

氏 名	た 田 村 淳
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2885 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 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	医 学 研 究 科 分 子 医 学 系 専 攻
学位論文題目	Achlorhydria by ezrin knockdown: defects in the formation/expansion of apical canaliculi in gastric parietal cells (エズリンノックダウンによる無酸症：胃壁細胞における表面陥入構造の形成および拡大不全)
論文調査委員	(主 査) 教 授 塩 田 浩 平 教 授 千 葉 勉 教 授 瀬 原 淳 子

論 文 内 容 の 要 旨

アクチンフィラメントと細胞膜との結合は、細胞の形態形成や細胞運動および細胞の増殖や分化において重要な役割を果たす。アクチンフィラメントと細胞膜を直接架橋する蛋白質として同定された ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) タンパク質は、細胞膜タンパク質の分布やその機能を制御し細胞表層構造を形成すると思われる。本研究では、生体内での ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) タンパク質の機能解析を目的として、エズリンのノックダウンマウスを作製した。

当初、エズリン遺伝子の第3, 4エクソンをネオマイシン耐性遺伝子と置き換えることにより、エズリン (ezrin) のノックアウトマウスを作製した。しかしながら、このマウスは生後1週間以上生き続けることができないため、成熟した器官形成過程におけるエズリンの機能解析が不可能であった。そこで、エズリン遺伝子の第2イントロンにネオマイシン耐性遺伝子を導入することで、エズリンのノックダウンマウスの作製を試みた。エズリンのノックダウンマウスは、メンデルの法則に従って生まれるが、出生後の高い致死率と成長障害を示した。ノックダウンマウスのおよそ7%が離乳期を越え、離乳期を越えた Ezrin ノックダウンマウスは、やせてはいるものの、体重は、生後7週までに、同腹の野生型マウスのおよそ80%までに成長した。エズリンは、胃の壁細胞において、他の ERM ファミリータンパク質であるラディキシンやモエシンに比べ、量的に圧倒的優位に発現している。そのため、まず最初に、胃における細胞生物学的解析を行った。

胃でのエズリンの発現は、野生型マウスの5%未満にまで低下しているが、これに伴うラディキシンやモエシンの発現上昇は見られなかった。また、エズリンのノックダウンマウスでは、野生型マウスに比べ、アクチンフィラメントによる細胞表層構造の形成が阻害され、表層構造の厚さが薄くなっていた。エズリンが壁細胞に特に多く発現することから、エズリンの壁細胞による胃酸分泌への関与を調べる目的で、2チャンバー法により胃酸分泌解析を行った。野生型マウスの胃の壁細胞は、食間の非刺激状態では、膜タンパク質であるプロトンポンプ (H. K-ATPase) を非活性化状態で含んだチューブ状小胞 (tubulovesicles) を多数細胞質に保持する。食事などで壁細胞にヒスタミンなどを介した刺激が入ると、これらのチューブ状小胞が、細胞膜に融合し、プロトンポンプが活性化され、胃酸が分泌される。これに対し、エズリンノックダウンマウスでは、ヒスタミンによる壁細胞からの胃酸分泌が、ほぼ完全に消失していた。野生型マウスとエズリンノックダウンマウスの壁細胞を、絶食時の不活性化状態とヒスタミンで刺激した活性化状態で電子顕微鏡で比較すると、ノックダウンマウスでは、ヒスタミン刺激を入れても、大部分のチューブ状小胞が細胞膜と融合できない状態のまま、細胞質に残ってしまうことが明かにされた。このことから、生体において、エズリンがチューブ状小胞の apical 細胞膜への融合および胃酸分泌において、重要な役割を担うことが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

細胞膜タンパク質とアクチンフィラメントを架橋する ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) タンパク質ファミリーの一員であるエズリンは、胃の壁細胞に特に多く存在する。壁細胞におけるエズリンの役割を解析する目的でエズリンノックアウトマ

ウスを作製したところ、生後1週間以内に死亡し、胃酸の分泌が十分に行われるまで生存する個体が得られなかった。そこで申請者は、ネオマイシン耐性遺伝子を、エズリン遺伝子の第2イントロンに導入することで、エズリンノックダウンマウスを作製した。エズリンノックダウンマウスは、メンデルの法則に従って生まれるが、出生後の高い致死率と成長障害を示した。ノックダウンマウスの約7%が離乳期を越え、離乳期を越えたエズリンノックダウンマウスは、やせてはいるが、体重は生後7週までに、同腹の野生型マウスの約80%までに成長した。胃でのエズリンの発現は、野生型マウスの5%未満にまで低下しているが、これに伴うラディキシンやモエシンの発現上昇は見られなかった。エズリンノックダウンマウスでは、ヒスタミン刺激による胃酸分泌は完全に消失していた。電子顕微鏡および免疫蛍光染色を用いた観察から、通常の胃酸分泌の際にみられる H^+ , K^+ -ATPase を含む tubulovesicles が細胞膜のアピカル面に融合し、apical canaliculi が拡張する現象が、エズリンノックダウンマウスでは完全に消失しており、tubulovesicles の細胞膜への融合および apical canaliculi の形成拡大過程に、エズリンが本質的な役割を果たしていることが示された。

以上の研究は、生体における胃酸分泌の分子機構の解明に貢献し、さらに一般的な小胞および膜融合過程の解明に発展する可能性が有り、また、これらに類する過程を利用する生体機構が破綻した時に生ずる病態の解明および治療法の開発に寄与する所が大きいと期待される。

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17年2月28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。