32陽性オルガネラの内部構造を解析した。

A. マクロファージにGFP-Rab32とStr-Rab5Aを同時に遺伝子導入し、RANKL刺激により破骨細胞に分化誘導を行った。固定後、共焦点蛍光顕微鏡で観察し、目的のオルガネラを抽出した。

B. 目的としたオルガネラを電子顕微鏡で解析した。赤矢印は内部に局在する構造物、赤矢頭はStr-Rab5Aが局在するRab32陽性オルガネラを示す。スケールバーは2 μm。

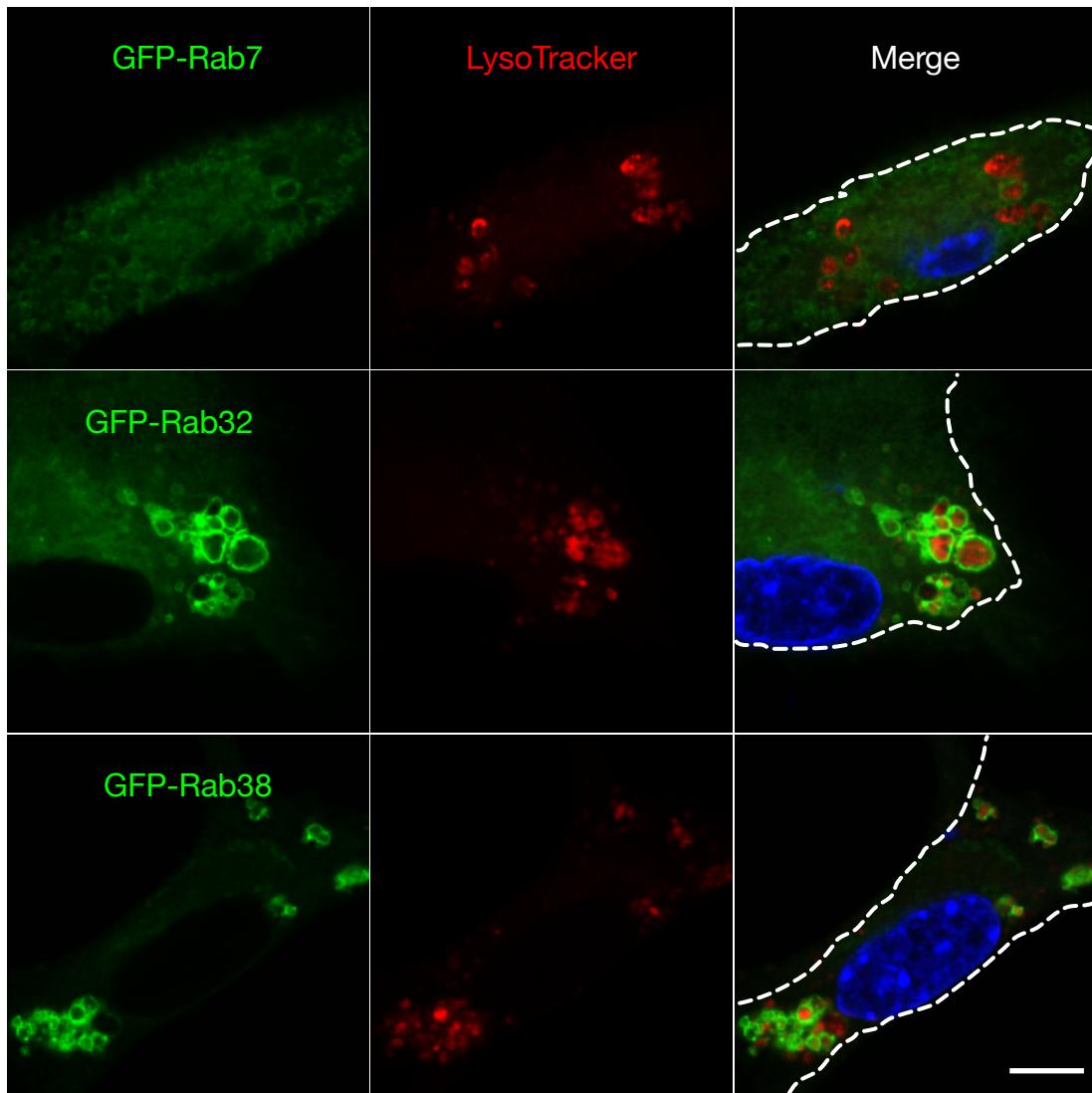


図29 Rab32/38陽性オルガネラは酸性の性質を示す

GFP-Rab7、GFP-Rab32及びGFP-Rab38をそれぞれ遺伝子導入したマクロファージ培養液中にLysoTracker 1 μ M添加した。2時間後固定を行い、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは10 μ m。

