

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：20104

研究種目：基盤研究（C）一般

研究期間：2009～2011

課題番号：21580251

研究課題名（和文）

ウナギ血漿を青緑色に着色するビリベルジン結合タンパク質アンギラシアニンの生化学

研究課題名（英文）

Studies on biochemical characterization of biliverdin-binding protein, anguillacyanin, from the plasma of Japanese eel (*Anguilla japonica*)

研究代表者

安藤 清一 (ANDO SEIICHI)

名寄市立大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：80131986

研究成果の概要（和文）：

ウナギ血漿中には胆汁色素であるビリベルジンが存在し、青緑色を呈する。本研究では、これまで生化学的に解明される機会の乏しかった、ウナギ血漿ビリベルジン結合タンパク質（アンギラシアニンと仮称）の構造と機能について検討した。アンギラシアニンは分子量 75,000 ダルトンの単量体として血漿中の非リポタンパク質画分に存在した。N末端および内部アミノ酸配列を決定した結果、アンギラシアニンは血漿中の遊離ヘム色素を結合する糖タンパク質であるヘモペキシン様タンパク質と高い相同性を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The plasma of Japanese eel (*Anguilla japonica*) is bluish green color, due to the presence of biliverdin. Anguillacyanin, a biliverdin-binding protein, was studied using the lipoprotein-free plasma of Japanese eel. The isolated protein with a molecular mass of 75,000 was assumed to be a monomer. N-Terminal amino acid sequences of Anguillacyanin were identical with 12 amino acids of warm temperature acclimation protein WAP65 from European seabass *Dicentrarchus labrax* and hemopexin-like protein from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* among 20 amino acids. The short amino acid sequences of internal peptides separated by endoproteinase digestion were also identical with warm temperature acclimation protein and hemopexin-like protein from other fishes. Hemopexin is a serum glycoprotein that binds free heme pigment and transports it to the liver for breakdown to bilirubin, after which the free hemopexin returns to the circulation. Anguillacyanin belongs to hemopexin family that may be involved in the transport of heme degradation products such as bilirubin and biliverdin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：(1) ニホンウナギ (2) ビリベルジン結合タンパク質 (3) アンギラシアニン
(4) 血漿 (5) リポタンパク質 (6) 分離・精製 (7) 一次構造

1. 研究開始当初の背景

魚類を含む脊椎動物の血漿の色調は、オレンジ色、茶褐色、青緑色に大別される。産卵期のサケ血漿は、カロテノイド色素であるアスタキサンチンによってオレンジ色を呈し、アスタキサンチンは血漿に存在する高密度リポタンパク質(HDL)と卵黄タンパク質前駆体であるビテロゲニンによって、それぞれ体表と卵巣に輸送されることが明らかにされている(Ando 他 : Carotenoid-carrying lipoproteins in the serum of chum salmon associated with migration. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 2185-2187 (1985) / Transport associated with serum vitellogenin of carotenoid in chum salmon. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 557-563 (1986) / Isolation of apolipoproteins from carotenoid-carrying lipoprotein in the serum of chum salmon. *J. Lipid Res.* **29**, 1264-1271 (1988))。また、放精後の雄サケ血漿中には、カロテノイド色素の他に、胆汁色素であるビリルビンが存在し、その色調は茶褐色である。ビリルビンは、カロテノイド色素と同様に血漿中の HDL と結合している(Ando 他 : Bilirubin-binding protein in the serum of spawning-migrating chum salmon: its identity with carotenoid-carrying lipoprotein. *Fish Physiol. Biochem.* **5**, 69-78 (1988))。一方、ウナギ血漿中には胆汁色素であるビリベルジンが存在し、青緑色を呈することが古くから知られている。ビリベルジンは血漿以外にも存在し、たとえばサンマの鱗や脊椎骨がビリベルジンの沈着によって、鮮やかな青色を呈することもよく経験することである。

