

ハマチ免疫グロブリンの精製と特性

| | |
|-------|------------|
| 誌名 | 日本水産學會誌 |
| ISSN | 00215392 |
| 巻/号 | 487 |
| 掲載ページ | p. 921-926 |
| 発行年月 | 1982年7月 |

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ハマチ免疫グロブリンの精製と特性*1

福田 穰・楠田 理一

(1981年12月3日受理)

Purification and Characterization of Yellowtail Immunoglobulin

Yutaka FUKUDA*2 and Riichi KUSUDA*3

In order to elucidate the immuno-system of yellowtail *Seriola quinqueradiata* against pseudo-tuberculosis, attempts were made to purify and characterize its immunoglobulin.

Yellowtail sera, which produced an agglutinating antibody in high titer against the causative agent of pseudotuberculosis, *Pasteurella piscicida*, were used. Immunoglobulin was purified from the sera by the procedures which involved gel filtration on Sepharose 6B and ion exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-25. Yellowtail immunoglobulin thus purified was found to be a macroglobulin having the electrophoretic mobility of β -globulin in agar gel immunoelectrophoresis.

Yellowtail immunoglobulin showed a higher agglutinating antibody activity at 20-25°C than at 37°C. The immunoglobulin was dissociated into subunits when subjected to partial reduction with dithiothreitol and alkylation. The subunit had no agglutinating antibody activity against *P. piscicida* cells.

硬骨魚類の免疫グロブリンは4量体のマクログロブリンで、ほ乳類のIgMに相当することが知られている。¹⁾ハマチの属するアジ科魚類の免疫グロブリンに関する報告はないが、比較的近縁と思われる魚種についてはCLEM²⁾およびRUSSELLら³⁾によって単離が試みられ、ギズキ科のgiant grouperでは16Sおよび6.4Sの、またフェダイ科のgray snapperでは約19Sの沈降定数を示すとされている。

本報ではハマチの免疫機構を解明するための基礎研究の一つとして、*Pasteurella piscicida*菌体抗原に対する凝集抗体活性を指標に免疫グロブリンの精製を試みた。また、得られた精製グロブリンの物理化学的および生物学的特性に検討を加えた。

実験方法

供試魚および免疫スケジュール 高知県浦の内湾で養殖された平均体重210gのハマチを実験に供した。これを流水式コンクリート水槽に収容し、生餌を投与して飼育した。なお、実験期間中の水温は24~25°Cであった。免疫抗原は前報⁴⁾と同様の方法で*Pasteurella piscicida*から調製し、これを0.5 ml/尾/回の割合で週1回の接種を2回くり返して免疫を行なった。免疫終了3週間後

に採血を行ない供試血清を得た。

凝集抗体価の測定 マイクロタイター法により行なった。

ゲル濾過 濾過材としてSepharose 6B (Pharmacia)を用いた。1.5×100 cmのカラムに供試血清2.0 mlを添加して0.1 M トリス-塩酸緩衝液(pH 7.2)を用いて溶出した。

等電点電気泳動 等電点電気泳動(IEF)はHARADA⁵⁾の方法にしたがいSeparax EF(富士写真フィルム)を用いて行なった。担体両性電解質にはAmpholine, pH 3.5~10(LKB)を5%、サッカロース水溶液で5%になるように希釈して用いた。陽極側電極液には30%サッカロースを添加した0.85%リン酸溶液を、陰極側電極液には1.0%エチレンジアミン水溶液を使用した。泳動は定電圧で300 V 30分、400 V 30分、600 V 30分、800 V 30分間行なった。泳動終了後pH測定用の余白を切り取り、他の部分を染色した。タンパク染色はコマジープリリアントブルーR 250染色液を用いて2~3分間行ない、10%酢酸25%エタノール溶液で脱色した。pH勾配はpH測定用に残した膜を電流軸に直角に幅5 mmずつ切断し、それぞれを0.5 mlの蒸留水で浸漬抽出しModel 12 Research pH Meter (Corning)で測

*1 本研究は1981年4月、日本水産学会春季大会において発表した。

*2 大分県水産試験場 (Present address: Oita Prefectural Fisheries Experimental Station, Kamiura, Minami-Amabe, Oita 879-26, Japan).

