

論文の内容の要旨

論文題名 「ニワトリ卵白中の新規タンパク質の構造と機能に関する研究」

学位申請者 柳 華英

キーワード： ①EW135 ②ニワトリ卵白タンパク質 ③カルシウム依存的結合 ④グループB スカベンジャー受容体システインリッチドメイン ⑤ゲノム配列

ニワトリの卵白には150種類以上のタンパク質が存在し、機能が明らかになっている卵白タンパク質の多くは生体防御に関与している。本論文は、ニワトリ卵白より発見されたグループBスカベンジャー受容体システインリッチ (SRCR) ドメインスーパーファミリーに属する新規タンパク質 (EW135)の構造と機能に関する研究である。

第一章は緒論であり、ニワトリの卵の構造、卵白タンパク質の種類と機能、およびSRCRドメインスーパーファミリーについて概説した。また、本研究の背景、目的、概要について述べた。

第二章では、EW135の二つの精製法について検討した。第一の精製法では、ニワトリ卵白の希釈液を出発材料にして、PEG沈殿とイオン交換クロマトグラフィーによりEW135を単離した。この精製の途中でPEG沈殿を溶解した液を静置すると新たに沈殿が生じ、これにEDTAを添加すると上清にEW135が回収された。この結果より、EW135は沈殿物中でCa²⁺依存的に卵白成分と結合しており、EDTAにより遊離したと考えられた。このことは、沈殿を高濃度のNaCl水溶液により溶解して得られたEW135を含む上清をCa²⁺存在下ELISAプレートにコート後、EDTA処理するとEW135が一部遊離したことから確かめられた。次に、EW135がCa²⁺依存的に結合している卵白成分を明らかにする目的で、上記のEW135を含む上清を抗EW135抗体-Sepharoseカラムに添加後、EDTAを含む緩衝液を流したところ、EW135が溶出したことからEW135同士がCa²⁺依存的に複合体を形成していることが分かった。EW135の第二の精製方法では、ニワトリ卵白の希釈液をCa²⁺存在下、抗EW135抗体-Sepharoseカラムに添加後、EDTAを含む緩衝液を流した後で、グリシン-HCl緩衝液で溶出を行った。その結果、グリシン-HCl緩衝液でEW135が溶出した。一方、EDTAを含む緩衝液ではEW135は溶出されなかった。このことから、EW135は卵白中ではEW135同士がCa²⁺依存的に複合体を形成して存在しているのではなく、第一の精製法の過程でEW135同士が会合したものと推定された。

第三章では、EW135の構造解析を行った。精製したEW135の部分アミノ酸配列の解析から、EW135がグループB SRCRドメインスーパーファミリーに属するタンパク質である可能性が高いことが分かった。また、データベースの検索の結果、類似のアミノ酸配列を持つタンパク質(XP_424435)が存在することが判明した。EW135の一次構造を明らかにする目的で、cDNAクローニングを以下のように行った。EW135の部分アミノ酸配列とXP_424435をコードする塩基配列を基にプライマーを設計し、ニワトリ輸卵管のcDNAを鋳型にしてPCRを行った。その後、得られたPCR産物をクローニングベクターに導入し、クローニングを行った。その結果、EW135cDNAの内部配列が決定された。更に、3' RACE法と5' 側の解析によりEW135cDNAの全塩基配列と、それから推定される一次構造(アミノ酸配列)が明らかになった。EW135は、グループB SRCRドメインのみが9回タンデムに繰り返すユニークな構造を持つことが分かった。また、EW135遺伝子のエクソン-イントロン構造を解析したところ、グループB SRCRドメインスーパーファミリーに一般的に見られるように、1つのエクソンが1つのSRCRドメインをコードしていることが明らかになった。EW135のメッセージの組織発現を調べる目的でRT-PCRを行ったところ、調べた11種類の組織の中では、EW135は輸卵管のみで発現することが判明した。また、EW135に類似構造のタンパク質が肝臓で発現している可能性も明らかになった。

第四章では、EW135の黄色ブドウ球菌とその構成成分であるプロテインAに対する結合性について検討した。ELISAプレートに黄色ブドウ球菌をコートしEW135を反応させる系と、ELISAプレートにEW135をコートし、プロテインAを反応させる系を用いて検討したところ、いずれの系においてもCa²⁺依存的な結合が見られた。グループB SRCRドメインスーパーファミリーに属するCD5, CD6, SP α /AIM, CD163, DMBT1/gp340/SAGなどが自然免疫に働いているが、EW135も病原体に結合し、卵の生体防御に働いている可能性があることが判明した。

第五章では各章の内容を総括すると共に、本研究の意義と展望について以下のように述べた。ニワトリ卵白から新規タンパク質を単離・同定した例は最近では無いことから、ニワトリの卵白研究における本研究の意義は大きいと考えられる。また、EW135がグループBのSRCRドメインスーパーファミリーに属する新規タンパク質であることを明らかにしたこと、また肝臓で作られるEW135と類似のタンパク質の可能性を推定したが、その可能性を検討することによってグループBのSRCRドメインスーパーファミリーの研究において新たな展開をもたらすと考えられる。また、黄色ブドウ球菌に結合することにより生体防御の機能を有しているならば、EW135の実用的な応用につながることも期待される。