

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592214

研究課題名(和文)破骨細胞における新規DAP12会合受容体の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of novel DAP12-associated receptor in osteoclasts.

## 研究代表者

北川 教弘 (Ishida-Kitagawa, Norihiro)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：30294284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Siglec-15は成熟破骨細胞の形成に働き、その機能には DAP12との会合に関わる K272 が必須である。さらにSiglec-15の細胞質内領域には 微小管関連タンパク質SBP1(仮称)と結合する機能領域が存在することを見出した。本機能領域までの Siglec-15K272A変異体と DAP12のITAM下流を連結したキメラタンパク質がSiglec-15の機能を代償し得たことから、Siglec-15がDAP12と協調的に働くことが示された。Siglec-15の骨組織における機能を解析するため、遺伝子欠損マウスを独自に樹立した。

研究成果の概要(英文)：Siglec-15 is DAP12 associated receptor, which is essential for the formation of functional osteoclast. In this research, we identified a Siglec-15-binding protein that interacts with cytoplasmic region of Siglec-15. Cytoplasmic region of Siglec-15 that associates this protein was essential for the function of Siglec-15. Chimeric molecules consisting of the extracellular region, transmembrane region with a K272A mutation, and the functional region of cytoplasmic tail of Siglec-15 and the cytoplasmic region of DAP12 restore bone resorption in osteoclasts from Siglec-15 knockout mice that were established in this research. These results strongly suggested that Siglec-15 is a critical DAP12-associated receptor in osteoclasts.

研究分野：骨代謝学

キーワード：骨・軟骨代謝学 破骨細胞 骨吸収 NFATc1 ITAM レクチン

## 1. 研究開始当初の背景

破骨細胞分化機構の研究は分化因子 RANKL およびその受容体分子 RANK の発見を契機として飛躍的に理解が進んだ。RANKL-RANK シグナル系とともに破骨細胞分化は DAP12 および FcR $\gamma$  の ITAM を介した costimulatory シグナル経路が重要であることが明らかになってきた。特に DAP12 欠損マウスは分化、細胞融合およびアクチンリング形成に破綻をきたすことで骨吸収が低下し大理石骨病を呈する。DAP12 シグナル系は DAP12 会合受容体により制御されると考えられることから、破骨細胞における主要な DAP12 会合受容体を同定することは DAP12 シグナル系の制御を理解する上で不可欠である。しかし破骨細胞で発現する既知の DAP12 会合受容体 TREM2、SIRP $\beta$ 1、MDL-1 などはこれらをコードする遺伝子欠損マウスにおいて骨との関連は不明である。

申請者は破骨細胞分化過程において転写因子 NFATc1/NFAT2 が細胞融合過程以降の鍵因子であることを 2002 年に報告した。さらに NFAT2 制御下で発現する膜タンパク質を探索した結果、DAP12 会合受容体 Siglec-15 を見出した。

Siglec-15 は I 型膜タンパク質であり、細胞外領域を介してシアル酸化糖鎖を認識することが報告されている。RNA 干渉法により破骨細胞における Siglec-15 の機能を解析した結果、DAP12 遺伝子ノックアウトマウス由来破骨細胞と同様に、細胞融合活性の低下、アクチンリング形成異常、および骨吸収活性の減少が観察された。さらに Siglec-15 の機能にはシアル酸化糖鎖認識に関わる V-set 免疫グロブリン様ドメインならびに DAP12 との会合に必須な膜貫通領域内リジン残基 (K272) が必要であることが明らかになった。以上の結果は Siglec-15 が DAP12 会合受容体として働くことが強く示唆された。

## 2. 研究の目的

以上の研究成果を踏まえ、本申請では破骨細胞における DAP12 会合受容体 Siglec-15 の骨代謝における意義、またその作用機序を明らかにし、さらに Siglec-15/DAP12 シグナル経路が骨疾患治療薬開発の標的分子群となり得るかを評価することを目標とする。このため、1) Siglec-15 遺伝子欠損マウスを作成し、その骨組織および骨代謝における役割を明らかにする、2) Siglec-15 複合体構成タンパク質を同定し、それらの機能解析を通じて Siglec-15-DAP12 シグナル経路の作用機序を解明する、3) Siglec-15 が破骨細胞における重要な DAR として働くのかを *in vitro* および *in vivo* にて検討する、の 3 点について研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) Siglec-15 遺伝子欠損マウスの作成と C57BL/6 系への純化

申請者は平成 21 年度科研費補助金の助成により Siglec-15 遺伝子欠損マウスの作成を試み、2 クローンの遺伝子改変 ES 細胞由来ヘテロマウスの樹立に成功している。そこで本申請では戻し交配により C57BL/6 純系組み換えマウスの樹立を行うと同時に、mixed background において交配しノックアウトマウスの作出し、以下の実験試料として用いた。

