

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830059

研究課題名(和文) 軟骨基質の細胞内輸送機構の解明

研究課題名(英文) Studies on intracellular transport of cartilage matrix

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・講師

研究者番号：50508869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内でのタンパク質輸送で中心的な役割を果たすゴルジ体において機能するgiantinの生体における発現を調べた結果、軟骨細胞を含む多くの細胞で発現していることが明らかになった。また、giantin欠損軟骨細胞においてもゴルジ体は正常に形成されることが示された。giantin欠損個体の軟骨では、II型コラーゲンとフィブロネクチンの量は正常個体と変わらなかったのに対し、アグリカンとリンクプロテインは著しく減少しており、II型コラーゲンは増加していた。以上のことから、giantinは特定の軟骨基質の分泌において極めて重要な役割を果たすと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Giantin is vesicle tethering factor that functions at cis-Golgi compartment. Immunohistological analysis showed that giantin were expressed in various types of cells including chondrocyte. Morphology of golgi apparatus in chondrocytes lacking giantin were indistinguishable from that of normal cell by immunofluorescence of golgi marker proteins. Cartilage of embryos lacking giantin showed similar level of type II collagen and fibronectin, has markedly reduced aggrecan and link protein, and increased type XI collagen. These results suggest that tethering factors have unique and redundant roles, and that giantin play a pivotal role in secretion and/or synthesis of specific cartilage matrix.

研究分野：動物遺伝学

キーワード：軟骨形成 繫留因子 小胞輸送 ゴルジ体 実験動物 細胞外基質

1. 研究開始当初の背景

分泌タンパク質は主に脂質の膜から成る輸送小胞内にパッケージングされ、細胞内を輸送される。輸送小胞の表面および輸送小胞の輸送先の膜には小胞繫留因子と呼ばれるタンパク質が存在しており、小胞と標的膜上の小胞繫留因子同士が結合することにより輸送小胞が細胞内輸送経路から逸脱するのを防ぎ、効率的に細胞内輸送が行われることを可能にしている。軟骨細胞は軟骨基質を構成している様々なサイズの分子を多量に分泌する必要があるため、特殊化した細胞内輸送系を有していると考えられているが、その詳細は不明であった。

2. 研究の目的

OCD ラット (*ocd/ocd*) は小胞繫留因子 Giantin の機能を喪失している突然変異ラットであり、軟骨のプロテオグリカンの減少を伴う骨軟骨形成不全症を呈する。このことから、Giantin は軟骨基質の細胞内輸送・分泌を担うことにより、軟骨内骨化において極めて重要な役割を果たしていると考えられる。このため、本研究では、giantin を欠損する *ocd/ocd* および *ocd/ocd* 由来の軟骨細胞を用いて、軟骨基質の細胞内輸送・分泌における giantin の役割を明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

1) 生体における Giantin 発現パターン

胎齢 18.5 日の胎仔後肢の新鮮凍結切片を作成し、抗 Giantin 抗体およびを用いた免疫染色を行った。

2) Giantin の欠損が軟骨基質の産生・分泌に及ぼす影響

ocd/ocd 胎仔を経時的に採材し、軟骨基質のサフラニン O 染色およびアザン染色を行うとともに、軟骨基質を構成している複数の分子の免疫染色を行った。

3) Giantin の欠損が軟骨細胞のゴルジ体形成に及ぼす影響

ocd/ocd 胎仔の肋軟骨から単離した軟骨細胞におけるゴルジ体の形成を、複数のゴルジ体マーカータンパク質に対する免疫染色を行って調べた。

4) Giantin を欠損する軟骨細胞の一般性状

ocd/ocd 胎仔の肋軟骨から単離した軟骨細胞の増殖能、アポトーシス頻度、一次繊毛の形成の程度を調べた。

5) 細胞の種類の違いが軟骨基質の分泌に及ぼす影響

正常および *ocd/ocd* 胎仔から作成した線維芽細胞および軟骨細胞に EGFP 融合リンクプロテインを発現するコンストラクトをトランスフェクションし、これらのタンパク質の発現を調べた。

4. 研究成果

1) 生体における Giantin 発現パターン

生体において、giantin は軟骨細胞を含む多くの細胞で発現していることが明らかになった(図 1)。また、軟骨における giantin の発現は、静止軟骨細胞から肥大軟骨細胞までのすべての分化段階の軟骨細胞で認められた。

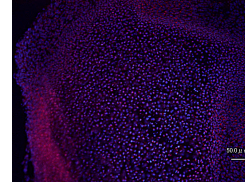


図 1.軟骨における giantin(赤)の発現

2) Giantin の欠損が軟骨基質の産生・分泌に及ぼす影響

サフラニン O 染色およびアザン染色から、*ocd/ocd* の軟骨ではプロテオグリカンが減少している一方、膠原線維が増加していた。また、軟骨基質の免疫染色の結果から、*ocd/ocd* ではアグリカン、リンクプロテインが著しく減少しているのに対し、XI 型コラーゲンが顕著に増加していた(図 2)。

