

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：30108

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16355

研究課題名（和文）母乳中アデノシンデアミナーゼ2の産生メカニズムと腸管粘膜組織における役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the production mechanism of adenosine deaminase 2 in breast milk and its role in intestinal mucosal tissue

研究代表者

伊藤 萌子（Ito, Moeko）

北海道科学大学・薬学部・講師

研究者番号：60711827

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：母乳には多種多様な生理活性物質が含まれ、直接的または間接的に新生児の成熟に関与する。近年、母乳の新規タンパク質が数多く発見されているが、アデノシンをイノシンに非可逆的に脱アミノ化する酵素群として知られるアデノシンデアミナーゼ（ADA）アイソザイムは網羅的解析から同定されていない。本研究では、ADAの既知の化学的性質を利用して得た乳清粗精製サンプルの半定量的解析により、乳清中のADA1、ADA2をそれぞれ検出し、ADAアイソザイム別の酵素活性測定法により産後1週間におけるADAの活性変化を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

母乳がADAアイソザイムを含有することが示唆され、初乳における高い活性は新生児期におけるADAの特異的役割が推測されるものである。ADA-related growth factorに属するADA2はヒトでは分布が限定的であるが、乳清中に継続して検出されたことでADA2の分布組織としての新たな知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：Breast milk contains a wide variety of bioactive substances and is directly or indirectly involved in the maturation of the newborn. In recent years, many novel proteins in breast milk have been discovered, but adenosine deaminase (ADA) isozymes, a group of enzymes known to irreversibly deaminate adenosine to inosine, have not been identified from comprehensive analysis. In this study, we detected ADA1 and ADA2 in crude purified whey samples which was obtained using the known chemical characteristics of ADA, respectively, and clarified changes in ADA activity during the first week postpartum.

研究分野：生物系薬学

キーワード：アデノシンデアミナーゼ 乳汁

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アデノシンデアミナーゼ (ADA) は、アデノシンをイノシンに非可逆的に脱アミノ化する酵素であり、ヒトの ADA 活性は、ADA1、ADA2 の 2 つのアイソザイムにより維持されている。細胞外の ADA はアデノシンの濃度を制御することにより、アデノシンが介在するシグナル伝達を調節できる。リンパ球の機能調節に関わる ADA1 は、全身で発現し、遺伝性突然変異により重症複合免疫不全症 (SCID) を発症する。一方、アデノシンデアミナーゼ成長因子 (Adenosine deaminase-related growth factors (ADGF)) に属する ADA2 は、モデル脊椎動物において組織発生の調節に関わり、ヒトでは主に血中に存在する。血中の全 ADA 酵素活性の約 6~7 割は ADA2 が担う。ADA2 の活性は HIV 感染症、結核、急性白血病、敗血症、各種肝疾患などで上昇し、また、ADA2 遺伝子の機能喪失性劣性変異により結節性多発動脈炎や若年性脳卒中の原因となることが報告されている。

新生児の消化管は出生後に始まる経腸栄養の刺激により構造的、機能的に発達する。消化管の消化吸收機能、内分泌機能、生体防御機能の総合的な発達には母乳栄養が重要である。母乳中には成長因子や免疫調節因子など多種多様な生理活性物質が含まれ、直接的または間接的に新生児の消化管粘膜の成熟に関与する。しかし、母乳中の低濃度タンパク質の発現については、その検出に伴う技術的な問題で、比較的わずかししか知られていない。そのため、母乳中の生理活性物質に関する全貌の解明が必要とされる。

### 2. 研究の目的

ヌクレオチド、ヌクレオシドおよび核酸塩基は、母乳の non-protein-nitrogen (NPN) 画分に属する。一般に、ほとんどのヌクレオシド類の濃度は、泌乳期間または授乳期間が進むにつれて徐々に減少する傾向があり、これらの微量化合物が幼少期に特異的な生理的影響を与える。母乳のヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基は、代謝物として作用するだけでなく、生物活性物質として身体機能の調節に関与する。例えば、ヌクレオチドは腸での鉄吸収に寄与し、脂肪酸合成における脱飽和および伸長速度、特に生後早期の長鎖多価不飽和脂肪酸に影響を与える。また、リボヌクレオシドによる細胞増殖およびアポトーシスの調節機能がヒト細胞培養モデルにより示されている。これらの要因から、乳児用調整粉乳やフォローアップミルクの製造においては、食事性ヌクレオシドの生物学的および栄養化学的特性により、特定のリボヌクレオチドが補充される。

