

氏名(本籍)	ごとうまさのり 後藤雅式(愛知県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博乙第1963号		
学位授与年月日	平成15年10月31日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Molecular Cloning and Characterization of Two Glycosyltransferases Responsible for the Synthesis of Chondroitin Sulfate. (コンドロイチン硫酸を合成する2種類の糖転移酵素遺伝子のクローニングとその特性評価)		
主査	筑波大学教授	医学博士	大塚藤男
副査	筑波大学教授	医学博士	加藤光保
副査	筑波大学教授	医学博士	高橋智
副査	筑波大学教授	医学博士	三輪正直

論文の内容の要旨

(目的)

コンドロイチン硫酸はN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) とグルクロン酸 (GlcA) が交互に繋がった多糖類でガラクトサミン残基の一部が硫酸エステル化されている。軟骨のみならず、脳、皮膚、筋肉等あらゆる組織の細胞外マトリックスの主要成分であり、成長因子受容や神経突起伸張促進にも関係するが、その合成機序には不明な点も多い。合成機序の一部を明らかにし、関節疾患、その他の疾患の原因解明の一助とするために、機能ドメインに含まれる2種の糖転移酵素モチーフの存在を指標に糖転移酵素をデータベースで検索し、遺伝子をクローニングし、その遺伝子産物の特性を評価した。

(対象と方法)

コンドロイチン硫酸の基本骨格 (GalNAc β 1-4GlcA β 1-3) $_n$ を元に、既存のB4-糖転移酵素 (B4-GT)、B3-糖転移酵素 (B3-GT) のアミノ酸配列をクエリーにしたBlast検索によりEST (expressed sequence tags) データベースから候補遺伝子を探索した。得られた結果をもとに5'-RACE (5'-rapid amplification of cDNA ends) 法により、完全長ORF情報を取得した。膜貫通ドメインを除く全長を昆虫細胞あるいはCOS-1細胞で発現させ、単糖及びポリマー糖鎖受容体を用いて基質特異性を解析した。また、リアルタイムPCR法を利用して各種組織における遺伝子発現を定量した。

(結果)

1. データベース検索

6種類の候補遺伝子を見出した。2種類はB3-GTとB4-GT両者、2種類はB4-GTのみ、残りの2種類はB3-GTのみのモチーフを有するタンパク質をコードしていた。B4-GTモチーフのみ (CSGalNAc-T1) とB3-GTモチーフのみ (CSGlcA-T) の各1種類の糖転移酵素としての特性を評価した。

2. CSGalNAc-T1 (GenBank Accession No. AB081516) の特性評価

本タンパク質の膜貫通ドメインを除いた可溶性領域はGalNAcをGlcAに転移する活性のみを有した。GalNAc-GlcA構造はコンドロイチン硫酸に特異的なので詳細に基質特異性を解析すると、リンケージ4糖ならびにコンドロイチンに高い転移活性を示し、コンドロイチン硫酸にもある程度の活性を示すことが明らかになった。また、本酵素を用いて試験管内でのコンドロイチン5糖合成にも成功した。さらに、本遺伝子は調べた限り全ての組織で発現しており、コンドロイチン硫酸の組織分布とも一致していた。

3. CSGlcA-T (かずさDNA研究所クローン KIAAI402) の特性評価

本タンパク質の膜貫通ドメインを除いた可溶性領域はコンドロイチンや11糖程度の短鎖コンドロイチン硫酸にGlcAを転移する強い活性を有し、その発現組織分布もコンドロイチン硫酸合成に関与する糖転移酵素であることを示唆した。

(考察)

本研究では2種類のヒト糖転移酵素遺伝子をクローニングし、一方はGlcAにGalNAcを転移するCSGalNAc-T1、もう一方はGalNAcにGlcAを転移するCSGlcA-Tであった。CSGalNAc-T1はリンケージ4糖へのGalNAc転移活性が最も強く、CSGlcA-Tは11糖程度の短いコンドロイチン硫酸へのGlcA転移活性が最も強いという特徴を有していた。またこれら酵素により試験管内でコンドロイチン5糖合成にも成功した点でもコンドロイチン鎖合成に関係する可能性を強く示唆するものである。このほかにも4種類の糖転移酵素遺伝子を分離しており、何れもコンドロイチン硫酸の基本骨格の合成に関与している可能性が高い。6種類の酵素がどのようなメカニズムでコンドロイチン鎖を合成しているかを解明することが今後の課題で、1種類の活性に2種類ずつ酵素があるようで、その意義を解明する予定である。コンドロイチン硫酸とならびグリコサミノグリカンの代表であるヘパラン硫酸の場合には、5種類の糖転移酵素が協調的にヘパラン鎖を合成することが知られており、コンドロイチン鎖合成も同様な複合体を形成している可能性もある。さらに、各種関節疾患の原因遺伝子の可能性もあり、患者サンプルを用いたSNPsや変異解析も興味深い課題である。

審査の結果の要旨

本研究では2種類のヒト糖転移酵素遺伝子をクローニングし、一方はGlcAにGalNAcを転移するCSGalNAc-T1、もう一方はGalNAcにGlcAを転移するCSGlcA-Tであった。CSGalNAc-T1はリンケージ4糖へのGalNAc転移活性が最も強く、CSGlcA-Tは11糖程度の短いコンドロイチン硫酸へのGlcA転移活性が最も強いという特徴を有していた。また前者により試験管内でコンドロイチン5糖合成にも成功している。参考論文でGalNAc転移活性を有するCSGalNAc-T2を明らかにしているが、これが主としてコンドロイチン硫酸合成の初期反応に、CSGalNAc-T1が糖鎖の延長に作動している可能性を指摘している。新しい遺伝子を探索してコンドロイチン硫酸合成に関与する酵素を明らかにした点で意義深い研究とすることができる。また、これまで十分解析できていない遺伝子も残されており、コンドロイチン硫酸合成機序をさらに解明するよう期待したい。

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。