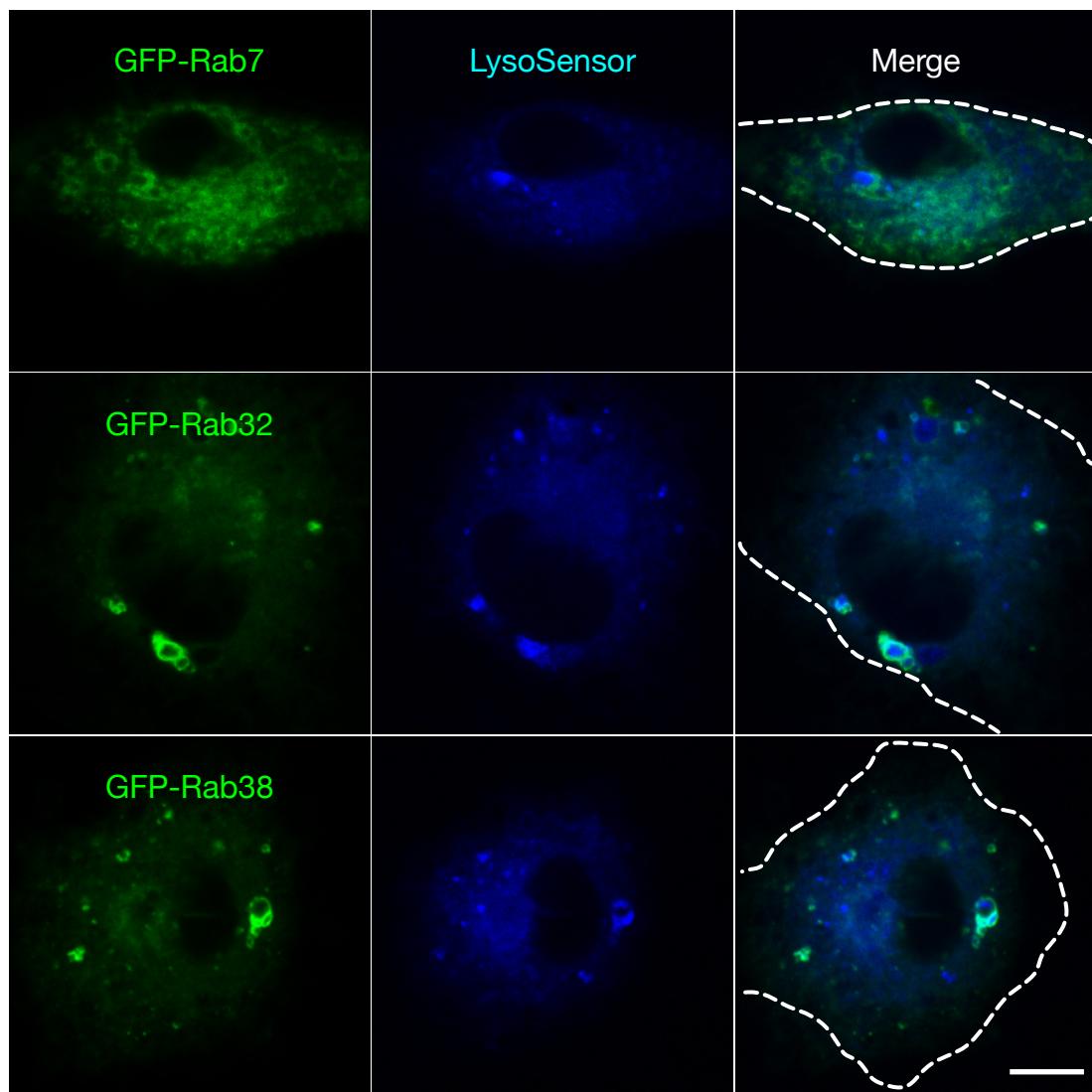


図30 Rab32/38陽性オルガネラは酸性の性質を示す

GFP-Rab7、GFP-Rab32及びGFP-Rab38をそれぞれ遺伝子導入したマクロファージ培養液中にLysoSensor Blue 4 μ M添加した。2時間後固定を行い、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは10 μ m。