ところで、ビリベルジンはどのようにして生成するのだろうか。ヒトの場合、色素タンパク質であるヘモグロビンやミオグロビンに存在するヘムは、肝臓においてまずビリベルジン-IX α に酸化される。水に不溶なビリルビン-IX α は、肝細胞内で水溶性のグルクロン酸と抱合され、最終的に胆汁中へ排泄される。胆汁中に排泄されるヘムの最終代謝産物は、胎生動物と卵生動物では異なり、ほ乳類ではビリルビン-IX α にまで還元代謝されるのに対して、鳥類・は虫類・両生類では酸化代謝産物であるビリベルジン-IX α として排泄される。一方、魚類は卵生動物の中でも特異なヘム代謝を示し、たとえばウナギやブリではビリベルジン-IX α とビリルビンの両形態で胆汁中に排泄される(Sakai 他 : Occurrence of bilirubin-IX β in the gallbladder bile of eel. *Biochim. Biophys. Acta* **993**, 128-130 (1989) / Bile pigments in the bile of marine fish: yellowtail, red sea bream, and flounder. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 2047-2153 (1990))。ビリベルジンによる魚類

血漿の青緑色化が、魚類の特異なヘム代謝と密接に関連していることは容易に推測されるが、血漿中でビリベルジンと結合する責任タンパク質の理解は不十分である。

40年程前に、山口はウナギ血漿が青緑色に着色する現象に着目して、ビリベルジンと結合するタンパク質に関する一連の研究を展開し、分子量 89,100 ダルトンのタンパク質を単離したが、ビリベルジン結合タンパク質の一次構造については不明のまま、現在に至っている。また、血漿が青緑色に着色するのは未成熟の天然および養殖ウナギに限られ、産卵のために降河回遊する銀ウナギの着色化は認められないことも見出されている(Yamaguchi : Biliproteins of marine animals. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **37**, 339-354 (1971))。一方、昆虫血リンパ中にはヘム代謝産物である青色色素を結合する、分子量 20,000 ダルトン程度のピリン結合タンパク質が存在し、その一次構造も決定されている(齊藤 : 幼虫の色. *化学と生物* **42**, 475-479 (2004))。昆虫のピリン結合タンパク質は、疎水性リガンドを結合するリポカリンファミリーに属することが知られている。山口が見出したウナギ血漿中のビリベルジン結合タンパク質が、リポカリンファミリーメンバーか否か興味深い。最近、ビリベルジンがアフリカツメガエルの胚発生に密接に関連することも明らかにされた。肝細胞で合成されたビリベルジンは、卵黄タンパク質前駆体ビテロゲニンによって卵細胞に運搬・蓄積され、胚発生のごく初期段階で背軸形成関連遺伝子の発現スイッチをオンにすることが示された(Montorzi 他 : Biliverdin during *Xenopus laevis* oogenesis and early embryogenesis. *Biochemistry* **41**, 10115-10122 (2002))。このことは、魚類を含めた卵生動物におけるビリベルジンの重要性を示唆するものであり、血漿中のビリベルジン量が生理状態によって変動するウナギは、ビリベルジンの生理機能を研究する上で最適の実験動物と考える。

2. 研究の目的

本研究では、これまで生化学的に解明される機会の乏しかった、ウナギ血漿ビリベルジン結合タンパク質(アンギラシアニンと仮称)の構造と機能について明らかにすることを目的として、(1)血漿中のアンギラシアニンをウナギ血漿から分離する方法の確立、(2)単離されたアンギラシアニンのN末端アミノ酸配列と内部ペプチド断片のアミノ酸配列の決定、(3)アンギラシアニンをコードする遺伝子の単離とその全塩基配列の決定、(4)アンギラシアニンの抗酸化機能について検討した。

3. 研究の方法

(1) ウナギ血漿中に存在するアンギラシアニンとリポタンパク質の単離方法

養殖ウナギ血漿中には高濃度のリポタンパク質が存在することが明らかとなっているために、超遠心分離 (39,000rpm、19時間) によって血漿中のアンギラシアニンとリポタンパク質の分離を行った。すなわち、養殖ウナギ血漿に臭化カリウムを添加して密度を 1.21g/ml に調整後、超遠心分離を行い、リポタンパク質を最上層に、またアンギラシアニンを最下層に分離した。

(2) 各種クロマトグラフィーによるアンギラシアニンの精製方法

超遠心分離によって単離されたアンギラシアニンを含む画分を 0.15M NaCl-EDTA (0.5 mg/ml) 溶液で一晩透析後、高性能ゲルろ過担体 Superdex 200 pg、Resource Q 陰イオン交換カラムおよび疎水性相互作用カラム RESOURCE PHE に供し、青緑色 (708nm) をモニターすることによってアンギラシアニン画分を集めた。

