

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21380116

研究課題名（和文） 再生鱗をモデルとしたコラーゲン配向機構の解明—魚コラーゲンから生体修復材料を造る

研究課題名（英文） Studies on the mechanism of collagen fibril assembly in fish scales

研究代表者

都木 靖彰 (TAKAGI YASUAKI)

北海道大学・大学院水産科学研究院・教授

研究者番号：10212002

研究成果の概要（和文）：質量分析を用いて、鱗コラーゲンの高次配向制御に関わる可能性が高いSLRPsを同定するとともに、その遺伝子クローニングをおこなって発現部位を明らかにした。また、コラーゲン変性温度が $\alpha 3$ 鎖の量とプロリン残基水酸化率とで制御される可能性を示した。さらに、磁場内でコラーゲン線維配向構造創出をおこなって粘弾性特性、引張強度を明らかにするとともに、再線維化コラーゲンをを用いて高密度の新規メソ多孔材料の開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：Using MS analysis, scale SLRPs, which were possible regulators of 3-dimensional architecture of teleost fish collagen, were identified. After the cDNA cloning of SLRPs, localization of their mRNAs were clarified. We also revealed a negative correlation between collagen denaturation temperature (DT) and contents of $\alpha 3$ -subunit, as well as positive correlation between DT and hydroxylation ratio of proline residues in the collagen. Thus, these two factors seem to be the major regulators of DT of fish collagen. Artificial fibrillogenesis of collagen under magnetic field enabled a synthesis of a material having relatively aligned collagen fibrils, whose viscoelasticity and tensile strength were highest under 4 T and 12 T, respectively. High-density meso-porous new material was also synthesized using fish collagen.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2012年度	0	0	0
年度			
総計	10,000,000	3,000,000	13,000,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：生理・生体材料・鱗・再生・コラーゲン・角膜

1. 研究開始当初の背景

人体の組織をささえ、それを形作るのはコラーゲンである。そのため骨、腱、角膜など再生能の低い組織の再生医療用人工基質（人工骨など）として、ウシ・ブタコラーゲンの

実用化研究が進められている。しかし、哺乳類コラーゲンにはBSEをはじめとする人獣共通感染症の心配があるうえ、コラーゲンを主体とする基質の物性（強度や細胞との親和性など）を決定づける線維の配向性を人工的に

制御する技術は完成していない。われわれのグループでは、人獣共通感染症の危険が極めて低い魚類コラーゲンが安全性の面で優れていると考え、その実用化研究を世界に先駆けて開始した。また、従来法に変わるコラーゲン配向制御技術として、生物の機能を模して配向を制御し、より生体に近い材料を合成する Bioinspired 技術の開発をめざすこととした。そのためには、対象とする組織の発生・再生機構の分子レベルでの解明が必要となる。しかし、哺乳類では角膜をはじめとする組織の再生能は低く、そのような研究をおこなうににくい場合もある。

魚類の鱗は構造の異なる 2 層よりなる。外層の骨質層は方向不定に走るコラーゲンにリン酸 Ca 結晶が沈着しており、その構造は哺乳類の頭蓋骨などの膜状の骨と同等である。内層の線維層板は、コラーゲンが一定方向に走る層が多数重層しており、しかも各層間でコラーゲンの走行方向が約 90° に交差する。この構造はわれわれの角膜に同等である。また、鱗は抜け落ちると急速に再生する。骨質層の再生は失われた膜骨を丸ごと再生する機能であり、線維層板の再生は角膜様高次配向コラーゲンの再生機能である。どちらも哺乳類では失われた特殊能力であり、鱗は骨再生および角膜再生機構を解明する極めてユニークなモデルである。われわれはこの点に世界で初めて着目し、ウロコ形成・再生の分子機構を解明してその成果をより生体に近い材料を合成する Bioinspired 技術の開発に繋げることをめざしている。

