

## 論文の内容の要旨

論文題目            新規  $\beta$ -defensin の同定と機能、組織分布の解析

氏名                                山口 泰弘

### 【研究の背景と目的】

高等脊椎動物において、感染防御は、生命の維持に最も重要なテーマであり、先天的、非特異的な自然免疫機構が、侵入する微生物に対して常に最も迅速に反応している。そして、自然免疫機構のエフェクター因子として、リゾチームやラクトフェリンのような比較的大きな抗菌物質に加えて、数 kD の小さな抗菌ペプチドの存在することが明かとなった。現在、ヒトの代表的な抗菌ペプチドとして、defensin や cathelicidin が知られている。

$\beta$ -defensin は、特異的な 6 つのシステイン配列を有する塩基性ペプチドである。ヒトの  $\beta$ -defensin としては、human  $\beta$ -defensin-1, 2, 3, 4 (hBD-1, 2, 3, 4) が報告された。そのほか、精巢上体での発現が報告されていた HE2 $\beta$ 1 も、 $\beta$ -defensin ファミリーに属する。また、マウスの  $\beta$ -defensin として、mouse  $\beta$ -defensin-1, -2, -3, -4 (mBD-1, -2, -3, -4) が報告されていた。mBD-1, mBD-3 は、それぞれ hBD-1, hBD-2 のマウスホモログである。

hBD-1, hBD-2 や、それらのマウスホモログは、皮膚、気道系、腎など、複数の組織での発現が報告されている。一方、HE2 $\beta$ 1 のラットホモログである Bin1b や、hBD-4 は、主に

男性生殖器に発現することが報告されている。そして、これらの $\beta$ -defensin アイソフォームが共通の臓器において、機能的に協調、代償しあうことが予想される。したがって、個々のアイソフォームの評価だけでなく、 $\beta$ -defensin アイソフォーム全体を同定し解析することが重要と考えられた。

報告されたヒトやマウスの defensin は、すべてクロモソーム 8 上の連続した領域に位置している。したがって、新規の  $\beta$ -defensin 遺伝子全体を同定するために、ゲノム塩基配列は、非常に有用な情報であると予想された。我々は、ヒトおよびマウスのゲノムより、新規の  $\beta$ -defensin を網羅的にサーチし、その発現、機能を解析した。

#### 【研究の方法と結果】

mBD-3 遺伝子を含む BAC クローンに対して mBD-3 や mBD-4 に共通のプライマーを用いて PCR を施行することにより、新規  $\beta$ -defensin をコードする 2.7 kB のゲノムシーケンスを同定した。この塩基配列をもとに、マウスの骨格筋 RNA に対して RT-PCR を施行することにより、相当する転写産物を確認した。この新規の転写産物のコードするアミノ酸配列は、 $\beta$ -defensin に特異的なシステイン配列を含んでおり、mouse  $\beta$ -defensin-6 (mBD-6) と命名した。

ヒトのゲノムシーケンスのほぼ全長が解読されることにより、我々は、複数のゲノムシーケンスが、 $\beta$ -defensin 特異的なシステイン配列をコードしていることを見出した。そのなかの 2 つの遺伝子について、ヒト精巣上体 RNA の RT-PCR により転写産物の存在を確認することができた。これらの新規の転写産物のコードするアミノ酸配列は、 $\beta$ -defensin 特異的なシステイン配列を含んでおり、human  $\beta$ -defensin-5 (hBD-5)、human  $\beta$ -defensin-6 (hBD-6) と命名した。

さらに、マウスについても、マウスゲノムシーケンスやヒト  $\beta$ -defensin cDNA との相同性により、hBD-5、hBD-6、HE2 $\beta$ 1、hBD-3 のマウスホモログを同定した。既存のゲノムシーケンスの命名や NCBI データベース上の命名に従い、hBD-5 のマウスホモログを mouse  $\beta$ -defensin-12 (mBD-12)、hBD-6 のマウスホモログを mouse  $\beta$ -defensin-11 (mBD-11)、

hBD-3 のマウスホモログを mouse  $\beta$ -defensin-14 (mBD-14) と命名した。マウスの精巣上体 RNA やマウス食道 RNA に対する RT-PCR、5'-RACE、3'-RACE により、mBD-11、mBD-12、mBD-14 遺伝子の転写とその塩基配列を確認した。

