HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヒラメ(Paralichthys olivaceus)血清中の免疫グロブリン(IgM)の精製
Author(s)	西田, 弘子; 榎田, 剛; 平松, 尚志; 原, 彰彦; 吉水, 守
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 49(3), 157-164
Issue Date	1998-12
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/24177
Type	bulletin (article)
File Information	49(3)_P157-164.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北 大 水 産 彙 報
49(3), 157-164, 1998.

ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) 血清中の免疫グロブリン (IgM) の精製

西田　弘子[1)]・榎田　　剛[1)]・平松　尚志[2)]
原　　彰彦[3)]・吉水　　守[1)]

Purification of Immunoglobulin M (IgM) in Serum of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Hiroko NISHIDA[1)], Tsuyoshi ENOKIDA[1)], Naoshi HIRAMATSU[2)]
Akihiko HARA[3)] and Mamoru YOSHIMIZU[1)]

Abstract

Immunoglobulin M (IgM) was purified from the serum of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) by a combination of salting-out, ion-exchange chromatography and gel filtration. At first, the serum was precipitated by addition of ammonium sulfate at 50% saturation. The precipitate collected by centrifugation at 10,000 rpm for 30 min was dissolved and dialyzed against a 0.015 M Tris-HCl buffer, pH 8.0. The dialysate was fractionated by a DEAE cellulose (DE-52) column, equilibrated with the same buffer, using a stepwise elution with the same buffer containing NaCl at 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 and 0.4 M. The fraction eluted by NaCl at 0.15 M was then reprecipitated by ammonium sulfate at 50% saturation, and was collected by centrifugation at 10,000 rpm for 30 min. The precipitate was dissolved in a 0.02 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 2% NaCl and 0.1% NaN_3 and was then gelfiltrated through a Sepharose 6B column with the same buffer. Two distinct protein peaks were obtained. The first peak, collected and concentrated by ultra-titration was refiltrated through the same Sepharose 6B. A single peak was obtained and was collected as the purified Japanese flounder IgM.

The molecular weight of Japanese flounder IgM was determined to be 750,000 by means of 3% SDS-PAGE. The molecular weights of two subunits were estimated to be 75,000 and 23,000 respectively, by SDS-PAGE with 2-mercaptoethanol. Molecular weight of a monomeric IgM could be 196,000 and the whole molecule of Japanese flounder IgM (mol. wt. 750,000) can be considered to have a tetrameric structure.

Key words: Immunoglobulin, Gel filtration, SDS-PAGE, Ion exchange chromatography, *Paralichthys olivaceus*

緒　　言

魚病診断の分野でも慢性疾患や不顕性感染，さらにこれに伴う既往症の診断やワクチン投与時

[1)] 北海道大学水産学部生物化学工学講座（旧微生物学座）
(*Laboratory of Biochemical Process Technology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)
[2)] 北海道大学水産学部附属七飯養殖実習施設
(*Nanae Fish Culture Experimental Station, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)
[3)] 北海道大学水産学部機能生物学講座
(*Laboratory of Aquatic Breeding Science, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)

の免疫効果の判定などを目的に，魚類の血中に存在する病原体に対する特異抗体を検出する方法が取り上げられている (Yoshimizu, et al., 1992, 1997 ; Furuta, et al., 1995 ; Nishida, et al., 1998)。魚類の病原体に対する抗体の検出を行うには，被検魚の免疫グロブリンに対する抗血清あるいは抗体が必要となる。その際，用いる抗血清が IgM のみと特異的に反応するのであれば，被検魚血清中に存在する供試抗原との非特異的反応を減少させることができる。

魚類の IgM は近縁魚種間では大きな違いが見られず，交叉反応することが知られている (Mochida, et al., 1994)。そこで今回，ELISA 法を用いてヒラメ血液中の病原体に対する抗体の検出に用いるためのヒラメ IgM に対する抗血清を作製すべく，ヒラメとマツカワの IgM の交叉反応性を利用し，抗マツカワ IgM ウサギ血清を用いてヒラメ IgM 画分の確認を行いながら，ヒラメ IgM を血清より硫安塩析，イオン交換クロマトグラフィー，およびゲル濾過によって分離精製した。さらに精製品を家兎に免疫し，ウサギ抗ヒラメ IgM 血清を作製した。

