HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ウシの鉄結合タンパク質フェリチンに関する生化学的研究
Author(s)	折野, 宏一
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第5324号
Issue Date	1998-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3137287
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51517
Type	doctoral thesis
File Information	000000322477.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

ウシの鉄結合タンパク質フェリチンに関する生化学的研究

折野宏一

(1)

ウシの鉄結合タンパク質フェリチンに関する生化学的研究

1997

折野　宏一

〈目次〉

略語表 iii

緒言 1

第一章　ウシFtHおよびL鎖cDNAのクローニング、シークエンシングおよび発現

序文 4

材料および方法

［1］脾臓および心臓Ftの精製 6

［2］精製市販ウマ脾臓、ウマ心臓およびウシ脾臓Ftに対する抗血清の調製および抗体の精製 6

［3］SDS-PAGE、イムノブロット法およびレクチンブロット法 7

［4］ウシFtHおよびL鎖cDNAのクローニングおよびシークエンシング 7

［5］ウシFtHおよびL鎖cDNAの発現 8

結果

［1］ウシとウマの脾臓および心臓FtのSDS-PAGEおよびイムノブロット 10

［2］ウシFtHおよびL鎖cDNAのシークエンシングおよび発現 10

考察 17

小括 19

第二章　ウシおよびウマFtの免疫測定に及ぼす血清および血漿の阻害効果

序文 20

材料および方法

［1］脾臓Ftの精製 21

［2］ウマTfの精製 21

［3］血清および血漿 21

［4］精製市販ウマ脾臓Ftおよびウシ脾臓Ftに対する

抗血清の調製 21
[5] アルカリホスファターゼ（ALP）標識抗体および
ビオチン化抗体の調製 21
[6] サンドイッチ ELISA および ABC 法 ELISA 22
[7] Ft結合活性の測定 23
結果
[1] ウマ血清に添加したウマ脾臓 Ftの回収率に及ぼす
加熱処理の効果 24
[2] ウマ血清 Ft測定に及ぼす加熱処理の影響 24
[3] ウマ血清および血漿 Ft測定値の比較 28
[4] ウシ血清および血漿 Ft測定のための基礎的検討 28
考察 37
小括 40

第三章　ELISA 法で測定した健常牛および各種疾病牛の血清 Ft濃度
並びにウシ胎子血清の高 Ftレベル
序文 41
材料および方法
[1] ウシ Ftおよび抗 Ft抗体 42
[2] イムノブロット法 42
[3] ウシ血清 42
[4] Tfおよび抗 Tf抗体 42
[5] サンドイッチ ELISA および ABC 法サンドイッチ ELISA 43
[6] 血清鉄および TIBC の測定 43
[7] ウシ胎子血清 Ft鉄測定 43
[8] 胎子血清 Ftの ConA への結合実験 43
結果
[1] 妊娠期間中の血清 Ft 濃度 44
[2] 各種疾病牛の血清 Ft濃度 44
[3] ウシ胎子血清における Ftおよび鉄濃度 44
[4] ウシ胎子血清 Ft鉄濃度 44

［5］ウシ胎子血清Ftのサブユニット　48
［6］ウシ胎子血清におけるTf濃度およびTf飽和度　48
考察　52
小括　54

総括　55

謝辞　58

引用文献　59

英文抄録　64

〈略語表〉

本論文で用いた略語は以下の通りである。

ALP：alkaline phosphatase
BSA：bovine serum albumin
cDNA：complementary deoxyribonucleic acid
ConA：concanavalin A
dNTP：deoxy nucleoside triphosphate
Ft：ferritin
kb：kilobase
m.o.i：multiplicity of infection
PAGE：polyacrylamide gel electrophoresis
pfu：plaque-forming unit
TIBC：total iron-binding capacity
Tf：transferrin

〈緒言〉

鉄代謝に関与する鉄の輸送および貯蔵タンパク質としてトランスフェリン（Tf）およびフェリチン（Ft）あるいはヘモジデリンが知られている。このうちFtは1937年 Laufberger〔35〕により最初にウマ脾臓から結晶として分離されたが、その後脊椎動物、無脊椎動物、植物、真菌および細菌に広く分布することが明らかにされた〔60〕。Ftは分子量約480 kDa の水溶性の球状タンパク質で、24 個のサブユニットから構成され、その内部コアには最大限4,500 個の3価の鉄原子を貯蔵できる〔60〕。Ftは脊椎動物のほとんど全ての細胞に見出されるが〔60〕、血清中にも微量に存在する〔2〕。三種類のサブユニット［H(eart) 鎖：21 kDa, L(iver) 鎖：19 kDa, 糖鎖を含むG鎖：23 kDa］が同定されており〔4, 14, 52, 60, 67〕、組織Ftは種々の比率のH鎖およびL鎖から構成され〔4, 60〕、一方細胞から分泌されると考えられる血清FtはL鎖およびG鎖から構成される〔52〕。G鎖はL鎖と免疫学的交差反応すること〔52〕、および血清FtのコンカナバリンA（ConA）への結合に関与することが報告されている〔14, 67〕。

Sodium dodecyl sulfate-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）で測定されるヒト、ウマおよびラットの心臓Ftにおいて優勢なH鎖の分子量は肝臓Ftにおいて優勢なL鎖より大きいことが報告されている〔4, 39, 60〕。ヒトFtではH鎖およびL鎖の間に機能的な違いが見られ、H鎖に富むFtは鉄取り込みに有利であり、L鎖に富むFtは鉄貯蔵に適していることが報告されている〔37, 38〕。

これまでウシFtの分子性状については詳細に検討が行われていなかったが、最近、Kakuta ら〔30〕はSDS-PAGE で測定されるウシFtのH鎖の分子量はL鎖より小さいことを明らかにした（H：18 kDa; L：21 kDa）。このことはSDS-PAGE で測定される他の哺乳類Ft H鎖の分子量がL鎖より大きいことと相違する。まず、本論文の第一章ではウシと他の哺乳類の間のFtサブユニットの分子量の違いが何に起因するかを明らかにし、ウシFtのH鎖およびL鎖間の機能的な違いを明らかにする目的でウシFtサブユニットのアミノ酸配列を決定し、既報の他の哺乳類Ftサブユニットのアミノ酸配列と比較した〔48〕。

血清Ftの免疫学的測定法が開発され、ヒトおよび各種家畜において、血清Ft

濃度と体内貯蔵鉄量との間には正の相関性があること〔2, 29, 44, 56, 57〕、また、ヒトにおいては血清Ft濃度は炎症および腫瘍性疾患において上昇することが明らかにされている〔26, 66〕。このように血清Ftの測定は生理学的および臨床学的に意義がある。Furugouri らはウシ血清Ft定量のためのラジオイムノアッセイ〔23〕および酵素免疫測定法〔43〕を開発し、泌乳牛、成雄牛、哺育牛における生理的変動および鉄栄養状態と血清Ft量との関連性について報告している〔22, 23, 43, 44〕。しかし、彼らの開発した酵素免疫測定法におけるFtの測定限界は5ng/mlであり、臨床応用には不十分であった〔43〕。ラジオイムノアッセイは放射性物質を取り扱う上でいくつかの制約が伴うため、ラジオイムノアッセイの感度に匹敵する酵素を用いた酵素免疫測定法が普及している。したがって、ウシ血清Ft測定を臨床的に応用するためにはより感度の高い酵素免疫測定法を開発することが必要である。

ところで血清あるいは血漿には、Ft結合タンパク質の存在することが知られている〔13, 70〕。もし、これが血清Ftのエピトープを隠蔽するならば、免疫学的方法により測定される血清Ft濃度は実際より低く見積もられると考えられる。Niitsuら〔46〕は、ヒト血清をSDS処理または70℃ で10 分間加熱処理することにより、ラジオイムノアッセイで測定した血清Ft値が上昇することを見出し、これらの処理は、Ftのエピトープを隠蔽し抗原抗体反応を阻害すると予想されるFt結合物質を変性させるのではないかと推測した。しかしながら、ヒト以外の動物において血清によるFt免疫測定阻害に関する情報は知る限りでは全くない。Smith ら〔57〕はウマFt測定のための酵素免疫測定法を開発したが、Ft免疫測定法に及ぼすウマ血清の阻害効果を見出し得なかった。また、Furugouri ら〔23, 43〕はウシ血清のFt免疫測定に及ぼす影響について全く検討していない。そこで第二章ではウマFtの免疫測定法に及ぼすウマ血清および血漿の阻害効果を再検討したところ、ウマ血清および血漿にはFt免疫測定を阻害する阻害因子が存在することを明らかにした〔49, 50〕。さらにウシ血清および血漿Ft測定のための酵素免疫測定法を確立するために、アビジン-ビオチン複合体（avidin-biotin complex）法を用いた高感度enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）（ABC 法ELISA）を開発し、ウシ血清および血漿Ft 測定のための基礎的条件を検討した。

胎子への鉄の供給に伴う母親の体内貯蔵鉄量の減少を反映し、妊娠期間中に

母親の血清鉄およびFt濃度は減少するのに対して、Tf濃度は増大する〔1, 9, 31, 62〕。胎子の血漿鉄レベルは母親より高いのに対して、総鉄結合能（TIBC）は母親より低いことが知られており〔9, 18, 20〕、これは鉄が血漿鉄濃度およびTf飽和度の低い母親からそれらの値の高い胎子の血液に輸送されなければならないことを示す。血清Ft濃度は体内貯蔵鉄量を反映することが多くの研究者により報告されている〔2, 29, 44, 56, 57〕。ヒト胎児の血清Ftレベルは成長とともに上昇し〔1, 55〕、出生時には80～290ng/mlで、母親の血清Ftレベルより6～10倍高いことが報告されている〔1, 31, 51〕。したがって、胎児の貯蔵鉄量は胎児の成長に伴い増大し出生時には高レベルに達すると考えられる。しかしながら、ヒト以外の動物の胎子における血清Ftについての情報は知る限りでは全くない。

そこで、第三章では健常牛および各種疾病牛の血清Ft濃度、ウシ胎子血清におけるFt濃度およびFt鉄含量を測定し〔30〕、Ft濃度と疾病との関係および胎子Ftの特性について考察した。

第一章　ウシFtHおよびL鎖cDNAのクローニング、シークエンシングおよび発現

〈序文〉

Ftは24量体の鉄貯蔵タンパク質であり、脊椎動物のほとんど全ての細胞で合成される〔60〕。組織Ftは心臓Ftに優勢なH(eart)型および肝臓および脾臓Ftにおいて優勢なL(iver)型の2種類のサブユニットで構成される〔4, 39, 60〕。SDS-PAGEで測定されるウマ、ヒト、ウサギおよびラットFtH鎖の分子量はL鎖より大きい（H：21 kDa, L：19 kDa）〔4, 39, 53, 60〕。それはSDS-PAGEにおける移動度とも一致することからHおよびL鎖はそれぞれH(eavy)およびL(ight)と命名された。HおよびL鎖間のアミノ酸配列の相同性はヒトFtにおいて56%〔10〕、ラットFtにおいて50%〔36, 45〕であり、両鎖は互いに免疫学的〔41〕および機能的〔37, 38〕に異なる。H鎖に富むFtは鉄取り込みに有利であり、L鎖に富むFtは鉄の貯蔵に適していることが報告されている〔37, 38〕。一方、各種哺乳類FtのH鎖間のアミノ酸配列の相同性は94%以上〔3, 6, 10, 45〕、L鎖間では79%以上〔3, 6, 10, 16, 27, 36〕と高い。哺乳類Ftのサブユニットのアミノ酸配列の比較においては、フェロオキシダーゼに関与するアミノ酸がH鎖によく保存され、一方鉄の核化形成に関与するアミノ酸がL鎖でよく保存されていることが明らかにされ、これらのアミノ酸の保存の違いは両鎖の間の機能的な違いを反映すると考えられている〔3, 21〕。

Kakutaら〔30〕はSDS-PAGEにより測定されるウシ脾臓および心臓FtのH鎖の分子量（18 kDa）がL鎖（21 kDa）より小さいことを明らかにした。しかし、その理由は明らかにされていない。このようなウシと他の哺乳類との違いを分子レベルで明らかにするためには、ウシFtサブユニットのアミノ酸配列を明らかにし、既報の他の哺乳類Ftサブユニットと比較する必要がある。

本章ではウシFtHおよびL鎖のアミノ酸配列を明らかにするために、ウシ脾臓cDNAライブラリーからHおよびL鎖cDNAクローンを分離し、塩基配列を決定した。推定されたウシFtサブユニットのアミノ酸配列と他の哺乳類Ftサブユニットのアミノ酸配列を比較するとともに、HおよびL鎖の間の機能的な違いについても比較検討した。また、バキュロウイルス発現系を用いてサブ

ユニットcDNA を発現させ、発現タンパク質のSDS-PAGE 解析を行なった。

〈材料および方法〉

［1］脾臓および心臓Ftの精製

市販ウマ脾臓Ft（Sigma, St. Louis, MO, USA）は、Ftモノマーのみならずオリゴマーも有するので〔47〕、モノマーを得るために、市販標品をあらかじめphosphate-buffered saline（PBS：20 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.0）で平衡化したセファロースCL-6B（Pharmacia, Sweden）カラム（2x100cm）に添加し、流速12.5 ml/hr で溶出し、5 ml ずつ分画した。Ftモノマーを含む画分を集め、精製標品とした。

ウシおよびウマ脾臓Ftは以下の如く精製した。脾臓に2 倍量の1 mM ethylenediaminetetraaceticacid（EDTA）、0.1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride（PMSF）を加え、10 分間ホモジナイズした。ホモジネートはCetinkayaら〔11〕の方法に従って加熱処理（70～75℃, 10 min）、酸性沈澱（pH 4.8）および40% 飽和硫酸アンモニウム（硫安）塩析を行った。硫安塩析により得られた沈澱をPBS に溶解し、PBS 1 ℓ に対して一晩透析した。透析内液を4 ℃で10,000xg、15 分間遠心して得られた上清を10%（w/v）ショ糖を含むPBS 1 ml に重層し、日立70P-72 超遠心機でRPS55T-2 ローターを用い4 ℃で150,000xg、2 時間遠心した。得られた沈澱をPBS に溶解し、PBS で平衡化したセファロースCL-6B カラム（2x100cm）を用いてゲルろ過し精製Ftモノマーを得た。

ウシおよびウマ心臓Ftは以下の如く精製した。ミンスした心臓に2 倍量の1 mM EDTA、0.1 mM PMSF を加えて10分間撹拌後、セライト（No.535）をろ過補助剤として添加し、ブッフナーロートでろ過した。得られたろ液を上述したように加熱処理、酸性沈澱、塩析、超遠心、およびゲルろ過して精製Ftモノマー画分を集め、これを精製標品とした。

