

氏 名（国籍）	神 谷 誠 治 （茨城県）
学 位 の 種 類	博士（農学）
学 位 記 番 号	農博甲第84号
学 位 授 与 年 月 日	平成9年3月14日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	家禽におけるホルモン誘導性アポトーシス機構 に関する生理化学的研究
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 中 村 孝 雄 副査 岐 阜 大 学 教 授 木 村 正 雄 副査 静 岡 大 学 教 授 森 誠 副査 信 州 大 学 教 授 太 田 克 明 副査 岐 阜 大 学 助 教 授 土 井 守

論 文 の 内 容 の 要 旨

生物は様々な外的変化に対して自らを適応させるために、生体レベルや細胞レベルにおいて常に反応し、恒常性を保っている。家禽を断水や断食、高温や低温の温度環境ならびに病原菌による攻撃などのストレス下におくと、ストレス応答の結果として血漿中のコルチコステロン量が増加し、著しい成長遅延や産卵率の低下などの影響が現れる。一方、ニワトリにコルチコステロンを投与すると、腹腔内脂肪および肝脂肪の蓄積増加などを誘発する。さらに、胸腺、脾臓ならびにファブリシウス囊などの免疫系臓器の退縮が起こり抗病性が低下することが知られている。このグルココルチコイド（GC）によるリンパ系器官の萎縮には、細胞内在の遺伝子により制御されるアポトーシスという細胞死滅機構が関与している。アポトーシス機構に関する研究は、哺乳類では報告されているが、鳥類ではほとんど報告されていない。

本論文は、かかる背景の下にニワトリの主要なリンパ器官であるファブリシウス囊にGC誘導性のアポトーシスを発現させ、その形態を調べるとともに、その作用機構について生理化学的な検討を加えたもので、以下の3章に分けて記述されている。

第1章では、ニワトリヒナを供試し、GCの誘導体であるデキサメタゾン（Dex）を投与してファブリシウス囊にアポトーシスを惹起させ、一方で伝染性ウイルス（IBDV）を感染させて変性壊死（ネクローシス）させた組織を対比させて、組織変化を光学顕微

鏡と走査型電子顕微鏡により観察している。その結果、Dex投与により、組織は萎縮し、リンパ濾胞は退行性変化を示すとともに、濾胞内リンパ細胞は死滅して減数した。また、リンパ細胞はリンパ濾胞内の皮質部よりも髓質部で顕著に減少し、アポトーシスに特有な細胞の萎縮や核の凝縮が現れ、隣接する細胞間の間隙が拡大した。さらに、電子顕微鏡で詳細に観察したところ、髓質部では細網細胞系も消失し、リンパ細胞間の結合が切断されて、アポトーシス特有な半円形のクロマチンの凝縮像を観察している。これに対して、ウイルス感染で変性壊死した組織は、リンパ細胞は皮質や髓質の区別なく一様に死滅しており、組織全般に炎症が認められている。以上の観察結果より、GC投与によるファブリシウス嚢の萎縮には、ネクローシスとは異なったアポトーシスによるリンパ細胞の死滅機構が関与していることを明らかにしている。さらに、リンパ濾胞髓質部の未成熟なリンパ細胞は皮質部の成熟リンパ細胞と比較して、GCに対する感受性が高く、GC誘導性のアポトーシスの発現がより顕著であることを認めている。

第2章では、同様の試料より核DNAを電気泳動により分析した結果、DNAラダーを観察し、アポトーシスが発現していることを生化学的に検証した。つまり、DNAラダーはGC投与後1時間で観察され、その後12時間までは時間の経過とともに明瞭になっていた。しかし、24時間経過後には、発現細胞数の減少により次第に消滅することを明らかにしている。さらに、免疫組織化学的手法を用いて、アポトーシスの組織内での発現部位と発現形態を検討した結果、リンパ濾胞髓質部でアポトーシスの発現を示す陽性細胞が増加することを認めた。このことを第1章の結果と併せて考察し、髓質部の未成熟なリンパ細胞はGCに対して感受性が高く、アポトーシスの発現がより顕著であると結論している。髓質部の陽性細胞を詳細に観察すると、核周囲部にCの字状の強い染色性を認めた。しかしウイルス感染による変性壊死を引き起こした組織には認められず、アポトーシスとネクローシスによるファブリシウス嚢のリンパ細胞の死滅形態や死滅機構には明確な相違のあることを明らかにしている。

第3章では、GCを投与することによってファブリシウス嚢を構成する蛋白質がどのように変化するかをSDS-PAGE法により検索している。その結果、5種類の蛋白質（分子量：88,000, 31,000, 26,000, 25,000 および 19,000）が減少し、一方3種類（分子量：80,000, 67,000, および 28,000）の蛋白質が増加していることを認めた。これらの蛋白質は、アポトーシスを誘発する作用あるいは抑制するために発現したアポトーシスの誘導遺伝子の産物であることを推論している。以上の成績を踏まえて、GC投与1時間後に採取したリンパ組織からmRNAを抽出し、これをもとに翻訳された蛋白質をSDS-PAGE電気泳動により分析した結果、分子量 約 85,000 および 20,000の2種類の蛋白質がGC投与により消失した。この結果より、この2種類の蛋白質はアポトーシスを抑制する働きを持つ可能性があるものと考えられる。GC投与後のユビキチンレベルを、蛍光免疫測定法により調べ、アポトーシス機構におけるユビキチンの関与について検討した結果、GC投与後ユビキチンは一過性の増加を示し、その後急激に減少した。このユビキチンの増加は、アポトーシスの発現過程で重要な役割を果たすDNAの断片化に関与し、また、その減少はリンパ細胞内の恒常性の維持機能を低下させ、アポトーシスによる細胞の死滅を助長するものと推論している。

