

血管形成における ATX-LPA シグナルの役割の解明

分子細胞生化学分野 木瀬 亮次

【背景・目的】

オートタキシン (ATX) は lysoPLD 活性を有する分泌型の酵素であり、生理活性脂質リゾホスファチジン酸 (LPA) の産生酵素である。ATX は 7 つの遺伝子で構成される ENPP (ecto-nucleotide pyrophosphate/phosphodiesterase) ファミリーのメンバーであり、3 つのドメインから構成されるタンパク質であるが、酵素活性を担うドメイン以外のドメインの機能はわかっていない。近年の ATX の X 線結晶構造解析により、ATX は、LPA を保持し、提示する機能があることや、細胞膜と相互作用しながら機能していることが示唆されてきているがその詳細な検証は行われていない。

リゾリン脂質メディエーターである LPA は、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) である 6 種類の LPA 受容体 (LPA₁₋₆) を介して多彩な生理機能を発揮している。個々の LPA 受容体は異なるシグナル経路を活性化し、細胞によって異なるパターンで複数の LPA 受容体を発現するなどして LPA の多彩な機能を可能としている。LPA 受容体はタンパク質相同性から大きく LPA₁₋₃ と LPA₄₋₆ の 2 つに分けられる。それぞれの受容体群の LPA 受容体の X 線結晶構造解析の結果、LPA 受容体の LPA 受容機構が明らかにされてきており、LPA₁₋₃ は、細胞外から LPA が相互作用する一方で、LPA₄₋₆ は細胞膜中の脂質が側方拡散されることにより LPA が供給されることが示唆されている。このような LPA 受容体の違いから、LPA 産生の機序や場所により、活性化される LPA 受容体が異なっていることが示唆されるが、その詳細は不明である。これまでに LPA シグナルの解析には、LPA の添加による LPA 受容体の一過性の活性化による解析が行われてきたが、上記のように、ATX-LPA シグナルには、単なる LPA 添加だけでは評価できていない側面もあることが考えられる。

ATX の遺伝子欠損マウスは血管形成異常により胎生致死を示す。しかしながら、ATX-LPA シグナルが内皮細胞においてどのような機能を果たしているかはよくわかっていない。血管内皮細胞は、血管の内側を構成する細胞であり、常に血液にさらされている。血液中には ATX とその基質である LPC が豊富に存在することが知られ、血漿や血清の加温により LPA が産生されることから、生体内でも血管内皮細胞は常に LPA にさらされ、LPA シグナルが活性化されることが想定される。そこで、ATX 阻害剤を用いて ATX-LPA シグナルが内皮細胞にどのような細胞応答を引き起こしているのか

解析した。また、個体発生時の血管形成の過程をより詳細に解析するため、血管形成の解析に適したモデル生物であるゼブラフィッシュを用いた解析を試みた。ATX の機能を評価するため、*atx* 欠損フィッシュの作製を行い、個体レベルでの解析を行うことを目指した。また、ATX の LPA 産生以外の機能を明らかにすることを目的として、さまざまなアプローチで ATX と細胞膜との相互作用に関する検討を試みた。

【方法・結果】

まず、一般的に用いられる培養細胞である HEK293 細胞に ATX 阻害剤を処理し、細胞に与える影響を検討した。その結果、ATX 阻害剤処理により HEK293 細胞は湾曲し、細長い突起を生じるなどの細胞形態変化が観察された。ATX 阻害剤を処理した細胞では、アクチン繊維の数が少なくなっている様子が観察された。細胞のタイムラプス撮影を行うと、ATX 阻害剤を処理した細胞では細胞同士が接触を維持せずに、湾曲や突起を伸長させながら遊走している様子が観察された。そこで、ATX 阻害剤の細胞間接着に対する影響を調べると、HEK293 細胞に発現するカドヘリン分子である N-カドヘリンの細胞接着面におけるシグナルがまばらになり、減弱したことから、ATX 阻害剤は細胞間接着にも影響を及ぼしていることが示唆された。以上の結果から、ATX-LPA シグナルは恒常的に細胞に働きかけ、細胞形態や細胞間接着に影響を及ぼしていることが示唆された。

