



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

鶏卵卵白オボムチンの特異的構造に関する化学的・
生化学的解析

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 柘植, 洋治 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2461

氏 名 (国籍)	柘 植 洋 治 (岐 阜 県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第120号
学 位 授 与 年 月 日	平成10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	鶏卵卵白オボムチンの特異的構造に関する化学的・ 生化学的解析
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 渡 邊 乾 二 副査 岐 阜 大 学 教 授 加 藤 宏 治 副査 岐 阜 大 学 教 授 金 丸 義 敬 副査 信 州 大 学 教 授 細 野 明 義 副査 静 岡 大 学 教 授 碓 氷 泰 市

論 文 の 内 容 の 要 旨

オボムチンは卵白タンパク質の約3.5%を占める繊維状の糖タンパク質で、性質の異なった α -サブユニット〔見掛け上の分子量(AMM); 約220 kDa〕及び β -サブユニット (AMM; 約400 kDa)からなる構造を有し、その各サブユニットがジスルフィド結合を介して巨大分子構造をとっている。不溶型オボムチンについては分子全体の粒子量が 2.3×10^4 kDa と算出されている。しかし、そのオボムチンの構造は、その分子構造が複雑であることや難水溶性であることなどから、詳細には解析されていない。

本研究ではオボムチンの複雑な特異的構造を明らかにするために、化学的手法（化学的分析、SDS-PAGE、加熱処理及び還元処理など）と生化学的（ウイルスと抗オボムチン抗体に対する親和性の測定及び酵素処理など）を組み合わせる解析したものである。

本論文は第1～3章で構成されている。第1章では卵白タンパク質及びオボムチンのウイルスに対する親和性につき検討し、オボムチンは他の卵白タンパク質と比較して、ウシロタウイルス（シマネ株、RV）では4000倍以上、ニワトリニューキャッスル病ウイルス（石井株、NDV）及びヒトインフルエンザウイルス（A型/北京、IV）では200倍以上の強い赤血球凝集阻害（HI）活性をもつと明らかにした。オボムチンサブユニット、還元アルキル化及び酵素処理したオボムチンのRV及びNDVに対するHI活性の測定結果から、オボムチンがウイルスに対してHI活性を発揮するためには、RVに対しては α -と β -サブユニットが結合した巨大分子構造が、NDVに対しては β -サブユニットのみが必要であるとした。

第2章ではオボムチンの特異的構造の解析として、加熱処理あるいは還元処理したオボムチンのNDVと抗オボムチン抗体に対する親和性につき検討した。オボムチンサブユニット及び還元アルキル化オボムチンのNDVに対する親和性をELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)により評価したところ、HIによる結果とほぼ同様な傾向が認められた。また、脱シアル化したオボムチンはNDVへの親和性をほとんど消失していたことから、そのシアル酸の寄与が示された。一方、オボムチンの抗体への親和性が還元アルキル化処理により完全に消失したことから、抗体はジスルフィド結合付近の三次構造を特異的に認識していると分った。これらの結果を踏まえて加熱処理したオボムチンの構造を解析したところ、pH及び加熱温度の上昇に伴い構造の破壊が認められるが、pH 6と8では70℃以下、pH 10では60℃以下の加熱であれば比較的安定であると示された。さらに、部分的に還元アルキル化したオボムチンの構造を解析した結果、NDVに対しては α -サブユニット間あるいは各サブユニット分子内の、抗体に対しては主に比較的分子表面に存在するジスルフィド結合が親和性の発揮に関与すると結論づけた。また、 α -および β -サブユニット1分子当たりの全チオール基数はそれぞれ144及び15個であることも明らかにした。