審 査 結 果 の 要 旨

学位申請者、神谷誠治の学位論文【家禽におけるホルモン誘導性アポトーシス機構に関する生理化学的研究】審査が平成9年1月27日、14時30分より、岐阜大学大学院連合農学研究科において実施された。初めに公開論文発表会が行なわれ、引き続いて質疑応答（口頭試問）が行なわれた。その後、学位論文審査委員会が開催された。

以下にその論文内容について審査結果の概要およびその評価を記す。

I. 研究の背景と目的：

アポトーシスとは〈制御されて起こる細胞死〉である。この現象は多様な生物種に共通し、その進化の過程でそれぞれの生物が獲得した重要な機構であり、細胞分裂や分化と表裏一体となって生命現象の多面的制御に関与している。

本研究は、家禽に強度のストレスを与えると胸腺やファブリシウス嚢など特有の免疫系組織が萎縮して、発育や抗病性が低下する。このリンパ系器官の萎縮には、細胞内在の遺伝子により制御されているアポトーシス機構が関与しているとの考えのもとに進められたものであり、審査委員会はこの研究に優れた独創性を見い出すことができると判定した。

II. 研究成果と審査概要：

本論文は1～3章で構成されており、第1章では、ストレス関連のグルココルチコイド誘発のアポトーシス組織と、伝染性ウイルス感染によるネクローシスの組織を対比させて、組織の変化の状態を光学顕微鏡と走査型電子顕微鏡により観察し、貴重な知見を得ている。さらに、リンパ濾胞髄質部の未成熟なリンパ細胞は皮質部の成熟リンパ細胞と比較して、ホルモンに対する感受性が高く、アポトーシスの発現が顕著であることを見いだした。この知見に対して、供試したニワトリのファブリシウス嚢において、髄質部と皮質部の機能面での役割の違いについて活発な質疑が出され、申請者は適格な応答をした。第2章では、試料中の核DNAを電気泳動により分析することにより、DNAラダー（核の断片化）を経時的に観察し、アポトーシスが発現していることを生化学的に検証している。その結果、約180bpの倍数の位置に梯子状に現れるDNAラダーはホルモン投与後1時間で観察され、その後12時間まで時間の経過とともに反応が進行するが、24時間後には発現細胞数の減少により次第に消滅することを明らかにした。この実験で、免疫化学的手法を用いてアポトーシスの発現部位とその形態を詳細に検討した結果、髄質部の陽性細胞の核周囲部にCの字状の強い染色域を認め、ネクローシスによるリンパ細胞の死滅形態やその機構に明確な相違のあることが判明した。この点について、ラットなどの他種との比較や、他臓器との違いについて意見の交換が行なわれ、今後の課題として貴重な指摘を受けている。第3章では、ホルモン投与によってストレスを受けたリンパ組織中の蛋白質がどのような変化をもたらすかをSDS-PAGE法により検索している。つまり、ホルモン投与1時間後に採取したリンパ組織からmRNAを抽出し、これを鋳型として翻訳された蛋白質を分析した結果、分子量：約85,000および

20,000 の 2 種類の蛋白質が、ホルモン投与により消失した。この結果より、これらの蛋白質はアポトーシスを抑制する働きをもつ可能性があるものと考えられる。また、関連してストレス負荷に激しく応答するユビキチン（典型的な熱ショック蛋白質）を蛍光測定法より調べた結果、ホルモン投与後に一過性の増加を示し、その後急激に減少することを認めている。このユビキチンの増加はアポトーシスの発現過程で DNA の断片化に関与し、また減少はリンパ細胞内の恒常性の維持機能を低下させ、細胞の死滅を助長させるものと推論している。すなわち、リンパ組織にはストレスによって生じた異常蛋白質を、代謝エネルギーを消費してまでも急速に排除しようとする防御機構が作動しており、その中心的な役割を担っているのがユビキチンであるとの考えを示した。これに対して、ユビキチンの測定法が充分でなく、また、ユビキチン／プロテアソーム依存性の蛋白質分解システムについての確証が得られていないので、本研究のデータからは断定することは早計であるとの指導がなされた。その他、単位の記述、一部表現の修正を指摘された。

以上の論文構成や研究内容について慎重審議をした結果、家禽類の生産性や抗病性の解明に結びつく貴重な知見であり、学術的にも価値のあるものと評価された。その結果、審査委員会全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の博士（農学）の学位論文として十分価値あるものと判定した。

Ⅲ. 基礎となる学術論文の発表雑誌名：

- ① ニワトリヒナのファブリシウス嚢におけるグルコルチコイド誘導性のアポトーシスに関する免疫組織化学的検討。神谷 誠治、小野 雅章、土井 守、中村 孝雄。 家禽会誌、33（6）、366～370、1996。
- ② Contribution of ubiquitin to glucocorticoid-induced apoptosis in the bursa of fabricius. Kamiya, S., Doi, O., Nakamatsu, F., Akayama, T. and Nakamura, T. Anim. Sci. Technol. 68(1) : 13 - 17, 1997.

【参考】

- ③ Novel lighting systems stimulating gonadal development and expediting sexual maturity of male and female chickens. Umeda, I., Hayakawa, H., Kamiya, S. and Tanabe, Y. AJAS 6(1) : 127 - 132, 1992.