

論 文 要 旨

Latent TGF- β binding protein-2 is essential for the development of ciliary zonule microfibrils

(LTBP-2は毛様小帯のミクロフィブリル形成に必須である)

関西医科大学形成外科学講座
(指導：楠本 健司 教授)

井 上 唯 史

【はじめに】

LTBP (Latent TGF- β binding protein)は、LTBP-Fibrillinファミリーに属する分泌タンパク質であり、マイクロフィブリルと結合して細胞外マトリックスにTGF- β を蓄える作用をしている。LTBPの4つのファミリー分子の中でもLTBP-2だけはTGF- β と結合せず、そのノックアウトマウスは胎生早期致死であると報告されていたため、生体内における役割は分かっていなかった。最近、ヒトのLTBP2の変異家系が複数見つかかり、そのホモ変異患者は、成長に問題はないが、先天性緑内障・水晶体脱臼を発症することが報告された。これは以前のマウスの報告と異なるため、今回、新たにLtbp2ノックアウトマウスを作成し、表現型を解析した。さらに今まで報告されている変異家系のLTBP2遺伝子から生じる変異タンパク質を作成し、機能解析を行った。

【方法】

Ltbp2ノックアウトマウスの作製と表現型解析

遺伝子組み換えにより作製したLtbp2 floxマウスから、全身でLtbp2を欠損するマウス (Ltbp2^{-/-}マウス) を作成し、その表現型を検討した。

マイクロフィブリル形成におけるLTBP-2の機能解析

ヒト毛様体細胞にLTBP2 siRNAを導入し、マイクロフィブリル形成をin vitro で解析した。Ltbp2^{-/-}マウス眼球を組織培養し、LTBP-2タンパク質を加えることでマイクロフィブリル形成が回復するかを解析した。

LTBP2変異家系の表現型に対する原因解析

293T 細胞に LTBP2 フラグメント cDNA を導入し、LTBP-2 の断片化タンパク質を作成した。この断片化タンパク質とマイクロフィブリルを形成する Fibrillin-1 タンパク質との結合実験を行った。さらに、ヒトで緑内障と水晶体脱臼が起こると報告されている LTBP2 遺伝子変異の中から、C末端近傍にある Fibrillin-1 結合ドメインを残しているもの4つを選び、そのcDNAを293T細胞に導入し、変異タンパク質が分泌されるかどうか、また Fibrillin-1 との結合能を持っているかどうかを検討した。

【結果】

我々の作成した Ltbp2^{-/-}マウスは出生し、成長にも問題はなかった。眼圧は野生型マウスと同等であり、緑内障を示唆する所見は得られなかった。しかし、水晶体を支持するマイクロフィブリルよりなる毛様小帯の形成不全を認め、水晶体脱臼を発症した。

培養ヒト毛様体細胞にLTBP2 siRNAをトランスフェクションすることによりLTBP-2タンパク質の発現を抑えるとマイクロフィブリル形成は阻害され、リコンビナントLTBP-2タンパク質を加えると線維形成が回復した。組織培養では、

Ltbp2^{-/-}マウス眼球であってもリコンビナントLTBP-2タンパク質を加えると、ミクロフィブリルの線維束である毛様小帯が形成された。

断片化タンパク質による結合試験では、C末端から2番目(cb-EGF様リピート領域)のドメインのみがFibrillin-1タンパク質と結合した。ヒトLTBP2遺伝子変異からできる変異タンパク質はいずれも293T細胞から分泌されず、コンフォメーション異常をおこすものと考えられた。Fibrillin-1との結合実験では、4つのうち3つのLTBP-2変異タンパク質が結合能を失っていた。

【考察】

我々の作成した *Ltbp2*^{-/-}マウスは、ヒトの *LTBP2* 変異家系と同様の表現型である水晶体脱臼を示したものの緑内障を発症しなかった。*LTBP2* ホモ変異による緑内障は二次的な症状であると考えられた。ヒトの培養細胞とマウスの組織培養の結果から、LTBP-2は、眼の毛様小帯ミクロフィブリルの線維束形成に必要であると考えられた。Fibrillin-1とLTBP-2タンパク質あるいはLTBP-2変異タンパク質の分泌実験と結合実験から、変異家系で起きている水晶体脱臼は、LTBP-2の分泌能に障害があるか、分泌されてもFibrillin-1と結合できず、ミクロフィブリル形成に寄与できないことが原因であると示唆される。

本研究は、これまで全く未知であったLTBP-2の生体内における機能を明らかにした。LTBP-2がミクロフィブリルを束ねる分子機構、LTBP-2が発現する他の組織(皮膚や肺や血管)のミクロフィブリルが*Ltbp2*^{-/-}マウスで正常であった理由、*Ltbp2*^{-/-}で眼圧が上昇しなかった理由、等については今後明らかにすべき課題である。