



ヒトRANK ligand遺伝子の5'側上流領域の解析

梶本, 和義
北澤, 理子
北澤, 荘平

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 62(3/4):143-150

(Issue Date)

2002-03

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00317239>



ヒト RANK ligand 遺伝子の 5'側上流領域の解析

梶本 和義^{1, 2}, 北澤 理子¹, 北澤 莊平¹

神戸大学大学院医学系研究科

1 生体情報医学講座分子病理学分野

(指導：前田 盛教授)

2 応用分子医学講座内分泌代謝・神経・血液腫瘍内科学分野

(指導：千原和夫教授)

連絡先：梶本和義，応用分子医学講座内分泌代謝・神経・
血液腫瘍内科学分野，神戸大学大学院医学系研究科

兵庫県神戸市中央区楠町 7-5-1

TEL: 078-382-5885

FAX: 078-382-5899

(平成14年 1 月 31日受付)

要 約

破骨細胞分化因子 (RANK ligand) は骨芽細胞に発現する膜貫通性蛋白で、破骨細胞前駆細胞上の受容体 RANK と結合し破骨細胞分化のシグナルを伝達する。種々の骨吸収因子は RANKL 発現調節を介して破骨細胞形成を亢進すると考えられている。本研究では $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による破骨細胞形成の分子機序を解析するために、ヒト RANKL 遺伝子 5'側上流領域をクローニングし、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による RANKL 転写調節機構について検討した。ヒト RANKL 遺伝子の基本転写調節部位には逆 TATA, CAAT ボックスがあり既報のマウス RANKL プロモーターとの類似性を認めた。ゲルシフトアッセイでは 3 箇所の vitamin D_3 結合配列 (VDRE) 類似配列のうち最上流 (-1584/-1570) の AGGTCAAAGACTACA が VDR, RXR α ヘテロダイマーと *in vitro* での結合性を示した。核蛋白抽出物とステロイドホルモン受容体に対する抗体を用いたゲルシフトアッセイでも VDR, RXR α ヘテロダイマーが同配列に結合することが示された。ヒト骨肉腫細胞株 SaOS₂ に対する一過性遺伝子導入実験では、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は VDRE を含む RANKL プロモーターコンストラクトの転写活性を促進したが、VDRE を欠失したコンストラクトや VDRE に変異を導入したコンストラクトに有意な作用を示さなかった。以上より $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は骨芽細胞に作用して、遺伝子 5'側上流に存在する VDRE を介して RANKL 遺伝子発現亢進を誘導することによ

り破骨細胞形成を促進することが示唆された。

緒 言

破骨細胞は骨髄単球/マクロファージ系に由来する多核の巨細胞であるが、その分化維持には骨髄ストローマ細胞/骨芽細胞との相互作用が必須とされてきた¹⁻³⁾。1998年ストローマ細胞由来の破骨細胞分化因子として Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) が分離同定された⁴⁻⁷⁾。RANKL は破骨細胞前駆細胞上の受容体 RANK と結合してシグナルを伝達し、破骨細胞分化に特徴的な遺伝子発現を誘導する。破骨細胞形成に関与する種々のサイトカインやステロイドホルモンは骨髄ストローマ細胞/骨芽細胞上の RANKL 発現制御を介して破骨細胞の分化、維持を調節すると考えられている⁸⁻¹⁰⁾。最近マウスにおいて $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は転写レベルで RANKL 発現を亢進させ破骨細胞形成を促進することが報告されたが^{9, 10)}、ヒトにおける $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の RANKL 発現や破骨細胞形成に対する作用機構の詳細は不明である。本研究で私共は $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ によるヒト RANKL 遺伝子制御と破骨細胞形成の機構について解析を行った。

方 法

- 1) 細胞培養及び *in vitro* での破骨細胞形成
5 % CO_2 , 37℃加湿条件下でヒト骨肉腫細胞株

キーワード：破骨細胞, RANK ligand, プロモーター, クローニング, VDRE

SaOS2 (メルボルン大学 T.J. Martin 博士より供与) を 10% 胎児ウシ血清 (FBS, GIBCO-BRL) を含む RPMI1640 (Sigma) で培養した。動物実験は神戸大学医学部実験動物倫理規定に従って行われた。生後 8-10 週のマウスを頸部脱臼法で屠殺後、摘出した大腿骨と頸骨の骨髓腔より minimum essential medium alpha (α -MEM) にて骨髓細胞成分をフラッシュし M-CSF 存在下で 48 時間培養した。常法に従って調節した骨髓単核細胞 ($10^5/\text{cm}^2$) を 24 穴プレート内 (Becton Dickinson) で 1α , $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-8}M) 単独或いはデキサメサゾン (10^{-8}M) 共存下に SaOS2 細胞 ($10^4/\text{cm}^2$) と共培養を行った。10 日間の培養後に細胞を酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色し, TRAP 陽性の多核細胞を破骨細胞様細胞として計測した。

