



Title	組換えウシラクトフェリンNロープの作製とその特性に関する研究
Author(s)	中村, 一郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第5570号
Issue Date	2001-03-23
DOI	https://doi.org/10.11501/3182449
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32798
Type	doctoral thesis
File Information	5570.pdf



組換えウシラクトフェリンNローブの作製と
その特性に関する研究

畜産学専攻 博士後期課程

中 村 一 郎

目次	頁
第Ⅰ章 緒言	1～7
Ⅰ-1 多機能性蛋白質ラクトフェリン	1
Ⅰ-2 ラクトフェリンの生理機能	4
Ⅰ-3 ウシラクトフェリン N ロープ作製の意義	6
第Ⅱ章 方法	8～25
Ⅱ-1 試葉	8
Ⅱ-2 ウシラクトフェリン遺伝子の分離とクローニング	10
Ⅱ-3 大腸菌の形質転換	14
Ⅱ-4 プラスミドの調製	14
Ⅱ-5 DNA の塩基配列決定	14
Ⅱ-6 組換えラクトフェリンの発現系	15
Ⅱ-7 糖鎖の切断	20
Ⅱ-8 Sf-9 細胞破碎液による組換えラクトフェリンの分解	22
Ⅱ-9 組換えラクトフェリンの検出と定量	22
Ⅱ-10 抗菌活性の評価	23
Ⅱ-11 蛋白質の分子モデリング	24
第Ⅲ章 実験結果	26～42
Ⅲ-1 ラクトフェリン遺伝子	26
Ⅲ-2 大腸菌における組換えラクトフェリン N ロープの発現	30
Ⅲ-3 昆虫細胞系における発現	33
Ⅲ-4 植物ウイルス系における発現	42
第Ⅳ章 考察	43～55
Ⅳ-1 ラクトフェリン遺伝子	43
Ⅳ-2 大腸菌における組換えラクトフェリン N ロープの発現	45
Ⅳ-3 昆虫細胞系における組換えラクトフェリン N ロープの生産	47
Ⅳ-4 植物における有用蛋白質の作製	53
謝辞	56
参考文献	57～63
要旨	64～65

図表索引	頁
第Ⅰ章	
図Ⅰ-1 ウシラクトフェリンの立体構造	2
表Ⅰ-1 ウシラクトフェリンノドメイン構造	3
表Ⅰ-2 ウシラクトフェリンの生理機能	5
表Ⅰ-3 組換えラクトフェリン	7
第Ⅱ章	
図Ⅱ-1 ウシラクトフェリン N ロープ遺伝子のクローニングと大腸菌に おける発現プラスミドの構築	11
図Ⅱ-2 ウシラクトフェリン C ロープ遺伝子のクローニングと全長遺伝子 の作製	12
図Ⅱ-3 pASK-IBA2 および昆虫細胞系におけるラクトフェリン N ロープ 発現プラスミドの構築	16
図Ⅱ-4 昆虫細胞を宿主とする組換え蛋白質の生産	19
図Ⅱ-5 <i>Vicia faba</i> (ソラマメ)を宿主とする組換え蛋白質の生産	21
図Ⅱ-4 ウシラクトフェリンの大腸菌 O111 株に対する抗菌活性	24
表Ⅱ-1 合成オリゴヌクレオチドプライマーおよびアダプターの配列	25
第Ⅲ章	
図Ⅲ-1 制限酵素 <i>Pst</i> I による pGEM-LNf のカットチェック	26
図Ⅲ-2 pASK にクローニングしたラクトフェリン N ロープ(WT)の配列と その変異(K301E、S324P)	27
図Ⅲ-3 制限酵素 <i>Apa</i> I および <i>Xba</i> I による pGEM-Cr のカットチェック	28
図Ⅲ-4 ウシラクトフェリン遺伝子の配列(DDBJ AB046664)と 変異体(pGEM-bLf00)	29
表Ⅲ-1 大腸菌における組換えラクトフェリン N ロープの作製	31
図Ⅲ-5 pASK-IBA2 系で発現した組換えラクトフェリン N ロープの確認	32
図Ⅲ-6 pASK-IBA2 系における宿主大腸菌の生育阻害	32
図Ⅲ-7 昆虫細胞系における組換えラクトフェリン N ロープの発現 (細胞粗抽出液)	34

図Ⅲ-8 昆虫細胞系における組換えラクトフェリン N ロープの発現 (培養上清)	34
図Ⅲ-9 プラーク純化後の組換えラクトフェリン N ロープの移動度の変化	36
図Ⅲ-10 ウシラクトフェリン存在下での再感染	36
図Ⅲ-11 超遠心操作後の各層に含まれる組換えラクトフェリン N ロープと再感染能	37
図Ⅲ-12 組換えラクトフェリン N ロープの糖鎖切断	38
図Ⅲ-13 組換えラクトフェリン N ロープの宿主細胞破碎液による分解	38
図Ⅲ-14 固定化ヘパリンカラムによる組換えラクトフェリン N ロープの 部分精製(ウエスタンブロット)	39
図Ⅲ-15 固定化ヘパリンカラムによる組からラクトフェリン N ロープの 部分精製(銀染色)	39
表Ⅲ-1 固定化ヘパリンカラム溶出画分の抗菌活性	41
図Ⅲ-16 組換え植物ウイルス感染ソラマメ葉 PBS 抽出物中の 組換えラクトフェリン N ロープの検出	42
第Ⅳ章	
図Ⅳ-1 ウシラクトフェリン N ロープの立体構造	44
図Ⅳ-2 ウシラクトフェリンの立体構造	44
図Ⅳ-3 ウシラクトフェリンのヘパリン結合残基	51

第I章 緒言

I-1 多機能性蛋白質ラクトフェリン

乳は新生児(仔)の生育に必要な栄養の源であり、同時に未熟な生体防御機構を補い、その発達を促すさまざまな成分を含んでいる(山本 1983)。乳に含まれる生体防御成分には免疫グロブリン(IgG、IgA、IgM)、リゾチーム、ラクトフェリンといった蛋白質や、マクロファージやリンパ球、多形核白血球等の血球細胞があり、これらは特に初乳で高濃度に含まれていることから、新生児(仔)の正常な発育に極めて重要な役割を果たしていると考えられる。特にラクトフェリンは、消化管内における病原菌の感染と生育を阻害する他、血液中においては免疫系の間接伝達物質(メディエーター)のひとつになっていると考えられており、生体防御機構の調節機能が注目されている(高瀬 1994)。

I-1-1 ラクトフェリンの性質

ラクトフェリンは乳等の外分泌液に含まれる鉄結合性の糖蛋白質である。牛乳中に見出されたこの蛋白質は鉄を結合して赤色を呈することから milk red protein と呼ばれた(Sørensen 1938)。1960 年に Groves らによって分離法が示され(Groves 1960)、以来ヒト(Montreuil 1960)、マウス(Shirsat 1992)、ラクダ(Kappeler 1999)、水牛(Sharma 1998)、ヤギ(Le Provost 1994, Lee 1997)、ブタ(Chu 1993)、ウマ(Sharma 1998)などの乳中、ヒトの涙、唾液、気管支粘膜、精液、羊水、およびヒトとウシの好中球二次顆粒中に見出されている(Masson 1966)。分子量は概ね 80,000 Da で、ヒトでは 726 アミノ酸残基(Metz-Boutigue 1984, Rey 1990)、ウシでは 708 アミノ酸残基(Pierce 1991)からなる一本鎖のポリペプチドであり、乳汁中に分泌されるものは N 末端の 19 アミノ酸残基(リーダー配列)を欠いた成熟型ラクトフェリンである。ラクトフェリンは塩基性蛋白質で、ウシラクトフェリンの等電点は 8.2~8.9 の範囲にあり(Shimazaki 1993a)、酸性条件下で比較的強い熱耐性を示す(Abe 1991)。また、280 nm におけるウシラクトフェリンの吸光係数は $E_{280}^{1\%} = 15.1$ と報告されている(Groves 1960)。

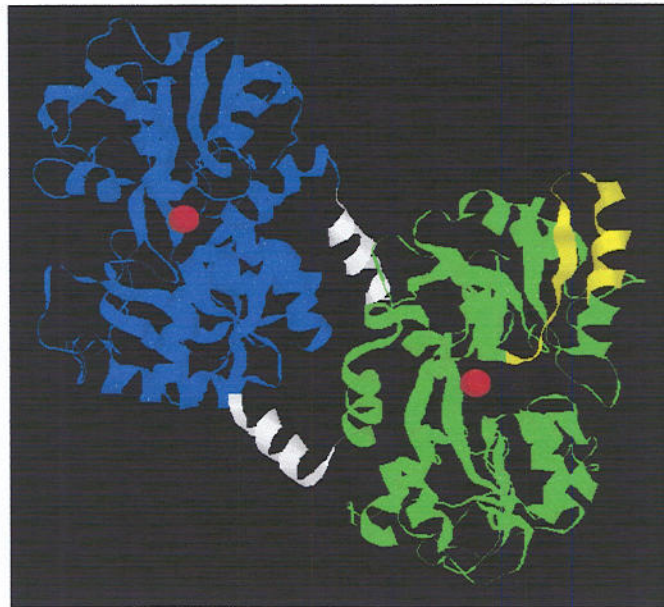


図 I -1 ウシラクトフェリンの立体構造

ウシラクトフェリンのペプチド主鎖構造(N24~R708)のリボンモデル。Nローブを緑、Cローブを青、ヒンジ領域とCローブの対応する領域(tail)を白で表した。また、鉄イオン(スペースフィルモデル)は赤で表した。ラクトフェリシンBに相当する部分(F36~F60)を黄色で示した。

I -1-2 ラクトフェリンの構造

ラクトフェリンはトランスフェリンファミリーに属する蛋白質であり、ペプチド主鎖は構造上相同性の高い二つの「ローブ」と呼ばれる構造からなる(Moore 1997, Anderson 1989)。両ローブはアミノ酸数残基からなる「ヒンジ領域」によって結ばれており、N末端側は「Nローブ」、C末端側は「Cローブ」と呼ばれる。Moore らによって決定されたウシラクトフェリンのペプチド主鎖の立体構造を図 I -1 に示した。各ローブは、立体構造に基づいてそれぞれ4つのフラグメントに細分することができる(表 I -1)。N_IフラグメントとN_{III}フラグメント、およびN_{II}フラグメントとN_{IV}フラグメントがそれぞれNローブの第一ドメイン、および第二ドメインを構成し、Cローブでも同様である。N_Vフラグメントはヒンジ領域であり、Cローブの最後尾の14個のアミノ酸残基は構造上ヒンジ領域に相当するのでC_Vフラグメントとした。

表 I-1 ウシラクトフェリンのドメイン構造

Component	fragment	residues
leader sequence	L	M1 – A19 (19)
N-lobe A20 – R351 (332)	N _I	A20 – T109 (90)
	N _{II}	H110 – P270 (161)
	N _{III} (cross over)	S271 – L339 (69)
	N _{IV} (run back)	G340 – R351 (12)
hinge region	N _V	E352 – R363 (12)
C-lobe V364 – C694 (331)	C _I	V364 – G451 (88)
	C _{II}	Y452 – A611 (160)
	C _{III} (cross over)	P612 – L680 (69)
	C _{IV} (run back)	G681 – C694 (14)
tail	C _V	S695 – R708 (14)

ウシラクトフェリンには N 型糖鎖が結合できる部位が 5 箇所確認されている(Pierce 1991)。実際には 3~4 本の N 型糖鎖を結合しており(Spik 1994, Moore 1997)、その結合位置は N ロープの 252 残基目のアスパラギン(N252)と C ロープの N387、N495、および N564 であって、N252 と N564 にはハイマンノースタイプ、N387 と N495 にはハイブリッドタイプの糖鎖が結合している。ラクトフェリンが持つ糖鎖の生理的な役割は現在のところ明らかになっていないが、組換えラクトフェリンの構造解析の結果から、糖鎖がラクトフェリンの立体構造形成には関与していないことが示されている(Day 1993)。

I-1-3 金属イオン結合

ラクトフェリンは蛋白質 1 分子あたり 2 分子の第 2 鉄イオン(Fe^{3+})を結合する。結合部位は各ローブの二つのドメインの間に形成される溝の内部にあり(図 I-1)、アスパラギン酸とヒスチジン各 1 残基、および 2 残基のチロシンが鉄イオンと相互作用している。結合には炭酸イオン(CO_3^{2-})や蓚酸イオン(OOC-COO^-)等の 2 価の陰イオンが必要であり、これらを介した鉄結合の様子は詳細に研究されている(Anderson 1989, Baker 1987)。それらによると、ラクトフェリンは他のトランスフェリンファミリーよりも強固に鉄を結合することが知られている。たとえば、血清トランスフェリンが pH 6~4 で鉄を放出する

のに対し、ラクトフェリンは pH 4~2 まで安定して鉄を結合している(Aisen 1972)。また、ラクトフェリンは鉄以外にも、銅(Hutchens 1991)、亜鉛(Yip 1994)、アルミニウム(Congiu-Castellano 1997)、ガリウム(Harris 1986)、バナジウム(Carmichael 1979)等の金属イオンを結合することが知られている。

I-1-4 リガンド結合

ラクトフェリンは金属イオン以外にもヘパリン(Mann 1994)、ferritin (Pahud 1976)、 β -lactoglobulin (Ena 1990)、DNA (Hutchens 1989)、lipopolysaccharide (LPS)(Miyazawa 1991, Appelmeik 1994)等の様々な生体物質と結合することが確認されている。また、Cibacron blue F3GA のような色素とも相互作用が認められている(Shimazaki 1991)。ラクトフェリンと特異的に結合するレセプターは、小腸上皮細胞(Cox 1979, Kawakami 1990)、肝細胞(Debanne 1985)、血球細胞(Bennett 1983, Brock 1997)、ある種の微生物(Dhaenens 1997, Naidu 1991, Schryvers 2000)等に見出されている。これらのリガンド結合およびレセプター結合に関与する部位は、多くが N ロープに存在すると考えられている(Rochard 1989, Ellass-Rochard 1995, Legrand 1992, Legrand 1997, Shimazaki 1998)。

I-2 ラクトフェリンの生理機能

ラクトフェリンは鉄を結合し、腸管細胞を経て血液中に移行しすることから、腸管からの鉄の吸収とその輸送および代謝に関与していると考えられている(Cox 1979)。一方、ラクトフェリンは幅広い範囲の微生物に対して抗菌活性を示すことが知られており(Arnold 1980, Ellison III 1994)、これは、環境中の鉄イオンを強く結合することによって微生物の生育に必要な鉄を制限するためと考えられている。更に、ラクトフェリンはグラム陰性細菌の菌体外膜に直接作用してその構成成分である LPS を遊離させ、膜の物質透過性を変化させることによって殺菌作用を示すと考えられている(Ellison 1988)。また、ウシおよびヒトラクトフェリンのペプシンで分解物の中には非常に強い抗菌活性を示す環状ペプチドが見出されており(Bellamy 1992)、それぞれラクトフェリン B (図 I-1)、およびラクトフェリン H と呼ばれている。ラクトフェリンは細菌だけでなく、種々の病原性ウイルスの細胞への感染を阻害することも報告されている(Swart 1998, Valenti 1998, 田中 2000)。

ラクトフェリンには直接的な抗菌活性の他にも、抗炎症作用(Baynes 1994)、免疫調節機能(Bullen 1979, Miyauchi 1997)、抗酸化活性(Britigan 1991)等が知られており、これらの機能は生体防御機構において重要な役割を果たしている。また、免疫応答や炎症反応においてはラクトフェリンが中間伝達物質として働いており、生体防御機構の調節に関与していると考えられる(Shimazaki 2000, Nuijens 1996)。ラクトフェリンを経口投与した場合、その一部が血液中に移行することが明らかにされており(Harada 1999, Hutchens 1989)、直接的な感染抑制と併せて本来動物が持つ生体防御機構を増強することで感染症の予防・治療に幅広く利用できると考えられる。また、ラクトフェリンが抗癌作用(Bezault 1994, Tanaka 2000)や細胞成長促進作用(Hagiwara 1995, Hashizume 1983)、更にある種の血球細胞に対するアポトーシス誘導作用(Yoo 1997)を持つことも報告されており、生体内で果たす役割は多岐にわたっている。ラクトフェリンのさまざまな生理機能と関与する諸性質を表 I-2 にまとめた。

表 I-2 ラクトフェリンの生理機能

N-lobe	鉄代謝の調整	鉄結合
	鉄輸送	レセプター結合
	抗菌作用	鉄結合
		LPS 結合
		抗菌ペプチド(ラクトフェリシン)
	抗酸化作用	各種リガンド結合(LPS, DNA, ferritin, heparin, etc)
	抗炎症作用	レセプター結合
C-lobe	抗癌作用	細胞増殖・細胞分化の誘導、アポトーシスの誘導
	免疫調整機能	各種金属イオン結合(Cu, Zn, Al, Ga, V)
	鉄代謝の調整	鉄結合
	鉄輸送	レセプター結合
	抗菌作用	鉄結合
	構造の安定化	鉄結合 分子内相互作用

I-3 ウシラクトフェリン N ロープ作製の意義

ラクトフェリンは乳に由来する蛋白質であり、副作用のない天然の薬品として搾乳牛の乳房炎等の難治性感染症の治療・予防やヒト、特に免疫疾患や免疫機能の未発達な乳児等への応用拡大が期待される。ラクトフェリンの持つ様々な生理機能を有効に利用するためには、分子内で各機能を担当する部位を特定してその機能を発揮するのに必要な構造を明らかにするとともに、多機能性蛋白質であるラクトフェリンが生体内でどのような作用機序で働き、それによって生体内でどのような生理反応が誘発されるのかといったことを詳細に理解する必要がある。ラクトフェリンは構造上相同性の高い二つの「ロープ」から構成されるので、これらを分離して各々の構造上および機能上の特性を明らかにする必要がある。これまでに蛋白質分解酵素を用いてラクトフェリンを分解して各ロープを分離する試みがなされてきたが、ウシラクトフェリンの C ロープの分離例は報告されているが、N ロープは酵素消化に対する感受性が強く (Shimazaki 1993b)、その分離は成功に至っていない。また現在までに様々な宿主を用いてヒト、ウシ、およびマウスの組換えラクトフェリンおよびラクトフェリンのフラグメントが作製されている(表 I・3)が、組換え蛋白質の構造に関する研究は進んでいるが、その生理機能についての報告は多くない。そこで本研究では、天然のラクトフェリンや酵素分解によって得られた C ロープとその構造、および機能上の相違を比較・検討することを目的として、ウシラクトフェリンの遺伝子をクローニングし、組換えラクトフェリン N ロープを作製した。

表 I -3 組換えラクトフェリン

	Host	Products	Reference
Yeasts	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	human Lf	Liang (1993)
	<i>Candida</i> sp.	bovine Lf (fragment)	Kim S. (2000)
Molds	<i>Aspergillus oryzae</i>	human Lf	Ward (1992 a)
	<i>Aspergillus nidulans</i>	human Lf	Ward (1992 b)
	<i>Aspergillus awamori</i>	human Lf	Ward (1995)
		murine Lf	Ward (1997)
Mammalian cells	Baby hamster kidney (BHK)	human Lf N-lobe	Day (1992)
		human Lf	Stowell (1991)
Insect cells	Human kidney (293 (S))	human Lf	Van Barkel (1995)
		bovine Lf	Salmon (1997)
	<i>Spodoptera frugiperla</i> (Sf-9)	murine Lf	Matsuura (2000)
	<i>Mamestra brassicae</i>	bovine Lf	Lopez (1997)
Transgenic animal	<i>Mus musculus</i>	human Lf	Nuijens (1997)
		human Lf	Kim S. J. (2000)
Transgenic plants	<i>Nicotiana tabacum</i> (tobacco)	human Lf	Mitra (1994)
	<i>Oryza sativa</i> v. <i>japonicum</i> (rice)	human Lf	Anzai (2000)
	<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomato)	human Lf	Anzai (2000)
	<i>Solanum tuberosum</i> (potato)	human Lf	Arakawa (1998)

第Ⅱ章 実験方法

Ⅱ-1 試薬

ウシラクトフェリン(牛乳由来)は森永乳業(東京)で精製されたもの(lot. 980427)を使用した。核酸抽出試薬および逆転写酵素は Life Technologies Japan (東京)の Trizol™ Reagent および SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase をそれぞれ使用した。mRNA の分離には PerSeptive Biosystems (Framingham, MA, USA)の BioMag® mRNA Purification Kit を使用した。合成オリゴヌクレオチドヌクレオチドおよびプロモータープライマー(表Ⅱ-1)は全て Sigma Genosys Japan (石狩)において合成したものを使用した。polymerase chain reaction (PCR)には Perkin Elmer Japan (浦安)の Ampli Taq Gold™を使用した。TA クローニングベクターは Promega Japan (東京)の pGEM-T と pGEM-T Easy、および Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)の pCR2.1 を使用した。DNA のライゲーションおよび末端平滑化には宝酒造(大津)の DNA ligation kit ver. 1 または ver. 2 および DNA blunting kit をそれぞれ使用した。大腸菌における発現ベクターは Quiagen (Valencia, CA, USA) の pQE13 に制限酵素 *Apa* I の認識配列を組み込んだ pQE13L、Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) の pET20b、Amersham-Pharmacia biotech (Uppsala, Sweden)の pGEX-2T、および Sigma Genosys Japan (石狩)の pASK-IBA2 を使用した。各種制限酵素はニッポンジーン(東京)、New England Biolabs (Beverly, MA, USA)、東洋紡績 (大阪)、または B ringer Mannheim (Mannheim, Germany)の製品を使用した。形質転換に用いた大腸菌(*Escherichia coli*)の培地は Difco Laboratories (Detroit, MI, USA)の Bacto® Tryptone および Bacto® Yeast Extract を使用して調製するか、または Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA)の LB broth を使用した。抗生物質 ampicilin は萬有製薬(東京)の注射用ペントレックス®を使用した。RNA の分解には Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA)の ribonuclease A (RNaseA)を使用した。アガロースゲル電気泳動に用いた agarose はニッポンジーン(東京)の Agarose S を使用した。大腸菌における組換え蛋白質の誘導は、pQE13L、pET20b、pGEX-2T の *lac* プロモーターに対しては Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA)または和光純薬(大阪)の isopropyl- -thio-D-galactopyranoside (IPTG)を、pASK-IBA2 の *tet* プロモーターに対しては Sigma Genosys Japan (石狩)の anhydrotetracyclin (AHT)を添加して行った。pGEX-2T を用いて発現した組換え蛋白質の可溶化には Promega Japan (東京)の BugBuster® Reagen を使用した。昆虫細胞用の培地は Life Technologies Japan (東京)の Sf900-II SFM、Grace

