

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791039  
 研究課題名（和文） ノックアウトマウス作製による軟骨形成・維持における Galnt3 の役割解明  
 研究課題名（英文） Elucidation of Galnt3 functions in skeletal development and metabolism.  
 研究代表者  
 吉田 カロリナアンドレア (YOSHIDA CAROLINA ANDREA)  
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
 研究者番号：50437828

## 研究成果の概要

GALNT3 はムチン型糖 を形成する酵素の一つである。  
 本研究では *Galnt3* 遺伝子欠損マウスの作成 解析を通し、GALNT3 の生理的機能を明らかにすることを目的とした。  
*Galnt3* 欠損マウスは リン血症の患者と相似した表現型を示し、野生型マウスに対して血清中のリンは 濃度で、FGF23 は減少していた。  
 さらに *Galnt3* <sup>-/-</sup> マウスの大腿 は野生型マウスの大腿 に比べて 量共に海綿 数が増床していることがわかった。

## 交付

|     | 金 単 位 円   |         |           |
|-----|-----------|---------|-----------|
|     | 直接経費      | 接経費     | 合 計       |
| 年度  | 1,800,000 | 0       | 1,800,000 |
| 年度  | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 年度  |           |         |           |
| 年度  |           |         |           |
| 年度  |           |         |           |
| 総 計 | 3,300,000 | 450,000 | 3,750,000 |

研究分野 医歯薬学

科研費の分科・細目 外科系臨床医学・整形外科

キーワード ・軟 代謝学

研究 始当初の背景  
 GALNT3 転移酵素は、蛋白質のセリンとトレオニンのアミノ酸残基に GalNAc を付加し、ムチン型糖 を形成する。  
*GALNT3* 遺伝子の突然変異は、ハイパーオストシス・リン血症ならびに皮膚と皮下組織における異所性のカルシウム沈着を特徴とする家族性腫瘍状石灰症と 連があることが報告された。  
 GALNT3 は、近位尿細管においてリンの再吸収を抑制する FGF23 に糖 を付加、その蛋白切

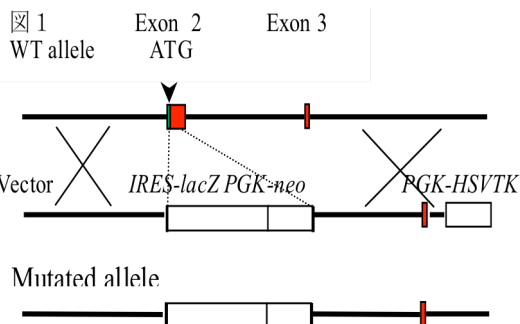
断による不活化を 害し、活性型 FGF23 の分泌に重要な働きをすることがさらに明らかとなった。すなわち、ハイパーオストシス・リン血症及び家族性腫瘍状石灰症は、GALNT3 の活性低下により FGF23 の切断、不活化が促進され、リン血症ならびに異所性のカルシウム沈着が引き起こす事が分かった。しかし、格における GALNT3 の特定機能は明らかではない。

## 研究の目的

本研究では *Galnt3* 遺伝子欠損 *Galnt3*<sup>-/-</sup> マウスの作製及び、この *Galnt3*<sup>-/-</sup> マウスの解析を通じ、骨格/ミネラルホメオスタシスにおける GALNT3 の生理的機能を明らかにする事を目的とした。

## 研究の方法

- (1) *Galnt3* 遺伝子欠損 *-/-* マウスの作成。  
ターゲティングベクターを作製し、マウス胚茎 ES 細胞上で遺伝子の相同組み換えを利用して *Galnt3* 遺伝子欠損 *-/-* マウスを作成した。  
ターゲティングベクターの作製  
11 のエクソンから成るマウス *Galnt3* 遺伝子を含む クローンを用いて蛋白翻訳開始メチオニンを含むエクソン を PGK プロモーター・ネオマイシン・IRES-lacZ レポーターカセットと置換した。正しい LacZ 表現を確実にするために、スプライシングドナー・アクセプター信号を残した。またゲノム上でランダムな統合を 行う為 PGK プロモーター・ウイルスチミジンキナーゼ HSVTK 遺伝子もターゲティングベクターに含めた。  
ターゲティングベクターは、図 1 で表す。



