岐阜大学機関リポジトリ
Gifu University Institutional Repository

Identification and Characterization of a Novel Human-specific Carbohydrate Epitope in Milk Proteins

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 楊, 山明 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2557

氏　　名（国籍）	楊　　山　明　（中国（台湾））
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	農博甲第２１６号
学位授与年月日	平成１３年３月１３日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	Identification and Characterization of a Novel Human-specific Carbohydrate Epitope in Milk Proteins
審査委員	主査　岐阜大学教授　金丸義敬 副査　岐阜大学教授　渡邊乾二 副査　信州大学教授　大谷　元 副査　静岡大学教授　碓氷泰市 副査　岐阜大学助教授　長岡　利

論文の内容の要旨

乳の複合糖質の多様な役割を明らかにするためには、それらの成分の化学的特性や生理作用及び機能発揮のﾒｶﾆｽﾞﾑを解明することが不可欠である。さまざまな微生物の標的細胞への吸着をﾌﾞﾛｯｸしたり、細胞のがん化と関連するなど、多様な生理機能と関連することが明らかにされつつある人乳糖ﾀﾝﾊﾟｸ質の MUC1 ﾑﾁﾝに対して作製されたﾓﾉｸﾛｰﾅﾙ抗体の一つ1CF11抗体がMUC1ﾑﾁﾝばかりでなく多様な人乳糖ﾀﾝﾊﾟｸ質を特異的に認識するという興味深い性質を示したことから、本研究はその抗体が認識する抗原決定基（1CF11ｴﾋﾟﾄｰﾌﾟ）の特性をさまざまな点から検討することを目的としたものである。

実験ではまず各種動物の乳、唾液、血液などに対する 1CF11 抗体の反応性を調べ、人乳やﾋﾄ唾液などﾋﾄの分泌液に強い反応性が認められること、人乳の分泌型免疫ｸﾞﾛﾌﾞﾘﾝ A（SigA）のｻﾌﾞﾕﾆｯﾄではＨ鎖には反応がなくSCにのみ反応が見られることを明らかにした。さらに、人乳 lactoferrin（Lf）を用いて、反応性の消失が過ﾖｳ素酸処理や穏和なｱﾙｶﾘ処理によってのみ生じること、また、Lfの断片化で得られた1CF11ｴﾋﾟﾄｰﾌﾟ含有ﾌﾗｸﾞﾒﾝﾄの分析から、このｴﾋﾟﾄｰﾌﾟが新規のＯ型糖鎖を構成する可能性を示唆する結果を得た。

次に、人乳の精製Lfを用いた実験から、SDS-PAGE で移動度の異なる二種の成分の存在を認め、CBB 染色では主要成分（Lf-a）と微量成分（Lf-b）として現れるそれら二種の Lf 成分が 1CF11 抗体に対してはほとんど同じ反応性を示すことを明らかにした。Lfのﾄﾘﾌﾟｼﾝ消化物による生じる主要ﾌﾗｸﾞﾒﾝﾄは分子量 51,000 と 39,000 の二種であるが、1CF11 との反応性では分子量54,000と39,000のﾊﾞﾝﾄﾞが強く染色されることから、二種

のLfは1CF11ｴﾋﾟﾄｰﾌﾟの発現量の異なる二種のC-ﾛｰﾌﾞに起因することを示唆した。

人乳中の糖ﾀﾝﾊﾟｸ質の中で分子量135,000の成分（135K）がきわめて強い1CF11抗体との反応性を示すことから、種々のｸﾛﾏﾄｸﾞﾗﾌｨｰを用いてこの成分を精製し、これが人乳胆汁酸刺激ﾘﾊﾟｰｾﾞ（BSSL）であることを明らかにした。BSSLはLfと比較して1/1000の濃度で同じELISA反応性を示した。1CF11との反応性に関する両者の共通性と相違とを同時に説明するいかなる糖鎖構造もこれまで報告されていないことから、1CF11ｴﾋﾟﾄｰﾌﾟが新規の糖鎖構造と関連することが示唆されることを示した。

最後に、ﾋﾄ及びｻﾙを含む種々の動物個体から得た多数の唾液を用いて1CF11ｴﾋﾟﾄｰﾌﾟの反応性を分析し、ﾋﾄ及び旧世界ｻﾞﾙには本ｴﾋﾟﾄｰﾌﾟが認められ、その他の動物では発現がないことを示す結果を得た。

以上の研究結果は、現在一般的に受け入れられている哺乳動物ﾀﾝﾊﾟｸ質の糖鎖構造の基本であるN型糖鎖やO型糖鎖とは異なる構造の新規糖鎖が存在している可能性を示唆しており、また、それらがﾋﾄやﾋﾄに近縁の高等霊長動物に特異的に発現されているというきわめて新しい知見をもたらした。さらに、それらが人乳や唾液といったﾋﾄの分泌液中のさまざまな糖ﾀﾝﾊﾟｸ質に強く発現されていることから、ﾋﾄが経口的に摂取する成分としてﾕﾆｰｸな生理機能と結びつく可能性も示唆するものである。よって審査委員会は全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

