

## 審査要旨

この研究は、センチニクバエの抗菌蛋白ザーペシン B の活性中心を形成する、アミノ酸 11 残基よりなるペプチドをもとにデザインされたペプチド KLKLLLLLKLK-NH<sub>2</sub> (L5) の、宿主免疫能活性化機序について検討を加えたものである。さらに、L5 の受容体と考えられている細胞表面の Calreticulin について、その情報伝達機構を結合分子の検索から検討したものである。

L5 には、マウス感染死を回避する活性があることが分かっており、また *in vitro* で L5 が好中球から活性酸素を産生させることが明らかだった。また、L5 の抗菌性は *in vitro* よりも *in vivo* で強く現れることから、L5 はマウス体内において宿主免疫系を活性化することにより抗感染症活性をあらわしているという仮説がたてられていた。今回、この仮説を検証するために、宿主免疫の活性化を検討するのに適している腹腔内感染系を用いて解析を行った。その結果、L5 によって腹腔内に好中球が浸潤し、腹腔細胞の活性酸素産生、腹腔内の抗菌性が上昇していることが明らかになった。そして、L5 の宿主体内での抗菌活性は、投与後 7 時間を経過しないと発現しなかった。L5 が、菌に対して直接の抗菌性をもつのであれば、投与直後に抗菌性が一番高いはずである。よって、L5 の抗感染症作用は、その直接の抗菌性に依存するというよりも、宿主免疫系の活性化によるものであると示された。

また、L5 がまず腹腔内においてどのように機能するのかについて検討するために、腹腔内に常在する単球や中皮細胞への作用を検討した。これらの培養細胞(単球は THP1, 中皮細胞は CRL9444)に対して L5 を加えた場合、浮遊細胞である THP1 は凝集、接着細胞である CRL9444 は接着が亢進するという結果が得られた。この結果から、L5 は腹腔内細胞についてその接着性を変化させ、細胞表面の機能変化をひきおこしている可能性を示した。

次に、この凝集、接着について、L5 の受容体と考えられている Calreticulin が機能するかどうか検討した。凝集の定量的解析が可能な血小板凝集系を用いて解析を行い、L5 が血小板も凝集させること、また、この凝集が抗 Calreticulin 抗体によって阻害されることを示した。

L5 は好中球においては、Calreticulin を受容体としていたと考えられていた。しかし、Calreticulin には細胞膜貫通領域が存在しないことから、この分子がどのように細胞内へ情報を伝達しているかは明らかではなかった。そこで、Calreticulin は他の細胞膜貫通性分子と相互作用することにより細胞内へ情報を伝達しているのではないかと考えられ、そのような相互作用分子を、免疫沈降と LC/MS/MS を用いて検索した。そして、その結果に基づき beta Integrin 鎖について検討を加えた。Integrin と Calreticulin が *in vitro* で結合することと、また、Calreticulin を介するとされている、L5 による好中球からの活性酸素産生を、beta-1 Integrin 抗体が阻害することを示した。これらの解析により Calreticulin のアダプター分子が beta Integrin である可能性をはじめて示した。

以上のように、この研究は L5 というペプチドが宿主免疫を活性化している点を明らかにし、また、L5 受容体と考えられている Calreticulin について、そのアダプター分子として Integrin を提示したという点で、独創性の高い研究であり、博士（薬学）に値するものと判断される。