

## 学位論文の要旨

学位の種類	博 士	氏 名	福 田 光 子
<p>学位論文題目</p> <p>膜型コレクチン CL-P1 はゼブラフィッシュの血管形成に關与する</p> <p>共 著 者 名</p> <p>大谷 克城、張 成宰、吉崎 隆之、本村 亘、小山 聡 福澤 純、小笠原 正洋、吉田 逸朗、高後 裕、若宮 伸隆</p> <p>未 公 表</p> <p>研究目的</p> <p>コレクチンは、その分子内部にコラーゲン様領域を有し、カルシウム依存的に糖と結合する C 型レクチンに分類され、自然免疫に關与する因子の一つと考えられている。CL-P1 (collectin placenta 1) は、主に血管内皮に局在し、細菌や酵母と結合し貪食するコレクチンとしての自然免疫機能のみならず、酸化変性を受けた LDL (酸化 LDL) と結合しエンドサイトーシスするスカベンジャー受容体としての機能も併せ持っている。また、CL-P1 は血管内皮増殖因子である VEGF (vascular endothelial growth factor) の刺激を受けてその発現量の増加することが明らかとなっており、CL-P1 が血管系における生体防御や生体の恒常性維持、血管形成において何らかの役割を担うことが推測されている。そこで本研究では、CL-P1 の個体レベルでの機能を明らかにするため、ゼブラフィッシュにおいてアンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチドを用いた遺伝子ノックダウン法により、種々の検討を行った。</p> <p>材料・方法</p> <p>1. 実験動物</p> <p>野生型のゼブラフィッシュを用い、交配させて胚を得た。</p> <p>2. zebrafish CL-P1 (zCL-P1) のクローニング</p> <p>ゼブラフィッシュ成魚より全 RNA を精製し、cDNA ライブラリーを作成した。また、ヒトとマウスの CL-P1 の配列で保存性の高い部分に注目し、ゼブラフィッシュの ESTs (expressed sequence tags) データベースを検索した。得られた部分塩基配列を用いて zCL-P1 の cDNA のクローニングを行った。</p> <p>3. 免疫細胞染色と微生物および酸化 LDL との結合の検討</p> <p>zCL-P1 遺伝子をチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO 細胞) にトランスフェクションし、免疫</p>			

染色した。次に Alexa 標識酵母と黄色ブドウ球菌、DiI 標識酸化 LDL とを反応させ、蛍光顕微鏡で観察した。

#### 4. zCL-P1 部分組換え体の作製とポリクローナル抗体の作製

zCL-P1 のコラーゲン領域の一部から糖認識領域を大腸菌で発現させ、得られた部分タンパク質をウサギに免疫した後、抗血清からアフィニティー精製してポリクローナル抗体を作製した。

#### 5. zCL-P1 の局在についての検討

mRNA の局在を明らかにするため、zCL-P1 の RNA プローブを作成したのち、受精後 24 時間のゼブラフィッシュ胚を用いて *in situ* hybridization を行った。次にタンパクの局在について検討するため、受精後 48 時間のゼブラフィッシュ稚魚と生後 2 カ月の幼魚を用いてパラフィン切片を作成し、その切片について zCL-P1 ポリクローナル抗体で免疫組織化学染色を行った。

#### 6. アンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチド (Antisense Morpholino Oligo ; MO) と遺伝子ノックダウン

MO は標的 mRNA と結合して翻訳を阻害する一本鎖ヌクレオチドであり、本研究では zCL-P1 の開始コドンの上流で作成した (Gene Tools)。さらに MO の特異性を評価するために、その塩基配列のうち 5 カ所を他の塩基に置き換えた 5-base mismatch MO を作成した。これらの MO を、1-4 細胞期のゼブラフィッシュ受精卵にマイクロインジェクションし、受精後 48 時間の稚魚の表現型について観察した。血管形成を評価するために血管造影および血管内皮のアルカリフォスファターゼ染色を施行した。また、MO と同時に zCL-P1 mRNA をインジェクションし、表現型の変化について観察した。遺伝子ノックダウンによる CL-P1 タンパク質の翻訳抑制は、上記抗体を用いたウェスタンブロットティングにより評価した。

#### 7. 定量的 PCR 法

受精後 1 時間から 48 時間までのゼブラフィッシュ胚を採取し、全 RNA を精製して逆転写反応の後、定量的 PCR を行った。

#### 8. 統計学的解析

すべてのデータは平均値±標準誤差で示した。また、分散分析に加えて多重比較検定を行い、有意差を判定した。P < 0.05 で有意差ありと判定した。

### 成績

#### 1. zCL-P1 遺伝子のクローニングと一過性発現細胞における機能

クローニングされた zCL-P1 はヒト CL-P1 と同様のドメイン構造を有し、アミノ酸配列の相同性は全体で 51% であった。zCL-P1 発現細胞における免疫蛍光染色の結果、zCL-P1 は II 型膜タンパク質であることが認められた。また、発現細胞は酵母や黄色ブドウ球菌との結合や酸化 LDL との結合を認めた。

#### 2. zCL-P1 の生体での発現とその局在

*in situ* hybridization では zCL-P1 mRNA は主に背部大動脈に発現していた。免疫組織化学染色では zCL-P1 タンパク質は血管領域にその局在を認めた。また、zCL-P1 mRNA は VEGF やその受容体関連遺伝子と同様に、受精早期から発現していることが明らかになった。

