

氏名	竹見 祥大
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第 1116 号
学位授与年月日	平成 31 年 3 月 20 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	スンクス (<i>Suncus murinus</i>) を用いた消化管抗菌ペプチドの基盤的研究
論文審査委員	委員長 教授 坂井 貴文 委員 准教授 坂田 一郎 委員 准教授 塚原 伸治 委員 教授 菅沼 雅美

論文の内容の要旨

ヒトやマウスなどでは消化管粘膜表面に菌叢が常在しており、宿主の生体機能に影響を及ぼしていることが明らかになってきている。スンクス (*Suncus murinus*) は常在する腸内細菌がいないと報告されており、他の動物には見られない生物学的特徴を示す。本研究では、腸内細菌の定着抵抗性を担う因子として消化管表面から管腔へ分泌され、抗菌を担う「抗菌ペプチド」に着目した。スンクス消化管抗菌ペプチドの基盤的な知見を得ることを目的に、スンクスの消化管に発現する抗菌ペプチドを同定し、その分布と発現調節について検討した。

本研究では、スンクス小腸から Lysozyme と GroupIIA secretory phospholipase A2 (GIIA sPLA2) の 2 種類の遺伝子を同定した。Lysozyme 遺伝子の翻訳領域をコードする cDNA は 447 塩基対から成り、予想されるアミノ酸配列は 148 残基であった。ヒトとアミノ酸レベルで 83.1% の相同性を示し、立体構造の形成に必要なジスルフィド結合と酵素活性部位のアミノ酸残基の位置はこれまで同定されている他種哺乳類と一致していた。定量 PCR 法で Lysozyme mRNA 発現量を測定した結果、Lysozyme mRNA レベルは脾臓で最も多く、次いで消化管や肺などで多かった。Lysozyme mRNA 発現量が多かった脾臓と消化管で免疫組織化学と *in situ* hybridization 法により Lysozyme 産生細胞の分布を検討した結果、Lysozyme 免疫陽性細胞は脾臓では主に赤脾髄に散在性に分布していた。一方、小腸の Lysozyme 免疫陽性細胞は陰窩に多く、絨毛では少数であったが、Lysozyme mRNA 発現細胞は絨毛にも多数存在していた。さらに小腸における Lysozyme 免疫陽性細胞の細胞種を同定するために、増殖細胞マーカーである Ki67 と PAS 染色との共染色を行った。陰窩に存在する Lysozyme 免疫陽性細胞は Ki67 と共局在しなかったが、一部で PAS 陽性の顆粒が共局在した。絨毛においては PAS 陽性の Lysozyme 免疫陽性細胞は見られなかった。また、Lysozyme mRNA の発現調節機構を検討するために 24 時間の絶食を行ったところ、下部小腸の Lysozyme mRNA レベルが低下した。

GIIA sPLA2 遺伝子の翻訳領域をコードする cDNA は 435 塩基対から成り、予想されるアミノ酸配列は 144 残基であった。ヒトとアミノ酸レベルで 61.1% の相同性を示し、Lysozyme と同様に、ジスルフィド結合と酵素活性部位のアミノ酸は保存されていた。

定量 PCR による mRNA 発現分布を検討した結果、GIIA sPLA2 mRNA レベルは脾臓で最も高かった。

In situ hybridization 法により mRNA 発現細胞の小腸における分布を調べたところ、GIIA sPLA2 mRNA 発現細胞は小腸の粘膜層に散在性に観察された。脾臓における GIIA sPLA2 mRNA 発現細胞は赤碑髄に散在性に見られた。下部小腸の GIIA sPLA2 mRNA レベルは、自由摂食群と比べて絶食群で発現量が約 2 倍増加した。また、小腸小片を用いた解析からグルコース濃度が 1mM と低い培地で培養した際に GIIA sPLA2 mRNA 発現が高く、10mM では約半分まで減少した。

スunks小腸の Lysozyme mRNA 発現細胞は小腸陰窩だけでなく絨毛にも観察された一方で、Lysozyme 免疫陽性細胞は主に陰窩で見られたことから、絨毛においては構成性に管腔内に Lysozyme が分泌されていることが考えられた。また、スunks小腸の Lysozyme 産生細胞と GIIA sPLA2 mRNA 発現細胞はこれまで報告されている他種哺乳類のように陰窩の底部だけではなく絨毛でも観察されることが明らかとなり、これら抗菌ペプチドはスunks小腸粘膜表面での抗菌機能に関与する可能性が考えられた。

論文の審査結果の要旨

竹見祥大氏（申請者）の提出した学位論文について、本論文の審査委員会は平成 31 年 2 月 5 日に理学部 9 番教室において公開で発表会を開催し、詳細な質疑を行って内容を審査した。以下に、審査結果の概要を示す。