2) RNA 抽出及び Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8}M の 1α , $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 単独或いはデキサメサゾン (10^{-8}M) 共存下に 48 時間培養した SaOS2 細胞から RNAzol B (Tel Test) を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA $1\mu\text{g}$ を鋳型にランダムヘキサマー (Takara) 並びに Superscript RNase H- 逆転写酵素 (GIBCO-BRL) を用いて cDNA を合成した後, 以下に示す 2 組のプライマーを用いて PCR を施行した。ヒト GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) を対照に用いた。ヒト RANKL, PCR 産物 347 bp 5'-GCACATCAGAGCAGAGAAAGCGATG-3' (598-622, sense) 5'-GTATGAGAACTTGGGATTTTGATGC-3' (921-945, antisense), GAPDH, PCR 産物 179 bp 5'-TGCACCA CCAACTGCTTAG-31 (514-532, sense) 5'-AGAGGCAGGGATGATGTTC-3' (672-690, antisense)。PCR 反応条件は, 94°C で 3 分の熱変性, 55°C で 1 分のアニーリング, 72°C で 1 分のポリメラーゼ反応を 35 サイクルとした。1.0% アガロースゲル電気泳動後エチジウムブロマイドにて染色し, mRNA の発現量を半定量的に評価した。

3) Nuclear run on 解析

10^{-10} , 10^{-8}M の 1α , $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 単独或いは 10^{-8}M のデキサメサゾン共存下で 48 時間培養した SaOS2 細胞を, PBS で洗浄後に 1 x SSC 中にスクレーパーで回収し, 1500rpm で 5 分間遠心した。細胞成分を溶解緩衝液 (10mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 3mM MgCl_2 , 0.5% NP-40) で処理し 10 分間氷上で静置後, 3000rpm で 5 分遠心した。細胞核分画を

含む沈殿物を溶解緩衝液で洗浄後, 浮遊緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 40% glycerol, 5 mM MgCl_2 , 0.1 mM EDTA) 0.5ml にて核蛋白を抽出した。核抽出物を反応混合液 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM MgCl_2 , 300 mM KCl, 0.5 mM ATP, CTP, GTP, 100 μCi of [α - ^{32}P] UTP 3000 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$) 100 μl と混合し, 30°C にて 30 分間 *in vitro* で転写反応を行った。 30°C で 30 分間の DNaseI (最終濃度 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 処理後, 停止液 (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 2% SDS, 10mM EDTA, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of proteinase K) を加え転写を停止させ, 反応産物を 42°C で 30 分間静置した。フェノール/クロロホルムで RNA を抽出後, tRNA 50 μg と 5% 三塩化酢酸 (TCA) 5ml を上清に添加した。反応溶液を氷上で 30 分間インキュベート後, ニトロセルロース膜 (Amersham Pharmacia Biotech) に吸着させた。ニトロセルロース膜を 3% TCA で 3 回洗浄後, インキュベーション溶液 (20 mM HEPES pH 7.5, 5 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , DNase I 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 0.9ml にて 37°C で 30 分間処理した。ラベルした mRNA は 60°C で 30 分間 0.5 M EDTA 30 μl と 10% SDS 100 μl とで処理し, proteinase K (25 mg/ml) にて 37°C で 30 分間処理後, エタノール沈殿にて精製し, 50 ml の TE (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 2 mM EDTA) に溶解した。ヒト RANKL cDNA, ヒト GAPDH cDNA, vector DNA それぞれ 10 μg を 0.2 N NaOH 50 μl にて変性後, 6 x SSC 500 μl で中和し, H_2O と 6 x SSC で侵したナイロン膜にブロットし, 1:1 で混和した硫酸デキストランとハイブリダイゼーション溶液 (50% formamide, 5 x SSC, 50 mM sodium phosphate pH 6.5, 1 x Denhardt's solution, 1 x Background Quencher (Tel-Test, Inc.)) 中で 42°C , 48 時間標識 RNA とハイブリダイズした。ニトロセルロース膜は 0.1% SDS を含む 2 x SSC で 27°C 15 分間, 0.1% SDS を含む 0.2 x SSC で 65°C , 30 分間洗浄した後, BAS2000 (FUJIX, Tokyo, Japan) で解析を行った。

