

別紙 1-1

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	甲	第	号
------	---	---	---	---

氏 名 三田 直美

論 文 題 目


Vwf K1362A resulted in failure of protein synthesis in mice

(*Vwf* K1362A はマウスではタンパク合成不全を呈する)

論文審査担当者


名古屋大学教授

主 査 委員

清井 仁 

名古屋大学教授

委員

木村 宏 

名古屋大学教授

委員

室原 豊明 

名古屋大学教授

指導教授

中村 栄男 

論文審査の結果の要旨





フォン・ヴィレブランド因子(VWF)は一次止血において、ずり応力下でVWFのA1ドメインが血小板 GPIb と結合し、血小板凝集を惹起させる働きをもつ。今回の研究では A1 ドメインに存在する Lys1362 をアラニンに置換したノックインマウス(K1362A)を作成し詳細な解析を行った。K1362A ノックインマウスにおいて VWF の mRNA は確認されたが、血中及び血管内皮細胞中に VWF 抗原を確認できなかった。原因として、転写後の過程で VWF 合成に障害を来していると考えられた。立体構造解析の結果、K1362A 変異によりアミノ酸側鎖が短くなり、表面電荷も変化することが予測された。マウスにおいて K1362 部位は血小板との結合だけでなく VWF 生成においても重要である可能性が示唆された。

本研究に対し、以下の点を議論した。

1. 野生型および K1362A マウスにおいて、*Vwf* mRNA は RT-PCR において肺、心臓、肝臓のすべての臓器で発現が検出されたが、K1362A マウスでは Real-time PCR で評価可能なレベルの発現がみられたのは肺のみで、野生型と比較した K1362A ホモ接合体マウスの肺における *Vwf* mRNA 発現量は 60%、VWF ノックアウトマウスは 7%であった。肺と比較して心臓と肝臓は *Vwf* mRNA 発現レベルが低く、これは野生型および K1362A マウスで同様の傾向を示した。
2. K1362A マウスでは *Vwf* mRNA の発現は確認できたが、肺の内皮細胞における免疫染色では VWF の発現を認めなかった結果から、転写後の過程で異常を来したと推測した。ヒトとマウス A1 ドメインに K1362A 変異を加えた三次構造シミュレーションモデルで立体構造解析を行った結果では、リジンからアラニンへのアミノ酸変化は、アミノ酸側鎖が短くなると考えられ、マウス A1 ドメインでは蛋白質表面に小さな凹みが形成され、表面電荷も変化することが予測された。K1362A 変異は、正に荷電したリジンの 4-アミノブチル基の損失をもたらすことが推測され、蛋白質構造に予想外の影響を及ぼし得ると考えられる。
3. K1362A ホモ接合体マウスは特に問題なく生まれ、自発的な出血は認められなかった。しかし、出血時間では VWF ノックアウトマウス同様に延長が認められ、ROTEM 解析においても VWF ノックアウトマウスに匹敵する凝固時間の延長が確認できた。

以上の理由により、本研究は博士(医学)の学位を授与するに相応しい価値を有するものと評価した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※甲第	号	氏名	三田 直美
試験担当者	主査 清井 仁  木村 宏  室原 豊明  指導教授 柳 孝男 			

(試験の結果の要旨)

主論文についてその内容を詳細に検討し、次の問題について試験を実施した。

1. 肺、心臓、肝臓におけるVwf mRNA発現量について
2. K1362AマウスにおけるVWF合成不全のメカニズムについて
3. K1362Aマウスの出血症状について

以上の試験の結果、本人は深い学識と判断力ならびに考察力を有するとともに、臓器病態診断学一般における知識も十分具備していることを認め、学位審査委員合議の上、合格と判断した。