

筋. 骨格系細胞に対する伸張刺激で発現する 遺伝子のクローニングとその解析

(課題番号 11671418)

平成11年度～12年度 科学研究費補助金
〔基盤研究 (C)〕 研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 和田 佑 一
(千葉大学医学部整形外科助手)

千葉大学附属図書館



20002815563

はしがき

研究組織

研究代表者：和田佑一（千葉大学医学部整形外科助手）

研究分担者：佐粧孝久（千葉大学医学部整形外科助手）

研究経費

平成 11 年度 1,400 千円

平成 12 年度 800 千円

計 2,200 千円

研究発表

(1)口頭発表（佐粧孝久、Cloning and Analysis of the Gene Induced by Cyclic Mwchanical Stimuli、Societe Internationale de Recherche Orthopedique et de Traumatologie 8th world triennial congress、平成 11 年 4 月 18 日）

(2)口頭発表（佐野 栄、第 15 回日本整形外科学会基礎学術集会、平成 12 年 9 月 28 日）

千葉大学附属図書館



20002815563

研究成果

生体内の器官を形成する様々な細胞は、圧、伸長などのさまざまな機械的なストレスを受けている。こうしたストレスは生理的な範囲にあっては生体の恒常性の維持に必要であると考えられるが、生理的範囲を超えた場合には疾病の原因となりうる。また最近では発生過程においても機械的刺激が器官形成に必要なまたはそれ自体が信号となりうると考えられている。しかし、細菌においては機械的刺激受容体としてイオンチャンネルがクローニングされているものの、真核細胞においては機械的刺激受容体は存在すると考えられているものの本体は明らかにされてはいない。また、機械的刺激に対する細胞応答に関しては今まであまり注目されていなかったこともあり、サイトカインなどの細胞内シグナル伝達の研究等に比較すると未知の部分が多く残されている。そこで我々は伸長刺激で特異的に発現するような遺伝子をクローニングし、この遺伝子の詳細な解析をすすめることで、機械的刺激に対する細胞応答を明らかにしていくことを計画した。

実験に用いたのは骨芽細胞系細胞株 MC3T3E.1 である。培養に際しては、特殊な培養装置を用い、一群には伸張刺激を付与し、他群には刺激を与えずに培養した。培養は48時間行い、伸長刺激は15%で、6秒に一度の割合で刺激を加えた。この2群の各々の細胞から得た RNA に対し DIFFERENTIAL DISPLAY 法を用い、伸張刺激特異的に発現してくるような遺伝子の断片をクローニングした。

DIFFERENTIAL DISPLAY 法では擬陽性 (false positive) であることも多く、RNA ブロットにて明らかに 2 群で差の見られた遺伝子は 1 遺伝子のみであった。DIFFERENTIAL DISPLAY 法で得られた遺伝子断片は 200 ベースペアの大きさであったが、RNA ブロットにてこの遺伝子の大きさは 7.0 キロベースペアであることがわかった。また、マウスでは心、骨格筋、肺、脳などの組織でこの遺伝子の発現がみられることがわかった。その後この遺伝子片をプローブとし、骨格筋の cDNA ライブラリーをスクリーニングし、得られた遺伝子の塩基配列を下流から 2.5 キロベースペアの長さまで決定した。データベースとの間でホモロジー検索をしたところ、この遺伝子は 7 回細胞膜を貫通する膜型のレセプター遺伝子ファミリーに属する新規遺伝子であることがわかった。光受容体であるロドプシンもこのファミリーに属していること、ロドプシンには物質としてのリガンドが存在しないこと、は機械的刺激受容体とロドプシンの共通性である。このファミリーの遺伝子のなかに機械的刺激受容体が存在する可能性があると考えられた。

我々はこの遺伝子を KEAKI (Kinetics evoked and kinetics induced gene) と名付けた。培養系で KEYAKI 遺伝子は機械的刺激 (伸長刺激) の有無によって発現に差が見られたわけだが、ついで生体内でこの遺伝子の発現量が伸張刺激に応じて変化するかどうかを調べた。機械的刺激の大きさと発現量に関係があるとする、本来の目的とは離れてしまうが、遺伝子の発現量を調べることで局

所において細胞にどの程度の機械的刺激が加わっているかを知るための分子的マーカーとして利用できる可能性があると思われたからである。そこで我々はウサギのアキレス腱を切断し、1) 切断直後で細胞に伸張刺激が加わらない状態、2) 切断後4週にてアキレス腱が修復した場合を伸張刺激が再び加わるようになった状態、3) 切断前で生理的な刺激が加わっている場合の3つの条件で筋組織、腱組織から RNA 抽出し、RT-PCR にて KEYAKI の半定量を行った。その結果、筋組織では発現量に変化が見られなかったが、腱においては切断により発現が増加し、その後低下するという *vitro* の結果とは逆の結果となった。筋組織で発現量に変化がなかったのは、モデルとしてアキレス腱を切断したわけだが、神経切断ではないので筋組織では筋を収縮させることが可能であったことが考えられた。また腱において予想と逆の結果がでたことに関しては、培養では KEYAKI 遺伝子をクローニングするために15%の伸長刺激を選択したわけだが、生体内で細胞自体に15%もの伸長が加わることは実際にはなく、刺激の大きさが生理的範囲を超えていたこと、あるいは *in vivo* と *in vitro* の違いによる未知の要素の差によって生じているものとも考えられた。

現在はさらに上流にむけ遺伝子配列を決定する研究をすすめている。さらにはプロモータ解析を今後すすめる予定であり、これにより機械的刺激に応答するために必要な染色体上のエレメントを明らかにする計画である。