

氏 名	木 村 新
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 6 1 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 0 年 3 月 2 5 日
学 位 論 文 題 目	The production of antibodies that distinguish rat choline acetyltransferase from its splice variant product of a peripheral type (ラットのコリンアセチル基合成酵素をその末梢型スプライスバリエーションと見分ける抗体の作成)
審 査 委 員	主 査 教 授 竹 内 義 博 副 査 教 授 山 田 尚 登 副 査 教 授 陣 内 皓 之 祐

論文内容要旨

※整理番号	566	(ふりがな) 氏名	きむらしん 木村新																								
学位論文題目	<p>The production of antibodies that distinguish rat choline acetyltransferase from its splice variant product of a peripheral type (ラットのコリンアセチル基合成酵素をその末梢型スプライスバリエントと見分ける抗体の作成)</p>																										
【目的】	<p>アセチルコリンを神経伝達物質とするコリン作動性神経(以下、コリン神経)は脊椎動物から無脊椎動物に幅広く存在し、中枢および末梢神経系が担う高次統御機構において重要な役割をもつ。コリン神経の形態学的研究は、生体制御系の理解に必須である。アセチルコリン自体を染色する技術はないため、1980年に開発されたコリンアセチル基転移酵素(ChAT)の免疫組織化学を用いてコリン神経回路の研究が進められてきた。ChAT はアセチルコリンの合成酵素で、動物界では単一の相同 ChAT タンパクが機能するとされ、世界中で作成された ChAT 抗体はその特異性(抗原認識)において類似している。しかし、どの ChAT 抗体を用いても腸管神経叢の90%以上を占める末梢コリン神経を染色できなかった。この問題の回答は2000年に本学から出され、新規スプライシング変異 ChAT の存在が証明された。その発現様式から新規は末梢型(pChAT:末梢神経系に優勢)、既知は共通型(cChAT:中枢と末梢神経系に共通)と呼ばれた(Fig.1)。cChAT はエクソン 2-15</p> <p>cChAT mRNA <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td><td>10</td><td>11</td><td>12</td><td>13</td><td>14</td><td>15</td></tr></table></p> <p>pChAT mRNA <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>10</td><td>11</td><td>12</td><td>13</td><td>14</td><td>15</td></tr></table> Fig. 1</p> <p>が連続的に転写・翻訳されるのに対し、pChAT はエクソン 6-9 を欠く。pChAT 特異抗体はエクソン 5 と 10 の結合部アミノ酸配列に対して作成され、cChAT を認識することはない。しかし、cChAT は pChAT と共通のアミノ酸配列をもつため(Fig. 1)、既存 cChAT 抗体が pChAT を認識する可能性が問題として残る。既存 cChAT 抗体は、pChAT の発見以前はもちろん以降でも、pChAT 認識を避ける目的で作成されたことはない。pChAT にはなく cChAT にあるアミノ酸配列は、エクソン 6-9 対応領域に含まれる(Fig. 1)。後方視的に文献検索したところ、2000 年以前にエクソン 6 関連ペプチドに対する抗体が偶然作製されてはいたが、cChAT を認識しないと報告されている。本研究では、pChAT を認識しない cChAT 特異抗体の作製を目的とした。</p>			2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	2	3	4	5	10	11	12	13	14	15
2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15														
2	3	4	5	10	11	12	13	14	15																		

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

【方法】**1. 標的抗原の選定**

PChAT ではなく cChAT にあるエクソン6-9から転写・翻訳されるアミノ酸配列について、抗体作成に有利な条件を検討した。まず疎水性など抗原性が高い配列を数種のコンピュータプログラムを用いて検索を試みたが、プログラム毎で異なる推定を示し、有用な情報は得られなかった。次に、タンパク質の結晶構造解析ソフト(National Center for Biotechnology Information の Cn3D)を用いて ChAT 全体の3次元構造を調べ、タンパク立体構造の外部に露出し抗原提示部位として有望な配列は「エクソン 7-8」にあると推定した。