培地および TC-100 を使用した。ウシ胎児血清(FCS)は Life Technologies Japan (東京)の製品を非動化して使用した。組換えウイルスの作製には昆虫ウイルス *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV)は BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)の Baculo Gold™ Baculovirus DNA およびシャトルベクター pVL1392 を使用し、Life Technologies Japan (東京)の Lipofectin® Reagent を使用して lipofection を行った。ブランクアッセイに用いた低融点アガロースは FMC bioproducts (Rockland, ME, USA)の SeaPlaque® agarose を使用した。蛋白質の糖鎖切断酵素は ProZyme (San Leandro, CA, USA)の Glycopro® deglycosylation kit を使用した。このキットには Peptide N-glycosidase F (PNGase F)、Sialidase A™、Endo-O-glycosidase、bovine fetuin、denaturation solution (2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 M 2-mercaptoethanol (2ME))が含まれている。昆虫細胞系で作成した組換えラクトフェリン N ロープの精製には Amersham-Pharmacia biotech (Uppsala, Sweden)の HiTrap®-heparin および HiTrap®-chelating を使用した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)における蛋白質の色素染色には関東化学(東京)の coomassie brilliant blue (CBB)、または和光純薬(大阪)の Quick-CBB を使用した。銀染色には和光純薬(大阪)の銀染色試薬「第一」または 2D 銀染色試薬 II・「第一」を使用した。分子量マーカーは Amersham-Pharmacia biotech (Uppsala, Sweden)の LMW marker kit または rainbow marker を使用した。転写後の膜の金コロイド染色には Amersham-Pharmacia biotech (Uppsala, Sweden)の Auro Dye forte™を、ブロッキングには Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA)の bovine serum albumin (BSA)または cold fish gelatin (CFG)を使用した。ラクトフェリンに対する抗体は抗ラクトフェリン(ウサギ)抗血清(Shimazaki 1991)、および北海道大学農学部酪農科学講座で作製した抗ラクトフェリンモノクローナル抗体(Shimazaki 1996, Shimazaki 1998b)および抗ラクトフェリン C ロープモノクローナル抗体(Shimazaki 1998b)を使用した。また、抗 *Schizocytozoma japonica* glutathione-S-transferase (GST)(ウサギ)抗体、horseradish peroxidase (HRP)標識抗ウサギ Ig (ヤギ)抗体、HRP 標識抗マウス Ig (ウサギ)抗体、alkaline phosphatase (AP)標識抗ウサギ Ig (ヤギ)抗体、AP 標識抗マウス Ig (ウサギ)抗体は和光純薬(大阪)または Zymed laboratories (San Francisco, CA, USA)の製品を使用した。HRP 標識 streptavidin はニチレイ(東京)のヒストファイン SAB-PO(R)キットを使用した。ニトロセルロース膜上の HRP の活性を検出するにはコニカ(東京)のコニカ イムノステイン HRP-1000、または Amersham-Pharmacia biotech (Uppsala, Sweden)の ECL™を使用した。抗菌活性測定における *E. coli* O111 の培地は栄研化学(東京)のハート

インフュージョン寒天培地、Difco Laboratories (Detroit, MI, USA)の Bacto® Hert Infusion Broth および和光純薬(大阪)のポリペプトンを使用した。その他の試薬は特級、生化学用、または難溶性蛋白質研究用の試薬を使用した。

II-2 ウシラクトフェリン遺伝子の分離とクローニング

II-2-1 N ロープ遺伝子のクローニング

ウシ乳腺細胞を出発材料として、ラクトフェリン遺伝子を調製した。屠殺直後のウシ乳房より乳腺細胞を含む組織約 1 cm³ を切り出し、液体窒素中で凍結して使用時まで -80℃で保存した。組織片は凍結した状態で秤量し、液体窒素中で粉末状に破碎してトリゾール試薬(1 ml/g 組織)を用いて全 RNA を抽出し、次いで DynaBeads を用いて mRNA を分離した。これをテンプレートとし、ウシラクトフェリン N ロープに特異的な合成オリゴヌクレオチド(表 II-1 RT)をプライマーとして一本鎖相補 DNA (sscDNA)を合成した。この sscDNA をテンプレートとし、合成オリゴヌクレオチド(表 II-1 Lf/S_Bcl, Lf/AS_Apa)をプライマーとして PCR を行い、ラクトフェリン N ロープ遺伝子を増幅した。PCR の条件は成書(Sambrook 1989, Ausubel 1995)に従ったが、プライマーのアニリング温度は使用したプライマーの塩基組成によって調整した。この PCR 産物を TA クローニングベクター pGEM-T にクローニングし、ラクトフェリン N ロープ遺伝子を導入したプラスミド LfN/T を作製した(図 II-1)。また、別の合成オリゴヌクレオチド(表 II-1 LfN/S_Nco, LfN/AS_Eco)をプライマーとして PCR を行い、増幅された遺伝子を pGEM-T に導入して作製したプラスミドを pGEM-N16 とした(図 II-1)。

LfN/T および pGEM-N16 にクローニングした A20~K358 をコードするラクトフェリン N ロープ遺伝子はリーダー配列(M1~A19)およびヒンジ領域の一部(A359~R363)を欠いている。これらの部分を付加するために、リーダー配列およびヒンジ領域の不足部分のアミノ酸をそれぞれコードする合成オリゴヌクレオチド(表 II-1 bLfS1, bLfNAS)をプライマーとし、LfN/T に由来する発現ベクター LfN/pET20b (後述 II-8)をテンプレートとして PCR を行った。この PCR 産物を TA クローニングベクター pGEM-T Easy に導入し、リーダー配列とヒンジ領域を付加したラクトフェリン N ロープ遺伝子を組み込んだプラスミド pGEM-LNf を作製した(図 II-1)。

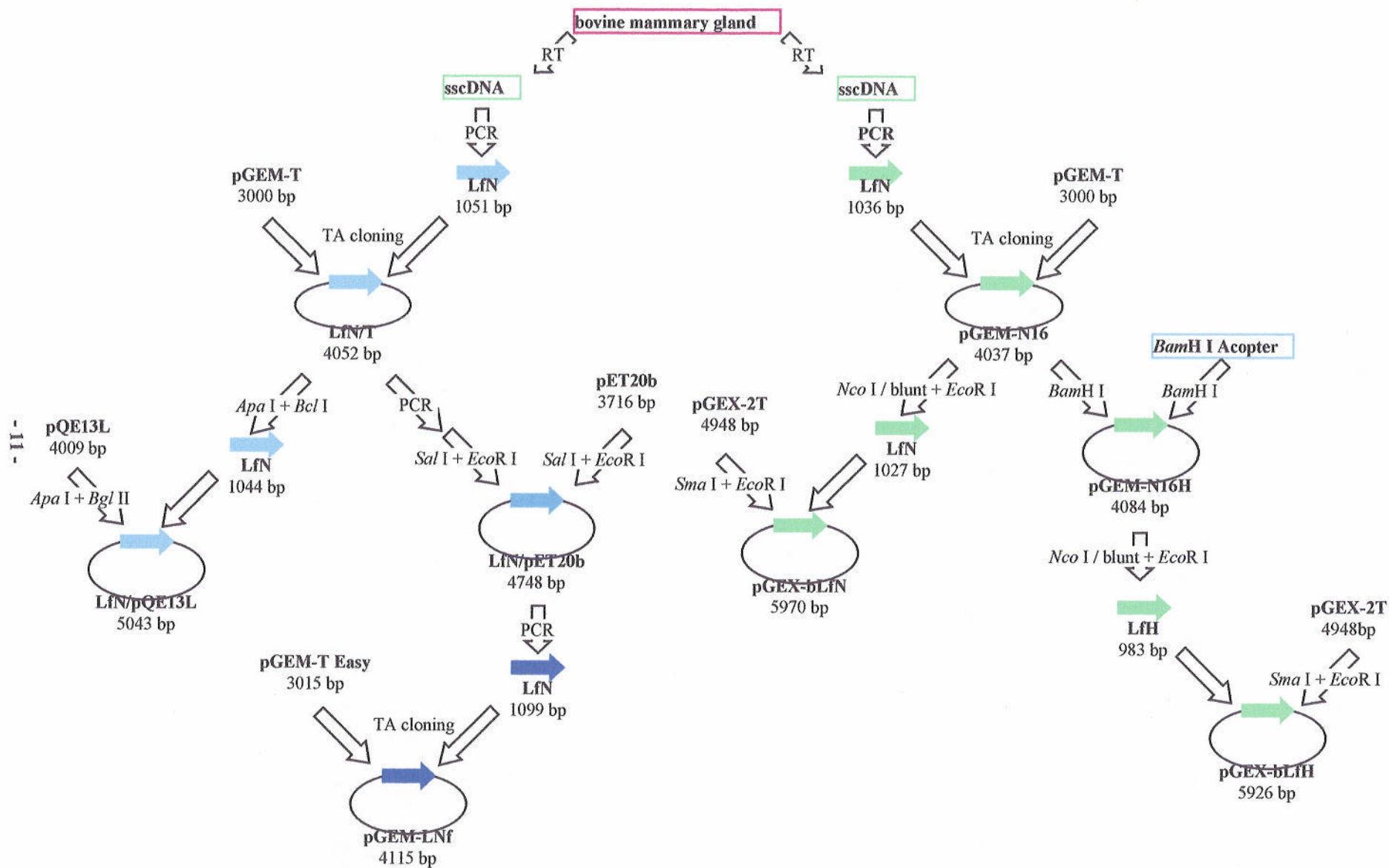


図 II-1 ラクトフェリンNローブ遺伝子のクローニングと大腸菌における発現プラスミドの構築

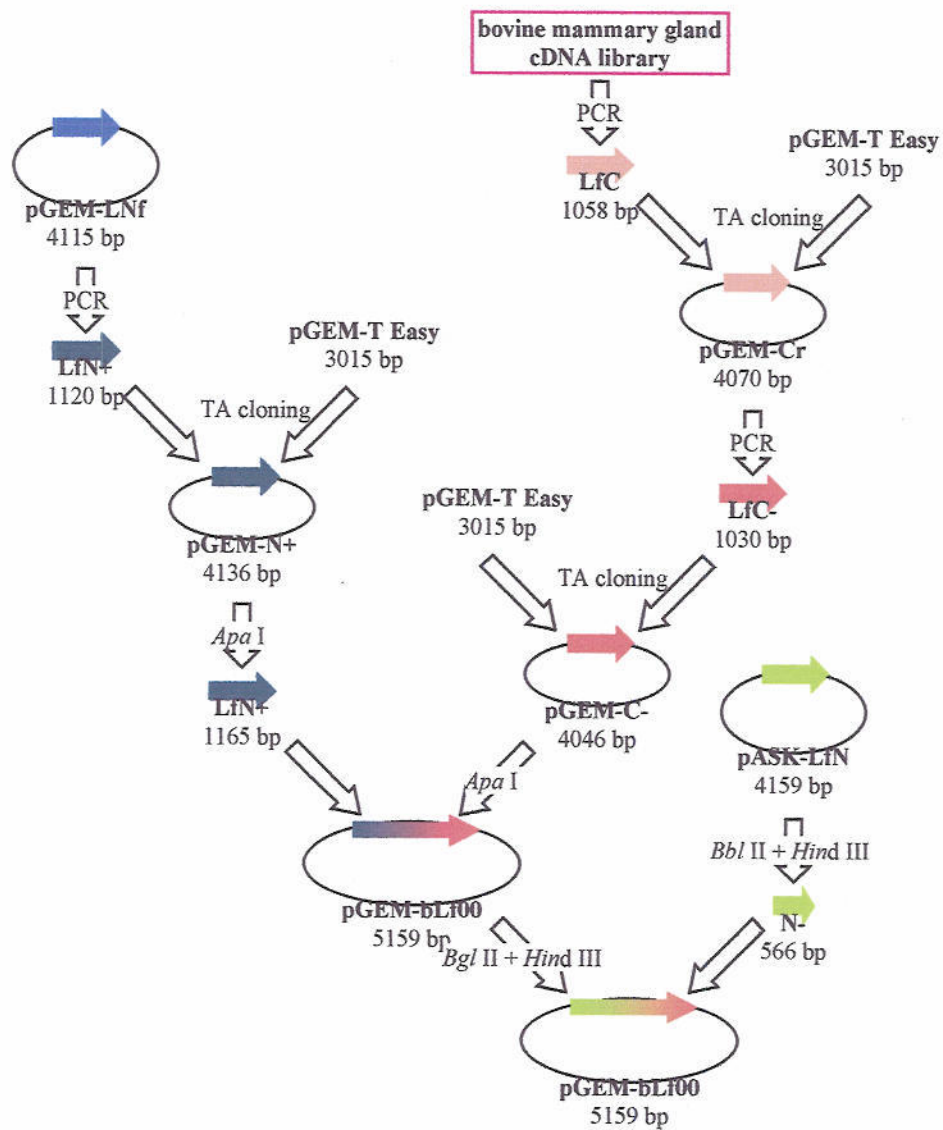


図 II -2 ラクトフェリンCローブ遺伝子のクローニングと全長遺伝子の作製

Ⅱ-2-2 Cローブ遺伝子のクローニング

ウシ乳腺細胞のcDNAライブラリー(λファージ)は農林水産省家畜衛生試験場北海道支場臨床生化学研究室の渡辺淳氏から供与されたものを使用した。ウイルス液は沸騰水浴中で5分間加熱処理して熱変性を行い、これをテンプレートとし、目的遺伝子に特異的な合成オリゴヌクレオチド(表Ⅱ-1 bLfCS、bLfAS)をプライマーとしてPCRによりラクトフェリンCローブ遺伝子を増幅した。増幅された約1 kbpのPCR産物をpGEM-T Easyに導入し、ラクトフェリンCローブ遺伝子を組み込んだプラスミドをpGEM-Crとした(図Ⅱ-2)。

Ⅱ-2-3 ウシラクトフェリン全長遺伝子の作製

完全長のウシラクトフェリン遺伝子作製のフローチャートを図Ⅱ-2に示す。pGEM-LNfをテンプレートとしてCローブのN末端7アミノ酸残基をコードするプライマー(表Ⅱ-1 bLfAS1112)を用いてPCRを行った。この時370残基目(G370)のコドンでggAからggCに変更することによりコドンの読み枠を変更することなく、またコードするアミノ酸を変えることもなく制限酵素 *Apa* I の認識配列を組み入れた。PCR産物はpGEM-T Easyに導入した。また、これと同じ変異を導入した合成オリゴヌクレオチドプライマー(表Ⅱ-1 bLfS1107)を合成し、pGEM-CrをテンプレートとしてPCRを行い、制限酵素 *Apa* I の認識配列を組み込んだウシラクトフェリンCローブ遺伝子を作製してpGEM-T Easyに導入した。これらのNローブおよびCローブ遺伝子を導入したプラスミドのうち挿入遺伝子がそれぞれ正方向にクローニングされたものを制限酵素 *Apa* I で切断し、ウシラクトフェリンNローブ遺伝子をコードする約1 kbpのDNA断片と、Cローブ遺伝子を含む約4 kbpのベクターをそれぞれ精製した。この両者を組み合わせて完全長のウシラクトフェリン遺伝子を作製し、この遺伝子が導入されたプラスミドをpGEM-bLf00とした。このラクトフェリン遺伝子はアミノ酸の置換を伴う変異(S144P)を持っていた(後述 第3章Ⅲ-1、第4章Ⅳ-1)ので、これを野生型に戻すためにpGEM-bLf00を制限酵素 *Bgl* II および *Hind* III で切断し、ここに同じ制限酵素を用いてpASK-LfN(WT)(後述Ⅱ-6-1、第3章Ⅲ1-1)から調製した566 bpの遺伝子断片を挿入した。遺伝子断片が正しい方向に挿入され、野生型ラクトフェリン遺伝子を持つプラスミドをpGEM-bLf01とした。

II-3 大腸菌の形質転換

大腸菌の形質転換には塩化カルシウムコンピテントセル法(Sambrook 1989)を用いた。宿主菌株として、クローニングには大腸菌 JM109 株または XL1-blue 株を、組換え蛋白質の発現には大腸菌 TG-1 株、DH5 α 株、または BL21 株を用いた。形質転換した大腸菌は 100 μ g/ml の ampicilin を含む LB 培地(1% bacto tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl)中で、37℃で振盪培養(160 rpm)し、対数増殖期終期($OD_{660} = 0.8 \sim$)に達した培養液に終濃度 15%(v/v)の glycerol を加えて-80℃で保存した。

II-4 プラスミドの調製

大腸菌からのプラスミドの調製にはアルカリミニプレップ法(Sambrook 1989)を用いた。プラスミドを含む大腸菌は 37℃で振盪培養(160 rpm)し、対数増殖期終期から定常期に達した培養 2 ml を遠心分離(4,000 rpm、10 分、4℃)して菌体を回収し、-80℃で凍結した。凍結した菌体を 100 μ l の Soln. I (50 mM glucose, 25 mM tris-(hydroxymethyl)-amino methane (Tris), 10 mM ethylenediaminetetraacetate (EDTA), pH 8.0)に懸濁し、30 分間氷冷して菌体外膜を破壊した。ここに 200 μ l の Soln. II (0.2 N NaOH, 1% SDS)を加え、激しく混和した後 30 分間氷冷して菌体蛋白質を変性させた。次に 150 μ l の Soln. III (3 M KOAc, 2 M Ac-OH)と 10 μ l のクロロホルムを加えて激しく混和し、4℃で遠心分離(15,000 rpm、15 分)して上清を回収した。ここに RNase A を加え、室温で 3 時間反応させて RNA を分解した後、フェノール・クロロホルム抽出により除蛋白を行い、イソプロパノール沈殿を行ってプラスミドを回収した。プラスミドは 70%(v/v)エタノールで濯いだ後 TE8.0 (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)に溶解し、アガロースゲル電気泳動(Ausubel 1995)を行って RNA が除かれたことを確認した。また、260 nm における吸光度を測定して次式(Ausubel 1995)により dsDNA の濃度を求めた。

$$c = OD_{260} / 200$$

c: dsDNA 濃度(mg/ml)

この方法で得たプラスミドは使用時まで-20℃で凍結保存した。

II-5 DNA の塩基配列決定

プラスミドにクローニングされたラクトフェリン遺伝子の DNA 塩基配列は

ABI-Prism™ model 310 を用いてダイターミネーター法(Takumi 1997)により確認した。使用した各プロモータープライマー(T7、SP6、M13F(-20)、M13R)、およびラクトフェリン遺伝子に特異的な合成オリゴヌクレオチドヌクレオチドプライマー(bLfS240、bLfS516、bLfCS、bLfS1695、bLfAS1788、bLfNAS)の配列は表Ⅱ-1 に示した。

Ⅱ-6 組換えラクトフェリンの発現系

Ⅱ-6-1 大腸菌系

pQE13L における組換え蛋白質の合成にはベクター由来の転写開始コドンを使用するので、挿入する目的遺伝子は成熟型ラクトフェリンの N ロープ(A20~K358)とした。LfN/T を制限酵素 *Bcl* I および *Apa* I で処理して 1044 bp の挿入配列を作製し、制限酵素 *Bgl* II および *Apa* I で切断した pQE13L に組み込んで発現ベクター LfN/pQE13L を作製した(図Ⅱ-1)。目的蛋白質の誘導は super broth (1.5% tryptone, 1% yeast extract, 1% NaCl)中、最終濃度 0~0.25 mM の IPTG を添加し、37℃で数時間振盪培養して行った。

pET20b においても組換え蛋白質の合成にはベクター由来の転写開始コドンを利用するので、発現させるラクトフェリン N ロープは成熟型の A20~K358 とし、LfN/T をテンプレートとし、制限酵素 *Eco*R I の認識配列と thrombin の認識配列をコードする配列を組み込んだセンスプライマー(表Ⅱ-1 LfPET/S)、および制限酵素 *Sal* I の認識配列と停止コドンを組み込んだアンチセンスプライマー(表Ⅱ-1 LfPET/AS)を用いて PCR を行い挿入配列を作製した。これを各制限酵素で処理した後に、同じ制限酵素で処理した pET20b に組み込んで発現ベクター LfN/pET20b を作製した(図Ⅱ-1)。組換え蛋白質の誘導は LfN/pQE13L と同様にして行った。

pGEX-2T においては組換え蛋白質は N 末端側に日本住血球虫(*Schizocytosoma japonica*) GST を持つ融合蛋白質として発現するので、ここでも発現させるラクトフェリン N ロープは成熟型の A20~K358 とした。pGEM-N16 を制限酵素 *Nco* I で処理した後に T4 DNA polymerase を用いて末端平滑化を行い、更に制限酵素 *Eco*R I で処理して 1027 bp の挿入配列を作製した。これを制限酵素 *Sma* I および *Eco*R I で切断した pGEX-2T に組み込んで発現ベクター pGEX-bLfN を作製した(図Ⅱ-1)。また、制限酵素 *Bam*H I の認識配列、Thrombin の認識配列および 6 分子のヒスチジン(His-Tag)をコードする合成オリゴヌクレオチド(表Ⅱ-1 HisTag Adapter)を作製し、これを制限酵素 *Bam*H I で処理した後に pGEM-N16 の *Bam*H I サイトに組み込み、その後 pGEX-bLFN を作製した。

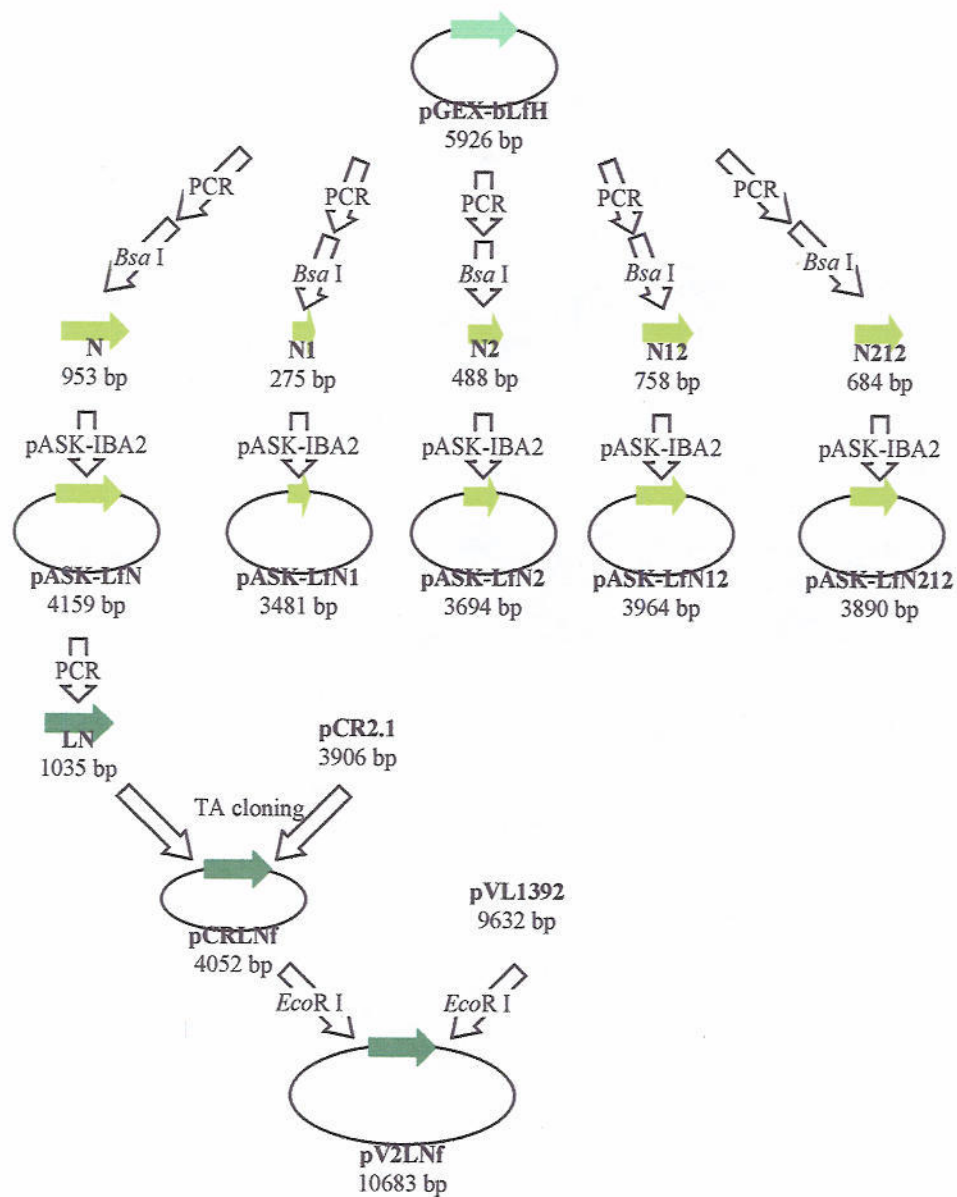


図 II -3 pASK-IBA2および昆虫細胞系におけるラクトフェリンNローブ発現プラスミドの構築

のと同様の処理を行って GST-bLfN 融合蛋白質の C 末端に His-Tag を導入した組換え蛋白質を発現するためのベクター pGEX-bLfN を作製した(図 II -1)。組換え融合蛋白質の誘導は LB 培地中、37℃で振盪培養し、対数増殖期中期($OD_{600} = 0.25$)に最終濃度 0.2 mM の IPTG を添加して行った。

pGEX-bLfN をテンプレートとして、発現ベクター pASK-IBA2 において発現させるためのラクトフェリン N ロープの各フラグメントの遺伝子を調製した。使用したプライマーは制限酵素 *Bsa* I の認識部位を組み込んだ合成オリゴヌクレオチド(表 II -1 SLfN, SLfN2, ASLfN1, ASLfN2, ASLfN)で、ラクトフェリン N ロープ(A20~P330)は SLfN と ASLfN を、 N_I フラグメント(A20~T109)は SLfN と ASLfN1 を、 N_{II} フラグメント(H110~P270)は SLfN2 と ASLfN2 を、 N_I および N_{II} フラグメント(A20~P270)は SLfN と ASLfN2 を、そして $N_{II} \sim N_{IV}$ フラグメント(H110~P330)は SLfN2 と ASLfN を用いて PCR を行って増幅した。増幅した各遺伝子は制限酵素 *Bsa* I で切断し、同じ酵素で処理した pASK-IBA2 に導入して各発現ベクター(それぞれ pASK-LfN, pASK-LfN1, pASK-LfN2, pASK-LfN12 および pASK-LfN212)を作製した(図 II -3)。それぞれの発現ベクターを組み込んだ宿主大腸菌は、LB 培地中 37℃で一晩振盪して予備培養を行った。これを LB 培地 5 ml あたり 50 μ l 接種して振盪培養し、対数増殖期中期($OD_{600} = 0.25$)に最終濃度 200 ng/ml の AHT を加え、1~5 時間振盪培養を続けて組換えラクトフェリン N ロープおよび各組換えラクトフェリン N ロープフラグメントの誘導を行った。組換え蛋白質を発現した宿主大腸菌は氷冷し、遠心(4℃、4,000 rpm、10 分)して菌体を集めた。この菌体を氷冷した buffer W (100 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)で 2 回洗浄したのちに buffer P (500 mM sucrose / buffer W)に懸濁し、氷上で 30 分間静置した後、遠心(4℃、15,000 rpm、15 分)して上清(ペリプラズム成分)と沈殿(細胞質成分)をそれぞれ回収した。

