

学 位 論 文 題 名

Studies on porcine interleukin-18
and interleukin-1 beta converting enzyme

(豚のインターロイキン18とその変換酵素に関する研究)

学位論文内容の要旨

インターロイキン 18 (IL-18) は、T 細胞や NK 細胞からのインターフェロンの発現を IL-12 と相乗的に誘導し、Th1 細胞の活性化と NK 細胞活性を増強し、自然免疫と獲得免疫の両者に関与するサイトカインとしてその免疫学的役割が注目されている。本研究では、豚における様々な疾病の病態形成における IL-18 の役割およびその予防・治療あるいはワクチンアジュバントへの利用の可能性を検討するため、まず、豚 IL-18 の cDNA をクローニングし、組み換えタンパク質と特異抗体の作出を試みた。次いで、IL-18 を前駆体型から活性型へと変換するために必須な酵素である豚 IL-1b 変換酵素 (ICE) 遺伝子のクローニングを行い、豚活性型 IL-18 の効率的産生に成功した。得られた成績は以下のように要約される。

1. 豚 IL-18 遺伝子のクローニングと組み換えタンパク質の発現

リポポリサッカライド (LPS) で刺激した豚の肺胞マクロファージより RNA を抽出し、cDNA を合成した。豚 IL-18 の 5'部分塩基配列を基に、3'RACE 法により完全長の豚 IL-18cDNA を得て、その塩基配列を決定した。豚 IL-18 の cDNA のオープンリーディングフレームは 579 塩基であり、192 アミノ酸をコードしていた。予想されるアミノ酸配列はヒト、マウス及びラットの IL-18 のアミノ酸配列とそれぞれ 76.7%、64.7%および 61.6%の相同性を示した。豚 IL-18 の前駆体型および活性型タンパク質をバキュロウィルスをベクターとして昆虫細胞 Tn5 中で発現させた。

2. 豚 IL-18 に対する特異抗体の作製とその利用

組み換え IL-18 に対するモノクローナル抗体を作出した。得られた抗体を用い、ウェスタンブロット法で組み換え豚 IL-18 の検出、ならびにイムノアフィニティークロマトグラフィーにより生物活性を有する豚 IL-18 の精製が可能となった。また、モノクローナル抗体を利用することにより、免疫組織化学染色や、サンドウィッチ ELISA 法により、高感度に豚 IL-18 を検出することが可能となった。

3. 豚 IL-1b 変換酵素 (ICE) のクローニング

ヒト、マウス及びラットの ICE のアミノ酸配列に基づいて設計したプライマーを用いて、RT-PCR 法により、豚 ICE の cDNA をクローニングした。得られた豚 ICE の cDNA のオープンリーディングフレームは 1,215 塩基であり、404 アミノ酸をコードしていた。予想されるアミノ酸配列はヒト、マウス及びラットの ICE のアミノ酸配列とそれぞれ 72.5%、62.6%および 64.1%の相同性を示した。LPS 刺激豚肺胞マクロファージでの ICE、IL-1b および IL-18 の mRNA 発現を調べたところ、LPS 刺激により ICE の発現は増強され、IL-1b と IL-18 は異なった発現動態を示した。

4. 豚活性型 IL-18 の効率的生産

通常、昆虫細胞は前駆体型 IL-18 が活性型 IL-18 にプロセッシングされるのに必要とされる ICE を持たない。そこで、豚 ICE を発現する組み換えバキュロウイルスを作製し、昆虫細胞内で発現させた。そして、昆虫細胞内で ICE と豚前駆体型 IL-18 の共発現系により、豚活性型 IL-18 を培養上清中に効率よく分泌させることに成功した。さらに、ICE の特異的阻害剤を用いた ICE 活性の阻害により、昆虫細胞中での前駆体型 IL-18 から活性型 IL-18 へのプロセッシングも阻害された。この方法により大量の組み換え豚活性型 IL-18 が得られるようになり、豚における様々な疾病での病態形成における IL-18 の役割の研究、およびそれら疾病の予防・治療あるいはワクチンアジュバントとしての IL-18 の利用が可能となった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	小沼	操
副査	教授	斉藤	昌之
副査	教授	喜田	宏
副査	助教授	大橋	和彦

学位論文題名

Studies on porcine interleukin-18 and interleukin-1 beta converting enzyme

(豚のインターロイキン18とその変換酵素に関する研究)

インターロイキン 18 (IL-18) は、T 細胞や NK 細胞からのインターフェロンの発現を IL-12 と相乗的に誘導し、Th1 細胞の活性化と NK 細胞活性を増強し、自然免疫と獲得免疫の両者に関与するサイトカインとしてその免疫学的役割が注目されている。そこで、豚 IL-18 の cDNA をクローニングし、組み換えタンパク質と特異抗体の作出を試みた。次いで、IL-18 を前駆体型から活性型へと変換するために必要な酵素である豚 IL-1 β 変換酵素 (ICE) 遺伝子のクローニングを行い、豚活性型 IL-18 の効率的産生について検討した。

まず RACE 法により完全長の豚 IL-18cDNA を得て、その塩基配列を決定した。豚 IL-18 の cDNA のオープンリーディングフレームは 579 塩基であり、192 アミノ酸をコードしていた。予想されるアミノ酸配列はヒト、マウス及びラットの IL-18 のアミノ酸配列とそれぞれ 76.7%、64.7% および 61.6% の相同性を示した。組み換え IL-18 に対するモノクローナル抗体を作出し、サンドイッチエライサ法により、高感度に豚 IL-18 を検出することを可能にした。

次に、豚 ICE の cDNA をクローニングした。得られた豚 ICE の cDNA のオープンリーディングフレームは 1,215 塩基であり、404 アミノ酸をコードしていた。予想されるアミノ酸配列はヒト、マウス及びラットの ICE のアミノ酸配列とそれぞれ 72.5%、62.6%、64.1% の相同性を示した。通常、昆虫細胞は前駆体型 IL-18 が活性型 IL-18 にプロセッシングされるのに必要とされる ICE を持たない。そこで、豚 ICE を発現する組み換えバキュロウイルスを作製し、昆虫細胞内で発現させた。そして、昆虫細胞内で ICE と豚前駆体型 IL-18 の共発現系により、豚活性型 IL-18 を培養上清中に効率よく分泌させることに成功した。

本研究は、豚 IL-18 の効率的な発現の成功により、豚の様々な疾病での病態形成にお

ける IL-18 の役割の研究、およびそれら疾病の予防・治療あるいはワクチンアジュバントとして IL-18 の利用を可能とした。よって、審査員一同は宗田吉広氏が博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。