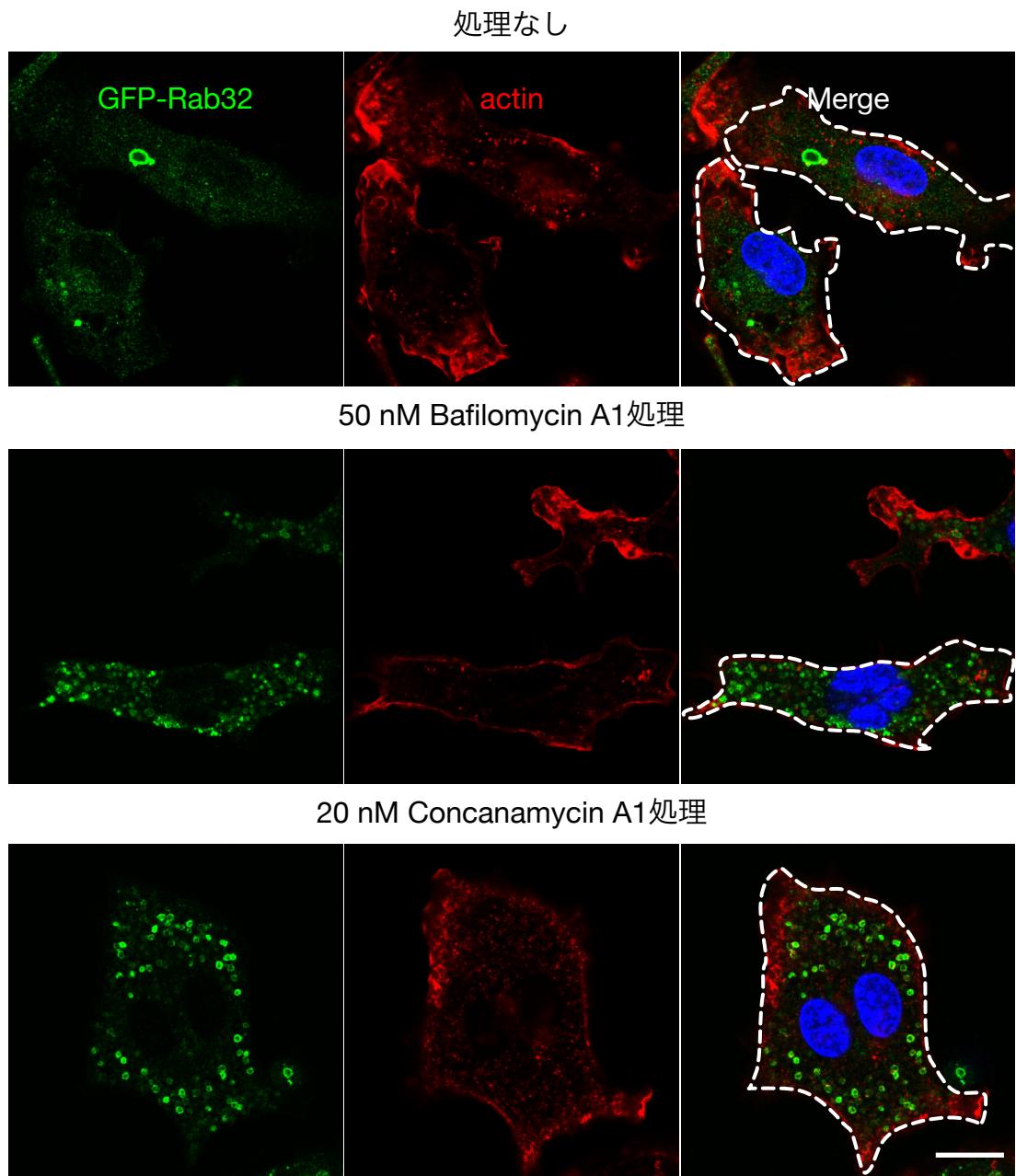


図3.1 マクロファージにV-ATPase阻害剤を添加するとRab32陽性オルガネラの数が増加する

マクロファージにGFP-Rab32を遺伝子導入し、50 nM Bafilomycin A1もしくは20 nM Concanamycin A1を添加し、24時間培養した。固定後、アクチンで染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは25 μ m。

