

Title	Human Lactoperoxidase : Distribution in Breast Milk, Molecular Properties, and Mechanism of Antimicrobial Activity
Author(s)	新, 光一郎
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43132
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	新 光 一 郎
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学位記番号	第 1 6 5 3 9 号
学位授与年月日	平成 13 年 9 月 28 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Human Lactoperoxidase : Distribution in Breast Milk, Molecular Properties, and Mechanism of Antimicrobial Activity (ヒトラクトパーオキシダーゼの母乳における分布、分子特性、および抗菌作用機構に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 二井 将光 (副査) 教授 関 達治 教授 室岡 義勝 教授 卜部 格

論文内容の要旨

ラクトパーオキシダーゼ (LPO) は、過酸化水素の存在下にチオシアン酸の酸化を触媒する。この反応系 (LPO 系) で生成される次亜チオシアン酸は抗菌活性を示し、LPO 系は哺乳類の分泌液と粘膜の感染防御に寄与することが明らかにされているが、母乳におけるヒト LPO の分布や生理的意義を追求した研究は殆ど見られない。本研究では、ヒト LPO の母乳における分布と分子特性を解析するとともに、LPO 系の抗菌作用機構の解明を試みた。

第 1 章の序説に続いて第 2 章では、カラムクロマトグラフィーによる粗分画、免疫学的同定、アミノ酸配列決定によって母乳 (常乳) における LPO の存在を明らかにした。第 3 章では、ヒト LPO と唾液パーオキシダーゼのアミノ酸配列の相同性に着目し、唾液パーオキシダーゼ遺伝子に基づく合成プライマーを用いた PCR を行ない、ヒト乳腺 cDNA から LPO 遺伝子を増幅した。LPO と唾液パーオキシダーゼは同一遺伝子産物である可能性が高い。クローニングした LPO 遺伝子をバキュロウイルス-昆虫細胞系で発現させ、活性を保持した組換え型酵素の大量調製を実現した。第 4 章では、この組換え型ヒト LPO でウサギを免疫し、抗ヒト LPO 抗体を作成した。抗ヒト LPO 抗体を固定化したカラムによって、母乳から 80 および 100kDa の精製 LPO を得た。本抗体を利用した ELISA は、高感度であり高い特異性を示した。本定量法により、分娩後 1 ~ 5 ヶ月目の母乳の LPO 含有量は、平均 $0.77 \mu\text{g/ml}$ と測定された。第 5 章では、第 3 章の発現系を利用して動物ヘムパーオキシダーゼの一次構造に共通するカルシウム結合部位に部位特異的変異を導入した。側鎖カルボキシル基がカルシウムに配位する LPO の 227 番目のアスパラギン酸をアラニンに置換したところ、酵素活性と培地への分泌量が顕著に低下したことから、このアミノ酸残基は活性発現および分泌に重要であることが明らかになった。第 6 章では、LPO 系の抗菌作用機構を検討した。LPO 系で処理した大腸菌から調製した細胞膜画分のデヒドロゲナーゼの不活性化率は末端オキシダーゼのそれよりも高かったため、デヒドロゲナーゼが LPO 系の主要な作用部位であると思われた。第 7 章では、LPO 系が胃炎および胃潰瘍の原因菌である *Helicobacter pylori* に抗菌作用を示すこと、胃内定着に関与するウレアーゼを不活性化することを明らかにした。

以上の研究は、ヒト LPO の分子レベルでの基礎的研究を通じて母乳の感染防御における重要性を示したものであり、これらの成果は LPO の応用的利用に向けた基礎的知見として役立つと考えられる。

論文審査の結果の要旨

ラクトパーオキシダーゼ (LPO) は、過酸化水素の存在下にチオシアン酸の酸化を触媒している。この反応系 (LPO 系) で生成される次亜チオシアン酸は抗菌活性を示し、LPO 系は哺乳類の分泌液と粘膜の感染防御に寄与することが明らかにされているが、母乳におけるヒト LPO の分布や生理的意義を追求した研究はこれまでのところ殆ど見られていない。このような背景から、本論文では、ヒト LPO の母乳における分布とその分子特性を解析するとともに、LPO 系の抗菌作用機構の解明が試みられている。主な結果は次の通りである。

まず、カラムクロマトグラフィーによる粗分画、免疫学的同定、アミノ酸配列決定によって母乳 (常乳) における LPO の存在を明らかにしている。このアミノ酸配列決定の結果からヒト LPO と唾液パーオキシダーゼの相同性に着目し、唾液パーオキシダーゼ遺伝子に基づく合成プライマーを用いた PCR を行ない、ヒト乳腺 cDNA から LPO 遺伝子を増幅している。この結果は、LPO と唾液パーオキシダーゼは同一遺伝子産物であることを示すものである。クローニングした LPO 遺伝子をバキュロウイルス-昆虫細胞系で発現させ、活性を保持した組換え型酵素の大量調製を実現している。この組換え型ヒト LPO でウサギを免疫し、抗ヒト LPO 抗体を作成している。抗ヒト LPO 抗体を固定化したカラムによって、母乳から 80 および 100kDa の精製 LPO を得ている。本抗体を利用した ELISA は、高感度であり高い特異性を示している。本定量法により、分娩後 1~5 ヶ月目の母乳の LPO 含有量は、平均 $0.77 \mu\text{g/ml}$ と測定されている。次に、組換え型酵素の発現系を利用して動物ヘムパーオキシダーゼの一次構造に共通するカルシウム結合部位に部位特異的変異を導入している。側鎖カルボキシル基がカルシウムに配位する LPO の 227 番目のアスパラギン酸をアラニンに置換したところ、酵素活性と培地への分泌量が顕著に低下したことから、このアミノ酸残基は活性発現および分泌に重要であることを明らかにしている。LPO 系の抗菌作用機構の検討では、LPO 系で処理した大腸菌から調製した細胞膜画分のデヒドロゲナーゼの不活性化率は末端オキシダーゼのそれよりも高かったため、デヒドロゲナーゼが LPO 系の主要な作用部位であることを指摘している。さらに、LPO 系が胃炎および胃潰瘍の原因菌である *Helicobacter pylori* に抗菌作用を示すこと、胃内定着に関与するウレアーゼを不活性化することを明らかにしている。

以上のように、本論文は(1)ヒト LPO の母乳における分布、(2)ヒト LPO の分子特性の解析、(3)LPO 系の抗菌作用機構の解明に関する研究をまとめたものである。本論文では、分子レベルでの研究によって得られた知見をもとに母乳の感染防御作用における LPO の重要性が考察されており、その研究成果は単にヒト LPO に関する学術的成果に止まらず、今後 LPO の応用的研究や利用に向けた基礎的知見となるものとして評価することができる。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。