

学 位 論 文 題 名

ヒグマ血清ハプトグロビンの構造と季節性変動

学位論文内容の要旨

冬眠は食物が不足する冬を乗り越えるための適応戦略であり、生体内に蓄えたエネルギーの消費を節約するための生理現象である。冬眠中の動物は低体温を示すので、冬眠動物には低体温に耐えるための何らかの適応機構があると考えられている。これまでに冬眠動物である数種のジリスにおいて、急性相タンパク質である α_2 マクログロブリン(α_2 M)の血清濃度が冬眠に関連して増加することが示された。また、北海道にも生息しているシマリス(*Tamias sibiricus*)では他の急性相タンパク質である α_1 アンチトリプシン(α_1 -AT)の類似タンパク質を含む複合体の血清濃度が冬眠時に減少する季節性変動を示すことが知られている。急性相タンパク質とは感染や炎症の初期に血中濃度が増加するタンパク質の総称であり、炎症反応によって乱される恒常性の回復、維持に必要であると考えられている。一方、冬眠中の動物では体温、心拍数、呼吸数等が低いながら一定に維持されているので、恒常性維持機能は保たれている。したがって、冬眠は生体の恒常性のセットポイントを再設定する機構であるとも考えられるので、冬眠にいくつかの急性相タンパク質あるいはその類似タンパク質が関与していても不思議ではない。本研究では大型の冬眠動物であるヒグマ(*Ursus arctos*)の急性相タンパク質と冬眠との関係を明らかにする目的で、代表的な急性相タンパク質であるハプトグロビン(Hp)を中心に検討し、以下の結果を得た。

1. Hpはヘモグロビン(Hb)結合タンパク質であり、ほとんどの脊椎動物に存在している。多くの動物のHpは二つのサブユニット、 α

鎖（軽鎖）と β 鎖（重鎖）からなり、 β 鎖に糖鎖が結合した血清糖タンパク質である。ヒトHpでは3種の表現型が同定され、この中でもっとも単純な分子構造をとるHp1-1は α 鎖と β 鎖がS-S結合によって結合した $\alpha\beta$ ユニットを形成し、さらに、 α 鎖間のS-S結合によって $\alpha\beta$ ユニットが結合した $\beta-\alpha-\alpha-\beta$ の構造をとる。ほとんどの動物種のHpはHp1-1と同様の構造をとっていると考えられているが、ヒグマに近縁なイヌのHpでは、 $\alpha\beta$ ユニットが非共有結合によって結合した $(\alpha-\beta)_2$ の異種四量体であること及び α 鎖にも糖鎖が付加されている等、他の動物種のHpではみられない特徴を持っている。そこで、ヒグマHpもイヌHpと同様の特徴を持っているか否かを明らかにする目的で、北海道ヒグマ (*U. a. yesoensis*) の血清からHpを精製し、ヒグマと同じ食肉目の動物であるネコとイヌのHp及びヒトHp1-1と比較した。

還元及び非還元条件下のラウリル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動やゲル濾過高速液体クロマトグラフィー、アミノ酸配列分析の結果から、ヒグマHpのサブユニット構成はイヌHpと同様、 $\alpha\beta$ ユニットが非共有結合で結合した $(\alpha-\beta)_2$ の四量体構造であることが示された。ネコHpについても同様の結果が得られたので、上述のサブユニット構成は食肉目動物種のHpに共通に見られる特徴であると思われる。一方、N末端領域のアミノ酸配列の分析によってヒグマ及びネコHp α 鎖には糖鎖が結合していないことが示唆された。したがって、 α 鎖の糖鎖付加はイヌHp特有の特徴であることが示された。

2. ヒグマ血清のHp濃度を免疫学的方法で測定するために、抗ヒグマHpウサギ血清を作成し、これを用いて単純放射免疫拡散法によるヒグマ血清のHp濃度測定法を確立した。この測定法は、被検血清や精製ヒグマHpにHbを添加しても測定結果に影響しなかったので、溶血した被検血清にも適応可能であると考えられる。なお、この測定法の検出限界値は10 $\mu\text{g/ml}$ であった。

3. 上記の測定法を使って101頭の飼育下及び27頭の野生北海道ヒ

グマの血清のHp濃度を測定したところ、野生の健常な成獣25頭の平均値は 0.94 ± 0.25 mg/ml であり、これまでに報告されている他の動物種の健常な成獣の平均値とほぼ同じであった。一方、飼育下の健常な成獣67頭の平均Hp濃度は 3.82 ± 0.29 mg/ml であり、野生個体のそれよりも4倍高値であった。この違いの原因としてグループ飼育の影響等が考えられたが、明確な理由は不明である。なお、いずれにおいても雌雄差は認められなかった。また、当歳の幼獣17頭の血清では低グロブリン濃度を示し、これと同様にHp濃度も低値を示した。一方、外傷を持った飼育下の成獣14頭の平均値は健常な成獣のそれとほぼ同じであったが、より重篤な疾患を持っている飼育下の成獣(3頭)や明らかに異常が認められた野生の成獣(2頭)の血清Hp濃度は高値を示したので、Hpはヒグマでも急性相タンパク質であると考えられた。

