

学 位 論 文 題 名

ニジマス血清中に存在するペントラキシンファミリー
タンパク質および炎症誘導時の血清蛋白質変動に関する研究

学位論文内容の要旨

ペントラキシンファミリーに属する急性相蛋白質のC反応性蛋白質 (C-reactive protein: CRP) と血清アミロイドP成分 (Serum amyloid P component: SAP) は分子進化上起源の古い蛋白質であり、免疫系の発達が不十分な魚類などの下等脊椎動物においては、生体防御上重要な役割を有すると考えられる。これらの蛋白質をニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) の血清から分離し、その性状を明らかにすることを試みて以下の成績を得た。

CRP は肺炎双球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) の多糖体C画分を結合した支持体によるアフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって分離を行った。精製したニジマス CRP はポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) で 135 kDa、非還元条件 SDS-PAGE で 25 kDa の位置に泳動された。電気泳動したゲル内分離蛋白質を Polyvinylidene difluoride 膜に転写した後、転写部分を切り取り、プロテインシーケンサーの試料反応部に直接挿入して、N末端アミノ酸配列を解析した。判明した配列と各種蛋白質の配列を比較した結果、ニジマス CRP は既知の動物 CRP と類似する配列を有していた。電子顕微鏡による蛋白質分子の観察では、ペントラキシンファミリー分子構造の特徴である五角形状にサブユニットが結合した 5 量体構造が認められた。

SAP は HEアガロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーと

ゲル浸透カラムを用いた HPLC によって分離した。SAP は PAGE で分子サイズ 140 kDa、非還元条件 SDS-PAGE で 100 kDa 以上、還元 SDS-PAGE で 32 kDa に泳動され、サブユニットが共有結合構造をとっていることが判明した。N末端アミノ酸配列解析によって判明した配列は、他の動物種の SAP と類似部分を有しており、電子顕微鏡による観察では五角形の 5 量体構造と五角形が 2 個結合した 10 量体構造の 2 種類が認められた。

次に、炎症刺激や環境変化に対する、ニジマスの CRP や SAP の変動についての情報を得るため、さらに未同定の急性相蛋白質存在の可能性を調べる目的で、血清蛋白質成分変化の経時的解析を試みた。実験魚に炎症誘導物質であるリポ多糖体、またはフロイント完全アジュバントを腹腔内投与し、経時的に 3 尾ずつ全採血して血清を分離した。分離血清を等電点電気泳動と SDS-PAGE を組み合わせた 二次元電気泳動により解析した結果、各物質接種後 24 時間後から分子サイズ 43 kDa、等電点 (pI) 6.8~7.0 の蛋白質 (43 kDa 蛋白質) 増加が認められた。43 kDa 蛋白質はニジマス CRP や SAP と電気泳動での移動度や pI が異なっており、炎症誘導によって産生が増加する未同定の急性相蛋白質である可能性が示唆された。一方、CRP や SAP の変動は検出されなかった。また環境変化実験として、飼育実験水の温度を 12°C から 25 °C へ急激に上昇させた後、同様の解析を行ったが、認めるべき変化は得られなかった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 沼 操 副 査 教 授 齊 藤 昌 之
副 査 教 授 藤 永 徹 副 査 助 教 授 児 玉 洋

学 位 論 文 題 名

ニジマス血清中に存在するペントラキシンファミリー タンパク質および炎症誘導時の血清蛋白質変動に関する研究

ペントラキシンファミリーに属する急性相蛋白質のC反応性蛋白質 (C-reactive protein:CRP) と血清アミロイドP成分 (Serum amyloid P component:SAP) は分子進化上起源の古い蛋白質であり、免疫系の発達が不十分な魚類などの下等脊椎動物においては、生体防御上重要な役割を有すると考えられている。これらの蛋白質をニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) の血清から分離し、その性状を明らかにすることを試みて以下の成績を得た。

CRPは肺炎双球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) の多糖体C画分を結合した支持体によるアフィニティークロマトグラフィーと高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって精製した。精製ニジマスCRPはポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) で135kDa、非還元条件ラウリル酸ナトリウム (SDS) -PAGEで25kDaの位置に泳動された。N末端アミノ酸配列を解析したところ、ニジマスCRPは既知の動物CRPと類似する配列を有していた。電子顕微鏡観察では、ペントラキシンファミリー分子構造の特徴である五角形状にサブユニットが結合した5量体構造が認められた。

SAPはHEアガロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーとHPLCによって精製した。SAPはPAGEで分子サイズ140kDa、非還元条件SDS-PAGEで100kDa以上、還元SDS-PAGEで32kDaに泳動され、サブユニットが共有結合構造をとっていた。N末端アミノ酸配列解析では、他の動物種のSAPと類似部分を有しており、電子顕微鏡観察では五角形の5量体構造と10量体構造の2種類の存在が示唆された。

次に、炎症刺激や環境変化に対するニジマスのCRPやSAPの変動を調べる目的で、血清蛋白質成分の経時的変化を二次元電気泳動により解析した。炎症誘導物質であるリボ多糖体またはフロイント完全アジュバントを腹腔内投与した時、CRPやSAPの変動は検出されなかったが24時間後から分子サイズ43kDa、等電点 (pI) 6.8~7.0の蛋白質の増加が認められた。この蛋白質はニジマスCRPやSAPと電気泳動での移動度やpIが異なっており、炎症誘導によって産生が増加する未同定の急性相蛋白質である可能性が示唆された。飼育実験水の温度を12°Cから25°Cへ急激に上昇させたが、認めるべき変化は得られなかった。

この研究はニジマスのCRPとSAPの性状を初めて明らかにしたものであり、魚類の生体防御を解明する際重要な知見を提供するものである。よって審査員一同は村田美栄氏が博士 (獣医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。