

学位論文要旨	
氏名	マライチョドリ
題目	ウナギ血清中の新奇アポリポタンパク質分子種に関する研究 (Structural Studies on Novel Apolipoproteins Found in the Plasma of Japanese Eel, <i>Anguilla japonica</i>)
<p>アポリポタンパク質 (apoA-I, apoA-II, apoA-IV, apoE など) は脂質結合タンパク質であり、主に肝臓と腸で合成され、循環系における脂質輸送において重要な役割を果たしている。現在、apoA-I 遺伝子については、哺乳動物では 1 つ、魚類では 2 つ存在するものと考えられている。本研究では、魚類における脂質輸送の機構をしらべるために、apoA-I, apo-14kDa、および 11 個の apoA-I ファミリー遺伝子 (apoIA-I 1~11) を単離し、その構造を明らかにした。</p> <p>得られたすべての遺伝子は、4 つのエキソンで構成されるという脊椎動物アポリポタンパク質共通の特徴を有していた。apoA-I 遺伝子クローニングは 3595 bp, apo-14kDa 遺伝子クローニングは 2419 bp であった。apo-14kDa は血清中では HDL と結合しているが、得られた完全長 cDNA の塩基配列をもとに分子進化系統樹を作成したところ、より多くの繰り返し配列を持つなどの相違はあるものの apoA-II であることが示された。同様に分子進化系統樹によって、得られた 11 個の apoIA-I 遺伝子のうち 5 つは既に遺伝子データベースに投稿されている 28kDa-I cDNA 群 (LDL に見い出される 28kDa アポリポタンパク質をコードしている) に近いものであるが、他はそれらとは異なる遺伝子であることが示された。</p> <p>apoIA-I10 遺伝子クローニングは 3232 bp, apoIA-I1~8 および 11 のクローニングは 1280~1441 bp の範囲であり、4 つのエキソンを全て含んでいた。apoIA-I9 のみ第 4 エキソンが不完全であった。apoIA-I 遺伝子のエクソン-イントロン境界は、GT-AG 則にほぼ従っていた。apoIA-I1~7 のイントロン 1 のスプライス受容部位は(AG)ではなく(AC)であった。apoIA-I1~3, 7, 8 の成熟タンパク質は 237 アミノ酸残基であり、apoIA-I4~6 では 239 残基、apoIA-I10 は 255 残基 apoIA-I11 は 195 残基であった。VLDL 中の 23kDa アポリポタンパク質である apoIA-I11 は、成熟 apoIA-I10 タンパク質と 65% の類似性を示した。これらすべての apoIA-I 成熟アミノ酸配列は、アミノ酸側鎖の疎水性に関して apoA-I, apoA-IV, apoE と共に構造的特徴を有していた。</p> <p>ただし、apoIA-I11 は、apoA-I ファミリーのメンバーが持つ繰り返し配列 7, 8, 9 を欠いていた。また、全ての apoIA-I クローニングの演繹アミノ酸配列は、17 残基のシグナルペプチドと 5 残基のプロペプチドの存在を示していた。</p> <p>本研究において日本ウナギから単離されたアポリポタンパク質遺伝子 apoIA-I1~11 は、apoA-IV, apoE より、apoA-I に近く、apoIA-I4~6, 8, 10, 11 は新奇 apoIA-I 遺伝子であることが示された。</p>	