*3 高知大学農学部水族病理学講座 (Fish Disease Laboratory, Faculty of Agriculture, Kochi University, Nan-koku, Kochi 783, Japan).

定した。

イオン交換クロマトグラフィー イオン交換体には DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia) を用いた。0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.2) で平衡化した 1.5×30 cm のカラムに試料を吸着させ、塩化ナトリウムの濃度勾配 (convex gradient) を作製して連続的に溶出した。操作はすべて 10°C の定温で行なった。

純度の検定 ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動 (PAGE) および寒天ゲル免疫電気泳動 (AIE) は前報⁴⁾の方法にしたがって行なった。

ウサギ免疫グロブリン 前報⁵⁾と同様の方法で調製した。

免疫グロブリンの還元・アルキル化 MILLERら⁷⁾の方法にしたがって行なった。すなわち、0.2 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.6) に試料を約 1% 濃度に溶解し、終濃度 1 mM になるようにジチオスレイトール (DTT) を添加して 25°C で 60 分間還元した。還元後、-SH 基に対して 10% 過剰のヨードアセトアミドを含む 0.2 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.3) を等量加え、室温で 15 分間アルキル化を行なったのち、4°C で 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.2) に対し、透析して過剰の試薬を除去した。

結 果

免疫魚血清中の MP-12 株に対する凝集抗体価の測定は反応時間を 2 時間とし、反応温度を変化させて行なった。その結果、Table 1 に示すように多くのもので反応温度が 25°C において、37°C よりも高い値が得られることが明らかになった。この結果から以下の実験では 25°C、2 時間の反応条件とした。被検血清のうち抗体価の高い No. 1, 4, 8 の血清をプールして以下の実験に供した。なお、試料血清の凝集抗体価は 1:4,096 であっ

Table 1. Agglutinating antibody titers in immunized yellowtail sera

| Fish No. | Body weight (g) | Titer (1:) | |
|----------|-----------------|------------|------|
| | | 25°C | 37°C |
| 1 | 245.5 | 1024 | 512 |
| 2 | 263.5 | 256 | 128 |
| 3 | 171.5 | 256 | 128 |
| 4 | 213.5 | 4096 | 1024 |
| 5 | 195.5 | 64 | 64 |
| 6 | 165.5 | 256 | 256 |
| 7 | 229.0 | 128 | 64 |
| 8 | 214.0 | 4096 | 2048 |

た。

試料血清の Sepharose 6B によるゲル濾過パターンを Fig. 1 に示す。凝集抗体活性は第 2 分画に検出された。イオン交換クロマトグラフィーの条件設定のために、IEF で第 2 分画を構成するタンパク成分の pI を測定した。結果は Fig. 2 に示したとおりである。第 2 分画を構成するタンパク成分の pI は 4.5~5.0 の範囲内に存在した。これらの結果にしたがい、回収した第 2 分画は pH 7.2 で DEAE-Sephadex A-25 にすべて吸着させ、塩化ナトリウムの濃度勾配で溶出した。その結果は Fig. 3 に示すとおりである。凝集抗体活性は塩化ナトリウム濃度 0.25~0.33 M の範囲に溶出する分画に検出された。PAGE で純度検定を行なった結果、かなり他成分の混入が認められたので、この分画について塩化ナトリウムの濃度勾配を小さくして再クロマトグラフィーを行なった。その結果は Fig. 4 に示すとおりである。凝集抗体活性は塩化ナトリウム濃度 0.25~0.30 M の範囲に溶出する分画に認められた。この分画を回収して電気泳動で純度検定を行なった結果を Fig. 5 および 6 に示す。