タンパク質濃度は、ウシ血清アルブミン（BSA, Boehringer Mannheim, FRG）を標準タンパク質として用いて、Lowry ら〔40〕の方法に従って測定した。

［2］精製市販ウマ脾臓、ウマ心臓およびウシ脾臓Ftに対する抗血清の調製および抗体の精製

精製市販ウマ脾臓、ウマ心臓あるいはウシ脾臓Ftに対する抗血清の調製は以

下の如く行った。1～3 mg の精製Ft モノマーを含むPBS 0.5 ml とFreund's Complete Adjuvant 0.5 mlを混合し、ウサギ（日本クレア, 東京）の背部皮内10ヵ所に接種した。初回免疫から3 週および4 週後に、それぞれ初回免疫に用いた抗原量の半量を皮下の数カ所に接種した。最終免疫より2 週後に、ペントバルビタール麻酔下で心臓から全採血し、血清を分取し、0.05% NaN_3 存在下で使用時まで-20℃において保存した。

Ftに対する特異抗体は、アフィニティクロマトグラフィーにより抗血清から以下の如く精製した。5～10 mgの精製Ft モノマーを臭化シアン活性化セファロース4B（Pharmacia）10 ml に共有結合させて調製したアフィニティカラム（1.5 x 5.7 cm）を0.5 M NaClを含む20 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）であらかじめ平衡化し、20 ml の抗血清を添加した。カラム流出液の280nm での吸光度（A_{280}）が0.01 以下になるまで同緩衝液でカラムを洗浄後、3 M チオシアン酸カリウムを含むPBS（pH 7.0）で抗体を溶出し、溶出液は直ちにPBS に対して透析した。抗体濃度はウサギIgG の吸光係数$A^{1\%}_{280}=14.6cm^{-1}$を用いて算出した。

［3］SDS-PAGE、イムノブロット法およびレクチンブロット法

SDS-PAGE はLaemmli〔33〕の方法に準じて行い、12.0% ポリアクリルアミド分離ゲルおよび4.5% ポリアクリルアミド濃縮ゲルを用いて行った。イムノブロット法はWatanabeら〔65〕の方法に従って行った。但し、抗Ft 抗体は1 μg/ml の濃度で用い、対照血清として正常ウサギIgG 抗体を用いた。

レクチンブロット法はConA（Sigma）を用いてSantambrogioら〔52〕の方法に準じて行った。

デンシトメトリーは島津二波長フライングスポットスキャナー（CS-9000）を用い、クーマシーブリリアントブルー染色後のゲルは波長565nm で透過吸収法で測定した。

［4］ウシFt HおよびL鎖cDNA のクローニングおよびシークエンシング

ウシ脾臓λgt11cDNA ライブラリー（Clontech Laboratories, Inc., CA, USA、挿入部位, *Eco*RI）25,000 pfu を*Escherichia coli* Y1090 と共にLuria-Bertini 寒天培地で42℃、3.5 時間インキュベートした。10 mM イソプロピル-チオ-β-D- ガ

ラクトシドを浸み込ませたニトロセルロースディスク膜（Bio-Rad, USA）をプレートに載せ、さらに37℃で3.5時間インキュベートした。その後イムノブロット法と同様に膜を抗体で処理した。但しHおよびL鎖cDNAクローンはそれぞれH鎖特異的抗ウマ心臓Ft抗体およびL鎖特異的抗市販ウマ脾臓Ft抗体を用いて選択的に分離した（各抗体濃度, 1μg/ml）。クローンの挿入cDNAのpolymerase chain reaction（PCR）による増幅は以下の如く行なった。PCRの反応容量を100μlとし、その組成をλファージDNA（50～200 ng）、Amplitaq^{R} DNAポリメラーゼ（Perkin Elmer, USA）2.5U、dNTP（dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 各200μM）、λgt11プライマー［forwardプライマー（5'-GACTCCTGGAGCCCG-3'）およびreverseプライマー（5'-GGTAGCGACCGGCGC-3'）, 各20 pmol］、2 mM $MgCl_2$、20 mM $(NH_4)_2SO_4$、80mM Tris/HCl、pH9.0 に調製した。PCRは熱変性（96℃, 15秒）→アニーリング（50℃, 1秒）→ポリメラーゼ反応（60℃, 4分）のサイクルを25回行った。PCR増幅フラグメントの精製にはmicrocon 100（アミコン, 東京）を用いた。λDNAおよびPCR増幅cDNAフラグメントの塩基配列は、Taq Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit（Perkin Elmer）を用い、Applied Biosystems model 373A DNAシークエンサー（Applied Biosystems, USA）で決定した。塩基およびアミノ酸配列相同性はGENETYX-MAC Ver. 8.0で調べた。

［5］ウシFt HおよびL鎖cDNAの発現

発現用トランスファーベクターおよび発現ベクターの構築のために用いたpAcYM$_1$、*E. coli* JM105、ヨトウガ卵巣細胞由来*Spodoptera frugiperda*（Sf）細胞（IPLV-SF-21AE）、バキュロウイルス（*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus）およびAcRP23-*lac*Z DNA〔32〕は北里大学獣医畜産学部家禽疾病学講座竹原一明博士より分与された。まず、HおよびL鎖cDNAクローンのコード領域をトランスファーベクター、pAcYM$_1$へサブクローニングするために、H鎖のプライマー（5'-TCAGGATCCCACCATGACGACCGCATC-3'および5'-AAAGGATCCTGAGGCTTAGCTCTCACTG-3'）とL鎖のプライマー（5'-TTAGGATCCAATCATGAGCTCCCAGATTC-3' および5'-ACTGGGATCCAGAAGCTCCTAGTCGTGCT-3'）を作製した（*Bam*HI認識部位を下線で示す）。これらのプライマーを用いてHおよびL鎖のコード領域を上述の方法に

従ってPCR により増幅し、さらにアガロース電気泳動に供し目的のPCR フラグメントを切り出した。精製PCR フラグメントを*Bam*HI 制限酵素処理した。*Bam*HI 酵素処理PCR フラグメントと*Bam* HI および脱リン酸化処理pAcYM$_1$DNA のライゲーションは、DNA Ligaton System Ver 2.0 （宝酒造, 東京） を用いて行い、*E. coli* JM105 をトランスフォームしリコンビナントトランスファーベクターを得た。発現システムに用いた感染用のSf 細胞は、10% ウシ胎子血清添加 TC-100 培地（GIBCO BRL, USA）で培養した。リコンビナントトランスファーベクターDNA 50 ng および*Eco*81I 酵素処理直鎖状型AcRP23-*lac*Z DNA 200 ng を含む混合液10μlをリポフェクチン（Bethesda Research Laboratories Life Techonologies, USA） （5μl） を用いて、35 mm シャーレに播いたSf 細胞 1.5x10^6 cells に共感染した〔19〕。28℃で数日間培養後、*lacZ* を発現する細胞をXgal で染色し、青染しないプラックをクローニングした。クローン化組み換え体ウィルスのSf 細胞への感染はm.o.i=10 で行ない、発現はSDS-PAGE およびイムノブロット解析により調べた。コントロールとして非組み換え体バキュロウイルスを用いた。

〈結果〉

［1］ウシとウマの脾臓および心臓Ftの SDS-PAGE およびイムノブロット

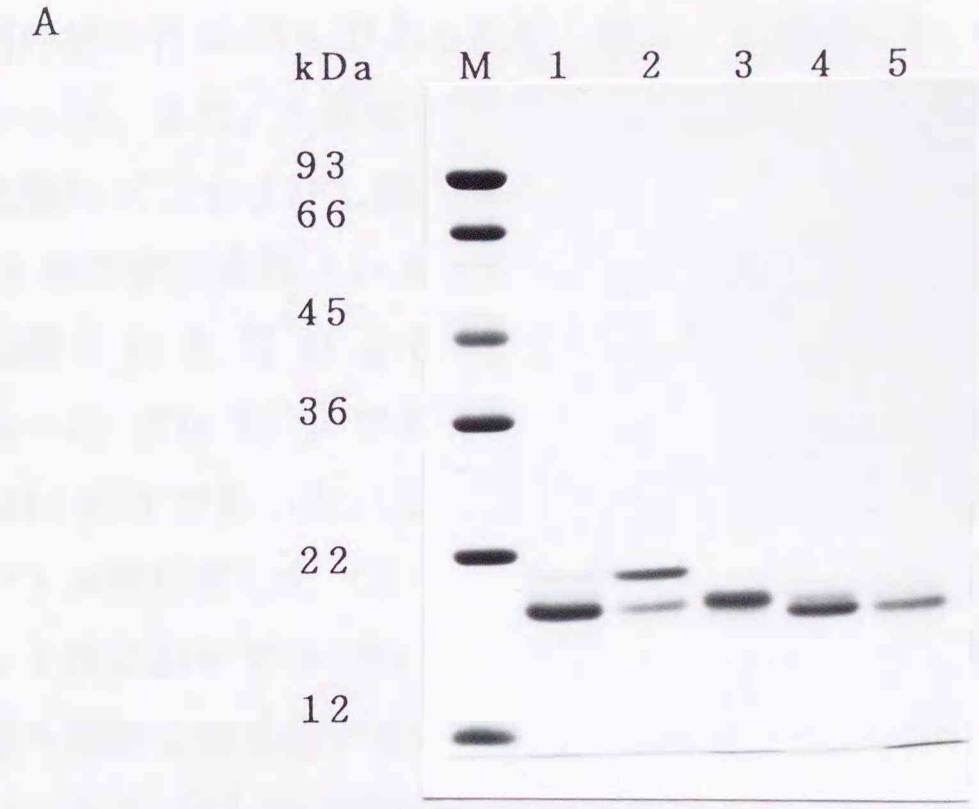
ウシのFtのサブユニット構成を調べるために、脾臓および心臓Ftを SDS-PAGE で分析し、ウマの結果と比較した。Fig. 1A に示すようにウマ心臓Ftは18.8 kDa に強いバンドを与え、H鎖が確認された。また、ウマ脾臓Ftは18.8 kDa の弱いバンドと17.6 kDa の強いバンド（L鎖）となり、デンシトメトリーの結果H：Lのモル比は1 ：2.3 と計算された。なお、ウマ心臓FtのH：L比は9 ：1であった。一方、ウシ脾臓および心臓Ftは18.4 kDa と20.9 kDa の２本のバンドに分かれた。18.4 kDa のバンドは心臓Ftの主成分であり、かつ分子量もウマH鎖（18.8 kDa）とほぼ同一なので、これがウシH鎖であり、より大きな20.9 kDa のバンドがウシのL鎖と考えられる。これらのバンドのデンシトメトリーによる結果から、H：Lモル比はウシ心臓Ftで9 ：1、脾臓Ftで１ ：1.5と計算された。これらの結果は、ウシFt HおよびL鎖の SDS-PAGE による移動度が他の哺乳類Ft サブユニットと逆であることを示す。

イムノブロット法において、ほとんどL鎖で構成される市販ウマ脾臓Ft（Fig. 1A）に対する抗体はウシおよびウマFtのL鎖のみと反応し、H鎖とは全く反応しなかった（Fig. 1B）。一方、H鎖が90% を占めるウマ心臓Ft に対する抗体は、ウシおよびウマFtのH鎖のみと反応し、L鎖とは反応しなかった。抗ウシ脾臓Ft抗体はウシおよびウマのHおよびLの両鎖と反応した。したがって、抗市販ウマ脾臓Ft抗体および抗ウマ心臓Ft 抗体を用いたイムノスクリーニングを行ってそれぞれLおよびH鎖cDNA クローンを選択的に分離することができると判断した。

レクチンブロット法においてウシFtのHおよびL鎖はいずれもConA と反応しなかった。

［2］ウシFt HおよびL鎖cDNA のシークエンシングおよび発現

イムノスクリーニングによりH鎖を発現する２個のクローン、L鎖を発現する４個のクローンを得た。クローンの挿入cDNA をPCR で増幅しアガロース電気泳動で鎖長を調べ、最大鎖長のcDNA を持つHおよびL鎖クローンを塩基配列決定に用いた（H ：900 bp, L ：800 bp）。HおよびL鎖cDNA から5' 末端



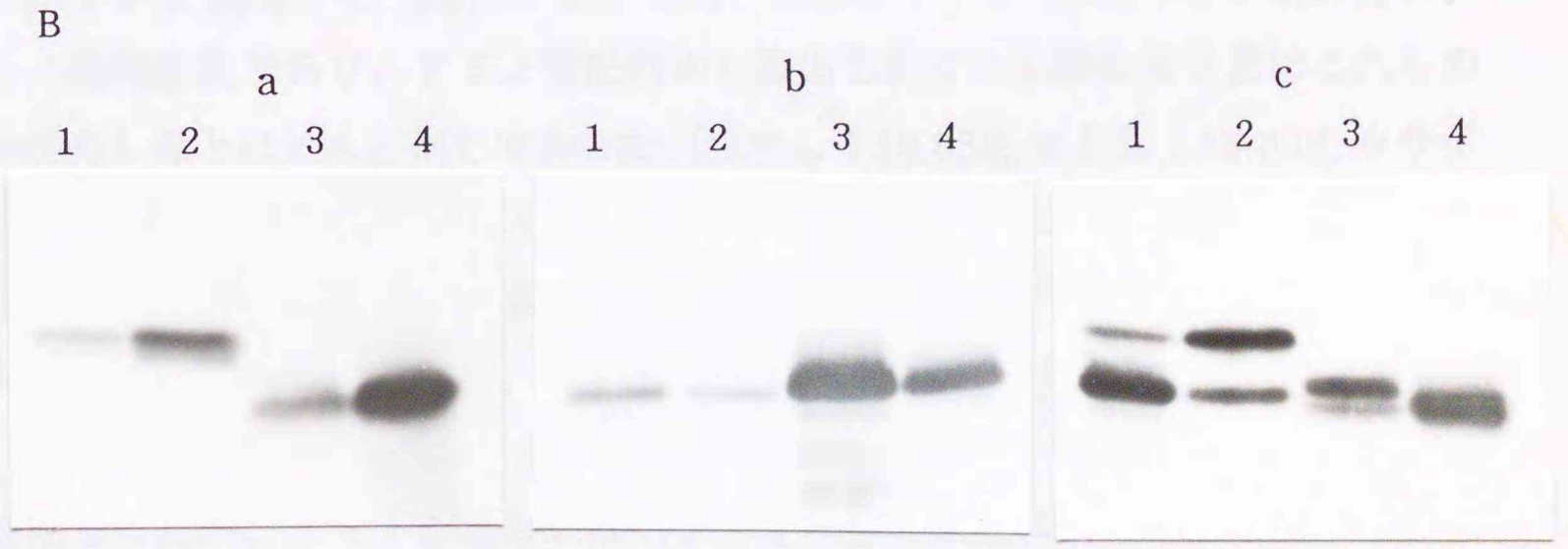


Fig. 1. SDS-PAGE (A) and immunoblotting (B) of purified bovine and horse Fts. (A) The samples (2 μg each) were bovine heart Ft (1), bovine spleen Ft (2), horse heart Ft (3), horse spleen Ft (4), and commercial horse spleen Ft (5). M represents marker proteins (1 μg each). (B) The membranes containing Ft antigens (100ng each) purified from bovine heart (1), bovine spleen (2), horse heart (3), and horse spleen (4) were incubated in anti-commercial horse spleen Ft (a) , anti-horse heart Ft (b), and anti-bovine spleen Ft (c) antibody solutions. Anode at bottom.

