

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	熊谷安希子
題 目	ニホンウナギ血清高密度リポタンパク質 (HDL) の役割及び HDL 結合タンパク質のリガンドに関する研究 (Studies on the role of Japanese eel serum high-density lipoprotein (HDL) and the ligand for HDL binding protein)
<p>一般にウナギを含め魚類の血清リポタンパク質、特に高密度リポタンパク質(HDL)の濃度が高いことが知られている。ヒト等における HDL の役割は、いわゆるコレステロールの逆輸送としてよく理解されている。しかし、魚類における HDL の役割がコレステロールの逆輸送のみとすると、その高い血中濃度の理由が不明であった。</p> <p>本研究は HDL の新しい役割として、ビテロゲニン (VTG) 合成の促進作用があることを明らかにし、その作用は HDL 中のガングリオシドを介して HDL が肝臓へ取り込まれてなされることを明らかにしたものである。</p> <p>エストラジオール (E₂) を腹腔内注射し VTG 合成を誘導させたウナギの肝細胞は、未処理の肝細胞と比較して HDL 結合が 3 倍に上昇した。また、ウナギ培養肝細胞に E₂ 及び HDL を添加すると、E₂ のみの場合と比べて VTG 合成の誘導を顕著に促進した。ウナギでは HDL が E₂ 存在下で肝臓での VTG 合成の促進に関わっていることを初めて明らかにした。</p> <p>HDL の肝細胞への作用は、肝細胞膜の HDL 結合タンパク質 (HBP) を介していると考えられる。HBP の候補である vigilin の cDNA をウナギ肝臓よりクローニングしたが、推定される一次構造は膜タンパク質の特徴を有してなかった。</p> <p>ヒトでは、HDL 中の主要構成タンパク質である apoAI が HBP のリガンドであることが明らかにされている。そこで、ウナギ HDL 中の主要構成タンパク質である apoAI、apoAII また HDL から精製されたガングリオシド GM4 について HBP に対するリガンドの検討を行った。HDL から精製されたガングリオシドは、N-アセチルノイラミン酸、ガラクトースの 2 糖からなること、HPTLC 上で精製 GM4 及びそのリゾ体は標品 GM4 及び標品 GM4 リゾ体と一致すること、また質量分析の結果等から GM4 と同定された。</p> <p>HBP のリガンドの検討には、2 つの方法を用いた。1 つは培養肝細胞への FITC-HDL の結合実験で、他は肝細胞から細胞膜タンパク質を調製し、FITC-HDL によるリガンドプロットである。以下の結果が得られた。①過剰の HDL 存在下では FITC-HDL の肝細胞への結合は抑制された。②抗 apoAI 抗体、抗 apoAII 抗体で処理した FITC-HDL の肝細胞への結合は対照と変わらなかった。③GM4 とインキュベートした FITC-HDL の肝細胞への結合が顕著に促進された。④リガンドプロットにおいては、過剰の apoAI あるいは apoAII 存在下で FITC-HDL の結合は抑制されなかった。⑤GM4 とインキュベートした FITC-HDL の結合は促進され、80kDa、64kDa の膜タンパク質が確認された。⑥GM1 とインキュベートした FITC-HDL の結合は強く抑制された。以上の結果から、ウナギ HBP に対する HDL のリガンドは GM4 であることを強く示唆した。</p>	

