

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462986

研究課題名(和文) 骨膜細胞の3次元構造のためのタンパク質間ネットワーク

研究課題名(英文) Protein interactions in periosteum-derived cells determine their three dimensional structure

研究代表者

秋山 真理 (AKIYAMA, Mari)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60340618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：今までに培養上清に含まれるタンパク質を質量分析し、免疫染色(単染色)との組み合わせによりウシ骨膜由来細胞に発現しているタンパク質のグループを明らかにしてきたが、本研究課題ではタンパク質の相互作用を調べた。2重免疫染色によってタイプ1プロコラーゲン(青)とTMX2(赤)は発現部位が一致し、相互作用している可能性が示唆された。

培養上清中のサンプルの質量分析と免疫染色の組み合わせも継続して行い、Fボックスタンパク質の1つ、FBXW2が培養細胞側ではなく、骨膜組織の内部で発現していることを明らかにした。さらに骨膜由来細胞の細胞質抽出液の質量分析を行い、候補タンパク質の免疫染色を行った。

研究成果の概要(英文)：In a previous study, I investigated samples of culture supernatants using a combination of mass spectrometry and single immunohistochemistry. This method identified some proteins expressed in bovine periosteum-derived cells. In this study, I investigated the interactions of these proteins. Double immunohistochemistry was carried out to reveal interactions of type 1 procollagen and other proteins. The results showed that type 1 procollagen overlapped with TMX2. Therefore, type 1 procollagen and TMX2 may interact with each other. FBXW2 (F-box/WD repeat-containing protein 2) was found in the periosteum, while other proteins were expressed in periosteum-derived cells. Mass spectrometry was carried out using cytoplasmic extracts. Immunohistochemistry of candidate protein ARHGAP36 revealed that this protein was not always expressed in periosteum-derived cells.

研究分野：再生医療

キーワード：骨膜由来細胞 骨再生 タンパク質相互作用 質量分析 2重免疫染色

### 1. 研究開始当初の背景

申請者の従来の研究で、ウシ前肢から採取した骨膜組織には骨膜細胞が含まれ、骨膜組織の explant culture によって得られた骨膜由来細胞はスキャフォールドフリーでの骨再生能があることを明らかにしてきた。さらに、質量分析法を用いた研究課題(基盤研究(C)23592908)では、コラーゲンとともに非コラーゲン性タンパク質(UACA、EXOSC9、TMX2、FBXL14、 $\gamma$ -チュープリン)が骨膜由来細胞において発現していることを明らかにした<引用文献>。この時は、培養細胞だけから成る細胞塊のパラフィン切片を作製して、単染色で非コラーゲン性タンパク質の免疫染色を行った。そのため、どの抗体を用いても同様の染まり方を示し、タンパク質の相互作用および発現部位の違いはわかっていなかった。

### 2. 研究の目的

ウシ骨膜由来細胞をスキャフォールドフリーでヌードマウス皮下に移植すると骨が再生する。移植前の骨膜由来細胞は、培養シャーレ上ですでに細胞同士が積み重なった立体構造を形成しており、通常の培養細胞のような平面的な細胞増殖の様式と異なる。骨膜由来細胞が立体構造を形成するのに必要なタンパク質の相互作用を明らかにすることが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

(1) アスコルビン酸添加条件で、ウシ前肢(神戸中央畜産荷受株式会社)から採取した骨膜の explant culture を行い、培養5週間後に骨膜と一緒に骨膜由来細胞をパラホルムアルデヒド固定した。その後パラフィン切片を作製し、多層構造を形成しながら骨膜の周囲を取り囲んでいる培養細胞を2重免疫染色にて観察した。まず、タイプ1プロコラーゲンを青に染色し、それ以外のタンパク質(UACA、EXOSC9、TMX2)を赤で染めた。タイプ1プロコラーゲンと $\gamma$ -チュープリンの2重染色の場合のみ、良好な染色結果を得るために順序を逆にし、最初に $\gamma$ -チュープリンを赤に染めた。コントロールとしてタイプ1プロコラーゲンのみ(青)の免疫染色を行った。同様の2重免疫染色をオステオカルシン(青)、他のタンパク質(赤)でも行った。