ターゲティングベクターを SalI で線形化し、E14.1 ES 細胞にエレクトロポレーションし、ネオマイシン耐性フィーダー細胞の上に ES 細胞をまき、G418 と gancyclovir で 8 日培養した。およそ 200 クローンを選んで、正しい組み換えを持つ ES クローンをサザンブロット分析によってスクリーニングした。

2 つの ES クローンを選択し C57BL/6 胚盤胞に注射し、これを仮親となる ICR マウスの子宮に移植した。生まれ育ったキメラマウスを C57BL/6 マウスと交配しヘテロ変異 *Galnt3*<sup>+/-</sup> マウス得、尾ゲノムのサザンブロット分析によってスクリーニングをし、同腹の *Galnt3*<sup>+/-</sup> を交配させ、ホモ変異体 (*Galnt3*<sup>-/-</sup>) マウスに最終的に得た。

*Galnt3*<sup>-/-</sup> マウスで GALNT3 mRNA ・タンパ

ク質が完全な損失を確認するため、軟骨と皮膚サンプルから RNA の RT-PCR 分析とタンパク質のウェスタンブロット分析を行った。

## (2) *Galnt3* 発現パターン:

LacZ 遺伝子が *Galnt3* プロモーターの下流にあるため、*Galnt3*<sup>+/-</sup> マウスでベータガラクトシダーゼ活性を評価することによって *Galnt3* の内因性発現を評価することができた。

胎生期サンプルは、帝王切開手術をおこなって 13.5、15.5、16.5 と 18.5 日のものを得た。成獣マウスサンプルは、1 週目のマウスから得た。

染色は、X-ギャル 1mg/mL 及びカリウムフェリシアン化物 5mM を含む水溶液で実行した。

## (3) *Galnt3*<sup>-/-</sup> マウスの全身評価

*Galnt3* 発現組織を中心に、*Galnt3*<sup>-/-</sup> マウスの胎仔および成体マウスの組織切片の評価を行った。また、分泌性蛋白の修飾に関する可能性もあるので、全身臓器の組織切片の評価、およびフォンコッサ染色にて異所性の石灰化がないか検討した。また、カルシウム、リン、全型 FGF23、の血中濃度を測定した。

における GALNT3 の機能評価は microCT にて、骨量、海綿骨数を検討した。

## 研究成果

- (1) *Galnt3* 遺伝子欠損 *-/-* マウスの作成  
我々は胚茎 ES 細胞上で遺伝子相同組み換え技術を用いて *Galnt3* 遺伝子を崩壊させた。具体的に *Galnt3* エクソン 2 翻訳開始点を含むエクソン を PGK プロモーター・ネオマイシン選択・IRES-lacZ 遺伝子配列カセットと置き換えた。遺伝子組み換えを持つ ES 細胞は、C57BL/6 胚盤胞に注射しキメラマウスを得た。次にキメラマウスから得られる *Galnt3* ヘテロ変異型マウス *+/-* 同士を交配したことにより、ホモ変異型マウスを得た。サザンブロットにより 11kb の野生型対立遺伝子及び 7kb の変異型対立遺伝子を確認した。

## (2) *Galnt3* 遺伝子の発現

IRES-lacZ 遺伝子を組み替えたことにより、ベータガラクトシダーゼの活性をもとに *Galnt3* の発現パターンを *Galnt3*<sup>+/-</sup> マウスで調べた。ベータガラクトシダーゼの活性は腎臓・精巣器にみとめられ、*Galnt3* はそれらの臓器に発現していることが分かった。

一方 mRNA in situ hybridization 方によ

り、野生型マウスではGalnt3が葉細胞に発現していることがわかった。

(3)-Galnt3<sup>-/-</sup>マウスの解析:

- ① Galnt3<sup>-/-</sup>マウスは通常に生まれるが、リン血症の患者と相似したフェノタイプを示し、血清中のリンは、野生型マウスより濃度であった 図 2。

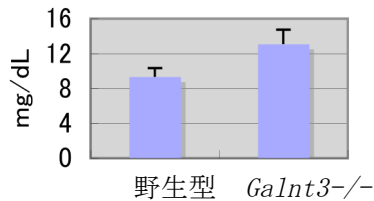


図 2: 17 週 マウスの血清中リン濃度

また ELISA 法で測定した血清中の FGF23 は野生型マウスに比べて減少していたが、異所性石灰化はみとめなかった。これらは FGF23 によるリン代謝調節に GALNT3 が重要な働きをする事が証明できた

