

学 位 論 文 題 名

ウシの鉄結合タンパク質フェリチンに関する生化学的研究

学位論文内容の要旨

フェリチン (Ft) は24量体で分子量約48万の鉄貯蔵タンパク質である。Ftは細胞内タンパク質であるが、血中にも微量に存在する。血清Ft量は体内貯蔵鉄量の指標であり、また炎症および腫瘍性疾患で上昇する。胎子血清Ftレベルも妊娠の進行とともに上昇するが、ヒト以外の動物における胎子Ftについての情報は全くない。従来より、ヒト血清または血漿にFt結合タンパク質が存在し、Ft免疫学的測定に影響を与えることが示唆されていた。本研究ではウシの構造と病態生理学的意義を明らかにする目的で、まず、ウシ組織Ftの分子性状を明らかにした。次にウシおよびウマFtのための免疫学的測定法を確立し、これに対する血清および血漿の阻害効果を調べた。そして、この測定法を用いて健常牛および各種疾病牛の血清Ft濃度を測定した。さらにウシ胎子血清Ftの分子性状を明らかにし、胎子血液循環系における生理学的役割について検討した。これらの成績は以下の如く要約される。

1) Sodium dodecyl sulfate-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) において測定されるウマ、ヒトおよびラットFtのH(eart)型鎖の分子量はL(iver)型鎖より大きいことが一般に報告されているが (H : 21 kDa, L : 19 kDa)、ウシでは逆であった (H : 18 kDa, L : 21 kDa)。ウシと他の哺乳類の間のFtサブユニットの分子量の違いが何に起因するかを明らかにするために、ウシ脾臓 λ gt11 cDNAライブラリーから分離したウシFtサブユニットcDNAクローンの塩基配列を決定し、演繹されたウシFtサブユニットのアミノ酸配列と既報の他の哺乳類Ftサブユニットのアミノ酸配列を比較した。HおよびL鎖はそれぞれ180および174アミノ酸残基で構成され、アミノ酸配列から算出されたH鎖の分子量は20,920、L鎖は19,856であった。HおよびL鎖間のアミノ酸配列の相同性は54%であった。ウシH鎖とヒト、ラットおよびマウスFt H鎖の間の相同性はそれぞれ91%、92%および93%と高かった。ウシL鎖はウマ、ヒトおよびウサギL鎖と同じアミノ酸残基数であり、ウシとウマ、ヒトおよびウサギL鎖の配列比較ではそれぞれ24個 (相同性, 86%)、28個 (84%) および23個 (87%) のアミノ酸置換が見られたが、アミノ酸あるいはペプチドの挿入または欠失は認められなかった。ウシFtサブユニットはコンカナバリンA (ConA) と反応しなかった。バキュロウイルス-昆虫細胞 (Spodoptera

frugiperda) 発現系で発現させたHおよびL鎖をSDS-PAGEにより解析した結果、発現HおよびL鎖はそれぞれウシ脾臓FtのHおよびL鎖と全く同じ移動度を示した。以上の結果から、SDS-PAGEにおいてウシL鎖が他の哺乳類L鎖に比べ非常に遅く泳動されるのは、ウシL鎖へのアミノ酸あるいはペプチドの挿入および欠失または糖鎖付加によるのではなく、これらのL鎖へのSDSの結合量の違いに起因すると推察された。

2) ウマFt免疫測定に及ぼす血清の影響を、システムAおよびシステムBの2種のサンドイッチELISAシステムを用いて調べた。システムAでは、一次抗体としてアフィニティ精製ウマ脾臓Ft抗体を、二次抗体としてアルカリホスファターゼ標識精製抗体を用い、システムBでは全抗血清および酵素標識全抗血清をそれぞれ用いた。ウマ血清に添加した精製ウマ脾臓Ftの回収率は、いずれのシステムでも非常に低かった(システムA: 50~71%; システムB: 42~79%)。血清を75℃で15分間加熱処理することによりシステムAでの回収率は改善された(90~96%)が、システムBにおける回収率は加熱処理によっても十分には改善されなかった(75~83%)。これらの結果から、ウマ血清にはFt免疫測定法を阻害する熱に不安定な物質の存在することが示唆された。ELISAシステムAにより測定したウマ血漿のFt測定値は血清のそれよりも10~50%低いFt値を示したが、両者を加熱処理(75℃, 15min)することにより、これらのFt測定値は上昇し、ほぼ同じ値を示した。ウマ血清に添加したウマフィブリノーゲンは、Ft測定値を著しく低下させた。また、フィブリノーゲンはウマ脾臓Ftの免疫測定を阻害し、このFtと結合することが見出された。以上の結果から、フィブリノーゲンはFtの免疫測定を阻害する血漿特異的Ft結合物質であることが結論づけられた。

