

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)

舟橋 亜希

2017

Abstract

A novel green fluorescent protein (eel GFP) derived from muscle of *Anguilla japonica* was firstly reported for the molecular weight, fluorescent properties, and partial amino acid sequences by Hayashi and Toda. Thereafter, eel GFP requires the binding of bilirubin as ligand to fluoresce. In order to examine the distributions and characteristics of eel GFP, the complementary DNAs were isolated from six genus *Anguilla*, *A. japonica*, *A. australis*, *A. anguilla*, *A. bicolor bicolor*, *A. bicolor pacifica*, and *A. mossambica* based on partial amino acid sequences, and the proteins were expressed in *E. coli* with their recombinant DNAs. Moreover, the culture cells expressing eel GFP were generated and used to investigate the effect of the eel GFP-bilirubin complex on oxidative stress tolerance.

In the fluorescence observation of the eel GFP, the fluorescence was confirmed in muscle from all of genus *Anguilla*, albeit with different intensity among species. The full-length cDNAs of eel GFP were 631 ~ 644 bp long and contained an open reading frame of 417 bp encoding 139 amino-acid residues, which showed similarity to fatty acid binding protein (FABP). Exon- intron structures of eel GFP are consistent with the ORF starting at 1st exon and ending at 4th exon, and conserved for exon number and length of many FABP family.

The proteins of eel GFP expressed in *E. coli* with their recombinant DNAs were fluorescence by supplemented with bilirubin, and the excitation and emission spectra of eel GFP had maximum wavelengths of 490 ~ 496 and 527~ 530 nm, respectively. In all six genus *anguilla*, the deduced amino-acid sequences used as protein expression vector are consistent with eight amino acids which are recognized as ligand binding sites, and tripeptide, Gly58-Pro59-Pro60 which may play a role as chromophore.

The fluorescent intensities were stronger in the order of *A. japonica* = *A. bicolor* > *A. mossambica* >> *A. australis* >> *A. anguilla*, indicating *A. japonica* and *A. bicolor* intensities had 10 fold higher than that of *A. anguilla*.

In *A. australis* and *A. anguilla*, Leu63 and Tyr110 near Thr61 and Arg112 of ligand binding site were replaced with Phe63 and Leu110, assuming that the difference in two amino acids among genus *Anguilla* may be related to that of fluorescent intensities.

Eel GFP gene derived from *A. japonica* was stably and forcibly expressed in transfected into human embryonic kidney (HEK) 293 cells, generating the fluorescent cells, HEK293-eel GFP. The control groups were as followed: HEK293-CV cells, transfecting with the control vector (pcDNA3.1 (+)), and HEK293-jf GFP cells, with GFP cDNA derived from *Aequorea victoria*. The growth rate was compared with the three types of cells in the presence or absence of phenol red which possess antioxidant activity. The growth rates of HEK293-CV and HEK293-jf GFP under phenol red-free conditions were reduced to 52 and 31% of those under phenol red phenol red-containing condition. Under the phenol red-free condition, HEK293-eel GFP had a growth rate of approximately 70% of the phenol red-containing condition. Moreover, the eel GFP-expressing cells were approximately 2-fold resistant to oxidative stress such as H₂O₂ exposure. The fluorescence intensity partially decreased or disappeared after exposure to H₂O₂, and these phenomena were suggested to release the oxidized biliverdin from GFP-bilirubin. These results suggested that eel GFP coupled with bilirubin provided the antioxidant activity to the cells as compared to bilirubin free GFP.

要旨

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) の筋肉に由来する新奇緑色蛍光タンパク質 (eel GFP) は Hayashi and Toda によって脊椎動物では初めて発見され、その性状と部分アミノ酸配列が報告された。その後、eel GFP にビリルビンがリガンドとして結合することで蛍光発現する分子機序が明らかにされた。本研究では、ウナギ属 6 種、*A. japonica* *A. australis*、*A. anguilla*、*A. bicolor bicolor*、*A. bicolor pacifica*、*A. mossambica* から eel GFP 遺伝子のクローニングおよびタンパク質の発現解析を行い、分布およびその性状を調べた。さらに eel GFP を強制発現させた培養細胞を作製し、eel GFP-ビリルビン複合体の形成が酸化ストレス耐性に及ぼす影響を検討した。

eel GFP の蛍光観察では、種間で蛍光に強弱の差はあるものの、6 種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 631-644 bp、ORF は 417 bp、演繹アミノ酸は 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、翻訳領域が 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が一致していた。

大腸菌に発現させたリコンビナントタンパク質は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 490-496 nm、最大蛍光波長は 527-530 nm 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のアミノ酸配列および発色団と推測される 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、*A. japonica* と *A. bicolor* は *A. anguilla* の 10 倍の蛍光強度を示した。*A. anguilla* および *A. australis* においてリガンド結合部位の Thr61 と Arg112 の近くに存在する Leu63 が Phe63 に、Tyr110 が Leu110 にそれぞれ入れ替わっており、この 2 つのアミノ酸の違いが蛍光強度の差に関与して

いると推察された。

A. japonica 由来のeel GFP遺伝子をヒト胎児腎臓由来株化培養細胞 HEK293にトランスフェクトして安定に強制発現させ、HEK293-eel GFP細胞を作成した。対照として、コントロールベクター (pcDNA3.1(+)) またはオワンクラゲ由来GFPをそれぞれHEK293細胞にトランスフェクトしたHEK293-CV細胞およびHEK293-jf GFP細胞を用いた。これら3種類の細胞を抗酸化能を有するフェノールレッド存在下および非存在下培地で細胞増殖速度を比較したところ、HEK293-CVおよびHEK293-jf GFP細胞においてフェノールレッドを含まない培地を用いた場合に細胞増殖速度がフェノールレッド含有培地に比べてそれぞれ52%と31%まで低下した。一方、HEK293-eel GFP細胞においては細胞増殖速度の低下は70%に留まった。また、eel GFPを発現している細胞は過酸化水素 (H_2O_2)による酸化ストレスに対して発現していない細胞の約2倍の耐性を示した。 H_2O_2 に曝露後、培養細胞および筋細胞においても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。これらの結果よりビリルビンと結合している eel GFP複合体は単体のeel GFPよりも細胞に対して抗酸化能を供給することが推察された。

目次

緒言	1
第 1 章 各種ウナギ属の eel GFP 遺伝子のクローニング	4
実験試料および方法	7
蛍光観察	7
試料魚	7
ミトコンドリア DNA 内に存在する cytochrome b による種の同定	7
蛍光顕微鏡観察および組織片の作製	8
eel GFP の cDNA クローニング	8
Total RNA 抽出	8
cDNA の合成	8
Degenerate PCR	9
RACE PCR	13
ウナギ属の遺伝子構造および <i>A. japonica</i> 5' 上流域のクローニング	16
エクソン-イントロン遺伝子構造の解析	16
<i>A. japonica</i> における 5' 上流の転写調節領域の解析	17
<i>A. japonica</i> における筋肉内の蛍光の局在化と遺伝子の発現量	19
結果および考察	22
蛍光観察	22
ウナギ種の同定	22
各種ウナギ属における蛍光の分布と遺伝子の発現量	22
<i>A. japonica</i> における筋肉内の蛍光の局在化と遺伝子の発現量	24
<i>A. japonica</i> cDNA 塩基配列の解析	28
Degenerate PCR	28

RACE 法	30
3' RACE	30
5' RACE	31
全長 cDNA	31
<i>A. anguilla</i> 、 <i>A. australis</i> 、 <i>A. bicolor b.</i> 、 <i>A. bicolor p.</i> 、 <i>A. mossambica</i> cDNA 塩基 配列の解析	33
Degenerate PCR.....	33
3' RACE と Nested PCR.....	34
5' RACE	35
6 種ウナギ属の塩基配列の解析	36
ウナギ属の演繹アミノ酸配列の比較	37
脂肪酸結合タンパク質 FABP のアミノ酸配列の比較と系統樹	39
ウナギ属の遺伝子構造と 5' 上流域の解析	42
5' UTR の塩基配列の構造解析	46
 第 2 章 大腸菌を用いた eel GFP タンパク質の発現と機能解析	47
実験試料および方法.....	48
制限酵素サイトの選択とプライマーの設計	48
インサート DNA の調製	49
pCold へのインサート DNA の挿入と形質転換.....	51
遺伝子の発現	51
大腸菌から発現タンパク質の精製	52
融合タンパク質濃縮と溶媒の置換および Factor Xa を用いたタグの除去	52
Factor Xa および切断サイトの除去	53
SDS-PAGE	53

融合タンパク質濃縮と溶媒の置換	53
ビリルビンの調製	54
遊離ビリルビンの除去	54
蛍光強度の測定	54
結果および考察.....	55
SDS-PAGE による発現タンパク質の確認	55
インサート DNA のシーケンス解析	55
蛍光強度の測定	60
第 3 章 培養細胞を用いた eel GFP の機能解析	62
実験試料および方法.....	64
eel GFP の安定発現株の作製	64
細胞培養	65
蛍光顕微鏡を用いた HEK293-eel GFP 細胞の緑色蛍光の観察.....	65
低濃度 FCS 条件下での増殖活性および蛍光強度と発現率の測定	65
HEK293-eel GFP 細胞の機能解析.....	66
a) 細胞成長速度の測定.....	66
b) H ₂ O ₂ を用いた酸化ストレス感受性試験	66
筋細胞の単離と蛍光観察	67
H ₂ O ₂ の活性酸素種(ROS)への変換.....	67
結果および考察.....	68
安定発現株の作製	68
低濃度 FCS 条件下での増殖活性の観察	69
eel GFP 緑色蛍光の FCS 濃度依存的発現と細胞生残率	69
eel GFP 発現が細胞成長速度へ及ぼす影響	72

酸化ストレスに対する細胞の抵抗性	74
eel GFP の蛍光発現と蛍光強度の細胞ごとの不均一性	76
酸化力をもつ活性酸素種 (hROS) の検出.....	77
総括	78
謝辞	84
参考文献	85

緒言

緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein: GFP)と、青色の励起光を当てると緑色の蛍光を示すタンパク質のことで、Shimomura *et al.* (1962) によってオワンクラゲ *Aequorea victoria* より初めて発見された。その後、無脊椎動物であるサンゴ虫やイソギンチャクなどにおいてもその存在が報告されている (Kelmanson and Matz, 2003; Martynov *et al.*, 2001; Shagin *et al.*, 2004)。

1992 年にはオワンクラゲ GFP の遺伝子が単離され (Prasher *et al.*, 1992)、現在ではタンパク質の細胞内局在、機能、および活性の解析、遺伝子発現の解析、ならびにトランスジェニック生物の開発、選別のための利用など、細胞生物学や生化学などの分野において広く利用されている (Tsien, 1998; Yang *et al.*, 1996)。

ウナギ由来蛍光タンパク質 (以下 eel GFP)は、Hayashi and Toda (2009)によってニホンウナギ *Anguilla japonica* の筋肉より脊椎動物として初めて発見され、わずかに黄色みがかった緑色の蛍光を発するタンパク質として部分アミノ酸配列およびその性質が報告された。それによると eel GFP は最大励起波長 493 nm、最大蛍光波長 527 nm であり、分子量 16.5 kDa の単量体である。eel GFP は、最大励起波長 395 nm、最大蛍光波長 507 nm で、分子量 27 kD の二量体を形成するオワンクラゲ由来 GFP とは異なる性質を有していた。しかしながら、eel GFP 遺伝子の塩基配列、普遍的分布、蛍光発現機構、生理学的機能、ならびにその有用性など不明な点が多くある。

これらを解明するために、第 1 章ではまず eel GFP が *A. japonica* 以外の他のウナギ属に普遍的に存在しているかどうかの確認を行った。蛍光を発することが既に報告されている *A. japonica* を含めてヨーロッパウナギ *A. anguilla*、オーストラリアウナギ *A. asutris*、アフリカウナギ *A. mossambica*、*A. bicolor* に属する亜種

ニューギニアウナギ *A. bicolor bicolor* (b.) と *A. bicolor pacifica* (p.) の計 4 種・2 亜種の蛍光観察を行った。さらに、Hayashi and Toda (2009) により明らかにされた *A. japonica* 由来の部分アミノ酸配列を基に PCR プライマーを設計して degenerate PCR および RACE PCR を行い、6 種のウナギ属の eel GFP 全長 cDNA の塩基配列を明らかにすることを試みた。また、アライメント、分子進化系統樹解析、エクソン-イントロン構造解析、5' 上流域解析を行い、eel GFP 遺伝子の進化系統由来を推測した。

eel GFP のタンパク質の特性を明らかにするために、第 1 章で明らかになった cDNA 塩基配列を基にして大腸菌を用いて eel GFP のタンパク質を発現させたところ、発現したタンパク質は蛍光を示さず、励起光を照射するだけで蛍光を発するオワンクラゲ GFP の性質とは異なる現象が確認された。eel GFP は進化系統からみて脂肪酸結合タンパク質 (fatty-acid binding protein: FABP) に類似していることから、ウナギ筋肉より有機溶媒での抽出物を大腸菌発現タンパク質に添加してみたが、蛍光は観察されなかった。eel GFP の蛍光発現機構について解析を行っていたところ、理化学研究所の Kumagai *et al.* (2013) により eel GFP が蛍光を発する際には特定のリガンドと結合する必要があると、ビリルビン (bilirubin) がリガンドとして働くことが発表された。そこで第 2 章では、大腸菌に発現させたタンパク質にビリルビンを加えて、ウナギ属 6 種の最大蛍光波長、最大励起波長および蛍光強度の差を比較した。

eel GFP のリガンドであるビリルビンはヘムの通常代謝物であり、血中においてアルブミンに結合して全身循環して最終的に肝臓に運ばれる。血中のビリルビン濃度が上昇すると新生児黄疸など様々な疾病を引き起こすことが報告されている (Dennerly *et al.*, 2001)。一方で、ビリルビンは抗酸化能を有しており (Stocker *et al.*, 1987)、活性酸素種を消去する能力を有し、自身は容易に酸化される性質を持っている (Inoue, 2001)。また、ビリルビン単体で機能するよりもアルブミンと結

合したビリルビン・アルブミン結合体として機能する方が抗酸化能が強いことが知られている (Wu *et al.*, 1991; Kapitulnik, 2004)。

そこで第3章では、ビリルビンに高い親和性を持ち結合する eel GFP の生理学的機能を解析するために、eel GFP を安定に強制発現させた培養細胞を作製して、eel GFP- ビリルビン複合体の形成が細胞の酸化ストレス耐性に及ぼす影響を検討した。

なお、本論文の一部は下記の学術論文において受理済みである。

- 1) Eel green fluorescent protein is associated with resistance to oxidative stress
Aki Funahashi, Masaharu Komatsu, Tatsuhiko Furukawa, Yuki Yoshizono, Hikari Yoshizono, Yasuhiro Orikawa, Shota Takumi, Kazuhiro Shiozaki, Seiichi Hayashi, Yoshio Kaminishi, Takao Itakura
Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 181-182, 35-39.2016
- 2) Ubiquitous distribution of fluorescent protein in muscles of four species and two subspecies of eel (genus *Anguilla*)
Aki Funahashi, Takao Itakura, Abeer A.I. Hassanin, Masaharu Komatsu, Seiichi Hayashi, Yoshio Kaminishi
Journal of genetics (In press)

第 1 章 各種ウナギ属の eel GFP 遺伝子のクローニング

eel GFP は、Hayashi and Toda (2009) によって *Anguilla japonica* の筋肉より脊椎動物として初めて発見され、少し黄色みを帯びた緑色の蛍光を発するタンパク質として部分アミノ酸配列およびその性質が報告された。それによると eel GFP は、最大励起波長 493 nm、最大蛍光波長 527 nm で分子量 16.5 kDa の単量体であり、最大励起波長 395 nm、最大蛍光波長 507 nm で、分子量 27 kD の二量体を形成するオワンクラゲ由来 GFP とは異なっていた。これらのことから eel GFP は、オワンクラゲ GFP と異なる分子である。

分類学的にウナギは、脊椎動物門 (Vertebrata)、条鰭綱 (Actinopterygii)、ウナギ目 (Anguilliformes)、ウナギ科 (Anguillidae)、ウナギ属 (*Anguilla*) のことであり、現在 16 種・3 亜種が確認されている (Ege, 1939; Aoyama, 2009; Inoue *et al.*, 2010)。ウナギ属の地理的分布は広範囲に及び、太平洋の東端と南大西洋を除けば、ほぼ全世界に分布している。テーティス海仮説によると、ウナギは今からおよそ 1 億年前の白亜紀、現在のボルネオ島付近の海産魚を起源として生まれ、世界中に広がっていったと推定されている (Aoyama *et al.*, 2001)。

今回の研究では、eel GFP の存在が既に報告されている *A. japonica* を含めて、*A. anguilla*、*A. asutris*、*A. mossambica*、*A. bicolor* の計 4 種と *A. bicolor bicolor* (b.) と *A. bicolor pacifica* (p.) の 2 亜種を入手することができた。ウナギ種および亜種は、それぞれのミトコンドリアに存在する Cytochrome b の一部塩基配列(約 550bp)を求め、遺伝子データベースと比較することで確認した。

それぞれの生息分布 (Fig. 1-1) をみると、*A. japonica* は日本、朝鮮半島、中国、台湾およびベトナムに、*A. anguilla* はヨーロッパ・北アフリカの大西洋および地中海沿岸近くに、*A. mossambica* はマダガスカル、ケニア南部、南アフリカのア

ガラス岬などの東南アフリカの熱帯沿岸域に生息している(Ege,1939; Watanabe *et al.*, 2004; Teng *et al.*, 2009)。 *A.asutralis* においてはオーストラリア東海岸、タスマニア島、ロード・ハウ島に生息する *A. australis australis* とニュージーランドに分布する *A. australis schmidtii* の2種の亜種に分類されるが、少なくともシラスウナギの形態学的に有意な差がみられるものの (Jellyman, 1987; Watanabe *et al.*, 2006)、遺伝学的には同種であることが報告されている(Dijkstra and Jellyman, 1999; Smith *et al.*, 2001; Jellyman, 2007)。 *A.bicolor b.* と *A.bicolor p.* は亜種だが、生活範囲は異なっている。 *A.bicolor b.* はウナギ発祥の地に近いインドネシアのジャワ島のインド洋側に生息し、 *A.bicolor p.* はフィリピン、ボルネオ島、ニューギニア島などの太平洋側に生息する (Ege,1939)。

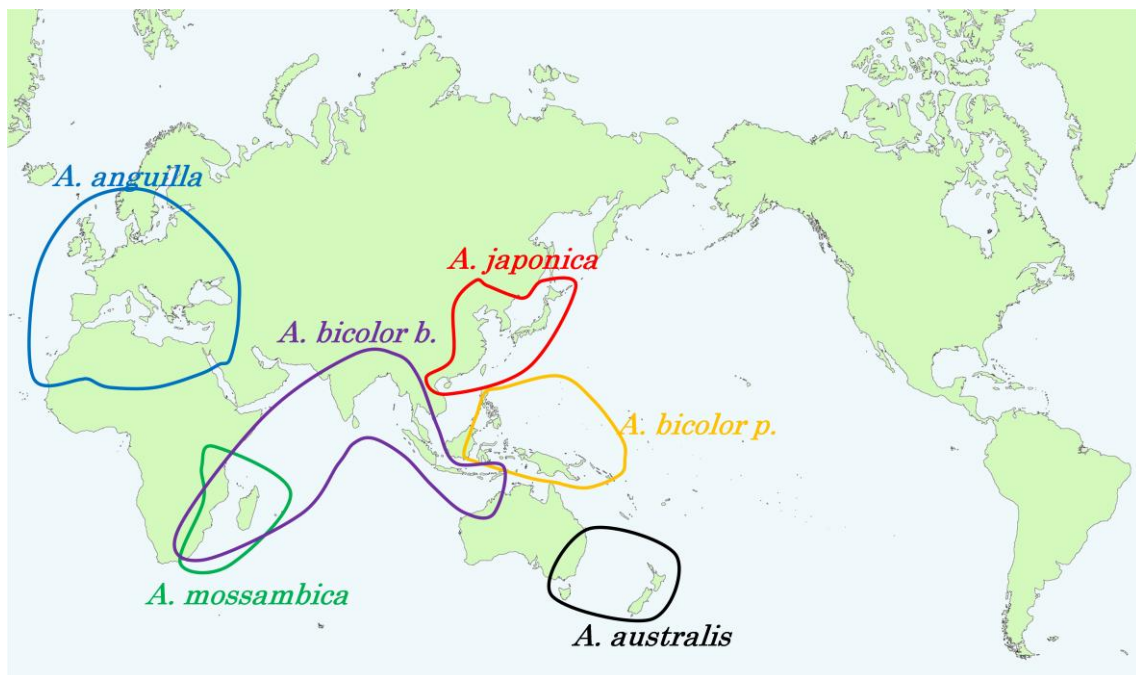


Fig. 1-1 Distribution of four species and two subspecies *Anguilla* genera according to Ege (1939), Watanabe *et al.* (2004), and Teng *et al.* (2009).

本章では、*A. japonica* と同様に他のウナギ属 (*A. anguilla*、*A. asutralis*、*A. mossambica*、*A. bicolor b.* および *A. bicolor p.*) にも蛍光が普遍的に分布しているか調べるために組織の蛍光観察を行い、蛍光強度および組織的分布を比較した。さらに、Hayashi and Toda (2009)により報告されている *A. japonica* において蛍光を発するタンパク質の部分アミノ酸配列を基にプライマーを設計して degenerate PCR および RACE PCR 行い、全長 cDNA の塩基配列を明らかにするとともに、蛍光が確認できた他のウナギ属 5 種についても同様に全長 cDNA のクローニングを行った。

eel GFP cDNA の塩基配列から得られたウナギ属 6 種の演繹アミノ酸配列をもとにアライメントおよび系統解析した結果、一部の FABP ファミリーと類似性を示した。このことから eel GFP は、FABP から進化したタンパク質であることが示唆された。さらなる確証を得るために、ウナギ属 6 種の eel GFP の gDNA のクローニングを行い、cDNA から得られた塩基配列と比較することで、エクソン-イントロン構造を解析した。また、eel GFP 遺伝子発現に関する機構を明らかにすることを目的に *A. japonica* において 5' 上流域のクローニングを試みた。

実験試料および方法

蛍光観察

試料魚

A. japonica (全長 54 cm) は鹿児島市の末吉商店(株)より購入したものを、*A. anguilla* (同 57.2 cm) は中国経由で輸入されたものを、*A. australis* (同 77cm) はオーストラリアのタスマニア島で捕獲されたものを株式会社海老仙を通したものを、*A. bicolor b.* (同 52.3 cm) はインドネシアのジャワ島南部で捕獲されたものを、*A. bicolor p.* (同 40 および 45cm) はフィリピン人のダバオ市の業者から乙仲を通したものを、*A. mossambica* (同 36cm) は *A. japonica* の代替魚として日本に輸入されたものをそれぞれ入手することができた。それぞれ、摘出した組織（筋肉、鰓、腸、肝臓）は液体窒素中で瞬間凍結させ、-80℃ で保存した。また、シラスウナギは志布志市にある山田水産(株) の養鰻場より購入した。

ミトコンドリア DNA 内に存在する **cytochrome b** による種の同定

今回入手したウナギ種は一部生息域が重なっていた為にミトコンドリアに存在する **cytochrome b** の一部塩基配列を求め、遺伝子データベースと比較することで種の確認を行った (Palumbi *et al.*, 1991)。cytochrome b の一部配列を増幅するようにプライマーcytb_F {5'-TGATATGAAAAACCACCGTTG-3'} および cytb_R {5'-GAAGTGGAATGCGAAGAATCG-3'} を設計した。6 種のウナギ筋肉より抽出した DNA を鋳型にして PCR を行った後にシーケンス反応により塩基配列を求め、NCBI の nucleotide blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/ BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/))を用いて種の同定および確認を行った。

蛍光顕微鏡観察および組織片の作製

蛍光顕微鏡用超高压水銀灯電源 BH-RFL-T3 (Olympus Corporation Japan)に接続した実体顕微鏡 SZX12-RFL (Olympus Corporation Japan)を用いて各組織 (筋肉、脳、鰓、腸、肝臓)を観察した。

eel GFP の cDNA クローニング

Total RNA 抽出

各種ウナギの筋肉から ISOGEN (Nippon Gene Co., Ltd., Japan)を用いて Total RNA を付属のマニュアルに従って抽出した (Chomczynski and Sacchi, 1987; Chomczynski, 1993)。凍結試料 50 ~100 mg に ISOGEN 溶液を加えてホモジナイズした後、クロロホルムを加えて遠心分離により DNA およびタンパク質を除き、RNA を含む水相を回収した。回収した水相をイソプロパノール沈殿およびエタノール沈殿により RNA を回収し、RNase-free water に溶解した。得られた Total RNA は分光光度計にて濃度および純度を求めた。

cDNA の合成

Total RNA からの cDNA の合成は PrimeScript™ 1st strand cDNA synthesis kit (TAKARA BIO INC., Japan)を用いて以下の手順で行った。鋳型 Total RNA 1,000 ng 含まれるように 50 μ M Oligo dT primer 1 μ l、50 μ M Random 6 mer 0.4 μ l、10 mM each dNTP Mixture 1 μ l を加えて RNase free DDW にて全量が 10 μ l になるように調製し、65°C で 5 分間インキュベートした後に氷上で急冷した。上記の反応液に 5 \times Prime Script Buffer 4 μ l、RNase Inhibitor (40 U/ μ l) 0.5 μ l、PrimeScript RTase (200 U/ μ l) 1 μ l を加えて RNase free DDW を用いて全量が 20 μ l に調製し、30°C で 10 分間、42°C で 60 分間、95°C で 5 分間インキュベートした後に氷上で冷却した。

Degenerate PCR

Hayashi and Toda (2009)により報告されたペプチド配列 (**Table 1-1**) を BLAST 検索したところ、LVYVQK (H-5), WDGEKTTYVR (H-6), IADSHNFGGEYLK (H-8), IENGPNTFLNTQ (C-9) において魚類の FABP と類似性を示した (**Table 1-2**)。アライメントの結果より eel GFP は FABP と類似する配列をもつと推定し、上記の4つのペプチドの並び順を **Fig. 1-2** のような高い類似性の位置にあると推定して Degenerate プライマーを IdentityX (<http://home.hiroshima-u.ac.jp/kei/IdentityX/>) を用いて設計した (**Table 1-3**)。

Table 1-1 Amino acid sequence of the peptides obtained from purified eel green fluorescent protein using trypsin digestion reported by Hayashi and Toda (2009).

