

学位論文題名

Identification of immune-related molecules in invertebrates and analyses of their regulatory mechanisms.

（無脊椎動物の生体防御に関わる分子の同定およびその発現制御機構の解析）

学位論文内容の要旨

1. 抗菌タンパク質遺伝子の誘導機構を調べるため、カイコ脂肪体のcDNAライブラリーから抗菌性タンパク質の一種セクロピンBのcDNAをクローニングした。得られた2つの陽性クローンの塩基配列を決定し、そのアミノ酸配列を予測した。これらのクローンがコードするアミノ酸配列は、両者ともセクロピンBと一致したが、翻訳領域の同一アミノ酸をコードするいくつかのコドンで第3番目の塩基に多様性が見られたほか、5'および3'の非翻訳領域の塩基配列に違いが見られた。ノーザン・ブロットによる解析の結果、カイコ・セクロピンBの遺伝子発現は大腸菌の注射によって急速に誘導され、8時間後には極大に達することが明らかになった。発現は、主に脂肪体および血球に見られた。
2. カイコ体液からのリポ多糖（LPS）の除去と、そのセクロピンBの誘導制御機構における生理的役割について調べた。脂肪体の初代培養系では、セクロピンB mRNAはLPSによって20分のうちに誘導され、その蓄積は72時間以上にわたって持続した。少なくとも24時間以内に有意な脱感作は認められなかった。それに対しLPSを直接カイコ体腔中に注射した場合では、セクロピンB mRNAは注射後24時間以内に完全に消失した。これらの結果は、体液中のLPSの濃度および（もしくは）生物活性が時間依存的に減少していることを示唆する。注射後の体液中のLPSの濃度を経時的に観測したところ、初期の速い相（ $t_{1/2} = 1.0$ h）とそれに続く遅い相（ $t_{1/2} > 18$ h）の2相からなるLPSの除去が見いだされた。さらに、体液中においてセクロピンB mRNAを誘導するために必要なLPSの閾値は、脂肪体初代培養系で調べた値に比べ10倍以上高いことが示唆された。LPS注射後24時間の脂肪体からはセクロピンB mRNAはほとんど検出されないが、LPSの再注射によって再び誘導された。この結果は、体液からのLPSの除去がLPS注射によるセクロピンB mRNAの誘導の終結に直接的に寄与していることを示す。これらの結果から、カイコはLPSによって引き起こされる抗菌タンパク質の誘導を終結させるのに足りる、生理的に意義ある能力をもったLPS除去機構を備えていることが示唆された。
3. カイコ体液中におけるリポホリン-LPS複合体形成と、そのLPS解毒における役割について調べた。蛍光標識したLPSをカイコ体腔中に注射し、経時的に採取した体液を密度勾配遠心法で解析した。注射後、蛍光のピークは高密度側から低密度側へ移動した。移動した低密度ピークは48時間以上の持続性を示し、体液中からの除去に対する抵抗性を示した。この低密度ピークはリポホリン-LPS複合体に由来するものと同定された。この複合体は、血球を含まない体液とLPSの混合物を25℃、24時間インキュベーションすることによって形成されたが、1℃では形成されなかった。リポホリンと複合体を形成したLPSは、遊離型のLPSに比べて、著しくセクロピン誘導能が低いことが示された。この複合体から再抽出されたLPSは、SDS/PAGEでの解析からは有為な構造上の変化は認められず、リムルス試験に対する活性もわずかな減少を示したにとどまった。これらの結果は、リポホリン-LPS複合体の形成がLPSの構造を変化させることなしにセクロピン誘導能を減少させていることを示唆する。類似した血漿リポタンパク質-LPS複合体形成によるLPSの生物活性の低下は哺乳動物でも報告されており、この機構は昆虫類および哺乳類に共通に保存されているLPSの解毒経路であることが示唆された。
4. カイコ体腔中に大腸菌を注射することによって、主要な体液タンパク質であるSP2（アリルフォリン類に属する貯蔵タンパク質）および30Kタンパク質の産生が抑制されることを見いだした。これらのタンパク質のmRNAの蓄積量も同様に減少したことから、この抑制現象の少なくとも一部分はこれに由来すると考えられる。SP2 mRNA量は、大腸菌注射後8時間以上経過してから急速な減少を始めた。それに対し、セクロピンB