(3) ドデシル硫酸ナトリウム不在および存在下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Native-PAGE および SDS-PAGE)

各種クロマトグラフィーによって単離されたアンギラシアニン溶液 (タンパク質濃度 10mg/ml) 0.5-20 μ l を、Bio-Rad 社製レディーゲル J (ミニゲル 80x73mm、ゲル厚 1mm、ゲル濃度 10%) に供し、200V 定電圧で 54 分間、冷蔵庫内で Native-PAGE を行った。電気泳動終了後、ゲルを染色せずに肉眼でアンギラシアニンの移動状況を確認し、さらにコマシーブリリアントブルーでゲルを染色した。

また、Native-PAGE に用いたアンギラシアニン溶液を 7.5% SDS-PAGE (還元剤 DTT 存在) に供した。電気泳動終了後、分離されたアンギラシアニンを PVDF 膜に電氣的に転写後、PVDF 膜をコマシーブリリアントブルーで染色した。

(4) アンギラシアニンの N 末端アミノ酸配列の分析

PVDF 膜に転写・染色・脱色されたアンギラシアニンのバンドをメスで切り取り、気相シーケンサーでアンギラシアニンの N 末端アミノ酸配列 20 残基を決定した。

(5) アンギラシアニンの内部アミノ酸配列の分析

7.5% SDS-PAGE (還元剤 DTT 存在) で分離された 5 レーン分のアンギラシアニンバンドを洗浄後、リジルエンドペプチダーゼを含むトリス緩衝液 (pH8.5) を加え、35°C、20 時

間の酵素処理を行った後、逆相 HPLC によって断片ペプチドを分離した。なお、対照として、SDS-PAGE 上のバンドのないゲル部分を切り出し、同様に処理した。

逆相 HPLC によって分離された断片ペプチドのアミノ酸配列を気相シーケンサーで決定した。

4. 研究成果

(1) ウナギ血漿中に存在するアンギラシアニンとリポタンパク質の単離

ウナギ血漿を超遠心分離することによって、密度 1.21g/ml 以下のリポタンパク質は上層に浮上し、青緑色のアンギラシアニン画分は下層に濃縮されることが示された (図 1)。アンギラシアニンを含む下層は、血漿中の全タンパク質の 58% を占めていた。また、

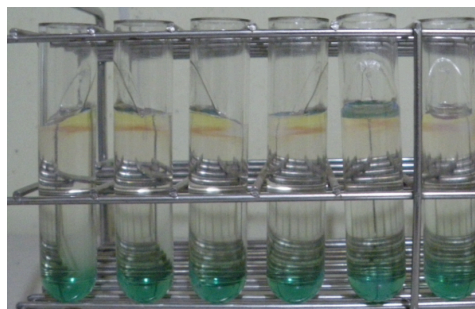


図 1. 超遠心分離後のウナギ血漿

超遠心分離後のアンギラシアニン画分の極大吸収は、708、387 および 280nm であった (図 2)。

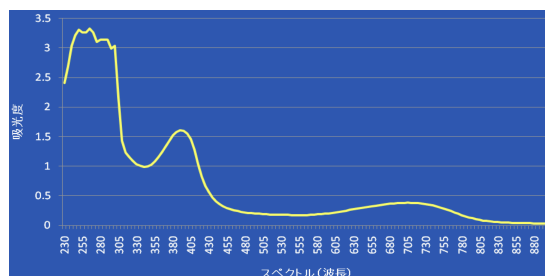


図 2. アンギラシアニン画分の吸収スペクトル

(2) 各種クロマトグラフィーによるアンギラシアニンの精製

超遠心分離後のアンギラシアニンを含む最下層を Superdex 200 pg に供した結果、64.5 ~ 81.5 分の溶出時間に青緑色の着色が確認された (図 3)。次いで、その画分を Resource Q 陰イオン交換カラムに供した結果、15.8 ~ 17.8 分の溶出時間に青緑色の着色が確認された (図 4)。Resource Q 陰イオン交換カラムによって分離された着色画分は、疎水性相互作用カラム RESOURCE PHE には吸着しなかった (図 5)。