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	Akiko Kumagai
題 目	Studies on the role of Japanese eel serum high-density lipoprotein (HDL) and the ligand for HDL binding protein (ニホンウナギ血清高密度リポタンパク質 (HDL) の役割及び HDL 結合タンパク質のリガンドに関する研究)
<p>In general, fish serum including eel serum contains high concentration of lipoprotein, particularly high-density lipoprotein (HDL). It is well investigated that the role of HDL in human is a reverse cholesterol transport. However, if fish HDL plays only a role as a reverse cholesterol transport, the reason for high concentration of HDL in fish serum is unclear.</p> <p>This study revealed that a novel function of eel HDL is a promoter for vitellogenesis and this is performed through the incorporation of HDL into a liver by interaction of HDL binding protein (HBP) and ganglioside of HDL.</p> <p>Primary cultured hepatocytes prepared from eel with intraperitoneal injection of estradiol (E₂) bound to HDL 3 times higher than hepatocytes prepared from a control eel. Furthermore, when E₂ and HDL were added to cultured hepatocytes, vitellogenesis increased remarkably compared with control. It was revealed for the first time that HDL stimulated vitellogenesis in eel liver in the presence of E₂.</p> <p>It is reasonable that HDL affects through HBP in plasma membrane of liver. cDNA of vigilin, which is known as HBP, was cloned from eel liver. However, the deduced primary structure didn't have properties of membrane proteins.</p> <p>In human, it is well known that apoAI, which is a main protein component of HDL, is a ligand of HBP. Then it was investigated whether apoAI, apoAII or ganglioside GM4 becomes a candidate as a ligand of HBP. The ganglioside purified from eel HDL was identified as GM4 by following evidences, composition of N-acetylneuraminic acid and galactose as a sugar chain, correspondence of purified ganglioside and its lyso form to authentic GM4 and its lyso form on HPTLC, and mass spectrometry analysis by TOF-mass.</p> <p>A ligand for HBP was investigated by two methods. One was binding experiment of FITC-HDL to cultured hepatocytes. The other was ligand blotting by FITC-HDL after SDS-PAGE of plasma membrane proteins prepared from isolated hepatocytes. Several results were obtained as follows. ① FITC-HDL binding to hepatocytes was inhibited by an excess of non labeled-HDL. ② FITC-HDL incubated with anti apoAI antibody or anti apoAII antibody bound to hepatocytes without any inhibition. ③ FITC-HDL incubated with GM4 bound to hepatocytes much more than FITC-HDL did. ④ An excess of apoAI or apoAII had no effect on FITC-HDL binding by ligand blotting. ⑤ FITC-HDL incubated with GM4 bound plasma membrane proteins of 80kDa and 64kDa much more than FITC-HDL. ⑥ Binding of FITC-HDL incubated with GM1 to HBP was remarkably inhibited by ligand blotting. These results strongly suggest that GM4 of HDL is a ligand of eel HBP.</p>	

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	熊谷 安希子
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 林 征一
	副査 鹿児島大学 准教授 安藤 清一
	副査 鹿児島大学 教授 青木 孝良
	副査 佐賀 大学 准教授 亀井 勇統
	副査 鹿児島大学 教授 八木 史郎
審査協力者	印
題 目	ニホンウナギ血清高密度リポタンパク質(HDL)の役割及びHDL結合タンパク質のリガンドに関する研究 (Studies on the role of Japanese eel serum high-density lipoprotein (HDL) and the ligand for HDL binding protein)
<p>一般にウナギを含め魚類の血清リポタンパク質中、特に高密度リポタンパク質(HDL)の濃度が高いことが知られている。ヒト等におけるHDLの役割は、いわゆるコレステロールの逆輸送としてよく理解されている。しかし、魚類におけるHDLの役割がコレステロールの逆輸送のみとすると、その高い血中濃度の理由が不明であった。</p> <p>本研究はHDLの新しい役割として、ビテロゲン(VTG)合成の促進作用があることを明らかにし、その作用はHDL中のガングリオンドを介してHDLが肝臓へ取込まれてなされることを明らかにしたものである。</p> <p>エストラジオール(E₂)を腹腔内注射しVTG合成を誘導させたウナギの肝細胞は、未処理の肝細胞と比較してHDL結合能が3倍に上昇した。また、ウナギ培養肝細胞にE₂及びHDLを添加すると、E₂のみの場合と比べてVTG合成の誘導を顕著に促進した。ウナギではHDLがE₂存在下で肝臓でのVTG合成の促進に関わっていることを初めて明らかにした。</p> <p>HDLの肝細胞への作用は、肝細胞膜のHDL結合タンパク質(HBP)を介していると考えられる。</p>	

ヒトでは HDL中の主要構成タンパク質であるapoAIがHBPのリガンドであることが明らかにされている。そこで、ウナギHDL中の主要構成タンパク質であるapoAI、apoAIIまたHDLから精製されたガングリオシドGM4についてHBPに対するリガンドの検討を行った。HDLから精製されたガングリオシドは、N-アセチルノイラミン酸、ガラクトースの2糖からなること、HPTLC上で精製GM4及びそのリゾ体は標品GM4及び標品GM4リゾ体と一致すること、また質量分析の結果等からGM4と同定された。

