

論文審査の結果の要旨

氏名：松浦 雄太

博士の専攻分野の名称：博士 (獣医学)

論文題名：魚類における簡便な細胞性免疫機能測定法の開発

審査委員：(主査) 教授 中西 照幸
(副査) 教授 森友 忠昭
教授 五味 浩司

魚類は獲得免疫を有する最も下等な脊椎動物であり、抗原に対する特異性と記憶を備えた免疫応答が可能で、哺乳類と同様にワクチンが実用化されている。獲得免疫には、ウイルスや細胞内寄生性細菌などに感染した細胞、腫瘍細胞などを免疫細胞が直接攻撃する細胞性免疫ならびに抗原に対して抗体を産生することで病原体を排除する液性免疫の2種類が存在する。

近年魚類増養殖の現場において、ウイルスや細胞内寄生性細菌が原因となる疾病が多大な被害を引き起こしている。これら病原体に対する感染防御には細胞性免疫が主要な役割を果たしている。従って、これら感染症に対して細胞性免疫機能を誘導するワクチンを開発する必要がある。しかし、魚類においては研究ツールの不足や近交系がほとんど存在しないことなどが障害となり、細胞性免疫機構の解明が遅れており、有効な細胞性免疫機能測定法が確立されていない。また、水産用ワクチンの有効性評価においても適切な手法が開発されていないため、病原体の人為感染による攻撃試験に頼っているのが現状である。

そこで、本研究では魚類の中で唯一、細胞傷害試験およびそれによる細胞性免疫機能の測定が可能なクローンギンブナを用いて、魚種ごとに特別なツールの開発や準備を必要とせず、簡便かつ魚類養殖の現場においても実施可能な細胞性免疫機能測定法の開発を試みた。

1. グランザイムの酵素活性による細胞性免疫機能測定法の検討

グランザイムは主に細胞傷害性 T 細胞(CTL)や NK 細胞などにより産生され、腫瘍細胞や移植片など非自己の細胞、あるいはウイルス感染細胞などに対してアポトーシスを誘導するセリンプロテアーゼであり、細胞性免疫のうち細胞傷害機構を担う重要な分子である。生物種によって異なるが、哺乳類においては5~10数種類が知られているファミリー分子であり、特にグランザイム A および B が詳細に研究されている。このうち、グランザイム B の酵素活性の測定により、ヒトインフルエンザワクチンの投与効果を簡便に評価する方法が報告されているなど、細胞性免疫機能と本酵素の活性が相関していることが知られている。そこで、グランザイムの酵素活性値から魚類における細胞性免疫機能を測定する実験系の構築を試みた。

魚類グランザイムの機能や性状に関する知見は乏しく、ギンブナにおいては全く情報がない。そこで、ゲノム情報が整備されており同じくコイ科に属するゼブラフィッシュの遺伝子を参考に、ギンブナにおけるグランザイム遺伝子の単離を試みた。その結果、胸腺由来リンパ球よりギンブナグランザイム遺伝子の単離に成功し、その推定アミノ酸配列より哺乳類のグランザイム B と類似した構造をもつセリンプロテアーゼであることがわかった。本遺伝子の発現をリンパ球サブセットレベルで解析したところ、哺乳類のグランザイムと同じく主要な発現細胞は CD8 陽性 T 細胞(CTL)であり、細胞傷害活性を誘導する同種異系細胞移植によって発現量が顕著に上昇することがわかった。また、エドワジェラ症の原因菌として知られる細胞内寄生性細菌 *Edwardsiella tarda* を用いて人為感染実験を行った結果、主要な感染部位である肝臓において本遺伝子の発現量が顕著に上昇することが分かった。

続いて、本分子の酵素活性測定系を樹立するため、基質特異性の解析を行った。ギンブナグランザイム

遺伝子を強制発現させた HEK293T 細胞の細胞溶解液を用いて、哺乳類の各種グランザイム特異的基質に対する加水分解活性を測定したが、いずれの基質に対しても加水分解活性を示さなかった。

以上の結果より、ギンブナグランザイムは哺乳類のグランザイム B に類似した構造をもつセリンプロテアーゼであり、同種異系細胞や細胞内寄生性細菌の感染に伴う細胞傷害機構に関与する分子であることが示唆された。しかし、本酵素の基質特異性は哺乳類のいずれのグランザイムとも異なることから、哺乳類とは異なる細胞死関連因子を基質とする魚類特有の酵素である可能性が示された。

2. 細胞性免疫に関与する内因性プロテアーゼの酵素性状解析および本酵素活性を指標とした細胞性免疫機能測定法の検討

前項の研究により、同種異系細胞移植および細胞内寄生性細菌感染によって遺伝子発現が上昇し、細胞傷害に関与する酵素を見出すことに成功した。しかし、魚類の細胞傷害機構関連分子に関する知見は限られており、推定アミノ酸配列のみで基質特異性を予測することは難しく酵素活性の測定は不可能であった。そこで、本章では生体内で実際に細胞傷害機構に関与している内因性酵素を探索し、精製した酵素について性状解析を試みた。