2. 研究の目的

コラーゲン性基質の Bioinspired 合成として、実用化研究では抽出した鱗コラーゲンの再線維化における配向制御と高密度化をめざす。また、より安全な化学架橋剤や架橋剤そのものを用いないで魚類コラーゲンの変成温度を制御する方法の開発をめざす。そのための基礎研究として、*in vivo* においてコラーゲンの変性温度および配向を制御する因子の同定 (A~C)、抽出した鱗コラーゲンのプロセス化技術開発、その物性解明 (D, E) をおこなう。

3. 研究の方法

(1) 鱗の非コラーゲン性基質タンパク質の同定：鱗コラーゲンの線維化や配向制御には、非コラーゲン性基質タンパク質が関与するとの仮説に基づき、鱗から非コラーゲン性タンパク質を抽出し、質量分析法を用いてその同定をおこなう。タンパク質を用いた研究にはキンギョを用いる（鱗が大きくタンパク質抽出が可能のため）。

(2) 同定された鱗基質タンパク質の機能解明：質量分析で同定されたタンパク質の遺伝

子クローニングと、発現解析をおこなう。遺伝子の発現および機能探索は技術開発のもっとも進んでいるモデル魚（ゼブラフィッシュ）を用いる。

(3) 魚類コラーゲンの変性温度制御機構の解明：コラーゲンの変性温度は、コラーゲン分子のアミノ酸組成と相関することが報告されている。たとえば、ヒドロキシプロリン残基 (Hyp) は α 鎖間の架橋を形成して変性温度を高めると予想されている。一方、グリシン-グリシン (Gly-Gly) の連続配列は、 α 鎖のヘリックスをゆがめ、変性温度を下げると予想されている。また、魚類の $\alpha 3$ 鎖は Hyp の数が少なく、Gly-Gly 配列を多く含むので、 $\alpha 3$ 鎖を多く含むコラーゲンの変性温度は低くなると予想されている。そこで、キンギョの様々な器官から精製された I 型コラーゲンの変性温度と、これらの器官におけるコラーゲンの $\alpha 1\sim 3$ 鎖の mRNA 発現量を比較し、コラーゲンの変性温度と $\alpha 3$ 鎖の量との層間を尾明らかにする。次に、飼育水温とコラーゲンの変性温度との関係をコイを用いて調べる。中国のコイで、季節によりコラーゲンの変性温度が変化することが報告されているため、日本のコイでも同様のことが観察されるかを確認するとともに、コラーゲンの変性温度とアミノ酸組成、特に Hyp 含量との関係を明らかにする。

(4) 再線維化におけるコラーゲン線維配向構造の構築と材料物性：磁場内での配向構造創出をおこない、その粘弾性特性を明らかにする。

(5) 再線維化コラーゲンの高密度体の構造解析：コラーゲンを線維化して高密度体を造り、その気孔率等を測定する。

4. 研究成果

(1) 鱗の非コラーゲン性基質タンパク質の同定：TOF-MS, LC-MS, ライブラリスクリーニングを実施し、53 種のタンパク質を同定した。そのうち、コラーゲン線維の形成や配向に関わる可能性の高い重要なものは 6 種の SLRPs とデルマトポンチンと呼ばれるコラーゲンに結合する基質タンパク質であった。

(2) 同定された鱗基質タンパク質の機能解明：ゼブラフィッシュ SPP1, コンドロアドヘリン等全 10 種をクローニングし発現解析を終了した。また、機能解明に用いる研究ツールとして Vivo-morpholino ノックダウン法、鱗細胞培養系を確立した。しかし、遺伝子解析の過程で、ゼブラフィッシュ SLRPs には 2 型以上の遺伝子が存在する（しかもデータベースの登録は 1 型のみの場合が多い）可能性が高まった。そのため、常法に従ったモルフォリノノックダウン等が有効ではない可能性が考えられた。そのため、SLRPs の機能解

