

学 位 論 文 題 名

サケ・マス類の免疫グロブリン（IgM）に関する研究；

—特に血清 IgM の動態及び卵黄中の IgM 様蛋白に関する構造学的研究

学位論文内容の要旨

現在、わが国で漁業生物上重要な位置を占めているサケ・マス類の種苗生産において疾病の発生は深刻な問題である。疾病を直接低減する方法として水産用医薬品が用いられている。一方、魚類が持っている自己の生体防御能を高めるワクチネーションも試みられているが、現在認められているワクチンは2種類と数少なく、しかもその作用機構は不明な点が多い。立ち遅れている魚類の生体防御機構の解明は急務かつ熱望されている研究課題の一つである。これまで魚類の免疫機構に関しては、生体内に病原菌が侵入した場合等に生ずる“免疫応答”に関する研究及び他の脊椎動物において体液性免疫の中心的役割を演ずる“免疫グロブリン”の構造や機能に関する研究が主に行われてきた。サケ・マス類の免疫グロブリン（IgM）の研究は、わずかにギンザケ、シロサケ及びニジマスにみられるのみである。本研究では免疫機構に関する基礎的知見を集積するために、サクラマス *Oncorhynchus masou* 及びシロサケ *Oncorhynchus keta* を対象魚として、IgM の生化学的検討を行い、血清 IgM の動態及び卵黄中に存在する Ig に関する研究を行った。

サクラマス血清の IgM の検索並びに分離精製を行い、精製 IgM を得、家兎抗 IgM 血清を製した。これを用いて血清 IgM の測定系を確立し、池中飼育サクラマスの仔魚期から成熟産卵期の生活史全般にわたり血清 IgM の動態を観察した。次に親魚から卵への IgM の移行の可能性を推測し、卵黄中の Ig を免疫学的手法により検索した。シロサケに初めて卵に存在する“IgM 様蛋白”が観察できた。この IgM 様蛋白の分離を試み、部分精製し、いくつかの物理化学的生状を明らかにした。

サクラマス IgM の精製は硫酸塩析、イオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過を組み合わせ分選精製を行った。精製 IgM は抗シロサケ IgM 血清と抗サクラマス血清に対して一本の沈降線を示し、免疫学的に高純度であった。セルロースアセテート膜電気泳動では、 β -グロブリン領域に Ig の特徴的なバンドが見られた。非還元下 SDS-PAGE での IgM の分子量は750

kDであり、還元処理後のSDS-PAGEでは、H鎖及びL鎖に相当する分子量68kD及び23kDのサブユニットが出現した。このことから、サクラマスIgMは2H-2Lを基本構造とした4量体であると推定された。アミノ酸分析の結果を含め、今回のサクラマスIgMに関して得た結果は、シロサケ及びこれまでの硬骨魚類での報告とほぼ一致した。

精製サクラマスIgMを標準蛋白とし、抗サクラマスIgM血清を用いたSRID法により高感度な血清IgMの測定法を確立した。同法を用いて北大水産学部附属七飯養魚実習施設で飼育中のサクラマス（七飯系）及び北海道立水産孵化場森支場のサクラマス（森系）を用い、孵化後49日から成熟産卵年までのIgMの動態を観察した。孵化後49日から489日（1+前後）までの血清IgMは49日に既に検出されたが、定量が可能になったのは孵化後88日以降であった。88日から235日までIgM量は、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の低いレベルであり、235日から徐々に増加し、429日までに $691\pm 37\mu\text{g}/\text{ml}$ （mean \pm SE）のレベルに達した。429日以降、IgM量には大きな個体変異が観察されたが、以後一定レベルで推移した。一方、血清総蛋白量は孵化後88日から235日までは $10\text{mg}/\text{ml}$ 以下でほぼ一定値を示したが、235日から300日にかけて急激に増加し、 $36.1\pm 0.4\text{mg}/\text{ml}$ に達した後、489日までほとんど変化は観察されなかった。血清IgM量は、血清総蛋白量が一定値を示した後も増加した。

血清IgMの孵化後512日から777日（1+後期）までの推移は、日数の経過に伴い個体差が大きくなる傾向が見られたが、特に大きな変動は観察されなかった。測定期間中、全個体のIgM量の平均は $822.3\pm 25.6\mu\text{g}/\text{ml}$ （ $n=264$ ）であり、1+前期のプラト一期の平均と比べると、若干高いレベルであった。

