

氏 名	西村 嘉洋
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 甲第710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26年 3月10日
学位論文題目	Immunohistochemical localization of D-serine dehydratase in chicken tissues (ニワトリ組織におけるD-セリンデヒドラクターゼの局在に関する免疫組織化学的検討)
審査委員	主査 教授 堀江 稔 副査 教授 西 克之 副査 教授 杉原 洋行

論文内容要旨

※整理番号	716	(ふりがな) 氏名	にしむら よしひろ 西村 嘉洋
学位論文題目	Immunohistochemical localization of D-serine dehydratase in chicken tissues (ニワトリ組織におけるD-セリンデヒドラターゼの局在に関する免疫組織化学的検討)		
<p>[目的]</p> <p>D-セリンは脊椎動物の中樞神経系においてグリシン/D-セリン依存型グルタミン酸受容体(NMDA 受容体)に結合し、興奮性の神経伝達を調節している。したがって、D-セリンの組織濃度がどのように調節されているかを調べることは重要である。これまで、D-セリンの分解はD-アミノ酸オキシダーゼ(DAO)によるとされてきた。しかし、DAO 以外にも、多くの脊椎動物がD-セリンデヒドラターゼ(DSD)をもっていることが発見され、その D-セリン濃度調節への関与が注目される。また、哺乳類だけは例外的に、本酵素を発現しておらず、データベース検索を行っても DSD に対して相同性を示す配列が全くみつかっていない。そのため、本酵素の生理的意義について脊椎動物の進化的な観点からも興味を持たれている。</p> <p>本研究では、まずニワトリ主要臓器のうち DSD 酵素活性を示す臓器を調べ、抗 DSD ポリクローナル抗体(DSD-Ab)を用いたウエスタンブロッティングにより確認した。さらにそれぞれの臓器における DSD の局在を明らかにするため、DSD-Abを用いて、免疫組織化学を行ない、それぞれの組織においてD-セリンの分解を担っている細胞を同定した。</p> <p>[方法]</p> <p>(1) 逆相 HPLC による DSD 活性の測定: ニワトリ組織ホモジネートをD-セリンと反応させることにより生成する2-オキシ酸について逆相 HPLC 法で測定した。まず、ニワトリから主要臓器を取り出し、3 倍量の 10 mM リン酸カリウム(pH 7.2、50 μM 補酵素ピリドキサルリン酸を含む)緩衝液中でガラスホモジナイザーを用いてホモジネートし酵素液を調整した。D-セリンが酵素 DSD による分解を受けると、ピルビン酸が生成する。この2-オキシ酸を MBTH でラベルした後生成されるアジン誘導体を、逆相 HPLC を用いて分離・定量した。内部標準物質には2-オキソグルタル酸を用いた。</p> <p>(2) 使用する DSD-Ab ポリクローナル抗体は、ウサギに抗原(DSD、10 mg)を接種して免疫したウサギから得られた抗血清を、アフィニティーカラムで精製したものを用いた。ウエスタンブロッティングは以下の操作手順で行った。市販のニワトリ(<i>Gallus gallus domesticus</i>)主要臓器(腎臓、肝臓、骨格筋、心筋、脳)のホモジネートサンプルを SDS-PAGE(1レーンあたり 20 μgタンパク質)により分離した。</p>			

- (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。

次に、セミドライ法により PVDF 膜へ転写し、プロットティングを行った。ブロッキングバッファー (5% スキムミルク/TBS-T) を用いて、1 時間 (室温) ブロッキング処理後、一次抗体反応は DSD-Ab (希釈倍率 1:1,000) を用いて 2 時間 (室温) 行い、二次抗体反応は、HRP を結合させたヤギ抗ウサギ IgG (希釈倍率 1:5,000) を用いて 2 時間 (室温) 行った。免疫反応の検出はケミルミネッセンス (ECL, Amersham) で行った。

