

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 金山 敦宏

タウリンは、古くから知られているアミノ酸であり、その生理機能は多岐に渡っている。しかし、免疫系細胞におけるタウリンの役割は現在のところまだ明確ではない。好中球に豊富に存在することが報告されているタウリンは、この細胞に特徴的な myeloperoxidase (MPO) の働きで生じる次亜塩素酸と反応して taurine chloramines (TauCl) となることが知られている。本論文は、この TauCl の生理機能に焦点を当て、特に転写因子 NF $\kappa$ B の活性化に対するタウリンの阻害効果の研究をまとめたもので、序論と総論を含め 6 章から構成されている。

第 1 章序論で研究の背景と動機を述べた後、第 2 章で TauCl に I $\kappa$ B $\alpha$  分解阻害と NF $\kappa$ B 活性化阻害作用があることを示した。Jurkat 細胞を TNF $\alpha$  で刺激すると I $\kappa$ B $\alpha$  は速やかにリン酸化され、分解されるが、TauCl で細胞を前処理すると、I $\kappa$ B $\alpha$  の電気泳動のバンドがシフトし、そのバンドは TNF $\alpha$  刺激後も消滅せずに残ることが観察された。このバンドシフトのパターンは、プロテアソームの阻害剤 (PSI) やリン酸化阻害剤 pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) で細胞を処理した場合とは異なっていた。同時に、核内に移行する NF $\kappa$ B の経時的増加が TauCl 処理により阻害されることがゲルシフトアッセイにより観察された。ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイでは、TauCl の処理濃度に依存して、TNF $\alpha$  に誘導される NF $\kappa$ B 依存性の転写活性化が抑制された。

TauCl による I $\kappa$ B $\alpha$  分解阻害と NF $\kappa$ B 活性化阻害が明確になり、特に TauCl による I $\kappa$ B $\alpha$  のバンドのシフトという特徴的な現象を捉えたことを基盤にして、第 3 章では、HL-60 細胞と好中球におけるタウリンの機能について論じている。MPO を発現している HL-60 を過酸化水素で処理すると、Jurkat 細胞を TauCl で処理した場合と同様の I $\kappa$ B $\alpha$  のシフトバンドが観察され、TNF $\alpha$  による NF $\kappa$ B の核移行は阻害された。しかし MPO 阻害剤で前処理すると、I $\kappa$ B $\alpha$  のバンドはシフトせずに TNF $\alpha$  処理によって分解し、しかも NF $\kappa$ B の核移行は阻害されなかった。以上から、MPO を持つ細胞では TauCl が細胞内で生合成され、それが NF $\kappa$ B の活性化を阻害する可能性が示された。細菌食食によって誘導される IL-8 の産生は、タウリン濃度を減少させたラット好中球では経時的に上昇したが、タウリンを再吸収させた細胞では、劇的に抑制された。しかも MPO 阻害剤でこの細胞を前処理すると、IL-8 の産生は上昇した。よって、食食刺激で細胞内で合成された TauCl が NF $\kappa$ B に依存し

た IL-8 の産生を抑制することが示唆された。

続く第4章では TauCl による  $I\kappa B\alpha$  の修飾反応の解析を試みている。リン酸化部位に変異を導入した  $I\kappa B\alpha$  (S32/36A) のバンドも TauCl 処理でシフトしたこと、アルカリフォスファターゼ処理してもシフトしたバンドは元に戻らなかったこと、煮沸処理によって酵素を失活させてから TauCl で処理しても  $I\kappa B\alpha$  のバンドはシフトしたことから、TauCl による  $I\kappa B\alpha$  の酵素的修飾の可能性は否定された。Tau<sup>36</sup>Cl を用いた解析から、 $I\kappa B\alpha$  の塩素化が示唆されたが、塩素化の標的となる Tyr 残基と Trp 残基に点突然変異を導入した  $I\kappa B\alpha$  も TauCl 処理でシフトを示したことから、塩素化のバンドシフトへの関与は否定された。

第5章では、 $I\kappa B\alpha$  のバンドシフトの原因を探るために  $I\kappa B\alpha$  の部分欠失変異体を作成し、バンドのシフトに必要な領域を探索している。その結果、 $I\kappa B\alpha$  (43-180) ではバンドのシフトが生じるが、 $I\kappa B\alpha$  (67-180) ではシフトが生じないことを見出した。この知見をもとに各種の変異体を用いて解析を進め、TauCl による  $I\kappa B\alpha$  の修飾アミノ酸残基が Met45 であることを突き止めるとともに、Met45 を含むペプチド断片の MS 分析からメチオニン残基の酸化がバンドシフトの原因であることを明らかにした。さらに Met45 を変異させた  $I\kappa B\alpha$  を Jurkat 細胞に導入した場合、変異体は TauCl で細胞を前処理してもバンドがほとんどシフトせず、TNF $\alpha$  の刺激によって速やかに分解した。しかも、 $I\kappa B\alpha$  (M45A) を導入した Jurkat 細胞では、野生型の  $I\kappa B\alpha$  を導入した細胞に比べて、NF $\kappa$ B に依存した転写活性化の TauCl による抑制率が低下することが見出された。すなわち、TauCl によって Met45 が酸化されることで、 $I\kappa B\alpha$  が TNF $\alpha$  に誘導される分解に耐性を持つようになり、NF $\kappa$ B の活性化による転写が抑制されることが強く示唆された。なお第6章では、本研究を総括するとともに、研究の展望が述べられている。

以上、本論文は、好中球が貪食する時に合成される TauCl が、貪食刺激等で活性化されることが知られている NF $\kappa$ B の活性化を抑制することが示し、そのメカニズムを細胞・分子レベルで詳細に明らかにしたもので、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。