

## 反芻動物ラクトフェリンのN末端領域 アミノ酸配列の類似性について

関川 三男<sup>1</sup>・島崎 敬一<sup>1</sup>・三上 正幸<sup>1</sup>・三浦 弘之<sup>1</sup>

(受理: 1992 5月29日)

Similarity of N-terminal amino acid sequences  
among three ruminant lactoferrins

M. SEKIKAWA<sup>1</sup>, K. SHIMAZAKI<sup>1</sup>,  
M. MIKAMI<sup>1</sup> and H. MIURA<sup>1</sup>

### 摘 要

3種類の反芻動物の初乳から得られたラクトフェリンのN末端領域のアミノ酸配列を決定し相互の類似性を検討した。決定されたアミノ酸配列は、N末端からヤギ19残基 (APRKNV<sup>R</sup>WX AISLPEWSKX), ヒツジ26残基 (APRKNV<sup>R</sup>WX AISPPEGSKXYEQQWRM), ウシ29残基 (APRKNV<sup>R</sup>WCAISPPEGSKRYQWQKKMRM) である。これら3種類の反芻動物間での類似性は、これまでに報告された他の動物間 (ヒト, サル, ウマ, マウスおよびブタ) のものよりいずれも高かったが, ウマとの類似性が比較的高いことが注目された。

キーワード: ラクトフェリン, N末端アミノ酸配列, 反芻動物

### 緒 言

ラクトフェリンは、ヒトを含む哺乳動物の乳汁や涙、唾液、胆汁などの各種分泌液に存在する鉄結合能をもつタンパク質で、静菌作用や補体系の調節作用などが知られている<sup>10,11</sup>。さらに、タンパク質化学的な研究からは、ヒトや牛においてはcDNAの塩基配列やタンパク質のエドマン分解から全一次構造が決定されている<sup>7,8</sup>。ヒトのラクトフェリンは、N末端領域に4残基アルギニンが連続し、他の動物とは異なる配列を示す。また、乳汁中のラクトフェリン濃度はヒトと牛で異なり、初乳においてヒトは牛の5-6倍の含有量を示す<sup>10</sup>。このようにラ

クトフェリンは、一次構造や乳汁中での含有量に動物間で差がみられる。そこで、今回は、3種類の反芻動物の初乳から得られたラクトフェリンのN末端領域のアミノ酸配列を決定し相互の類似性を検討した。さらに、これまでに報告されている各種動物での結果とも比較を行った。

### 材料および方法

牛、羊および山羊の初乳は、帯広畜産大学付属農場において飼育されている動物から得られたものである。ラクトフェリンの精製は、主にイオン交換およびアフィニティカラムクロマトグラフィーで行った<sup>9-12</sup>。得られたラクトフェリンの精製度は、SDS

<sup>1</sup>生物資源利用学講座

<sup>1</sup>Department of Bioresource Chemistry, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido 080, Japan.

電気泳動および逆相カラムクロマトグラフィーで確認を行った。

アミノ酸配列は、気相シーケンサー (ABI470) を用いて決定した。すなわち、ラクトフェリンの水溶液  $10 \mu\text{l}$  ( $1 \text{mg}/\text{ml}$ ) をポリブレン処理を行ったガラス濾紙上に滴下し風乾した後、装置へ挿入し分析した。なお、エドマン分解のサイクル制御は標準プログラムを用い、各サイクルで得られたPTHアミノ酸は、オンラインのHPLCを用いて標準アミノ酸のクロマトグラムと比較して同定した。

得られた結果から動物間でのアミノ酸配列の類似性を数量的に検討した。類似性は、比較する2つのアミノ酸配列において、同位置で同じアミノ酸残基である数に対する比較を行った全アミノ酸残基数との比率を求めることで評価し、この数値を類似度とした。類似度は、2つの配列が完全に一致すれば、1.0で、まったく一致するアミノ酸がなければ0である。

### 結果および考察

分析に供したラクトフェリンは、牛、羊および山羊それぞれの初乳から精製したもので、SDS電気泳動および逆相カラムクロマトグラフィーで、ほぼ単一であることを確認した。

Table 1の上段 (No. 1-3) は、今回、決定した反芻動物3種のラクトフェリンのN末端アミノ酸配列である。N末端から牛では29残基、羊では27残基および山羊では19残基までが同定された。なお、3種ともに9および19番目のエドマン分解サイクルでは特異的なPTHアミノ酸が得られなかった。このことは、一般にエドマン分解においては、システインは不安定で、ほとんど特徴のあるクロマトグラムを示さないことによるものと考えられる。さらに、これまでに報告された各種動物のラクトフェリンのアミノ酸配列は、第9および第19残基がほとんどシステインであるので<sup>1-3)</sup>、今回、分析を行った3種の動物のラクトフェリンにおいても第9および第19残基はシステインであると推定される。