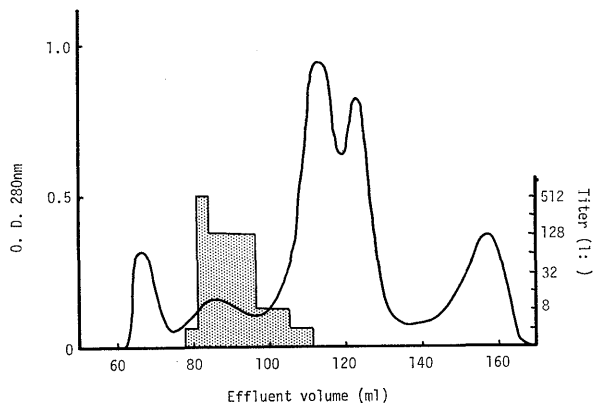


Fig. 1. Chromatogram of whole immune yellowtail serum from Sepharose 6B column demonstrating the elution characteristic of yellowtail anti-*Pasteurella piscicida* cell antibody. The shaded area represents the antibody. Note that the majority of antibody is associated with the second peak eluted from the column.

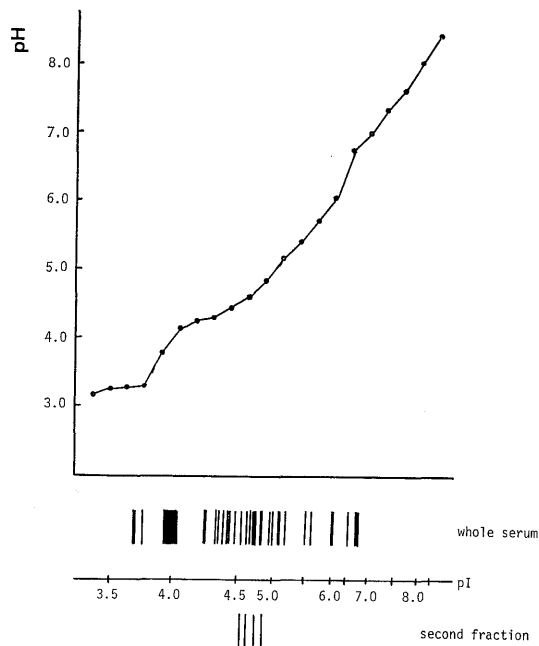


Fig. 2. Isoelectric focusing of whole yellowtail serum and second fraction from Sepharose 6B column.

PAGE による検定では、主成分は Rm 値 0.02 に泳動したが、Rm 値 0.13 付近にわずかな他成分の混入がみられた。また、AIE を用いた検定では、主成分は原点付近に沈降線を形成したが、 α - β -グロブリン域にかけて他成分の混入が認められた。なお、本法によるハマチ免疫グロブリンの収率は OD 280 nm で計算すると血清総タンパク量に対して 2.3% であった。

ハマチ免疫グロブリンの凝集抗体活性におよぼす反応

温度の影響を Fig. 7 に示す。活性は 20~25°C で最大値を示すが、45°C の高温においても活性は消失しなかった。また、抗原と抗体を混合したのち反応を行わずに 4°C、1 夜放置した場合でも活性は検出された。なお、反応時間は 2 時間で一定である。

ハマチ免疫グロブリンを温和な条件下で還元・アルキル化したのち、ゲル透過を行なった結果を Fig. 8 に示す。処理前のハマチ免疫グロブリンは Sepharose 6B カラムの Kav 0.23 付近に溶出したが、還元・アルキル化後の主成分は Kav 0.94 付近に溶出した。なお、還元・アルキル化により免疫グロブリンの抗体活性は消失した。

考 察

免疫グロブリンの精製および特性や構造の研究は脊椎動物全般にわたって、系統発生上の興味から行なわれており、数多くの報告がある。真骨魚類では rainbow trout^{8,9)} coho salmon¹⁰⁾ brown trout¹¹⁾ などのマス類および gold fish^{12,13)} gray snapper³⁾ などでマクログロブリン抗体だけが産生されると報告されている。ところが、ALEXANDER ら¹⁴⁾は Atlantic salmon が 2-ME に感受性をもつ 19S 高分子抗体と 2-ME 耐性の 7S 低分子抗体を産生することを報告している。また、前述のように gold fish はマクログロブリン抗体を産生することが知られているが、UHR ら¹⁵⁾は gold fish をフェージ ϕ X 174 で免疫すると、2 ヶ月後には 19S および 7S グロブリン分画に抗体活性が認められるが、5 ヶ月後には 7S 分画だけに活性が検出されるようになることを報告している。さらに、TRUMP¹⁶⁾は gold fish を BSA で免疫した場合、等電点の異なる 16.4S および 15.3S の 2 種の