■RNAの蓄積は注射後20分で明らかに認められた。さらに、SP2■RNA量の減少を引き起こすには、セクロビン-B■RNAの誘導に必要な量よりはるかに多くの大腸菌を必要とした。これらの結果から、大腸菌注射による主要体液タンパク質の産生抑制は、抗菌性タンパク質の誘導とは異なった機構で制御されていると結論した。

5. 寄生性線虫の一種、豚回虫の体液から3つの基本的な防御活性（抗菌、細菌溶解および異物凝集活性）を検出した。抗菌活性は、相対的にグラム陽性菌（バチルス・サブティリスおよび黄色ブドウ球菌）に対して強く、グラム陰性菌に対して弱かった。体液中の抗黄色ブドウ球菌活性は、1 mg/ml ストレプトマイシン当量と見積もられた。黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を示標として、ゲル濾過HPLCおよび逆相HPLCによりこの抗菌因子を精製し、ASABFと命名した。ASABFは熱耐性（100℃、6分）を示したが、トリプシン処理で失活したことからタンパク性と考えられた。ゲル濾過により、分子量は3 - 4.5 kDaと見積もられた。ASABFのN末端のアミノ酸配列は既知の抗菌性タンパク質のいずれとも相同性を示さなかった。細菌溶解活性も検出されおおよそ10 ug/ml 卵白リゾチーム当量前後と見積もられた。さらに、大腸菌およびグルタルアルデヒド固定トリプシン処理ヒトA型赤血球に対する凝集活性が検出された。ゲル濾過により、ASLLF-1（500 kDa）およびASLLF-2（25 kDa）の少なくとも2種の異なる凝集因子が見いだされた。両者とも熱処理（100℃、6分）またはトリプシン処理により活性が失われた。以上の防御活性は全て無処理線虫から採取した体液から検出され細菌注射のような前処理は活性の検出に必要でなかった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 栗 原 堅 三
副 査 教 授 横 沢 英 良
副 査 助 教 授 三 宅 教 尚
副 査 助 教 授 澤 田 均

学 位 論 文 題 名

Identification of immune-related molecules in invertebrates and
analyses of their regulatory mechanisms.

(無脊椎動物の生体防御に関わる分子の同定およびその発現制御機構の解析)

申請者は長年、無脊椎動物の生体防御機構に関する研究を行ってきた。今回の論文は、申請者の長年の研究成果をまとめたものである。

1. 抗菌タンパク質遺伝子の誘導機構を調べるため、カイコ脂肪体のcDNAライブラリーから抗菌性タンパク質の一種セクロピンBのcDNAをクローニングした。得られた2つの陽性クローンの塩基配列を決定し、そのアミノ酸配列を予測した。これらのクローンがコードするアミノ酸配列は、両者ともセクロピンBと一致したが、塩基配列に違いが見られた。ノーザン・ブロットによる解析の結果、カイコ・セクロピンBの遺伝子発現は大腸菌の注射によって急速に誘導され、8時間後には極大に達することが明らかになった。発現は、主に脂肪体および血球に見られた。

2. カイコ体液からのリポ多糖 (LPS) の除去と、そのセクロピンBの誘導制御機構における生理的役割について調べた。注射後の体液中のLPSの濃度を経時的に観測したところ、初期の速い相 ($t_{1/2} = 1.0 \text{ h}$) とそれに続く遅い