II-6-2 昆虫細胞系

宿主として鱗翅目夜蛾科の昆虫(*Spodoptera frugiperda*)由来の培養細胞 Sf-9 を使用した。細胞の維持には Grace 培地に 10%の FCS と 50 μ g/ml の kanamycin および 50 μ g/ml の streptomycin を添加して濾過滅菌したものを使用し 27℃で静置培養した。培地交換は 4 日毎に行い、細胞が単層状に増殖した時点で継代した。

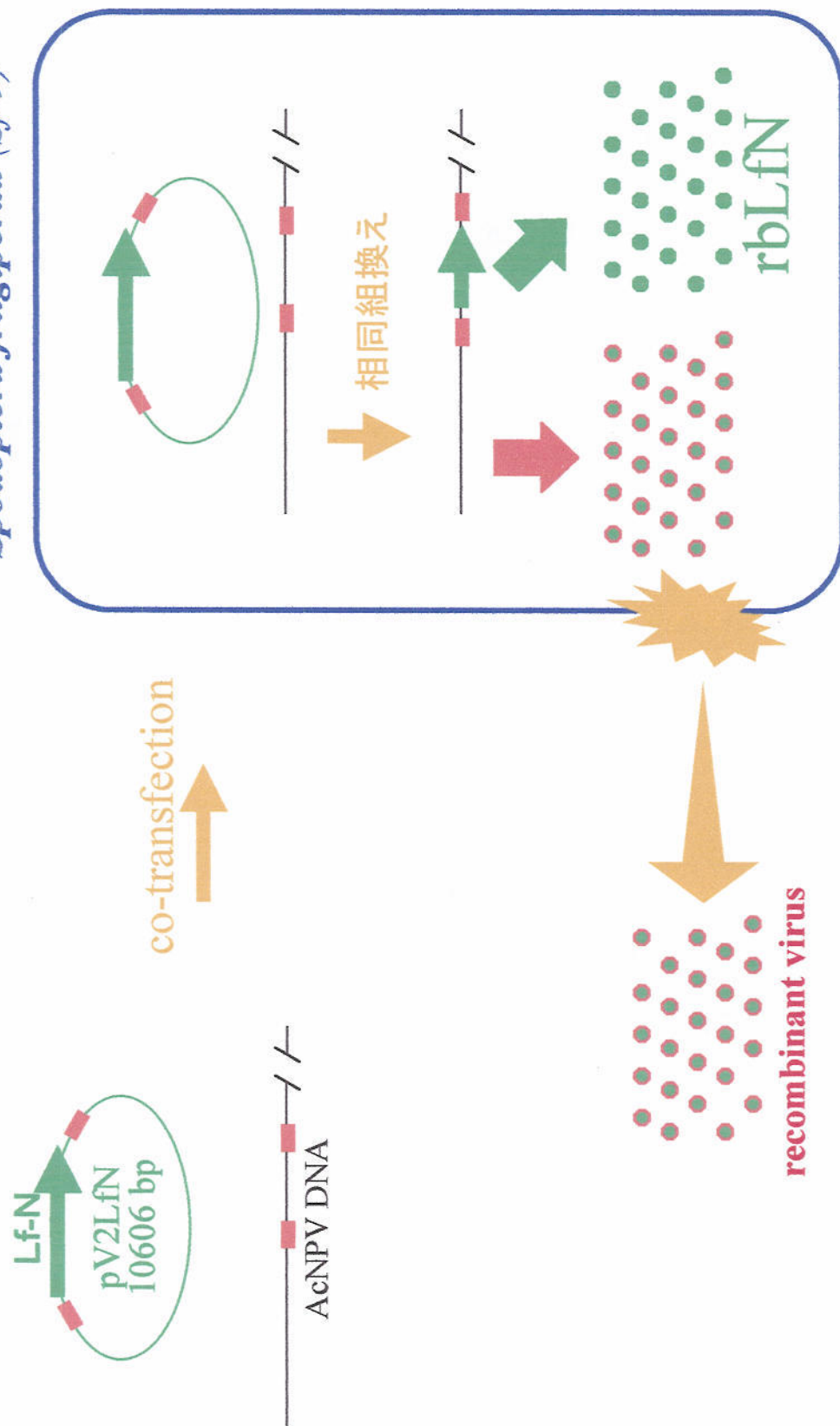
ラクトフェリン遺伝子のベクターには pVL1392 を用いた。ラクトフェリンのリーダー配列の遺伝子を組み入れたセンスプライマー(表 II -1 bLfS1)とアンチセンスプライマー(表 II -1 bLfAS1035)を用い、pASK-LfN(WT)をテンプレートとして PCR によって増幅し

た遺伝子をクローニングベクターpCR2.1 にクローニングした(pCRLNf)。ここでクローニングされた遺伝子は配列内に制限酵素 *EcoR* I の認識配列を持たないので、これを *EcoR* I で処理して得た 1051 bp の挿入配列を pVL1392 の *EcoR* I サイトに組込んで形質転換用ベクターpV2LNf を作製した。このベクターの構築戦略を図 II -3 に示す。また、ラクトフェリン全長遺伝子の発現ベクターは、ラクトフェリン N ロープ遺伝子を挿入したプラスミドの *Bam*HI サイトに、pGEM-bLf01 から *Bam*HI および *Xba*I によって切り出した 1047 bp の遺伝子断片を組み込んで作製した(pV2bLf)。このベクターの構築戦略を図 II -3 に示す。また、図 II -4 に昆虫細胞系における組換え蛋白質の作製の概略を示す。プラスミドに組み込んだ目的遺伝子は AcNPV と混合し、lipofection 法(Felgner 1987)によって宿主細胞に導入して組換えウイルスを作製した。細胞は 27℃で 4 日間培養し、組換えウイルスを含む培養上清を回収した。培養上清は濾過滅菌し、ウイルス原液として使用時まで 4℃で保存した。

Sf-9 細胞における形質転換および組換え蛋白質の誘導には無血清培地 Sf900-II SFM に 50 µg/ml の kanamycin および 50 µg/ml の streptomycin を添加したものを使用した。宿主細胞は組換えウイルスを感染させるまでに二回以上無血清培地で継代培養し、概ね 80%コンフルエントに増殖した時点で感染させた。組換えウイルスを感染させた宿主細胞は 27℃で 4 日間培養し、細胞および培養上清をそれぞれ回収した。組換えウイルスと組換え蛋白質を含む細胞および培養上清は使用時までそれぞれ-80℃および 4℃で保存した。

ラクトフェリン N ロープ遺伝子を組み込んだ組換えウイルス(LfN/AcNPV)の単一プラーク分離にはプラークアッセイ法(Ausubel 1995)を用いた。6 穴培養プレート(内径 35 mm)または細胞培養プレート(内径 35 mm)に一穴あたり $2 \sim 3 \times 10^6$ 個の宿主細胞を播種し、室温で 1 時間静置して細胞を付着させた。希釈した組換えウイルスを感染させ(室温、1 時間)、ウイルス希釈液を除いた後に約 37℃に冷却した 1%低融点アガロース/TC-100 培地(10% FCS、50 µg/ml kanamycin を含む)を一穴あたり 2 ml 加え、アガロースが固化してから 1 ml の TC-100 培地(10% FCS、50 µg/ml kanamycin を含む)を重ねてプレートを密閉容器に入れ、27℃で 3 日間培養した。感染 3 日後に 0.01% neutral red を一穴あたり 2 ml 加え、更に一日培養を継続して非感染細胞を染色した。ウイルスが感染して炸裂した細胞とその周辺部分をパスツールピペットでアガロースごと回収し、それぞれ宿主細胞に感染させて組換えウイルスを感染させ、数回増幅を繰り返した。

Spodoptera frugiperda (Sf-9)



図Ⅱ-4 昆虫細胞を宿主とする組換え蛋白質の生産

組換えウイルスを感染させた宿主細胞の培養上清中に分泌された組換えラクトフェリン N ロープを、HiTrap®-heparin カラムを用いて部分精製した。組換えラクトフェリン N ロープを含む培養上清をカラムに通した後、カラム体積の 10 倍量の培地を用いて非吸着成分を洗浄した。次に 1.5 ml の PBS(138 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 3.2 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄)で吸着した成分を溶出し、更にカラム体積の 10 倍量の PBS を用いてカラムの洗浄を行った。次いで、各 1.5 ml の 0.1、0.2、0.3、0.5 および 1.0 M NaCl/PBS でカラムに吸着した成分の溶出を行った。各溶出画分は使用時まで 4℃で保存した。

II-6-3 植物ウイルス系

マメ科植物のソラマメ(*Vicia faba*)を宿主植物として外来遺伝子を発現させる植物ウイルスベクター(Masuta 2000、上田 2000)は、北海道大学農学部植物病原学グループ(上田一郎教授)において開発されたベクター系である。このベクター系では外来遺伝子をクローバー葉脈黄化ウイルス(Takahashi 1997)の構成蛋白質と共にポリジーンとして発現させ、翻訳後に遺伝子産物が分解されて目的蛋白質が作製される(図 II-5)。本研究では、このベクターに pGEM-LNf をテンプレートとして作製したラクトフェリン N ロープ遺伝子を組み込んで宿主ソラマメの葉に接種し、組換え植物ウイルスを作製した。

II-7 糖鎖の切断

Glycopro® deglycosylation kit を使用して、昆虫細胞系で発現した組換えラクトフェリン N ロープの糖鎖を解析した。組換えウイルス感染後 4 日目の培養上清に 1/20 容の denaturation solution を加えて 100℃で 5 分間処理して蛋白質を変性させ、1/50 容の Triton X-100 (TX100)を加えて余分な SDS を除いた。ここに PNGase F、Sialidase A、および Endo-O-Glycosidase を加えて 37℃で 3、12、および 72 時間糖鎖分解反応を行い、-20℃で凍結することによって酵素反応を停止した。糖鎖分解反応後の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)における移動度の変化をウエスタンブロッティングによって検出した。対照実験として、ウシ fetuin および牛乳由来のラクトフェリンを用いた。これらは 37℃、3 時間の糖鎖分解反応を行った後 SDS-PAGE を行ない、ゲルを CBB で染色して蛋白質の移動度の変化を検出した。

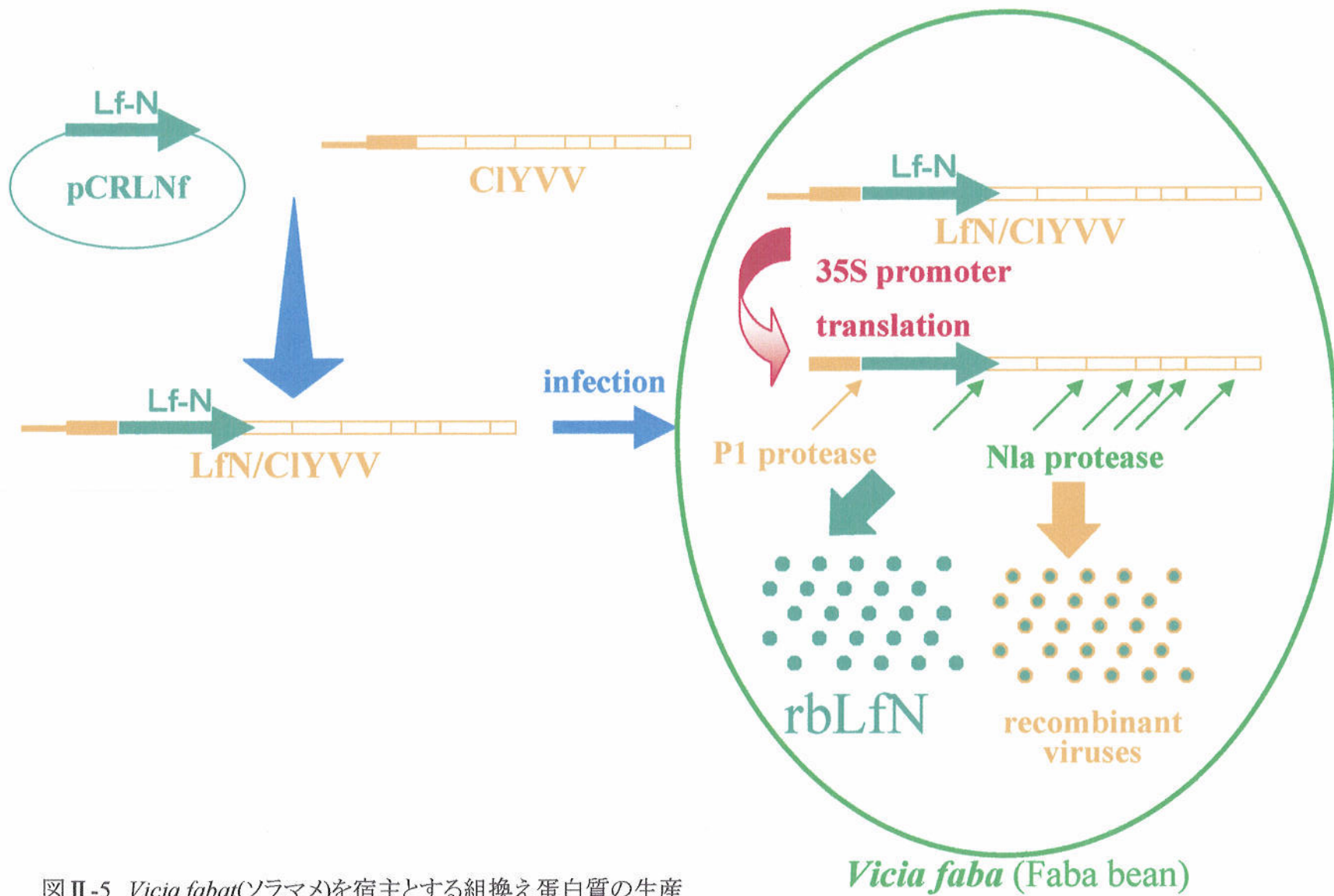


図 II-5 *Vicia faba*(ソラマメ)を宿主とする組換え蛋白質の生産

II-8 Sf-9 細胞破碎液による組換えラクトフェリンの分解

宿主細胞の破碎液は無血清培地中で4日間培養した健常細胞(約 6×10^6 個)に無血清培地 1 ml を加え、凍結融解($-85^{\circ}\text{C}/37^{\circ}\text{C}$)を三回繰り返して細胞を破碎した後、遠心分離(15,000 rpm, 10 min, 4°C)して上清を回収した。組換えラクトフェリン N ロープを含む培養上清 150 μl に対し、宿主細胞破碎液 15 μl を加え、 27°C で 24、72、および 96 時間反応させ、 -85°C で凍結することによって反応を停止した。反応後の組換えラクトフェリン N ロープの分子量の変化をウエスタンブロッティングによって検出した。

II-9 組換えラクトフェリンの検出と定量

II-9-1 SDS-PAGE

SDS-PAGE(Maniatis, 1989)には厚さ 1 mm の不連続ミニスラブゲルを使用した。分離ゲルには 10%、12%、12.5%、13%または 15%のポリアクリルアミドゲルを、濃縮ゲルには 4.5%ポリアクリルアミドゲルをそれぞれ用いた。電気泳動はゲル一枚あたり 10 mA の定電流で通電した。電気泳動で分離した蛋白質は固定液(35% methanol / 10 % acetic acid)で固定し、CBB で染色した。また、より微量の蛋白質の検出には銀染色(Sambrook 1989)を行った。

II-9-2 ウエスタンブロッティング

SDS-PAGE で分離した蛋白質のニトロセルロース膜への転写(Sambrook 1989)にはセミドライ式のエレクトロブロッター(アトー、AE6670)を使用した。転写は膜 1 cm^2 あたり 2 mA の定電流で 90 分間通電して行った。ブロッキングには 2.5%(w/v) BSA または 2%(v/v) CFG を使用した。ブロッキングと抗原抗体反応は何れも phosphate buffered saline-Tween 20 (PBST: 0.05%(v/v) Tween 20/PBS)中、室温で 30 分間穏やかに振盪して(40 ~ 50 rpm)反応させた。

pASK-IBA2 を用いて大腸菌で発現した StrepTag 融合蛋白質の検出には HRP で標識したストレプトアビジン(HRP-SA)を使用した。融合蛋白質を転写したニトロセルロース膜は 2.5%(w/v) BSA でブロッキングし、PBST 中、室温で穏やかに振盪(40 ~ 50 rpm)して HRP-SA を反応させた。膜上の HRP 活性の検出にはコニカイムノステイン染色試薬を使用した。

II-9-3 ドットブロットと ELISA

昆虫細胞系で作製し、培地中に分泌された組換えラクトフェリンはドットブロットによって定量した。培地中に含まれる蛋白質を 96 穴ドットブロッター(トーヨーロ紙、DP-96)を用いてニトロセルロース膜に吸着させ、ブロッキングには 2%(v/v) CFG を使用した。抗ラクトフェリン抗体および二次抗体はウエスタンブロッティングで使用したものと同一である。膜上の HRP 活性の検出にはコニカイムノステイン染色試薬を用いた。発色した膜をデジタルカメラで撮影し、Scion Image (Scion Co.)を用いてスポットのシグナル強度を解析した。

組換えラクトフェリンの定量には抗ラクトフェリン(ウサギ)抗血清をプレーティング抗体として、抗ラクトフェリンモノクローナル抗体を一次抗体として用いたサンドイッチ ELISA も用いた。ブロッキングには 2%(v/v) CFG を使用し、AP 標識した二次抗体を使用した。抗原抗体反応はすべて PBST 中 37℃で行い、反応後には自動プレート洗浄機(バイオラッド、Model 1575)を使用して PBST で洗浄した。マイクロプレートの 1 穴あたりに基質溶液(30 mM *p*-nitrophenyl phosphate (PNP)と 110 mM Glycine/1.1 mM MgSO₄/1.1 mM ZnSO₄を 1:9 で混合)を 200 μl 加え 37℃で 30 分間反応させた後に停止液(200 mM EDTA)を 1 穴あたり 100 μl 加え、マイクロプレートリーダー(ワコー、SpectraFluoro/Plus)で 405 nm における吸光度を測定した。

II-10 抗菌活性の評価

大腸菌 O111 株に対する抗菌活性測定はマイクロプレートアッセイ法 (Kimura 2000)で行った。検定菌は heart infusion broth 中、37℃で静置培養し、24 時間おきに 2 回継代したものを使用した。ethyleneoxide gas 滅菌した 96 穴マイクロプレート上で濾過滅菌した試料 50 μl と 2% peptone 50 μl を混合し、ここに 1% peptone で希釈した検定菌を 1 穴あたりの最終菌量が $4 \sim 5 \times 10^4$ cfu/ml となるよう植菌した。マイクロプレートは 37℃で 5~7 時間静置培養し、マイクロプレートミキサー (イウチ、NS-P) で数秒間攪拌した後、マイクロプレートリーダー (トーソー、MPR-A4i II) で 600 nm における吸光度、即ち培養液の濁度を測定した。この方法で牛乳由来のウシラクトフェリンの抗菌活性を測定すると、minimal inhibitory concentration (MIC)値は約 5%(w/v)と求められた(図 II-4)ので、陽性対照としてこの濃度のウシラクトフェリンを使用し、この活性を 100%として組換えラクトフェリンの抗菌活性を評価した。

II-11 蛋白質の分子モデリング

蛋白質の分子モデルの作成には、RasMol (RasWin Molecular Graphics Windows ver. 2.6) を使用した。X 線結晶構造解析のデータは、Protein Data Bank (PDB)に登録されているウシラクトフェリンのデータ(Moore 1997)を使用した。

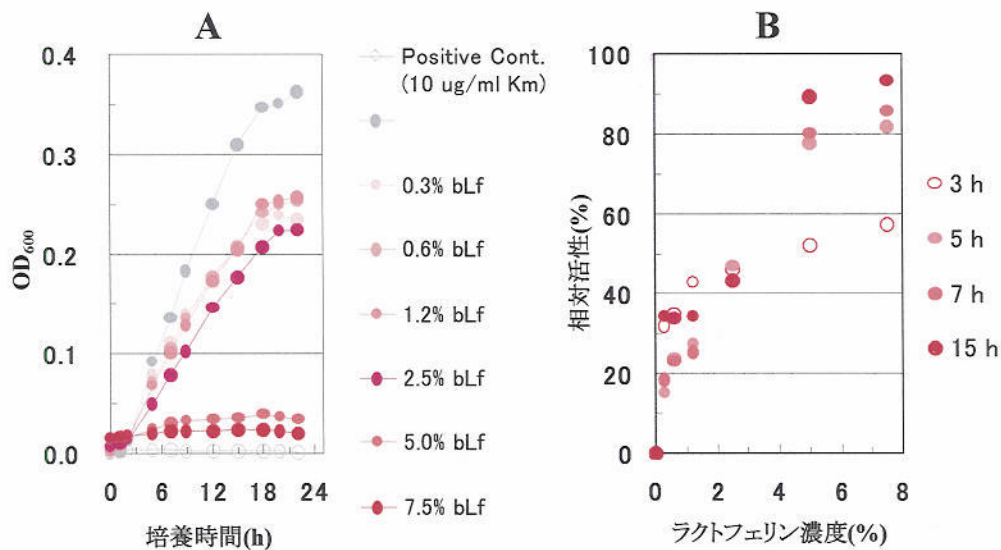


図 II-4 ウシラクトフェリンの大腸菌O111株に対する抗菌活性

大腸菌O111株に対するウシラクトフェリンの抗菌活性を、マイクロプレートアッセイ法により測定した。検定菌の成長曲線(A)と培養開始から3、5、7、15時間後のラクトフェリン濃度に対する抗菌活性(10 μ g/ml カナマイシンを100%とする相対活性)(B)を示した。

