



Title	サクラマス (<i>Oncorhynchus masou</i>) 血清の免疫グロブリン (IgM) の精製および定量
Author(s)	布田, 博敏; FUDA, Hirotoshi; 原, 彰彦 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 40(4), 292-306
Issue Date	1989-11
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/24040
Type	departmental bulletin paper
File Information	40(4)_P292-306.pdf



サクラマス (*Oncorhynchus masou*) 血清の免疫グロブリン
(IgM) の精製および定量*

布田 博敏**・原 彰彦***・山崎 文雄**

Purification and Quantification of Immunoglobulin M (IgM)
in Serum of Masu Salmon (*Oncorhynchus masou*)

Hirotohi FUDA**, Akihiko HARA***
and Fumio YAMAZAKI**

Abstract

Immunoglobulin M (IgM) was purified from the serum of masu salmon (*Oncorhynchus masou*) by a combination of salting-out, ion-exchange chromatography and gel filtration. At first, the serum was precipitated by the addition of ammonium sulfate at 50% saturation. The precipitate collected by centrifugation at 10,000 rpm for 10 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 0.1 M was then reprecipitated by ammonium sulfate at 50% saturation, and was collected by centrifugation at 10,000 rpm for 10 min. The precipitate was dissolved in a 0.02 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 2% NaCl and 0.1% NaN₃, and was then gel filtered through a Sepharose 6B column with the same buffer. Two distinct peaks were obtained. The first peak, collected and concentrated by lyophilization was refiltrated through the same Sepharose 6B. A single and symmetrical peak was obtained and was collected as the purified masu salmon IgM.

Immunoelectrophoresis of the purified IgM revealed a single precipitin line with a polyvalent antiserum to masu salmon serum proteins as well as with a specific antiserum to chum salmon IgM. Conversely, the antiserum raised against the purified preparation gave rise to a single precipitin line with the masu salmon whole serum, suggesting that the IgM preparation was pure. Cellulose acetate membrane electrophoresis of the preparation revealed a single band at the β -region.

The molecular weight of masu salmon IgM was determined to be 750,000 by means of 3% SDS-PAGE. The molecular weights of two subunits, μ and light chains (L), were estimated to be 68,000 and 23,000 respectively, by SDS-PAGE with 2-mercaptoethanol. The mol. wt. of a monomeric IgM could be 182,000 (μ_2L_2) and the whole molecule of masu salmon IgM (mol. wt. 750,000) can be considered to have a tetrameric structure.

The concentration of serum IgM in masu salmon was determined by single radial

* 北海道大学水産学部附属七飯養魚実習施設業績第 46 号
(Contribution No. 46 from Nanae Fish Culture Experimental Station, Faculty of Fisheries,
Hokkaido University)

** 北海道大学水産学部発生学遺伝学講座
(Laboratory of Embryology and Genetics, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

*** 北海道大学水産学部附属七飯養魚実習施設
(Nanae Fish Culture Experimental Station, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

immunodiffusion (SRID) with the antiserum to the chum salmon IgM using purified masu salmon IgM as a standard. The concentration of the purified masu salmon IgM was estimated by a Bio-Rad Protein Assay kit using bovine IgG as the standard. The range of IgM in the serum was 0.6-2.7 mg/ml for mature males.

The immunological cross-reactivity among IgM of masu salmon, Japanese charr (*Salvelinus leucomaenis*), smelt (*Osmerus eperlanus mordax*) and hybrid sturgeon (best, female *Huso huso* × male *Acipenser ruthenus*) was tested using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with anti-chum salmon IgM antibody. The IgMs of masu salmon, Japanese charr and smelt showed cross-reactivity on the ELISA, however, that of sturgeon did not.

免疫グロブリン (Ig) は、生体内に入ってきた細菌などの異物に結合し、中和させ、食細胞などによって摂取され、分解されやすくする重要な働きをしている。ヒトの Ig は IgG を初めとして IgM, IgA, IgD, IgE の 5 つのクラスが知られている。魚類の Ig は、1 種類で高等脊椎動物の IgM クラスに属すると考えられている。ヒトと軟骨魚類の IgM は、主として 5 量体である (Clem and Small, 1967; Kobayashi et al., 1984) のに対して硬骨魚類は 4 量体と報告されている (Shelton and Smith, 1970, Acton et al., 1971b)。魚類において、Ig は系統発生的興味から多くの研究がなされている (総説: Snieszko, 1970; Corbel, 1975; 大西, 1977; Ingram, 1980; Ellis, 1982; Ambrosius and Richter, 1985; 小林, 1986, 1987)。円口類では、メクラウナギ (Kobayashi et al., 1985)、板鰐類は、lemon shark (Clem and Small, 1967), nurse shark (Voss et al., 1969), stingray (Johnston et al., 1971), ガンギエイ (Kobayashi et al., 1984) の魚種で報告されている。一方、硬骨魚類は、カレイ (Fletcher and Grant, 1969), コイ (Shelton and Smith, 1970; Marchalonis, 1971), キンギョ (Trump, 1970; Marchalonis, 1971), ヘラチョウザメ (Acton et al., 1971c), gar (Acton et al., 1971a; Bradshaw et al., 1971), bowfin (Bradshaw and Sigel, 1972), channel catfish (Hall et al., 1973), ブリ (福田・楠田, 1982; Matsubara et al., 1985; 浜口・楠田, 1988), toadfish (Warr, 1983) などの他、特にサケ科魚類及びその近縁類ではサケ (Kobayashi et al., 1982), ニジマス (倉茂ら, 1972; Warr et al., 1983; Watanabe and Suzuki, 1986), アユ (伊丹ら, 1988) がある。

動物の Ig の同定法としては、1) 蛋白質のアミノ酸配列の相似性、2) 免疫学的交叉反応性、3) 特定の Ig に特徴的な組織分布性やある種の細胞や蛋白質との結合性、4) 物理学的性格の相似性、に基づく方法が挙げられる (小林, 1987)。今回、サクラマスの免疫機能の発現に関する基礎研究の一つとして、家兎抗サケ IgM 血清を用い、免疫学的交叉性を利用してサクラマス IgM を検出し、サクラマス IgM の分離精製を行った。また、一元放射状免疫拡散法 (Mancini 法, SRID) および酵素免疫測定法 (ELISA) により血清中の IgM の定量を試み、併せて免疫学的交叉反応性を観察したので報告する。

材料と方法

血清試料 IgM の精製材料としてのサクラマス *Oncorhynchus masou* は、1988 年 9 月 30 日北海道立水産孵化場森支場および北海道大学水産学部附属七飯養魚実習施設において飼育の約 20 尾の 2 年魚雄個体を用いた。免疫学的交叉反応性を観察するための血清試料としては七飯養魚実習施設で飼育中の本州イワナ *Salvelinus leucomaenis* 2 年魚雄、河川遡上のキュウリウオ *Osmeridae eperlanus mordax* 雄個体および水産庁養殖研究所飼育のチョウザメ雑種 F_1 , ベステル (*Huso huso* L. ♀ × *Acipenser ruthenus* ♂) の 3 年魚雄を用いた。

採血は常法に従い供試魚の尾柄部より注射器により行い、室温にて数時間静置した後、3,000 回転、20 分間遠心後、血清を得た。血清は分析するまで -20°C に保存した。

