The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	In silico study of whey-acidic-protein domain containing oral protease inhibitors
Author(s)	伊堂寺, 良子
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49760
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【46】

氏　　名	伊堂寺（石濱）良　子（いどうじ いしはま よし こ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学 位 記 番 号	第　２３２５０　号
学位授与年月日	平成21年３月24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	In silico study of whey-acidic-protein domain containing oral protease inhibitors （乳漿酸性タンパク質（whey-acidic-protein）のドメイン構造を持つ口腔内プロテアーゼインヒビターのコンピューター解析による研究）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授　丹羽　　均 （副査） 教 授　川端　重忠　　講 師　久保　和子　　講 師　佐伯万騎男

論 文 内 容 の 要 旨

【はじめに】

分泌型白血球プロテアーゼインヒビター（Secretory Leukocyte Protease Inhibitor ： SLPI）やエラスターゼ特異的インヒビター（Elastase-specific inhibitor ： Elafin）のようなプロテアーゼインヒビター（Protease Inhibitor ： PI）は局所の組織や臓器で産生、分泌され PI 活性のみならず抗菌活性を持つことが知られている。特に SLPI は口腔粘膜の表面で真菌や細菌の増殖を阻害、またウイルス感染を妨害し、さらにこれらの感染後に放出される細胞破壊活性のあるプロテアーゼを不活化することで口腔における感染防御の一端を担うと考えられている。これら 2 種類の PI は乳漿酸性タンパク質（Whey-Acidic-Protein ： WAP）にある WAP ドメインと呼ばれるタンパク質構造と良く似た構造を持ち、この構造が抗菌活性や PI 活性に中心的な役割を果たしている（以下、WAP ドメインやそれに良く似た構造を WAP と略記す）。口腔内の PI は感染予防や治療への応用が期待できることから、本研究では多種類の PI を収集後、WAP ドメインを切り出してアミノ酸配列を比較解析することによりそれらの持つ機能の予測を試みた。

【方法】

1）舌、唾液腺、鼻腔粘膜および気管の臓器、組織で高いレベルで発現している PI 遺伝子が唾液中の PI のレベルを維持していると考え、これら臓器で高いレベルで発現している PI に対応する cDNA クローンを選択した。選択にはマウス発現データベース（GNF1M、Genomics Institute of the Novartis Research Foundation, USA）を利用した。このデータベースにはマウスの 61 種の臓器、組織、細胞を用いて 2 回の独立した実験で得られた 36,182 種のマウス遺伝子の発現データが保存されている。2 回の実験で得られた保存データをそれぞれ正規化して標準偏差が何れの実験でも +2 SD（Standard Deviation）以上の値を示すクローンを臓器、組織特異的 cDNA クローンと定義した。

2）得られた cDNA クローンの遺伝子名を利用して PI や WAP ドメイン構造をコードする cDNA クローンを選択した。SLPI は N-末端側と C-末端側にそれぞれ 45、47 アミノ酸残基からなる SLPI-N-WAP、SLPI-C-WAP を含んでおり、前者が抗菌活性、後者が PI 活性を担っていることが知られている。2 種類の WAP のアミノ酸配列をプローブとし、NCBI のタンパク質データベースから相同性アミノ酸配列検索プログラム（PSI-BLAST）を用いて検索を行い、WAP を持つタンパク質を多数収集した。新たに開発したプログラム（extractCD）を使用して、得られたタンパク質から WAP 部分を切り出し、解析した。

3）得られた多数の WAP のアミノ酸配列を、実験的に抗菌活性または PI 活性が証明されている WAP のアミノ酸配列と多重整列（multiple alignment）を行うことで、実験的な結果が得られていない WAP の機能を予測した。多重整列には既存のプログラム CLUSTAL W を利用した。また多数のアミノ酸配列の機能比較解析には、新たに開発したプログラム（CCResid）を利用した。

4）系統樹作成には MEGA 4.0 版または CLUSTAL W の Neighbor-Joining 法を利用した。

【結果および考察】

1）口腔の組織、臓器で高いレベルで特異的に発現している cDNA クローンの単離と WAP を含む PI をコードしているクローンの選択：36,182 個のクローンから、舌、唾液腺、鼻腔粘膜および気管で高いレベルで発現している mRNA に対応する cDNA クローンを選択し、1,603 個のクローンを単離した。1,603 クローンのうち 26 個は PI をコードしていた。26 個のうち 4 個は、WAP を含むタンパク質である SLPI、WFDC2、WFDC5 および WFDC12 をコードしていた（WFDC：WAP Four-Disulphide Core の略。WAP 内にシステインによる S-S 結合を 4 つずつ含むタンパク質である）。

2）SLPI と WFDC 由来の WAP の構造と機能：カモノハシからヒトまでの様々な動物に由来する 98 種類の WAP 構造を収集した。これらの中には 14 種の Elafin に由来する WAP が含まれていた。

3）抗菌活性について：これら WAP のアミノ酸配列構造を比較、検討することで哺乳類に由来する大部分の SLPI-N-WAP と WFDC12 由来の WAP は抗菌活性を持つことが予測できた。

4）PI 活性について：哺乳類に由来する大部分の SLP-C-WAP と Elafin 由来の WAP は PI 活性を持つことが予測できた。

5）WAP 構造の進化：系統樹は、1 個の祖先 WAP タンパク質が、最初に WFDC5-C-WAP と他の

総ての WAP の祖先タンパク質に分岐した。その後、Elafin、SLPI-C-WAP と SLPI-N-WAP、WFDC15b、WFDC12、WFDC5-N-WAP の祖先タンパク質に分岐した。さらに系統樹は、WFDC5-N-WAP と WFDC12-WAP が共通の祖先タンパク質に由来していることを明らかにした。

6）治療への応用の可能性：これら解析の結果、タンパク質としては比較的小さい数多くの N-WAP や C-WAP に抗菌活性や PI 活性を示す可能性のあることが明らかになった。小さなタンパク質は遺伝子操作を利用することで細菌や酵母での大量生産が比較的容易と予想でき、感染予防や治療への利用も十分に考えられる。このタンパク質による抗菌活性は多剤耐性菌に対しても有効であるばかりでなく、エイズなどのウイルス感染に対しても予防効果があるとの報告もあり、将来の感染症の予防、治療への応用が期待できる。

論文審査の結果の要旨

本研究では口腔における感染防御の一端を担うプロテアーゼインヒビター（Protease Inhibitor：PI）に着目し、まず、コンピュータとデータベースを利用して多種類の PI の候補タンパク質を選択した。その後、これら PI から抗菌活性や PI 活性を担う WAP ドメインと呼ばれる部位を抽出し、多重整列でアミノ酸配列を比較解析した。また系統樹作成によりWAP ドメインの進化を分析した。その結果、収集した多種類の WAP ドメインには異なる微生物やプロテアーゼに対する抗微生物活性、PI 活性を示す可能性のあるものが多数、含まれていることが示唆された。

本研究は PI による感染症の予防、治療への応用に新たな知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位に値するものと認める。