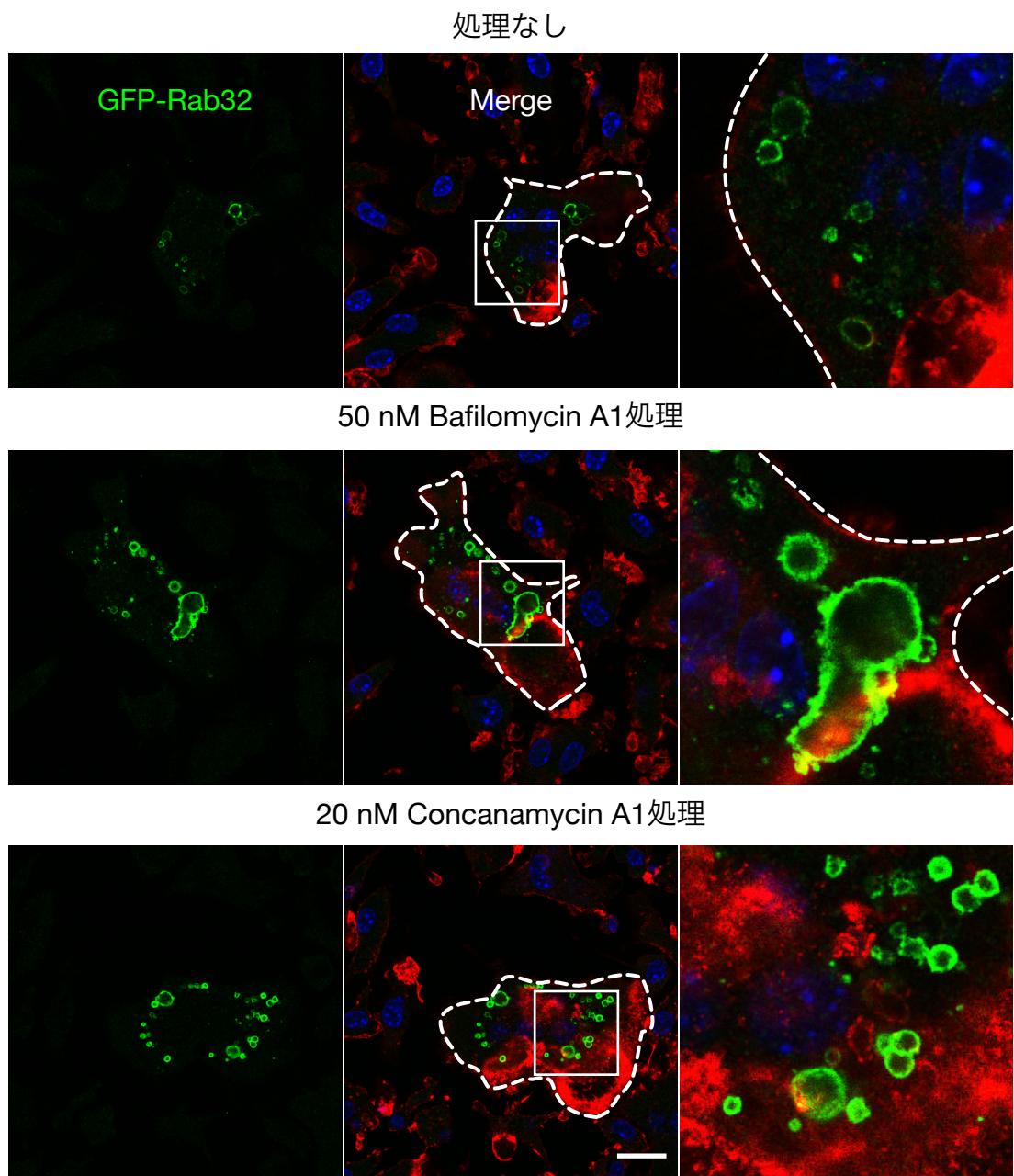


図3-2 破骨細胞にV-ATPase阻害剤を添加するとRab32陽性オルガネラのサイズが増大する

マクロファージにGFP-Rab32を遺伝子導入し、RANKL刺激により破骨細胞に分化誘導を行った。50 nM Bafilomycin A1もしくは20 nM Concanamycin A1を添加し、24時間培養し、固定後アクチンで染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。赤はアクチン。スケールバーは25 μ m。

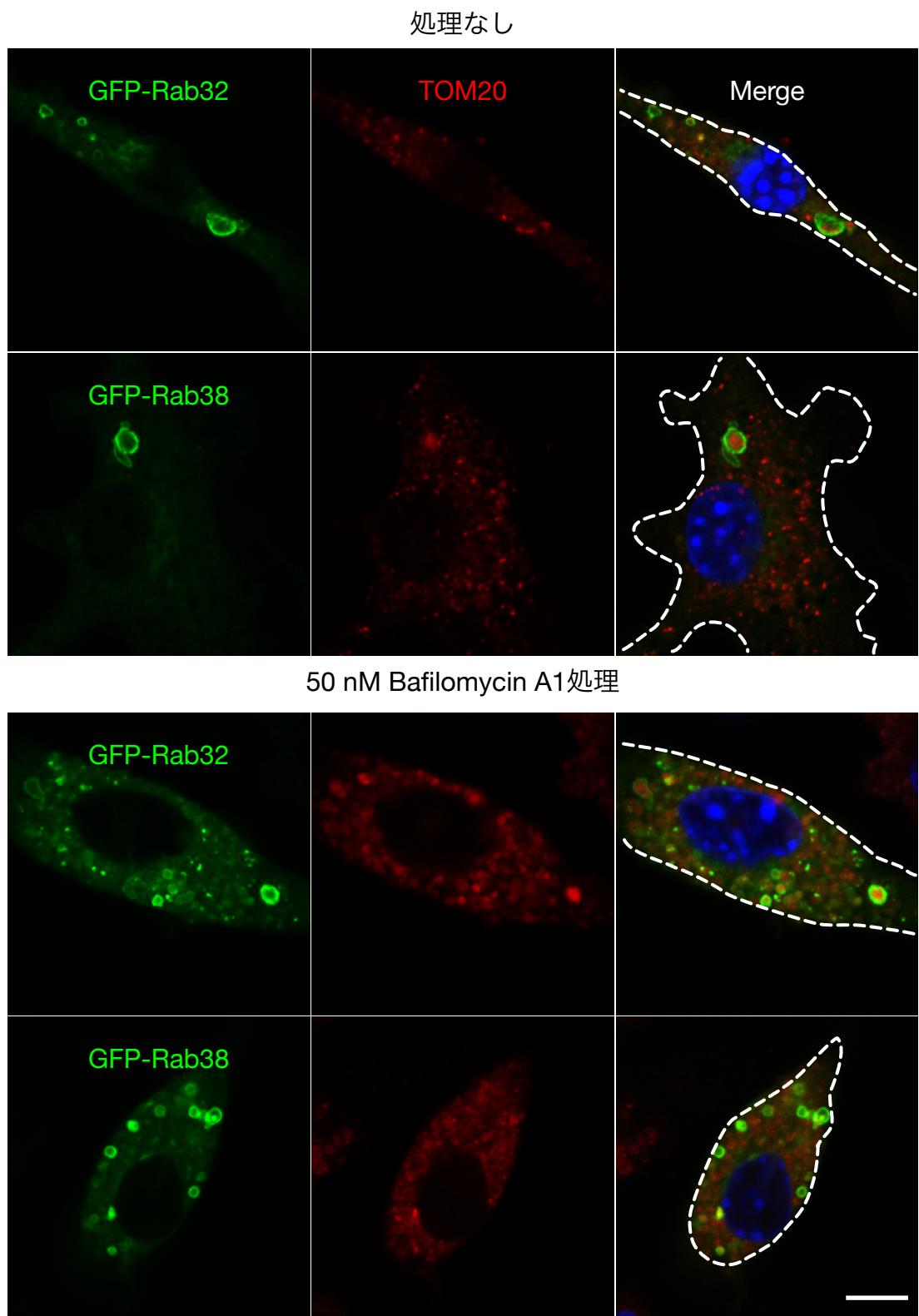


図3 3 マクロファージにV-ATPase阻害剤を添加するとRab32/38陽性オルガネラ内部に局在するミトコンドリアが増加する

マクロファージにGFP-Rab32、Rab38を遺伝子導入し、50 nM Bafilomycin A1を添加し、24時間培養した。固定後、ミトコンドリア抗体であるTOM20で染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは10 μ m。

