

博士論文審査報告書

論文題目: Studies on the structure and function of histidine-rich glycoprotein as an activator of immune cells

「免疫細胞活性化因子としてのヒスチジンリッチ糖タンパク質の構造と機能に関する研究」

申請者: 大田 剛

1. 論文内容の要旨

ヒスチジンリッチ糖タンパク質 (HRG) は、自然免疫システムに關与する血漿糖タンパク質である。申請者は、HRG による免疫細胞の形態変化促進能の作用機序解析を通じて、HRG の免疫系における役割をより明確にすることを目的として本研究を実施した。

まず、HRG がコンカナバリン A (Con A) との共刺激により、本来浮遊細胞である T 細胞系培養細胞 MOLT-4 の形態変化を特異的に促進し、培養皿への接着を著しく促進することを示した。この形態変化は、細胞活性化のための細胞骨格再構成であると考えられたため、F-actin を染色し MOLT-4 細胞の細胞骨格形成を観察し、Con A のみの刺激では仮足部分に F-actin の集積のみが見られるが、HRG/Con A 共刺激ではさらに突起様の F-actin が観察されることを示した。さらに、申請者は、細胞骨格形成に關与するシグナル分子の 1 つである PI3 キナーゼについて調べ、Con A 刺激によるシグナル伝達は PI3 キナーゼ依存的であるのに対し、HRG/Con A 共刺激では、PI3 キナーゼ非依存的であることを明らかにした。他方、HRG 分子中の作用部位の解析を行い、Arg23 ~ Lys66 糖ペプチドが形態変化促進能に必要な最小構造であること、さらに、Asn45 の N 型糖鎖がその活性に必須であることなどを明らかにした。

申請者は、次に、形態変化促進能に關与する MOLT-4 細胞上の HRG 受容体を明らかにするため、既知の受容体である細胞表層型グリコサミノグリカンと Fc 受容体について調べたが、それらの關与が認められなかったことから、申請者は、MOLT-4 細胞上に新規の HRG 受容体が存在することを示唆するものであると判断し、Arg23 ~ Lys66 糖ペプチドをリガンドとしたアフィニティー精製を行い、MOLT-4 細胞膜の HRG 結合タンパク質として ATP 合成酵素を同定した。さらに、HRG とミトコンドリア ATP 合成酵素の相互作用における解離定数が 66 nM であることも示した。また、蛍光抗体染色法、フローサイトメーターによる解析を行い、ATP 合成酵素が細胞表層にも存在することを明らかにし、抗 ATP 合成酵素抗体にて HRG/Con

A による MOLT-4 細胞の形態変化が抑制されることを示した。これらの結果は、形態変化に関与する MOLT-4 細胞上の HRG 受容体が、細胞表層型 ATP 合成酵素であることを強く示唆するものである。

以上の結果より、申請者は、HRG は細胞表層型 ATP 合成酵素と Con A との結合を介して PI3 キナーゼ非依存的なシグナル伝達を生むことによって形態変化を誘導し、免疫細胞を活性化状態へと導くと結論した。

2. 論文審査結果

本論文は、血液凝固線溶の調節因子として機能する血漿ヒスチジンリッチ糖タンパク質 (HRG) の免疫系における新しい機能に関する研究成果を述べたもので、主として、次の2点について明らかにした。

申請者は、まず、HRG がコンカナバリン A による T 細胞系培養細胞 MOLT-4 の形態変化を特異的に促進する現象を詳細に解析し、その細胞内シグナル伝達機構がコンカナバリン A 単独の場合には PI3 キナーゼ依存的であるのに対して、PI3 キナーゼ非依存的であることを明らかにした。さらに、HRG のアミノ末端領域の Arg23 ~ Lys66 がその作用部位であること、また、Asn45 に結合した糖鎖が HRG の形態変化促進作用に必須であることなどを明らかにすると共に、細胞表層に存在する ATP 合成酵素が HRG 受容体として機能していることを初めて示した。これらの結果から、この論文は、免疫系細胞の活性化における HRG の作用機構に関して、その構造と機能相関の研究に新しい展開をもたらし、この研究領域の今後の発展に大いに貢献するものであると考えられる。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値のあるものと認める。

また、平成 21 年 8 月 4 日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

主査：小 出 武 比 古 印

副査：大 隅 隆 印

：西 谷 秀 男 印

：小 倉 尚 志 印

：丸 山 征 郎 印

(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科、教授)

：若 林 貞 夫 印