側非コード領域（H：157 bp, L：77 bp）、コード領域（H：543 bp, L：525 bp）および3' 末端側非コード領域（H：161 bp, L：154 bp）の塩基配列を決定した（Fig. 2）。コード領域におけるHおよびL鎖間の塩基配列の相同性は63% であったが、非コード領域においては高い相同性は見られなかった。また、本研究ではウシのHおよびL鎖の5' 非コード領域には、他の哺乳類FtのHおよびL鎖mRNA の5' 非コード領域に高度に保存されている27～28 個の鉄反応性エレメント配列〔61〕をいずれにおいても見出せなかった。演繹されたHおよびL鎖間のアミノ酸配列の相同性は54% であった（Fig. 3）。アミノ酸配列から算出されたH鎖の分子量は20,920、L鎖は19,856 であった。HおよびL鎖の配列には糖鎖付加シグナル（Asn-X-Ser）が1カ所存在した（H：108 番目, L：8 番目）。しかしながら、レクチンブロット法においてウシFt サブユニットはConA と反応しないことから、いずれの鎖も糖鎖を含まないと考えられた。ウシH鎖とヒト〔10〕、ラット〔45〕およびマウス〔6〕Ft H鎖の間の相同性はそれぞれ91%、92% および93% と高かった。ウシL 鎖はウマ〔27〕、ヒト〔10〕およびウサギ〔16〕Ft L鎖と同じアミノ酸残基数であり、アミノ酸配列から算出したウシL鎖の分子量はこれらの動物のL鎖とほとんど同じであった（ウマL：19,830; ヒトL：19,888; ウサギL：19,943）（Table 1）。また、これらの動物のL鎖にはFig. 3 に見られるようなラットおよびマウスL鎖に存在するオクタペプチドの挿入〔6, 36〕は存在しなかった。ウシとウマ、ヒトおよびウサギのL鎖の配列比較ではそれぞれ24 個（配列相同性, 86%）、28 個（84%）および23 個（87%）のアミノ酸置換が見られたが、アミノ酸あるいはペプチドの挿入または欠失は認められなかった（Fig. 3）。

バキュロウイルスを用いたH鎖cDNA 発現系の感染細胞およびその培養上清のSDS-PAGE においていずれにも非組み換え体に見られないバンドが1つ見られ（Fig. 4A）、このバンドはウシ脾臓Ft H鎖と同じ移動度を示した。HおよびLの両鎖を認識する抗ウシ脾臓Ft抗体を用いて発現タンパク質のイムノブロット解析を行ったところ、HおよびL鎖発現系の感染細胞および培養上清に各発現サブユニットが特異的に検出された（Fig. 4B）。これらの結果から、SDS-PAGE における発現HおよびL鎖の移動度はウシ脾臓Ftのそれらと全く同じであることが明らかにされた。

```
(H) :  ctgctcgtcccccccctaccccggccggccactcagagccagccctcgtcaccacttgaca
(H) :  gcgccctccgaccggcccaaggtccccgccaccgctccagtgccgctcggccgtcgccgc
(L) :                                agtcagccactcagctgtccgcgatcaccgggaccag
                                                                    1
(H) :  caccaccaccaccaccgcccgttttcagccgcccaccATGACGACCGCATCCCCCTCGCA
(L) :  ccaccatttttttaactccttattattaccgaccaatc                  ATGAG---C--
                  20                  40                  60
(H) :  GGTGCGCCAGAACTACCACCAGGACTCGGAGGCCGCCATCAACCGCCAGATCAACCTGGA
(L) :  -A-T--T-----T--TTCTACC--GGT----------G---------T-G-T---A--C-
                  80                 100                 120
(H) :  GCTCTACGCCTCCTATGTCTACCTGTCCATGTCGTACTATTTTGACCGTGATGATGTGGC
(L) :  A--GCGG--------CAC------C--TC--GGC-T------C-----C--C--------
                 140                 160                 180
(H) :  TTTGAAGAACTTTGCCAAATACTTTCTTCACCAATCTCATGAGGAGAGGGAACATGCTGA
(L) :  CC--G--GGTG-G-GTC-C-TT----GCG-ATTGG-CA-G---A--C-C--GGGC--G--
                 200                 220                 240
(H) :  GAGACTGATGAAGCTGCAGAACCAGCGAGGCGGCCGAATCTTCCTTCAGGATATCAAGAA
(L) :  -C-T--CT----A-----A--------T--------CGC-C--T-C-T---CG-GC----
                 260                 280                 300
(H) :  ACCAGACCGTGATGACTGGGAGAATGGGCTGACTGCAATGGAATGTGCGCTGTGCTTGGA
(L) :  G---TCT-AA-----G----GT--AACC-A-GAC--T-----GGCC--C--TCT-G-A--
                 320                 340                 360
(H) :  GAGAAGTGTGAATCAGTCACTACTGGAACTGCACAAACTGGCCACTGAAAAAAATGATCC
(L) :  --AG-ACC-------AG-C--GT----T-----TGGC-----TT---CCCGCGGA--C--
                 380                 400                 420
(H) :  CCATCTGTGTGATTTCATTGAGACTCATTACCTGAATGAGCAGGTGGAAGCCATCAAAGA
(L) :  ---CA-C-----C---C-G----AC--C-T---AG-----G-A---A--CT------GA-
                 440                 460                 480
(H) :  ATTGGGTGACCACATAACCAACCTGCGCAAGATGGGGGCCCCTGGATCTGGCATGGCAGA
(L) :  GA----------TC-G--------C----G-C---CT-GT--CCAGG----GT---GC--
                 500                 520
(H) :  GTACCTCTTTGACAAGCACACCCTGGGACACAGTGAGAGCTAAgcctcaggctggtttcc
(L) :  ---T-----C--A-G--TT-----CAAG---GACTAGgagcttctggagaccagtggcca
(H) :  cacagccacgggggtgacttccctggtcaccaaggcagtgcatgcatatttgggttacct
(L) :  ctgaagaacccacctaacatcagggctgcctgaagcccctctctgcagctactaggcagc
(H) :  tcatcttttctataagttgtaacaaaacatctacttaagttctttctttagtaccattcc
(L) :  ttttttttaacaccctggagccctctctcaagccttggaccatatggaaacaataaagctt
(H) :  ttcaaataaagtaatttggtaccc
(L) :  tttgcagcata
```

Fig. 2. Nucleotide sequences of bovine Ft H and L chain cDNAs. The sequences have been aligned to give maximum homology over their coding (capital letters) and noncoding regions (lowercase letters). The dashed lines indicate conserved nucleotides in their coding regions. The putative polyadenylation signals are underlined.

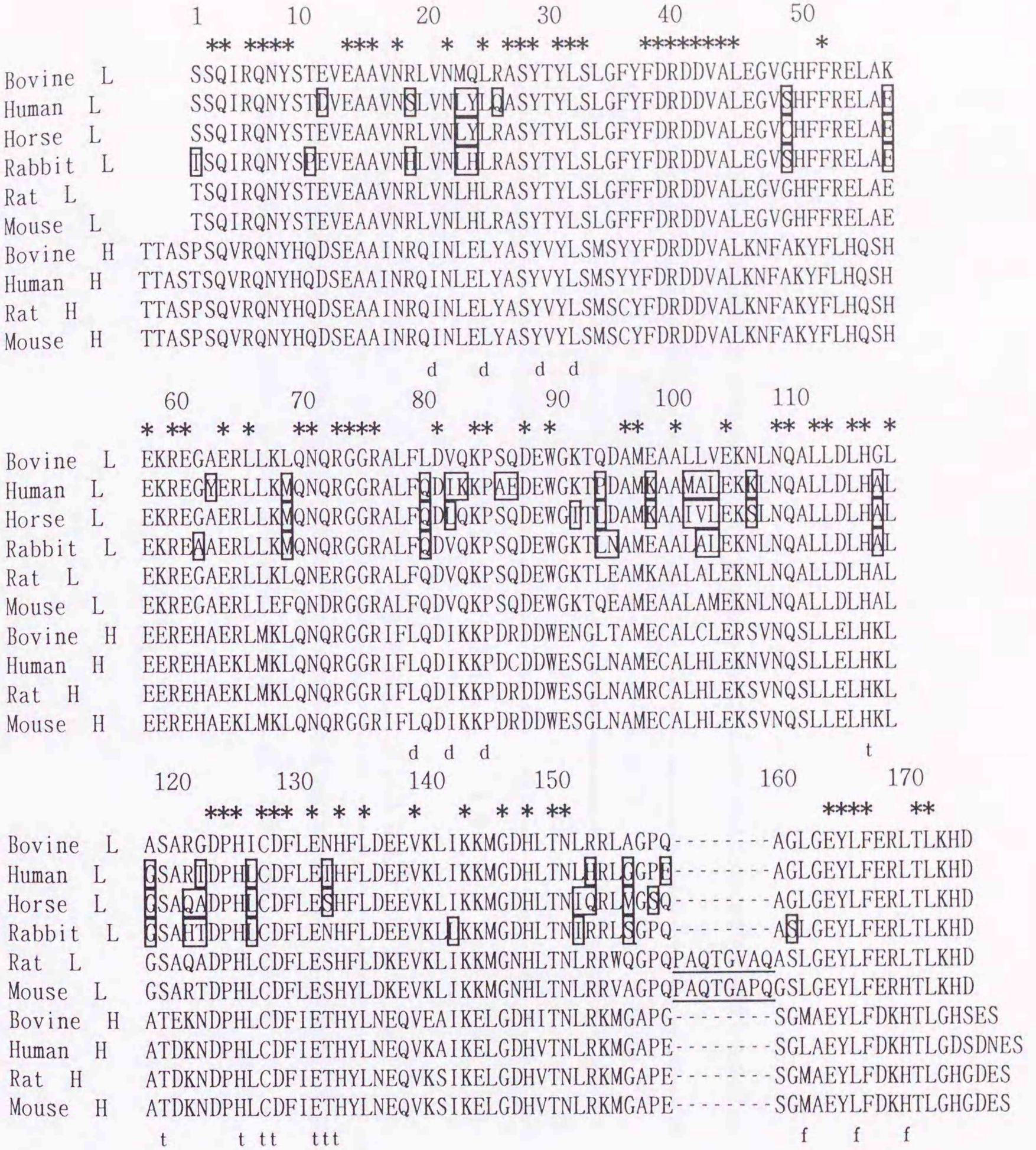


Fig. 3. Alignment of amino acid sequences of mammalian Ft H and L subunits. Gaps for maximum matching are indicated by dash lines. Numbers of the amino acids are from the human L sequence and do not include the extra octapeptide underlined. The amino acids identical in aligned Ft subunits sequences are indicated by asterisks. Residues which are substituted as compared between bovine L chain and human, horse, or rabbit L chains are boxed. Both H and L chains contain residues involved in dimer formation (d) and in 3-fold (t) or 4-fold (f) symmetry axis proposed by Ford *et al.* [21]. Sequence data were from human H and L chains [10], horse L chain [27], rat H [45] and L [36] chains, mouse H and L chains [6], and rabbit L chain [16].

Table 1. Molecular weights[a)] of mammalian Ft H and L subunits calculated from amino acid sequences

	Bovine Ft		Human Ft		Horse Ft		Rabbit Ft	
	L	H	L	H	L	H	L	H
Number of Amino acid residues	174	180	174	182	174	ND	174	ND
Molecular weight	19,856	20,920	19,888	21,094	19,830	—	19,943	—

a) Molecular weights of Ft subunits were calculated from amino acid sequences deduced from cDNA sequences of human H and L chains [10], horse L chain [59], and rabbit L chain [16]. ND: not determined

