

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590186

研究課題名（和文） コラーゲンの生成と分解過程の液中原子間力顕微鏡による動態解析

研究課題名（英文） Analysis of collagen fibril formation and degeneration by atomic force microscopy in liquid condition

研究代表者

星 治（HOSHI OSAMU）

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：10303124

研究成果の概要（和文）：本研究では、コラーゲン線維の成熟過程のメカニズムとそれに及ぼす因子について、原子間力顕微鏡により解明した。成果の概要は以下の通りである。

- 1) I型コラーゲン分子の束である segment-long-spacing (SLS) crystallites の観察を AFM で可能にした。
- 2) コラーゲン産生能を有する培養細胞（NOS-1）を用いて、コラーゲン線維の成熟過程を液中 AFM により解析できた。
- 3) 高速原子間力顕微鏡により、培養細胞から産生されたコラーゲン細線維のイメージングに成功した。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we investigated that the mechanism of formation and degeneration of collagen fibrils by atomic force microscopy (AFM) in liquid condition. The results of the study are as follows.

- 1) We succeeded in the observation of segment-long-spacing (SLS) crystallites, which is the bundle of type I collagen molecules, by atomic force microscopy in liquid.
- 2) A human osteosarcoma cell line named NOS-1 is known to produce a large amount of type I collagen fibrils on the culture dish. The developing collagen fibrils were observed by AFM in phosphate-buffered saline.
- 3) We succeeded in the observation of collagen fibrils produced by NOS-1 with high-speed AFM.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：コラーゲン線維、原子間力顕微鏡

1．研究開始当初の背景

コラーゲンは人体を構成するタンパク質の約 30%を占めており、細胞外マトリックスを構成し、さまざまな細胞増殖の足場として、また軟骨や骨では基質タンパク質の構成成分として、生体にとって重要な役割を演じている。その成熟過程の微細構造解析は、これまで電子顕微鏡により行われてきたが、試料作製上の制限から、液中でそのまま解析することはできなかった。ところが近年、原子間力顕微鏡という新しい顕微鏡が出現し、生体組織の三次元微細構造を液中で可視化できるようになってきた。

本研究では、液中環境で観察が可能な原子間力顕微鏡の特性を生かして、コラーゲン線維の成熟過程の観察を行い、そのメカニズムや影響を及ぼす因子の解明を目指した。

2．研究の目的

研究代表者らが培ってきた原子間力顕微鏡の観察技術をコラーゲンを対象に発展させようとするのが一つの目標であり、さらに、生理的な環境にあるコラーゲンに対して成熟過程に影響を与える因子を加えながら、微細構造解析することで、組織としてコラーゲンが力学的に高い強度を持つ特性の要因や、生成や分解のメカニズムの解明を目的に研究を行った。

3．研究の方法

(1) I型コラーゲン分子の束である

segment-long-spacing (SLS)crystallites を作製し、電子顕微鏡で確認後、AFM により観察した。

(2) コラーゲン産生能を有する骨肉腫由来の培養細胞 (NOS-1) を用いて、コラーゲン線維の成熟過程を解析した。培養開始後、3 日目、7 日目に固定後、走査型電子顕微鏡で観察した。

(3) (1) と同様に作製した NOS-1 細胞を液中環境で原子間力顕微鏡により観察した。

(4) NOS-1 細胞のコラーゲン産生能や成熟過程の微細構造に与えるアスコルビン酸の影響について、培地に対する添加濃度を 10 μ M、50 μ M、100 μ M とした群と添加しない対象群とを比較検討した。

(5) 高速原子間力顕微鏡による NOS-1 細胞から生成されたコラーゲン細線維の液中環境での観察を試みた。

4．研究成果

(1) I型コラーゲン分子の束である segment-long-spacing (SLS) crystallites 結晶の表面立体形状を液中 AFM で観察し、特徴的な縞状構造と微細構造との関係を示すことができた。

