

氏名(本籍)	おお と たつ ゆき 大 戸 達 之 (茨 城 県)
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	博 甲 第 2928 号
学位授与年月日	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Identification of RsulfFP1 as a novel non-lysosomal sulfatase expressed in the floor plate, choroid plexus and cartilage (フローアプレート、脳室脈絡叢及び軟骨に発現する、非リソソーム型の新規スルファターゼ遺伝子-RsulfFP1 の単離と解析)
主 査	筑波大学教授 理学博士 坂 内 四 郎
副 査	筑波大学助教授 博士(獣医学) 杉 山 文 博
副 査	筑波大学講師 博士(医学) 一 條 裕 之
副 査	筑波大学講師 医学博士 山 本 三 幸

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

発生期の脊髄腹側正中部に位置するフローアプレートは、神経軸索ガイダンスや細胞分化を担う重要な細胞群である。例えばフローアプレートから分泌される軸索ガイダンス蛋白netrin-1は交連神経軸索を腹側正中部へと導き、モルフォゲンであるSonic hedgehogは運動ニューロンの分化を誘導する。本研究は、フローアプレートの多彩な機能を担う新規の遺伝子を単離し、解析する事を目的とした。

(対象と方法)

胎生13日ラットの脊髄フローアプレート細胞と脊髄背側片からRNAを抽出し、suppression subtractive hybridization法により、フローアプレートに特異的に発現する遺伝子のスクリーニングを行った。得られた遺伝子の中からスルファターゼ族に相同性を持つ遺伝子に注目して完全長cDNAを単離し、塩基配列を決定した。次に、*In situ* hybridizationとNorthern blot法によりmRNAの発現部位を調べた。更に、この遺伝子を培養細胞に発現させて、蛋白質の局在について調べた。

(結果)

既知のスルファターゼと相同性をもつ4.1kbpの新規スルファターゼcDNAが得られ、RsulfFP1と命名した。予想されるアミノ酸は870残基から成り、N末端にシグナル配列を持っていた。RsulfFP1はスルファターゼ族に共通して保存されたアミノ酸配列を持ち、非アリルスルファターゼ型のスルファターゼと考えられた。またその相同遺伝子が線虫、ショウジョウバエ、ウズラ、ヒトで存在する事が明らかとなった。*In situ* hybridizationの結果、RsulfFP1 mRNAは胎生期ラットの脊髄フローアプレートの他、脳室脈絡叢、軟骨形成部位に強く発現し、生後には視床下部や大脳皮質にも発現していることが分かった。Northern blot法では、RsulfFP1 mRNAの成体ラットでの発現は、脳室脈絡叢で最も強く、脳、眼、脊髄、肺、膀胱、精巣、卵巣、子宮にも発現が認められた。C末端にgreen fluorescent protein (GFP)を付加したRsulfFP1を培養細胞に発現させて細胞内局在について調べたところ、

RsulFP 蛋白質は細胞内では主にゴルジ体と小胞体に局在し、リソソームには存在しなかった。また RusulFP1 蛋白質は培養細胞の細胞外にも存在するが、Western blot 解析の結果、細胞外の RsulFP1 蛋白質は培養液中には放出されず、細胞膜表面に結合して存在していることが明らかになった。

(考察)

既知のスルファターゼの多くがリソソームでグリコサミノグリカン等に作用するのに対し、RsulFP1 はゴルジ体と小胞体に局在することから、蛋白質の合成過程において機能している可能性が示唆された。また RsulFP1 は細胞外にも存在することから、細胞膜表面においてグリコサミノグリカン等の脱硫酸化を行う可能性も考えられた。グリコサミノグリカンは硫酸基に富む細胞外基質の成分であり、発生におけるシグナル伝達に重要な役割を担っていることから、RsulFP1 が胎生期のラット脊髄フロアプレートや能室脈絡叢、軟骨形成部位においてグリコサミノグリカン等の硫酸化の微細構造を変化させ、形態形成シグナル分子の情報伝達に重要な役割を担っている可能性が考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

硫酸化 (スルフェーション) は多糖類などの構造や機能を修飾するものとして注目されている。本研究で胎生期の神経組織分化に重要な役割をもつフロアプレートに選択的に発現しているスルファターゼを新たに同定したことは高く評価できる。見いだされたこの酵素の局在も特異で、その機能としてはグリコサミノグリカン等の脱硫酸化を介して、形態形成におけるシグナル伝達を行う因子である可能性が考えられる。これらの想定される機能についての研究や病態との関連などは、今後の興味ある課題であり、その解明が期待される。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。