

審査の結果の要旨

氏名 建石 綾子

本研究は、SHR(高血圧自然発症ラット)の血管平滑筋細胞を用いて、その増殖と細胞膜糖タンパク質の N-型糖鎖の変化との関係、及びその原因となる遺伝子変化を解析した。糖鎖は翻訳後修飾の一つとして注目されており、特に細胞表面のタンパク質に結合した糖鎖は、細胞の接着や情報伝達に深く関与することが明らかになりつつあり、癌細胞などではその増殖制御異常との関係が報告されている。

まず、SHR と対照の WKY (Wistar-Kyoto)ラットの大動脈から血管平滑筋細胞の初代培養を樹立し、細胞増殖曲線を作成。その細胞増殖特性の差を明らかにした。次に、培養細胞の膜タンパク質を調整し、レクチンプロットにより糖鎖修飾を解析した。その結果 N-型糖鎖の高分岐化が示され、その原因遺伝子となりうる、GlcNAcT (N-acetylglucosaminyltransferase) V や GalT (β 1,4-galactosyltransferase) I ~ VIについてノザンプロットで解析した。その結果高分岐化を起こす GlcNAcTVは上昇、その基部となるガラクトースを転移する GalT については、癌細胞とは異なることが明らかとなった。現時点では GalT の基質は明確でなく、糖鎖が細胞増殖に関わる機序と共に考察した。

以上、本論文は SHR の血管平滑筋細胞の増殖における、細胞表面の糖タンパク質糖鎖の変化という新しい知見を明らかにした。循環器領域における翻訳後修飾と細胞増殖の関係は、高血圧や動脈硬化の機序解明の一助となりうる点が評価され、学位の授与に値するものと考えられる。

尚、審査会において以下のような質疑応答があり、それに沿って論文の記述を訂正した。

- ・細胞表面の糖鎖という視点が新しく興味深い。
- ・高血圧への関与は本研究では触れておらず、細胞増殖に話を絞った方がよい。
- ・糖鎖は遺伝子の発現のみで調節されるのか。→今のところ他の調節因子は見つかっていない。
- ・培養細胞はどの時期のものを使用したのか。→飽和密度となる少し手前、培養 5-7 日目の hills and valleys を示さない増殖期の細胞を回収して実験に使用した。
- ・大動脈をそのままレクチンプロット解析したらどうなるか。→ラット 3 匹分で行ったが、得られるタンパク質量が少なく、レクチンとの反応が非常に弱く解析できなかった。

- ・レクチンプロットにおいてCBBでWKYとSHRに差があるように見え、タンパクに差があるために糖鎖に差があるだけではないのか。→提出した論文の写真では一部スミアになってしまい差があるように見えるが、何度も繰り返した実験ではほとんど差はなかった。
- ・たまたま二つの事象が同じ転写因子の系の末端として起こっているだけではないのか。追加実験として遺伝子変化を導入すると細胞増殖に実際に変化が起こるか。→癌細胞においてはそのような実験が行われているが、現在研究室がなくなり物理的にも追加実験を行うことは難しいため、考察で触れた。
- ・Working hypothesisの図を入れる。
- ・実際に自分の行った実験と考察をはっきり区別して記述する。
- ・糖鎖は増殖に実際にどのように関与するのか →糖鎖は、分子の立体構造や可塑性、親水性を変化させてタンパク質間相互作用などに影響すると考えられている。
- ・SHRのVSMCの増殖においてG1,G2が短縮していることがわかっており、それとどう関係するか。
- ・転写因子のレベルではどういったことがわかっているのか。
→既存の報告より考察に加えた