### (2) Siglec-15 結合タンパク質の探索と同定

C 末端に HIS<sub>6</sub> タグならびに FLAG タグをタンデムに付加した Siglec-15 をレトロウイルス法によりマウス野生型破骨細胞に遺伝子導入し、その細胞抽出液から Ni-NTA レジンおよび抗 FLAG 抗体を付加した磁気ビーズによるアフィニティ精製を行った。得られたサンプルを SDS-PAGE で分離し蛍光色素 Flamingo による染色を行い、分離されたタンパク質を可視化した。mock 感染細胞由来のバンドパターンと比較し、組み換え Siglec-15 特異的に共沈したペプチドに着目した。見出されたペプチドは所属機関植物科学研究教育推進ユニットの協力により質量分析し、同定した。

### (3) Siglec-15 変異体ならびに Siglec-15-DAP12 キメラタンパク質をコードする遺伝子の設計と破骨細胞への導入

Siglec-15 の細胞質内領域の欠失変異体をコードする遺伝子配列を PCR 法により作成した。また DAP12 とは結合し得ない Siglec-15 K272A 変異体の細胞外および膜貫通領域と DAP12 の細胞質内領域を融合させた SSDKA キメラタンパク質、ならびに K272A 変異体の細胞外領域、膜貫通領域、細胞質内機能領域と DAP12 の ITAM 下流の配列を融合した改良型 SSDKA キメラタンパク質をコードする遺伝子を PCR 法により構築した。野生型ならびに変異体 Siglec-15、SSDKA、および改良型 SSDKA をコードする遺伝子配列をレトロウイルスベクターに組み込み、Retrovirus Packaging kit (TAKARA 社) を用いて組換えレトロウイルスを作成し、Siglec-15 発現抑制破骨細胞もしくは Siglec-15 遺伝子欠損マウス由来破骨細胞に導入した。形成された破骨細胞は TRAP 染色、蛍光標識ファロイジンによるアクチン細胞骨格の観察、ヒドロキシアパタイトの吸収活性により検討した。

## 4. 研究成果

Siglec-15 遺伝子欠損マウスは C57BL/6

と戻し交雑を繰り返し、純系系統の樹立に成功するとともに、樹立した系統から凍結胚を作成した。この過程で mixed background のヘテロマウスを交配させて得られた Siglec-15 遺伝子欠損マウスから破骨細胞を in vitro にて分化誘導させた結果、RNA 干渉法を用いた Siglec-15 遺伝子発現抑制破骨細胞と同じく、野生型細胞と比較して多核破骨細胞数の減少、形成された多核破骨細胞の形態異常、骨吸収活性の減少が確認された。

DAPI2 は細胞外領域が非常に短くその ITAM を介したシグナル系の制御には会合受容体が関わると考えられている。Siglec-15 はシアル酸化糖鎖を認識するレクチンであり、native PAGE による実験結果からタンパク質複合体を形成することが予想された。そこでアフィニティ精製法により Siglec-15 と共沈するタンパク質を探索し、質量分析法による同定を試みた。その結果 Siglec-15 と会合することが分かっている DAPI2 とともに、微小管関連タンパク質 SBP1 (仮称) を同定した。DAPI2 と会合し得ない Siglec-15 K272A 変異体においても SBP1 との結合は確認できたことから、少なくとも DAPI2 を介した結合ではないと考えられた。SBP1 が細胞内に存在することから、Siglec-15 の細胞質内領域に未知の機能領域が存在することが示唆された。

そこで Siglec-15 細胞質内機能領域の探索を試みた。細胞質内領域の各種欠失変異体を発現するベクターを構築し、Siglec-15 遺伝子欠損マウス由来破骨細胞に遺伝子導入した。実験に供試した各種変異体は DAPI2 との結合能を有していることを免疫沈降法により確認した。各種変異体と野生型 Siglec-15 を導入した破骨細胞の形成数ならびにヒドロキシアパタイト吸収活性を比較することにより、機能領域の同定に成功した。さらに各種変異体と SBP1 の会合を免疫沈降法により検討した結果、本機能領域を欠損した変異体では SBP1 との会合も失われることを明らかにした。以上の結果から Siglec-15 細胞質領域が SBP1 との会合を介する未知の機能を有することが強く示唆された。

Siglec-15 K272A 変異体は DAPI2 との結合能を有さず、かつ野生型 Siglec-15 の機能を代償し得ない。以上の結果は Siglec-15 が破骨細胞における DAPI2 会合受容体として働くことは示唆されるが、K272 を介する他のタンパク質との結合も否定できず、証明にはならない。そこで K272 変異を導入した Siglec-15 の細胞外領域-膜貫通領域と DAPI2 の ITAM を有する細胞質内を融合させたキメラタンパク質 SSDKA を作成した。SSDKA は DAPI2 との結合能は失っており、かつ ITAM がリン酸化されるとチロシンキナーゼ Syk がリクルートされることから、SSDKA は一分子で Siglec-15-DAPI2 複合体を模倣しうることを確認した。Siglec-15 遺伝子発現抑制細胞に SSDKA を導入した結果、部分的にはあ

