

令和 3 年 4 月 28 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06106

研究課題名(和文) 骨のコラーゲン線維分解におけるグリコサミノグリカンの新たな機能の解明

研究課題名(英文) A novel function of glycosaminoglycans in degradation of collagen fibrils of bone

研究代表者

多田羅 洋太 (Tatara, Yota)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：00443995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲンとグリコサミノグリカン(GAG)は骨の主要な有機成分であるにもかかわらず、その相互作用はこれまでほとんど知られていなかった。これまでに酸性条件においてGAGがコラーゲン線維に結合して耐酸性コラーゲン線維を形成することを見出している。該当年度ではコラーゲンの分解産物を網羅的にモニターできる質量分析装置を使用した測定系を用いて、カテプシンKによる耐酸性コラーゲン線維の分解について検討した。この結果、コラーゲン線維とコンドロイチン4-硫酸とが結合して耐酸性コラーゲン線維を形成したサンプルでは、カテプシンKによるコラーゲン線維からのペプチド遊離が抑制される傾向が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グリコサミノグリカン(GAG)がコラーゲン線維に結合して、耐酸性コラーゲン線維を形成することに本研究による新発見であり、骨分解においてGAGが今まで知られていなかった新しい機能を持つ可能性が示された意義がある。このことは骨吸収においてコラーゲン線維が分解されるメカニズムの解明に寄与するものであり、骨のGAGをターゲットとした新しい骨粗鬆症治療薬の開発への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：Even though collagen and glycosaminoglycans (GAGs) are the major organic components of bone, little is known about their interaction so far. I have found that GAGs bind to collagen fibrils under acidic conditions to form acid-resistant collagen fibrils. In this year's study, I investigated the degradation of acid-resistant collagen fibrils by cathepsin K using a measurement system with a mass spectrometer that can comprehensively monitor the degradation products of collagen. As a result, the release of peptides from collagen fibrils by cathepsin K tended to be suppressed in the samples in which collagen fibrils bind to chondroitin 4-sulfate to form acid-resistant collagen fibrils.

研究分野：糖質生物学

キーワード：グリコサミノグリカン 骨分解 コラーゲン線維

1. 研究開始当初の背景

骨吸収ではまず、破骨細胞から放出されるプロトンにより酸性微小環境が作られる。骨組織の65%を占める無機質はこの酸により溶解し骨が脱灰される。骨組織に最も多く存在する有機質はコラーゲン線維であるが、破骨細胞から分泌され酸性条件下で活性化したカテプシン K によりコラーゲン線維は分解される。

プロテオグリカンはコラーゲン線維に次いで骨に多く含まれる有機質である。グリコサミノグリカン (GAG) はプロテオグリカンの糖鎖として存在しており、枝分れのない長鎖多糖で、2糖の繰り返し構造からなる。多数の硫酸基とカルボキシ基を持つために、強く負に帯電する特徴を持つ。骨に最も豊富に含まれる GAG はコンドロイチン 4-硫酸であるが、コンドロイチン 4-硫酸はカテプシン K の活性を促進することが報告されている。また骨のプロテオグリカンはコラーゲンの線維形成を調節することが知られている。このようにプロテオグリカンとコラーゲンや、GAG とカテプシン K の相互作用はよく研究されているが、GAG とコラーゲンの関係はあまり注目されてこなかった。このため、骨のコラーゲン線維の分解メカニズムは未だに解明されていない。しかし、破骨細胞が形成する酸性条件下において GAG がコラーゲン線維に結合し、酸により変性・溶解しない耐酸性コラーゲン線維 (図 1) を形成することを発見したことにより、骨分解における GAG の機能を解明する糸口が開かれた。

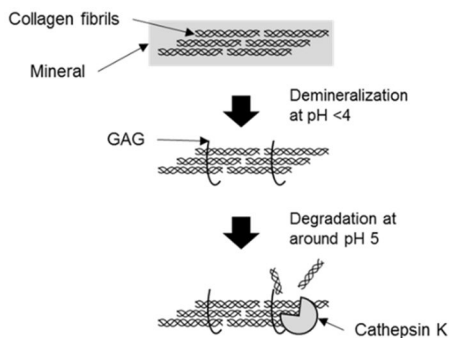


図1. GAG結合による耐酸性コラーゲン線維の形成

2. 研究の目的

GAG により形成される耐酸性コラーゲン線維がコラーゲン線維分解においてどのような役割を担うのかを明らかにする。これにより、これまで知られていなかった GAG の新たな機能を明らかにし、骨吸収におけるコラーゲン線維の分解メカニズムを解明することを目的とする。