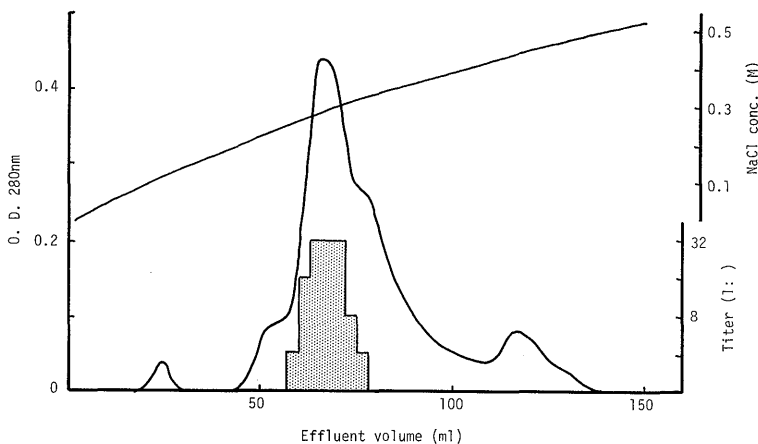


Fig. 3. Further purification of yellowtail immunoglobulin. Second fraction obtained on Sepharose 6B were pooled and chromatographed on DEAE-Sephadex A-25. Note that the bulk of agglutinating antibody activity eluted between 0.25-0.33 M NaCl.

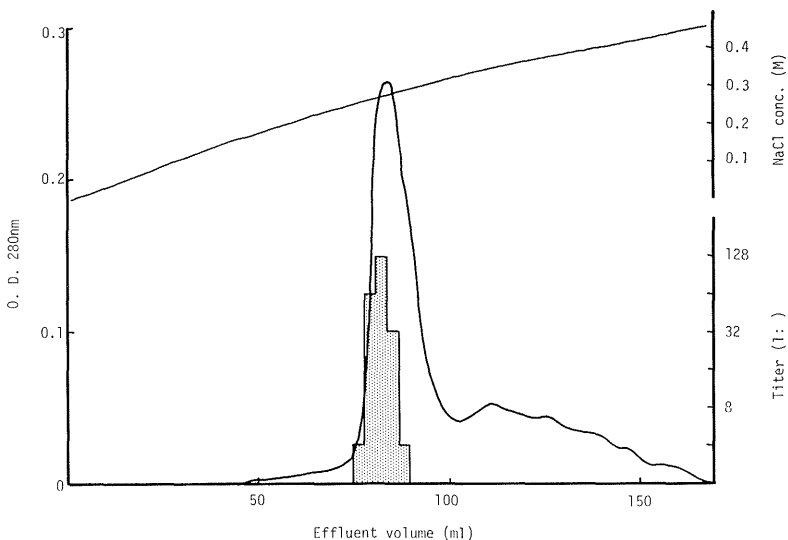


Fig. 4. Further purification of yellowtail immunoglobulin after recycling on DEAE-Sephadex A-25. Most of the antibody eluted between 0.25-0.30 M NaCl.

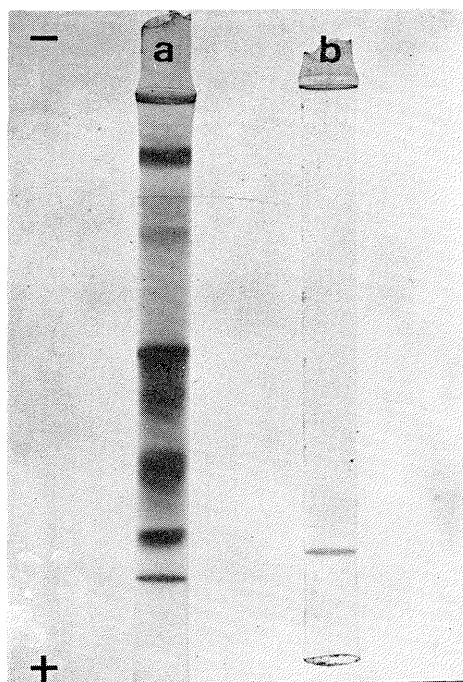


Fig. 5. PAGE of purified yellowtail immunoglobulin. a: whole serum, b: yellowtail immunoglobulin.