(2) 平成23~25年度の研究課題基盤研究(C)23592908)で得た質量分析のデータを再度、分析した結果、FBXW2の一部とマッチするペプチドが検出され、FBXW2が骨膜由来細胞に関連のあるタンパク質として候補に挙がった。培養5週間後の骨膜と骨膜由来細胞を切り離さずにパラホルムアルデ

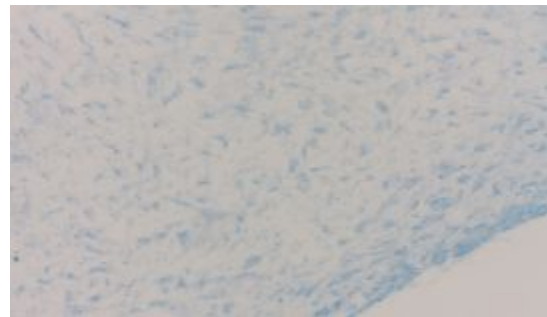
ヒド固定し、FBXW2抗体で免疫染色(DAB単染色)した結果、FBXW2は、従来、印刷公表してきたUACA、EXOSC9、TMX2、FBXL14、 $\gamma$ -チュープリンなどの発現部位と異なり<引用文献>、骨膜に発現していたことが明らかとなった。

(3) 骨膜由来細胞を5週間培養し、細胞質抽出液を2次元電気泳動した。高分子量領域に現れたスポットの中で最もはっきりしていたものを選び、質量分析を行った。質量分析で、ARHGAP36の一部を検出したため、候補タンパク質とし、免疫染色(DAB単染色)を行った。

### 4. 研究成果

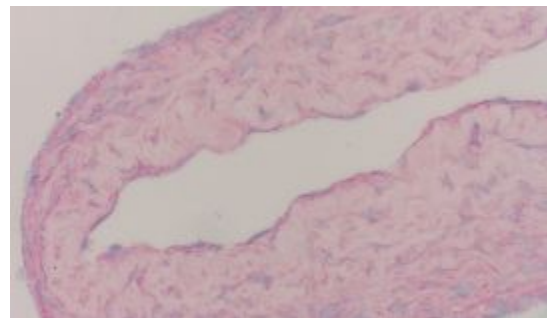
#### (1) 2重免疫染色

タイプ1プロコラーゲン単染色(強拡大、コントロール)



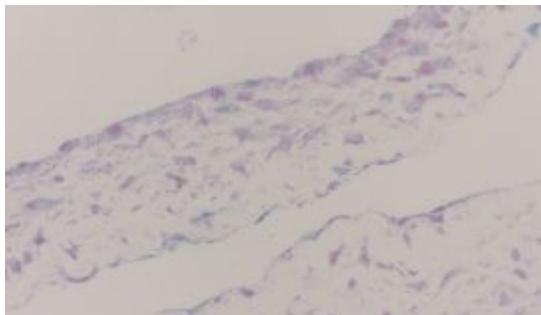
骨膜由来細胞の細胞質が全体的に青に染まった。

タイプ1プロコラーゲン、UACA 2重染色(強拡大)



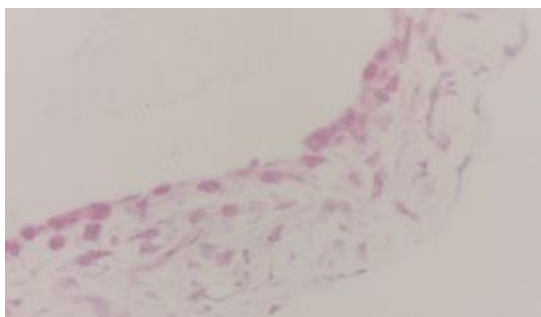
骨膜由来細胞(青)の周囲がUACA抗体で赤に染まった。

タイプ1プロコラーゲン、EXOSC9 2重染色（強拡大）



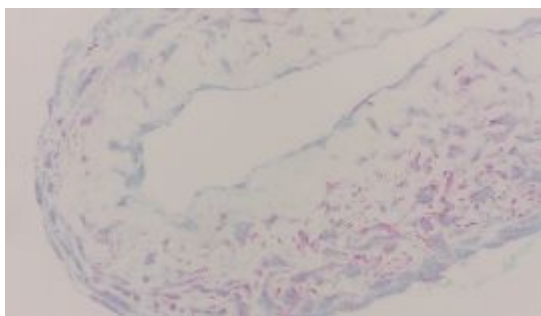
骨膜由来細胞（青）の核が EXOSC9 抗体で赤く染まった。以前公表した論文<引用文献>においても EXOSC9 は細胞核に存在し、今回の結果と一致していた。

