

## 物理的刺激に対するメダカのウロコの骨芽及び破骨細胞の応答

矢野幸子<sup>1</sup>, 北村敬一郎<sup>2</sup>, 服部淳彦<sup>3</sup>, 鈴木信雄<sup>1</sup>

<sup>1</sup>〒927-0553 鳳珠郡能登町小木, 金沢大学 環日本海域環境研究センター 臨海実験施設; <sup>2</sup>〒920-1192 金沢市角間町 金沢大学医薬保健研究域薬学系; <sup>3</sup>〒272-0827 千葉県市川市国府台, 東京医科歯科大学 教養部 生物学教室

Sachiko YANO<sup>1</sup>, Kei-ichiro KITAMURA<sup>2</sup>, Atsuhiko HATTORI<sup>3</sup>, Nobuo SUZUKI<sup>1</sup>: Response of osteoblasts and osteoclasts to physical stimuli in Medaka

### 【はじめに】

硬骨魚のウロコは骨芽細胞と破骨細胞を含む石灰化した組織である。したがって、ウロコは骨のモデルとして使用可能であり、これまでの研究では実際にキンギョのウロコは過重力にも感度よく応答した<sup>1, 2)</sup>。一方、メダカのウロコに関する研究は、これまで少なく、ウロコの重力応答に関する研究は報告されていない。メダカは宇宙実験も実施されており<sup>3)</sup>、宇宙実験を計画する上で非常によい実験材料である。そこで本研究では、メダカのウロコを用いて過重力の応答を解析した。

### 【実験方法】

#### 実験1：メダカのウロコのアッセイ系の開発

メダカのウロコは小さいので、メダカ個体の片面から採取した全てのウロコを 1.5 ml チューブに入れ、蒸留水を添加して超音波破砕した。その上清中の破骨細胞活性（酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ活性：TRAP 活性）及び骨芽細胞活性（アルカリフォスファターゼ活性：ALP 活性）をタンパク質当たりの比活性で算出することで、メダカのウロコのアッセイシステムを開発した。

#### 実験2：遠心機および加速度負荷装置による過重力への応答解析

実験1で開発した系を用いて、遠心機による静的及び加速度負荷装置（バイブレーション負荷装置）による動的な過重力への応答を解析した。2-、3-、4-G を遠心機またはバイブレーション装置によって10分間負荷後、6または24時間培養し、その後破骨及び骨芽細胞活性を測定した。

#### 実験3：遺伝子発現解析

静的な遠心機の過重力と動的なバイブレーションによる加速度重力の応答の違いを調べるため、最も差が顕著な条件下において、骨芽細胞で発現し、破骨細胞を活性化する Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL) の遺伝子発現を解析した。プライマーは、RANKL の配列<sup>4)</sup>に基づき (sense: AGGCAAACGGCAAAGAAAT; anti-sense: CCCAGCTTTATGGCTCCAA) 作成した。

一方、Osteoprotegerin (OPG) 様の配列をメダカの Genome to Protein Structure and Function database から見つけ出し、その配列を用いてプライマー (sense: GGATCCGTCCACTGGTAAAA; antisense: GAGCACTCGATTTCCACCTC) を作成した。

過重力処理後、メダカのウロコからキアゲンのキット (total RNA isolation kit for fibrous tissue) を用いて total RNA を抽出し、タカラバイオのキット (PrimeScript™ RT reagent kit) を用いて cDNA を合成して、これらのプライマーを使用してリアルタイム PCR を行った。RANKL 及び OPG 様の遺伝子発現は、 $\beta$ -actin の発現により補正した<sup>5)</sup>。

## 【実験結果及び考察】

### 実験 1：メダカのウロコのアッセイ系の開発

実験に使用したメダカの右側すべてのウロコと左側すべてのウロコを超音波破碎してタンパク質当たりの細胞活性を測定すると左右の間に有意差はなく、アッセイ系として有効であることが示された。

### 実験 2：遠心機および加速度負荷装置による過重力への応答解析

メダカのウロコは、キンギョのウロコと同様にして遠心機の過重力にもバイブレーションの加速度重力にも非常によく応答することが判明した。即ち、骨芽細胞の活性は、2~4-G において遠心とバイブレーションの両方で有意に上昇した。一方、破骨細胞の活性は 2-、3-G では遠心とバイブレーションの両方で有意に減少したが、バイブレーションによる 4-G 負荷では上昇した。これは、骨芽細胞の活性が 4-G において顕著に上昇したことに起因する可能性がある。

### 実験 3：遺伝子発現解析

遺伝子発現解析の結果、RANKL の発現はバイブレーションによる動的な加重力負荷 (4 G) では上昇したが、遠心機の静的な負荷 (4 G) では変化しなかった。なお、OPG-様の発現は、バイブレーション及び遠心機でも変化せず、RANKL/OPG 様の比は、バイブレーションにより有意に上昇していた。この結果は、実験 2 の結果と一致していた。したがって、本研究で開発したメダカの系は、動的な過重力と静的な加重力を区別して応答していることが判明した。

メダカは全ゲノム配列が解読されている。したがってメダカを用いて様々な生理現象を分子レベルで解析することが可能である。本研究で開発されたウロコの系は、骨代謝の研究に貢献できる可能性が高い。

## 【引用文献】

- 1) Suzuki, N. et al., Adv. Space Res., 40:1711-1721 (2007)
- 2) Suzuki, N. et al., Biol. Sci. Space, 22: 3-7 (2008)
- 3) Ijiri, K. Biol. Sci. Space, 9: 3-16 (1995)
- 4) To, T.T., Development 139: 141-150 (2012)
- 5) Suzuki, N. et al., Bone, 48: 1186-1193 (2011)

本研究の内容は、矢野幸子氏の学位論文の一環として行われ、平成23年9月30日に横浜国立大学において実施された日本宇宙生物科学会第25回大会で発表した。