

学 位 論 文 題 名

組換えラクトフェリンNローブの作製と
その特性に関する研究

学位論文内容の要旨

ラクトフェリンはトランスフェリンファミリーに属する糖蛋白質であり、哺乳動物の乳汁などの外分泌液、および血液にも含まれている。最も良く知られたラクトフェリンの機能は、幅広い種類の微生物に対する抗菌活性である。また、ラクトフェリンは生体内では免疫機構のメディエーターとして機能しており、生体防御機構の中で重要な役割を果たす多機能性蛋白質であると考えられている。ラクトフェリンは新生児の発育に不可欠な母乳、および古くから食品として利用されてきた牛、ヤギ、羊、馬、ラクダなどの乳汁に含まれる物質であり、ヒトが摂取するに際し極めて安全であると考えられる。ラクトフェリンの持つ生理機能をより高度に利用するためには、その機能を発揮するのに必要な部位を特定し、蛋白質の構造と機能との関係を明らかにする必要がある。ラクトフェリンは構造上類似した二つの「ローブ」からなるが、その生理機能の多くがN末端側のローブ（Nローブ）上にあると考えられている。C末端側のローブ（Cローブ）は蛋白質分解酵素処理および各種クロマトグラフィー操作によって分離されているが、Nローブには蛋白質分解酵素に対して感受性の高い部位が存在するため、これまで分離に成功した例はなかった。そこで本研究では、組換えラクトフェリンと乳汁から得られた天然のラクトフェリンについて、それらの構造上、および機能上の相違を比較・検討することを目的として、ウシラクトフェリン遺伝子をクローニングし、組換えラクトフェリンNローブを作製した。

まず、ウシ乳腺細胞から mRNA を分離し、cDNA を合成してラクトフェリン N ローブ遺伝子、および C ローブ遺伝子をクローニングした。次いでこれらを用いてラクトフェリン全長の遺伝子を作製した。このラクトフェリン遺伝子の塩基配列を確認したところ、数箇所に変異が見られたものの、これまでに報告された配列と基本的に一致した。次いで大腸菌を宿主として組換えラクトフェリン N ローブを作製したが、発現した組換え蛋白質は宿主大腸菌の菌体内で不溶性の封入体となり、生理活性の評価に使用できる形で可溶化して回収することはできなかった。そこで昆虫細胞系で組換えラクトフェリン N ローブを作製

することとした。その結果、SDS-PAGEにおいて移動度の異なる3種類(約43、38、および35 kDa)の組換え蛋白質が、抗ラクトフェリン抗血清を用いたウエスタンブロットによって確認され、そのうち分子量43 kDaのものは培養上清中に分泌された。糖鎖切断酵素を用いて糖鎖を解析した結果、分泌型の組換えラクトフェリンNローブは糖鎖を持たないと考えられた。さらに、宿主として用いた昆虫細胞の破碎液によって分泌型組換えラクトフェリンNローブが分解されることから、宿主細胞中で合成された組換え蛋白質が分解されることによって分子量の異なる組換え産物を生じていると考えられた。また、ラクトフェリンの精製に多用されている固定化ヘパリンカラムを用いて、培養上清中から組換えラクトフェリンNローブを粗精製することができたが、透析によって脱塩すると可溶性の組換え蛋白質の収量は激減した。組換えラクトフェリンNローブはヘパリンカラムに吸着し、高塩濃度で溶出した数画分に存在することが抗ラクトフェリン抗体との反応によって確認された。しかし、大腸菌O111を指標菌とし、液体培地で培養した際の濁度の増加を測定するマイクロプレートアッセイ法によって組換えラクトフェリンNローブの抗菌活性を測定したところ、大腸菌O111に対する抗菌活性が認められたのは固定化ヘパリンカラムを用いて部分精製した画分の一部のみであった。これらのことから、昆虫細胞系で作製された分泌型の組換えラクトフェリンNローブの立体構造は、天然のラクトフェリンとは幾分異なると考えられた。さらに、ソラマメを宿主とする植物ウイルス系を用いて組換えウイルスを作製し、そのウイルスを感染させたソラマメで組換えラクトフェリンNローブを発現させることを試みた。その結果、ウイルスに感染したソラマメ葉でNローブが産生されていることが、抗ラクトフェリンモノクローナル抗体を用いて確認された。ソラマメの葉で発現した組換えラクトフェリンNローブはリン酸緩衝化生理食塩水によって抽出することができ、その分子量は約50 kDaと推測された。植物で作製された組換えラクトフェリンNローブは翻訳後修飾、特に糖鎖の付加位置やその構造などが天然のものとは異なると考えられる。しかし、ペプチド鎖由来のラクトフェリンの各種の機能は保持されていることが期待される。