4) ヒト RANKL 遺伝子の 5' 側上流域のクローニングと塩基配列決定

ヒト胎盤 DNA を鋳型にして PCR 法でプローブを作成した。ヒト RANKL cDNA 配列 (GenBank AF053712) からプライマー (5'-GGAACCACTGGAGTAGCCCCCAGC-3' (sense), 5'-GAGCCACGCAGGTACTTGGTGTAGTCTC-3' (antisense)) を設定し, PCR で得られた 396 塩基の DNA 断片をランダムラベリング法により [α - ^{32}P] dCTP でラベルした。ヒト胎盤由来の genomic DNA ライブラリ (Clontech) を

XL1-Blue (Promega) と共に LB/アンピシリン (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) プレートに播き、プラークハイブリダイゼーション法により 5×10^6 個のリコンビナントをスクリーニングした。3回の遺伝子スクリーニングの後、5個の陽性クローンを得た。約2.0kbのDNA断端をプロモーターやエンハンサーを持たない PGL3 Basic ベクター (Promega) にサブクローニングした。全塩基配列はダイデオキシターミネーション法により ABI PRISM310 自動シーケンス解読機械 (Perkin Elmer) で解析した。

5) プライマー伸長法

ヒト RANKL cDNA に相補的なオリゴヌクレオチドプライマー (5'-CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCC-3') の末端を、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (Takara) を用い [γ - ^{32}P]ATP にて 2×10^8 cpm/ μg にラベルした。 2.0×10^6 cpm のオリゴヌクレオチドを溶液中 (80% フォルムアミド, 1mM EDTA, 400mM NaCl, 50mM PIPES (pH6.4) で、Avian Myeloblastosis Virus-逆転写酵素 (Superscript II, GIBCO-BRL) を用いて SaOS2 細胞より抽出したポリアデニル化 mRNA 5 μg に 58°C で 2 時間アニーリングさせた。同じプライマーを用いて行ったヒト RANKL 遺伝子のシーケンス反応産物をマーカーとしてポリアクリルアミドゲルに電気泳動し、伸長産物の長さを確認して転写開始部位を決定した。

6) ルシフェラーゼアッセイ

クローニングした DNA について制限酵素と PCR 法とで、2 種類の DNA フラグメント (-1781/+187, 1035/+187) を作成し、それぞれの DNA を PGL3 Basic ベクター (Promega) に組み込んだ (PGL3-1781, PGL3-1035)。プラスミド DNA を EndoFree plasmid Maxi kit (QIAGEN) で精製した。これらのプラスミドコンストラクトと PRL-TK ベクター (Promega) とをリポソーム媒介の遺伝子導入試薬 EffecteneTM (QIAGEN) を用いて SaOS2 細胞に導入した。導入24時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性をルミノメーター (Model ATP-300, Advantec) で計測した。各コンストラクトの遺伝子導入効率を PRL-TK ベクターの転写活性で標準化した。 1α , 25 (OH) $_2$ D $_3$ の効果を調べるために、ヒト RANKL プロモーターコンストラクトを導入した SaOS2 細胞を 6 時間、 10^{-8}M 1α , 25 (OH) $_2$ D $_3$ で処理した後にルシフェラーゼ活性を測定した。

7) ゲルシフトアッセイ (EMSA)

1α , 25 (OH) $_2$ D $_3$ にて処理・未処理の SaOS2 細胞より定法に従い核蛋白を抽出した。3箇所の VDRE 類似配列の各々について 2 本鎖オリゴヌクレオチド 5'-TGGGAAGAGGTCAAAGACTACAAGGAGTA-3' (-1591/-1563, VDRE1), 5'-TAAAAAAAATTCAACCTGGTCACTCTTCC-3' (-1425/-1397, VDRE2), 5'-TTTACTGAGGTCTAAGTGTTCAATTTAGA-3' (-1390/-1362, VDRE3), を作成し、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (Promega) を用いてこれらの5'端を [γ - ^{32}P]ATP でラベルした。ラベルしたオリゴヌクレオチドにリコンビナント VDR 蛋白, RXR α 蛋白を加え室温で30分間反応させた。核抽出物 (5 μg) についても同様に結合反応を行った。スーパーシフトアッセイにあらかじめ VDR, GR, RXR α , RXR β , RXR γ , RAR α , RAR β , RAR γ (Santa Cruz Biotechnology) に対する各抗体を用い 4°C 45分間反応させた。これらの反応産物は 0.5 x Tris borate-EDTA 緩衝液中で 4 % ポリアクリルアミドゲルにて 120分間電気泳動して BAS2000 で解析した。

