

ギンブナをモデル動物とした、グランザイムによる魚類特有の細胞傷害機構解明

日本大学 大学院 獣医学研究科 魚病学研究室
博士課程 3年 松浦雄太

魚類は獲得免疫を有する最も下等な脊椎動物である。獲得免疫には、非自己の細胞や病原体感染細胞を免疫細胞が直接攻撃する細胞性免疫、抗原に対する抗体を産生することで病原体を排除する液性免疫の2種類が存在する。魚類もこの獲得免疫を有することで、抗原特異的な免疫応答が可能であり、哺乳類と同様ワクチンも実用化されている。

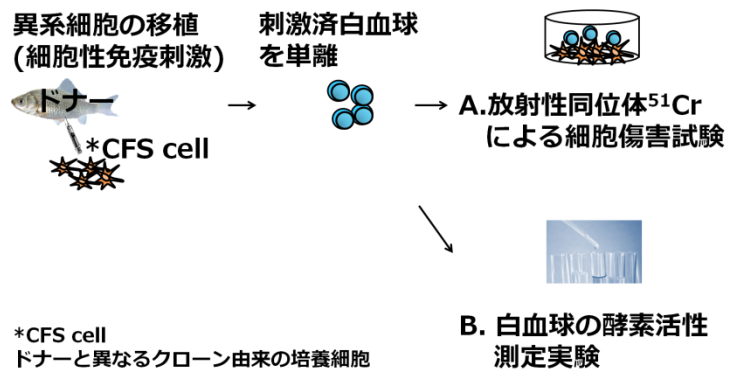
魚類増養殖の現場で多大な被害を引き起こしているウイルス等病原体に対する防御反応には、細胞性免疫が重要な役割を担っている。よって、これら病原体による被害を防ぐためには、細胞性免疫機構を十分理解したうえで対策を講じる必要がある。しかし、研究ツールの不足や近交系がほとんど存在しないことで、有効な免疫機能測定法が確立されておらず、魚類の細胞性免疫機構はその多くが未だ解明されていない。

我々のグループは魚類の細胞性免疫機構解明のため、クローンギンブナを用いて研究を進めてきた。ギンブナは天然雌性発生によるクローン繁殖を行うため、遺伝的に均一な個体を容易に得ることができる。これらのクローン個体を用いることで、抗原特異的な細胞性免疫機能の測定が可能となるため、魚類の細胞性免疫研究において極めて優れたモデルとなっている。また、各クローン系統由来の培養細胞を用いた細胞傷害試験により、リンパ球が標的細胞を直接攻撃する細胞傷害活性を測定することも可能である。上記実験系を活用することで、細胞傷害機構の解明を目指している。

中でも本研究は、分子レベルでの細胞傷害機構解明を目指し、細胞傷害に関与する酵素の探索および同定を行ったもので、これにより以下の成果を得た。

1. 細胞傷害に関与する内因性プロテアーゼの探索

哺乳類の細胞傷害において種々のプロテアーゼが関与することが知られているが、魚類においてはほとんど解明されていない。そこで本項では、右図に示す移植実験の系を用いてプロテアーゼ阻害剤による白血球の細胞傷害活性阻害実験および酵素活性測定実験を行い、細胞傷害に関与するプロテアーゼの探索を行った。



その結果、セリンプロテアーゼが細胞傷害に関与していることがわかった。また、セリンプロテアーゼの中でも合成蛍光ペプチド基質である Z-GPR-MCA を加水分解する酵素の活性が細胞傷害活性と相関していることが明らかとなった(図 1, 図 2)。このことから、Z-GPR-MCA を加水分解するセリンプロテアーゼが細胞傷害に関与していることが判明した。

2. 細胞傷害に関与する内因性プロテアーゼの精製

酵素の同定を目的とした酵素性状解析には十分に精製された酵素を用いる必要があるため、本項ではギンブナ白血球より内因性 Z-GPR-MCA 加水分解酵素の精製を行った。その結果、SDS-PAGE 解析にて分子量約 26,900 の単一の酵素を精製することに成功した(図 3)。

3. 細胞傷害に関与する内因性プロテアーゼの酵素性状解析

本酵素を酵素学的に同定するため、酵素性状の解析を行った。その結果、本酵素は P1 位が塩基性アミノ酸であるトリプシン様セリンプロテアーゼであることが判明し(図 4)、コラーゲンを基質とする可能性が示された。また、至適 pH が塩基性であることから、本酵素はヒトグランザイム A と類似した酵素性状を持つことが明らかとなった。一方、Zymography 解析の結果、本酵素は単量体で酵素活性を有することがわかった。この結果は、グランザイム A がホモ 2 量体で酵素活性を有するという酵素性状と大きく異なる。なお、本酵素の反応速度論的パラメータは表 1 の通りである。

以上の結果から、魚類の細胞傷害に関与する酵素としてグランザイム A を見出すことに成功した。これは、魚類において内因性グランザイムを見出すことに成功した初めての報告である。一方で、グランザイム A の作用機序など、未だ不明な点が多い。単量体で酵素活性を示す点がヒトグランザイム A と異なるため、酵素反応機構も哺乳類と魚類で異なり、本酵素による細胞傷害経路も異なる可能性が高い。今後は、細胞傷害における魚類グランザイム A の役割やその作用機序を調べることで、魚類特有の細胞傷害機構が存在する可能性も視野にいれ、細胞傷害機構の全容解明を目指し研究を進めていきたい。

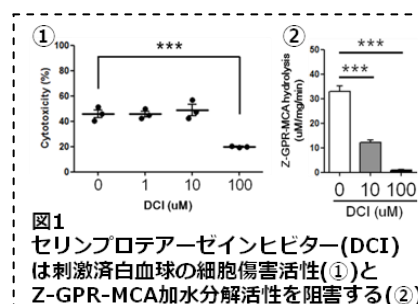


図1 セリンプロテアーゼインヒビター(DCI)は刺激済白血球の細胞傷害活性(①)とZ-GPR-MCA加水分解活性を阻害する(②)

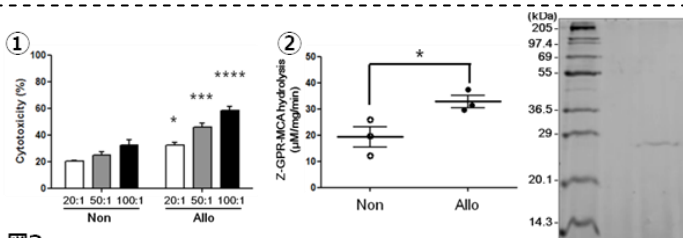


図2 細胞性免疫刺激(Allo)により、刺激済白血球の細胞傷害活性(①)とZ-GPR-MCA加水分解活性(②)は共に上昇する

図3 精製した酵素の SDS-PAGE解析結果

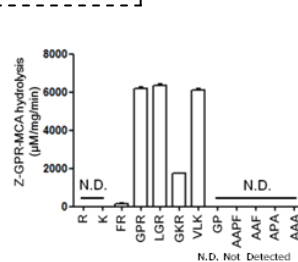


図4 本酵素の基質特異性解析結果

Kinetics constants	
Km (µM)	220
Kcat (sec ⁻¹)	21.7
Kcat/Km (sec ⁻¹ ·M ⁻¹)	98796

表1 本酵素の反応速度論的パラメータ
基質:Z-GPR-MCA
pH: 7.5