

学 位 論 文 要 旨

氏 名

篠 原 広 志

題 目

胚発生中に生じる熱安定型 HS-オボアルブミンの構造と機能に関する研究
(Studies on Structure and Function of HS-ovalbumin naturally occurring during Embryonic Development)

オボアルブミンは卵白の 54 % を占めるタンパク質であるが、その機能は不明である。オボアルブミンはセルピン(セリンプロテアーゼインヒビター)の構造を持つが、プロテアーゼに対して阻害活性をもたない。しかし、胚発生の過程で分解を受けず胚組織に移行することから、アミノ酸源以外の生理機能が予想される。その過程で、ネイティブなオボアルブミン(N-オボアルブミン)は構造的変化を受け、熱安定型となる。熱安定型には 2 種類が存在し、83 °C に変性温度を持つ HS-オボアルブミンと命名したタイプのオボアルブミンが胚組織に蓄積することから、HS-オボアルブミンが機能型オボアルブミンであることが推定された。

本研究はオボアルブミンの生理機能を明らかにする目的で HS-オボアルブミンを発生卵より精製し、その性質を明らかにすると共に、構造の解明と若干の機能について調べた。

HS-オボアルブミンは産卵直前の卵白にも存在しており、オボアルブミン合成後から早い段階で熱安定型に変化することが明らかになった。産卵後、孵化が開始すると HS-オボアルブミンは卵白内で増加し、胚の孵化まで存在する。孵卵 5 日目以降では卵白のオボアルブミンのほとんどが熱安定型となっているが、その中で無精卵の貯蔵中に見られる S-オボアルブミンと同じ 86 °C に変性温度を有するオボアルブミンも生じた。HS-オボアルブミンの性質を明らかにするため、HS-オボアルブミンを孵卵 2.5 日目の卵白より精製した。オボアルブミンは修飾リン酸基の数によって A₁ (P=2), A₂ (1), A₃ (0) のアイソフォームがあるが、本研究では A₁ 精製品を用いた。HS-オボアルブミンは N-オボアルブミンの構造変化が原因により、熱安定性が増すと考えられることから、HS-オボアルブミンの 2 次構造および立体構造について、CD スペクトル、トリプトファン蛍光強度、ANS 結合性、X 線小角散乱パターンを測定した。その結果、HS-オボアルブミンはタンパクの 2 次構造に N-および S-オボアルブミンとの違いが見られ、高次構造では N-オボアルブミンと S-オボアルブミンの間にあると考えられた。N-オボアルブミンと S-オボアルブミンはその結晶構造が報告され、両者にはほとんど構造的には差がないとされていた。しかし、今回の解析から、N、S-および HS-のそれぞれには構造的な差が認められた。さらに、S-オボアルブミンを認識しない抗オボアルブミンモノクローナル抗体(Mab2B3/2H11)を見出し、そのエピトープ部位を決定した。Mab2B3/2H11 はオボアルブミンの reactive centre loop(RCL)の Ser-344 のリン酸基を認識した。RCL はセルピンのプロテアーゼ解裂サイトであり、HS-オボアルブミンは Mab2B3/2H11 によって認識されることから、RCL は表面に露出していると推定された。さらに、廣瀬らは、S-オボアルブミンの結晶構造解析で RCL は N-オボアルブミンと全く同じであると報告したが、溶液中では S-オボアルブミンの RCL は、Huntington らが提唱したように内部に部分的挿入されており、そのため Mab2H11 では認識されないと結論した。また、3 つのオボアルブミンにプロテアーゼに対する感受性やリゾチームとの相互作用に差を認めたことから、胚発生が進行することで、N-オボアルブミンのタンパクの構造が徐々に変化し、熱安定型の HS-オボアルブミンとなり、さらにその一部は RCL が部分挿入した S-オボアルブミンになっていくと考えられる。しかし、胚に利用されるのは HS-オボアルブミンであり、胚血清や胚の各組織に局在している。本研究ではオボアルブミンの構造変化と胚発生との関連について考察し、オボアルブミンの生理的重要性を提唱した。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Shinohara Hiroshi
題 目	Studies on Structure and Function of HS-ovalbumin naturally occurring during Embryonic Development (胚発生中に生じる熱安定型 HS—オボアルブミンの構造と機能に関する研究)

Ovalbumin is a major protein component in the hen egg white, belong to serpin (serine protease inhibitor) family on structure, but is a unique serpin without inhibitory activity against proteases. During embryonic development, ovalbumin in the native (N) form seems to undergo conformational changes and take a heatstable form, which was named HS-ovalbumin. It has been known that N-ovalbumin is artificially converted to another thermostable form called S-ovalbumin by heating at an alkaline pH. Critical temperatures at which ovalbumin became susceptible to proteolysis were shown to be reflected by the previously determined denaturation temperatures (T_m) of the three forms of ovalbumin (78, 83 and 86 °C, respectively). Here we characterized further the three ovalbumin forms, N, HS, and S. The epitope of the monoclonal antibody 2B3/2H11, which recognizes N- and HS-ovalbumin but not S-ovalbumin, was found to reside in the region EVVGS~~A~~EAGVDAASVSEEFR, which is contained in reactive centre loop (RCL). Dephosphorylation experiments showed that the phosphorylated Ser-344 residue located on RCL is crucial for the epitope recognition. The tryptic digests of the three forms of ovalbumin inhibited lysozyme activity and the temperatures at which the digests exerted the highest inhibition were roughly comparable to the respective T_m values. Moreover, the trypsin fragment that inhibits the lysozyme activity was shown to be ILEL~~P~~FASGT MSMLVLLPDE VSGLEQLESI INFEK, derived from the 2B strands 2 and 3, which reside near RCL. It is thus likely that a conformational rearrangement of ovalbumin takes place at least at RCL and B strands, which would originally be in internal portions and emerge on heating.

