

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670801

研究課題名(和文)新規分泌型キナーゼFam20Cによるリン酸化と骨細胞機能について

研究課題名(英文)Golgi-localized Fam20C phosphorylation and osteocyte functions

研究代表者

豊澤 悟 (Toyosawa, Satoru)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30243249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Fam20Cはゴルジ装置に局在し、分泌蛋白質をリン酸化する新規のキナーゼである。Fam20Cは骨芽細胞では軽度に発現し、骨細胞では高度に発現するため、これらの細胞が分泌する骨基質蛋白質はFam20Cによりリン酸化されると考えられる。一方、Fam20C欠損マウスは骨の石灰化不全を示すことから、骨芽細胞や骨細胞が分泌する蛋白質のリン酸化は骨形成に重要であると考えられる。そこで、骨芽細胞や骨細胞が分泌する骨基質蛋白質のリン酸化の機能的意義を検討するため、骨芽細胞がFam20Cを過剰発現するマウスを作製し、Fam20C過剰発現マウスにおける骨の変化を検討中である。

研究成果の概要(英文)：Golgi-localized protein kinase Fam20C phosphorylates secretory pathway proteins with S-x-E/pS motifs. In the bone tissue, Fam20C is slightly expressed in the osteoblasts and highly expressed in the osteocytes. Therefore, the bone matrix proteins which are produced by osteoblasts and osteocytes, are phosphorylated by Fam20C within these cells. Considering that Fam20C-null mice have osteomalacia with decreased bone mineral density, these findings suggest that phosphorylation of these matrix proteins by Fam20C is critical for bone formation and maintenance. To understand the functional significance of phosphorylation for the bone matrix, we generated transgenic mice that had Fam20C-overexpression in osteoblasts (Fam20C-Tg mice), and we are examining the change of the bone tissues in Fam20C-Tg mice.

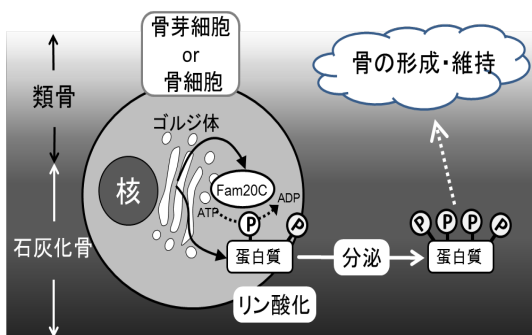
研究分野：口腔病理学

キーワード：Fam20C リン酸化 骨細胞 骨芽細胞 骨基質蛋白質

1. 研究開始当初の背景

Fam20C は、核や細胞質に局在する既知のキナーゼとは異なり、分泌蛋白質をリン酸化する新規のキナーゼである。Fam20C は細胞内のゴルジ体に局在し、S-X-E/pS モチーフを有する分泌蛋白質をリン酸化する。また、Fam20C は骨と歯に発現する事が報告されており、我々は骨における Fam20C は骨芽細胞にも発現するが骨細胞に高率に発現していることを見出した。そこで、骨芽細胞や骨細胞が産生する S-X-E/pS モチーフを有する基質蛋白質は、ゴルジ体の Fam20C によりリン酸化された後に分泌されると考えられる(下図)。

<骨基質蛋白質のリン酸化>



また、Fam20C 欠損マウスでは、くる病様の病態を示すことから、骨芽細胞や骨細胞が分泌する蛋白質のリン酸化は骨の形成・維持に重要であると考えられる。骨芽細胞や骨細胞が分泌する骨基質蛋白質としてよく知られている SIBLINGs ファミリーの蛋白質は、高度にリン酸化されて骨の形成・維持に関与すると考えられているが、これらの骨基質蛋白質のリン酸化の機能的意義はいまだ明らかにはなっていない。

2. 研究の目的

骨芽細胞や骨細胞が分泌する骨基質蛋白質は、ゴルジ体の Fam20C により高度にリン酸化されて、骨の形成・維持に重要な役割を果たすと考えられる。特に、骨細胞では Fam20C が高率に発現することから、骨細胞が特異的に産生する DMP1 のリン酸化は骨の形成・維持に重要と考えられる。

本研究では、まず、骨芽細胞が Fam20C を過剰発現するトランスジェニック (Fam20C-Tg) マウスを作製する。

次に、この Fam20C-Tg マウスの骨芽細胞や骨細胞が過剰産生する Fam20C により、SIBLINGs ファミリーの蛋白質が高度にリン酸化した状態の骨組織の変化を検討し、骨基質蛋白質のリン酸化の機能的意義を明らかにする。

