



Title	骨細胞における骨基質蛋白質Dmp1の翻訳後修飾について
Author(s)	大家, 香織
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52359
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (大家香織)	
論文題名	骨細胞における骨基質蛋白質Dmp1の翻訳後修飾について
【諸言】 骨細胞は、骨基質に埋まった状態で骨の至る所に存在し、互いに細胞突起を伸ばして細胞間ネットワークを形成している。最近、骨細胞が特異的または高率に発現する分子が明らかになり、これまで十分に理解されていなかった骨細胞の生理機能が次第に明らかになってきた。これらの分子の中で、骨基質蛋白質の dentin matrix protein 1 (Dmp1) は、骨の石灰化やリン代謝に関与して骨の形成・維持に重要であることが知られている。Dmp1は、その分泌過程で、N末端断片 (37kDa) とC末端断片 (57kDa) に切断され、ゴルジ体キナーゼ (Fam20C) によりリン酸化される等の翻訳後修飾を受けており、切断されたC末端断片のリン酸化はDmp1の機能に重要であると考えられている。 骨細胞は骨芽細胞に由来し、骨表層付近から骨の深部に向かう成熟段階の順に、骨芽細胞様骨細胞 (osteoblastic-osteocyte)、類骨骨細胞 (osteoid-osteocyte)、幼若骨細胞 (young-osteocyte)、成熟骨細胞 (old-osteocyte) と形態学的に分類されている。この成熟に伴って骨細胞の細胞内小器官は減少するため、Dmp1の産生レベルは全ての成熟段階の骨細胞によって様ではないと考えられる。同様に、Dmp1が翻訳後修飾を受ける時期や部位は骨細胞の成熟に伴って変化して骨の石灰化に関与していると思われるが、その詳細は明らかではない。 本研究では、Dmp1の翻訳後修飾と骨の石灰化との関係を解明することを目的として、骨細胞の成熟に伴うDmp1の発現・分布を<i>in situ</i> hybridizationと免疫組織化学的手法を用いて観察し、次にDmp1の切断やリン酸化の過程、さらにその分泌経路を、免疫組織化学的および超微構造学的手法を用いて検討した。 【材料と方法】 2週齢から12週齢の雄性Wistarラットの脛骨を本実験に供した。<i>in situ</i> hybridization および免疫組織化学的染色には、4% パラホルムアルデヒド固定した脛骨を10% EDTAにて低温脱灰した後、パラフィン包埋した試料を用いた。包埋後免疫電顕には、0.1% グルタルアルデヒド含有4% パラホルムアルデヒドにて固定した脛骨を低温脱灰後、水溶性樹脂 (LR Gold®) に包埋した試料を用い、包埋前免疫電顕には、同様の固定と脱灰の後、脛骨をOCT compoundに凍結包埋した試料を用いた。 1. <i>in situ</i> hybridization ラットのDmp1 RNAプローブは、全長Dmp1 cDNAを鋳型にしてdigoxigenin (DIG)-UTPで標識して合成した。合成RNAプローブは約150 bpにアルカリ加水分解後、切片に滴下してhybridizationを行ない、アルカリホスファターゼ染色にて検出した。上記の全行程をRNase free環境下にて行った。 2. 免疫組織化学的染色 ラットDmp1 C末端断片ペプチド (FRRSRVSEEDDRGEL) とN末端断片ペプチド (SGDDTFGDEDNGPGPEER-QWGG) およびヒトFam20Cに対するウサギポリクローナル抗体と、ヒトDmp1 C末端断片、ホスホセリン、ラットGM130 (ゴルジ体のマーカー) に対するマウスモノクローナル抗体を一次抗体として切片に滴下した。各一次抗体との免疫反応部位は、sABC (streptavidin-biotin complex) 法を用いてDAB発色にて検出した。蛍光二重染色には、二種の動物種の一次抗体を同一切片に滴下・反応後、各々の一次抗体を認識する二種の蛍光標識二次抗体と反応させ、蛍光顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡を用いて二種の蛍光発色部位を観察した。 3. 包埋後免疫電顕 水溶性樹脂包埋試料から超薄切片を作製して、免疫組織化学的染色による二重染色を行った。同一切片に抗ラットDmp1 C末端断片ペプチド抗体と抗ホスホセリン抗体を滴下・反応後、各々の一次抗体を認識する20 nmと10 nmの金粒子標識二次抗体と反応させ、透過型電子顕微鏡 (加速電圧: 80 kV) を用いて金粒子の局在部位を観察した。 4. 包埋前免疫電顕 凍結包埋資料から凍結切片を作製して、抗ラットDmp1 C末端断片ペプチド抗体を滴下・反応後、1.4 nmの金粒子標識二次抗体と反応させ、銀増感を行った後にエポキシ樹脂 (Quetol-812) に包埋した。約700 nm厚の切片を作製後、	