表Ⅱ-1 合成オリゴヌクレオチドプライマーおよびアダプターの配列

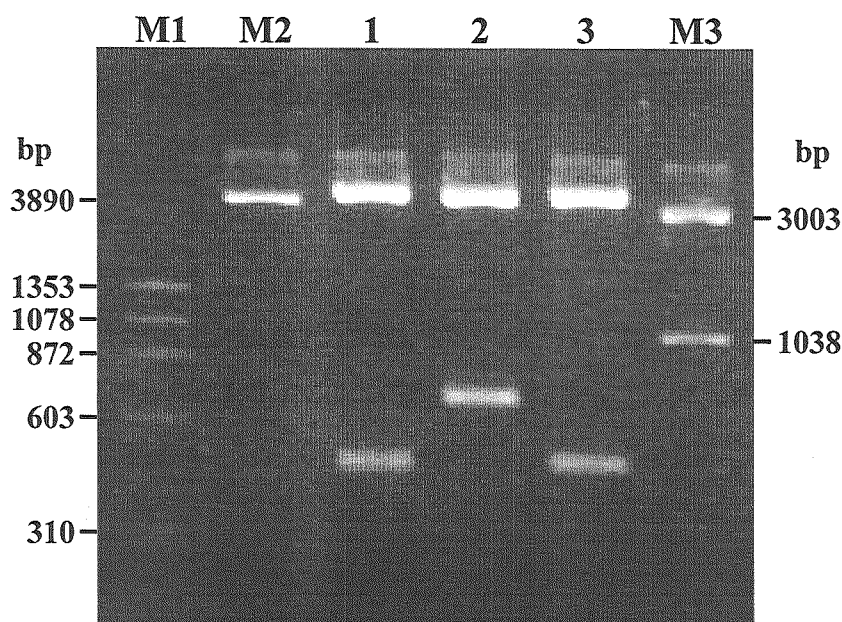
N	Name	Sequence
0.		
1	RT	5'-CACgACCCTgg-3'
2	Lf/S_Bcl	5'-TgATCACTggTgCCgCgCggCgCgCCCCgAggAAAAACgT T CgATgg-3'
3	Lf/AS_Apa	5'-gggCCCTTACTTCACCTCCTCCgCagT-3'
4	LfN/S_Nco	5'-gTCCCATggCCCCgAggAAAAACgTTCgATggTgTA-3'
5	LfN/AS_Eco	5'-gTgAATTCTTACTTCACCTCCTCCgCagTTTCCCT-3'
6	SLfN	5'-CgTgggTCTCgggCCgCCCCgAggAAAAACgTTCg-3'
7	SLfN2	5'-AgAgAggTCTCgggCCCACTATTATgCTgTggCCgT-3'
8	ASLfN1	5'-CggCCTTggTCTCagCgCTggTTTggggAgACTCTTTCgT-3'
9	ASLfN2	5'-CCACggTCTCagCgCTAgggACCTgggCCAgg-3'
10	ASLfN	5'-gATgggTCTCagCgCTgCCACgCggAACCAGggggATC-3'
11	bLfS1	5'-ATgAAgCTCTTCgTCCCCgCCCTgCTgTCCCTTggAgCCCT T ggACTgTgTCTggCTgCCCCgAggAAAAACg-3'
12	bLfNAS	5'-CCTCTAgATCCTggTgTACCgCgCCTTCACCTC-3'
13	bLfCS	5'-CACggCCgTCgTgTgTgTgCCgTgggACCT-3'
14	bLfAS	5'-TgTCTAgATTACCTCgTCaggAAggCgCaggC-3'
15	bLfAS1112	5'-gggCCCACggCACACCACACgACCCTggTgTACCgCg-3'
16	bLfS1107	5'-gggCCCTgAggAgC-3'
17	T7	5'-TAATACgACTCACTATAggg-3'
19	SP6	5'-ATTTAggTgACACTATAgAA-3'
20	M13F(-20)	5'-gTAAACgACggCCAg-3'
21	M13R	5'-CaggAAACAgCTATgAC-3'
22	bLfS240	5'-gCggCCAgTAGCagCagA-3'
23	bLfS516	5'-CCCCAACCTgTgTCAACT-3'
24	bLfS1695	5'-TATggCTATACCggggCT-3'
25	bLfAS1788	5'-CTCCATTCgTgTTCTCCC-3'
26	LfPET/S	5'-TTgAATTCgCTggTgCggCgCggCagCgCC-3'
27	LfPET/AS	5'-TTgTCgACTTACTTCACCTCCTCCgCag-3'
28	HisTag Adapter	5'-TTTTTTAggATCCCCCTggTTCCgCgTggCTCgCATCATCAT C ATCATCAITgAggATCCTTTTTT-3'

第Ⅲ章 結果

Ⅲ-1 ラクトフェリン遺伝子の調製

Ⅲ-1-1 ラクトフェリン遺伝子のクローニング

ラクトフェリン N ロープ遺伝子が挿入されたプラスミド LfN/T は 6 クローンについて制限酵素 *Apa* I および *Bcl* I によって挿入配列を切り出し、制限酵素 *Hind* III、*Bgl* II、および *Hinf* I による切断片のアガロースゲル電気泳動を行なって挿入配列が目的遺伝子であることを確認した。pGEM-N16 についてはマルチクローニングサイト付近の塩基配列から、挿入したラクトフェリン N ロープ遺伝子が SP6 プロモーターの転写方向に挿入されたものであることを確認した。また、プラスミド pGEM-LNf については制限酵素 *Pst* I による切断片の長さ(図Ⅲ-1)から、ラクトフェリン N ロープ遺伝子が T7 プロモーターの転写方向に挿入されたものであることを確認した。プラスミド pASK-LfN では導入したラクトフェリン N ロープ(A20~P330)の遺伝子が組み込まれた



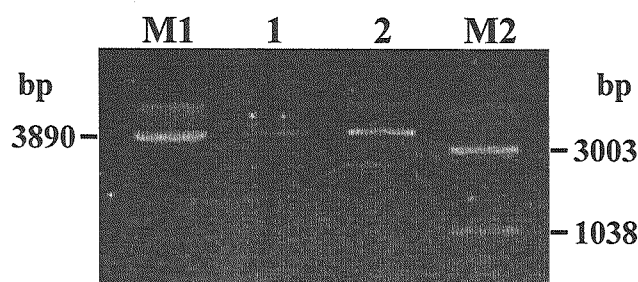
図Ⅲ-1 制限酵素 *Pst* I による pGEM-LNf のカットチェック

ラクトフェリン N ロープ遺伝子の挿入されたベクターが導入された 3 クローンについてプラスミドを調製し、制限酵素 *Pst* I により切断してアガロースゲル電気泳動を行ない各フラグメントの大きさを比較した。ラクトフェリン N ロープ遺伝子が T7 プロモーターの転写方向に挿入されたものは 500 bp の、SP6 プロモーターの転写方向に挿入されたものは約 760 bp の切断片が得られる。各レーンは M1; Φ X174 の *Hae* III による切断片(1353, 1078, 872, 603, 310 bp)、M2; pCR2.1 の *Eco*R I による切断片(3890 bp)、M3; pGEM-N16 の *Nco* I による切断片(3003, 1038 bp)、1~3; ラクトフェリン N ロープ遺伝子の挿入された pGEM-T Easy の *Pst* I による切断片。

	1	ATgAAAAgACA	gCTATCgCgATT	gCagTggCACTg	gCTggTTTCgCT	ACCgTAGCgCAG	gCCgCCCCgAgg	AAAAACgTTCgA	TggTgTACCATC	96
	1	M K K T	A I A I	A V A L	A G P A	T V A Q	A A P R	K N V R	W C T I	32
	97	TCCCAACCTgAg	TggTTCAAATgC	CgCCgATggCag	TggAggATgAAg	AAgCTgggTgCT	CCCTCTATCACC	TgTgTgAggAgg	gCCTTTgCCTTg	192
	33	S Q P E	W F K C	R R W Q	W R M K	K L G A	P S I T	C V R R	A F A L	64
	193	gAATgTATCCgg	gCCATCgCggAg	AAAAAggCggAT	gCTgTgACCCTg	gATggTggCATg	gTgTTTgAggCg	ggCCgggACCCC	TACAACTgCgg	288
	65	E C I R	A I A E	K K A D	A V T L	D G G M	V F E A	G R D P	Y K L R	96
	289	CCAgTAGCAgCA	gAgATCTATggg	ACgAAAAGgTCT	CCCCAAACCCAC	TATTATgCTgTg	gCCgTCgTgAAg	AAgggCAGCAAC	TTTCAGCTggAC	384
	97	P V A A	E I Y G	T K E S	P Q T H	Y Y A V	A V V K	K G S N	F Q L D	128
	385	CAGCTgCAAggC	CggAAgTCCTgC	CATACgggCCTT	ggCAGgTCCgCT	gggTggATCATC	CCTATgggAATC	CTTCgCCCgTAC	TTgAgCTggACA	480
	129	Q L Q G	R K S C	H T G L	G R S A	G W I I	P M G I	L R P Y	L S W T	160
	481	gAgTCACTCgAg	CCCCTCCAgggA	gCTgTggCTAAA	TTCTTCTCTgCC	AgCTgTgTTCCC	TgCATTgATAgA	CAAgCATACCCC	AACCTgTgTCAA	576
	161	E S L E	P L Q G	A V A K	F F S A	S C V P	C I D R	Q A Y P	N L C Q	192
	577	CTgTgCAAgggg	gAgggggAgAAC	CagTgTgCCTgC	TCCTCCCGggAA	CCATACTTCggT	TATTCTggTgCC	TTCAAgTgTCTg	CAGgACggggCT	672
	193	L C K G	E G E N	Q C A C	S S R E	P Y F G	Y S G A	F K C L	Q D G A	224
	673	ggAgACgTggCT	TTTgTTAAAgAg	ACgACAgTgTTT	gAgAACTTgCCA	gAgAAggCTgAC	AgggACCAgTAT	gAgCTTCTCTgC	CTgAACAACAgT	768
	225	G D V A	F V K E	T T V F	E N L P	E K A D	R D Q Y	E L L C	L N N S	256
	679	CgggCgCCAgTg	gATgCgTTCAAg	gAgTgCCACCTg	gCCCAGgTCCCT	TCTCATgCTgTC	gTggCCCgAAgT	gTggATggCAAg	gAAgACTTgATC	864
	257	R A P V	D A F K	E C H L	A Q V P	S H A V	V A R S	V D G K	E D L I	288
WT	865	TggAAgCTTCTC	AgCAAggCgCAG	gAgAAATCTggA	AAAAACAAGTCT	CggAgCTTCCAg	CTCTTTggCTCT	CCACCCggCCA	AgggACCTgCTg	960
K301E					g					
S324P					A					
WT	289	W K L L	S K A Q	E K F G	K N K S	R S F Q	L F G S	P P G Q	R D L L	320
K301E					E					
S324P					E					
WT	961	TTCAAAgACTCT	gCTCTTgggTTT	TTgAggATCCCC	CTggTTCCgCgT	ggCAGCgCTTgg	AgCCACCCgCAG	TTCgAAAAATAA		1044
K301E		T								
S324P		C								
K301E	321	F K D	A L G F	L R I P	L V P R	G S A W	S H P Q	F E K	end	347
S324P		S								
		P								

図Ⅲ-2 pASK にクローニングしたラクトフェリン N ロープ (WT) の配列とその変異 (K301E、S324P)

10 クローンを得た。各クローンについて挿入配列の塩基配列を確認したところ、8 クローンで野生型のラクトフェリン N ロープと同一の塩基配列であったが、他の 2 クローンでアミノ酸の置換を伴う 2 種類の変異が確認された(図Ⅲ-2)。ひとつ目の変異は 901 残基目(OmpA-ラクトフェリン融合蛋白質の翻訳開始コドン を 1~3 塩基目とする)がグアニン(g)であり N301E のアミノ酸置換を伴い、もうひとつは 970 残基目がシトシン(C)であって S324P のアミノ酸置換を伴っていた。これらを区別するために変異型の前者が導入されたプラスミドを pASK-LfN(301E)、後者を pASK-LfN(324P)、更に野生型のラクトフェリン N ロープ遺伝子が導入されたものを pASK-LfN(WT)とした。pASK-LfN1、pASK-LfN2、pASK-LfN12 および pASK-LfN212 では、導入された各フラグメントの遺伝子は野生型のものと同一であった。pCRLNfについては挿入遺伝子の塩基配列を確認した。その結果、挿入配列はリーダー配列を含むラクトフェリン N ロープの 1~1035 bp が T7 プロモーターの転写方向に挿入されたものであった。また、pGEM-Cr については制限酵素 *Apa* I および *Xba* I による切断片の長さ(図Ⅲ-3)からラクトフェリン C ロープ遺伝子が SP6 プロモーターの転写方向に挿入されたものであることを確認した。



図Ⅲ-3 制限酵素*Apa* I および *Xba* I による pGEM-Cr のカットチェック

ラクトフェリン C ロープ遺伝子の挿入されたベクターが導入された 1 クローンについてプラスミドを調製し、制限酵素 *Apa* I および *Xba* I により切断してアガロースゲル電気泳動を行ない各フラグメントの大きさを比較した。ラクトフェリン C ロープ遺伝子が T7 プロモーターの転写方向に挿入されたものは約 1 kbp と約 3 kbp の、SP6 プロモーターの転写方向に挿入されたものは約 4 kbp の切断片が得られる。各レーンは M1; pCR2.1 の *Eco* R I による切断片 (3890 bp)、M2; pGEM-N16 の *Nco* I による切断片 (3003, 1038 bp)、1; pGEM-Cr の *Apa* I による切断片、2; pGEM-Cr の *Apa* I および *Xba* I による切断片。

1 ATgAAgCTCTTC gTCCCCgCCCTg CTgTCCCTTggA gCCCTTggACTg TgTCTggCTgCC CgAggAAAAAC gTTCgATggTgT ACCATCTCCCAA 96
 97 CCTgAgTggTTC AAATgCCgCCgA TggCagTggAgg ATgAAgAAgCTg ggTgTCCCTCT ATCACCTgTgTg AggAgggCCTTT gCCTTggAATgT 192
 193 ATCCgggCCATC gCggAgAAAAg gCggATgCTgTg ACCCTggATggT ggCATggTgTTT gAggCgggCCgg gACCCCTACAAA CTgCggCCAgTA 288
 289 gCagCagAgATC TATgggACgAAA gAgTCTCCCCAA ACCCACTATTAT gCTgTggCCgTC gTgAAgAAgggC AgCAACTTTCAg CTggACCAgCTg 384
 bLf01 385 CAAggCCggAAg TCCTgCCATAgC ggCCTTggCAgg TCCgCTgggTgg ATCATCCCTATg ggAATCCTTCgC CCgTACTTgAgC TggACAgAgTCA 480
 bLf00 C
 481 CTCgAgCCCCTC CAgggAgCTgTg gCTAAATTCTTC TCTgCCAgCTgT gTTCCTgCATT gATAgACAAGCA TACCCCAACCTg TgTCAACTgTgC 576
 577 AAgggggAgggg gAgAACCAgTgT gCCTgCTCCTCC CgggAACCATAC TTCggTTATTCT ggTgCCTTCAAg TgTCTgCaggAC ggggCTggAgAC 672
 673 gTggCTTTTgTT AAAGAgACgACA gTgTTTgAgAAC TTgCCAgAgAAg gCTgACAgggAC CAgTATgAgCTT CTCTgCCTgAAC AACAgTCgggCg 768
 769 CCAgTggATgCg TTCAAggAgTgC CACCTggCCCAg gTCCCTTCTCAT gCTgTCgTggCC CgAAgTgTggAT ggCAAggAAgAC TTgATCTggAAg 864
 865 CTTCTCAgCAAg gCgCaggAgAAA TTTggAAAAAAC AAgTCTCggAgC TTCCAgCTCTTT ggCTCTCCACCC ggCCAgAgggAC CTgCTgTTCAAA 960
 961 gACTCTgCTCTT gggTTTTTgAgg ATCCCTCgAAg gTAgATTcggCg CTgTACCTgggC TCCgCTACTTg ACCACCTTgAAg AACCTCAgggAA 1056
 1057 ACTgCggAggAg gTgAAggCgCgg TACACCAgggTC gTgTggTgTgCC gTgggCCCTgAg gAgCAgAAgAAg TgCCAgCAgTgg AgCCAgCAgAgC 1152
 1153 ggCCAgAACgTg ACCTgTgCCAgC gCgTCCACCACT gACgACTgCATC gTCCTggTgCTg AAAgggAAgCA gATgCCCTgAAC TTggATggAggA 1248
 1249 TATATCTACACT gCgggCAAgTgT ggCCTggTgCCT gTCCTggCAGAg AACCggAAATCC TCCAAACAGAgT AgCCTAgATTgT gTgCTgAgACCA 1344
 1345 ACggAAgggTAC CTTgCCgTggCA gTTgTCAgAAA gCAAATgAgggg CTCACATggAAT TCTCTgAAgAC AAgAAgTCgTgC CACACCgCCgTg 1440
 1441 gACAggACTgCA ggCTggAACATC CCCATgggCCTg ATCgTCAACCAG ACaggCTCCTgC gCATTTgATgAA TTCTTTAgTCAG AgCTgTgCCCCT 1536
 1537 ggggCTgACCCg AAATCCAgACTC TgTgCCTTgTgT gCTggCgATgAC CAgggCCTggAC AAgTgTgTgCCC AACTCTAAggAg AAgTACTATggC 1632
 1633 TATACCggggCT TTCAggTgCCTg gCTgAggACgTT ggggACgTTgCC TTTgTgAAAAAC gACACAgTCTgg gAgAACACgAAT ggAgAgAgCACT 1728
 1729 gCAgACTgggCT AAgAACTTgAAT CgTgAggACTTC AggTTgCTCTgC CTCgATggCACC AggAAgCCTgTg ACggAggCTCAg AgCTgCCACCTg 1824
 1825 gCggTggCCCCg AATCACgCTgTg gTgTCTCggAgC gATAgggCAGCA CAgTgAAACAg gTgCTgCTCCgC CAgCAggCTCTg TTTgggAAAAAT 1920
 1921 ggAAAAAACTgC CCggACAAGTTT TgTTTgTTCAAA TCTgAAACCAAA AACCTTCTgTTC AATgACAACACT gAgTgTCTggCC AAAGTgAggC 2016
 2017 AgACCAACgTAT gAAgAATATTTg gggACAgAgTAT gTCACggCCATT gCCAACCTgAAA AAATgCTCAACC TCCCCgCTTCTg gAAgCCTgCgCC 2112
 2113 TTCCTgACgAgg TAA 2127

図Ⅲ-4 ウシラクトフェリン遺伝子の配列(DDBJ AB046664)と変異体(pGEM-bLf00)

Ⅲ-1-2 ラクトフェリン全長遺伝子の作製

pGEM-bLf00 の挿入配列の全長について DNA 配列を確認した(図Ⅲ-4)。その結果、得られた 5 クローンすべてについて、397 塩基目(ラクトフェリン遺伝子の翻訳開始コドン を 1~3 塩基目とする)がシトシン(C)、1895 塩基目がグアニン(g)であった。これらの変異によってコードされる蛋白質にはそれぞれ S133P と H632R のアミノ酸置換を生じると考えられる。S113P のアミノ酸置換を伴う変異を野生型に戻した pGEM-bLf01 を作製し、その挿入配列の全長についてセンス鎖、アンチセンス鎖とも DNA 配列を決定した(図Ⅲ-4)。その結果は日本 DNA データバンク (DDBJ) に登録した (Accession No. AB046664)。

Ⅲ-2 大腸菌における組換えラクトフェリン N ロープの発現

Ⅲ-2-1 大腸菌菌体内での発現

LfN/pQE13L ではラクトフェリン N ロープ遺伝子が正方向に挿入された 3 クローンを得たが、これらの各クローンの間では、平板培養した際のコロニーの外観および組換え蛋白質を誘導した時の宿主大腸菌の成長特性に差は見られなかった。ウェスタンブロットによって検出したところ、いずれのクローンにおいても組換え蛋白質を誘導した宿主菌体破碎液中に抗ラクトフェリン抗血清に反応するバンドは多数見られたが、約 40 kDa のバンドは誘導後に顕著に増加していた。LfN/pET20b ではラクトフェリン N ロープ遺伝子が正方向に挿入された 2 クローンを得たが、組換え蛋白質誘導後の培地に組換えラクトフェリン N ロープは見られず、組換え蛋白質は菌体内に蓄積していた。pGEX-bLfN および pGEX-bLfH でもそれぞれ数クローンを得たが、いずれのクローンでも組換えラクトフェリン N ロープは菌体内に蓄積した。大腸菌を宿主とした場合の組換えラクトフェリン N ロープの発現について、結果を表Ⅲ-1 にまとめた。

組換え蛋白質を発現する際の誘導条件について、培地の組成、培養温度(37、34、30、27、24、16℃)、誘導剤(IPTG)添加後の培養時間について検討したが、組換え蛋白質の発現量に関して特に変化は見られなかった。IPTG の濃度(0~0.5 mM)は 0.25 mM が最も効率的であった。一方、組換え蛋白質の誘導後の培地には抗ラクトフェリン抗血清に反応する蛋白質は見られなかった。また宿主菌体内に蓄積した組換え蛋白質はポリトロンホモジェナイザーによる破碎や超音波破碎などの物理的手段、および 0.05~2% TX100、

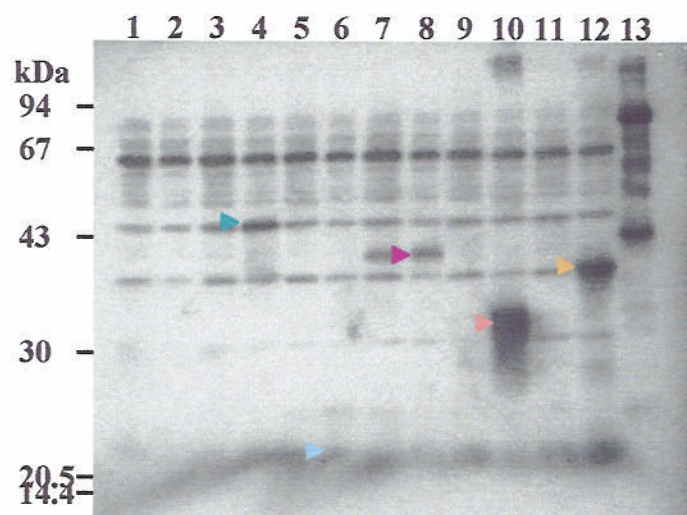
表Ⅲ-1 大腸菌における組換えラクトフェリン N ロープの作製

vector	host strain	plasmid	recombinant product	result
pQE13	TG-1	LfN/pQE13L	DHFRase-LfN	trace
pET20b	M15REP4	LfN/pET20b	pelB-LfN-His ₆	trace
pGEX-2T	DH5 α	pGEX-bLfN	GST-LfN	inclusion body
		pGEX-bLfH	GST-LfN-His ₆	inclusion body
		pASK-LfN	OmpA-LfN-StrepTagII	inclusion body
pASK-IBA2	BL21	pASK-LfN1	OmpA-N _I -StrepTagII	inclusion body host inhibition
		pASK-LfN2	OmpA-N _{II} -StrepTagII	inclusion body
		pASK-LfN12	OmpA-N _I N _{II} -StrepTagII	inclusion body host inhibition
		pASK-LfN212	OmpA-N _{II} N _{III} N _{IV} N _V -StrepTagII	inclusion body host inhibition