ヒト母乳は ADA の基質であるアデノシンを検出可能なレベルで含有する。母乳のアデノシン量の調節機構は明らかではないが、母乳中に ADA が存在する場合、アデノシン代謝を介してシグナル伝達の調節に寄与する可能性がある。ヒト母乳のプロテオミクス解析により、何百もの新しいタンパク質が発見されているが、ADA アイソザイムは網羅的な解析からは同定されていない。本研究では、母乳中の ADA に着目し、母乳中の酵素活性、含有量、化学的性質からその生理的意義を考察することを目的とした。また、母乳中の種々の成長因子は初乳で高く、新生児期における消化管上皮の成熟に成長因子が多量に要求されることと相関する。ADA2 は ADGF に属するため母乳が含有する成長因子の一つとして機能する可能性があり、アイソザイム別に活性を検出することで ADA2 特異的な活性変化を明らかにし、その役割を推察する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 対象

倫理委員会の承認のもと、天使病院で出産した産婦 24 人から産後 7 日以内の母乳の提供を受けた。

#### (2) ADA 活性測定

乳清の ADA 活性の測定は 96 穴マイクロプレートを用いた比色法で実施した。遠心分離により乳清を得た後、乳清 20 $\mu$ L を 0.1U/mL XOD (Xanthine oxidase from butter milk)、0.24U/mL PNP (Nucleoside phosphorylase from microorganisms)、0.1mM NBT (Nitro blue tetrazolium chloride)、20mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 緩衝液 (pH6.5) を含む反応液に加え、37<sup>o</sup>C、5 分間プレインキュベーションした後、終濃度 3mM となるように adenosine を加え反応を開始した (反応液全量: 200 $\mu$ L)。37<sup>o</sup>C、1~6 時間反応後、50% 酢酸 50 $\mu$ L を加え反応を停止させ、生じた diformazan の吸光度を 540nm の波長で microplate reader により測定した。ADA1 の特異的阻害剤である EHNA は、終濃度 0.1mM となるように加える。1U=1 diformazan  $\mu$ mole/min/mL と規定する。インキュベーション時間は、吸光度増加が直線性を示す範囲で設定した。

ADA2 活性と全 ADA 活性は、各々 EHNA の添加と非添加時の活性を測定し求めた。また、ADA1 活性は、全 ADA 活性から ADA2 活性を差し引いて算出した。Diformazan のモル吸光係数が 36,000 (M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>) であり、かつ、この反応系では 1/2 モル生成するので、単位時間当たりの酵素活性は、(A540-B.G.)  $\times$  {1/(1/2  $\times$  36000)}  $\times$  全量 250( $\mu$ L)/検体量( $\mu$ L)  $\times$  1/60 (min) = 0.231  $\times$  (A540-B.G.) / 検体量( $\mu$ L) ( $\mu$ mole/min/mL) として算出した。

産後 1 週間の乳清における total ADA、ADA1、ADA2 の酵素活性の経時変化を記録し、また、ADA1/ADA2 活性比を算出した。

### (3)ADA の検出

ADA2 のヘパリン結合性利用し、乳清からヘパリンアフィニティクロマトグラフィーにて粗精製した ADA アイソザイムをウエスタンブロットで検出し、母乳中のタンパク量を推定した。