サクラマス IgM の精製 概ね, Kobayashi et al. (1982) のサケ IgM の精製方法に順じて以下のように行った。プールしたサクラマス血清 100 ml に 50% 飽和硫酸濃度となるよう固形硫酸を加え、一晚 4°C で攪拌しながら塩析を行った。得られた沈澱は 10,000 回転, 10 分間遠心し, 50% 飽和硫酸溶液で 3 回洗浄した。沈澱を少量の蒸留水 (DW) に溶解した後, 0.015 M Tris-HCl 緩衝液, pH 8.0 に透析後, 同液で平衡化した DEAE セルロース (DE-52, Whatman) のカラム (5×5 cm) に添加し, 非吸着分画を溶出後, 上記緩衝液に NaCl を加え, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.4 M の濃度とし順次 stepwise 法で溶出した。カラムの流速は 2.2 ml/min とし 10 ml/tube ずつ分取した。0.1 M NaCl 濃度の溶出液 100 ml を得, 等量の飽和硫酸を加え, 50% 飽和硫酸濃度とし, 10,000 回転, 10 分間遠心した後, 沈澱を同飽和液で一回洗浄した。その後, 沈澱を 2% NaCl, 0.1% NaN₃ を含む 0.02 M Tris-HCl 緩衝液, pH 8.0 に溶解し, Sepharose 6B (2.2×56.5 cm) によるゲル濾過を行った。緩衝液は, 上記の Tris-HCl 緩衝液を用いた。流速は 12.4 ml/h とし 2.7 ml/tube ずつ分取した。得られた 2 つの peak のうち first peak を凍結乾燥により濃縮後, 再び Sepharose 6B に添加し, 再ゲル濾過を行い, 主たる 1 peak を得, 精製サクラマス IgM とした。

抗血清 サクラマス血清に対する家兎抗血清は, Hara (1976) の方法に従って作製した。またサケ IgM に対する特異抗血清は Kobayashi et al. (1982) と同様のものを使用した。

サクラマス IgM に対する抗血清は, 精製 IgM を 250 μg/ml の濃度に調整後, 1 ml を取り, 等量の Freund's complete adjuvant と混合し, エマルジョンを作製後, 家兎背部の皮下に注射し, ほぼ 1 週間隔で 4 回免疫して作製した。

電気泳動法および免疫学的方法 セルロースアセテート膜電気泳動法は, セロゲルを用い, 0.05 M ベロナール緩衝液, pH 8.6 により約 20 分, 175 V 定電圧で電気泳動した。染色は, 45% methanol, 10% acetic acid の混合液に Amido Black 10B を 0.5% (w/v) の濃度となるように溶解したのものにより 1 分間行い, 脱色は, methanol, DW, acetic acid (475:475:50) の混合液を用いた。

二元免疫拡散法 (Ouchterlony 法) は, Ouchterlony (1953) の方法, 一元放射状免疫拡散法 (Mancini 法, SRID) は, Mancini et al. (1965) の方法, 免疫電気泳動法 (IEP) は, Grabar and Williams (1953) の方法にそれぞれ従い, 0.05 M ベロナール緩衝液, pH 8.6 に溶解した 1% agarose (Litex, HSA) を用いて行った。

分子量測定 濃度勾配スラブゲル (5-25%) を用いた Tris 系緩衝液での SDS (sodium dodecyl sulfate) ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) は, Laemmli (1970) に従った。試料の処理は Hara and Hirai (1978) に従った。即ち, 試料に SDS 濃度が 1% になるように 10% SDS を添加し, 37°C, 2 時間または 100°C, 2 分間処理した。また蛋白質を還元処理する場合は, 試料に 2-mercaptoethanol (2-ME), SDS 濃度がそれぞれ 1% になるように添加後, 60°C, 1 時間または 100°C, 2 分間処理した。処理を施した試料を厚さ 1 mm のスラブゲル上に添加後, 試料に添加した Bromphenol Blue (BPB) がゲルの先端に移動するまで泳動した。泳動条件は, 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 24 mA 定電流で約 4 時間行った。一方, 一昼夜での泳動時は 25 V 定電圧で行った。

3% SDS-PAGE は phosphate 系緩衝液 (Weber and Osborn, 1969) を用い, Kobayashi and Hirai (1980) に従って作製した。即ち, 0.5% agarose を含む 3% ゲル (厚さ 1 mm のスラブゲル) は, アクリルアミド溶液 (19% Acrylamide, 1% Bis-acrylamide) 4.5 ml, DW 0.05 ml, 0.2% の SDS を含む 0.2 M リン酸緩衝液 (Na₂HPO₄ · 12H₂O, 53.7 g; NaH₂PO₄ · 2H₂O, 8.2 g; SDS, 2 g) 15 ml, 3-dimethylaminopropionitrile 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溶解させておいた 1.5% agarose, 10 ml を加え, 10% ammonium persulfate, 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。試料の処理は前記の Tris 系での SDS-PAGE と同様に行った。電気泳動は 150 V 定電圧で数時間, もしくは 20~30 V 定電圧で一昼夜泳動した。

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、40% ethanol, 10% acetic acid の混合液に Coomassie Brilliant Blue R-250 を 0.1% (w/v) の濃度となるように溶解したのものにより行い、脱色は、20% ethanol, 5% acetic acid, 2.5% glycerin の混合液で行った。

分子量マーカーには、human IgM (mol. wt. 900,000, μ 鎖 70,000, L 鎖 23,000), human IgA (mol. wt. 160,000 α 鎖 54,000), human IgG (mol. wt. 160,000, γ 鎖 50,000) を用いた。

ゲル濾過での分子量測定は、Sephacrose 6B のカラム (2.2×56.5 cm) を用いた。分子量マーカーは human IgM, thyroglobulin (mol. wt. 670,000) 及び ferritin (mol. wt. 470,000) を用いた。

アミノ酸分析 試料は 6N HCl (1% phenol を含む) で、130°C, 4, 8, 24 時間加水分解した後、空気酸化を行い、ベックマンアミノ酸分析計 6300E に添加した。検出は、ニンヒドリン法で行い、定量は 1 nmol アミノ酸スタンダードを用いた絶対検量線法で行った。アミノ酸のうち valine は 24 時間の値を、isoleucine は 8 時間の値を用い、threonine, serine は 0 時間の値をグラフより求め、残りのアミノ酸は 4 時間の値を用いた。

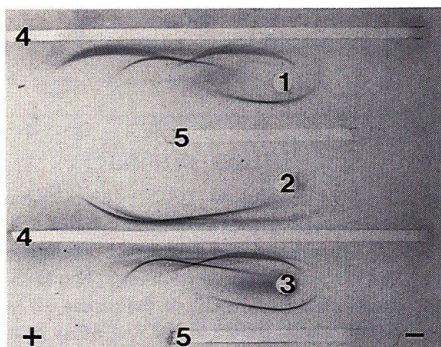
SRID による IgM 量の測定 Bio-Rad Protein Assay kit を用い、bovine IgG を蛋白量の standard として、精製サクラマス IgM の蛋白量を測定した。測定したサクラマス IgM から standard (25, 50, 100, 200, 400 μ g/ml) を作製し、前述の SRID よりサクラマス血清中の IgM の測定を行った。SRID プレートに用いた抗血清は、抗サケ IgM 血清であり、その濃度は 1%, 2% とし比較を行なった。

Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗サケ IgM 抗体作製 抗サケ IgM 血清から硫酸塩析、イオン交換クロマトグラフィーにより家兎 IgG を精製した。即ち、抗サケ IgM 血清 2 ml に飽和硫酸 1.34 ml を加え、40% 飽和硫酸濃度とし、沈澱を遠心により得、さらに同飽和濃度溶液で 3 回洗浄した。その沈澱物を PBS 1 ml に溶解させ、0.0175 M リン酸緩衝液、pH 6.3 に一晚透析後、同液にて平衡化した DEAE セルロース (DE-52, Whatman) のカラムに添加し非吸着分画を集め、セルロースアセテート膜電気泳動により 1 本のバンドを確認後精製 IgG とした。

次に精製 IgG を過ヨウ素酸々化法により以下のように HRP を標識した。HRP (ペーリンゲーマンハイム社, ELISA 用) 4 mg を 1 ml の DW に溶解し、0.2 ml の 0.1 M NaIO_4 溶液を加え、20 分間室温にて攪拌しながら反応させ、1 mM 酢酸緩衝液、pH 4.5 に一晚透析後、0.2 M 炭酸水素緩衝液、pH 9.5 に溶解した 8 mg の IgG 溶液に加えて、2 時間室温にて攪拌させた。氷水中に冷却後、4 mg/ml NaBH_4 溶液 0.1 ml を加え 2 時間 4°C で攪拌し、PBS に透析後、Sephadex G-200 (2.5×73 cm) にてゲル濾過を行い、HRP-IgG を得た。

ELISA の手順 続ら (1984) の方法に従い、以下のように行った。

Fig. 1. Immunoelectrophoresis of salting-out fractions with ammonium sulfate at 50% saturation. 1: masu salmon serum, 2: supernatant of 50% ammonium sulfate saturation, 3: precipitate of 50% ammonium sulfate saturation, 4: polyvalent antiserum to masu salmon serum proteins, 5: specific antiserum to chum salmon IgM.



1) 96穴のELISA用マイクロタイタープレート (Linbro/Titertek, No. 76-381-04) の各wellに50 $\mu\text{g/ml}$ の精製IgG (抗サケIgM) を150 μl 入れ, 室温で2時間静置し, 抗体を各wellにcoatingした。

2) 0.9% NaCl, 200 μl で1回洗浄後, 1% BSA, 0.01% thimerosal を含む0.01 M リン酸緩衝液, pH 7.0 を150 μl 入れ, 室温で1時間反応させ blocking した。

3) 0.9% NaCl, 200 μl で1回洗浄後, 試料血清およびサクラマスIgMのstandard (0.6, 6, 60, 600, 6,000, 60,000, 600,000 ng/ml) を100 μl (1% BSA, 0.01% thimerosal を含む0.01 M リン酸緩衝液, pH 7.0 にて希釈) 入れ, 室温で4時間または37°C で2時間反応させた (1次反応)。

4) 0.9% NaCl, 200 μl で2回洗浄後, HRP-IgG (131 $\mu\text{g/ml}$) を1% BSA, 0.01% thimerosal を含む0.01 M リン酸緩衝液, pH 7.0 で500倍希釈したものを100 μl 入れ, 室温で一晩または37°C で4時間反応させた (2次反応)。

5) 0.9% NaCl, 200 μl で3回洗浄後, o-phenylenediamine を3 mg/ml の濃度となるように0.1 M citric acid-NaHPO₄, pH 5.0 に溶解したものを150 μl を加え, 室温で10-60分間反応させ, 発色させた。各wellから120 μl とり, 1 N HCl 1 ml に入れ, 充分混和させて発色を停止後, 492 nm の吸光度を測定した。

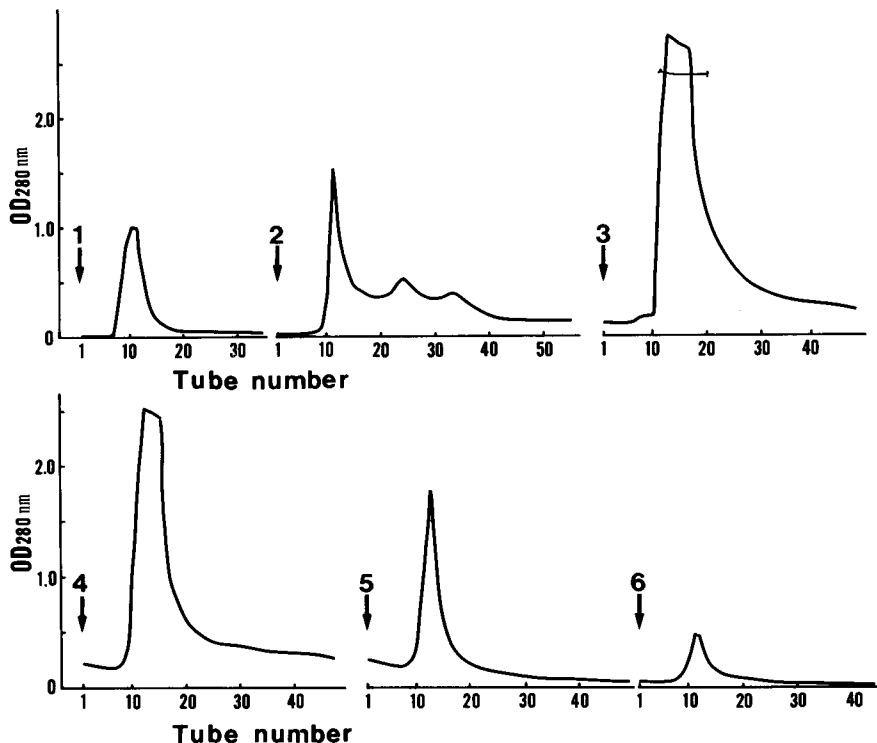


Fig. 2. DEAE cellulose (DE-52) chromatography of the masu salmon serum precipitated by ammonium sulfate at 50% saturation. A stepwise elution with 0.015 M Tris-HCl buffer pH 8.0, containing different NaCl molarities i.e., 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 and 0.4 were employed for the separation of proteins. Fractions as indicated by bars were pooled and further fractionated by means of Sepharose 6B gel filtration (see Fig. 4). 1: original buffer, 2: 0.05 M NaCl, 3: 0.1 M NaCl, 4: 0.15 M NaCl, 5: 0.2 M NaCl, 6: 0.4 M NaCl.

