

氏名(本籍)	ほ かり よし のり 保 莉 義 則 (静岡県)			
学位の種類	博 士 (学 術)			
学位記番号	博 甲 第 6143 号			
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 23 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	生命環境科学研究科			
学位論文題目	Purification and Identification of a Novel Class of Neutrophil-Activating Cryptides (新規好中球活性化クリプタイトの単離・同定)			
主査	筑波大学教授	農学博士	深 水 昭 吉	
副査	筑波大学教授	農学博士	小 林 達 彦	
副査	筑波大学教授	博士(農学)	谷 本 啓 司	
副査	筑波大学講師	博士(学術)	加 香 孝一郎	

論 文 の 内 容 の 要 旨

生理活性ペプチドは、DNA にコードされた遺伝情報に基づいてその mRNA が転写・翻訳された後、まず活性を持たない前駆体タンパク質として生合成される。その後、様々なプロセシング酵素によって切断されて成熟体となり機能を発揮し、種々のプロテアーゼにより分解・不活化される。このような生理活性ペプチドの生合成や代謝過程においては同時に多くの断片化ペプチドが生じる。同様に、機能タンパク質の生合成や代謝過程においても多数の断片化ペプチドが生じることが知られているが、これら断片は長らく単なる代謝産物で生物活性を持たないと考えられてきた。しかし、最近著者は、これらの中に高い好中球刺激活性をもつペプチドが多数存在することを見出し、このようなタンパク質の構造に隠された生理活性ペプチドを「クリプタイト」と命名した。

好中球は自然免疫に関わる白血球の一種で、微生物感染や組織障害により炎症が起きると直ちに血流からその部位に浸潤し、殺菌作用を持つ活性酸素や種々の物質に対する分解酵素を産生するとともに、貪食作用を示すことで微生物や細胞由来毒素を除去する。この好中球浸潤を惹起する因子としては、インターロイキン 8 などのケモカインや C5a などの補体由来成分が知られている。しかし、これら既知因子では炎症初期の極めて迅速な好中球の浸潤は説明ができず、その制御機序は不明のままである。そこで著者は好中球の炎症初期の調節機構の解明を目的とし、未知の好中球活性化因子の同定を試みた。

著者は、まず第一に好中球様に分化した HL-60 細胞からの β -ヘキソサミニダーゼ分泌活性を指標に、ブタ心臓より各種クロマトグラフィー（イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、各種 HPLC）を駆使して好中球活性化因子の探索を試み、新規活性化因子の単離・同定に成功した。そしてその因子のアミノ酸配列をタンパク質データベース Swiss Prot で検索したところ、チトクローム c オキシダーゼサブユニット VIII の C 末端 23 残基と一致することが明らかとなった。このように今回同定したペプチドはミトコンドリアタンパク質由来の 1 番目のクリプタイトであることから mitocryptide-1 (MCT-1) と命名した。次に著者は MCT-1 について好中球細胞における機能解析を行った。その結果、MCT-1 は好中球様に分化した HL-60 細胞においてバクテリアタンパク質由来の N 末端ホルミル化ペプチド fMLF と同様、濃度依存的に

β -ヘキサミニダーゼ分泌を促進するとともに細胞遊走も惹起することが明らかになった。以上の結果から、MCT-1は好中球活性化作用を持ったクリプタイドであることが示された。さらにその精製過程においてMCT-1以外の多数の好中球活性化ペプチドの存在が示されたことから、好中球の生体防御機構を解明するためにはこれら未知因子の同定が不可欠であることが明らかとなった。

著者は、さらに好中球活性化ペプチドの精製を試み、新しい好中球活性化ペプチドの同定に成功した。そして、その一次構造がミトコンドリアチトクローム *c* (68-85) の配列と一致したことから、本新規好中球活性化ペプチドを mitocryptide-CYC (MCT-CYC) と命名した。また、そのヒトホモログの好中球様に分化した HL-60 細胞からの β -ヘキサミニダーゼ分泌活性における構造活性相関を検討した結果、チトクローム *c* の C 末端由来のペプチドが好中球を活性化すること、その中でもチトクローム *c* (70-85) が最も高い活性を持っていることが示された。近年、チトクローム *c* はアポトーシス機構に関与していることが報告されており、本研究結果を考え合わせると、MCT-CYC をはじめとするチトクローム *c* 由来クリプタイドがアポトーシス後の死細胞を好中球に処理させる情報伝達物質として機能している可能性が提起された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究より見出された知見は、ミトコンドリアタンパク質チトクローム *c* オキシダーゼ サブユニット VIII より産生された MCT-1 が好中球を効率的かつ低濃度で活性化することを発見したこと、また MCT-CYC をはじめとするチトクローム *c* 由来クリプタイドが好中球を活性化することを初めて明らかにしたことである。最近、著者らはバイオインフォマティクスの手法を用いて生理活性ペプチドを予測・同定する新しい手法を報告しており、既に 50 種類以上の新規好中球活性化ペプチドを同定しているが、その中にチトクローム *c* (70-85) が含まれていた。本研究において、その類縁体である MCT-CYC が実際にブタ心臓より精製され、その存在が示されたことから、著者の新しい手法が多く的好中球活性化ペプチドを網羅的に同定するための有効な方法となることが明らかとなった。以上のように、著者は新規好中球活性化ペプチド MCT-1、MCT-CYC の発見により、好中球の関わる炎症発症機構の解明やその治療法の確立に役立つ知見を開拓したと判断される。

平成 24 年 1 月 24 日、学位論文審査委員会において、審査員全員の出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。