

氏 名	まる たにし ひろ 丸 谷 寿 裕
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2930 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	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	コラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 ノックアウトマウスにおける Ⅳ型コラーゲンの小胞体内での蓄積と基底膜形成不全
論文調査委員	(主 査) 教 授 永 田 和 宏 教 授 森 和 俊 助教授 吉 田 秀 郎

論 文 内 容 の 要 旨

HSP47 は、小胞体 (ER) に局在するコラーゲン特異的分子シャペロンであり、その発現は、基質であるコラーゲンの発現と強く関連している。HSP47 は、Ⅰ～Ⅴ型コラーゲン及び、そして高度に変性したコラーゲン分子が形成するゼラチンと結合することが知られている。HSP47 はコラーゲン分子に見られる Gly-X-Y の繰り返し配列を認識する。HSP47 ノックアウトマウスは11.5日までに基底膜の断裂を伴う胎生致死を示す。

本研究においては、HSP47 ノックアウトマウスに見られる基底膜の断裂が起こる分子の機構を明らかにするために、免疫組織学的手法を用いた解析を行った。基底膜は、ラミニンと HSP47 の基質であるⅣ型コラーゲンの独立した二つのネットワーク構造から形成されており、そのふたつのネットワーク構造はナイドジェンによって結び付けられている。HSP47 ノックアウトマウス9.5日胚を用いた免疫染色では、基底膜においてラミニンとナイドジェン-1 の局在は見られたが、Ⅳ型コラーゲンは見られなかった。免疫電子顕微鏡観察において、HSP47 ノックアウトマウス9.5日胚では、Ⅳ型コラーゲンが野生型における様な基底膜への蓄積ではなく、膨潤した ER 内に蓄積していることが明らかにされた。

HSP47 ノックアウトマウス10.5日胚に対して、抗ラミニン抗体と抗 ナイドジェン-1 抗体を用いた免疫染色を行なった結果、断裂した基底膜構造が観察された。従って、HSP47 の欠失によりⅣ型コラーゲンが基底膜から失われることにより、劇的な形態変化が起こる胎生10.5日において基底膜が維持できなくなることが示唆された。このことから、Ⅳ型コラーゲンが基底膜の形成初期には必須ではなく、基底膜構造の維持に必要であると考えられた。

胎生致死に至る直前の HSP47 ノックアウトマウス10.5日胚では、アポトーシス下における典型的な DNA 断裂が起き、小胞体ストレスに起因するアポトーシス下において転写が誘導される CHOP mRNA レベルの顕著な上昇が見られた。

以上の結果から、HSP47 ノックアウトマウス胚においては基底膜ではなく、膨潤した ER 内にⅣ型コラーゲンが蓄積していることが明らかにされた。また、HSP47 ノックアウトマウスにおいて、CHOP レベルの上昇を介したアポトーシスを引き起こすことが示された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

HSP47 は脊椎動物のタンパク質のなかでも最も大きな割合を占めるコラーゲンの生合成に必須な役割を担う重要な分子である。HSP47 はコラーゲン特異的分子シャペロンであるが、コラーゲンの生合成の過程において果たす役割については明らかにされていなかった。そこで HSP47 ノックアウトマウスが作成された。ノックアウトマウスの解析の結果、HSP47 ノックアウトマウス胚は胎生致死となり、従って、HSP47 がマウスの発生に必須の遺伝子であることが明らかにされた。このノックアウトマウス胚においてはコラーゲン分子の安定性が損なわれており、また基底膜に形成不全が生じていることがすでに報告されてきたが、その基底膜の形成不全を引き起こす機構については明らかではなかった。

申請者は HSP47 ノックアウトマウス胚において基底膜の形成不全が生じる機構について明らかにするために基底膜を形

成する主要な構成要素であるラミニンとⅣ型コラーゲン、そしてナイドジェン-1の局在について免疫組織学的手法を用いて調べた。免疫組織染色を用いた本研究の結果から、HSP47 ノックアウトマウス9.5日胚では、基底膜においてHSP47の基質でないラミニンとナイドジェン-1の局在は見られたが、HSP47の基質であるⅣ型コラーゲンの局在は見られず、10.5日胚においては、ラミニン抗体で染色される基底膜様構造も断裂していることが明らかになった。これはⅣ型コラーゲンが正しく合成されないような条件下では、基底膜様構造自体は構成されるが、発生に伴う劇的な組織の動態変化に抗しきれず、基底膜の断裂を引き起こしたものと考えられた。さらに免疫電子顕微鏡観察によって、HSP47 欠損胚においては、Ⅳ型コラーゲンが組織中に分泌・蓄積されることなく、小胞体に蓄積していることを明らかにした。また、Ⅳ型コラーゲンが蓄積されると共に小胞体は大きく膨潤しており、小胞体ストレスが生じていることが明らかにされた。強い小胞体ストレスはアポトーシスを引き起こすことが知られているため、HSP47 ノックアウトマウスにおいてもアポトーシスが生じている可能性が唆された。そこで、アポトーシスを検出するためにDNA ラダーの検出およびTUNEL 染色が行われた。その結果、ノックアウトマウス胚においてはアポトーシスが生じていることが明らかにされた。これらの結果からHSP47 ノックアウトマウス胚においては小胞体ストレスが引き起こされて、マウス胚にアポトーシスを引き起こしていることが明らかになった。また、HSP47 と同じく小胞体においてコラーゲンの生合成に必至な役割を担う事が知られているプロリン4-水酸化酵素がHSP47の欠損の影響を受けているか否かが半定量的RT-PCR法を用いて調べられたところ、HSP47 ノックアウトマウスにおいて、プロリン4-水酸化酵素のmRNA レベルが有意に上昇していることを示す結果が得られた。HSP47 とプロリン4-水酸化酵素は異なる作用機序によってコラーゲンの生合成に関与していると考えられている。このことからHSP47の欠失がプロリン4-水酸化酵素に影響するという実験結果は非常に興味深いものである。

本研究は、HSP47 がコラーゲン特異的分子シャペロンとして、基底膜の維持に重要な役割を演じることによって、マウスの発生に必須の役割を果たしていることを明らかにしたものであり、また従来不明であった基底膜の形成機序に関しても、その形成自体にはⅣ型コラーゲンは必須ではなく、その構造の維持に必須であるという新しい知見をもたらしたものである。

よって本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。なお主論文および参考論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した試問を行った結果、合格と認めた。