タイプ1プロコラーゲン、TMX2 2重染色（強拡大）



骨膜由来細胞の細胞質が全体的に紫に染まり、2つのタンパク質は同じ部位に存在することが示された。

タイプ1プロコラーゲン、 $\alpha$ -チューブリン 2重染色（強拡大）



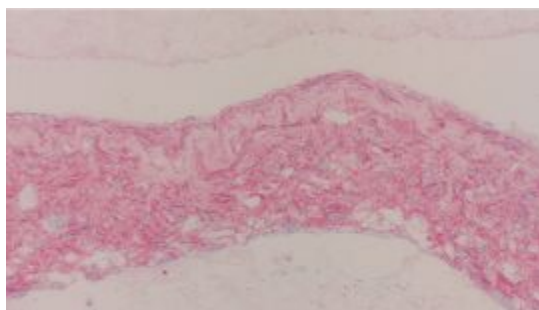
タイプ1プロコラーゲン（青）と  $\alpha$ -チューブリン（赤）は離れた部位に存在している。

オステオカルシン単染色（強拡大、コントロール）



骨膜由来細胞のオステオカルシン発現部位が青く染まった。

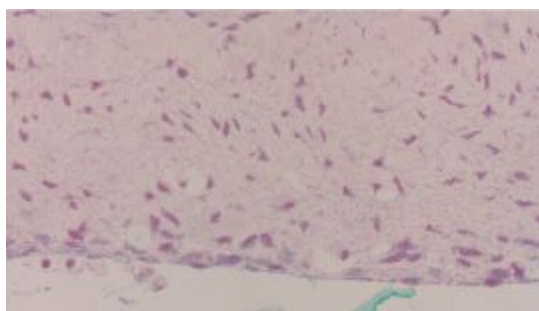
オステオカルシン、UACA 2重染色（強拡大）



骨膜由来細胞（青）の周囲が UACA 抗体で赤に染まった。

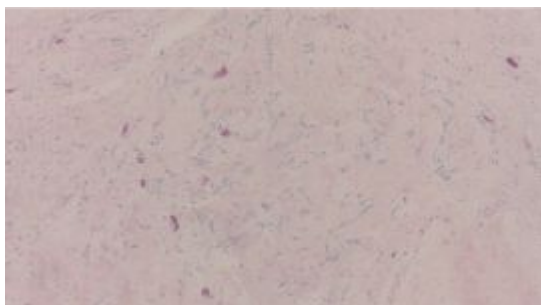
オステオカルシン、EXOSC9 2重染色（強拡大）

骨膜由来細胞



オステオカルシン（青）、TMX2（赤）が両方存在する部位は紫に染まるが、完全に重なっている訳ではない。

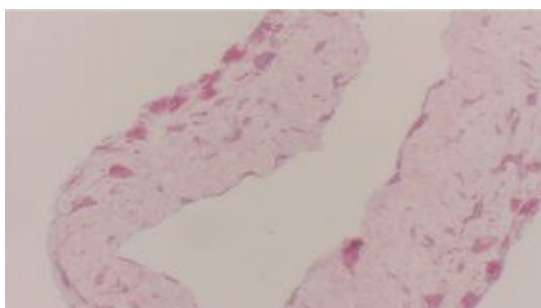
## 骨膜



EXOSC9 (赤) は細胞の中のみ存在し、オステオカルシン(青)は細胞外にも存在する。

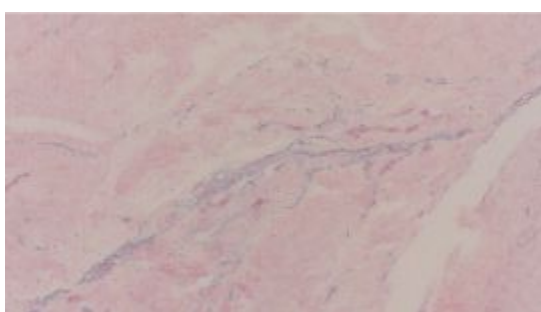
オステオカルシン、TMX2 2重染色  
(強拡大)

