

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19346

研究課題名(和文)血清アルブミンは鯨類の海洋進出を支える鍵分子となったのか？

研究課題名(英文) Has serum albumin played key roles in the secondary adaptation of cetacea?

研究代表者

鈴木 美和 (SUZUKI, Miwa)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：70409069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,600,000円

研究成果の概要(和文)：イルカの血清アルブミン(DSA)について、以下を明らかにした。タンパク質の構造上の特性としては、(1)抗酸化作用に重要な34番目のシステイン(Cys34)がクジラ目でセリンに置換されている、(2)DSAはHSAと異なる二次・三次構造をもつ、(3)HSAよりも高い熱安定性をもつ、ことが各々明らかとなった。また、抗酸化作用として、(4)Cys34を欠くにも関わらず、DSAの抗酸化作用はHSAよりも強く、チオール活性もHSAよりも約3倍高いことが判明した。このようなSAの獲得は、潜水・浮上に伴い生じる酸化ストレスに常に晒される鯨類にとって進化上有利であったと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、血中に最も多く存在する血清アルブミン(SA)について、イルカ型アルブミン(DSA)がヒト型(HSA)よりも強いチオール活性と抗酸化力をもつと結論づけられた。このようなSAの獲得は、潜水・浮上に伴い生じる酸化ストレスに常に晒される鯨類にとって、進化上有利であったと考えられる。この成果は、鯨類の潜水生理に新たな知見を導入するだけに止まらず、彼らの抗酸化力の高さ、ひいては彼らの長寿を支えるメカニズムを追求する上でも役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：The structures and antioxidant properties of serum albumin of bottlenose dolphin (DSA) were characterized by comparing with human SA (HSA) in this study. Regarding features of the protein structure, our data demonstrated that (1) Cysteine at the 34 position (Cys34), that is present as free thiol and is the most important residue for antioxidant of SA, is replaced to serine in the most cetacean species including bottlenose dolphin, (2) DSA may show different properties of the secondary structure from HSA, and (c) DSA may have a higher thermal stability than HSA. In addition, for antioxidant property, (4) DSA may possess higher antioxidant effects and stronger thiol activity than HSA. These results suggests that cetaceans may have acquired these characteristics of SA competitive with oxidative stress induced by the consequences of their diving-surfacing behaviors during their evolutionally process.

研究分野：動物生理学

キーワード：鯨類 海中適応 アルブミン 抗酸化作用 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

血清アルブミン (SA) は血中に最も多く存在するタンパク質であり、浸透圧調節や物質運搬など多様な機能を担うが、抗酸化作用をもつ物質としても知られている。鯨類は、摂餌などのために潜水と浮上を常に繰り返している。彼らが潜水すると、脳と心臓を除く器官へつながる血管が収縮して血流が制限され、浮上して呼吸すると制限が解除されるため、虚血と再灌流が常に起こっており、再灌流の際に急激な酸素の導入が起きるため、酸化ストレスがかかると考えられている。したがって、鯨類にとって抗酸化物質は極めて重要であると考えられるが、鯨類を含め、海生ほ乳類における SA の抗酸化力に関する知見は皆無であった。

本研究の実施に先立ち、我々が潜水前後のイルカ類の血清タンパク質を網羅的に解析したところ、浮上に続く呼吸後に、SA が分解される様子が観察された。この現象から、「鯨類の SA は酸化ストレスによって分解される脆弱性をもち、同時に、この脆弱性が SA にリザーブされているアミノ酸や尿素の即時的な供給をもたらす、尿濃縮や糖新生をサポートする」と仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

上記で示した「鯨類の SA は酸化ストレスによって分解される脆弱性をもち、同時に、この脆弱性が SA にリザーブされているアミノ酸や尿素の即時的な供給などの生理学的な意義をもつ」という仮説を検証するためには、まず、鯨類の SA の物質特性を明らかにした上で、その抗酸化力を確かめる必要がある。アルブミンの物質特定や抗酸化力に関する知見はヒトでもっとも多く蓄積されているため、バンドウイルカから得られた血清からアルブミン (DSA) を抽出し、同様に市販のヒト血清から抽出したアルブミン (HSA) と比較しながら、DSA の抗酸化力を検証することを旨とした。