抗体が産生されることを報告している。このように、gold fish では免疫グロブリンの性状に関してさまざまな結果が得られている。

CLEM ら¹⁷⁾は牛ガンマグロブリンおよび牛血清アルブミンに結合させたジニトロフェニールを抗原として

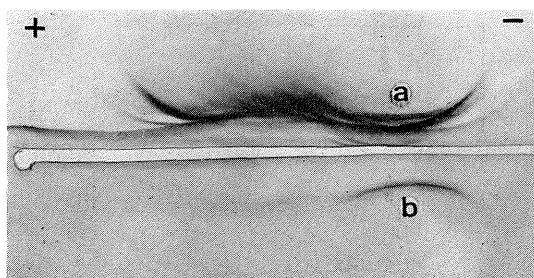


Fig. 6. AIE of purified yellowtail immunoglobulin. a: whole serum, b: yellowtail immunoglobulin, Trough: anti-yellowtail serum rabbit serum.

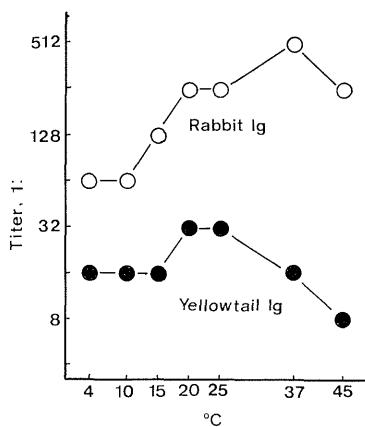


Fig. 7. Effect of incubation temperature on agglutinating antibody activity of yellowtail immunoglobulin.

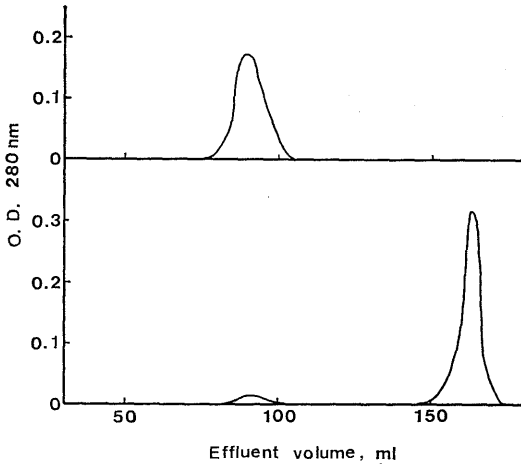


Fig. 8. Elution patterns from Sepharose 6B column, equilibrated with tris-HCl buffer, of native (upper), and partially reduced and alkylated (lower) yellowtail immunoglobulin.

giant grouper を免疫すると、免疫後2年間にわたって16S 高分子抗体および6.4S 低分子抗体が検出されることを報告している。また、彼らは16S 抗体の抗原結合価が8 価であることを述べている。CLEM²⁾は16S および6.4S 免疫グロブリンを精製して両者が抗原的に一致したことから、低分子抗体の一部は高分子抗体の前駆体あるいは分解産物であろうと推察している。

以上のように、一部の魚類で複数の免疫グロブリンクラスの存在を示唆する報告があるものの、現在まで魚類の免疫グロブリンクラスはほ乳類のIgM に相当するものだけであると考えられている。