0.05~1% Tween20、1~2% Tween80 等の界面活性剤によって可溶化・抽出することはできなかった。組換え蛋白質は 1% TX100 によって洗浄した後の菌体から 6 M guanidine hydrochloride (GuHCl)、8 M 尿素、または 1% SDS によって抽出されたが、透析や希釈によって蛋白質変性剤の濃度を下げるとウエスタンブロッティングによって溶液中の組換えラクトフェリン N ロープを検出することはできなくなった。チオール還元剤として 2% 2ME または 10~100 mM dithiothreitol (DTT)を加えて 8 M 尿素によって抽出した組換えラクトフェリン N ロープは、10 mM 酸化型グルタチオンおよび 100 mM 還元型グルタチオンの存在下で透析によって段階的に尿素濃度を下げると溶液中から消失した。また、HisTag を付加した組換えラクトフェリン N ロープを 6 M GuHCl で抽出し、Ni³⁺または Co³⁺イオンを用いた金属キレートクロマトグラフィーによって融合蛋白質を精製することも試みたが、金属アフィニティーカラムから組換えラクトフェリン N ロープを回収することはできなかった。更に、pGEX-bLfN および pGEX-bLfH において発現した組換え融合蛋白質については BugBuster®による抽出法を試みたが、組換えラクトフェリン N ロープを可溶化することはできなかった。

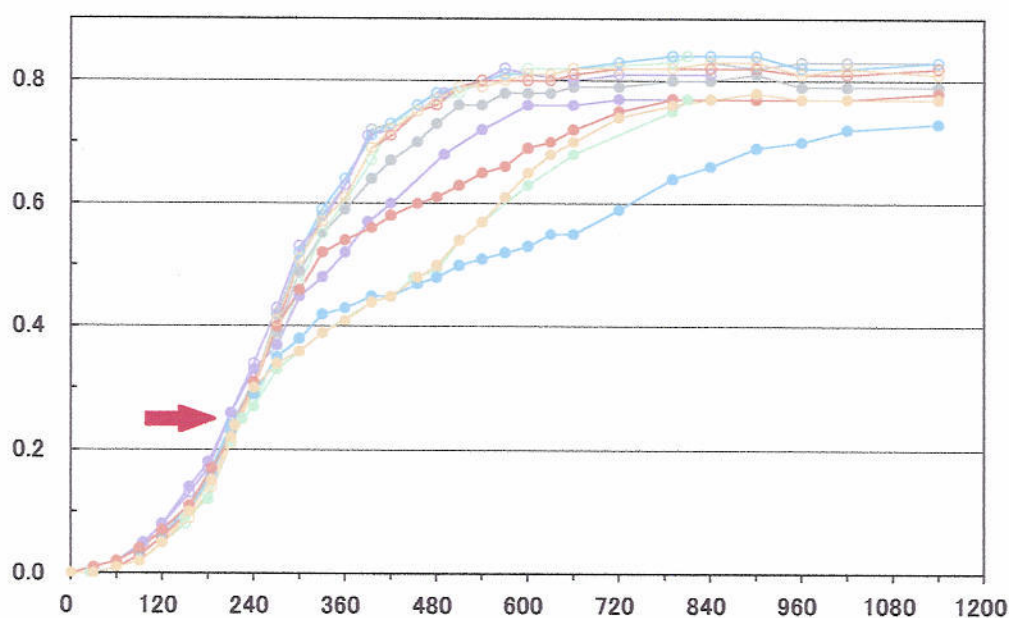
Ⅲ-2-2 組換えラクトフェリン N ロープのペリプラズム層への移行

pASK-IBA2 をベクターとして発現したラクトフェリン N ロープおよび各フラグメントは、SDS-PAGE における移動度がクローニングした各遺伝子の長さから期待されるものと一致することがウエスタンブロッティングによって確認された(図Ⅲ-5)。これらの組換え蛋白質は浸透圧ショック法によって調製したペリプラズム画分では検出できなかった。pASK-LfN、pASK-LfN1 および pASK-LfN212 を用いてラクトフェリン N ロープ



図Ⅲ-5 pASK-IBA2系で発現した組換えラクトフェリンNローブの確認

宿主大腸菌の粗抽出液中の各組換えラクトフェリンフラグメントを、抗ラクトフェリン抗血清を用いたウェスタンブロットにより検出した。各レーンは1; pASK-IBA2、非誘導、2; pASK-IBA2、誘導、3; pASK-LfN、非誘導、4; pASK-LfN、誘導、5; pASK-LfN1、非誘導、6; pASK-LfN1、誘導、7; pASK-LfN12、非誘導、8; pASK-LfN12、誘導、9; pASK-LfN2、非誘導、10; pASK-LfN2、誘導、11; pASK-LfN212、非誘導、12; pASK-LfN212、incuded、13; bovine lactoferrin (250 μ g)。



図Ⅲ-6 pASK-IBA2系における宿主大腸菌の生育阻害

各組換えラクトフェリンフラグメントを誘導した際の宿主大腸菌の生育曲線。誘導条件はLB中、27°C、振盪培養、OD₆₀₀が0.25に達したとき(⇒)に最終濃度 0.5 μ MのAHTを添加。○非誘導、●誘導、○●pASK-IBA2、○●pASK-LfN、○●pASK-LfN1、○●pASK-LfN12、○●pASK-LfN2、○●pASK-LfN212

ブ(A20~P330)、N_Iフラグメント(A20~T109)、およびN_{II}~N_{IV}フラグメント(H110~P330)を発現させた場合、誘導開始直後から約4時間後に渡って宿主大腸菌の増殖が停滞した(図Ⅲ-6)。pASK-LfN2 および pASK-LfN12 を用いて N_{II} フラグメントおよび N_I~N_{II} フラグメントを発現させた場合は、宿主大腸菌の生育阻害は他の三者に比べて弱かった。誘導開始後2~3時間の各宿主菌体からはそれぞれの組換えフラグメントがウエスタンブロットティングによって確認された(図Ⅲ-5)。

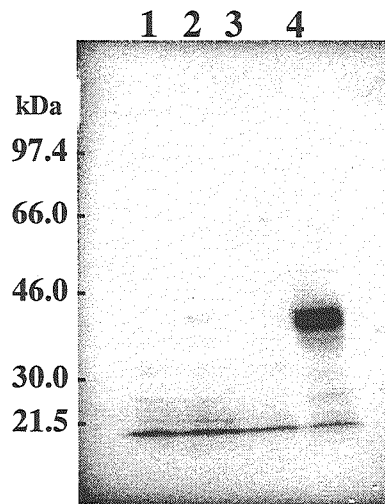
Ⅲ-3 昆虫細胞系における発現

Ⅲ-3-1 組換えラクトフェリン N ロープの検出

ラクトフェリン N ロープ遺伝子を導入した組換えウイルスを感染させて3日目の宿主細胞の粗抽出液についてウエスタンブロットティングを行なったところ、抗ラクトフェリンシモノクローナル抗体に反応する分子量約38 kDa および約35 kDa の蛋白質のバンドが検出された(図Ⅲ-7 lane 4)。また、感染後4日目以降の培地中には抗ラクトフェリン抗血清に反応する分子量約43 kDa の蛋白質のバンドが検出された(図Ⅲ-8 lane 2)。これらのバンドは組換えウイルスを感染させていない宿主細胞およびその培養上清では検出されなかった。また、感染後4日目に培養上清を回収した後に培地を交換して継続して培養を続けた場合には、7日目以降の培養上清で検出される組換え蛋白質は分子量38 kDa のものが優勢となった(図Ⅲ-8 lane 3~6)。ウエスタンブロットティングによって検出されたこれらバンドの移動度は、感染後3日目に宿主細胞中で検出されたものと一致した。光学顕微鏡による観察で組換えウイルス感染後7日目以降の宿主細胞は大部分が炸裂していることが確認された。

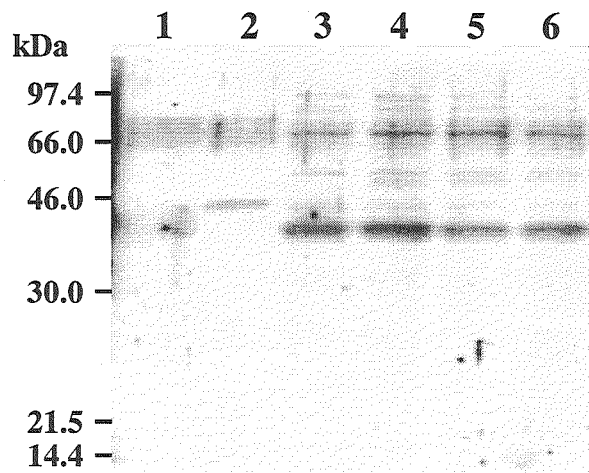
Ⅲ-3-2 組換えウイルスのプラーク純化

昆虫細胞系で生産される組換えラクトフェリン N ロープはポリアクリルアミドゲル電気泳動において移動度の異なる少なくとも3種類のバンドが検出された(図Ⅲ-7, 図Ⅲ-8)。これらの組換えラクトフェリン N ロープが、感染させた組換えウイルスが単一プラークでないことによって生じたものである可能性があるので、ラクトフェリン N ロープ遺伝子を導入した組換えウイルスのプラーク純化を行い、発現する組換えラクトフェリン N ロープに違いが見られるか検討した。純化した5プラークのうちウイルスの高力価の2プラーク(それぞれ 4×10^7 および 4×10^8 plaque forming unit (pfu)/ml)につい



図Ⅲ-7 昆虫細胞系における組換えラクトフェリンNローブの発現(細胞粗抽出液)

宿主昆虫細胞の粗抽出液中の組換えラクトフェリンNローブを、抗ラクトフェリン抗血清を用いたウエスタンブロットにより検出した。各レーンは1; 健康宿主細胞(1日目)、2; LfN/AcNPV感染細胞(1日目)、3; 健康宿主細胞(3日目)、4; LfN/AcNPV感染細胞(3日目)。



図Ⅲ-8 昆虫細胞系における組換えラクトフェリンNローブの発現(培養上清)

宿主昆虫細胞の培養上清中の組換えラクトフェリンNローブを、抗ラクトフェリンモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロットにより検出した。各レーンは1; 健康宿主細胞の培養上清、2; LfN/AcNPV感染後4日目、3; LfN/AcNPV感染後7日目、4; LfN/AcNPV感染後8日目、5; LfN/AcNPV感染後9日目、6; LfN/AcNPV感染後10日目。

て、それぞれ宿主細胞に感染させて得られた組換えラクトフェリン N ロープの移動度を比較した。その結果、宿主細胞の粗抽出液と培養上清の両方で、組換えラクトフェリン N ロープのバンドはプラーク純化前のものと同一であった(図Ⅲ-9)。

Ⅲ-3-3 組換えウイルスの再感染

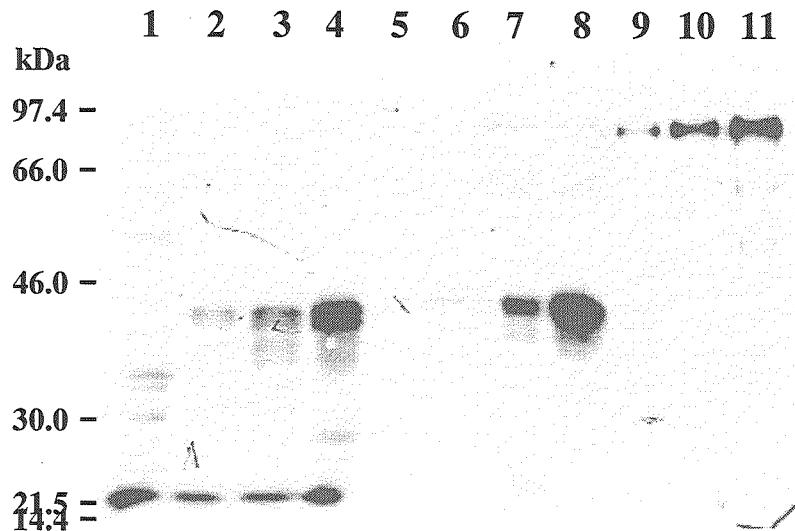
組換えラクトフェリンを含む培養上清を健常昆虫細胞の培地に接種すると、接種後 4 日目の培養上清、および宿主細胞内に組換えラクトフェリン N ロープが生産されていることがウエスタンブロッティングによって検出された。また、FCS を含む培地を用いた場合(図Ⅲ-9, lane 7, 8)、および $\sim 20 \mu\text{g/ml}$ の牛乳由来のラクトフェリンを含む無血清培地を用いた場合(図Ⅲ-10)にも組換えウイルスを接種することによって組換えラクトフェリン N ロープが生産された。また、組換えラクトフェリン N ロープおよび組換えウイルス LfN/AcNPV を含む培養上清について超遠心分離($200,000 \times g$, 240 分)を行ない、遠心分離した後の上清の上層および中層と、ウイルスを含む下層のそれぞれについてウエスタンブロッティングと健常細胞への再感染試験を行なったところ、全ての画分で組換えラクトフェリン N ロープの量に差は認められなかった(図Ⅲ-11 A)が、上層を接種したものでは下層を接種したものに比べて組換えラクトフェリン N ロープの生産量が著しく減少していた(図Ⅲ-11 B, C)。

Ⅲ-3-4 組換えラクトフェリン N ロープの生産量

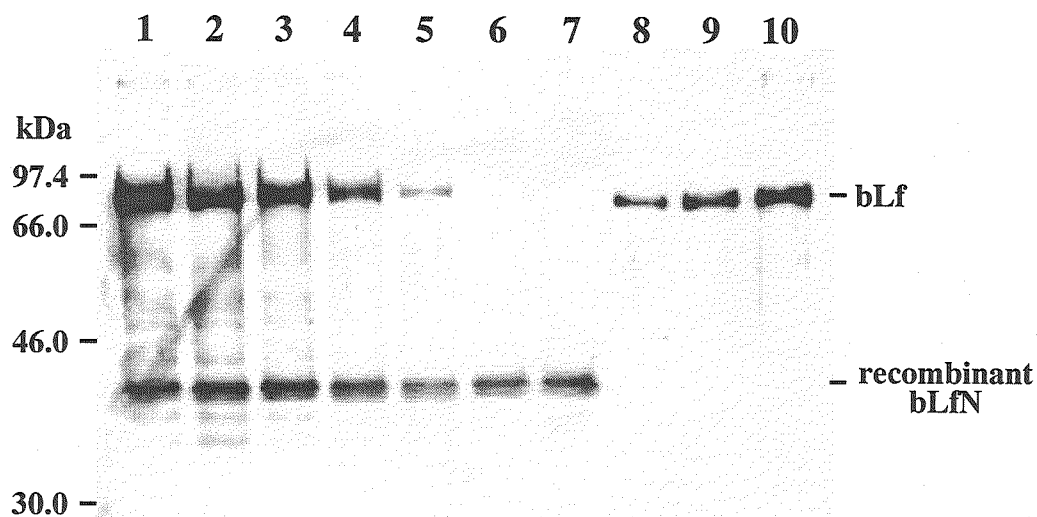
ドットプロットおよびウエスタンプロットの結果をデジタルカメラで撮影し、取り込んだ画像のシグナル強度を ScionImage を用いて解析した。その結果、底面積 25 cm^2 の培養フラスコにおいて無血清培地 5 ml で組換えウイルス感染後 4 日間培養した場合、組換えラクトフェリン N ロープの総生産量は約 $300 \mu\text{g}$ で、そのうち約 $50 \mu\text{g}$ が培地中に分泌されている(約 $10 \mu\text{g/ml}$)ものと推定された。

Ⅲ-3-5 組換えラクトフェリン N ロープの糖鎖切断

昆虫細胞系で産生された組換えラクトフェリン N ロープにどのような糖鎖が付加されているかを推定するために、本実験で得られた組換えラクトフェリン N ロープのうち最も分子量の大きい分泌型のラクトフェリン N ロープについて PNGase F、Endo-O-glycosidase および Sialidase A による糖鎖切断処理を行い、SDS-PAGE における

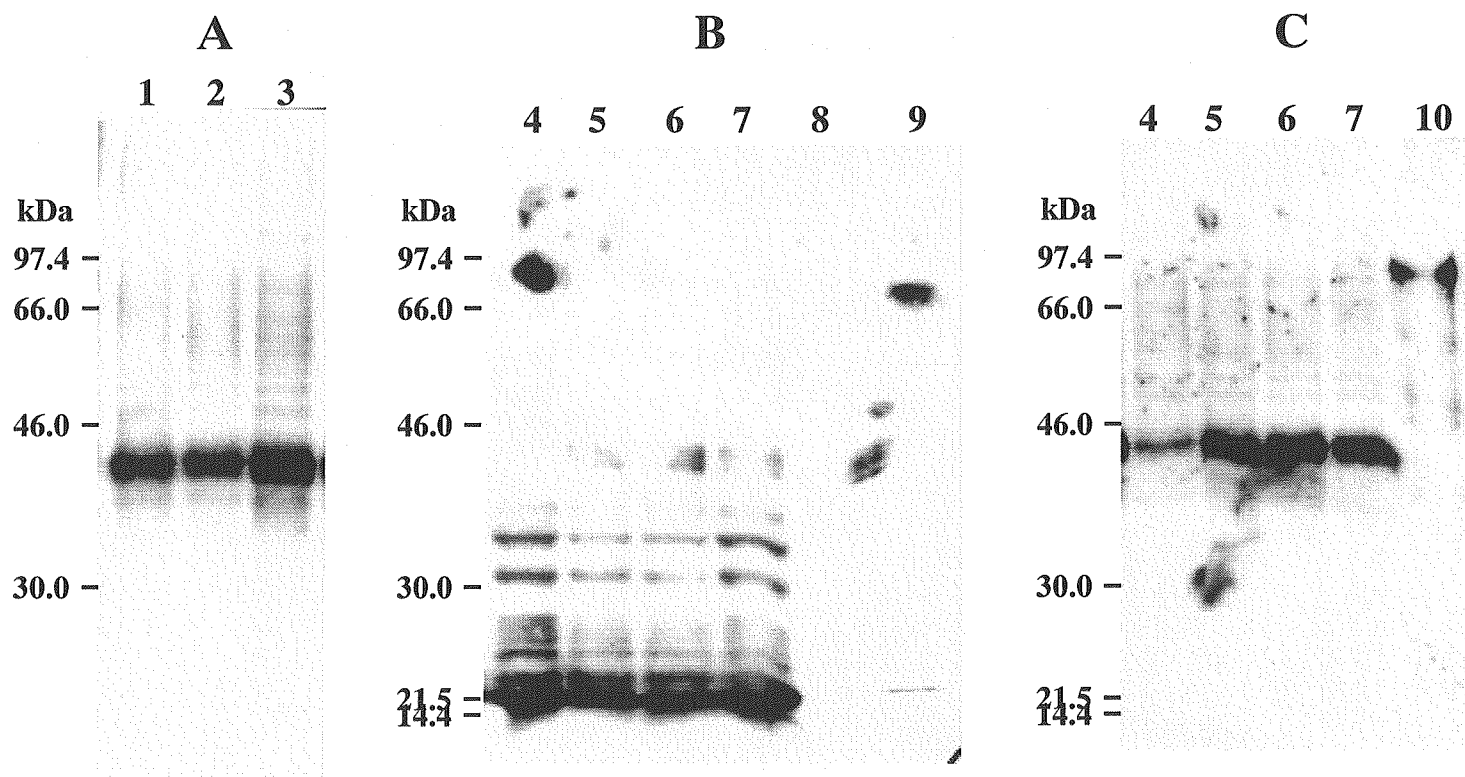


図Ⅲ-9 プラーク純化後の組換えラクトフェリンNローブの移動度の変化
 プラーク純化した組換えウイルス(プラーク番号1-1-2および1-1-5)を感染させて4日後の細胞粗抽出液および培養上清中の組換えラクトフェリンNローブを、抗ラクトフェリン抗血清を用いたウエスタンブロットにより検出した。各レーンは1; 健常宿主細胞の粗抽出液、2; プラーク純化前のLfN/AcNPV感染細胞の粗抽出液、3; LfN/AcNPV (1-1-2)感染細胞の粗抽出液、4; LfN/AcNPV (1-1-5)感染細胞の粗抽出液、5; 健常宿主細胞の培養上清、6; プラーク純化前のLfN/AcNPV感染細胞の培養上清、7; LfN/AcNPV (1-1-2)感染細胞の培養上清、8; LfN/AcNPV (1-1-5)感染細胞の培養上清。9～11; ウシラクトフェリン(50、100、200 ng)



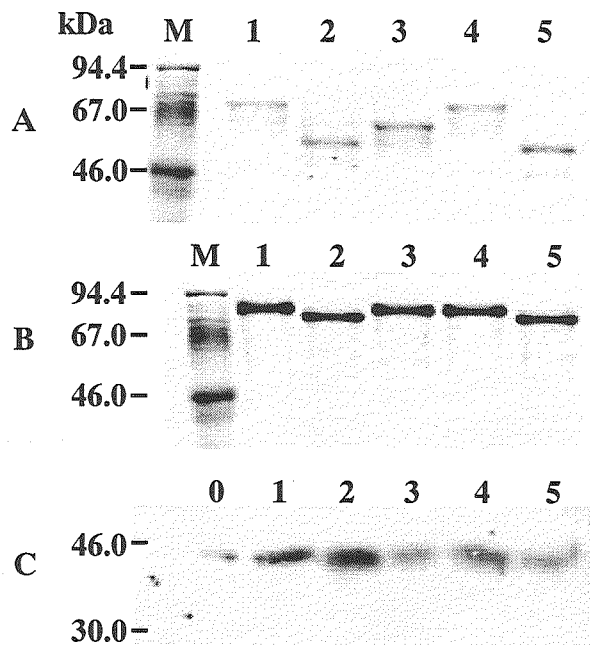
図Ⅲ-10 ウシラクトフェリン存在下での再感染

ウシラクトフェリン(0～200 $\mu\text{g/ml}$)存在下でLfN/AcNPVを感染させた宿主昆虫細胞の培養上清中の組換えラクトフェリンNローブを、抗ラクトフェリン抗血清を用いたウエスタンブロットにより検出した。各レーンは1～6; ウシラクトフェリン(それぞれ200、100、50、20、10、0 $\mu\text{g/ml}$)存在下で組換えウイルスを感染させた細胞の培養上清、7; LfN/AcNPV感染後4日目の培養上清、8～10; ウシラクトフェリン(50、100、200 ng)



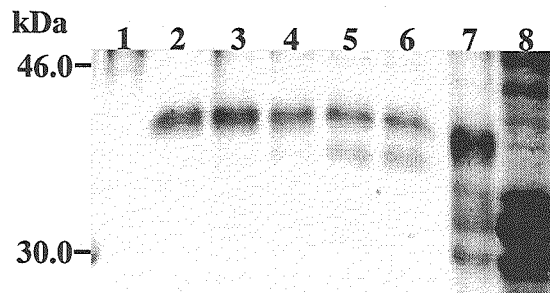
図Ⅲ-11 超遠心操作後の各層に含まれる組換えラクトフェリンNローブと再感染能

LfN/AcNPVと組換えラクトフェリンNローブを含む宿主昆虫細胞の培養上清を超遠心操作によって分離した上層および下層について、含まれる組換えラクトフェリンNローブの検出(A)と健常細胞への再感染試験を行なった。再感染の成立は、宿主昆虫細胞の粗抽出液(B)および培養上清(C)中に含まれる組換えラクトフェリンNローブを抗ラクトフェリンモノクローナル抗体および抗ラクトフェリン抗血清を用いたウエスタンブロットによって検出することによって確認した。各レーンは1; 超遠心前の培養上清、2; 超遠心後の上層、3; 超遠心後の下層、4; 超遠心後の上層を感染させた宿主昆虫細胞の粗抽出液(B)と培養上清(C)、5; 超遠心前の培養上清を感染させた宿主昆虫細胞の粗抽出液(B)と培養上清(C)、6; 超遠心後の下層を感染させた宿主昆虫細胞の粗抽出液(B)と培養上清(C)、7; プラーク純化前のLfN/AcNPV感染細胞の培養上清、8~10; ウシラクトフェリン(500、1000、100 ng)。