Table 1の下段 (No. 4-8) は、これまでに報告されたヒトを含む各種動物の乳汁ラクトフェリンのN末端領域のアミノ酸配列を示したものである。Pierceら<sup>2)</sup> は、ラクトフェリンのN末端領域のアミノ酸配列において、Val 6, Trp 8, Cys 9, Ser 12,

Table 1 Partial N-terminal amino acid sequences of three ruminant and other animals' lactoferrins

1. goat	APRKNVRWXAISLPEWSKX-
2. sheep	APRKNVRWXAISPPGSKXYEQQWRM-
3. cow	APRKNVRWCAISPPEGSKRYQWQKMRM-
4. pig <sup>2)</sup>	APKKGVRWCVISTAEYSKCRQWQSKIRRTN-
5. horse <sup>4)</sup>	APRKSVRWCTISPAEAAKCAKFRQNMKK-
6. mouse <sup>6)</sup>	KATTVRWCAVSNSEBEKCLRQWQNMKRVG-
7. human <sup>2)</sup>	GRRRSVQWCAVSQSQPEATKCFQWQRNMRKVR-
8. monkey <sup>2)</sup>	ARRRSVRXXAV-

1-3 : from this study

Glu15, Lys18, Cys19は動物間での差が少なく保守的な部位であると推定している。これらの部位は、今回の反芻動物3種の結果においても前述のPierceらが指摘したアミノ酸にすべて一致し、動物間での変異が少ないものと考えられる。

ヒト<sup>5)</sup>およびサル<sup>2)</sup>のラクトフェリンでは、N末端領域のアミノ酸配列にArgが数個連続するが、他の動物ではこのような配列は見られない。さらに、ラクトフェリンと機能的にもタンパク質科学的にも類似する鉄結合性のタンパク質であるヒト血清トランスフェリンやオボトランスフェリンにおいてもこの特徴は認められない<sup>1)</sup>。すなわち、この特徴は霊長類のラクトフェリンに限定されたものと考えられる。

Table 2は、ラクトフェリンのN末端領域のアミノ酸配列の類似性を示すもので、今回用いた3種の反芻動物に加え、これまでに報告されている動物5種合計8種の動物間での類似度を求めた結果である。なお、今回はN末端から19残基を用いて類似度を求めたが、マウスでは18残基、サルでは11残基の報告しか入手できなかったため、これを用いて計算した。Table 2において、もっとも数値の大きいのは、ヤギとヒツジ間の0.89であり、一方、最小値はサルとマウスの0.29である。この類似度の全体的な特徴を明確化するためにクラスター分析を行い、その結果をFig. 1に示した。この結果は最短距離法によるものであるが最長距離法においてもほぼ同じパターンが形成された。注目される特徴は、1) ヤギ、ヒツジおよびウシの3種が小さいクラスターを形成し、2) これに、まずウマ、次いでブタ

Table 2 Similarity values of the partial N-terminal amino acid sequences of lactoferrins from 8 species

1. goat	1								
2. sheep	0.89	1							
3. cow	0.84	0.79	1						
4. pig	0.68	0.68	0.63	1					
5. horse	0.68	0.74	0.74	0.68	1				
6. mouse	0.50	0.50	0.44	0.44	0.44	1			
7. human	0.53	0.53	0.53	0.37	0.53	0.50	1		
8. monkey	0.55	0.55	0.45	0.36	0.55	0.28	0.73	1	
	1	2	3	4	5	6	7	8	

が加わり、やや大きいクラスターとなること、また、3) ヒトとサルは、ウマとウシの関係よりは近いクラスターを形成すること、しかし、4) マウスは他の動物とは独立したクラスターとなることである。供試した反芻動物3種がクラスターを形成することは、Table 2において、この3種の動物間の値が行列中で最大値を含む3つの大きな値であることから理解できる。すなわち、反芻動物3種のラクトフェリンのN末端領域のアミノ酸配列が相互に類似することを示す。また、ヒトとサルにおいても、Argの連続配列が示すように類似性が高い。しかし、マウスは、今回比較した動物間では、やや異なるN末端領域のアミノ酸配列を示すことが分かる。

これらのクラスターは、従来の動物分類と概ね一致するが、奇蹄類の馬が偶蹄類である反芻動物と豚の間に混在する結果となっている。今回、用いた8種の動物において、反芻動物と馬は草食性で、これ以外はすべて雑食性である。この食性による分類と今回得られたラクトフェリンのN末端領域のアミノ酸配列の類似性のクラスターが一致することは興味深い。すなわち、初乳は動物の誕生後に始めて経口的に摂取する食餌であり、その動物種に固有の組成や特徴を持ち、これらの特徴がその動物の食性ともしも関連性を有するとすれば、初乳に含まれる特定のタンパク質、例えばラクトフェリンなどの一次構造と食性とが関連しているかも知れないからである。