8) 部位特異的変異

VDRE に変異を導入した 2 本鎖オリゴヌクレオチド (5'-TGGGAAGAGGCTCAAGACTCTCAGGAGTA-3') を作成し、ゲルシフトアッセイに用いた。リコンビナント PCR 法にて、PGL3-1781 に含まれる VDRE1 (AGGTCAAAGACTACA, -1584/-1570) を (AGGCTCAAGACTCTC) に置換した DNA を増幅し、この PCR 産物を EcoRV と EcoRI で切断し pGL3 Basic に取り込み、変異コンストラクト (pGL3-1781mut) を作成した。プラスミド DNA を EndoFree plasmid Maxi kit (QIAGEN) で調整し、SaOS2 細胞に導入しルシフェラーゼアッセイを行って 1α , 25 (OH) $_2$ D $_3$ の効果を調べた。

結 果

1) 共培養

1α , 25 (OH) $_2$ D $_3$ の破骨細胞形成に及ぼす効果を検討した。図 1 に示すように対照の $14/\text{cm}^2$ に比べ、 1α , 25 (OH) $_2$ D $_3$ 単独処理で $90/\text{cm}^2$ と約 6 倍の破骨細胞様多岐細胞を誘導した。デキサメサゾン共存下では $127/\text{cm}^2$ と対照の約 9 倍の破骨細胞形成を認め、相加的作用を示した。

2) RT-PCR

1α , 25 (OH) $_2$ D $_3$ の RANKL 遺伝子発現に及ぼす効果を検討した。 1α , 25 (OH) $_2$ D $_3$ は濃度依存性に

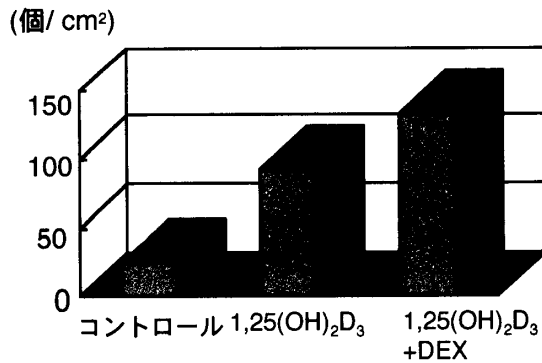


図1 共培養。M-CSF 処理したマウス骨髄マクロファージとSaOS2 細胞を無処理, 10^{-8} M $1\alpha, 25$ (OH) $_2$ D $_3$, 10^{-8} M $1\alpha, 25$ (OH) $_2$ D $_3$ と 10^{-8} M デキサメサゾン処理の条件下で 10 日間共培養を行った。グラフは形成された TRAP 陽性の破骨細胞様の細胞数を示す。

RANKL mRNA 発現を促進し, デキサメサゾン共存下では相加的に RANKL mRNA の発現量が増した。一方 GAPDH mRNA の発現量はほぼ一定であった (図2)。

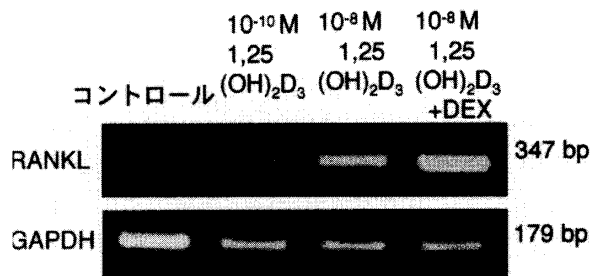


図2 RT-PCR。 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} M の $1\alpha, 25$ (OH) $_2$ D $_3$ 或いはデキサメサゾン共存下で処理した SaOS2 細胞から抽出した total RNA に対し RT-PCR 法を行った。RANKL cDNA (347 bp) および GAPDH cDNA (179 bp) のシグナルを半定量的に評価した。

3) Nuclear run on アッセイ

定常状態の RANKL 遺伝子転写を検討した。対照と比較して, $1\alpha, 25$ (OH) $_2$ D $_3$ は SaOS2 細胞において RANKL 遺伝子の転写を 10^{-10} M で約 3 倍, 10^{-8} で約 5 倍に促進した。一方, 対照の GAPDH 遺伝子の転写は一定であった (図3)。