学位論文要旨	
氏名	Malay Choudhury
題目	Structural Studies on Novel Apolipoproteins Found in the Plasma of Japanese Eel, <i>Anguilla japonica</i> (ウナギ血清中の新奇アポリポタンパク質分子種に関する研究)
<p>Apolipoproteins (apo) such as apoA-I, apoA-II, apoA-IV, and apoE are lipid binding proteins synthesized mainly in liver and intestine and play an important role in the transfer lipids through the circulatory system. To investigate the mechanism of lipid transport in fish, I have isolated <i>apoA-I</i>, <i>apo-14kDa</i> and 11 genes of apoA-I family, <i>apoIA-I</i> (<i>apoA-I isoform</i>) 1-11, from Japanese eel by the PCR amplification and elucidated their genomic structure. Each of the genes obtained consisted of 4 exons separated by 3 introns, which is a property characteristic of most vertebrate apolipoprotein genes. <i>ApoA-I</i> gene is 3595 bp long whereas <i>apo-14 kDa</i> gene is 2419 bp long. Currently only one type of <i>apoA-I</i> gene was annotated in the mammalian genome whereas extensive search in fish genome database retrieved two types of <i>apoA-I</i> gene namely <i>apoA-Ia</i> and <i>apoA-Ib</i>. On the basis of the phylogenetic analysis of fish and mammalian <i>apoA-I</i> gene and the conserved gene synteny with the chicken <i>apoA-I</i> on chromosome 24, fish <i>apoA-Ia</i> and <i>apoA-Ib</i> might be the duplicates resulting from a whole genome duplication event early in the ray-finned fish lineage some 230-400 million years ago. Although apolipoprotein with molecular weight 14 kDa (apo-14 kDa) is associated with fish plasma high density lipoproteins (HDLs), it remains to be determined whether apo-14 kDa is the homologue of mammalian apoA-II. We have obtained the full cDNA and genomic DNA sequences of Japanese eel and full cDNA sequences of rainbow trout that encode apo-14 kDa. Fish apo-14 kDa lacks propeptide and contains more internal repeats than mammalian apoA-II. Nevertheless, phylogenetic analysis allowed fish apo-14 kDa to be the homologue of mammalian apoA-II. Some genes of <i>apoIA-I</i> corresponded to 28kDa-1 cDNA which had already been deposited into the database and encoded an apolipoprotein with molecular weight of 28kDa in the LDL, whereas others seemed to be the novel genes. <i>ApoIA-I10</i> had a total length of 3232 bp, whereas other genes except for <i>apoIA-I9</i> ranged from 1280 to 1441 bp. The sequences of <i>apoIA-Is</i> at the exon-intron junctions were mostly consistent with the consensus sequence (GT/AG) at exon-intron boundaries, whereas the sequences of 3' splice acceptor in intron 1 of <i>apoIA-II-7</i> were (AC) but not (AG). The deduced amino acid sequences of all <i>apoIA-Is</i> contained a putative signal peptide and a propeptide of 17 and 5 amino acid residues, respectively. The mature proteins of <i>apoIA-I1-3</i>, 7, and 8 consisted of 237 amino acids, whereas those of <i>apoIA-I4-6</i> composed of 239 amino acids. The mature <i>apoIA-I10</i> sequence showed 65% identity to amino acid sequence of <i>apoIA-I11</i> which was associated with an apolipoprotein with molecular weight of 23 kDa in the VLDL. All these mature <i>apoIA-I</i> sequences satisfied the common structural features depicted for the exchangeable apolipoproteins such as apoA-I, apoA-IV, and apoE but <i>apoIA-I11</i> lacked internal repeats 7, 8, and 9 when compared with other members of apoA-I family. Phylogenetic analysis showed that these novel <i>apoIA-Is</i> isolated from Japanese eel were much closer to apoA-I than apoA-IV and apoE, suggesting new members of apoA-I family.</p>	