No.	Peptide Sequence (3 letter)	(1 letter)
H-1	Ser-Tyr-Arg	SYR
H-2	Met (or Gly)-Thr-Gly-Lys	M(G)TGK
H-3	Ala-Ile-Gly-Ala-Pro-Lys	AIGAPK
H-5	Leu-Val-Tyr-Val-Gln-Lys	LVYVQK
H-6	Trp-Asp-Gly-Lys-Glu-Thr-Thr-Tyr-Val-Arg	WDGKETTYVR
H-7	Glu-Leu- Ser-Asp-Gly-Gly-Asp-Ala-Thr-Thr-Pro-Thr-Leu	ELSDGGDATTPTL
H-8	Ile-Ala-Asp-Ser-His-Asn-Phe-Gly-Glu-Tyr-Leu-Lys	IADSHNFGGEYLK
H-9	Ile-Glu-Asn-Gly-Pro-Pro-Thr-Phe-Leu-Asp-Thr-Glu-Val-Leu-Lys	IENGPPTFLDTQVLK
A-25	Phe-Val-Gly-Asn-Leu-Val-Gly-Glu-Lys	FVGNLVGEK
B-25	Ser-Val-Gly-Thr-Leu-Lys	SVGTLK
C-8	Phe-Val-Gly-Thr- Leu- Val-Gly-Glu-Lys	FVGTLVGEK
C-9	Ile-Glu-Asn-Gly-Pro-Asn-Thr-Phe-Leu-Asn-Thr-Gln	IENGPNTFLNTQ
C-10-1	Ile-Gly-Asp-Ser-Phe-Asp-Glu-Phe-Tyr-Leu-Arg-Val	IGDSFDEFPYLRV
C-10-2	Leu-Ala-Glu-Pro-Asn-Phe-Gly-Leu-Ser-Asp-Lys-Arg	LAEGPNFGLSDKR
C-12	Ile-Glu-Asn-Gly-Pro-Pro-thr	IENGPPT
10	Arg-Arg-Ala-Thr-Glu	RRATE

Table 1-2 FABPs of bony fish was similar to peptide sequences obtained from purified fluorescent protein using trypsin digestion reported by Hayashi and Toda (2009).

NO.		FABP type	Amino acid residue	Accession NO.
H-5 LVYVQK	<i>Osmerus mordax</i> (Rainbow smelt)	retina	132	ACO09952
	<i>Salmo salar</i> (Atlantic salmon)	brain	132	ACN12396
	<i>Danio rerio</i> (Zebrafish)	brain	132	AAI62202
	<i>Esox lucius</i> (Northern pike)	brain	132	ACO14084
H-6 WDGKETTYV R	<i>Osmerus mordax</i> (Rainbow smelt)	retina	132	ACO09952
	<i>Danio rerio</i> (Zebrafish)	brain, b	132	AAI62202
	<i>Cyprinus carpio</i> (Common carp)	heart	133	ADA61016
	<i>Salmo salar</i> (Atlantic salmon)	heart	132	ACI66142
H-8 IADSHNFGGEY LK	<i>Anoplopoma fimbria</i> (Sablefish)	brain	132	ACQ58715
	<i>Osmerus mordax</i> (Rainbow smelt)	retina	132	ACO09952
	<i>Danio rerio</i> (Zebrafish)	brain, a	132	NP_571680
C-9 IENGPNTFLN TQ	<i>Anoplopoma fimbria</i> (Sablefish)	brain	132	ACQ58715
	<i>Salmo salar</i> (Atlantic salmon)	brain	132	ACN12396
	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Rainbow trout)	muscle	133	AAB53643

MVDTFCATWKLVDSNFDEYMKALGVGFATRQVGNVTKPTVVIK
LADSHNFGEYLK (H-8)

EGDKVVIKTQSTFKNTEISFKLGEEFDESTADDRNCKSTVTMDGDK
IENGPNTFLNTQ (C-9)

LVYVQKWDGKETTFVRELKDGKLVNMLKFEDIVAVRTYEKA
LVYVQKWDGKETTYVR
(H-5) (H-6)

Fig. 1-2 Comparison of Rainbow smelt FABP retina type (Accession no. ACO09952) amino acid sequence with putative eel GFP peptide sequences. Red letters indicated the agreement of amino acid sequence, while green letters indicated the similarity of nucleotide sequence level between FABP and eel GFP. The region of FABP corresponding to residues of the putative eel GFP peptide boxed and the putative eel GFP peptide sequences indicated below.

Table 1-3 Oligo nucleotide primers used in the degenerate PCR amplification.

Forward primer	Nucleotide sequence (5' → 3')	Location	Tm	Deg.
H8(a)_F	GCIGAYWSICAYAAYTTYGG	34→	57.9	64
H8(b)_F	GAYWSICAYAAYTTYGGIGA	37→	55.9	64
C9(b)_F	GARAAYGGICCIAAYACITT	154→	55.9	8
C9(e)_F	CCIAAYACITTYTIAAYAC	163→	53.8	16
Reverse primer	Nucleotide sequence (5' → 3')	Location	Tm	Deg.
C9(f)_R	AIGTRTTIGGICCRTTYTC	←175	55.4	32
C9(h)_R	GTRTTIARRAAIGTRTTIGG	←182	53.8	16
H5H6e_R	IGTIGTYTCYTTICCRTCCC	←312	57.9	8
H5H6k_R	TCYTTICCRTCCCAYYTYTG	←305	55.9	16

Abbreviations: I = inosine; Y = C or T; W = A or T; S = C or G; and R = A or G;

プライマーはH8(a)_FとH5H6e_R、H8(b)_FとH5H6k_R、C9(b)_FとH5H6e_R、C9(e)_FとH5H6k_R、H8(a)_FとC9(f)_R、H8(b)_FとC9(h)_Rの6通りの組み合わせを用いてPCRを行った。Takara Ex Taq[®] (TAKARA BIO INC., Japan)を使用して以下の反応条件でPCRを行った。

<u>PCR reaction solution</u>		<u>PCR reaction</u>	
Template cDNA	<500 ng	1 cycle:	
10×Ex Taq buffer	2.5 µl	94°C	2 min 30 sec
dNTP mixture (2.5 mM each)	2 µl	35 cycles:	
100 µM Forward primer	0.5 µl	94°C	30 sec
100µM Reverse primer	0.5 µl	50°C	30 sec
Ex Taq	0.125 µl	72°C	30 sec
DDW	X µl	1 cycle:	
Total	50 µl	72°C	1 min

PCR 反応後、2%アガロースゲルを使用して電気泳動を行い、目的サイズの産物が増幅されているかを確認した。目的の PCR 産物は GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, UK) を用いてゲルから精製し、Ligation Convenience kit (Nippon Gene Co., Ltd., Japan) を用いてプラスミドベクターpT7 Blue T-Vector (Novagen, Germany) に導入した後、大腸菌 *E. coli* JM109 Competent Cells (AKARA BIO INC., Japan) に形質転換させた。これを LB 培地中で大量培養させ、核酸自動分離装置 PI-24 (KURABO INDUSTRIES LTD., Japan) を用いてプラスミド DNA の調製を行った。分光光度計を用いて DNA 濃度を測定してシーケンス解析に用いるプラスミド DNA とした。

塩基配列の決定にはダイデオキシ法を用いた Big Dye terminator v3.1 cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA) および DNA シークエンサーABI PRISM 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) を使用した。また、BioEdit ver7.09 (Hall, 1999) および Lasergene (DNASTAR Inc., USA)を用いて塩基配列の解析を行った。

RACE PCR

Degenerate PCR によって得られた部分塩基配列を元に 3' RACE および 5' RACE 用のプライマーを設計した (Table 1-4)。

また、RACE 反応に用いた cDNA は SMARTer[®] RACE cDNA Amplification kit (Clontech Laboratories, Inc., USA)を使用して合成した。

Table 1-4 Oligonucleotide primers used in RACE.

3' RACE Primer name	Nucleotide sequence (5' → 3')	mer
eelGFP_RACE_7F	GGGCCGAATACGTTCTTTGACACTG	25
eelGFP_RACE_37F	GGAGCCCCAAAGGAATTAAGCGATG	25
eelGFP_RACE_95F	CCCAGAAGGACGGAGACAAAATGACA	26
5' RACE primer name	Sequence (5' → 3')	mer
eelGFP_RACE_262R	CGTACACCAGCTTCTCTCCCACCAA	25
eelGFP_RACE_255R	CAGCTTCTCTCCCACCAAGTTCACG	25
eelGFP_RACE_64R	CGTCGAACTCCTCCCCTAATTTGAAC	26

設計したプライマーを用いて SMARTer[®] RACE cDNA Amplification kit により 3' RACE および 5' RACE を行った。なお、SMARTer RACE PCR は以下に示す通りに行った。

<u>PCR reaction solution</u>		<u>Reaction condition</u>	
5' RACE-Ready or 3' RACE-Ready cDNA	1.25 μ l	1 cycle:	
10 \times Ex Taq buffer	2.5 μ l	94°C	30 sec
dNTP mixture (10 mM each)	0.5 μ l	5cycles:	
10 \times UPM primer	0.5 μ l	94°C	30 sec
20 μ M 5' RACE or 3' RACE GSP	0.5 μ l	72°C	3 min
Ex Taq	0.125 μ l	5 cycles:	
DDW	X μ l	94°C	30 sec
<hr/>		70°C	30 sec
Total	25 μ l	72°C	3 min
		35 cycles:	
		94°C	30 sec
		68°C	30 sec
		72°C	3 min
		1 cycle:	
		72°C	3 min

反応終了後、電気泳動にて目的とする産物が増幅されたかを確認した。最初の RACE PCR で目的産物が得られた場合、Degenerate PCR と同様の操作をしてシーケンスの解析を行った。

なお、最初の RACE PCR で特異的なバンドを確認が出来なかった場合やスメアになった場合には、さらに内側に設計したプライマーと希釈した 1 回目の PCR 産物を鋳型として以下に示す通り Nested PCR を行った。

<u>Reaction solution</u>		<u>Reaction condition</u>	
RACE PCR products (1:50 dilution)	5 µl	1 cycle:	
10×Ex Taq buffer	2.5 µl	94°C	30 sec
dNTP mixture (10 mM each)	0.5 µl	30 cycles:	
Nested primer	0.5 µl	94°C	30 sec
20 µM 5µM 5' RACE or 3' RACE NGSP	0.5 µl	68°C	30 sec
Ex Taq	0.125 µl	72°C	3 min
DDW	X µl	1 cycle:	
Total	25 µl	72°C	3 min

ウナギ属 の遺伝子構造および *A. japonica* 5' 上流域のクローニング

エクソン-イントロン遺伝子構造の解析

6種の筋肉より ISOGEN を用いて DNA を抽出した。凍結試料 50~100 mg に ISOGEN 溶液を加えてホモジナイズした後、クロロホルムを加えて遠心分離により DNA およびタンパク質を含む中間層と有機相を回収した。回収した溶液にエタノールを加えタンパク質を含む溶液を取り除いて DNA を含む沈殿を回収した。その後、0.1 M クエン酸ナトリウム in エタノールで洗浄およびエタノール沈殿により DNA を回収し、DDW に溶解し、これを PCR の鋳型 gDNA とした。PCR 増幅反応は nested PCR を用いた。1st ステップには 5' UTR に位置する 5UTR_1F プライマーと 3' UTR に位置する 3UTR_2R プライマーを使用した (Talbe 1-5)。2nd ステップには 5' UTR に位置する 5UTR_3F とタンパク質発現 (ORF を増幅する) 用に設計したリバースプライマーを使用した(Talbe 1-5)。

Table 1-5 Oligonucleotide primers used in the PCR amplification of genus *Anguilla* eel GFP gene cloning.

Gene Structure	Sequence (5' → 3')
5UTR_1F	5'-GGAAAAAGAGGCAACAGCTT-3'
5UTR_3F	5'-CAACAGCTTTGCGAGCATCT-3'
3UTR_2R	5'-AGGAGGAAGACAGGGCGACA-3'
pCold_Xho1_2R	5'-aaaa <u>CTCGAG</u> TCATTCCGTCGCCCTCCG-3'
pCold_Xho1_4R	5'-aaaa <u>CTCGAG</u> TCATTCCGACGCCCTCCG-3'

*Xho*I site is underlined

<u>Reaction Solution</u>		<u>Reaction condition</u>	
Template gDNA	50 ng	1 cycle:	
10×Ex Taq buffer	5 µl	94°C	2 min 30sec
dNTP mixture (2.5 mM each)	4µl	35cycle:	
20 µM Forward primer	0.5µl	94°C	30 sec
20 µM Reverse primer	0.5 µl	60°C	45 sec
Ex Taq	0.25 µl	72°C	5 min
DDW	X µl	1cycle:	
Total	50 µl	72°C	3 min

Degenerate PCR の時と同様に電気泳動を行った後に PCR 産物の回収、ライゲーションおよびトランスフォーメーションを行った。得られた組換えプラスミドを各種制限酵素 (*SphI*, *StuI*, *PstI*, *HindIII*, *EcoRI*, *SacI*, *BamHI*, *XbaI*) でマッピングした。制限酵素で処理した DNA 断片を pBlueScript II SK (+) ベクター (MBI Fermentas, USA) を用いてサブクローニングし、シーケンス解析を行い、cDNA 塩基配列と比較することで翻訳領域 (open reading frame: ORF) 内のエクソン-イントロン構造を明らかにした。

***A. japonica* における 5' 上流の転写調節領域の解析**

A. japonica においては非翻訳領域 (untranslated region: UTR) を含む 5' 上流域および 3' 下流域を増幅するために Inverse PCR を行った (Ochman *et al.*, 1988)。gDNA 1,000 ~ 2,000 ng を制限酵素 *SphI* もしくは *StuI* で 37°C で 3 時間以上処理した。その後、フェノール・クロロホルム処理して制限酵素を除き、さらにエタノール沈殿により切断 DNA を回収した。回収した溶液 25 µl に 2×Ligation Mix を 25 µl (等量) 加え、16°C で 20 分間インキュベートしてセルフライゲーションを行った。再びフェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、30 µl の

DDW に DNA 沈殿を溶かして濃度を測定して環状化 DNA を作成した。これを Inverse PCR 用の鋳型 DNA とした。

明らかになったエクソン-イントロン配列をもとにしてリバースプライマーは既知配列から 5' 末端方向に、フォワードプライマーは既知配列から 3'末端方向に進むように設計した (Table 1-6)。

Table 1-6 Oligonucleotide primers used in the inverse PCR amplification of *A. japonica* eel GFP gene cloning.

5' upstream	Nucleotide sequence (5' → 3')	mer
Inverse5_1F	AGGACAGGATAAGTGCAATGTTACA	25
Inverse5_2R	ACTTGGTGTGGTGTGAAAACATAGT	25
Inverse5_3F	TACTCTTTCATGGCTCACAGTTTC	24
Inverse5_4R	GACCACGTTATATGTTTTGTCCC	23
3' downstream	Sequence (5' → 3')	mer
Inverse3_1F	AGCACGTAGCCTTATTCTTATGGT	24
Inverse3_2R	GACCACAAACACAAGGGTAATAGG	25

5' 上流の増幅反応には Inverse5_1F と Inverse5_2R プライマーおよび鋳型として *SphI* で制限酵素処理した環状化 DNA、3' 下流の増幅反応には Inverse3_1F と Inverse3_2R プライマーおよび鋳型として *StuI* で制限酵素処理した環状化 DNA をそれぞれ使用した。反応条件を以下に示す通りである。

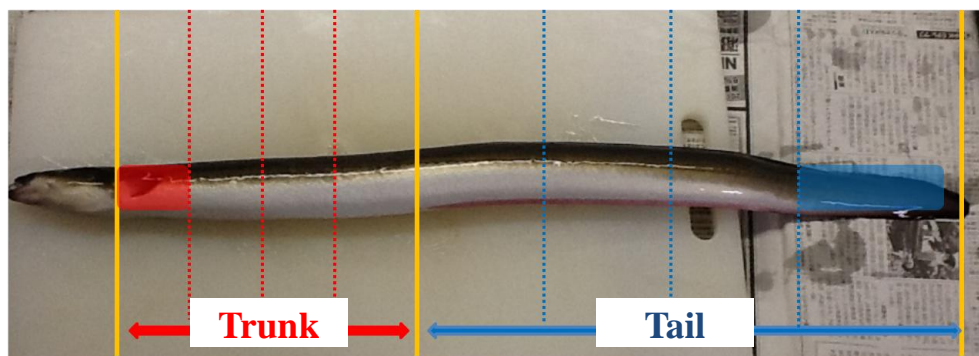
<u>Reaction Solution</u>		<u>Reaction condition</u>	
10×Ex Taq Buffer	5 µl	1 cycle:	
dNTP Mixture (2.5mM each)	4 µl	94°C	2min 30 sec
20 µM Forward primer	1 µl	35 cycles:	
20 µM Reverse primer	1 µl	94°C	30 sec
Ex Taq	0.25 µl	60°C	45 sec
Circularization DNA	50 ng	72°C	10 min
DDW	X µl	1 cycle:	
Total	50 µl	72°C	1 min

得られた PCR 産物を電気泳動に供したところ、5' 上流の増幅反応においては特異的なバンドは確認されなかった。このため、さらに内側に設計したプライマー-Inverse5_3F と Inverse5_4R および 100 倍希釈した 1 回目の PCR 産物を鋳型として 1 回目と同様の条件で 2 回目の PCR 反応をした。それぞれの PCR 産物は、Degenerate PCR の時と同等の手順を用いて塩基配列を決定した。

***A. japonica* における筋肉内の蛍光の局在化と遺伝子の発現量**

試料としてシラスウナギ、成魚 *A. japonica* の筋肉、肝臓、腸を用いた。筋肉は鰓から肛門までを【胴部: trunk】、肛門から尻尾の付根までを【尾部: tail】として **Fig1-3 A** に示す部分からさらに **Fig. 1-3 B** に示す脊椎周りの 1 ~ 2 mm の厚さの筋肉を【脊椎側: backborn】、皮を剥ぎ 1 ~ 2 mm の厚さの筋肉を【皮側: skin】として【trunk-backborn】、【trunk-skin】、【tail-backborn】、【tail-skin】の 4 つの部位に区分した。

A



B

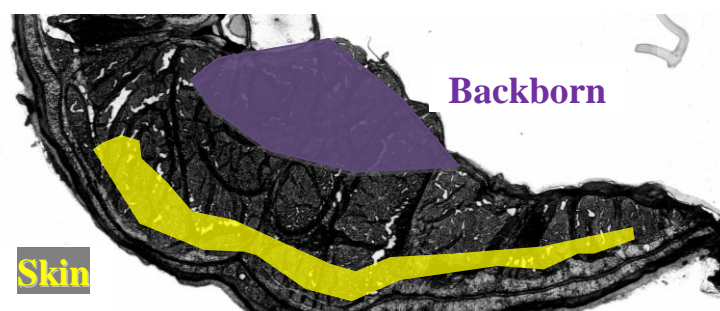


Fig. 1-3 Division of muscle. A: a body divided into trunk and tail, which were stained with red and blue shadows used as samples. B: a cross-section divided into two group, backbone (purple highlight) and skin (yellow highlight).

筋肉内の蛍光分布の観察を行うために、ミクロトームを用いて凍結切片を作製し、正立顕微鏡 AxioImager (Zeiss, Germany) を用いて蛍光を観察した。当初、凍結切片の厚さを 30 μm 程度で調製したが、薄い切片では明瞭な蛍光が認められなかったために、100 ~ 150 μm の凍結切片を用いて蛍光観察を行った。

また、蛍光強度と遺伝子の発現量を比較するため、Real-time PCR を用いて eel GFP 遺伝子の転写発現量を定量した。各組織区分より ISOGEN を用いて Total RNA を抽出し、PrimeScript1st strand cDNA Synthesis Kit より cDNA を合成した。Real-time PCR に用いたプライマーは、eel GFP cDNA クローニングにより得られた塩基配列をもとに作製した (Table 1-7)。定量法として検量線法を用い、内部標準遺伝子として *actb* を使用した。全反応液中に鋳型 cDNA は 50 ng 含まれるように調製し、各組織区分につき 3 個のデータを得て、それぞれの平均値と標準偏差から統計処理を行った。

Table 1-7 Oligonucleotide primers used in Real-time PCR

Name	Sequence (5' → 3')
eelgfp_Real-time F	AAGCTATCGGAGCCCCAAA
eelgfp_Real-time R	AGAGGAAATTCGTCGAATCC
actin_Real-time F	TGGGTGGAGAAGAGCTACGA
actin_Real-time R	TGATGGAGTTGAAGGTGGTCTC

反応は FastStart Essential DNA Green Master (Roche, Swiss) を用いて以下に示す条件で行った。

PCR reaction solution

50 ng/μl cDNA	1 μl
Master Mix 2× conc. (DNA Green Mix)	10 μl
10 μM Forward primer	0.6 μl
10 μM Reverse primer	0.6 μl
H ₂ O, PCR Grade	7.8 μl
Total	20 μl

PCR reaction

1 cycle:	
95°C	10min
45 cycles:	
95°C	10 sec
60°C	10 sec
72°C	15 sec
1 cycle:	
95°C	30 sec
60 C	20 sec
95 C	20 sec

結果および考察

蛍光観察

ウナギ種の同定

4 種 2 亜種のウナギから cytochrom b を含むミトコンドリア DNA の塩基配列 550 ~ 551 bp を決定した後に、BLAST 検索を行った。その結果、今回得られたミトコンドリア DNA の塩基配列はデータベースに報告されている同一種のウナギミトコンドリア DNA と 99 ~ 100% の類似性を示し、それぞれのウナギ種が入手段階で保証されていた種であることが確認できた。

各種ウナギ属における蛍光の分布と遺伝子の発現量

種間において強弱の差はあるものの、6 種すべての筋肉において緑色蛍光が確認できた (**Fig. 1-4**)。種によって体長に差があるため、この差は個体の成熟度の違いによるものとも考えられる。結果は示さないが脳、腸、肝臓、鰓などの他の臓器でも確認を行ったが、緑色蛍光を確認することはできなかった (データ未発表)。

また、同じウナギを輪切りにして横断面を観察したが、部位によって蛍光の強弱が見られ、皮側よりも脊椎周りの方で蛍光が強い傾向にあった。

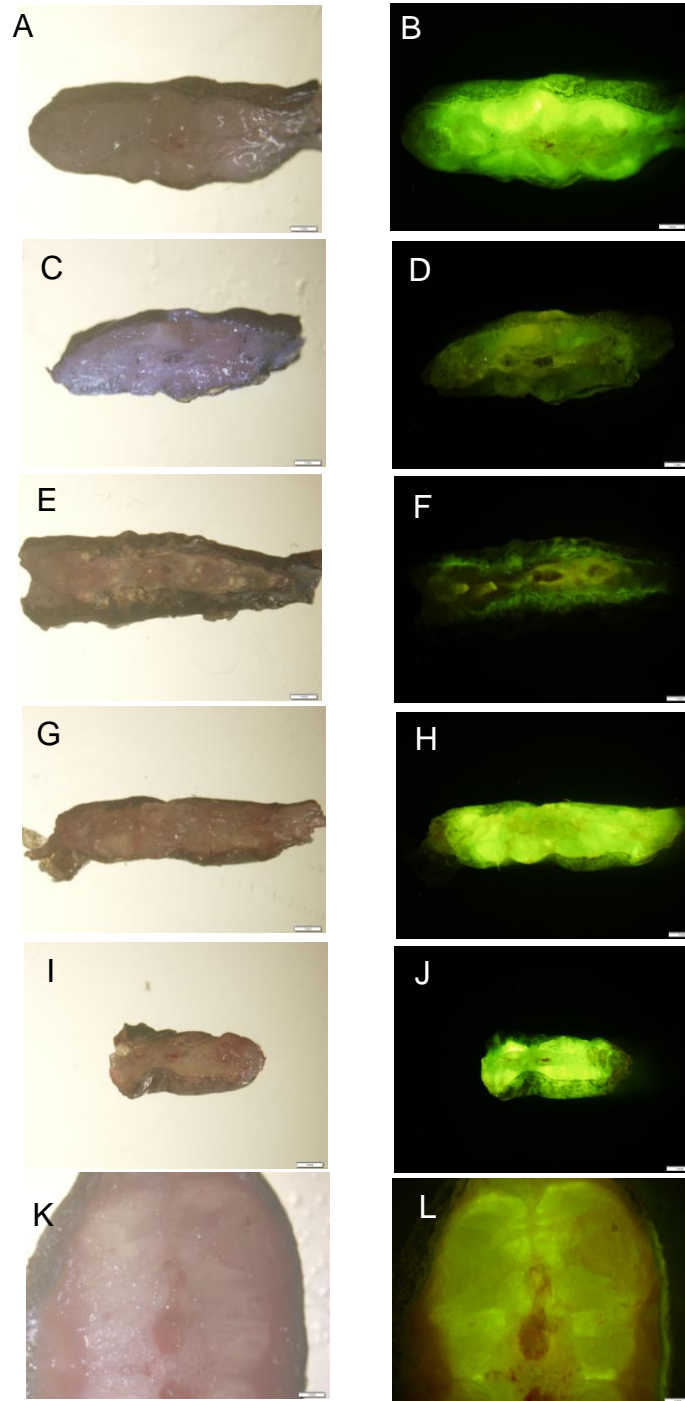


Fig. 1-4 Observation of cross-sections of six genus *Anguilla* skeletal muscle using stereomicroscope (SZX12-RFL3-2, OLYMPUS) equipped with reflected light fluorescence (BH2-RFL-T3, OLYMPUS): (A, B), *A. japonica*; (C,D), *A. anguilla*; (E, F), *A. australis*; (G,H), *A. bicolor b*; (I, J), *A. bicolor p*; and (K, L), *A. mossambica*. (A, C, E, G, I, K) are light microscopy images of the same samples as those shown in observed in fluorescence microscope; (D, F, H) set a time of exposure of 5 seconds, (B, L) set that of 2 second, and (J) set that of 0.5 seconds at ISO 400, respectively. Scar bar represents 1mm.