## 骨膜由来細胞



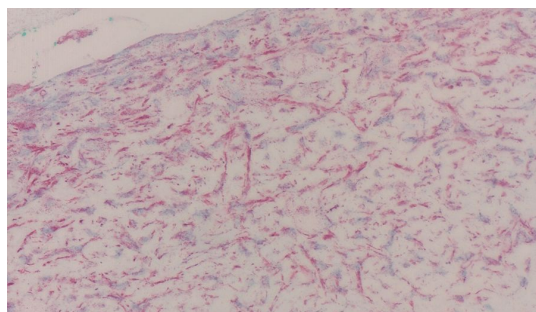
オステオカルシン(青)、TMX2(赤)が両方存在する部位は紫に、TMX2のみ発現する部位は赤く染まった。

## 骨膜



骨膜上では、オステオカルシン(青)とTMX2(赤)の発現部位は一致していない。

オステオカルシン、 $\alpha$ -チューブリン 2重染色(強拡大)



オステオカルシン(青)は骨膜由来細胞の細胞質に発現し、 $\alpha$ -チューブリン(赤)は離れた部位に発現している。

<国内外における位置づけとインパクト>  
ほ乳類のタンパク質の種類が約2万3千だとすると、2つのタンパク質の組み合わせは5億通り以上になり、タンパク質の相互作用を明らかにするのは困難である。本研究課題の成果では、タイプ1プロコラーゲンとTMX2の組み合わせにおいて2つのタンパク質がまったく同じ部位に発現していることが示され、相互作用の可能性が示唆された。前回の研究課題(基盤研究(C)23592908)においても、細胞外微小環境(ニッチ)について調べていたが、今回、UACAと $\alpha$ -チューブリンが骨膜由来細胞のニッチ形成に関与することが示唆された。従来のタンパク質相互作用の研究では、ファーウエスタン法、共免疫沈降、アフィニティークロマトグラフィーなどが用いられてきたが、これらの方法は、タンパク質同士が検出可能な程度に結合していなければならない。2重免疫染色では、結合が緩くても同じ部位に存在する2つのタンパク質を検出することができる。質量分析と2重免疫染色との組み合わせによってタンパク質の相互作用を調べた国内外初の研究成果である。

## ( 2 ) FBXW2 の同定

前回の研究課題 ( 基盤研究 ( C ) 23592908 )  
において骨膜由来細胞の培養上清中に含ま  
れるタンパク質の質量分析を行ったことが  
あり、以下のアミノ酸シーケンス;

71-85: K.WLDPQTLTCLVSK.Q

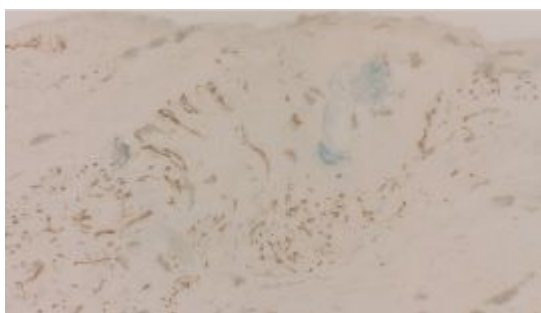
を検出し、FBXW2 の一部であると仮定した  
が、FBXW2 が骨膜由来細胞において発現し  
ているのを明らかにできなかった。本研究課  
題では、骨膜中に FBXW2 が発現しているこ  
とを免疫染色により明らかにし、オンライン  
ジャーナル誌上で公表した。