(3) 市販のニワトリ組織を、それぞれ 4% ホルムアルデヒドで固定後、パラフィン包埋した。組織切片は 6 μm に薄切後、MAS コートスライドガラス (松浪硝子) によく接着させ、脱パラフィン・親水処理後、免疫組織化学を行った。抗原性の再賦活化法としてオートクレーブによる加熱処理 (10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0), 120°C, 10 min)、内因性ペルオキシダーゼ阻害のために、3% H_2O_2 を含むメタノールで 30 分間処理した。一次抗体反応は DSD-Ab (1:1,000) を用いて 2 時間 (室温) 行い、二次抗体反応は HRP を結合させたヤギ抗ウサギ IgG (1:5,000) を用いて 2 時間 (室温) 反応させた。可視化には、3,3'-diaminobenzidin を用い、アミノ酸ポリマー法 (シンプルステイン MAX-PO、ニチレイ) で染色した。一次抗体を省略した溶液で同様の操作を行い、ネガティブコントロールとした。対比染色はヘマトキシリンによる核染色を行った。蛍光免疫染色は以下の操作手順で行った。まずパラフィン切片を DSD-Ab (1:1,000) と 4°C で一晩反応させた。PBS で洗浄後、Alexa 594 (1:500) と室温で一時間反応させた。二重染色による細胞の同定のため、抗 GFAP 抗体 (1:1,000)、抗 NeuN 抗体 (1:1,000)、抗 Pax-7 抗体 (1:1,000) を適宜用いた。

[結果]

DSD 活性が最も高い臓器は腎臓であった。次いで肝臓や脳にも活性を示した。腎臓や肝臓では部位による活性の差は認めなかったが、脳では差を認め、小脳は脳に比べて 6 倍高い活性を示した。骨格筋と心臓には活性を示さなかった。これらの結果は、ウェスタンブロットの結果とよく一致していた。DSD-Ab による免疫組織化学を行ったところ、腎臓では DSD 陽性細胞を近位尿細管上皮細胞に認め、糸球体、遠位尿細管、集合管では染色は認めなかった。肝臓では肝細胞が一様に染色された。また、脳では DSD 陽性細胞がアストロサイトであることが形態学的に示唆された。さらに、蛍光二重染色により、それらの陽性細胞は、ニューロン特異的マーカーである NeuN に対してネガティブであった。一方、GFAP との蛍光二重染色では全てではないもののよく一致していた。

[考察]

DSD はニワトリ腎臓の近位尿細管や肝臓で強く発現していることから、D-セリン分解酵素である本酵素が、全身を循環している血中遊離 D-セリン濃度を抑えていると考えられる。また、脳では、DSD がバークマングリア細胞を含むアストロサイトに優位に発現していた。したがって、ニワトリ脳の局所では、本酵素が D-セリン定常濃度の決定に関与し、興奮性の神経伝達を調節している可能性が示唆された。

[結論]

本研究で調べた DSD は D-セリン特異的分解酵素であり、脊椎動物に広く分布しているが、哺乳類だけには欠損している。ヒトを含む哺乳類の脳には、非哺乳類と比べて D-セリン濃度が異常に高い。その要因のひとつとして、哺乳類が進化の過程で本酵素を遺伝子レベルで失ったことが考えられる。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	716	氏名	西村 嘉洋
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨)</p> <p>D-セリンは脊椎動物の中樞神経系においてグリシン/D-セリン依存型グルタミン酸受容体 (NMDA 受容体) に結合し、興奮性の神経伝達を調節している。したがって、D-セリンの組織濃度がどのように調節されているかを調べることは重要である。これまで、D-セリンの分解はD-アミノ酸オキシダーゼ (DAO) によるとされてきた。しかし、DAO 以外にも、多くの脊椎動物がD-セリンデヒドラターゼ (DSD) をもっていることが発見され、その D-セリン濃度調節への関与が注目される。本研究では、まずニワトリ主要臓器のうち DSD 酵素活性を示す臓器を調べ、抗 DSD ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングにより確認した。さらに免疫組織化学により、それぞれの臓器における DSD の局在を解析し、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) DSD は腎臓では近位尿細管上皮細胞、肝臓では肝細胞に発現する。また、脳では小脳バークマングリア細胞を含むアストロサイトに発現する。 2) 腎臓・肝臓 DSD は血中に循環する遊離 D-セリン濃度を抑えている。 3) DSD は神経伝達物質である D-セリンを分解し、興奮性神経伝達を調節する可能性がある。 <p>本論文は、新規 D-セリン分解酵素である D-セリンデヒドラターゼの細胞局在について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 600 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 26 年 / 月 28 日)</p>			