



Title	Large scale isolation of osteoclast-specific genes by an improved method involving the preparation of a subtracted cDNA library
Author(s)	小堀, 正人
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41140
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 小 堀 正 人

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 4 2 6 1 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 11 年 2 月 12 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学 位 論 文 名 Large scale isolation of osteoclast-specific genes by an improved method involving the preparation of a subtracted cDNA library
(サブトラクティッド cDNA ライブラリーを用いた破骨細胞特異的遺伝子の包括的単離と機能解析)

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 野 島 博
(副査)
教 授 島 田 和 典 教 授 岡 部 勝

論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】

破骨細胞は、造血幹細胞から分化生成する細胞で骨基質やミネラルを溶解して骨を吸収し、骨リモデリングのトリガーとなる細胞である。しかし、生化学的解析に十分量の純粋な破骨細胞を得る方法が存在せず、また、株化細胞の樹立も困難であるため、破骨細胞特有の機能の分子機構についての研究は進んでいない。われわれは破骨細胞の骨吸収作用のメカニズムを明らかにすると共に、骨リモデリングの分子制御機構の解明を目的として、破骨細胞特異的に発現している遺伝子の解析を行った。本研究では特異的に発現している遺伝子の単離と機能検索を効率的に行うため、新たに改良した方法により破骨細胞 subtracted cDNA library を作製し、その遺伝子解析を実施した。

【方法ならびに成績】

はじめに、pcD2 (Okayama et al. 1987) ベクターを改変して、多彩な機能を持ち、哺乳動物細胞などで発現可能なプラスミドベクター (pAP3neo) を作製した。次に、cDNA library の作製とそれに続く subtraction の方法を改良・最適化し、高品質な subtracted library を効率良く作製する方法を開発した。すなわち、手塚らの方法 (1992) により純化したウサギ破骨細胞から調製した mRNA を用い、インサート cDNA が sense に挿入されるように方向付けし、更に、cDNA とベクターはそれぞれ片側のみリン酸基を持たせることで、複数の cDNA が挿入されないように工夫して破骨細胞 cDNA library を作製した。次に、helper phage により library を一本鎖化後、ビオチン化した脾臓 mRNA を用いて subtraction を繰り返し、二本鎖化の後、破骨細胞 subtracted library を作製した。この過程で、subtraction 条件と二本鎖化に用いる DNA polymerase を選択することにより、高品質な subtracted library を効率良く作製することを可能にした。この破骨細胞 subtracted library 中の osteopontin クローンの塩基配列を解析すると、その 80% が開始コドンを含んでいた。更に、subtracted library 中の任意のクローンをプロットし、破骨細胞と脾臓の mRNA から各々作製した probe を用いて hybridization し、そのシグナル強度から各クローンの両細胞における発現レベルを検定した結果、subtracted library 中の約 80% のクローンが破骨細胞でより特異的に発現していることが明らかとなった。これらの結果は、われわれの protocol により、効率良く特異的遺伝子が濃縮され、高品質な破骨細胞 subtracted

library が作製されたことを示している。

1,136クローンの5'部分塩基配列を決め、データベース検索した結果、424種類のクローンが既知遺伝子と相同性を示さず、新規な遺伝子と考えられた。各臓器 mRNA から作製した probe を用いたドットプロット解析の結果、新規なクローン中の70%が他臓器と比較して破骨細胞で高い発現を示していた。更に、ノザンプロット解析により14クローンが破骨細胞特異的な組織分布を示すことが確認された。新規クローンの中には、SH2, SH3 や signal sequence などのモチーフをコードする遺伝子を含み、破骨細胞特有の機能を担っている可能性が考えられる。一方、既知遺伝子の中には、酸分泌機構に関わる分子、プロテアーゼやインヒビターなどをコードする遺伝子が多く含まれ、破骨細胞の機能に関わると考えられる特徴的な遺伝子発現を反映していた。また、MMP-12 や PTPase (70zpep) などが破骨細胞で強く発現していることが新たに確認され、破骨細胞の骨吸収やシグナル伝達における役割に興味を持たれる。

次に、解析した遺伝子の中で二つのクローンを取り上げ、破骨細胞機能における役割を解析した。これらのクローンは、cysteine proteinase inhibitor である cystatin B と cyatatin C をコードしており、ノザンプロット解析の結果、破骨細胞に強く発現していた。破骨細胞の骨吸収に対する作用を解析した結果、cystatin B と cyatatin C は濃度依存的にその骨吸収を抑制した。これらのことは、破骨細胞による骨吸収の制御に破骨細胞自身が発現する cysteine proteinase inhibitor が関与していることを示唆すると共に、今回解析された他のクローンの中にも骨代謝を調節する重要な遺伝子が多く含まれている可能性を示している。

【総括】

われわれは、高品質な subtracted library を作製する方法を改良・開発し、その方法を用いて破骨細胞特異的な遺伝子を効率良く濃縮し、その遺伝子を解析した。この subtraction protocol とその解析方法は、発現変動する遺伝子群を単離、解析するための有効な手段となりうる。

論文審査の結果の要旨

本論文では、破骨細胞による骨吸収作用や骨リモデリングの分子制御機構の解明を目的として、特異的に発現している遺伝子を効率良く単離・機能解析するための新たな subtraction protocol の開発に成功している。さらに、この方法により破骨細胞特異的な遺伝子を効率良く濃縮した subtracted library を作製し、その遺伝子解析を実施することで破骨細胞の骨吸収調節メカニズムの新たな可能性を提示すると共にその有用性を示しており、評価に値する論文である。

また、この subtracted library を用いることで、今後も破骨細胞機能に対する独自の研究進展が期待できる。さらに、この subtraction protocol とその解析方法は、発現変動する遺伝子群の単離に有効な手段となるばかりでなく、発現クローニングとの組み合わせなど、幅広い応用が期待でき、価値あるものである。よって、本論文を学位に値するものと認める。