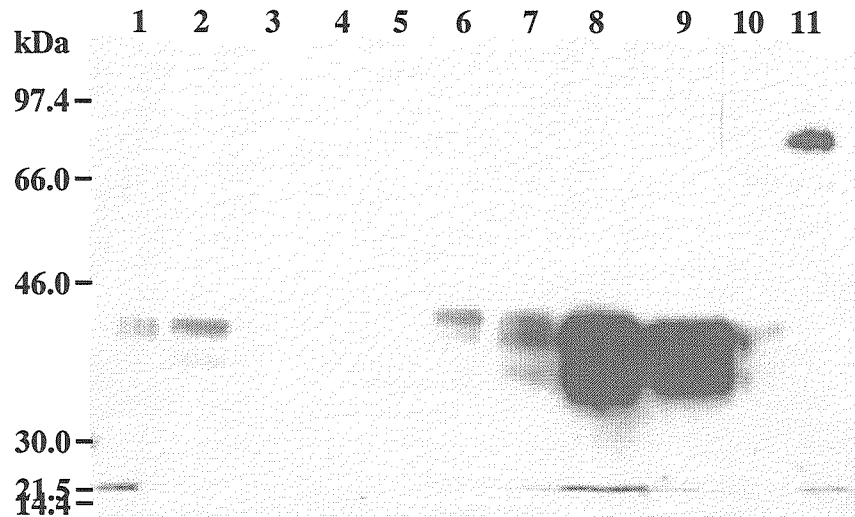
図Ⅲ-12 組換えラクトフェリンNローブの糖鎖切断

昆虫細胞系で発現した分泌型の組換えラクトフェリンNローブについて、糖鎖切断酵素による分子量の変化を調べた。ウシフェチニン(A)およびウシラクトフェリン(B)については、SDS-PAGEにおける移動度の変化をCBB染色によって検出した。培養上清に含まれる組換えラクトフェリンNローブ(C)の移動度の変化は、抗ラクトフェリンモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロットにより検出した。各レーンはM; 分子量マーカー(LMW)、0; LfN/AcNPV感染細胞の培養上清、1; 糖鎖切断酵素無添加(Negative control)、2; Peptide-N-glycosidase Fによる切断、3; Sialidase Aによる切断、4; Endo-O-glycosidaseによる切断、5; Peptide-N-glycosidase F、Sialidase A、およびEndo-O-glycosidaseによる切断。



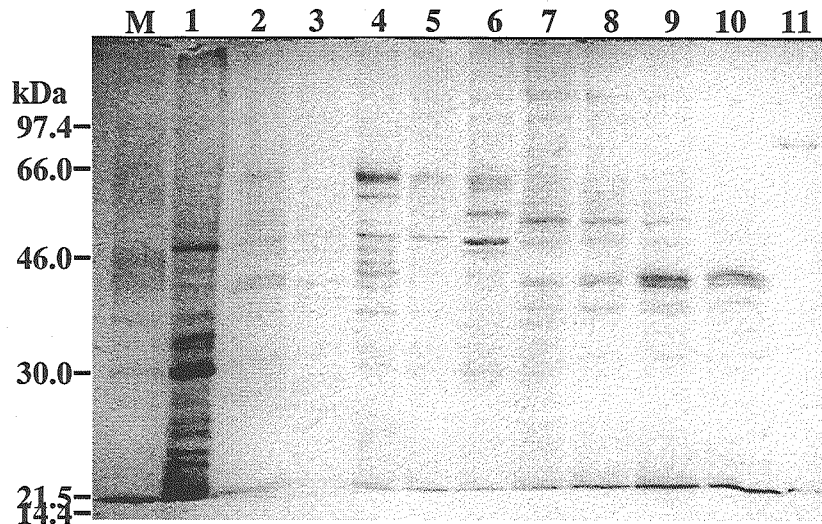
図Ⅲ-13 組換えラクトフェリンNローブの宿主細胞破碎液による分解

健全細胞破碎液での処理による分泌型組換えラクトフェリンNローブの分子量の変化を、抗ラクトフェリン抗血清を用いたウエスタンブロットにより検出した。各レーンは1; 健全細胞破碎液、2; LfN/AcNPV感染細胞の培養上清、3~6; 宿主細胞破碎液添加0、1、3、4日後、7; LfN/AcNPV感染細胞の粗抽出液、8; 健全宿主細胞の粗抽出液。



図Ⅲ-14 固定化ヘパリンカラムによる組換えラクトフェリンNローブの部分精製(ウエスタンブロット)

固定化ヘパリンカラムを用いて部分精製した組換えラクトフェリンNローブを、抗ラクトフェリン抗血清を用いたウエスタンブロットにより検出した。各レーンは1; LfN/AcNPV感染宿主細胞の粗抽出液、2; LfN/AcNPV感染宿主細胞の培養上清、3; ヘパリンカラム非吸着画分、4; 10 mlのPBSによる洗浄液の画分、5~9; 0.1、0.2、0.3、0.5、1.0 M NaCl/PBSによる溶出画分、10; 溶出後の洗浄液の画分、11; ウシラクトフェリン(100 ng)



図Ⅲ-15 固定化ヘパリンカラムによる組換えラクトフェリンNローブの部分精製(銀染色)

固定化ヘパリンカラムからの各溶出画分に含まれる蛋白質を銀染色により検出した。各レーンはM; LMW 分子量マーカー、1; LfN/AcNPV感染宿主細胞の粗抽出液、2; LfN/AcNPV感染宿主細胞の培養上清、3; ヘパリンカラム非吸着画分、4; PBSによる溶出画分(E0) 5; 10 mlのPBSによる洗浄液の画分、6~10; 0.1、0.2、0.3、0.5、1.0 M NaCl/PBSによる溶出画分、11; ウシラクトフェリン(100 ng)。

移動度の変化をウエスタンブロッティングによって調べた。陽性対照のウシ fetuin は 37℃、3 時間の酵素反応で 3 種の糖鎖切断酵素に対して感受性を示した(図Ⅲ-12 A)。また、牛乳由来のラクトフェリンは同じ反応条件で PNGase F に感受性であった(図Ⅲ-12 B lane 2)が、Endo-O-glycosidase および Sialidase A によって SDS-PAGE における移動度に変化は見られなかった(図Ⅲ-12 B lane 3, 4)。分泌型の組換えウシラクトフェリン N ロープは酵素反応によって SDS-PAGE における移動度に変化は見られなかった(図Ⅲ-12 C)。

Ⅲ-3-6 宿主細胞破碎液による組換えラクトフェリン N ロープの分解

宿主細胞内で合成された組換えラクトフェリン N ロープが細胞内で分解されたことによって分泌能を失ったという可能性を検討するために、健常宿主細胞の破碎液によって分泌型組換えラクトフェリン N ロープが分解されるか否かを調べた。凍結融解法によって調製した健常宿主細胞の破碎液によって培養上清中に分泌された組換えラクトフェリン N ロープは分解された(図Ⅲ-13)。ウエスタンブロッティングによって確認された SDS-PAGE における移動度から、分子量の変化は約 5 kDa と推定された。

Ⅲ-3-7 固定化ヘパリンカラムによる部分精製

分泌型の組換えウシラクトフェリン N ロープについて、固定化ヘパリンカラムによる精製を試みた。培養上清約 10 ml を 1 ml 容の HiTrap®-heparin カラムに通したところ、非吸着画分には組換えラクトフェリン N ロープが検出されなかった。カラムに吸着した成分を 0、0.1、0.2、0.3、0.5 および 0.75 M NaCl/PBS によって溶出すると、組換えラクトフェリン N ロープの一部が PBS 溶出画分に検出される他は大部分が 0.5 および 0.75 M NaCl/PBS で溶出した画分に含まれていた(図Ⅲ-14 lane 8, 9)。0.1~0.3 M NaCl/PBS による溶出画分には、抗ラクトフェリン抗血清に反応しない蛋白質も含まれていた(図Ⅲ-15 lane 6~8)。また、非吸着画分と各溶出画分について健常細胞に対する再感染試験を行なったところ、非吸着画分、PBS 溶出画分、0.1 および 0.75 M NaCl/PBS による溶出画分では再感染は成立せず、0.3 および 0.5 M NaCl/PBS による溶出画分で弱い感染能が認められた。

Ⅲ-3-8 透析による脱塩

固定化ヘパリンカラムから 0.5 および 0.75 M NaCl/PBS で溶出した画分および牛乳由来のラクトフェリンについて、透析によって塩濃度を PBS の 1/8 まで段階的に低下させ

ると、後者では濃度の減少が 1/2 程度(回収率 50%)であるのに対して、組換え蛋白質では濃度が 1/10 (回収率 10%)以下に減少した。それ以外の各画分では透析後には組換えラクトフェリン N ロープはウエスタンブロッティングによって検出できなくなった。

Ⅲ-3-9 組換えラクトフェリン N ロープの抗菌活性

固定化ヘパリンカラムからの各溶出画分について、マイクロプレートアッセイ法による抗菌活性の測定を行なった(表Ⅲ-1)。PBS 溶出画分、0.1 および 0.3 M NaCl/PBS による溶出画分では大腸菌 O111 株に対する強い抗菌活性が認められたが、組換えラクトフェリン N ロープの大部分が含まれる 0.5 および 1.0 M NaCl/PBS による溶出画分では検定菌の生育阻害は見られなかった。

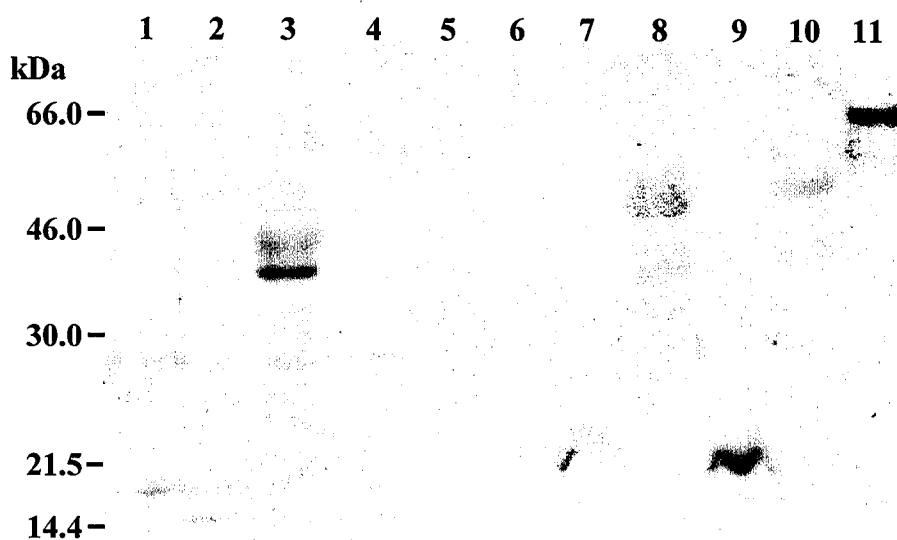
表Ⅲ-2 固定化ヘパリンカラム溶出画分の抗菌活性

Materials	Concentration	Activity (%)
ウシラクトフェリン	5% (w/v)	100
	2.5%	84.1
	1.25%	73.6
	0.625%	51.5
PBS (陰性対照)		N. I. ¹
NaCl/PBS	0.25 M	N. I. ¹
	0.5 M	N. I. ¹
ヘパリンカラム溶出画分		
	0.1 M NaCl	121.5
	0.2 M NaCl	48.2
	0.3 M NaCl	97.8
	0.5 M NaCl	15.4
	1.0 M NaCl	N. I. ¹

¹No inhibition of bacterial growth.

III-4 植物ウイルス系における発現

ラクトフェリンNローブ遺伝子を組み込んだ組換え植物ウイルスに感染したソラマメ葉の抽出液を健常ソラマメ葉に接種することによって再感染が成立し、更に再感染した組換えウイルスがラクトフェリンNローブ遺伝子を保持していることがRT-PCRによって確認されている。また、葉のPBS抽出液中に抗ラクトフェリンモノクローナル抗体に反応する約50 kDaの蛋白質が確認された(図III-16)が、茎の抽出液中には見られなかった。組換えウイルスを感染させていないソラマメの健常葉の抽出液にはこの蛋白質は認められなかったことから、組換えウイルスによって組換えラクトフェリンNローブが作製されたものと考えられる。



図III-16 組換え植物ウイルス感染ソラマメ葉PBS抽出物中の組換えラクトフェリンNローブの検出

ソラマメを宿主とする植物ウイルス系で作製した組換えラクトフェリンNローブを抗ラクトフェリンモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットによって検出した。各レーンは1; 健常ソラマメ葉の粗抽出液、2; 健常ソラマメ葉のPBS抽出残渣、3; 健常ソラマメ葉のPBS抽出液、4; 健常ソラマメ葉の2% 2ME/PBS抽出残渣、5; 健常ソラマメ葉の2ME/PBS抽出液、6; 組換え植物ウイルス感染葉の粗抽出液、7; 組換え植物ウイルス感染葉のPBS抽出残渣、8; 組換え植物ウイルス感染葉のPBS抽出液、9; 組換え植物ウイルス感染葉の2ME/PBS抽出残渣、10; 組換え植物ウイルス感染葉の2% 2ME/PBS抽出残渣、11; 組換え植物ウイルス感染葉の2% 2ME/PBS抽出液。

第IV章 考察

IV-1 ラクトフェリン遺伝子

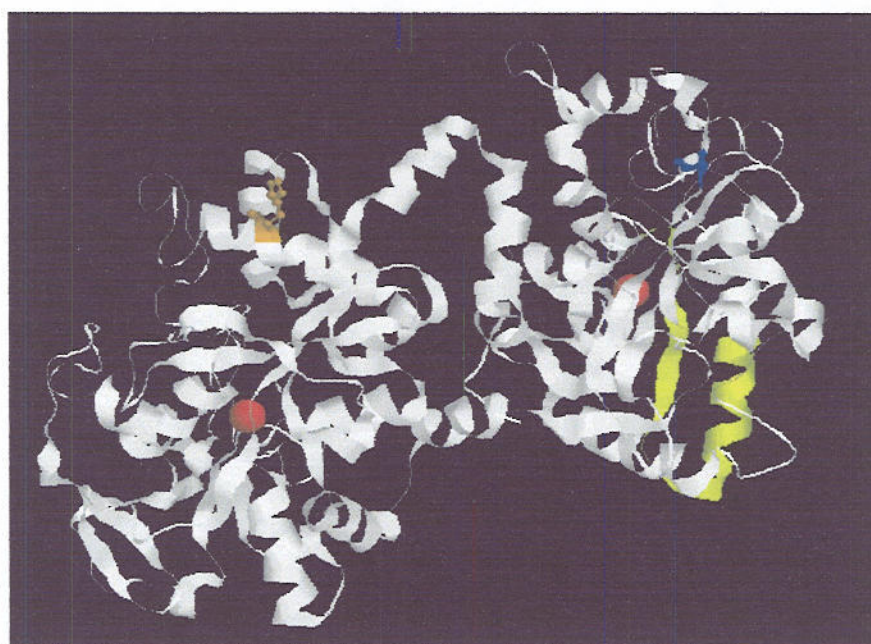
IV-1-1 クローニングしたラクトフェリン N ロープ遺伝子の変異

ウシラクトフェリンの遺伝子配列はこれまでに 4 例の報告がある (Goodman 1991, Mead 1990, Pierce 1991, Seyfert 1994)。これらを比較すると何れも数箇所異なる塩基配列が見出され、そのうち幾つかについてはアミノ酸の置換を伴うものである。これらの差異は遺伝的なバリエーションによる変異と考えられる (Seyfert 1997)。本研究においてクローニングを行い、塩基配列を確認したラクトフェリン N ロープ遺伝子では、pCRLNf の 528 塩基目で T→C、pGEM-LNf の 397 塩基目で T→C、更に pASK-LfN(301E)および pASK-LfN(324P)のそれぞれ 901 残基目で A→g および 970 残基目で T→C (図Ⅲ-2)の変異が確認された。このうち pCRLNfに見られた変異はアミノ酸の置換を伴わないが、pGEM-LNfにおける変異はトリプレットコードを TCC から CCC に変え、その結果 S133P のアミノ酸の置換を生じると考えられる。この変異はこれまでの報告例には見出されていないが、出発材料とした乳腺組織に由来する変異であるか、遺伝子の増幅操作の中で偶然発生した塩基の置換によるものかは不明である。pASK-LfNに見出された二つの変異株(N301E、S324P)は、配列を確認した 10 クローンの中でそれぞれ 1 クローンのみについて確認されたものである。また、同じテンプレートから挿入配列を増幅して作製した pASK-LfN212 にはこれらの変異は見られなかった。従ってこれらの変異は PCR によってベクターに組み込む挿入配列を増幅した際に DNA ポリメラーゼの読み間違いによって生じたものであると考えられる。これら二つの変異は何れも鉄結合部位を構成するアミノ酸残基ではないが、ラクトフェリン N ロープの第一ドメインの cross over 領域の蛋白質表面付近に位置している(図Ⅳ-1)。側鎖は立体構造上近位にある第一ドメインと第二ドメインを結ぶ領域と相互作用をして蛋白質の構造を維持する上で重要な役割をしていると考えられるので、これらのアミノ酸側鎖が性質の異なるものに置換した場合はラクトフェリン N ロープの立体構造が不安定になることが考えられる。



図IV-1 ウシラクトフェリンNローブの立体構造

ウシラクトフェリンNローブのペプチド主鎖構造(N24~R363)のリボンモデル。ラクトフェリンBに相当する部分(F36~F60)を黄色で示した。また、K299およびS322の側鎖(ボール&スティックモデル)をそれぞれ赤と緑で示した。



図IV-2 ウシラクトフェリンの立体構造

ウシラクトフェリンのペプチド主鎖構造(N24~R708)のリボンモデル。ラクトフェリンBに相当する部分(F36~F60)を黄色で示した。また、S133およびR632の側鎖(ボール&スティックモデル)をそれぞれ青と橙で示した。

IV-1-2 ラクトフェリン全長遺伝子の変異

pGEM-bLf00に見出された2ヶ所の変異は遺伝子産物にS133P、およびH632Rのアミノ酸置換を生じさせるものであった(図Ⅲ-4)。野生型ラクトフェリンにおいてS133は鉄の結合には関与しないと考えられているが、N_{II}ドメイン中の β シートの中央部に位置し(図IV-2)、Nローブの立体構造の維持に寄与しているものと考えられる。セリンの側鎖は親水性が高く、蛋白質の立体構造形成において水素結合を形成するなどの働きをしている場合があるが、プロリンの側鎖は親水性ではなく、蛋白質の主鎖構造を固定する働きがある。S133Pのアミノ酸置換は側鎖の性質が大幅に変化するので、この変異によって組換え蛋白質の立体構造は天然のものと大きく異なったものになる可能性が考えられる。一方、H632はC_Iドメインのrun back部分で α ヘリックスの中に位置し、側鎖はドメインの外方を向いている(図IV-2)。この側鎖はラクトフェリンの鉄結合性や立体構造への寄与分は少ないと考えられるが、ヒスチジンの側鎖は芳香環であって電子供与体として機能し得るので、この性質を考慮するとラクトフェリンのリガンド結合部位、またはレセプター結合部位の一部になっている可能性も考えられる。

IV-2 大腸菌における組換えラクトフェリンNローブの発現

IV-2-1 不溶性封入体の生成

本研究において大腸菌を宿主とする組換え蛋白質発現ベクターは、外来遺伝子をマウス dihydroforate reductase との融合蛋白質として発現する pQE13L、大腸菌の蛋白質分泌シグナル配列である pelB リーダーを付加して発現する pET20b、日本住血球虫 *Schistosoma japonica* GST との融合蛋白質として発現する pGEX-2T、および宿主大腸菌のペリプラズム層に組換え蛋白質を分泌する pASK-IBA2 を使用した。これらの発現系で作製した組換えラクトフェリンNローブは全ての系で不溶性の封入体(インクルージョンボディ)となって宿主菌体内に蓄積し、本研究で試みた方法ではこれを可溶化することはできなかった。発現した組換え蛋白質が不溶性封入体となることを防ぐために、組換え蛋白質を発現させる際の培地の組成(塩濃度、緩衝成分、糖濃度、グリセロールや金属塩の添加)、培養温度、発現を誘導する試薬の濃度と誘導を開始するタイミング、誘導開始後の培養時間について検討したが、可溶性の組換えラクトフェリンNローブは得られなかった。一方、6 M GuHCl、8 M 尿素、または1% SDS を用いて菌体内に不

溶性封入体として蓄積した組換え蛋白質を変性させて抽出することはできたが、抽出溶液中の変性剤を除くと組換えラクトフェリン N ロープは溶液中には検出できなくなった。これは変性剤を除くことによって疎水性相互作用等の蛋白質間相互作用が強まり、組換え蛋白質が再び沈殿したため、或いは透析膜などに吸着したためと考えられる。金属キレートクロマトグラフィーにおいて HisTag 融合蛋白質を回収できなかったのも、同様の理由で組換え蛋白質がカラム内で再び不溶化し、沈殿またはカラム担体等に吸着したものと考えられる。大腸菌では真核細胞由来の蛋白質が持つ糖鎖は合成されず、組換え蛋白質は糖鎖を持たないペプチド鎖のみが作成される。大腸菌を宿主として発現した組換えラクトフェリン N ロープが糖鎖を持たないことも、不溶性封入体を形成しやすくする一因になっているものと考えられる。結局、大腸菌を宿主とする外来遺伝子発現系においては組換えラクトフェリン N ロープは作製されるが、発現した組換え蛋白質を可溶化して分離・精製の可能な形で回収することは不可能であった。最近、N 末端領域を欠くウシラクトフェリンを thioredoxin との融合蛋白質として大腸菌において作製に成功した例が報告された(Sitaram 1998)。この例では宿主菌体内で発現した組換えラクトフェリンを超音波処理によって破壊した菌体から 8 M の尿素で抽出し、glutathione (酸化型対還元型の濃度比は 10 対 1) の共存下で透析することによって段階的に尿素を除いて立体構造の再構築(リナチュレーション)を行い、ラクトフェリンレセプターと可逆的に結合する組換え蛋白質を得ているが、この立体構造が天然のラクトフェリンと同一であるかは明らかではない。ウシラクトフェリン N ロープは 14 個のシステイン残基を持ち、牛乳由来の天然型ラクトフェリンの N ロープ中では 7ヶ所でジスルフィド結合が形成されている(Goodman 1991)。大腸菌は原核細胞であって、蛋白質の翻訳後修飾および立体構造形成機構が真核細胞とは異なるので、発現した外来遺伝子産物は立体構造を形成する以前に分子内、或いは分子間でランダムにジスルフィド結合を形成し、これが不溶性の封入体を造る原因の一つであると考えられる。従ってラクトフェリン N ロープのようなジスルフィド結合を多く持つ蛋白質を大腸菌を宿主として発現させる場合は、シャペロン共発現系(Nishihara 1998, 柳 1999)等を利用して天然の立体構造を形成させるような工夫が必要であると考えられる。

IV-2-2 組換えラクトフェリンフラグメントによる宿主大腸菌の生育阻害

組換えラクトフェリン N ロープ、組換えラクトフェリン N_I ドメイン、および cross over、run back 領域を含む N_{II} ドメインを発現させることによって、宿主大腸菌の生育阻害が

