

学位授与記録簿（博士）

バイオサイエンス研究科

氏名	服部 竜弥
学位の種類	博士（バイオサイエンス）
授与年月日	2017年（平成29年）3月18日
学位授与の要件	本学学位規程第18条第1項該当者（学位規則第4条第1項）
学位論文の題名	一群の好中球活性化ペプチド、マイトクリプタイトの生理機能の解明に関する研究
審査委員 主査	教授 河合 靖
副査	教授 齊藤 修
副査	教授 西 義介

論文内容要旨

第一章：序論

好中球は自然免疫において重要な働きをしている白血球の一種であり、微生物の感染や組織に傷害が起きると、迅速に血流中からその感染および傷害部位に遊走・浸潤し、微生物の殺菌や壊死細胞片の貪食・除去を行うことで生体防御を担っている。これら好中球の遊走・活性化を惹起する新しい因子として、マイトクリプタイト-1 (MCT-1) およびマイトクリプタイト-2 (MCT-2) が正常なブタの心臓組織より単離・同定された。そして MCT-1 および MCT-2 は、それぞれミトコンドリアタンパク質であるチトクロム *c* オキシダーゼ サブユニット VIII ならびにチトクロム *b* に由来する断片化ペプチドであることが明らかとなっている。また現在までに、マイトクリプタイト-1 に類似した二次構造、すなわち両親媒性で正電荷を持つミトコンドリアタンパク質由来の好中球活性化ペプチドが 50 種類以上同定されており、このような機能性タンパク質の配列中に隠された、親タンパク質と異なる生物活性を持つ断片ペプチドは総称してクリプタイトを名付けられた。このように高い活性を持つミトコンドリアタンパク質由来のクリプタイト、マイトクリプタイトが生体内で多数存在することが示唆されたことから、これら一群のマイトクリプタイト (MCTs) の生理機能を解明することは、好中球の動員を伴う内因性の炎症メカニズムを理解する上で重要であると考えられる。しかし、これら MCTs の生体

内での産生や分布、さらには生理機能や病態との関わりは未だ検討されていない。そこで本研究では、まず天然から同定された MCT-1 ならびに MCT-2 の生理機能を解析するために、これらペプチドには結合するものの親タンパク質に結合しないペプチド特異的モノクローナル抗体を作製すること、また MCTs の生物活性を特異的に阻害する中和抗体を獲得することで、マイトクリプタイドをはじめとしたクリプタイドの生理機能を解析する方法を確立することを目指した。

第二章：MCT-1 特異的な中和モノクローナル抗体の獲得

機能性タンパク質の生理機能は、目的の因子をコードする遺伝子をノックアウトした動物を作出し、その影響を解析することにより明らかにすることが一般的であるが、MCT-1 は電子伝達系に関わるチトクロム *c* オキシダーゼ サブユニット VIII の一部を構成する配列であるため、その遺伝子配列の改変により親タンパク質の機能にも影響を与えてしまうと考えられる。そこで、MCT-1 の生体機能解析を可能にするため、MCT-1 に結合することで、その機能を阻害する中和モノクローナル抗体の作製を試みた。すなわち、MCT-1 をキャリアタンパク質に結合させたペプチド抗原を免疫したマウスの脾細胞を回収し、ミエローマ細胞と融合することでハイブリドーマを作製した。そしてクローニングを行った単一ハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体について、阻害 ELISA を用いて MCT-1 に対する結合特異性ならびにエピトープを解析した。また MCT-1 の生物活性に対する抗体の阻害効果は、好中球様に分化した HL-60 細胞の遊走活能およびその細胞からの β -ヘキソサミニダーゼ分泌に対する阻害作用で検討した。その結果、全長 23 残基からなる MCT-1 の 9-22 位に結合することで MCT-1 の生物活性を特異的に阻害する中和モノクローナル抗体、NM1B1 の獲得に成功した。

第三章：MCT-2 に対するモノクローナル抗体の作製-クリプタイドの生理機能解析法の確立を目指して-

MCT-2 は、ミトコンドリア DNA にコードされたチトクロム *b* の N 末端に由来する断片化ホルミルペプチドである。また、MCT-2 は formyl peptide receptor-2 の特異的内因性リガンドであり、好中球様分化 HL-60 細胞の活性化には G_{i2} サブタイプの G タンパク質および ERK1/2 のリン酸化が関与していることが明らかとなっている。このように細胞レベルでは MCT-2 の情報伝達機構が解析されているが、その生理的存在意義は全く分かっていない。そこで MCT-2 の生理機能解析に有用となる 2 つの特徴の持ったモノク

ローナル抗体を作製した。すなわち、まずチトクロム *b* からプロテアーゼによって切断されることで露出する MCT-2 の C 末端側切断点を認識するモノクローナル抗体 NhM2A1 を獲得した。この NhM2A1 の獲得により、親タンパク質と混同することなく生理的な MCT-2 の産生や分布について解析することが可能となった。また MCT-2 が惹起する好中球様分化 HL-60 細胞からの β -ヘキソサミニダーゼ分泌を特異的に阻害する抗体 NhM2A5 を得ることに成功し、MCT-2 の機能について個体レベルで解析することが可能となった。

第四章：結語

現在 MCTs をはじめとしたタンパク質の配列中に隠された生理活性ペプチド、クリプトイドの生体機能を解析することは困難である。本研究において、それら MCTs に結合するものの親タンパク質を認識しない特異的モノクローナル抗体を獲得するとともに、さらには各 MCT に特異的な中和モノクローナル抗体を作製したことで、細胞レベルだけでなく好中球の活性化を伴う虚血再灌流傷害や劇症肝炎などの疾患における MCT の産生・分布・機能について解析することが可能になった。このように、これら断片ペプチド特異的抗体ならびに中和抗体の獲得により、クリプトイドの生理機能解析が進捗するようになることが期待される。

論文審査結果要旨

本論文では、好中球を活性化するミトコンドリアタンパク質由来のペプチド MCT-1 と MCT-2 に対して結合する特異的な抗体の取得を行っている。さらに、これら抗体のエピトープマッピングとこれらを用いた MCTs の生理活性の中和作用を明らかにしている。これまで MCTs に関して様々な生理活性が報告されているが、その詳細な機能はいまだ解明されていない。本研究によって、親タンパク質は認識せずに MCT のみの解析が可能になり、また、MCT の活性を特異的に阻害できる中和抗体が獲得できたことから、細胞レベルや個体レベルでの MCT の機能や分布を解明するための研究が初めて可能になり、その研究成果は大いに評価できる。

論文審査におけるプレゼンテーションも論理的でわかりやすく、それに続く口頭試問における応答も明瞭かつ的確であった。さらに本研究内容は英語論文として筆頭著者で報告されている。よって審査員は全員一致で本論文が長浜バイオ大学の博士（バイオサイエンス）の学位論文に相応しいものであると判断した。