第3章ではオボムチンの特異的構造の解析として、プロナーゼ処理オボムチンフラグメントの調製と、そのフラグメントの部分的構造につき検討した。プロナーゼ処理したオボムチンをゲルろ過して、糖を比較的多く含む画分(P1～P3)とタンパク質を多く含む画分(P4, P5)に分画した。主なフラグメントのAMMはP1が約220 kDa、P2が約120 kDa (P2a)及び100kDa (P2b)、P3が約60 kDaであった。各画分の化学組成を2種のサブユニットと比較したところ、P1～P3は β -サブユニット由来、P4及びP5は主に α -サブユニット由来の分解物を含有していた。P1～P3の糖の割合が約90%と非常に高いことから、 β -サブユニットには糖鎖の多い領域と少ない領域が存在すると示された。P1をさらにプロナーゼ処理して得たフラグメントを解析した結果、P1がP2a及びP3から成っていると明らかにした。また、脱シアル化したP2をプロナーゼ処理した結果から、P2aはさらに糖鎖に富む分子量のほぼ等しい2つの領域からなると思われた。NDVに対しては主にシアル酸を多く含む画分、抗体に対してはジスルフィド結合を含む画分に高い親和性が認められた。抗体に対する親和性は主にP4及びP5由来の3つのフラグメントに認められた。そこで、P4の還元後の主なフラグメントと α -サブユニットについてN末端からのアミノ酸配列を決定した。

これらの結果より、オボムチン及び β -サブユニットの特異的なモデル的構造を考案し、それに基づき考察した。

本研究の成果はオボムチンのみならず、広く糖タンパク質の構造と機能の研究に対しても新しい知見を示し得た。

審 査 結 果 の 要 旨

本審査委員会は、学位申請者、柘植洋治の学位論文「鶏卵卵白オボムチンの特異的構造に関する化学的・生化学的解析」につき、論文の構成、内容ならびに基礎となる学術論文等について慎重に審議し、その内容が貴重な知見であり、学術的にも価値のあるものと評価した。その結果、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の博士

(農学)の学位論文として十分価値あるものと認めた。

以下に論文内容についての審査結果の概要につき記す。

I. 研究の目的:

オボムチンは卵白タンパク質の約3.5%を占める繊維状の糖タンパク質で、性質の異なった α -サブユニット[見かけ上の分子量(AMM); 約220 kDa]及び β -サブユニット(AMM; 約400 kDa)からなる構造を有し、その各サブユニットがジスルフィド結合を介して巨大分子構造をとっている。不溶型オボムチンについては分子全体の粒子量が 2.3×10^4 kDaと算出されている。しかし、そのオボムチンの構造は、その分子構造が複雑であることや難水溶性であることなどから、詳細には解析されていない。

本研究ではオボムチンの複雑な特異的構造を明らかにするために、化学的手法(化学的分析、SDS-PAGE、加熱処理及び還元処理など)と生化学的(ウイルスと抗オボムチン抗体に対する親和性の測定及び酵素処理)を組み合わせることで解析したものであり、この研究に優れた独創性を見い出すことができると審査委員会は判定した。

II. 研究成果と審査概要:

本論文は第1～3章で構成されている。第1章では卵白タンパク質及びオボムチンのウイルスに対する親和性につき検討し、オボムチンは他の卵白タンパク質と比較して、ウシロタウイルス(シマネ株, RV)では4000倍以上、ニワトリニューキャッスル病ウイルス(石井株, NDV)及びヒトインフルエンザウイルス(A型/北京, IV)では200倍以上の強い赤血球凝集阻害(HI)活性をもつと明らかにした。オボムチンサブユニット、還元アルキル化処理、または酵素処理したオボムチンのRV及びNDVに対するHI活性の測定結果から、オボムチンがウイルスに対してHI活性を発揮するためには、RVに対しては α -と β -サブユニットが結合した巨大分子構造が、NDVに対しては β -サブユニットのみが必要であるとした。

