

氏名(本籍)	清水 良彦(滋賀県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第 515号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成18年3月24日
学位論文題目	ROCK-I regulates closure of the eyelids and ventral body wall by inducing assembly of actomyosin bundles (ROCK-I はアクチン繊維を束化させることにより胎児期の眼瞼閉鎖、腹壁閉鎖を制御する)
審査委員	主査 教授 竹内 義博 副査 教授 大路 正人 副査 教授 松浦 博

論文内容要旨

※整理番号	520	(ふりがな) 氏名	しみず よしひこ 清水 良彦
学位論文題目	ROCK-I regulates closure of the eyelids and ventral body wall by inducing assembly of actomyosin bundles (ROCK-Iはアクチン繊維を束化させることにより胎児期の眼瞼閉鎖、腹壁閉鎖を制御する)		
<研究の目的> Rho associated coiled-coil forming protein kinase (ROCK)は Rho の 標的タンパクとして 1996 年に同定された遺伝子であり、ROCK-I, -II の 2 つのアイソフォームをもつ。 Rho により活性化された ROCK-I はアクチン細胞骨格の制御を介して、細胞運動、接着、細胞質分裂など、多くの細胞反応の調節分子として機能していることが <i>in vitro</i> で示されている。アクチンは細胞膜直下の主要な細胞骨格であり、真核細胞の形態変化、細胞運動に不可欠なものであることから、発生における ROCK-I の重要性も予想されていた。われわれは哺乳類の発生において ROCK-I が果たす役割を分子細胞生物学的実験手法をもちいて解明することを実験の目的とした。			
<方法> Gene targeting により ROCK-I ノックアウトマウスを作成し、その表現型を解析した。			
<結果> ROCK-I ゲノムスクリーニング、ターゲティングベクターの作成、ES 細胞への導入、キメラマウスの作成、ヘテロマウスの作成を順次施行した。ヘテロマウスの雌雄を交配させることにより、ROCK-I ノックアウトマウスの作成に成功した。サザンブロットイング、PCR により ROCK-I 遺伝子が deletion されていること、ウェスタンブロットイングにより ROCK-I タンパクが消失していることを確認した。 ROCK-I ノックアウトマウスは胎児期の眼瞼閉鎖、生理的臍帯ヘルニア閉鎖に異常をきたし、新生児期に死亡するという表現型を示した。 野生型のマウスでは胎児期 16 日令に表皮で形成される上下の眼瞼が融合し、眼裂は閉鎖する。この眼瞼閉鎖は角膜やレンズの誘導・分化に必要と考えられている。野生型マウスでは眼瞼は閉鎖したまま出生し、生後 12 日前後に開眼する。一方、ROCK-I ノックアウトマウスでは開眼しながら出生していた。胎児期 16 日令の走査型電子顕微鏡による			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
 2. ※印の欄には記入しないこと。

検討、組織学的検討により 16 日令の眼瞼閉鎖が正常に行われていないことが判明した。

また、野生型のマウスでは胎児期 16 日令に腹壁の表皮が閉鎖して、生理的に腹腔外に脱出していた腸管(生理的臍帯ヘルニア)が腹腔内に戻る。同様に組織学的検討により、ROCK-I ノックアウトマウスではこの胎児期 16 日令の生理的臍帯ヘルニア閉鎖が正常に行われていないことが判明し、新生児臍帯ヘルニアの状態で出生していた。このヘルニアは母親マウスにより共食いされ、ROCK-I ノックアウトマウスは食殺される結果となった。

眼瞼閉鎖、生理的臍帯ヘルニア閉鎖のそれぞれの場所におけるアクチン細胞骨格が障害されている可能性があるとして、アクチン細胞骨格を染色するファロイデイン染色を施行した。結果、胎児期の眼瞼閉鎖、生理的臍帯ヘルニア閉鎖にはアクチン細胞骨格がそれぞれの場所でバントリング(アクチンがクロスリンクして太くなること)が必要であること、ROCK-I ノックアウトマウスではこのバントリングが正常に行われなかったために眼瞼閉鎖、生理的臍帯ヘルニア閉鎖が正常に行われなかったことが判明した。

これらの *in vivo* のデータを裏付けるために、野生型、ROCK-I ノックアウトマウス新生児から表皮を摘出し、角化細胞の初代培養を施行した。EGF 刺激により野生型の角化細胞ではアクチン細胞骨格のバントリングの形成が見られたが、ノックアウトマウスでは野生型と比較して明らかに形成が少なかった。

<考察>

胎児期の眼瞼閉鎖、生理的臍帯ヘルニアの閉鎖には ROCK-I 依存的な角化細胞内のアクチン細胞骨格のバントリングが必要であることが判明した。しかし、なぜアクチン細胞骨格のバントリングが眼瞼閉鎖、生理的臍帯ヘルニア閉鎖を引き起こすのかは不明のままである。*Drosophila* の dorsal closure においては角化細胞内でアクチン細胞骨格がバントリングすることにより収縮力が発生して dorsal closure が引き起こされることが証明されている。*Drosophila* dorsal closure とマウス胎児期の眼瞼閉鎖のメカニズムは形態的に、また関与している分子が酷似していることから、後者においてもアクチン細胞骨格のバントリングが収縮力を発生、閉鎖の原動力となっていると考えている。

EGF 受容体ノックアウトマウスが ROCK-I ノックアウトマウスと同様に胎児期の眼瞼閉鎖に異常をきたすこと、角化細胞の初代培養の実験結果から、EGF シグナリングの下流に ROCK-I が存在していることが明らかとなった。

<結論>

ROCK-I は *in vitro* のみならず、発生時期の生体内においても、アクチン細胞骨格の制御に関与していることが明らかとなった。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	520	氏名	清水 良彦
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>ROCK-I はアクチン細胞骨格の制御を介して、細胞運動、接着、細胞質分裂など、多くの細胞反応の調節分子として機能していることが <i>in vitro</i> で示されている。一方、これまで発生における ROCK-I の役割はほとんど明らかにされてこなかったが、細胞骨格を制御する分子であることから、発生における ROCK-I の重要性が予想されていた。本研究は、哺乳類の発生における ROCK-I の役割を解明することを目的とし、<i>gene targeting</i> により ROCK-I ノックアウトマウスを作成し、その表現型を解析したものである。</p> <p>ROCK-I ノックアウトマウスは胎児期の眼瞼閉鎖、生理的臍帯ヘルニア閉鎖に異常をきたし、新生児期に死亡するという表現型を示した。胎児期の眼瞼閉鎖、生理的臍帯ヘルニア閉鎖にはアクチン細胞骨格がそれぞれの部位で <i>bundle</i> 化 (束状化) される必要があること、ROCK-I ノックアウトマウスではこの <i>bundle</i> 化の異常により眼瞼閉鎖、生理的臍帯ヘルニア閉鎖が正常に起こらないことが判明した。</p> <p>以上の研究は、ROCK-I が <i>in vitro</i> のみならず、発生時期の <i>in vivo</i> においても、アクチン線維の束状化という、アクチン細胞骨格の制御に関与していることを明らかにしたものであり、博士 (医学) の授与に値するものと判定された。</p>			
(平成18年2月2日)			