

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	柳 橋 祐 一
論文題目	A novel smooth septate junction-associated membrane protein, Snakeskin, is required for intestinal barrier function in <i>Drosophila</i> (新規スムーズセプテイトジャンクション関連膜タンパク質 Snakeskin はショウジョウバエの中腸のバリア機能に必要である)		
(論文内容の要旨)			
上皮は多細胞生物の体内を多数の区画に分けるバリアとして機能している。上皮がバリア機能を果たすためには、上皮細胞に存在する閉塞結合と呼ばれる細胞間接着構造が細胞同士の隙間を塞ぎ、傍細胞経路からの物質の自由拡散を防ぐことが重要である。この閉塞結合に相当するのが、脊椎動物においてはタイトジャンクション(TJ)であり、無脊椎動物においてはセプテイトジャンクション(SJ)である。TJ と SJ は形態的に大きく異なっている。SJ には動物の系統や上皮の種類によって形態的に区別される複数の種類が存在している。例えば、節足動物であるショウジョウバエでは外胚葉由来上皮細胞に存在するプリーテッドセプテイトジャンクション(pSJ)と内胚葉由来上皮細胞に存在するスムーズセプテイトジャンクション(sSJ)の 2 種類が知られている。しかし、その分子構築に関しては、pSJ で一部が明らかになっているが、その他はほとんど知られていない。脊椎動物の TJ の解析から明らかになった閉塞結合の重要性を鑑みると、SJ の分子基盤を解析することにより、TJ との共通の作動原理および閉塞結合の進化についての重要な情報が得られることが期待される。そこで、本研究ではこの 2 つの SJ のうち解析の進んでいない sSJ の構成分子の同定とその機能解析を試みた。 まず、カイコ中腸をホモジナイズしショ糖密度勾配法により細胞膜画分を調製した。細胞膜画分をラットに免疫してモノクローナル抗体ライブラリーを作成した。この中からカイコ中腸の sSJ 領域を認識する抗体を蛍光抗体法によりスクリーニングし、免疫沈降法によりその抗原分子を濃縮した。アミノ酸シークエンスによりアミノ酸配列を決定し、遺伝子を同定した。この分子のショウジョウバエにおける相同分子をコードしている遺伝子 CG6981 を同定し、遺伝子産物を Snakeskin(Ssk)と名付けた。Ssk は 4 回膜貫通タンパク質と推定された。 Ssk は蛍光抗体法により sSJ が存在しているといわれるショウジョウバエの中腸とマルピーギ管のみに発現が検出された。さらに免疫電子顕微鏡法では、Ssk は細胞の sSJ 領域のみに局在していることが示された。次に、機能解析のために Ssk の発現を RNA 干渉法により抑制した系統および Ssk 周辺のゲノム領域を欠損させた系統を作成した。どちらの系統も孵化直前の時期に胚性致死であり、中腸全体の形態に異常は見られなかったが、野生型では見られない腸管内の卵黄の蓄積が見られた。また、中腸上皮細胞では頂端膜の内腔側への異常伸長及び sSJ の形成不全が認められた。この Ssk 遺伝子ゲノム欠損系統に外来の Ssk を強制発現させると sSJ が形成された。従って、Ssk が sSJ の形成または維持に必須であることが示された。また、Ssk 遺伝子を発現抑制した系統においては、蛍光色素の中腸内腔から体腔への漏れが観察された。即ち、Ssk が細胞同士の隙間を塞ぎ、傍細胞経路による物質の自由拡散を防ぐ腸管バリア機能にとって必要であることが示唆された。			

(論文審査の結果の要旨)
閉塞結合が上皮細胞同士の隙間を塞ぎ、物質の自由拡散を防ぐことは重要である。しかし、節足動物の内胚葉由来上皮細胞に存在する閉塞結合である sSJ（スムーズセプテイトジャンクション）においては分子構築を始めとして未知な部分が多い。
本研究ではカイコ中腸の膜画分に対する抗体を作成し、その中から蛍光抗体法により sSJ 領域を認識するものを選定した。この抗体を用いて抗原分子を同定し、ショウジョウバエ相同遺伝子 Ssk (Snakeskin)をクローニングした。Ssk は 4 回膜貫通型と推定される膜タンパク質で中腸とマルピーギ管で発現していた。これは sSJ が存在している器官と一致した。加えて、Ssk は免疫電子顕微鏡法により sSJ 領域にのみ局在していることが確認された。この Ssk を欠損させると sSJ の形成不全と中腸上皮細胞の形態異常が認められたが、Ssk を強制発現させると sSJ が形成された。これは Ssk が sSJ の形成または維持に必須であることを示している。また、Ssk を発現抑制した個体に蛍光色素を摂食させると色素の中腸内腔から体腔への漏れが観察された。即ち、Ssk は細胞同士の隙間を防ぐために不可欠であることが示唆された。
以上の研究は節足動物内胚葉由来上皮細胞における閉塞結合の分子構築の解明に貢献し、閉塞結合の共通の作動原理及び分子進化の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みとめる。
なお、本学位授与申請者は、平成 24 年 2 月 28 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。