4) ヒト RANKL 5' 側上流領域の塩基配列と転写開始部位の決定

図4に示すようにプライマー伸長反応の結果, 複数の転写産物が得られたが, 最上流にあるシグナルを転

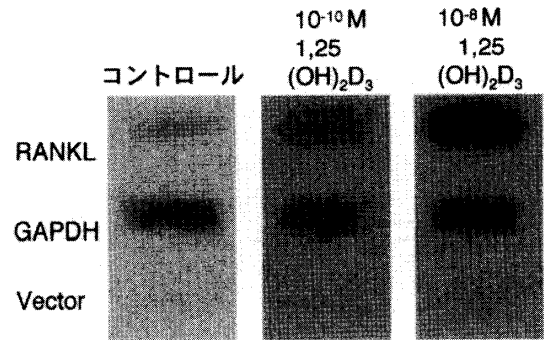


図3 Nuclear run on アッセイ。 10^{-10} , 10^{-8} M の $1\alpha, 25$ (OH) $_2$ D $_3$ で処理した SaOS2 細胞の核抽出物を用い *in vitro* 転写反応を行い, RANKL, GAPDH および Vector の cDNA をプローブとしてシグナルを検出した。

写開始部位 (+1) とした。この転写開始部位は, TATA ボックスの22塩基下流に位置した。転写開始部位の上流には逆 TATA ボックス (-22) に加え CAAT ボックス (-56) を認めた。また, -201には Runx2 結合配列を, -1584, -1418, -1383の3ヶ所に VDRE 類似配列を認めた (データ提示せず)。

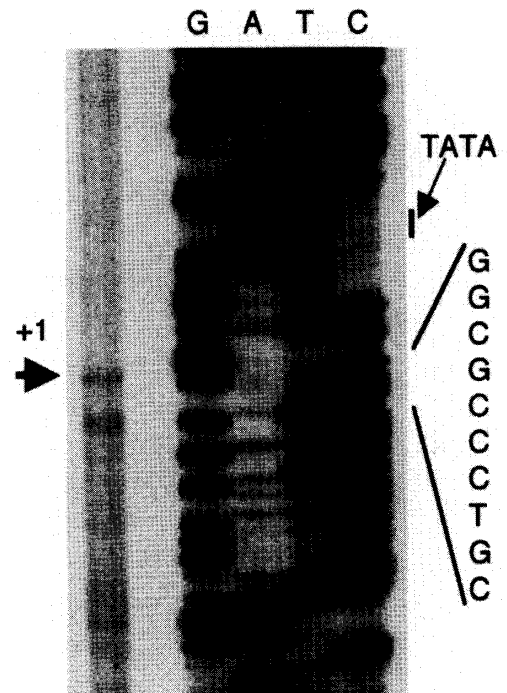


図4 プライマー伸長法。ヒト RANKL 遺伝子 5' 側上流領域の塩基配列を右側の GATC レーンに示す。矢印はプライマー伸長反応産物を示す。転写開始部位 (+1) は TATA から22塩基下流に位置していた。

5) ゲルシフトアッセイ

図5Aに示すように, 3箇所の VDRE 類似配列の

うち、最上流 VDRE1 を含むオリゴヌクレオチドに関して、VDR, RXR α 蛋白との有意な蛋白 DNA 結合を認めた。VDRE1 について、一連のステロイドホルモンに対する抗体を加えたスーパーシフトアッセイでは、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 処理の SaOS2 細胞の核抽出物を用いたアッセイにおいて、有意な蛋白 DNA 結合を認め、抗 VDR 抗体、抗 RXR 抗体によるスーパーシフトを認めた (図 5 B)。VDRE1 (AGGTCAAAGACTACA) について変異を導入したオリゴヌクレオチド (AGGCTCAAGACTCTC) を用いたゲルシフトアッセイでは、有意な蛋白 DNA 結合やスーパーシフトを認めなかった (データ提示せず)。

