

## 論文内容の要旨

申請者氏名 辻田 忠志

ヒトはグラム陰性細菌のリポポリサッカライド (LPS) に強く応答してエンドトキシンショックを起こす。重篤な場合、死に至る。一方、魚類はLPSではなく、バクテリアの鞭毛蛋白 flagellin に強く応答して、エンドトキシンショックを起こす。一般に、微量の flagellin ( $>1\mu\text{g}$ ) で死に至る。近年、flagellin の認識が Toll 様受容体の TLR5 によって行われることがヒト・マウスで判明した。魚類に TLR5 ortholog が存在することがフグゲノムプロジェクトから判明した。これとは独立に、申請者は四年前にニジマスから TLR5 ortholog を cDNA cloning した。驚くべきことに、この TLR5 ortholog は細胞内ドメインを欠く可溶性蛋白をコードしていた。そこで、申請者は RT-PCR, 3' RACE, 5' RACE を用いて膜型 TLR5 ortholog をニジマスから cloning することを試みた。Southern 解析の結果、ニジマスには三種の TLR5 orthologs が存在し、一つは psoidogene、一つは可溶性 TLR5 (rtTLR5S)、もう一つが膜型 TLR5 (rtTLR5M) であることが判明した。すなわち、魚類の flagellin 認識機構は哺乳類のそれより複雑であることが予想された。

rtTLR5M を種々の細胞に発現させて、flagellin 応答を調べた。TLR5 発現を欠くヒト細胞で NF $\kappa$ B のレポーター活性化が見られた。ニジマスの flagellin 認識機構を分子レベルで解析するため、バキュロシステムを用いて大量の rtTLR5S 蛋白を作製した。rtTLR5M 発現細胞 (他の TLR を発現していない CHO または HeLa) に flagellin をかけると、わずかな NF $\kappa$ B の活性化が観察された。rtTLR5S 蛋白をこの系に加えると、flagellin による NF $\kappa$ B 応答が飛躍的に増強した。この活性化は flagellin の種類 (flagellinA, C etc.) によらず観察された。従って、魚類は哺乳類と異なり、flagellin の増幅的応答機構を発達させ、これによって微量の鞭毛細菌類を感知し宿主免疫応答を誘導するシステムを保有することが証明された。

メッセージ解析の結果、rtTLR5M はすべての臓器で constitutive に発現が見られたが、rtTLR5S は肝臓のみに弱いメッセージが確認できた。なお、rtTLR5S は微量の菌体成分によって発現誘導がかかることが、ニジマス肝細胞 RTH-149 の微生物 (ピブリオ菌) や flagellin の刺激実験によって証明された。従って、可溶性 rtTLR5S は肝臓で特異的に発現誘導する acute phase protein であることが示唆された。

以上から、魚類は鞭毛微生物に弱く応答する一次応答と、増幅経路 (rtTLR5S 誘導) を介する強力な二次応答からなる生体防御反応を誘起しうる。魚類の flagellin ショックは強力な二次応答の副作用と考えられる。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 辻田 忠志

申請者は魚類の flagellin ショックの原因が、魚類に特有の可溶型 rtTLR5S の flagellin による発現誘導とそれに続く rtTLR5M の強力な二次応答の結果によることを初めて明らかにした。

申請者はニジマス rtTLR5S の ortholog が他の魚類（フグ、メダカ、ゼブラフィッシュ）にも存在することを EST やゲノムデータから明らかにした。従って、本システムは広く魚類全般に保持される感染防御機構であることが推定された。この flagellin 認識機構は陸生の脊椎動物（ヒト、マウス、トリ）では喪失している。従って、水棲脊椎動物に特有な系と推定され、その証明をカエルなどで試みる予定である。

なお、フグとヒトのゲノム比較から推定できる TLR システムの構造的な差異は①TLR4 がヒトにあってフグにない、②TLR5 にサカナ特有の可溶型が存在する、③フグのみに存在する TLR ファミリー（TLR21, TLR22）がある、の三点であった。これらのヒトとの相違点を明らかにすることから、ヒトと魚類の共通祖先がもっていた TLR ファミリーのプロトタイプを類推できる。進化の過程でヒトは TLR21, TLR22, TLR5 の可溶型を失ったが、魚類は LPS 応答性の TLR4 を失った。この点も検証中である。

以上の①サカナ TLR5 可溶型の機能解析と flagellin 応答のシステム解明、②進化史におけるヒトとサカナの TLR ファミリーの相違点と生活環境への適応、は申請者によって初めて解明された生体防御の機構で、本論文の骨子をなすものである。本結果は魚類の生体防御機構の解明に資するのみならず、養殖産業や人魚共通型の感染症対策に学術上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文がバイオサイエンス博士の学位論文として価値あるものと認定した。