

氏名	トウ 陶	ウ 雨	フウ 風
学位(専攻分野)	博士(農学)		
学位記番号	農博第1587号		
学位授与の日付	平成18年11月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科・専攻	農学研究科食品生物科学専攻		
学位論文題目	Studies on the Membrane Receptors Sensing Heat Shock Protein 70 in an Innate Defense System (初期生体防御系において熱ショックタンパク質70を感知する膜受容体に関する研究)		
論文調査委員	(主査) 教授 北 島 直 文	教授 吉 川 正 明	助教授 谷 史 人

### 論 文 内 容 の 要 旨

熱ショックタンパク質(Heat shock protein:Hsp)は、大腸菌からヒトに至るまで進化的に普遍的に保存されたタンパク質の一つである。Hspは、細胞内における新生ポリペプチド鎖の立体構造形成や変性タンパク質の凝集阻止などの分子シャペロンとして機能することが明らかにされてきた。最近、細胞の壊死に伴い細胞外に放出されたHspが抗原としてはたらき疾病を引き起こしたり、また、生体への危険シグナルとして、マクロファージや樹状細胞などの初期生体防御系で機能する細胞を活性化させる作用が報告されている。しかし、このようなHspの免疫学的機能については明らかにされていない点も多い。本論文では、Hspのなかでも代表的なHsp70に着目し、初期生体防御系に対するHsp70の作用機作を解明するために、DnaKの構造的特性や、Hsp70と相互作用する免疫細胞上の膜受容体分子の構造と機能について解析し、主に以下のことを明らかにした。なお、Hsp70については、Hsp70ファミリーのマウスHsp72、ハウレンソウHsc70、大腸菌DnaK、乳酸菌DnaKを取り上げ、それらについて検討した。

抗体産生B細胞や上皮細胞の表面に発現している膜タンパク質CD40分子が細胞の増殖・分化、Ig-クラススイッチや炎症反応に関与していることから、はじめに、マウスCD40はHsp70を危険シグナルとして認識するか否かについて解析した。マウスIL-3依存性pro B細胞株Ba/F3とヒト上皮系細胞HEK293にマウスCD40をコードする遺伝子を導入し、CD40を安定に発現するCD40-293形質転換株を作製した。得られた二種類の形質転換体に発現したCD40のサイズは異なり、CD40分子の発現は用いた細胞の種類に依存した選択的スプライシングを伴うことを明らかにした。マウスCD40分子に対して同種生物の抗原となるマウスHsp72やそのフラグメント変異体および異種抗原となる大腸菌由来DnaKの形質転換株への作用を調べたところ、いずれのHsp70もマウスCD40分子へ特異的な結合を示さなかった。また、形質転換株に対するケモカインRANTESの産生刺激能を調べたところ、いずれのHsp70もケモカインを産生しなかった。この結果は、ヒトのCD40分子が、ヒト、大腸菌や結核菌のHsp70と結合しケモカインを産生するという従来の報告とは異なるものであった。それ故、マウスCD40分子はヒトのホモログとは異なり単独ではHsp70を認識できないか、あるいはマウスCD40がHsp70を識別するには他の補助分子が必要であるという可能性を指摘した。

次に、Hsp70分子にビオチンを化学的に導入することによって生じる構造変化が、細胞応答を引き起こすことを見出した。ビオチン化したマウスHsp72と大腸菌DnaKのCD40-293形質転換株への結合をストレプトアビジン蛍光色素で検出すると、両者ともに細胞に結合することを見出した。しかし、このビオチン化物の結合は親株のHEK293細胞においても観察されたことから、CD40分子に非依存的であった。HEK293細胞に対するビオチン化物の結合は用量依存性を示す特異的な結合であったが、未修飾のHsp70やビオチン自身では阻害されなかった。また、ビオチン化物をHEK293細胞に加えると、Hsp70の由来に関係なくケモカインRANTESの産生を誘導した。このケモカインの産生誘導はFITC化したHsp70やビオチン化BSAでは観察されなかった。これらの結果から、ある種の細胞に対してはHsp70のコンホメーション変化が危険シグナルとして作用すること、また、ビオチン化Hsp70を結合する未知の受容体が上皮系細胞に存在するこ