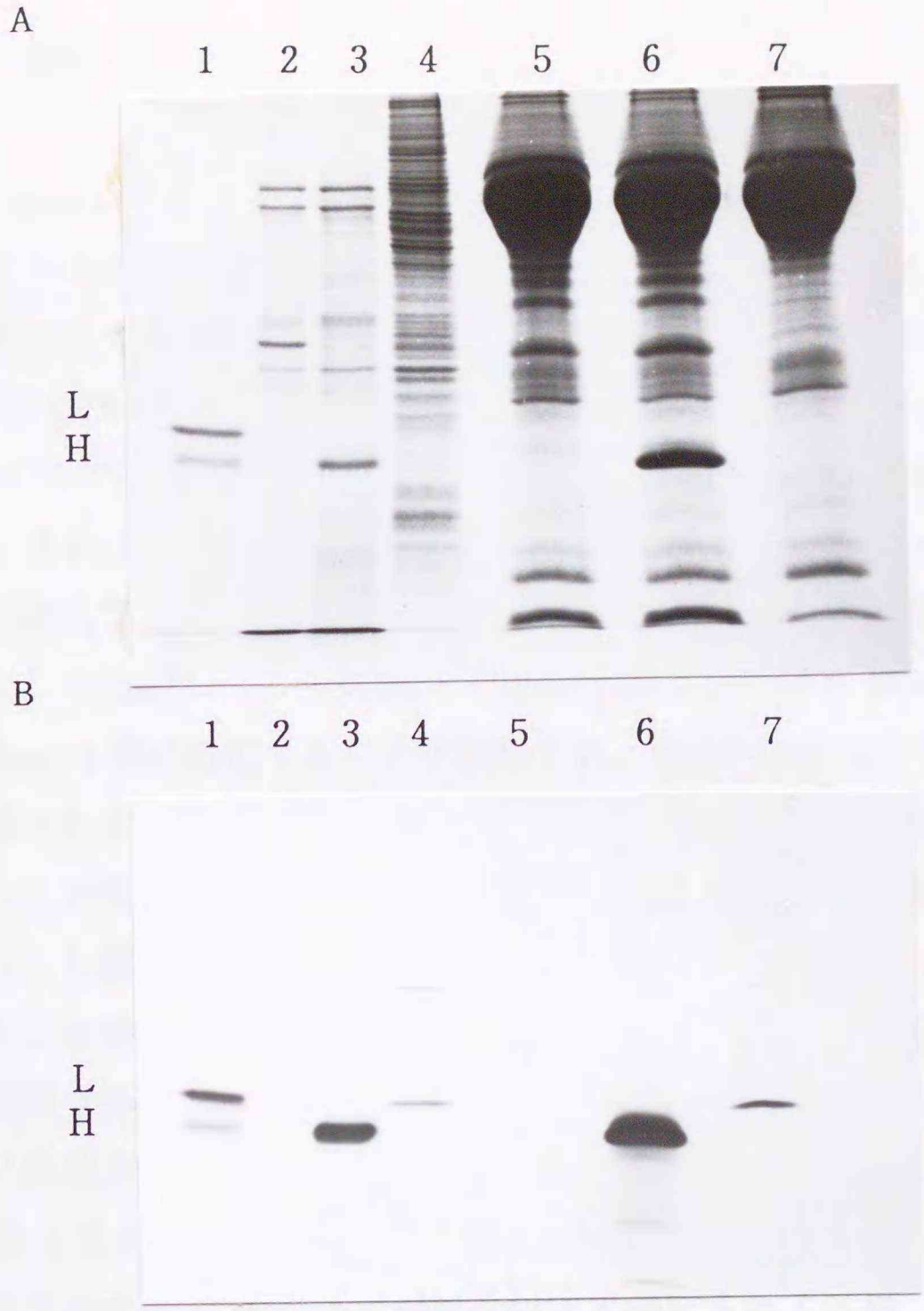


Fig. 4. Expression of bovine Ft H and L chains in Sf cells. Sf cells (1.5×10^4cells) were infected with the wild-type baculovirus (lane 2) or the recombinant baculovirus carrying H (lane 3) and L (lane 4) chains, respectively, and then the cells and the culture medium were collected by centrifugation at 16,000xg for 5 min. The whole cells and the culture medium were subjected to 12% SDS-PAGE. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue (A) or subjected to immunoblot analysis using anti-bovine spleen Ft antibody (B). Lane 1, purified bovine spleen Ft (2 μg/lane and 200ng/lane in A and B, respectively); lane 5, culture medium of cells infected with the wild-type virus; lane 6, culture media of H chain expressed cells; lane 7, culture media of L chain expressed cells. L and H are liver- and heart-type Ft subunits, respectively.

〈考察〉

Cetinkaya ら〔11〕はSDS-PAGE によりウシFtサブユニットを分離することができなかったが、本研究でウシFtサブユニットをHおよびL鎖に分離することができた。彼らはウシ脾臓FtのSDS-PAGE にWeber およびOsborn の緩衝系を用いているが、本研究ではLaemmli の緩衝系を用いているので、このサブユニットの分離の違いはSDS-PAGE に用いた緩衝系の違いによるものと考えられた。また、Mertz およびTheil〔42〕は羊脾臓FtのH(eavy)：L(ight) 比が1.5：1と報告しており、これらのサブユニット構成比はウシ脾臓Ftのそれと同じであった。したがって、羊脾臓FtのH(eavy)およびL(ight) 鎖はそれぞれL(iver) およびH(eart) 鎖に対応することが推察され、SDS-PAGE によりL鎖がH鎖より遅く泳動されるのは反芻類の特有の現象であることが考えられる。

ヒトおよびウマFtL鎖のタンパク質のアミノ酸配列およびcDNA の塩基配列から、L鎖は翻訳後N末端Met 残基が除去され、次のSer 残基がNアセチル化されることが明らかにされている〔10, 27, 59, 69〕。ウシFt HおよびL鎖も同様の翻訳後修飾を受けるものと考えられる。演繹されたウシFtサブユニットのアミノ酸配列から分子量を求めたところ、H鎖（180アミノ酸残基）の分子量（20,920）はL鎖（174 残基）の分子量（19,856）より大きいことが明らかにされた。このことはSDS-PAGEで測定されるH鎖（18kDa）の分子量がL鎖（21kDa）より小さいことと相違する。ウシとウマ、ヒトおよびウサギの間のL鎖の配列比較においてアミノ酸あるいはペプチドの挿入または欠失は認められなかった。ヒト血清FtにはL鎖と免疫学的に交差反応し、糖鎖を有するG鎖が存在することが知られている〔52〕。このサブユニットはSDS-PAGE において23kDaの分子量を示し、ConA を用いたレクチンブロット法で検出され得る〔52〕。ウシFt HおよびL鎖にはそれぞれ糖鎖付加部位が存在するが、レクチンブロット法でウシFtサブユニットはCon A と反応しなかった。以上のことから、SDS-PAGE においてウシL鎖が他の哺乳類L鎖より非常に遅く泳動されるのは、前者へのアミノ酸あるいはペプチドの挿入あるいは欠失または糖鎖付加によるものではないと考えられる。

SDS-PAGE により測定されるFtサブユニットの分子量がアミノ酸配列から推定される分子量と必ずしも一致しないことが報告されている〔12, 17〕。

Beaumontら〔7〕は大腸菌発現系を用いてマウスFtHおよびL鎖cDNAを発現させ、SDS-PAGE解析により発現H鎖が発現L鎖より非常に速く泳動されることを見出した。マウスとラットのFtサブユニット間のアミノ酸配列は非常に高い相同性を示し、L鎖間で14個（配列相同性92%）、H鎖間で1個（99%）の置換が見られるが〔6, 36, 45〕、ラットにおいてはSDS-PAGEで測定されるL鎖（19,700）の分子量はH鎖（20,700）より小さいことが報告されている〔4, 39〕。これらの知見から、SDS-PAGEにおいてサブユニットタンパク質へのSDSの結合量が不十分であるために、見かけの分子量がアミノ酸配列から算出される分子量より大きく見積もられることが考えられる。

Fordら〔21〕はウマL鎖のアミノ酸配列からサブユニットダイマー形成、三倍あるいは四倍対象軸に関与するアミノ酸を推察している（Fig. 3参照）。サブユニットダイマー形成および三倍軸形成に関与するアミノ酸においてこれらの配列と各種哺乳類Ftサブユニット配列の比較でいくつかの置換は見られたが、これらの置換されたアミノ酸同士の電気的性質の違いは認められなかった。したがって、これらのアミノ酸の置換はサブユニットの機能的な性質には影響を及ぼさないと考えられる。しかしながら、四倍軸を形成するアミノ酸においては169番目のアミノ酸がL鎖ではLeu、H鎖ではHisと電気的性質の全く異なるアミノ酸がそれぞれの鎖において保存されており、この違いはHおよびL鎖の機能的な違いを反映すると推察されている〔10〕。ウマL鎖においてFt分子内部における鉄の核化に関与する15アミノ酸残基（His49, Arg52, Glu53, Glu56, Glu57, Arg59, Glu60, Arg64, Lys67, Glu136, Lys139, Lys142, Lys172, His173, Asp174）が推定されており〔21〕、これらの配列は特に反芻類であるウシを始め哺乳類L鎖において完全にあるいはほぼ完全に保存されていた。ウシL鎖の鉄の核化形成に関与するアミノ酸はGlu56のみがLysに置換されているのを除き、他のアミノ酸は全て保存されていた。一方、フェロオキシダーゼ活性に関与する7アミノ酸残基（Glu23, Tyr30, Glu57, Glu58, His61, Glu103, Gln137）〔3〕はウシを含む哺乳類H鎖に完全に保存されていた。これらのHおよびL鎖間の機能的アミノ酸の保存の違いは、L鎖に富むFtは長期間の鉄貯蔵に有利であり、一方H鎖に富むFtは迅速な鉄供給に適していると説明される〔37, 38〕。ウシFtのHおよびL鎖の間にも同様な機能的な違いのあることが認められた。

〈小括〉

SDS-PAGE により測定されるウマ、ヒト、ウサギおよびラットFt H鎖の分子量はL鎖より小さいことが報告されているが（H：21 kDa , L：19 kDa）、ウシでは逆であった（H：18 kDa , L：21 kDa）。本研究ではウシと他の哺乳類の間のFtサブユニットの分子量の違いが何に意味するかを明らかにするために、ウシ脾臓λgt11 cDNA ライブラリーから分離したウシFtサブユニットcDNA クローンの塩基配列を決定し、演繹されたウシFtサブユニットのアミノ酸配列と既報の他の哺乳類Ftサブユニットのアミノ酸配列を比較した。HおよびL鎖はそれぞれ180および174アミノ酸残基で構成され、アミノ酸配列から算出されたH鎖の分子量は20,920 、L鎖は19,856 であった。HおよびL鎖間のアミノ酸配列の相同性は54% であった。ウシH鎖とヒト、ラットおよびマウスFt H鎖の間の相同性は、それぞれ91%、92% および93% と高かった。ウシL鎖はウマ、ヒトおよびウサギFt L鎖と同じアミノ酸残基数であり、アミノ酸配列から算出したウシL鎖の分子量はこれらの動物のL鎖とほとんど同じであった。ウシとウマ、ヒトおよびウサギのL鎖の配列比較ではそれぞれ24 個（配列相同性, 86%）、28 個（84%）および23 個（87%）のアミノ酸置換が見られたが、アミノ酸あるいはペプチドの挿入あるいは欠失は認められなかった。ウシFtサブユニットはConA と反応しなかった。バキュロウイルス-昆虫細胞発現系で発現させたHおよびL鎖をSDS-PAGE により解析したところ、発現Hおよび L鎖の移動度はウシ脾臓Ftのそれらと全く同じ移動度を示した。以上の結果から、SDS-PAGE においてウシL鎖が他の哺乳類L鎖に比べ非常に遅く泳動されるのは、ウシL鎖へのアミノ酸あるいはペプチドの挿入あるいは欠失または糖鎖付加によるのではなく、これらのL鎖へのSDS の結合量の違いに起因すると推察される。

第二章　ウシおよびウマFtの免疫測定に及ぼす血清および血漿の阻害効果

〈序文〉

ヒトおよびウサギの血清あるいは血漿にはFtと結合する物質が存在することが報告されている〔13, 70〕。Ft結合物質の生理的意義は明らかにされていないが、組織から血中に遊離された組織Ftのクリアランスに関与すると推察されている〔68〕。Bellottiら〔8〕はFt結合物質として補体成分（C3, C4）、α_2マクログロブリンおよびイムノグロブリンを同定した。Niitsuら〔46〕は血清成分に含まれるFt結合物質がFtと結合することによりFtのエピトープが隠蔽され、抗原抗体反応が阻害されるために免疫学的測定法により測定される血清Ft値が実際より低く見積られることを明らかにした。しかしながら、ヒト以外の動物で血清によるFt免疫測定に及ぼす影響についての情報は全くない。

Smithら〔57〕は、ウマ血清Ftの酵素免疫測定法を開発したが、測定法に及ぼす血清の阻害効果を見出し得なかった。Furugouriらはウシ血清Ft定量のためのラジオイムノアッセイ〔23〕およびエンザイムイムノアッセイ〔43〕を開発したが、いずれの測定系においてもウシ血清のFt免疫測定に及ぼす影響について検討していない。また、彼らの開発したエンザイムイムノアッセイにおけるFtの測定限界は5ng/mlであり、臨床応用には不十分であった〔43〕。

本章ではまず始めにウマFt測定のための酵素免疫測定法を開発し、ウマ血清および血漿の阻害効果について再検討した。さらにウシFt測定のためのABC法を用いた高感度ELISAを開発し、ウシ血清および血漿Ft測定のための基礎的条件を検討した。

〈材料および方法〉

［1］脾臓Ftの精製

市販ウマ脾臓およびウシ脾臓Ftの精製は、第一章で述べた方法に従って行った。

タンパク質濃度は、BSAを標準タンパク質として用いて、Lowryら〔40〕の方法に従って測定した。

［2］ウマTfの精製

ウマTfはウマ血液からWatanabeら〔64〕の方法に従って精製した。

［3］血清および血漿

ウマ血液サンプルは、北里大学獣医畜産学部およびタイヘイ牧場（青森県八戸市）で飼育されたサラブレッド種から採取した。血清は37℃で血液凝固後、また、血漿はヘパリン処理血液から1,650xg、15分間の遠心により分離した。血清および血漿には、防腐剤としてNaN_3を最終濃度0.1%になるように加え、使用時まで4℃で冷蔵保存し、また血清の一部は-20℃で冷凍保存した。

ウシ血液は北里大学獣医畜産学部附属家畜病院で飼育された健常なホルスタイン種および十和田食肉センターでと殺されたウシから採血した。血清および血漿は上述の方法で調製した。

［4］精製市販ウマ脾臓Ftおよびウシ脾臓Ftに対する抗血清の調製

ウサギ抗市販ウマ脾臓Ft血清およびウサギ抗ウシ脾臓Ft血清は第一章に述べた方法により調製した。

［5］アルカリホスファターゼ（ALP）標識抗体およびビオチン化抗体の調製

ウマ脾臓およびウシ脾臓Ftに対する特異抗体は第一章で述べたアフィニティークロマトグラフィーにより、それぞれ市販ウマ脾臓Ftおよびウシ脾臓Ftに対する抗血清から精製した。ALP標識抗体はAvrameous〔5〕の方法に従いグルタルアルデヒドを用いて精製抗体にALP（Sigma）を共有結合させて調製した。ビオチン化抗体はHsuら〔28〕の方法に従って精製抗体にD-ビオチニル-ε

-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（Sigma）を共有結合させて調製した。

［6］サンドイッチELISA およびABC 法ELISA

本研究ではウマFt 免疫測定のために2種のサンドイッチELISA システムを開発した。PBSで希釈した精製抗市販ウマ脾臓Ft 抗体（100 ng/ml）（システムA）、または、90,000 倍希釈した抗ウマFt 全抗血清（システムB）をImmuno Plate Maxisorp F96 マイクロタイタープレート（Nunc, Denmark）の各ウェルにそれぞれ100μl ずつ添加し、4℃で一夜放置した。プレートを0.1% BSA、0.1% Tween 20 および0.02% NaN_3 を含むPBS（ELISA 緩衝液）で3 回洗浄し（1 回の洗浄時間20 分）、抗原の非特異的吸着を防ぐためにプレートをBSAでマスクした。次いで、ウマFt 標準液およびELISA 緩衝液で希釈した血清および血漿を100μl を各ウェルに添加し、37℃で2 時間反応させた。ELISA 緩衝液で洗浄後、ALP 標識精製抗Ft 抗体（システムA）、または、同標識抗ウマFt 全抗血清（システムB）を、ELISA 緩衝液でそれぞれ適切に希釈し、各ウェルに100μl ずつ添加し、37℃で2 時間反応させた。プレートを同緩衝液で洗浄後、200μl の基質溶液（3 mM p-ニトロフェニルリン酸, 100 mM グリシン/ NaOH, 1 mM $ZnSO_4$, 1 mM $MgCl_2$, pH 10.0）を各ウェルに添加し、37℃での反応で遊離するp-ニトロフェノールの405nm における吸光度を、ELISA リーダーTitertek Multiskan MCC/340 （Flow Laboratories, USA）を用いて測定した。