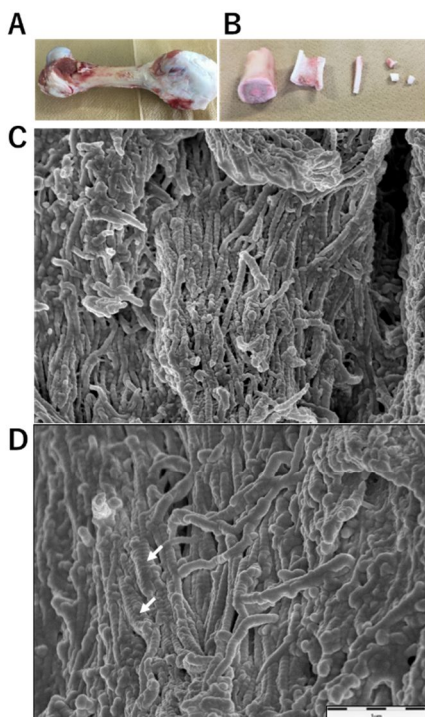


図2. 脱灰骨の調製と骨表面の観察
A, ウシ骨. B, 骨髓の除去と骨の小片化. C, 走査型電子顕微鏡による耐酸性コラーゲン線維の観察. 骨小片をEDTAにより脱灰後、コンドロイチナーゼABC処理によりGAGを除去した。D, 酸性条件下でコンドロイチン4-硫酸と結合させ耐酸性コラーゲン線維を形成させた。コラーゲン線維の束構造を矢印で示した。

3. 研究の方法

GAG がコラーゲン線維分解においてどのような役割を持つのかを明らかにするために、GAG の結合により形成される耐酸性コラーゲン線維がカテプシン K により分解される様子を観察する。

骨を酸や EDTA で脱灰して得られるコラーゲン線維をコンドロイチナーゼ ABC で処理することで、GAG を欠失したコラーゲン線維を調製する。このコラーゲン線維がカテプシン K により分解されていく様子を走査型電子顕微鏡により観察する (図 2)。また、溶液中に溶け出してくるヒドロキシプロリンを定量することで、コラーゲン分解活性を比較する。

カテプシン K によるコラーゲン線維の分解において、予めコンドロイチン 4-硫酸とカテプシン K を混合した場合と、コンドロイチン 4-硫酸とコラーゲンを先に混合した場合でコラーゲン分解を比較する。これによりカテプシン K が、コラーゲン線維に結合した状態のコンドロイチン 4-硫酸によっても活性化されるか検討する。カテプシン K の活性化は SDS-PAGE により分子量の変化を測定することにより評価する。

カテプシン K によるコラーゲン線維分解のメカニズムを解明するために、コラーゲン分解産物を解析してカテプシン K によるコラーゲンの切断点を同定する。

カテプシン K は線維状態のコラーゲンを分解することができるが、それにはコンドロイチン 4-硫酸が必要となる。この研究ではカテプシン K によるコラーゲン線維の分解に与える GAG の影響を、分解産物を質量分析計により解析することで比較する。これによりコラーゲン線維の分解過程と、それに与える GAG の影響を明らかにする。

4. 研究成果

動物骨組織の小片について、カテプシンKによる分解実験と走査型電子顕微鏡による骨表面の観察実験を行った。まず小片化した骨を EDTA により脱灰し、続いてコンドロイチナーゼ ABC 処理することで内因性の GAG を除いた。この骨に酸性条件下でコンドロイチン 4-硫酸を結合させ、走査型電子顕微鏡により観察した(図2)。この結果、耐酸性コラーゲン線維では線維が束になっている様子が観察された。このことからコラーゲン線維は GAG と結合して束構造を形成することで、酸変性に対して耐性もつことが示唆された。

さらに、カテプシンKによる分解の様子を観察したところ、GAG を持たないコラーゲン線維は分解により末端の遊離が見られたが、耐酸性コラーゲン線維の束構造は分解されずに保持されていた(図3)。このことは GAG がコラーゲン線維に耐酸性を与えるだけでなく、分解に対しても耐性を与えていると考えられる。

