

ester (2-CAPE) はプロボリスの活性成分として単離され、抗酸化や抗菌、抗炎症、腫瘍細胞増殖抑制効果など多様な生理活性をもつことが明らかにされている。CQA esterase はクロロゲン酸と 2-Phenethyl alcohol (2-PA) から 2-CAPE に変換し、さらにカフェ酸と 2-PA を基質として酵素反応させても 2-CAPE が生成したことから、2-PA を 2-Phenethyl bromide に代えても 2-CAPE が生成したことから、本酵素は加水分解反応以外にエステル置換反応と縮合反応、臭素置換反応も触媒できる多機能酵素であることを明らかにした。また、2-PA の代わりに 1-PA を基質に用いて CQA esterase を作用させると、(S)-1-CAPE (e.e.50%) が生成したことから、本酵素は光学特異性をもつことを明らかにした。

本酵素を用いた 2-CAPE への最適変換条件は、クロロゲン酸と 2-PA を基質としたエステル置換反応でモル変換率 50% であった。この反応は水が共存する条件下で、加水分解反応と並行してエステル置換反応が高い収率で進行するところが特徴的である。得られた 1-CAPE と 2-CAPE には、紫外線吸収や抗酸化、抗菌、抗ガン活性の他にインフルエンザウイルス増殖阻止活性が確認された。とくに 1-CAPE は 2.5ppm で A 型ウイルス 92% と B 型ウイルス 95% の増殖を阻害し、有望な抗インフルエンザ剤として期待できる。また、これらの物質はウイルス感染細胞内でのウイルス複製を阻害していることを明らかにした。diCQA はクロロゲン酸より高い生理活性を示したが、コーヒー生豆中の含量が少ない。そこで、クロロゲン酸と Vinyl caffeate を基質として diCQA へ酵素変換することを考えた。まず市販の Vinyl cinnamate (VCI) とクロロゲン酸から Cinnamoyl caffeoyl quinic acid (CCQA) に変換できる酵素の探索と最適変換条件を検討した。そこで、市販リパーゼ 21 種類をスクリーニングした結果、リパーゼ AL のみが CCQA へ変換できることを見いだした。

しかしながら得られた CCQA の抗酸化活性はクロロゲン酸と同程度で、diCQA ほど高くなかったことから、抗酸化活性の発現にはジヒドロキシ構造が重要であり、また Vinyl caffeate とクロロゲン酸から diCQA に変換できる酵素生産菌を広くスクリーニングすれば、目的の酵素を見いだすことができると確信している。このことは未利用コーヒー豆から調製した diCQA とクロロゲン酸を酵素変換して得られた 2-CAPE は、ともに高い生理活性をもっていた。とくに 2-CAPE は正常細胞に対する毒性が低く抗ガン、抗ウイルス活性など特徴ある活性をもっており、今後 in vivo での実験を経て製品への応用開発が期待できそうである。

以上、上記一連の結果から、本研究ではコーヒー豆に含まれる未利用資源であるアラビノガラクトンとクロロゲン酸類に注目し、その機能性を解明して、コーヒー抽出残渣や等級外コーヒー豆が資源として有効利用できることを明らかにしただけでなく、通常飲用されているコーヒー抽出液が多様な健康増進機能を有することを証明する手掛かりを提供したといえる。さらに、クロロゲン酸類を原材料として、多様な機能性を有する物質に酵素変換できることを明らかにしたことはコーヒー豆の機能性食品素材としての利用に道を開くものであり、博士論文として価値あるものとする。

氏 名	すが はら だい すけ 菅 原 大 輔
学 位 の 種 類	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	医 第 8 3 8 号
学位授与の日付	平 成 16 年 9 月 11 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Identification of a protective CD4 ⁺ T-cell epitope in the p15 ^{CAF} of Friend murine leukemia virus and the role of the MA protein targeting to the plasma membrane for its immunogenicity (マウスレトロウイルス MA 蛋白の感染防御に有効な構造要件の検討)
論文審査委員 (主 査)	教 授 宮 澤 正 顯
(副主査)	教 授 下 村 嘉 一
(副主査)	教 授 義 江 修

論文の内容の要旨

【目的】

近年、HIV に対する免疫応答に Gag 抗原特異的 CD4⁺ T リンパ球が重要な働きをしている可能性が示唆されている。フレンド白血病レトロウイルス (FV) は、成体マウスへの接種により致死性の赤白血病を誘発する。我々が以前に行った解析から、FV gag 遺伝子産物 Matrix (MA) 蛋白質は、感染制御に有効な T 細胞エポトープが存在することが示唆された。そこで本研究では、このエポトープの構造を同定し、さらに Gag 特異的 CD4⁺ T 細胞の活性化に重要な MA 蛋白質の構造要件について検討を行った。

