

京都大学	博士（医学）	氏名	井村 嘉孝
論文題目	NEFA/nucleobindin-2 is a target autoantigen of the anti-Wa antibody and is associated with transfer RNA (NEFA/nucleobindin-2は抗Wa抗体の対応抗原でありトランスファーRNAと関連する)		
(論文内容の要旨)			
<p>膠原病で認める自己抗体は、核酸自体もしくは核酸結合蛋白を対応抗原とするものが多い。抗 Wa 抗体は強皮症のまれな自己抗体として 1991 年に報告され、数種類のトランスファーRNA (tRNA) と結合する 48kDa 蛋白を対応抗原とするが、その詳細は不明であった。本研究では Wa 抗原蛋白とその結合 tRNA について検討した。</p> <p>抗 Wa 血清をプローブとして遺伝子クローニングを行ったところ、対応抗原蛋白は NEFA および Nucleobindin-2 として報告された分子と一致した。その際に、これまで報告されていた NEFA cDNA に加えて、 exon11 を欠失したスプライシングバリエーションの存在を確認した。HeLa 細胞 mRNA より作成した NEFA リコンビナント蛋白は免疫沈降法では抗 Wa 陽性血清全例と反応し、対照血清とは反応しなかった。このリコンビナント蛋白をウサギに免疫して作成した抗 NEFA 血清は患者抗 Wa 血清と同じ tRNA を免疫沈降した。Wa/NEFA 結合 tRNA の同定のために、各アミノ酸特異 tRNA に対するプライマーを作成し、抗 Wa 血清および抗 NEFA 血清が免疫沈降する tRNA を基質として RT-PCR を行った。抗 Wa 血清沈降 tRNA では 6 種の tRNA (アルギニン、グリシン、ヒスチジン、メチオニン、リシン、プロリンに対する tRNA) の増幅を認め、この tRNA 増幅パターンはウサギ抗 NEFA 血清沈降 tRNA を基質とした場合と同様であった。ヒト組織 cDNA パネルを用いた定量もしくは半定量 PCR において、NEFA は膵臓、胎盤、精巣、唾液腺などの分泌組織での高発現を認めた。また、スプライシングバリエーション NEFA の発現は通常の NEFA より少ないが、同様の発現パターンを認めた。</p> <p>NEFA はカルシウムイオン結合ドメインを有し、また Necdin や TNFR1 および ARTS-1 との結合も報告されている。NEFA の生理機能に関しては、NEFA の過剰発現でカフェイン刺激下の細胞質カルシウムレベルは増大し、この作用は Necdin との共発現で増強されること、NEFA と TNFR1 および ARTS-1 の結合はカルシウム依存性であり、TNFR1 の細胞外分泌に関与すること、NEFA の N 末端部分蛋白である nesfatin-1 は摂食減退作用があり、マウス膵島β細胞へのカルシウム流入を促進してグルコース依存性インスリン分泌を増強することが報告されている。本研究ではアルギニン、グリシン、ヒスチジン、メチオニン、リシン、プロリンに対する tRNA が NEFA と結合することを示したが、ヒスチジン、メチオニン、リシンは必須アミノ酸であり、アルギニン、グリシン、プロリンは条件付必須アミノ酸であることから、NEFA は一定の tRNA と結合して栄養状態を監視し、細胞外分泌や nesfatin-1 などを介して摂食行動に影響を与えている可能性がある。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

抗 Wa 抗体は強皮症のまれな自己抗体として報告され、トランスファーRNA (tRNA) 結合蛋白を対応抗原とするが、その詳細は不明であった。本研究では Wa 抗原蛋白とその結合 tRNA について検討した。

患者抗 Wa 血清をプローブに用いた遺伝子クローニングで、Wa 抗原蛋白は NEFA および Nucleobindin-2 と同定された。また、既報告の NEFA cDNA に加え、 exon11 を欠失したスプライスバリエーションを確認した。NEFA リコンビナント蛋白は抗 Wa 陽性血清全例と反応し、このリコンビナント蛋白をウサギに免疫して作成した抗 NEFA 抗体は tRNA を免疫沈降した。各アミノ酸特異 tRNA に対するプライマーを作成し、抗 Wa 抗体と抗 NEFA 抗体が免疫沈降する tRNA を基質とした RT-PCR で、いずれも 6 種の tRNA (アルギニン、グリシン、ヒスチジン、メチオニン、リシン、プロリン tRNA) の増幅を認めた。ヒト組織 cDNA パネルを用いた定量および半定量 PCR により、NEFA は膵臓、胎盤、精巣、唾液腺で高発現を認めた。

NEFA はカルシウム依存的に TNFR1 やインスリンの細胞外分泌に関与し、NEFA の部分蛋白 nesfatin-1 は摂食減退作用を示すことが近年報告されている。NEFA は必須アミノ酸や条件付必須アミノ酸に対する tRNA を結合することから、NEFA はこれらの tRNA を介して栄養状態を監視し、細胞外分泌や nesfatin-1 による摂食行動に影響を与えている可能性がある。

以上の研究は新たな自己抗体の対応抗原を同定し、機能不明分子の生物学的機能解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成24年 3月19日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降