

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 岩森 督子

乳清酸性タンパク質(WAP)は、げっ歯類をはじめ幾つかの動物種の乳汁中に同定された乳清タンパク質である。WAPはWAPモチーフと呼ばれるドメインを二つもち、分泌性プロテアゼインヒビタ様構造を示すことから、その生物学的機能が示唆されていた。WAPを乳腺で過剰発現するトランスジェニック(Tg)マウスでは、乳腺の発達が抑制され、その結果、哺乳仔の発育不全がみられることが報告されている。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いる。またWAPは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、乳腺以外の組織でのWAPの発現を調べ、さらに乳汁から精製したWAPを用いて、その抗菌作用について種々な観点から解析したものである。

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、ウエスタン法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、*in vitro*の系を用いてWAPの抗菌実験を行った。WAPはラット乳汁から採取および精製し、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をを用いた。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、増殖を50%まで減少させた。また、pH6.6で最も強い抗菌作用を示し、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。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。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いる。そこで、第3章では、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つをアラニンに置換し、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、ジスルフィド結合を形成できない8つの変異体を作製した。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、本研究で初めて WAP が抗菌作用を有することを明らかにした。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を示し、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の異なることを推察した。以上の成果は、学術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。