

(第5号様式)

学位論文審査の結果の要旨

氏名	赤澤 隆志
審査委員	主査 小川 雅廣
	副査 松本 由樹
	副査 菅原 卓也
	副査 櫻庭 春彦
	副査 足立 亨介

論文名 Structural and functional analyses of egg white protein ovalbumin-related protein X in chicken embryo

(鶏卵白タンパク質 ovalbumin-related protein X の胚発生における構造と機能の解析)

審査結果の要旨

鶏卵白には 148 種類のタンパク質が存在する。これらのタンパク質は胚の発達のためのアミノ酸供給源と考えられているが、数種のタンパク質には特有の機能が報告されている。例えば、Ovotransferrin (OTF) や Lysozyme (LYZ) は抗菌作用を有しており、微生物感染から卵黄中に位置する胚を保護している。さらに、Ovalbumin (OVA)、OTF、LYZ については、受精卵を 37°C で保温すると卵白から胚に移行することが示され、胚発生に直接的な働きをする可能性が示唆されているが、そのことを証明する研究報告はほとんどない。

Ovalbumin-related protein X (OVAX) は分子量約 50kDa の卵白タンパク質で、卵白中に 0.03%(w/v)しか存在しない微量タンパク質である。この OVAX については、近年、複数の硫酸基を持つ多糖 Heparin と静電相互作用で結合することが報告され、生物学的に重要な機能を持つ可能性が示唆されている。Heparin やその構造類似体である Heparan Sulfate (HS) は、Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) や Fibroblast Growth Factors (FGFs) などの成長因子と結合して胚発生の調節を行っていることから、Heparin に結合する OVAX は胚発生の調節に直接的に関わっているとの仮説を立てて、その仮説を検証するための研究を行った。研究結果は学位論文の第2章から第4章までの3つの章で構成され、卵白中の OVAX が孵化過程において胚に移行するか、孵化過程における OVAX は Heparin 結合能を有しているか、OVAX が胚発生における骨形成因子 BMP2 の軟骨形成活性に影響を及ぼすかを調べた。

第2章では、有精卵を 37°C で保温中に OVAX が卵白から別の部位に移動するかを、抗 OVAX 抗体を使って調べた。ウエスタンブロッティングの結果から、OVAX は保温中に卵白から卵黄に移動することが明らかとなった。また、10 日間保温した胚の免疫組織化学分析より、OVAX

は鶏胚のほぼすべての組織に存在することを示した。これらの結果から、卵白 OVAX は卵黄を通して胚の各組織に取り込まれることが示唆された。

第3章では、OVAX の Heparin との結合親和性が卵の保温中も維持されているか、また維持されている場合どの程度の親和性があるのかを調べることにより、孵化過程における OVAX の Heparin 結合力を予測した。保温前の卵と 10 日間保温した卵からそれぞれ卵白を回収し、Heparin Sepharose クロマトグラフィーにかけ、NaCl の濃度勾配で OVAX を溶出させたところ、卵白には Heparin 親和性の異なる 4 つの OVAX 分子種（親和性の強い方から OVAX₄、OVAX₃、OVAX₂、OVAX₁）が存在すること、保温前の卵白には OVAX₄ と OVAX₃ が多く存在するのに対して、10 日間保温した卵白では OVAX₂ が圧倒的に多いことがわかった。これら 4 種類の OVAX 分子種は、いずれも同じ分子量（約 50kDa）を持っていたが、OVAX₄ と OVAX₂ の構造を比較すると、OVAX₂ は OVAX₄ よりも α -helix 含量が低く、また分子表面の正電荷の数も低いとわかった。OVAX₄ と OVAX₂ の Heparin 結合親和性を、リガンドとして Fondaparinux を使い等温滴定熱量計で調べたところ、OVAX₄ の解離定数 K_d 値は 0.096 ± 0.001 (nM) であったのに対し、OVAX₂ の K_d 値は 0.185 ± 0.037 (nM) であり、OVAX₂ の Heparin 結合能は OVAX₄ より低いことがわかった。以上のことから、産卵直後の卵白の OVAX は OVAX₄ と OVAX₃ が大半を占めるが、保温中に構造変化を伴い Heparin 結合力は低下し 10 日後には OVAX₂ が多数を占めるようになることがわかった。

第4章では、Heparinの類似多糖HSが胚発生中の軟骨分化の調節に関わっていることから、卵白OVAXがHSを介した軟骨分化調節にどのような作用を示すか調べた。OVAXはHeparinと同様に複数の硫酸基を持ち静電相互作用によりHSと強く結合すると考えられたので、HSと相互作用する骨形成成長因子BMP2の働きにOVAXが関与するとの仮説を立て研究を行った。本章では、鶏胚から採取した間葉系細胞の高密度培養系を使ってBMP2の軟骨形成活性へのOVAXの作用を調べた。OVAX₄を培養系に加えることでBMP2の軟骨形成活性は増加したが、OVAX₂を加えても軟骨形成活性の増加はみられなかった。また、OVAX₄を添加した細胞ではSmadリン酸化が亢進していたことから、OVAX₄はBMP2を介した軟骨形成を促進すると結論づけた。第3章の結果よりOVAX₄はOVAX₂よりもHeparin 結合親和性が高いことから、OVAX₄はHSについても同様の高い親和性を維持していると予想され、その高いHS親和性が軟骨分化の促進に関わっていると示唆された。

以上の結果より、鶏卵白タンパク質 OVAX は卵黄を通過して胚に取り込まれるが、その過程で Heparin 親和性は減少していくことが明らかとなった。胚発生の初期段階に多い OVAX₄ は BMP2 の軟骨形成活性を増加させたが、胚発生の後期段階に多い OVAX₂ は軟骨形成活性を増加させなかったことから、OVAX は主に胚発生の初期段階における軟骨形成を促進させる働きをしていると示唆された。このように鶏卵白中の特定のタンパク質が胚発生中の器官形成に直接的な関わりを示す結果はこれまでに報告されておらず、オリジナリティーの高い博士論文であるといえる。

本学位論文に関する公開審査会は、令和2年2月8日に愛媛大学農学部で開催され、論文の口頭発表とそれに関する質疑応答が行われた。引き続き開催された学位論文審査委員会において本論文の内容について慎重に審査を行った結果、審査委員全員一致して博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定した。