

学 位 論 文 題 名

Biochemical and molecular aspects
of bovine C—reactive protein

(ウシ C—反応性タンパク質の生化学的および分子生物学的性状)

学位論文内容の要旨

C—反応性タンパク質 (CRP) はヒトでは古くから急性相タンパク質の 1 つとして知られており、炎症及び組織の損傷により血清中の濃度は数百倍に増加する。CRP は他の多くの動物でも存在が明らかにされ、その分子性状や特定のリンガンド、例えばホスホリルコリン (PC) 基への結合性はよく知られている。しかし、CRP の生体内における真の役割は解明されておらず、おそらく侵入した微生物の多糖体や崩壊した組織のクロマチンに PC 基を介して結合し、抗体、補体、マクロファージの助けを得て、これらを速やかに排泄する役割を持つであろうと想像されている。しかし、ウシ CRP は PC 結合能が弱く、他の役割をはたしている可能性がある。

本論文の目的は、先ずウシの CRP をより効率よく精製する方法を考案し血清中 CRP 濃度を敏速かつ簡便に測定できる免疫測定法を確立し、臨床応用を可能にすることである。ウシ CRP の分子性状をより明らかにする手段として単クローン抗体を作出し、更に各種の CRP に認められる PC 結合部位をコードする遺伝子配列が、ウシでどのように変異しているか調べ、ウシ CRP に認められた PC 結合能の低下の原因を探ることを目的とした。

本論文は以下の 4 章よりなり、各章の要旨は次の如くである。

1) CRP と血清アミロイド P タンパク質 (SAP) をウシ血清より、高純度に精製し、各々のタンパク質のサブユニットに、1 つの分子内 S—S 結合が存在することを明らかにした。ここで使われた精製法は新しい方法で、CRP 及び SAP の回収率は各々 15% 及び 26% であった。この方法は先ず血清の 45—75% の硫酸塩析画分を HE アガロースカラムにかけ、ガラクトースに対する親知性を利用して CRP と SAP を分離し、この両者を DEAE—5 PW カラムを用いた HPLC にて分離する方法である。

2) 血清中の CRP 濃度を野外でも敏速かつ正確に測定するため、簡便なラテックス粒子凝集反

応法を開発した。本法では精製した抗体を径が $0.489\mu\text{m}$ のラテックス粒子 1mg 当たり $20\mu\text{g}$ の割合でコートし、 1% の濃度に懸濁して用いた。これを検体と等容ガラス板上で攪拌し、45分間密閉容器内に放置し、凝集の度合で判定した。本法により得られた値は過去に確立した単純放射免疫拡散法により得られた値と極めてよく相関した。

3) ウシ CRP に対する 3 つの異なる単クローン抗体を BALB/c マウスを免疫することによって樹立した。このすべての抗体は K 軽鎖を持つ IgM 型の抗体で、2 つはヒト、ヤギ、ネコの CRP と交差反応したが、残りの 1 つはウシ CRP とのみ反応した。過去に作出したヒト CRP に対する 5 つの単クローン抗体 (すべて IgG 型) についても交差反応性を調べたが、1 つがウシ、ヤギ、ネコの CRP と交差反応し、他の 1 つがネコ CRP とのみ交差反応し、残りの 3 つはヒト CRP とのみ反応した。

4) ウシ CRP の分子構造を明らかにするため、 2.2Kb よりなる cDNA をウシ肝 cDNA ライブラリーより分離した。この cDNA は *EcoR* I, *Hind* III, *Pst* I, *Sac* I, *Xba* I の制限酵素で切断される箇所を各々 1 つずつ持つことが判った。この cDNA の塩基配列の一部を決定したところ、19 のアミノ酸よりなるシグナルペプチドを持ち、N 末端はグルタミンから始まり、合計 87 のアミノ酸配列まで明らかにされた。この部分でのアミノ酸配列をヒト、ウサギ、マウス、ハムスターの CRP と比較すると、各々 82%, 89%, 81%, 81% の相同性がみられ、これがウシ CRP の cDNA であることが確認された。一方このアミノ酸配列中に PC 基に対する結合部位 (52 番のアミノ酸から 66 番のアミノ酸まで) が含まれるが、ウシ CRP が PC 基に対し親和性が極めて弱い理由は、48 番の塩基性のアルギニンが中性のグルタミンに置換しているためと解釈された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齊 藤 昌 之