***A. japonica* における筋肉内の蛍光の局在化と遺伝子の発現量**

A. japonica から凍結切片を作製し、成魚の皮側から脊椎付近を含む胴部および尾部、あるいはシラスウナギの蛍光観察を行った。その結果、シラスウナギでは脊椎周り、皮側関係なく強い蛍光が筋肉において観察された (**Fig. 1-5**)。一方で成魚においては胴部では脊椎周り強い蛍光が確認できたが、皮側ではほとんど蛍光を発していなかった (**Fig. 1-6**)。尾部では胴部とは異なり、脊椎側、皮側においてわずかな蛍光が確認できた (**Fig. 1-7**)。

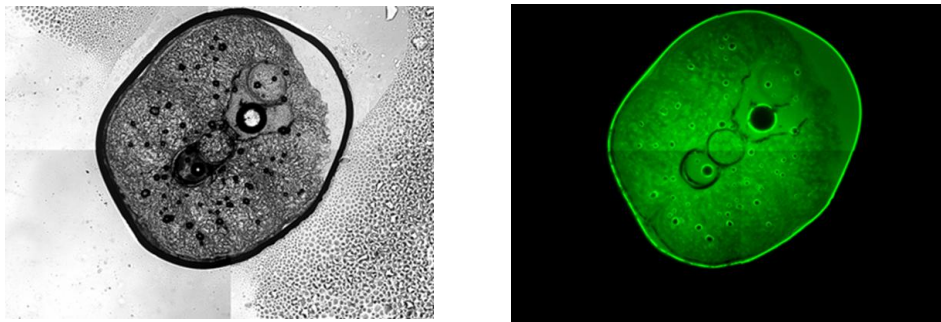


Fig. 1-5 Observation of a thickness of 150 μm cross-section from glass eel, *A. japonica* skeletal muscle for 5 sec exposure.

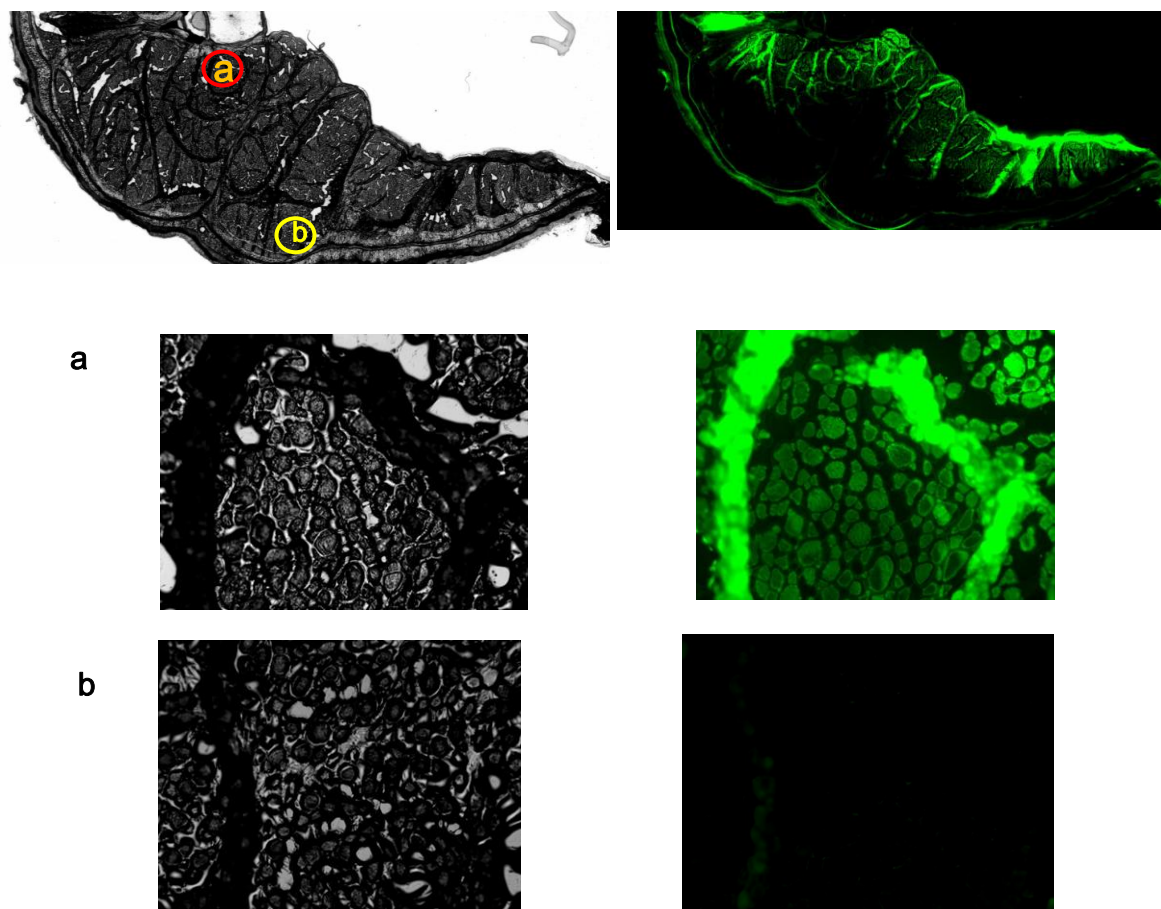


Fig. 1-6 Observation of a thickness of 150 μm cross-section from mature *A. japonica* skeletal muscle in trunk for 5 sec exposure. Magnified bright and fluorescence images of muscle cells around backbone (a). Magnified bright and fluorescence images of muscle cells nearby skin (b).

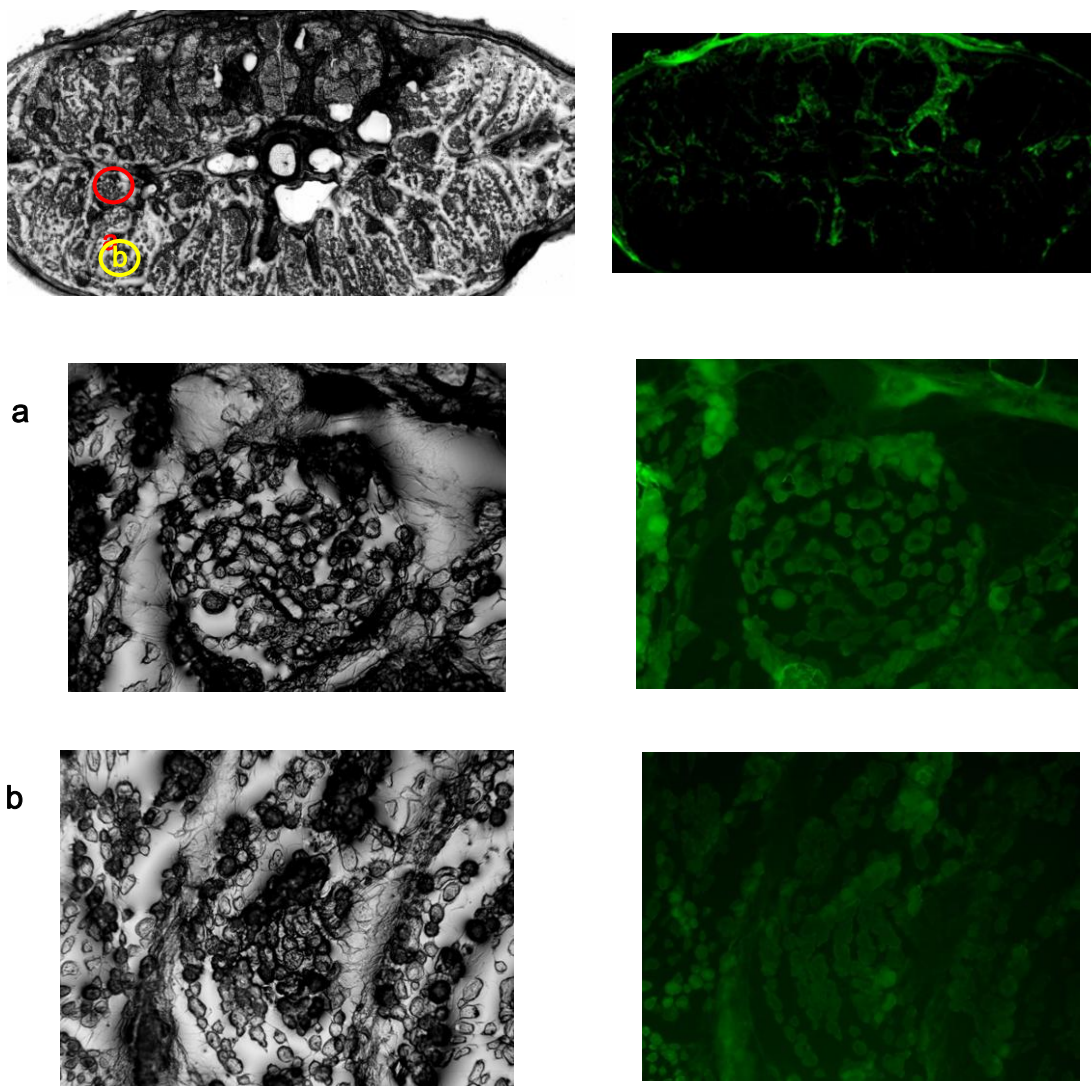


Fig. 1-7 Observation of a thickness of 150 μm cross-section from mature *A. japonica* skeletal muscle in tail for 7 sec exposure. Magnified bright and fluorescence images of muscle cells around backbone (a). Magnified bright and fluorescence images of muscle cells nearby skin (b).

Real-time PCR の結果 (Fig. 1-8) は、筋肉以外の組織 (肝臓、腸) において eel GFP 遺伝子の転写を検出することはできなかった。成魚 *A. japonica* では、胴部脊椎側で最も発現量が多く、胴部皮側、尾部脊椎側、尾部皮側の 3.6%、5.0%、1.9% の発現量に過ぎなかった。一方、シラスウナギは成魚の胴部脊椎側よりも約 1.9 倍の発現量があった。

以上の結果は、蛍光の局在化あるいはシラスウナギの蛍光強度と遺伝子の転写発現量との間に関連性があると思われる。このことは、eel GFP の転写には、何らかの抑制や活性化に関与する因子が存在することを示唆している。

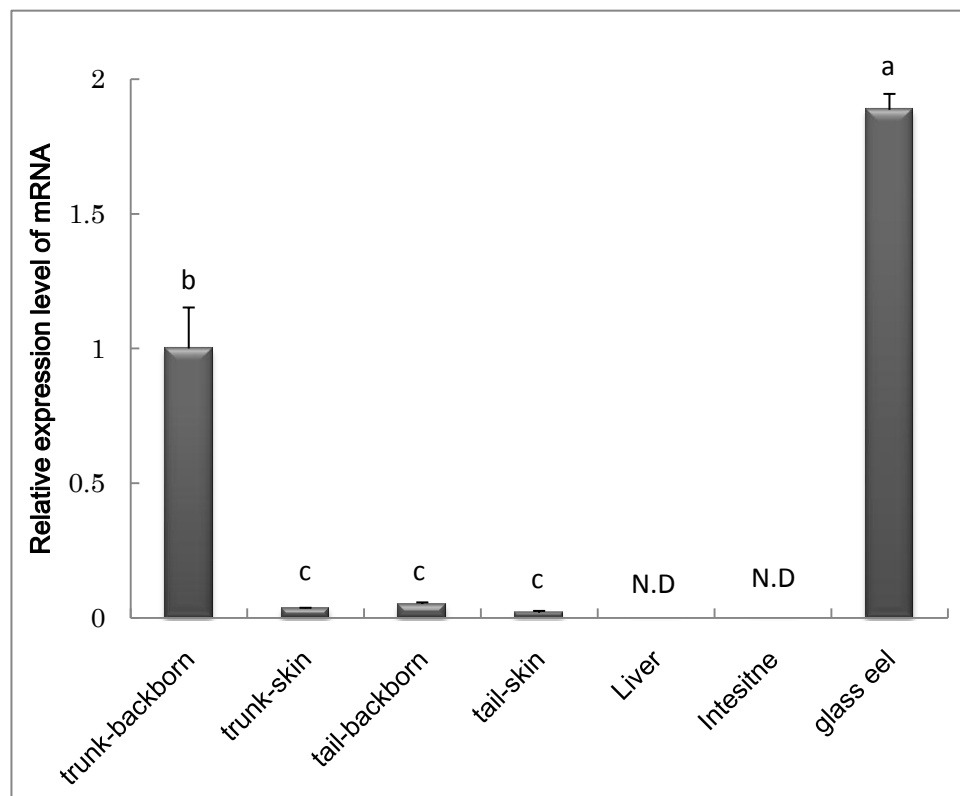


Fig. 1-8 Comparison of eel GFP expression levels among mature *A. japonica* divided into four muscle groups, liver and intestine and glass eel muscle. Expression levels of mRNAs were quantified using real-time PCR method and the relative eel GFP mRNA levels were normalized to *actb* expression. Each bar represent the mean \pm SD of three independent samples. Statistical differences among the samples were determined by one-way ANOVA followed by Tukey's test. Different letters denote a statistically significant difference ($p < 0.05$). N.D means not detected.

A. japonica cDNA 塩基配列の解析

Degenerate PCR

6通りのプライマーの組み合わせの結果、すべての組み合わせにおいて予想されるサイズの PCR 産物が得られた (**Fig. 1-9**)。単一かつ長いバンドである②を用いてクローニングおよびシーケンス解析を行った。シーケンス解析の結果、284 bp の塩基配列が得られた (**Fig. 1-10**)。 Hayashi and Toda (2009) によって報告されたペプチド配列の一部と一致したため、次に RACE を行い全長の cDNA の塩基配列を決定した。

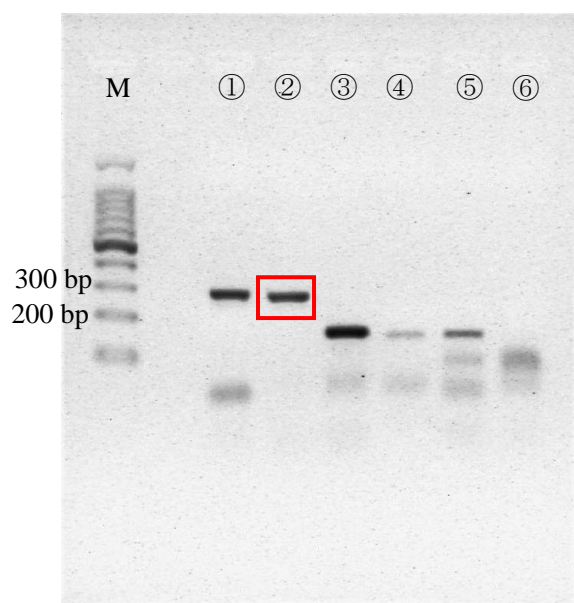


Fig. 1-9 Products of Degenerate PCR from *A. japonica*. M, 100bp DNA ladder; ①, H8(a)_F - H5H6e_R primers ; ②, H8(b)_F - H5H6k-R primers; ③, C9(b)_F ~ H5H6e_R primer; ④, C9(e)_F ~ H5H6k_R primers; ⑤, H8(a)_F ~ C9(f)_R primers; ⑥, H8(b)_F ~ C9(h)_R primers.



Fig. 1-10 A partial nucleotide sequences of *A. japonica* eel GFP cDNA and its deduced amino acid residues. Blue letters showed primer binding site. Green letters were indicated the corresponding to amino acid sequences of eel GFP purified from muscle of *A. japonica* reported by Hayahsi and Toda (2009).

RACE 法

Degenerate PCR より得られた部分塩基配列を元に新たに RACE 用のプライマーを設計し、3' RACE と 5' RACE を行った。

3' RACE

eelGFP_RACE_37F および eelGFP_RACE_95F プライマーでは目的とする産物を得られなかったため、さらに eelGFP_RACE_37F プライマーを用いて増幅した PCR 産物を鋳型にして eelGFP_RACE_95F プライマーを用いて Nested PCR を行った。その結果、約 420 bp の産物を得ることが出来た (**Fig. 1-11**)。得られた産物をクローニングしてシーケンス解析を行った。

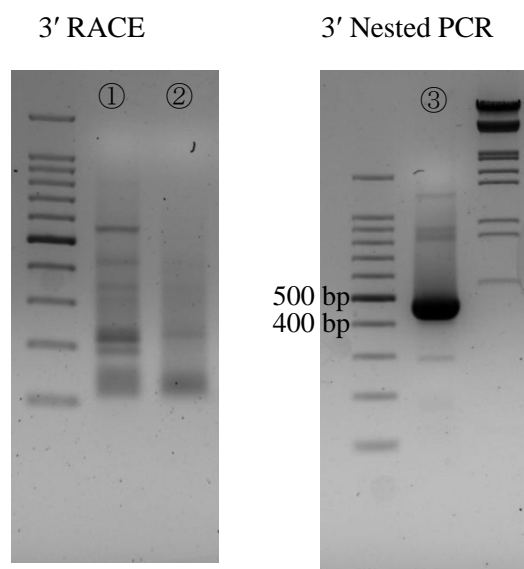


Fig. 1-11 3' RACE and Nested PCR products from *A. japonica*. (1), eelGFP_RACE_37F primer and 3' RACE-Ready cDNA as template; (2), eelGFP_RACE_95F Primer and 3' RACE-Ready cDNA as template; (3), eelGFP_RACE_95F primer and 1:50 dilution of PCR product from eelGFP_RACE_37F primer as template.

5' RACE

eelGFP_RACE_255R プライマーを用いたところ、目的サイズの産物 約 420 bp が得られた (**Fig. 1-12**)。この産物をクローニングした後にシーケンス解析を行った。

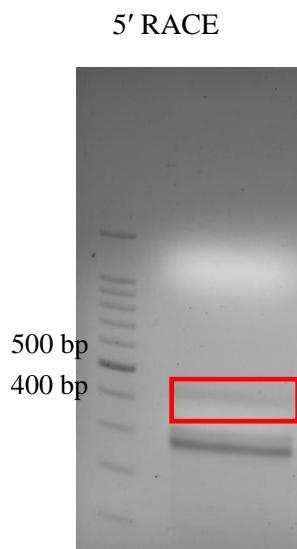


Fig. 1-12 5' RACE PCR products from *A. japonica*. PCR product was amplified by eelGFP_RACE_37F primer and 5' RACE-Ready cDNA as template.

全長 cDNA

3' RACE および 5' RACE で得られた塩基配列のアライメントをおこない、全長 cDNA を解析した結果、5' UTR 85 bp、3' UTR 167 bp を含む全長 cDNA 669 bp が得られ、演繹アミノ酸は 139 残基であった (**Fig. 1-13**)。

	ACATGGGGGAAAAAGAGGCAACAGC	-61
TTTGCGAGCATCTACTTTTTATTCTCCCTTATCTGCTTGACTGCTCTTTAACTCTTCACC		-1
ATGGTCGAGAAATTTGTTGGCACCTGGAAGATCGCAGACAGCCATAATTTTGGTGAATAC		60
M V E K F V G T W K I A D S H N F G E Y		20
CTGAAAGCTATCGGAGCCCCAAAGGAATTAAGCGATGGTGGGGATGCCACGACGCCGACA		120
L K A I G A P K E L S D G G D A T T P T		40
TTGTACATCTCCCAGAAGGACGGAGACAAAATGACAGTGAAAATAGAGAATGGACCTCCT		180
L Y I S Q K D G D K M T V K I E N G P P		60
ACGTTTCCTTGACACTCAAGTAAAGTTCAAATTAGGGGAGGAGTTCGACGAATTTTCCTTCT		240
T F L D T Q V K F K L G E E F D E F P S		80
GATCGAAGAAAAGGCGTAAAATCTGTCGTGAACTTGGTGGGAGAGAAGCTGGTGTACGTA		300
D R R K G V K S V V N L V G E K L V Y V		100
CAAAAGTGGGACGGCAAGGAGACGACGTATGTCCGAGAGATAAAGGACGGTAAACTGGTC		360
Q K W D G K E T T Y V R E I K D G K L V		120
GTGACACTTACGATGGGAGACGTCGTGGCTGTGCGCAGCTACCGGAGGGCGACGGAATGA		420
V T L T M G D V V A V R S Y R R A T E *		139
ACCCGTGTCGCCCTGTCTTCCTCCTTCGTTTCGCCAAACTCGCTTATATGACGTCAAATG		480
ATTAAAACAACGTGTACATGAATGACTTAAATCTTTCCATACTGAGT <u>GAAATAAATACTTA</u>		540
TATCTCTTCAAGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA		669

Fig. 1-13 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *A. japonica* eel GFP. The stop codon, TGA, and one polyadenylation singnals are marked by an astersisk and underlined, respectively.

A. anguilla、*A. australis*、*A. bicolor b.*、*A. bicolor p.*、*A. mossambica* cDNA 塩基配列の解析

Degenerate PCR

A. japonica の時と同様に 6 通りのプライマーの組み合わせで PCR および電気泳動を行った結果、*A. anguilla*、*A. australis*、*A. bicolor b.*、*A. bicolor p.*、*A. mossambica* はそれぞれ③において目的とするサイズの PCR 産物が得られた。これらのバンドを切り出してシーケンス解析を行った(Fig. 1-14)。シーケンス解析の結果、*A. anguilla* 162 bp、*A. australis* 160 bp、*A. bicolor b.* 162 bp、*A. bicolor p.* 162 bp、*A. mossambica* 162 bp の部分塩基配列が得られた。

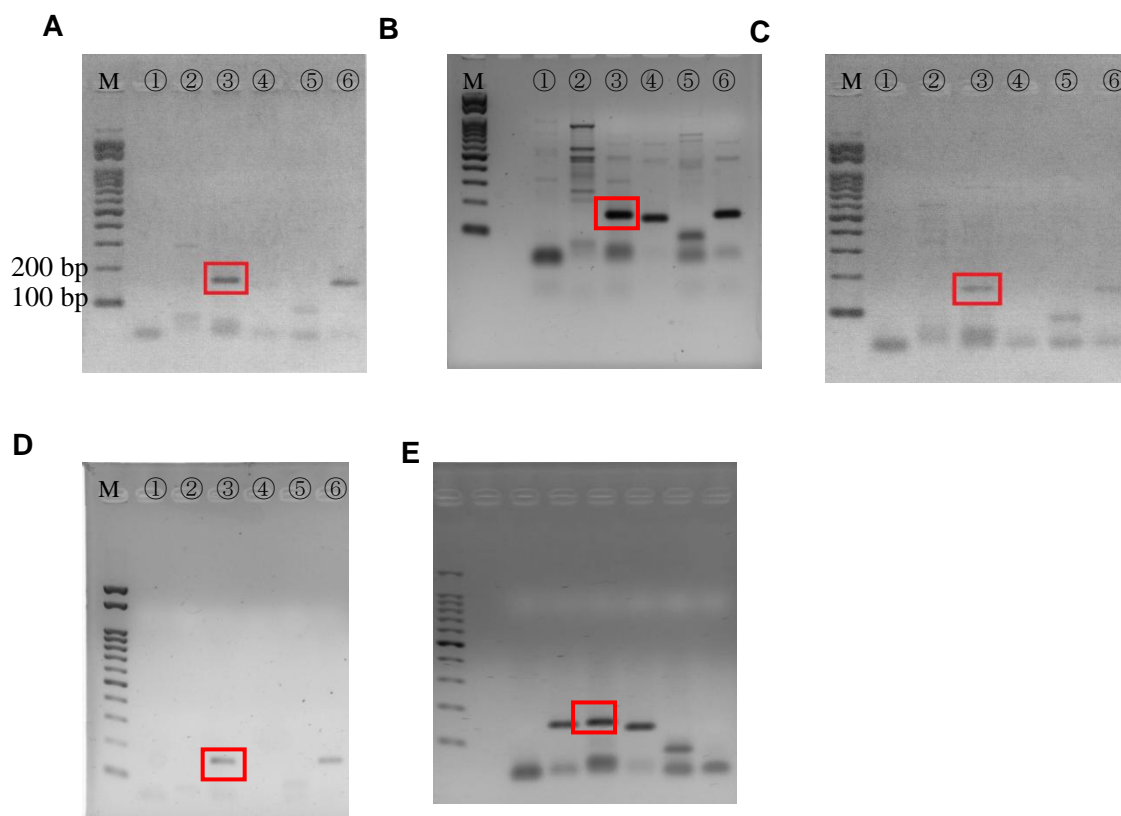


Fig. 1-14 Prodcuts of Degenerate PCR from *A.anguilla* (a), *A. australis* (b), *A. bicolor b.* (c), *A. bicolor p.* (d), and *A. mossambica* (e) . M, 100bp DNA ladder; (1), H8(a)_F - H5H6e_R primers ; (2), H8(b)_F - H5H6k-R primers; (3),C9(b)_F ~ H5H6e_R primer; (4), C9(e)_F ~ H5H6k_R primers; (5), H8(a)_F ~ C9(f)_R primers; (6), H8(b)_F ~ C9(h)_R primers

3' RACE と Nested PCR

5 種のウナギ属において eelGFP_RACE_7F、eelGFP_RACE_37F および eelGFP_RACE_95F プライマーでは目的とする産物を得られなかったため、さらに eelGFP_RACE_37F プライマーを用いて増幅した PCR 産物を鋳型にして eelGFP_RACE_7F プライマーを用いて Nested PCR を行った (**Fig. 1-15**)。その結果、約 420bp の産物を得られたため、産物をクローニングしてシークエンス解析を行った。

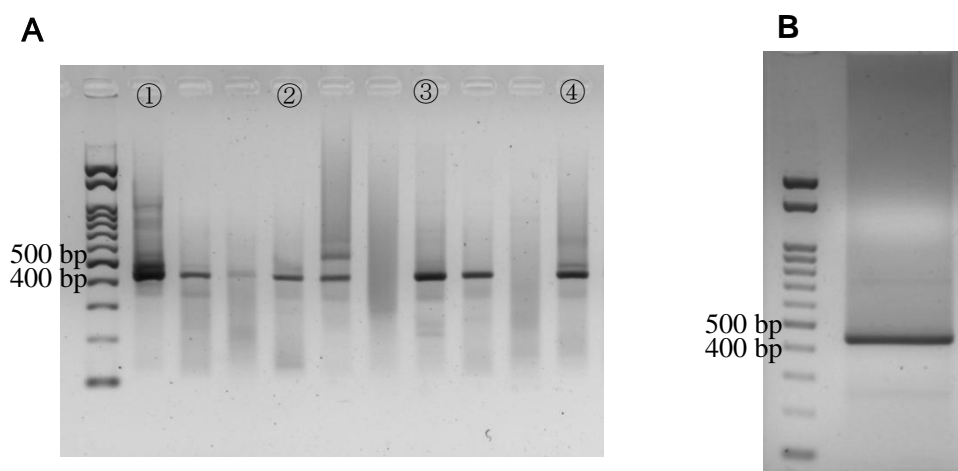


Fig. 1-15 3' Nested PCR products from *A. australis* (A1), *A. anguilla* (A2), *A. bicolor b.* (A3), *A. bicolor p.* (A4), and *A. mossambica* (B). The PCR product was amplified by eel GFP_RACE_7F primer and 1:50 dilution of PCR product from eelGFP_RACE_37F primer as template.

