

論文審査の結果の要旨

報告番号	博(生)甲第255号	氏名	王 亜軍
学位審査委員		主査 長 富 潔 副査 原 研 治 副査 小田 達也 副査 金井 欣也	
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>王 亜軍氏は2008年4月長崎大学大学院生産科学研究科博士後期課程に入学し、現在に至っている。同氏は生産科学研究科に入学以降、環境科学を専攻して所定の単位を修得すると共に、魚病細菌感染に伴う宿主細胞の酸化ストレス応答に関する研究に従事し、その成果を2010年12月に主論文「Studies on the Responses of Macrophages to Oxidative Stress Caused by <i>Edwardsiella tarda</i> Exposure (<i>Edwardsiella tarda</i> 暴露に伴うマクロファージ系細胞の酸化ストレス応答に関する研究)」として完成させ、参考論文として、学位論文の印刷公表論文3編(うち審査付き論文3編)、その他の論文1編(審査付き論文)を付して、博士(学術)の学位を申請した。長崎大学大学院生産科学研究科教授会は、2010年12月15日の定例教授会において論文内容等を検討し、本論文を受理して差し支えないものと認め、上記の審査委員を選定した。委員は主査を中心に論文内容について慎重に審議し、公開論文発表会を実施すると共に、最終試験を行い、論文審査及び最終試験の結果を2011年2月16日の生産科学研究科教授会に報告した。</p> <p>本研究は、魚病細菌 <i>Edwardsiella tarda</i> (<i>E.tarda</i>) 暴露に伴うマクロファージ系細胞の酸化ストレス応答機構の解明の一環として、生体側の免疫防御機構並びに <i>E.tarda</i> 感染に伴う炎症反応の作用機序について細胞レベル及び分子レベルでの解析に取り組んだものである。</p> <p>第1章では、背景としてエドワジエラ症の概要、<i>E.tarda</i> の諸性状と病原性及びマクロファージの殺菌因子に関するこれまでの知見を詳述し、本研究の目的と構成を紹介している。</p> <p>第2章では、細菌感染に伴う生体防御機構を解明する一環として、ヒラメ腹腔マクロファージの初代培養系による <i>in vitro</i> 実験系を用いて、<i>E.tarda</i> 暴露に伴うマクロファージの活性酸素種(ROS)放出能及び <i>E.tarda</i> の病原性との関係について検討した。先ず、<i>E.tarda</i> NUF251(強毒株)もしくはNUF194(弱毒株)のマクロファージ内での増殖能を調べた。マクロファージ内の生菌数はコロニーカウント法で算出した。その結果、<i>E.tarda</i> はマクロファージに貪食された後、弱毒株では生菌数の増加はほとんど見られなかったが、強毒株では生菌数が経時的に増加することが明らかになった。次いで、<i>E.tarda</i> 暴露に伴うヒラメ腹腔マクロファージによる ROS の放出能を化学発光法により調</p>			

べた。その結果、*E.tarda* 強毒株のマクロファージ内での生存がヒラメ腹腔マクロファージの活性酸素依存性殺菌機構を回避することと密接な関連性があることを明らかにした。

第3章では、活性酸素代謝において重要因子として働く NO 及び炎症性サイトカインの一つである TNF- α の変動を解明するために、*E.tarda* 暴露に伴うヒラメ腹腔マクロファージ並びにマウスマクロファージ系細胞株 (RAW264.7) の NO 及び TNF- α 産生能について検証した。その結果、*E.tarda* 暴露 3 時間後に強毒株、弱毒株共に NO の産生は見られたが、強毒株の方が弱毒株より早い段階で急激に上昇した。一方、TNF- α 産生は、*E.tarda* 強毒株のみ確認された。以上の結果より、*E.tarda* 強毒株による NO と TNF- α の産生誘導が生体内の炎症を引き起こす可能性を示唆した。

第4章では、*E.tarda* に存在する病原因子を探索するために、*E.tarda* 菌体外産生物質 (Extracellular Products, ECP) を用いて、マクロファージ系細胞株の NO 及び TNF- α 産生能を調べた結果、*E.tarda* 強毒株 ECP 暴露に伴う NO と TNF- α 産生量は ECP 濃度依存的に増加することを確認した。また、主要な ECP 成分(45 kDa タンパク質)を自動エドマン分解法で解析した結果、45 kDa タンパク質は鞭毛構成タンパク質 flagellin として同定した。更に、3 種の MAP キナーゼに対する特異的インヒビターを用い細胞内シグナル伝達について検討した結果、NO と TNF- α 産生は JNK 経路を介する細胞内シグナル伝達によって誘導される可能性を示唆した。以上の結果より、*E.tarda* 強毒株 flagellin はマクロファージの NO 及び TNF- α 産生を誘導し、炎症促進に関与している可能性を示唆した。

E.tarda 暴露に伴う生体側の抗酸化酵素の一つであるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の応答機構を分子レベルで明らかにするためには、SOD の遺伝情報を得る必要がある。第5章では、ヒラメ Cu,Zn-SOD 及び Mn-SOD 遺伝子の cDNA クローニングを行った。ヒラメ肝臓より両酵素を単離精製し、N 末端アミノ酸配列を決定した。また、その遺伝情報に基づいてデザインしたプライマーを用いて RT-PCR 及び RACE 法により得られた増幅産物の TA クローニングを行い、塩基配列を決定した。その結果、両 SOD cDNA の全塩基配列及び演繹アミノ酸配列を明らかにした。

第6章では、両 SOD の遺伝情報に基づいてデザインしたプライマーを用いて、*E.tarda* 暴露に伴うヒラメ SOD の mRNA レベルの挙動を調べた。その結果、Mn-SOD mRNA の誘導は、*E.tarda* 暴露に伴うマクロファージの ROS 産生と密接に関連する可能性を示唆した。

第7章では、本研究での成果を総括した上で、今後の展開として *E.tarda* 強毒株 flagellin による宿主免疫回避の分子機構の解明を挙げている。

以上のように、本論文は *E.tarda* 感染に伴う生体側の活性酸素依存性殺菌機構並びに炎症反応の作用機序を細胞レベル及び分子レベルで明らかにした。学位審査委員会は、これらの知見が水圏生化学の分野において極めて有益な成果であるとともに、水産科学の分野の進歩発展に貢献するところが大きいと評価し、博士 (学術) の学位に値するものとして合格と判定した。