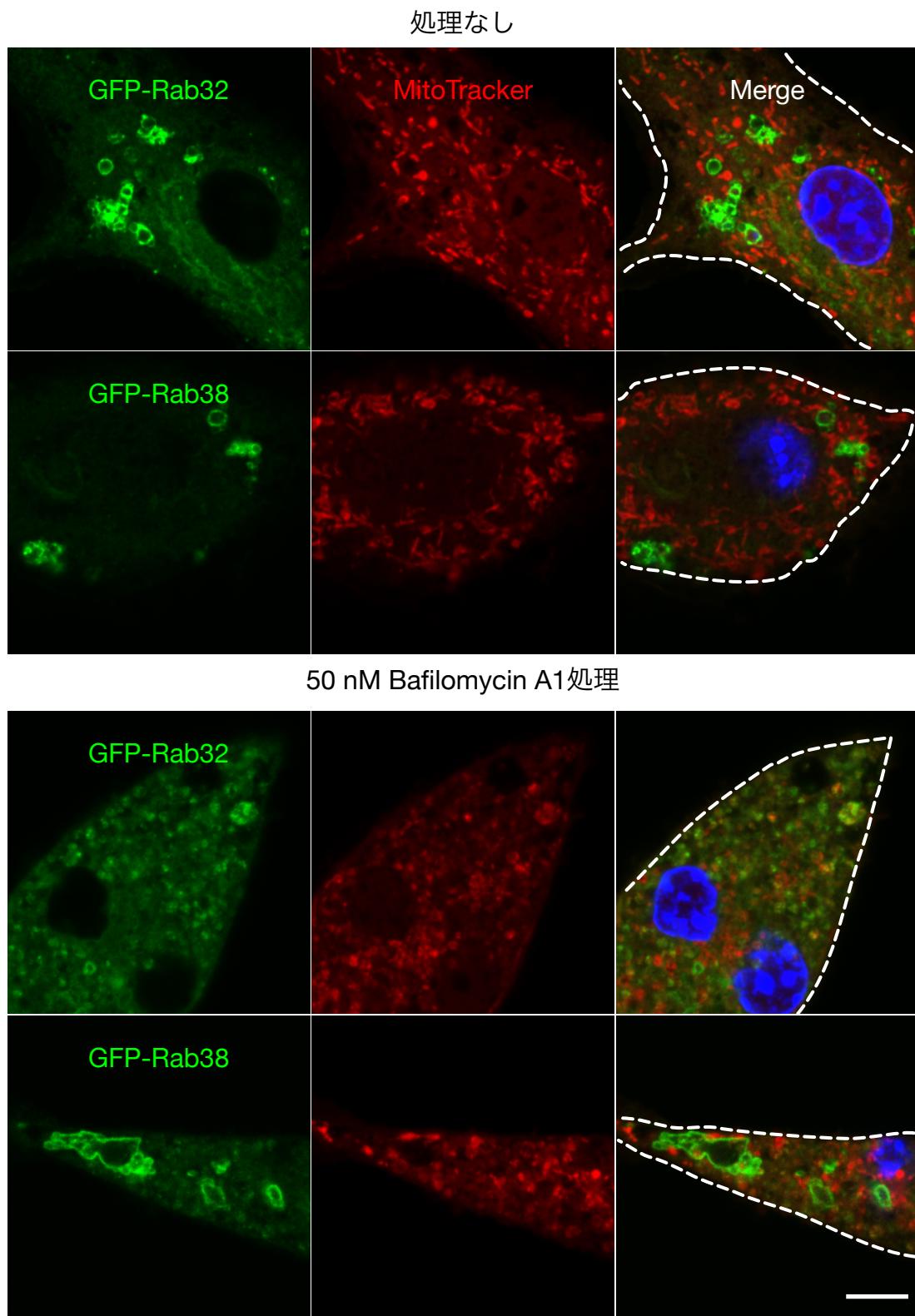


図34 マクロファージにV-ATPase阻害剤を添加するとミトコンドリアがRab32陽性オルガネラ内部に局在する

マクロファージにGFP-Rab32、Rab38を遺伝子導入し、50 nM Bafilomycin A1を添加し24時間培養した。固定の2時間前にミトコンドリアマーカーであるMitoTrackerを添加し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは10 μ m。

