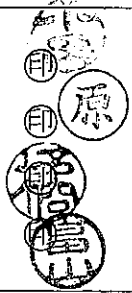


(別記様式第5号)

論文審査の結果の要旨

報告番号	博(生)乙第 45号	氏名	山西 智大
学位審査委員	主査 小田達也 副査 原 研治 副査 橋 勝康 副査 畠山智充		
論文審査の結果の要旨			
<p>山西智大氏は平成 21 年 3 月に長崎大学大学院生産科学研究科水産学専攻修士課程を修了後、ハウスウェルネスフーズ株式会社に入社。平成 21 年 4 月から同社研究生産本部にて、健康食品開発における、特に機能性飲料の工業化検討業務に従事し、現在に至っている。同氏は健康食品素材として知られるビタミン類、コラーゲン、リコペン等の飲料生産への適用を検討する中、学生時代より取り組む海洋性棘皮動物グミ由来レクチン CEL-I の生物活性に関する研究を継続し、その成果を平成 25 年 12 月に主論文「海洋性棘皮動物グミ由来 N-Acetylgalactosamine 特異的 C 型 レクチン CEL-I の in vitro での生物活性に関する研究」を完成させ、参考論文として、学位論文の印刷公表論文 5 編 (うち審査付き論文 5 編)、その他の論文 1 編 (うち審査付き論文 1 編) を付して、博士 (水産) の学位の申請をした。</p> <p>長崎大学大学院生産科学研究科教授会は、平成 25 年 12 月 18 日の研究科教授会において論文内容等を検討した結果、学位申請の提出資格ありと判定し、上記の審査委員を選定した。委員は主査を中心として、その論文内容を慎重に審査し、公開論文発表会を行わせるとともに、試験及び試問を行い、それらの結果を平成 26 年 2 月 19 日の研究科教授会に報告した。</p> <p>以下に論文審査内容について記載する。</p> <p>海洋性棘皮動物グミ (<i>Cucumaria echinata</i>) より新規に精製された CEL-I は、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) に強い結合性を示す、16kDa のサブユニットが 1 本のジスルフィド結合によりホモダイマーを形成する C 型レクチンである。生物活性に関しては、ウサギやヒトの赤血球を凝集する他、細胞種に特異的な細胞毒性を示す事が見出されている。一方、ある種のレクチンは、マクロファージ刺激作用を有し、サイトカインや一酸化窒素 (NO) の産生を誘導する事が知られている。また、マウスやヒトのリンパ球に対してマイトジェン作用を示すレクチンも知られている。本研究では、CEL-I の生物活性の解明を目的とし、マウスマクロファージ株細胞 RAW264.7 に対する CEL-I の腫瘍壊死因子-<math>\alpha</math> (TNF-<math>\alpha</math>) や顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) などのサイトカイン誘導作用及び NO 産生誘導活性について調べた。さらに、CEL-I のマウス脾臓リンパ球</p>			

に対するマイトジェン作用について検討し、以下の知見を得ることができた。

1. CEL-I は RAW264.7 細胞を刺激し、TNF- $\alpha$  並びに G-CSF の放出を濃度依存的に誘導した。また TNF- $\alpha$  については CEL-I 刺激より 2 時間後、G-CSF は 6 時間後より検出された。また、CEL-I は NO 放出誘導活性も有していた。LPS 阻害剤の polymyxin B を同時に添加したところ、サイトカインや NO 検出量に影響は無く、その活性が CEL-I 独自のものであり、エンドトキシンとの関与は無いことが確認された。CEL-I を FITC 蛍光標識し、細胞への結合を調べたところ、CEL-I の細胞結合量は活性発現と良い相関が認められた。さらに、CEL-I 刺激から各因子放出に至るまでのプロセスについて調べた。CEL-I の特異的糖である GalNAc を添加すると、活性が部分的ではあるが阻害された。よって、細胞表面の特異的糖鎖への CEL-I 結合が活性発現に重要である事が分かった。細胞内伝達シグナル系である 3 種の MAP キナーゼの関与について調べたが、それぞれのシグナル系は CEL-I 刺激後 90 分をピークに活性化した。またそれぞれに特異的な阻害剤を添加したところ、サイトカイン放出は阻害され、本シグナル系の関与が示唆された。
2. 抗酸化活性を有し、サイトカイン、NO 産生系免疫をはじめとする免疫系への影響が報告されている赤色色素リコペンの CEL-I の活性に対する影響について検討した結果、CEL-I による TNF- $\alpha$  及び NO 産生放出レベルがリコペンで阻害される結果となった。
3. CEL-I のレクチン機能以外に、蛋白質間の接触を妨害するため牛血清アルブミン (BSA) の影響を調べた。結果として CEL-I の NO 誘導作用は BSA で阻害された。細胞内伝達シグナルの挙動に関して、MAP キナーゼ系の阻害剤により活性は阻害された。
4. CEL-I のマイトジェン活性はマウス脾臓細胞 (ddY 系, 雄, 6 週齢) を用いて検討したところ、CEL-I は濃度依存的な活性を示した。またその活性は GalNAc により阻害され、CEL-I の糖鎖認識を介した活性であることが示唆された。マイトジェンは T 細胞、B 細胞に特異性があるか、若しくは両者に活性を示すものが知られており、この点を CEL-I について調べた。B 細胞についてはヌードマウスより採取し、T 細胞については脾臓細胞をナイロンウールカラムに供することで T 細胞画分を得た。結果、CEL-I は T 細胞、及び B 細胞の両者に対しマイトジェン活性を示すことが判明した。

以上のように、本論文で見出された海洋性棘皮動物由来レクチン CEL-I の生物活性に関する新知見はレクチン及び蛋白質の生理活性との観点から高く評価できると考えられ、水産化学、生化学、及び分子生物学分野へ寄与するものであることを認め、学位審査委員会は、博士 (水産) の学位に値するとして合格とした。