

(別紙様式第3号)

論文要旨

論文題目

Structure of the human acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-2 (ACAT-2) gene and its relation to dyslipidemia

(ヒト ACAT-2 遺伝子の構造解析及びその変異と脂質異常の関連)

氏名 勝連啓介 

論文要旨

1

| |
|--|
| 【目的】 ACATはコレステロールエステル(CE)の生成を触媒する小胞体酵素である。ACATには2つのアイソザイムが存在し、マウスではACAT-1はステロイド産生細胞や動脈硬化病変のマクロファージにおいて、CEを蓄積する役割をもつ。一方、ACAT-2は肝臓におけるVLDLの合成、小腸におけるカイロミクロンの合成に重要である。また、サルの肝臓ではACAT-2が主に発現していることから、私達はヒト肝臓の主要なACATアイソザイムはACAT-2であろうと推論し、ACATによるCEの生成が、血中リポ蛋白の動態にどう影響を及ぼすか検討するためには、まずヒトACAT-2の遺伝子構造を解明し、次にその変異を解析して脂質異常との関連を検討した。 |
| 【方法 - 遺伝子構造解析】 ACAT-2 cDNA特異的なプライマーを用いたPCR (polymerase chain reaction) 法でヒトPAC genomic libraryをスクリーニングした。 |
| 単離したPACクローンは制限酵素BamHIで消化し、プラスミドベクターにサブクローング |

した。次にエクソンを含むサブクローンを得るためには、ACAT-2 cDNAの断片を用いてdot blot hybridizationでスクリーニングし、単離したクローナンをシーケンスして、塩基配列を決定した。

【方法 - 患者解析】高脂血症91名、正脂血症96名を対象として、PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法を用いて、ACAT-2 遺伝子変異と血清脂質・アポ蛋白レベルとの関連を検討した。

【結果】ヒト ACAT-2 遺伝子の coding region は全長 21 kb の genomic DNA 上に 15 個のエクソンを含んでいた。その塩基配列は報告されている ACAT-2 cDNA と完全に一致し、各々のエクソン - イントロン境界はスプライス部位のコンセンサス領域と一致した。変異解析では E14G 、 T254I 、 IVS7-35G→A の 3 つの変異を発見した。 E14G と IVS7-35G→A では、血清脂質・アポ蛋白濃度との関連は見出せなかつたが、 T254I ヘテロでは、高脂血症群及び正脂血症群とも野生型に比べ

血清アポC-3濃度が高値を示した。またトリグリセリド(TG)濃度には有意差はなかった。

【考察】ACATアイソザイムの組織分布については、最近種により違いがあることがわかつてきた。マウス、サルの肝臓はACAT-2優位だが、ヒト成人肝細胞にはACAT-1が優位に発現していたとの報告がある(Chang,2000)。またヒト腸管細胞においてはACAT-1、2共に発現しているが、CEのカイロミクロン合成にいずれが関与しているか、まだ解明されていない。私達はACAT-2の変異は血中リポ蛋白の動態と関連すると考え検討した結果、T254Iへテロの症例では、野生型に比べ血清アポC-3濃度が高値を示した。また高脂血症群ではTGは高い傾向にあった。アポC-3はTGリッチリポ蛋白の主要な蛋白で、in vitroではアポC-3はリポ蛋白リバーゼを阻害し、TGリッチリポ蛋白の肝への取り込みを阻害する(Wang,1985)ため、ACAT-2が腸管でアポC-3とTGのアセンブリーに関与している可能性が示唆された。

(別紙様式第7号)

論文審査結果の要旨

| | | | | |
|--------|--------------|------------|-------|-------|
| 報告番号 | * 課程博 論文博 | 第 号 | 氏名 | 勝連 啓介 |
| 論文審査委員 | | 平成13年12月5日 | | |
| | | 主査教授 | 武藤 良彌 | 勝連 印 |
| | | 副査教授 | 菊谷 研一 | 御 |
| | | 副査教授 | 陣野 吉廣 | 勝連 |

(論文題目)

Structure of the human acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-2
(ACAT-2) gene and its relation to dyslipidemia

(論文審査結果の要旨)

上記の論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義、学術的水準等につき慎重かつ公正に検討し、以下のような審査結果を得た。

1. 研究の背景と目的

ACAT(acyl-CoA:cholesterol acyltransferase)はfree cholesterolをエステル化する酵素である。ACAT-1とACAT-2の2つのアイソザイムが存在し、ACAT-1はほとんどの組織に発現しているが、ACAT-2はマウス、サルでは主に肝臓、小腸に発現している。私たちは、ACAT-2遺伝子の異常が血中リポ蛋白の動態に影響を与え、脂質異常症の一因になると推測した。この仮説を検証するために、ACAT-2遺伝子構造の解明と変異検出を行い、脂質異常症との関連を検討した。

2. 研究内容

【方法-遺伝子構造解析】 ACAT-2 cDNA 特異的なプライマーを用いた PCR (polymerase chain reaction)法でヒト PAC genomic library をスクリーニングした。単離した PAC クローンは *Bam*HI で消化し、プラスミドベクターにサブクローンングした。次にエクソンを含むサブクローンを得るために、ACAT-2 cDNA の断片を用いて dot blot hybridization を行い、単離したクローンをシークエンスして、塩基配列を決定した。

備考 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書とすること。

2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。

3 *印は記入しないこと。

【方法-患者解析】高脂血症 91 名、正脂血症 96 名を対象として、PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)法を用いて、ACAT-2 遺伝子変異と血清脂質・アポ蛋白レベルとの関連を検討した。

【結果】ヒト ACAT-2 遺伝子の coding region は全長 21 kb の genomic DNA 上に 15 個のエクソンを含んでいた。変異解析では E14G、T254I、IVS7 -35G→A の 3 つの変異を発見した。T254I ヘテロでは、野生型に比べ血清アポ C-3 濃度が高値を示した。またトリグリセリド(TG)濃度には有意差はなかった。

【考察】ACAT アイソザイムの組織分布について、最近、ヒト肝細胞では ACAT-1 が発現していると報告されたことと今回の私達のデータから、ヒト肝臓における VLDL 合成は ACAT-1 が、腸管におけるカイロミクロンの合成は ACAT-2 がそれぞれ関与していると考えられた。

3. 研究成果の意義と学術水準

この研究は、独自にヒト ACAT-2 遺伝子構造を解明し、初めて患者解析を可能にして、高脂血症患者の血中アポリポ蛋白の動態を、TG rich lipoprotein の合成の面から説明しようと試みたものである。今後、リポ蛋白異常症の発症機序を解明していく上で、今回の成果はその基礎と成るべく有意義なものと考えられ、高く評価されるものである。

以上により、本論文は学位授与に十分に値するものであると判断した。