ウマ血清および血漿はELISA 緩衝液で11倍あるいは21倍希釈し75℃で15分間加熱処理を行い、24,000xg で15 分間遠心した。得られた上清をELISA に供し、Ft 濃度を測定した。回収実験においては既知量の精製市販ウマ脾臓Ft を21倍希釈ウマ血清に添加し、上記と同様に処理した。

ウシFt 測定のために開発されたABC 法ELISA は以下の如くである。コーティングおよびマスキングは精製抗ウシ脾臓Ft 抗体をPBS で200 ng/ml に希釈しサンドイッチELISA と同様に行なった。マスキング後、同緩衝液でプレートを洗浄し、0.5 M $(NH_4)_2SO_4$ を含むELISA 緩衝液（pH 7.2）で11 倍希釈したウシ血清および血漿ならびにウシFt 標準液100μl をプレートの各ウェルに添加し、37℃で1.5 時間反応させた。洗浄後、ELISA 緩衝液で希釈したビオチン化抗ウ

シFt抗体溶液（250 ng/ml）100μlを各ウェルに添加し、37℃で1.5時間反応させた。洗浄後、ストレプトアビジン（10μg/ml）（Sigma）とビオチン-ALP（5μg/ml）（Zymed Laboratories, Inc., So. San Francisco, CA, USA）を含むELISA緩衝液100μlを各ウェルに添加し、37℃で1時間反応させた。以後の操作はサンドイッチELISAに準じて行った。

サンドイッチELISAは上述の方法に準じて行なった。但し、コーティング用の精製抗ウシFt抗体はPBSで200 ng/mlに希釈して用い、ELISA緩衝液には0.1% ゼラチン、0.1% Tween 20および0.02% NaN_3を含むPBSを用いた。ALP標識Ft抗体は250 ng/mlの濃度で用いた。

［7］Ft結合活性の測定

PBSで100μg/mlまたは10μg/mlに希釈したウマフィブリノーゲン（Sigma）、ウマ血清アルブミン（Sigma）およびウマTf溶液を100μlずつマイクロタイタープレートの各ウェルに添加し、4℃で一夜放置した。プレートをELISA緩衝液で3回洗浄し（1回の洗浄時間は20分）、ELISA緩衝液で希釈した精製市販ウマ脾臓Ft（10μg/ml）100μlを各ウェルに添加後、37℃で2時間反応させた。ELISA緩衝液で3回洗浄後、ELISAシステムAで用いたALP標識抗ウマFt抗体を各ウェルに100μlずつ添加した。37℃で2時間反応後、サンドイッチELISAと同様の方法で酵素反応を行なった。

〈結果〉

［1］ウマ血清に添加したウマ脾臓Ftの回収率に及ぼす加熱処理の効果

本研究でウマ血清のFt免疫測定に及ぼす影響を調べるために、2種のELISAシステムを開発した。システムAおよびBのいずれにおいても、測定限界は1 ng/mlであった（Fig. 5）。ELISA 緩衝液で21 倍希釈したウマ血清に既知量の精製ウマ脾臓Ftを添加し、Ft濃度を測定した。しかしながら、いずれのシステムにおいても回収率は非常に低かった（システムAで50～71%, システムBで42～79%）（Table 2）。これらの低い回収率は血清のFt結合タンパク質によるものと推察された〔45〕。そこで、Ftが熱耐性タンパク質である〔24〕ことを利用して、仮想上のFt結合物質を変性させるために、血清を75 ℃で15 分間加熱処理したところ、システムAにおける回収率は著しく上昇した（90～96%）が、システムBにおける回収率は依然低かった（75～83%）。50℃あるいは60℃での同様の加熱処理では、回収率は十分には改善されなかった。また、血清への10 mM EDTA 添加は、回収率に全く影響を及ぼさなかった。

Ft結合物質は動物種の異なるFtと結合することが知られている〔13〕。ウマ脾臓Ftを21倍希釈したウサギ正常血清に添加し、加熱処理しないでシステムAでFt濃度を測定した結果、回収率は87～89%（n=5）であった。このことは、ウサギ血清はウマFtの免疫測定に対して弱い阻害効果しか有しないことを示す。したがって、精製抗体および全抗血清を用いたいずれのELISA システムにおいてもウサギ血清Ft結合物質による回収率に及ぼす影響は無視できると考えられる。

［2］ウマ血清Ft 測定に及ぼす加熱処理の影響

システムBにおける回収率は、血清の加熱処理後においても低かったので、以後の実験はシステムAを用いて行なった。新生子馬および成馬の血清Ft値に及ぼす加熱処理の影響を調べたところ、新生子馬および成馬のいずれの血清も加熱処理することにより、加熱処理血清のFt測定値は未処理血清のそれより著しく高い値を示した（Table 3）。

この測定系による測定内変動係数は7.6%（n=4）、測定間変動係数は6.1%（n=14）であった。

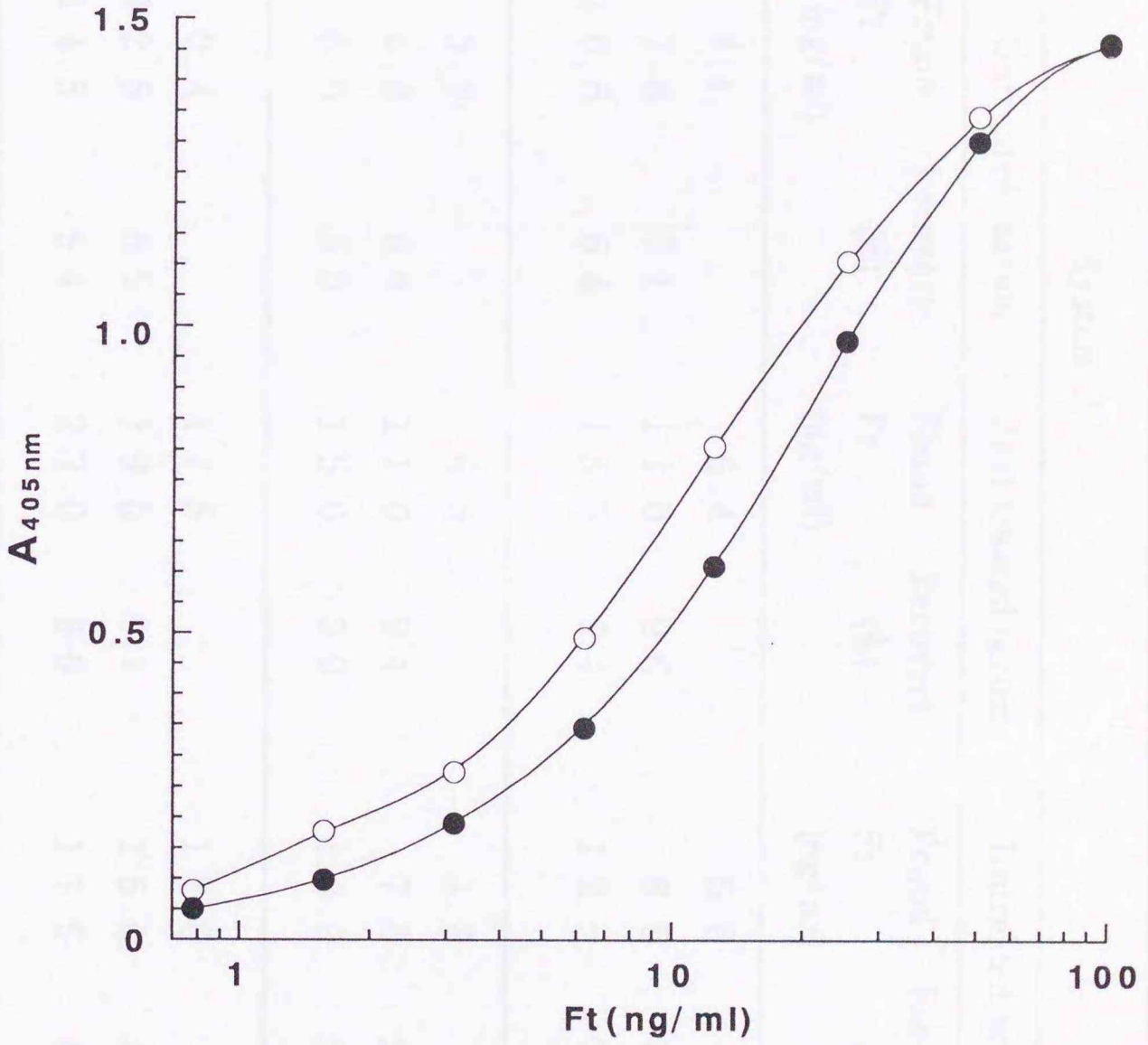


Fig. 5. Standard curves for horse spleen Ft in ELISA Systems A (◯) and B (●). Each point represents the mean of triplicate determinations.

Table 2. The effect of heat treatment on the recovery of horse spleen Ft added to horse serum in ELISA Systems A and B[a)]

Serum No.	Added Ft (ng/ml)	System A				System B			
		Untreated serum		Heat-treated serum		Untreated serum		Heat-treated serum	
		Found Ft (ng/ml)	Recovery (%)	Found Ft (ng/ml)	Recovery (%)	Found Ft (ng/ml)	Recovery (%)	Found Ft (ng/ml)	Recovery (%)
1	0	4.4		6.4		5.0		6.1	
	4.8	7.8	71	11.0	96	8.5	73	9.8	77
	9.5	10.5	64	15.3	94	12.5	79	13.5	78
2	0	3.8		6.5		4.8		6.2	
	4.8	6.8	63	11.0	94	7.4	54	9.8	75
	9.5	8.5	50	15.0	90	10.0	55	13.5	77
3	0	9.4		14.5		13.0		14.5	
	4.8	12.5	65	19.0	94	15.0	42	18.5	83
	9.5	14.5	54	23.0	90	17.5	47	22.0	79

a) Known quantities of horse spleen Ft were added to three horse sera diluted 21-fold with ELISA buffer and the concentrations were determined by ELISA Systems A and B as described in Materials and Methods.

Table 3. The effect of heat treatment on serum Ft concentrations

Sample No.	Serum Ft (ng/ml)			
	Adult horse[a]		Newborn horse[b]	
	Untreated	Heat-treated	Untreated	Heat-treated
1	66	110	20	25
2	68	140	37	42
3	88	160	20	30
4	66	108	20	27
5	102	155	44	64
6	138	180	67	77
7	79	104	37	45
8	108	159	93	108
9	144	202	72	92
10	76	112	52	59
Mean±S.E.	94±9.1	143±10.7[c]	46±7.9	57±9.0

a) 3 to 14 years of age.
b) 1 to 3 days of age.
c) Significantly different from untreated serum ($p<0.05$) by Student's *t*-test.

［3］ウマ血清および血漿Ft 測定値の比較

同一血液から調製したウマ血清および血漿Ft 測定値をTable 4 に示した。未処理血漿のFt 値は未処理血清より10～50% 低かったが、加熱処理することにより、両者のFt 値は上昇し、ほぼ同じ値を示した。この結果から、血漿には特有のFt 測定阻害物質の存在することが示唆された。そこで、ウマ血清にウマフィブリノーゲンを添加し、このタンパク質のFt 測定に及ぼす阻害効果を調べた（Fig. 6）。種々の濃度のフィブリノーゲンを21 倍希釈ウマ血清に添加したところ、フィブリノーゲンは血清Ft 測定値を濃度依存性に減少させ、フィブリノーゲン濃度0.5 mg/ml では無添加血清に比べ血清Ft 値を14～32% 低下させた。また、フィブリノーゲンはFt 標準液の測定値にも阻害効果を及ぼすことが認められた（Fig. 7）。次いで、フィブリノーゲンがFt 結合活性を有するか否かを調べた（Fig. 8）。フィブリノーゲンはウマ血清アルブミンおよびTf に比べて著しく高いFt 結合活性を示した。フィブリノーゲンおよびウマ脾臓Ft の混合物をPBS で平衡化したセファロースCL-6B カラムでゲルろ過しても、これらのタンパク質の複合体は検出されなかった。これはフィブリノーゲンの組織Ft に対する親和性が非常に低いことを示唆する。

［4］ウシ血清および血漿Ft 測定のための基礎的検討

ABC 法およびサンドイッチELISA におけるウシ脾臓Ft の典型的な標準曲線をFig. 9 に示す。これらのELISA システムにおけるウシ脾臓Ft の測定検出限界はABC 法で0.1 ng/mlであり、サンドイッチELISAで1 ng/mlであった。ウマFt ELISA システムＡにおいては、ウマFt タンパク質が熱耐性であることを利用してウマ血清を75℃で15 分間の加熱処理し、Ft 結合物質を変性させることにより血清のウマFt 免疫測定に及ぼす阻害効果を解除した。しかしながら、ウシ血清を同様の条件で加熱処理したところ、ABC 法ELISA で測定した加熱処理血清のFt 測定値は未処理血清のそれより低い値を示した。このことは、ウシ血清Ft の熱に対する安定性がウマ血清Ft に比べ低いことが示唆された。そこで血清（血漿）FtとFt 結合物質の相互作用を阻害する目的で希釈液のイオン強度を増大させ、ウシ血清および血漿のFt 免疫測定に及ぼす影響を調べることを試みた。ウシ血清に硫安を添加（最終濃度：0.46 M）しABC 法ELISA で血清Ft 濃度を測定した結果、硫安添加血清のFt 測定値は無添加血清のそれより高くなっ

Table 4. Comparison of Ft concentration between serum and plasma[a)]

Horse No.	Ft (ng/ml)			
	Untreated		Heat-treated	
	Serum	Plasma	Serum	Plasma
1	126	97	151	155
2	63	57	82	80
3	55	29	76	62
4	143	97	231	221
5	176	139	221	221

a) Serum and plasma were obtained from the same blood samples.

