

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成14年度博士課程進学

氏名： 竹山 夏実

指導教員名： 小野寺 節

論文題目

Distribution Patterns of Insulinoma Associated Protein 2, IA-2 and IA-2 β in
Neuroendocrine Cells and Tissues

(マウス神経内分泌組織、細胞における膵島細胞腫関連蛋白、
IA-2 および IA-2 β の分布)

序論

膵島細胞腫関連蛋白 IA-2 および IA-2 と高い相同性を持つ IA-2 β は、1990 年代に相次いで同定された蛋白である。両者とも膜1回貫通型蛋白であり、細胞内ドメインに1つの蛋白チロシン脱リン酸化酵素 (PTP) モチーフを有することから、PTP ファミリーに分類される。しかしながら、PTP 活性中心部位において IA-2、IA-2 β 共にアミノ酸置換を持つ為に PTP 活性を持たず、これら分子の生体内における機能については明確な答えが出ていない。一方で IA-2 および IA-2 β 両分子はグルタミン酸脱炭酸酵素に並び、自己免疫疾患である1型糖尿病の主要な自己抗原である。1型糖尿病患者、あるいは予備群の血清中には IA-2、IA-2 β に対する自己抗体が高率に認められることが報告されている。生体において IA-2 および IA-2 β はインスリン分泌顆粒膜に存在すると言われており、これらの分子量は細胞外ドメインの特定配列でプロセッシング酵素により切断され、IA-2 は約 65 kDa、IA-2 β は約 60 kDa となることが報告されている。これまで IA-2 および IA-2 β は1型糖尿病の自己抗原としての研究報告が中心で、膵島以外の組織における発現にはさほ

ど注目が集まらなかった。しかし、近年、米国立衛生研究所 Notkins 博士のもとで IA-2、IA-2B それぞれの遺伝子欠損マウスが樹立され、これらのマウスがインスリンの分泌低下を引き起こしたという結果から IA-2 および IA-2B はインスリン分泌に関与する蛋白であると考えられた。調節性分泌機構を持つ顆粒は一般に内分泌細胞、神経細胞に共通して存在している。このことから著者は IA-2 および IA-2B が内分泌組織や神経組織において発現する蛋白であると考えた。

以上のような背景から本研究では、IA-2 および IA-2B の内分泌組織および中枢神経組織における発現細胞や発現様式について同定することを目的として研究を行った。

第 1 章：膵島細胞腫関連蛋白 IA-2 に対するモノクローナル抗体の作製、及びマウス神経内分泌細胞における IA-2 の免疫組織化学的解析

米国立衛生研究所 Notkins 博士より分与いただいた IA-2 遺伝子欠損マウスに対して大腸菌組換えマウス IA-2 蛋白を免疫し、抗 IA-2 モノクローナル抗体を作製した。特に反応性の強い 2 種類の抗体 SK1 (IA-2 の細胞外ドメインを認識) および CC20 (IA-2 の細胞内ドメインを認識) を選択し、抗体の特徴づけを行った。その結果、これら 2 種類の抗体が IA-2 に対して特異性が高く、かつラットやヒトの IA-2 と交差性する抗体であることを明らかにした。次に、得られた抗体を用い、IA-2 遺伝子欠損マウスを陰性コントロールとした IA-2 発現組織および細胞の同定を行った。ウエスタンブロッティングにより、IA-2 が膵臓だけでなく大脳、小脳、延髄、副腎、下垂体、消化管の筋層においても 65 kDa で発現していることを明らかにした。興味深いことに、副腎では 65 kDa の IA-2 以外に約 120 kDa の IA-2 が存在したことから、副腎では切断を受けない IA-2 が多く共存することが明らかとなった。また、免疫組織染色により IA-2 存在部位および細胞を特定したところ、脳においては海馬、視床下部、嗅糸球の部位に多く存在していた。内分泌組織では、膵島 α 、 β 、 δ 細胞、甲状腺濾胞傍細胞、副腎髄質細胞、Kulchitsky 細胞、細胞の特定には至らなかったが、下垂体前葉内分泌細胞、消化管内分泌細胞で IA-2 が発現していることが明らかとなった。末梢神経組織については、消化管筋層部の神経叢において IA-2 が発現していることを認め、消化管神経初代培養の蛍光染色により IA-2 が軸索に顆粒状に分布していることを認めた。更に、神経成長因子によって分化誘導した神経様細胞株 PC12 についても同様に、IA-2 が神経終末や軸索に多く分布することを明らかにした。作製した新規モノクローナル抗体により、IA-2 が広く神経内分泌細胞に発現する

蛋白であることを明らかにした。IA-2 はインスリン分泌のみならず神経伝達物質やその他ペプチドホルモンの分泌において機能的に働く主要な蛋白であると考えられた。

第2章：膵島細胞腫関連蛋白 IA-2B のマウス神経内分泌組織における分布

IA-2 と相同性の高い分子である IA-2B に関して、その組織内局在についてはこれまで明らかにされていない。そこで、2章では IA-2B のマウスにおける発現分布について解析した。