細胞傷害機構に関与しているプロテアーゼを探索するため、各種プロテアーゼ阻害剤を用いて、同種異系細胞に対する細胞傷害活性への影響を解析した。その結果、セリンプロテアーゼ阻害剤によって腎臓白血球の細胞傷害活性が顕著に阻害されることが分かった。次に、セリンプロテアーゼ阻害剤によって阻害される酵素の基質を探索するため、各種蛍光ペプチド基質を用いて、ギンブナ腎臓白血球溶解液のプロテアーゼ活性を測定したところ、z-GPR-MCA に対する加水分解活性のみ濃度依存的に阻害された。

上記で見出したセリンプロテアーゼを約 50 尾分のギンブナ腎臓白血球より、アフィニティークロマトグラフィーおよび陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製した結果、分子量約 26,900 の酵素を精製することに成功した。精製した酵素の比活性は精製前と比較して 309 倍まで上昇し、各種プロテアーゼ阻害剤を用いた酵素活性測定実験により精製した酵素がセリンプロテアーゼであることも確認された。また、本酵素の基質特異性を調べた結果、基質の P1 位に塩基性アミノ酸をもつ基質のみを加水分解するトリプシン様セリンプロテアーゼであることがわかった。基質に対する酵素の親和性を表すミカエリス・メンテン定数 (K_m) を測定したところ、Boc-VPR-MCA に対する K_m (28.7 μ M) が他の基質と比べて最も小さく、Boc-VPR-MCA が最も特異性の高い基質であることが判明した。

次に、本酵素の活性値が細胞性免疫機能を反映していることを確かめるため、基質特異性解析の結果判明した特異的基質 Boc-VPR-MCA を用いた酵素活性測定実験により、同種異系細胞移植による活性値への影響を調べた。その結果、腎臓白血球の同種異型細胞に対する細胞傷害活性および Boc-VPR-MCA 加水分解活性は、いずれも同種異型細胞移植により顕著に上昇することがわかった。

以上の結果より、Boc-VPR-MCA を加水分解するトリプシン様セリンプロテアーゼが魚類の細胞傷害機構に関与することが示唆された。また、酵素活性の上昇と細胞傷害活性の上昇が一致していることから、本酵素の活性値より細胞性免疫機能を評価することが可能であると考えられる。

3. 細胞性免疫に関与する内因性プロテアーゼの同定

第 2 章において細胞傷害機構に関与する酵素を見出し、その酵素性状を解明したが、どのような分子であるかについては不明である。本知見を増養殖において重要な魚種に応用するためには、本酵素をコードする遺伝子の同定など、基礎的な知見を充実させる必要がある。そこで、本章では第 2 章で精製した酵素をコードする遺伝子を単離し、既知の分子と比較することにより同定を試みた。

本酵素の N 末端配列をエドマン分解法により解読した結果、N 末端側から Ile-Ile-Gly-Gly-Tyr-Glu-X-Arg-Pro-His の配列を解読することに成功した。この配列を参考に、ギンブナ腎臓

白血球より本酵素をコードする遺伝子の単離を試みた結果、キンギョの myofibril-bound serine proteinase というセリンプロテアーゼと最もよく類似した遺伝子が単離された。次に、本酵素の発現を各白血球細胞レベルで解析した結果、好中球およびマクロファージに特異的に発現している分子であることが明らかとなった。また、本分子を HEK293T 細胞に強制発現させたところ、培養上清中に分子量約 27,000 のバンドが確認されたことから、本分子は分泌型の酵素であることが明らかとなった。

以上の結果より、第 2 章で精製した酵素は顆粒球やマクロファージに発現する分泌型酵素であることが明らかとなった。myofibril-bound serine proteinase の生理的機能は不明であるが筋肉中に存在する酵素であることが知られている。しかし、本研究において貪食細胞に発現していることが明らかとなったことから、本酵素は哺乳類においても未報告の新奇な機能を有していることが示唆される。第 2 章の研究により本酵素が抗原特異的な細胞傷害に関与していることが示されたため、今後は抗原特異的な細胞傷害活性における好中球およびマクロファージの役割について検討する必要があると思われる。

結論

第 1 章の研究により、細胞傷害に関与する魚類特有のグランザイムを見出すことに成功した。しかし、基質特異性が哺乳類のいずれのグランザイムとも異なることから、酵素活性の測定が不可能であったため、簡便な魚類細胞性免疫機能測定法への応用が難しいことが判明した。一方、第 2 章および第 3 章において細胞傷害機構に関与する内因性セリンプロテアーゼを見出すことに成功した。本酵素は特異的基質 Boc-VPR-MCA を加水分解するトリプシン様セリンプロテアーゼであり、その酵素活性を測定するだけで細胞性免疫機能を測定できることを明らかにした。今後、感染防御に細胞性免疫が重要な役割を果たす病原体をモデルとし、一般の養殖魚においても本酵素活性と細胞性免疫機能が相関していることを明らかにすれば、細胞傷害活性の測定が困難なブリ、マダイ、ヒラメなどの養殖魚においても細胞性免疫機能の測定が可能になる。本手法は簡便かつ安価な実験機器のみで実施可能であり、多大な労力と多数の魚を必要とする攻撃試験によるワクチン有効性判定法の代替法となりうることから、水産用ワクチンの開発や検定業務の効率化への貢献が期待できる。

よって本論文は、博士（獣医学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成 29 年 2 月 21 日