

論文審査の結果の要旨

氏名 宮澤 清太

本論文は 4 章からなり、第 1 章はホヤ体腔液の溶血活性の検討、第 2 章および第 3 章は補体受容体候補としてのホヤインテグリン $\alpha \cdot \beta$ 両サブユニット遺伝子の同定と機能解析、第 4 章はホヤ原始補体系活性制御因子の候補遺伝子の同定について述べられている。

補体系は感染の初期段階で特に重要な生体防御反応を行う自然免疫系の 1 つであるが、近年の研究により、獲得免疫を持たない下等脊椎動物および無脊椎動物においても補体活性化経路の複数の因子が存在することが示されている。しかし、現在までのところ原始補体系の効果機構についてはほとんど明らかになっていない。本研究は、尾索動物ホヤの原始補体系を対象として、その効果機構および活性調節機構について解析することを目的として行われた。

第 1 章では、哺乳類補体系において重要な効果機構の 1 つである溶血活性が、ホヤ体腔液中にも存在するかどうかについての検討が行われた。非感作ウサギ赤血球を用いた溶血活性測定によって、マボヤ体腔液にも濃度依存的な溶血活性が存在することが示されたが、この活性はヒト血清の補体第二経路による溶血活性に比較し約 20%と弱いものであった。また、このマボヤ体腔液の溶血活性は熱処理による補体成分の失活や抗ホヤ C3 抗体を用いた C3 の吸収によっても阻害されなかったことから、補体とは独立の機構によるものであることが示された。

第 2 章では、ホヤ補体受容体の同定を目的として、マボヤインテグリン α サブユニット遺伝子の単離と機能解析が行われた。マボヤ血球 RNA から相同性 PCR により 2 種類のインテグリン α サブユニット遺伝子が単離され、全長配列が決定された。うち 1 種 (α_{Hr1}) は、哺乳類以外の動物から発見されたインテグリンとしては初めて I ドメイン (VWA ドメイン) と呼ばれる挿入配列を持つものであり、分子系統樹から、哺乳類補体受容体 CR3/CR4 の α サブユニットを含む I ドメイン含有インテグリン α 遺伝子のグループの中で最も古く分岐したものであることが明らかとなった。マボヤ α_{Hr1} mRNA は血球特異的に発現しており、組換えタンパク質に対して作成された抗 α_{Hr1} 抗体を用いた免疫染色によっても、 α_{Hr1} サブユニットがマボヤ血球部分集団の細胞膜上に発現していることが観察された。酵母を用いたマボヤ血球の貪食活性測定により、補体依存性の貪食促進活性のみが抗 α_{Hr1} 抗体で阻害されることが明らかとなった。これらの結果から、マボヤインテグリン α_{Hr1} サブユニットがホヤ血球上で哺乳類の CR3/CR4 に相当する補体受容体分子を形成していることが示唆された。

第 3 章では、マボヤ α_{Hr1} と結合してホヤ補体受容体を形成するインテグリン β サブユニットの同定が行われた。マボヤ血球から相同性 PCR によってインテグリン β サブユニット遺伝子 2 種 (β_{Hr1}, β_{Hr2}) が単離され、全長配列が決定された。分子系統樹から、 α サブユニットの場合と異なり、ホヤ β サブユニット遺伝子はホヤの系統で独自に起こった遺伝子重複の結果生じた特殊なものであることが示された。マボヤ β_{Hr1}, β_{Hr2} mRNA はともにマボヤ血球に特異的な発現が見られた。免疫沈降により、昆虫細胞発現系では β_{Hr1}, β_{Hr2} サブユニットがともに α_{Hr1} と結合し得ること、またマボヤ血球上では β_{Hr1} と α_{Hr1} が結合していることが明らかにされた。抗 β_{Hr1} 抗体を用いた免疫染色により、 β_{Hr1} サブユニットはマボヤ血球のうち、貪食活性をもつとされる細胞上に発現していることが明らかとなった。これらの観察と第 2 章の結果から、マボヤ血球上で $\alpha_{Hr1} \beta_{Hr1}$ インテグリンが補体受容体として機能していることが示された。このことは、原始補体系において既に C3 依存性の異物貪食促進作用が存在し、有効な効果機構として機能していたことを示すものである。

第 4 章では、ホヤ原始補体系の活性調節に関与する因子の探索が行われた。マボヤ肝臓より作成された EST ライブラリの約 1200 クローンについて 5' 側領域の配列解析が行われ、補体制御因子遺伝子の網羅的探索が試みられた。この結果、マボヤ Clusterin 遺伝子が単離された。Clusterin はこれまで脊椎動物でのみ発見されている糖タンパク質であり、哺乳類補体系では後期経路の制御にも関わることが示唆されている。脊椎動物の Clusterin はさまざまな組織で発現していることが知られているが、マボヤ Clusterin 遺伝子は鰓嚢での顕著な発現が確認された。さらに、哺乳類補体制御因子群に共通に見られる特徴的な構造である SCR (Short Consensus Repeat) を指標とした BLAST 検索によって、マボヤ受精卵 EST データベース (MAGEST データベース) およびカタユレイボヤ EST データベースから SCR 様配列を持つクローンの探索が行われた。これらの結果、マボヤから SCR 配列を持つ 3 つの新規遺伝子 (HrSCR-1, -2, -3) が同定された。このうち HrSCR-1 は 5 個の SCR と膜貫通領域を持ち、脊椎動物の膜型補体制御因子との構造上の類似性が示された。HrSCR-1 遺伝子はすべての組織で発現しており、この因子がマボヤ各組織の細胞表面で補体活性化の制御を担っている可能性が示唆された。これらの結果より、ホヤ原始補体系においても哺乳類と同様の機構によって補体活性の調節が行われている可能性が極めて高いことが示された。

なお、本論文の第 2 章は安住薫氏および野中勝との共同研究、第 3 章は野中勝との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験および解析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士 (理学) の学位を授与できると認める。