2. リコンビナント・ペプチド抗原の作成

エクソン 7-8 がコードする配列は 116 アミノ酸と長く、ペプチド作成装置による化学合成は適用できないため、遺伝子組み換え技術を用いた。ラット線条体から抽出した cDNA を鋳型としてエクソン 7-8 領域の核酸配列を PCR 法で増幅し、得られた PCR 産物をまず pCR2.1 ベクターに組み込んだ。次いでタンパク N 末端にヒステジン・タグを付加する pQE30 ベクターに再組み込み後、大腸菌に遺伝子導入リコンビナントペプチドを強制発現させた。増殖させた大腸菌を破壊し、可溶性成分を硫酸分画およびヒステジン・タグ親和性カラムクロマトグラフィーで精製した。

3. 免疫

家兎 3 匹に精製抗原を皮下注射で免疫した。注射は 2 週間毎、8 ヶ月間にわたり行い、各注射4日目に血清を採取し抗体価を検定した。免疫開始から7ヶ月目(13-14 回目の免疫)で、一匹の家兎から最高の抗体価をもつ血清が得られた。

4. ウェスタンブロット

ラットを深麻酔下に断頭し新鮮脳を摘出した。ChAT を高濃度に含む線条体を摘出し、10 mM リン酸緩衝食水(PBS)でホモジナイズし、遠心上清を電気泳動(SDS-PAGE)した。ネガティブコントロールとして green fluorescent protein (GFP)のみ、および GFP 結合リコンビナント pChAT、またポジティブコントロールとして GFP 結合リコンビナント cChAT、の3者を同時に電気泳動した。泳動後のゲルをニトロセルロース膜に転写し、抗 ChAT 血清および免疫前血清を第一次抗体としてウェスタンブロットを行った。

5. 免疫組織化学

ラットを深麻酔下に開胸し、左心室から氷冷 4%パラホルムアルデヒド(100 mM リン酸緩衝)で灌流固定し、脳および後根神経節を摘出した。これらの組織を同固定液で浸漬固定 24 時間の後、15%ショ糖(100 mM リン酸緩衝)に移し、クリオスタットで厚さ 20 μ mの切片を作成した。抗 ChAT 血清および免疫前血清を第一次抗体として ABC 法による免疫組織化学染色を行った。

(続 紙)

【結果】

1. ウェスタンブロット

ラット線条体の粗抽出標本では、得られた抗 cChAT 血清により、cChAT 分子量と合致する約 69kD の単一バンドが染色された(Fig. 2)。次に、pChAT-GFP(74 kDa), cChAT-GFP(96 kDa), GFP 単独(27 kDa)の3者をウェスタンブロットで調べ、抗 GFP 抗体では各々が単一バンドを示すことを確認した。さらに抗 cChAT 血清では、cChAT-GFP のみが検出され、抗 GFP 抗体による単一バンドと一致することが分かった。すなわち、抗 cChAT 血清は cChAT を特異的に認識するが、pChAT とは全く交叉反応しないことが証明された。