著者ら¹³⁾はすでに、ハマチの産生する抗体がマクログロブリンであることを報告した。本報では精製の第1段階にゲル濾過を使用した。ゲキストランゲルを用いると目的とする免疫グロブリンは分画範囲に溶出しないことから、濾過材として高分子についても分画可能なアガロースゲルを選択した。一般に、ゲル濾過は大量の試料の処理には適さないことから、精製の初期段階に使用されることは少ない。硫酸塩析法あるいは等電点沈殿法で分画したのちにイオン交換クロマトグラフィーで部分精製を行ない、最終段階としてゲル濾過を用いる方法が一般的である。しかし、GELOTTE ら¹⁰⁾は血漿タンパクを、第1段階としてSephadex G-200 によるゲル濾過、第2段階として調製用電気泳動あるいはDEAE-Sephadex A-50 によるイオン交換クロマトグラフィーを用いて分画している。魚類の免疫グロブリン精製の研究においても、同様な2~3 段階のクロマトグラフィーがしばしば用いられている。ハマチの場合には高度に免疫した抗血清を大量に得ることは困難で、試料量が限定されてお

り、精製の第1段階にゲル濾過を行なうことも可能である。また、最終段階にイオン交換クロマトグラフィーを用いることにより、試料の希釈を防ぐこともできることから、本法は比較的有利な方法であると思われる。しかし、大量の免疫グロブリンを精製する必要がある場合には本法は不適當であり、より実用的な精製法を検討しなければならないことはいまでもない。

第2の問題は純度に関するものである。PAGE による検定ではほぼ純粋であることが確認されたが、AIE による検定ではかなり他成分の混入がみられた。このことはアガロースゲルを用いたゲル濾過で除去することの困難なタンパク質以外的高分子血清成分の混入を意味するものと思われる。イオン交換クロマトグラフィーの starting buffer のpH を低くし、低い塩濃度で免疫グロブリンを溶出させることが必要であろう。あるいは、精製の第1段階に硫酸塩析法を使用するのもよい方法と考えられる。

血清総タンパク量に対する免疫グロブリンの収率は2.3% と低い。他成分の混入を考慮すると実際はもっと低い値になると思われるので、研究に十分な量の免疫グロブリンを得るためには大量のハマチ血清を処理する必要がある。以上のことから、ゲル濾過の前段階に硫酸塩析法を使用した精製法を検討する必要があると思われる。

魚類における抗体産生能は一般に低温で低下することが知られているが、AVTALION²⁰⁾は carp を12°C で抗原刺激しても抗体を産生しないのに対して、25°C で抗原に応答した carp を12°C に移しても抗体産生が続けられることを報告している。このことは冬期における魚類の病原体に対する抵抗力を液性免疫で考察する場合に興味深い。本報においてはハマチ免疫グロブリンの生物活性に対する反応温度の影響をほ乳類の免疫グロブリンと比較した結果、ウサギ免疫グロブリンの抗体活性が低温で著しく低下するのに対して、ハマチ免疫グロブリンの抗体活性は低温においても著しく低下しないことが明らかになった。変温動物の体温は環境温度に左右されるため、このような低温条件下における抗体活性の安定性は生体を維持するための必要条件と考えられる。また、ハマチ免疫グロブリンの抗体活性は37~45°C で低下することが観察されたが、このことはハマチ免疫グロブリンが熱に対して不安定であることを意味しているのかもしれない。魚類の補体系に関して詳細なことはわかってないが、²¹⁻²³⁾これらの研究を進めるうえで補体の非動化の条件が問題であり、ハマチ免疫グロブリンの熱に対する不安定性が存在する可能性は十分考慮する必要がある。精製ハマチ免疫グロブリンにおいても抗体活性は20~25°C で最大となることから、すでに述べたように

チマチ血清中の抗体価測定には 20~25°C, 2 時間の反応条件を用いるのが適当と思われる。

ほ乳類 IgM の種々のサブユニットについては KISHIMOTO ら²⁴⁾が図説している。温和な条件下で IgM を還元すると IgG 分子に類似したサブユニット (IgMs) に解離する。^{7,25)} 本報ではこれらの方法をハマチ免疫グロブリンに適用して温和な還元を行なった結果, IgMs サブユニットに相当すると思われる低分子タンパクを得ることができた。魚類の免疫グロブリンが4量体のマクログロブリンであることはほぼ定説化されているが, ハマチ免疫グロブリンについてもこれらの例と同様と推測される。