副 査 教 授 佐 藤 文 昭

副 査 教 授 藤 永 徹

副 査 国立予防衛生

研究所部長 内 貴 正 治

血清タンパク質の一つであるC-反応性タンパク質（CRP）については、ヒトでは古くから研究されており、炎症や組織の損傷により血清濃度が著しく増加することから、代表的な急性相タンパク質として知られている。ヒト以外の多くの動物種でもCRPの存在が確認されており、その分子性状や血中動態に関する知見も集積されつつある。特に、ウシのCRPについては、代表的なりガンドであるホスホリルコリン（PC）基への結合が弱く、しかも炎症時でも血中濃度があまり変化しないことが知られている。ミーナ・サリカプティ氏は、このようなウシCRPの特質を分子レベルで解明し併せて臨床応用への手掛りを得ることを目的として、まず、ウシCRPの効率よい精製法を考案し、これに対する単クローン抗体を作出すると共に血清濃度の迅速かつ簡便な定量法を確立した。更に、アミノ酸配列を決定し分子特性の理解を深めた。これらの成績をまとめた本論文は、英文68頁からなり、以下の4章で構成されている。各章の要旨は以下の通りである。

1) CRPと血清アミロイドPタンパク質（SAP）をウシ血清より、高純度に精製するために、血清の45-75%の硫酸塩析画分をHEアガロースカラムにかけ、ガラクトースに対する親知性を利用してCRPとSAPを分離し、この両者をDEAE-5PWカラムを用いたHPLCにて分離するという新しい方法を考案した。CRP及びSAPの回収率は各々15%及び26%であった。

2) 血清中のCRP濃度を野外でも迅速かつ正確に測定するため、簡便なラテックス粒子凝集反応法を開発した。即ち、精製した抗CRP抗体を径が $0.489\mu\text{m}$ のラテックス粒子1mg当たり20 μg の割合でコートし、1%の濃度に懸濁して用いた。等容の検体とガラス板上で攪拌した。45分間密閉容器内に放置し、凝集の度合で判定した。本法により得られた値は過去に確立した単純放射免疫拡散法により得られた値と極めてよく相関した。

3) ウシCRPに対する3種の単クローン抗体をBALB/cマウスを免疫することによって樹

立した。このすべての抗体はK軽鎖を持つIgM型の抗体で、2つはヒト、ヤギ、ネコのCRPと交差反応したが、残りの1つはウシCRPとのみ反応した。ヒトCRPに対する5種の単クローン抗体（すべてIgG型）についても交差反応性を調べたが、1つがウシ、ヤギ、ネコのCRPと交差反応し、他の1つがネコCRPとのみ交差反応し、残りの3つはヒトCRPとのみ反応した。

4) ウシCRPの分子構造を明らかにするため、2.2 KbよりなるcDNAをウシ肝cDNAライブラリーより分離した。このcDNAは*EcoR* I, *Hind* III, *Pst* I, *Sac* I, *Xba* Iの制限酵素で切断される箇所を各々1つずつ持つことが判った。このcDNAの塩基配列の一部を決定し、19個のアミノ酸よりなるシグナルペプチドと、グルタミンから始まるN末端から87個のアミノ酸配列を明らかにした。これをヒト、ウサギ、マウス、ハムスターのCRPと比較すると、各々82%, 89%, 81%, 81%の相同性がみられ、これがウシCRPのcDNAであることが確認された。一方このアミノ酸配列中にPC基に対する結合部位（52番のアミノ酸から66番のアミノ酸まで）が含まれるが、ウシCRPがPC基に対し親和性が極めて低い理由は、48番の塩基性のアルギニンが中性のグルタミンに置換しているためと解釈された。

以上のように、本論文はウシCRPに関する多くの新知見を提示しており、今後の基礎的並びに臨床的研究の推進に貢献するところが大きい。よって審査員一同は、ミーナ・サリカプティ氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格を有するものと認める。