### 骨膜の FBXW2 単染色 ( 強拡大 )



DAB 染色によって、FBXW2 が茶色に染まっ  
た。

### 骨膜の FBXW2、オステオカルシン 2 重 染色 ( 強拡大 )



FBXW2( 茶 ) の近くにオステオカルシン( 青 )  
が存在する。

### 骨膜のオステオカルシン単染色 ( 強拡大 )

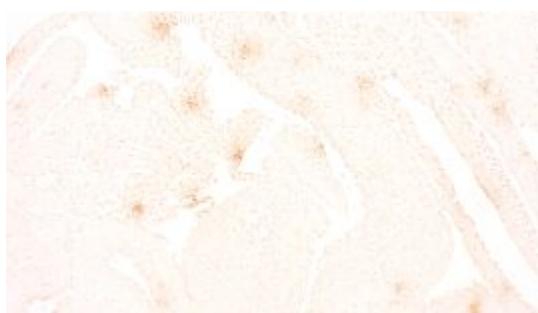


オステオカルシン ( 青 ) も FBXW2 同様、骨  
膜に存在している。

< 当初予期しなかった結果 > 従来の研究で  
は、骨膜由来細胞に着目し、骨膜は調べてい  
なかった。今回の研究成果では、偶然、骨膜  
に FBXW2 が発現していることがわかった。  
骨膜の FBXW2 の付近にオステオカルシンが  
存在することも、HRP ( ホースラディッシュ  
ペルオキシダーゼ ) 標識よりも感度の高い  
AP ( アルカリホスファターゼ ) 標識した 2 次  
抗体を用いることで偶然わかった。

## ( 3 ) ARHGAP36 の同定

### 骨膜由来細胞の ARHGAP36 単染色 ( 弱拡 大 )



DAB 染色 ( 茶 ) によってまばらに  
ARHGAP36 が存在していることが示された。

骨膜由来細胞の ARHGAP36 単染色 (弱拡大)



上図と同じ個体から培養した骨膜由来細胞であってもほとんど ARHGAP36 を検出できない場所もある。さらには、他の個体由来の培養 5 週間後の細胞ではまったく、ARHGAP36 が発現しないこともあり、ARHGAP36 の発現にはまだ明らかにされていない条件が必要であることが示唆された。

<今後の展望> タイプ 1 プロコラーゲンと TMX 2 との相互作用を明らかにすること。

FBXW2 とオステオカルシンとの相互作用を明らかにすること。骨膜由来細胞において常に発現しているタンパク質ではなく、細胞培養が順調で、タンパク質の量が増えている条件下でのみ発現するタンパク質を探ること。

<引用文献>

Akiyama M. Identification of UACA, EXOSC9, and TMX2 in bovine periosteal cells by mass spectrometry and immunohistochemistry. Analytical Bioanalytical Chemistry 2014; 406(24): 5805-5813.

Akiyama M. Association of  $\alpha$ -tubulin, F-box/Leucine-Rich Repeat Protein 14, and Type 1 Procollagen C-peptide in bovine periosteal cells. Current Tissue Engineering 2014; 3(1): 2-6.

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 1 件)

Akiyama M. Characterization of the F-box proteins FBXW2 and FBXL14 in the initiation of bone regeneration in transplants given to nude mice. Current Tissue Engineering, 査読有, 2016, オンラインジャーナル (E-pub Ahead of Print) DOI:10.2174/2211542005666161018130010

[学会発表](計 2 件)

秋山 真理, 今井 弘一. 多層構造を有するウシ骨膜細胞におけるタンパク質の挙動-培養開始から骨形成時まで、第 23 回日本歯科医学総会、2016 年 10 月 21 日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

秋山 真理. ウシ骨膜由来培養細胞の足あとによるタンパク質の解析、日本歯科理工学会 近畿・中四国地方会、2016 年 8 月 20 日、大阪府立男女共同参画・青少年センター(大阪府大阪市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ

オンラインジャーナルである Current Tissue Engineering 誌上で骨膜に存在している FBXW2 に関する論文が公開された。URL: <http://benthamscience.com/journal/index.php?journalID=cte>

6. 研究組織

(1)研究代表者

秋山 真理 (AKIYAMA, Mari)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号: 6 0 3 4 0 6 1 8

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし