

## 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 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780266

研究課題名（和文）ゴルジ体タンパク giantin の発生過程における機能の解析

研究課題名（英文）Investigation of the role of giantin in the rat development

研究代表者

片山 健太郎（KATAYAMA KENTARO）

日本獣医生命科学大学・獣医学部・獣医学科・講師

研究者番号：50508869

研究成果の概要（和文）：ゴルジ体蛋白質 Giantin に変異を持ち、骨軟骨形成不全症を示す OCD ラットにおける軟骨内骨化は初期の段階から遅延していることを明らかにした。また、OCD ラットが呈する全身性の皮下水腫にはリンパ管の形成異常および血管透過性の亢進が関与している可能性を示した。これらはゴルジ体蛋白質 Giantin の発生過程の役割に関する世界で初めての報告であり、骨軟骨形成不全症および水腫の発症における新たな原因を示したものである。

研究成果の概要（英文）：Insertional mutation in giantin (*Golgb1*) gene is responsible for the developmental abnormalities including osteochondrodysplasia and systemic edema in *ocd/ocd* rat. *ocd/ocd* rats exhibited the delayed mesenchymal condensation in chondrogenesis, abnormalities of lymphatic vessels and enhanced vascular permeability. The present findings indicate that the important role of giantin in normal embryonic development, especially chondrogenesis, and formation of lymphatic and blood vessels.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：骨軟骨形成不全症、軟骨形成、Giantin、ゴルジ体、ラット

## 1. 研究開始当初の背景

ゴルジ体は扁平な膜が数層に重なった、真核生物のほぼ全ての細胞が有する細胞内小器官であり、小胞体から脂質二重層の輸送小胞に包まれて送られてきた分泌性タンパク質の修飾、選別、輸送ならびに脂質の

輸送を行う細胞内輸送経路（小胞輸送）において中心的な役割を担っている。Giantin は小胞体から輸送されてきた小胞のゴルジ体への繫留に関与する golgin タンパク質ファミリーの一員であり、脊椎動物にのみ存在する分子である。近年、申請者

が所属している研究室で樹立された骨軟骨形成異常および全身性の皮下水腫を呈する突然変異ラット系統 (OCD) において、**giantin** をコードする遺伝子に挿入変異が同定された。このことから **giantin** は発生過程において重要な役割を果たすと考えられるが、その詳細は不明であった。

## 2. 研究の目的

小胞繫留因子の機能解析は培養細胞および酵母を用いて精力的に解析されているが、個体レベルでの機能に関しては不明な点が多い。特に **giantin** は脊椎動物にのみ存在している分子であることから、生体での機能を明らかにするためには **giantin** に変異を有するモデル動物を用いた解析が必須である。これまでに **giantin** に変異を有する動物は OCD ラットのみにあることから、OCD ラットを用いて発生学的解析を行う事により **giantin** の成体における機能を明らかにすることを試みた。

## 3. 研究の方法

(1) ocd/ocd ラットにおける **giantin** タンパク質の欠損の証明 ocd/ocd 胎子の肢芽から抽出したタンパク質を電気泳動し、抗 **giantin** 抗体を用いたウェスタンブロット分析を行った。

(2) Giantin の発現部位の調査 **Giantin** をコードする mRNA に対する相補 RNA を用いたホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

(3) ocd/ocd ラットにおける軟骨内骨化および膜内骨化の過程の解析 ocd/ocd における軟骨内骨化および膜内骨化の過程を組織学、免疫組織化学、組織化学的手法を用いて経時的に調べた

(4) ocd/ocd ラットにおけるリンパ管および血管形成の解析 胎齢 21.5 日の ocd/ocd 胎子の心臓からエバンスブルー溶液を注入し、血管への分布および血管外へのエバンスブルーへの漏出を調べた。また、胎齢 21.5 日の ocd/ocd 胎子の皮下にエバンスブルー溶液を投与し、リンパ管への取り込みおよびリンパ管の走行を調べた。

(5) Giantin の欠損がゴルジ体に及ぼす影響の解析 ocd/ocd 胎子の線維芽細胞においてゴルジ体の形成に異常が生じているかを、ゴルジ体のマーカータンパクに対する抗体を用いた免疫蛍光法により調べた。また、プレフェルジン A を用いてゴルジ体を分解後、ゴルジ体が再構成される時間を調べた。

## 4. 研究成果

(1) ocd/ocd ラットにおける **giantin** タンパク質の欠損の証明 抗 **giantin** 抗体を用いたウェスタン分析を行った結果、ocd/ocd では **giantin** のシグナルが観察されなかったことから (図 1)、OCD ラットにおいて **giantin** をコードする遺伝子に同定された挿入変異は機能喪失変異であり、ocd/ocd は **giantin** の機能を喪失していることが証明された。



WT He Ho

図 1. Giantin のウェスタン分析 (WT : +/+、He : ocd+/+、Ho : ocd/ocd)

(2) Giantin の発現部位の調査 ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションにより、胎齢 13.5 日のラット胎子における **giantin** の発現部位を調べた結果、肢芽および体節由来の構造で発現が認められたことから (図 2)、**giantin** は四肢および中軸骨格の形成に関与していると考えられた。



図 2. Giantin mRNA のホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション

(3) ocd/ocd ラットにおける軟骨内骨化および膜内骨化の過程の解析 軟骨内骨化の過程を経時的に調べた結果、ocd/ocd では軟骨細胞へと分化する Sox9 陽性の間葉系細胞の凝集が遅延していることが明らかとなり (図 3)、軟骨内骨化の初期の段階から遅延が生じていることが明らかになった。軟骨細胞の各分化段階のマーカータンパクに対する抗体を用いた免疫組織化学を行った結果、胎齢 17.5 日の時点で軟骨細胞の分化は正常個体よりもおよそ 1 日遅延していた。von Kossa 染色により胎齢 18.5 日の胎子大腿骨の骨化の状態を調べた結果、ocd/ocd では石灰化が島上に生じていたことから、骨化は起こるが骨化のパターンに異常が生じている可能性が考えられた。また、胎子頭部のホールマウント ALP 染色を行った結果、膜内骨化初期の間葉系細胞の凝集は遅延していないことが明らかになった。このことから **giantin** は軟骨内骨化において初期の段階から働いているこ

とが明らかになった。

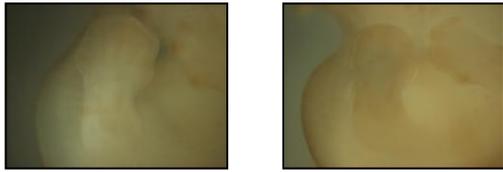


図 2. Sox9 ホールマウント免疫染色 (左: +/+, 右: *ocd/ocd*)

(4) *ocd/ocd* ラットにおけるリンパ管および血管形成の解析 胎子の心臓にエバンスブルー溶液を注入し、血管外へのエバンスブルー溶液の漏出を経時的に調べた結果、*ocd/ocd* では血管の透過性が亢進している可能性が示唆された。また胎子の皮下にエバンスブルー溶液を投与し、リンパ管への取り込みおよび、リンパ管の走行を調べた結果、*ocd/ocd* では末梢の細い網目状に走行するリンパ管は確認されたが、太いリンパ管は認められなかった (図 4)。この結果、*ocd/ocd* ではリンパ管の形成に異常を生じている可能性が考えられた。以上の結果から、*ocd/ocd* が呈する水腫には血管透過性の亢進およびリンパ管の形成異常が関与していることが示唆された。



図 4. リンパ管によるエバンスブルーの取り込み (左: 正常、右: 発症個体)

(5) *Giantin* の欠損がゴルジ体に及ぼす影響の解析 ゴルジ体タンパク質に対する抗体を用いた免疫蛍光を行った結果、*ocd/ocd* の線維芽細胞においてもゴルジ体の構造が認められた (図 5)。また、プレフェルジン A を用いてゴルジ体を分解後、ゴルジ体が再構成される時間を調べた結果、*ocd/ocd* の線維芽細胞では、再構成が遅延していた。以上の結果から、*giantin* が欠損してもゴルジ体は形成されるが、再構成が遅延すると考えられた。

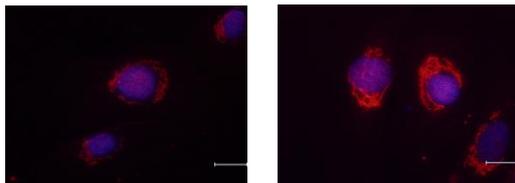


図 5. ゴルジ体タンパクの免疫蛍光 (左: +/+, 右: *ocd/ocd*)

(6) 総括 本研究から *ocd/ocd* は脊椎動物に特異的に存在する *giantin* の機能を欠損した動物であることが証明され、*giantin* が軟骨内骨化において初期の段階から重要な役割を果たしていること、リンパ管形成を含む脈管形成にも関与している可能性が示された。本研究において示された *giantin* が生体において果たす機能は、いずれも世界で初めての報告であり、他の小胞繫留因子の生体における機能、骨軟骨形成不全症および水腫の発生機構を調べる上で新たな知見をもたらすものと考えられる。