HBPのリガンドの検討には、二つの方法を用いた。一つは培養肝細胞へのFITC-HDLの結合実験で、他は肝細胞から細胞膜タンパク質を調製し、FITC-HDLによるリガンドブロットである。以下の結果が得られた。① 過剰のHDL存在下ではFITC-HDLの肝細胞への結合は抑制された。② 抗apoAI抗体、抗apoAII抗体で処理したFITC-HDLの肝細胞への結合は対照と変わらなかった。③ GM4とインキュベートしたFITC-HDLの肝細胞への結合が顕著に促進された。④ あらかじめGM4とインキュベートしたHDLが過剰量存在する条件下では、FITC-HDLの肝細胞への結合は①の場合に比べ抑制が更に強まった。⑤ リガンドブロットにおいては、過剰のapoAIあるいはapoAII存在下でFITC-HDLの結合は抑制されなかった。⑥ GM4とインキュベートしたFITC-HDLの結合は促進され、80 kDa、60 kDaの膜タンパク質が確認された。⑦ GM1とインキュベートしたFITC-HDLの結合は強く抑制された。⑧ HDLにおけるapoAI/GM4のモル比は、約20であった。以上の結果から、ウナギHBPに対するHDLのリガンドはGM4であることが強く示唆された。ヒト等のHBPに対するHDLのリガンドはapoAIであることが知られているが、ウナギではapoAIやapoAIIはリガンドとして機能していないことが分かった。

HBPの候補としてvigilinのcDNAクローニングを試みた。その結果3,816bpの翻訳領域を含む3,872bpの完全長cDNAを得た。1,271アミノ酸から推定された分子量は、141.5 kDaであった。しかし、リガンドブロットで得られた80 kDaの分子量とは大きく異なった。また、アミノ酸組成からvigilinは水溶性タンパク質で、膜タンパク質ではないことが分かったので、vigilinはHBPではないと結論された。

本論文ではHDLの新奇な役割と、HDL中のガングリオシドが肝細胞膜のHBPのリガンドであることを示した。これら二つの発見はウナギのみならず魚類におけるHDLの新たな役割を提起するもので、学位論文として十分価値あるものと判断される。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	熊谷 安希子
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 林 征一
	副査 鹿児島大学 准教 安藤 清一
	副査 鹿児島大学 教授 青木 孝良
	副査 佐賀 大学 准教 亀井 勇統
	副査 鹿児島大学 教授 八木 史郎
審査協力者	
実施年月日	平成19年 7月21日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、平成19年7月21日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(水産学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	熊谷 安希子
<p>以下は質疑応答についてまとめたものである。なお当日答えられなかった質問については、後日書面により答え、各審査委員により了解を得た。</p> <p>[質問 1] HDLの分子量はどのくらいか。</p> <p>[回答 1] HDL粒子は均一なものではなく、HDL粒子が形成される過程によりその分子量は変わるが、およそ20万～40万である。</p> <p>[質問 2] HDL中のガングリオシドGM4がリガンドとしてHDL結合タンパク質(HBP)に働いていると考えてよいか。</p> <p>[回答 2] HDLのリガンドとしては、ヒト等哺乳動物ではapoAIであることが知られているが、ウナギHDLではapoAIはリガンドとして機能せず、HDL中のGM4がリガンドであることを見出した。</p> <p>[質問 3] エストラジオール17β (E2)のHBPへの影響についてはどのように考えるか。</p> <p>[回答 3] E2を腹腔内注射したウナギから調製した肝細胞とHDLとの結合能は、E2処理しなかったウナギ肝細胞に比べ、約3倍上昇したことからE2によりHBP合成の誘導が生じたものと考えている。</p> <p>[質問 4] apoAIとGM4の分子比がHDL中で、20 : 1というのは、HDL、apoAIの分子量、HDLのタンパク質の割合から考えて納得できないがどう考えるか。</p> <p>[回答 4] この分子比は凍結乾燥したHDL 100mg中のapoAI、GM4の分子数から求めたもので、HDL 1分子中の分子比ではない。また約20 : 1の比率は、GM4精製における回収率を100%と仮定して求めた。実際には回収率は100%以下と考えられるので、比率は20 : 1より小さいと考えられる。HDL 1分子中に4分子前後のapoAIを含むと考え、HDL分子 5分子前後につきHDL 1分子の割合でGM4を持っているHDLが存在すると考えられる。</p> <p>[質問 5] HDLと肝細胞の結合実験の実験方法はこの方法でよいのか。過剰のHDL存在下での肝細胞の固定化HDLへの結合は、過剰のHDLと肝細胞をあらかじめインキュベートし、ついで肝細胞をHDLから分離後、固定化HDLに添加すべきではないか。</p> <p>[回答 5] 肝細胞とHDLとの結合実験は、LDL受容体に関するBrown and Goldstein (Science, 232, 34-47 (1986))の方法に準じたもので、問題はないと考えている。</p> <p>[質問 6] VigilinのKHドメインの比較や、相同性の検討はアフリカツメガエルと較べるよりゼブラフィッシュと較べるべきではないか。</p> <p>[回答 6] ゼブラフィッシュとの比較についても検討を行った。その結果、KHドメインの数はウナギと同数の14個あること、アミノ酸配列についてもドメイン部分についてはほとんど一致していた。一致しないのはドメイン以外の部分であった。</p>	