要 約

Sepharose 6B を用いたゲル濾過と2段階の DEAE-Sephadex A-25 を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーによりハマチ免疫グロブリンを精製した。ハマチ免疫グロブリンの収率は血清総タンパク量の 2.3% であった。精製ハマチ免疫グロブリンは PAGE では Rm 値 0.02 に泳動した。また, AIE では原点付近 (β -グロブリン域) に沈降線を形成した。

ハマチ免疫グロブリンの凝集抗体活性は 20~25°C, 2 時間の反応条件で最大値を示した。また, ハマチ免疫グロブリンを温和な条件下において還元・アルキル化し, サブユニットと考えられる単一の成分が得られた。この成分には抗体活性はみられなかった。

本研究の一部は昭和 55 年度文部省科学研究費補助金によって行なったことを付記し, 感謝の意を表します。

文 献

- 1) R. T. ACTON, P. F. WEINHEIMER, S. J. HALL, W. NIEDERMEIER, E. SHELTON, and J. C. BENNETT: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 107-111 (1971).
- 2) L. W. CLEM: *J. Biol. Chem.*, **246**, 9-15 (1971).
- 3) W. J. RUSSELL, E. W. VOSS, JR., and M. M. SIGEL: *J. Immunol.*, **105**, 262-264 (1970).

- 4) 楠田理一・福田 穰: 日水誌, **46**, 801-807 (1980).
- 5) S. HARADA: *Clin. Chim. Acta*, **63**, 275-283 (1975).
- 6) 福田 穰・楠田理一: 魚病研究, **16**, 85-89 (1981).
- 7) F. MILLER and H. METZGER: *J. Biol. Chem.*, **240**, 4740-4745 (1965).
- 8) H. O. HODGINS, G. J. RIDGWAY, and F. M. UTTER: *Nature*, **208**, 1106-1107 (1965).
- 9) H. O. HODGINS, F. L. WENDLING, B. A. BRATEN, and R. S. WEISER: *Comp. Biochem. Physiol.*, **45**, 975-977 (1973).
- 10) J. O. CISAR and J. L. FRYER: *Infect. Immun.*, **9**, 236-243 (1974).
- 11) G. A. INGRAM and J. B. ALEXANDER: *J. Fish Biol.*, **14**, 249-260 (1979).
- 12) J. J. MARCHALONIS: *Immunology*, **20**, 161-173 (1971).
- 13) D. L. EOERHART: *Immunology*, **22**, 503-507 (1972).
- 14) J. B. ALEXANDER, J. G. M. WILSON, and W. E. KERSHAW: *J. Fish Biol.*, **2**, 384 (1970).
- 15) J. W. UHR, M. S. FINKELSTEIN, and E. C. FRANKLIN: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **111**, 13-15 (1962).
- 16) G. N. TRUMP: *J. Immunol.*, **104**, 1267-1275 (1970).
- 17) L. W. CLEM and P. A. SMALL: *J. Exptl. Med.*, **132**, 385-400 (1970).
- 18) Y. FUKUDA and R. KUSUDA: *Fish Pathol.*, **15**, 263-269 (1981).
- 19) B. GELOTTE, P. FLODIN, and J. KILLANDER: *Arch. Biochem. Biophys., Suppl.*, **1**, 319-326 (1962).
- 20) R. R. AOTALION: *Immunology*, **17**, 927-931 (1969).
- 21) J. E. CUSHING, JR.: *J. Immunol.*, **50**, 61-74 (1945).
- 22) J. E. CUSHING, JR.: *J. Immunol.*, **50**, 75-89 (1945).
- 23) D. W. LEGLER and E. E. EOANS: *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **96**, 237-242 (1967).
- 24) T. KISHIMOTO, K. ONOUE, and Y. YAMAMURA: *J. Immunol.*, **100**, 1032-1040 (1968).
- 25) H. F. DEUTSCH and J. I. MORTON: *Science*, **125**, 600-601 (1957).