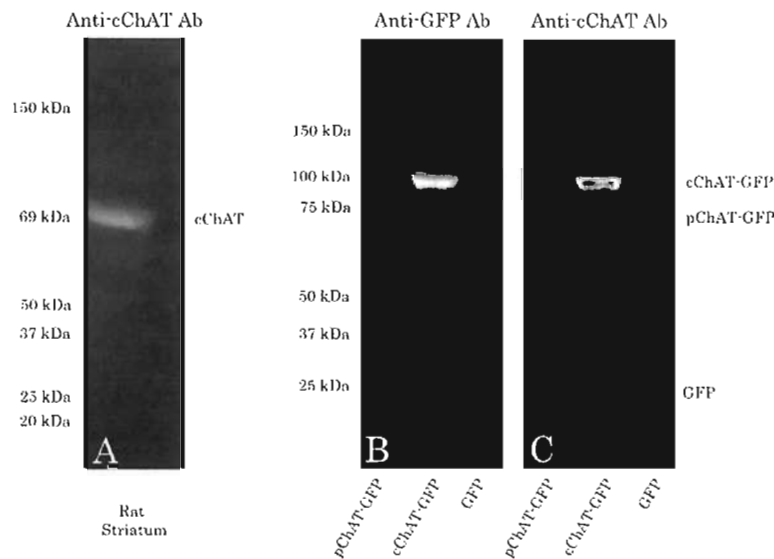


Fig. 2 Western blotting analysis

2. 免疫組織化学

得られた cChAT 血清を用いてラット脳の各種領域を染色したところ、コリン神経の細胞体および神経線維が分布するとされる線条体や前脳マイネルト基底核の他、脳神経運動核および脳神経副交感神経核(舌下神経核や顔面神経核など)で陽性細胞や神経線維が明瞭に観察された。一方、pChAT のみが存在するとされる後根神経節においては、陽性反応は検出されなかった。

【考察】

ウェスタンブロットおよび免疫組織化学の結果から、作成した抗体は cChAT 特異抗体であることが証明された。標的抗原の選定にあたり、cChAT タンパクの立体構造をコンピュータプログラムにより解析し、抗原提示部位を探索することは有力な手段であると考えられた。しかし、免疫を試みた家兎3匹のうち、唯一匹の動物だけが高力価の抗血清を産生したことから、エクソン 7-8 翻訳ペプチドの抗原性はそれほど高いものではないと考えられた。この理由のため、おそらく市販品を含め既存の cChAT 抗体が、今回の標的ペプチド配列を認識する蓋然性は低いものと推定される。したがって、本研究で作成された抗 cChAT 血清は、pChAT を排除・鑑別する研究にとって有用と考えられる。また、この抗 cChAT 血清を用いた予備研究において、各種の脊椎動物のみならず軟体動物(タコ)など無脊椎動物の神経系におけるコリン神経の検出ができることから、

(続 紙)

ラット ChAT のエクソン 7-8 領域に含まれる一定のペプチド配列が動物の種属および門を超えて保存されていると推定される。この点において、当該の抗 cChAT 血清はコリン神経系の系統発生学的な研究にとっても有力な手段と期待される。

【結論】

ラット ChAT 遺伝子のエクソン 7-8 翻訳ペプチド抗原としてをウサギを免疫したところ、pChAT とは全く反応しない cChAT 特異抗体が得られた。この事実は、「生体には cChAT あるいは pChAT を含有する2種類のコリン神経が存在する」、という新しい概念を支持するものである。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	566	氏名	木村 新
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>アセチルコリン(Ach)は最初に同定された神経伝達物質で、脊椎動物から無脊椎動物の中枢および末梢神経系に広く存在し、運動・感覚・記憶・学習に関与している。Ach 神経が含有するコリンアセチル基転移酵素(ChAT:Ach 合成酵素)は Ach 神経のマーカーとして重要であり、本研究は pChAT (末梢型 ChAT) を認識しない cChAT (共通型 ChAT) 特異抗体の作成を目的としたものである。本研究では pChAT ではなく cChAT にあるエクソン 6-9 に着目し、cChAT の 3 次元構造の解析から抗原提示部位として有望な配列をエクソン 7-8 と推定、エクソン 7-8 がコードする配列 (116 アミノ酸) を遺伝子組み換えにより作成、得られたリコンビナント・ペプチド抗原を精製、家兎に免疫し pChAT とは全く反応しない cChAT 抗体の作成に成功した。このエクソン 7-8 抗体の特異性は、ウェスタンブロット、免疫組織化学等により確認された。</p> <p>本研究は「生体には cChAT あるいは pChAT を含有する 2 種類の Ach 神経系が存在する」という新しい概念を支持するものであり、博士 (医学) の学位を授与することに値すると判定された。</p>			
(平成 20 年 1 月 31 日)			