

Functional Diversity of Complement C4 Isotypes in Bony Fish Complement

ネーラー ビンティ ロスリ

<https://hdl.handle.net/2324/6796073>

出版情報 : Kyushu University, 2023, 博士 (農学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

氏 名	ネーラー ビンティ ロスリ (NEHLAH BT ROSLI)			
論 文 名	Functional Diversity of Complement C4 Isotypes in Bony Fish Complement (硬骨魚類における補体成分 C4 アイソタイプの機能的多様性)			
論文調査委員	主 査	九州大学	教授	中尾 実樹
	副 査	九州大学	准教授	杉本 智軌
	副 査	九州大学	教授	太田 耕平

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

魚類の免疫機構の解明は、健全な養殖魚の育成に必要な魚病防除法を確立するための鍵となる。特に、比較的原始的な脊椎動物である魚類においては、自然免疫が生体防御に果たす役割が高いと推測されている。自然免疫の主要な液性因子である補体系は、硬骨魚類において、その多くの構成成分が複数のアイソタイプとして存在する点で、他の脊椎動物と比較して際立った特徴を持つ。補体成分 C4 は、分子量約 190,000 の糖タンパク質で、限定水解で活性化されると標的異物に共有結合し、その後の補体活性化を異物上で進めるために重要な役割を果たす。一部の魚類、両生類、爬虫類には、染色体重複によって生じたと考えられる 2 種の C4 アイソタイプ (C4-1, C4-2) が存在するが、C4-1 と C4-2 の機能的な違いはほとんどわかっていない。特に、C4-2 はすべての動物に存在するタイプの C4 と考えられるが、C4-1 は、異物への反応特異性を規定するアミノ酸残基が置換された非定型なアイソタイプであり、その補体活性化経路における反応機構は不明なままである。本論文は、コイを実験魚として用い、補体成分 C4 のアイソタイプ (C4-1, C4-2) について、それらの機能分化をタンパク質レベルで検討した結果をまとめたものである。

まず、コイ C4-1、C4-2 それぞれに対する特異抗体の作成を進めた結果、C4-1 を特異的に認識する抗ペプチド抗体 (抗 C4-1 α) を作成し、この抗体が C4-1 を特異的にウエスタンブロッティングで検出できることを確認した。また、非変性状態の C4-1 および C4-2 を認識できるポリクローナル抗体を、C4-1 および C4-2 分子内に存在するネトリンドメインの組換えタンパク質を免疫原として作成し、これら抗体 (抗 C4-1-NTR、抗 C4-2-NTR) がそれぞれのアイソタイプに特異的であることをウエスタンブロッティングで確認した。

次に、C4-1 および C4-2 の各種標的異物への結合特異性を、抗 C4-1-NTR、抗 C4-2-NTR を用いたイムノアッセイによって解析した。その結果、C4-1 と C4-2 の一次構造から予測された結合特異性とは異なり、グラム陰性菌のリポ多糖、酵母のマンナン、ポリ L-リジン、コイ IgM 抗体に対して、両アイソタイプ間でほぼ同様な結合特異性を示すことが、タンパク質レベルで初めて明らかとなった。

さらに、コイ補体系の抗体依存的活性化経路 (古典経路) および非依存的活性化経路 (レクチン経路) における非定形アイソタイプである C4-1 の関与を検討した。古典経路において C4 を限定水解する成分 (C1r/s) とレクチン経路において C4 を限定水解する成分 (Mannose-Binding Lectin-MBL-associated serine protease-2 複合体) をコイ血清から精製し、コイ血清中の C4-1 に作用させ、C4-1 の限定水解を抗 C4-1 α を用いたウエスタンブロッティングで解析した。その結果、両成分ともに C4-1 を限定水解して活性化できること、および MBL-MASP2 よりも C1r/s によって

より効率よく活性化されることが判明した。これらの結果から、C4-1 アイソタイプはレクチン経路よりも古典経路でより効率よく活性化を受け、標的異物に対して C4-2 アイソタイプと同様の結合特異性を示して、補体活性化において C4-2 と同等の機能を果たすことが示唆された。

以上要するに、本研究は魚類で多様化した補体成分の機能と分子進化について新規の知見を見いだしたものであり、比較免疫学、水族生化学に寄与する価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士（農学）の学位に値すると認める。