

学 位 論 文 題 名

ウシのハプトグロビンの分子構造とその病態生化学

学位論文内容の要旨

ハプトグロビン (Hp) は、ヘモグロビン (Hb) に特異的に結合するタンパク質で、ほとんどの哺乳動物種に血清タンパク質の主要成分のひとつとして存在しており、Hb の代謝や急性相反応に関与していると言われている。本研究ではウシの Hp を比較生化学的に検索し、Hp のより普遍的な性質と機能を明らかにすることを目的として、1) Hp をウシ血清より分離精製してその分子性状を調べ、特に巨大集合体を構築するメカニズムを明らかにするために、2) cDNA をクローニングして一次構造を決定した。さらに、3) 特異抗体を用いた測定法を確立して Hp の急性相反応を C-反応性タンパク質 (CRP) 等の他の血清タンパク質の変動と比較検討し、以下の諸知見を得た。

1) 炎症ウシ血清より Hb との結合活性を指標として Hp を分離した。精製されたタンパク質は、1,000-2,000kDa と血清タンパク質の中では最も巨大な分子であり、20kDa (α 鎖) の単純ペプチドと35kDa (β 鎖) の糖ペプチドの2種のサブユニットがS-S結合により1対1の比で会合してこのタンパク質を構成していた。それぞれのサブユニットのN-末端領域のアミノ酸配列はヒトの Hp と相同性を示したことが、およびこのタンパク質が Hb に結合したことより、これが Hp であることを確認した。ウシ Hp を部分的に還元して得られる産物の分子サイズの測定から、このタンパク質は $\alpha_2\beta_2$ の4量体を基本構築ユニットとし、血清中にはそれが2から20ユニット会合した非常に不均一な分子形態で存在すると推定した。さらに、血清中の Hp には $\alpha_2\beta_2$ の1ユニットあたり1分子の Hb が結合し得ること、および Hp を部分的に還元して分子サイズを変化させても Hb との結合活性はほとんど変化しないことも明らかとなった。

2) ウシの Hp が巨大分子を構築するメカニズムをタンパク質の一次構造レベルで明らかにするために、炎症性疾患のウシの肝臓より調製した mRNA をもとに作製した cDNA ライブラリーから Hp の cDNA をクローニングし、塩基配列を決定した。それにコードされたアミノ酸配列から、ウシ Hp は、シグナルペプチド、一部繰り返し構造を持つ α 鎖、および β 鎖が連なった1本のポリペプチドとして合成された後にプロテアーゼによる切断を受け、137残基の α 鎖と245残

基の β 鎖が生成するものと推定された。ウシ Hp の配列をヒトやラットと比較すると、Hb 結合サブユニットである β 鎖に α 鎖よりも高い相同性が認められた。ウシ Hp の α 鎖には、約60残基の重複配列が存在しており、ウシ Hp はヒト Hp^2 遺伝子産物と同様に、遺伝子の重複により形成された分子であると考えられた。しかも、その重複構造はヒト Hp^2 と極めてよく対応する位置に存在しており、何らかの共通のメカニズムによって構築されたものと推察された。また、ヒト Hp^2 産物もウシ Hp と同様に S-S 結合で高度に重合した不均一なタンパク質であるが、サルを含め他の動物種の Hp が均一であることと考え併せると、ウシ Hp をコードする遺伝子はヒト Hp^2 とは独立に遺伝子重複によって非常に似通った進化（収斂進化）を行ったことが示唆された。さらに、 α 鎖にはヒト Hp には欠けているシステイン残基が存在しており、これが、極めて高度に重合した巨大分子を形成するというウシ Hp の分子特性に関与するものと考えられた。

3) 精製したウシ Hp をウサギに免疫して特異抗体を作製し、これを用いて単純放射免疫拡散法による簡便な測定法を開発した。特に、試料を予め温和な還元条件で処理することにより、高度に重合した不均一な Hp が部分的に還元されて均一になることを見出し、測定感度と信頼性の飛躍的向上に成功した。この方法を用い、テレピン油を皮下に投与して実験的に炎症を誘発したウシで、血清 Hp の変動を、CRP、血清アミロイド P 成分 (SAP)、および α_1 -酸性糖タンパク質 (α_1 -AG) とともに観察した。投与局所の腫脹にともない、Hp 濃度は処置前には検出限界 ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) 以下だったのが、1-2 日後には50倍 ($1 \text{mg}/\text{ml}$) 以上に上昇し、その後、炎症の治癒にともない再び検出限界以下に低下した。これに対し、CRP と α_1 -AG は2-3 倍程度の上昇にとどまり、SAP はほとんど変動しなかった。第一胃切開術を施した場合にもほぼ同様の傾向が観察され、Hp がウシの炎症において極めて有効なマーカーの1つとなり得る可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齊 藤 昌 之