材 料 と 方 法

供試魚および採血方法

供試血清は北海道立栽培漁業総合センターで飼育中のヒラメ成魚から採血し，遠心分離 (4,000 rpm, 20 min) して得られたものを用いた。血清は実験に使用するまで 5°C の冷蔵庫内で保存した。

IgM の精製

ヒラメの IgM の精製は，Kobayashi et al. (1982) および布田ら (1989) の方法に順じて行った。すなわち，血清試料と等量の飽和硫安溶液を加えて室温で 1 時間攪拌し，遠心分離 (14,000 rpm, 30 min) して沈殿を集めた。集めた沈殿を少量の 15 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に溶解して，同緩衝液に対して 4°C で 14 時間透析した。透析後，遠心分離 (14,000 rpm, 30 min) により上清を得，硫安塩析画分とした。

次ぎに，得られた硫安塩析画分 15 ml を 15 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した DEAE-cellulose (DE-52, Whatman) カラム (2.8×15 cm) に吸着させ，ステップワイズ法により NaCl 濃度 0.05 M, 0.1 M, 0.15 M, 0.2 M および 0.4 M で順次溶出させた。溶出の速度は 133 ml/h で，溶出液の分取は 8 ml/tube で行った。寒天内 2 次元免疫拡散法 (Ouchtelony, 1953) によりヒラメの IgM に交叉反応性を持つウサギ抗マツカワ IgM 血清に対して強い沈降線が確認された 0.15 M NaCl 濃度で溶出した IgM を含む画分 64 ml を集め，50% 飽和硫安濃度で塩析を行い，得られた沈殿を 50% 飽和硫安溶液で 1 回洗浄した。その後，沈殿を 2% NaCl, 0.1% NaN_3 を含む 0.02 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 2 ml に溶解し，Sepharose 6B (Pharmacia) カラム (2.2×56.5 cm) によるゲル濾過を行った。溶出は同溶液を用いて流速は 20 ml/h，分取は 1.5 ml/tube で行った。得られたタンパク質ピークのうち，Ouchtelony 法により強い沈降線が確認された IgM を含む画分約 160 ml を集め，透析膜 (8/32 三光純薬 UC8-32-25) を用いて減圧下で約 1 ml まで濃縮した後，再び Sepharose 6B カラムを用いてゲル濾過を行い，得られたピークを精製 IgM とした。

精製過程の IgM の検出

本研究室所有のヒラメに対して交叉反応を持つマツカワ (*Verasper moseri*) の IgM に対するウサギ血清を用い，ヒラメ IgM の検出を行った。

ゲル内沈降反応法は Ouchtelony の方法に従い，0.05 M ベロナール緩衝液，pH 8.6 に溶解した 1% アガロース (Litex, HAS) を用いて行った。

分子量測定

濃度勾配スラブゲル (5-22.5%) を用いた。Tris 系緩衝液での SDS (sodium dodecyl sulfate) ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は，Laemmili (1970) に従った。試料の処理は，終濃度 1% となるように SDS を添加し，100°C で 2 分間行った。また，タンパク質を還元処理する場合には，試料に 2-メルカプトエタノール (2-ME) および SDS を濃度がそれぞれ 1% となるように添加後，100°C にて 2 分間処理した。試料を厚さ 1 mm のスラブゲル上に添加後，Bromphenol Blue (BPB) が濃縮用ゲル中を通過するまで 16 mA 定電流で，分離用ゲル内に入ってからは 24 mA 定電流で約 4 時間泳動した。

3% SDS-PAGE はフォスフェイト系緩衝液 (Weber and Osborn, 1969) を用い，Kobayashi and Hirai (1980) に従った。0.5% アガロースを含む 3% ゲルはアクリルアミド溶液 (19% アクリルアミド，1% ビスアクリルアミド) 4.5 ml, 0.2% の SDS を含む 0.2 M リン酸緩衝液 ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 53.7 g ; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 8.2 g, SDS, 2 g/L) 15 ml, 3-ジメチルアミノプロピオニトリル 0.15 ml の混合液を 60～65°C に加温した後，あらかじめ同温度に加温した 1.5% アガロース 10 ml を加え，10% アンモニウムパーサルフェイト 0.3 ml を添加後，ゲル板に入れ，約 30 分間室温で静置し作製した。試料の処置は前記の Tris 系での SDS-PAGE と同様に行った。電気泳動は 150 V 低電圧で数時間泳動した。泳動用の緩衝液は 0.1% SDS を含む 0.1 M リン酸緩衝液を用いた。

