

博士（農学）渡邊市紀子

学位論文題名

Studies of Bovine Lactoperoxidase : Comparison between Natural and Recombinant Lactoperoxidase

（ウシラクトペルオキシダーゼの研究：ラクトペルオキシダーゼ
とその遺伝子組換え体の比較）

学位論文内容の要旨

本論文は図32、表13を含む、6章から構成され合計129ページからなる英論文で、別に5編の参考論文が添えられている。なお、第1章は「序論」であり、以下にまとめた研究の背景と目的について記述し、第6章は「総合考察」である。

哺乳類の分泌する乳汁には、新生児の成長に必要な多様な成分が含まれている。それらは栄養的な意義の大きいもののに他に、もっぱら感染防御機能を担うタンパク質成分も多く含まれている。後者は異物から自身を防御すると考えられている生体防御性の乳タンパク質であり、免疫グロブリン、ラクトペルオキシダーゼ、ラクトフェリン、リゾチームなどが相当する。これらは特異的あるいは非特異的なメカニズムによって、直接的に細菌やウィルスに対する殺菌作用を示したり、あるいは生体の免疫機能を何らかの形で増強することによって間接的に機能するなど、様々な形で感染防御に寄与している。本研究では特にラクトペルオキシダーゼの構造を詳細に調べる一手段として、組換え体を作成し、その生化学的な性質を調べた。

(1) ラクトペルオキシダーゼ遺伝子のクローニング

屠殺直後のウシから乳腺細胞を含む組織を切り出し、常法によりフェノール・チオシアニ酸グアニジン溶液中で破碎した後、クロロホルム抽出によってタンパク質を除き、全RNAからmRNA画分を得、さらに逆転写法によって1本鎖cDNAを得た。次いで既知のアミノ酸配列に従って合成したプライマーを用い、ラクトペルオキシダーゼをコードする塩基配列を有するcDNAをPCR法で伸長・増幅させた。さらにTAクローニングを行なった後、ベクターの大腸菌への導入、cDNAプラスミドの調製を得て目的のクローンを得た。

(2) ラクトペルオキシダーゼ組換え体の調製

ラクトペルオキシダーゼをコードするcDNAを、動物細胞系発現ベクターpcDNA3に挿入し、次いでエレクトロポーレーション法によってCHO細胞に導入して、組換えラクトペルオキシダーゼを分泌させた。細胞培養上清中に分泌された組換えラクトペルオキシダーゼは、陽イオンおよび陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。

なお、16リットルの培養液から13mgの組換えラクトペルオキシダーゼが得られた。また、組換え体作成に先立ち、ラクトペルオキシダーゼの検出・同定のために、ラクトペルオキシダーゼに対するポリクローナルおよびモノクローナル抗体を作成し、かつそれらのエピトープの詳細も調べた。

(3)組換えラクトペルオキシダーゼの生化学的性質

精製された組換えラクトペルオキシダーゼは緑色を呈しており、乳汁由来のものと同じくペルオキシダーゼ活性も認められた。得られた組換えラクトペルオキシダーゼをSDS-電気泳動法で分析したところ、移動度の異なる2種のタンパク質が認められた。一方、両者のN-末端アミノ酸配列が同じであったことから、糖鎖の不均一性による可能性が大であると推定され、グリコシダーゼおよびレクチンを用いた糖鎖成分分析を行なった。その結果、組換えラクトペルオキシダーゼの糖鎖は、乳汁由来のものが高マンノース型であるのとは異なり複合型であることが判明した。さらに、N-末端アミノ酸配列を乳汁由来ラクトペルオキシダーゼと比較したところ、N-末端側が15~20残基分長いことが確認された。このことからラクトペルオキシダーゼが乳汁中に分泌される際、シグナルペプチドよりさらにC-末端側でペプチドの開裂が生じていることが明らかになった。また二次構造を円偏光二色性スペクトルの測定を行って比較し、 α -ヘリックス18.6%、 β -構造50%、不規則構造28%なる値が得られ、乳汁由来ラクトペルオキシダーゼとほとんど差が無いことが明かとなった。

(4)ヘム近傍構造解析へのアプローチ

ラクトペルオキシダーゼの示す酵素活性の活性部位であると考えられているヘム近傍の構造を調べるために、ヘムに由来する可視部の吸収スペクトルを測定したところ、組換えラクトペルオキシダーゼは乳汁由来のものと同じく、413 nmに吸収ピークを示した。また、X-線結晶解析によりその詳細な立体構造が解明され、かつヘム周辺の構造が解明されているミエロペルオキシダーゼと比較して、ウシラクトペルオキシダーゼのヘム結合に関与していると考えられるアミノ酸残基を置換した変異体をCOS細胞を用いて調製した。すなわち、Gln376をMetに置換した変異体を作成したが、ヘム結合性に変化は見られなかった。

