




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ①・論	第466号	氏名	加藤愛子
審査委員会委員	主査氏名	橋邊 誠	
	副査氏名	小野克重	
	副査氏名	植口 英典	

論文題目： Dermato-pontin Interacts with Fibronectin, Promotes Fibronectin Fibril Formation, and Enhances Cell Adhesion

論文掲載誌名： The Journal of Biological Chemistry

学位論文要旨： 真皮細胞外マトリックスに豊富に存在する Dermato-pontin (DP) は多彩な機能を有するとされ、fibroblast 接着への関与等々の報告がある。本研究では DP の創傷治癒に果たす役割解明を目的とした。Fibrin clot を二重染色すると、DP は fibrin や fibronectin (Fn) とともに net-like 構造を呈した。創傷滲出液を western blot で解析すると、Fn は血清と創傷浸出液で同程度の量であるのに対し DP は血清より創傷浸出液に遥かに多量に存在し、DP が創傷部で濃縮される可能性が示唆された。Solid phase assay for protein interaction では DP は Fn 及び Fibrin と相互作用し、それらとの三量体を形成する可能性が示唆された。DP はさらに Fn-Fibrin complex への fibroblast 接着を亢進させ、その亢進は $\alpha 5 \beta 1$ integrin を介して生じると考えられた。この Fn-Fibrin complex に接着した fibroblast は DP の有無で大きくその形態にも変化が生じ、それに対応して actin filament や vinculin の存在様式にも変化が認められた。これらの結果から学位申請者らは DP が Fn の Fibrin への結合を量的に増加させるのみならず、Fn 自体の構造変化を引き起こす考え、Fn を DP の存在下で incubate すると不溶性の沈降物が得られ、この沈降物には scanning electron microscope で Fn の fibril と考えられる構造が観察され、DP が Fn fibril formation を引き起こしたとした。Fn はその構造が 1~12 の Type I repeats, 1 と 2 の Type II repeats, 1~15 の Type III repeats や anastellin, retronectin 等々の部分から構成されている。これらのうちの DP 結合部位を解析すると、III₁ 部分を含む anastellin 部分と retronectin 部分、その中でも III₁₃ と III₁₄ 部分と強く結合すると考えられた。さらに I₁₋₅ と III₁₂₋₁₄ 部分との相互作用が DP により亢進し III₂₋₃ と III₁₂₋₁₄ 部分との相互作用は DP により半減するとの結果が得られ、DP は III₂₋₃ と III₁₂₋₁₄ 部分との相互作用を抑制することで Fn の高次構造を変化させ、I₁₋₅ と III₁₂₋₁₄ 部分との相互作用を亢進させ fibril formation を起こしていると考えられた。これらの結果から学位申請者等は従来報告されていた $\alpha 5 \beta 1$ integrin に加えて、DP も Fn-fibril formation を生ずる因子であり、この創傷治癒部に豊富な DP が Fn の活性化を惹起して創傷治癒を促進していると結論づけている。

本研究は DP が創傷治癒に関与する機序解明を目的とし、Fn fibril formation 介して創傷治癒を促進する可能性を示したもので、今後の発展を期待して審査委員は本論文を学位論文に値するものと判定した。

学 位 論 文 要 旨

氏名 加藤 愛子

論 文 題 目

Dermatopontin Interacts with Fibronectin, Promotes Fibronectin Fibril Formation, and Enhances Cell Adhesion

(デルマトポンチンはフィブロネクチンと相互作用し、フィブロネクチンに細線維を形成させ、細胞接着を増強する。)

要 旨

【緒言(目的)】デルマトポンチン(DP)は真皮細胞外マトリックスに豊富に存在する分子量22kDaの蛋白質であるが、その機能は未知の部分が多い。最近DPが強力な表皮細胞接着能を有することが明らかとなり、創傷治癒への関与が示唆された。我々はDPが創傷初期に形成される仮マトリックスと創傷浸出液中に存在していることを見出した。このことから、仮マトリックスにおけるDPの創傷治癒に対する役割を検討した。

【研究対象と方法】仮マトリックスと創傷浸出液、血清中のDPの存在または分布を、免疫染色およびウェスタンブロット法で検討した。DPとフィブリン、フィブロネクチン(Fn)との相互作用を固相法にて検討した。同様の条件にてDP-フィブリン-Fn三者複合体の正常線維芽細胞に対する細胞接着実験を行った。Fnの細線維形成を電気泳動法ならびに走査型電子顕微鏡写真で検討した。Fnの特定のドメインを大腸菌に発現させて作成し、DPとの相互作用およびドメイン間の相互作用に対するDPの影響を固相法にて検討した。

【結果と考察】仮マトリックスにおいてフィブリンと Fn は高分子複合体を形成しているが、DP はこれらの蛋白質それぞれと相互作用した。さらに DP はフィブリンと Fn の相互作用を濃度依存性に増強し、Fn の線維芽細胞に対する接着を濃度依存性に増強した。このときのレセプターは $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンであった。DP 存在下で細胞は Fn にびまん性に接着したのに対し、DP 非存在下では細胞は Fn に不規則なパターンで接着した。このことから DP は Fn の高次構造を変化させていると思われた。

Fn が活性化すると細線維を形成し不溶化することが知られている。Fn と DP を混合すると Fn は不溶化し、走査型電子顕微鏡でも細線維の形成が確認され、DP が Fn を活性化することが示された。

Fn は 12 個のタイプ I リピート (I_{1-12})、2 個のタイプ II リピート (II_{1-2})、15 個のタイプ III リピート (III_{1-15}) と呼ばれるドメインから構成されている。溶液中では III_{2-3} リピートと III_{12-14} リピートが相互作用し、Fn はらせん状の構造をとって安定化している。また Fn は III_{12-14} リピートと I_{1-5} リピートが相互作用することによって細線維を形成することが知られている。Fn の DP 結合部位は III_1 、 III_{13} 、 III_{14} リピートであり、 III_{13-14} リピートが最も優位であった。さらに DP は III_{2-3} リピートと III_{12-14} リピートの相互作用を抑制し、 III_{12-14} リピートと I_{1-5} リピートの相互作用を増強していた。このことから DP は、 III_{2-3} リピートと III_{12-14} リピートの相互作用を抑制することで Fn の高次構造を変化させ、また III_{12-14} リピートと I_{1-5} リピートの相互作用を増強することで、細線維を形成させていると考えた。

【結 語】以上より、仮マトリックスにおいて DP はフィブリン、Fn と相互作用し、Fn を活性化して細線維を形成させ、細胞接着を増強していると推察された。従来 Fn は細胞表面のレセプターである $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンと結合すると活性化し細線維を形成することが知られている。今回の研究で DP は Fn の活性化を惹起する初めての非インテグリン蛋白質であることが明らかになった。このように Fn を介して DP は創傷治癒を促進していると考えられた。