

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

杉本 穂波

論文題目

骨芽細胞から開口分泌される
骨代謝関連タンパク質の生物発光イメージング

I. 緒言

骨芽細胞に発現する骨代謝関連タンパク質は、骨形成に重要な役割を担っている。矯正歯科治療の歯の移動は骨代謝によって成り立っており、骨代謝関連タンパク質の性質を理解することは、効率的な歯の移動法を開発する上で重要な意義を有している。骨代謝関連タンパク質であるオステオカルシン、骨形成タンパク質 2 (BMP2)、RANKL などは骨代謝において重要な役割を果たしている。これらの骨代謝関連タンパク質は遺伝子発現調節が精力的に研究されてきた一方で、分泌動態とその制御機構は未だほとんど不明である。本研究では、骨代謝関連タンパク質の分泌動態とその制御機構を解明することを目的とし、「生物発光イメージング法」を用いて、マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 からのオステオカルシン、BMP2 および RANKL の分泌動態を可視化した。本イメージング法は、発光酵素 *Gaussia luciferase* (GLase) と解析目的のタンパク質の融合タンパク質をレポーターに用いて、生細胞から開口分泌された GLase 融合タンパク質と細胞培養液に添加した基質セレンテラジンの酵素反応で生じる微弱発光を超高感度カメラで検出するという独自性の高いものである。

本研究では、GLase の融合タンパク質の開口分泌により生じる発光スポットの消失を解析し、オステオカルシンと BMP2 の拡散性の違いを検討した。また、BMP2 の N 末端塩基性アミノ酸残基を欠失させた変異体 (Δ 3BMP2-GLase) を用いて、BMP2 の拡散性に関わる責任配列を解析した。

II. 材料および実験方法

1. プラスミドベクターの構築

GLase の N 末端融合プラスミドベクターである pcDNA3-pGLuc-pN にマウスオステオカルシン、BMP2 (野生型と変異体)、および RANKL の cDNA を挿入し、発現ベクターを構築した。

2. 細胞培養と遺伝子導入

マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 は、10% 牛胎仔血清を含む MEM α を用いて 37 °C、5% CO₂ 条件で培養した。一過性の遺伝子導入には、Avalanche-Everyday transfection reagent を用いた。

3. ウェスタンブロット解析

発現ベクターを遺伝子導入した MC3T3-E1 細胞から濃縮培養液および細胞溶解液を調製した。調製したサンプルを SDS-PAGE によって分離した後、一次抗体として抗 GLase 抗体、二次抗体として Horse radish peroxidase 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いて、GLase 融合タンパク質の発現およびプロセッシングについて解析を行った。

4. ルミノメーターを用いた遺伝子導入細胞の GLase 活性測定

遺伝子導入から 24 時間後の細胞から培養上清および細胞溶解液を調製してテストチューブに分取し、セレンテラジンを添加してルミノメーターを用いた発光強度測定を行った。また、各 GLase 融合タンパク質の分泌効率

を調べるため、細胞溶解液中の発光活性に対する培養液中の発光活性の比率を算出した。

5. 顕微鏡システムを用いたビデオレート生物発光イメージング

タンパク質の開口分泌動態の可視化は、水冷式 EM-CCD カメラを備えた顕微鏡システムと AQUACOSMOS ソフトウェアを用いて行った。

遺伝子導入した MC3T3-E1 を顕微鏡にセットし、セレンテラジンを加えて発光反応を開始させ、ビデオ画像を 500 ms/frame の露光条件で 5-20 分間、ハードディスクに記録した。各 GLase 融合タンパク質について代表的な発光スポットを選択し、発光強度の経時変化を解析した。拡散特性を解析するため、発光強度最大値から消失するまでの経時変化に基づいて、各スポットの半減期を算出した。

6. 統計解析

発光スポットの半減期の算出、及び統計解析には GraphPad Prism 8 を使用した。統計的有意性の評価には一元配置分散分析および Tukey's multiple comparisons test を実施した。

III. 結果

1. MC3T3-E1 細胞における OC-GLase および BMP2-GLase の生物発光イメージング

OC-GLase および BMP2-GLase の開口分泌を示す発光スポットは、一過性に出現して消失した。この時、OC-GLase は周囲に広がりながら急速に拡散す

る消失パターンを示したのに対し、BMP2-GLase は拡散性の低いものであった。

2. MC3T3-E1 細胞における RANKL-GLase の生物発光イメージング

分泌型タンパク質である OC-GLase および BMP2-GLase とは異なり、膜タンパク質である RANKL-GLase は細胞全体が持続的な発光を示した。一方、RANKL-GLase が開口分泌により細胞膜上に輸送された瞬間を示す発光スポットは、OC-GLase と同様に速やかに拡散した。

