京都大学	博士（医学）	氏　名	木下　将樹
論文題目	The novel protein kinase *Vlk* is essential for stromal function of mesenchymal cells （新規リン酸化酵素 *Vlk* は間葉系細胞のストローマ機能に必須である）		

（論文内容の要旨）

哺乳類の初期発生は母体内で起こり、初期胚自体を構成する細胞数も少ないために個々の遺伝子に関して発現解析を行うのは困難であった。そこで、3.5 日胚の内部細胞塊より樹立され試験管内で様々な細胞に分化誘導できるマウス胚性幹細胞(ES 細胞)を用いることで初期発生における細胞分化をモデル化し、誘導した初期中内胚葉細胞における遺伝子発現解析を DNA マイクロアレイ法により行った。

リン酸化酵素は細胞内情報制御因子として発生、分化のみならず腫瘍化にも多様な役割を担っている。ところが、胚発生過程において機能解析が不十分のリン酸化酵素が数多く発現している。これらに変異が起こることにより悪性腫瘍をはじめ様々な病気の原因となりうる。しかし、発生過程においてその発現がどのように制御されているかに関してはあまり良く解析されていない。そこで、ES 細胞由来中内胚葉用細胞において発現するリン酸化酵素遺伝子の解析を網羅的に行い、発現が動的に制御される分子として *Vlk (Vertebrate Lonesome Kinase)*を同定した。Vlk は脊椎動物に特異的で既知のリン酸化酵素ファミリーに属さない特徴的な一次構造を有する。Vlk は細胞内でゴルジ体に局在を示す分子であり、かつ Vlk 自身もリン酸化を受け、そのリン酸化はゴルジ局在に依存することが判明した。そこで、Vlk の生物学的機能について解析を行うために遺伝子ノックアウトマウスを作製した。

Vlk ノックアウトマウスは新生児致死であり、口蓋裂、肺の低形成によるチアノーゼ、内軟骨性骨化遅延といった表現型を伴い、生後２４時間以内に死亡した。*Fgf18*や*Aggrecan* といった細胞外へ輸送される分子のノックアウトマウスが同様の表現型を持つことより細胞外への輸送に関与している可能性が示唆された。*VSVG (Vesicular Stomatitis Virus G-protein)*遺伝子に *GFP (Green Fluorescent Protein)*タグを付加した VSVG-GFP を用いることで Vlk 遺伝子の有無により膜輸送への影響を解析した。Vlk の存在下では VSVG-GFP はゴルジ体に留まり細胞膜への膜輸送が阻害されることが明らかとなった。*Vlk* は発生過程においてその発現が部位、発生段階に応じて制御されているため、時空間特異的にタンパク質の輸送を遅延することが考えられる。以上より *Vlk* はゴルジ体においてタンパク質の輸送あるいは修飾のための時間を動的に制御する因子である可能性が示唆された。

（論文審査の結果の要旨）

本研究では、ES細胞の試験管内分化系を用い、初期胚の中内胚葉細胞で発現する新規キナーゼ分子が同定された。配列解析の結果より、この分子は脊椎動物間にのみ存在すること、既存のタンパクとは相同性が低い分子であることから、Vlk(Vertebrate lonesome kinase)と命名された。作成したノックアウトマウスは口蓋裂および肺の低形成、軟骨細胞の成熟遅延などの多様な表現型を呈した。

次にVlkの細胞レベルの機能の検討を行った。Vlkはゴルジ装置に局在するため、細胞外に分泌されるタンパク質の輸送経路に関与する可能性が示唆された。その検証のため、40℃では小胞体に留まり、32℃ではゴルジ装置を介した細胞膜までの輸送が起こる水疱性口内炎ウイルスのエンベロープ糖タンパク(VSVG)の温度感受性変異体、tsO45を用いて解析を行ったところVlk存在下においてVSVG(tsO45)-GFPの輸送が32℃においてもゴルジ装置で阻害された。これよりVlkが小胞輸送に関与することが明らかとなった。以上の研究はキナーゼによる新規の細胞内小胞輸送制御の解明に貢献し、発生異常の分子的基盤の理解に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成21年6月1日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降