

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 25 年 2 月 28 日現在

機関番号：12605

研究種目：基板研究 (C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580305

研究課題名（和文）

細網線維の形成機構を通じた組織柔剛特性の解明と新規肉質評価指標の確立

研究課題名（英文）

Elucidation of tissue flexibility through morphogenesis of reticular fiber and establishment of new biomarker for meat evaluation

研究代表者

新井 克彦 (ARAI KATSUHIKO)

東京農工大学・農学部附属硬蛋白質利用研究施設・教授

研究者番号：60175940

研究成果の概要(和文):線維形成に対して促進的に働くと考えられている XII 型コラーゲンが、筋分化に伴いその発現が上昇することを見出した。そこで、筋分化過程において XII 型コラーゲンの転写を制御する因子の同定を試みたところ、がん抑制タンパク質 p53 がその発現を抑制し、 $\Delta Np73$ が発現を上昇させることを見いだした。以上の結果より、筋細胞の分化過程における XII 型コラーゲン発現制御には p53 ファミリーが関与するメカニズムが存在し、筋間結合組織の性状に寄与している可能性が示された。

研究成果の概要(英文):The type XII collagen, which was thought to accelerate fibrogenesis, was upregulated during myoblast differentiation. To identify the transcription factor that regulate expression of type XII collagen gene, it was found that tumor suppressor protein, p53 bind the regulatory region of the gene and p53-inhibitor, $\Delta Np73$ stimulated expression of the gene. Thus, p53 family regulated extracellular matrix during myogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
23 年度	600,000	180,000	780,000
24 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：コラーゲン、筋、p53、 $\Delta Np73$

1. 研究開始当初の背景

現在までに、コラーゲン分子種は XXVIII 型まで報告されており、その線維形成特性や分子構造の特徴から、線維形成性コラーゲン、FACIT コラーゲン、などのサブファミリーに分類される。そのうち、FACIT コラーゲンは

I 型や II 型などの線維形成性コラーゲンから成るコラーゲン細線維の表面に結合することで、その後のコラーゲン線維の太さを制御していることが、XIV 型ノックアウトマウスを用いた研究により示された。我々は今までに、安定型ビタミン C 存在下で構築されたウ

マ腱細胞の三次元培養系に TGF β 1 を添加することで太く明瞭な横紋を示すコラーゲン線維が形成されること、並びにこの際に XII 型発現が上昇するとともに XIV 型が低下することを明らかにした。この結果は、XII 型および XIV 型がコラーゲン線維の成熟（太さ）に関与することを示唆するものである。

一方、組織内での XIV 型の局在としては、鶏胚腱組織において、未だ横紋を形成していない未熟なコラーゲン細線維上には多く分布するが、孵化後に太く明瞭な横紋を示すコラーゲン線維が出現するに伴い、XIV 型 mRNA 量並びに線維上への局在が減少すること、或いはヒト肺組織では、肺胞間の細線維に一致して局在することが示されている。我々も XIV 型は胎児組織や胎児由来線維芽細胞で高い発現を示すが、出生後の組織や成体組織由来細胞での発現が低下することを確認した。さらに、*in situ* ハイブリダイゼーションにより XIV 型コラーゲン mRNA 発現細胞の同定を試みたところ、肝臓類洞や脾臓の細網細胞に、筋肉では筋間間質細胞で陽性反応が確認された。

2. 研究の目的

胎児期に豊富で成長に伴い激減することの知られている XIV 型コラーゲンは、コラーゲン線維を細いままに保つことで組織の柔軟性に寄与していると考えられている。応募者は、この分子種が肝臓、肺、筋肉などの細網線維或いは好銀線維と呼ばれるコラーゲン細線維の豊富な組織において高発現を示すことを見出したことから、当該コラーゲンがこれらの組織に共通の特性である組織柔軟性に関与しているのではないかと考えた。本研究では、未だ明らかにされていない細網線維形成のメカニズムを解明し、筋間結合組織における当該コラーゲンの肉質への関与を解析することにより、食肉の新規品質評価指標の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) XIV 型コラーゲンの遺伝子発現制御領域並びに転写因子を同定するために、既にマウス肝由来ゲノムより約 14 キロベースの第一エクソンを含む XIV 型コラーゲン遺伝子をクローニングしている。この遺伝子断片を元に LA-*Taq* (TAKARA) を用いた PCR を用いて様々な領域の DNA 断片を増幅した後、ホタル・ルシフェラーゼをレポーター遺伝子に持つ pGL4basic プラスミドベクター (Promega) にサブクローニングする。

