

Title	Cooperative interaction of Angiopoietin-like proteins 1 and 2 in zebrafish vascular development
Sub Title	アンジオポエチン様因子1および2のゼブラフィッシュ血管発生における協調的作用
Author	久保田, 義顕(Kubota, Yoshiaki)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2006
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.83, No.2 (2006. 6) ,p.8-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20060602-0008

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Cooperative interaction of Angiopoietin-like proteins 1 and 2 in zebrafish vascular development

(アンジオポエチン様因子1および2のゼブラフィッシュ血管発生における協調的作用)

久保田 義 顕

内容の要旨

論文審査の要旨

アンジオポエチン様因子 (Angptl) はアンジオポエチンファミリーと類似の構造を持つ分泌性タンパクとして、哺乳類において Angptl1 から Angptl6 までの 6 種類が見出されており、アンジオポエチンと同様、血管をはじめとする様々な組織において重要な機能を有することが示唆されているが、現在受容体は同定されておらず、その機能に関しては殆ど理解されていない。その中で Angptl1 と Angptl2 は特に相溶性が高く、推定受容体結合領域であるフィブリノゲン様ドメインにおいては約 80% の相溶性を有し、共通の受容体を介した協調的または競合的作用の存在が示唆されている。今回われわれはゼブラフィッシュの系において、アンチセンス法 (モルフォリーノ) による両遺伝子のノックダウンを行うことで、両遺伝子の生理的機能につき検証した。

まず、われわれのクローニングしたゼブラフィッシュ Angptl1 と Angptl2 遺伝子の全長の塩基配列をもとに、それぞれの転写を特異的に阻害するモルフォリーノを作成し、これらをゼブラフィッシュ受精卵に注入することで、両遺伝子のノックダウンを試みた。その結果、Angptl1 と Angptl2 各々単独のノックダウンでは表現型は現れなかったが、両者を同時にノックダウンした場合、背側大動脈から発芽する節間血管が欠失し、それ以降の血管の発生が進行せず、受精後約 72 時間で心嚢液貯留をきたし死亡した。また、節間血管の欠失は同血管の血管内皮細胞のアポトーシスによって引き起こされており、それ以前の血管発生、すなわちヘマンジオブラストの出現、背側大動脈、後主静脈の形成過程には異常はなかった。In vitro の系において Angptl1 と Angptl2 タンパクは血管内皮細胞株 (HUVEC) に競合的に結合し、この細胞株に対して PI3 キナーゼ/Akt 経路を介した抗アポトーシス作用を有することを見出した。さらにはゼブラフィッシュの系において、恒常活性化型 Akt (myristoylated Akt) の mRNA を Angptl1 と Angptl2 両者のノックダウンの個体に注入することで、血管の異常が有意に救済されることも確認した。

以上の結果より、ゼブラフィッシュ血管発生において Angptl1 と Angptl2 は PI3 キナーゼ/Akt 経路を介した抗アポトーシス因子として血管内皮細胞に協調的に作用することが示された。

アンジオポエチン様因子はアンジオポエチンファミリーと類似の構造をもつ分泌性タンパクであるが、現在受容体は同定されておらず、その機能に関しては殆ど理解されていない。そのファミリーの中で Angptl1 と Angptl2 は特に相溶性が高く、協調的または競合的作用の存在が示唆されている。本研究は、その両遺伝子の発生期における生理的機能につきゼブラフィッシュの系を用いて検証された。近年、ゼブラフィッシュは、血管発生研究においても、その発生の早さ、血管構築の可視化の容易さ、遺伝子操作の簡便性などから広く利用されている。本研究においては、それらの利点が最大限に生かされ、Angptl1 と Angptl2 がゼブラフィッシュ血管発生において PI3 キナーゼ/Akt 経路を介した抗アポトーシス因子として血管内皮細胞に協調的に作用することが示された。これにより、ヒトを含めた哺乳類の血管発生において、この 2 分子の協調的作用が必須であることが示唆された。

審査ではまず、両遺伝子のノックダウンの手段として用いたモルフォリーノの特異性の評価について質問がなされた。これに対しては、蛋白レベルでの発現低下を評価するためにはゼブラフィッシュ蛋白に対する抗体を作成し、ウェスタンブロットなどで定量化することが直接の証明になり得るが、本研究ではその抗体の作成まで至っていないものの、両遺伝子の他の塩基配列を標的として作成したモルフォリーノでほぼ同じ結果が得られること、5 塩基置換型のモルフォリーノで表現型が現れないことなど、間接的な証明がなされていると回答された。次いで、受精卵に注入したモルフォリーノの持続期間、および他組織への非特異的影響について問われた。これに対し、ゼブラフィッシュの発生過程で細胞分裂は哺乳類同様、活発に繰り返されるものの、個体全体としての大きさは殆ど変わらないため、注入物質が希釈されていく程度は低く、また糖鎖の付加により分解されにくい構造として合成されており、一般的に注入後 48 時間は効果を持続することができると考えられている旨説明された。また、全身への影響に関しては、注入量が過剰になれば他の組織における異常も見られるものの、少量の注入では血管に選択的に異常が見られることや、少なくとも心臓、体節、消化管には異常が見られないことを確認していると回答された。最後に今後の本研究の展開についての展望について問われた。これに対しては、両遺伝子に関して哺乳類にも共通した協調的作用が存在するか否か検討すべく、ダブルノックアウトマウスの解析が必須であり、現在それを作成中であるとの説明がなされた。

以上のように本研究は今後さらに検討すべき点はあるものの、ゼブラフィッシュ血管発生における Angptl1 と Angptl2 の協調的作用を明らかにした点で、血管生物学の分野において大変価値のある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 発生・分化生物学 須田 年生
構造生物学 福田 恵一 眼科学 坪田 一男
皮膚科学 天谷 雅行
学力確認担当者:
審査委員長: 福田 恵一

試問日: 平成17年12月22日