【237】

氏　名（本籍）	小　池　誠　一（長 野 県） こ　いけ　せい　いち
学 位 の 種 類	博　　士（医　　学）
学 位 記 番 号	博　甲　第　4069　号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科
学 位 論 文 題 目	**Functional characterization of an exoenzyme autotaxin in the mouse early development.** （細胞外酵素オートタキシンのマウス初期発生における役割の解明）

主　査	筑波大学教授	薬学博士	金　保　安　則
副　査	筑波大学助教授	博士（医学）	桜　井　　武
副　査	筑波大学助教授	薬学博士	伊　東　　進
副　査	筑波大学講師	博士（理学）	依　馬　正　次

論 文 の 内 容 の 要 旨

目　　的：

メラノーマ細胞から分泌されて細胞の運動性を亢進させる分子 atutotaxin（ENPP2 とも呼ばれる）は，リゾホスホリパーゼ D の酵素活性を持つことが明らかになり，細胞外においてリゾフォスファチジン酸（LPA）やスフィンゴシン－１－リン酸（S1P）を産生することにより，細胞増殖，細胞運動を制御していると考えられている。本酵素は，膜蛋白として合成された後に切断されて細胞外へと分泌されると考えられてきたが，細胞外切断のメカニズムは明らかにされていない。本研究では，autotaxin の細胞外への分泌方法を明らかにすることを目的とした。更に，ノックアウトマウスを作製し，autotaxin の機能を個体レベルで明らかにすることを目的とした。

対象と方法：

1. 細胞表面免疫染色：Autotaxin，PC-1，B10 の C 末端に FLAG タグを付加したコンストラクトを作成し，COS-7 細胞にトランスフェクションした。細胞表面の蛋白を検出するために，生細胞を抗 FLAG 抗体と反応させてから，固定し，蛍光標識抗マウス IgG 抗体を用いて可視化した。
2. *In vitro* translation：*Autotaxin* の N 末端断片（1-243 アミノ酸）に FLAG タグを付加した cDNA から作製した RNA を鋳型にして，ウサギ網状赤血球とミクロゾームを用いて *in vitro* translation を行った。その後，SDS-PAGE により蛋白を分離し，抗 FLAG 抗体により目的の蛋白を検出した。
3. ノックアウトマウス作製：*Autotaxin* 遺伝子破壊のために，酵素活性部位を含むエキソン 6 ～ 7 をネオマイシン耐性遺伝子で置き換えた標的破壊ベクターを用いて ES 細胞内で相同組み換えを起こさせ，次いでキメラマウスを作製した。
4. 卵黄嚢臓側内胚葉細胞の HRP 取り込み量の測定：胎生 8 日目の胎児を卵黄嚢を保持したまま取り出し，10μg/ml HRP の入った培地に 3 分間浸けた。その後，卵黄嚢に含まれる HRP の活性を比色反応を用いて調べた。

結　　果：

培養細胞に発現させたautotaxin蛋白は細胞表面にはほとんど検出できず，autotaxinのほとんどが培養上清に存在していることが明らかになった。また，細胞外へと分泌されたautotaxinは，N末端の2カ所で切断されており，それぞれの切断部位の配列はシグナルペプチダーゼとfurinによって切断されるコンセンサス配列に一致していることが明らかとなった。更に，ミクロゾームを加えて*in vitro* translationを行うと，N末端の約3kDaが切り出されることが明らかになった。これらの結果から，autotaxinの持つN末端の疎水性領域は，膜貫通領域ではなく，シグナルペプチドとして機能していることが示唆される。

次に，個体レベルでautotaxinの機能を明らかにするために，ノックアウトマウスを作製した。ヘテロマウスでは，大きな異常は見られなかったが，ホモマウスにおいては，原始血管叢から成熟血管への血管リモデリングが正常に起こっておらず，胎生9日頃に卵黄嚢の血管形成不全により胎生致死になった。この時期に*autotaxin*が発現している卵黄嚢の臓側内胚葉細胞は，母側からの栄養分を取り込み，胎児に輸送したり，血管形成に必須であるVEGFなどの分子を分泌する重要な機能を持っている。そこで，VEGFの発現量を調べたところ，卵黄嚢の細胞内に含まれる蛋白量に差は見られなかったが，卵黄嚢から分泌されるVEGFの蛋白量がホモマウスで減少していることが分かった。同様な分泌量の減少はα-fetoprotein，TGF-β1でも見られた。このことから，ホモマウスで見られた卵黄嚢の血管形成異常は，臓側内胚葉細胞からの血管形成分子の分泌量が減少することによって引き起こされていることが明らかになった。また，ホモマウスでは，臓側内胚葉細胞によるHRP（ピノサイトーシスの指標）の取り込み量の減少や，細胞に取り込ませた蛍光標識トランスフェリン，EGF，dextranの輸送にも異常が見られた。更に，電子顕微鏡による観察では，臓側内胚葉細胞内に存在する小胞の大きさが，ホモマウスではコントロールマウスに比べて小さくなっていることが分かった。

考　　察：

ノックアウトマウスを用いた研究から，autotaxinはエンドサイトーシス，エキソサイトーシス，小胞輸送を制御していることが明らかになった。これまでに，autotaxin，LPA，S1Pが小胞輸送の制御に関わっているという報告はほとんどなく，autotaxinがどのようなメカニズムで小胞輸送を制御しているかを明らかにすることは，今後の課題である。LPA受容体，S1P受容体のいくつかは卵黄嚢に発現しているが，これらの遺伝子のノックアウトマウスでは，*autotaxin*のホモマウスの様な初期発生における異常を示さない。従って，未だクローニングされていないLPA，S1P受容体が存在する可能性，もしくはautotaxin自身がLPA，S1Pの合成とは別の機能を持つのではないかという可能性などが考えられる。

結　　論：

本研究により，autotaxinは同じファミリーに属する他の分子とは異なり，分泌蛋白質として合成されることがわかった。また，*autotaxin*ノックアウトマウスでは，発生初期に血管形成不全により胎生致死になること，その原因が卵黄嚢の臓側内胚葉での小胞輸送の異常により，VEGFやTGF-β1など血管形成に重要な分子の分泌量が減少することによって引き起こされることが明らかになった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は，メラノーマ細胞から分泌されて細胞の運動生を亢進させるautotaxinの細胞外切断のメカニズムについて丁寧に解析し，autotaxinの持つN末端疎水領域はシグナルペプチドとして機能していることを示唆した点，およびautotaxinノックアウトマウスの作製とその解析から，autotaxinは細胞内小胞輸送を制

御して血管形成機構に関与していることを示唆した点で興味深い研究成果であり，すでに専門誌に公表され高い評価を受けている。ただし，autotaxin のエンドサイトーシスやエキソサイトーシス，小胞輸送などへの関与がどのように血管形成機構に関わっているのかについては詳細な解析がなされておらず，この点に関しては今後の検証が必要と思われる。

よって，著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。