第2章ではオボムチンの特異的構造の解析として、加熱処理あるいは還元処理したオボムチンのNDVと抗オボムチン抗体に対する親和性につき検討した。オボムチンサブユニット及び還元アルキル化オボムチンのNDVに対する親和性をELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)により評価したところ、HIによる結果とほぼ同様な傾向が認められた。また、脱シアル化したオボムチンはNDVに対する親和性をほとんど消失していたことから、そのシアル酸の寄与が明らかになった。一方、オボムチンの抗体への親和性が還元アルキル化処理により完全に消失したことから、抗体はジスルフィド結合付近の三次構造を特異的に認識していると分った。これらの結果を踏まえて加熱処理したオボムチンの構造を解析したところ、pH及び加熱温度の上昇に伴い構造の破壊が認められたが、pH 6と8では70℃以下、pH10では60℃以下の加熱であれば比較的安定であると示された。さらに、部分的に還元アルキル化したオボムチンの構造を解析した結果、NDVに対しては α -サブユニット間あるいは各サブユニット分子内の、抗体に対しては主に比較的分子表面に存在するジスルフィド結合が親和性の発揮に関与すると結論づけた。

また、 α - 及び β - サブユニット1 分子当たりの全チオール基数はそれぞれ144 及び15 個であることも明らかにした。

第3 章ではオボムチンの特異的構造の解析として、プロナーゼ処理オボムチンフラグメントの調製と、そのフラグメントの部分的構造につき検討した。プロナーゼ処理したオボムチンをゲルろ過して、糖を比較的多く含む画分(P1 ~P3) とタンパク質を多く含む画分(P4, P5)に分画した。主なフラグメントの見かけ上の分子量はP1が約220 kDa, P2が約120 kDa (P2a) 及び100 kDa (P2b), P3 が約60 kDaであった。各画分の化学組成を2 つのサブユニットと比較したところ、P1~P3は β - サブユニット由来、P4及びP5は主に α - サブユニット由来の分解物を含有していた。P1~P3の糖の割合が約90% と非常に高いことから、 β - サブユニットには糖鎖の多い領域と少ない領域が存在すると示された。P1をさらにプロナーゼ処理して得たフラグメントを解析した結果、P1がP2a 及びP3から成っていると明らかにした。また、脱シアル化したP2をプロナーゼ処理した結果から、P2a はさらに糖鎖に富む分子量のほぼ等しい二種の領域からなると思われた。ND V に対しては主にシアル酸を多く含む画分、抗体に対してはシスチン残基を多く含む画分に高い親和性が認められた。抗体に対する親和性は主にP4及びP5由来の3 つのフラグメントに認められた。そこで、P4の還元後の主なフラグメントと α - サブユニットについてN 末端からのアミノ酸配列を決定した。

これらの結果より、オボムチン及び β - サブユニットの特異的なモデル的構造を考案し、それに基づき考察した。

以上の内容の論文に対して、いくつかの疑問及び考察への希望は出されたものの、内容の充実度、論文の完成度のいずれの点でも非常に高い評価を受けた。

III. 基礎となる学術論文の発表雑誌名:

- ① Y. Tsuge, M. Shimoyamada and K. Watanabe, Binding of egg white proteins to viruses. Biosci. Biotech. Biochem., 60, 1503-1504 (1996)
- ② Y. Tsuge, M. Shimoyamada and K. Watanabe, Differences in hemagglutination inhibition activity against bovine rotavirus and hen newcastle disease virus based on the subunits in hen egg white ovomucin. Biosci. Biotech. Biochem., 60, 1505-1506 (1996)
- ③ Y. Tsuge, M. Shimoyamada and K. Watanabe, Structural features of newcastle disease virus- and anti-ovomucin antibody-binding glycopeptides from pronase-treated ovomucin. J. Agric. Food Chem., 45, 2393-2398 (1997)
- ④ Y. Tsuge, M. Shimoyamada and K. Watanabe, Bindings of ovomucin to newcastle disease virus and anti-ovomucin antibodies and its heat stability based on binding abilities. J. Agric. Food Chem., 45, 4629-4634 (1997)