学位論文審査結果の要旨				
学位申請者	Malay Choudhury			
氏名				
審査委員	主査	鹿児島大学	教授	板倉 隆夫
	副査	鹿児島大学	教授	上西 由翁
	副査	琉球大学	教授	屋 宏典
	副査	鹿児島大学	教授	菅沼 俊彦
	副査	鹿児島大学	准教授	小松 正治
審査協力者				
題目	ウナギ血清中の新奇アポリポタンパク質分子種に関する研究 (Structural Studies on Novel Apolipoproteins Found in the Plasma of Japanese Eel, <i>Anguilla japonica</i>)			
本研究は、ウナギ血清中のアポリポタンパク質の分子種に関するものである。アポリポタンパク質 (apoA-I, apoA-II, apoA-IV, apoE など) は脂質結合タンパク質であり、主に肝臓と腸で合成され、循環系における脂質輸送において重要な役割を果たしている。現在、apoA-I 遺伝子については、哺乳動物では 1 つ、魚類では 2 つ存在するものと考えられている。本研究では、魚類における脂質輸送の機構をしらべるために、apoA-I, apo-14kDa, および 11 個の apoA-I ファミリー遺伝子 (apoIA-I 1~11) を単離し、その構造を明らかにした。得られたすべての遺伝子は、4 つのエキソンで構成されるという脊椎動物アポリポタンパク質共通の特徴を有していた。apoA-I 遺伝子クローンは 3595 bp, apo-14kDa 遺伝子クローンは 2419 bp であった。apo-14kDa は血清中では HDL と結合しているが、得られた完全長 cDNA の塩基配列をもとに分子進化系統樹を作成したところ、より多くの繰り返し配列を持つなどの相違はあるものの apoA-II であることが示された。同様に分子進化系統樹によって、得られた 11 個の apoIA-I 遺伝子のうち 5 つは既に遺伝子データベースに投稿されている 28kDa-I cDNA 群 (LDL に見い出される 28kDa アポリポタンパク質をコードしている) に近いものであるが、他はそれらとは異なる遺伝子であることが示された。				

apoIA-I10 遺伝子クローンは 3232 bp, apoIA-I1~8 および 11 のクローンは 1280~1441 bp の範囲であり、4つのエキソンを全て含んでいた。apoIA-I9 のみ第4エキソンが不完全であった。apoIA-I 遺伝子のエクソン・イントロン境界は、GT-AG 則にはほぼ従っていた。apoIA-I1~7 のイントロン 1 のスプライス受容部位は(AG)ではなく(AC)であった。apoIA-I1~3, 7, 8 の成熟タンパク質は 237 アミノ酸残基であり、apoIA-I4~6 では 239 残基、apoIA-I10 は 255 残基、apoIA-I11 は 195 残基であった。VLDL 中の 23kDa アポリポタンパク質である apoIA-I11 は、成熟 apoIA-I10 タンパク質と 65% の類似性を示した。これらすべての apoIA-I 成熟アミノ酸配列は、アミノ酸側鎖の疎水性に関して apoA-I, apoA-IV, apoE と共に構造的特徴を有していた。ただし、apoIA-I11 は、apoA-I ファミリーのメンバーが持つ繰り返し配列 7, 8, 9 を欠いていた。また、全ての apoIA-I クローンの演繹アミノ酸配列は、17 残基のシグナルペプチドと 5 残基のプロペプチドの存在を示していた。

本研究において日本ウナギから単離されたアポリポタンパク質遺伝子 apoIA-I1~11 は、apoA-IV, apoE より、apoA-I に近く、apoIA-I4~6, 8, 10, 11 は新奇 apoIA-I 遺伝子であることが示された。

以上のように、本研究は、ウナギの食味と重要な関係があるアポリポタンパク質について、ウナギに特徴的に多くの分子種が存在することを遺伝子レベルで示した価値あるものであると評価された。

最終試験結果の要旨				
学位申請者 氏名	Malay Choudhury			
審査委員	主査	鹿児島大学	教授	板倉 隆夫
	副査	鹿児島大学	教授	上西 由翁
	副査	琉球大学	教授	屋 宏典
	副査	鹿児島大学	教授	菅沼 俊彦
	副査	鹿児島大学	准教授	小松 正治
審査協力者				
実施年月日	平成23年 7月 5日			
試験方法（該当のものを○で囲むこと。）				口答・筆答
<p>主査及び副査は、平成23年7月5日の公開審査会において、学位申請者に対して学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（水産学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>				

