

氏 名 ^{ネルソン ロペス} Nelson D. Lopez
 学位(専攻分野) 博 士 (医 学)
 学 位 記 番 号 医 博 第 2170 号
 学位授与の日付 平成 11 年 11 月 24 日
 学位授与の要件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
 研究科・専攻 医 学 研 究 科 分 子 医 学 系 専 攻
 学位論文題目 Isoform Specific Expression of the SDR-1 Protein, α and β in Subregions of Adult Rodent Brain
 (SDR-1 α , β タンパク質の成体ラット・マウス脳内におけるアイソタイプと特異的分布)

論文調査委員 (主 査) 教 授 清 水 章 教 授 笹 井 芳 樹 教 授 本 庶 佑

論 文 内 容 の 要 旨

SDR-1 (マトロマ細胞由来受容体-1) α 型と β 型は、申請者の属する研究室で単離された免疫グロブリンスーパーファミリーに属する I 型膜タンパク質である。神経系に発現する免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜タンパク質の多くが神経発生や脳機能維持に寄与することが知られている。今回、SDR-1 タンパク質の α 型、 β 型それぞれの脳内分布を調べる目的で SDR-1 β 型特異的ポリクローナル抗体と、SDR-1 α 型と β 型の両方を認識するポリクローナル抗体が作製され、免疫組織化学的検索が行われた。

SDR-1 β 型は、 α 型のアミノ末端付近に 116 アミノ酸が挿入されだオルタナティブスプライス型メッセンジャー RNA から生合成されるアイソフォームである。 β 型は α 型の全アミノ酸残基を持つため、 β 型タンパク質全長を動物に免疫したのでは両型を認識する抗血清ができてしまう。今回、 β 型特異的領域のアミノ酸配列に対応する合成ポリペプチドに対するウサギ抗血清をとり、それを抗原ポリペプチドカラムでアフィニティー精製することにより、 β 型特異的ポリクローナル抗体 (抗 SDR-1 β 抗体) を調製した。また、 α 型特異的領域が存在しないため、 α 型特異的抗体を作製する術は事実上無い。したがって、SDR-1 α タンパクの組織分布は、免疫組織学的実験によって直接的に抽出することは不可能であり、SDR-1 α 型と β 型の両方を認識する抗体による染色パターンと、SDR-1 β 型のみを認識する抗体による染色パターンを比較した上で結論づける必要がある。そのため、SDR-1 β と免疫グロブリン定常領域のフュージョンタンパク質でウサギを免疫して、 α 、 β 両型を認識するポリクローナル抗体 (抗 SDR-1 $\alpha\beta$ 抗体) を調製した。両抗体の特異性と感度は、マウス脳ライセートと SDR-1 β を強制発現した 293 T 細胞ライセートのウェスタンブロット解析で確認した。抗 SDR-1 β 抗体は、65 kDa のバンドを 1 本のみを検出し、抗 SDR-1 の β 抗体は、52 kDa のバンドと 65 kDa のバンドの 2 本のバンドのみを検出した。

ラット脳切片の免疫組織化学で、抗 SDR-1 β 抗体でも抗 SDR-1 $\alpha\beta$ 抗体でも顆粒状の陽性所見が神経線維 (neuropil) に観察された。SDR-1 β 陽性の領域は嗅球内の嗅糸球、大脳皮質の II 層と III 層に局限されていた。一方、SDR-1 $\alpha\beta$ 陽性の領域は、嗅結節、大脳皮質、海馬、視床、中脳と小脳の分子層であり、 α 型タンパク質が β 型より広く分布していることが判明した。 β 型タンパク質の発現は、視床、視床下部、中脳、海馬、線状体、小脳、橋、延髄にはみとめられなかった。したがってこれらの比較から SDR-1 α タンパク質は、嗅策、大脳皮質、新線状体、海馬の歯状回と CA 1 から CA 4 にかけての領域、視床の外側膝状体と内側膝状体、中脳の黒質網様体と脚間核、小脳の分子層に分布することが結論された。

SDR-1 のヒトの病気への関与を検索するため、ヒト SDR-1 遺伝子の染色体マッピングが行なわれた。マウス SDR-1 cDNA をプローブにしてヒト cDNA がクローニングされ、両者に 94% の相同性があることが判明した。さらに 7 kb のジェノミック DNA が単離され、FISH 法により染色体上の位置が 15 q 22 であることが決定された。15 q 22 付近には、Bardet-Biedl 症候群タイプ 4 と異型幼児型セロイドリポフシノーシスという 2 つの知能障害でおこす病気がマップされており、

SDR-1のこれらの病気への関与が興味深く、さらなる研究が期待される。

論文審査の結果の要旨

申請者は、シグナル・シーケンス・トラップ法で単離した、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する膜タンパク SDR-1（ストロマ細胞由来受容体-1）の脳内分布を解析した。

まず、2つのcDNAを単離して、短い方を α 型、 α 型アミノ末端付近に116アミノ酸残基の挿入のある長い方を β 型と名付け、 β 型は脳特異的に発現することを示した。SDR-1タンパクの脳内分布を調べるため、 β 型特異的抗体と α, β 両型を認識する抗体を作製・精製し、それら2抗体の検出感度と特異性はウエスタンブロット解析で示した。両抗体を用いたラット脳切片の免疫組織化学染色により、顆粒状の陽性所見が、細胞体ではなく、神経線維（neuropil）に観察された。 β 型陽性の領域は、嗅糸球、大脳皮質のII, III層に限られていた。 α 型特異的抗体が事実上作製できないので、 α 型の分布は α, β 両型を認識する抗体の組織染色パターンから抗 β 抗体の染色パターンを引き算して、嗅球、大脳皮質、新線状体、海馬、視床外側膝状体と内側膝状体、中脳の黒質と脚間核、小脳の分子層と結論した。さらに、ヒト染色体上のSDR1遺伝子の位置を15q22にマップした。そこには2種の神経系の病因遺伝子がマップされており、SDR-1とそれらの遺伝病との関連が今後の課題となる。

以上の研究は新規分子SDR-1の脳内特異的局在の解明に貢献し、医学の研究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11年10月20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。