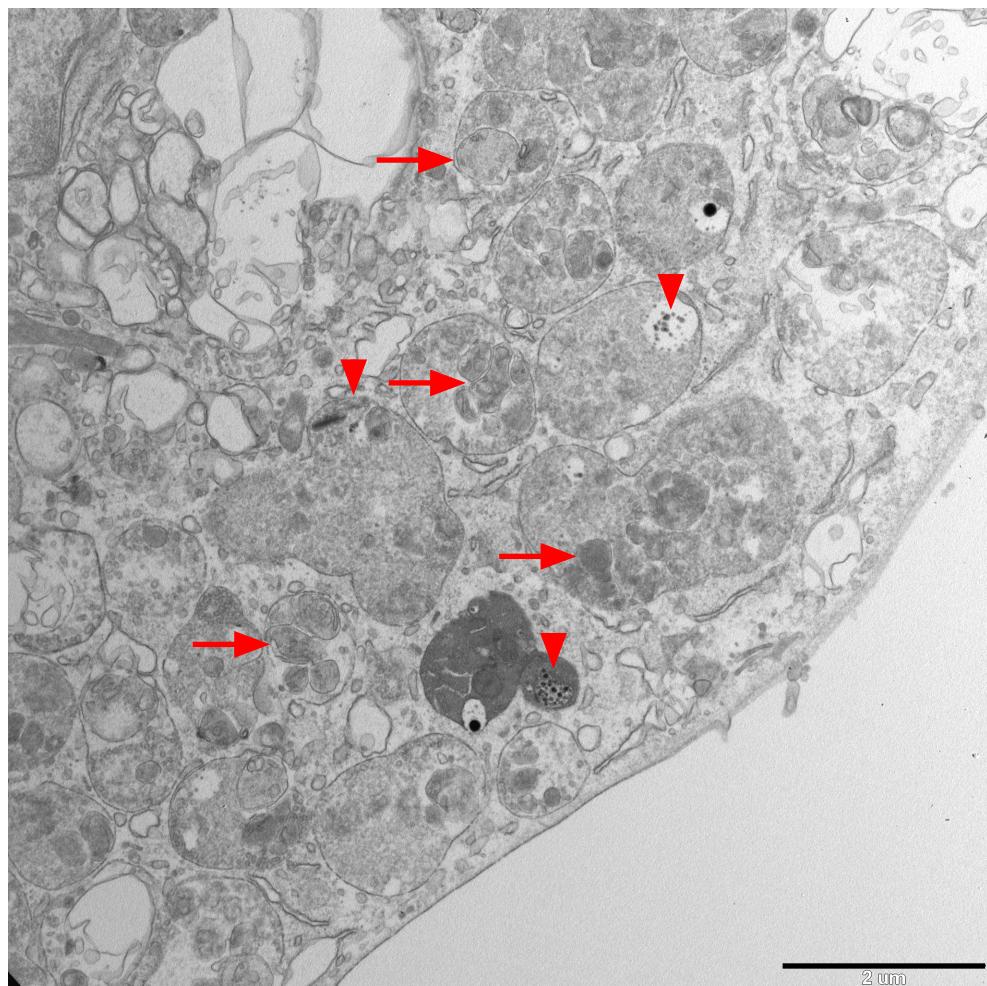
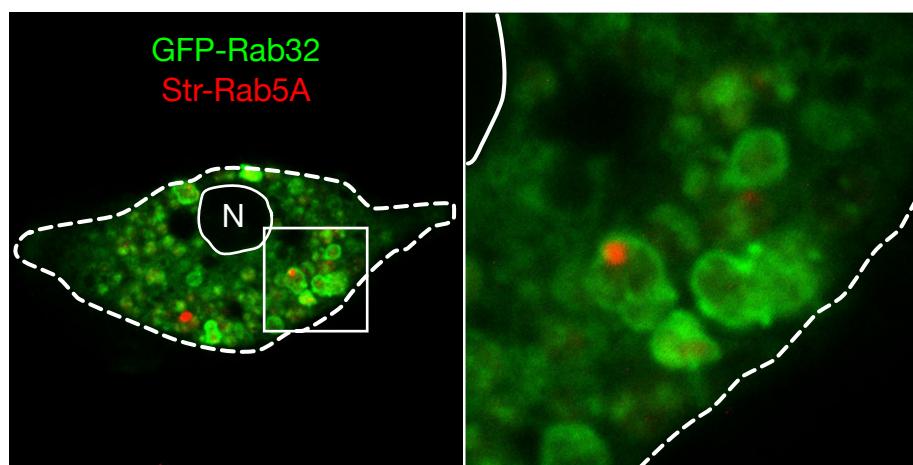


図35 Rab32陽性オルガネラ内部には膜構造を維持した様々なオルガネラが認められる

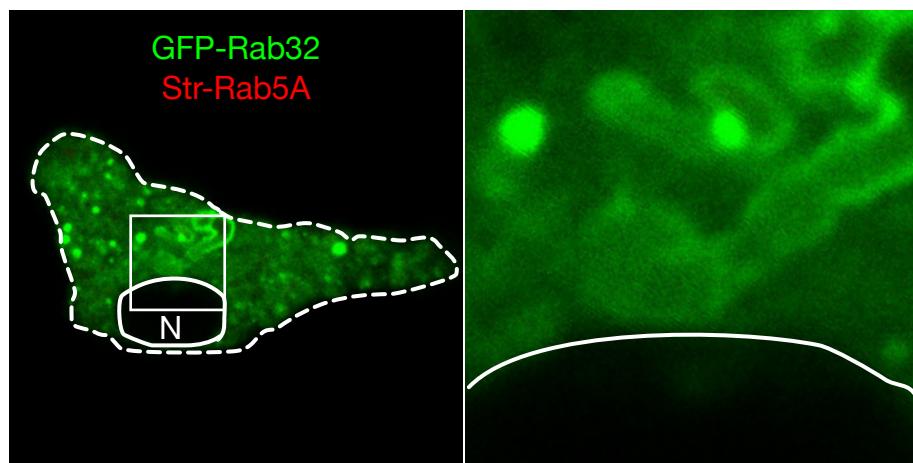
CLEMを用いて、Bafilomycin A1を添加し培養したマクロファージに見られるRab32陽性オルガネラの内部構造を解析した。

