

学位論文題名

マウスの消化管と神経組織における
diazepam binding inhibitor の細胞局在および
脂肪酸結合蛋白との共存

学位論文内容の要旨

diazepam binding inhibitor (DBI)は、GABA_A 受容体上のベンゾジアゼピン受容体に結合する内因性の物質としてラットの脳から単離された分子量約 10,000 の細胞質蛋白で、植物界、動物界を通じて多くの種に広く存在し、その構造は種間でよく保存されている。哺乳類においては脳以外の様々な組織に広く分布することから、DBI は GABA 作動性の神経伝達とは別の多様な機能をもっていることが考えられる。また DBI は、長鎖脂肪酸 acyl-CoA エステルに高親和性に結合する acyl-CoA binding protein (ACBP)と同一の分子であることが示されている。acyl-CoA エステルは脂質代謝における基質および中間体として重要な分子であると同時に、酵素活性の調節や細胞内情報伝達、遺伝子の転写など、細胞内の様々な機能を調節している。したがって DBI の主な機能は、acyl-CoA エステルの細胞内輸送や代謝の調節を介して細胞の基本的な活動に関係していると予想される。DBI の機能を明らかにするにあたって、DBI の組織発現、細胞内局在についての情報が不足している。そこで本研究では、*in situ* hybridization 法と免疫組織化学を用いて、DBI がもっとも強く発現している消化管、つぎに DBI がはじめに単離された場である脳を含めた神経系において、DBI mRNA と蛋白の分布を詳細に調べ、さらに長鎖脂肪酸の代謝に関係することで知られる脂肪酸結合蛋白(fatty acid binding protein, FABP)の分布と比較検討した。

消化管では、DBI の mRNA と蛋白は、口腔、食道および前胃において重層扁平上皮の有棘層、腺胃の表層粘液細胞および腸絨毛の吸収上皮細胞に強く発現していた。小腸の DBI mRNA は絨毛の基部に強く発現していた。また、十二指腸腺の腺上皮細胞にも DBI mRNA のシグナルを認めた。消化管を通して、DBI mRNA がもっとも強く発現していたのは回腸であった。大腸では、DBI mRNA のシグナルは陰窩の上皮にびまん性に分布していた。過去の報告で DBI を発現するとされていた杯細胞は DBI mRNA および蛋白を発現していなかった。

神経組織における DBI の発現は、アストログリア系の支持細胞に選択的に認められた。中枢神経系では、DBI の免疫反応は小脳のバークマングリア、*olfactory ensheathing glia*、海馬歯状回顆粒層の基底部細胞層、上衣/脈絡叢、網膜の Müller 細胞に見られた。末梢神経系では、知覚・自律神経節の衛星細胞、副腎髄質の支持細胞が DBI 抗体に対し免疫反応を示した。神経線維における DBI の免疫反応は、背根、坐骨神経、迷走神経、および小腸壁内神経のシュワン細胞、視神経のアストログリア、嗅神経の *olfactory ensheathing glia* に認められた。

DBI は FABP と消化管全体を通して上皮において共発現していた。すなわち、口腔から前胃までは皮膚型(E-) FABP と、腸では腸型(I-) FABP と共存していた。ヒト腸上皮由来の細胞株である Caco-2 細胞では、RT-PCR 法により DBI と肝臓型(L-) FABP mRNA の発現が認められた。神経組織では、上記のアストログリア系の支持細胞において、DBI と脳型(B-) FABP の共存が頻繁に認められた。中枢神経系では、小脳バークマングリア、嗅球の *olfactory ensheathing glia*、海馬歯状回顆粒層の基底部細胞層が両抗体に免疫反応を示した。末梢神経系では、背根神経節と小腸の粘膜下・筋層間神経叢の衛星細胞、副腎髄質の支持細胞が両抗体に染色された。神経線維では、嗅神経の *olfactory ensheathing glia* が DBI と B-FABP 抗体の両方に対し陽性反応を示した。本研究で明らかになった消化管や神経組織以外でも、肝臓、脂肪組織、心臓、精巣などの組織で DBI の mRNA および蛋白の発現が報告されているが、これらの組織はそれぞれ別のサブタイプの FABP を含有している。DBI と FABP が体内で広く共存していることは、両者が細胞内の基本的な活動や代謝に協調して働くことを示唆している。例えば、腸上皮細胞では、DBI と I-FABP は食物由来の脂肪の吸収・輸送に重要な役割を果たしており、またアストログリアとその関連細胞においては、DBI と B-FABP はエネルギー代謝に関係し、神経の発達や機能の調節していると考えられる。ある細胞において両者がどのような機能に関与するかは、共発現する FABP サブタイプの種類によって決まるのであろう。

DBI はこれまでの報告から考えられていたよりもはるかに広い分布様式を示していた。がしかし、特定の細胞においてつねに FABP と共存していたことは機能を考える上で重要である。本研究で得られた所見は、DBI あるいは DBI/FABP の機能を解析する際の基盤となると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 岩 永 敏 彦
副 査 教 授 斉 藤 昌 之
副 査 教 授 梅 村 孝 司
副 査 助 教 授 橋 本 善 春

学 位 論 文 題 名

マウスの消化管と神経組織における diazepam binding inhibitor の細胞局在および 脂肪酸結合蛋白との共存

diazepam binding inhibitor (DBI)は、GABAA受容体上のベンゾジアゼピン受容体に結合する内在性の物質としてラットの脳から単離されたペプチド（分子量約 10,000）である。DBIは消化管など脳以外の組織にも大量に存在し、長鎖脂肪酸 acyl-CoA エステルに高親和性に結合する分子（acyl-CoA binding protein、ACBP）でもあることから、GABA 作動性の神経伝達以外に、例えば脂肪酸の取り込み・代謝に関係していることが予想される。しかし、DBIの機能を明らかにする上で重要な細胞局在についての情報が大いに不足している。そこで本研究では、*in situ* hybridization 法と免疫組織化学により、DBIの発現をマウスの消化管と神経組織において検索し、長鎖脂肪酸の代謝に関係するとされる脂肪酸結合蛋白(fatty acid binding protein、FABP)の発現と比較した。

消化管における DBI の mRNA と産物は、口腔、食道および前胃において重層扁平上皮の有棘層、腺胃の表層粘液細胞および腸絨毛の吸収上皮細胞に強く発現していた。神経組織における DBI の発現は、星状膠細胞を含む支持細胞に選択的に認められた。すなわち、中枢神経系では小脳のバークマングリア、olfactory ensheathing glia、網膜のミュラー細胞、上衣細胞など、末梢神経系では知覚・自律神経節の衛星細胞、シュワン細胞、副腎髄質の支持細胞などであった。

上記 DBI 発現細胞において FABP との共存関係が認められた。口腔から胃までは皮膚型 FABP と、腸では腸型 FABP と、また神経系では脳型 FABP と共発現していた。これら以外の組織でも、DBI は別のタイプの FABP と共存していることから、DBI と FABP の共存は普遍的な現象であること、両者が共同で脂肪酸の取り込み・代謝、ひいては細胞の機能発現、分化に関与していることが強く示唆された。

以上の結果は、DBI が過去に報告されていたよりもはるかに広い分布域を示すとともに、FABP との共存が、DBI の存在意義、脂肪酸代謝のメカニズム、グリア系細胞の機能を明らかにする上で重要な所見であり、この方面の研究に大きく寄与すると思われる。よって、審査員一同は、築瀬晴子氏が博士（獣医学）の学位を受ける十分な資格を有するものと認めた。