卵黄膜タンパク質 VMO-1 の分子特性と生理活性に関する研究

お茶の水女子大学基幹研究院自然科学系・教授　相川　京子

■　緒　言

VMO-1(vitelline membrane outer layer protein-1)は鶏卵の卵黄膜外層に含まれる分子量 18,000 のタンパク質である。ニワトリの体内で成熟卵胞が卵管を通過し、卵が形成される過程において、VMO-1 は卵管膨大部の上皮細胞から分泌され、卵胞表面に付着して被覆し、膜を形成すると考えられるが、VMO-1 の物性や鶏卵における生物学的役割に関する研究は少ない。また、VMO-1 はヒトでは涙液や肺粘膜に分泌されており、眼球や肺の粘膜保護において何らかの生理作用を有する可能性がある。VMO-1 は糖鎖と結合する活性を持つタンパク質(レクチン)と立体構造において高い類似性があり、レクチンは免疫や炎症治癒、感染防御などにおいて様々な活性を示すことが報告されていることから、VMO-1 にも類似した活性があることも推定される。これらの背景を踏まえて本研究ではトリおよびヒト VMO-1 について分子特性や物理化学的な特性を明らかにし、生理活性を探索することを目的として研究を進めた。その成果を鶏卵の生産性の向上や新たな品質管理法への活用、卵黄膜を使った材料や加工品、化粧品開発などの鶏卵由来タンパク質の新たな価値創出につながる研究に発展させることを目指した。

■　方　法

1)鶏卵卵黄膜からのトリ VMO-1 の精製

卵黄膜を凍結破砕後に 0.5M NaCl 溶液中で超音波処理を行い、遠心分離し、得られた上清をヘパリンカラムクロマトグラフィーで分離した。卵黄膜の主成分(オボアルブミン、リゾチーム、オボトランスフェリン、VMO-1、VMO-2)のうち、オボアルブミン、オボトランスフェリンはヘパリンに結合せず、素通り画分に溶出された。リゾチームは 0.4M NaCl で溶出され、VMO-1 は 0.6 ～ 0.7M NaCl で溶出された。VMO-1 溶出画分にはリゾチームが混在していたため、ヘパリンカラムでリクロマトを繰り返し、精製度をあげることでき、より純度の高い VMO-1 を得ることができた。

2)リコンビナントヒト VMO-1 の精製

ヒト組織由来 cDNA より PCR 法により増幅したヒト VMO-1 遺伝子の ORF 領域を pEXPR ベクターに挿入し、Expi293 細胞を使って ST タグ融合タンパク質として VMO-1 を発現させた。培養上清からアフィニティークロマトグラフィーで VMO-1-ST を精製した。

3)VMO-1 の糖鎖修飾、物理化学的性質

VMO-1 の糖鎖修飾はレクチンブロット法で検出した。修飾部位の特定はアミノ酸配列予測および部位特異的変異体解析により行った。融解温度(Tm)測定はサーマルシフト法により行った。

4)リゾチームの酵素活性への影響

VMO-1 がリゾチームの酵素活性を調節する可能性を考え、リゾチームの溶菌活性が VMO-1 共存下で変化するかを比較した。溶菌活性は *Micrococcus lysodeikticus* 懸濁液にリゾチームを添加し、450nm における吸光度変化を観察した。

5)VMO-1 とリゾチームの結合試験

リゾチームをマイクロタイタープレート表面に固相化し、リコンビナントヒト VMO-1-ST を添加した。その後にリゾチームに結合した VMO-1-ST を、抗 ST 抗体を使って検出した。