5' RACE

eelGFP_RACE_64R プライマーを用いたところ、それぞれ目的サイズの産物約 380 bp が得られた (**Fig. 1-16**)。この産物をクローニングした後にシーケンス解析を行った。

さらに 3' RACE および 5' RACE で得られた塩基配列のアライメントをおこない全長 cDNA を解析した。

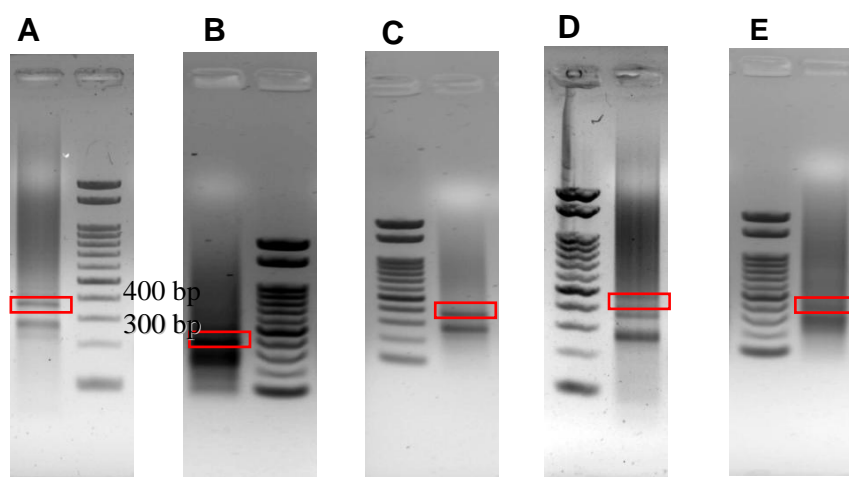


Fig. 1-16 5' RACE PCR product *A.anguilla* (a), *A. australis* (b), *A. bicolor b.* (c), *A. bicolor p.* (d), and *A. mossambica* (e) . PCR product was amplified by eel GFP _RACE_64F primer and 5' RACE-Ready cDNA as template.

6 種ウナギ属の塩基配列の解析

Degenerate PCR および 5' RACE、3' RACE の結果、6 種類のウナギ属すべてにおいて全長 cDNA を得ることができた (Table 1-8)。5' UTR および 3' UTR の長さに差はみられるものの、翻訳領域の長さは 417 bp と一致していた。

Table 1-8 Comparison of sequence analysis of six *Anguilla* genras eel GFP

	<i>A. japonica</i>	<i>A. anguilla</i>	<i>A. australis</i>	<i>A. bicolor b.</i>	<i>A. bicolor p.</i>	<i>A. mossmbica</i>
Full length (bp)	632	632	632	644	643	631
5' UTR (bp)	78	78	78	91	90	78
ORF (bp)	417	417	417	417	417	417
3' UTR (bp)	137	137	137	136	136	136
Amino acids (aa)	139	139	139	139	139	139
Moleclur weight (kDa)	15.6	15.6	15.6	15.6	15.7	15.7
Polyadenylation signal	1	1	1	1	1	1
Accession No.	AB731138	LC002777	LC002778	LC002779	LC002780	LC002781

ウナギ属の演繹アミノ酸配列の比較

今回得られた 6 種のウナギ属の eel GFP cDNA の配列をアライメントした (Fig. 1-17)。また、アミノ酸残基を推定し、その配列を比較した (Fig. 1-18)。ウナギ属 6 種において cDNA の翻訳領域のみでは 95.2% ~ 99.5% の塩基配列の類似性を示し、全長 cDNA においては 93.9% ~ 99.7% であった。また後述するが、今回の 5' RACE の結果において、6 種すべて 5' UTR 78 bp の塩基配列が一致していた。

第 2 章で詳述するが、eel GFP は蛍光を発するためにリガンドとしてビリルビンを要求する。Kumagai *et al.* (2013) は、ビリルビンが結合する際に 8 カ所のアミノ酸残基 (Asn57, Thr61, Glu77, Ser80, Asp81, Arg112, Arg132, Tyr134) が重要な働きを担うことを報告している。本実験で決定した 6 種すべてのウナギにおいても、これら 8 カ所の基質認識部位であるアミノ酸残基は保存されていることが確認された。一方、eel GFP は FABP と近縁に位置するが、FABP3 と FABP7a と比較した場合、Asn57→Ser および Ser80→Ala でアミノ酸配列が異なっており、この置換が FABP ではリガンドとして脂肪酸を要求していると推測される。また、Gruber *et al.* (2015) は、イワアナゴ筋肉の蛍光タンパク質において tripeptide Gly58-Pro59-Pro60 が蛍光発色団であることを報告しており、ウナギ種のすべてにおいてこれらの配列も保存されていた。

```

A. japonica : -----ggaaaaagaggcaacagctttgcgagcatctactttttattctcccttatctgcttgactgc : 62
A. anguilla : ----- : 62
A. australis : ----- : 62
A. bicolor b : acacagtagccct..... : 75
A. bicolor p : -gacagtagccct..... : 74
A. mossambica : ----- : 62

A. japonica : tctttaactcttcaccATGGTCGAGAAATTGTTGGCACCTGGAAGATCGCAGACAGCCATAATTTTGGTGAATA : 137
A. anguilla : ..... : 137
A. australis : ..... : 137
A. bicolor b : .....T.....A..... : 150
A. bicolor p : .....T.....A..... : 149
A. mossambica : ..... : 137

A. japonica : CCTGAAAGCTATCGGAGCCCCAAAGGAATTAAGCGATGGTGGGGATGCCACGACGCCGACATTGTACATCTCCCA : 212
A. anguilla : ..... : 212
A. australis : ..... : 212
A. bicolor b : .....A..... : 225
A. bicolor p : .....A..... : 224
A. mossambica : .....G..... : 212

A. japonica : GAAGGACGGAGACAAAATGACAGTGAAATAGAGAATGGACCTCCTACGTTCTTGACACTCAAGTAAAGTTCAA : 287
A. anguilla : ..... : 287
A. australis : .....C : 287
A. bicolor b : .....G.....G..... : 300
A. bicolor p : .....G.....G.....A..... : 299
A. mossambica : .....A.....G.....A..... : 287

A. japonica : ATTAGGGGAGGAGTTTCGACGAATTTCTTCTGATCGAAGAAAGGCGTAAAATCTGTCTGAACTTGGTGGGAGA : 362
A. anguilla : .....C.....G.....CG..... : 362
A. australis : .....C.....CG..... : 362
A. bicolor b : .....G..... : 375
A. bicolor p : .....G..... : 374
A. mossambica : .....CG..... : 362

A. japonica : GAAGCTGGTGTACGTACAAAAGTGGGACGGCAAGGAGACGCGTATGTCCGAGAGATAAAGGACGGTAAACTGGT : 437
A. anguilla : .....T.....TG.....C.....T..... : 437
A. australis : .....T.....TG.....C.....T..... : 437
A. bicolor b : .....C.....G.....A..... : 450
A. bicolor p : .....G.....A.....G..... : 449
A. mossambica : .....T.....A.....TG.....C..... : 437

A. japonica : CGTGACACTTACGATGGGAGACGTCGTGGCTGTGCGCAGCTACCGGAGGGCGACGGAATGAacccgtgtcgcct : 512
A. anguilla : .....T..... : 512
A. australis : .....T.....T..... : 512
A. bicolor b : .....A.....T.....t..... : 525
A. bicolor p : .....A.....T.....t..... : 524
A. mossambica : .....T..... : 512

A. japonica : gtcttcctccttcggttcgcaaaactcgcttatatgacgtcaaatgattaaaaacaacgtgtacatgaatgactta : 587
A. anguilla : .....C.....C.....t..... : 587
A. australis : .....C.....C.....t..... : 587
A. bicolor b : .....C.....g.....t..... : 600
A. bicolor p : .....C.....-.....g.....t..... : 598
A. mossambica : .....t.....g..... : 587

A. japonica : aatctttccatactgagtgaataaatacttatatctcttcaagttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa : 662
A. anguilla : .....t.c..... : 662
A. australis : .....t.....- : 661
A. bicolor b : .....t.a.....-- : 673
A. bicolor p : .....t.cc.....--- : 669
A. mossambica : .....g.....t.a..... : 662

A. japonica : ---- : -
A. anguilla : aaaa : 666
A. australis : ---- : -
A. bicolor b : ---- : -
A. bicolor p : ---- : -
A. mossambica : aa-- : 664

```

Fig. 1-17 Comparison of the full-length cDNA sequences of eel GFP among the six *Anguilla* genera. Residues that are identical to the *A. japonica* eel GFP sequence are indicated by dots (.), and the absence of a nucleotide in the sequence is indicated by dashes (-).

```

A. japonica : MVEKFVGTWKIADSHNFG EYLKAIGAPKELSDGGDATTP TLYISQKDGDK : 50
A. anguilla : ..... : 50
A. australis : ..... : 50
A. bicolor p. : .....E.....K..... : 50
A. bicolor b. : .....E.....K..... : 50
A. mossambica : .....R.. : 50

          *      *              *      **
A. japonica : MTVKIENG PPTFLDTQVKFKLGEEFDEFPSDRRKGVKSVVNLVGEKLVYV : 100
A. anguilla : .....T..... : 100
A. australis : .....T..... : 100
A. bicolor p. : ..... : 100
A. bicolor b. : .....A : 100
A. mossambica : ..... : 100

          *              *      *
A. japonica : QKWDGKETTYVREIKDGKLVVTLTMGDVVAVRSYRRATE : 139
A. anguilla : .....L.....F..... : 139
A. australis : .....L.....F.....S..... : 139
A. bicolor p. : .....S..... : 139
A. bicolor b. : .....S..... : 139
A. mossambica : .....K..L.....S..... : 139

```

Fig. 1-18 Alignment of the deduced amino-acid sequences of six eel GFP with CLUSTALW. The identical positions are indicated by dots. The amino-acid residues that play an important role in the binding to bilirubin are indicated with asterisks, as reported by Kumagai *et al.* (2013).

脂肪酸結合タンパク質 FABP のアミノ酸配列の比較と系統樹

eel GFP はそれぞれ *A. japonica* FABP3、*D. rerio* FABP3 および *D. rerio* FABP7 と最も近い 50%前後の類似性を示した (Table 1-9)。また、系統樹 (Fig. 1-19) においては eel GFP は FABP に分類され、FABP3、FABP7 とクラスターを形成していた。

Table 1-9 *Anguilla* genera eel GFP and *Anguilla* and *Danio rerio* genera fatty acid-binding protein (FABP) family genes: comparisons of the deduced amino-acid sequences, % identity

	<i>A. japonica</i>	<i>A. anguilla</i>	<i>A. australis</i>	<i>A. bicolor b.</i>	<i>A. bicolor p.</i>	<i>A. mossambica</i>	<i>A. japonica</i>	<i>D. rerio</i>	<i>D. rerio</i>	<i>D. rerio</i>	<i>D. rerio</i>
	eel GFP	eel GFP	eel GFP	eel GFP	eel GFP	eel GFP	FABP3	FABP3	FABP7a	FABP7b	FABP10a
<i>A. japonica</i> eel GFP		95.7	95.0	95.7	96.4	95.0	47.5	49.6	51.8	51.1	26.6
<i>A. anguilla</i> eel GFP			99.3	93.5	93.5	95.0	47.5	48.2	48.9	49.6	25.9
<i>A. australis</i> eel GFP				94.2	94.2	95.7	48.2	48.9	48.2	48.9	25.9
<i>A. bicolor b.</i> eel GFP					99.3	95.7	48.9	51.1	50.4	50.4	26.6
<i>A. bicolor p.</i> eel GFP						95.7	48.9	51.8	51.1	51.1	26.6
<i>A. mossambica</i> eel GFP							48.2	48.9	48.9	48.2	25.2
<i>A. japonica</i> FABP3								68.1	58.5	57.0	26.7
<i>D. rerio</i> FABP3									61.7	62.4	28.6
<i>D. rerio</i> FABP7a										81.8	28.0
<i>D. rerio</i> FABP7b											30.3
<i>D. rerio</i> FABP10a											

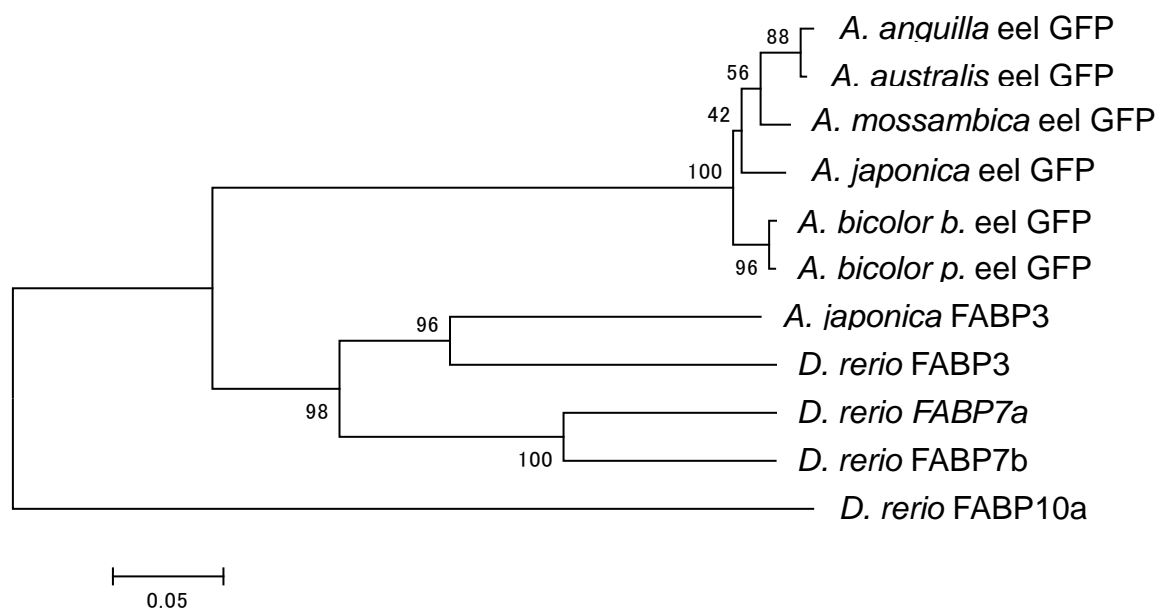


Fig. 1-19 Phylogenetic tree of genus *Anugilla* eel GFP and eel and zebrafish fatty acid-binding protein (FABP) genes constructed by the neighbor-joining method with amino-acid sequences. The bootstrap values that are based on the number per 1,000 samplings are indicated above or under each node. The scale bar under the tree indicates 0.05 amino-acid substitutions per site. The amino-acid sequences used in this analysis include *Danio rerio* FABP3 (AAH49060), FABP7a (AAH55621), FABP7b (AAQ92970), and FABP10a (NP_694492) and *A. japonica* FABP3 (BAA92355).

ウナギ属の遺伝子構造と 5' 上流域の解析

PCR 反応により 5' UTR から ORF の 3' 末端を増幅したところ、3,288 ~ 4,020 bp の g DNA 断片を得ることができた。この配列を RACE によって得られた cDNA の塩基配列と比較してエクソン-イントロン構造を解析した (Table 1-10)。6 種すべてにおいて翻訳開始点は 1st エクソンに終止コドンは 4nd エクソンに位置していた。eel GFP の遺伝子構造は 4 つのエクソンと 3 つのイントロンから構成されることが明らかになった。4 つのエクソンのサイズは 6 種すべてにおいて同一であったが、イントロンは種によってサイズが異なっており、またイントロンの長さは 3' 側に進むにつれ徐々に長くなっていった。3 つのイントロンすべては GT から始まり AG で終わっており AT-GT 則に従っていた (Padgett *et al.*, 1986)。eel GFP のエクソン-イントロン構造は、5' UTR 内にイントロンを含むゼブラフィッシュ FABP1 (Sharma *et al.*, 2006)、および 2 つのイントロンからなる無脊椎動物であるのサバクトビバッタ locust muscle FABP (Wu *et al.*, 2001) を除いて、エクソン 4 つおよびイントロン 3 つからなる脊椎動物の FABP ファミリー (FABPs, CRBPs, CRABP) (Zimmerman and Veerkamp, 2002) の構造と高い類似性を示した。多くの FABP ファミリーにおいてエクソンの長さは保存されているのに対して、イントロンの長さは多岐にわたる。*A. japonica* eel GFP の 1st と 3rd エクソンのアミノ酸残基の数はゼブラフィッシュ FABP3、FABP4、FABP7、ヒメダカ FABP7、ヒト FABP7 と一致していたのに対して、2nd および 4th エクソンのアミノ酸残基の数は異なっていた (Table 1-10)。これらの結果より、eel GFP と FABP は共通の祖先遺伝子をもつホモログであることが考えられる。

Table 1-10 Comparison of exon/ intron structure between genus *Angillua* eel GFP and *D. rerio* FABP.

	1st	2nd	3rd	4th	1st	2nd	3rd
<i>A. japonica</i> eel GFP	73bp(24)	188bp(63)	102bp(34)	57bp(18)	2701	491	348
<i>A. anguilla</i> eel GFP	24	63	34	18	2362	492	347
<i>A. australis</i> eel GFP	24	63	34	18	2716	493	344
<i>A. bicolor b.</i> eel GFP	24	63	34	18	2372	490	323
<i>A. bicolor p.</i> eel GFP	24	63	34	18	2370	485	347
<i>A. mossambica</i> eel GFP	24	63	34	18	2218	489	347
<i>D. rerio</i> FABP3	73bp(24)	173bp(58)	102bp(34)	54bp(17)	4233	249	4431
<i>D. rerio</i> FABP4	73bp(24)	176bp(59)	102bp(34)	54bp(17)	217	101	1468
<i>D. rerio</i> FABP7	73bp (24)	173bp(58)	102bp(34)	51bp(16)	146	153	1363
<i>O. latipes</i> FABP7	73bp(24)	173bp(58)	102bp(34)	51bp(16)	120	127	267
<i>H. sapiens</i> FABP7	73bp (24)	173bp(58)	102bp(34)	51bp(16)	423	629	2522

FABP family sequences were obtained from GenBank: *A. japonica* (LC041351), *A. anguilla* (LC149923), *A. australis* (LC149924), *A. bicolor b.* (LC149925), *A. bicolor p.* (LC149926), *A. mossambica* (LC149927), *D. rerio* FABP3 (AF448057), *D. rerio* FABP4 (CR759777), *D. rerio* FABP7 (AY145893), *O. latipes* FABP7 (AB127930), and *H.sapiens* FABP7 (NM_001446).

さらに *A. japonica* において、得られた gDNA の塩基配列をもとにプライマーを新たに設計してインバース PCR を行うことで 5' 側および 3' 側方向への伸長を行った。その結果、構造遺伝子 4,173 bp、5' 上流 2,050 bp、3' 下流 411 bp が得られた (**Fig.1-1**)。

5' 上流 2050 bp の解析を行ったところ、プロモーター領域には転写開始点から 25 bp 上流 に TATA box (TATAAA)が、68 bp 上流に CAAT box (CCAAT)が存在していた。5' 上流に存在する転写調節に関わる DNA 配列 *cis*-element を検索したところ、抗酸化剤応答因子(antioxidant response element: ARE) (5'- RTGAYNNNGC -3')に 1 塩基だけ異なり類似した配列である ARE like motif (5'-GTGAGTGTGC-3')が 1,681 bp 上流に存在していた(Rushmore *et al.*, 1991)。この ARE 配列はシス作動性のエレメントとして GST (glutamate cysteine ligase catalytic) (Rushmore and Pickett, 1990)や NQO1 (quinine oxidoreductase: NAD(P)H) (Rushmore and Pickett, 1990; Jaswal, 1991)、HO-1 (heme oxygenase-1) (Inamdar *et al.*, 1996)、ferritin (Tsuji *et al.*, 2000)のような抗酸化タンパク質や第 2 相薬物代謝酵素 (phase II detoxification enzymes)をコードしている遺伝子の転写活性を仲介していることが報告されている。

Fig. 1-20 Nucleotide sequence of the *A. japonica* eel GFP gene. Nucleotides numbered from the transcriptional start site, and negative numbers represent the 5' upstream region. Numbers on the right indicate nucleotide positions in the gene sequence. Nucleotides in exon are represented in uppercase letters and underlined and the deduced amino acid sequence indicated below. Nucleotides in intron and others are represented in lowercase letters. Putative CAAT box, TATA box are underlined. ARE-like motif is double-lined.

5' UTR の塩基配列の構造解析

今回の 5' RACE の結果、6 種すべてにおいて 5' UTR 78 bp の塩基配列が一致していたことを「ウナギ属の演繹アミノ酸配列の比較」の項で述べた。UTR では、一般的にその相同性が低くなるが、興味あることにウナギ種の eel GFP 遺伝子では極めて高いレベルで配列は保存されていた。

5' UTR、成熟 mRNA のコーディング領域の上流にあるタンパク質に翻訳されない領域である。真核生物の場合、5' 端にキャップ構造の付加がリボゾームを呼び込む働きに関わっており、5' UTR に存在する幾つかのタンパク質発現制御部位が報告されている (Vagner, *et al.*, 2001; Baird *et al.*, 2006)。そのひとつに、リボスイッチ (riboswitch) による mRNA 自身による発現調節が報告されている (Coppinset *et al.*, 2007)。リボスイッチは概念的には 2 つに分けられるが、その中で発現調節に関わる基本機能があり、典型的なものでは低分子により遺伝子発現をオフあるいはオンにするものがある。

基本機能のひとつに、リボソーム結合部位を抑制することで翻訳をブロックするようなフォールディングやヘアピン構造を形成することが知られている。

5' UTR 78 bp の塩基配列の高次構造を DNA STAR で解析させたところ、次のようにいくつかのループの二次構造が得られ、リボスイッチの特徴的な構造を持つことが示唆された。今後は転写に関わる 5' 上流域の解析とあわせて、5' UTR が eel GFP の転写制御に関与しているか検討したい。

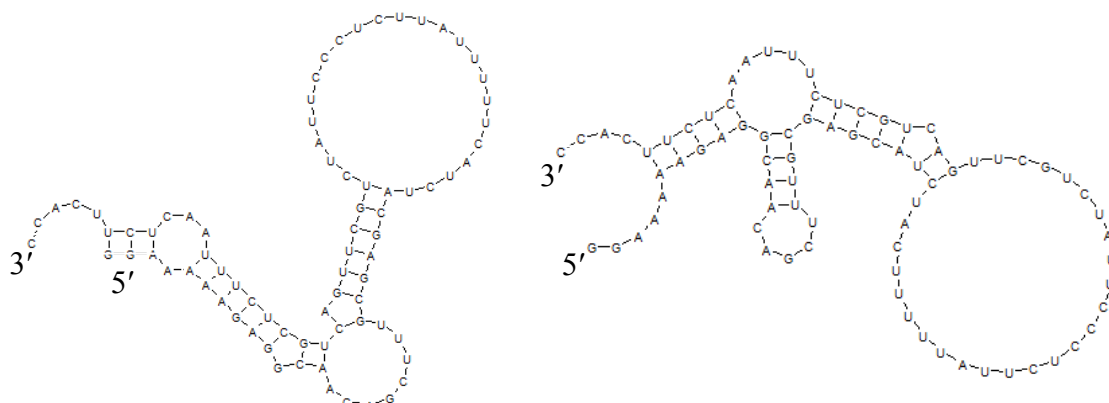


Fig. 1-21 Second structure of eels 5' UTR 78 bp which is stimulated by Genequest, Lasergene softwear. Parameter : Left 37°C, Right 25°C.

