

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻
平成 15 年博士課程 進学
氏名 岩森 督子
指導教員 東條英昭

乳清酸性タンパク質(WAP)の新規機能に関する研究 -抗菌作用と WAP 機能の活性部位-

乳清酸性タンパク質(WAP)は、げっ歯類、ウサギ、ラクダ、ブタ等の乳汁中に含まれている乳清タンパク質である。WAP は WAP モチーフと呼ばれる 4 つのジスルフィド結合からなるドメインを二つもち、分泌性プロテアゼ・ゼインヒビタム様構造を示すことから、何らかの生物学的機能を有することが推察されていた。これまでの WAP の生物学的機能に関する研究としては、WAP を乳腺特異的もしくは全身性に過剰発現するトランスジェニック(Tg)マウスで、乳腺の発達が抑制され、その結果、乳汁の生産が十分でないため、哺乳仔の発育不全がみられることが報告されている。また、WAP は、ホルモン依存的に乳腺胞の上皮細胞特異的に妊娠中期から泌乳中期まで高発現することが明らかになっている。一方、WAP は種々の組織においても RNA レベルで低い発現が報告されているが、抗乳腺以外におけるタンパク質レベルでの発現は確認されていない。

WAP モチーフを有する WAP ファミリータンパク質の中には抗プロテアーゼ活性、抗菌作用、消炎作用、細胞増殖抑制等を示すことが報告されており、これらのタンパク質が生体の様々な組織から合成分泌されていることが知られている。WAP は当研究室の研究結果から、乳腺上皮細胞の増殖を抑制することが確認されている。

本研究では、WAP ファミリータンパク質の多くが抗菌作用を有することに注目し、WAP が乳腺以外の外分泌組織で発現していないかどうかを調べ、さらに、乳汁から精製した WAP を用いて、種々な観点からその抗菌作用について解析した。

第一章では、未経産および泌乳期の雌マウス、成熟雄マウスを用いて乳腺以外の各種組織における RNA レベルおよびタンパク質レベルでの WAP の発現を解析した。RT-PCR では、雌の多くの外分泌組織で、一方、雄では精巣上体のみで発現が確認されたが、ウエスタンブロットでは泌乳期の乳腺における高発現と雄の精巣上体において低い発現が確認された。しかし、免疫組織化学染色による解析の結果、泌乳期雌マウスの顎下腺漿液性終末部と子宮の子宮腺、成熟雄マウスの精巣上体において部位特異的に WAP の発現が確認された。

そこで、第二章では、WAP が発現している生物学的意義を探るために当研究室で作製された WAP を全身性に発現している CAG/WAP Tg マウスの解析を行った。解析の結果、過去の報告と同様に乳腺において発達異常が観察されたと同時に、Tg マウスでは唾液中の常在細菌の構成が異なる傾向がみられた。以上の結果から、乳腺以外の各種分泌腺で WAP が発現している意義として、WAP の抗菌作用が強く示唆された。そこで、*in vitro*の系を用いて WAP の抗菌実験を行った。実験に用いた WAP は、ラット乳汁から精製し、乳腺上皮細胞 HC11 に作用させて増殖抑制を示すことを確認したものである。

まず、グラム陰性菌 *Escherichia coli* JCM15491, *Escherichia coli* ML35P グラム陽性菌 *Staphylococcus aureus* JCM2413 (*S. aureus*), *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* MRSA10 に対し精製 WAP を処理させた。その結果、WAP はグラム陽性菌 *S. aureus* の増殖を濃度依存的に抑制し、1.75 μ M から 7 μ M で増殖を 50%まで減少させた。ラット乳汁中で WAP は最終濃度、約 7 μ M で存在しており、生体内で十分作用しうると考えられる。また、pH6.6 で最も強い抗菌作用を示し、乳汁や唾液は弱酸性であることから生体内を反映した結果となった。さらに、抗菌タンパク質や抗菌ペプチドの大部分は cationic(陽性)であり、NaCl により干渉を受け抗菌作用を失うものが多いが、WAP は anionic(陰性)であり、NaCl に耐性を示した。さらに、WAP を作用させた *S. aureus* を走査型電子顕微鏡で観察したところ、表面構造の破壊が認められた。また、表面の破壊が WAP の膜貫通によるものであるかどうかを調べるため、基質 diSC3-5 を用いて蛍光を測定したところ、WAP は *S. aureus* に対して非膜貫通的に作用していることが判明した。走査型電子顕微鏡写真で観察された *S. aureus* 表面の破壊は細胞壁や細胞膜を貫通しているのではないことが明らかとなり、抗菌試験で WAP が *S. aureus* の増殖を完全に抑制しなかったことから、WAP は *S. aureus* の表面で非膜貫通型に影響を及ぼした結果、*S. aureus* の増殖を抑制した可能性が考えられた。

以上、WAP は細胞増殖抑制の他に抗菌作用を有することが今回初めて明らかとなった。

WAP ファミリータンパク質の中には多様な機能をもつものが多く存在しており、その作用ごとに活性ドメインが異なるものも知られている。そこで、WAP の抗菌作用と細胞増殖抑制作用における活性ドメインを同定するために、二つのドメインの各々の 8 つのシステインのうち 4 つをアラニン置換し、片方のドメインの立体構造を形成できない変異体 (domain1(D1), domain2(D2)) を作製した。また、各々のドメインの 4 つのジスルフィド結合を構成するシステインを個々にアラニンに置換し、一つずつジスルフィド結合を形成できない 8 つの変異体 (D1- C1, D1- C2, D1- C3, D1- C4, D2- C1, D2- C2, D2- C3, D2- C4) を作製した。これらの変異体を培養細胞で合成させて、乳腺上皮細胞 HC11 と *S. aureus* に対する影響をそれぞれ調べた。その結果、抗菌作用にはドメイン 2 に存在し、WAP ファミリータンパク質で保存されている配列を含んだ 2,3 番目のジスルフィド結合部位が大きく影響していることが明らかとなった。一方、細胞増殖抑制作用には両方のドメインの立体構造の存在が必要であることが分かった。

以上、本研究から初めて WAP が抗菌作用を有することが明かとなり、また、抗菌作用と細胞増殖抑制作用を示す活性ドメインの異なることから、WAP の抗菌作用と細胞増殖抑制作用における分子メカニズムはそれぞれ異なることが推察された。