第一に、IA-2B mRNA の発現組織を RT-PCR により同定したところ、大脳、小脳、延髄、脊髄、下垂体、甲状腺、肺、膵臓、副腎、胃、小腸、大腸といった、神経や内分泌細胞を含む組織で共通して発現が認められた。一方、心臓、肝臓、腎臓、生殖器官、骨格筋では mRNA は検出限界以下であった。次に、マウス抗 IA-2B モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色法により発現細胞の同定を行ったところ、膵臓 α 、 β 、 δ 細胞、甲状腺濾胞傍細胞、副腎髄質細胞、Kulchitsky 細胞、下垂体前葉内分泌細胞、消化管内分泌細胞における IA-2B の発現を認めた。脳において IA-2B は海馬、視床下部、嗅糸球、僧坊細胞層、橋に多く分布していた。また末梢神経である腸管筋層間神経叢の神経細胞において、IA-2B は細胞体よりむしろ突起に顆粒状に分布していることを明らかにした。本研究によって IA-2B 発現が認められた細胞は第1章で IA-2 を発現していた細胞や部位とほぼ一致した。このことから、IA-2B は IA-2 と同様に神経内分泌細胞で発現している蛋白であり、両蛋白は共に調節性顆粒の分泌に機能している分子であると考えられた。

第3章：細胞、細胞内小器官特異的 IA-2B アイソフォームの局在

膵島 β 細胞において 60 kDa で発現していることが知られている IA-2B であるが、本研究の過程で IA-2B が主に3つの異なる分子量で発現していることが明らかとなった。第3章では、これら IA-2B アイソフォームの発現パターンについて、組織、細胞、細胞内小器官について解析を行った。中枢神経組織では大脳、小脳、延髄全ての部位で IA-2B が 71, 64, 60 kDa で発現していることを認めた。これらを分子量に従い IA-2B71, IA-2B64, IA-2B60 と命名した。膵臓では主に IA-2B60 が検出され、副腎においても主に IA-2B60 が検出された。一方、下垂体では脳と同様に IA-2B71, IA-2B64, IA-2B60 が検出された。IA-2B の発現が予想された甲状腺、肺においては検出限界以下であった。内分泌細胞が多く存在する消化器官について調べたところ、粘膜層で主に IA-2B60 の発現が確認された

が、消化管筋層においては IA-2B71, IA-2B64, IA-2B60 の発現を認めた。このように IA-2B アイソフォームの発現パターンは組織によって異なり、3つあるいは1つの分子量で認められる組織に大別された。更に、IA-2B アイソフォーム発現パターンを、膵臓内分泌細胞由来細胞株を用いて検証した。その結果、 β 細胞由来である MIN6, BTC6 では主に IA-2B60 が発現し、 α 細胞由来 α TC1 においては IA-2B71, IA-2B64, IA-2B60 すべてが発現していた。すなわち、IA-2B は IA-2B71, IA-2B64, IA-2B60 が同一の細胞内に存在するパターンと、IA-2B60 のみが存在するパターンに分類されることが明らかになった。最後に、脳サンプルを用いたショ糖密度勾配遠心法により、IA-2B アイソフォームの細胞内小器官の分布について検証した。興味深いことに IA-2B60 はシナプス顆粒膜に、IA-2B64, IA-2B71 は分泌顆粒膜分画に存在した。このことから、IA-2 と異なり IA-2B の3つのアイソフォームは異なる2つの調節性分泌顆粒に存在する分子であり、それぞれ顆粒内に存在する異なる修飾酵素により切断を受ける結果、アイソフォームが生じるものと考えられた。

まとめ

本研究により、これまで膵島 β 細胞のみで発現が注目されていた IA-2 および IA-2B が中枢および末梢神経細胞、ペプチドホルモン、アミンの分泌を行う神経内分泌細胞においても発現している蛋白であることが明らかになった。脳における存在量の多い部位は、神経突起が多く分布する部位であった。また、IA-2 および IA-2B とともに組織、細胞によっては従来報告されていた発現分子量とは異なる分子量で発現していることが明らかとなり、細胞が有する切断酵素の種類により、分子量の違いが生じてくると考えられた。IA-2 および IA-2B が調べた全ての神経や内分泌細胞で発現していたことから、インスリン分泌のみならず、ホルモンや神経伝達物質の分泌に関わる蛋白であることが考えられた。IA-2 および IA-2B は分子構造的には極めて近縁の蛋白であるが、IA-2 は主に分泌顆粒で働き、IA-2B は分泌顆粒だけでなくシナプス顆粒やシナプス様顆粒で機能している分子であると考えられた。