HS-ovalbumin was presented dominantly in egg yolk, amniotic fluid, and serum of fertilized eggs. Moreover, analyses by monoclonal antibody and heat treatment indicated that the HS-ovalbumin occupies the largest fraction of ovalbumin that accumulates in the embryonic tissues. At the late stages of development, HS-ovalbumin of amniotic fluid seems to be swallowed through pharynx, carried in the intestine through stomach, and absorbed in the blood. The current findings suggest that HS-ovalbumin is crucial for embryogenesis.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	篠原 広志
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 杉元 康志
	副査 鹿児島大学 教授 青木 孝良
	副査 佐賀大学 教授 渡邊 啓一
	副査 宮崎大学 教授 六車 三治男
	副査 鹿児島大学助教授 南 雄二
審査協力者	
題目	<p>胚発生中に生じる熱安定型HS-オボアルブミンの構造と機能に関する研究 (Studies on Structure and Function of HS-ovalbumin Naturally Occurring during Embryonic Development)</p>
<p>オボアルブミンはセリンプロテアーゼインヒビター（セルピン）ファミリーに属しているが、胚のアミノ酸源以外の生理機能は不明である。オボアルブミンは胚発生過程で変性温度が83℃の熱安定型のオボアルブミン（HS-オボアルブミン）に変化し、この転換がオボアルブミンの機能に関係すると予想されるが、その構造は不明である。HS-オボアルブミンの構造と性質を明らかにすることがその機能を解明するために重要であると考えられる。</p> <p>そこで本研究はHS-オボアルブミンのタンパク構造を詳細に解析し、Native-オボアルブミンおよびS-オボアルブミンとの構造の違いと構造変化の機構について考察した。また、HS型に転換したオボアルブミンが卵白から羊水、胚の消化管、血液そして胚組織に移行していく過程を追究した。研究の過程で構造の解明に必要な特異的なモノクロナール抗体を見出し、この抗体を使って、いくつかの重要な知見を得た。そして、これまで熱安定型オボアルブミンの論議の中核であったオボアルブミンのreaction center loop（RCL）のタンパク内部への部分的挿入の仮説を証明する結果を得た。</p>	

学位論文から得られた結果の骨子は以下のことである。

- 1) 胚発生におけるHS-オボアルブミンの出現—オボアルブミンの合成組織である輸卵管膨大部、子宮部の卵白、産卵直後の卵を調べた結果、HS-オボアルブミンは子宮部の卵白から見られ、卵白合成の早期から出現することを明らかにした。
 - 2) HS-オボアルブミンの精製法の確立—発生中の卵にはN-オボアルブミン、HS-オボアルブミン、S-オボアルブミンが混在することから、これらを硫酸アンモニウムを使わず、DEAE-クロマト、CM-クロマトそして陰イオン交換Pros HQクロマトにて3者を分離した。得られたHS-オボアルブミンは90%の純度を有していた。この過程でN-オボアルブミンとHS-オボアルブミンは認識するが、S-オボアルブミンを認識しない2B3/2H11モノクロナール抗体を見出し、加熱処理方法を併用することにより3者のオボアルブミンを区別する方法を確立した。
 - 3) HS-オボアルブミンの構造解析—トリプトファン蛍光スペクトル、表面疎水性、塩酸グアニジン変性、CDスペクトル、X線小角散乱、プロテアーゼ感受性、リゾチーム結合性などについて調べた。HS-オボアルブミンはN-オボアルブミンに比べ、やや構造はタイトになっており、S-オボアルブミンはさらに構造は堅固となり非常に安定な構造となっていることを明らかにした。モノクロナール抗体2B3/2H11のエピトープ認識部位はオボアルブミンのRCL上のSer344のリン酸基であることを決定し、RCLは可動性のものであり、HS-オボアルブミンでは僅かに移動し、S-オボアルブミンでは内部に挿入されるため認識されなくなると推定した。これはS-オボアルブミンのRCLの分子内部への部分挿入を提唱したHuntingtonモデルと一致しており、廣瀬のS-オボアルブミンの結晶構造解析とは一致していないが、溶液中ではオボアルブミンのRCLは可動性であると結論した。
 - 4) HS-オボアルブミンの胚への移行—HS-オボアルブミンは卵白から羊水、消化管、血液そして胚組織へと移行していき、その機能を果たしていることを推察した。
- 以上のように、本論文はオボアルブミンの発生過程でのHS-オボアルブミンの生成とその機構、分子構造の解明、発生における重要性を明らかにし、これまで不明であったオボアルブミンの機能を解明する手がかりとなり、タンパク化学的および食品化学的な面だけでなく、発生生物学にも大きく貢献するものであった。したがって、博士の学位論文として十分な価値を持つと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	篠 原 広 志
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 杉 元 康 志
	副査 鹿児島 大学 教授 青 木 孝 良
	副査 佐賀 大学 教授 渡 邊 啓 一
	副査 宮崎 大学 教授 六 車 三 治 男
	副査 鹿児島 大学助教授 南 雄 二
審査協力者	
実施年月日	平成18年 8月 1日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) ○口答・筆答	
<p>主査および副査は、平成18年8月1日の公開審査会において学位申請者に対して学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について諮問を行った。具体的には別紙のような質疑がなされ、いずれも満足できる回答を得ることが出来た。</p> <p>その結果、審査委員会は、申請者が大学院連合農学研究科博士課程修了者としての学力および識見を有するものと認め、博士(農学)の学位を与えるに十分な資格を持つものと判定した。</p>	