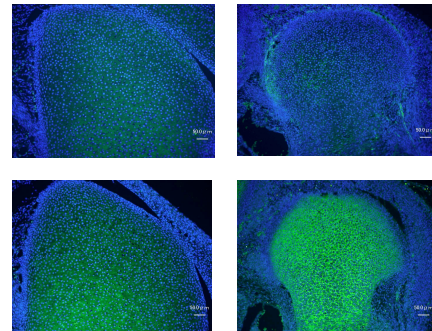


図 2.軟骨基質の特殊染色・免疫染色。左：正常個体、右：*ocd/ocd*。上段：アグリカン、下段：XI 型コラーゲン

3) Giantin の欠損が軟骨細胞のゴルジ体形成に及ぼす影響

ocd/ocd の軟骨細胞では giantin の発現は認められなかったが、GM130 および Mannosidase II などのゴルジ体の各区間のマーカータンパク質の発現および局在については、正常個体の軟骨細胞との間に顕著な差異が認められなかった(図 3)。

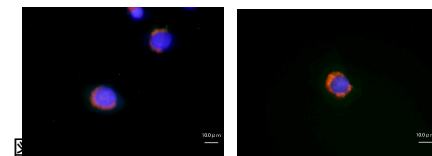


図 3.軟骨細胞におけるゴルジ体マーカーの染色像。左：正常個体の軟骨細胞、右：*ocd/ocd* の軟骨細胞。Mannosidase II(緑)、GM130(赤)

4) Giantin を欠損する軟骨細胞の一般性状
ocd/ocd の単離軟骨細胞の増殖能、アポトーシス頻度を調べた結果、増殖能は正常個体の軟骨細胞と同等であり、アポトーシスを起こしている細胞は、ほとんど検出されなかった。また、一次繊毛の形成頻度および形成された一次繊毛の長さに *ocd/ocd* と正常個体の軟骨細胞の間に有意差は認められなかった。

5) 細胞の種類の違いが軟骨基質の分泌に及ぼす影響
線維芽細胞および軟骨細胞に EGFP 融合リンクプロテインを発現するコンストラクトをトランスフェクションした結果、軟骨細胞では、EGFP 融合リンクプロテインのシグナルが認められたが、繊維芽細胞では EGFP 融合リンクプロテインのシグナルはほとんど認められなかった。また、正常個体と *ocd/ocd* の単離軟骨細胞の間で EGFP 融合リンクプロテインのシグナルの程度に大きな差異は認められなかった。

● (まとめ)

これまでに不明であった生体における Giantin の発現パターンを明らかにし、Giantin は軟骨細胞を含む非常に多くの細胞で発現していることを示した。また、Giantin が欠損していても、ゴルジ体は正常に形成され、giantin と結合することが報告されている小胞繫留因子の局在も影響を受けないことが示した。Giantin 欠損個体の軟骨ではアグリカンなど、特定の軟骨基質の構成成分が減少しているだけでなく、XI 型コラーゲンが逆に上昇していることが示された。これらの結果から、giantin は特定の軟骨基質の分泌ないしは産生に必須な因子であることを強く示唆している。

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2件)

Renal function and hematology in rats with congenital hypoplasia. Yasuda H, Amakasu K, Tochigi Y, Katayama K, Suzuki H. *Comparative Medicine*. 66(1) pp. 10-20. (2016) 査読あり

Homeobox family Hoxc localization during murine palate formation.

Hirata A, Katayama K, Tsuji T, Imura H, Natsume N, Sugahara T, Kunieda T, Nakamura H, Otsuki Y. *Congenital Anomalies*. doi: 10.1111/cga.12153. [Epub ahead of print] 査読あり

[学会発表](計6件)

伊藤順也 他、胸腺低形成を伴う矮小症ラット(PET)の *Thap4* 遺伝子における 2塩基欠失変異の同定 第 157 回日本獣医学会学会学術集会 北海道大学高等教育推進機構(北海道札幌市)(2014年9月9日)

原田奈美香 他、両側性腎低形成症ラットの雌において完全生殖周期が腎機能に与える影響 第 157 回日本獣医学会学術集会 北海道大学高等教育推進機構(北海道札幌市)(2014年9月10日)

中根潤 他、てんかんを伴う致死性矮小症ラット(LDE 系統)の脳病変の組織学的解析 第 157 回日本獣医学会学術集会 北海道大学高等教育推進機構(北海道札幌市)(2014年9月10日)

金子七波 他、ウォルフ管由来臓器の低形成または欠損を伴う精巣異常系統(TW)ラットにおける生殖器系の組織学的解析 第 157 回日本獣医学会学術集会 北海道大学高等教育推進機構(北海道札幌市)(2014年9月10日)

Sasaki K *et al.*, Dielectric Property Measurements of Biological Tissues: Recent Activities for Development of a Novel Database. URSI GASS 2014. Beijing, China (2014年8月19日)

Yasuda *et al.*, The loss of Astrin suppresses ureteric bud branching in kidney development by apoptosis and decreased proliferation of metanephric mesenchyme (MM). 47th Annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. Nagoya, Japan. (2014年5月29日)

〔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：