染色は，1% クマシーブリリアントブルーR-250 を 40% エタノール，10% 酢酸に溶解した溶液にて行い，脱色は，40% エタノール，10% 酢酸，2.5% グリセリンの混合液で行った。

精製ヒラメ IgM に対する抗血清の作製

ヒラメ IgM に対する家兎抗血清は，以下の方法で作製した。精製したヒラメ IgM を 250 μg/ml の濃度に調整し，等量の Freund's complete adjuvant (Gibco) と混合してエマルジョンを作製した。このエマルジョン 2 ml を SPF (specific pathogen free) ニュージーランドホワイトラビット (日本 SNC) の背部皮下に接種し，その後ほぼ一週間隔で 4 回耳静脈から追加免疫を行った。ブースター投与後採血し，血球を凝固させ，分離した血清を集め，56°C で 30 分間非動化し，ミリポアフィルターHA (0.45 μm) で濾過後，分注して－80°C に保管した。

結　　果

ヒラメ IgM の精製

ヒラメ血清の 50% 飽和硫安沈殿画分を DEAE セルロースカラムでイオン交換クロマトグラフィーを行い，その溶出の結果を Fig. 1 に示した。非吸着画分を溶出後，0.15 M NaCl 濃度で最も多くのタンパク質が溶出した。Ouchtelony 法の結果からも 0.15 M NaCl 濃度において IgM が最も多く溶出したことが確認された。これらの溶出画分のうち，280 nm における吸光値が 0.7 以上の値を示した画分 No. 114～124 をプールし，濃縮した。この濃縮液の Sepharose 6B カラムによるゲル濾過パターンを Fig. 2 に示した。最初のゲル濾過の結果 (Fig. 2A) では 2 つのピークが生じたが，Ouchtelony 法により最初のピークに IgM が含まれることが判明した。画分 No. 31～41，すなわち最初のピークの頂点までをプールし，再度濃縮した後，再びゲル濾過を行った。二度目のゲル濾過溶出パターンで単一のピークを示し (Fig. 2B)，電気泳動パターン (Fig.4) から，ピークの頂点となる画分 No. 20 を精製ヒラメ IgM とした。

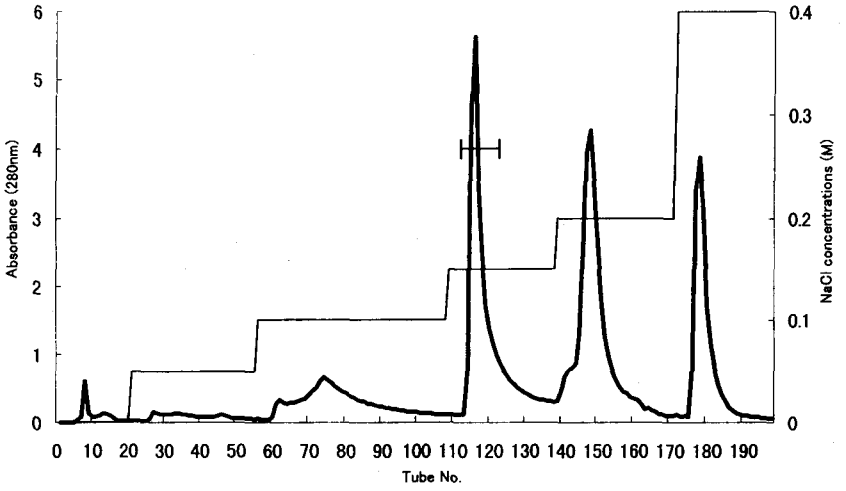

Fig. 1. DEAE cellulose (DE-52) chromatography of the Japanese flounder serum precipitated with ammonium sulfate at 50% saturation. A stepwise elutions with 0.015 M Tris-HCl buffer pH 8.0, containing different NaCl moralities i.e., 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 and 0.4 M were employed for the separation of proteins. Fractions indicated by bars were pooled and further fractionated by means of Sepharose 6B gel filtration.