## 3. 研究の方法

### (1) SA の抽出と精製

2018~2019年に、沖縄美ら海水族館で飼育されている5頭のバンドウイルカ (*Tursiops truncatus*, オス2頭, メス3頭) から朝の摂餌前に採血を行い、得られた血清を直ちに-30℃で保存した。ヒトの血清は市販 (Sigma, n=3) のものを用いた。血清精製キットを用いてイルカおよびヒトの SA をそれぞれ樹脂に吸着させた。樹脂から溶出バッファーにより SA を溶出させた後、フィルターメンブレンを用いて 50kDa 以上の画分を回収し、精製した。得られた精製 SA 溶液に対し、活性炭を加えて酸性条件 (pH3) にすることにより脱脂した後、遠心分離により活性炭を取り除いて中性条件 (pH7.4) に戻した。これをフィルター濾過して脱脂 SA 溶液を得た。

### (2) タンパク質の構造解析

・ DSA の構造的特徴を把握するため、データバンクに登録されている多岐にわたる分類群のほ乳類の SA のアミノ酸配列を取得して多重配列比較を行い、一次構造解析の特徴を解析した (京都大学・岸田拓土助教との共同研究)。

・ 生化学的に DSA と HSA との相違を確認するため、円二色性スペクトル解析による三次構造の比較、疎水性プローブ (1-Anilinonaphthalene-8-sulfonic acid : ANS) を用いた分子表面の疎水性解析、トリプトファン (Trp) 近傍の構造を比較するための蛍光解析、ならびにタンパク質の熱安定性を比較するための示差走査熱量 (DSC) 測定を各々行い、種間で差の有無を検定した (崇城大学・安楽誠教授との共同実験)。

### (3) 抗酸化力の評価

DSA の抗酸化力を確かめるため、2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) を指標とした抗酸化力の評価を行った(崇城大・安楽教授との共同実験)。また、SA のチオール活性を測定するため、蛍光染料を用いたチオール活性試験を行なった。それぞれの試験について、HSA で得られた値との有意差の有無を検定した。

### (4) 脱脂の有無による抗酸化力の相違の評価

脱脂前後の SA を各々用いて、過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) による SA の酸化分解の程度を比較するとともに、dihydrorhodamine (DHR) 123 を指標として用いた抗酸化力の測定も行った。それぞれの試験について、HSA で得られた値との有意差の有無を検定した。

## 4. 研究成果

DSA と HSA を用いて実験を行い、以下の成果を得た(論文投稿予定)。

### (1) タンパク質の構造上の特性

HSA においてフリーのチオールとして抗酸化作用に重要な役割を果たすと証明されている 34 番目のシステイン残基 (Cys34) が、ほとんどのクジラ目ではセリンに置換されていることが明らかとなった。HSA において、人工的に Cys34 を Ser へ置換すると SA の抗酸化力が低下すると報告されており (Anaraku et al. 2001), Cys34 が Ser へ変換されている DSA は HSA よりも低い抗酸化力をもつと予測された。また、HSA と同様の位置に存在する 17 対の Cys は、3D ホモロジーモデルを用いた構造解析から、HSA と同様のほぼ配向性をもち、S-S 結合に供されると予測された。

各 SA 溶液に疎水性プローブ (ANS) を添加して疎水性解析を行ったところ、DSA は HSA に比べて分子表面の疎水性が小さいことが判明した。また、トリプトファン (Trp) 蛍光解析を行ったところ、DSA は HSA の 2 倍近い蛍光強度を示したことから、DSA は多くの Trp をもつと考えられた。さらに、DSC 測定により熱安定性を測定した結果、DSA の熱転移温度ならびに転移エンタルピー変化が HSA より大きかったことから、DSA が HSA に比べて熱安定性が大きいと示唆された。これに加えて、円二色性スペクトル解析により、DSA と HSA で異なるスペクトルを示したことから、互いの三次構造が異なると示唆された。また、3D ホモロジー構造解析の結果、DSA の複数の残基の種類や配向性が HSA と異なること、ならびに、抗酸化力を増加させる可能性のある残基が表面に存在することが示唆された。