見られた(図Ⅲ-6 ●緑、青、橙色)。組換え蛋白質の誘導剤 AHT は抗生物質であるが、誘導に使用した濃度は抗生物質としての有効濃度以下であり、外来蛋白質遺伝子を含まないプラスミド(pASK-IBA2)を持つ宿主大腸菌の生育に影響を与えない(図Ⅲ-6 ●灰色)。また、AHT の添加によって宿主大腸菌の生育に影響が出始めるのは添加後約 1 時間後からであり、AHT の直接的な作用による生育阻害ではないと考えられる。従って、pASK-LfN、pASK-LfN1、pASK-LfN212 を持つ菌株で見られた宿主大腸菌の生育阻害は発現した組換え蛋白質の作用であると考えられる。各組換え蛋白質は宿主大腸菌のペリプラズム層に分泌されず菌体内で不溶性の封入体になっていると考えられ、本来ラクトフェリンが持つ生理作用を発揮できるとは考えにくい。しかし、大腸菌が持つ蛋白質分解酵素の働きによって不溶性封入体の一部が分解され、ラクトフェリシン(Bellamy 1992)のような強い抗菌活性を持つペプチドが生じて宿主の生育に影響を与えている可能性があると考えられる。ただし、ラクトフェリシンは N_I フラグメントに含まれるペプチドであって、 N_{II} 、 N_{III} 、および N_{IV} フラグメント(表 I -1)には存在しない。この組換えフラグメントが宿主大腸菌の生育を強く阻害することが示されたことから、ラクトフェリン N ロープにはラクトフェリシン以外にも抗菌活性を持つペプチド領域が存在する可能性が示唆された。

IV-3 昆虫細胞における組換えラクトフェリン N ロープの生産

IV-3-1 組換えラクトフェリン N ロープの発現

本研究で用いた昆虫ウイルスベクター系は、宿主特異性が高く、また感染能力も高い AcNPV ウイルスに目的遺伝子を導入し、発現力の強いポリヘドリンプロモーターを利用して組換え蛋白質を生産させるものである(松浦 1991)。遺伝子の導入に用いたプラスミドは AcNPV のポリヘドリン遺伝子をシャトルベクターにクローニングし、転写開始コドンを含む遺伝子配列の一部を除き、そこにマルチクローニングサイトを導入したものである。マルチクローニングサイトに挿入された外来遺伝子はその上流、下流に位置するポリヘドリン遺伝子と AcNPV のポリヘドリン遺伝子との間に生じる相同組換えによってウイルス遺伝子中に組込まれ、ウイルスの活動に伴って宿主細胞内で転写・翻訳される。

LfN/AcNPV を感染させた宿主昆虫細胞および培養上清で抗ラクトフェリン抗血清、または抗ラクトフェリシンモノクローナル抗体を使用したウエスタンブロッティング

によって確認された組換え蛋白質は健常宿主細胞では全く見られなかったことから、組換えウイルスを感染させたことによって生じた組換えラクトフェリン N ロープであると考えられる。培養上清中に検出された組換えラクトフェリン N ロープは、SDS-PAGE における移動度(図Ⅲ-8)から分子量約 43 kDa と推定されたが、これはウイルスに組み込んだラクトフェリン N ロープ遺伝子の大きさから期待される遺伝子産物の分子量(約 42 kDa)に一致する。これに対して宿主細胞の粗抽出液中に見出された組換えラクトフェリン N ロープ(図Ⅲ-7)は 38 kDa、および 35 kDa と推定された。一方、組換えウイルス感染後 7 日目以降の培養上清で優勢となった組換え産物は、分子量は約 38 kDa と推定された(図Ⅲ-8)。この時期の宿主細胞は大部分がウイルスの活動によって炸裂していることから、感染後 7 日目以降に優勢となる分子量の小さい組換えラクトフェリン N ロープは宿主細胞から分泌されたものではなく、宿主細胞の炸裂によって培地中に漏出したものであると考えられる。

また、LfN/AcNPV を感染させた宿主細胞の培養上清を健常細胞の培養液に添加すると 4 日後には炸裂した細胞が確認され、培養上清中からは組換えラクトフェリン N ロープが検出された。組換えウイルスの再感染が成立したことから、ラクトフェリン N ロープ遺伝子を保持した組換えウイルスが感染細胞で作製され、感染能力を備えた LfN/AcNPV が培養上清中に存在していることが確認された。

IV-3-2 組換えウイルスの感染能に対する影響

本研究においては組換えラクトフェリン N ロープを生産する目的で LfN/AcNPV を接種する場合、宿主昆虫細胞の培養には無血清培地を用いた。一方、ウイルスの増幅および力価の検定を目的とする場合は、FCS を添加した培地を用いて組換えウイルスの接種を行っており、FCS の存在下でも感染が成立することが確認されている(図Ⅲ-9)。また、ウシラクトフェリン(～20 µg/ml)の存在下で LfN/AcNPV を感染させ、無血清培地を用いて感染細胞を培養した場合にも、ウェスタンブロッティングによって組換えラクトフェリン N ロープが生産されていることが確認された(図Ⅲ-10)。従って、牛乳由来のラクトフェリンおよび組換えラクトフェリン N ロープは LfN/AcNPV の感染能に影響を与えないことが確認された。また、超遠心分離操作によって組換えラクトフェリンと組換えウイルスとを含む培養上清を、ウイルスを含まない上層とウイルスが沈殿した下層とに分離し、各層に含まれる組換えラクトフェリン N ロープをウェスタンブロットによって検出した(図Ⅲ-11 A)。また、各層の健常宿主細胞に対する再感染試験を行った(図

Ⅲ-11 B, C)。その結果、組換えラクトフェリン N ロープは各層で分離前の培養上清と同程度の量が含まれていたのに対し、上層の再感染能は分離前および下層に比べて弱くなっていた。このことから、LfN/AcNPV との間に相互作用はないと考えられる。ラクトフェリンは単純ヘルペスウイルス(Hasegawa, 1994)、サイトメガロウイルス(Harmsen, 1995)、ヒト免疫不全ウイルス(Harmsen, 1995)、ロタウイルス(Supertti, 1997)等の各種病原性ウイルスに対して感染抑止活性を持つことが認められている(Swart 1998, Valenti 1998, 田中 2000)。AcNPV は昆虫ウイルスであり、宿主特異性が高く哺乳動物の細胞には感染しない(松浦 1991)。これはウイルスの宿主認識部位が鱗翅目昆虫細胞に特徴的な構造をリガンドとしているためである。従って、本来昆虫細胞に存在しないラクトフェリンは AcNPV を認識せず、抗ウイルス活性を示さないものと考えられる。

Ⅳ-3-3 組換えウイルスの単一性

プラーク純化を行なって得られた 2 プラークの組換えウイルスを感染させることによって宿主昆虫細胞で生産された組換えラクトフェリン N ロープの SDS-PAGE の泳動パターンは、培養上清および細胞粗抽出液の双方において、プラーク純化前の組換えウイルスの感染によって生産された組換えラクトフェリン N ロープのそれと同一であった(図Ⅲ-9)。従って、昆虫細胞系で作製した組換えラクトフェリン N ロープで SDS-PAGE における移動度の異なる 3 種類以上の分子種が検出されたのは、長さの異なるラクトフェリン N ロープ遺伝子が導入された複数種類の組換えウイルスが存在しているためではなく、単一のラクトフェリン N ロープ遺伝子から生産された遺伝子産物が宿主細胞内において分解を受けているか、または宿主細胞における翻訳後修飾の過程で何らかの差を生じた結果であると考えられる。

Ⅳ-3-4 糖鎖切断酵素による組換えラクトフェリン N ロープの解析

培養上清中に分泌される組換えラクトフェリン N ロープに糖鎖が付加されているか、また、付加されているとしたらそれはどのような糖鎖なのかを確認するために、組換え蛋白質を糖鎖切断酵素によって処理し、その移動度の変化を調べた。組換えウイルスを感染させた昆虫細胞の培養上清には組換えラクトフェリン N ロープ以外にも宿主細胞に由来する蛋白質が混在している(図Ⅲ-15 lane 2)。これらは宿主昆虫細胞から分泌されたものであって、宿主細胞内での合成過程において糖鎖の付加などの翻訳後修飾を受けているものと考えられる。したがって、宿主昆虫細胞の培養上清に含まれる組換えラクトフェリン N ロープに対して過ヨウ素酸-シッフ染色(PAS)やレクチン結合による糖蛋

白質の検出方法を適用するには、目的蛋白質を培養上清から精製する必要がある。そこで本研究では、培養上清に対して糖鎖切断酵素 PNGase F、Sialidase ATM、および Endo-O-glycosidase を作用させた後に SDS-PAGE を行ない、抗ラクトフェリンモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングによって組換えラクトフェリン N ロープのみを検出し、そのバンドの移動度の変化を調べた。陽性対照として用いたウシ fetuin は N 型糖鎖と O 型糖鎖の両者を持ち、本研究で用いた 3 種類の糖鎖分解酵素に対して感受性である。ウシ fetuin は 37℃、3 時間の反応でこれらの糖鎖切断酵素によって SDS-PAGE における移動度がそれぞれ低分子側にシフトした(図Ⅲ-12 A)。このことから、本研究で用いた各糖鎖切断酵素はこの反応条件下で十分な活性を示すことが確認された。牛乳由来のラクトフェリンの SDS-PAGE における移動度は、PNGase F 処理によって低分子側に移動した(図Ⅲ-12 B)。この分子量の変化は約 3 kDa と推定された。PNGase F は N 型糖鎖のペプチド結合部位を切断する(Iwase 1993)ので、牛乳由来のウシラクトフェリンに結合しているのは N 型糖鎖であり、糖含量は約 4% と推定される。一方、宿主昆虫細胞の培養上清中に分泌された組換えラクトフェリン N ロープは PNGase F、Sialidase ATM、および Endo-O-glycosidase の何れに対しても感受性を示さなかった(図Ⅲ-12 C)。この結果から、本研究で得られた分泌型組換えラクトフェリン N ロープには、これらの 3 種類の酵素によって切断される糖鎖は結合していないと考えられる。従って、昆虫細胞内で生産された組換えラクトフェリン N ロープのうち糖鎖付加を受けたもののみが培養上清中に分泌されたのではなく、宿主細胞内で分解を受けた組換え蛋白質が分泌能を失って宿主細胞内に蓄積したものと推測される。

IV-3-5 Sf-9 細胞破碎液による組換えラクトフェリン N ロープの分解

昆虫細胞系で生産された組換えラクトフェリン N ロープが宿主細胞内で分解されているという上記の仮説を検討するために、凍結融解法によって健常宿主細胞の破碎液を調製し、これを用いて培養上清中に分泌された組換えラクトフェリン N ロープを分解することができるかどうかを検証した。健常宿主細胞破碎液を加えて 3 日目および 4 日目の培養上清では、組換えラクトフェリン N ロープが分解されて SDS-PAGE における移動度が低分子側にシフトしていることがウエスタンブロッティングによって確認された(図Ⅲ-13)。この移動度から、健常宿主細胞の破碎液によって分解された分泌型組換えラクトフェリン N ロープの分子量は約 38 kDa と推定される。これは組換えウイルスを感染させた宿主細胞中に見出された 2 種類の組換えラクトフェリン N ロープのうち

の一方の分子量に一致する(図Ⅲ-7)。従って、宿主細胞中で検出された組換えラクトフェリンNローブのうち少なくとも一方は、合成された分泌型ラクトフェリンNローブが宿主細胞内で分解された結果その分泌能を失ない、細胞内に蓄積したものと考えられる。

IV-3-6 ヘパリンカラムによる部分精製

昆虫細胞系で発現し、培養上清中に分泌された組換えラクトフェリンNローブは固定化ヘパリンカラムに吸着した。ゲル体積1 mlのカラムは本研究において作製した組換えラクトフェリンNローブを100 μ g以上吸着できることが確認された。固定化ヘパリンカラムに吸着した組換えラクトフェリンNローブは一部分がPBSで溶出し、その他の大部分は0.5 および0.75 M NaCl/PBSで溶出した(図Ⅲ-14)。このことから分泌型の組換えラクトフェリンNローブはヘパリンと可逆的に相互作用することが確認された。ウシラクトフェリンのヘパリン結合部位(図Ⅳ-3)はRMKK(44~47)、KCRR(37~40)、およびRR(57~58)であるとされており(Shimazaki 1998)、本研究で得られた組換えラクトフェリンNローブはこれらのヘパリン結合部位を含んでいると考えられる。このようにヘパリンとの相互作用を利用して培養上清中に分泌された組換えラクトフェリンN



図Ⅳ-3 ウシラクトフェリンのヘパリン結合残基

ウシラクトフェリンのペプチド主鎖構造(N24~R708)のリボンモデル。ラクトフェリンBに相当する部分(F36~F60)を黄色で示した。また、ヘパリン結合残基の側鎖(ボール&スティックモデル)を緑で示した。

ローブを部分精製することができたが、ヘパリンカラムからの溶出画分に含まれる蛋白質には抗ラクトフェリン抗血清によって認識されない宿主細胞由来と考えられるものも含まれており(図Ⅲ-15)、組換えラクトフェリンNローブの生理活性評価を行なうためには更に精製を進めてより純度の高い標品を得る必要がある。

IV-3-7 ヘパリンと組換えウイルスの相互作用

組換え蛋白質と組換えウイルスを含む培養上清の固定化ヘパリンカラム非吸着画分には健常宿主細胞に対する再感染能が見られず、0.3 および 0.5 M NaCl/PBS による溶出画分には弱い再感染能が認められた。このことから、LfN/AcNPV がヘパリンと相互作用を行なう可能性が示唆された。溶出画分に含まれる組換えウイルスの力価は不明だが培養上清の再感染能の強さと比較すると、0.3 および 0.5 M NaCl/PBS による溶出画分に含まれるのはヘパリンカラムに吸着した組換えウイルスの一部分のみか、或いはヘパリンと相互作用することによって組換えウイルスの感染能力が低下したものと考えられる。

IV-3-8 透析操作による組換えラクトフェリンNローブの損失

固定化ヘパリンカラムを用いて部分精製した組換えラクトフェリンNローブは、透析操作を行うことによって溶液中の蛋白質含量が極端に低下した。分泌型の組換えラクトフェリンNローブは培養上清中で何らかの立体構造をとっていると考えられるが、糖鎖を持たないのでペプチド部分の構造も天然のものとは異なっている可能性がある。天然のラクトフェリンの持つ糖鎖の生理的な役割は未だに明らかにされていないが、蛋白質の表面に存在する大きな親水性残基は蛋白質立体構造の安定化、蛋白質分解酵素に対する耐性の強化、蛋白質表面の親水性の増大等に寄与しているものと考えられる。本研究で作製した分泌型組換えラクトフェリンNローブは糖鎖を欠くため、分子表面の親水性と立体構造の安定度において天然のラクトフェリンに劣り、精製操作中に膜や容器表面に対する親和性が増大して収量が低下した可能性が考えられる。

IV-3-9 組換えラクトフェリンNローブの抗菌活性

固定化ヘパリンカラムからの各溶出画分のうち 0.1 および 0.3 M NaCl/PBS による溶出画分には大腸菌 O111 に対する抗菌活性が認められた(表Ⅲ-1)。培地(Sf900-II SFM)を同様に処理して得た画分には抗菌活性は認められなかったことから、宿主細胞で作製された組換えラクトフェリンNローブの一部に強い抗菌活性を持つものがあると考えられ

る。カラムから溶出した組換えラクトフェリン N ロープの大部分は 0.5 および 1.0 M NaCl/PBS による溶出画分に含まれている(図Ⅲ-14)が、これらの画分にはそれ以外の蛋白質も含まれており(図Ⅲ-15, lane 9, 10)、共存する物質によって組換えラクトフェリン N ロープの抗菌活性がマスクされている可能性が考えられる。また、ラクトフェリンはラクトフェリンよりも強い活性を持つことが知られており(Bellamy 1992)、抗菌活性の見られた溶出画分に組換えラクトフェリンの分解産物が含まれていて、これが検定菌の生育を阻害している可能性も考えられる。

IV-4 植物における有用蛋白質の作製

IV-4-1 植物ウイルス系における組換えラクトフェリン N ロープの発現

植物ウイルス系において宿主ソラマメ葉で発現した組換えラクトフェリン N ロープは SDS-PAGE における移動度から分子量は約 50 kDa と推定される(図Ⅲ-16)。これは遺伝子の大きさから期待される値(約 42 kDa)よりも大きく、宿主植物内で糖鎖の付加などの修飾を受けているものと考えられる。組換えラクトフェリン N ロープを含むソラマメ葉抽出液は 4℃で保存した場合数時間で黒く変色し、-85℃で保存しても数日後には変色した。これは植物の抽出物に含まれる酸化力の強い物質の働きによるものと考えられる。従って、組換えラクトフェリン N ロープを含む PBS 抽出液を冷蔵、または冷凍して保存することは困難であり、抽出後直ちに目的蛋白質の分離・精製を行う必要があると考えられる。そこで組換えウイルスを感染させたソラマメの葉から PBS で抽出した後、直ちに固定化ヘパリンカラムによる組換えラクトフェリン N ロープの精製を試みたが、抗ラクトフェリンモノクローナル抗体に反応する成分はヘパリンカラムに吸着しなかった。このことから、抽出液中に含まれる成分が組換えラクトフェリン N ロープのヘパリン結合を阻害しているか、または組換えラクトフェリン N ロープが宿主植物内で受けた修飾によってヘパリン結合部位がマスクされているものと考えられるが、植物ウイルス系で作製した組換えラクトフェリン N ロープのヘパリン結合能の欠落については更に検討を加える必要がある。加えて、宿主ソラマメ葉の PBS 抽出液中には宿主に由来する様々な夾雑物質が含まれていることも考慮する必要がある。また、現段階では目的蛋白質の生産量も微生物や昆虫細胞を宿主とするものと比べて少ないと考えられるので、組換えラクトフェリン N ロープを精製する手段として、モノクローナル抗体を利用するなどの特異性の高い精製方法を用いる必要があると考えられる。植物

ウイルス系で発現した組換えラクトフェリン N ロープでは固定化ヘパリンカラムとの相互作用は確認できなかったが、PBS のような単純な抽出溶媒中で宿主植物を破砕することで容易に抽出されることから、安定した立体構造をとっていることが考えられる。従って、適当な条件の下で精製して夾雑物質を除くことによって、生理機能を保持した組換えラクトフェリン N ロープを得られるものと期待される。

IV-4-2 組換え植物の開発とその有用性

本研究において大腸菌で発現させた組換えラクトフェリン N ロープは不溶性となり、利用できる形では回収できなかったが、昆虫細胞系で作製したものは一部が培養上清中に分泌された。分泌型の組換えラクトフェリン N ロープは糖鎖を持っておらず、蛋白質の構造は天然のものとは異なる点があると考えられるが、ヘパリン結合能と抗菌活性を備えていた。更に、植物ウイルス系で作製したものは他の発現系で作製したものよりも安定した構造を保っていると考えられ、生理活性を保持していることが期待される。植物で発現させた組換えラクトフェリンが天然のラクトフェリンの持つ活性を有しているならば、植物で作製した組換え蛋白質を直接摂取してその生理活性を利用する方向へ、応用方法を発展させることも可能である。

天然のラクトフェリンは経口摂取した場合でも、様々な生理機能を発揮することが報告されている(山口 2000)。その場合、消化管内で分解されて有効成分が遊離し、活性を持つ分解産物が体内において有用な生理作用を発揮することが期待される(Kuwata 2000)。また、経口摂取したラクトフェリンの一部が尿中で検出されており(Hutchens 1989)、消化管内に入ったラクトフェリンおよびその分解産物は生理機能を保持した状態で血中に移行し、免疫機構を活性化すること等によって生体防御機構を非特異的に増強すると考えられる。飼料植物、食用植物、薬用植物においてラクトフェリン等の有用な多機能性蛋白質を発現する遺伝子組換え植物が作製されたならば、組換え蛋白質を発現した植物を直接摂取することによって感染症をはじめとする広範囲の疾病に対して予防・治療効果を発揮することが期待される。現在、農林水産省家畜衛生試験場の研究プロジェクトにおいてラクトフェリン N ロープ遺伝子を導入したジャガイモを作製し、これを家畜感染症の予防・治療等に応用するための研究が行われている。しかし、組換え植物における有用蛋白質の作製については、発現部位と発現時期の調節が可能かどうか、発現量をどの程度まで引き上げられるか、植物体内で動物型の糖鎖を付加する方法の開発など、多くの解決すべき課題がある。本研究の成果は、多機能性蛋白質等の有用物質の植物における生産とその利用を実現するための重要な基礎的データを提出するものである。

人類は古くから牛乳を食品として利用しており、牛乳に含まれるウシラクトフェリンはヒトや家畜が摂取して安全な成分である。しかし、さまざまな発現系で作製した組換え蛋白質が天然のものと同様に安全であるかは評価が確立されていない。本来動物の生体内で生理機能を発揮する蛋白質が他の細胞系で作製された場合、付加される糖鎖の種類やリン酸化等の細胞内修飾が宿主によって異なる可能性がある。天然のものと完全に同一ではない以上、生体内において天然のものとは異なる効果をおよぼす可能性を無視することはできず、安全性の評価基準を確立することが必要である。ヒトや家畜にとって有用な組換え蛋白質をより高度に利用していくためには、まず研究室内での実験において組換え蛋白質が天然のものと同様な部分がどの程度異なるのかを明らかにし、遺伝子組換えによって生じる変化について質・量ともに豊富な知識および情報を蓄積することが重要であると考えられる。本研究において明らかになった培養昆虫細胞、および植物で作製した組換えラクトフェリン N ロープの性状についての知見をふまえて、今後、遺伝子組換え蛋白質の利用に向けた研究がさらに発展することが期待される。

謝辞

大学院に入学した時から8年間にわたって御指導頂いた島崎敬一先生に心から感謝いたします。家畜衛生試験場北海道支場の八木行雄室長と、臨床生化学研究室内の皆さんには、本研究において昆虫細胞系における組換え蛋白質の発現系を作製する機会を与えていただき、組換えラクトフェリンNローブの特性の解析において多大な御指導、御協力をいただきました。家畜衛生試験場七戸研究施設の恒光裕室長には、昆虫細胞の形質転換に関して御指導いただきました。児玉研究所の児玉みち先生には、本研究で使用した抗ラクトフェリンモノクローナル抗体の増幅について御協力いただきました。また、北海道大学大学院農学研究科植物病原学グループの上田一郎先生、上田重文先生、八木橋悠さんの御協力により、植物ウイルスを用いた外来蛋白質発現系でウシラクトフェリンNローブを作製することができました。遺伝子の取り扱いと大腸菌における組換え蛋白質発現系については、Sigma-Genosys Japanの牧与志幸さんに御指導いただきました。北海道大学大学院農学研究科食品開発学講座の服部昭仁先生には本研究について貴重な御意見をいただきました。玖村朗人先生と田仲哲也先生、ならびに酪農科学研究所の皆さんには、本研究の全般にわたって多大な御協力をいただきました。本研究をまとめるにあたり、御指導、御協力いただいた皆さんに謝意を表します。