次に、内皮細胞における機能を明らかにするため、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いて、ATX 阻害剤を用いた同様の検討を行った。すると、ATX 阻害剤の処理により、細胞形態が変化する傾向が得られ、アクチン繊維の数の減少も観察された。アクチン繊維の数で細胞を 2 つに分類すると ATX 阻害剤処理によりアクチン繊維の少ない細胞の比率が増加していた。アクチン染色を行った際に、ATX 阻害剤を処理した細胞で細胞の縁にアクチンに富んだラメリポディアが生じていることが観察されたため、細胞のタイムラプス撮影を行い、アクチンの動的変化を観察した。すると、アクチン繊維の発達した多くの細胞でラメリポディアの伸長・退縮サイクルが繰り返されていたのに対し、ATX 阻害剤の処理で増加したアクチン繊維の少ない細胞群で、ラメリポディアが伸長し続ける様子が観察された。内皮細胞の細胞間接着因子であり、細胞接着面におけるラメリポディアの動きにより制御される VE-カドヘリンの局在を調べると、VE-カドヘリンの配置が接着面においてより幅広く配置を変化させ、網目状の構造を呈した。以

上の結果から、ATX はアクチンストレスファイバー形成、ラメリポディア制御、VE-カドヘリン制御などにより細胞遊走や形態形成に寄与していることが示唆された。

ATX と細胞膜との相互作用の有無を検討するため、以下の 3 つの方法で検討を行った。まず、血清飢餓処理による HEK293 細胞の細胞形態変化を利用した検討を行った。HEK293 細胞は血清飢餓の処理により 30 分後に顕著な細胞形態変化が観察され、リコンビナント ATX と LPC の同時添加により、細胞形態変化はほぼ完全に抑制される。このときの LPC の存在様式を、LPC と結合するアルブミン分子を用いて、LPC の形質膜との親和性をさまざまに変化させることで形質膜中の LPC 存在量を変化させ、検討を行った。しかし、LPC の存在様式による ATX の機能の変化は認められなかった。形質膜中のリゾリン脂質の量を操作した後に、ATX のみを添加し、形質膜中の基質を利用した際の効果を検討したが、形質膜中のリゾリン脂質量の操作による顕著な影響は観察されず、ATX が形質膜中の基質を利用している証拠は得られなかった。次に、ATX と形質膜上の ATX 相互作用タンパク質の結合を阻害する抗 ATX 抗体の探索を行った。これまでに作製されてきた 17 種類の抗 ATX 抗体に関して、ATX と形質膜上の ATX 相互作用タンパク質の結合を阻害することで細胞形態が変化する抗体クローンが存在するか検討を行ったが、いずれの抗体クローンも細胞形態に顕著な変化を引き起こさず、ATX が形質膜と相互作用して機能している証拠を確認することはできなかった。最後に、近接タンパク質のビオチン化法である BioID 法を用いて、形質膜に存在することが想定される ATX 相互作用タンパク質の同定を試みた。ATX と、近接するタンパク質のリジン残基を無作為にビオチン化する BirA*タンパク質の融合タンパク質を細胞外から作用させ、ATX の近傍に存在するタンパク質の同定を試みた。しかし、ATX と BirA*の融合タンパク質が顕著にビオチン化を亢進する様子は観察されず、形質膜上の ATX 相互作用タンパク質の同定には至らなかった。

血管形成解析を行うためゲノム編集技術 TALEN によりデータベースに唯一登録されている *atx* 遺伝子の欠損ゼブラフィッシュを作製したが、予想外にも血管形成異常や酵素活性の消失が確認されなかった。ゼブラフィッシュではしばしば遺伝子が重複して存在することからゼブラフィッシュゲノム中にデータベースに登録されていない *atx* 遺伝子が存在すると仮説を立て、既知の *atx* 遺伝子のタンパク配列を元に BLAST を用いたホモロジー検索で *atx* の重複遺伝子を探索した。その結果、60%のタンパク質配列の類似性を示し、同様の酵素活性を有する *atx* 遺伝子を単離し、*atxb* と命名した。