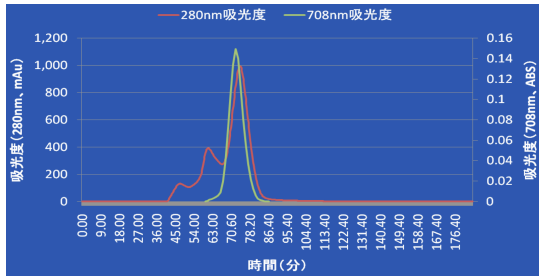


図3. アンギラシアニン画分の Superdex 200 pg によるクロマトグラム

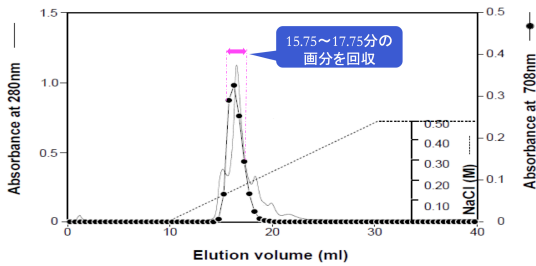


図4. アンギラシアニン画分の Resource Q クロマトグラム

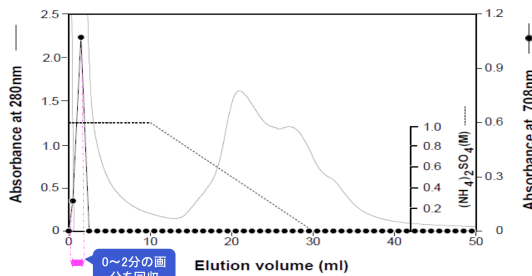


図5. アンギラシアニン画分の RESOURCE PHE クロマトグラム

超遠心分離後のアンギラシアニン画分を Superdex 200 pg、Resource Q および Resource PHE カラムを用いて分離精製した結果、2.26 倍に精製された。

(3) アンギラシアニン画分の Native-PAGE

超遠心分離および各種クロマトグラフィーによって単離したアンギラシアニンを Native-PAGE に供した。アンギラシアニン溶液を 7 μ l (タンパク質量 70 μ g) および 20 μ l (タンパク質量 200 μ g) 供したレーンでは、電気泳動終了後、分子量 75,000 ダルトンの位置に青緑色のバンドが確認された。一方、電気泳動終了後のゲルをコマシーブリリアントブルーで染色した結果、分子量 75,000 ダルトンと 110,000 ダルトンにそれぞれバンドが認められたが、前者のバンドが 80% 程度を占めていた (図6)。

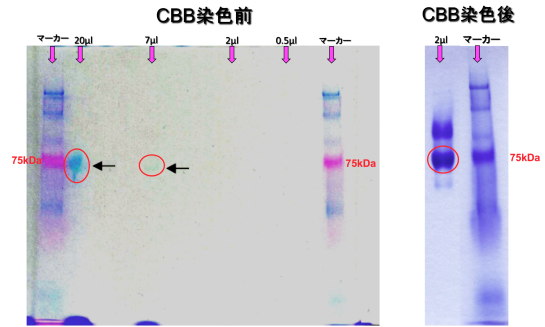
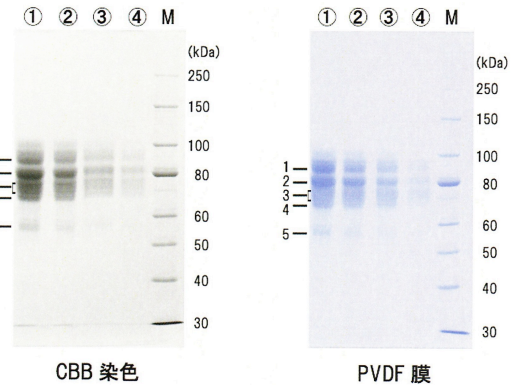


図6. アンギラシアニン画分の Native-PAGE

(4) アンギラシアニン画分の SDS-PAGE

超遠心分離および各種クロマトグラフィーによって単離したアンギラシアニンを SDS-PAGE に供した。アンギラシアニンは 5 本程度のバンドに分離されたが、Native-PAGE の場合と同様、分子量 75,000 ダルトンのバンドが主要成分であった (図7)。



- ① : Eel (10 μ g)
- ② : Eel (5 μ g)
- ③ : Eel (2.5 μ g)
- ④ : Eel (1 μ g)
- M : 分子量マーカー