IgM の分子量および subunit 構造

非還元下での 3% SDS-PAGE では, Fig. 3 に見られるように移動度の遅いバンドの他に 2 本のバンドが観察され, 濃いバンドの分子量は, 750,000 と推定された。

ヒラメ IgM を 2-ME により還元処理をし, SDS-PAGE を行った結果 (Fig. 4) では, ヒラメ IgM は H 鎖と L 鎖に相当すると思われる二本のバンドを示した。それぞれのバンドの分子量は 75,000 および 23,000 と測定された (Fig. 5)。

抗ヒラメ IgM ウサギ血清の作製

精製ヒラメ IgM をウサギに接種し, 得られたウサギ抗ヒラメ IgM 血清は, 精製ヒラメ IgM およびヒラメ血清との間に 1 本の沈降線を形成した (Fig. 6)。

考　　察

魚類の疾病履歴診断法の一つとして, 血清学的診断法がある。その一つである ELISA 法では, 抗体検出に使用する抗血清は, 検査対象魚の免疫グロブリンを精製し, それに対する抗血清を用いる方が好ましい。

これまで魚類の Ig の精製試料を得るためには, あらかじめ菌体や異種の動物の赤血球などを接種することによって抗原刺激を施し, 血清中の抗体量を増加させ, その抗原に対する抗体を検出することを指標にして IgM の精製が行われてきたが (Yoshimizu, et al., 1992; Furuta, et al., 1995), 今回はヒラメとマツカワ間の IgM の交叉反応性を利用し, 抗マツカワ IgM ウサギ血清を用いてヒラメ IgM 画分の確認をしながら, 抗原刺激をしない正常魚血清から硫安塩析, DEAE イオン交換クロマトグラフィー, Sepharose 6B のゲル濾過法により, IgM の分離精製を行った。

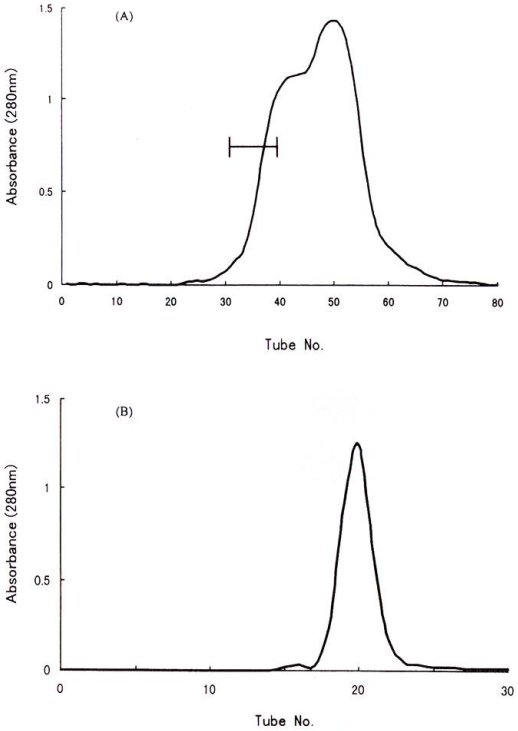

Fig. 2. Sepharose 6B gel filtration of Japanese flounder serum protein in the 0.015M NaCl fraction from the DEAE-cellulose (DE-52) chromatography (A). Fraction as indicated by bar were collected, and were re-fractionated by the same Sepharose 6B (B).

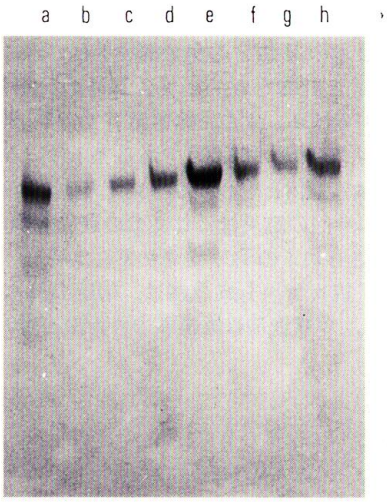

Fig. 3. SDS-PAGE (3%) profile of gel filtration fractions. Band patterns of fractionated Japanese flounder IgM were compared with Jupanese huchen IgM (Lane a). From lane b to lane h indicated gel filtraton fractions number from 17 to 23. Fraction number of 20 (Lane c), the top of the filtration peak was selected for purified IgM.