5'-GGAAAAAGAGGCAACAGCTTTGCGAGCATCTACTTTTTATTCTCCCTTATCTGCTTG
ACTGCTCTTTAACTCTTCACC-3'

第2章 大腸菌を用いた eel GFP タンパク質の発現と機能解析

第1章において6種のウナギ属から eel GFP 遺伝子をクローニングすることができた。得られた cDNA 塩基配列が緑色蛍光を発するタンパク質をコードしているかを確認するために、大腸菌およびヒト胎児腎臓由来株化培養細胞 (human embryonic kidney cells: HEK293) を用いて eel GFP タンパク質を発現させて機能解析を進めた。その結果、大腸菌においては蛍光を示さず、HEK293 細胞においては蛍光を示し、励起光を照射するだけで蛍光を発するオワンクラゲ GFP の性質とは異なる現象が確認された。eel GFP の蛍光発現機構について解析を行っていたところ、理化学研究所の Kumagai *et al.* (2013) により eel GFP が蛍光を発する際には特定のリガンドと結合する必要があることを報告した。

eel GFP は培地を構成するウシ胎児血清に存在するビリルビンがリガンドとして特異的に結合し、発色団として機能することにより蛍光を発する。一方でオワンクラゲ GFP は、タンパク質自身にセリン(Ser)、チロシン(Tyr)、グリシン(Gly)のアミノ酸配列からなる発色団を持っており、オワンクラゲ体内でイクオリンが発する青色光を吸収することで励起されて緑色の蛍光を発する。このようにオワンクラゲ GFP とは異なる蛍光発現機構を eel GFP は有していた。

そこで大腸菌に発現させたタンパク質を精製し、精製した eel GFP にビリルビンを加えて6種のウナギ属の間で励起波長、蛍光波長および蛍光強度の差を比較した。

実験試料および方法

制限酵素サイトの選択とプライマーの設計

得られた全長 cDNA 配列をもとに、翻訳領域を増幅するようにプライマー設計した (Table 2-1)。

foward プライマーは開始コドンを含むように作成して 5' 末端側には *Nde* I 切断部位の配列を付加した。Reverse プライマーには終止コドンを含むように設計し *Xho* I 切断部位の配列を 5' 末端に付加した。なお、*Nde* I、*Xho* I とともにエンドヌクレアーゼであるため、さらに 5' 末端にそれぞれ 4 塩基任意の配列を付加した。 *A. japonica*、*A. mossambica* においては pCold_Nde1_1F および pCold_Xho1_2R を、*A. anguilla*、*A. australis* においては pCold_Nde1_1F および pCold_Xho1_4R を、*A. bicolor b.*、*A. bicolor p.*においては pCold_Nde1_3F および pCold_Xho1_2R をそれぞれ用いた。

Table 2-1 Oligonucleotide primers used in the PCR amplification of eel GFP ORFs.

primer	Nucleotide sequence (5' → 3')
pCold_Nde1_1F	GCCG <u>CATATG</u> TCGAGAAATTTGTTGGC
pCold_Nde1_3F	GCCG <u>CATATG</u> TCGAGAAATTTGTTGGT
pCold_Xho1_2R	AAA <u>ACTCGAGT</u> CATTCCGTCGCCCTCCCG
pCold_Xho1_4R	AAA <u>ACTCGAGT</u> CATTCCGACGCCCTCCG

*Nde*I or *Xho* I sites are underlined. Start or stop codons are shown in bold.

インサート DNA の調製

増幅反応は Takara Ex Taq を使用して以下の反応条件で行った。

<u>Reaction Solution</u>		<u>Reaction condition</u>	
Template cDNA	<500 ng	1 cycle:	
10×Ex Taq buffer	5 µl	94°C	2 min 30sec
dNTP mixture (2.5 mM each)	4µl	35cycle:	
20 µM Forward primer	0.5µl	94°C	30 sec
20µM Reverse primer	0.5µl	60°C	45 sec
Ex Taq	0.25µl	72°C	30sec
DDW	X µl	1cycle:	
Total	50 µl	72°C	3 min

PCR 反応後、アガロースゲル電気泳動で目的産物を確認した。その後、Degenerate PCR の時と同様の手順でシーケンスを行い、pT7 Blue T-vector 内のインサート DNA 配列の確認を行った。

上記で得られた組換え体 pT7 Blue T-vector を以下のように *Nde* I と *Xho* I で制限酵素処理を行い、アガロースゲルで電気泳動を行った後に GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, UK)を用いて回収し、これをベクターに組み込むインサート DNA とした。同様にコールドショック発現系 pColdTM I DNA (TAKARA BIO INC., Japan) (Fig. 2-1) の MCS に存在する *Nde* I と *Xho* I を制限酵素により処理して回収を行った。なお、pColdTM I DNA にはコールドショック遺伝子の一つである *cspA* 遺伝子のプロモーターを利用したコールドショック発現ベクターであり、*cspA* 遺伝子プロモーターの下流には 5' 非翻訳領域、翻訳を促進する Translation enhancing element (TEE)、発現タンパク質の精製に有用な His タグ配列、精製後の Tag の除去に有用な Factor Xa 切断配列が配置されている。

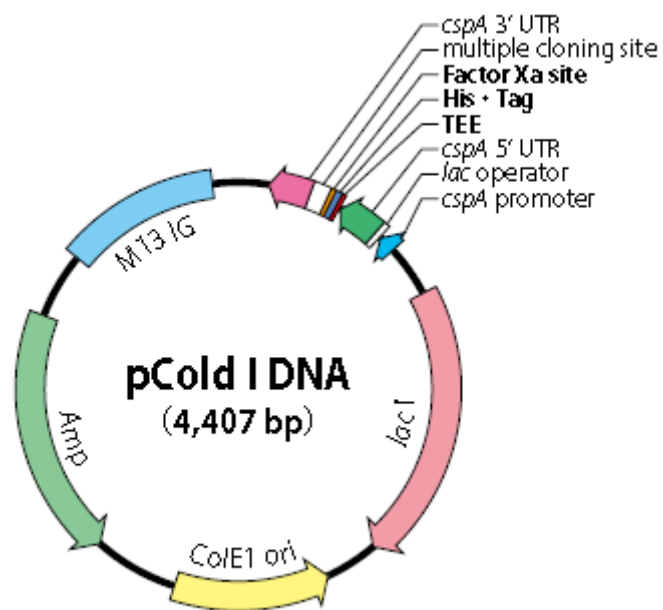


Fig. 2-1 pCold I DNA vector map (TAKARA BIO INC., Tokyo)

Restriction enzyme digest mixture

Plasmid DNA	>1 µg
10×Red buffer or 10×K buffer	5 µl
<i>Nde</i> I	1.5~2.0 µl
<i>Xho</i> I	1.5~2.0 µl
DDW	X µl
Total	50µl

Incubate at 37°C over 1hour

pCold へのインサート DNA の挿入と形質転換

以下の手順で回収したインサーDNA を Ligation Convenience kit (Nippon Gene Co., Ltd., Japan)を用いて pColdTM I DNA へ挿入した。

Ligation reaction mixture

Digested pCold	1 μ l
Insert DNA fragment	4 μ l
2×Ligation Mix	5 μ l
Total	10 μ l

Incubate at 16°C for 20 min

氷中にて事前に融解しておいた 100 μ l の TaKaRa Competent BL21(TAKARA BIO INC., Japan) に上記の ligation 反応液を加え穏やかに撹拌した。氷中で 30 分間放置した後に 42°C で 45 秒間保温し、再度氷中で 2 分間放置した。あらかじめ 37°C に保温しておいた SOC 培地を 400 μ l 加えて 37°C で 1 時間培養した。50 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 寒天培地に接種し、37°C で一晩培養した。

得られたコロニーはアンピシリンを含む LB 液体培地にて一晩振とう培養し、PI-24 (KURABO INDUSTRIES LTD., Japan)よりプラスミドを精製した。得られたプラスミドを制限酵素で切断した後、電気泳動によりインサートの有無を確認した。さらに、シーケンス反応によりインサートの塩基配列を確認し、発現プラスミドとして以降の実験に用いた。

遺伝子の発現

LB 寒天培地より単一のコロニーを選択して 50 μ g/ml アンピシリンを含む LB 液体培地 10 ml に植菌し、37°C 一晩振とう培養した。培養した LB 液体培地 1ml を新たに 50 μ g/ml アンピシリンを含む LB 液体培地 200 ml に加えて 37°C で振とう培養した。培養液の OD₆₀₀ が 0.4~0.5 となった時点ですみやかに 15°C に冷却し、そのまま 30 分間放置した。終濃度が 0.1 mM となるようにイソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside: IPTG) を添加して 15°C で 24 時間振とう培養した。

大腸菌から発現タンパク質の精製

His タグ融合タンパク質を発現している大腸菌培養液から直接融合タンパク質をワンステップで精製できる 20 ml TALON Single Step Columns (Clontech Laboratories, Inc., USA)を用いて発現タンパク質を回収した。

ファルコンチューブにセットしたカラムに培養液 20 ml を加えて蓋をした後に室温で 30 分間回転撹拌させカラム内の TALON×Tractor Buffer にて大腸菌を溶解して Resin にタンパク質を吸着させた。その後、706 g、4°C で 2 分間遠心して溶液を取り除いた。Equilibration buffer (50 mM Sodium Phosphate, 300 mM NaCl, pH 7.4) 20 ml をカラムに加えてよく懸濁した後、706 g、4°C で 2 分間遠心して溶液を取り除いた。Wash-Buffer (50 mM Sodium Phosphate, 300 mM NaCl, 7.5mM Imidazole, pH7.4) 20 ml をカラムに加えて良く懸濁した後、706 g、4°C で 2 分間遠心して溶液を取り除いた。この 平衡、洗浄の作業はそれぞれ 2 回ずつ行った。

カラムを新しいファルコンチューブに移して Elution Buffer (50 mM Sodium Phosphate, 300 mM NaCl, 150 mM Imidazole, pH7.4) 2ml を加えて 2 分間転倒撹拌してタンパク質を溶出した。その後、706 g、4°C で 2 分間遠心して溶液を回収した。

融合タンパク質濃縮と溶媒の置換および Factor Xa を用いたタグの除去

Factor Xa (Bovine) (TAKARA BIO INC., Japan)を用いて His タグを除去するために、Amicon[®] Ultra- 0.5 ml Centrifugal Filter Unit with Ultracel[®] - 3K もしくは Amicon[®] Ultra-4ml Centrifugal Filter Unit with Ultracel[®] - 3K (Merck Millipore Ltd., Ireland)を用いて融合タンパク質の濃縮し、Elution Buffer から TBS Buffer (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 6 mM CaCl₂, pH 8.0)に置き換えた。融合タンパク質に対して 1%以上の Factor Xa を添加して 22°C で一晩処理し、His タグを切断した。

Factor Xa および切断サイトの除去

切断した His タグおよび Factor Xa をバッファーから除去するために HiTrap Benzamidine FF 1ml カラムにペリスタルティックポンプ (Amersham Pharmacia Biotech Inc, UK)を使いカラムの約 5 倍量の DDW をカラムに通して洗浄した。

次に 0.45 μ M フィルターに通した Binding and wash buffer (0.05 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.4)をカラムの約 5 倍量流してカラム内を平衡化させた。その後、Factor Xa で処理したタンパク質溶液をカラムに流し、再び Binding and wash buffer を流して 1 ml ずつチューブに回収した。回収した溶液はタンパク質の濃度を Bio-Rad protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) を用いて算出した。

SDS-PAGE

泳動用のゲルおよび泳動用バッファーは市販の c-PAGEL 15% (ATTO Corporation, Japan)と EzRun (ATTO Corporation, Japan)をそれぞれ使用した。

タンパク質サンプル 4 μ l に等量の DTT を含む EzApply (ATTO Corporation, Japan)を混合して 5 分間 98°C でインキュベートすることにより、泳動用のサンプルを調製した。8 μ l の泳動用サンプルを AE-7350 コンパクト PAGE (ATTO Corporation, Japan)にセットしたゲルのウェルにアプライして 1 時間 (10.5 mM) 泳動した。その後、ゲルを EzStain Aqua (ATTO Corporation, Japan)の入ったタッパーに移して室温で 3 時間から一晩振とうしながら染色した。十分な染色ができたことを確認した後、DDW に置き換えてバックグラウンドが透明になるまで脱色した。

融合タンパク質濃縮と溶媒の置換

HiTrap Benzamidine FF を用いて回収したタンパク質を、Amicon[®] Ultra- 0.5 ml Centrifugal Filter Unit with Ultracel[®]- 3K もしくは Amicon[®] Ultra-4ml Centrifugal Filter Unit with Ultracel[®]- 3K (Merck Millipore Ltd., Ireland)を用いて濃縮および 30 mM PBS (pH 7.0)に置き換えた。

ビリルビンの調製

ジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide: DMSO) にビリルビンを溶解して濃度が 1mM になるように調製した。ウナギ GFP タンパク質に対して bilirubin を 1 : 4 になるように添加した。

遊離ビリルビンの除去

脱塩・バーファー交換用デスポーザカラムである PD-10 (GE Healthcare, UK)内の保存バッファー を排出した後に PBS を 4 回流してカラム内を平衡化した。ビリルビンとタンパク質を含む溶液をカラムにアプライした。その後、再び PBS を流して 1ml ずつチューブに回収した。

回収した溶液はタンパク質の濃度を Bio-Rad protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) を用いて算出した。蛍光強度を測るために必要に応じて希釈し、それぞれの濃度において測定した。

蛍光強度の測定

遊離ビリルビンを除去した溶液 1 ml を、蛍光測定には日立分光蛍光光度計 F-200(Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan)を用いた。

結果および考察

SDS-PAGE による発現タンパク質の確認

SDS-PAGE の結果 (**Fig. 2-2**)、コールドショック (誘導) 前の培養液には他の大腸菌タンパク質が発現しており目的タンパク質は発現していないが、誘導後は目的のタンパク質が多く発現していることが確認できた。精製後については他の大腸菌タンパク質は除かれ HisTag をもつ発現タンパク質のみが抽出されていた。

インサート DNA のシーケンス解析

pColdTM I DNA に挿入したそれぞれのインサート DNA をシーケンス解析した結果、一部の *Anguilla* 属において GenBank に登録した配列とは演繹アミノ酸配列が異なっていた。*A. anguilla* においては Thr37 → Met, Thr52 → Arg, Leu63 → Phe、*A. australis* においては Gly33 → Ser, Leu63 → Phe, Thr70 → Lys, Phe120 → Val、*A. bicolor b.* においては Ala100 → Val、*A. mossambica* においては Asp13 → Glu, Asp32 → Glu, Arg48 → Gly, Leu63 → Phe, Glu107 → Lys にそれぞれ置き換わっていた (**Fig. 2-3**)。なお、亜種である *A. bicolor b.* および *A. bicolor p.* においては演繹アミノ酸配列が 100% 一致していたため、*A. bicolor* として 1 つにまとめて蛍光強度を測定した。

ゼブラフィッシュ FABP3 およびゼブラフィッシュ FABP7a の演繹アミノ酸配列ともにアライメント解析をしたところ類似性は 46.4% ~ 51.4% を示した。(**Table 2-2**)。系統樹 (**Fig. 2-4**) においては、すべての eel GFP は FABP に大分類され FABP3、FABP7 とクラスターを形成していた。さらに細分すると *A. australis*、*A. mossambica*、*A. anguilla* が同一のクラスターに、*A. japonica*、*A. bicolor b.*、*A. bicolor p.* が同一のクラスターに属しており、2 つのグループに分けられた。

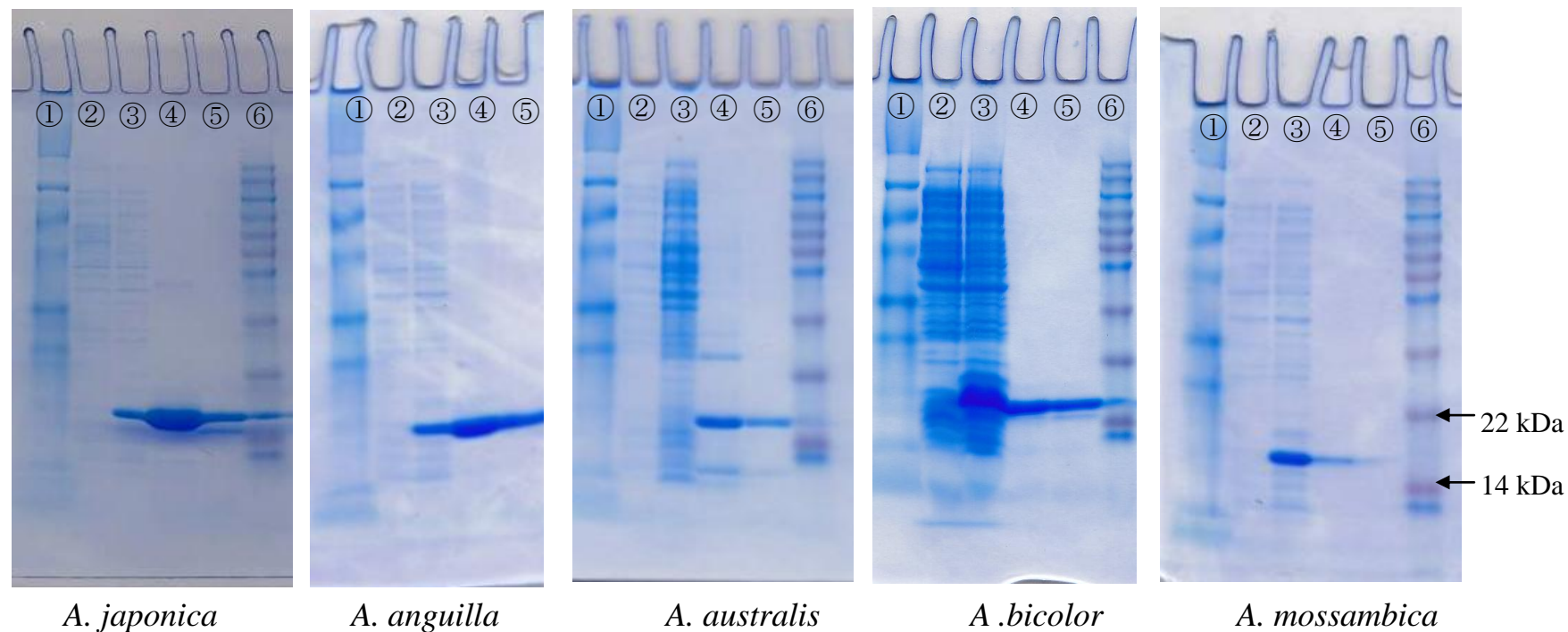


Fig. 2-2 Comparison of SDS-PAGE of the protein samples from each preparation steps. ①, Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range (Marker); ②, Before induction; ③, After induction; ④, Purified protein by TALON Single Step Column; ⑤, After treatment with Factor Xa; ⑥, Pink Plus Prestained Protein Ladder (Maker).

```

A. japonica : MVEKFVGTWKIADSHNFGEYLKAIGAPKELSDGGDATTPPLYISQKDGDK : 50
A. anguilla : .....M..... : 50
A. australis : .....S..... : 50
A. bicolor p. : .....E.....K..... : 50
A. bicolor b. : .....E.....K..... : 50
A. mossambica : .....E.....E..... : 50

          *      *                      *      **
A. japonica : MTVKIENGPPTFLDTQVKFKLGEEFDEFPSDRRKGVKSVVNLVGEKLVYV : 100
A. anguilla : .R.....F.....T..... : 100
A. australis : .....F..... : 100
A. bicolor p. : ..... : 100
A. bicolor b. : ..... : 100
A. mossambica : .....F..... : 100

                      *                      *      *
A. japonica : QKWDGKETTYVREIKDGKLVVTLTMGDVVAVRSYRRATE : 139
A. anguilla : .....L.....F..... : 139
A. australis : .....L.....S..... : 139
A. bicolor p. : .....S..... : 139
A. bicolor b. : .....S..... : 139
A. mossambica : .....L.....S..... : 139

```

Fig. 2-3 Alignment of the deduced amino acid sequences on six eel GFP from pCold I vector analyzed with CLUSTAL W. The identical positions are indicated by dots. The amino acid residues that play an important role in the binding of bilirubin are indicated with asterisks (Kumagai *et al.*, 2013).

Table 2-2 *Anguilla* genus eel GFP and *Anguilla* and *Danio rerio* genera FABP family genes: comparisons of the deduced amino-acid sequences, % identity

	<i>A. japonica</i>	<i>A. anguilla</i>	<i>A. australis</i>	<i>A. bicolor b.</i>	<i>A. bicolor p.</i>	<i>A. mossambica</i>	<i>D. rerio</i> FABP3	<i>D. rerio</i> FABP7a
<i>A. japonica</i>	—	92.1	94.3	96.4	96.4	93.6	49.3	51.4
<i>A. anguilla</i>		—	95.0	91.4	91.4	94.3	46.4	47.9
<i>A. australis</i>			—	95.0	95.0	96.4	50.0	50.0
<i>A. bicolor b.</i>				—	100.0	95.7	51.4	50.7
<i>A. bicolor p.</i>					—	95.7	51.4	50.7
<i>A. mossambica</i>						—	50.0	48.6
<i>D. rerio</i> FABP3							—	61.7

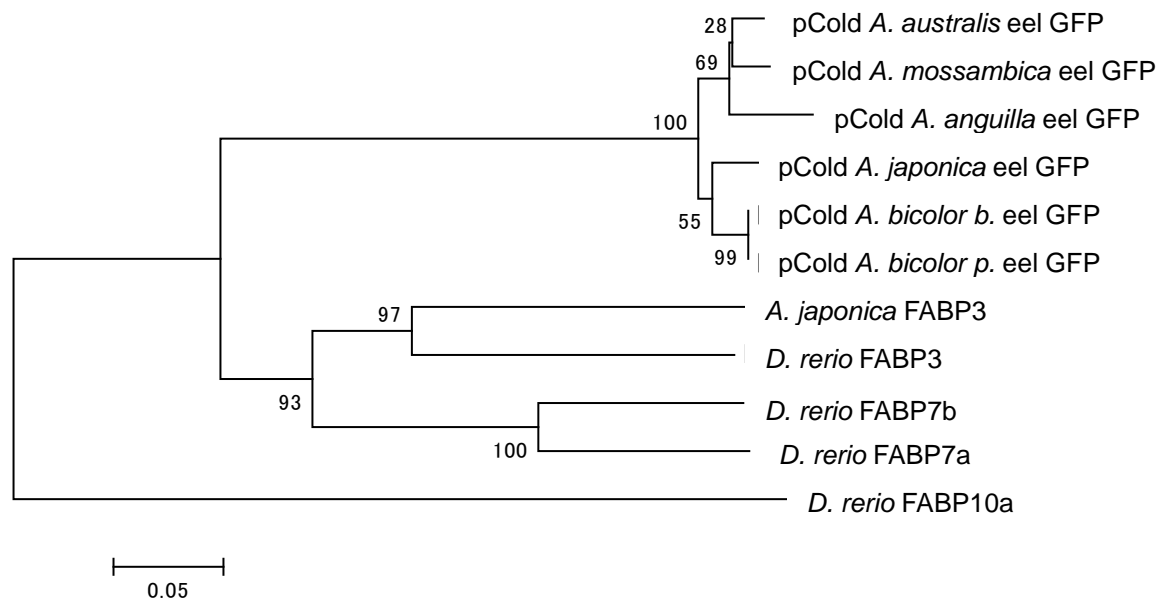


Fig. 2-4 Phylogenetic tree of eel GFPs and eel and zebrafish FABPs constructed by the neighbor-joining method with amino acid sequences. The bootstrap values that are based on the number per 1,000 samplings are indicated in each node. The scale bar under the tree indicates 0.05 amino acid substitutions per site. The amino acid sequences used in this analysis include zebrafish (*Danio rerio*) FABP3 (AAH49060), FABP7a (AAH55621), FABP7b (AAQ92970), and FABP10a (NP694492) and *A. japonica* FABP3 (BAA92355).

