

学位論文題名

キンギョ *Carassius auratus* 再生鱗の
初期石灰化機構に関する研究

学位論文内容の要旨

硬骨魚類の鱗は、I型コラーゲンを主成分とした有機基質にリン酸カルシウムのハイドロキシアパタイト結晶が沈着することで石灰化する硬組織で、構造が哺乳類の骨組織と極めて類似し強く石灰化する骨質層と、高次に配向したコラーゲン線維からなり部分的にしか石灰化しない線維層板の2層から構成される。また、鱗は骨組織に比べて極めて強い再生能を持つ。

鱗と相同な器官である哺乳類の骨組織にも骨折の治癒能力はある。しかし、複雑骨折の治療には骨折治癒をサポートする生体組織修復材料、すなわち人工骨が必要となる。現在の主要な治療法のひとつは患者自身の健康な骨を一部切り出し、患部に移植する方法であるが、健康な骨の移植には痛みや疾病などの大きな障害の可能性を伴うなどの問題があり、高機能な人工骨の開発は極めて重要な課題となっている。人工骨は患者に移植された場合に免疫反応を引き起こさないことはもちろんのこと、移植先にて効率的に患者自身の骨芽細胞を誘引し、分化させ、それを機能させて骨組織を誘導する能力を持つ必要がある。一般に生体内の細胞はホルモンや各種増殖因子などの液性因子によりその機能を調節されているだけでなく、自身を取り巻く細胞外基質から情報を受け取り、その機能を調節している。骨芽細胞の場合には骨に存在するコラーゲンをはじめとする各種有機基質分子やハイドロキシアパタイト結晶から情報を受け取り、その機能を調節していると考えられる。そこでコラーゲンをを用いて、骨と同等のアパタイト結晶構造を持つ人工骨を合成する研究が進められている。魚類コラーゲンは人獣共通感染症のリスクが低く、コラーゲンを豊富に含む鱗は人工骨などの合成に使用するコラーゲンの供給源として極めて有望な組織である。しかし、将来鱗コラーゲンを人工骨として利用するためには、骨や鱗などコラーゲン性基質の初期石灰化の分子機構に関する情報と鱗コラーゲンの性状解析が必要不可欠である。しかしながら、骨の石灰化の分子機構については、哺乳類を中心に研究が進められているものの、その全容の解明には至っていない。上述のように鱗は骨と似た構造を持つ再生能の高い組織であり、再生鱗においてはコラーゲンの高次構造が迅速に再構築され、石灰化も急速に進行する。そのため、鱗の再生機構を分子レベルで解明することで、「生体反応を模して」合成する鱗コラーゲンを主体とする人工骨の開発に必要な基礎生体情報を提供することが可能となる。そこで、本研究では鱗コラーゲンをを用いた人工骨合成に資することを目的に、鱗の再生初期の石灰化について分子レベルで詳細に検討するとともに、魚類コラーゲンの生化学的特性、特に臓器ごとの特性の差異について解析をおこなった。

第一章では鱗が再生するという特徴を利用した石灰化の人為的制御法の確立と結晶形成機構の組織学的解析を試みた。これまでにカルシウム (Ca) とリン (Pi) の不足した環境条件下では石灰化度の極端に低い再生鱗 (未石灰化再生鱗) が形成され、これを培養することで石灰化を誘起できることが報告されている。本章では未石灰化再生鱗および培養により石灰化させた再生鱗の Ca、Pi 含有量を定量し、電顕レベルで結晶成長の様子を観察することで、本実験系が鱗の骨質層基質の

初期石灰化機構を調べるモデルとして有用であることを示すとともに、鱗の骨質層の石灰化がコラーゲン線維間に存在する高電子密度物質中でおこることを明らかにした。

第二章では、結晶成長に関与すると考えられる有機基質の同定を目指して鱗の基質タンパク質を SDS-PAGE により比較することで、正常鱗および再生鱗の骨質層に特異的なタンパク質を見出した。このことから、鱗を構成するタンパク質の組成が再生過程においてダイナミックに変動することを明らかにした。

第三章では、第一章で開発した未石灰化再生鱗実験系を利用し、石灰化前後の鱗から抽出されるタンパク質を比較することで、初期石灰化に関与するタンパク質を Apolipoprotein A-I (ApoA-I) と同定し、このタンパク質が血液中と同様に鱗においても高密度脂質タンパク質 (HDL) として存在することを示した。また、鱗由来 HDL の表面は血液由来のそれと比べて酸性に荷電していることを明らかにした。

