

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 奈良井 朝 子

腸管上皮の細胞間隙を物質が受動拡散的に透過する経路は、水溶性低分子物質の吸収経路として重要である。ここでは、細胞間接着装置のtight junction (TJ) が周囲の環境や刺激に応答して細胞間隙の物質透過性を制御しているので、TJの機能が栄養素や生理活性成分の吸収・透過に及ぼす影響は多大なものであると考えられる。一方、腸管上皮細胞層のTJを調節しうる因子が、食品由来成分そのものの中からこれまでに幾つか見い出されており、それらの発見と作用機構の解明は、薬物吸収促進剤の開発分野においても重要な意義があるものとして注目されている。本論文は、腸管上皮のTJ経路を介した吸収・透過を調節しうる新規な食品由来成分の探索とその作用に関する解析を試みたもので6章より構成されている。

第一章では、小腸上皮のモデル系として頻用されるヒト結腸癌由来の株化細胞Caco-2を単層培養し、その管腔側から試料を添加して、細胞間隙透過性の指標となる経上皮電気抵抗 (TEER) の変化を引き起こす成分を検索した。その結果、エノキタケ水粗抽出試料にCaco-2細胞層のTEERを低下させるタンパク質成分が含まれていることを見い出した。毒性試験や蛍光マーカーの透過性検定によって、TEERの低下が細胞膜損傷や細胞剥離によるものではなく、細胞間隙の拡張を反映していることが明らかになった。

第二章ではエノキタケ由来のTEER低下活性タンパク質 (TDP) の精製を行ない、SDS-PAGE上、約31kDaの活性タンパク質を得た。精製物はNative PAGEによって、N末端アミノ酸配列が共通な3つの活性タンパク質に分離された。3つのTDPはリン酸化/糖鎖修飾によらず、内部配列あるいはC末端の長さが異なるものと予想された。

第三章では、TDPのN末端アミノ酸配列を基にエノキタケのmRNAからRT-PCR法によるTDPのcDNAクローニングを行なった。獲得したTDP cDNAは、開始Metを除いて271アミノ酸からなる推定分子量30,095のタンパク質をコードしていた。ゲノムサザン分析とノーザン分析の結果から、TDPは単一遺伝子にコードされており、第二章で得られた複数のTDPは翻訳後のC末端プロセッシングか精製途中の分解によって生じている可能性が示唆された。データベース上にTDPの一次構造と相同性を示すものは見い出されなかったため、TEER低下活性を持つ新規タンパク質として登録した。しかし、TDPcDNAは同時期にクローニングされたエノキタケ由来の溶血性膜孔形成タンパク質flammutoxin (FTX) のcDNAと同じであり、精製したTDPも溶血活性を示したことから、TDPがFTXと同一タンパク質であることが判明した。

第四章では、抗FTX抗血清を用いたウェスタン分析やFura2による細胞内Ca²⁺イメージングなどに

より、TDPが腸管上皮細胞の膜上で膜孔を形成していること、これを介した水やイオンの透過平衡の攪乱がF-actinを顕著に変化させ、その物理的な影響によってTJのバリア機能が破綻している可能性が示唆された。

第五章では、TDPと細胞膜との相互作用に必須な細胞膜成分の探索を試みた。脂質成分から成るリポソームにTDPは結合していたが膜孔を形成せず、リポソームの溶解は生じなかった。一方で細胞の膜表面をtrypsinやPI-PLC、glycosidaseで処理する実験系により、TDPとGPIアンカータンパク質のglycan coreとの相互作用が膜孔形成時の「分子会合」過程において重要な役割を担っていることが示唆された。

第六章ではTDP組み換え体が大腸菌に発現させ、構造・活性相関について検討した。N末端側は、タグを付加したりアミノ酸を少し欠損させただけでTDPのTEER低下活性と膜孔を形成する性質を失った。C末端側は、タグを付加しても活性を保持しており、更にC末側から欠損させる領域の長さによってTDPの活性の強弱が生じることが示唆された。この結果から、膜孔形成時にN末とC末の両方が重要で、特にN末領域が立体構造的に重要な機能を果たしていることが示唆された。又、組み換え体は全て細胞膜表面に結合したが、N末欠損タイプとC末欠損タイプを混合しても活性の発現は認められなかったことから、両領域は細胞膜上における「分子会合による膜孔形成」に至る分子内相互作用や立体構造の変化に重要であると考えられた。

以上、本研究は、腸管上皮細胞層の物質透過性を昂進する膜孔形成タンパク質を食用キノコ中に見出し、その構造や作用機構を明らかにするとともに、その細胞膜との相互作用や構造・活性相関を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。