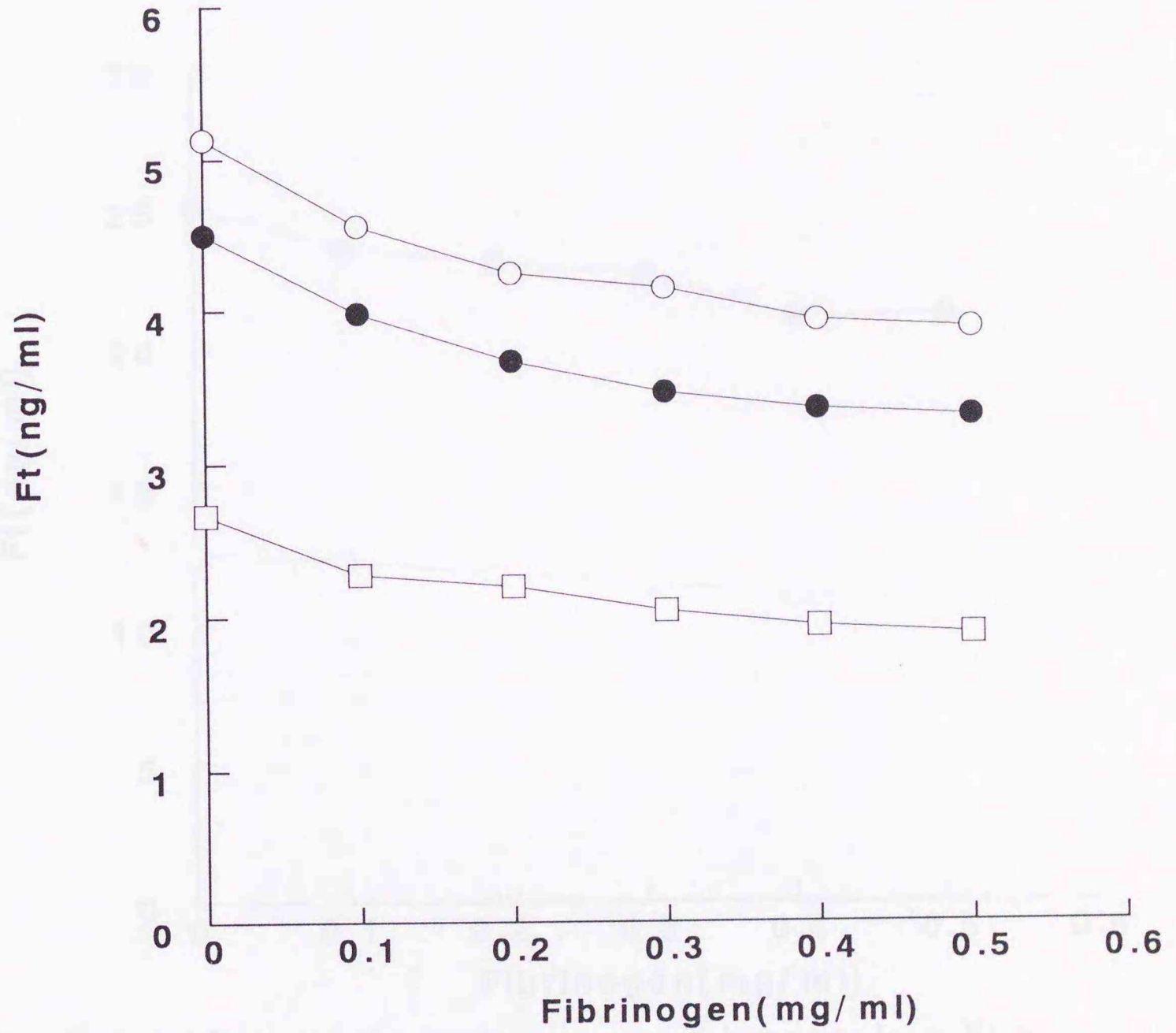


Fig. 6. The effect of fibrinogen on the immunoassay of serum Ft. Various amounts of horse fibrinogen were added to three horse sera (○, ●, and □) diluted 21-fold with ELISA buffer containing 10 mM EDTA, and the Ft concentrations of the mixtures were determined.

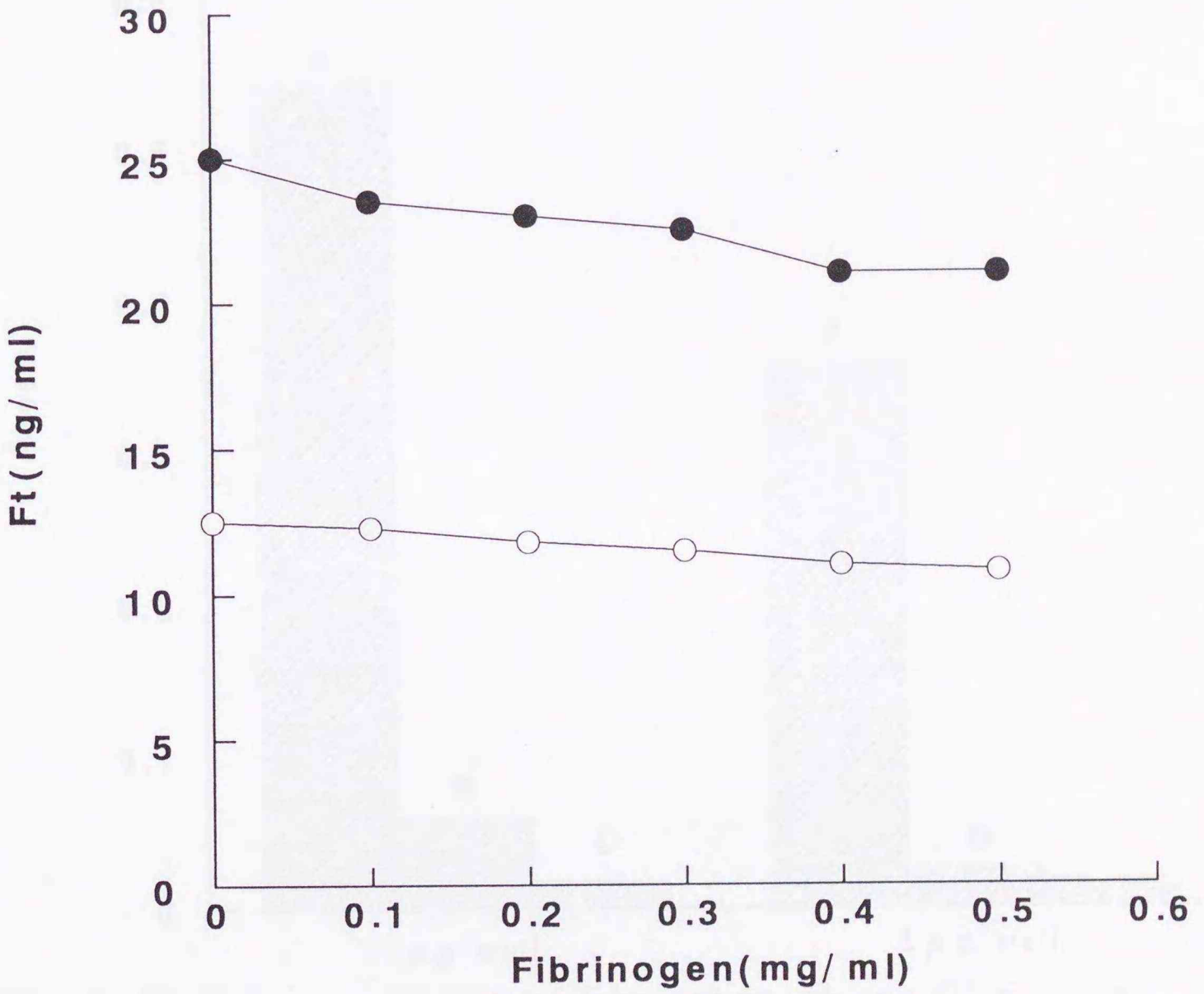


Fig. 7. Inhibition of the immunoassay of horse spleen Ft by fibrinogen. Various amounts of horse fibrinogen were added to 12.5 ng/ml (◯) or 25 ng/ml (●) horse spleen Ft in ELISA buffer, and the Ft concentrations of the mixtures were determined.

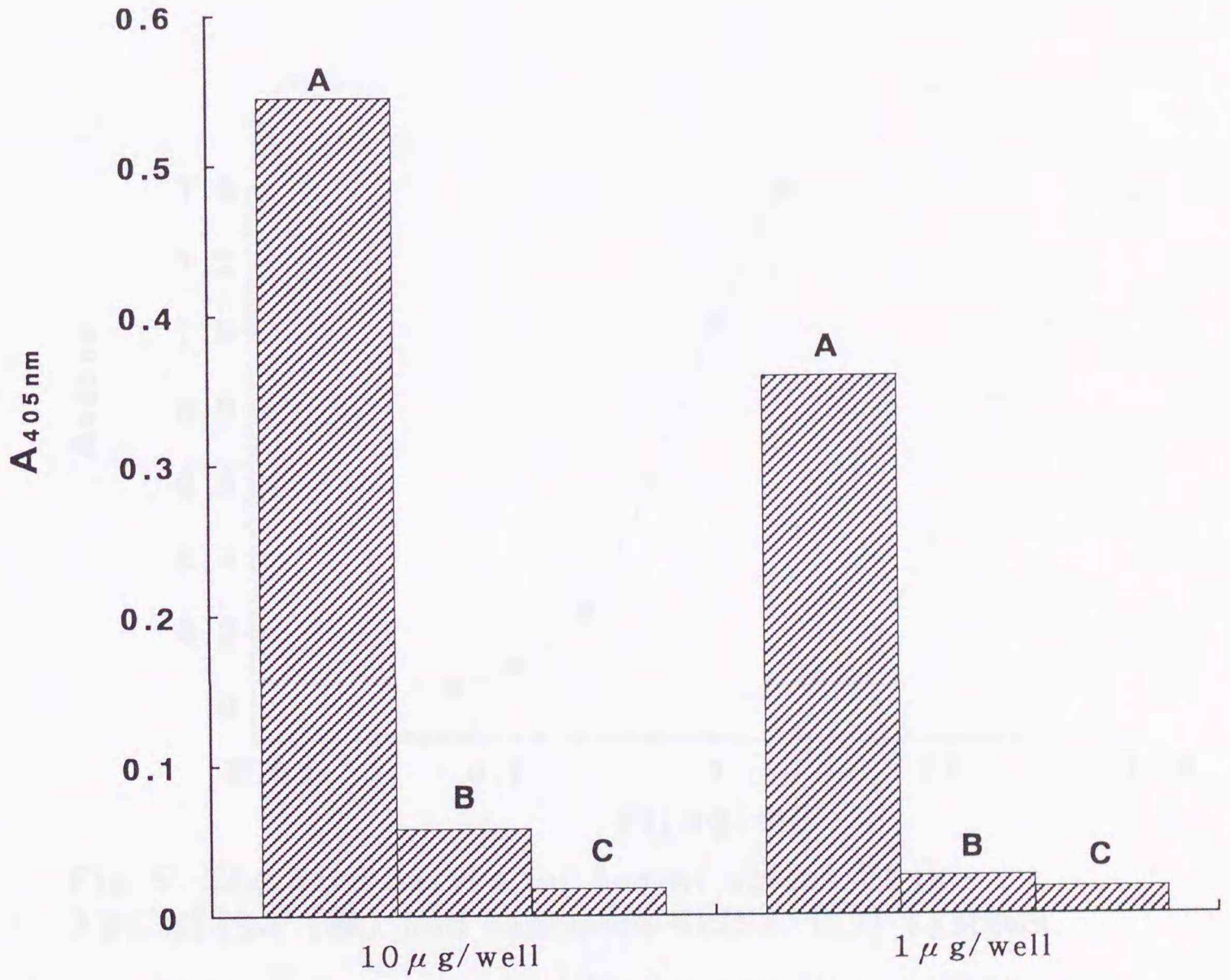


Fig. 8. Ft-binding activity of fibrinogen. Horse fibrinogen (A), serum transferrin (B), or serum albumin (C) was added to each well of the microtiter plates (each 10 μg/well or 1 μg/well) and their Ft-binding activities were determined as described in the text.

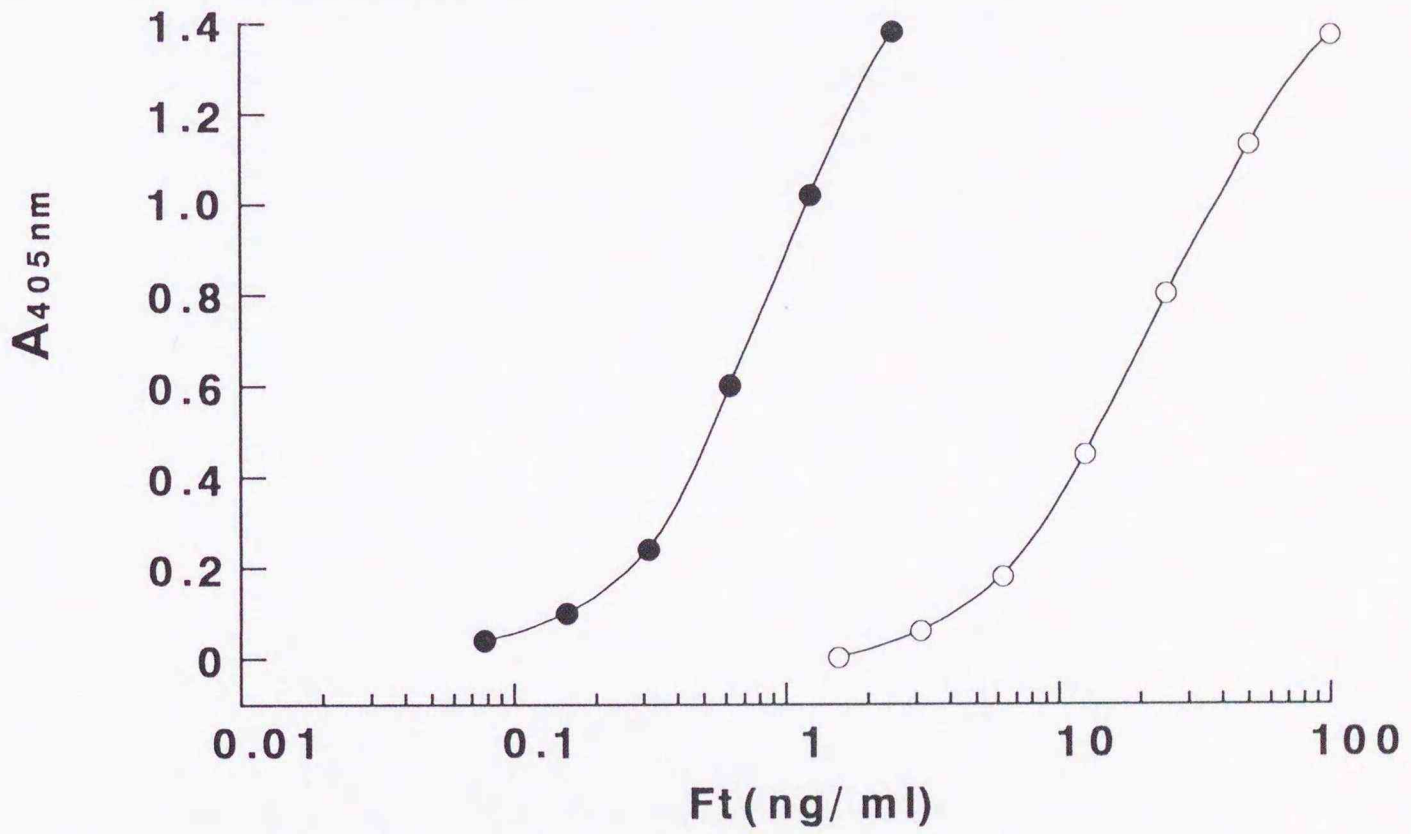


Fig. 9. Standard curves for bovine spleen Ft in ABC ELISA (●) and sandwich ELISA (○) systems.

