

学位論文題名

テネイン X によるコラーゲン線維形成の制御

学位論文内容の要旨

序論

当研究室で同定された細胞外マトリックス糖タンパク質であるテネイン X (TNX) は、ほとんどの組織において発現し、特に骨格筋や心臓、血管周囲の間質で高い発現が見られる分子量約 450 kDa の巨大な多機能型タンパク質である。TNX は血管内皮増殖因子である VEGF と結合し、VEGF の機能を増強することにより血管形成に重要な役割を担っている。また、我々の研究室で作製された TNX 欠損(-/-)マウスを用いた解析により TNX-/-マウスにおいて黒色細胞腫の転移、浸潤が促進すること、脂質トリグリセリドが増加すること、TNX 欠損線維芽細胞の細胞接着能が減少することが明らかとなっている。さらに TNX は結合組織の組織構築に異常をきたす遺伝病である Ehlers-Danlos 症候群の原因遺伝子の 1 つであると考えられており、TNX はコラーゲン細線維形成に関係するのではないかと考えられている。しかし、これらの TNX の機能の分子機構の詳細は明らかにされていない。そこで本研究では、TNX の生体内機能の分子機構を明らかにするために、TNX 遺伝子の発現調節機構の解析と TNX の欠損により発現量が増加する分子の単離を行った。

結果と考察

第 1 章 マウス TNX 遺伝子のプロモーター解析

TNX 遺伝子の発現調節領域を調べるためにマウス TNX 遺伝子上流とその欠失変異体をルシフェラーゼ遺伝子ベクターに連結させ、L 細胞に導入してルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、-150~-126 の領域に TNX の発現を調節する因子が結合することが明らかとなり、転写調節因子を TFSEARCH により解析したところ、Sp1 結合配列が存在することが明らかとなった。この領域をプローブとして、L 細胞の核抽出液を調製してゲルシフトアッセイ、スーパーシフトアッセイを行ったところ、TNX の発現を主に調節している因子は、この領域に結合する Sp1 であることが明らかとなった。TNX はほとんどの組織において mRNA の発現が見られることから、多くの組織で発現している Sp1 が、TNX 遺伝子の様々な組織における発現を調節していると考えられる。

第 2 章 TNX によるコラーゲン線維形成の制御

2-1. TNX の欠損により増減する分子の単離

TNX の生体内機能の分子機構を明らかにするために TNX-/-マウス、野性型(+/+)マウスより樹立した線維芽細胞及び心臓の RNA を用いて mRNA-differential display を行った。発現量の変化が確認された分子を Northern blot により再現性を確認したところ TNX の欠損により減少する分子が 2 種、増加する分子 1 種得られた。これらの分子の中で TNX の欠損により特に大きく発現量が増加していた type VI collagen は type I collagen と相互作用することが報告されている。TNX が Ehlers-Danlos syndrome の原因遺伝子の一つであり、コラーゲン細線維形成と関係していることから、type I collagen と相互作用することが報告されている type VI collagen と TNX がコラーゲン細線維形成に与える影響に興味を持たれた。そこで以後 type VI collagen について

解析を進めることとした。まず、タンパク質レベルの発現量を Western blot により解析したところ mRNA と同様に TNX の欠損により線維芽細胞において発現量が減少していることが明らかとなった。次に TNX による type VI collagen の発現調節機構を明らかにするために、actinomycin D chase 実験を行った。TNX^{-/-}, +/- 線維芽細胞を RNA 合成阻害剤である actinomycin D で処理した後、経時的に RNA を抽出して Northern blot 解析を行ったところ、type VI collagen mRNA の安定性は TNX の欠損により変化しないことが明らかとなった。そこでさらに TNX が type VI collagen の発現量を転写レベルで調節するか検討するために type VI collagen α 1 subunit のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子に連結したレポーターを作製し、ルシフェラーゼアッセイを行った。TNX 全長を発現するエフェクターと共にレポーターを Balb 3T3 細胞に導入したところ type VI collagen α 1 subunit 遺伝子のプロモーターが活性化されることが明らかとなった。このことから、TNX は type VI collagen mRNA の安定性を変化させるのではなく、細胞外又は細胞内の分子を介して転写レベルで発現を調節していることが確認された。