[質問7] FITC-HDL中のGM4分子の300倍量のGM4をFITC-HDLとインキュベートした時、FITC-HDLの肝細胞への結合が46%しか増加しないのは少ないのではないか。

[回答7] GM4は2糖からなる糖鎖を一つしか持っていないので、水には溶けにくい性質を持っている。実験ではGM4は10% DMSOのPBS溶液として調製し、FITC-HDLとインキュベートした。そのために添加したGM4が全てHDL粒子に取込まれてはいないと推定される。従って、300倍量のGM4の内HDL粒子に取込まれたのはそれ程多くはなく、促進作用にもそのことが反映したと考えている。しかし、GM4の量依存的にFITC-HDLの結合促進が認められた。

[質問8] FITC-HDLに抗apoAI抗体を作用させた場合、HDL中のapoAIに抗体が結合していない可能性もあるのではないか。抗体処理したFITC-HDLが肝細胞への結合を抑制しなかったのは、抗体が結合しなかったためと考えられないか。

[回答8] ポリクローナル抗体を用いているので一般的には、HDL中のapoAIに抗体が結合しないということは考えにくい。しかし、抗体がHDLと結合しない可能性が全く無いわけではないので、肝細胞への結合実験とは別に肝細胞膜タンパク質を用いて、FITC-HDLによるリガンドプロットを行った。過剰のapoAI存在下での競合実験を行ったが、FITC-HDLの膜タンパク質への結合阻害が認められなかった。これらの結果もふまえapoAIのリガンドとしての機能はないものと判断した。

[質問9] HDLはE2存在下では、ビテログニン合成を促進する効果があることを示したが、これは雌ウナギに特有なものである。雌雄の区別なくより普遍的役割としてはやはりコレステロールの逆輸送と考えられるが、その際も今日発表したHBPを介してなされると考えてよいか。

[回答9] 今回発表したHBPがコレステロールの逆輸送をも担っていると考えている。

[質問10] HDLの合成場所はどこか。

[回答10] HDLの合成場所は血液中である。肝細胞はVLDLを合成・分泌するが、HDLの合成・分泌は行わない。しかし、遊離のapoAIの合成・分泌を行うことは分かっている。apoAIIはVLDLの構成成分として合成・分泌されることも確認されている。遊離apoAIが末梢組織からコレステロールを受け取り、更に血中でVLDLからapoAIIを受け取ることによりHDLが形成されると考えている。

[質問11] FITC-HDLと結合した肝細胞の蛍光顕微鏡写真があるが、その対照の細胞に見られる蛍光はなにか。対照の細胞には、FITC-HDLを添加していないので蛍光は見られないと思うが。

[回答11] 対照の肝細胞にみられる蛍光は、肝細胞の自家蛍光である。肝細胞中には蛍光を持つフラビン補酵素が存在しているので、このような物質による自家蛍光と考えられる。

[質問12] 80 kDaのHBPについては、MALDI-TOF-MSによる解析を試みたらどうか。

[回答12] HBPの分子量に関してはSDS-PAGE上のリガンドプロットのデータしかなく、HBPが単量体かサブユニット構造を持つものかは現時点では不明である。機会があればMALDI-TOF-MSによる解析を試みたい。