第四章では、HDL の合成部位を調べるため ApoA-I をコードする mRNA の cDNA クローニングをおこない、RT-PCR により ApoA-I mRNA 発現部位が再生鱗ではなく、肝臓であることを明らかにした。一方、鱗から精製された HDL で抗体を作製し、免疫組織化学的手法で局在を解析したところ、鱗の骨質層に陽性反応が認められた。このことから、HDL は主に肝臓で合成され、血液中を運ばれて鱗の骨質層に導入されることが明らかになった。さらに、電子顕微鏡レベルでの免疫組織化学により、第一章で初期石灰化を誘導する場所として観察された骨質層の高電子密度物質中に HDL が局在することを明らかにし、骨質層に取り込まれた HDL が初期石灰化に関与する可能性を示した。

第五章では、鱗の基質として取り込まれた HDL の機能を解析した。鱗の HDL は Ca および Pi を生理的濃度で含む環境下で凝集、不溶化することを示した。その凝集は、他の EDTA 可溶性基質タンパク質を巻き込んで起こる可能性も示唆された。さらに、鱗の HDL はヒドロキシアパタイト結晶と結合する能力を持っていること、リン酸カルシウム過飽和溶液中では結晶の生成を阻害することを示した。

第六章では、魚類コラーゲンは採取する臓器によって回収効率とサブユニット組成が異なることを示した。また、プロリンおよびリシン残基の水酸化および糖鎖による翻訳後修飾にも違いが認められた。さらに、コラーゲンの熱安定性も採取する臓器により異なり、これがサブユニット組成や糖鎖による修飾により制御されている可能性を示唆した。

これらの結果を総合し、これまでに各種バイオミネラルで報告されている有機基質の性質とそこから推測される結晶誘起に関わる機能を参考に、鱗の初期石灰化における HDL の機能を以下のように推測した。すなわち、HDL は血液中から鱗の基質に取り込まれる過程でその表面が酸性に荷電する。酸性に荷電した鱗 HDL は不溶化する前には Ca イオンや微細なリン酸カルシウム結晶と相互作用して結晶成長を阻害する。鱗 HDL はやがて Ca および Pi イオン存在下で鱗の EDTA 可溶性タンパク質を取り込みつつ不溶化し、石灰化を誘導するための場を形成する。また、魚類では同じ種でも臓器ごとにコラーゲンの性質が異なるため、様々な魚種の各種臓器のコラーゲンの特性を解明することで、人工骨をはじめとする体組織修復材料の合成など、その利用目的に応じたコラーゲンを選択できる可能性がある。

今後、これらの知見をもとに、非食用部分として処分されてきた魚類コラーゲンと鱗の初期石灰化制御機構から得られた知見を応用することで、生体を模した人工骨など高機能な生体組織修復材料が合成されるようになれば、魚類コラーゲンの価値が格段に向上するものと期待される。これにより養殖魚の付加価値を上昇させることができれば、低環境負荷であるもののコストが高い閉鎖循環養殖技術の産業化が実現できると考える。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 都 木 靖 彰
副 査 教 授 足 立 伸 次
副 査 教 授 尾 島 孝 男
副 査 助 教 浦 和 寛

学 位 論 文 題 名

キンギョ *Carassius auratus* 再生鱗の 初期石灰化機構に関する研究

硬骨魚類の鱗はI型コラーゲンを主成分とした有機基質にリン酸カルシウム結晶が沈着することで石灰化した骨様組織で、構造の異なる骨質層と線維層板の二層よりなる。鱗と相同な器官である哺乳類の骨組織の再生能力は比較的弱く、複雑骨折の治療には骨折治癒をサポートする人工骨が必要とされる。人獣共通感染症のリスクが極めて低い魚類コラーゲンは、人工骨などの合成に使用するコラーゲンの供給源として極めて有望である。非食用部分として処分されてきた鱗のコラーゲンで人工骨などが合成されるようになれば、魚類コラーゲンの価値は格段に向上し、養殖産物の高付加価値化も期待できる。