副 査 教 授 藤 田 正 一

副 査 教 授 藤 永 徹

副 査 部 長 内 貴 正 治 (国立予防衛生研究所)

ハプトグロビン (Hp) は、ヘモグロビン (Hb) に特異的に結合する血清糖タンパク質で、Hb の代謝や急性相反応に関与している。ウシをはじめとする反芻動物の Hp についても、従来から比較生化学的な研究が行われており、他種の Hp とは異なる巨大分子であることが知られていた。しかし、その分子構造の詳細は不明のままだった。申請者はウシ Hp を分離精製しその分子性状を調べ、特に巨大集合体を構築するメカニズムを明らかにするために、cDNA をクローニングして一次構造を決定した。さらに、特異抗体を用いた Hp の定量法を確立してウシにおける急性相反応について検討した。これらの成績をまとめた本論文は和文57頁からなり、参考論文5編を付している。

第1章では、炎症ウシ血清より Hb との結合活性を指標として Hp を分離し、その分子性状を調べた。精製されたタンパク質は、1,000–2,000kDa と血清タンパク質の中では最も巨大な分子であり、20kDa (α 鎖) の単純ペプチドと35kDa (β 鎖) の糖ペプチドの2種のサブユニットがS–S結合により1対1の比で会合していた。それぞれのサブユニットのN–末端領域のアミノ酸配列はヒトの Hp と相同性を示し、しかもこのタンパク質が Hb に強く結合するので、これが Hp であることを確認した。ウシ Hp を部分的に還元して得られる産物の分子サイズを測定した結果、このタンパク質は $\alpha_2\beta_2$ の4量体を基本構築ユニットとし、血清中にはそれが2から20ユニット会合した非常に不均一な分子形態で存在すると推定した。

第2章では、ウシの Hp が巨大分子を構築するメカニズムをタンパク質の一次構造レベルで明らかにするために、Hp の cDNA をクローニングし、塩基配列を決定した。それにコードされたアミノ酸配列から、ウシ Hp は、シグナルペプチド、一部繰り返し構造を持つ α 鎖、および β 鎖が連なった1本のポリペプチドとして合成された後に、プロテアーゼによる切断を受け、137残基の α 鎖と245残基の β 鎖が生成するものと推定された。ウシ Hp の配列をヒトやラットと比較すると、Hb 結合ドメインを有する β 鎖のほうが α 鎖よりも高い相同性を有していた。また、ウシ Hp の α 鎖には、約60残基の重複配列が見出されたが、これはヒト Hp² 遺伝子で知られて

いる重複配列と対応する位置に存在していた。この結果と、重複型の Hp はサル等には存在しないという報告とを考え併せると、ウシ Hp とヒト Hp² 遺伝子産物は、共通の祖先から由来したというよりは、何らかの似通ったメカニズムにより、それぞれ別々に構築されたのではないかと想像されるので、この結果は分子進化の観点において非常に興味深いものである。さらに、 α 鎖にはヒト Hp には欠けているシステイン残基が存在しており、これが分子間 S-S 結合を形成することにより、極めて高度に重合した巨大分子を形成すると推定した。

第3章では、精製したウシ Hp をウサギに免疫して特異抗体を作製し、これを用いて単純放射免疫拡散法による簡便な測定法を開発した。特に、試料を予め温和な還元条件で処理することにより、高度に重合した不均一な Hp が部分的に還元されて均一になることを見出し、測定感度と信頼性の飛躍的向上に成功した。この方法を用い、実験的に炎症を誘発したウシでの血清 Hp 濃度の変動を、他の急性相タンパク質である、C-反応性タンパク質 (CRP) や、 α_1 -酸性糖タンパク質 (α_1 -AG) とともに観察した。Hp 濃度は、炎症誘発から 1-2 日後には前値の50倍以上にまで上昇し、炎症の治癒にともない再び検出限界 ($20\mu\text{g}/\text{ml}$) 以下に低下した。これに対し、CRP と α_1 -AG は 2-3 倍程度の上昇にとどまった。これらの成績は、Hp がウシの炎症マーカーとして極めて有用であることを示唆している。

以上のように申請者は、ウシ Hp を分離精製するとともに、cDNA 側からその全一次構造を推定することにより、この巨大タンパク質の形成に、遺伝子重複と一つのアミノ酸のシステインへの変異が関与することを示した。さらに、本研究で確立された特異抗体を用いた測定法は、ウシの炎症診断法の一つとして有望なものである。よって審査員一同は、森松正美氏が博士 (獣医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。