A. マクロファージにGFP-Rab32とStr-Rab5Aを同時に遺伝子導入した。50 nMのBafilomycin A1を培地中に添加し、24時間培養した。固定後、共焦点蛍光顕微鏡で観察し、目的のオルガネラを抽出した。（N：核）

B. 目的としたオルガネラを電子顕微鏡で解析した。赤矢印は内部に局在する構造物、赤矢頭はStr-Rab5A局在相当部を示す。スケールバーは2 μm。

A.

マクロファージ (Bafilomycin A1添加)



B.

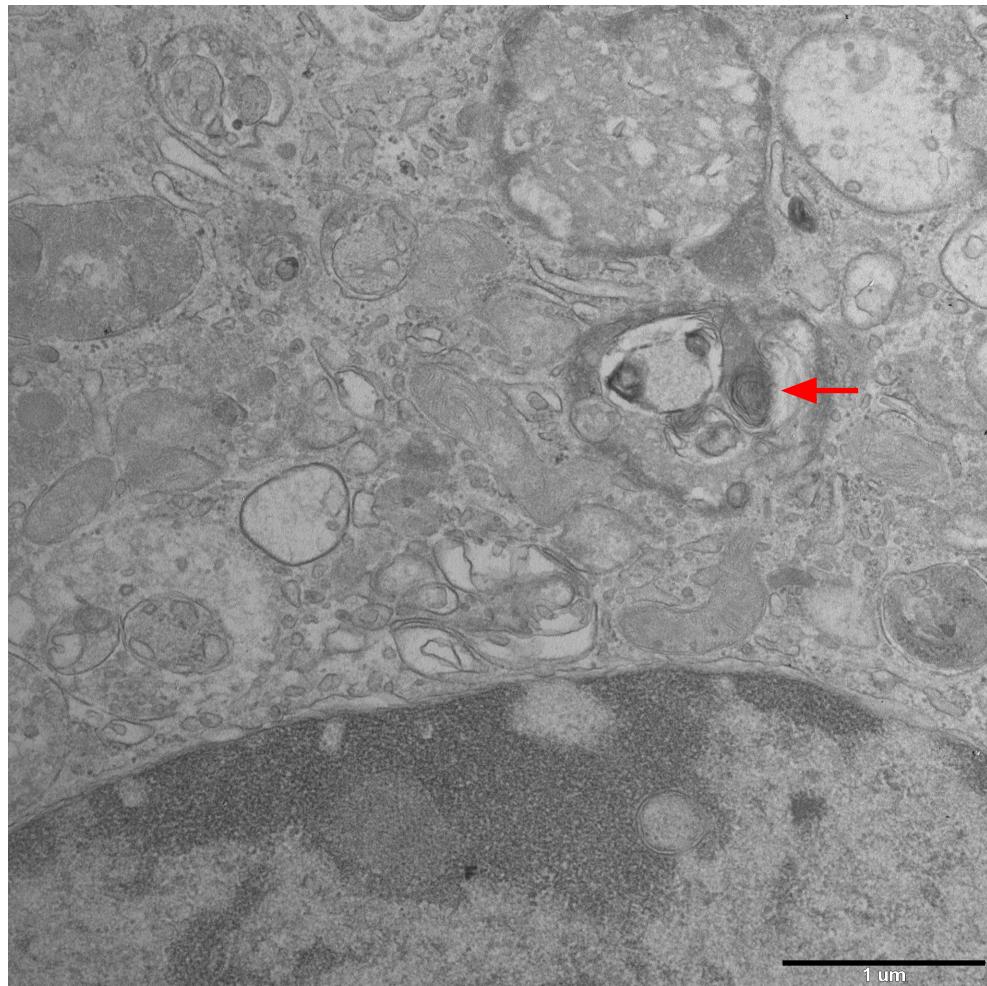


図3 6 Rab32陽性オルガネラ内部に膜構造を維持した後期エンドソームが認められる

CLEMを用いて、Bafilomycin A1を添加し培養したマクロファージに見られるRab32陽性オルガネラの内部構造を解析した。

A. マクロファージにGFP-Rab32とStr-Rab5Aを同時に遺伝子導入した。50 nMのBafilomycin A1を培地中に添加し、24時間培養した。固定後、共焦点蛍光顕微鏡で観察し、目的のオルガネラを抽出した。（N：核）

B. 目的としたオルガネラを電子顕微鏡で解析した。矢印は後期エンドソームを示す。スケールバーは1 μm。