析をおこなう前に、多型の遺伝子配列決定と、発現部位・発現量解析を徹底的におこない、魚類 SLPRs に関する基礎生物学的基盤形成が必要であることが示された。

(3) 魚類コラーゲンの変性温度制御機構の解明：キンギョの皮膚、浮袋、鱗、および消化管から精製された I 型コラーゲンの変性温度は器官に異なる特異的な値を示すこと、コラーゲンの変性温度が低い器官においては $\alpha 3$ 鎖の mRNA 発現量が高いことを見いだした。このことから、当初の仮説通り、コラーゲンの 3 本鎖を形成する $\alpha 3$ 鎖の量と変性温度との間には負の相関関係があることが推察された。次に、長野県で養殖されているコイを夏期と冬期に採集し、皮膚および鱗の I 型コラーゲンを抽出してその変性温度を測定した。その結果、両組織のコラーゲンの変性温度は水温が高い夏期に有意に高かった。また、そのアミノ酸組成を比較したところ、夏期ではプロリン残基の水酸化率が高く、プロリン水酸化酵素の活性とコラーゲンの変性温度との関係に正の相関があることが推測された。このように、コラーゲンの変性温度は $\alpha 3$ 鎖の量とプロリン水酸化率とで調節されており、それは飼育水温と関係することが予想された。このように、プロリン水酸化酵素の活性を通して、コラーゲンの変性温度を人為的に調整する技術の開発が可能となるかもしれない。

(4) 再線維化におけるコラーゲン線維配向構造の構築と材料物性：磁場内での配向構造創出をおこない、その粘弾性特性は 4 T (テスラ) のときに最も高い値を示すこと、引張強度は磁場強度が最も高い 12 T で最大値 80 MPa を示すことを明らかにした。

(5) 再線維化コラーゲンの高密度体の構造解析：構造解析の結果、新規メソ多孔材料の開発に成功した。

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 7 件)

- ① Zhang X, Shimoda K, Ura K, Adachi S, Takagi Y, 2012, Developmental structure of the vertebral column, fins, scutes and scales in the bester, the hybrid of Beluga *Huso huso* and Sterlet *Acipenser ruthenus*, Journal of Fish Biology, 81, 1985-2004, 査読有り,
DOI: 10.1111/j.1095-8649.2012.03451.x
- ② Iimura K, Tohse H, Ura K, Takagi Y,

2012, Expression patterns of *runx2*, *sparc* and *bgp* during scale regeneration in the goldfish *Carassius auratus*, Journal of Experimental Biology, Part B, Molecular and Developmental Evolution, 318, 190-198, 査読有り,
DOI: 10.1002/jez.b.22005.

- ③ 都木靖彰, 2011, ウロコから眼：さかなのウロコのコラーゲンを利用して人工角膜を造る, 化学と生物, 49, 156-158, 査読無し.
- ④ 都木靖彰, 2011, 魚類コラーゲンと哺乳類コラーゲン—分子から見た共通点と相違点, そして魚類コラーゲン利用の水産業へのインパクト, バイオインダストリー, 28(11), 10-15, 査読無し.
- ⑤ Ogawa N, Ura K, Takagi Y, 2010, Scale calcification in the goldfish *in vitro*: histological and quantitative analysis, Fisheries Science, 76, 189-198, 査読有り,
DOI 10.1007/s12562-009-0197-7
- ⑥ 都木靖彰, 2010, はじめに一なぜ, 今, さかなコラーゲン—, マテリアルインテグレーション, 23(02), 1-5, 査読無し.
- ⑦ 都木靖彰, 2010, 魚のうろこのコラーゲンの特徴—分子生物学—, マテリアルインテグレーション, 23(02), 12-16, 査読無し.