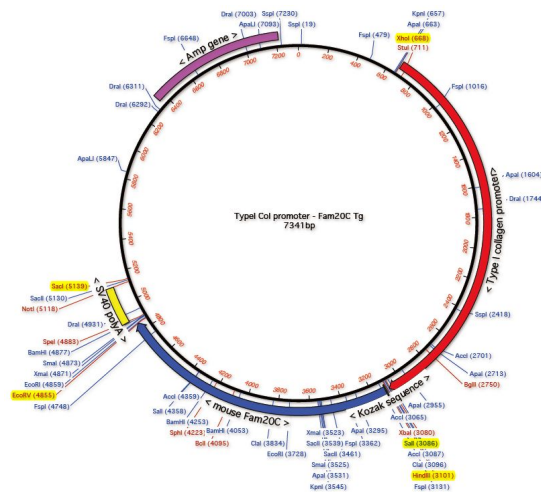
3. 研究の方法

Fam20C-Tg マウス用のベクター作製

・マウスの cDNA ライブラリーから Fam20C cDNA をサブクローニングし、Fam20C cDNA の上流には *Hind* 制限酵素配列と Kozak 配列を付与し、下流には *EcoRV* 制限酵素配列を付与する。

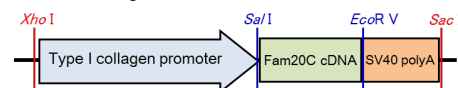
・pBS SK(+)ベクターを *Hind* と *EcoRV* により切断して Fam20C cDNA 挿入する。次に、Fam20C cDNA を骨芽細胞に過剰発現させるために、Fam20C cDNA 上流の *XhoI* と *SalI* 切断部位に I 型コラーゲン・プロモーター(2.3kbp)を挿入して Fam20C-Tg 用遺伝子コンストラクトを作製し、プラスミドを増量する。この遺伝子コンストラクトの DNA 配列はシーケンスにより確認する。

<Fam20C-Tg マウス用ベクター>



・上記のプラスミドを *XhoI* と *SacI* にて一本鎖に切断して、受精卵にインジェクションする遺伝子コンストラクトを精製する(下図)。

<Fam20C-Tg マウス用遺伝子コンストラクト>



Fam20C-Tg マウスの作製とライン化

・12 週齢の B6C3H F1♀マウスにセロトロピンを腹腔内投与して 2 日後にゴナトロピンを腹腔内投与して、マウスと同居させる。翌日、マウスの卵管膨大部から採卵する。

・採卵した前核期受精卵の 300 個に、精製した Fam20C-Tg マウス用遺伝子コンストラクトの溶液をインジェクションする。一昼夜、受精卵をインキュベーションし、発生の 2 細胞期胚をレシピエント マウスに移植する。

・F0 マウスを得た後、F0 マウスを C57BL/6 の近交系マウスと自然交配させて得た F1 マウスを用いてライン化する。

Fam20C-Tg マウスの解析

・F1 マウスを C57BL/6 の近交系マウスと自然交配させてライン化した F2 マウス以降のマウスを用いて解析を行う。

・各ラインの F2 マウスの大腿骨から total RNA を抽出して cDNA 合成後、リアルタイム PCR により骨における導入遺伝子の発現レベルを野生型マウスと比較検討する。

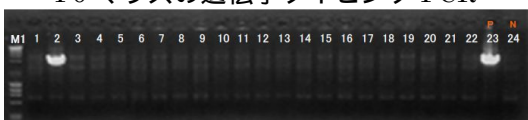
・各ラインの F2 マウスにおいて、導入遺伝子産物が骨芽細胞に高率に発現することを確認するため、頭蓋骨を固定後に脱灰して、パラフィン切片を作製する。各切片の免疫染色を行い、Fam20C-Tg マウスの骨における Fam20C の分布を野生型と比較検討する。

4. 研究成果

Fam20C-Tg マウスの作製

・レシピエント マウスに導入遺伝子をインジェクションした受精卵を移植して3週間後、22 匹のファウンダー (F0) マウスが出生した。3 週齢の F0 マウスの尻尾から DNA を抽出し、遺伝子タイピングを実施したところ、1 匹の F0 マウスの染色体への導入遺伝子の組込が確認できた。

