

学位論文審査結果の要旨

| | | | |
|---|---|-------|-----------|
| 学位申請者 氏名 | 舟橋 亜希 | | |
| 審査委員 | 主査 | 鹿児島大学 | 教授 上西 由翁 |
| | 副査 | 鹿児島大学 | 准教授 小松 正治 |
| | 副査 | 琉球大学 | 教授 屋 宏典 |
| | 副査 | 鹿児島大学 | 教授 侯 徳興 |
| | 副査 | 鹿児島大学 | 准教授 塩崎 一弘 |
| 審査協力者 | 印 | | |
| 題目 | ウナギ筋肉に存在する新奇蛍光タンパク質に関する研究 (Studies on a novel fluorescent protein from eel muscle) | | |
| <p>ニホンウナギ (<i>Anguilla japonica</i>) の筋肉に由来する新奇緑色蛍光タンパク質 (以下、GFP) は、鹿児島大学水産学部の林らによって脊椎動物で初めて発見され、その性状と部分アミノ酸配列が報告された。本研究では、ウナギ属6種、<i>A. japonica</i>、<i>A. australis</i>、<i>A. anguilla</i>、<i>A. bicolor bicolor</i>、<i>A. bicolor pacifica</i>、<i>A. mossambica</i> から GFP 遺伝子のクローニングおよび大腸菌によるタンパク質の発現を行い、その性状を調べた。さらに、GFP を強制発現させた培養細胞を作製し、GFP の機能について解析した。</p> <p>GFP の組織観察では、種間で強弱の差はあるものの、すべてのウナギ筋肉において蛍光が確認された。ウナギ属6種の cDNA は、全長が 631-644bp、翻訳領域が 417bp (139 残基) で、脂肪酸結合タンパク質 (FABP) と類似性を示した。エクソン-イントロン構造は、翻訳領域は 1st エクソンから始まり 4th エクソンで終わり、多くの FABP ファミリーとエクソン数やサイズは一致しており、FABP と共通の遺伝子から分岐したと思われる。遺伝子データベース上では、今までに登録されていない新奇のタンパク質である。</p> | | | |

凍結切片を作成して蛍光観察を行ったところ、シラスウナギで最も強い傾向が観察され、成魚のウナギでは皮側より脊椎付近で強く、肝臓やその他の組織では蛍光は全く認められなかった。遺伝子の転写においても強い蛍光強度のところで発現しており、肝臓等その他の組織では転写発現は認められなかった。

大腸菌に発現させたタンパク質は、すべてのウナギ種でビリルビンを添加することで蛍光を発し、最大励起波長は490-496nm、最大蛍光波長は527-530nmであった。用いたタンパク質発現ベクターの演繹アミノ酸配列では、8カ所のリガンド結合部位と発色団と推定される Gly58-Pro59-Pro60 のトリペプチド配列が6種のウナギ属すべてにおいて保存されていた。蛍光強度は *A. japonica* = *A. bicolor* > *A. mossambica* >> *A. australis* >> *A. anguilla* の順に高く、2カ所のアミノ酸の置換の組み合わせ (Leu63 - Tyr110) もしくは Phe63 - Leu110) が蛍光強度の差に関与していると推察された。

GFPの機能を解明する方法の一つとして培養細胞系を作成し、増殖速度ならびに酸化ストレス耐性について調べた。*A. japonica* 由来のGFP遺伝子結合ベクターをヒト胎児腎臓由来株化培養細胞 (HEK293) に導入したHEK293-eel GFPとして、対照としてベクターだけのHEK293-CV、比較のためにオワンクラゲ由来のGFPを含むHEK293-jf GFPを作成した。

増殖速度の実験においては、一般的な細胞培養法では抗酸化性のフェノールレッドを加えて行っており、これらと比較してフェノールレッド無添加の条件下では、対照区のHEK293-CVおよびHEK293-jf GFPでの増殖速度は52%と31%まで低下する一方で、HEK293-eel GFPでは70%であった。過酸化水素に暴露した酸化ストレスに対しては、HEK293-eel GFPがHEK293-CVおよびHEK293-jf GFPの約2倍の耐性を示した。過酸化水素に曝露後、培養細胞の蛍光強度の部分的な減少や消失が観察されたが、これはビリルビンがビリベルジンに酸化されGFPから遊離することが示唆された。これらの結果より、GFP-ビリルビン複合体は、抗酸化能を有する機能を持つことが推察された。ウナギGFPの機能の一つとして、抗酸化能を有するビリルビンの貯蔵体として機能するとともに、ウナギの長距離回遊において抗酸化的な生体防御に寄与していることが推察された。