た（Table 5）。一方、血漿Ft測定値は硫安の添加に影響されず、無添加血漿とほとんど同じ値を示したが、硫安存在下および非存在下のいずれにおいても血清より低かった。また、血清に添加したウシ脾臓Ftの回収率は39～57% と低かった（結果図示せず）が、硫安存在下で血清に添加したウシ脾臓Ftの回収率は91～109% と改善された（Table 6）。しかし、血漿 における回収率は硫安存在下でも73～87% と低く、ウシ血漿によるFt免疫測定阻害効果を解除することはできなかった。本測定法における血清Ft測定の精度は測定内変動係数が5.5%（n=6）、測定間変動係数が9.2%（n=8）であった。

Table 5. The effect of ammonium sulfate on bovine serum and plasma Ft concentrations[a)]

Sample No.	Ft (ng/ml)			
	Serum		Plasma	
	Without $(NH_4)_2SO_4$	With $(NH_4)_2SO_4$	Without $(NH_4)_2SO_4$	With $(NH_4)_2SO_4$
1	10	17	4	4
2	29	46	12	13
3	32	57	4	4
4	32	57	18	18
5	18	22	13	13
6	46	55	19	19
7	23	40	3	3
Mean±S.D.	25±12[b),c),d)]	37±17[b),e),f)]	10±7[c),e)]	11±7[d),f)]

a) Serum and plasma obtained from the same blood samples were diluted 11-fold with ELISA buffer containing 0.5M ammonium sulfate and applied to ABC ELISA to determine the Ft concentrations.

b～f) There was a significant difference between the same superscripts ($p<0.05$) by Student's *t*-test .

Table 6. The recoveries of bovine spleen Ft added to bovine serum and plasma in the presence of ammonium sulfate[a)]

Serum No.	Added Ft (ng/ml)	Serum Found Ft (ng/ml)	Serum Recovery (%)	Plasma Found Ft (ng/ml)	Plasma Recovery (%)
	0	1.4		0.5	
1	1.1	2.4	91	1.4	82
	2.3	3.8	104	2.5	87
	0	2.0		0.7	
2	1.1	3.2	109	1.6	82
	2.3	4.3	100	2.5	78
	0	3.6		2.9	
3	1.1	4.6	91	3.7	73
	2.3	6.0	104	4.8	83

a) The known amounts of bovine spleen Ft were added to bovine serum diluted 11-fold with ELISA buffer containing 0.5M ammonium sulfate and the concentrations were determined by ABC ELISA.

〈考察〉

Niitsu ら〔46〕は、ヒト血清を75℃で10 分間加熱処理することにより、または、1% SDS 処理することにより血清Ft 測定値が増大することを最初に報告し、これらの処理が血清Ftのエピトープを隠蔽する仮想上のFt結合物質を変性させるのではないかと考えた。血清Ft結合物質が、ヒト以外の動物の血清でFt免疫測定を阻害するという報告は全くない。本研究では、ウマとウシの血清および血漿にFt 免疫測定を阻害する効果があることを見出した。ウマではこの血清阻害を除去するには、血清を75 ℃で15 分間加熱処理することが有効であった。したがって、ウマ血清には抗原抗体反応を阻害する成分（おそらくFt結合タンパク質）が含まれ、それらは加熱処理により変性すると考えられる。Smith ら〔57〕は、全抗血清とペルオキシターゼ標識全抗血清を用いたサンドイッチELISA により、ウマ血清に添加したFtのほとんど全てを回収し、Ft免疫測定に及ぼすウマ血清の阻害効果を検出し得なかった。しかしながら、本研究では彼らの測定系に類似したシステムＢを用いても、ウマ血清の阻害効果を認めた。この結果の不一致については用いた抗原または抗体の違いによるものと考えられる。ウマ血清に添加したウマFtの回収率は、加熱処理によってもELISA システムＢでは低いままであった。したがって、アフィニティ精製抗体を用いたシステムＡの方が全抗血清を用いたシステムＢよりも優れている。

Smith ら〔57〕は正常成馬の血清Ft 濃度は70～250 ng/ml と報告しており、本法で開発したELISA システムは血清Ft 測定に十分の感度を有していた。また、Harvey ら〔25〕は出生1 日後の仔馬の血清Ft 濃度は急激に160 ng/ml までに上昇するが、その後は成長に伴い減少して3 週間後には最低値60 ng/ml を示し、それ以後は再び上昇し始め6 ヵ月後には成馬レベルに達することを報告している。Harvey ら〔25〕は初乳中に高濃度のFt （354 ng/ml）が存在することから、出生後の子馬の血清Ft濃度の上昇が初乳の摂取により起ると示唆している。Ft測定における血清阻害は出生後数日の新生子馬においても認められたことから、Ft 結合タンパク質は、出生後の早い時期にウマ血清中にすでに存在すると思われる。

血清（血漿）によるFt免疫測定阻害効果は血清（血漿）FtとFt結合物質の複合体形成により、抗原決定基が隠蔽されるために起こると推察されてきた〔8,

47〕が、Ft結合物質がその阻害効果の原因であるという直接的な証拠は得られていない。Bellotti ら〔8〕は、ヒト血清Ft結合タンパク質として抗Ft抗体（IgG, IgM, IgA ）、α_2 マクログロブリンおよび補体タンパク質（C3, C4 ）を同定したが、これらのタンパク質がFt免疫測定を阻害するか否かについては検討していない。したがって、本研究では21倍希釈ウマ血清にフィブリノーゲンを生理学的濃度（0.1～0.2 mg/ml）になるように添加したとき、血清阻害効果が増強されたこと、ウマフィブリノーゲン単独でもFt標準液の測定値にも及ぼす阻害効果が見られたこと、および、フィブリノーゲン自体にFt結合活性が認められたことから、このタンパク質がFt結合タンパク質の一つであること、およびFt 結合タンパク質がFt免疫測定を阻害する本体の一つであることを明らかにした最初の報告である。加熱処理血清および血漿は同じFt値を示すことから、血液凝固によりフィブリノーゲンがフィブリンに変換する時、血漿Ftへの結合能は消失すると考えられる。フィブリノーゲン添加血清のFt測定値は未処理血漿のそれより高い値を示した。したがって、フィブリノーゲンの他に血漿特異的Ft結合タンパク質が存在することが考えられ、これらのタンパク質が相加的あるいは相乗的に作用してFt 測定に阻害効果を引き起こす可能性がある。

Furugouri および彼の共同研究者が開発したラジオイムノイアッセイで測定した健常な成牛の平均血清Ft 濃度は約40 ng/ mlであり、性差は認められないことを報告している〔23, 43〕。したがって、本研究で開発したABC 法ELISAはウシ血清Ft 測定に十分の感度を有していた。Furugouriらはウシ血清Ft測定のためのラジオイムノアッセイ〔23〕およびエンザイムイムノアッセイ〔43〕を開発しているが、いずれのELISA システムにおいても回収率実験を行なっておらず、ウシ血清によるFt 測定に及ぼす影響について検討していない。しかし、本研究ではウシ血清に添加したFt の回収率が低い値を示し、ウシ血清によるFt免疫測定阻害効果が見られた。ウマでは血清および血漿を75℃、15 分間の加熱処理をすることによりこれらのFt免疫測定阻害効果が解除されたが、同様の方法でウシ血清を処理したところ、ウシ血清Ft の熱変性によると考えられる血清Ft濃度の減少が見られた。そこでウシにおいては血清または血漿の希釈液に硫安を添加しイオン強度の高めることにより、血清（血漿）FtとFt結合物質の相互作用を阻害できるか否かを調べた。11倍希釈ウシ血清に硫安（最終濃度0.46 M）添加した結果、血清に添加したウシFt はほとんど全て回収

され、血清によるFt免疫測定阻害効果が解除された。0.5 M 硫安濃度で調製したウシ脾臓Ftの検量線は硫安未添加の検量線に比べ僅かに右方移動した（結果図示せず）。このことは、ELISA に用いた硫安濃度で抗原抗体反応が非常に弱く阻害されることを示す。また、牛組織Ftの精製には40% 飽和硫安濃度を用いているが、この濃度は約1.6 Mに相当するのでELISA で用いた硫安濃度では血清Ftは塩析されないと考えられる。ウマ血清においては硫安を添加しても血清による阻害効果は解除できなかった。Covell ら〔13〕はヒト、ウサギ、ウマおよび羊の血清成分（Ft 結合物質）が動物種の異なるFtと相互作用することを見出し、これらの血清とヒトあるいはウサギ組織Ftとの親和性が種の間で異なることを報告した。本研究で見られた阻害効果の解除の条件の違いは、ウマとウシの間の血清Ft と血清Ft 結合物質の親和性の違いによるものと考えられる。

本研究ではウシ血漿によるFt測定阻害効果を解除することはできなかった。しかしながら、ウシ血漿にも血漿特異的Ft結合物質が存在することが示唆される。本章では、ウマフィブリノーゲンが血漿特異的Ft結合物質であることを明らかにしたが、ウシフィブリノーゲンがFtに結合し、Ft免疫測定を阻害するか否かについては調べられていない。

Covell ら〔13〕はヒトFt結合物質はH鎖を含む組織Ft と強い相互作用を示すが、血清Ftとはほとんど反応しないことを報告した。Worwood ら〔68〕は^{131}I標識ヒト血漿Ftを用いて循環血から血清Ft（$T_{1/2}$ =27～30 hr）が組織Ft（$T_{1/2}$ =2～10 min）に比べて非常に遅くクリアランスされることを明らかにした。ウシおよびウマのFt結合物質がH鎖に富む心臓Ftと結合するか否か、および血漿Ftと組織Ftのクリアランス速度に違いがあるか否かについては調べられていない。多くの血清あるいは血漿タンパク質成分にFt結合活性が認められるが、今後、これらのタンパク質とFtとの相互作用の生理学的意義を明らかにする必要がある。

〈小括〉

ウマFtの免疫測定に及ぼす血清の影響を、2種のサンドイッチELISA システムを用いて調べた。システムAでは、一次抗体としてアフィニティ精製抗ウマ脾臓Ft抗体を、二次抗体としてALP 標識精製抗体を用い、システムBでは全抗血清および酵素標識全抗血清をそれぞれ用いた。ウマ血清に添加した精製ウマ脾臓Ftの回収率は、いずれのシステムでも非常に低かった（システムAで50～71%，システムBで42～79%）が、血清を75℃で15 分間加熱処理することによりシステムAでの回収率は改善された（90～96%）。しかしながら、システムB における回収率は加熱処理によっても十分には改善されなかった（75～83%）。新生子馬および成馬の血清Ft測定値は、血清の加熱処理により 著しく上昇した。同一ウマ血液から調製した血漿および血清を加熱処理しないでELISA システムAにより測定したところ、血漿は血清よりも10～50% 低いFt値を示したが、加熱処理により、両者のFt測定値は上昇し、ほぼ同じ値を示した。ウマ血清に添加したウマフィブリノーゲンは、Ft測定値を著しく低下させた。また、フィブリノーゲンにはFt結合活性が検出された。以上の結果から、ウマ血清および血漿にはFtの免疫測定を阻害する熱不安定な物質が存在すること、また、フィブリノーゲンはFt免疫測定を阻害する血漿特異的Ft結合物質であることが結論づけられた。ウシ血清Ft測定のために開発した高感度ABC 法ELISA のウシ脾臓Ftの測定限界は0.1 ng/ml であった。硫安を含むELISA 緩衝液で希釈した血清（最終濃度：0.46 M）のFt測定値は硫安を含まない同緩衝液で希釈した血清のそれより有意に高い値を示したが、血漿Ft測定値は硫安の影響を受けなかった。硫安存在下および非存在下のいずれにおいても血漿は血清より有意に低いFt値を示した。血清に添加したウシ脾臓Ftの回収率は39～57%と低かったが、硫安を添加することにより91～109% に改善された。しかし、血漿における回収率は73～87% と低かった。これらの結果はウシ血清および血漿にもFt免疫測定を阻害するFt結合物質が存在することを示唆する。

第三章　ELISA 法で測定した健常牛および各種疾病牛の血清Ft 濃度並びにウシ胎子血清の高Ft レベル

〈序文〉

Ftは分子量約48 万の鉄貯蔵タンパク質であり、細胞内のみならず血液中にも微量に存在することが明らかにされている〔2〕。ヒトおよび各種家畜において血清Ft測定のための免疫測定法が開発され、血清Ft量は体内貯蔵鉄量と正の相関性を示すことが明らかとなった〔2, 29, 44, 56, 57〕。また、ヒトにおいては血清Ftは急性相タンパク質および腫瘍マーカーであることが報告されている〔26, 66〕。Furugouri らはウシ血清Ft定量のためのラジオイムノアッセイ〔23〕およびエンザイムイムノアッセイ〔43〕を開発し、妊娠牛、泌乳牛、成雄牛、哺育牛における生理的変動および鉄栄養状態と血清Ft量との関連性について報告した〔22, 23, 43, 44〕。Furugouri〔22〕は低栄養状態のホルスタイン雄子牛の血清Ft濃度が上昇することを報告しているが、ウシ血清Ft 測定の病態生理学的意義については詳細に検討されていない。

ヒト胎児の血清Ftレベルは胎齢とともに上昇し〔1, 55〕、出生時には80～290 ng/mlで、母親の血清Ftレベルより6～10 倍高いことが報告されている〔1, 31, 51〕。この知見はたとえ母親が鉄欠乏状態に陥っていても、胎児の増加する鉄要求を満たすために、鉄濃度勾配に逆らって胎児へ鉄が供給されることを示す。胎児の貯蔵鉄量は胎児の成長に伴い増大し、出生時には高レベルに達すると考えられる。しかしながら、ヒト以外の動物の胎子における血清Ftについての情報は全くない。