【方法】

ワクシニアウイルス発現ベクターに MA 蛋白質コード領域の種々の断片あるいは点変異体を組み込んだ。これらのミニ遺伝子または変異遺伝子を発現する組み換え型ワクシニアウイルス (rVV) で (C57BL/6×A) F₁ マウスを免疫し、FV を接種して感染の成立と発症の経過を観察するとともに、Infectious center assay 及び FACS 解析により脾内ウイルス産生細胞数ならびに感染細胞数の経時変化を調べた。さらに、感染防御能を有する可能性のある領域をカバーする合成ペプチドを作製し、T 細胞増殖反応誘導の有無を調べた。また、共焦点レーザーキャノン顕微鏡を用い、各 rVV 感染細胞における MA 蛋白質の細胞内局在部位を解析した。

【結果】

MA 蛋白質全長を発現する rVV (vMA) で免疫したマウスでは、FV 接種後の脾腫が急速に退縮し、脾内ウイルス産生細胞が早期に排除されて、中和抗体の IgM から IgG へのクラススイッチも早期に誘導された。vMA の N-末端 Gly を Ala に置換した変異体 vMAmu で免疫したマウスでは、感染防御能の誘導が vMA 免疫に比べ低下した。vMA 感染細胞と vMAmu 感染細胞では、MA 蛋白質の細胞内局在に大きな違いがみられた。合成ペプチドを用いた解析により、MA のアミノ酸残基 84-95 の領域に、感染防御性の CD4⁺ T 細胞認識エポトープが存在することが明らかとなった。

【考察】

vMA は、FV 感染に対し強力な防御能を誘導する。これは MA 内に存在する CD4⁺ T 細胞認識エポトープが、FV 感染後に種々のエフェクター機能を誘導する事に起因する。レトロウイルスの MA 蛋白質は、その N-末端の Gly 残基がミリスチル化され、細胞膜の裏打ちに局在することが知られている。しかし、このミリスチル化が阻害されると MA 蛋白質の細胞内局在が変化し、MHC クラス II への抗原提示効率が悪くなり、それに伴って MA 蛋白質特異的 CD4⁺ T 細胞の誘導能も低下すると考えられる。

【結論】

MA 蛋白質のレトロウイルスワクチンとしての有用性が示唆された。ミリスチル化により細胞膜の裏打ちに局在した MA 蛋白質は、細胞内で分解処理を受け、MHC クラス II により提示される可能性が考えられた。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2004 年 月 日 公表予定	出版物名
	公 表 内 容	Journal of Virology
	全 文	2004 年 月 日 発行予定

論文審査結果の要旨

菅原大輔の学位論文は、マウスレトロウイルスgag遺伝子産物の一つであるマトリクス(MA)タンパク質上に、ウイルス感染防御免疫の誘導に有効なCD4陽性ヘルパーTリンパ球認識エピトープを分子同定し、このエピトープによるCD4陽性T細胞感作のためには、MAタンパク質がそのN-末端でミストイル化されて細胞膜の裏打ちに位置することが重要であることを明らかにしたものである。

レトロウイルスのMAタンパク質は、gag遺伝子翻訳産物の生合成直後から、ウイルス粒子出芽部位へのenv遺伝子産物の集積や、形成途中のウイルス粒子へのゲノムRNA取り込みに必須の役割を果たす。マウスレトロウイルスMAタンパク質上に感染防御性のT細胞認識エピトープが存在することは、以前の研究から明らかにされていた。また、ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)のMAタンパク質(p17)についても、その中にTリンパ球認識エピトープや抗ウイルス抗体の反応エピトープが含まれることが報告されており、HIV gag遺伝子産物に対する宿主免疫応答の成立と感染初期のウイルスコピー数との間に相関傾向が見られることから、HIV gag遺伝子産物、特にMAタンパク質は、HIV感染防御ワクチンの候補分子としても有力視されている。

今回菅原は、免疫系の既に完成した成体マウスへの接種によって、重篤な免疫不全症を伴う急性かつ致死性の白血病を誘発するフレンドレトロウイルスをモデルに、レトロウイルス感染の免疫学的防御に有効な、MAタンパク質上の抗原エピトープを分子レベルで同定することを研究目標とした。この目的のため、菅原はフレンド白血病レトロウイルスのgag遺伝子から、MAタンパク質コード部分の種々の断片をクローニングし、ワクシニアウイルストランスファーベクターにそれらを挿入して、複数の組換えワクシニアウイルスを作製した。更に、それらの組換えワクシニアウイルスをマウスに感染させて、挿入した遺伝子断片の発現産物に特異的な免疫応答を誘導し、その後にフレンドウイルスを接種して感染成立と発症の経過を丹念に追うことにより、MA遺伝子断片に対する免疫応答成立と感染防御との関係を明らかにした。