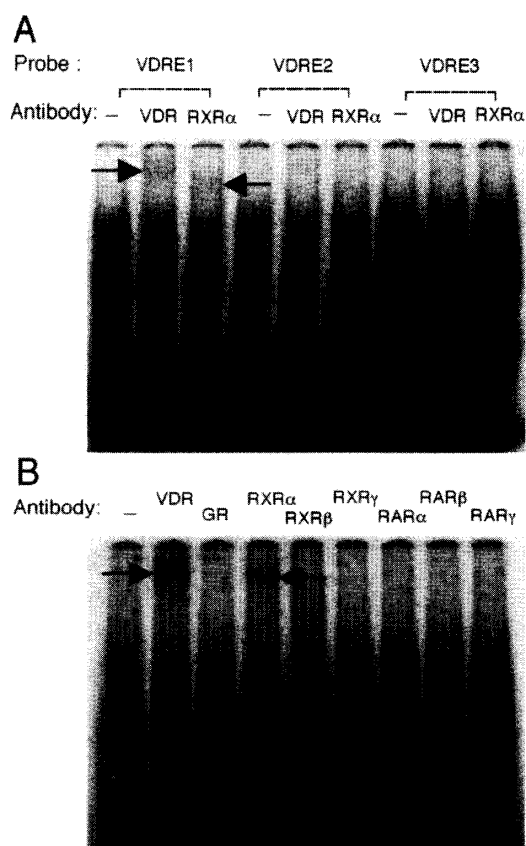


図 5 ゲルシフトアッセイ。A. 3ヶ所の VDRE 類似配列 (VDRE1, VDRE2, VDRE3) に対してリコンビナント VDR 蛋白, RXR α 蛋白を用いたゲルシフトアッセイでは、VDRE1 において有意な蛋白 DNA 結合 (矢印) を認めた。B. VDRE1 に関して一連のステロイドホルモンを加えたスーパーシフトアッセイでは、有意な蛋白 DNA 結合と、抗 VDR 抗体と抗 RXR 抗体によるスーパーシフトを認めた (矢印)。

6) ルシフェラーゼアッセイ

VDRE を含むコンストラクト (pGL3-1781) を用いた一過性遺伝子導入実験では、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 処理により約60%のプロモーター活性上昇を認めたが、

VDRE を含まないコンストラクト (PGL3-1035) では $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による有意なプロモーター活性促進作用を示さなかった (図 6)。また、変異 VDRE1 を組み込んだコンストラクト (pGL3-1781 mut) を用いた一過性遺伝子導入実験では、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 処理による RANKL プロモーター活性は17%にとどまり、有意の増加を認めなかった (図 6)。

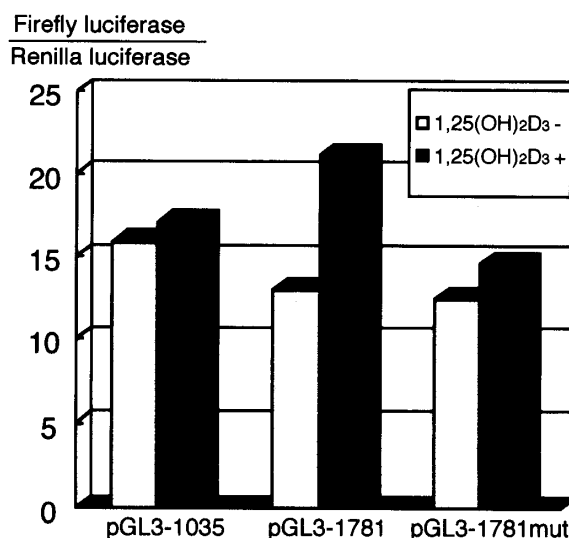


図 6 ルシフェラーゼアッセイ。PGL3-1035, pGL3-1781 および VDRE1 に変異を導入した pGL3-1781mut の一過性導入実験において定常状態と $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 処理後のルシフェラーゼ活性を示す。pGL3-1781 では $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在下でプロモーター活性が約60%増加したが、pGL3-1035 については変化を示さず、pGL3-1781mut ではプロモーター活性の増加は17%にとどまった。

考 察

ステロイドホルモンであるビタミン D は、肝臓と腎臓で水酸化を受けて活性型の $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ になる。 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は小腸からのカルシウム吸収や骨からのカルシウム動員を促進することにより血中カルシウムの恒常性維持機能を果たすが、破骨細胞分化を促進することで骨吸収を促進し、骨芽細胞に働いて骨基質蛋白合成を促進することで骨形成を促進するとされている^{11, 12)}。1988年に確立されたマウス骨髄細胞と骨芽細胞の共培養実験系において、破骨細胞分化に骨芽細胞系との相互作用が不可欠であること、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は骨芽細胞存在下で破骨細胞形成を促進することが示された^{1, 2)}。その後マウスでは $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は骨髄ストローマ細胞/骨芽細胞上の RANKL 発現を誘導することにより破骨細胞形成を