結 果

IgMの精製

サクラマス血清の50%飽和硫酸塩析後の分画の免疫電気泳動 (IEP) パターンを Fig. 1 に示す。サクラマス血清は抗サクラマス血清に対し10数本の沈降線を示した。一方、抗サケ IgM 血清に対しては陰極側に一本の沈降線のみを示し、サクラマスの IgM を検出した。50%硫酸上清には IgM は観察されないが、沈澱分画には高濃度に見られ、また抗サクラマス血清に対しては well 近くに複数の沈降線が見られた。

50%硫酸塩析沈澱分画の DEAE セルロースカラムの溶出パターンおよび各溶出分画の IEP パターンを Fig. 2 および Fig. 3 に示した。DEAE 溶出パターンでは、NaCl 濃度 0.1 M と 0.15 M にほとんどの蛋白が溶出された。IEP より IgM は 0.1 M 以降の各分画に観察されたが、main は NaCl 濃度 0.1 M で溶出された (Fig. 3)。

Fig. 4A に DEAE セルロースカラムでの 0.1 M NaCl 溶出分画の Sepharose 6B の溶出パターンを示した。SRID の結果からは IgM はフラクション No. 29-54 に観察された。フラクション No. 38-43 を pool し、凍結乾燥後、再びゲル濾過を行った。その溶出パターンを Fig. 4B に示した。void volume に小さな peak を認めたが、フラクション No. 42, 43 を peak とする symmetric な peak を得、精製サクラマス IgM とした。

サクラマス血清から50%硫酸塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過の各過程および精製サクラマス IgM の IEP パターンを Fig. 5 に示した。IgM はゲル濾過により高度に精製されたことが観察された。精製 IgM は抗サケ IgM 血清と抗サクラマス血清に対して一本の沈降線が見

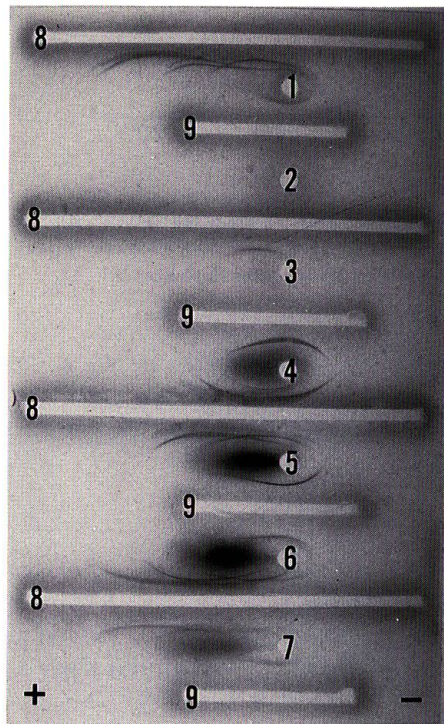


Fig. 3. Immunoelectrophoresis of fractions from the DEAE cellulose (DE-52) chromatography. 1: masu salmon serum, 2: pass through, 3: 0.05 M NaCl, 4: 0.1 M NaCl, 5: 0.15 M NaCl, 6: 0.2 M NaCl, 7: 0.4 M NaCl, 8: polyvalent antiserum to masu salmon serum proteins, 9: specific antiserum to chum salmon IgM.

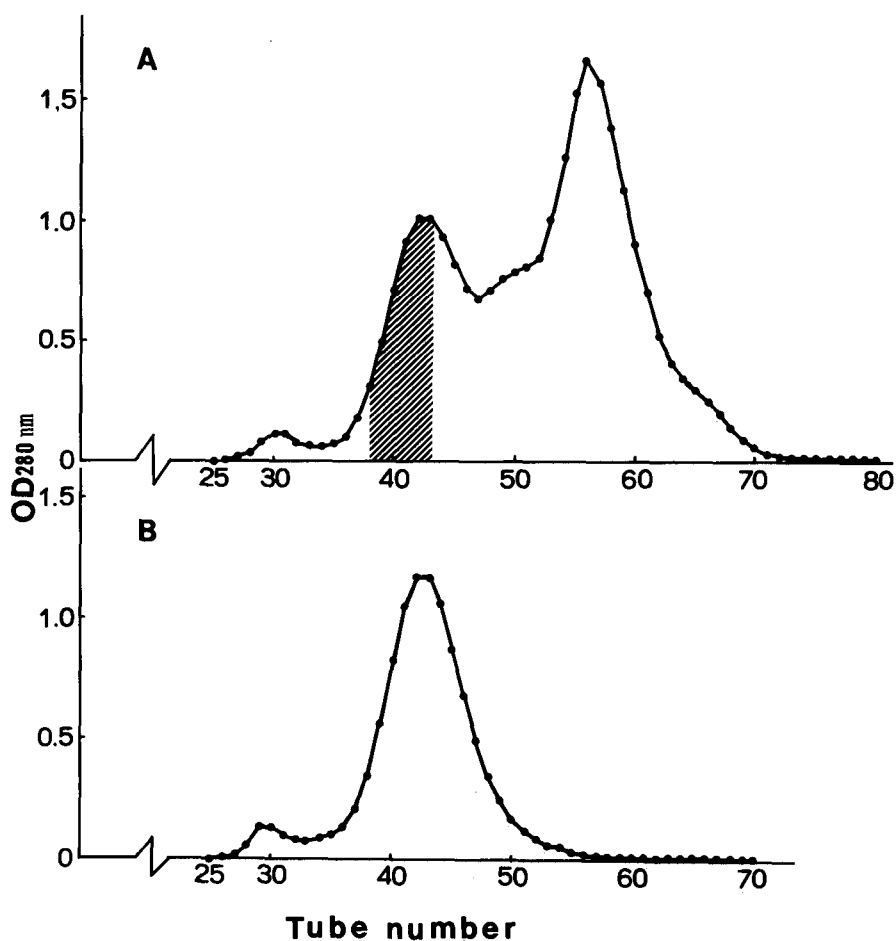


Fig. 4. Gel filtration on Sepharose 6B of the 0.1 M NaCl fraction from the DEAE cellulose (DE-52) chromatography (A). Fractions as indicated by shadow were collected, concentrated by lyophilization and were again fractionated by the same Sepharose 6B (B).

られ、免疫電気泳動的に高純度であった。セルロースアセテート膜電気泳動では、Fig. 6 に示したように β 領域に polyclonal な immunoglobulin のバンドが見られた。一方、精製 IgM を家兎に免疫して得た抗血清はサクラマス血清に対して、一本の沈降線のみが観察され、免疫抗原が高純度に精製されたことを示した。

IgM の分子量および subunit 構造

サクラマス IgM の分子量は Sepharose 6B のゲル濾過では human IgM と thyroglobulin の間に溶出され、分子量は 760,000 と推定された。

非還元下での 3% SDS-PAGE では Fig. 7 に示した様に移動度の遅い濃いバンドの他に 3 本の minor バンドが観察され、それぞれの分子量は、750,000, 620,000, 420,000, 210,000 と測定された (Fig. 8)。

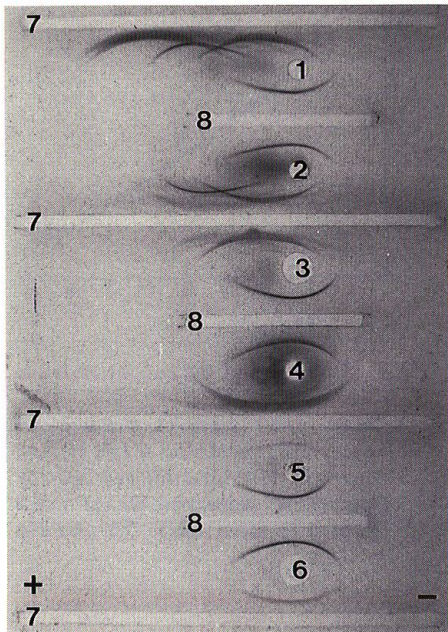


Fig. 5. Immunoelectrophoresis of each fraction obtained in the purification of masu salmon IgM. 1: masu salmon serum, 2: precipitate of 50% ammonium sulfate saturation, 3: 0.1 M NaCl eluate from the DEAE cellulose, 4: precipitate of 50% ammonium sulfate saturation of 0.1 M NaCl fraction from the DEAE, 5: the first peak from the Sepharose 6B (see Fig. 4A), 6: the purified masu salmon IgM (see Fig. 6B), 7: polyvalent antiserum to masu salmon serum proteins, 8: specific antiserum to chum salmon IgM.