学位申請者
氏 名

篠 原 広 志

質問 1) S-オボアルブミンの X 線結晶化モデルでは 3 つのセリンにラセミ化が生じており、RCL の挿入が見られないが、今回の結果は RCL の挿入があると結論づけていることとの矛盾はないのか。

回答 1) 結晶解析で使用した S-オボアルブミンは 30 °C で 7 日間、保温するマイルドな条件で作製しており、私が今回用いたものとは条件が違う。S-オボアルブミンの調製は私の方法が一般的であり、ラセミ化の可能性はあるが、明らかに RCL の違いが認められる。溶液の中の解析の方がインタクトの状態であり、結晶状態ではタンパク質分子間の相互作用により、特に微妙な RCL に影響が出たと推測する。

質問 2) 塩酸グアニジンによるアンフォールディングの実験のネイティブの 100% はどのように測定したのか。

回答 2) トリプトファンの蛍光強度を測定して求めた。

質問 3) 3 者のオボアルブミンの構造変化を調べるために、常法である硫酸アンモニウム分画を行わなかった理由は何か。

回答 3) 3 者の構造的違いは微妙なところにあると考えられ、塩によるタンパク構造への影響を避けるため、硫酸アンモニウムによる精製は行わなかった。

質問 4) 熱安定型オボアルブミンが自発的、生理的に生じるのは何故か。

回答 4) HS-オボアルブミンの胚発生での生成の様式、胚組織を含めた各場所での HS-オボアルブミンの存在、初期胚でのオボアルブミン欠如した発生異常などから HS-オボアルブミンの重要性が強く示唆され、HS-オボアルブミンに転換されることがオボアルブミンの機能に深く関係すると結論づけた。よって、HS-オボアルブミンはその必要性から自発的、生理的に生じてくると考えられる。

質問 5) 今回のデータは S-オボアルブミン X線構造解析からの結果と違いが見られるが、何故データの差が出たと考えるか。X線解析と共通するデータはあるのか。

回答 5) RCLの挿入が一番問題となる。セルピンの RCLの多くは可動性であるとされ、オボアルブミンでも同じように起っていると考える。S-オボアルブミンも生成段階でいくつかの形があると考えられる。先に述べたようにタンパク本体のセリンのラセミ化については確実に起こる実証はない。RCLの解裂サイトが内部に移行するため、エラストラーゼに対する感受性が低下すると結論した。今回のデータは S-オボアルブミンでは RCLを含めかなりダイナミックな構造変化が起こっていると考えられ、構造変化が少ないとする結晶構造の報告とは異なる。

質問 6) 受精卵では S-オボアルブミンの方が無くなるのでこれが使われているのではないか。

回答 6) 胚血清や胚組織中にあるのは HS-オボアルブミンで S-オボアルブミンではない。特に発生初期では S-オボアルブミンはまだ生成されていない。

質問 7) N-オボアルブミンから HS-オボアルブミンや S-オボアルブミンが生成されるが、この反応は不可逆的と言っているが、その根拠は。

回答 7) いくつかの報告でこの反応は不可逆的とされている。

質問 8) 有精卵と無精卵での pHの上昇が熱安定型オボアルブミンへの移行に重要であり、温度はそれを促進するだけではないのか。

回答 8) *In vitro* の実験で中性 pHでも熱安定型オボアルブミンが生成されたことから、pH、温度は重要なファクターであるが、他の要因も関係していると思う。

質問 9) 胚発生における 3者のオボアルブミンの量比が器官形成などに重要ではないか。

回答 9) 胚の成長に従って HS-オボアルブミンの量は増えている。関係があると思う。

質問 10) 表面疎水性の増加と RCLの変化の関係はあるのか。

回答 10) RCLの挿入だけで上昇したとは考え難く、もっと大きな構造変化が起こり、表面疎水性が上昇したと考える。