## 4 . 研究成果

乳清からは total ADA 活性が検出された。EHNA を添加して ADA1 の活性を選択的に阻害したところ、活性は完全に失われることなく残存した。一方、2'-DCF (2'-deoxycoformycin) を添加して ADA1 と ADA2 の両方の活性を阻害すると、酵素活性は完全に消失したため、母乳には ADA1 および ADA2 の両方が存在すること示唆された。また、乳清をヘパリン結合画分と非結合画分に分離すると、結合画分に ADA2、非結合画分に ADA1 が検出された。ヒトでは ADA1 が全身で発現するのに対し、ADA2 の分布は限定的であるため、ADA2 の組織分布として新たな知見が示された。

産後 1 週間の活性変化は、母乳中の ADA1、ADA2 とともに生後 1 日目の平均活性が高く、その後低下する傾向があった。白血球が主な ADA 産生細胞であることを考慮すると、母乳中の白血球数が ADA アイソザイムの活性に影響を与えると推測する。一般に、初乳には多数の白血球が含まれるが、産後 1 週間を過ぎると急激に減少し、移行期および成熟乳では感染期を除いて白血球の含有量は非常に少なくなるが、産後 7 日間の ADA アイソザイムの酵素活性の変動は母乳中の白血球数の変動と類似しており、両者の関連が推測された。また、ADA アイソザイムの活性は、産後 1 日目の個人差が大きく、1 週目の終わりにかけて差は収束した。生後 1 日目の白血球数は個人差が大きく、成熟乳では一定の範囲内で変動するため、ADA アイソザイム活性と白血球の関連を示すものと考えられる。また、乳清の ADA1 および ADA2 の酵素活性比は、通常血漿で ADA2 が優位であるのとは異なり、ADA1 活性が高い傾向があった。母乳中の ADA アイソザイム含有量は活性値と相関しない傾向があり、検出法の見直しを含めた正確な定量が課題となった。これらの結果は、母乳が ADA アイソザイムを含有することを示唆し、初乳における高い活性は、新生児期における ADA の特異的役割が推測されるものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nihira, H. Izawa, K. Ito, M. Umebayashi, H. Okano, T. Kajikawa, S. ...Yasumi, T.	4. 巻 148
2. 論文標題 Detailed analysis of Japanese patients with adenosine deaminase 2 deficiency reveals characteristic elevation of type II interferon signature and STAT1 hyperactivation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol	6. 最初と最後の頁 550-562
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaci.2021.01.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito, M. Nihira, H. Izawa, K. Yasumi, T. Nishikomori, R. Iwaki-Egawa, S.	4. 巻 628
2. 論文標題 Enzyme activity in dried blood spot as a diagnostic tool for adenosine deaminase 2 deficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anal Biochem	6. 最初と最後の頁 114292
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ab.2021.114292	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤 萌子, 多田 美月, 相馬 まゆ子, 今田 愛也, 佐々木 洋一, 江川(岩城) 祥子
2. 発表標題 ヒト乳汁中アデノシンデアミナーゼアイソザイムの産後7日間における活性変化とタンパク検出
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木まどか、鈴木麻美、多田美月、伊藤萌子、相馬まゆ子、今田愛也、佐々木洋一、江川(岩城)祥子
2. 発表標題 ヒト乳汁中の2つのADAアイソザイムの産後7日間における活性変化
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第146回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤萌子、中江雄星、大野彩美、渡辺泰裕、江川（岩城）祥子
2. 発表標題 アデノシンデアミナーゼ2の活性発現における糖鎖修飾の役割
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山内萌生、白井瑠奈、伊藤萌子、渡辺泰裕、江川（岩城）祥子
2. 発表標題 疾患原性変異型ADA2の機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 江川（岩城）祥子、富所拓、伊藤萌子、後藤眞、渡辺泰裕
2. 発表標題 Werner症候群におけるアデノシンデアミナーゼアイソザイム
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前島優子、西村知貴、伊藤萌子、江川（岩城）祥子
2. 発表標題 アデノシンデアミナーゼ2の二量体形成における糖鎖修飾の役割
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第148回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金森万由里、伊藤萌子、江川(岩城)祥子
2. 発表標題 新規アデノシンデアミナーゼ内因性インヒビター
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------