(2) マウス肝臓より肝臓における主たるコ

ラーゲン産生細胞である肝臓星細胞分画を調製する。すなわち、全身麻酔下でマウス肝門脈からコラーゲナーゼを灌流することにより肝組織を消化し、細胞懸濁液を調製する。得られた細胞懸濁液から低速遠心で肝実質細胞を除いた上清について、さらに Percoll 密度勾配遠心法を行い血管内皮細胞やクッパー細胞等を除去することにより 90% 以上の純度で初代肝臓星細胞を調製し、 5×10^4 cell / 2 cm^2 の濃度で 12 穴マルチウエルプレートに播種する。本申請課題では、大量の肝臓星細胞を調製することが最も重要でありかつ労力を有するため、実験条件を十分に検討する必要がある。

(3) 様々な部分の XIV 型コラーゲン遺伝子断片を含んだ pGL4basic コンストラクト 1mg とコントロールベクターであるウミシイタケルシフェラーゼベクター (pRL-tk) (Promega) 100 ng を 6 ml の Fugene HD (Roche) とともに初代培養の肝臓星細胞に対しトランスフェクションを行い、一晚培養を行う。その後 100 ml の Passive Lysis Buffer (Promega) により細胞を可溶化した後、その遠心上清について Dual luciferase assay system (Promega) を用いてルミノメーターにより各ルシフェラーゼ活性を測定し、肝臓において強い発現活性を持つコンストラクトを選択する。

(4) 高い転写活性を持つ領域をさらに deletion mutant の作製により 500 bp 程度まで絞り込み、それを元にゲルシフトアッセイ用プローブを設計する。すなわち、高転写活性の遺伝子領域の塩基配列を元に、オーバーラップするように 40 塩基の配列を設計し、その 3' -末端にジゴキシゲニン-ddUTP (Roche) をターミナルトランスフェラーゼ (Roche) により標識することでプローブを作製する。

(5) 初代肝臓星細胞より核蛋白質抽出キット (CellLytic NuCLEAR EXTRACTION KIT; Sigma) により抽出した核蛋白質を用いてゲルシフトアッセイを行い、核蛋白質を結合しうるプローブを選択する。

(6) XIV 型コラーゲン遺伝子制御に関わる転写因子に対するラット・モノクローナル抗体を作製する。モノクローナル抗体の作製には十分な実績を持っている (Arai, et al., *Cell Motil. Cytoskel.*, 2002 など)。初代肝臓星細胞由来核蛋白質を抗原とし、初回免疫から一ヶ月後に追加免疫、その 3 日後に腸骨リンパ節細胞を調製し、ミエローマ P3U1 とポリエチレングリコール存在下で細胞融合を行い、HAT 培地により選択培養を進

める。モノクローナル抗体にとってそのスクリーニング作業が最も重要でありかつ労力を有するため、ここで大学院生3名を研究協力者に充てる。なお、スクリーニング並びに抗体の絞り込みの順序は以下に示す通りに実施する。

(7) 初代肝臓星細胞由来核蛋白質は二次元電気泳動 (Invitrogen ZOOM system を所有している) によりまず pH3-10 で展開した後、必要に応じてより狭い pH レンジで展開を行う。この二次元マップについて、上記で作製されたモノクローナル抗体で認識される XIV 型遺伝子制御因子のスポット位置を同定した後、同様の二次元マップを PVDF 膜に転写、CBB 染色により出現した目的のスポットを切り出し、ペプチドシーケンス解析を外部委託する。以上の実験により、XIV 型コラーゲン遺伝子制御に関わる転写因子を同定できる。

