

氏名(本籍)	さとう たかのぶ	佐藤 隆信 (広島県)
学位の種類		博士(医学)
学位記番号		博甲第 6584 号
学位授与年月日		平成 25 年 3 月 25 日
学位授与の要件		学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科		人間総合科学研究科
学位論文題目		好中球における活性酸素産生および酵素放出反応の分子メカニズム解析
主査	筑波大学教授	薬学博士 熊谷 嘉人
副査	筑波大学准教授	博士(薬学) 鈴木 裕之
副査	筑波大学准教授	博士(医学) 松本 功
副査	筑波大学助教	博士(理学) 内木 隆寛

論文の内容の要旨

(目的)

好中球は細菌を細胞内に取り込み、スーパーオキシドなどの活性酸素産生や殺菌酵素の酵素放出反応により、取り込んだ細菌を殺菌する。これまでの解析から、好中球のスーパーオキシド産生および酵素放出反応では、リン脂質代謝酵素ホスホリパーゼ D (PLD) が重要な役割を果たしていることが知られている。生理的条件下において、PLD は、生体膜主要構成リン脂質であるホスファチジルコリンを加水分解して、脂質性シグナル伝達分子であるホスファチジン酸 (PA) を産生し、シグナルを下流に伝達する。しかし、反応系にエタノールや一級ブタノールが存在すると、PLD はホスファチジル基転移反応を優先的に触媒するため、PLD による PA の産生は抑制される。上述の好中球機能への PLD の関与は、一級アルコールを用いて、PLD による PA 産生を阻害する方法を用いて解析されてきたが、このような解析方法では、アルコールによる非特異的な効果が否定できないため、これらの好中球機能への PLD の関与には、未だ再考の余地が残っている。そこで本研究では、*PLD* ノックアウト (*PLD*^{-/-}) マウスを用いて、好中球におけるスーパーオキシドの産生および酵素放出反応への PLD の関与を検討すること、またこれら好中球機能を制御するメカニズムを解明することを目的とし、解析を行った。

(対象と方法)

野生型 (WT) および *PLD*^{-/-} マウスから好中球を得た。*N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) 依存的なスーパーオキシド産生は cytochrome c の還元で調べた。好中球からの酵素放出は β -glucopyranoside を基質として解析した。fMLP 依存的な PA 産生は放射標識リン脂質を用いた薄層クロマトグラフィーにて検出した。PLD 活性は phosphatidylethanol 産生で算出した。

(結果)

野生型 (WT) および *PLD*^{-/-} 好中球を用いて fMLP 依存的なスーパーオキシド産生および酵素放出反応を解析した。その結果、これまでの報告に反して、PLD がこれら好中球機能には必須ではないことが明らかになった。また、*PLD*^{-/-} 好中球においても WT と同程度の PA 産生が観察され、PLD は fMLP 依存的な PA 産生総量には寄与していないことが明らかになった。エタノールは好中球におけるこれらの機能を阻害する

ことが示されているが、*PLD^{-/-}* 好中球においても、エタノールの添加によりこれら好中球機能は抑制された。これらのことから、PLDは上述の好中球機能には関与しておらず、エタノールはこれら好中球機能を阻害する非特異的な効果を有することが明らかになった。

次に、膜透過性 DG である OADG およびカルシウムイオノフォアである ionomycin を用い、どの PKC サブファミリーがスーパーオキシド産生および酵素放出反応に重要であるか検討した。その結果、これらの好中球機能には nPKC ではなく cPKC が重要であることが明らかになった。また、酵素放出反応においては、cPKC を介した経路以外にも、Ca²⁺ 依存的なシグナル伝達経路および、それらの経路を介さない第三の経路の関与も示唆された。さらに、エタノールの PKC 活性に与える影響を解析したところ、エタノールは PKC 活性を抑制した。このことから、エタノールは少なくとも PKC を阻害することで、好中球のスーパーオキシド産生や酵素放出反応を抑制していることが明らかになった。

(考察)

PLD^{-/-} 好中球を用いた実験により、PLD は fMLP 依存的なスーパーオキシド産生および酵素放出反応には関わっていないことが明らかになった。この結果は、PLD の機能解析においてエタノールを使用することの危険性を強く主張するものである。また、本研究では、これらの好中球の機能には、DG-cPKC 経路が重要であることを明らかにし、酵素放出反応においては Ca²⁺ 依存的な経路およびそれ以外の第三の経路の存在を示した。このような経路には、synaptotagmin や mitogen-activated protein kinase の関与が推察されるため、今後、これらの分子の関与を検討することで好中球のスーパーオキシド産生および酵素放出反応における分子メカニズムの理解を深化させることができると考えている。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は好中球機能への PLD の関与を再考したものである。得られた研究成果より、PLD は fMLP 依存的なスーパーオキシド産生および酵素放出反応には関わっていないことが判明した。同時に好中球の機能には、DG-cPKC 経路の重要性も示した。本研究内容は Mol Cell Biol のスポットライトにも取り上げられており、当該分野の研究者に対して貴重な情報を提供したと言えよう。

平成 25 年 1 月 7 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。