■　結　果

ヘパリンカラムを用いて卵黄膜抽出液からトリ VMO-1 を精製する過程で、リゾチームと VMO-1 の分離が困難であったことから、両者が相互作用する可能性が考えられた。これは Guyot らによるプロテオーム解析において[1]、VMO-1 が卵白成分中のヘパリン結合タンパク質の 1 つとして同定されていたこともからも支持された。そこで、ヒト VMO-1-ST に関してもヘパリンとの相互作用をヘパリンカラムクロマトグラフィーで調べたところ、ヘパリンとは全く結合しないことが明らかになった。哺乳類の VMO-1 とトリ VMO-1 のアミノ酸配列を比較したところ、トリ VMO-1 と比較して哺乳類 VMO-1 ではヘパリンとの相互作用に寄与する塩基性アミノ酸残基が少ないことがわかった。トリ

VMO-1 において塩基性アミノ酸残基はジスルフィド結合の周辺に多く分布しており、これらの残基が分子表面でヘパリンとの結合に寄与する領域を形成していることが推定された。ヘパリン結合性はトリ VMO-1 の特徴であることがわかり、卵黄表面への吸着性に寄与する可能性が考えられた。

アミノ酸配列上のポテンシャルグリコシレーションサイトから、トリおよびヒト VMO-1 には N-結合型糖鎖は付加しないことがわかった。一方、ムチン型 O-結合型糖鎖が付加する可能性の高いアミノ酸残基が 3 カ所見つかった。ムチン型 O-結合型糖鎖を検出するレクチンである PNA と SBA で検出を試みたところ、トリ VMO-1 にはムチン型 O-結合型糖鎖付加はないことがわかった。一方ヒト VMO-1 にはムチン型 O-結合型糖鎖が付加していることがわかった(図 1)。ヒト VMO-1 のムチン型 O-結合型糖鎖付加のポテンシャル 3 残基(Thr33、Ser100、Ser102)について変異体解析を行ったところ、そのうちの Ser100 にムチン型 O-結合型糖鎖が付加していることがわかった。これはトリ VMO-1 とは異なる特徴である。また、Ser100 を置換した VMO-1 は顕著に細胞外への分泌性が低下したことから(図 2)、ムチン型 O-結合型糖鎖修飾がヒト VMO-1 の可溶性に大きく寄与していることがわかった。

サーマルシフト法により、トリおよびヒト VMO-1 の Tm 測定を行ったところ、トリ VMO-1 の Tm は約 63℃であることがわかった。一方、ヒト VMO-1 は測定開始の 25℃よりすでに色素の蛍光強度が高く、未変性の状態で表面疎水性が高い可能性が考えられた。しかしながらヒト VMO-1 は溶液中での可溶性は高く、この特性はムチン型 O-結合型糖鎖付加により付与されている可能性が高い。

リゾチームに対する固相結合試験の結果から、トリおよびヒト VMO-1 は共にリゾチームに結合することがわかった。しかし、VMO-1 共存下でもリゾチーム活性は影響を受けないことがわかった。この結果から、リゾチーム分子表面の VMO-1 結合部位はリゾチームの酵素活性部位とは異なることがわかった。

■ 考 察

ヒトおよびトリ VMO-1 は共にリゾチームと結合するが、リゾチームの酵素活性には影響しないことがわかった。この相互作用の生物学的意義は不明である。ヒト VMO-1 にはトリ VMO-1 にはないムチン型 O-結合型糖鎖修飾があることがわかった。これにより塩基性アミノ酸残基が減少しても分子の可溶性が保持されていることが推定された。また、ヒト VMO-1 は天然の状態で疎水性が高いが、可溶性を保持しているユニークな特性を持つことがわかった。何らかのリガンドと結合することでコンフォメーション変化が起こる可能性もあり、それがヒト VMO-1 の生物学的役割と関連する可能性がある。

■ 要 約

ヒト VMO-1 とトリ VMO-1 についてヘパリン結合性、リゾチーム結合性、糖鎖修飾、アミノ酸配列比較、Tm 値の比較をし、両者の分子特性の特徴づけを行った。

■ 文 献

1. Guyot N, Labas V, Harichaux G, Chessé M, Poirier JC, Nys Y, *et al*. Proteomic analysis of egg white heparin-binding proteins：towards the identification of natural antibacterial molecules(2016)*Scientific Reports* 6(2016)27974.