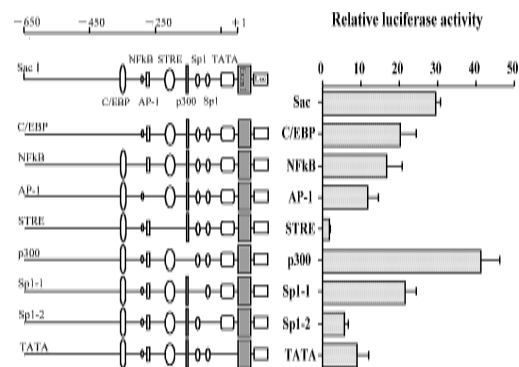
(8) マウスの様々な部位より採材した筋組織より ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem) を用いて抽出した核蛋白質に対し、ゲルシフトアッセイ並びに樹立されたモノクローナル抗体を用いた免疫化学的解析を実施する。また、種々の部位の筋組織について鍍銀染色を施した後に、画像解析により好銀線維の単位面積あたりの密度を定量化する。さらに、筋肉単位重量あたりのヒドロキシプロリン量を測定することでコラーゲン含量を測定する。以上の実験により、XIV 型発現と好銀線維量並びに肉質との相関性を解析する

4. 研究成果

(1) XIV 型コラーゲンの遺伝子発現制御領域並びに転写因子を同定するために、既にマウス肝由来ゲノムより約 14 キロベースの第一エクソンを含む XIV 型コラーゲン遺伝子を元に、LA-Taq (TAKARA) を用いた PCR を用いて様々な領域の DNA 断片を増幅した後、ホタル・ルシフェラーゼをレポーター遺伝子に持つプラスミドベクター (Promega) にサブクローニングした。続いて、様々な部分の XIV 型コラーゲン遺伝子断片を含んだホタル・ルシフェラーゼコンストラクト 1 μ g とコントロールベクターであるウミシイタケルシフェラーゼベクター (pRL-tk) (Promega) 100 ng を 6 μ l の Fugene HD とともに初代線維芽細胞に対しトランスフェクションを行い、一晚培養を行った。その後 Passive Lysis Buffer により細胞を可溶化した後、その遠心上清について Dual luciferase assay system を用いてルミノメーターにより各ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、転写開始点の

上流 700 塩基以内に転写活性を上昇させる領域が存在し、700 塩基よりさらに上流域には転写活性を抑制する領域が含まれることが示唆された。さらに、転写開始点の上流 350 塩基内にある転写因子結合部位、C/EBP、NFkB、AP-1、STRE、p300、Sp1-1、Sp1-2、TATA それぞれにおいて点突然変異を導入したところ、STRE 結合領域に変異を加えた際に転写活性が消失した頃から、この領域が当該コラーゲンの転写制御に重要な領域であることが示された。

XIV 型コラーゲン転写制御領域の推定



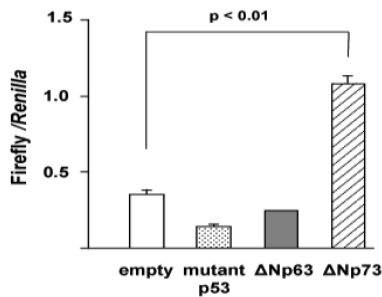
(2) マウス筋芽細胞株 C2C12 は 20% FBS を含む DMEM で維持・増殖させ、2% ウマ血清を含む DMEM で培養を行うことで筋分化を誘導した。マウス XII 型コラーゲン遺伝子は転写開始点の上流 893 塩基からその下流 214 塩基までの 1112 bp を PCR により増幅した後、pGL3-basic にサブクローニングし、これを元に欠損変異体を作製した。これらのプラスミドをトランスフェクションした後に、筋分化に伴うルシフェラーゼ活性の変化を検討した。また、未分化並びに分化誘導後 2 日目の C2C12 株由来核タンパク質を用いたゲルシフトアッセイにより、DNA 結合蛋白質の変化を解析した。さらに、p53 ファミリーの強制発現が筋分化に伴う XII 型コラーゲンの転写活性化に及ぼす影響について検討した。加えて、 Δ Np73 安定発現 C2C12 株を持続性アスコルビン酸存在下で長期培養した際に形成される細胞間のマトリックス構造の特性について、電子顕微鏡並びに抗 XII 型コラーゲン抗体を用いたレーザー顕微鏡解析を行った。