< F0 マウスの遺伝子タイピング PCR >



↑ 陽性
↑ 陽性コントロール
↑ 陰性コントロール

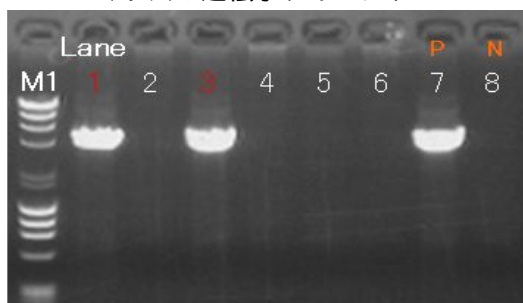
< F0 マウスの判定結果 >

Lane No.	個体No.		判定
Lane1:	101	tail	陰性
Lane2:	102	tail	陽性
Lane3:	103	tail	陰性
Lane4:	104	tail	陰性
Lane5:	105	tail	陰性
Lane6:	106	tail	陰性
Lane7:	107	tail	陰性
Lane8:	108	tail	陰性
Lane9:	109	tail	陰性
Lane10:	110	tail	陰性
Lane11:	111	tail	陰性
Lane12:	112	tail	陰性
Lane13:	113	tail	陰性
Lane14:	114	tail	陰性
Lane15:	115	tail	陰性
Lane16:	116	tail	陰性
Lane17:	117	tail	陰性
Lane18:	118	tail	陰性
Lane19:	119	tail	陰性
Lane20:	120	tail	陰性
Lane21:	121	tail	陰性
Lane22:	122	tail	陰性
Lane23:	positive control: W.T.Genome 60ng + Transgene		
Lane24:	negative control: W.T.Genome 60ng		
M1	Hind Digest + X174Hae Digest Mix Marker		

Fam20C-Tg マウスのライン化

・マウス染色体への導入遺伝子の組込が確認された 1 匹の F0 マウスを C57BL/6 の近交系 マウス(2 匹)と自然交配させて得た F1 マウスの遺伝子タイピングを実施した。その結果、4 匹の F1 と 1 匹の F1 マウスを得た。

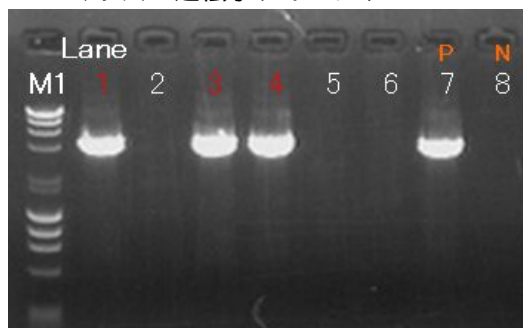
< F1 マウスの遺伝子タイピング PCR-1 >



< F1 マウスの判定結果-1 >

Lane No.	個体No.		判定
Lane1:	102F1-001	tail	陽性
Lane2:	102F1-002	tail	陰性
Lane3:	102F1-003	tail	陽性
Lane4:	102F1-004	tail	陰性
Lane5:	102F1-005	tail	陰性
Lane6:	102F1-006	tail	陰性
Lane7:	positive control: 102-Tg Genome 60ng		
Lane8:	negative control: W.T.Genome 60ng		
M1	Hind Digest + X174Hae Digest Mix Marker		

< F1 マウスの遺伝子タイピング PCR-2 >



< F1 マウスの判定結果-2 >

Lane No.	個体No.		判定
Lane1:	102F1-101	tail	陽性
Lane2:	102F1-102	tail	陰性
Lane3:	102F1-103	tail	陽性
Lane4:	102F1-104	tail	陽性
Lane5:	102F1-105	tail	陰性
Lane6:	102F1-106	tail	陰性
Lane7:	positive control: 102-Tg Genome 60ng		
Lane8:	negative control: W.T.Genome 60ng		
M1	Hind Digest + X174Hae Digest Mix Marker		

・前記の 4 匹の導入遺伝子の確認された F1 マウスを C57BL/6 の近交系 マウス(2 匹)と自然交配させて、ライン化した 4 系統の Fam20C-Tg(F2)マウスを得た。