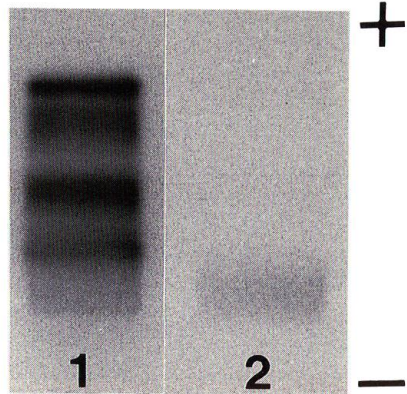


Fig. 6. Cellulose acetate membrane electrophoresis of masu salmon serum (1) and purified masu salmon IgM (2).

一方、サクラマス IgM を 2-ME により還元処理をし、SDS-PAGE を行なった結果 (Fig. 9) では、サクラマス IgM は 2 本のバンドを示した。それぞれのバンドは human IgM の μ 鎖および L 鎖とはほぼ同様の位置に移動した。サクラマス H 鎖の分子量は、human μ 鎖よりやや小さく 68,000, L 鎖の分子量は、human L 鎖と同じ 23,000 と測定された (Fig. 10)。

アミノ酸分析

精製サクラマス IgM のアミノ酸分析の結果を Table 1 に示す。サクラマス IgM のアミノ酸分析をサケ IgM (Kobayashi et al., 1982) と比較すると、Val においてはシロサケより高く、Glu においては低かったが、他のアミノ酸組成はほぼ類似していた。

SRID によるサクラマス IgM 量の測定

抗サケ IgM 血清の濃度 1%, 2% での SRID プレートおよび standard curve を Fig. 11 にそれぞれ

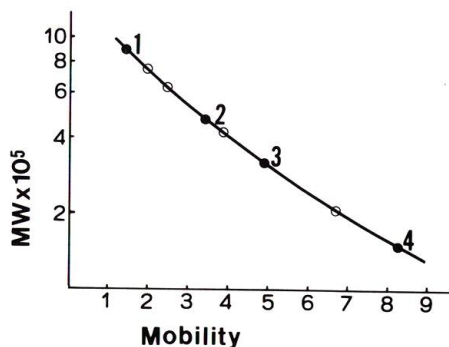
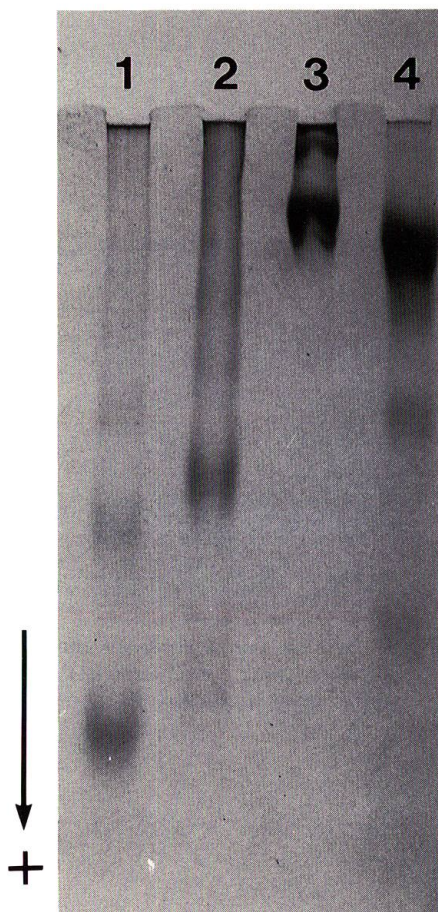


Fig. 8. Estimation of the mol. wt. of intact masu salmon IgM by 3% SDS-PAGE. Closed circles represent standards of human immunoglobulins of IgM (1), IgA trimer (2), IgA dimer (3) and IgG (4). Open circles correspond to the bands obtained for masu salmon IgM (see Fig. 7).

Fig. 7. 3% SDS-PAGE analysis of the intact masu salmon IgM molecule in comparison with human immunoglobulins. 1: human IgG, 2: human IgA, 3: human IgM, 4: masu salmon IgM.

れ示す。SRID プレートの抗血清の濃度、1%と2%の比較を行った結果、Fig. 11C に示すように、抗血清の濃度 1% では検量線の直線性が IgM 濃度 25-100 $\mu\text{g/ml}$ と狭く、抗血清の濃度 2% では直線性が IgM 濃度 25-400 $\mu\text{g/ml}$ と広がった。サクラマス産卵期雄の血清中の IgM を測定した結果は、0.6-2.7 mg/ml の範囲であった。

酵素抗体測定法

精製サクラマス IgM の標準曲線およびイワナ、キュウリウオ及びチョウザメ雑種のベステル血清の希釈曲線を Fig. 12 に示した。サクラマス IgM の標準曲線においては、6 ng/ml から 60 $\mu\text{g/ml}$ まで典型的な sigmoid curve が見られたが、それ以上の高濃度では high dose hook effect が観察された。

一方、Ouchterlony 法でサクラマス IgM と交叉反応性が認められたサケ属のイワナと交叉反応性が見られないキュウリウオおよびベステルとの ELISA を用いた交叉反応性は、Fig. 12 に示したようにイワナでは、血清量 $10^{-3} \mu\text{l}$ から $10^{-1} \mu\text{l}$ において典型的な sigmoid curve を示し交叉反応性が認められ、キュウリウオにおいては、僅かに sigmoid curve がみれることから交叉反応性が

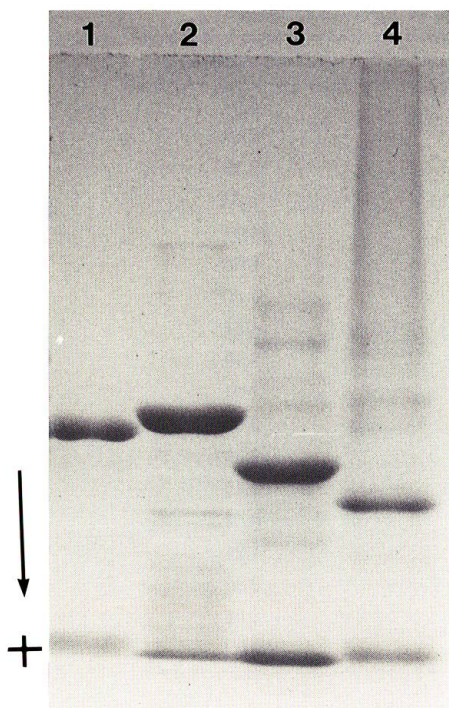


Fig. 9. SDS-PAGE analysis of the purified masu salmon IgM reduced with 2-mercaptoethanol in comparison with human immunoglobulins. SDS-PAGE was performed in 5-25% gradient polyacrylamide gel. 1: masu salmon IgM, 2: human IgM, 3: human IgA, 4: human IgG.

