The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Identification and Characterization of ADAMTSL-6
Author(s)	筒井, 仰
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57997
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【58】

氏　　名	筒　井　　仰（つつい　こう）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　２３５８８　号
学位授与年月日	平成22年３月23日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 理学研究科生物科学専攻
学　位　論　文　名	Identification and Characterization of ADAMTSL-6 （ADAMTSL-６の同定とその機能解析）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　関口　清俊 （副査） 教　授　高木　淳一　　教　授　西田　宏記

論　文　内　容　の　要　旨

フィブリリン１は約 350 kD の巨大細胞外マトリックス（ECM）蛋白質で、弾性線維の骨格であるミクロフィブリル線維の主要構成成分である。ヒトフィブリリン１遺伝子の異常により発症する全身性の結合組織疾患であるマルファン症候群では、高身長で四肢や指先が長いという外面的な特徴の他に、弾性線維の脆弱化による大動脈の障害や眼の水晶体の偏位などの生命の質にかかわる問題も生じる。しかしながら、フィブリリン１によるミクロフィブリル線維形成の制御機構は未知の部分が多く残されている。

ADAMTSL-6 は網羅的 cDNA スクリーニングから見いだした新規 ECM 蛋白質である。一次構造解析から種々の ECM 蛋白質を分解する ADAMTS メタロプロテアーゼファミリーと一部構造的類似性を持つことがわかったすなわち、ADAMTS 蛋白質に特徴的な C 末側のドメイン構造の配置を保持しているが、酵素活性に必要な触媒領域はもっておらず、ADAMTSL ファミリーに分類された。

ADAMTSL-6 は、マウス胎仔の大動脈周囲、皮下、軟骨膜など、弾性線維形成が盛んな部位に線維状に局在しており、また免疫電子顕微鏡観察から、ミクロフィブリル線維に会合していることが明らかになった。次に、ミクロフィブリル線維の骨格となるフィブリリン１と直接結合するかどうか表面プラズモン共鳴法で測定したところ、ADAMTSL-6 はフィブリリン１蛋白質の N 末側領域に結合することがわかった。ミクロフィブリル線維は多くの会合蛋白質からなる巨大複合体として機能しているが、フィブリリン１の線維形成を制御する活性をもつ会合蛋白質の報告はこれまでのところない。ADAMTSL-6 がフィブリリン１線維形成の制御に関わるかどうか、MG63 細胞（ヒト骨肉腫細胞株）に ADAMTSL-6 を発現または添加して、細胞が作るフィブリリン１線維形成への影響を検討した。フィブリリン１線維形成は培養５日目から確認されるが、ADAMTSL-6 存在下では３日目から明瞭なフィブリリン１線維が形成され、外来 ADAMTSL-6 の ECM アッセンブリはフィブリリン１線維とよく一致していた。これらの結果は、ADAMTSL-6 がフィブリリン１線維形成に対して促進的に機能することを示している。

ADAMTSL-6 が生体内でもフィブリリン１と機能的に相関があるかどうか検証するために、軟骨で ADAMTSL-6 を高発現するトランスジェニックマウスを作製して、骨格形成に対する影響を調べた。得られたマウスは軟骨形成時にフィブリリン１の線維形成促進が認められ、軟骨成長板の乱れを伴った小人症を呈した。さらに、フィブリリン１低発現マウスとかけ合わせた二重変異マウスで尾の形成異常が認められ、両者の機能的相関が示唆された。

本研究で明らかにされた新規 ECM 蛋白質 ADAMTSL-6 によるフィブリリン１線維形成の促進は、フィブリリン１アッセンブリメカニズムの解明につながるものである。また、その解明を通してマルファン症候群の発症メカニズムの理解とその治療法の開発にも貢献できる可能性が考えられる。

論文審査の結果の要旨

ADAMTSL-6 は、新規細胞外マトリックスの網羅的な探索から見つかってきた機能未知の糖蛋白質である。学位申請者は、ADAMTSL-6 の生理機能を解明するため、免疫組織染色、精製蛋白質を用いた結合実験、細胞生物学的手解析、トランスジェニックマウスの作製・解析を行い、ADAMTSL-6 がミクロフィブリルの構成成分であるフィブリリン１のマトリックスアッセンブリを促進する活性を有することを見いだした。ADAMTSL-6 は、その予測されるドメイン構造から ADAMTS-like (ADAMTSL)蛋白質ファミリーに分類された。ADAMTSL-6 の生体内局在を免疫組織染色により解析したところ、マウス胎仔の大動脈周囲、皮下、軟骨膜など、弾性線維形成が盛んな部位に線維状に局在しており、また免疫電子顕微鏡観察から、ミクロフィブリル線維に会合していることが明らかになった。次に、ミクロフィブリル線維の骨格となるフィブリリン 1 と直接結合するかどうか表面プラズモン共鳴法で測定したところ、ADAMTSL-6 はフィブリリン 1 蛋白質の N 末側領域に結合することがわかった。フィブリリン 1 遺伝子の異常によるミクロフィブリル線維形成の低下は全身性の結合組織疾患であるあるマルファン症候群を引き起こすが、フィブリリン 1 のマトリックスアッセンブリの制御機構には未知の部分が多く残されている。ADAMTSL-6 がフィブリリン１のマトリックスアッセンブリの制御に関わっているかどうか、MG63 細胞（ヒト骨肉腫細胞株）に ADAMTSL-6 を発現または添加して、細胞が作るフィブリリン 1 線維形成への影響を検討したところ、ADAMTSL-6 がフィブリリン 1 マトリックスアッセンブリに対して促進的に機能していることがわかった。また、ADAMTSL-6 を軟骨膜/軟骨で高発現するトランスジェニックマウスでのフィブリリン 1 線維を免疫組織染色により検討したところ、生体内でも ADAMTSL-6 はフィブリリン 1 マトリックスアッセンブリを促進することが明らかとなった。以上から、ADAMTSL-6 はフィブリリン 1 マトリックスアッセンブリを制御する活性をもつ初めてのミクロフィブリル会合蛋白質であることがわかった。

本研究で得られた知見は、ADAMTSL-6 の生体内における機能を考える上で有用なだけでなく、フィブリリン 1 のマトリックスアッセンブリを通したミクロフィブリル線維形成の制御機構に関しても新たな知見をもたらすと考えられ、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。