次に、*in vitro* で再構成したコラーゲン細線維のカテプシンKによる分解実験を行った(図4)。既に報告されている通り、カテプシンKはGAGにより活性化するため、コラーゲン細線維が分解されるが、GAGをコラーゲン細線維に結合した状態では分解が抑制されていた。この結果は走査型電子顕微鏡で観察した結果と一致していると言える。

さらに詳細にGAGが関与するコラーゲン線維分解メカニズムを解明するために、質量分析装置を用いてカテプシンKにより産生するコラーゲン断片を網羅的にモニターする活性測定系(MRM-HR)を構築した(表1)。この系を用いて、カテプシンKによる耐酸性コラーゲン線維の分解について検討した。コラーゲン線維はカテプシンKによる分解を受け、経時的にN末端およびC末端側から分子内部へと分解が進行する様子がモニターされた。コンドロイチン4-硫酸を結合した耐酸性コラーゲン線維では、コラーゲンの内部配列の分解が抑制される傾向が見られた。この結果は走査型電子顕微鏡により観察されたカテプシンKに対して耐性を持つ耐酸性コラーゲン線維の束構造を裏付けていると考えられる。

以上より、コラーゲン線維はカテプシンKによる分解の際に、GAGと結合して耐酸性コラーゲン線維を形成することでカテプシンKの基質特異性に関与することが示唆された。このことは、骨分解におけるコラーゲン線維の分解メカニズムを解明する上で重要な知見であると思われる。なぜなら破骨細胞による骨吸収では第1段階として酸による無機質の溶解が行われる。このときコラーゲン線維は酸変性により溶解してしまうが、内因性のGAGが結合することで溶解が抑えられている可能性がある。さらにGAGはカテプシンKに結合してこれを活性化させるので、骨のGAGは骨分解の際にコラーゲン線維とカテプシンKに結合することで、両者を調整する役割があると考えられる。

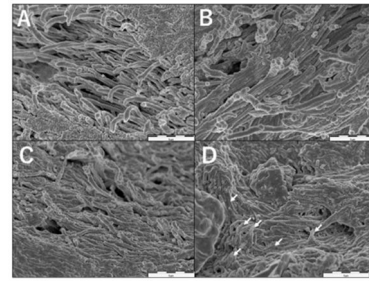


図3. 走査型電子顕微鏡を用いたウシ脱灰骨の分解観察
A, 対照. B, カテプシンKによる分解後. C, コンドロイチン4-硫酸存在下でのカテプシンKによる分解後. D, カテプシンKによる耐酸性コラーゲン線維の分解. コラーゲン線維の束構造を矢印で示した。

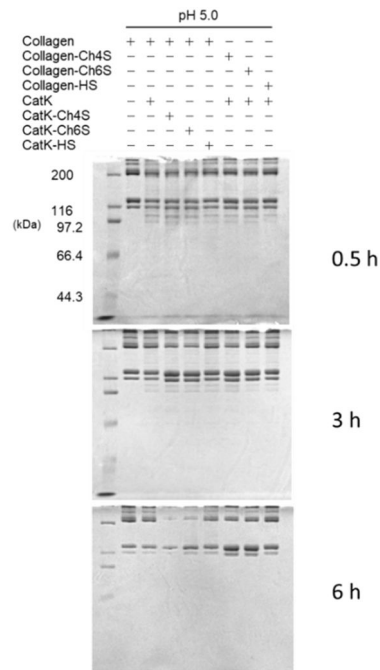


図4. カテプシンKによるコラーゲン細線維の分解実験

表1. コラーゲン分解産物を網羅的にモニターするMRM-HR測定系

Sequence	Obs MW	z	Product ion	Product ion m/z
GIPGQPGLPGPPGPPG	1408.7155	2	y10	859.4308
GLPGPPGERGGPG	1194.5907	2	y8	758.3428
GPPGPAGEEGKRGARGEPGPA	1974.9978	4	b2	155.0815
GPPGEAGKPGEQGVPGDLG	1765.8767	2	b14	1293.607
GARGAPGDRGEPGPPGPA	1662.7776	3	b11	520.747
AEGSPGRDGSAGKDRGETGPA	2157.0229	4	b2	201.087

コラーゲン分解の進行と関連のあるコラーゲン断片ペプチドのみを表示した。

参考文献

1. Yota Tatara, Shinichiro Suto, Ken Itoh. Novel roles of glycosaminoglycans in the degradation of type I collagen by cathepsin K. *Glycobiology* 27, 1089-1098, 2017
2. Yota Tatara, Ikuko Kakizaki, Shinichiro Suto, Haruna Ishioka, Mika Negishi, Masahiko Endo. Chondroitin sulfate cluster of epiphysean from salmon nasal cartilage

defines binding specificity to collagens. *Glycobiology* 25, 557-569, 2015.