2-2. TNX によるコラーゲン線維形成の制御

次に TNX と type VI collagen, type I collagen の相互作用を検討するために solid phase binding assay を行った。type VI collagen と type I collagen は相互作用が報告されている。そこで TNX と type VI collagen を精製し、アッセイしたところ、TNX と type VI collagen は結合しないが、type I collagen は結合することが明らかとなった。このように TNX が type I collagen と結合すること、また Ehlers-Danlos 症候群の原因遺伝子の 1 つであることからコラーゲン細線維形成に関与するその他の分子についても TNX の欠損により発現量が変化しているのではないかと考え、Northern blot により解析した。その結果、コラーゲン細線維形成を制御することが知られている type XII collagen, type XIV collagen, lumican, fibromodulin 又は type I collagen の発現は TNX の欠損により減少し、反対に decorin の発現は増加することが明らかとなった。このように TNX の欠損によりコラーゲン細線維形成に関係する分子の発現量が変化していることから TNX がコラーゲン細線維形成過程に関与しているのではないかと推測された。そこで TNX, type VI collagen がコラーゲン細線維形成にどのような影響を与えるかを検討するために、*in vitro* collagen fibrillogenesis assay を行った。その結果、TNX はコラーゲン線維形成の初期会合速度と重合速度、重合度を上昇させ、一方 type VI collagen は初期会合速度と重合速度を上昇させることによって、コラーゲン細線維形成に関与するということが明らかとなった。このように、TNX の欠損によりコラーゲン細線維形成に関係する分子の発現量が変化していることと、TNX が直接コラーゲン細線維形成を制御することから TNX 欠損マウスのコラーゲン線維に異常があるのではないかと考え、マウスの皮膚のコラーゲン細線維を電子顕微鏡により観察し、その直径と密度を計算した。その結果、TNX^{-/-}マウスのコラーゲン細線維は実際に TNX^{+/+}マウスに比べて密度には変化がないが、直径は大きくなっていることが明らかとなった。

これらのことから TNX は線維芽細胞において type VI collagen の発現を転写レベルで正に制御しており、また、直接 type I collagen と結合することにより直接コラーゲン細線維形成を制御しているということが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主査	助教授	松本健一
副査	教授	有賀寛芳
副査	教授	五十嵐靖之
副査	助教授	井ノ口仁一

学位論文題名

テネイシン X によるコラーゲン線維形成の制御

細胞外マトリックス・テネイシン X (TNX)は、結合組織の組織構築に異常をきたす遺伝病である Ehlers-Danlos 症候群の原因遺伝子の 1 つであり、コラーゲン細線維形成に関係するのではないかと考えられている。しかしながら、それに関連する TNX の機能の分子機構の詳細はこれまで明らかにされていなかった。

本研究では、TNX の生体内機能を明らかにするために、TNX 遺伝子の発現調節機構の解析と、TNX 欠損により発現量が増加している分子の同定を行うことにより、TNX の機能に関与する分子機構を探った。

まず、TNX 遺伝子の発現調節機構を調べるためにルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイ、スーパーシフトアッセイを行った。その結果、TNX の発現を主に調節している転写因子は Sp1 であることを明かにした。このことは、ほとんどの組織において発現が見られる TNX mRNA は、多くの組織で発現している転写因子 Sp1 により、その発現が調節されていることを示唆する。

次に TNX の生体内機能の分子機構を明らかにするために TNX^{-/-}マウス、野生型(+/+)マウスより樹立した線維芽細胞及び心臓の RNA を用いて mRNA-differential display を行った。Northern blot により再現性を確認された分子の中の type VI collagen は、type I collagen と相互作用することが報告されており、TNX がコラーゲン細線維形成と関係すると考えられていることから興味を持たれた。次に、タンパク質レベルの発現量を Western blot により解析したところ mRNA と同様に減少していた。次に TNX による type VI collagen の発現調節機構を明らかにするために、actinomycin D chase 実験、type VI collagen

$\alpha 1$ subunit のプロモーター領域を用いたレポーターアッセイを行ったところ、TNX は type VI collagen の mRNA の安定性を変化させるのではなく、転写レベルで発現を調節していることが明らかとなった。

次に solid phase binding assay により、TNX と type I collagen は結合することが明らかとなり、TNX がコラーゲン細線維形成に関与する可能性が推測され、コラーゲン細線維形成を調節するその他の分子の発現量も TNX の欠損により変化しているのではないかと考え、Northern blot により解析した。その結果、コラーゲン細線維形成を制御する type XII collagen, type XIV collagen, lumican, fibromodulin 又は type I collagen の発現は TNX の欠損により減少し、反対に decorin の発現は増加していた。次に、TNX, type VI collagen がコラーゲン細線維形成に直接与える影響を検討するために、*in vitro* collagen fibrillogenesis assay を行った。その結果、TNX, type VI collagen はいずれもコラーゲン細線維形成に関与するということが明らかとなった。さらに、マウスの皮膚のコラーゲン細線維を電子顕微鏡により観察し、直径と密度を計算したところ、TNX^{-/-}マウスのコラーゲン細線維は TNX^{+/+}マウスに比べて実際に密度には変化がないが、直径は大きくなっていることが明らかとなった。

以上のことから TNX は type VI collagen の発現を転写レベルで制御しており、また、直接 type I collagen と結合することによりコラーゲン細線維形成を制御しているということが、本研究により明らかとなった。

TNX が原因遺伝子の一つである Ehlers-Danlos 症候群では、TNX^{-/-}マウスに見られたように TNX の欠損と、type VI collagen をはじめ他のコラーゲン細線維の形成を制御する分子の発現量に変化しているために、コラーゲン細線維形成に異常が生じて発症しているのではないかと考えられる。今後、TNX が生体内においてどのような機構でコラーゲン細線維形成を調節しているかを解明することにより、TNX が原因で発症する Ehlers-Danlos 症候群の治療に貢献できるものと期待される。

本学位論文に記載されている上記の内容は、細胞外マトリックス分野の進展のみならず、皮膚の結合組織の遺伝病である Ehlers-Danlos 症の克服に繋がる基礎研究であり、博士（薬学）の学位を授与するに値する内容であると判断される。