学位論文審査の要旨

主査教授 島崎敬一
副査教授 近藤敬治
副査教授 三河勝彦
副査教授 三上哲夫

学位論文題名

Studies of Bovine Lactoperoxidase : Comparison between Natural and Recombinant Lactoperoxidase

(ウシラクトペルオキシダーゼの研究：ラクトペルオキシダーゼ
とその遺伝子組換え体の比較)

本論文は図32、表13を含む、129ページからなる英文で、別に5編の参考論文が添えられている。

哺乳類の分泌する乳汁には、新生児の成長に必要な多様な成分が含まれている。それらは栄養的な意義の大きいもののに他に、もっぱら感染防御機能を担う成分も多く含まれている。後者は異物から自身を防御すると考えられている生体防御性のタンパク質で、免疫グロブリン、ラクトペルオキシダーゼ、ラクトフェリン、リゾチームなどが相当する。これらのタンパク質は特異的あるいは非特異的なメカニズムによって、直接的に細菌やウィルスに対する殺菌作用を示したり、あるいは生体の免疫機能を何らかの形で増強することによって間接的に機能するなど、様々な形で感染防御に寄与している。本研究では特にラクトペルオキシダーゼの構造を詳細に調べる一手段として、組換え体を作成し、その生化学的な性質を調べた。

(1) ラクトペルオキシダーゼ遺伝子のクローニング

屠殺直後のウシから乳腺細胞を含む組織を切り出し、フェノール・チオシアニ酸グアニジン溶液中で破碎した後、クロロホルム抽出によってタンパク質を除き、全RNAからmRNAを精製した後、さらに1本鎖cDNAを得た。次いで既知のアミノ酸配列に従って合成したプライマーを用い、ラクトペルオキシダーゼをコードする塩基配列を有するcDNAをPCR法で伸長・増幅させた。さらにTAクローニングを行なって目的のクローンを得た。

(2) ラクトペルオキシダーゼ組換え体の調製

ラクトペルオキシダーゼをコードするcDNAを、動物細胞系発現ベクターであるpcDNA3に挿入し、次いでエレクトロポーレーション法によってCHO細胞に導入して、組換えラクトペルオキシダーゼを分泌させた。細胞培養上清中に分泌された組換えラクトペルオキシダーゼは、陽イオンおよび陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。なお、16リットルの培養液から13mgの組換えラクトペルオキシダーゼが得られた。また、組換え体作成に先立ち、ラクトペルオキシダーゼの検出・同定のために、ラクトペルオキシダーゼに対するポリクローナルおよびモノクローナル抗体を作成した。

(3)組換えラクトペルオキシダーゼの生化学的性質

精製された組換えラクトペルオキシダーゼは緑色を呈しており、乳汁由来のものと同じくペルオキシダーゼ活性も認められた。得られた組換えラクトペルオキシダーゼをSDS-電気泳動法で分析したところ、移動度の異なる2種のタンパク質が認められた。両者のN-末端アミノ酸配列が同じであったことから、糖鎖の不均一性による可能性が大であると推定され、グリコシダーゼおよびレクチンを用いた糖鎖成分分析を行なった。その結果、組換えラクトペルオキシダーゼの糖鎖は、乳汁由来のものが高マンノース型であるのとは異なり複合型であることが分かった。さらに、N-末端アミノ酸配列を乳汁由来ラクトペルオキシダーゼと比較すると、15~20残基、N-末端側が長かった。このことからラクトペルオキシダーゼが乳汁中に分泌される際、シグナルペプチドよりさらにC-末端側でペプチドの開裂が生じていることが明らかになった。また二次構造も、 α -ヘリックス18.6%、 β -構造50%、不規則構造28%と、乳汁由来ラクトペルオキシダーゼとほとんど差が無いことが分かった。

(4)ヘム近傍構造解析へのアプローチ

ヘムに由来する可視部の吸収スペクトルを測定したところ、組換えラクトペルオキシダーゼは乳汁由来のものと同じく、413 nmに吸収ピークを示した。また、X-線結晶解析によりその詳細な立体構造が解明され、かつヘム周辺の構造が解明されているミエロペルオキシダーゼと比較して、ウシラクトペルオキシダーゼのヘム結合に関与していると考えられるアミノ酸残基を置換した変異体をCOS細胞を用いて調製した。すなわち、Gln376をMetに置換した変異体を作成したが、ヘム結合性に変化は見られなかった。

以上の研究成果は、ラクトペルオキシダーゼの構造・機能について多くの新知見を見出し、また学術上も高く評価されている。よって審査員一同は、渡邊市紀子が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。