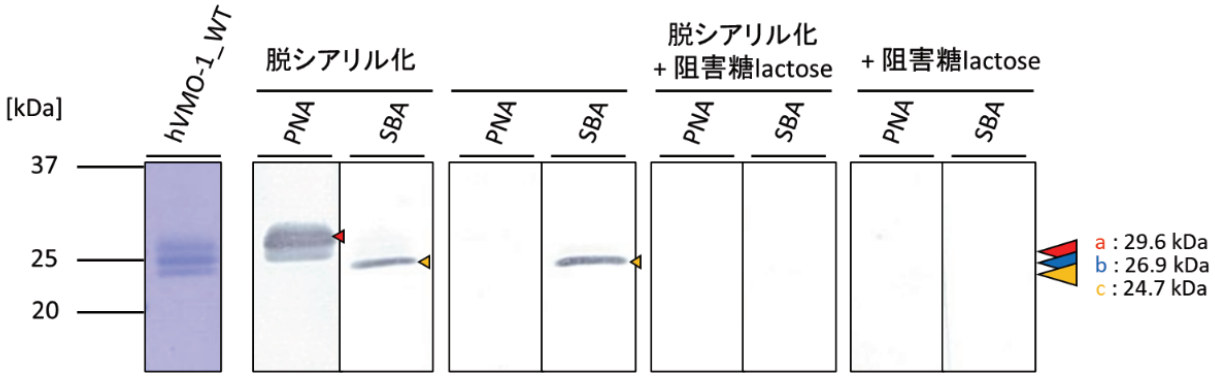

図 1　リコンビナントヒト VMO-1（VMO-1-ST）のレクチンブロット
VMO-1-ST を電気泳動で分離後、PVDF 膜に転写し、25mM H_2SO_4 で 80℃、1 時間反応させてシアル酸を除去した。その後にピーナッツレクチン（PNA）、ダイズレクチン（SBA）と反応させた。VMO-1 は糖鎖修飾の違いで 3 つのバンド（a、b、c）として分離されたが、いずれも PNA あるいは SBA で検出されたことから、糖鎖付加していることが明らかになった。

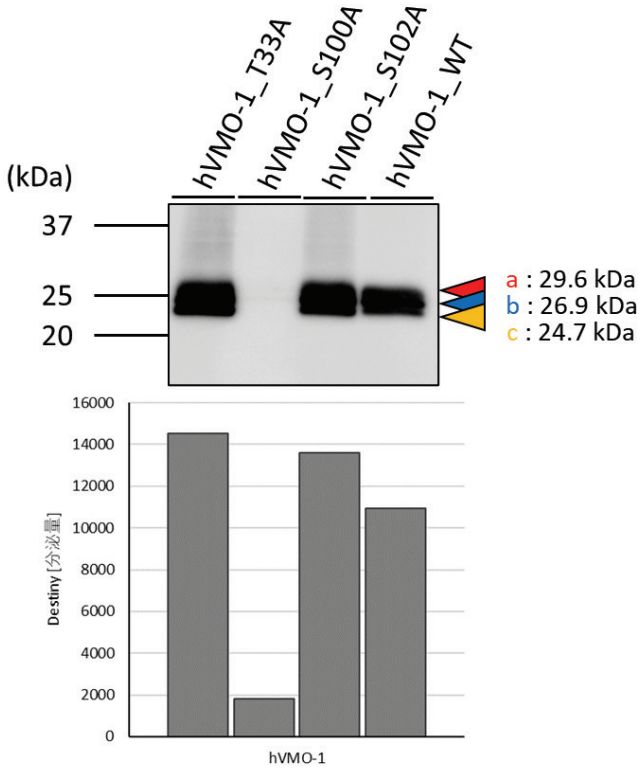

図 2　ヒト VMO-1 の分泌性
Expi293 細胞の培養上清中の VMO-1 を電気泳動で分離後、イムのブロットにより検出した。下の棒グラフはブロットのバンドのデンシトグラフィーである。