孵化後489日までのIgM量と体重、体長との相関関係を調べた結果、体重25gまでIgM量と体重は強い正の相関（相関係数、 $r=0.65$ ）を示したが、25g以上では相関性を示さなかった。しかし、銀毛個体を除いた場合、25g以上でも強い正の相関（ $r=0.64$ ）を示した。一方、IgM量と体長の相関関係はほとんど無かったが、銀毛個体を除くと、正の相関（ $r=0.59$ ）を示した。免疫学的成熟の指標と考えられる血清IgMの増加は、1+前期までは孵化からの日数（年齢）より体重や体長（サイズ）に強い相関性を示した。また銀毛個体のIgM量がサイズに比較し低かったのは、パー・スマルト変態期における血中コーチゾルの一時的増加による免疫機構の抑制に関連していると推測された。

成熟産卵年の1月から9月までの森系サクラマスの血清IgM量を測定した結果、雌雄とも性成熟に伴う季節的変動は特に観察されなかった。しかしながら、雄の血清IgM量は $2.273\pm 118\mu\text{g}/\text{ml}$ 、雌では $2.049\pm 97\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、七飯系サクラマス1+と比較すると、森系の血清

IgM量は、七飯系 ($691 \pm 37 \mu\text{g}/\text{ml}$) の約3倍の値を示した。このIgM量の大きな差には、生息環境の違いが強く影響していると推測された。

二元免疫拡散法によって、シロサケ及びサクラマス卵黄中の抗シロサケIgM血清に反応する蛋白を検索した結果、シロサケ卵黄中のみ抗IgM血清に反応する蛋白が観察され、この蛋白を“IgM様蛋白”とした。IgM様蛋白の部分精製は概ね血清IgMの精製に準じた。卵黄中のIgM様蛋白と血清IgMとの免疫学的交差反応性は抗IgM血清を用いた二元免疫拡散法において、同一の抗原性を有した。免疫電気泳動でのIgM様蛋白は、血清IgMと同様、 β -グロブリン位に移動した。一方、IgM様蛋白の分子量はSDS-PAGEでは495kDと測定され、血清IgMの分子量(750kD)より小さかった。IgM様蛋白の還元処理後のSDS-PAGEとウエスタンブロットティングでは、分子量68kD、51.5kD及び23kDの3本のサブユニットバンドが観察された。分子量68kD及び23kDはそれぞれ血清IgMのH鎖、L鎖に対応した。1次抗体に抗H鎖抗体を用いたウエスタンブロットティングにより、68kDと51.5kDのサブユニットはH鎖であり、23kDのサブユニットはL鎖であることを証明した。分子量68kDと51.5kDの各H鎖のモル比が1:2.5であったことから、51.5kDのサブユニットは分子量495kDのIgM様蛋白の主H鎖であると結論づけた。IgM様蛋白の単量体が、2H-2L構造からなるとすれば、分子量は約150kD ($2 \times 51.5\text{kD} + 2 \times 23\text{kD} = 150\text{kD}$) となり、卵黄中のIgM様蛋白は3量体 ($3 \times 150\text{kD} = 450\text{kD}$) であると推定された。

本研究では、IgM様蛋白の起源や機能を解明するには至らなかったが、卵に存在するIgM様蛋白は、これまでの知見及び血清IgMとの比較生化学的解析から卵細胞自体で合成されるのではなく、血液を介して卵に取り込まれると考えられた。サケ・マス類に発生する疾病に対して、疾病特有の抗原等で雌魚を免疫しておけば、卵黄を介して胚体や仔魚にその特異抗体が移行し、予め疾病に強い卵や稚仔魚を得ることができる可能性が示唆された。本研究で明らかにされたサケ・マス類の卵黄中のIgM様蛋白について、今後健苗生産の面からも詳細な研究が必要である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 崎 文 雄
副 査 教 授 山 田 寿 郎
副 査 助 教 授 後 藤 晃
副 査 助 教 授 原 彰 彦

サケ・マス類の増養殖における集約化には疾病の発生は深刻な問題であり、この対策には生体防御機構の解明が不可欠な研究課題となっている。申請者は本論文において、生体防御機構の中で特に免疫応答の主役となる血清 IgM について生活史全般に亘りその動態を観察し、親魚から卵への IgM の移行の可能性を推測して卵黄中の Ig を免疫学的手法によって検索したものである。本論文で特に評価される成果は以下の通りである。