近年、消化管に生息する腸内細菌は宿主の免疫系や代謝に重要な効果を及ぼすことが報告されてきている。一方で、宿主は腸内細菌の過剰増殖を抑制するために、蠕動運動による物理的な菌の排出や、腸上皮細胞から分泌される抗菌ペプチドなどによる化学的殺菌の機構を有している。これまで、哺乳類食虫目のスunks (*Suncus murinus*) には常在腸内細菌がほとんど存在しないことが報告されているが、その背景にある機構は未知である。また、スunksの消化管粘膜を防護する免疫系に関する知見は乏しく、スunks消化管で産生される抗菌ペプチドの種類や分布についても明らかになっていない。本論文では、スunks消化管における抗菌ペプチドの基盤的な知見を蓄積することを目的として、抗菌ペプチドの一種である Lysozyme と GroupIIA secretory phospholipase A2 (GIIA sPLA2) 遺伝子のクローニングとそれぞれの遺伝子の mRNA 発現分布、脾臓と消化管での産生細胞の局在、絶食及びグルコース濃度による発現動態の変化について検討している。本論文によって述べられている主要な研究成果は以下の通りである。

第一章では、スunks Lysozyme 遺伝子のクローニングとスunksにおける Lysozyme の特徴について得られた知見を詳細に記述している。申請者は、Lysozyme 遺伝子の翻訳領域をコードする cDNA は 447 塩基対から成り、予想されるアミノ酸配列は 148 残基であることを明らかにし、スunks Lysozyme アミノ酸配列はヒトと 83.1% の相同性を示すのに加えて、立体構造の形成に必要なジスルフィド結合と酵素活性部位のアミノ酸残基の位置はこれまで同定されている他種哺乳類と一致していることを示している。次に、申請者は定量 PCR 法を用いて Lysozyme mRNA 発現量を測定し、Lysozyme mRNA 発現が脾臓で最も高く、次いで消化管で高いことを示した。それらの組織の Lysozyme 産生細胞の分布を検討した結果、脾臓では赤脾髄に多数の Lysozyme 免疫陽性細胞が観察され、また、小腸の Lysozyme 免疫陽性細胞は陰窩に多く、絨毛では少数であったが、Lysozyme mRNA 発現細胞は絨毛にも多数存在することを明らかにしている。これらの結果より、脾臓では多数のマクロファージなどの細胞が Lysozyme を細胞内に有すること、小腸では絨毛の Lysozyme 産生細胞は構成性に Lysozyme を分泌するが、陰窩では細胞内に Lysozyme を貯蓄するということが示唆された。さらに、小腸における Lysozyme 免疫陽性細胞の細胞種を同定するために、増殖細胞マーカーである Ki67、または PAS 染色との共染色を行い、陰窩に存在する Lysozyme 免疫陽性細胞は Ki67 免疫陽性細胞と共局在しなかったが、一部で PAS 陽性であったことを述べている。また、24 時間の絶食に伴い、下部小腸の Lysozyme mRNA 発現が低下したという結果は、マウスでの知見と一致していると述べている。以上、第一章ではスunks Lysozyme mRNA 配列の同定を行い、ヒトやげっ歯類とは異なる Lysozyme 産生細胞の局在を示し、絶食による mRNA 発現低下などの他動物種と一致する性質を一部有することを明らかにしている。

第二章では、第一章で行った解析を基に、小腸上皮で産生されることが報告されている別の抗菌ペプチドである GIIA sPLA2 遺伝子のクローニングとスunksにおける GIIA sPLA2 の特徴について得られた知見を詳細に記述している。申請者は、GIIA sPLA2 遺伝子の翻訳領域をコードする cDNA は 435 塩基対から成り、予想されるアミノ酸配列は 144 残基であることを明らかにし、それはヒトとアミノ酸で 61.1% の相同性を示すことに加えて、Lysozyme と同様に、GIIA sPLA2 アミノ酸配列のジスルフィド結合と酵素活性部位のアミノ酸

はこれまで報告のある哺乳動物間で保存されていることを示している。次に、定量 PCR による GIIA sPLA2 mRNA 発現分布を検討した結果、GIIA sPLA2 mRNA 発現は脾臓で最も高いことを明らかにした。また、*in situ* hybridization 法により mRNA 発現細胞の小腸における分布を検討し、GIIA sPLA2 mRNA 発現細胞は小腸の粘膜層の陰窩と絨毛に散在性に観察され、脾臓における GIIA sPLA2 mRNA 発現細胞は赤髄に散在性に見られることを述べている。この結果は、第一章で示された Lysozyme と同様に、GIIA sPLA2 mRNA 発現細胞も今まで報告があるマウスやヒトなどの小腸上皮を構成する細胞種とは異なることを示している。また、絶食による GIIA sPLA2 mRNA 発現動態の検討も行っており、自由摂食群と比べて絶食群で発現量が約 2 倍増加したことを明らかにし、小腸小片を用いた解析からグルコース濃度が低い培地で培養した際に GIIA sPLA2 mRNA 発現が高くなることを示した。以上、第二章では、スunks GIIA sPLA2 mRNA 配列の同定を行い、GIIA sPLA2 産生細胞のヒトなどとは異なる局在を示し、GIIA sPLA2 mRNA 発現は絶食やグルコースにより制御されることを明らかにしている。

以上、本論文で明らかにされたスunksにおける、ヒトやげっ歯類とは異なる Lysozyme および GIIA sPLA2 を産生する細胞の局在は新しい発見であり、小腸粘膜の免疫系の理解に大きく貢献するものである。なお、上記の内容は査読付き国際学術専門誌に発表されている。これらの成果から、本審査委員会は本学位論文を博士（理学）の学位を授与するに値するものと判断し、学位論文審査に合格とした。