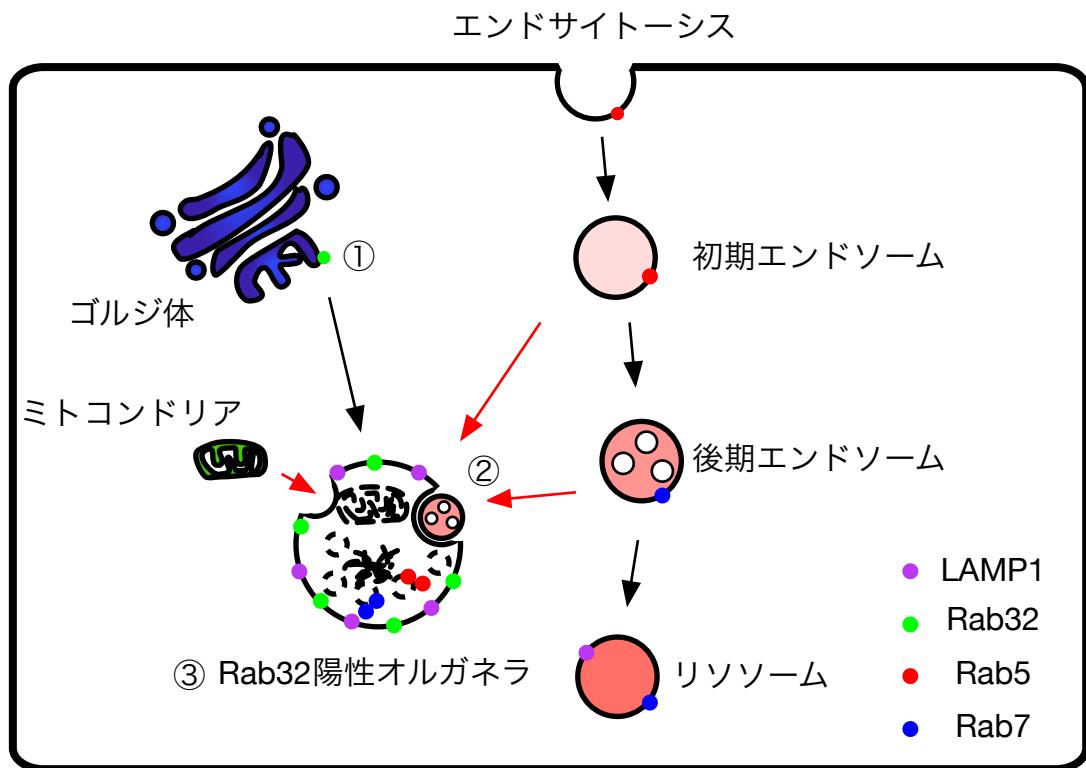


図37 Rab32/38が局在するオルガネラモデル図

- ① Rab32 (Rab38) は、GDP結合型はゴルジ体に、GTP結合型は主にRab32陽性オルガネラに結合する。
- ② Rab32/38陽性オルガネラは、初期エンドソーム、後期エンドソームやミトコンドリアを取り込み、分解を行う。
- ③ Rab32/38陽性オルガネラは、リソソームの性質を一部備えた新規LROである。

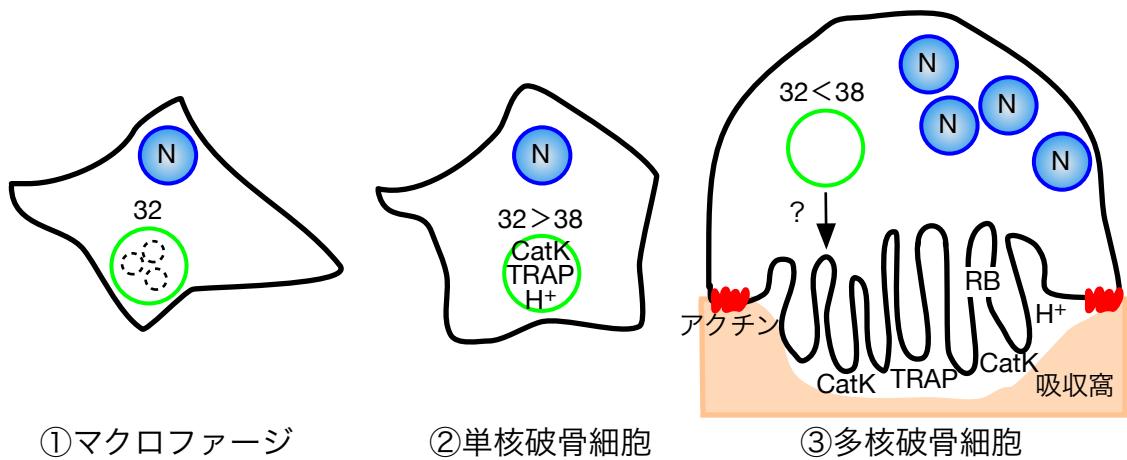


図38 破骨細胞成熟過程におけるRab32/38陽性オルガネラ機能モデル

- ① マクロファージにおいては、Rab32が発現しRab32陽性オルガネラではミクロオートファジーにより様々なオルガネラの分解が起こっている。
- ② RANKL刺激後、成熟前の単核破骨細胞ではRab32/38が発現し、前記に加えカテプシンKやTRAPなどのプロテアーゼが内在する。
- ③ 成熟した多核破骨細胞ではRab38が主に発現機能し、より分解が亢進し、Rab32/38陽性オルガネラは波状縁に輸送される可能性がある。

N: 核 RB: 波状縁 CatK: カテプシンK