3) ウシ血清Ft測定のための高感度ABC (avidin-biotin complex) 法ELISAを開発した。この測定系におけるウシ脾臓Ftの測定限界は0.1ng/mlであった。硫酸アンモニウム(硫安)を含むELISA緩衝液で希釈した血清(最終濃度: 0.46 M)のFt測定値は硫安を含まない同緩衝液で希釈した血清のそれより有意に高い値を示したが、血漿Ft測定値は硫安の影響を受けなかった。硫安存在下および非存在下のいずれにおいても血漿は血清より有意に低いFt値を示した。血清に添加したウシ脾臓Ftの回収率は39~57%と低かったが、硫安を添加することによりほぼ100%に改善された。しかし、血漿における回収率は硫安存在下でも73~87%と低かった。これらの結果から、ウシ血清および血漿にはFt免疫測定を阻害するFt結合物質が存在することが示唆された。血清Ftレベルは2才以上の健常な非妊娠牛の血清Ft値(平均値 $\pm$ SD=46 $\pm$ 28 ng/ml, n=69)に比べて、白血病(149 $\pm$ 130ng/ml, n=14)、炎症性疾患(553 $\pm$ 530ng/ml, n=7)および小型ピロプラズマ病(415 $\pm$ 337ng/ml, n=13)においては非常に高い値を示した。したがって、ウシ血清Ftは炎症および腫瘍マーカーになり得ること、および小型ピ

ロプラズマ発症牛の血清Ft 値が高値を示すのは網内系の活発な異常赤血球の貧食に起因することが考えられた。

6) 市販ウシ胎子血清 13ロットにおけるFt レベルは800～6,000ng/ml の範囲であった。免疫沈降反応により測定した血清Ft 鉄濃度は0.16～0.96 μ g/ml の範囲であった。Ft 鉄含量はFt 濃度にかかわらず約20%と高値を示し、Ft 鉄は血清鉄の8.8～28.5%を占めた。Ft 鉄含量と血清Ft 濃度の間には高い正の相関性が認められた ($r=0.9398$, $p<0.001$)。胎子血清Ft のConAへの結合はほとんど見られなかった。血清Ft のLおよびH鎖の分子量は脾臓Ft のそれらと同じであり、L鎖が優勢であった。血清Tf 濃度は1.8～2.2mg/ml とほぼ一定であったが、Tf 飽和度は54.8～91.7%と大きく変動した。血清Ft 濃度とTf 飽和度の間には高い相関性 ($r=0.8864$, $p<0.001$) が認められた。以上の結果から、ウシ胎子は高い鉄貯蔵レベルを有すること、および血清Ft は胎子血液循環系の鉄輸送に寄与す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 藤 永 徹

副 査 助教授 木 村 和 弘

副 査 教 授 首 藤 文 栄 (岩手大学農学部)

学 位 論 文 題 名

ウシの鉄結合タンパク質フェリチンに関する生化学的研究

フェリチン(Ft)は、20 kDa前後の2種類のポリペプチド(L鎖とH鎖) 24個からなる鉄貯蔵タンパク質である。Ftは細胞内タンパク質であるが、血中にも微量存在しており体内貯蔵鉄量の指標とされている。ヒトではFtの分子構造や診断学的意義などについて多くの研究がなされているが、家畜を含めて他の動物種でのFtに関する知見は極めて少ない。本論文では、ウシFtについて、分子性状を明らかにするとともに免疫学的測定法を確立し、各種疾患での血中濃度変化や胎子血清中のFtに関する検討を行った。その要旨は以下の通りである。

1、ウシFtのL, H鎖は、電気泳動での挙動が他の哺乳動物Ftと異なることが知られていた。この原因を調べる目的で、ウシ脾臓cDNAライブラリーからFt cDNAをクローニングしヌクレオチド配列を決定した。その結果、HとL鎖はそれぞれ180と174アミノ酸からなり、両者に54%の相同性があることが明らかとなった。また、他の動物種との比較では、アミノ酸数で0-2個しか変わらず、H鎖で91-93%, L鎖で84-87%の相同性があった。バキュロウイルスー昆虫細胞発現系から得られたHおよびL鎖は電気泳動の上ではウシのそれと全く同じであった。以上のように、ウシFtの構造を明らかにすることによって、電気泳動上の特異な挙動は分析に伴う人為的な変化に起因することが示された。

2、ウシFtに対する抗体を用いて高感度ELISAを開発したが、血清中にはFtに結合して測定を妨害する物質が存在するため、そのままでは利用できなかった。測定条件を検討した結果、硫酸アンモニウムを添加することによって血清濃度を正確に測定できることが明らかになった。これを利用して、合計103頭の成牛の血清Ft濃度を測定した。健常牛のFt濃度は約46ng/mlであったが、白血病や炎症性疾患、小型ピロプラズマ病では高値となっていたので、炎症や腫瘍のマーカーとなりうる可能性が示唆された。また、市販ウシ胎子血清には、800-6,000ng/mlという高濃度のFtが含まれるおり、ウシ胎子血清が高い鉄貯蔵レベルを有することが示唆された。なお、ウマFtについても同様の測定法を開発し、フィブリノーゲンが妨害物質として作用することを明らかにした。

以上のように、本論文は、従来ほとんど研究されていなかったウシのFtについて、分子構造を明らかにするとともに診断学的有用性を検討しており、獣医学への貢献が大である。よって審査員一同は折野宏一氏が博士(獣医学)の学位を受ける資格が十分あると認めた。