蛍光強度の測定

eel GFP 発現タンパク質はビリルビンを加えなければ、蛍光を確認することができなかった。また、FABP のアミノ酸配列と類似性を示したため、FABP が親和性を持つ脂肪酸 (DHA、EPA、 α -トコフェロール、リノレン酸) を添加してみたが、蛍光を確認することはできなかった。

最大励起波長/最大蛍光波長はそれぞれ *A. japonica* で 492 nm/ 527 nm、*A. anguilla* で 490 nm/ 528 nm、*A. australis* で 494 nm/ 529 nm、*A. bicolor* で 495 nm/ 528 nm、*A. mossambica* で 496 nm/ 530 nm で、最大蛍光波長および励起波長の差はウナギの種間において大きく異なることはなかった。

それぞれの濃度段階における強度をプロットして近似曲線 (線形) を求めてタンパク質 1 μ M 辺りの蛍光強度を算出したところ、蛍光波長においては *A. japonica* = *A. bicolor* > *A. mossambica* >> *A. australis* >> *A. anguilla* の順に強く (**Fig. 2-5 A**)、励起波長においても同様に *A. japonica* = *A. pacifica* > *A. mossambica* >> *A. australis* >> *A. anaguilla* の順であった (**Fig. 2-5 B**)。 *A. japonica* と *A. bicolor* は *A. anguilla* の 10 倍の蛍光強度を示した。

5 種類の eel GFP の蛍光強度を分子進化系統の観点から考察した。テーティス海仮説によると、ウナギは今からおよそ 1 億年前の白亜紀、現在のボルネオ島付近の海産魚を起源として生まれ、世界中に広がっていったと推定されている (Aoyama *et al.*, 2001)。Minegishi *et al.* (2005) は、*A. mossambica* が最も原種に近く 200 万年前に Atlantic (*A. anguilla* など)、Oceania (*A. australis* など)、Indo-Pacific (*A. japonica*, *A. bicolor b.*, *A. bicolor p.* など)、地理的に共通の祖先から進化した 3 つの生物群が地理的分布を形成しているとしている。eel GFP の分子進化系統でも **Fig. 2-4** のように、Atlantic 群と Oceania 群は系統的に近く Indo-Pacific 群と進化の過程で分岐しており、これらは前者で蛍光強度が弱く、後者で強い蛍光にあった。

第 1 章でも述べたが、eel GFP は蛍光を発するためにリガンドとしてビリルビンを要求し、ビリルビンが結合する際に 8 カ所のアミノ酸残基 (Asn57, Thr61, Glu77, Ser80, Asp81, Arg112, Arg132, Tyr134) が重要な働きを担うことを報告している (Kumagai *et al.*, 2013)。また、Gruber *et al.* (2015) は、イワアナゴ筋肉の蛍光タンパク質において tripeptide Gly58-Pro59-Pro60 が蛍光発色団であることを報告している。

Indo-Pacific 群の Leu63 と Tyr110 (リガンドの結合部位では Thr61 と Arg112 の近傍) が、Atlantic –Oceania 群では Phe63 と Leu110 に共通して置換されており、これらのアミノ酸配列の違いが蛍光強度に影響していると推察している。

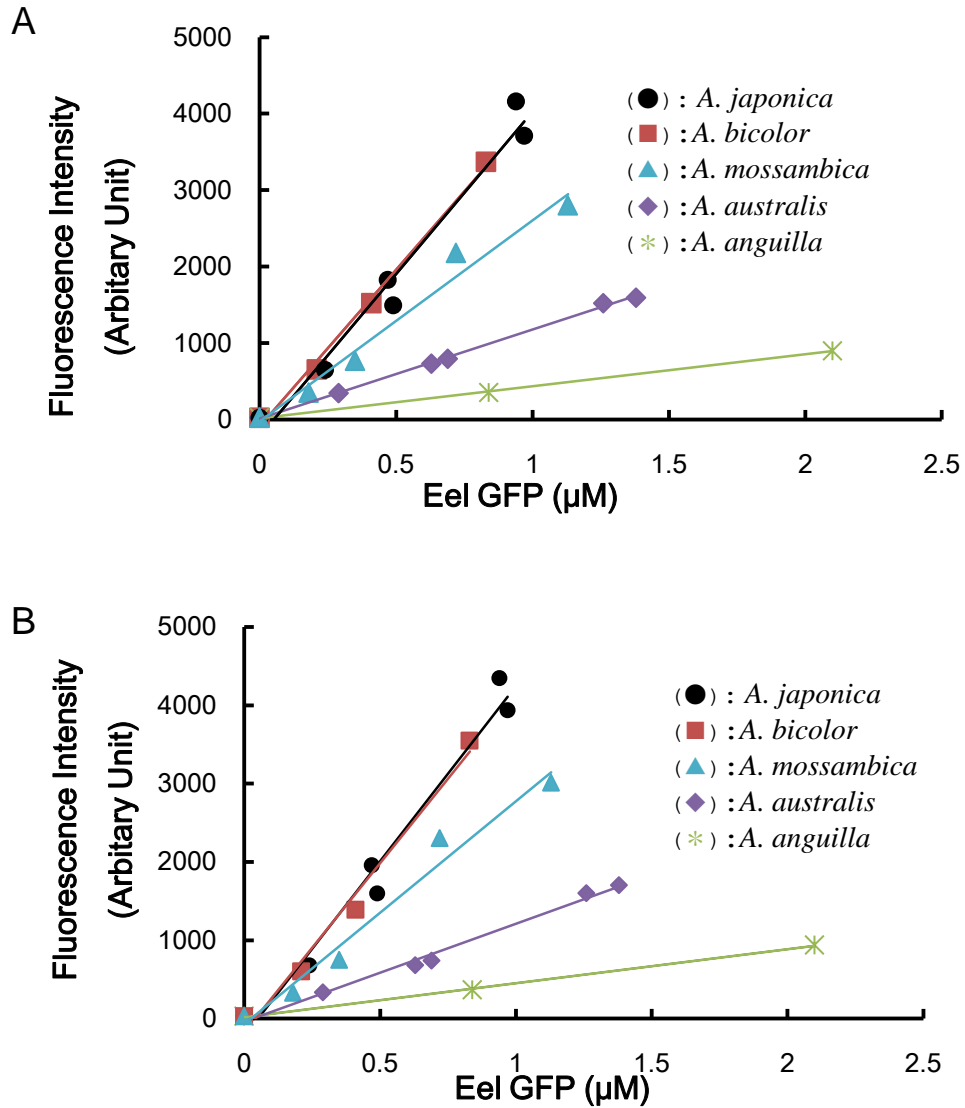


Fig. 2-5 The regression lines between protein concentration and fluorescent intensities (A) and between protein concentration and Excitation spectra (B) on five species eels. Regression lines of fluorescent intensities {*A. japonica* : $y = 4251x - 224.7$, $R^2 = 0.970$; *A. bicolor* : $y = 4101x - 92.9$, $R^2 = 0.995$; *A. mossambica* : $y = 2633x - 27.2$, $R^2 = 0.975$; *A. australis* : $y = 1165x - 10.2$, $R^2 = 0.998$; and *A. anguilla* : $y = 418x - 16.4$, $R^2 = 0.999$ }. Regression lines of excitation spectra {*A. japonica* : $y = 4468x - 226.2$, $R^2 = 0.973$; *A. bicolor* : $y = 4320x - 174.9$, $R^2 = 0.983$; *A. mossambica* : $y = 2845x - 71.2$, $R^2 = 0.974$; *A. australis* : $y = 1250x - 39.0$, $R^2 = 0.991$; and *A. anguilla* : $y = 434.3x - 18.3$, $R^2 = 0.999$ }.

第3章 培養細胞を用いた eel GFP の機能解析

eel GFP のリガンドであると報告されたビリルビン¹はヘムの通常代謝物で、ヘムがヘムオキシナーゼ (heme oxygenase) によりまずビリベルジン (biliverdin) に分解され、さらにビリベルジンがビリベルジン還元酵素により還元されることによりビリルビンが生成される(Maines, 1988) (**Fig. 3-1**)。このビリルビンは水には解けず、血中ではアルブミンに結合して全身循環して最終的に肝臓に運ばれる。肝臓ではグルクロン酸転移酵素 (glucuronyltransferase) により抱合されることで水溶性となり、胆汁より排出される (Ostrow and Schmid, 1963; Zucker *et al.*, 1994; Partra and Pai, 1997)。

血中のビリルビン濃度が上がると様々な疾病を引き起こすことが報告されている。ヒト新生児において循環器系への過剰なビリルビンの蓄積は黄疸を引き起こし、さらに脳血流関門を通過して大脳基質核に沈着して中枢神経障害を引き起こすことが知られている (Dennerly *et al.*, 2001)。

一方で、ビリルビンは抗酸化能を有しており (Stocker *et al.*, 1987)、脂質 (Frei *et al.*, 1988, Hulea *et al.*, 1995)、タンパク質 (Neuzil *et al.*, 1993; Minetti *et al.*, 1998)、細胞 (Sedlak *et al.*, 2009)などを酸化から守っている。ビリルビンはペルオキシラジカル $\text{LOO}\cdot$ 、ヒドロキシラジカル $\text{HO}\cdot$ 、スーパーオキシドアニオン $\text{O}_2^-\cdot$ などの活性酸素種を消去する能力を有しており、自身は容易に酸化され再びビリルベジン戻るかあるいは propentdyopents や methylvinylmaleimid になる性質をもっている (Inoue, 2001)。また、ビリルビン単体で機能するよりもアルブミンと結合したビリルビン・アルブミン結合体として機能する方が抗酸化能が強いことが知られている (Wu *et al.*, 1991; Kapitulnik, 2004)。

そこでビリルビンに高い親和性を持ち結合する eel GFP の生理学的機能を解析するために、まず eel GFP を安定に強制発現させた培養細胞を作製して培養方法を探索した。細胞増殖速度実験および酸化ストレス感受性試験の2つを用いて eel GFP-ビリルビン複合体の形成が細胞の酸化ストレス耐性に及ぼす影響を検討した。

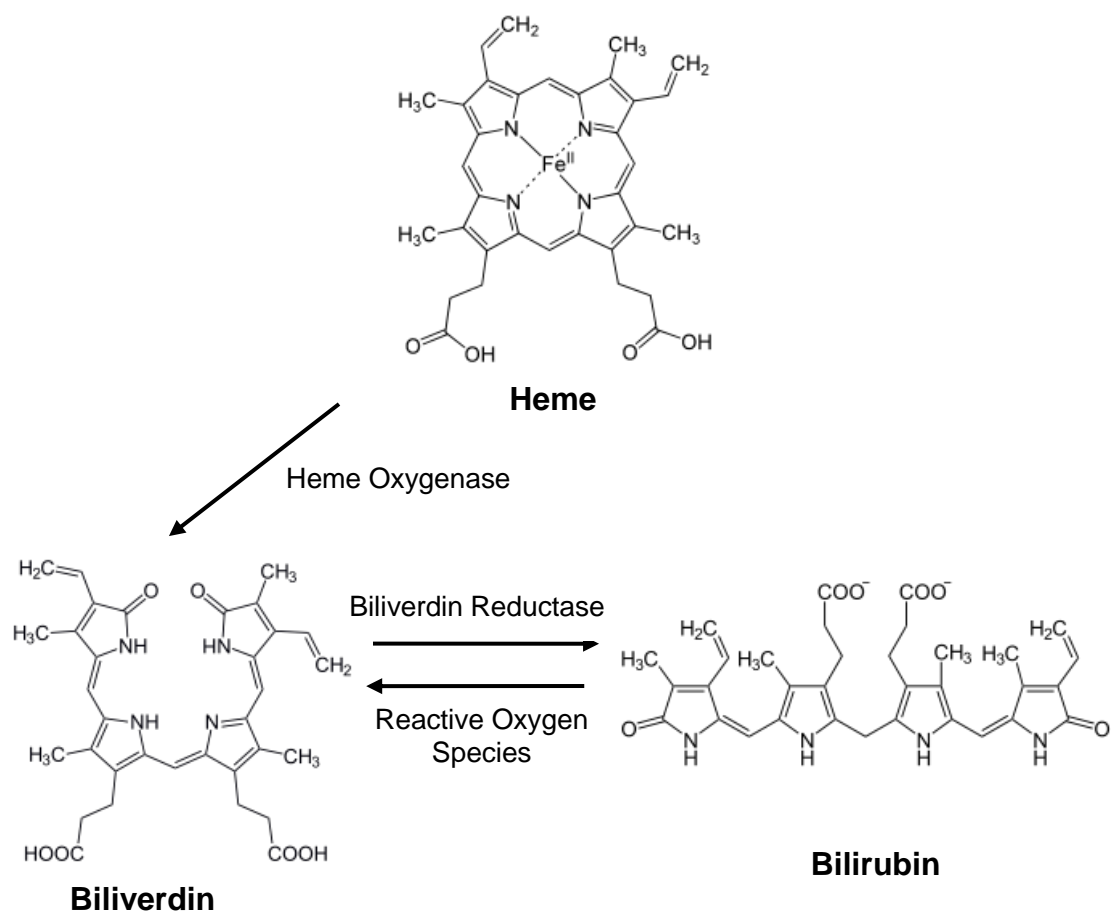


Fig. 3-1 Metabolism of heme into biliverdin and further reaction to bilirubin by heme oxygenase and biliverdin reductase.

実験試料および方法

eel GFP の安定発現株の作製

eel GFP の機能解析を行うにあたり、ヒト胎児腎臓由来株化培養細胞株 HEK293 に *A. japonica* eel GFP 遺伝子をトランスフェクトして安定的に強制発現させた HEK293-eel GFP 細胞を作製した。

翻訳領域 417 bp を増幅するように 5' 末端側に制限酵素処理サイト *Xho*I (下線) をそれぞれに付加した F primer {5'-AAAACTCGAGACCATGGTCGAGAAATTTGT T-3'} および R primer {5'-AAAACTCGAGTCATTCCGTCGCCCTCCG-3'} を設計した。*A. japonica* cDNA を鋳型に上記のプライマーを用いて PCR 反応を行った。電気泳動で目的産物が増幅されたかを確認した後に pBlueScript II SK (+) (MBI Fermentas, USA) を用いてクローニングし、シーケンス解析を行った。

上記で得られた組換え pBlueScript II SK (+) ベクターおよび哺乳類細胞発現用ベクター pcDNA3.1TM(+) (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA USA) を制限酵素 *Xho*I で処理した後、インサート DNA を pcDNA3.1(+) に挿入して pcDNA3.1(+)-eel GFP を作製した。このベクターを HEK293 細胞にトランスフェクトした。その後、400 µg/ml 抗生物質 G418 でセクションをかけ、安定的に強制発現させた HEK293-eel GFP 細胞をクローニングした。また、コントロールとして HEK293 細胞にインサート DNA を含まない空の pcDNA3.1(+) ベクターをトランスフェクトした HEK293-CV とオウソクラゲ由来の pEGFP-C2 ベクター (Clontech, Mountain View, CA USA) をトランスフェクトした HEK293-jf GFP を作製した。

細胞培養

3 種類の HEK293-eelGFP、HEK293-jf GFP、および HEK293-CV 細胞は 10% ウシ胎児血清 (Fetal calf serum: FCS)、100 units/ml ペニシリン(penicillin)、100 µg/ml ストレプトマイシン (streptomycin)、および 400 µg/ml G418 を含有するイーグル最小必須培地 (Eagle's Minimal Essential Medium: E-MEM) に飽和湿潤、5% CO₂、37°C の条件下で 3 ~ 5 日間隔で継代操作を行いながら培養した。

蛍光顕微鏡を用いた HEK293-eel GFP 細胞の緑色蛍光の観察

正立顕微鏡 Axio ImagerZ1 のセクショニング蛍光顕微鏡システム ApoTome (ZEISS, Germany) を用いて細胞の観察を行った。

低濃度 FCS 条件下での増殖活性および蛍光強度と発現率の測定

蛍光を発現していない HEK293-eel GFP 細胞を得るために、HEK293 の培養環境中のビリルビン濃度が低い条件での培養方法を検討した。

HEK293 細胞の培養環境中に含まれるウシ胎児血清アルブミンには eel GFP のリガンドであるビリルビンが結合した状態であるため、HEK293-eel GFP 細胞の培養環境中のビリルビン濃度を低くするためにまずは FCS 低濃度下で細胞の増殖活性を測定した。100 units/ml ペニシリンおよび 100 µg/ml ペニシリンーストレプトマイシン (P/S)を含む FCS 濃度を 10%に調整した E-MEM を用いて HEK293-eel GFP 細胞を 6-well plate に 4.8×10^4 cells (volume 2 ml/well) となるように各 well に播種した。その後、24 時間 CO₂ インキュベーターで培養した後、FCS 濃度 0、1、2、5、10% に調整した培地に交換して 24 時間毎に細胞の状態を観察し、最大何日間の培養が可能であるか検討を行った。

さらに、低濃度 FCS 条件下における eel GFP の蛍光強度および発現率への影響を検討した。増殖活性の結果をもとにして FCS 濃度を 10%に調整した培地で 48 時間インキュベートした。培地交換前の培養時間を 48 時間としたのは HEK293-eel GFP 細胞を十分に足場に接着させるためである。インキュベート後、FCS 0、1、2、10% の培地に交換して 5 日間培養後、Tali[®]イメージサイトメーター (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) を用いて蛍光強度および発現率の測定を行った。

HEK293-eel GFP 細胞の機能解析

eel GFP のリガンドであると同定されたビリルビンの抗酸化能に着目し、eel GFP-ビリルビン複合体の形成が細胞の酸化ストレス耐性へ及ぼす影響を解析するために、a) 細胞増殖速度実験と b) 酸化ストレス感受性試験 を行った。

a) 細胞増殖速度の測定

HEK293-eel GFP、HEK293-jf GFP、および HEK293-CV 細胞をそれぞれ 2.0×10^5 cell/well (3ml/well) になるように 12-well プレートに播種し、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM) に 10% FCS、100 units/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin、6.0 ml L-グルタミン(glutamine) を有する phenol red 含有培地 (D-MEM-10% FCS phenol red (+))あるいは phenol red 非含有培地 (D-MEM-10% FCS phenol red (-)) を用いて培養を行った。

Phenol red は pH 6.6 以下の酸性で黄色、pH 8.0 以上の塩基性で赤紫色に変化する。この pH によって色が変わる性質を活かして pH 指示薬として広く利用されており、細胞培養液に含まれることも多い。また、フェノール基を有するために抗酸化能をもつことが知られている (Rice-Evans *et al.*, 1996; Foti, 2007)。このため phenol red の抗酸化能を考慮して phenol red 含有培地と非含有培地を用いて細胞増殖速度の違いを解析した。

b) 過酸化水素 H_2O_2 を用いた酸化ストレス感受性試験

酸化ストレスの誘導剤として H_2O_2 を使用して、感受性試験を MTT assay を用いて行った。

30% H_2O_2 を RO 水で希釈して 8 段階 (終濃度 0、2、5、10、20、50、100、200 μ M) の H_2O_2 溶液を調製した。HEK293-eel GFP 細胞を 1.3×10^4 cells/well、HEK293-CV 細胞と HEK293-jf GFP 細胞は 1.0×10^4 cells /well (Volume 180 μ l/well) となるようにそれぞれ 96-well plate に播種し、D-MEM-10% FCS phenol red (-) 培地にて 37°C、5% CO_2 濃度条件下で 48 時間培養した。その後、8 段階の濃度の H_2O_2 にそれぞれ曝露し、37°C、5% CO_2 濃度条件下で 3 日間培養した。生存細胞数を決定するために 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay

(Carmichael, 1987)を用いた。培養細胞に MTT 溶液を添加して 3 時間インキュベートした後に 570 nm における吸光度を測定した。細胞生存率は H_2O_2 を含まない状態における細胞数に対する各 H_2O_2 濃度における細胞数の割合から算出し、 H_2O_2 に対する細胞感受性を評価した。IC₅₀ 値は対照培地で細胞数を 50% に減少させた H_2O_2 濃度として測定した。

筋細胞の単離と蛍光観察

A. japonica からコラゲナーゼ除去法 (Rosenblatt *et al.*, 1995; Alam *et al.*, 2004; Hayashi and Toda, 2009) を用いて筋細胞を単離した。単離した筋細胞は 3ml D-MEM を含む 6-well plate に播種し、飽和湿潤、28°C、5% CO₂ 濃度条件下で培養した。培養した筋細胞は蛍光顕微鏡 (MZ10F, Leica, Wetzlar, Germany)を用いて蛍光観察した。

H_2O_2 の活性酸素種(ROS)への変換

2- [6-(4'-amino)phenoxy-3*H*-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid (aminophenyl fluorescein : APF) は中性水溶液中では蛍光を発しないが、選択的にヒドロキシラジカル $\cdot\text{OH}$ のような強い活性を持つ活性酸素種 (highly reactive oxygen species: hROS) と反応すると (H_2O_2 とは反応しない) 緑色蛍光化合物であるフルオレセイン fluorescein が生成され蛍光を発する (Setsukinai *et al.*, 2003)。

HEK293-eel GFP および HEK293- jf GFP 細胞はすでに緑色の傾向を発しているため、HEK293-CV 細胞内の H_2O_2 からフェントン反応によって変換された hROS の一種であるヒドロキシラジカル $\cdot\text{OH}$ の検出を試みた。

HEK293-CV 細胞を 1.2×10^4 cells/well になるように 96-wll プレートに播種して 24 時間培養した。その後 CO₂ インキュベーター内で細胞を 200 μM H_2O_2 に 4 時間曝露し、hROS を特異的に検出する APF を添加してさらに 24 時間培養した。生成されたフルオレセインの緑色蛍光は EVOS Fluid imaging station (ThermoFisher Scientific Inc., MA USA)を用いて観察した。

結果および考察

安定発現株の作製

eel GFP の安定発現株である HEK293-eel GFP 細胞を正立顕微鏡 Axio ImagerZ1 とセクショニング蛍光顕微鏡システム ApoTome (ZEISS, Germany)を用いて細胞の観察を行ったところ、蛍光を発現していることが確認できた (**Fig. 3-2**)。また、細胞によって蛍光強度にばらつきがあることが確認できた。

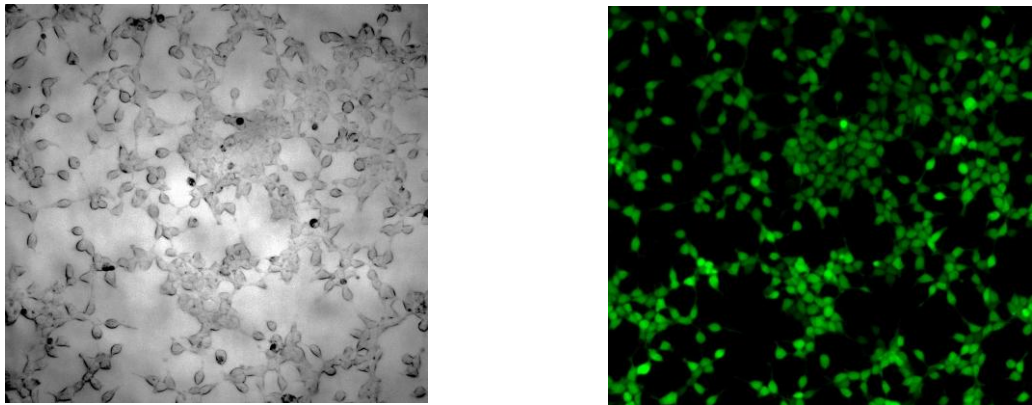


Fig. 3-2 Stable cell line, HEK293-eel GFP cells. Bright field image and fluorescence image.

低濃度 FCS 条件下での増殖活性の観察

0、1、2、5、10%の低濃度 FCS 条件下において培地交換後 24、120、および 240 時間時点での細胞形態および増殖活性を観察した (**Fig. 3-3**)。培地交換後、120 時間時点では FCS 濃度による変化が顕著にみられるようになり、FCS 濃度が 0%、1% では足場に接着している細胞数が大きく減少していた。培地交換後 240 時間では FCS 濃度 0%、1%の細胞はほとんど足場から離れ浮いていた。また、2% FCS 培地でも接着していた細胞の減少が確認された。この結果より、0~10%の低濃度 FCS 条件下では HEK293-eel GFP 細胞は 5 日程度培養が可能であることが示唆された。

eel GFP 緑色蛍光の FCS 濃度依存的発現と細胞生残率

低濃度 FCS 条件下での増殖活性の結果をもとに、FCS 濃度 0%、1%、2%、10% を含む E-MEM 培地に HEK293-eelGFP 細胞を 120 時間培養したものを用いて緑色蛍光発現率および生残細胞数を測定した (**Fig. 3-4**)。なお FCS 内に含まれるアルブミンには eel GFP のリガンドであるビリルビンが結合している。このため eel GFP-ビリルビン複合体の形成は緑色蛍光の検出により確認することができる。蛍光発現率は Tali[®]イメージサイトメーターによって測定した。蛍光発現率は FCS 濃度 2% まで生存細胞の増加とともに FCS 濃度依存的な様式で増加して行き、FCS 濃度 2%~10%の条件下では蛍光の発現率は約 80%に達しと差異は見られなくなった。このため通常の培養条件と同じ FCS 濃度 10%を細胞増殖と蛍光発現の観点から培養に利用した。

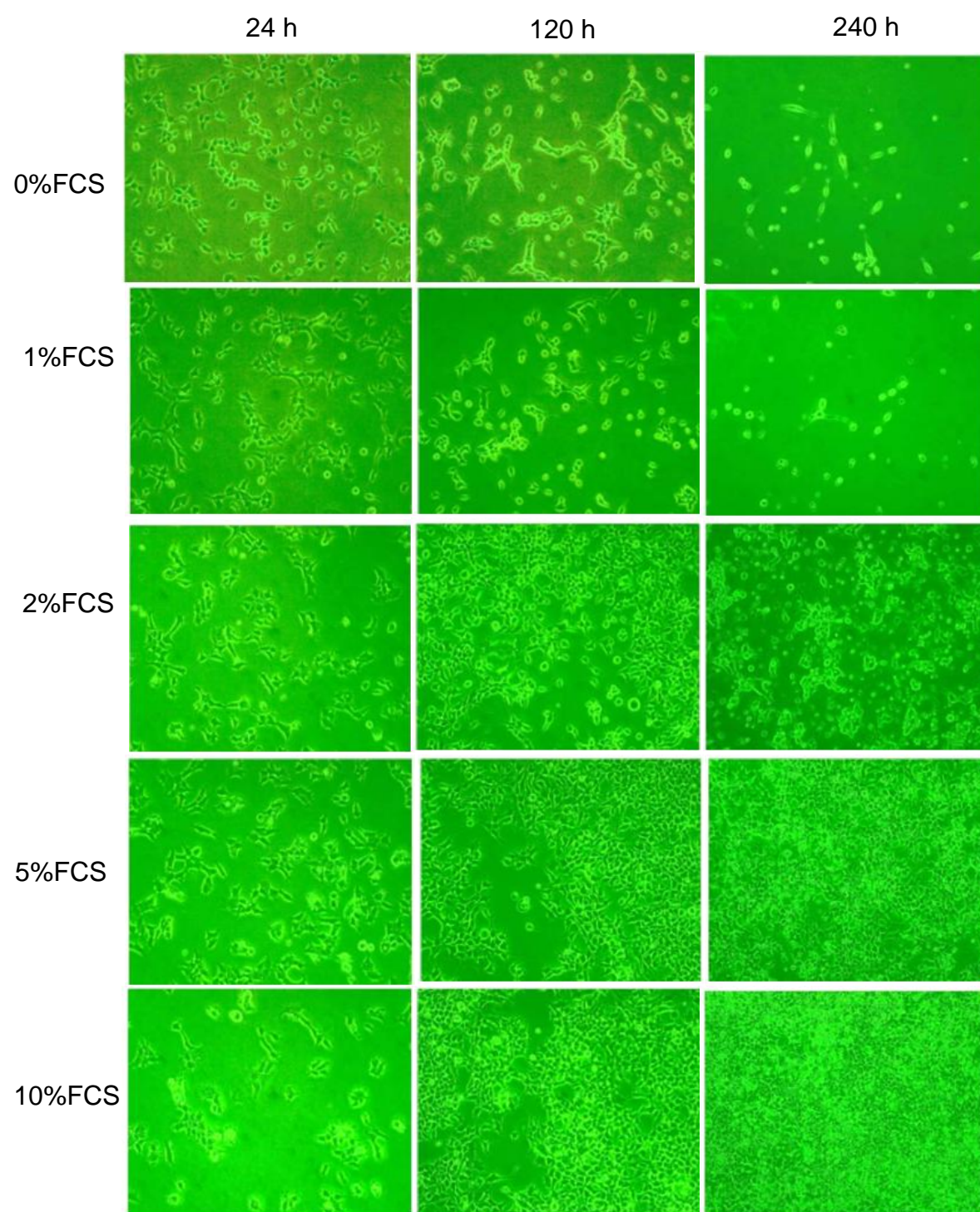


Fig. 3-3 Morphology and proliferation of HEK293 cell transfected with eel GFP (HEK293-eel GFP cell). HEK293-eel GFP cells were cultured in E-MEM with 0, 1, 2, 5, and 10 % FCS, respectively, for 1day, 5day, and 10day.