#### 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 5 件)

- ① Katayama K, Sasaki Tetsu, Goto S yo, Ogasawara Kei, Maru Hiromi, Suzuki Katsushi, Suzuki Hiroetsu. Insertional mutation in the *Golgb1* gene is associated with osteochondrodysplasia and systemic edema in the OCD rat. *Bone* 49(5) pp. 1027-1036 (2011) 査読有  
DOI: 10.1016/j.bone.2011.08.001
- ② Amakasu Kohei, Suzuki Katsushi, Katayama Kentaro, Suzuki Hiroetsu. Age-related pathophysiological changes in rats with unilateral renal agenesis. *Journal of Veterinary Medical Science* 73(6) pp. 787-795(2011) 査読有  
DOI: 10.1292/jvms.10-0498
- ③ Chiba Junko, Suzuki Hiroetsu, Aoyama Hiroaki, Katayama Kentaro, Suzuki Katsushi. Postnatal development of hypoplastic thymus in semilethal dwarf *pet/pet* males. *Journal of Veterinary Medical Science* 73(4) pp. 495-499 (2011) 査読有  
DOI: 10.1292/jvms.10-0397
- ④ Suzuki Hiroetsu, Katayama Kentaro, Takenaka Motoo, Amakasu Kohei, Saito Kenichi, Suzuki Katsushi. A spontaneous mutation of the *Wwox* gene and audiogenic seizures in rats with lethal dwarfism and epilepsy. *Genes, Brain and Behavior* 8(7) pp.650-660 (2009) 査読有  
DOI: 10.1111/j.1601-183X.2009.00502.x
- ⑤ Katayama Kentaro, Miyamoto Saya, Furuno Aki, Akiyama Kouyou,

Takahashi Sakino, Suzuki Hiroetsu, Tsuji Takehito, Kunieda Tetsuo. Characterization of the chromosomal inversion associated with the *Koa* mutation in the mouse revealed the cause of skeletal abnormalities. *BMC Genetics* 10:60 (2009)査読有  
DOI: 10.1186/1471-2156-10-60

〔学会発表〕(計 件)

- ① 安田英紀,他 腎低形成症ラットの貧血傾向における血管外溶血と大球性変化 第 152 回日本獣医学会学術集会 2011 年 9 月 20 日 大阪府立大学中百舌鳥キャンパス
- ② 安田英紀,他 腎低形成症ラットにおける腎機能不全と貧血傾向に関する調査 第 151 回日本獣医学会学術集会 2011 年 3 月 31 日東京農工大学府中キャンパス
- ③ 鈴木浩悦,他 精巣形成不全(HGN)ラットの *Spag5*cDNA 導入による救済実験 第 29 回日本アンドロロジー学会学術大会 2010 年 7 月 30 日 日本獣医生命科学大学
- ④ 片山健太郎,他 精巣形成不全および腎低形成を呈する HGN ラットの *Spag5* cDNA 導入 (*Spag5* トランスジェニック)による救済実験 第 149 回日本獣医学会学術集会 2010 年 3 月 26 日 日本獣医生命科学大学
- ⑤ 中井里香,他 てんかん発作を伴う矮小ラット (*Idel/Idel*) のウエスタンブロット解析と脳病変に関する組織学的観察 第 149 回日本獣医学会学術集会 2010 年 3 月 26 日 日本獣医生命科学大学
- ⑥ 茂木巡太郎,他 両側性腎低形成症ラット (*hgn/hgn*) の片側腎摘出による影響の評価 第 149 回日本獣医学会学術集会 2010 年 3 月 26 日 日本獣医生命科学大学
- ⑦ 片山健太郎,他 骨軟骨形成不全症 (OCD) ラットはゴルジ体タンパク Giantin をコードする *Golgb1* 遺伝子に挿入突然変異を持つ 日本動物遺伝育種学会第 10 回記念大会 2009 年 11 月 9 日 群馬会館
- ⑧ 後藤匠,他 骨軟骨形成不全症 (OCD) ラットの胎生期における大腿骨の病理解析 第 148 回日本獣医学会学術集会 2009 年 9 月 25 日 鳥取県とりぎん文化会館
- ⑨ 鈴木浩悦,他 てんかん発作を伴う矮小ラット (*Idel/Idel*) の原因遺伝子は WWOX である 第 147 回日本獣医学会学術集会 2009 年 4 月 4 日 栃木県総合文化センター

- ⑩ 片山健太郎,他 骨軟骨形成不全症 (OCD)ラットの *Golgb1* 遺伝子における 10bp の挿入突然変異の同定 第 147 回日本獣医学会学術集会 2009 年 4 月 4 日 栃木県総合文化センター
- ⑪ 稲垣将治,他 精巣形成不全および両側性腎低形成症を呈するラット (*hgn/hgn*) の骨形態計測の所見 2009 年 4 月 4 日 栃木県総合文化センター

〔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：  
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

片山 健太郎 (KATAYAMA KENTARO)  
日本獣医生命科学大学・獣医学部・獣医学科・講師  
研究者番号：50508869

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：