(2) 走査電子顕微鏡の観察では、NOS-1 培養後 3 日目には、両端が先細りした直径 30nm のコラーゲン細線維が細胞周囲にみ

られ、D 周期に対応する 60-70nm 周期の凹凸もみられた。7 日目には産生されるコラーゲン細線維はさらに伸長し、線維の分岐や集束も増加した(図 1)。

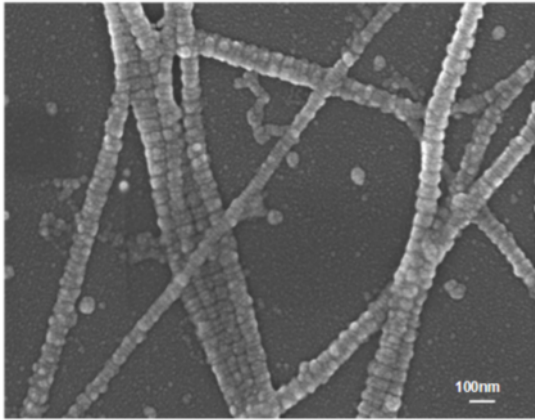


図 1 NOS-1 細胞から産生されたコラーゲン細線維の走査型電子顕微鏡像。

(3)原子間力顕微鏡での液中観察により、培養細胞(NOS-1)から産生されるコラーゲン線維の成熟過程を解析した。細胞周囲に直径 60nm から 280nm までのさまざまな太さのコラーゲン細線維が分岐し、集束する様子が見られ、線維表面には D 周期に対応する凹凸がみられた。さらに、コラーゲン細線維の長軸方向に対して斜めに走る線維も認められ、成熟していく過程で線維の一部がらせん方向に巻いていくことが示唆された(図 2)。

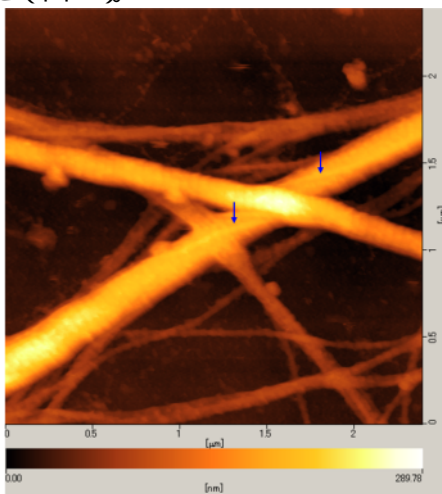


図 2 NOS-1 細胞から産生されたコラーゲ

ン細線維の原子間力顕微鏡像。矢印はコラーゲン細線維の長軸に対して斜めに走る線維を示す。

(4) NOS-1 細胞のコラーゲン産生能に対して、アスコルビン酸には有意な促進作用があることが確認された。アスコルビン酸の添加により、コラーゲン細線維の伸長の速度が増加し、線維の集束の幅も増加した。

(5) 高速原子間力顕微鏡によるコラーゲン細線維の観察方法を検討した結果、培養細胞から産生されたコラーゲン細線維のイメージングに成功し、リアルタイムでコラーゲン線維の成熟過程や分解過程をイメージングできる可能性が示唆された。

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)

[学会発表](計 3 件)

1. Hoshi O and Ushiki T: Collagen fibril formation by human osteosarcoma cells observed by atomic force microscopy. The 12th International Scanning Probe Microscopy Conference, May 10, 2010, Sapporo.

2. 星 治, 牛木辰男: 培養細胞系を用いたコラーゲン線維形成過程の原子間力顕微鏡による構造解析. 日本解剖学会第 115 回総会・全国学術集会, 2010 年 3 月 28 日, 岩手.

3. 尾崎明加, 星 治, 繁野雅次, 中島邦雄, 牛木辰男: コラーゲン成分の液中 AFM 観察. 日本顕微鏡学会第 64 回学術講演会,

2008年5月21日，京都．

〔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：

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 なし

6．研究組織

(1)研究代表者

星 治 (HOSHI OSAMU)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：10303124

(2)研究分担者

牛木 辰男 (USHIKI TATSUO)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：40184999

(3)連携研究者

無し