天然のラクトフェリンは経口的に摂取された場合でも、生体内でさまざまな機能を発揮することが知られており、食用植物で発現したラクトフェリンを直接摂取してその機能を家畜の感染症の予防・治療などに利用することも検討されている。本研究の成果は、乳汁に含まれる多機能性蛋白質であるラクトフェリンの機能発現の機構を解明する有力な手段を提供するとともに、植物や培養細胞における有用な組換え蛋白質の発現と組換え産物の利用を実現するために必須な基礎的データとなるものである。

学位論文審査の要旨

主査	教授	島崎敬一
副査	教授	服部昭仁
副査	教授	上田一郎
副査	助教授	玖村朗人

学位論文題名

組換えラクトフェリンNローブの作製と その特性に関する研究

本論文は図 26、表 6、引用文献 116 を含む 4 章、65 ページからなり、別に参考論文 2 編が添えられている。

ラクトフェリンはトランスフェリンファミリーに属する金属結合性の糖蛋白質であり、哺乳動物の乳汁その他の外分泌液、および血液にも含まれている。最も良く知られたラクトフェリンの作用は、幅広い種類の微生物に対する抗菌活性であり、かつその作用は選択的である。また、ラクトフェリンは生体内では免疫系のメディエーターとして機能しており、生体防御機構の中で重要な役割を果たす多機能性蛋白質でもある。ラクトフェリンは新生児の発育に不可欠な母乳、および古くから食品として利用されてきたウシ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ラクダなどの乳汁に含まれる物質であり、人間が摂取するに際し極めて安全であると考えられる。ラクトフェリンの持つ生理機能をより高度に利用するためには、その機能を発揮するのに必要な部位を特定し、蛋白質の構造と機能との関係を明らかにする必要がある。ラクトフェリンは構造上類似した二つのローブから構成されているが、その機能の多くが N 末端側のローブ (N ローブ) 上にあると考えられている。C 末端側のローブ (C ローブ) は蛋白質分解酵素処理および各種クロマトグラフィー操作によって分離されるが、N ローブには蛋白質分解酵素に対して感受性の高い部位が存在するため、これまで分離に成功した例はなかった。そこで本研究では、組換えラクトフェリンと乳汁から得られた天然のラクトフェリンについて、それらの構造上、および機能上の相違を比較・検討することを目的として、ウシラクトフェリン遺伝

子をクローニングし、組換えラクトフェリン N ロープを作製した。

まず、ウシ乳腺細胞から mRNA を分離し、cDNA を合成してラクトフェリン遺伝子をクローニングした。次いで大腸菌を宿主として組換えラクトフェリン N ロープを作製したが、発現した組換え蛋白質は宿主大腸菌の菌体内で不溶性の封入体となり、生理活性の評価に使用できる十分な量を得ることはできなかった。そこで昆虫細胞系で組換えラクトフェリン N ロープを作製した。その結果、SDS-PAGE において移動度の異なる 3 種類の組換え蛋白質が、抗ラクトフェリン抗血清を用いたウエスタンブロットによって確認され、そのうち分子量 43 kDa のものが培養上清中に分泌された。糖鎖切断酵素を用いて糖鎖を解析した結果、分泌型の組換えラクトフェリン N ロープは糖鎖を持たないと考えられた。さらに、宿主として用いた昆虫細胞の破碎液によって分泌型組換えラクトフェリン N ロープが分解されることから、宿主細胞中で合成された組換え蛋白質が分解されることによって分子量の異なる組換え産物を生じている結果も示唆された。また、ヘパリンアフィニティーカラムを用いて、培養上清中から組換えラクトフェリン N ロープを部分精製することができた。得られた組換えラクトフェリン N ロープの抗菌活性を大腸菌 O111 を指標菌に用いて測定したところ、一部の画分に抗菌活性が認められた。さらに、ソラマメを宿主とする植物ウイルス系を用いて組換えウイルスを作製し、そのウイルスを感染させたソラマメで組換えラクトフェリン N ロープを発現させることも試みた。その結果、ウイルスに感染したソラマメ葉で N ロープが産生されていることが、抗ラクトフェリンモノクローナル抗体を用いて確認された。ソラマメの葉で発現した組換えラクトフェリン N ロープはリン酸緩衝化生理食塩水によって抽出することができ、その分子量は約 50 kDa と推測された。

ラクトフェリンは経口的に摂取された場合でも、生体内でさまざまな機能を発揮することが知られており、その機能を家畜だけでなく人間の感染症の予防・治療などに利用することも検討されている。本研究の成果は、乳汁に含まれる多機能性蛋白質であるラクトフェリンの機能発現の機構を解明する有力な手段を提供するとともに、培養細胞や植物における有用な組換え蛋白質の発現と応用を実現するために役立つものである。

よって審査員一同は、中村一郎が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有すると認めた。