

申請者	学科名	栄養学科	職名	教授	氏名	木本 眞順美
調査研究課題	乳幼児期アレルギーの新規な発症要因の検索と予防法の構築 (2)					
調査研究組織	氏名	所属・職		専門分野	役割分担	
	代表	木本眞順美	保健福祉学部・教授	代謝生化学 分子栄養学	・研究全般、総括 ・L-PGDSの精製	
	分担者	山本登志子	保健福祉学部・准教授	細胞生物学 脂質生化学	・乳中に分泌されるプロスタグランジン類の解析 ・食物アレルギーモデルマウスの作製と解析	
調査研究実績の概要	<p><b>【研究の目的】</b>                  プロスタグランジンD<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>)は、アラキドン酸カスケードにおけるPGH<sub>2</sub>からPGD合成酵素 (PGDSs) によって生成され、哺乳動物においては睡眠誘発や痛み応答の調節などの神経生理学的機能に関係している。同時に、末梢組織の肥満細胞やTh2リンパ球で活発に産生され、アレルギーや炎症反応のメディエーターとして働くが、その影響は複雑である。PGD<sub>2</sub>やその非酵素的代謝物が炎症の状況に応じて炎症を強めたり、逆に緩和するからである。私たちは先行研究において、牛乳中にL-PGDSならびにPGD<sub>2</sub>の存在を見いだした。さらにL-PGDSの存在量について、市販乳(正常乳)と乳房炎罹患牛の乳を比較した結果、乳房炎牛乳において明らかにL-PGDS濃度が上昇した。この事実から、乳中L-PGDS濃度が乳房炎のマーカーとなり、その微量定量法の開発は牛乳の品質管理にも利用できるものと期待される。本研究においては、乳中L-PGDSの定量系の構築とともに乳中L-PGDSの免疫応答への影響について研究するために、まず牛乳からL-PGDSを精製し、タンパク質学的な性質について精査した。</p> <p><b>【方法および結果】</b> 精製には、昨年度岡山県農林水産総合センター畜産研究所より供与された乳房炎牛乳Eを用いた。精製途中のL-PGDSの追跡は SDS-PAGE, ウェスタンブロットおよび酵素活性測定により行った。まず牛乳を遠心分離により脱脂乳とし、これから等電点沈殿によりカゼインを除き、乳清タンパク質を得た。次いで、タンパク質精製の常法である硫酸分画を行い、乳清タンパク質中の大部分のL-PGDSを硫酸60-80%飽和画分に回収した。この塩析・透析後の溶液をDEAE-Sepharoseカラムを用いたイオン交換クロマトグラフィー、次いでPhenyl-Sepharoseカラムによる疎水クロマトグラフィーに供した。牛乳をスタートとする4段階の精製ステップを経て、L-PGDSは活性収率35%、比活性において1600倍にまで精製された。精製酵素は、PGH<sub>2</sub>に対するKm値が37 μMで比活性は1.4 μmol/min・mg of proteinであり、至適pHは9であった。酵素学的な性質を比較したところ、これまでに精製されているラット (Km 14 μM, Vmax 4.0 μmol/min・mg) やヒト (Km 4 μM, Vmax 1.0 μmol/min・mg) のL-PGDSとほぼ同等の酵素活性であった。さらに精製度を上げるために糖タンパク質であることを確認後、糖タンパク質アフィニティークロマトグラフィーを行い、SDS-PAGEにおいて27 kDaに位置するほぼ単一のペプチドバンドとして得た。このようにして精製されたL-PGDSのN末</p>					

	<p>端アミノ酸分析を行い、-ALQPNFEEDKFLGRWFTSGL-20残基の配列が明らかとなった。本配列がウシのL-PGDS全一構造の29-49残基部分と一致したことから、牛乳中のL-PGDSは28残基のN末端ペプチドが除かれた分泌タンパク質であることが示された。精製酵素のペプシンならびにトリプシン消化に対する抵抗性を検討した結果、これらのプロテアーゼ、特にトリプシンに対して極めて高い安定性を示し、24時間処理後でも約半分の未消化物が残存し、酵素活性も約50%維持された。また、ウシ原乳の10分加熱処理においても、60°Cで100%、95°Cで40%の酵素活性を維持した。</p> <p>【考察ならびに今後の展望】以上のことから、牛乳中のL-PGDSは酵素として機能し、生体においてもPGD<sub>2</sub>産生に寄与する可能性が示された。さらに、乳房炎ウシ由来の原乳中では高いL-PGDS活性が認められており、牛乳による食物アレルギー反応において、本酵素によって産生されるPGD<sub>2</sub>がアレルギー性炎症の増幅因子として働く可能性が示唆された。現在、精製L-PGDSを用いて、モノクローナル抗体の作製に取りかかっているところであり、その成果をL-PGDSの微量測定系構築に繋げ、モデル動物を用いたアレルギー反応の解析プローブとすることが当面の課題となる。</p>
<p>成果資料目録</p>	<p>1. 第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2015) 講演要旨: 牛乳由来リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素の精製と酵素学的性質 ○田中充樹, 木本眞順美, 川井恵梨佳, 瀬来由衣, 戸田圭祐, 目賀拓斗, 川上祐生, 高橋吉孝, 山本圭, 村上誠, 山本-鈴木登志子</p> <p>2. 14th International Conference of Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases, Budapest, Hungary, July 12-15, 2015 Abstract: Purification and characterization of bovine lipocalin-type prostaglandin D synthase from cow's milk. ○Toshiko Suzuki-Yamamoto, Mitsuki Tanaka, Erika Kawai, Keisuke Toda, Yui Serai, Takuto Mega, Yuki Kawakami, Yoshitaka Takahashi, Kei Yamamoto, Makoto Murakami, Masumi Kimoto.</p>