るが Siglec-15 の機能を代償した。さらに SSDKA の機能には、V-set 免疫グロブリン様ドメインとともに ITAM 内のチロシン残基が必須であることが示された。SSDKA は Siglec-15 の細胞質内機能領域を欠失しており、このことが SSDKA の機能が部分的なものにとどまる理由であると考えられた。そこで細胞質内機能領域を考慮に入れた改良型 SSDKA を作成し Siglec-15 遺伝子欠損マウス由来破骨細胞に導入した結果、改良型 SSDKA は、SSDKA より効率的に Siglec-15 の機能を代償しうるということが明らかとなった。

## 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 8 件)

- (1) Akamatsu R, Ishida-Kitagawa N, Aoyama T, Oka C, Kawaichi M. (2014) BNIP-2 binds phosphatidylserine, localizes to vesicles, and is transported by kinesin-1. *Genes Cells*. 20 135-52 (査読有)
- (2) Ikeda A, Iizuka T, Maekubo N, Aono R, Kikuchi J, Akiyama M, Konishi T, Ogawa T, Ishida-Kitagawa N, Tatebe H, Shiozaki K. (2013) Cyclodextrin complexed [60]fullerene derivatives with high levels of photodynamic activity by long wavelength excitation. *ACS Med Chem Lett*. 4 752-6 (査読有)
- (3) Nitta M, Imamura M, Inoue Y, Kunitomo Y, Lin ZY, Ogawa T, Yogo K, Ishida-Kitagawa N, Fukunaga N, Okano H, Sato E, Takeya T, Miyoshi J. (2013) Aberrant gene expression and sexually incompatible genomic imprinting in oocytes derived from XY mouse embryonic stem cells in vitro. *PLoS One* 8(3):e58555 (査読有)
- (4) Komeda C, Ikeda A, Kikuchi J, Ishida-Kitagawa N, Tatebe H, Shiozaki K, Akiyama M. (2013) A photo-triggerable drug carrier based on cleavage of PEG lipids by photosensitizer-generated reactive singlet oxygen. *Org Biomol Chem*. 11 2567-70 (査読有)
- (5) Ishida-Kitagawa N, Tanaka K, Bao X, Kimura T, Miura T, Kitaoka Y, Hayashi K, Sato M, Maruoka M, Ogawa T, Miyoshi J, Takeya T. (2012) Siglec-15 protein regulates formation of functional osteoclasts in concert with DNAX-activating protein of 12 kDa (DAPI2). *J Biol Chem* 287

17493-502 (査読有)

- (6) Maruoka M, Sato M, Yuan Y, Ichiba M, Fujii R, Ogawa T, Ishida-Kitagawa N, Takeya T, Watanabe N. (2012) Abl-1-bridged tyrosine phosphorylation of VASP by Abelson kinase impairs association of VASP to focal adhesions and regulates leukaemic cell adhesion. *Biochem J.* 441 889-99 (査読有)
- (7) Bahtiar A, Nakamura T, Kishida K, Katsura J, Nitta M, Ishida-Kitagawa N, Ogawa T, Takeya T. (2011) The l-Ser analog #290 promotes bone recovery in OP and RA mice. *Pharmacol Res* 64 203-9 (査読有)
- (8) Morita Y, Ono A, Serizawa A, Yogo K, Ishida-Kitagawa N, Takeya T, Ogawa T. (2011) Purification and identification of lactoperoxidase in milk basic proteins as an inhibitor of osteoclastogenesis. *J Dairy Sci.* 94 2270-9

〔学会発表〕(計 5 件)

北川(石田)教弘、小川拓哉 破骨細胞における新規 DAP12 会合受容体 Sigle-15 の機能解析 第 30 回日本骨代謝学会学術集会 2012 年 7 月 21 日 京王プラザホテル(東京都・新宿区)

北川(石田)教弘 破骨細胞における新規 DAP12 会合膜タンパク質の機能解析 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 15 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Norihiro Ishida-Kitagawa Identification of a novel partner of DAP12 in the regulation of actin-ring formation in osteoclast. 2<sup>nd</sup> Asia-Pacific osteoporosis and bone meeting 2011 年 9 月 6 日 ゴールドコースト、オーストラリア

石田(北川)教弘 破骨細胞における新規 DAP12 会合膜タンパク質の機能解析 第 29 回日本骨代謝学会学術集会 2011 年 7 月 29 日 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

Norihiro Ishida-Kitagawa Identification of a novel partner of DAP12 in the regulation of actin-ring formation in osteoclast. ICPAPS2011 2011 年 7 月 19 日 ジョグジャカルタ、インドネシア 【招待講演】

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

北川 教弘 (Norihiro Ishida-Kitagawa)  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教  
研究者番号：30294284

(2)研究分担者 なし  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者 なし  
( )

研究者番号：