

[別紙 2]

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 竹山 夏実

膵島細胞腫関連蛋白 IA-2 および IA-2 β は、1990 年代に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、蛋白チロシン脱リン酸化酵素ファミリーに分類される。生体において IA-2 は約 65 kDa、IA-2 β は約 60 kDa でインスリン分泌顆粒膜に存在すると考えられている。IA-2 および IA-2 β についてこれまで 1 型糖尿病の自己抗原としての研究が中心で、膵臓以外の組織における発現には注目が集まらなかった。米国立衛生研究所 Notkins 博士のもとで樹立された IA-2、IA-2 β それぞれの遺伝子欠損マウスがインスリンの分泌低下を起こしたことから、IA-2 および IA-2 β がインスリン分泌に関与する蛋白であると考えられた。以上のような背景から申請者は、IA-2 および IA-2 β が神経内分泌組織に共通して発現する蛋白質と考え、それらの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。

申請者は IA-2 遺伝子欠損マウスに対して組換えマウス 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。反応性の強い 2 種類の抗体 SK1 および CC20 について性質を解析した後、これらの抗体を用いて IA-2 発現組織および細胞の同定を行った。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。副腎では 65 kDa の IA-2 以外に約 120 kDa の IA-2 が認められたことから、副腎では切断を受けない IA-2 も多く共存することを明らかにした。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。脳においては海馬、視床下部、嗅糸球の部位に多く存在し、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、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を明らかにした。神経組織では 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、申請者は 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。

申請者は更に、IA-2 と相同性の高い IA-2 β 蛋白についても、発現分布について解析を行った。RT-PCR により神経や内分泌細胞を含む組織で IA-2 β mRNA の発現を認めた。免疫組織化学染色法により、膵島 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-2 β の発現を認め、脳における IA-2 β の分布を海馬、視床下部、嗅糸球、僧坊細胞層、延髄に認めた。また IA-2 β が腸管筋層間神経叢の神経突起に顆粒状に分布することを明らかにした。IA-2 β 発現が認められ

た細胞は IA-2 の発現細胞や発現部位とほぼ一致したことから、IA-2 β および IA-2 が共に調節性顆粒の分泌に機能する分子であることが示唆された。

申請者は研究の過程で IA-2 β が 3 つの異なる分子量で発現していることを明らかとしたが、これらアイソフォームの発現パターンについて解析した。中枢神経組織で IA-2 β が 71, 64, 60 kDa で発現していることを認め、これらを分子量に従い IA-2 β 71, IA-2 β 64, IA-2 β 60 とした。膵臓、副腎では主に IA-2 β 60 のみが、下垂体では IA-2 β 71, IA-2 β 64, IA-2 β 60 が検出された。消化器官について、内分泌細胞を含む粘膜層で主に IA-2 β 60 の発現を確認し、筋層では IA-2 β 71, IA-2 β 64, IA-2 β 60 の発現を認めた。このように IA-2 β 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-2 β アイソフォーム発現パターンを膵島内分泌細胞由来細胞株を用いて検証した。 β 細胞株 MIN6, β TC6 では IA-2 β 60 が発現し、 α 細胞株 α TC1 では IA-2 β 71, IA-2 β 64, IA-2 β 60 が発現することを明らかにした。すなわち、IA-2 β は IA-2 β 71, IA-2 β 64, IA-2 β 60 が同一の細胞内に存在するパターンと、IA-2 β 60 のみが存在するパターンに分類されることが示された。マウス脳サンプルを用いたショ糖密度勾配遠心法により、IA-2 β 60 はシナプス顆粒膜に、IA-2 β 64, IA-2 β 71 は分泌顆粒膜分画に存在する分子であることが示唆された。このことから、IA-2 β 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ると考えられた。

申請者の研究により、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-2 β 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と考えられた。IA-2 および IA-2 β 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で分子量の違いが生じると考えられた。IA-2 および IA-2 β 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-2 β 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。申請者の研究は今後 IA-2 および IA-2 β が関わる調節性分泌機構解明への手がかりとなると期待される。以上の結果は、免疫学および内分泌学上、重要な知見を加えるものである。従って審査員一同は博士（農学）の資格を十分に有すると判断した。