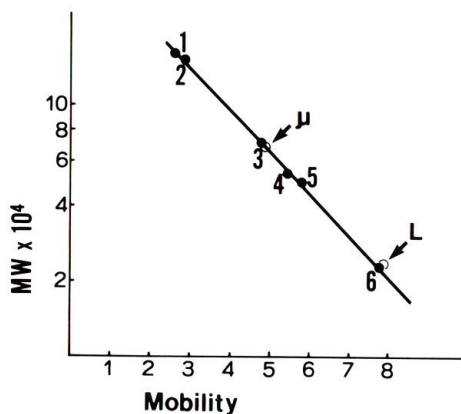


Fig. 10. Mol. wt. estimation of subunits by SDS-PAGE of 5-25% gradient polyacrylamide. Closed circles represent standards of human immunoglobulins of IgA (1), IgG (2), μ -chain (3), α -chain (4), γ -chain (5) and L-chain (6). Open circles represent the masu salmon μ - and L-chains.

見られたが、チョウザメでは全く交叉反応性が観察されなかった。

考 察

これまで魚類 Ig の精製試料を得るために、予め抗原刺激を施し、血清中の抗体量を高めた魚を用いる場合が多い。即ち、Ig を精製しようとする魚に菌体、異種の赤血球及び精製した蛋白質などを抗原として腹腔内投与あるいは筋肉注射等による刺激をし、その魚の血液中の Ig 量を増加させ、用いた抗原に対する凝集価等を測定しながら Ig の分離精製を行うものである。しかし、検出方法としての凝集反応に関しては、菌体抗原によっては、非特異的な凝集がみられたり (Korhonen et al., 1981)、抗体以外の凝集素を検出することもあり (Ingram, 1980)、精製品について、抗体の物理化学的特徴を確認する必要がある。

一方、抗体を精製しようとする魚にあえて抗原刺激を施さず、Ig の物理化学的特徴である subunit 構造 (L 鎖, H 鎖) を有する高分子量蛋白であることや電気泳動の移動度 (β 領域) を指標に正常血清から Ig を分離精製する方法も報告されている (Kobayashi et al., 1982, 1984,

Table 1. Amino acid composition of IgMs (mol/100 mol)

Amino acid	Chum salmon*	Masu salmon
Asp	9.08	8.64
Thr	10.23	10.68
Ser	11.76	12.12
Glu	11.00	9.82
Pro	4.86	4.03
Gly	7.03	6.95
Ala	5.37	5.35
Cys/2	2.43	1.64
Val	7.54	8.90
Met	1.92	2.01
Ile	2.94	3.03
Leu	7.29	7.83
Tyr	3.96	4.45
Phe	3.45	3.52
His	1.41	1.24
Lys	6.65	6.80
Arg	3.07	3.01
Total	99.99	100.02

* Kobayashi et al. (1982)

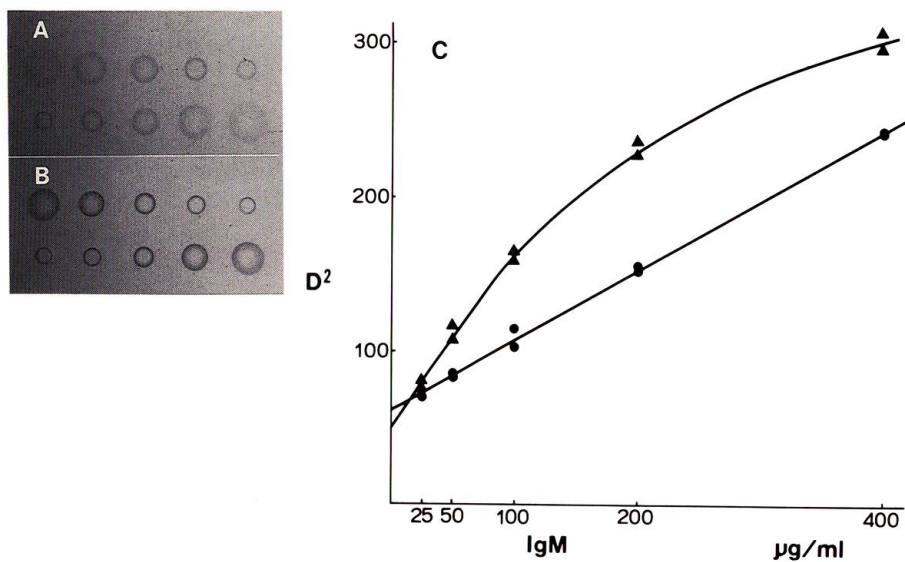


Fig. 11. SRID plates with two different concentrations of antibody and their standard curve. A: SRID with 1% anti-chum salmon IgM. B: SRID with 2% anti-chum salmon IgM. C: Standard curves. Triangles and circles represent values from SRID with 1% and 2% antiserum, respectively.

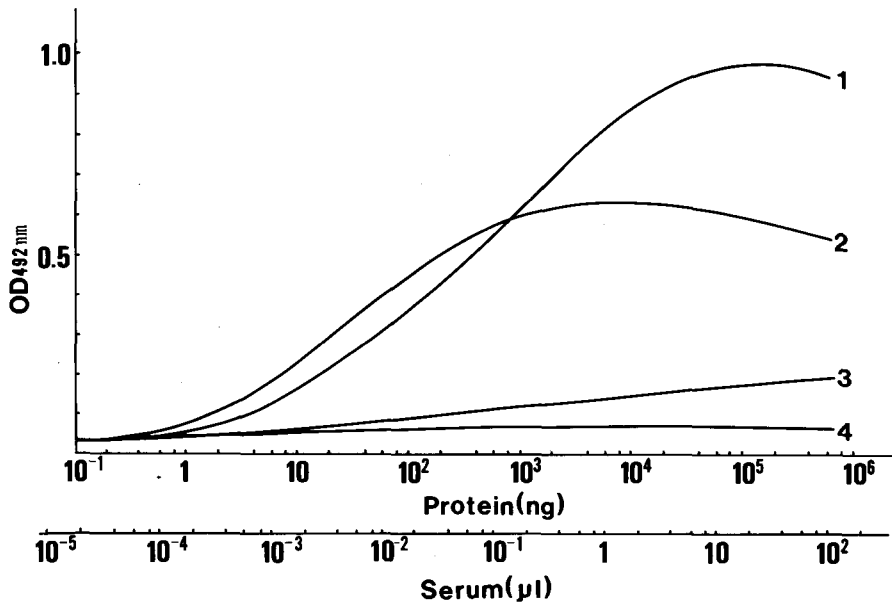


Fig. 12. A typical calibration curve for masu salmon IgM (1) and dilution curves for Japanese charr serum (2), smelt serum (3) and sturgeon serum (4) in ELISA.