4. 上述の飼育下の健常な成獣を対象に採血時期によって、春(3～5月)、夏(6～8月)、秋(9～11月)、冬(12月及び1～2月)の4グループに分けて、測定結果をまとめたところ、血清Hp濃度の平均値は季節性変動を示し、春に低く (2.29 ± 0.25 mg/ml)、秋に増加し (4.38 ± 0.34 mg/ml)、冬に春の値の約2倍 (4.61 ± 0.77 mg/ml) に増加することが判明した。総タンパク質及びアルブミンの血清濃度や赤血球数の平均値についても季節性の変動が認められたが、それらの変動幅はHpの変動に較べて小さく、いずれの変動パターンもHpとは異なっていた。

5. ヒグマ血清のHp濃度の季節性変動をより明確にするために、7頭のヨーロッパヒグマ (*U. a. arctos*) の同一個体から1年を通して数回血液を採取し、血清Hp濃度の変動を追跡した。すべての個体は2月に冬眠したが、この時、平均Hp濃度は最高値 (3.67 ± 0.56 mg/ml) となり、秋(9～10月及び11～12月)の平均値(それぞれ、 0.97 ± 0.41 mg/ml、 1.01 ± 0.42 mg/ml)の約3.5倍、5月の平均値 (0.32 ± 0.13 mg/ml) の約10倍であった。

他の急性相タンパク質濃度についてもウエスタンブロッティング法

で測定したところ、2月に採取した血清の平均 α_2 M 濃度が他の時期に採取した血清のそれに較べて約1.5倍に上昇していた。これはジリスで報告されている結果と一致していたので、冬眠中の α_2 M 濃度の増加は冬眠動物に共通した現象であると考えられた。一方、 α_1 -AT や C-反応性タンパク質の血清濃度については一定の季節性変動は認められなかった。

これらの結果から、ヒグマの血清の Hp 濃度の季節性変動は急性相反応とは独立した現象であり、冬眠に関連した変化であることが示された。冬眠における Hp の生理的な意義は明らかではないが、低体温状態での生体防御能の維持等、ヒグマの冬眠に必要な分子であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齊 藤 昌 之

副 査 教 授 金 川 弘 司

副 査 教 授 葉 原 芳 昭

副 査 助 教 授 森 松 正 美 (岩手大学農学部)

学 位 論 文 題 名

ヒグマ血清ハプトグロビンの構造と季節性変動

冬眠はエネルギー消費を節約して食物不足を乗り越える適応戦略の一つである。従来から、ジリスなどの小型の冬眠哺乳動物において、ある種の急性相蛋白質の血中濃度が冬眠に関連して季節性変動をすることが知られていた。本研究では、大型の冬眠動物であるヒグマ(*Ursus arctos*)の急性相蛋白質についてハプトグロビン(haptoglobin, Hp)を中心に検討し、冬眠との関係について以下の結果を得た。

1、7頭のヨーロッパヒグマを対象に、同一個体から1年を通じて数回にわたって血液を採取し、各種急性相蛋白質の血清変動パターンを調べたところ、 $\alpha 1$ -antitrypsinやC-反応性蛋白質がほとんど変化しないのに対して、Hpや $\alpha 2$ -macroglobulinは、冬眠している2月に上昇することが示唆された。特にHp濃度は変動幅が大きく、2月に最高値(3.67 ± 0.56 mg/ml)となり、秋(9-10月および11-12月)の平均値(0.97 ± 0.41 mg/ml, 1.01 ± 0.42 mg/ml)の約3.7倍、5月の平均値(0.32 ± 0.13 mg/ml)の約10倍であった。また、成獣と比較して新生子グマでは血清Hp濃度が著しく低値であるが、それでも冬眠中の2月には成獣と同レベルにまで上昇した。これらの結果から、ヒグマ血清のHp濃度が季節性変動を示し冬眠に一致して増加することが明らかになった。

2、ヒグマHpの分子構造上の特徴を明らかにするために、エゾヒグマから精製したHpについて各種の生化学的分析を行ったところ、ヒグマHpは2種のサブユニット α 、 β 鎖からなり、両鎖間がS-S結合で結合しさらにそれが非共有結合で会合して $(\alpha-\beta)_2$ の4量体構造をとることが明らかになった。この構造はヒトHpとは明らかに異なるが、イヌやネコなど他の食肉目動物のHpと同様の構造であり、一部のアミノ酸配列の違いを除けばヒグマに特有のHp構造が存在するとは結論できなかった。

以上のように、本論文は、大型の冬眠哺乳動物であるヒグマを対象に、Hpの分子構造

と血中動態を調べ、血中濃度が季節性変動を示し冬眠に一致して増加することを明らかにしたものであり、哺乳動物の生理学への貢献が大である。よって審査員一同は樫木勝巳氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格が十分あると認めた。