ラクトフェリンの機能の一つは鉄の運搬や組織への供給などであり、分子の立体構造や分子内での鉄結合部位はトランスフェリンやオボトランスフェリ

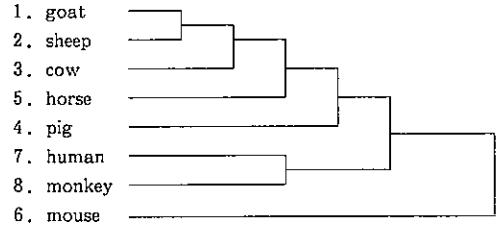


Fig 1 Dendrogram drawn by the cluster analysis based on the nearest neighbour method using the similarity value matrix

ンと類似する。このため、一次構造においても鉄結合部位や分子内での架橋部位(S-S結合等)、これらは主に分子(各葉)の中央領域に存在し、この領域のアミノ酸配列には動物間で共通部分が多い<sup>1)</sup>。一次構造がすべて決定されているヒトとウシとの類似性は、分子全体で69%<sup>1)</sup>であるが、今回示したN末端領域のアミノ酸配列の類似性は約50%で、分子全体より低い。すなわち、ラクトフェリンのN末端領域のアミノ酸配列は、分子全体と比較したときよりも動物間での差が大きい。このことは、N末端あるいはC末端領域では、分子の中央領域に比べて動物間で類似性が低いことによるものと推察される。

タンパク質の一次構造から生物の種や属レベルの系統関係を考察するには、一般にいくつかの仮定を置きタンパク質の完全アミノ酸配列から種々の方法で数値計算することが多い。しかし、今回示したようにN末端の部分アミノ酸配列の比較においても、従来の分類と大きく矛盾しない結果が得られることや、さらに動物の食性との関連性などの興味深い問題が提示されることなど、有用な情報が得られるので、今後は分類学的な方向からの検討や食性の異なる動物との比較も有益であると考えられる。

## 文 献

- 1) Crichton, R.R., Proteins of iron storage and transport, in *Advances in Protein Chemistry*, Anfinsen, C.B., Edsall, J.T., Richards F.M. and Eisenberg ed., Academic press, Cariformia, Vol. 40, 281-363, 1990.
- 2) Davidson, L.A. and Lonnerdal, B., Isolation and characterization of Rhesus monkey milk lactoferrin. *Pediatr. Res.*, 20 :

- 197-201, 1986.
- 3) Hutchens, T.W., Magnuson J.S. and Yip, T., Rapid purification of porcine colostrum whey lactoferrin by affinity chromatography on single-stranded DNA-agarose. Characterization, amino acid composition and N-terminal amino acid sequence. *Biochim. Biophys. Acta*, 999 : 323-329, 1989.
  - 4) Jolles, J., Donda, A., Amiguet, P. and Jolles, P., Mare lactotransferrin: purification, analysis and N-terminal sequence determination. *FEBS Lett.*, 176 : 185-188, 1984.
  - 5) Metz-Boutingue, M.-H., Jolles, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spik, G., Montreuil, J. and Jolles, P., Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur. J. Biochem.*, 145 : 659-676, 1984.
  - 6) Pentecost, B.T. and Teng, C.T., Lactotransferrin is the major estrogen inducible protein of mouse uterine secretions., *J. Biol. Chem.*, 262, 10134-10139, 1987.
  - 7) Pierce, A., Colavizza, D., Benaissa, M., Maes, P., Tartar, A and Montreuil, J., Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin, *Eur. J. Biochem.*, 196 : 177-184, 1991.
  - 8) Powell, M.j. and Ogden, J.E., Nucleotide sequence of human lactoferrin cDNA, *Nucleic Acids Res.*, 18:4013, 1990.
  - 9) 島崎敬一, 西尾真理, 河野信貴 : ホエー中の微量有用タンパク質の分離に関する研究, *酪農科学・食品の研究*, 37 : A45-51, 1988.
  - 10) 島崎敬一 : ラクトフェリンの分離と利用, *酪農科学・食品の研究*, 38 : A278-A283, 1989.
  - 11) Shimazaki, K. and Nishio, M.: Interacting properties of bovine lactoferrin with immobilized cibacron blue F3GA in column chromatography, *J. Dairy Sci.*, 74 : 404-408, 1991.
  - 12) Shimazaki, K., Kawano, N. and Yoo, YC.: Comparison of bovine, sheep and goat milk lactoferrins in their electrophoretic behavior, conformation, immunochemical properties and lectin reactivity, *Comp. Biochem. Physiol.*, 98B : 417-422, 1991.
  - 13) 高柳直己, 新飯田裕一, 千葉峻三 : ラクトフェリン 炎症, 免疫のChemical mediator としての再評価, *小児科臨床*, 39 : 1287-1293, 1986.

### Summary

The amino acid sequences of amino-terminal regions from goat, sheep and cow lactoferrins were determined and compared with those of other animal lactoferrins reported previously. The amino-terminal sequence of goat lactoferrin was APRKNVRWXAISLPEWSKX, that of sheep was APRKNVRWXAISPEEGSKXYEQQWRM and that of cows was APRKNVRWCAISPPEGSKRYQWQKKMRRM. These sequences for the three ruminant lactoferrins showed higher homology with each other than they did with other animal lactoferrins.