- ② 格における GALNT3 の機能評価: 8 週と 17 週 の成獣マウスから大腿を摘出し、microCT 解析した結果 Galnt3<sup>-/-</sup> マウスは野生型マウスに対して量、海綿 数が増床していることがわかった 図 。

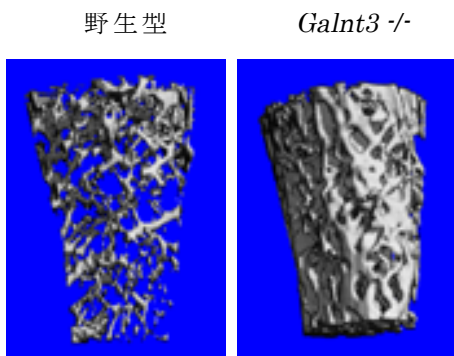


図 3: 17 週齢マウス大腿骨の MicroCT 画像

- ③ 精巣における GALNT3 の機能評価: Galnt3<sup>-/-</sup> マウスの精巣では精子の分化が 害され、のみが不妊状態を示した。

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

[ 誌論文] 計 件

- ① Tanaka T, Sato H, Doi H, Yoshida CA, Shimizu T, Matsui H, Yamazaki M, Akiyama H, Kawai-Kowase K, Iso T, Komori T, Arai M, Kurabayashi M. Runx2 represses myocardin-mediated differentiation and facilitates osteogenic conversion of vascular smooth muscle cells. Mol Cell Biol. 28:1147-60, 2008(査読有)
- ② Miyazaki T, Kanatani N, Rokutanda S, Yoshida C, Toyosawa S, Nakamura R, Takada S, Komori T. Inhibition of terminal differentiation of odontoblasts and their transdifferentiation into osteoblasts in Runx2 transgenic mice. Arch Histol Cytol. 71:131-146, 2008(査読有)
- ③ Maruyama Z, Yoshida CA, Furuichi T, Amizuka N, Ito M, Fukuyama R, Miyazaki T, Kitaura H, Nakamura K, Fujita T, Kanatani N, Moriishi T, Yamana K, Liu W, Kawaguchi H, Nakamura K, Komori T. Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency. Dev Dyn. 236:1876-1890, 2007(査読有)

[学会発表] 計 件

- ① Yoshida CA, Maeno T, Kanatani N, Izumi S, Fujita T, Yamana K, Takaoka K, Komori T Runx2 gain of function in mesenchymal cells enhanced bone formation but inhibited cartilage formation and limb development ミニシンポジウム , 第 26 回日本 代謝学会, 大 , 2008 年 10 月 29-31 日
- ② Rokutanda S, Fujita T, Kanatani N, Yoshida CA, Mizuno A, Komori T Akt Regulates Skeletal Development Through GSK3, mTOR, and FoxOs. 30th Annual Meeting(American society for Bone and Mineral Research) カナダ(Montreal), 2008 年 9 月 12-16 日
- ③ 吉田カローリナ、宮崎敏博、中村康平、藤田 司、金谷直子、森石武史、小守壽

文 Runx2 functions during postnatal bone development, 日本解剖学会第63回九州支部学術会, 崎, 2007年10月20日

- ④ Yoshida CA, Maeno T, Kanatani N, Fujita T, Izumi S, Komori T. Over-expression of Runx2 in mesenchymal cells enhanced bone formation but inhibited cartilage formation and limb development. 29th Annual Meeting(American society for Bone and Mineral Research). Honolulu, (USA) 2007年9月16-19日
- ⑤ Fujita T, Rokutanda S, Kanatani N, Yoshida C, Komori T. The regulation of chondrocyte proliferation, function, and differentiation by AKT signaling pathways. 29th Annual Meeting(American society for Bone and Mineral Research)Honolulu, (USA) 2007年9月16-19日
- ⑥ Fujita T, Rokutanda S, Kanatani N, Yoshida C, Komori T. The regulation of chondrocyte proliferation, function, and differentiation by AKT signaling pathways. ポスター . 29th Annual Meeting(American society for Bone and Mineral Research). Honolulu, (USA) 2007年9月16-19日

研究組織

(1)研究代表者

吉田 カロリナアンドレア

YOSHIDA CAROLINA ANDREA

崎大学・大学 医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号 50437828