1985)。

これまで用いられてきた血清からの Ig の分離精製方法は、大きく 3 つに分けられる。1) 血清を直接または、塩析後に Sepharose 6B あるいは Sephadex G-200 などのゲル濾過法、DEAE などのイオン交換クロマトグラフィーとの組合せによって行う方法 (Fletcher and Grant, 1969; Trump, 1970; Johnston et al., 1971; Acton et al., 1971a, 1971c; Bradshaw et al., 1971; Bradshaw and Sigel, 1972; Hall et al., 1973; 福田・楠田, 1982; Kobayashi et al., 1982, 1984, 1985; Warr et al., 1983; Matsubara et al., 1985; 伊丹ら, 1988), 2) 血清をアフィニティークロマトグラフィーを行い、その後、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーまたは分離用超遠心法により行う方法 (Clem and Small, 1967; Shelton and Smith, 1970; Watanabe and Suzuki, 1986; 浜口・楠田, 1988) 及び 3) 血清を分離用デンプン電気泳動とゲル濾過法との組合せによって Ig の分離精製を行う方法 (Marchalonis, 1971; 倉茂ら, 1972; Warr, 1983) が挙げられる。

今回、Kobayashi et al. (1982) のサケ IgM の精製方法に順じて、抗原刺激しない正常サクラマス血清から硫酸塩析、DEAE (DE-52) 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、抗サケ IgM 血清とサクラマス IgM との交叉反応性を利用し、IgM の分離精製を行った。精製品はセルロースアセテート膜電気泳動によって、 β 領域に polyclonal な Immunoglobulin のバンドを示した。また免疫電気泳動において、精製 IgM は抗サケ IgM 血清と抗サクラマス血清に対して一本の沈降線のみを形成し、一方精製品を抗原として家兎に免疫して得られた抗血清もサクラマス血清に対して一本の沈降線を示したことから、電気泳動的、免疫電気泳動的に高度に純化された精製品を得た。精製過程ではイオン交換法に続くゲル濾過法が有効な方法であった。

小林 (1987) は、魚類の Ig の構造とそのクラスに関して総説しているが、これを要約すると以下の様である。1) 円口類はヤツメウナギでの研究から Ig と同定されたものは、分子量約 150,000 でヒトの IgG と同じ値を示し、H 鎖の分子量は 70,000、L 鎖の分子量は 23,000 であり、H 鎖が分

量的にヒトの μ 鎖に一致するため、IgM に属すると考えられている。2) 軟骨魚類の Ig はエイとサメを含める板鰐類とギンザメを含める全頭類に分けられ、Ig の研究は板鰐類に限られている。サメ類は、分子量 900,000~1,000,000 の高分子 Ig と 170,000~180,000 の低分子 Ig に分けられ、高分子 Ig は電動的にヒトの IgM と同種の 5 量体と確認され、この H 鎖は 70,000 でヒトの μ 鎖とほぼ共通でヒトの IgM に相当すると考えられている。低分子 Ig の分子量は、高分子 Ig の約 1/5 で、抗原性も同一であるから単量体 IgM に相当する。一方、エイ類は、stingray と skate の二つに分けられている。stingray の Ig はサメ類と異なり形態的には 1 種類しかなく、種属間で差があるが、Ig のクラスとしては、その H 鎖の分子量が、サメ類と同じであるから IgM とされる。skate は IgM とは異なる第二のクラス分化があり、5 量体の IgM の他に 2 量体の Ig が存在する。H 鎖の抗原性の比較で、 μ 鎖とはまったく異なり、どのクラスに属するかは現在のところ不明である。3) 硬骨魚類は、ray-finned fishes と lobe-finned fishes に分けられている。大部分の硬骨魚類が含まれる ray-finned fishes の Ig は、いずれもその Ig は 4 量体の分子形態にもつことが知られ、Ig の H 鎖が 70,000 であることから IgM クラスと考えられている。lobe-finned fishes はシーラカンスの属する Crossopterygian と肺魚が属する Dipnoan に分けられ、肺魚の研究によると肺魚の Ig は、二つの異なる Ig 分子 (高分子 Ig と低分子 Ig) が認められている。高分子 Ig は H 鎖の分子量が 70,000 で 5 量体の IgM とされ、低分子 Ig は H 鎖が高分子 Ig とは抗原性が異なる分子量 38,000 の IgN と呼ばれている。

今回、サクラマス IgM の分子量は、非還元下 3% SDS-PAGE では 750,000 であり、ゲル濾過での 760,000 とよく一致した。還元後に出現した 2 つの subunit の分子量はそれぞれ H 鎖として、68,000、L 鎖として、23,000 であった。サクラマスの IgM の単量体を 2 本の H 鎖と 2 本の L 鎖で構成されているとすると、単量体の分子量は 182,000 ($68,000 \times 2 + 23,000 \times 2$) と計算され、750,000 のサクラマス IgM は、分子量 182,000 の 4 量体 ($182,000 \times 4 = 728,000$) とよく一致する。また、非還元での 3% SDS-PAGE において、750,000 の main バンドの他に 3 本の minor バンドが観察され、それぞれの分子量は、620,000、420,000、210,000 と観察され、それぞれの分子量から推定して、各々 3 量体、2 量体、単量体に相当すると考えられる。今回の結果は、サケ (Kobayashi et al., 1982) 及び今までの硬骨魚類の報告とほぼ一致した。

SRID を用いての血清 IgM の定量法において、抗血清濃度 2% のプレートでは、抗原量 25-400 $\mu\text{g/ml}$ で直線性が見られ、この範囲において、サクラマス IgM の測定が可能であったが、抗血清濃度 1% のプレートからの検量線は測定範囲が抗原量 25-100 $\mu\text{g/ml}$ と狭まったが、低濃度域においては測定誤差が低くなると思われる。従って、抗原量により抗血清濃度を使い分けることが必要である。今回のサクラマス IgM の血清中の濃度は 0.6-2.7 mg/ml であり、正常ヒト IgM の濃度の 0.4-2 mg/ml (河合, 1969) と似ている。一方、ヒトの IgM は、生後 1 週間で急激に増加し始め (成人値の 80~90%)、1, 2 歳頃までにはほぼ成人値に達する。本研究で精製されたサクラマス IgM とこれによって得られた抗血清により IgM の検出と定量が可能になった。IgM の測定法として、成魚においては、SRID により血清中の IgM の定量が可能であるが、稚仔魚期において、血清量が少ないことや血清中の IgM 量が微量であることが予想されるため、SRID より高感度に測定できる ELISA を使用することが必要と思われる。今後、サクラマスの発生、成長段階に伴った IgM 量の測定等により免疫機能の発達と稚仔魚が大量に死亡する時期との関係についての興味深い研究が可能となろう。

Ouchterlony 法によって、サケ IgM の交叉反応性が見られなかったサケマス類のキュウリウオにおいても、ELISA によって抗サケ IgM 血清との交叉反応性が見られ、将来、ELISA によって IgM を検出しながら IgM の分離精製を行うことが可能である。今回、ELISA の測定法の確立が主な目的であったが、サクラマス IgM の抗原濃度が 6 ng/ml から 60 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で典型的な sig-

moid curve を示し、SRID と併せることにより広範囲での微量測定が可能となった。

謝 辞

本研究を行うにあたり、貴重な human Ig をご提供くださり、また、終始ご指導とご助言を賜った山口大学医学部小林邦彦博士に深謝致します。また、標本の採集にあたっては北海道立水産孵化場森支場の各位、北海道大学水産学部附属七飯養魚実習施設の木村志津雄技官に多大なご協力をいただき厚く御礼申し上げる。さらにアミノ酸分析をお願いしたアース製薬株式会社の河合茂樹氏に謝意を表します。