### (2) 抗酸化作用

DPPH を指標として SA の抗酸化力を測定した結果、DSA が HSA よりも有意に高い抗酸化力を示した (図 1,  $p=0.034$ )。また、チオール活性試験を行なった結果、DSA が HSA よりも 3 倍高いチオール活性を示した (図 2,  $p=0.006$ )。このことから、脱脂した DSA が HSA よりも高い抗酸化力を有すると強く示唆された。

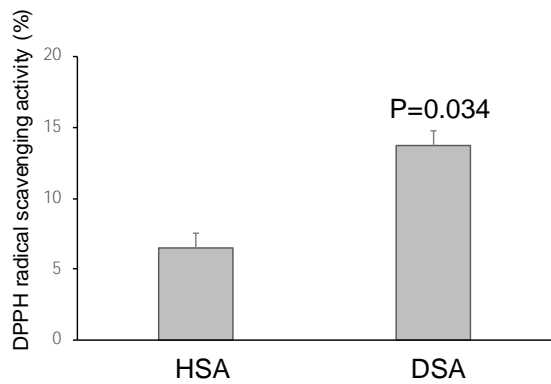


図 1 . DPPHを指標とした抗酸化力の比較

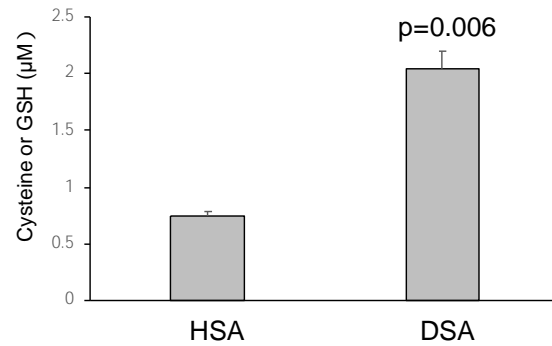


図 2 . チオール活性の比較

脱脂前の SA を用いて  $H_2O_2$  による SA の酸化分解試験を行った結果、DSA が HSA に比べて酸化分解が進んだ ( $p=0.049$ )。ところが、脱脂後の SA を用いて同様の試験を行った結果、有意差は検出されなかったものの、DSA が HSA に比べて酸化分解されにくい傾向を示した。DHR123 を用いた抗酸化力の評価においても、脱脂前には DSA が HSA よりも低い抗酸化力を示したが、脱脂後には DSA と HSA との差が認められなくなった。このことから、脂肪酸の結合の有無が DSA の抗酸化力に影響を与えることが示唆されたが、脂肪酸の質や量の分析までには至らなかった。

以上の結果から、当初掲げていた仮説に反し、血中に多量に存在するアルブミンについて、DSA が HSA よりも強い抗酸化力をもつと結論づけられた。これは、潜水・浮上に伴い生じる酸化ストレスに晒される鯨類にとって進化上有利であったと考えられる。ただし、脂肪酸が結合している状態では抗酸化力が低下することが示唆されたため、イルカ生体内での SA の動態と作用を明らかにするためにはさらなる研究が必要であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木美和, 諸橋 翠, 岸田拓士, 遠藤智子, 植田啓一, 伊藤琢也
2. 発表標題 イルカ血清アルブミンの抗酸化作用の検討
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki M, Morohashi M, Kishida T, Ueda K, Endoh T, Itou T
2. 発表標題 Antioxidant properties of dolphin serum albumin
3. 学会等名 World Marine Mammal Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	安楽 誠  (ANRAKU Makoto)		
研究協力者	岸田 拓士  (KISHIDA Takushi)		