3. Yota Tatara, Shinichiro Suto, Yoshitaka Sasaki, Masahiko Endo. Preparation of proteoglycan from salmon nasal cartilage under nondenaturing conditions. *Biosci Biotechnol Biochem* 79, 1615-1618, 2015.
4. Yota Tatara, Ikuko Kakizaki, Yoshiyuki Kuroda, Shinichiro Suto, Haruna Ishioka, Masahiko Endo. Epiphycan from salmon nasal cartilage is a novel type of large leucine-rich proteoglycan. *Glycobiology* 23, 993-1003, 2013.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishida T., Yamaguchi M., Tataru Y., Kashiwakura I.	4. 巻 96
2. 論文標題 Proteomic changes by radio-mitigative thrombopoietin receptor agonist Romiplostim in the blood of mice exposed to lethal total-body irradiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Radiation Biology	6. 最初と最後の頁 1125-1134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09553002.2020.1787546	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yokono Y., Hanada K., Narita M., Tataru Y., Kawamura Y., Miura N., Kitayama K., Nakata M., Nozaka M., Kato T., Kudo N., Tsushima M., Toyama Y., Itoh, K., Tomita H.	4. 巻 16
2. 論文標題 Blockade of protease-activated receptor-1 signaling attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis in renin-overexpressing hypertensive mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 e015616
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.119.015616	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kasai, S., Shimizu, S., Tataru, Y., Mimura, J., Itoh, K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Regulation of Nrf2 by Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Physiology and Pathology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 E320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom10020320.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Monzen S, Tataru Y, Mariya Y, Chiba M, Wojcik A, Lundholm L	4. 巻 13
2. 論文標題 HER2-positive breast cancer that resists therapeutic drugs and ionizing radiation releases sphingomyelin-based molecules to circulating blood serum	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular and clinical oncology	6. 最初と最後の頁 70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mco.2020.2140	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Suto S, Kakizaki I, Tatara Y, Endo M	4. 巻 251
2. 論文標題 Essential hyaluronan structure for binding with hyaluronan-binding protein (HABP) determined by glycotecnological approach	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Carbohydrate polymers	6. 最初と最後の頁 116989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carbpol.2020.116989	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 多田羅洋太
2. 発表標題 多層オミックス解析による認知症の早期発見のためのバイオマーカー探索
3. 学会等名 一般社団法人日本質量分析学会 東北談話会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多田羅洋太，門前暁，伊東健
2. 発表標題 定量的プロテオミックス解析による急性期放射線骨髄障害の重症化リスク因子の探索
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多田羅洋太、中村智洋、山崎博未、中山貴博、青木裕一、丹治邦和、三枝大輔、千葉満、勝岡史城、元池育子、木下賢吾
2. 発表標題 認知症の予防と早期発見のためのビッグデータ多層解析
3. 学会等名 第1回COI学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 認知機能障害のバイオマーカー及びその検出薬、被験者の認知機能障害を検査する方法、 認知機能障害の治療又は改善手段を被験者に提示する方法、並びに認知機能障害の治療又 は改善物質のスクリーニング方法	発明者 多田羅洋太，他6名	権利者 弘前大学，他2機 関
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/049251	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 認知機能障害のバイオマーカー及びその検出薬、被験者の認知機能障害を検査する方法、 認知機能障害の治療又は改善手段を被験者に提示する方法、並びに認知機能障害の治療又 は改善物質のスクリーニング方法	発明者 多田羅洋太，他6名	権利者 弘前大学，他2機 関
産業財産権の種類、番号 特許、特願 2 0 1 9 - 2 3 9 8 4 8	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 動物の軟骨からプロテオグリカンを調製する方法	発明者 多田羅洋太，遠藤正 彦，須藤晋一郎	権利者 弘前大学
産業財産権の種類、番号 特許、特許第6501350号	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

弘前大学大学院医学研究科分子生体防御学講座 http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~admed/department/index.html

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------