

学位論文の要旨

保健学専攻	医療生命科学分野 医療生命科学領域	氏名	上條 明生
題目			
Immunohistochemical study of the membrane skeletal protein, membrane protein palmitoylated 6 (MPP6), in the mouse small intestine (マウス小腸における膜骨格蛋白 MPP6の免疫組織化学的検討)			
要旨			
<p>【研究背景と目的】</p> <p>Membrane protein palmitoylated (MPP) 蛋白ファミリー (MPP1-7) は、4.1蛋白ファミリー (4.1B, 4.1G, 4.1N, 4.1R) と結合部位をもち、MPP1は赤血球膜直下でスペクトリン—アクチン—4.1R と、さらに4.1R は膜内蛋白に結合して「膜骨格」を形成している。この4.1—MPP による膜骨格は、末梢神経系ではシュワン細胞の髄鞘にあるシュミット・ランターマン切痕 (SLI) に4.1G—MPP6複合体がある。4.1R 欠損によって溶血性貧血になること、また4.1G 欠損マウスで MPP6局在や SLI 形態の変化が知られている。</p> <p>まず SLI の機能を検討するために、坐骨神経に液体窒素冷却液性混合寒剤 (-193℃) を直接かけて瞬時に凍結する“生体内凍結技法”を用いて、種々伸展下マウス坐骨神経の SLI 形態を4.1G の免疫染色を指標に解析した (副論文: Immunohistochemical study of mouse sciatic nerves under various stretching conditions with "in vivo cryotechnique"; J Neuroscience Methods 227:181-188, 2014)。この生体内凍結技法は血行動態を反映した SLI の機械的伸長に対応した形状変化を明らかにし、4.1G—MPP6を含む SLI の外力に抗する緩衝作用の役割が考えられた。さらに従来報告されていた可溶性蛋白アルブミンが SLI に浸透する現象は、生体内凍結技法による標本では観察されず、生体の神経線維内の正確な分布を明らかにした。</p> <p>次に主論文 (本学位論文) の目的として、これまでマウス腸管における4.1ファミリー4.1B の報告はあるが、MPP ファミリーについて研究がなかったので、単層円柱上皮をもち細胞局在が判別しやすいマウス小腸を用いて検討した。その部位を明確にするために、接着結合 (adherens junction) の E-cadherin もしくは密着結合 (tight junction) の zonula occludens (ZO)-1 と免疫染色によって比較した。一部の試料は、前包埋免疫電子顕微鏡法で超微形態的局在を検討した。さらに末梢神経のような4.1ファミリーの MPP ファミリー局在化への関与を検討するために、4.1B 欠損マウス小腸を用いて MPP6の局在と蛋白量の変化を検討した。また他の4.1ファミリーである4.1G と4.1N の腸管における局在と蛋白量の変化も比較した。さらに、マウス小腸上皮で知られる MPP のスーパーファミリー蛋白である calcium/calmodulin dependent serine protein kinase (CASK) と MPP6 の結合性について検討した。</p>			

【材料と方法】

免疫染色の標本作製には、麻酔マウスの心臓からパラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液を灌流して小腸を摘出、同液で1時間浸漬固定、ショ糖水で処理、凍結切片を作製後、Diaminobenzidine (DAB) 法および蛍光抗体法で免疫染色を行い、光学顕微鏡および共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。一部の DAB 法による試料はグルタルアルデヒドで再固定後、オスミウム処理、アルコール脱水、エポン包埋を経て超薄切片を作製し、電子顕微鏡で観察した。Western blot には、麻酔下でマウス小腸を摘出し、Laemmli sample buffer または Triton X-100 で溶解後、上清の蛋白濃度を調整、電気泳動後ブロット膜に転写し、MPP6、4.1G、4.1N、4.1B に対する抗体で免疫染色した。また免疫沈降には、マウス小腸上清を抗 MPP6 抗体で免疫沈降して電気泳動後、ブロット膜に転写、抗 CASK 抗体で免疫染色した。

【結果と考察】

免疫染色により、MPP6は腸陰窩から腸絨毛における上皮細胞側底面の細胞膜直下に局在していた。この MPP6の局在は E-cadherin とは類似するが ZO-1とは異なり、電子顕微鏡による超微形態での染色部位からも、上皮細胞側面頂上部にある tight junction への局在はわずかであった。マウス小腸上皮における4.1B と MPP6の局在を比較すると、腸絨毛では類似していたが、腸陰窩では MPP6のみで染色が得られ、それらは細胞質に局在していた。免疫染色による4.1B欠損マウス小腸における MPP6の免疫染色性や局在部位は野生型マウスと変わらず、Western blot による蛋白発現量でも変化は認めなかった。このことから、小腸上皮において4.1B は MPP6 の局在化に必須ではないことが明らかとなった。さらに4.1ファミリーの4.1G と4.1N は、野生型マウス小腸で神経線維にはあるが上皮において局在を認めないことと、4.1B欠損マウス小腸においての局在と発現にも変化が無かったことから、ファミリー蛋白による補填の可能性も低いと考えられた。一方、免疫沈降法によって抗 MPP6抗体で得た沈降物に、CASK の分子量を示す Western blot によるラインが得られたことから、CASK と MPP6の結合が明らかとなった。以上より、マウス小腸上皮における MPP6の CASK と結合した膜骨格蛋白複合体としての機能が示唆された。

【結論】

膜骨格の視点から行なった2つの実験によって、(1) 生体内凍結技法を用いた SLI の末梢神経における役割 (副論文) と (2) マウス小腸上皮における MPP6の局在と結合蛋白 (主論文) を明らかにした。