促進することが報告されたが^{8, 9)}, ヒトにおいては $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による RANKL 発現や破骨細胞形成に対する作用機序は明らかでない。私共は図1に示すようにヒト骨芽細胞 SaOS2 とマウス骨髄細胞との共培養において $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は破骨細胞形成を促進し, RT-PCR 法 (図2) にて $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が SaOS2 細胞における RANKL mRNA の発現を誘導することを示した。このように $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ はヒト骨芽細胞に対して RANKL 遺伝子発現を促進することにより破骨細胞形成を促進するが, さらに Nuclear run on 法 (図3) により, $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による RANKL mRNA の増加は, 転写亢進によることを明らかにした。私共は $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ によるヒト RANKL 遺伝子の転写調節機構を詳細に解析するため, 遺伝子 5'側上流領域のクローニングを行った。

ヒト RANKL 遺伝子 5'側上流領域には, 基本転写調節部位に逆 TATA, CAAT ボックス, Runx2 結合配列を認め, 既報のマウス RANKL プロモーターと構造上の類似を認めた。興味深いことに逆 TATA, CAAT ボックス構造は, 主要な骨基質蛋白である骨シヤロ蛋白オステオカルシン¹⁴⁾ のプロモーター領域においても報告されている。さらに, 骨形成に必須の転写因子である Runx2 結合配列がヒト RANKL 遺伝子プロモーター領域に含まれることから, RANKL 遺伝子は骨形成が促進される状況において同時に活性化され骨吸収が引き起こされる可能性が考えられた。

一般に, $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は, 核内受容体スーパーファミリーに属するビタミン D 受容体 (vitamin D receptor; VDR) と結合し, レチノイン酸受容体 (Retinoid X receptor; RXR) とヘテロダイマーを形成し標的遺伝子 5'側上流にあるビタミン D 応答配列 (vitamin D responsive element; VDRE) に結合し転写活性を制御すると考えられている。リガンド依存性に VDR-RXR ヘテロダイマーが結合する VDRE はダイレクトリピート (direct repeats; DR) 型と呼ばれる構造を持ち, 6 塩基からなるハーフサイトが 2 つ, 同方向で 3 つの塩基を狭んで並んでいる¹⁵⁾。ヒト RANKL 5'側上流領域の塩基配列の決定により, ヒト RANKL 遺伝子 5'側上流には (-1584/-1570, AGGTCAAAGACTACA) と (-1418/-1404, AATTCAACCTGGTCA) と (-1383/-1369, AGGTCTAAGTGTTC) の 3 箇所にダイレクトリピート型のハーフサイトが見い出された。これらの 3 箇所の VDRE 候補配列を含むオリゴヌクレオチドを用いゲルシフトアッセイを行った。図5Aに示すように, 最上流 (-1584/-1570, AGGTCAAAGACTACA) が VDR, RXR α ヘテロ

ダイマーと *in vitro* での蛋白 DNA 結合性を示し, 図5Bに示すように核蛋白抽出物とステロイドホルモン受容体に対する抗体を用いたスーパーシフトアッセイでも VDR, RXR ヘテロダイマーが結合することが確認された。変異 VDRE を用いたゲルシフトアッセイで特異的なバンドはほぼ完全に焼失した (データ提示せず)。ヒト骨芽細胞 SaOS2 を用いた一過性遺伝子導入実験を行って $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ のプロモーター活性に及ぼす効果を調べると, VDRE を有する PGL3-1781 で約60%の活性上昇を認めたが, PGL3-1035 については有意な促進作用を認めなかった。変異 VDRE を有する pGL3-1781 mut を用いた一過性遺伝子導入実験でも $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の効果は著明に減弱することから, RANKL 5'側上流領域 (-1584/-1570, AGGTCAAAGACTACA) が機能的な VDRE であることが示唆された。さらに, $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による効果がわずかに残存していたことにより他の 2 箇所の VDRE 様配列が機能を有する可能性も考えられた。

以上の結果より, ヒト骨芽細胞において, $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が RANKL 遺伝子 5'側上流領域に存在する VDRE を介して RANKL 遺伝子発現を転写レベルで促進し, 破骨細胞形成に寄与する分子機構が明らかとなった。

文 献

- 1) Udagawa, N., Takahashi, N., Akatsu, T., Tanaka, H., Sasaki, T., Nishihara, T., Koga, T., Martin, T. J., Suda, T.: Origin of osteoclasts: mature and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87 : 7260-7264, 1990.
- 2) Takahashi, N., Akatsu, T., Udagawa, N., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Moseley, J. M., Martin, T. J., Suda, T.: Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* 123 : 2600-2602, 1988.
- 3) Suda, T., Takahashi, N., Martin, T.J.: Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr. Rev.* 13 : 66-80, 1992.
- 4) Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinoshita, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N., Suda, T.: Osteoclast differentiation factor is a ligand