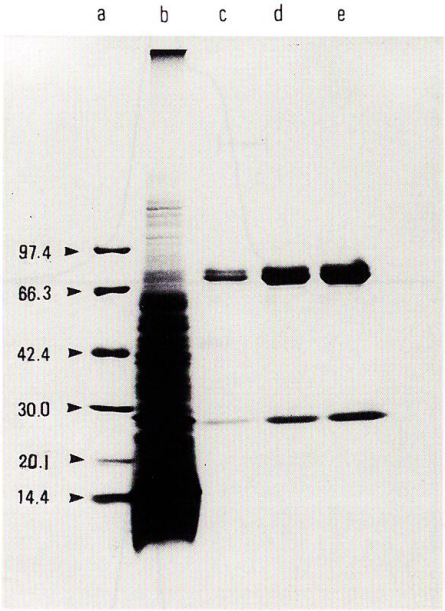

Fig. 4. SDS-Gradient PAGE of purified Japanese flounder IgM by Sepharose 6B gel filtration.
a : Molecular Marker
b : Whole serum of Japanese flounder
c : Fraction No. 19
d : Fraction No. 20
e : Fraction No. 21

ヒラメ IgM の分子量は非還元下の 3% SDS-PAGE では，750,000 であり，還元後の SDS-PAGE で出現した二つのサブユニットの分子量はそれぞれ H 鎖として 75,000, L 鎖として 23,000 であった。ヒラメの IgM の単量体が 2 本の H 鎖と L 鎖で構成されているとすると，単量体の分子量は 196,000 (75,000×2+23,000×2) と計算され，ヒラメ IgM の分子量 750,000 は 196,000 の 4 量体 (196,000×4=784,000) とほぼ一致する。また，非還元下での 3%SDS-PAGE において，4 量体および単量体の分子量がそれぞれ 750,000, 182,000 であるイトウ (*Hucho perryi*) の IgM サンプルとの比較から，ヒラメの IgM は 4 量体と思われるバンドの他に 3 量体，2 量体の分子量に相当する位置にもバンドが観察され，今回の結果はこれまでの硬骨魚類の報告とほぼ一致した (小林, 1986 ; Mochida, et al., 1994)。さらにこの IgM をウサギに免疫し，抗ヒラメ IgM ウサギ血清を作製したところ，得られたウサギ抗ヒラメ IgM 血清は，精製 IgM ならびにヒラメ血清と Ouchterlony 法で一本の沈降線を形成し，本抗血清は血清学的診断法に用いるに十分な特異性をもつことが確認された。

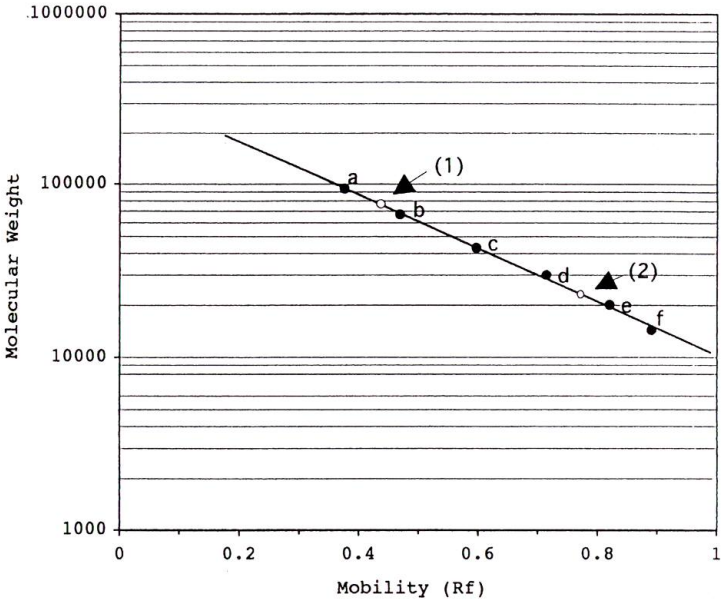

Fig. 5. Estimation of molecular weight of purified IgM subunits by SDS-PAGE. Molecular weight of H-chain was estimated to be 75 kDa (1) and that of L-chain was estimated to be 23 kDa (2). Molecular weight of standard proteins were marked with dots ; a : Phosphorylase b (97.4 kDa). b : Albumin (66.2 kDa). c : Ovalbumin (42.4 kDa). d : Carbonic anhydrase (30.0 kDa). e : Trypsin inhibitor (20.1 kDa). f : α-Lactalbumin (14.4 kDa).