### 3. 遺伝子ノックダウン法による解析

zCL-P1 MO をマイクロインジェクションすることにより、受精後 48 時間で背部の彎曲、心囊の浮腫、体幹部の成長の遅延を認めた。本表現型は全体の 68.3%で認められ、5-base mismatch MO 群および非インジェクション群と比較して有意に高率であった。また、zCL-P1 MO の濃度依存性に表現型の出現が認められた。更に、これらの胚についてウェスタンブロッティングを施行した結果、zCL-P1 MO 群では 5-base mismatch MO 群および非インジェクション群と比較して zCL-P1 タンパク質の合成阻害を認めた。

zCL-P1 MO 群における血流の評価をするために、血管造影を行った。非インジェクション群では背部大動脈およびそこから分枝する体節血管に血流を認めたが、zCL-P1 MO 群では体節血管の血流を欠いた weak phenotype、あるいは背部大動脈の血流を欠いた strong phenotype を認めた。そこで血管形成の評価をするために血管内皮の内在性アルカリフォスファターゼ染色を行った結果、血流の無い部分には血管が形成されていないことが明らかとなった。これらの表現型は zCL-P1 MO の濃度依存性に出現し、濃度の高い群ほどより強い表現型を示した。

zCL-P1 MO と zCL-P1 mRNA を同時にインジェクションした結果、zCL-P1 MO 群と比較して表現型の出現頻度が有意に低下したことから、この表現型が zCL-P1 遺伝子の発現抑制によることが明らかとなった。

### 考案

CL-P1 は硬骨魚類であるゼブラフィッシュにおいてもアミノ酸配列が高度に保存され、しかも zCL-P1 強制発現細胞の検討ではヒトと同様の生物学的機能を持つことが明らかになった。発生初期から mRNA が発現していることや、さらにその局在が主に血管に認められることから、血管系における生体防御や血管形成に関与している可能性が考えられた。

ゼブラフィッシュを用いた遺伝子ノックダウン法を行った結果、血管形成や体幹形成の阻害を認めた。次に zCL-P1 MO と zCL-P1 mRNA の同時添加によって上記表現型の回復が認められたことより、CL-P1 がゼブラフィッシュの血管形成に発生初期から関与し、かつ正常な血管発生において重要な役割を果たしていることが示唆された。

### 結論

CL-P1 は広範な種で高度に保存されており、自然免疫能やスカベンジャー受容体機能だけでなく血管の初期発生に深く関わっている可能性が明らかになった。

引 用 文 献

1. Ohtani, K., Suzuki, Y., Eda, S., Kawai, T., Kase, T., Keshi, H., Sakai, Y., Fukuoh, A., Sakamoto, T., Itabe, H., Suzutani, T., Ogasawara, M., Yoshida, I., and Wakamiya, N. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 44222-44228
2. Nasevicius, A., and Ekker, S. C. (2000) *Nat. Genet.* **26**, 216-220
3. Habeck, H., Odenthal, Jorg., Walderich, B., Maischein, H, M., Tubingen 2000 screen consortium., and Schulte-Merker, S. (2002) *Curr. Biol.* **12**, 1405-1412

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	福田 光子
審査委員長 牛首文隆 ㊞			
審査委員 高後裕 ㊞			
審査委員 菊池健次郎 ㊞			
審査委員 若宮伸隆 ㊞			
学位論文題目			
膜型コレクチン CL-P1 はゼブラフィッシュの血管形成に関与する			
<p>コレクチンは、その分子内にコラーゲン様構造を有する蛋白質であり、糖を認識し結合する C 型レクチンとして自然免疫機構を担っている。また、若宮らにより発見された膜型蛋白質であるコレクチン CL-P1 は、細菌や酵母を貪食するという自然免疫機能のみならず、酸化 LDL を取り込むスカベンジャー受容体としての機能も併せ持っている。一方、CL-P1 は主に血管内皮に局在し、血管内皮増殖因子 (VEGF) により発現量が増加することが明らかとなっており、血管系の恒常性維持や血管形成においても何らかの役割を担うことが推測される。そこで本研究は、ゼブラフィッシュを用いた CL-P1 遺伝子ノックダウン法によって、CL-P1 の個体レベルでの役割解明を目指した。</p>			

ゼブラフィッシュ CL-P1 (zCL-P1) は、ヒト CL-P1 と一致するドメイン構造を有し、アミノ酸配列の相同性は 51% であった。また、CHO 細胞に発現させた zCL-P1 は、細菌や酵母とともに酸化 LDL を結合した。また、ゼブラフィッシュの発生過程において、zCL-P1 mRNA は VEGF やその受容体関連遺伝子と同様に受精早期から発現していた。また、*in situ* hybridization 法や免疫組織化学的手法により、zCL-P1 の背部大動脈を含めた血管領域での局在が確認された。一方、受精卵への zCL-P1 アンチセンスオリゴヌクレオチドを注入することにより、zCL-P1 蛋白質の合成阻害が認められ、受精後 48 時間で体幹の屈曲、心嚢の浮腫、体尾部の成長遅延が認められた。これらの異常は、背部大動脈や体節血管の形成不全・欠失による血行障害に起因していた。また、この表現型は、zCL-P1 mRNA 投与によって回復可能であった。

これらの結果、zCL-P1 は自然免疫やスカベンジャー機能に加え、血管系の発生・分化において必須な役割を果たすことが明らかとなった。したがって、本研究は、当該分野の飛躍的發展に貢献するものと考えられる。

なお、論文提出者に対し各審査委員より、本論文とその関連領域に関して試問が行われ、適切な回答が得られた。

以上より、本論文は博士の学位論文として適切であると判定した。