その結果、MAタンパク質C-末端寄りのアミノ酸残基76-105の範囲に、CD4陽

性ヘルパーT細胞により認識される感染防御性のエピトープが存在することが明らかになったので、更にこの範囲を重複してカバーする複数の合成ペプチドを作製し、最終的にアミノ酸残基83-97の範囲に感染防御エピトープが存在すること、その中でCD4陽性ヘルパーT細胞が認識する最小エピトープ構造は84-95の12残基ペプチドであることを解明した。

一方、驚くべきことに、この感染防御エピトープ83-97を全て含むにも拘わらず、MAタンパク質のN-末端部分を欠いた部分遺伝子を発現する複数の組換えワクシニアウイルスには、感染防御免疫の誘導能がなかった。

レトロウイルスのMAタンパク質は、そのN-末端のグリシン残基がミストイル化され、細胞膜の裏打ちに局在することが知られている。また、このMAタンパク質の細胞膜への局在には、単にN-末端グリシンのミストイル化だけでなく、N-末側数十アミノ酸残基中に含まれる塩基性残基の存在も重要であることが、HIVについて示されている。そこで菅原は、MAタンパク質のミストイル化及び細胞膜への局在と感染防御免疫応答誘導との関係を明らかにするため、ミストイル化部位であるN-末端グリシンをアラニンに置換した点突然変異MA遺伝子、及びMAタンパクN-末端の24残基を欠失させた部分遺伝子を発現する組換えワクシニアウイルスを作製した。これらを用いてまず、共焦点レーザー顕微鏡により発現したMAタンパク質の細胞内局在を調べると、ミストイル化部位のグリシンをアラニンに置換しただけで、本来細胞膜に強く局在するはずのMAタンパク質が細胞質及び核に局在するようになり、N-末端の24残基削除により、変異MAタンパク質は殆ど全て核に局在するようになった。更に、これら変異型MAタンパク質を発現する組換えワクシニアウイルスで免疫したマウスでは、MAタンパク質上のCD4陽性ヘルパーT細胞認識エピトープと反応するT細胞が活性化されず、特に核に局在する24残基欠失型では、認識エピトープそのものは無傷で含まれるにも拘わらず、T細胞は全く活性化されなかった。

以上の実験結果から、マウスレトロウイルスMAタンパク質には、感染防御に有効なCD4陽性ヘルパーT細胞認識エピトープ構造が含まれること、その最小構造

は12アミノ酸残基であること、このエピトープによるTリンパ球の感作には、MAタンパク質が細胞膜の裏打ちに局在することが必要であることが明らかとなった。

この研究業績は国際的に高く評価され、菅原の学位論文は、アメリカ微生物学会のウイルス学専門誌、*Journal of Virology*に掲載された。その際、論文のレフェリーが2名ともこの研究を大変高く評価し、特に単にT細胞認識エピトープ構造を解析しただけではなく、これによるT細胞感作とMAタンパク質の膜局在との関係を明らかにした点は、他の類似論文から明らかに抜きん出た成果であると、レフェリー及び担当編集委員から絶讃された。

このように、本研究は菅原自身が遺伝子操作の技法を駆使し、かつ動物実験による細胞免疫学的解析も自分の手で行って完成させた業績であり、博士の学位を授与するに相応しいと判定された。

6月29日に開催された公聴会では、副主査の下村教授・義江教授より、MAタンパク質を用いた免疫により、抗MA抗体が産生される理由、MA遺伝子断片発現の際に、それぞれの切断部位を設定した根拠、決定したエピトープ中の、MHC分子結合モチーフの有無、ウイルス粒子形成におけるMAタンパク質の機能、及びMAタンパク質が細胞膜の裏打ちに局在することが、その免疫原性を決定する機序など、専門的事項に関する質問が行われた。また、他の聴衆からも質問が提起された。菅原はそれらの質問に的確に応答し、専門領域に対する十分な学識が確認された。

氏 名	とみ やま たか し 富 山 貴 司
学 位 の 種 類	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	医 第 8 4 0 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学 位 論 文 題 目	培養軟骨細胞のインターロイキン1および機械的 ストレスによる活性酸素種の誘導とエプセレンの 効果
論文審査委員 (主 査)	教 授 濱 西 千 秋
(副主査)	教 授 宗 像 浩
(副主査)	教 授 伊 木 雅 之