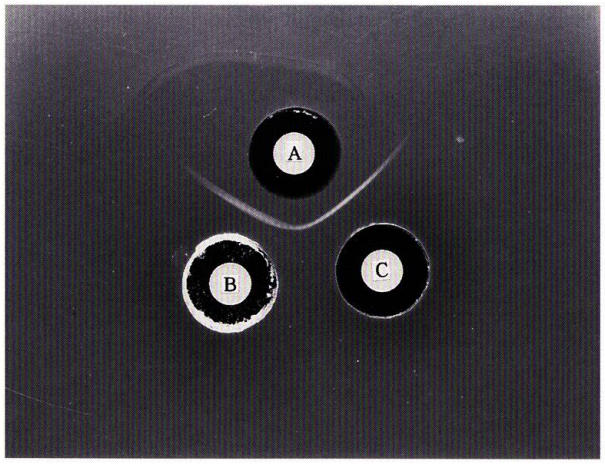

Fig. 6. Double immunodiffusion precipitation of serum and purified Japanese flounder IgM against anti-Japanese flounder IgM serum.
A : Anti-Japanese flounder IgM rabbit serum
B : Whole serum of Japanese flounder
C : Purified Japanese flounder IgM

文　　献

布田博敏・原　彰彦・山崎文雄 (1989). サクラマス (*Onchorhynchus masou*) 血清の免疫グロブリン M (IgM) の精製および定量. 北大水産彙報, **40**, 292-306.

Furuta, T., Iida, T., Trongvanichnam, K., Sakaguchi, I. and Wakabayashi, H. (1995). Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the detection of antibody in serum of Japanese flounder. *Fisheries Science*, **61**(4), 663-667.

小林邦彦 (1986). 系統発生と免疫グロブリン系の進化. 蛋白質核酸酵素, **31**, 904-918.

Kobayashi, K., Hara, A., Takano, K. and Hirai, H. (1982). Studies on subunit components of immunoglobulin M from a bony fish, the chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Molec. Immun.*, **19**, 95-103.

Kobayashi, K. and Hirai, H. (1980). Studies on subunit components of chicken polymeric immunoglobulins. *J. Immunol.*, **124**, 1695-1704.

Laemmili, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

Mochida, K., Y..-H.Lou, Hara, A. and Yamauchi, K. (1994). Physical biochemical properties of IgM from a teleost fish. *Immunology*, **83**, 675-680.

Nishida, H., Yoshimizu, M. and Ezura, Y. (1998). Detection of antibody against lymphocystis disease virus in Japanese flounder by enzyme linked immunosorbent assay. *Fish Patholo.*, **33**(4), 199-215.

Ouchtelony, O. (1953). Antigen-antibody reactions in gels. IV. Types of reactions in coordinated systems of diffusion. *Acta. Path. Microbiol. Scand.*, **32**, 231-240.

Weber, K. and Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight detections by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **224**, 4406-4412.

Yoshimizu, M., Dirakubusarakom, S., Nomura, T., Ezura, Y. and Kimura, T. (1992). Detection of antibody against *Aeromonas salmonicida* in the serum of salmonid fish by enzyme linked immunosorbent assay. *Fish Patholo.*, **27**, 73-82.

Yoshimizu, M., Suzuki, K., Nishizawa, T., Winton, J.R. and Ezura, Y. (1997). Antibody screening for the identification of nervous necrosis virus carriers in a flounder brood stock. P. 21-24, Inui, Y. (ed.). *New Approaches to Viral Diseases of Aquatic Animals*. National Institute of Aquaculture, International Workshop, Kyoto.