

## 審査の結果の要旨

氏名 山口泰弘

本研究は、ヒトの代表的な抗菌ペプチドである  $\beta$ -defensin に注目し、ヒトおよびマウスにおける新規  $\beta$ -defensin の同定およびそれらの組織分布や機能の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。高度な獲得免疫機構を備える高等脊椎動物においても、先天的、非特異的な自然免疫機構は、感染防御の第一線で、微生物の侵入に対して常に最も迅速に反応している。近年、この自然免疫機構のエフェクター因子として、defensin を代表とする分子量 数 kD の抗菌ペプチドが注目されている。

1. defensin 遺伝子が、クロモソーム 8 番上に遺伝子クラスターを構成していることを利用して、マウス  $\beta$ -defensin-3 遺伝子を含む BAC クローンをテンプレートとした degenerate PCR により、mouse  $\beta$ -defensin-6 (mBD-6) を新規に同定した。さらに、ヒトおよびマウスのゲノム塩基配列情報を利用して、ヒトの新規  $\beta$ -defensin 遺伝子として、human  $\beta$ -defensin-5 (hBD-5)、human  $\beta$ -defensin-6 (hBD-6) を同定した。同様に、新規マウス  $\beta$ -defensin として mouse  $\beta$ -defensin-12 (mBD-12)、mouse epididymal protein 2c (mEP2c)、mouse epididymal protein 2e (mEP2e)、mouse  $\beta$ -defensin-14 (mBD-14) を同定した。
2. mBD-6 および mBD-12 の分泌部位と推定される、それぞれ C 端 40 残基および 34 残基よりなるペプチドを、化学的に合成した。colony count assay により、大腸菌に対する抗菌活性を検討したところ、20  $\mu$ g/ml の濃度において、ヒトの  $\alpha$ -defensin である HNP-1 より有意に強い抗菌活性を示した。また、mBD-6、mBD-12 とも 50 mM 以上のナトリウム濃度で有意な抗菌活性の低下が認められ、他の  $\beta$ -defensin と同様にその抗菌活性は、塩濃度依存性を示すことが明らかとなった。
3. mBD-6 の組織分布を、Northern blot や RT-PCR により検討したところ、食道、舌、気

管、骨格筋での発現が認められた。既知の  $\beta$ -defensin である mouse  $\beta$ -defensin -3 (mBD-3) や mouse  $\beta$ -defensin -4 (mBD-4) と比較すると、食道、舌、気管での発現は、mBD-3、mBD-4 と共通しているが、骨格筋組織での発現は mBD-6 に特異的な所見であった。

4. 新規の  $\beta$ -defensin を含めて、ヒトおよびマウス  $\beta$ -defensin の組織分布を RT-PCR により解析したところ、ヒトでは、hBD-4、hBD-5、hBD-6、HE2 $\beta$ 1 が精巣上体にもみ発現しており、マウスでは、mBD-11、mBD-12、mEP2c、mEP2e が精巣上体にもみ発現していることが示された。すなわち、 $\beta$ -defensin には、精巣上体特異的に発現するアイソフォームの一群が存在することが明らかとなった。また、マウスの精巣上体を用いた *in situ* hybridization により、mBD-11、mBD-12、mEP2c、mEP2e が、精巣上体頭部の限局した領域にもみ発現していることが示された。さらに、mEP2c は initial segment を中心に、もっと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 にかけて発現しており、それぞれ異なる領域特異性を示すことも明らかとなった。

以上、本論文は、ゲノム情報を利用することにより、ヒトおよびマウスの新規の  $\beta$ -defensin を、多数、網羅的に同定し、その抗菌活性を証明し、特徴的な組織分布を明らかにした。特に、骨格筋組織や精巣上体における  $\beta$ -defensin 発現に関する知見は、たいへん興味深い。本研究は、感染防御の重要なエフェクター因子である  $\beta$ -defensin 研究の発展の基盤となるものであり、学位の授与に値するものと考えられる。