相 ($t_{1/2} > 18 \text{ h}$) の2相からなるLPSの除去が見いだされた。さらに、体液中においてセクロピンB mRNAを誘導するために必要なLPSの閾値は、脂肪体初代培養系で調べた値に比べ10倍以上高いことが示唆された。LPS注射後24時間の脂肪体からはセクロピンmRNAはほとんど検出されないが、LPSの再注射によって再び誘導された。この結果は体液からのLPSの除去がLPS注射によるセクロピンB mRNAの誘導の終結に直接的に寄与していることを示し、カイコが生理的に意義ある能力をもったLPS除去機構を備えていることが示唆された。

3. カイコ体液中におけるリポホリン-LPS複合体形成と、そのLPS解毒における役割について調べた。蛍光標識したLPSをカイコ体腔中に注射し、経時的に採取した体液を密度勾配遠心法で解析した。注射後、蛍光のピークは高密度側から低密度側へ移動した。移動した低密度ピークは48時間以上の持続性を示し、体液中からの除去に対する抵抗性を示した。この低密度ピークはリポホリン-LPS複合体に由来するものと同定された。この複合体は、血球を含まない体液とLPSの混合物を25℃、24時間インキュベーションすることによっても形成されたが、1℃では形成されなかった。リポホリン-LPS複合体の形成によりLPSの構造を変化させることなしにセクロピン誘導能が減少していることが示唆された。類似した血漿リポタンパク質-LPS複合体形成によるLPSの生物活性の低下は哺乳動物でも報告されており、この機構は昆虫類および哺乳類に共通に保存されているLPSの解毒経路であることが示唆された。

4. カイコ体腔中に大腸菌を注射することによって、主要な体液タンパク質であるSP2（アリルフォリン類に属する貯蔵タンパク質）および30Kタンパク質の産生が抑制されることを見いだした。これらのタンパク質のmRNAの蓄積量も同様に減少した。SP2 mRNA量は、大腸菌注射後8時間

以上経過してから急速な減少を始めた。それに対し、セクロピン B mRNA の蓄積は注射後 20 分で明らかに認められた。さらに、SP2 mRNA 量の減少を引き起こすには、セクロピン B mRNA の誘導に必要な量よりはるかに多くの大腸菌を必要とした。これらの結果から、大腸菌注射による主要体液タンパク質の産生抑制は、抗菌性タンパク質の誘導とは異なった機構で制御されていると結論した。

5. 寄生性線虫の一種、豚回虫の体液から 3 つの基本的な防御活性（抗菌、細菌溶解および異物凝集活性）を検出した。抗菌活性は、相対的にグラム陽性菌に対して強く、グラム陰性菌に対して弱かった。体液中の抗黄色ブドウ球菌活性は、1 mg/ml ストレプトマイシン当量と見積もられた。黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を示標として、ゲル濾過 HPLC および逆相 HPLC によりこの抗菌因子を精製し、ASABF と命名した。ASABF は熱耐性（100℃、6 分）を示したが、トリプシン処理で失活したことからタンパク性と考えられた。ゲル濾過により、分子量は 3 - 4.5 kDa と見積もられた。ASABF の N 末端のアミノ酸配列は既知の抗菌性タンパク質のいずれとも相同性を示さなかった。細菌溶解活性も検出されおよそ 10 ug/ml 卵白リゾチーム当量前後と見積もられた。さらに、大腸菌およびグルタールアルデヒド固定トリプシン処理ヒト A 型赤血球に対する凝集活性が検出された。ゲル濾過により、ASLLF-1（500 kDa）および ASLLF-2（25 kDa）の少なくとも 2 種の異なる凝集因子が見いだされた。両者とも熱処理（100℃、6 分）またはトリプシン処理により活性が失われた。以上の防御活性は全て無処理線虫から採取した体液から検出され細菌注射のような前処理は活性の検出に必要でなかった。

以上のように、本研究は無脊椎動物の生体防御に関する多くの新しい知見を含んでおり、博士（薬学）の学位を与えるに相応しいと判定した。