超高圧電子顕微鏡（加速電圧：3.0 MV）を用いて、銀増感された金粒子の局在部位を観察した。

【結果と考察】

1. *in situ* hybridizationの結果、ラット脛骨の皮質骨では、*Dmp1* mRNAは類骨に分布する骨芽細胞様骨細胞と類骨骨細胞で強発現していたが、石灰化骨に分布する幼若骨細胞では発現が低下し、成熟骨細胞では発現は殆ど認められなかった。また、免疫組織化学的染色の結果から、*Dmp1*は、骨芽細胞様骨細胞、類骨骨細胞、幼若骨細胞内のゴルジ領域に認められると共に、幼若骨細胞や成熟骨細胞の骨細管や骨小腔周囲にその分布を認めた。以上から、骨表層付近の未成熟な骨細胞は*Dmp1*を産生するが、骨深部に分布する成熟骨細胞は*Dmp1*を殆ど産生しておらず、幼若骨細胞が細胞外に分泌した*Dmp1*は、骨細管や骨小腔周囲に安定して分布し続けるものと考えられた。
2. 免疫組織化学的染色と蛍光二重染色の結果、*Dmp1*の分泌過程で切断を受けるN末端断片は骨小腔周囲に分布し、C末端断片は主に骨細管に分布する傾向があり、両者の分布に相違がみられたが、骨細胞内のゴルジ領域や一部の骨小腔周囲では共局在していた。このように、両者の分布が異なるのは分泌後の細胞外であるため、切断が起こるのは骨細胞内か分泌直後の骨小腔周囲と考えられた。
3. 蛍光二重染色と免疫電顕二重染色の結果、C末端断片はホスホセリンと共局在して、骨細管周囲や骨小腔周囲の骨基質に分布することから、C末端断片はリン酸化されて骨基質に分布することが示唆された。また、幼若骨細胞のゴルジ領域に局在するC末端断片はホスホセリンと共局在することから、C末端断片はゴルジ装置でリン酸化されていることが示唆された。さらに、未成熟な骨細胞のゴルジ装置内でC末端断片とFam20Cとの共局在が認められた。以上から、未成熟な骨細胞が産生したC末端断片はゴルジ装置内でFam20Cによりリン酸化され、リン酸化したC末端断片が細胞外に分泌され、骨基質に分布することが示唆された。
4. 超高圧電子顕微鏡を用いた免疫電顕の結果、骨細胞内におけるC末端断片はゴルジ装置と輸送小胞に局在し、*Dmp1*は骨細胞内を輸送小胞により運ばれることが示唆された。

【結論】

1. 骨の至る所に骨細胞が分布するが、*Dmp1*を産生するのは骨表層付近に分布する未成熟な骨細胞であり、骨深部に広範囲に分布する成熟骨細胞は*Dmp1*を殆ど産生しないことが分かった。
2. 未成熟な骨細胞で産生された*Dmp1*のN末端断片とC末端断片への切断は、骨細胞内か分泌直後に起こり、N末端断片は骨小腔周囲の骨基質に、C末端断片は骨細管周囲の骨基質に分布する傾向を認めた。骨細管は、従来、力学的負荷の感知に関与すると考えられてきたが、石灰化促進作用を有するC末端断片が骨細管に分布することから、骨細管構造は骨の石灰化にも関与することが示唆された。
3. *Dmp1*の機能ドメインであるC末端断片は、骨細胞のゴルジ装置でFam20Cによりリン酸化され、輸送小胞を経て細胞外に分泌され、リン酸化された状態で骨細管周囲の骨基質に分布して、骨の石灰化に関与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (大 家 香 織)			
	(職)		氏 名
論文審査担当者	主 査	教授	豊澤 悟
	副 査	教授	山城 隆
	副 査	准教授	波多 賢二
	副 査	講師	山田 聡

論文審査の結果の要旨

本研究は、骨細胞が特異的に産生する骨基質蛋白質 **dentin matrix protein 1 (Dmp1)** の翻訳後修飾過程を形態学的に解析し、骨細胞の機能について検討したものである。

Dmp1 は高い Ca^{2+} 結合能を有するため、骨の石灰化に重要と考えられている。皮質骨における解析の結果、**Dmp1** は骨の表層から深部に向かう骨細胞の成熟に伴ってその遺伝子発現は低下することが分かった。また、翻訳後修飾過程で切断された **Dmp1** の C末端断片はゴルジ装置内でリン酸化され、輸送小胞を経て細胞外に分泌され、主に骨細管周囲の骨基質に分布して、骨の石灰化に関与することが示唆された。

以上の結果は、骨細胞による骨の形成・維持のメカニズムを理解する上で重要な知見を与えるもので、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める。