とを明らかにした。

最後に、株化された数種類の免疫細胞に対するマウス Hsp72 の結合を調べた結果、マウス由来 B 細胞系の lymphoid neoplasm P388D1 に強く結合することを見出した。P388D1 細胞には、マウス Hsp72 の他にホウレンソウ Hsc70 が結合したが、大腸菌と乳酸菌の DnaK はほとんど結合しなかった。Hsp70 の C 末端配列は多様性に富んでいるが、この領域におけるマウス Hsp72 とホウレンソウ Hsc70 の相同性は50%程度であり、かなり保存されている。このことは、P388D1 細胞表面に Hsp70 の C 末端領域を識別する受容体が存在することを示唆している。P388D1 細胞表面をプロテアーゼ処理したところ、マウス Hsp72 の結合が低下したことから、Hsp72 に対する受容体はタンパク質性であると考えられた。光反応性架橋剤で修飾した Hsp72 を用いて P388D1 細胞上の受容体を標識した結果、免疫沈降物のウエスタンブロットング解析において分子サイズ 50kDa 付近にバンドが検出された。このバンドの出現は非標識の Hsp72 共存下で有意に抑えられた。以上の結果から、マウス Hsp72 の P388D1 細胞への結合には、P388D1 細胞表面に存在する分子サイズ 50kDa の膜タンパク質がかかわることを明らかにした。

### 論文審査の結果の要旨

熱ショックタンパク質 (Heat shock protein: Hsp) は種を越えて保存されたタンパク質であり、細胞内においては新生ポリペプチド鎖の立体構造形成や変性タンパク質の凝集阻止などに分子シャペロンとして重要な生理的機能を担っている。一方、細胞の壊死に伴い細胞外に放出された Hsp が、生体の異常を示す情報伝達因子としてはたらいっていることが示されている。しかしながら、Hsp の細胞外情報伝達因子としての特性や構造ならびに初期生体防御系におけるその受容機構についてはほとんど明らかにされていない。本論文は、Hsp のなかでも代表的な Hsp70 をとりあげ、数種類の生物由来 Hsp70 (マウス Hsp72, ホウレンソウ Hsc70, 大腸菌と乳酸菌 DnaK) と初期生体防御系細胞との相互作用の解析を通して、Hsp の細胞外情報伝達因子としての特徴を考察しているもので、成果として評価できる点は以下のとおりである。

(1) 抗体産生 B 細胞や上皮細胞の表面に発現している膜タンパク質 CD40 分子が、細胞の増殖・分化、Ig-クラススイッチや炎症反応に関与していることに着目し、CD40 を安定に発現する形質転換株を用いて、マウス CD40 と Hsp70 との相互作用を解析した。その結果、マウス Hsp72 とそのフラグメント変異体ならびに大腸菌由来の DnaK はマウス CD40 分子に対して特異的な結合を示さず、ケモカインの産生も誘導しないことを明らかにした。

(2) ビオチン化した Hsp70 は、その由来にかかわらず、ヒト上皮系 HEK293 細胞に特異的に結合し、ケモカイン RANTES の産生を用量依存的に誘導することを明らかにした。これは、ビオチン化によって Hsp70 のコンホメーションが変化し、危険シグナルとして作用したと考えられる。この結果は、タンパク質分子を修飾する際によく用いられるビオチンが、細胞の応答機能に対して大きな影響を及ぼすという新知見を与えている。

(3) 株化された免疫系の細胞に対する Hsp70 の結合を調べ、マウス由来 lymphoid neoplasm P388D1 細胞にマウス Hsp72 が強く結合することを見出した。P388D1 細胞にはホウレンソウ Hsc70 の結合も認められたが、大腸菌と乳酸菌 DnaK は結合せず、これらの結合を比較することによって、P388D1 細胞には Hsp70 の C 末端領域を識別する受容体が存在することを見出し、その受容体の候補の一つとして、分子サイズ 50kDa の膜タンパク質がかかわることを明らかにした。

以上のように、本論文は、熱ショックタンパク質 Hsp70 が初期生体防御系の細胞や膜受容体分子と相互作用することを明らかにし、その作用機作について詳細な検討を行い、Hsp70 の新たな機能に関する知見をもたらしたもので、これらの成果は、食環境学、食品免疫学、食品生理機能学の分野に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成18年9月14日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。