【考察・今後の展望】

ATX 阻害剤を用いて ATX-LPA シグナルの機能を阻害した際の細胞に対する影響を検討した結果、ATX-LPA シグナルは恒常的に働きうることが示唆された。生体内では、さまざまな生体内液で LPA が持続的に存在する状況が存在することが知られており、生体内でも ATX による LPA 産生を介して、LPA シグナルが持続的に機能していることが想定される。また、HEK293 細胞、HUVEC のいずれの細胞においても、アクチン繊維やカドヘリン分子に対する影響が観察されたことから、さまざまな細胞種で持続的な LPA シグナルが機能していることが想定される。HUVEC はラメリポディアの運動が盛んな細胞であり、隣り合う細胞と VE-カドヘリンのリモデリングを起こすことが知られている。VE-カドヘリンは、隣り合う細胞とのコミュニケーションに重要であることが明らかになってきており、細胞の集団としての協調的な遊走過程に重要であることが示唆されている。これまでに、内皮細胞の管腔形成アッセイなどで ATX は細胞の集団としてのふるまいに影響を与えることが示唆されており、本研究の結果と一致した結果であると考えている。以上のことから、本研究での ATX 阻害剤処理時の VE-カドヘリンの異常は、細胞間のコミュニケーションや力の伝達に影響を及ぼすことにより細胞集団の遊走を制御していることが考えられる。これまでに解析の進んでいる VEGF などの受容体型チロシンキナーゼを介する血管新生因子は、細胞の化学誘引活性や細胞増殖活性による新生血管の出芽などにより機能することが示唆されてきているが、GPCR に起因するシグナルがどのように血管形成に寄与しているかはあまりわかっていない。ATX-LPA シグナルは、血管形成へ至る細胞の集団としての運動過程を巧妙に制御することで血管形成に寄与する役割を担っていることが想定される。またその他に、ATX が細胞膜中のリゾリン脂質を認識し、細胞膜と相互作用することにより機能しているのではないかと考え、その可能性を検証したが、有力な証拠は得られなかった。しかし、いずれも酵素活性以外の ATX の機能を否定するものではなく、形質膜上のリゾリン脂質の変化なども含めた解析が必要であると考えられる。また、今回、ゼブラフィッシュにおける第二の ATX の同定に成功した。今後、*atxb* を欠損したゼブラフィッシュや *atxa*、*atxb* の同時欠損ゼブラフィッシュを作製し、その血管形成過程を解析することにより ATX の個体レベルでの血管形成における機能が明らかになるとと思われる。

論文審査結果の要旨

論文提出者: 木瀬 亮次

論文審査委員 (主査): 稲田 利文

論文題目: 血管形成における ATX-LPA シグナルの役割の解明

オートタキシン (ATX) は lysoPLD 活性を有する分泌型の酵素であり、生理活性脂質リゾホスファチジン酸 (LPA) の産生酵素である。リゾリン脂質メディエーターである LPA は、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) である 6 種類の LPA 受容体 (LPA₁₋₆) を介して多彩な生理機能を発揮する。LPA シグナルの解析には、LPA 添加による LPA 受容体の一過性の活性化による解析が行われてきたが、ATX とその基質である LPC が生体液中に豊富に存在することや ATX には形質膜脂質を基質とした機能発現機構が想定されることなどから、ATX-LPA シグナルには、単なる LPA 添加だけでは評価できていない側面があることが考えられる。本研究では、上記の点に関して様々な観点から検討を行ったほか、ATX が重要な機能を担っていることが示唆される内皮細胞における ATX の機能を解析した。

第 1 章では、HEK293 細胞において ATX 阻害剤を用いることで ATX が細胞形態に重要であることが示唆された。細胞のライブイメージングなどにより、ATX-LPA シグナルを介したアクチン、カドヘリンの制御により細胞形態、細胞間接着が制御されていることが示唆された。

第 2 章では、HUVEC において ATX-LPA シグナルがラメリポディアの制御に寄与していることが示唆された。ATX はアクチンストレスファイバーの形成に寄与し、ラメリポディアの退縮を促進する役割を担っていることが示唆された。ATX 阻害剤の処理時には、VE-カドヘリン分子の接着部位での局在化にも影響がある様子が観察され、ATX-LPA シグナルは内皮細胞の血管としての機能を制御していることが示唆された。

第 3 章では、アルブミンを用いた基質の状態の検討、抗 ATX 抗体による ATX と形質膜の相互作用の検討、BioID による ATX 相互作用分子の探索などを行い、ATX の形質膜上での機能に関する検討研究を行った。

第 4 章では、血管形成の解析に適したモデル生物であるゼブラフィッシュにおいて、ATX の機能を評価するため *atx* 欠損フィッシュの作製を行った。解析を進める中で、第二の ATX 分子 ATXb を同定し、ATXb が ATX と同様の酵素活性を有していることを示した。

本研究は、細胞の培養過程において ATX-LPA シグナルが常に機能していることを示唆し、ATX-LPA シグナルが働かない際に G12 経路を介した細胞骨格制御や細胞間接着制御が正常に働けなくなることを明らかにした。また、ゼブラフィッシュにおける第二の ATX を同定し、今後の ATX 研究の展開にも期待を持てる研究成果である。よって、本論文は博士 (薬科学) の学位論文として合格と認める。

(991 文字)