

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	室井 由起子
審査委員	主査 琉球大学 教授 和田 浩二
	副査 琉球大学 教授 高良 健作
	副査 佐賀大学 教授 濱 洋一郎
	副査 琉球大学 教授 屋 宏典
	副査 鹿児島大学 教授 大塚 彰
審査協力者	九州栄養福祉大学 教授 渡邊 啓一 九州栄養福祉大学 教授 杉元 康志
題 目	鶏卵白リゾチームの品質の安定性とそれに寄与する卵タンパク質に由来するペプチドに関する研究 (Studies on the quality stability of hen egg-white lysozyme and the contribution of peptides derived from egg proteins)
<p>タンパク質の機能発現には構造の安定が重要であるが、物理的・化学的環境によって影響を受けやすい。生体内で正常な構造を失ったタンパク質は速やかに分解されるか、re-foldingされ、再生される。しかし、一部のタンパク質は不良化し、線維を形成して、細胞内外に蓄積して疾患の原因となる。鶏卵の発生において卵内のタンパク質は38°Cに3週間ほどインキュベーションされるため、構造変化を受けやすい環境にあると考えられる。しかし、卵タンパク質は発生過程を通じて比較的安定とされ、機能を保持していると考えられるが、そのような研究は少ない。その中で、卵白リゾチームはアミノ酸139個、分子量1万4千のタンパク質であるが、細菌の細胞壁を分解するムラミダーゼ活性を有する抗菌タンパク質である。本研究では、リゾチームの胚発生における安定性について、構造および機能を中心に追究した。また、卵内のタンパク質が変性を受けやすい環境で安定を保つ要因として、卵タンパク質の分解物に注目し、リゾチームのアミロイド線維形成を阻止するペプチドの効果に焦点を当てた。</p>	

まず、胚発生過程におけるリゾチームの変化について解析した。発生が進行するに従って、卵内の総溶菌活性量は減少していくが、リゾチーム自体の活性は維持されていることが明らかになった。0、7、11、15および18日目の発生卵からリゾチームを精製し、精製したリゾチームはいずれもムラミダーゼ活性および溶菌活性を有していた。発生後期のリゾチームは T_m 値が70°Cと2°Cほど低くなっており、変性温度に若干の変化が見られた。8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸の結合実験では、発生の進行に従って表面疎水性が上昇していること、またトリプトファン蛍光およびアクリルアミドトリプトファン消光実験においてトリプトファン残基の表面への移行が示唆された。CDスペクトルによる二次構造の変化についても発生後期のリゾチームでは α -ヘリックス量の増加が見られ、分子構造の変化が内部でも起こっていると推測した。しかしながら、ムラミダーゼ活性および溶菌活性と黄色ブドウ球菌に対する抗菌性は、18日目までの発生過程のすべてのリゾチームが有しており、活性中心付近の構造は十分保持されていると結論した。

このように胚発生においてリゾチームをはじめ卵タンパク質は安定的であることから、次に安定化に寄与する因子の探索を行った。不安定化したリゾチームはアミロイド線維を形成することと、形成にはコア領域が関与していることが知られ、コア領域の線維形成を抑制する因子として鶏卵ペプチドに注目した。卵白、卵黄、カラザおよび卵殻膜のタンパク質の加水分解物を調製し、リゾチームの線維形成抑制効果を観察した。その結果、カラザおよび卵白ペプチドに線維抑制効果を見出した。また、カラザペプチドはヒトのリゾチームの線維形成を阻害することを確認し、線維形成を促進する金属イオンの効果を抑制することを明らかにした。さらに、アルツハイマー病の原因の1つであるアミロイド β ペプチドの線維形成も抑制することが観察された。したがって、カラザペプチドはリゾチームの線維形成抑制だけでなく、広く不良化したタンパク質の線維形成を阻害する可能性があると推測した。また、このようなタンパク質の分解物が発生卵のタンパク質の安定に寄与していると考えた。

以上のように、本研究ではリゾチームをモデルタンパク質として胚発生におけるタンパク質の安定性を解析し、リゾチームは僅かな構造変化をするものの機能は十分保持し、胚発生に貢献していることを明らかにした。また、安定化に寄与する因子としてカラザタンパク質由来のペプチドにアミロイド線維形成を抑制することを見出しており、タンパク質の構造と機能の知見に貢献するだけでなく、アミロイド病の疾患防止にも有用な知見を提供する成果である。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として十分に価値あるものと判定した。