- for osteoprotegerin/ osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95 : 3597-3602, 1998.
- 5) Simonet, W. S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Luthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R., Amgen EST Program, Boyle, W.J.: Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89 : 309-319, 1997.
 - 6) Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., Kelley, M.J., Dunstan, C.R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkin, N., Davy, E., Capperelli, C., Eli, Qian, Y.X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J., Boyle, W.J.: The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *Cell* 93 : 165-176, 1998.
 - 7) Nakagawa, N., Kinosaki, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Yano, K., Morinaga, T., Higashio, K.: RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253 : 395-400, 1998.
 - 8) Suda, T., Udagawa, N., Nakamura, I., Miyaura, C., Takahashi, N.: Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone* 17 : 87S-91S, 1995.
 - 9) Kitazawa, R., Kitazawa, S.: Promoter structure of mouse RANKL/TRANCE/OPGL/ODF gene. *Biochim Biophys. Acta*. 1445: 134-141, 1999.
 - 10) Kitazawa, R., Kitazawa, S.: Vitamin D(3) Augments Osteoclastogenesis via Vitamin D-Responsive Element of Mouse RANKL Gene Promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290 : 650-605, 2002.
 - 11) Reichel, H., Koeffler, H.P., Norman, A.W.: The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N. Engl. J. Med.* 320 : 980-991, 1989.
 - 12) Ishida, H., Bellows, C.G., Aubin, J.E., Heersche, J.N.: Characterization of the 1, 25-(OH)2D3-induced inhibition of bone nodule formation in long-term cultures of fetal rat calvaria cells. *Endocrinology* 132 : 61-6, 1993.
 - 13) Sodek, J., Li, J. J., Kim, R.H., Ogata, Y., Yamauchi, M.: Characterization of the bone sialoprotein (BSP) gene promoter. *Connect. Tissue. Res.* 35 : 23-31, 1996.
 - 14) Goldberg, D., Gardiner, E., Morrison, N., Eisman, J.: The osteocalcin and collagen type I (alpha 1) promoters share common basal regulatory units. *DNA Cell Biol.* 14 : 519-528, 1995.
 - 15) Issa, L.L., Leong, G.M., Eisman, J.A.: Molecular mechanism of vitamin D receptor action. *Inflamm. Res.* 47 : 451-475, 1998.

Characterization of the 5'-flanking region of the human RANK ligand gene

Kazuyoshi Kajimoto^{1, 2}, Riko Kitazawa¹, and Sohei Kitazawa¹

Division of Molecular Pathology, Department of Biomedical Informatics¹,
and Division of Endocrinology/Metabolism, Neurology and Hematology/
Oncology, Department of Clinical Molecular Medicine²,
Kobe University Graduate School of Medicine

ABSTRACT : RANK ligand has been identified as a prerequisite to osteoclastogenesis. Most of the bone resorptive factors are thought to modulate bone resorption by regulating RANKL expression on osteoblasts and stromal cells. To elucidate the mechanism regulating human RANKL gene expression, we first examined the effect of $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on the RANKL gene by nuclear run on analysis, and found that it accelerated the transcription rate of the RANKL gene in the SaOS2 cell line. We then focused on the promoter structure and cis-acting elements of the human RANKL gene that conducts $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ signaling. From the human genomic library, we cloned a 11kb fragment containing the 5'-flanking region of the RANKL gene and accessed its promoter activity by transient transfection assay. The basic promoter of human RANKL gene comprises inverted TATA- and CCAAT-boxes and putative Runx2 binding sites. Three putative VDRE are located at -1584/-1570 (VDRE1), -1418/-1404 (VDRE2), and -1383/-1369 (VDRE3) from the transcription start site. Radio-labeled double stranded oligonucleotides corresponding to the three putative VDREs were generated, mixed with nuclear extract from $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -treated SaOS2 cells, and subjected to gel motility shift assay. Specific binding of the VDR and RXR heterodimers to VDRE1 was observed as supershifted bands by anti-VDR and -RXR α antibodies. The presence of the functional VDRE was assessed by transient transfection studies. Promoter-luciferase constructs with (PGL3-1781) and without (PGL3-1035) VDRE1 were transfected into SaOS2 cells. The treatment increased RANKL promoter activity to 160% in PGL3-1781, which was almost nullified in PGL3-1035. Introduction of mutation to the VDRE1 site of the PGL3-1781 construct also nullified the inductive effect of $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on the RANKL promoter. These data indicate that the human RANKL gene promoter shares striking structural similarities with the mouse promoter, and that $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ transactivates human RANKL gene through cis-acting VDRE located at -1584/-1570.