参考文献

- Abe, H., Saito, H., Miyakawa, H., Tamura, Y., Shimamura, S., Nagao, E., and Tomita, M. (1991) *Journal of Dairy Science* **74**, 65-71
- Aisen, P., Leibman, A., (1972) *Biochimica et Biophysica Acta* **257**, 314-323
- Anderson, B. F., Baker, H. M., Dodson, E. J., Norris, G. E., Rumball, S. V., Waters, J. M., and Baker, E. N. (1987) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 1769-1773
- Anderson, B. F., Baker, H. M., Norris, G. E., Rice, D. W., and Baker, E. N. (1989) *Journal of Molecular Biology* **209**, 711-734
- Anzai, H., Takaiwa, F., and Katsumata, K. (2000) in *Lactoferrin: Structure, Function and Applications* (Shimazaki, K., Tsuda, H., Tomita, M., Kuwata, T., and Perraudin, J.-P., eds) Vol. 1195, pp. 265-271, Elsevier, Amsterdam
- Appelmek, B. J., An, Y. Q., Geerts, M., Thijs, B. G., de Boer, H. A., MacLaren, D. M., de Graaff, J., and Nuijens, J. H. (1994) *Infection & Immunity* **62**, 2628-2632
- Arakawa, T., Chong, D. K. X., Slattery, C. W., Hilliker, S., and Langridge, W. H. R. (1998) *AgBiotech News and Information* **10**, 103N-110N
- Arnold, R. R., Brewer, M., and Gauthier, J. J. (1980) *Infection & Immunity* **28**, 893-898
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., A., S. J., Struhl, K., Albright, L. M., Coen, D. M., and Varki, A. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*. Current protocols (Janssen, C., Ed.), John Wiley and Sons, Inc., New York
- Baker, E. N., Rumball, S. V., and Anderson, B. F. (1987) *Trends in Biochemical Sciences* **12**, 350-353
- Baynes, R. D., and Bezwoda, W. R. (1994) *Advances in Experimental Medicine & Biology* **357**, 133-141
- Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K., and Tomita, M. (1992) *Biochimica et Biophysica Acta* **1121**, 130-136
- Bennett, R. M., Davis, J., Campbell, S., and Portnoff, S. (1983) *Journal of Clinical Investigation* **71**, 611-618
- Bezault, J., Bhimani, R., Wiprovnick, J., and Furmanski, P. (1994) *Cancer Research* **54**, 2310-2312
- Britigan, B. E., Serody, J. S., Hayek, M. B., Charniga, L. M., and Cohen, M. S. (1991) *Journal of Immunology* **147**, 4271-4277
- Brock, J. (1997) *Experimental Biology and Medicine* **28**, 3-23
- Bullen, J. J., and Armstrong, J. A. (1979) *Immunology* **36**, 781-791
- Carmichael, A., and Vincent, J. S. (1979) *Federation of European Biochemical Societies Letters*

105, 349-352

- Chu, R. M., Wang, S. R., Weng, C. N., and Pursel, V. G. (1993) *American Journal of Veterinary Research* **54**, 1154-1159
- Congiu-Castellano, A., Boffi, F., Della Longa, S., Giovannelli, A., Girasole, M., Natali, F., Pompa, M., Soldatov, A., and Bianconi, A. (1997) *Biometals* **10**, 363-367
- Cox, T. M., Mazurier, J., Spik, G., Montreuil, J., and Peters, T. J. (1979) *Biochimica et Biophysica Acta* **588**, 120-128
- Day, C. L., Stowell, K. M., Baker, E. N., and Tweedie, J. W. (1992) *Journal of Biological Chemistry* **267**, 13857-13862
- Day, C. L., Anderson, B. F., Tweedie, J. W., and Baker, E. N. (1993) *Journal of Molecular Biology* **232**, 1084-1100
- Debanne, M. T., Regoeczi, E., Sweeney, G. D., and Krestynski, F. (1985) *American Journal of Physiology* **248**, G463-469
- Dhaenens, L., Szczebara, F., and Husson, M. O. (1997) *Infection & Immunity* **65**, 514-518
- Elass-Rochard, E., Roseanu, A., Legrand, D., Trif, M., Salmon, V., Motas, C., Montreuil, J., and Spik, G. (1995) *Biochemical Journal* **312**, 839-845
- Ellison, R. T., 3rd. (1994) *Advances in Experimental Medicine & Biology* **357**, 71-90
- Ellison, R. T. d., Giehl, T. J., and LaForce, F. M. (1988) *Infection & Immunity* **56**, 2774-2781
- Ena, J. M., Castillo, H., Sanchez, L., and Calvo, M. (1990) *Journal of chromatography* **525**, 442-446
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., and Danielsen, M. (1987) *Proceedings of National Academy of United States of America* **84**, 7413-7417
- Goodman, R. E., and Schanbacher, F. L. (1991) *Biochemical & Biophysical Research Communications* **180**, 75-84
- Groves, M. L. (1960) *Journal of American Chemical Society* **82**, 3345-3350
- Hagiwara, T., Shinoda, I., Fukuwatari, Y., and Shimamura, S. (1995) *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry* **59**, 1875-1881
- Harada, E., Itoh, Y., Sitizyo, K., Takeuchi, T., Araki, Y., and Kitagawa H. (1999) *Comparative Biochemistry and Physiology* **A124**, 321-327
- Harmsen, M. C., Swart, P. J., de Bethune, M. P., Pauwels, R., De Clercq, E., The, T. H., and Meijer, D. K. (1995) *Journal of Infectious Diseases* **172**, 380-388
- Harris, W. R. (1986) *Biochemistry* **25**, 803-808
- Hasegawa, K., Motsuchi, W., Tanaka, S., and Dosako, S. (1994) *Japanese Journal of Medical Science & Biology* **47**, 73-85
- Hashizume, S., Kuroda, K., and Murakami, H. (1983) *Biochimica et Biophysica Acta* **763**, 377-

- Hutchens, T. W., Henry, J. F., and Yip, T. T. (1989) *Clinical Chemistry* **35**, 1928-1933
- Hutchens, T. W., and Yip, T. T. (1991) *Journal of Chromatography* **536**, 1-15
- Iwase, H., and Hotta, K. (1993) in *Glycoprotein Analysis in Biomedicine* (Hounsell, E. F., ed) Vol. 14, pp. 151-159, Humana Press, Totowa, NZ
- Kappeler, S. R., Ackermann, M., Farah, Z., and Puhon, Z. (1999) *International Dairy Journal* **9**, 481-486
- Kawakami, H., Dosako, S., and Lonnerdal, B. (1990) *American Journal of Physiology* **258**, G535-541
- Kim S. J., Han, Y.-M., Yu, D.-Y., and Lee, K.-K. (2000) in *Lactoferrin: Structure, Function and Applications* (Shimazaki, K., Tsuda, H., Tomita, M., Kuwata, T., and Perraudin, J.-P., eds) Vol. 1195, pp. 279-288, Elsevier, Amsterdam
- Kim S., Ju, I., Lee, K., Wu, M., Kwon, I., Lee, J., Min, D., and Sung, C. (2000) in *Lactoferrin: Structure, Function and Applications* (Shimazaki, K., Tsuda, H., Tomita, M., Kuwata, T., and Perraudin, J.-P., eds) Vol. 1195, pp. 273-277, Elsevier, Amsterdam
- Kimura, M., Nam, M. S., Ohkouchi, Y., Kumura, H., Shimazaki, K., and Yu, D. Y. (2000) *Biochemical & Biophysical Research Communications* **268**, 333-336
- Kuwata, H. (2000) in *Lactoferrin: Structure, Function and Applications* (Shimazaki, K., Tsuda, H., Tomita, M., Kuwata, T., and Perraudin, J.-P., eds) Vol. 1195, pp. 311-317, Elsevier, Amsterdam
- Le Provost, F., Nocart, M., Guerin, G., and Martin, P. (1994) *Biochemical & Biophysical Research Communications* **203**, 1324-1332
- Lee, T. H., Shimazaki, K., Yu, S. L., Nam, M. S., Kim, S. J., Lee, K. K., and Yu, D. Y. (1997) *Animal Genetics* **28**, 367-369
- Legrand, D., Mazurier, J., Ellass, A., Rochard, E., Vergoten, G., Maes, P., Montreuil, J., and Spik, G. (1992) *Biochemistry* **31**, 9243-9251
- Legrand, D., van Berkel, P. H., Salmon, V., van Veen, H. A., Slomianny, M. C., Nuijens, J. H., and Spik, G. (1997) *Biochemical Journal* **327**, 841-846
- Liang, Q., and Richardson, T. (1993) *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **41**, 1800-1807
- Lopez, M., Coddeville, B., Langridge, J., Plancke, Y., Sautiere, P., Chaabihi, H., F., C., Harduin-Lepers, A., Cerutti, M., Verbert, A., and Delannoy, P. (1997) *Glycobiology* **7**, 635-651
- Lydon, J. P., O'Malley, B. R., Saucedo, O., Lee, T., Headon, D. R., and Conneely, O. M. (1992) *Biochimica et Biophysica Acta* **1132**, 97-99
- Mann, D. M., Romm, E., and Migliorini, M. (1994) *Journal of Biological Chemistry* **269**,

23661-23667

- Masson, P. L., Heremans, J. F., and Dive, C. (1966) *Clinica Chimica Acta* **14**, 735-739
- Masuta, C., Yamana, T., Tacahashi, Y., Uyeda, I., Sato, M., Ueda, S., Matsumura, T., Takahashi, Y., and Takahashi, T. (2000) *Plant Journal* **23**, 539-546
- Matsuura, M., Nosaka, S., Yajima, T., and Kuwata, T. (2000) in *Lactoferrin: Structure, Function and Applications* (Shimazaki, K., Tsuda, H., Tomita, M., Kuwata, T., and Perraudin, J.-P., eds) Vol. 1195, pp. 257-264, Elsevier, Amsterdam
- Mead, P. E., and Tweedie, J. W. (1990) *Nucleic Acids Research* **18**, 7167
- Metz-Boutigue, M. H., Jolles, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spik, G., Montreuil, J., and Jolles, P. (1984) *European Journal of Biochemistry* **145**, 659-676
- Mitra, A., and Zhang, Z. (1994) *Plant Physiology* **106**, 977-981
- Miyauchi, H., Kaino, A., Shinoda, I., Fukuwatari, Y., and Hayasawa, H. (1997) *Journal of Dairy Science* **80**, 2330-2339
- Miyazawa, K., Mantel, C., Lu, L., Morrison, D. C., and Broxmeyer, H. E. (1991) *Journal of Immunology* **146**, 723-729
- Montreuil, J., Tonnelat, J., and Mullet, S. (1960) *Biochimica et Biophysica Acta* **45**, 413-421
- Moore, S. A., Anderson, B. F., Groom, C. R., Haridas, M., and Baker, E. N. (1997) *Journal of Molecular Biology* **274**, 222-236
- Naidu, A. S., Andersson, M., Miedzobrodzki, J., Forsgren, A., and Watts, J. L. (1991) *Journal of Dairy Science* **74**, 1218-1226
- Nam, M. S., Shimazaki, K., Kumura, H., Lee, K. K., and Yu, D. Y. (1999) *Comparative Biochemistry & Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology* **123**, 201-208
- Nishihara, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H., and Yura, T. (1998) *Applied & Environmental Microbiology* **64**, 1694-1699
- Nuijens, J. H., van Berkel, P. H. C., and Schanbacher, F. L. (1996) *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **1**, 285-295
- Nuijens, J. H., van Berkel, P. H., Geerts, M. E., Hartevelt, P. P., de Boer, H. A., van Veen, H. A., and Pieper, F. R. (1997) *Journal of Biological Chemistry* **272**, 8802-8807
- Pahud, J., and Hilpert, H. (1976) *Protides Biological Fluids; Proceedings of the Colloquium* **23**, 571-574
- Pierce, A., Colavizza, D., Benaissa, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J., and Spik, G. (1991) *European Journal of Biochemistry* **196**, 177-184
- Qian, Z. Y., Jolles, P., Migliore-Samour, D., and Fiat, A. M. (1995) *Biochimica et Biophysica Acta* **1243**, 25-32
- Rey, M. W., Woloshuk, S. L., deBoer, H. A., and Pieper, F. R. (1990) *Nucleic Acids Research* **18**, 5288

- Rochard, E., Legrand, D., Mazurier, J., Montreuil, J., and Spik, G. (1989) *Federation of European Biochemical Societies Letters* **255**, 201-204
- Salmon, V., Legrand, D., Georges, B., Slomianny, M. C., Coddeville, B., and Spik, G. (1997) *Protein Expression & Purification* **9**, 203-210
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor laboratory Press, New York
- Schryvers, A. B., and Wong, H. (2000) in *Lactoferrin: Structure, Function and Applications* (Shimazaki, K., Tsuda, H., Tomita, M., Kuwata, T., and Perraudin, J.-P., eds) Vol. 1195, pp. 55-65, Elsevier, Amsterdam
- Seyfert, H. M., Tuckoricz, A., Interthal, H., Koczan, D., and Hobom, G. (1994) *Gene* **143**, 265-269
- Seyfert, H.-M., Kluessmann, U., and Steinhoff, U. M. (eds) (1997) *Variants and biotechnological use of the bovine lactoferrin-encoding gene*. Lactoferrin: Interactions and biological functions. Edited by Hutchens, T. W., and Loennerdal, B., Humana Press, Totowa, New Jersey
- Sharma, A. K., Karthikeyan, S., Sharma, S., Yadav, S., Srinivasan, A., and Singh, T. P. (1998) *Advances in Experimental Medicine & Biology* **443**, 15-21
- Sharma, S., Singh, T. P., and Bhatia, K. L. (1999) *Journal of Dairy Research* **66**, 81-90
- Shimazaki, K., and Nishio, N. (1991a) *Journal of Dairy Science* **74**, 404-408
- Shimazaki, K., Kawano, N., and Yoo, Y. C. (1991b) *Comp. Biochem. Physiol.* **98B**, 417-422
- Shimazaki, K., Kawaguchi, A., Sato, T., Ueda, Y., Tomimura, T., and Shimamura, S. (1993a) *International Journal of Biochemistry* **25**, 1653-1658
- Shimazaki, K., Tanaka, T., Kon, H., Oota, K., Kawaguchi, A., Maki, Y., and Sato, T. (1993b) *Journal of Dairy Science* **76**, 946-955
- Shimazaki, K., Nam, M. S., Harakawa, S., Tanaka, T., Omata, Y., Saito, A., Kumura, H., Mikawa, K., Igarashi, I., and Suzuki, N. (1996) *Journal of Veterinary Medicine and Science* **58**, 1227-1229
- Shimazaki, K., Tazume, T., Uji, K., Tanaka, M., Kumura, H., Mikawa, K., and Shimo-Oka, T. (1998a) *Journal of Dairy Science* **81**, 2841-2849
- Shimazaki, K., Kamio, M., Nam, M. S., Harakawa, S., Tanaka, T., Omata, Y., Saito, A., Kumura, H., Mikawa, K., Igarashi, I., and Suzuki, N. (1998b) in *Advances in Lactoferrin Research* (Spik, G., ed), pp. 41-48, Plenum Press, New York
- Shimazaki, K. (2000) *Animal Science Journal* **71**, 329-347
- Shirsat, N. V., Bittenbender, S., Kreider, B. L., and Rovera, G. (1992) *Gene* **110**, 229-233
- Sitaram, M. P., Moloney, B., and McAbee, D. D. (1998) *Protein Expression & Purification* **14**, 229-236

- Sørensen, M., and Sørensen, S. (1938) *Comptes rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg. Ser. Chimique.* 21 **23**, 55-99
- Spik, G., Coddeville, B., Mazurier, J., Bourne, Y., Cambillaut, C., and Montreuil, J. (1994) *Advances in Experimental Medicine & Biology* **357**, 21-32
- Stowell, K. M., Rado, T. A., Funk, W. D., and Tweedie, J. W. (1991) *Biochemical Journal* **276**, 349-355
- Superti, F., Ammendolia, M. G., Valenti, P., and Seganti, L. (1997) *Medical Microbiology & Immunology* **186**, 83-91
- Swart, P. J., Kuipers, E. M., Smit, C., Van Der Strate, B. W., Harmsen, M. C., and Meijer, D. K. (1998) *Advances in Experimental Medicine & Biology* **443**, 205-213
- Takahashi, Y., Takahashi, T., and Uyeda, I. (1997) *Virus Genes* **14**, 235-243
- Takumi, T., Fujiwara, H., and Kurachi, Y. (1997) *Analytical science* **13**, 735
- Tanaka, T., Kawabata, K., Kohno, H., Honjo, S., Murakami, M., Shimada, R., Kagami, S., and Tsuda, H. (2000) in *Lactoferrin: Structure, Function and Applications* (Shimazaki, K., Tsuda, H., Tomita, M., Kuwata, T., and Perraudin, J.-P., eds) Vol. 1195, pp. 401-411, Elsevier, Amsterdam
- Valenti, P., Marchetti, M., Superti, F., Amendolia, M. G., Puddu, P., Gessani, S., Borghi, P., Belardelli, F., Antonini, G., and Seganti, L. (1998) *Advances in Experimental Medicine & Biology* **443**, 199-203
- van Berkel, P. H., Geerts, M. E., van Veen, H. A., Kooiman, P. M., Pieper, F. R., de Boer, H. A., and Nuijens, J. H. (1995) *Biochemical Journal* **312**, 107-114
- Ward, P. P., Lo, J. Y., Duke, M., May, G. S., Headon, D. R., and Conneely, O. M. (1992a) *Bio/Technology* **10**, 784-789
- Ward, P. P., May, G. S., Headon, D. R., and Conneely, O. M. (1992b) *Gene* **122**, 219-223
- Ward, P. P., Piddington, C. S., Cunningham, G. A., Zhou, X., Wyatt, R. D., and Conneely, O. M. (1995) *Bio/Technology* **13**, 498-503
- Ward, P. P., Chu, H., Zhou, X., and Conneely, O. M. (1997) *Gene* **204**, 171-176
- Yip, T. T., and Hutchens, T. W. (1994) in *Lactoferrin: Structure and function* (Hutchens, T. W., ed) Vol. 357, pp. 53-60, Plenum Press, New York
- Yoo, Y.-C., Watanabe, R., Koike, Y., Mitobe, M., Shimazaki, K., Watanabe, S., and Azuma, I. (1997) *Biochemical & Biophysical Research Communications* **237**, 624-628
- Zhang, Z. C., Coyne, D. P., Vidaver, A. K., and Mitra, A. (1998) *Phytopathology* **88**, 730-734
- 上田一郎 (2000) ウイルス **50**, 251-257
- 高瀬光徳 (1994) 「ミルクのサイエンス」 (上野川修一、菅野長右衛門、細野明義編) pp. 78-83, (社)全国農協乳業プラント協会、東京
- 田中克明、池田正徳、加藤宣之 (2000) 臨床免疫 **34**, 370-375

- 松浦喜治 (1991) 「実験医学別冊 遺伝子工学ハンドブック」(松村正実、岡山博人編) pp.
305-308、羊土社、東京
- 柳秀樹、西原和代 (1999) バイオサイエンスとインダスリー 57, 38-39
- 山口英世 (2000) 化学と生物 38, 594-600
- 山本高治郎 (1983) 「母乳」(岩波新書黄版 230)岩波書店、東京

学位論文内容の要旨

博士(農学)

氏名 中村 一郎

組換えラクトフェリン N ロープの作製とその特性に関する研究

ラクトフェリンはトランスフェリンファミリーに属する糖蛋白質であり、哺乳動物の乳汁などの外分泌液、および血液にも含まれている。最も良く知られたラクトフェリンの機能は、幅広い種類の微生物に対する抗菌活性である。また、ラクトフェリンは生体内では免疫機構のメディエーターとして機能しており、生体防御機構の中で重要な役割を果たす多機能性蛋白質であると考えられている。ラクトフェリンは新生児の発育に不可欠な母乳、および古くから食品として利用されてきた牛、ヤギ、羊、馬、ラクダなどの乳汁に含まれる物質であり、ヒトが摂取するに際し極めて安全であると考えられる。ラクトフェリンの持つ生理機能をより高度に利用するためには、その機能を発揮するのに必要な部位を特定し、蛋白質の構造と機能との関係を明らかにする必要がある。ラクトフェリンは構造上類似した二つの「ローブ」からなるが、その生理機能の多くが N 末端側のローブ (N ローブ) 上にあると考えられている。C 末端側のローブ (C ローブ) は蛋白質分解酵素処理および各種クロマトグラフィー操作によって分離されているが、N ローブには蛋白質分解酵素に対して感受性の高い部位が存在するため、これまで分離に成功した例はなかった。そこで本研究では、組換えラクトフェリンと乳汁から得られた天然のラクトフェリンについて、それらの構造上、および機能上の相違を比較・検討することを目的として、ウシラクトフェリン遺伝子をクローニングし、組換えラクトフェリン N ローブを作製した。

まず、ウシ乳腺細胞から mRNA を分離し、cDNA を合成してラクトフェリン N ローブ遺伝子、および C ローブ遺伝子をクローニングした。次いでこれらを用いてラクトフェリン全長の遺伝子を作製した。このラクトフェリン遺伝子の塩基配列を確認したところ、数箇所に変異が見られたものの、これまでに報告された配列と基本的に一致した。次いで大腸菌を宿主として組換えラクトフェリン N ローブを作製したが、発現した組換え蛋白質は宿主大腸菌の菌体内で不溶性の封入体となり、生理活性の評価に使用できる形で可溶化して回収することはできなかった。そこで昆虫細胞系で組換えラクトフェリン N ローブを作製することとした。その結果、SDS-PAGE において移動度の異なる 3 種類(約 43、38、および 35 kDa)の組換え蛋白質が、抗ラクトフェリン抗血清を用い

たウエスタンブロットによって確認され、そのうち分子量 43 kDa のものは培養上清中に分泌された。糖鎖切断酵素を用いて糖鎖を解析した結果、分泌型の組換えラクトフェリン N ロープは糖鎖を持たないと考えられた。さらに、宿主として用いた昆虫細胞の破碎液によって分泌型組換えラクトフェリン N ロープが分解されることから、宿主細胞中で合成された組換え蛋白質が分解されることによって分子量の異なる組換え産物を生じていると考えられた。また、ラクトフェリンの精製に多用されている固定化ヘパリンカラムを用いて、培養上清中から組換えラクトフェリン N ロープを粗精製することができたが、透析によって脱塩すると可溶性の組換え蛋白質の収量は激減した。組換えラクトフェリン N ロープはヘパリンカラムに吸着し、高塩濃度で溶出した数画分に存在することが抗ラクトフェリン抗体との反応によって確認された。しかし、大腸菌 O111 を指標菌とし、液体培地で培養した際の濁度の増加を測定するマイクロプレートアッセイ法によって組換えラクトフェリン N ロープの抗菌活性を測定したところ、大腸菌 O111 に対する抗菌活性が認められたのは固定化ヘパリンカラムを用いて部分精製した画分の一部のみであった。これらのことから、昆虫細胞系で作製された分泌型の組換えラクトフェリン N ロープの立体構造は、天然のラクトフェリンとは幾分異なると考えられた。さらに、ソラマメを宿主とする植物ウイルス系を用いて組換えウイルスを作製し、そのウイルスを感染させたソラマメで組換えラクトフェリン N ロープを発現させることを試みた。その結果、ウイルスに感染したソラマメ葉で N ロープが産生されていることが、抗ラクトフェリンモノクローナル抗体を用いて確認された。ソラマメの葉で発現した組換えラクトフェリン N ロープはリン酸緩衝化生理食塩水によって抽出することができ、その分子量は約 50 kDa と推測された。植物で作製された組換えラクトフェリン N ロープは翻訳後修飾、特に糖鎖の付加位置やその構造などが天然のものとは異なると考えられる。しかし、ペプチド鎖由来のラクトフェリンの各種の機能は保持されていることが期待される。

天然のラクトフェリンは経口的に摂取された場合でも、生体内でさまざまな機能を発揮することが知られており、食用植物で発現したラクトフェリンを直接摂取してその機能を家畜の感染症の予防・治療などに利用することも検討されている。本研究の成果は、乳汁に含まれる多機能性蛋白質であるラクトフェリンの機能発現の機構を解明する有力な手段を提供するとともに、植物や培養細胞における有用な組換え蛋白質の発現と組換え産物の利用を実現するために必須な基礎的データとなるものである。