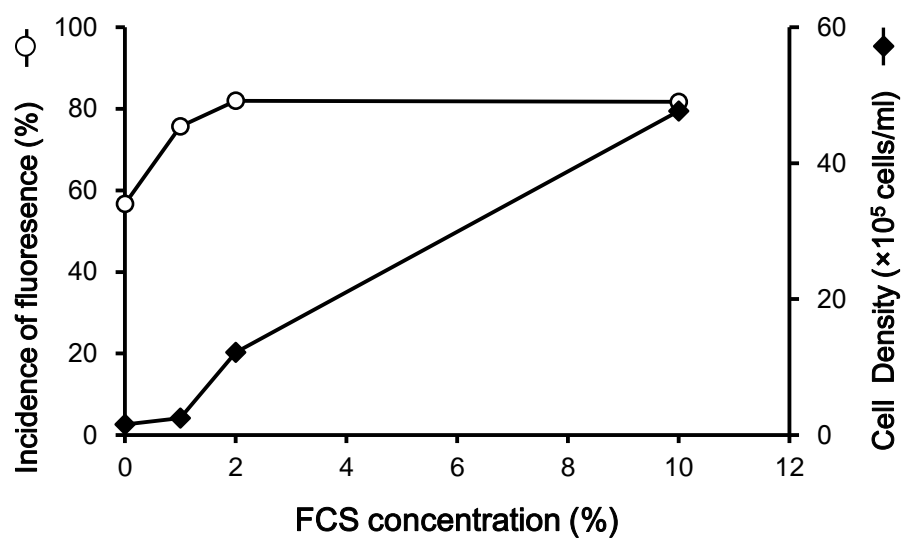


Fig. 3-4 The Relationship between cell density and fluorescent expression rate in HEK293-eel GFP cells depend on the FCS concentrations. The FCS concentration (0, 1, 2, 10%)-dependent green fluorescence expression was measured using Tali Image Cytometer after the cell culture for 120 h.

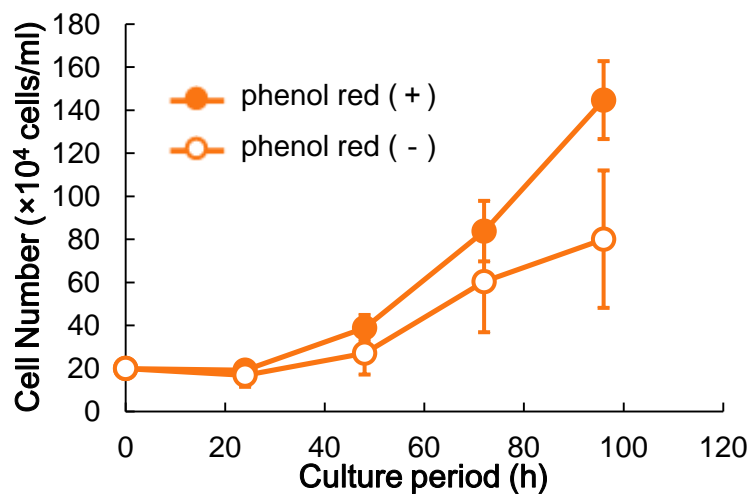
eel GFP 発現が細胞増殖速度へ及ぼす影響

HEK293-CV、HEK293-jf GFP、および HEK293-eel GFP 細胞を用いて抗酸化能を有する phenol red がそれぞれの細胞増殖速度へ及ぼす影響を評価した。

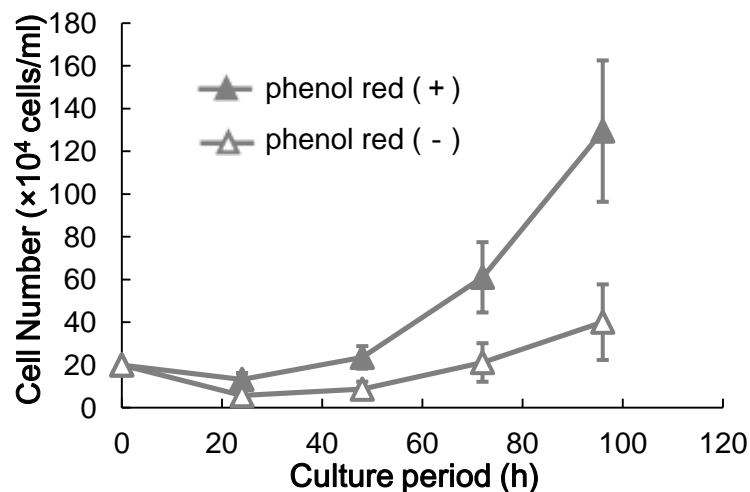
培養時間 96 時間において phenol red 非含有培地の HEK293-jf GFP および HEK293-CV 細胞の生残率は phenol red 含有培地に比べて 52% と 31% まで減少した (Fig. 3-5)。これは、抗酸化能を有する phenol red を含む培地と含まない培地とでは培地中の抗酸化能に違いがあり、phenol red 非含有培地では培地自体の抗酸化能が低く、細胞が酸化ストレスを受けやすくなったためだと考えられる。

一方で phenol red 非含有培地の HEK293-eel GFP 細胞の生残率は phenol red 含有培地に比べて約 70% までの低下に停まり、上記のコントロール細胞と比べ生残率の差が緩和されていた。eel GFP-ビリルビンの複合体の指標である蛍光発現は HEK293-eel GFP 細胞において phenol red 含有および非含有培地の両方で観察された。このことから抗酸化能をもつビリルビンと高い親和性を持ち結合する eel GFP を発現する細胞は培地中の FBS に由来するビリルビンの抗酸化能によって phenol red 非含有培地でも比較的細胞が酸化ストレスを受けにくくなっており、HEK293-jf GFP および HEK293-CV 細胞と比較して酸化ストレス耐性があることが示された。

A HEK293-CV



B HEK293-jf GFP



C HEK293-eel GFP

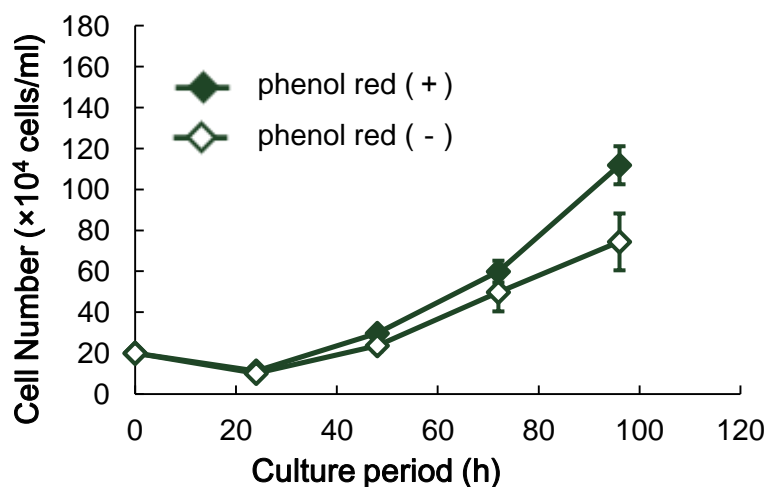


Fig. 3-5 Comparisons of cell growth rates of HEK293-CV (A), HEK293-jf GFP (B), and HEK293-eel GFP (C) cells. Cells were cultured in D-MEM-10% FCS with or without phenol-red, and the cell densities were counted at 0, 1, 2, 3, and 4 days. The data represent the mean values \pm SD of three independent experiments each performed in triplicate.

酸化ストレスに対する細胞の抵抗性

3 種の HEK293-eel GFP、HEK293-jf GFP、および HEK293-CV 細胞すべてにおいて H_2O_2 曝露濃度が上昇するにつれて生存率の低下が確認された (**Fig. 3-6**)。HEK293-jf GFP および HEK293-CV 細胞では曝露濃度 $20\ \mu\text{M}$ を超えた付近からともに生存率が大きく低下し始め、半数致死濃度 (half maximal (50%) inhibitory concentration : IC_{50}) (**Table 3-1**) は $66.6\ \mu\text{M}$ 、 $66.4\ \mu\text{M}$ を示した。これに対して HEK293-eel GFP 細胞は曝露濃度 $50\ \mu\text{M}$ までは生存率に大きな変化は見られず、 IC_{50} の値は約 $134\ \mu\text{M}$ となり、HEK293-jf GFP と HEK293-CV 細胞の約 2 倍の値を示した。また、 H_2O_2 曝露濃度 $200\ \mu\text{M}$ では HEK293-GFP 細胞および HEK293-CV 細胞の生存率は 0% であるの対して HEK293-eel GFP 細胞の生存率は約 13% であった。この結果より、HEK293-eel GFP 細胞は他の 2 細胞 HEK293-jf GFP と HEK293-CV に比べて酸化ストレス誘導剤である H_2O_2 への感受性が低く、酸化ストレスに耐性があることが示唆された。これは、ビリルビンと eel GFP が複合体を形成することでビリルビンの抗酸化能が働き、細胞の酸化ストレスを軽減しているためではないかと示唆された。

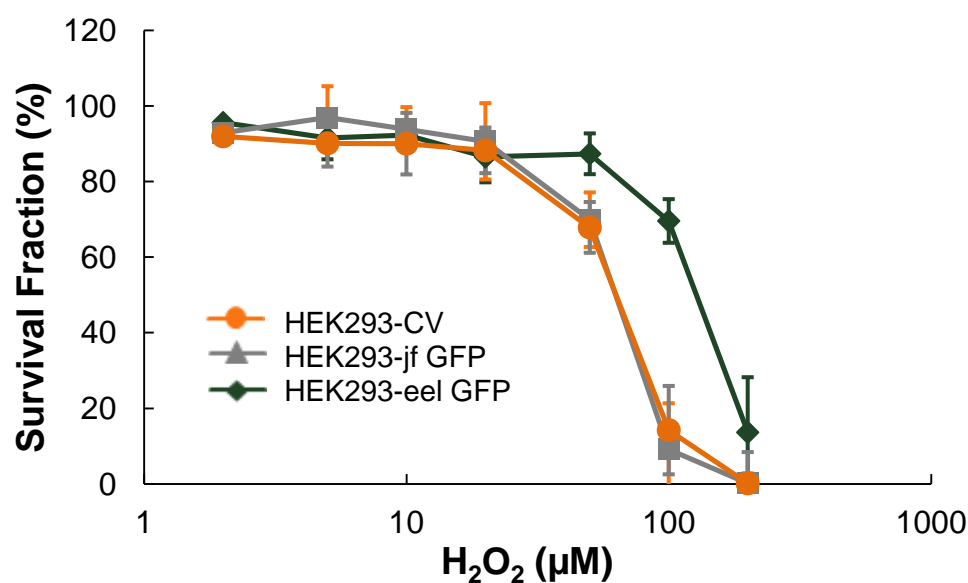


Fig. 3-6 Effect of H₂O₂ on the sensitivity of HEK293-CV, HEK293-jf GFP and HEK293-eel GFP cells. Cells were cultured in D-MEM-10% FCS without phenol red for 48 h, and then added the final concentrations of 0, 2, 5, 10, 20, 50, 100, and 200 μM of H₂O₂. After incubation for 72 h, cell viability was measured by MTT assay. The data represent the mean values ± SD of three independent experiments each performed in triplicate.

Table 3-1 Sensitivity of HEK293-CV, HEK293-jf GFP, and HEK293-eel GFP cells to the H₂O₂ exposure.

	IC ₅₀ (μM)
HEK293-CV	66.4±3.7
HEK293-jf GFP	66.7±5.1
HEK293-eel GFP	134.4±9.1*

The data represent the mean values ± SD of each cell performed in triplicate; *p < 0.05, as compared with control by Mann-Whitney U test.

eel GFP の蛍光発現と蛍光強度の細胞ごとの不均一性

精製した *A. japonica* の筋細胞を蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、細胞により蛍光発現の有無および蛍光強度の差が確認できた (**Fig. 3-7-a**)。また、HEK293-eel GFP 細胞を 200 μ M H_2O_2 に 24 時間曝露した際においても蛍光強度の低下や消失などの細胞間毎の不均一性が確認できた (**Fig. 3-7-b**)。

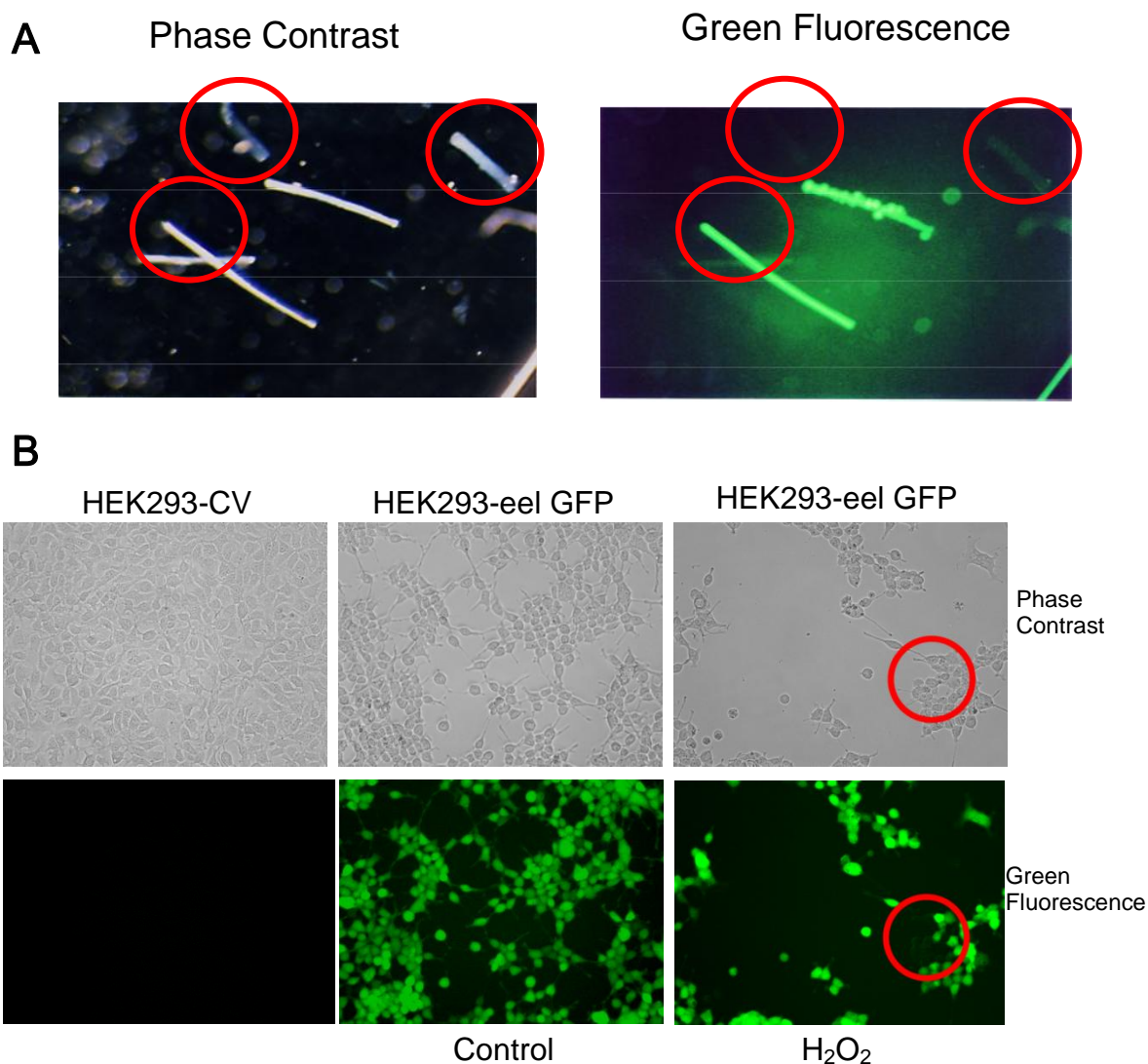


Fig. 3-7 Detection of heterogeneous green fluorescence in the eel skeletal muscle (A) and HEK293-eel GFP cells (B). Inside of the red colored circles indicated the cells with weak or non-intensity of green fluorescence.

酸化力をもつ活性酸素種 (hROS) の検出

HEK293-CV 細胞を 200 μM H_2O_2 に 28 時間曝露した後、高い酸化力を持つ活性酸素種 (hROS) の $\text{OH}\cdot$ の検出を蛍光プローブ APF を用いて試みた。 H_2O_2 は HEK293-CV 細胞においてフェントン反応によってヒドロキシルラジカル $\text{OH}\cdot$ に変化されることが示された (**Fig. 3-8**)。ビリルビン は H_2O_2 を消去する能力は有していないが、 $\text{OH}\cdot$ を消去する能力は有している。これらのことより、eel GFP-ビリルビンの複合体が $\text{OH}\cdot$ を除去する能力を保有していることが示唆された。

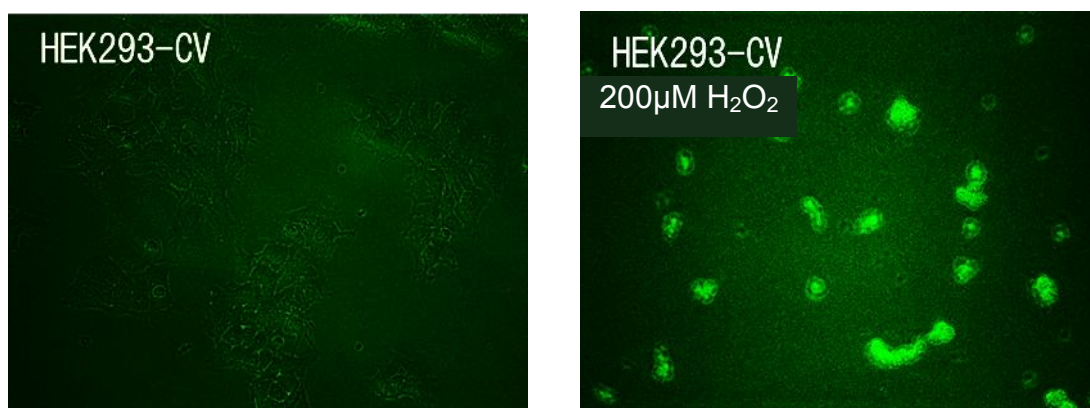


Fig. 6-7 Detection of hROS after exposure to H_2O_2 . Non-fluorescent HEK293-CV cells were treated with 200 μM H_2O_2 for totally 28 h, and the hROS was detected by APF.

総 括

今回入手できた6種のウナギ属 *A. japonica*, *A. anguilla*, *A. australis*, *A. bicolor b.*, *A. bicolor p.*, および *A. mossambica* を試料として、第1章では蛍光観察、eel GFP 遺伝子のクローニング、eel GFP 遺伝子の構造解析を、第2章では eel GFP 組換え遺伝子によるタンパク質の生産と蛍光タンパク質の特性解析、第3章では eel GFP の生物学的な機能解析について検討した。

第1章では、eel GFP の観察では、6種すべてにおいて筋肉のみで緑色蛍光が観察され、肝臓や腸などの他の組織では確認することができなかった。また、ウナギ筋肉の凍結切片での横断面の観察では部位によって蛍光の強弱の偏りが検出され、皮側よりも脊椎周りの方で蛍光が強い傾向にあった。蛍光の局在化あるいはシラスウナギの蛍光強度と eel GFP 遺伝子の転写発現量との間には関連性があり、eel GFP の転写には何らかの抑制や活性化に関与する因子が存在することが示唆された。そこで、*A. japonica* の eel GFP 5' 上流に存在する転写調節に関わる DNA 配列 *cis-element* を検索したところ、ARE 配列に1塩基だけが異なる類似配列 ARE like motif (5'-GTGAGTGTGC-3')が-1,681 bp 上に存在していた。この ARE 配列には、転写制御因子 (NF-E2 p45-related factor 2 : Nrf2) が直接結合することで応答遺伝子の転写活性が起こり、酸化損傷に対する保護機構に寄与することが報告されている (Wang *et al*, 2007; Vomhof-DeKrey and Picklo, 2012)。eel GFP の転写調節因子については、さらに検討する必要がある。

eel GFP cDNA のクローニングにより、全長の cDNA は 631 ~ 644 bp、演繹アミノ酸 139 残基で 93.6 ~ 99.3% と高度に保存されていた。eel GFP のアミノ酸配列は FABP ファミリーのアミノ酸配列と高い類似性を示した。エクソン-イントロン構造では、翻訳領域は 1st エクソンから始まり 4th エクソンで終わり、特に、多くの FABP ファミリーとエクソン数やサイズでほぼ保存されていた。FABP は脂肪酸などの疎水性リガンドに結合する細胞内脂質結合タンパク質のスーパーファミリーに属しており (Hertzel and Bernlohr, 2000; Schaap *et al.*, 2002)、主に脂質を細胞内の様々な区画 (小胞体、ミトコンドリア、細胞質ゾル、および核など) へ輸送する機

能を有している (Furuhashi and Hotamisligil, 2008)。Eel GFP は FABP ファミリーの中でも特に脊椎動物の FABP7 (brain- type) のアミノ酸配列と最も高い類似性を示し、類似性は約 50% であった。残基数を見てみると脊椎動物の FABP7 は 132 残基 (Lai *et al.*, 2012) と eel GFP の 139 残基に比べてやや少なかった。FABP ファミリーメンバーのアミノ酸の類似性は 20-70% の間で保存され、126-134 残基のアミノ酸からなる 14-15 kDa の低分子のタンパク質であることが報告されている (Zimmerman and Veerkamp, 2002; Esteves and Ehrlich, 2006; Smathers and Petersen, 2011)。ゼブラフィッシュおよびタイセイヨウサケの FABP7 においては、脳、腸、ならびに肝臓などの多種多様な組織において発現していることが報告されている (Liu *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2012)。一方で、マウスとヒトにおいては脳においてのみ FABP7 の発現が確認されている (Kurtz *et al.*, 1994; Shimizu *et al.*, 1997)。eel GFP は筋肉のみにおいてのみ発現がみられ、FABP ファミリーと同一祖先から分化していき、進化の過程で蛍光を発する異なる機能や組織特異的な発現を獲得したと推察された。

第 2 章では、6 種のウナギ属を pCold I ベクターを用いて eel GFP のタンパク質を発現させ、その励起波長および蛍光波長を調べた。pCold I により発現させたタンパク質のアミノ酸配列は RACE 法で求めた塩基配列と一部異なっていた。塩基配列が異なっていたのかは現在のところ不明ではあるが、以下のような原因が考えられる。PCR 反応においては Ex Taq ポリメラーゼを用いたために複製ミスが起こった可能性があり、Ex Taq より複製ミスの少ないポリメラーゼを使用したら複製ミスを押さえられるかもしれない。また、RACE 法においては複数の増幅産物が得られ、なおかつ少量の増幅産物しか得られなかったために、3' RACE においては Nested PCR を行っている。このように繰り返し PCR を行ったことにより複製ミスが起こった可能性も考えられる。

