

氏名	なが い なお こ 永 井 尚 子
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2269 号
学位授与の日付	平 成 12 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	Hsp47 ノックアウトマウスとコラーゲン分子成熟異常

論文調査委員 (主査) 教授 永田和宏 教授 竹市雅俊 教授 井口八郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

Hsp47 は、小胞体に局在する熱ショックタンパク質であり、コラーゲン、コラーゲン様トリプルヘリックス構造を持つタンパク質と特異的に結合することが知られている。これまでの Hsp47 に関する機能解析の研究から、Hsp47 は新生プロコラーゲン鎖と一過的に結合するが、その結合はコラーゲンの成熟を阻害する薬剤で細胞を処理しコラーゲンの分泌が抑制される条件下において遅延することが示され、コラーゲンのフォールディングを助ける分子シャペロンとして機能している可能性があることが示唆されてきた。しかし Hsp47 が本当に分子シャペロンとして機能しているかどうかについての明確な証拠は存在せず、Hsp47 がコラーゲンの生合成に与える影響についても不明であった。

申請者は Hsp47 の機能を明らかにすることを目的として、Hsp47 ノックアウトマウス・細胞の作成を行い、それらを用いて Hsp47 の欠損がコラーゲンの性状にどのような影響を与えているのかについて解析を行った。Hsp47 ノックアウトマウスは胎生 11.5 日以降その生存が確認できず、Hsp47 がマウスの発生過程に置いて必須の役割を果たしていることが明らかとなった。Hsp47 ノックアウトマウス胚では I 型コラーゲンのプロペプチドが切断された成熟型コラーゲンが殆ど存在せず、プロコラーゲンが野生型胚やヘテロマウス胚よりも蓄積していることが明らかとなった。IV 型コラーゲンに関しても 7S ドメインが切断された form がノックアウトマウス胚で観察できなかった。また、鍍銀染色や電子顕微鏡観察によりノックアウトマウス胚での繊維形成について解析を行ったところ、細網繊維構造、コラーゲン繊維構造が殆ど検出されず、基底膜は存在するものの断続的であった。また、ノックアウトマウス胚の 10.5 日胚については間葉系の細胞、心臓の心筋細胞にアポトーシスが起きているのが観察された。これらの結果は、Hsp47 の欠損が正常な機能を持つコラーゲンの形成を阻害し、コラーゲン繊維形成を障害していることを意味している。

次に申請者は Hsp47 がコラーゲン生合成のどの過程に影響を与えているのかを明らかにする目的で Hsp47 ノックアウトマウス胚から繊維芽細胞様株を樹立してコラーゲンの分子成熟に Hsp47 が与える影響について検討した。トリプシン・キモトリプシン処理を行うことによってコラーゲンのトリプルヘリックス形成について調べたところ、Hsp47<sup>-/-</sup> の遺伝子型を持つ細胞株から分泌されたプロコラーゲンはプロテアーゼ処理に対する感受性が高く、Hsp47 の欠損によって正常にトリプルヘリックスを形成したコラーゲンが分泌されていないことが明らかにされた。

本研究の結果から、Hsp47 がコラーゲンの生合成過程の中心の一つであるトリプルヘリックス形成において必須の役割を果たしている分子シャペロンであるということが明らかになった。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

Hsp47 は、小胞体に局在する熱ショックタンパク質であり、コラーゲン、コラーゲン様トリプルヘリックス構造を持つタンパク質と特異的に結合することが知られている。Hsp47 はコラーゲンのフォールディングを助ける分子シャペロンとして機能していると考えられてきたがその役割については不明な部分が多い。申請者は Hsp47 の機能を解明するため

Hsp47 欠損マウス・細胞の作成・解析を行い、Hsp47 がコラーゲンの性状に果たす役割について明らかにした。

まず申請者は Hsp47 ノックアウトマウスの作成を行い、それらを用いて Hsp47 の欠損がコラーゲンの性状にどのような影響を与えているかについて解析を行った。ノックアウトマウスは胎生致死の表現型を示し、マウスの発生過程において Hsp47 が必須の役割を果たしていることが明らかとなった。マウス胚抽出液を用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、Hsp47 ノックアウトマウス胚では I 型コラーゲンのプロペプチドが切断された成熟型コラーゲンが殆ど存在せず、プロコラーゲンが蓄積していることを明らかにした。IV 型コラーゲンについてもノックアウトマウス胚では 7S ドメインが切断された form が観察できなかった。また、ノックアウトマウス胚では繊維形成不全が観察され、細網繊維構造が殆ど検出されず、さらに基底膜は断続的であることを明らかにした。さらにノックアウトマウス胚では間葉系の細胞を中心にアポトーシスが起きていることを示した。これらの実験は Hsp47 が生体内でコラーゲンの生合成に果たす重要性を初めて明らかにしており、Hsp47 の機能の解明に大きく貢献したものと評価できる。

次に申請者は Hsp47 ノックアウトマウス胚から繊維芽細胞様株を樹立し、Hsp47 の欠損がコラーゲンの分子成熟にどのような影響を与えているかについて検討した。プロテアーゼ処理を行うことによってコラーゲンのトリプルヘリックス形成について調べたところ、Hsp47<sup>-/-</sup> の遺伝子型を持つ細胞株から分泌されたプロコラーゲンはプロテアーゼ処理に対する感受性が高く、Hsp47 の欠損によって正常にトリプルヘリックスを形成したコラーゲンが分泌されないことが明らかにされた。

Hsp47 のストレス誘導性、一過的な新生プロコラーゲンとの結合から、Hsp47 はコラーゲン特異的分子シャペロンとして機能していると考えられてきたが、その実際の役割は不明のままであった。本論文により初めて Hsp47 の果たす役割が明らかにされた。コラーゲンの生合成過程においてトリプルヘリックスの形成は重要なステップであり、Hsp47 がそのステップに関与していることを証明したのはコラーゲンの生合成過程の解明に新たな展開を与えたものと評価できる。

よって、申請論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認められる。なお、主論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。