3. OC-GLase および BMP2-GLase のプロセッシングと分泌

ウェスタンブロット解析の結果、OC-GLase および BMP2-GLase は、細胞溶解液にプロ型、培養上清に成熟型に相当するバンドが検出された。この結果から、OC-GLase と BMP2-GLase は分泌過程でプロ型から成熟型に適切にプロセッシングされて、培養液中に分泌されることが確認された。

4. MC3T3-E1 細胞における OC-GLase と BMP2-GLase の分泌効率の比較

培養上清と細胞溶解液の GLase 活性の比を算出したところ、OC-GLase は BMP2-GLase よりも培養上清の発光活性が高く、分泌効率が高いことが示された。OC-GLase の分泌効率は、GLase の非融合タンパク質と同様であった。これらの結果から、OC と比較して、BMP2 の分泌量は抑制されている可能性が示唆された。

5. OC-GLase と BMP2-GLase の分泌動態の比較

分泌された OC-GLase が急速に拡散して数秒以内に消失するのに対して、BMP2-GLase の分泌スポットは 10~30 秒程度持続し、徐々に減衰した。発光強度の経時変化を解析したところ、BMP2-GLase の発光スポットは OC-GLase よりも持続時間が長いことが示された。

6. Δ 3BMP2-GLase 変異体の可視化

BMP4 の N 末端塩基性アミノ酸 3 残基 (RKK) は細胞外マトリックスや細胞表面のプロテオグリカンと相互作用することが報告されている。BMP4 の RKK 配列に相当する BMP2 の RKR 配列を欠失させた変異体 (Δ 3BMP2) を作製し、GLase との融合タンパク質 (Δ 3BMP2-GLase) の可視化を行った。 Δ 3BMP2-GLase は野生型 BMP2-GLase と同様に適切にプロセシングされており、発現量および分泌効率も BMP2-GLase と同等であった。その一方で、 Δ 3BMP2-GLase の発光スポットの消失は BMP2-GLase に比べて速いことが示された。

7. 開口分泌における OC-GLase、BMP2-GLase および Δ 3BMP2-GLase の拡散特性の定量的解析

発光スポットの半減期を算出したところ、BMP2-GLase の半減期は OC-GLase 及び Δ 3BMP2-GLase より有意に長いことが示された。OC-GLase と Δ 3BMP2-GLase の半減期の間には有意差は認められなかった。

IV. 考察

オステオカルシンに対して BMP2 は開口分泌部位における拡散性が低いと考えられた。RANKL-GLase は、OC-GLase と同様に拡散性の速やかな消失パ

ターンを示したことから、開口分泌後に細胞膜上を速やかに拡散していくと考えられた。

BMP2-GLase と比較して、 $\Delta 3$ BMP2-GLase の半減期は有意に短かったことから、 $\Delta 3$ BMP2 変異体は BMP2 と比較して開口分泌部位から速やかに拡散すると考えられた。半減期について、BMP2-GLase は OC-GLase より有意に長かった一方、 $\Delta 3$ BMP2-GLase は OC-GLase と有意差が無かったことから、 $\Delta 3$ BMP2 変異体はオステオカルシンと同程度に速やかに拡散すると考えられた。

$\Delta 3$ BMP2 で欠失させた RKR 配列は、BMP2 の拡散性の低さに関与している可能性が示唆された。

BMP2 と細胞外マトリックスとの相互作用は細胞内シグナル伝達や骨形成に重要である一方で、オステオカルシンは全身性のホルモン様作用を示すことが知られている。開口分泌において BMP2 がオステオカルシンよりもゆっくりと拡散することは、骨形成で BMP2 が局所的なメディエーターとして機能する上で妥当と考えられた。

本研究で構築した発光プローブである GLase 融合タンパク質は開口分泌を可視化できる強力なツールである。またルミノメーターを用いた化合物スクリーニングに応用することで、骨代謝関連の疾患治療薬や矯正歯科治療薬の開発が可能となる。以上のことから本研究成果は、骨代謝機構の解明に向けた基礎研究に加えて、治療薬開発への貢献が期待される。

V. 結論

本研究は、オステオカルシン、BMP2 と RANKL の開口分泌動態を可視化した初めての報告である。分泌タンパク質であるオステオカルシンと BMP2、および膜タンパク質である RANKL は、それぞれ異なる開口分泌動態を示した。GLase 融合タンパク質を用いた生物発光イメージング法は、様々なタンパク質の分泌動態の解析に有用であると考えられる。本研究で得られた成果は、骨代謝が関わる歯科矯正学分野において重要な基礎的知見となると考えられる。