本論文は、鱗コラーゲンを人工骨として利用するために必要不可欠な、鱗のコラーゲン性基質の初期石灰化の分子機構を明らかにするとともに、魚類コラーゲンの基礎性状について解析したものである。

本論文の第一章では、Ca と Pi の不足した条件下でキンギョの鱗を再生させることでほとんど石灰化していない鱗（未石灰化再生鱗）を採取し、生理的塩類溶液中で石灰化を誘導させる実験系を完成させた。次に、未石灰化再生鱗および培養により石灰化させた再生鱗（培養石灰化鱗）の Ca および Pi 含有量を定量するとともに電顕レベルで結晶成長の様子を観察することで、鱗の骨質層の石灰化がコラーゲン線維間に存在する高電子密度物質中でおこることを明らかにした。

第二章では、結晶成長に関与すると考えられる有機基質の同定を目指して鱗の基質タンパク質を抽出し SDS-PAGE により比較することで、正常鱗および再生鱗の骨質層に特異的なタンパク質を見出した。このことから、鱗を構成するタンパク質の組成が再生過程においてダイナミックに変動することを明らかにした。

第三章では、第一章で開発した実験系を用い、未石灰化再生鱗と培養石灰化鱗から抽出されるタンパク質を比較することで、初期石灰化に関与するタンパク質をスクリーニングした。次にその主要なタンパク質を部分精製し、N 末端アミノ酸配列解析と質量分析により ApolipoproteinA-I (ApoA-I) と同定した。さらに、ApoA-I が血液中と同様に鱗においても高密度脂質タンパク質 (HDL) として存在すること、ただし、鱗 HDL の表面は血液由来のそれと比べて酸性に荷電していることを明らかにした。

第四章では、ApoA-I をコードする mRNA の cDNA クローニングをおこない、RT-PCR を用いて HDL の合成は鱗ではおこなわれておらず、肝臓でおこなわれていることを明らかにした。一方、鱗から精製された HDL で抗体を作製し、免疫組織学的手法を用いて鱗の骨質層に HDL が局在することを示し、HDL は主に肝臓で合成され、血液中を運ばれて鱗の骨質層に導入されることを明らかにした。さらに、電子顕微鏡レベルでの免疫組織化学により、第一章で初期石灰化を誘導する場所として観察された骨質層の高電子密度物質中に HDL が存在することを示し、骨質層に取り込まれた HDL がその初期石灰化に関与する分子であることを強く示唆した。

第五章では、鱗の基質として取り込まれた HDL の機能を *in vitro* で解析し、鱗の HDL が Ca および Pi を生理的濃度で含む環境下で他の基質タンパク質とともに凝集、不溶化することを示した。さらに、鱗の HDL はハイドロキシアパタイト結晶と結合する能力を持っていること、リン酸カルシウム過飽和溶液中では結晶の生成を阻害することを明らかにした。

第一章～第五章の結果と、これまでに報告されているバイオミネラリゼーションに関わる各種分子の機能に関する仮説から、鱗の初期石灰化機構を以下のように仮説立てた。すなわち、肝臓で合成された HDL は、血液を通して鱗の基質に取り込まれる。その際、HDL は表面が酸性に荷電する。鱗基質中の HDL は、可溶化した状態ではカルシウムイオンや微細なリン酸カルシウム結晶と相互作用して結晶成長を阻害する。その後、徐々にカルシウムおよびリン酸イオン存在下で他のタンパク質とともに HDL が凝集・不溶化し、石灰化を誘導するための場が形成され、この中で初期石灰化が進行する。

さらに、本研究第六章では、魚類コラーゲンは採取する臓器によって回収効率とサブユニット組成が異なることを示した。また、プロリンおよびリシン残基の水酸化および糖鎖による翻訳後修飾にも違いがあることを示した。さらに、熱安定性も採取する臓器により異なり、これがサブユニット組成や糖鎖による修飾により制御されている可能性を示した。この結果から、高機能な生体組織修復材料の合成には目的とする臓器に応じたコラーゲンの選択が必要であることを示唆した。

以上の成果は脊椎動物の硬組織の初期石灰化の新しいメカニズムを提唱するものであり、基礎生命科

学に大きく貢献するものであるとともに、水産廃棄物である鱗を医療用材料として利用するための応用研究に大いに寄与するものであると評価できる。よって審査員一同は申請者が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。