Fam20C-Tg マウスにおける Fam20C 発現

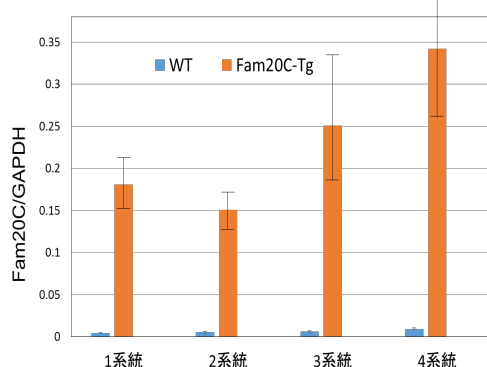
・各ラインの Fam20C-Tg マウスの大腿骨における Fam20C 遺伝子の発現レベルを内在性コントロールの GAPDH で標準化して、同腹仔の野生型マウスの値と共に下記の表に示す。

< 大腿骨における Fam20C 発現レベル >

Line	Tg/WT	Fam20C	GAPDH	(Fam20C/GAPDH)/calibrator
#1	Tg	112.391	553.34	0.203115552
#1	WT	2.68073	543.55	0.00493193
#1	WT	3.2948	803.03	0.004102964
#1	Tg	140.21	883.84	0.158636678
#2	Tg	111.754	714.04	0.156508176
#2	WT	2.9789	620.93	0.004797451
#2	Tg	118.517	690.15	0.17172574
#2	WT	2.20649	365.2	0.006041866
#2	Tg	69.1775	556.32	0.124347791
#2	WT	3.2316	589.71	0.005480032
#3	Tg	71.1277	634.89	0.112031041
#3	WT	3.78277	609.07	0.006210743
#3	Tg	198.954	561.53	0.354304823
#3	Tg	140.764	574.98	0.244814208
#3	Tg	105.601	360.97	0.292548637
#4	WT	1E-04	645.71	1.54154E-07
#4	WT	5.10139	609.61	0.008368315
#4	Tg	169.754	399.24	0.425191869
#4	WT	6.77737	588.36	0.011519025
#4	WT	4.23137	524.62	0.008065648
#4	Tg	135.835	525.03	0.258719192

・各ラインにおいて、大腿骨の Fam20C 発現レベルの平均値を、同腹仔の野生型マウスの平均値と比較すると、下記グラフに示すように、Fam20C-Tg マウスでは野生型マウスの 30 ~ 40 倍の Fam20C 発現上昇が認められた。

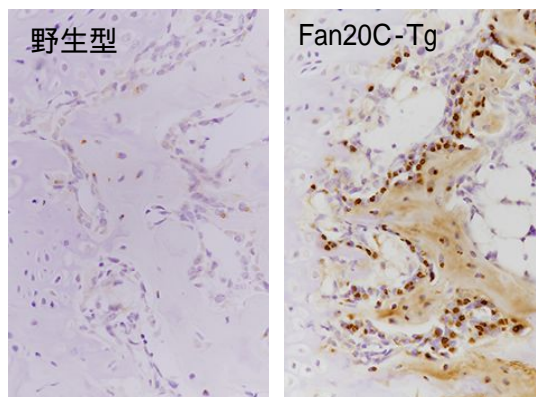
< Fam20C 発現レベルの比較 >



Fam20C-Tg マウスにおける Fam20C 分布

・右上図に示すように、野生型マウスでは、Fam20C は骨細胞に陽性反応、骨芽細胞には弱陽性反応を示した。一方、Fam20C-Tg マウスでは、骨芽細胞と骨細胞に強い陽性反応を認め、Fam20C 導入遺伝子産物が骨芽細胞に高率に発現していることが確認された。

< Fam20C の免疫染色 >



・ Fam20C-Tg マウスの系統維持のため、F1 マウス以降の交配には C57BL/6 の近交系マウスと交配させてヘテロで系統維持して、Fam20C-Tg マウスの骨の解析を行っている。

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0件)

なし

[学会発表](計1件)

廣瀬勝俊、佐藤 淳、小守壽文、豊澤 悟：
Fam20C 過剰発現マウスの骨組織の検討について 第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2016 年 8 月 24-26 日、札幌

[図書](計0件)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊澤 悟 (TOYOSAWA SATORU)
大阪大学・歯学研究科・教授
研究者番号：30243249

(2) 研究分担者

佐伯 万騎男 (SAEKI MAKIO)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：30273692

佐藤 淳 (SATO SUNAO)
大阪大学・歯学研究科・講師
研究者番号：70335660

宇佐美 悠 (USAMI YU)
大阪大学・歯学部附属病院・助教
研究者番号：80444579

(3) 連携研究者

なし