その結果、欠損変異体プラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイにより、筋分化に伴う XII 型コラーゲン遺伝子発現制御領域は、転写開始点の上流 230 塩基から 9 塩基の間に存在することが予想された。この領域をゲルシフトアッセイにより検索した結果、p53 結合部位が見出され、筋分化に伴いその部位に

における p53 結合活性が低下することが判明した。そこで、p53 強制発現の筋分化に伴う XII 型コラーゲン遺伝子発現に及ぼす影響を検討したところ、その活性上昇を抑制した。さらに、 Δ Np73 強制発現下においては低血清による分化誘導の有無にかかわらず XII 型コラーゲン遺伝子発現が上昇した。また、 Δ Np73 安定発現 C2C12 株の長期培養系において、細胞間コラーゲン線維が太くなり、同時に XII 型コラーゲンの蓄積が認められた。

以上の結果より、筋細胞の分化過程における XII 型コラーゲン発現制御には p53 ファミリーが関与するメカニズムが存在し、筋間結合組織の性状に寄与している可能性が示された。

XII 型コラーゲン発現の p53 ファミリーによる制御



XII 型および XIV 型コラーゲンが、マウス胎児の発生過程における組織の線維形成に関与していることが、最近になりドイツのグループにより作製されたノックアウトマウスの解析により明らかにされつつある。しかしながら、これらのコラーゲンの遺伝子発現制御機構についてはほとんどわかっていない。本研究課題により、筋分化制御因子やがん抑制タンパク質 p53 ファミリーにより、細胞培養系におけるこれらのコラーゲンの制御機構の一端が明らかになったことは、組織における線維形成制御、しいては線維の量や固さに起因する組織柔剛性の解明につながり、食肉の品質評価の新しいマーカーとなり得る。

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 2 件)

1. Yuda Y, Kasashima Y, Kuwano A, Sato K, Hattori S, Arai K., Active hyaluronidase 2 expression in the granulation tissue formed in the healing process of equine superficial digital flexor tendonitis. *J Vet Med Sci.* (査読有) 75:219-223 (2013)

2. Kihara M, Kasashima Y, Arai K and Miyamoto Y. Injury induces a change in the functional characteristics of cells recovered from equine tendon. *J Equ Sci.* (査読有) 22:57-60 (2011)

[学会発表] (計 6 件)

1. ウマ骨髄由来間葉系幹細胞のコラーゲングル内における腱分化形質の発現特性. 新井克彦、宮原志穂璃、湯田洋平、丸山勝弘、笠嶋快周、桑野 睦敏. 第 12 回再生医療学会 (神奈川) 2013 年 3 月 22 日

2. ウマ間葉系幹細胞のコラーゲングル内における腱分化形質の発現特性. 湯田洋平、宮原志穂璃、笠嶋快周、桑野睦敏、新井克彦. 第 154 回日本獣医学会学術集会 (岩手) 2012 年 9 月 15 日

3. ウサギ実験的腱損傷の治癒過程における腱関連遺伝子発現の解析. 小川智、湯田洋平、笠嶋快周、桑野睦敏、佐々木一昭、下田実、新井克彦. 第 154 回日本獣医学会学術集会 (岩手) 2012 年 9 月 15 日

4. 筋分化過程における XII 型コラーゲン遺伝子発現のがん抑制蛋白質 p53 による制御 有地 亮一郎、桑野睦敏、新井克彦. 第 84 回日本生化学会 (京都) 2011 年 9 月 23 日

5. マウス P19 細胞株の神経特異的分化形質発現の p53 がん抑制タンパク質による制御 丸山裕佳、木下恵見、新井克彦. 第 10 回日本再生医療学会総会 (東京) 2011 年 3 月 1 日

6. ウマ浅指屈腱炎発症後の肉芽組織で発現するヒアルロニダーゼ分子種 新井克彦、高木加奈子、桂田樹明、佐藤幹、笠嶋快周、桑野睦敏、和田信也、服部俊治. 第 42 回日本結合組織学会学術大会 第 57 回マトリックス研究会大会・合同学術大会 (秋田) 2010 年 8 月 19 日

[その他]

ホームページ等

<http://www.collagen-institute.jp/sclero-protein/lab2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 克彦 (ARAI KATSUHIKO)

東京農工大学・農学部附属硬蛋白質利用研究施設・教授

研究者番号：60175940