審　査　結　果　の　要　旨

人乳は乳児の成長に重要な意味を持っている。乳中に見られる遊離ｵﾘｺﾞ糖や複合糖質の種類や量の豊富さは人乳の特質の一つであることが知られているが、その意義については必ずしも理解されているわけではない。乳の複合糖質の多様な役割を明らかにするためには、それらの成分の化学的特性や生理作用及び機能発揮のﾒｶﾆｽﾞﾑを解明することが不可欠である。さまざまな微生物の標的細胞への吸着をﾌﾞﾛｯｸする働きを示すこと、あるいは、細胞のがん化と密接に関連するなど、多様な生理機能を持つことが明らかにされつつある人乳糖ﾀﾝﾊﾟｸ質の一つのMUC1ﾑﾁﾝに対して作製されたﾓﾉｸﾛｰﾅﾙ抗体の一つ1CF11抗体がMUC1ﾑﾁﾝばかりでなくさまざまな人乳糖ﾀﾝﾊﾟｸ質を特異的に認識するという興味深い性質を示したことから、本研究はその抗体が認識するｴﾋﾟﾄｰﾌﾟ（1CF11ｴﾋﾟﾄｰﾌﾟ）の特性をさまざまな点から明らかにすることを目的としたものである。

実験ではまず各種動物の乳、唾液、血液などを用いて1CF11の反応性を調べ、人乳やﾋﾄ唾液などﾋﾄの分泌液に強い反応性が認められること、人乳の分泌型免疫ｸﾞﾛﾌﾞﾘﾝA（SigA）のｻﾌﾞﾕﾆｯﾄのH鎖には反応がなくSCにのみ反応が見られ、ﾋﾄ血清の非反応性と一致することを明らかにした。さらに、人乳lactoferrin（Lf）を用いて、反応性の消失が過ﾖｳ素酸処理や穏和なｱﾙｶﾘ処理のみによって生じること、また、Lfの断片化で得られた1CF11ｴﾋﾟﾄｰﾌﾟ含有ﾌﾗｸﾞﾒﾝﾄの分析から、このｴﾋﾟﾄｰﾌﾟが新規のO型糖鎖を構成している可能性を示唆する結果を得た（これらの結果は"A Monoclonal Antibody That Recognizes a Common Carbohydrate Epitope Shared by Various Glycoproteins in Human Secretions"として*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249, 618-623, 1998にまとめ

られている。）

人乳の精製Lfを用いた実験から、SDS-PAGEで移動度の異なる二種の成分の存在を認め、CBB染色では主要成分（Lf-a）と微量成分（Lf-b）として現れるそれら二種のLf成分が1CF11抗体に対してはほとんど同じ反応性を示すことを明らかにした。Lfのﾄﾘﾌﾟｼﾝ消化物による生じる主要ﾌﾗｸﾞﾒﾝﾄは分子量51,000と39,000の二種であるが、1CF11との反応性では分子量54,000と39,000のﾊﾞﾝﾄﾞが強く染色され、二種のLfの存在が1CF11ｴﾋﾟﾄｰﾌﾟの発現量の異なるC-ﾛｰﾌﾞを持つことに起因すると考えられることを示した。（これらの結果は"Identification of two molecular species in human milk-derived lactoferrin"として*Lactoferrin: Structure, Function and Applications (K. Shimazaki et al., eds.)*, Elsevier Science B. V., pp. 17-25, 2000にまとめられている。）

人乳中の糖ﾀﾝﾊﾟｸ質の中で分子量135,000の成分（135K）がきわめて強い1CF11抗体との反応性を示すことから、種々のｸﾛﾏﾄｸﾞﾗﾌｨｰを用いてこの成分を精製し、これが人乳胆汁酸刺激ﾘﾊﾟｰｾﾞ（BSSL）であることを明らかにした。BSSLはLfと比較して1/1000の濃度で同じELISA反応性を示した。1CF11との反応性に関する両者の共通性と相違とを同時に説明するいかなる糖鎖構造もこれまで報告されていないことから、1CF11ｴﾋﾟﾄｰﾌﾟが新規の糖鎖構造と関連することが示唆されることを示した。（これらの結果は、"Human milk bile-salt-stimulated lipase is extremely reactive with the monoclonal antibody 1CF11 that recognizes a human-specific carbohydrate antigen"として*Biosci. Biotech. Biochem.*: 65 (4), 2001 (in press) にまとめられている。）

最後に、ﾋﾄ及びｻﾙを含む種々の動物個体から得た多数の唾液を用いて1CF11ｴﾋﾟﾄｰﾌﾟの反応性を分析し、ﾋﾄ及び旧世界ｻﾞﾙには本ｴﾋﾟﾄｰﾌﾟが認められ、その他の動物では発現がないことを示唆する結果を得た。（この結果は、"Unique occurrence of the 1CF11 carbohydrate epitope in primate saliva"として*Biosci. Biotech. Biochem.*: 65 (3), 2001 (in press) にまとめられている。）

以上の研究結果は、現在一般的に受け入れられている哺乳動物ﾀﾝﾊﾟｸ質の糖鎖構造の基本であるN型糖鎖やO型糖鎖とは異なる構造の新規糖鎖が存在している可能性を示唆しており、また、それらがﾋﾄやﾋﾄに近縁の高等霊長動物に特異的に発現されているというきわめて新しい知見をもたらした。さらに、それらが人乳や唾液といったﾋﾄの分泌液中のさまざまな糖ﾀﾝﾊﾟｸ質に強く発現されていることから、ﾋﾄが経口的に摂取する成分としてﾕﾆｰｸな生理機能と結びつく可能性も示唆するものである。よって審査委員会は全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。