

氏名	格日勒朝格図
授与した学位	博士
専攻分野の名称	学術
学位授与番号	博甲第3923号
学位授与の日付	平成21年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Studies on the involvement of intracellular calcium ion in the activation of chicken leukocytes (ニワトリ白血球の活性化における細胞内カルシウムイオンの関与に関する研究)
論文審査委員	教授 近藤 康博 教授 奥田 潔 准教授 阿部 浅樹

### 学位論文内容の要旨

カルシウムイオンは細胞内シグナル伝達経路における重要な因子の一つであり、セカンドメッセンジャーとして、細胞の刺激応答においてきわめて重要な役割を果たしている。本研究では、ニワトリの白血球を材料に用いて、刺激に伴う細胞内カルシウムイオンの変動ならびにカルシウムイオンの変動と細胞内シグナル伝達における酵素のリン酸化との関連について調査し、ラットやヒトなどで報告されている結果と比較して鳥類の白血球の活性化における細胞内カルシウムイオン濃度の関与の一端を明らかにしようとした。

第1の課題として、ニワトリリンパ球の活性化に伴うカルシウムイオン濃度の変化について試験した。ニワトリのヒナから胸腺リンパ球(T細胞)、脾臓リンパ球(T細胞とB細胞)、ファブリシウス嚢リンパ球(B細胞)を採取して、代表的なTリンパ球増殖因子であるフィトヘマグルチニン(PHA)とコンカナバリンA(ConA)が細胞内カルシウムイオン動態に与える効果を検討し、合わせて、これらのリンパ球の増殖性についても測定して比較した。ニワトリ胸腺リンパ球、脾臓リンパ球、ファブリキウス嚢リンパ球のいずれにおいても、マイトジェン刺激による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が観察された。ConAとPHAに対する反応性の違いやEGTAによるカルシウムイオン上昇抑制のパターンの違いから、ニワトリのリンパ球とラットのリンパ球の間には相違があると考えられた。マイトジェンによる細胞内カルシウムイオン上昇と細胞増殖の間には一応の相関が見られるものの、細胞内カルシウムイオンがマイトジェン濃度に依存して上昇するのに対して、細胞増殖は高濃度のマイトジェンでは抑制傾向にあること、あるいはEGTAの効果は細胞内カルシウムイオン上昇と細胞増殖で異なる部分があることから、マイトジェン刺激によるリンパ球の細胞内カルシウムイオンの上昇は細胞増殖以外の細胞活性にも関与している可能性が示唆された。

ニワトリの好異球の細胞内情報伝達系におけるカルシウムイオンの関与を明らかにする研究の一環として、MAPキナーゼの一つとして細胞内情報伝達経路において重要な役割を果たすERKに着目して実験を行った。この実験では、ERK抗体とリン酸化ERK抗体を用いて、ホルボールエステル(PMA)ならびにフォルミールペプチド(fMLP)とリポポリサッカライド(LPS)で刺激した好異球のERKの活性化を同酵素のリン酸化を指標にして測定した。ERKの活性化と細胞内カルシウムイオンの関係を、細胞外カルシウムイオンキレーターであるEGTAと細胞内カルシウムイオンキレーターであるBAPTA/AMを用いて検討した。さらに、ERKの活性化とPI3キナーゼ(PI3K)、ホスホリパーゼC(PLC)およびPKCの関係をそれぞれの酵素の阻害剤を用いて調べた。同時に、ラットの好中球のERK活性化についても測定して好異球と比較した。ラットの好中球ではERK1とERK2が確認されたが、ニワトリの好異球ではERK1は検出されなかった。この結果は、ニワトリの食細胞には哺乳類に見られるERK1が存在しないことを示しており、鳥類と哺乳類間の相違の可能性を示唆している。PMAやLPSによって誘導される好異球のERKリン酸化は細胞内のカルシウムプールからのカルシウムイオンの動員による細胞内カルシウムイオンの上昇に依存していることが示された。LPSによるERKのリン酸化はLY294002によって影響されなかったことからPI3Kに依存していないことが示された。哺乳類の細胞におけるERKリン酸化にはPI3Kの関与が報告されていることから、この結果はニワトリあるいは鳥類の細胞のERKリン酸化経路の特殊性を示すものかもしれない。一方、U73122とGF109203Xを用いた実験から、好異球のERKリン酸化にはPLCとPKCの活性化が必要であることが示された。

## 論文審査結果の要旨

本論文は種々の細胞機能の開始に関与することが知られている細胞内カルシウムイオンの動態をニワトリの白血球において追究した研究の成果に関するものである。哺乳類の白血球では、これまでに細胞内カルシウムイオンと細胞活性の関連に関する多くの報告がなされており、この分野ではかなりの知見が蓄積されているが、鳥類の白血球に関する報告はほとんどなく鳥類の白血球機能の解明は遅れていることからニワトリの白血球を用いて、細胞活性と細胞内カルシウムイオンの関係、ならびに細胞内シグナル伝達系における重要な酵素の一つであるERKの活性化と細胞内カルシウムイオンとの関連を明らかにして鳥類の白血球におけるカルシウムイオンの意義をあきらかにするとともに哺乳類の一種であるラットにおける結果と比較して比較生理学的な知見を得た。ニワトリのリンパ球では、マイトジェン誘導性の活性化による細胞内カルシウムイオン上昇が認められた。この上昇の程度はマイトジェン（PHAとConA）間で異なり、同程度の上昇が見られたラットのリンパ球との間で相違した。マイトジェンによる細胞内カルシウムイオン上昇と細胞増殖活性の間には、特に高濃度で一致が見られず、ニワトリリンパ球では、マイトジェン誘導性の細胞内カルシウムイオン上昇は増殖活性以外の機能に関係していると考えられた。ニワトリ好異球では哺乳類の細胞で見られるERK1が検出されず、ERK2のみが認められたことから鳥類の細胞ではERK1が存在しないことが示唆された。好異球ではERKの活性化関与するカルシウムイオンは細胞外からではなく細胞内カルシウムイオンプールから動員されることが示された。好異球では、PI3KはERKの活性化に関係していないことが示され、哺乳類の細胞との間の差異が示された。

以上の結果は、鳥類のリンパ球活性化におけるカルシウムイオン関与を始めて明らかにしたこと、哺乳類と鳥類のリンパ球では活性化機構に違いがある可能性を指摘したこと、哺乳類と鳥類の細胞におけるERK1の有無を明らかにしたこと、ERK活性化に関与するカルシウムイオンの由来を明らかにしたことなど多くの新しい知見を含んでおり、本論文は博士の学位（学術）の授与にふさわしい内容であると考えられる。