学位申請者 氏 名	Malay Choudhury
[質問 1]	
	ApoA-Iは、魚類ではどの臓器から分泌されるのか。
[回答 1]	
	一般的に魚類では、ApoA-Iの80%は肝臓から、残りの20%は腸より分泌される。哺乳動物では主に腸から分泌される。
[質問 2]	
	スライド（18番目）中のNo.1とNo.2は何を意味するのか。
[回答 2]	
	ここでは2匹のウナギ（No.1, No.2）より試料を調製しているので、それぞれのSDS-PAGEの結果をNo.1, No.2と示した。
[質問 3]	
	HDL ₂ とHDL ₃ のSDS-PAGEにおいて、2種類のプロフィールが示されたが、同じウナギの2つの個体で異なるバンドが見られるはどういうわけなのか。
[回答 3]	
	ウナギNo.1では28kDaのバンドが見られ、ウナギNo.2では28kDaの他に26kDaのバンドが見られた。しかし、ウナギNo.2の2つのタンパクのN末端アミノ酸配列は28kDa(ApoA-I)と同じであった。血清からの調製にはタンパク質分解阻害剤を入れていたにもかかわらず分解が生じたのか、あるいは、RNAスプライシングの違いによるものと考えられた。
[質問 4]	
	LDLとHDLの両方から28kDaのアポリポタンパク質が得られているが、両者は同じものか。
[回答 4]	
	違う分子種である。分子量が同じというだけである。
[質問 5]	
	それぞれのアポリポタンパク質のアミノ酸配列と塩基配列をどのように関連づけたのか。
[回答 5]	
	まず、血清よりアポリポタンパク質を調製してSDS-PAGEにかけ、N末端アミノ酸配列を決定した。それよりPCRプライマーを設計してそれぞれの肝臓cDNAを単離した。さらに血球DNAよりゲノムDNAを単離し、塩基配列を決定した。
[質問 6]	
	VLDL中に見られた200kDa以上のアポリポタンパク質のクローンの単離を試みたか。
[回答 6]	

いいえ、試みなかった。あまりにもサイズが大きく、限られた期間の中では無理だと判断した。

[質問 7]

SDS-PAGE中に見られたすべてのアポリポタンパク質について遺伝子を得たのか。

[回答 7]

apoIA-I10 以外については得られた。

[質問 8]

apoIA-I1-9 の 9 つのアポリポタンパク質にタンパク質のバンドが得られたのか。

[回答 8]

28kDa の 1 つのバンドの中に 9 つのアポリポタンパク質が含まれていたことになる。2 次元電気泳動法を用いればそれらを分離できるかもしれない。

[質問 9]

アポリポタンパク質の免疫学的な役割、あるいはその作用機構について知見はあるか。

[回答 9]

本研究は免疫学的な研究を含んでいないが、文献では、アポリポタンパク質にタンパク質が抗細菌、抗ウイルスの活性を持つことが示唆されている。

[質問 10]

apoA-II の機能は何か。

[回答 10]

apoA-I と同様、末梢から肝臓にコレステロールエステルを運ぶがその働きは限られており、apoA-I が不足した時に補う役割を持っているようだ。

[質問 11]

分子進化系統樹において、魚類では apoA-Ia と apoA-Ib がそれぞれグループを形成しているが、apoIA-I1-11 が 3 つめのグループを形成するのか。

[回答 11]

ウナギの apoIA-I1-11 は、apoA-IV や apoE ではなく apoA-I に似ているが apoA-I とは構造的に異なるので、apoIA-I (apoA-I の isoform) と呼ぶのが適当であろう。

[質問 12]

23kDa アポリポタンパク質が新奇性についてどのように考えるか。

[回答 12]

魚類からも哺乳動物からも 23kDa のアポリポタンパク質の報告は無い。塩基配列上でも他のアポリポタンパク質と類似性が認められない。さらにこのアポリポタンパク質は、3 つの internal repeat を欠いていることが特徴的である。