1) サクラマス血清 IgM の検索並びに分離精製を行った。IgM の精製には硫酸塩析、イオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過を組み合わせる免疫学的に高純度の IgM を得た。得られた血清 IgM の分子量は非還元化 SDS-PAGE で 750kD と推定し、還元処理後の SDS-PAGE で H 鎖および L 鎖に相当する分子量 68kD 及び 23kD のサブユニットを検出した。これらの結果からサクラマス IgM は 2 H - 2 L を基本構造とする 4 量体から成ることを明らかにした。

2) 精製サクラマス IgM を標準蛋白として抗サクラマス血清を作り、これを用いた SRID 法により高感度な血清 IgM の測定法を初めて確立した。同法を用いてサクラマスの生活史全般にわたり血清 IgM を測定した。更に飼育環境の異なる 2 系統のサクラマスについて孵化後 49 日から 489 日 (1+前期) までの血清 IgM の動態を明らかにした。血清 IgM は孵化後 49 日に検出され、定量が可能になるのは孵化後 88 日以降で、88 日から 235 日までは $100 \mu\text{g/ml}$ 以下の低いレベルで推移し、235 日から徐々に増加し、429 日までに $691 \pm 37 \mu\text{g/ml}$ のレベルに達すること、更に 429 日以降には個体変動が大きくなるがその後はある巾で一定になることを明らかにした。血清総蛋白量の推移についても併せて調べ、235 日から 300 日にかけて急激に増加するがその後一定の値を示すこと、サクラマスの移動期に相当する時期は血清 IgM 量と総蛋白量の動態から判断して生理的に不安定の時期であることを示唆した。

3) 血清 IgM 量と体重との関係を調べ、体重 25 g までは IgM 量と体重は強い正の相関 ($r = 0.65$) を示すが、25 g 以上では相関性は示さないことを明らかにした。しかし、25 g 以上でもギンケ個体を除くと相関がみられること、ギンケ個体の血清 IgM 量はサイズに比較して低いこ

とを明らかにした。この現象をギンケ変態時に起きる血中コーチゾル濃度の一時的な上昇との関連で考察し、ギンケ変態時にみられる個体の一時的不安定化と血清 IgM 量との関連について重要な指摘を行った。更に異なる系統間で血清 IgM 量の差のあることから飼育環境が血清 IgM 量に影響を与えること、雄の血清 IgM 量は $2,273 \pm 118 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、雌では $2,049 \pm 97 \mu\text{g}/\text{ml}$ で明らかに雌雄差のあることを指摘し、行動にみられる性差との関連で興味深い問題を提起した。

4) 二元免疫拡散法によってシロサケ及びサクラマス卵黄中にシロサケ IgM 血清に反応する蛋白を初めて検出し、この蛋白を IgM 様蛋白とした。IgM 様蛋白は免疫電気泳動により血清 IgM と同様、グロブリン位に移動すること、分子量は SDS-PAGE で 495kD と測定され、血清 IgM 分子量 (750kD) より小さいことを見だし、親魚血清中の IgM と卵黄中の IgM 様蛋白が分子的に異なることを明らかにした。更に申請者はこの蛋白の分子構造を解析し、分子量 51.5 kD を H 鎖、23kD を L 鎖とするサブユニットからなり、単量体が 2 H - 2 L 構造からなると仮定すると、分子量は 447kD となり、実測値 495kD と良く一致することから、卵黄中の IgM 様蛋白は 3 量体と推測した。この推測は雌親魚の血清中に存在する 4 量体 IgM が直接卵に移行して蓄積される可能性を否定するものである。申請者は従来の知見と血清 IgM との比較生化学的解析結果から IgM 様蛋白は卵細胞自体で合成されるのではなく、血液を介して卵に取り組みられると推論し、卵膜通過の際、分子的に修飾を受けることを示唆した点は、卵成熟との関連で極めて注目に値する。更にこの結果はサケ・マス類に発生する疾病に対して、疾病特有の抗原で雌親魚を免疫することにより、移行抗体によってあらかじめ疾病に強い卵や稚仔魚を得る可能性を示唆している点で応用的にも意義深く注目に値する。

本論文はこれまでシロサケから得られていた血清 IgM に関する生化学的知見をサクラマス IgM でも確かめたこと、更に血清 IgM の動態を明らかにしてサクラマスの発育に伴う生体防御能力を考慮した増養殖管理の可能性を示唆したこと、卵内に初めて IgM 様蛋白を検出したことにより、サケ・マス類稚仔魚における生体防御機構の解明に大きく寄与し、疾病の予防と健苗育成の上で重要な示唆を与えるものとして審査員一同は本論文を博士 (水産学) の学位論文として十分な業績と判定した。