最大励起波長は 490 ~ 496 nm 最大蛍光波長は 527 ~ 530 nm であり、6 種のウナギ属間では大きな差は検出されなかった。今回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、Kumagai *et al.* (2013) が報告したリガンド結合部位のアミノ酸配列の 8 カ所はすべてにおいて保存されていた。一方で FABP3 および FABP7 では Asn57→Ser、Ser80→Ala になっており、この置換がリガンドの選別に重要な機能を

果たしていると推察された。さらに Gruber *et al.* (2015) は、イワアナゴ属 2 種からビリルビン結合型の GFP の存在を報告し、発色団と推測する Gly58-Pro59-Pro60 のトリペプチド配列も 6 種のウナギ属においても保存させていた。

組み換え DNA による eel GFP での蛍光強度は、*A. japonica* = *A. bicolor* > *A. mossambica* >> *A. australis* >> *A. anguilla* の順に強く、*A. japonica* と *A. bicolor* は *A. anguilla* の 10 倍の蛍光強度を示した。これらの蛍光強度を分子進化系統樹の観点から比較検討した。*A. mossambica* は最初に分岐した基底の種であり、他の種は *A. anguilla* を含む 2 種からなる Atlantic 群と、*A. australis* を含む 3 種からなる Oceania 群、さらに *A. japonica*、*A. pacifica b.*、*A. pacifica p.*を含む 11 種からなる Indo-Pacific 群の 3 つの地理的なクレード(分岐群)を形成していることが報告されている (Minegishi *et al.*, 2005)。今回の pCold でクローニングした eel GFP の系統解析でも Indo-Pacifica に属するグループと Atlantic と Oceania に属するグループで分岐群を形成し、前者で高い蛍光強度が認められた。6 種のウナギ属の アミノ酸配列を比較してみると、*A. anguilla* および *A. australis* において Thr61 の近くに存在する Leu63 が Phe63 に および Arg112 の近くに存在する Tyr110 が Leu110 とそれぞれ異なっており、この 2 つのアミノ酸が蛍光強度に関与することが示唆された。

Sparks *et al.* (2014) により、16 目 50 科 105 属の 180 種以上の魚類より蛍光が検出されたことが報告された。しかしながら、現在のところウナギ属とイワアナゴ属のみで蛍光タンパク質の全塩基配列が明らかになっている。そこでウナギの近縁種だけが、なぜ、筋肉中にビリルビン結合型の GFP を有するのか、生態学的あるいは生理学的に検討した。ウナギ属に最も近である魚類は外洋の中深海水層(200-1000m)に分布する *Nemichthyidae* (シギウナギ科) と *Serrivomeridae* (ノコバウナギ科) であることが報告されている (Inoue *et al.*, 2010)。ウナギ属は降河性生活史を持つ。すなわち、未成熟のウナギ (yellow eel)は淡水域に生息する、成熟した雌ウナギ (silver eel) は産卵のために河川を下って外洋に移動し、そこで産卵をする。孵化したレプトケファルス幼生は受動輸送により沿岸域に運ばれ、シラスウナギに変態した後に淡水に入り成長する (Tsukamoto, 1992; Tsukamoto *et al.*, 2002)。また、Tsukamoto *et al.* (2011) により、*A. japonica* の産卵場が西マリアナ海溝のスルガ海山周辺の深度 150-200 m のより浅層域であることが推定されている。澄んだ外洋域

において日光を構成しているスペクトルは、深度 100m 付近では 470- 480nm の近単色帯の青光の波長が最も外洋において透過しやすい。

生物が光を放出する現象に GFP のような蛍光とルシフェラーゼのような生物発光がある (Hastings and Wilson, 1976; McCapra and Hart, 1980)。生物発光はカウンスターイルミネーション、捕食者への防衛および警告、仲間の認識や誘引、獲物捕獲などの海洋生物に多くの機能を提供している (Haddock *et al.*, 2010)。eel GFP がビリルビンと結合して蛍光を発することで、視覚への役割は現在のところ不明である。ウナギの網膜の最大吸収波長を測定したところ 490nm 付近に最大吸収波長があることが分かった (データ未発表)。腹部よりも尾部に、また、シラスウナギで蛍光強度が高いことから繁殖行動や回遊における種間の認識に大きく貢献しているかもしれない。

第 3 章では機能的特性の観点より、培養細胞を用いて eel GFP が持つ機能解析を試みた。eel GFP は蛍光を発する際にリガンドとしてビリルビンを要求する。このビリルビンは酸化ストレスから細胞を生理学的に守る機能を有している (Sedlak *et al.*, 2009)。ビリルビンは細胞を培養する際に用いる FCS 中にも含まれ、哺乳類の血液中においてアルブミンと結合して複合体を形成している (Carmichael *et al.*, 1987)。eel GFP 単独での機能解析にはビリルビン・フリーの培養細胞系の樹立が必要であるが、細胞増殖と蛍光強度の観点からは培地条件は FCS 濃度 10%が必要であることが示された。したがって、対照区ではベクターのみを組み込んだ HEK293-CV 細胞、eel GFP を組み込んだ HEK293-eel GFP 細胞、比較のためにビリルビンに依存せずに蛍光を発するオワンクラゲ由来の GFP を組み込んだ HEK293-jf GFP 細胞系を用いて抗酸化機能について調べた。

Growth 実験や過酸化水素感受性試験の結果より、抗酸化能を有するビリルビンと高い親和性を持ち結合する eel GFP を発現する HEK293-eel GFP 細胞は、HEK293-CV 細胞ならびに HEK293-jf GFP 細胞に比べて酸化ストレスに耐性があることが示唆された。これはビリルビンが eel GFP と結合することでビリルビンの抗酸化能が働き、細胞の酸化ストレスを軽減しているためではないかと考えられる。

ビリルビンはヘモグロビンの構成物質であるヘムが脾臓においてヘムオキシゲ

ナーゼによりビリベルジンに分解され、さらにビリベルジン還元酵素により還元されることにより生成する通常代謝物である。この代謝されたビリルビン(非抱合型)は水に溶けないため、血中においてはアルブミンと結合して肝臓に運ばれる。アルブミン-ビリルビン複合体の抗酸化能力は、ビリルビン単体で機能するよりも強いことが報告されている (Wu *et al.*, 1991; Kapitulnik, 2004)。一方で eel GFP はビリルビンのみに特異的に結合する高い親和性を保有しており、アルブミンよりも約 1000 倍強くビリルビンと結合し、ビリベルジンとは結合しないことが報告されている (Kumagai *et al.*, 2013)。このことは細胞が酸化ストレスを受けた際には、eel GFP に結合しているビリルビンがビリベルジンに酸化され、eel GFP からビリベルジンが解離して蛍光を発する能力を失うことが示唆している (Fig.1)。

第 1 章において、ウナギ筋肉中の蛍光の局在化および蛍光強度と eel GFP 遺伝子の転写発現量との間に関連性があることが示唆されたが、組織中のビリルビン量も蛍光強度に影響を与えている可能性が示唆された。ウナギの血液中におけるビリルビン量については報告 (Elis and Poluhowich, 1981; Endo *et al.*, 1992) がなされているが、他の組織における報告はない。今後、ウナギ組織におけるビリルビン含量を測定することやビリルビンとの結合を阻害する物質の存在の有無を検討する必要がある。

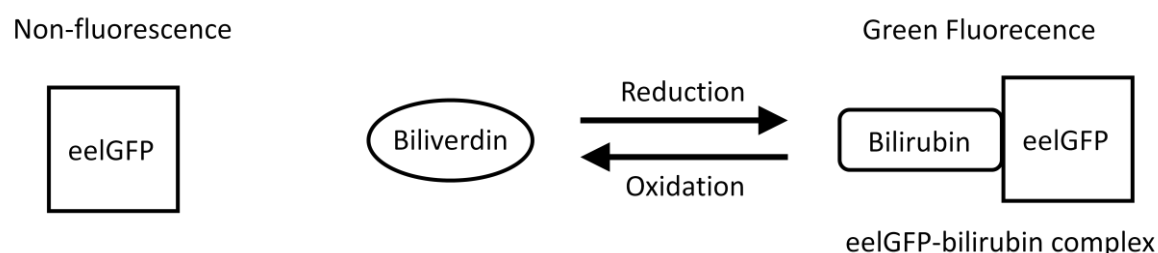


Fig. 1 Proposal mechanism of the heterogeneous green fluorescent expression of the eel GFP. Biliverdin, which is a main and abundant form of heme metabolite in the eel blood, is taken-up into the skeletal muscle cells. The biliverdin is enzymatically reduced to bilirubin intracellularly. The bilirubin binds to eel GFP with strongly high affinity and expresses bright green fluorescence. When skeletal muscle cells are exposed to oxidative stress, eel GFP-bilirubin complex functions as scavenger of ROS, and bilirubin is oxidized to biliverdin. The formed biliverdin is removed to eel GFP, and is transported to the blood.

ウナギの血中にはヒトのような他の生物種とは異なりビリベルジンが多く含まれており、ビリルビンの濃度が低いことが報告されている(Elis and Poluhowich, 1981; Endo *et al.*, 1992)。これはできるだけ多くのビリルビンを保持するために、eel GFP がいわばビリルビン貯蔵体として機能しており、ウナギ筋肉の酸化ストレスを軽減する働きを担っていることが示唆された。一般にウナギ属は、降河回游性の生活環を持ち、産卵のために数百 km から数千 km もの回遊を行う (Kuroki *et al.*, 2006; Aoyama 2009)。このためウナギの筋細胞は長い間酸化ストレスを受けやすくなっていることが推測される。このようなウナギの長距離回遊の習性に、ビリルビン貯蔵体として eel GFP が抗酸化的な生体防御に寄与していること、および eel GFP-ビリルビン複合体が酸化ストレスから細胞を保護していることを推察された。

謝辞

本研究の遂行にあたり終始貴重な御指導、御助言を賜りました鹿児島大学水産学部の上西由翁教授、板倉隆夫特任教授に心から感謝の意を申し上げますとともに厚く御礼申し上げます。

実験を遂行するにあたり御協力ならびに貴重な助言を頂きました鹿児島大学水産学部の小松正治准教授に心からの感謝の意をささげます。

また、適切な御助言を頂きました鹿児島大学水産学部の林 征一名誉教授、琉球大学農学部の屋 宏典教授、鹿児島大学水産学部の塩崎一弘准教授に厚く御礼申し上げます。

最後に本研究を行う上で御協力を頂いた海洋生物工学研究室、小松研究室、塩崎研究室の修士学生、4年生の皆さんに深く感謝いたします。

参考文献

- Alam N., Nakamura, K. and Hayashi, S. (2004). Lipoprotein metabolism in a coculture system with eel skeletal muscle and hepatocytes. *Fish Sci*, 70: 326-335
- Aoyama, J., Nishida, M. and Tsukamoto, K. (2001). Molecular phylogeny and evolution of the freshwater eel, genus *Anguilla*. *Mol Phylogenet Evol*, 20: 450-459.
- Aoyama, J. (2009). Life History and evolution of migration in catadromous eels (genus *anguilla*). *Aqua-BioSci Monogr* 2: 1-42.
- Baird, S.D., Turcotte, M., Korneluk, R.G. and Holcik, M. (2006). Searching for IRES. *RNA*, 12: 1755-1785
- Carmichael, J., Degraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D. and Mitchell, J.B. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated color metric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*, 47:936-942.
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, 15: 532-&.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of rna isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162: 156-159.
- Coppins, R.L., Hall, K.B. and Groisman, E.A. (2007). The intricate world of riboswitches. *Curri Opin Microbiol*, 10:176-181.
- Dennery, P.A., Seidman, D.S. and Stevenson, D.K. (2001). Drug therapy: Neonatal hyperbilirubinemia. *N Engl J Med*, 344: 581-590.
- Dijkstra, L.H. and Jellyman, D.J. (1999). Is the subspecies classification of the freshwater eels *Anguilla australis australis* Richardson and *A. a schmidtii* Phillipps still valid? *Mar Freshw Res*, 50: 261–263.
- Ege, V. (1939). A revision of the genus *Anguilla* Shaw; a systematic phylogenetic and geographical study *Dana Rep*, 16. 1-256
- Ellis, M.J. and Poluhowich, J.J. (1981). Biliverdin concentrations in the plasmas of fresh and brackish water eels, *Anguilla rostrata*. *Comp Biochem Physiol A Physiol*, 70: 587-589.
- Endo, M., Sakai, T., Yamaguchi, T. and Nakajima, H. (1992). Pathology of jaundice in the cultured eel *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 103: 1-7.
- Esteves, A. and Ehrlich, R. (2006). Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 142: 262-74.
- Foti, M.C. (2007). Antioxidant properties of phenols. *J Pharm Pharmacol*, 59: 1673-85.
- Frei, B., Stocker, R. and Ames, B.N. (1988). Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85: 9748-9752.

- Furuhashi, M. and Hotamisligil, G.S. (2008). Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov*, 7: 489-503.
- Gruber, D.F. Gaffney, J.P., Mehr, S., DeSalle, R., Sparks, J.S., Platasa, J. and Pieribone, V.A. (2015). Adaptive Evolution of eel fluorescent proteins from fatty acid binding proteins produces bright fluorescence in the marine environment. *PLoS ONE*, 10: e0140972.
- Haddock, S.H.D., Moline, M.A. and Case, J.F. (2010). Bioluminescence in the Sea. *Ann Rev Mar Sci*, 2: 443-493.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*, 41: 95-98.
- Hastings, J.W. and Wilson, T. (1976). Bioluminescence and chemiluminescence. *Photochem Photobiol*, 23: 461-73.
- Hayashi, S. and Toda, Y. (2009). A novel fluorescent protein purified from eel muscle. *Fish Sci*, 75: 1461-1469.
- Hertzel, A.V. and Bernlohr, D.A. (2000). The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: Molecular and genetic insights into function. *Trends Endocrinol Metab*, 11: 175-180.
- Hulea, S.A., Wasowicz, E. and Kummerow, F.A. (1995). Inhibition of metal-catalyzed oxidation of low-density-lipoprotein by free and albumin-bound bilirubin. *Biochim Biophys Acta*, 1259: 29-38.
- Inamdar, N.M., Ahn, Y.I. and Alam, J. (1996). The heme-responsive element of the mouse heme oxygenase-1 gene is an extended AP-1 binding site that resembles the recognition sequences for MAF and NF-E2 transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*, 221: 570-576.
- Inoue, J.G., Miya, M., Miller, M.J., Sado, T., Hanel, R., Hatooka, K., Aoyama, J., Minegishi, Y., Nishida, M. and Tsukamoto, K. (2010). Deep-ocean origin of the freshwater eels. *Biol Lett*, 6: 363-366.
- Inoue, M. (2001). Protective mechanisms against reactive oxygen species. IN Arias, I.M., L., B.J., V., C.F., Fausto, N., Schachter, D. and Shafritz, D.A. (Eds.) *The Liver: Biology and Pathobiology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Jaiswal, A.K. (1991). Human NAD(P)H - quinone oxidoreductase (NQO1) gene structure and induction by dioxin. *Biochemistry*, 30: 10647-10653.
- Jellyman, D.J. (1987). Review of the marine, life history of Australasian temperate species of *Anguilla*. *Am Fish Soc Symp*, 1: 276-285.
- Jellyman, D.J. (2007). Status of New Zealand fresh-water eel stocks and management initiatives. *ICES J Mar Sci*, 64: 1379-1386.
- Kapitulnik, J. (2004). Bilirubin: An endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties. *Mol Pharmacol*, 66: 773-779.
- Kelmanson, I.V. and Matz, M.V. (2003). Molecular basis and evolutionary origins of color diversity in great star coral *Montastraea cavernosa* (Scleractinia : Faviida). *Mol Biol Evol*, 20: 1125-1133.

- Kumagai, A., Ando, R., Miyatake, H., Greimel, P., Kobayashi, T., Hirabayashi, Y., Shimogori, T. and Miyawaki, A. (2013). A Bilirubin-Inducible Fluorescent Protein from Eel Muscle. *Cell*, 153: 1602-1611.
- Kuroki, M., Aoyama, J., Miller, M.J., Wouthuyzen, S., Arai, T. and Tsukamoto, K. (2006). Contrasting patterns of growth and migration of tropical anguillid leptocephali in the western Pacific and Indonesian Seas. *Mar Ecol Prog Ser*, 309: 233-246.
- Kurtz, A., Zimmer, A., Schnütgen, F., Brüning, G., Spener, F. and Müller, T. (1994). The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. *Development*, 120: 2637-49.
- Lai, Y.Y.Y., Lubieniecki, K.P., Koop, B.F. and Davidson, W.S. (2012). Characterization of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) brain-type fatty acid binding protein (*fabp7*) genes reveals the fates of teleost *fabp7* genes following whole genome duplications. *Gene*, 504: 253-261.
- Liu, R.Z., Denovan-Wright, E.M., Degraeve, A., Thisse, C., Thisse, B. and Wright, J.M. (2004). Differential expression of duplicated genes for brain-type fatty acid-binding proteins (*fabp7a* and *fabp7b*) during early development of the CNS in zebrafish (*Danio rerio*). *Gene Expression Patterns*, 4: 379-387.
- Maines, M.D. (1988). Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J*, 2: 2557-2568.
- Martynov, V.I., Savitsky, A.P., Martynova, N.Y., Savitsky, P.A., Lukyanov, K.A. and Lukyanov, S.A. (2001). Alternative cyclization in GFP-like proteins family - The formation and structure of the chromophore of a purple chromoprotein from *Anemonia sulcata*. *J Biol Chem*, 276: 21012-21016.
- McCapra, F. and Hart, R. (1980). The origins of marine bioluminescence. *Nature*, 286: 660-661.
- Minegishi, Y., Aoyama, J., Inoue, J.G., Miya, M., Nishida, M. and Tsukamoto, K. (2005). Molecular phylogeny and evolution of the freshwater eels genus *Anguilla* based on the whole mitochondrial genome sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 34: 134-146.
- Minetti, M., Mallozzi, C., Di Stasi, A.M.M. and Pietraforte, D. (1998). Bilirubin is an effective antioxidant of peroxynitrite-mediated protein oxidation in human blood plasma. *Arch Biochem Biophys*, 352: 165-174.
- Neuzil, J., Gebicki, J.M. and Stocker, R. (1993). Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain-breaking antioxidants. *Biochem J*, 293: 601-606.
- Ochman, H., Gerber, A.S. and Hartl, D.L. (1988). Genetic applications of an inverse polymerase chain-reaction. *Genetics*, 120: 621-623.
- Ostrow, J.D. and Schmid, R. (1963). The protein-binding of C¹⁴-bilirubin in human and murine serum. *J Clin Invest*, 42: 1286-99.
- Padgett, R.A., Grabowski, P.J., Konarska, M.M., Seiler, S. and Sharp, P.A. (1986). Splicing of messenger-rna precursors. *Annu Rev Biochem*, 55: 1119-1150.

- Palumbi, S.R., Martin, A., Romano, S., McMillan, W.O., Stice, L. and Grabowski, G. (1991). The Simple Fool's Guide to PCR, Version 2.0. University of Hawaii: privately published document compiled by S. Palumbi.
- Patra, S.K. and Pai, M.K. (1997). Spectroscopic probes of the individual and combined effects of Triton X-100 and chloroform on serum albumins and serum-albumin center dot bilirubin complexes. *Eur J Biochem*, 246: 658-664.
- Rosenblatt, J.D., Lunt, A.I., Parry, D.J. and Partridge, T.A. (1995). Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 31: 773-779.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. and Cormier, M.J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111: 229-33.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*, 20: 933-56.
- Rushmore, T.H. and Pickett, C.B. (1990). Transcriptional regulation of the rat glutathione s-transferase-ya subunit gene - characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *J Biol Chem*, 265: 14648-14653.
- Rushmore, T.H., Morton, M.R. and Pickett, C.B. (1991). The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem*, 266: 11632-9.
- Schaap, F.G., van der Vusse, G.J. and Glatz, J.F.C. (2002). Evolution of the family of intracellular lipid binding proteins in vertebrates. *Mol Cell Biochem*, 239: 69-77.
- Sedlak, T.W., Saleh, M., Higginson, D.S., Paul, B.D., Juluri, K.R. and Snyder, S.H. (2009). Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 5171-5176.
- Setsukinai, K., Urano, Y., Kakinuma, K., Majima, H.J. and Nagano, T. (2003). Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J Biol Chem*, 278: 3170-3175.
- Shagin, D.A., Barsova, E.V., Yanushevich, Y.G., Fradkov, A.F., Lukyanov, K.A., Labas, Y.A., Semenova, T.N., Ugalde, J.A., Meyers, A., Nunez, J.M., Widder, E.A., Lukyanov, S.A. and Matz, M.V. (2004). GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: Evolution of functional features and structural complexity. *Mol Biol Evol*, 21: 841-850.
- Sharma, M.K., Liu, R.-Z., Thisse, C., Thisse, B., Denovan-Wright, E.M. and Wright, J.M. (2006). Hierarchical subfunctionalization of *fabp1a*, *fabp1b* and *fabp10* tissue-specific expression may account for retention of these duplicated genes in the zebrafish (*Danio rerio*) genome. *FEBS J*, 273: 3216-3229.
- Shimizu, F., Watanabe, T.K., Shinomiya, H., Nakamura, Y. and Fujiwara, T. (1997). Isolation and expression of a cDNA for human brain fatty acid-binding protein (B-FABP). *Biochim Biophys Acta*, 1354: 24-28.

- Shimomura, O., Johnson, F.H. and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*, 59: 223-39.
- Smathers, R.L. and Petersen, D.R. (2011). The human fatty acid-binding protein family: evolutionary divergences and functions. *Hum Genomics*, 5: 170-91.
- Smith, P.J., Benson, P.G., Stanger, C., Chisnall, B.L. and Jellyman, B.J. (2001). Genetic structure of New Zealand eels *Anguilla dieffenbachii* and *A. australis* with allozyme markers. *Ecol Freshw Fish*, 10: 132-137.
- Sparks, J.S., Schelly, R.C., Smith, W.L., Davis, M.P., Tchernov, D., Pieribone, V.A., and Gruber, D.F. (2014). The convert world fish biofluorescence: a phylogenetically widespread and phenotypically variable phenomenon. *PLoS ONE*, 9: e83259
- Stocker, R., Glazer, A.N. and Ames, B.N. (1987). Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84: 5918-22.
- Teng, H.Y., Lin, Y.S. and Tzeng, C.S. (2009). A new *Anguilla* species and a reanalysis of the phylogeny of freshwater eels. *Zool Stud*, 48: 808-822
- Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 67: 509-544.
- Tsuji, Y., Ayaki, H., Whitman, S.P., Morrow, C.S., Torti, S.V. and Torti, F.M. (2000). Coordinate transcriptional and translational regulation of ferritin in response to oxidative stress. *Mol Cell Biol*, 20: 5818-5827.
- Tsukamoto, K. (1992). Discovery of the spawning area for Japanese eel. *Nature*, 356: 789-791.
- Tsukamoto, K., Aoyama, J. and Miller, M.J. (2002). Migration, speciation, and the evolution of diadromy in anguillid eels. *Can J Fish Aquat Sci*, 59: 1989-1998.
- Tsukamoto, K., Chow, S., Otake, T., Kurogi, H., Mochioka, N., Miller, M.J., Aoyama, J., Kimura, S., Watanabe, S., Yoshinaga, T., Shinoda, A., Kuroki, M., Oya, M., Watanabe, T., Hata, K., Ijiri, S., Kazeto, Y., Nomura, K. and Tanaka, H. (2011). Oceanic spawning ecology of freshwater eels in the western North Pacific. *Nature Comm*, 2: 179
- Vanger, S., Galy, B. and Pyronnet, S. (2001) Irresistible IRES - Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep*, 2: 893-898.
- Vomhof-DeKrey, E.E. and Picklo, M.J., Sr. (2012). The Nrf2-antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism. *J Nutr Biochem*, 23: 1201-1206.
- Wang, X.T., Tomso, D.J., Chorley, B.N., Cho, H.Y., Cheung, V.G., Kleeberger, S.R. and Bell, D.A. (2007). Identification of polymorphic antioxidant response elements in the human genome. *Hum Mol Genet*, 16: 1188-1200.
- Watanabe, S., Aoyama, J. and Tsukamoto, K. (2004) Reexamination of Ege's (1939) use of taxonomic characters of the genus *Anguilla*. *Bull Mar Sci*, 74: 337-351.

- Watanabe, S., Oyama, J. and Tsukamoto, K. (2006). Confirmation of morphological differences between *Anguilla australis australis* and *A. australis schmidtii*. *N Z J Mar Freshwater Res*, 40: 325-331.
- Wu, T.W., Wu, J., Li, R.K., Mickle, D. and Carey, D. (1991). Albumin-bound bilirubins protect human ventricular myocytes against oxyradical damage. *Biochem Cell Biol*, 69: 683-8.
- Wu, Q.W., Andolfatto, P. and Haunerland, N.H. (2001) Cloning and sequence of the gene encoding the muscle fatty acid binding protein from the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochem Mol Biol*, 31: 553-562.
- Yang, F., Moss, L.G. and Phillips, G.N. (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 14: 1246-1251.
- Zimmerman, A.W. and Veerkamp, J.H. (2002). New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell Mol Life Scis*, 59: 1096-1116.
- Zucker, S.D., Goessling, W., Zeidel, M.L. and Gollan, J.L. (1994). Membrane lipid-composition and vesicle size modulate bilirubin intermembrane transfer - evidence for membrane-directed trafficking of bilirubin in the hepatocyte. *J Biol Chem*, 269: 19262-19270.