[学会発表] (計 23 件)

- ① 檀永凱・浦和寛・都木靖彰, ゼブラフィッシュ *Danio rerio* の硬組織におけるデルマトポンチン (Dpt) の発現解析と機能解析, 第 7 回バイオミネラライゼーションワークショップ, 2012 年 12 月 1 日, 東京大学理学部.
- ② 檀永凱・飯村九林・佐藤哲郎・浦和寛・都木靖彰, ゼブラフィッシュ成魚におけるデルマトポンチン (Dpt) の発現解析, (社)日本動物学会 第 83 回大会, 2012 年 9 月 13 日~15 日, 大阪大学.
- ③ 檀永凱・飯村九林・浦和寛・都木靖彰, ゼブラフィッシュ *Danio rerio* におけるデルマトポンチン (DPT) の発現解析, 日本動物学会第 82 回大会, 2011 年 9 月 21 日~23 日, 旭川市大雪クリスタルホール.
- ④ Takagi Y, Sekimoto H, Sugiyama A, Komatsu N, Ogawa N, Iimura K, Ura K, LC-MS/MS analysis is a powerful tool to identify noncollagenous proteins in the scale basal plate of the goldfish *Carassius auratus*, 2nd International Workshop:

Interdisciplinary Approaches in Fish Skeletal Biology, April 26 - 28, 2011 Tavira, Algarve, Portugal.

- ⑤ Iimura K, Takagi Y, Expression patterns of bone-related factors during scale regeneration in zebrafish *Danio rerio*, 2nd International Workshop: Interdisciplinary Approaches in Fish Skeletal Biology, April 26 - 28, 2011 Tavira, Algarve, Portugal.
- ⑥ 関本拓・小松典彦・杉山ありさ・小川展弘・浦和寛・都木靖彰, 鱗の線維層板を構成するタンパク質の探索-1 非コラーゲン性タンパク質の網羅的同定の試み, 平成22年度日本水産学会秋季大会, 2010年9月, 京都大学.
- ⑦ 佐藤哲郎・浅井理沙・杉山ありさ・飯村九林・浦和寛・都木靖彰, 鱗の線維層板を構成するタンパク質の探索-2 Small Leucine-Rich Proteoglycans (SLRPs) の cDNA クローニングおよび発現解析, 平成22年度日本水産学会秋季大会, 2010年9月, 京都大学.
- ⑧ Iimura K, Tohse H, Ura K, Takagi Y, Molecular mechanisms of cellular differentiation in teleost fish scales, 2nd International Sclerochronology Conference, 24-28th July 2010, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, Germany.
- ⑨ Takagi Y, Tohse H, Ogawa, Nagasawa H, Proteomic and mRNA expression analyses in the teleost fish otolith and scale suggest organic control of rhythmic growth and biomineralization, 2nd International Sclerochronology Conference, 24-28th July 2010, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, Germany.
- ⑩ 飯村九林・真砂勇作・徳永啓太・長田光司・渡部晃・浦和寛・都木靖彰, キンギョ I 型コラーゲンに関する研究 1 I 型コラーゲンの cDNA クローニングとその発現解析, 平成 21 年度日本水産学会秋季大会, 2009 年 9 月 30 日~10 月 3 日, いわて県民情報交流センター.
- ⑪ 小川展弘・生駒俊之・都木靖彰, キンギョ I 型コラーゲンに関する研究 2 生化学的解析と熱安定性, 平成 21 年度日本水産学会秋季大会, 2009 年 9 月 30 日~10 月 3 日, いわて県民情報交流センター.
- ⑫ 小松典彦・小川展弘・浦和寛・都木靖彰 (2009) キンギョ鱗の線維層板を構成する非コラーゲン性タンパク質の性状解析. (社) 日本動物学会北海道支部第

55 回大会, 2009 年 8 月 8 日, 北海道大学水産学部.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

都木 靖彰 (TAKAGI YASUAKI)
北海道大学・大学院水産科学研究院・教授
研究者番号: 10212002

(2) 研究分担者

生駒 俊之 (IKOMA TOSHIYUKI)
東京工業大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号: 20370306

(3) 連携研究者

浦 和寛 (URA KAZUHIRO)
北海道大学・大学院水産科学研究院・助教
研究者番号: 90360940