図7. アンギラシアニン画分の SDS-PAGE

(5) アンギラシアニンの N 末端アミノ酸配列

7.5%SDS-PAGE によって分離されたアンギラシアニンを PVDF 膜に電氣的に転写後、気相シーケンサーで分子量 75,000 ダルトン成分の N 末端アミノ酸配列 20 残基を決定した。得られた配列は、DHHVGHHDALPDRCEGIEFD であった。

(6) アンギラシアニンのペプチドマッピングと内部アミノ酸配列

アンギラシアニンの内部アミノ酸配列を明らかにするために、SDS-PAGE で分離された分子量 75,000 ダルトンのゲルバンドを切り出し、リジルエンドペプチダーゼを用いてペ

プチドマッピングを行った(図8)。ペプチドマッピングの結果、アンギラシアニンは30本以上のペプチドピークに分離され、分取が可能であった2つのペプチド(保持時間47.5分と64.0分)のN末端アミノ酸配列を決定した。得られた内部配列はそれぞれDIPHPFとDVFPGIPDHLDAであった。

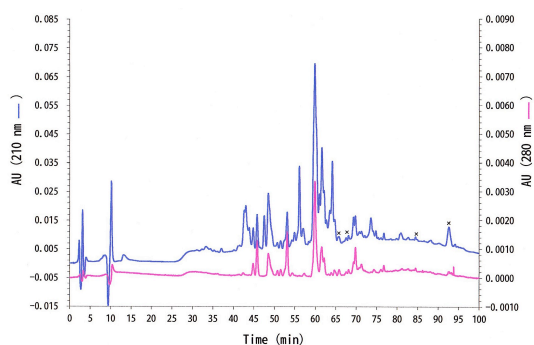


図8. アンギラシアニンのペプチドマッピング

(7) アンギラシアニンのN末端および内部アミノ酸配列とヘモペキシン様タンパク質との相同性

アンギラシアニンのN末端アミノ酸20残基のうち12残基は、ヨーロッパシーバス *Dicentrarchus labrax* の温度順化タンパク質 WAP65 およびニルティラピア *Oreochromis niloticus* のヘモペキシン様タンパク質 (Accession no. XP_003440941/439 残基) と一致していた。また、アンギラシアニンの内部アミノ酸配列12残基のうち11残基は、クロダイ *Acanthopagrus schlegelii* の温度順化タンパク質 65kDa およびニジマス *Oncorhynchus mykiss* のヘモペキシン様タンパク質 (Accession no. CAA92147/446 残基) と一致していた(図9)。ヘモペキシンは血液中の遊離ヘム色素を結合する糖タンパク質であることから、ビリベルジン結合タンパク質であるアンギラシアニンとの相同性が高いことが示唆された。

N末端アミノ酸配列
Nile tilapia 1 MELITRTRLLGLALSLTNAAPAHQDEPAPKDGDAALPDRCEGIEFDAITL 50
Anguillacyanin DHHVGHHDALPDRCEGIEFD

内部ペプチドのアミノ酸配列
Rainbow trout 121 FMLDTKVFSYKHKQLETGFPKDISEVFPGIPDHLDAAVCPA 162
Anguillacyanin DVFPGIPDHLDA

図9. アンギラシアニンとヘモペキシン様タンパク質におけるアミノ酸配列の同一性

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- 1) M. Choudhury, T. Oku, S. Yamada, M. Komatsu, K. Kudoh, T. Itakura, and S. Ando : Isolation and characterization of some novel genes of the apolipoprotein A-I family in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Central European Journal of Biology*, **6**, 545-557 (2011). (DOI: 10.2478/s11535-011-0042-8)

[学会発表] (計1件)

- 1) M. Choudhury・小松正治・山田章二・安藤清一 : ニホンウナギにおける2種の新規アポリポタンパク質A遺伝子の構造. 平成21年度日本水産学会秋季大会(平成21年10月1日、いわて県民情報交流センター・アイーナ) .

[図書] (計1件)

- 1) M. Komatsu, S. Ando, S. Hayashi, T. Furukawa, S. Takumi, K. Aoyama, and T. Takeuchi : A case study of intact vitellogenin isolated from the plasma of wild silver Japanese eel (*Anguilla japonica*). In Jackson E. Rathbond ed. *Handbook of Lipoprotein Research*. Nova Science Publishers, Inc. pp.195-205 (2011).

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計◇件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 清一 (ANDO SEIICHI)

名寄市立大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：80131986

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：