文 献

- Acton, R.T., Weinheimer, P.F., Dupree, H.K., Evans E.E. and Bennett, J.C. (1971a). Phylogeny of immunoglobulins. Characterization of a 14S immunoglobulin from the gar, *Lepisosteus osseus*. *Biochemistry* **10**, 2028-2036.
- Acton, R.T., Weinheimer, P.F., Hall, S.J., Niedermeier, W., Shelton, E. and Bennett, J.C. (1971b). Tetrameric immune macroglobulins in three orders of bony fishes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **68**, 107-111.
- Acton, R.T., Weinheimer, P.F., Dupree, H.K., Russell, T.R., Wolcott, M., Evans E.E., Schrohenloher, R.E. and Bennett, J.C. (1971c). Isolation and characterization of the immune macroglobulin from the paddlefish, *Polyodon spathula*. *J. Biol. Chem.* **246**, 6760-6769.
- Ambrosius, H. and Richter, R.G. (1985). 第5章 体液性免疫の進化。一魚類の免疫グロブリンを中心に。p. 121-135. 岩波講座 免疫科学。4. 免疫系の発生と分化。330 p. 岩波書店。東京。
- Bradshaw, C., Clem, L.W. and Sigel, M.M. (1971). Immunologic and immunochemical studies on the gar, *Lepisosteus platyrhincus*. II. Purification and characterization of immunoglobulin. *J. Immunol.* **106**, 1480-1487.
- Bradshaw, C. and Sigel, M.M. (1972). Dinitrophenyl-reactive immunoglobulins in the serum of normal bowfin, *Amia calva*. *Immunology* **22**, 1-8.
- Clem, L.W. and Small, P.A. (1967). Phylogeny of immunoglobulin structure and function. I. Immunoglobulins of the lemon shark. *J. Exptl. Med.* **125**, 893-920.
- Corbel, M.J. (1975). The immune response in fish: a review. *J. Fish Biol.* **7**, 539-563.
- Ellis, A.E. (1982). Differences between the immune mechanisms of fish and higher vertebrates. p. 1-29. In Robert, R.J. (ed.), *Macrobial Diseases of Fish*. Academic Press, London.
- Fletcher, T.C. and Grant, P.T. (1969). Immunoglobulins in the serum and mucus of the plaice (*Pleuronectes platessa*). *Biochem. J.* **115**, 65.
- 福田 稜・楠田理一 (1982). ハマチ免疫グロブリンの精製と特性。日水誌。 **48**, 921-926.
- Grabar, P. and Williams, C.A. (1953). Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques dun mélange de protéins. Application au sérum sanguin. *Biochem. Biophys. Acta* **10**, 193-194.
- Hall, S.J., Evans, E.E., Dupree, H.K., Acton, R.T., Weinheimer, P.F. and Bennett, J.C. (1973). Characterization of a teleost immunoglobulin: the immune macroglobulin from the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **46B**, 187-197.
- 浜口昌己・楠田理一 (1988). 蛍光抗体法により検出されるブリの表面抗体保有細胞。魚病研究。 **23**, 257-262.
- Hara, A. (1976). Iron-binding activity of female-specific serum proteins of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Biochem. Biophys. Acta* **427**, 549-557.
- Hara, A. and Hirai, H. (1978). Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* **59B**, 339-343.
- Ingram, G.A. (1980). Substances involved in the natural resistance of fish to infection-a review. *J. Fish Biol.* **16**, 23-60.

- 伊丹利明・高橋幸則・岡本隆義・久保埜和成 (1988). アユの体表粘液および血清中の抗体の精製と特性. 日本誌, **54**, 1611-1617.
- Johnston, W.H., Acton, R.T., Weinheimer, P.F., Niedermeier, W., Evans, E.E., Shelton, E. and Bennett, J.C. (1971). Isolation and physico-chemical characterization of the "IgM-like" immunoglobulin from the stingray *Dasyatis americana*. *J. Immunol.* **107**, 782-793.
- 河合 忠 (1969). 5. 免疫グロブリンの生物学的性状. p. 184-186. 血漿蛋白. 719 p. 医学書院. 東京.
- 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.
- 小林邦彦 (1987). 免疫グロブリンの系統発生. 小児医学. **20**, 433-449.
- Kobayashi, K. and Hirai, H. (1980). Studies on subunit components of chicken polymeric immunoglobulins. *J. Immunol.* **124**, 1695-1704.
- Kobayashi, K., Tomonaga, S. and Kajii, T. (1984). A second class of immunoglobulin other than IgM present in the serum of a cartilaginous fish, the skate, *Raja kenjei*: Isolation and characterization. *Molec. Immun.* **5**, 397-404.
- Kobayashi, K., Tomonaga, S. and Hagiwara, K. (1985). Isolation and characterization of immunoglobulin of hagfish, *Eptatretus burgeri*, a primitive vertebrate. *Ibid.* **22**, 1091-1097.
- 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*). *Ibid.* **19**, 95-103.
- Korhonen, T.K., Leffler, H. and Eden, C.S. (1981). Binding specificity of piliated strains of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* to epithelial cells, *Saccharomyces cerevisiae* cells, and erythrocytes. *Infect. Immun.* **32**, 796-804.
- 倉茂達徳・平石春男・山口宣夫・三橋 進 (1972). マスにおける抗体産性. 日本細菌学雑誌. **27**, 751-755.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Mancini, G., Carbonara, A.O. and Heremans, J.F. (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* **2**, 235-254.
- Marchalonis, J.J. (1971). Isolation and partial characterization of immunoglobulins of goldfish (*Carassius auratus*) and carp (*Cyprinus carpio*). *Immunology* **20**, 161-173.
- Matsubara, A., Mihara, S. and Kusuda, R. (1985). Quantitation of yellowtail immunoglobulin by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **51**, 921-925.
- 大西耕二 (1977). 免疫グロブリンの起源と進化. 最新醫學. **32**, 493-506.
- Ouchterlony, O. (1953). Antigen-antibody reactions in gels. IV. Types of reactions in coordinated systems of diffusion. *Acta Path. Microbiol. Scand.* **32**, 231-240.
- Shelton, E. and Smith, M. (1970). The ultrastructure of carp (*Cyprinus carpio*) immunoglobulin: a tetrameric macroglobulin. *J. Mol. Biol.* **54**, 615-617.
- Snieszko, S.F. (1970). Immunization of fishes: a review. *J. Wildl. Dis.* **6**, 24-30.
- 続 佳代・日比 望・塚田 裕・平井秀松 (1984). ヒト α -Fetoprotein の ELISA. —マイクロプレートを用いた簡便で高感度な方法—. 臨床病理. **32**, 629-636.
- Trump, G.N. (1970). Goldfish immunoglobulins and antibodies to bovine serum albumin. *J. Immunol.* **104**, 1267-1275.
- Voss, E.W., Russell, W.J. and Sigel, M.M. (1969). Purification and binding properties of nurse shark antibody. *Biochemistry* **8**, 4866-4872.
- Warr, G.W. (1983). Immunoglobulin of the toadfish, *Spheroides glaber*. *Comp. Biochem. Physiol.* **76B**, 507-514.
- Warr, G.W., Deluca, D. and Anderson D.P. (1983). Thymocyte plasma membrane of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*: associated immunoglobulin and heteroantigens. *Ibid.* **76B**, 515-521.
- Watanabe, T. and Suzuki, Y. (1986). Purification of fish immunoglobulin using affinity chromatography. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **52**, 1283.
- Weber, K. and Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.