ヒトの HE2 $\beta$ 1 は、チンパンジーの EP2 ファミリーに属する。マウスでは、EP2E や EP2C に相当する選択的スプライシングの存在が、マウス精巣上体 RNA の RT-PCR、5'-RACE、3'-RACE により明らかとなった。我々は、これらの新規遺伝子を、順に mouse EP2e (mEP2e)、mouse EP2c (mEP2c) と命名した。ヒトの HE2 $\beta$ 1 は、EP2D アイソフォームに相当するが、相当する選択的スプライシングは、マウスでは見出されなかった。

これらの新規遺伝子の機能を評価するために、mBD-6 の C 端 40 残基よりなるペプチドおよび mBD-12 の C 端 34 残基よりなるペプチドを化学的に合成した。3つのジスルフィド結合を空気酸化の手法で合成し、合成物の RP-HPLC にてシングルピークを確認した。

この mBD-6 および mBD-12 合成ペプチドは、20  $\mu$ g/ml の濃度において、同濃度のヒト  $\alpha$ -defensin、HNP-1 より有意に強い抗菌活性を示した。また、mBD-6 および mBD-12 の抗菌活性は、他の多くの  $\beta$ -defensin と同様に、環境中の高濃度の NaCl により有意に低下した。

続いて、これらの新規  $\beta$ -defensin の組織分布について検討をおこなった。ノーザンブロットにより、mBD-6 が骨格筋組織と肺に発現していることが明らかとなった。さらに、食道、舌、骨格筋、気管での mBD-6 の発現を RT-PCR により確認した。この組織分布は、mBD-3、mBD-4 と類似しているが、骨格筋組織での発現は、mBD-6 に特異的な所見であった。

一方、hBD-5、hBD-6、hBD-4、HE2 $\beta$ 1 やそれらのマウスホモログ mBD-11、mBD-12、mEP2c、mEP2e の発現を RT-PCR により評価したところ、これらの遺伝子は精巣上体に特異的に発現していた。食道、舌に発現する mBD-14、mBD-3 の組織分布とは、明らかに異なるパターンであった。ただし、mBD-14 は、精巣上体、精巣にも強い発現を認め、mBD-3 も精巣上体に弱い発現を認めた。

次に、in situ hybridization 法を用いて、mBD-11、mBD-12、mEP2e、mEP2c、mBD-3 mRNA の精巣上体での分布を細胞レベルで解析した。mBD-11、mBD-12、mEP2e、mEP2c のシグナ

ルは、精巣上体頭部の上皮細胞に限局しており、体部、尾部には発現が認められなかった。一方、mBD-3のシグナルは、対照的に、精巣上体頭部、体部、尾部のいずれにおいても、精巣上体を覆う間葉系細胞で最も強かった。

さらに興味深いことに、mBD-11、mBD-12、mEP2c、mEP2eの発現を、隣接切片を用いて検討したところ、mEP2cはinitial segmentを中心に、最も精巣に近い部分に発現し、mBD-11、mBD-12は、mid portionを中心に発現し、mEP2eは、mid portionからdistal portionにかけて発現していた。

### 【考察】

我々は、新規のマウス $\beta$ -defensin、mBD-6を同定し、その抗菌活性を証明した。mBD-6の組織分布は、mBD-3、mBD-4と類似しているが、骨格筋組織でのmBD-6の発現は特異的な所見であった。さらに、ゲノム塩基配列から、新規の $\beta$ -defensin遺伝子としてhBD-5、hBD-6、mBD-12、mEP2c、mEP2e、mBD-14を同定し、mBD-12の抗菌活性を証明した。

我々の新規 $\beta$ -defensinの同定により、 $\beta$ -defensinファミリーに二つのグループ、すなわち、精巣上体特異的なアイソフォームとその他のアイソフォームの存在することが明らかとなった。前者には、HE2 $\beta$ 1、hBD-4、hBD-5、hBD-6が含まれ、後者には、hBD-1、hBD-2、hBD-3が含まれる。興味深いことに、精巣上体特異的な $\beta$ -defensinは、クロモソーム8上の $\beta$ -defensinクラスターの中でも40kBの限局した領域に集中して存在していた。In situ hybridization法により、mBD-11、mBD-12、mEP2e、mEP2cは、精巣上体頭部の上皮細胞に発現し、mBD-3は、精巣上体全体を覆う間葉系細胞に発現していた。この知見も、精巣上体特異的なアイソフォームと他のアイソフォームの間の異なった特徴を示している。

さらに興味深いことに、mBD-11、mBD-12、mEP2e、mEP2cが精巣上体頭部のなかでも異なった領域に発現していた。それぞれの $\beta$ -defensinアイソフォームが異なった領域特異的な制御を受けることは、 $\beta$ -defensinが、精巣上体特異的な未知の機能にも参与している可能性を示唆しており、今後の重要な課題である。