本章では第二章でウシ血清Ft測定のために開発した高感度ABC 法ELISA を用いて、健常牛および各種疾病牛の血清Ft濃度を測定した。また、市販ウシ胎子血清におけるFt濃度およびFt鉄含量を測定し、ウシ胎子血清には鉄含量の高いFt が高濃度に存在することが明らかになった。

〈材料および方法〉

［1］ウシFt および抗Ft 抗体

ウシ脾臓Ft は、第一章で述べた方法に従って精製した。

Ft に対する特異抗体は、第一章で述べたようにウサギ抗ウシ脾臓Ft 血清からFt-セファロース4B を用いて精製した。

[2] イムノブロット法

イムノブロット法は第一章に述べた方法に従って行った。但し、抗ウシ脾臓Ft 抗体は1μg/ml で用い、対照血清として正常ウサギIgG 抗体を用いた。

デンシトメトリーは島津二波長フライングスポットスキャナー（CS-9000）を用い、ブロット膜上のFt バンドは波長535nm で反射吸収法で測定した。

[3] ウシ血清

ウシ血液は北里大学獣医畜産学部附属家畜病院、同大学附属八雲および牡鹿牧場で飼養された健常なアンガス種、日本短角種、黒毛和種、ホルスタイン種およびこれらの交雑種並びに十和田食肉センターでと殺されたウシから採血した。また、八雲および牡鹿牧場において正常な妊娠を継続しているウシからも採血した。炎症性疾患、白血病および小型ピロプラズマ（*Theileria sergenti*）感染牛の血清は同大学家畜病院、獣医病理学講座および山口共済連合会から分与された。血清は第一章で述べた方法に従って調製し、使用時まで-20℃で冷凍保存した。

ウシ胎子血清はBiocell Laboratories社（USA）、CSL Diagnosis社（Australia）、Flow Laboratories社（USA）、GIBCO BRL社、Irvine Scientific（USA）社およびJRH Biosciences 社（USA）の製品13ロットを用いた。胎子血清は使用時まで-20℃で冷凍保存した。

[4] Tf および抗Tf 抗体

ウシTf はWatanabe ら〔63〕の方法に従って精製した。ウサギ抗Tf 血清は第一章で述べた方法に従って調製し、抗ウシTf 特異抗体はウサギ抗Tf 血清からTf-セファロース4Bを用いて精製した。

［5］サンドイッチELISA およびABC 法ELISA

ウシFt 測定のためのABC 法およびサンドイッチELISA は第二章に述べた方法に従い、血清Ft 濃度はABC 法ELISA、胎子血清Ft 濃度はサンドイッチELISA を用いて測定した。

ウシTf のサンドイッチELISA はFt サンドイッチELISA に準じて行なった。但しコーティング用の精製抗Tf 抗体はPBS で5μg/ml に希釈して用い、ELISA 緩衝液には0.1% ゼラチン、0.1% Tween 20 および0.02% NaN_3 を含むPBS を用いた。またALP 標識Tf 抗体は200 ng/ml の濃度で用いた。

［6］血清鉄およびTIBC の測定

血清鉄およびTIBC はEnvironmental Sciences Associates（USA）社製のフェロケムⅡ（血清鉄・血清銅/TIBC自動測定システム）を用いて測定した〔58〕。

［7］ウシ胎子血清Ft 鉄測定

ウシ胎子血清1 ml に精製抗ウシ脾臓Ft 抗体 50μg およびPBS で50% に懸濁したプロテインA セファロースCL-4B（Pharmacia）200μl（ゲル100μl）を添加し4℃、一晩転倒撹拌後、室温で1,400xg、30 分間遠心した。Ft－抗体－プロテインA セファロースCL-4B 複合体を重炭酸生理的食塩水（200 mM $NaHCO_3$, 150 mM NaCl, 0.02% NaN_3, pH8.2）で2 回洗浄後、200μlの3 N HCl（最終濃度2 N HCl）によりセファロースに添加し37℃で1 時間インキュベートした。遠心後、上清50μl を用いてHCl により遊離したFt 鉄をフェロケムⅡで測定した。

［8］胎子血清Ft のConA への結合実験

ウシ胎子血清Ft およびConA の結合はConA セファロース4B（Pharmacia）を用いてWorwood ら〔67〕の方法に従って測定した。

〈結果〉

［1］妊娠期間中の血清Ft 濃度

2 才以上の健常な非妊娠牛（n=69）の血清Ft 値を調べたところ、平均値±SD=46±28 ng/mlであった（Fig. 10）。2 才以上の雌牛の妊娠期間中における血清Ft 値の変動は妊娠1 ヵ月齢から下降し、4 ヵ月齢には非妊娠牛より有意に低い値を示し、5 ヵ月齢では非妊娠牛の約1/2 までに減少した。その後上昇傾向に転じたが、非妊娠牛レベルまでには達しなかった。血清Ft 濃度は体内貯蔵鉄量と正の相関性を示すことから〔2, 29, 44, 56, 57〕、母牛の血清Ft 濃度の減少は胎子への鉄供給に伴う体内貯蔵鉄量の減少を反映すると考えられる。

［2］各種疾病牛の血清Ft 濃度

血清Ft は炎症および腫瘍マーカーであることが知られている〔26, 66〕。Fig. 11 に示されるように白血病（149±130 ng/ml, n=14）および炎症性疾患（553±530 ng/ml, n=7）において血清Ft 値は正常レベルに比べ非常に高い値を示した。また、小型ピロプラズマ病でも血清Ft 濃度は415±337 ng/ml（n=13）と正常レベルに比べ非常に高い値を示した。

［3］ウシ胎子血清におけるFt および鉄濃度

胎子期における血清FtがTf より鉄輸送に関与しているか否かを調べるためにサンドイッチELISA で13 ロットの市販ウシ胎子血清のFt 濃度を測定した。血清Ft 濃度の範囲は800～6,000 ng/ml 、その平均値±SD は2,300±1,500 ng/mlであった。血清鉄濃度の範囲は1.56～3.37μg/ml、その平均値は2.40±0.63μg/ml であった。血清Ft 濃度と血清鉄濃度の間には高い正の相関性（r=0.8855, $p<0.001$）が認められた。

［4］ウシ胎子血清Ft 鉄濃度

ウシ胎子における血清Ft鉄濃度の範囲は0.16～0.96μg/mlであり、Fig. 12 に示すように、血清Ft 濃度と血清Ft 鉄濃度の間には非常に高い正の相関性が認められた。そして

$$\frac{\text{血清Ft 鉄濃度}}{\text{血清Ft 濃度}} \times 100$$

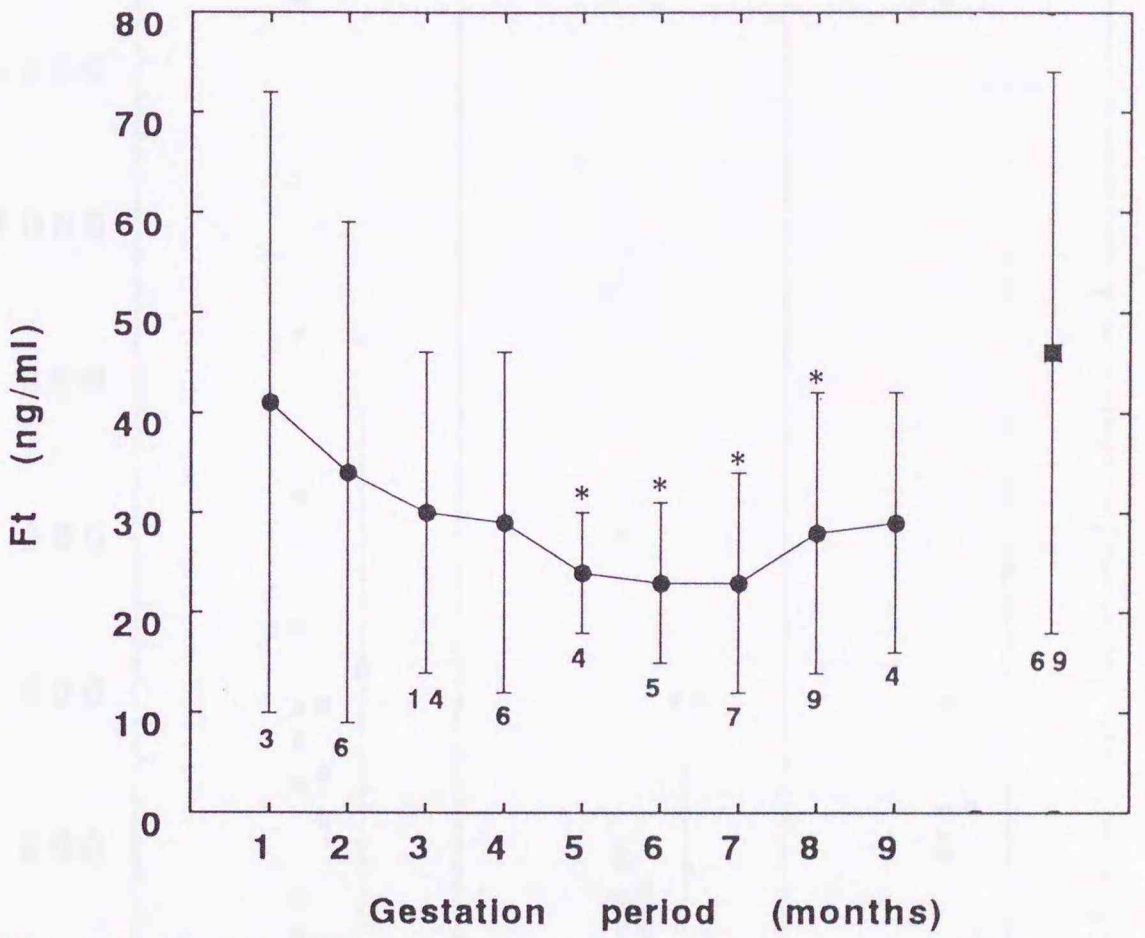


Fig. 10. Serum Ft concentration in cows during pregnancy. Figures in the graph indicate the number of animals. ●: pregnant cows over 2 years old; ■: non-pregnant cows over 2 years old; *: significantly different from non-pregnant cows ($p<0.05$) by Student's *t*-test.

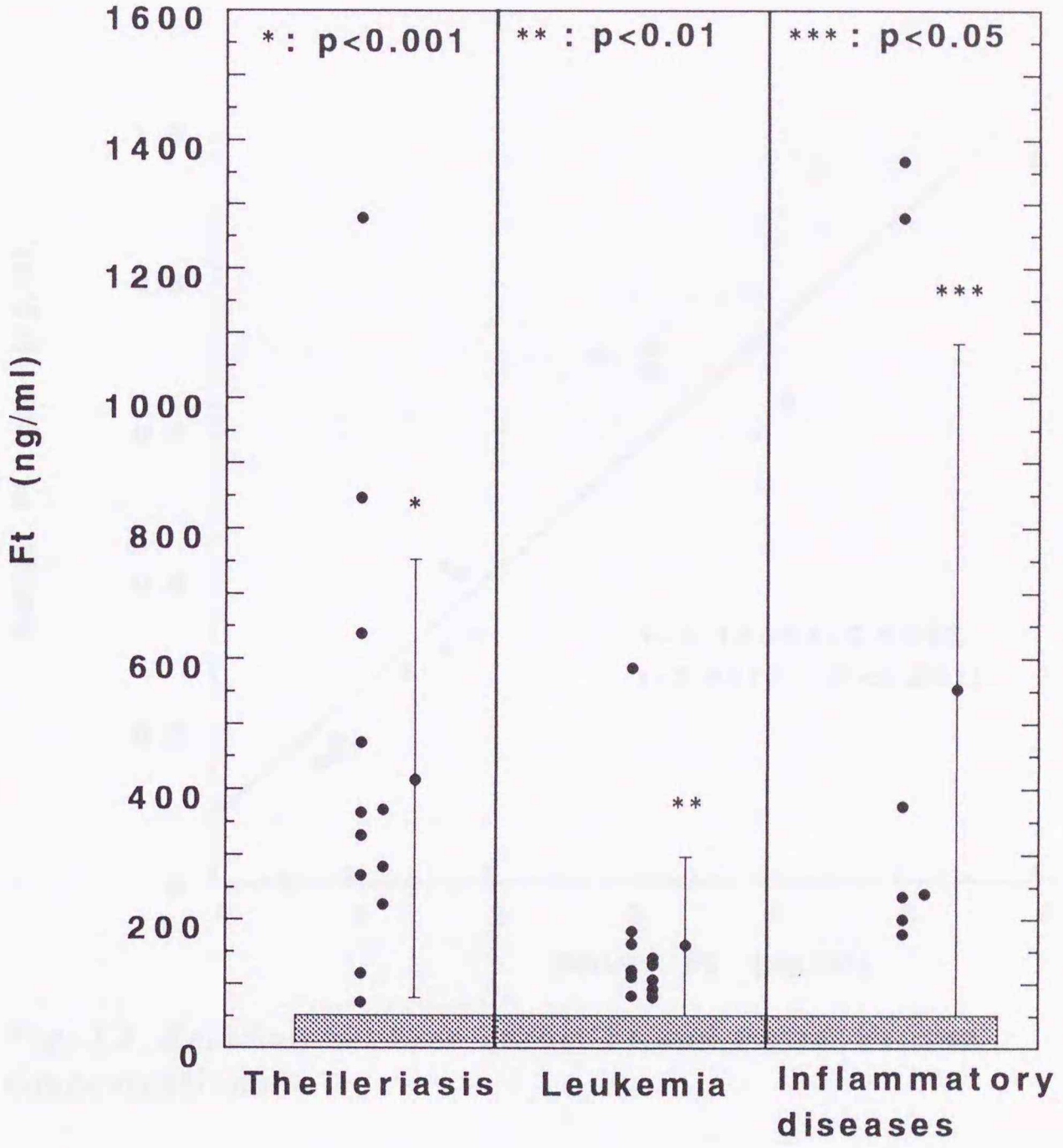


Fig. 11. Serum Ft concentration in cows with theileriasis, leukemia, and clinical signs of inflammation.

*, **, and *** show significatly different ($p<0.001$, $p<0.01$, and $p<0.05$, respectively) from non-pregnant cows over 2 years old by Student's *t*-test.

Shaded areas indicate the mean ± SD of non-pregnant cows over 2 years old (n=69).

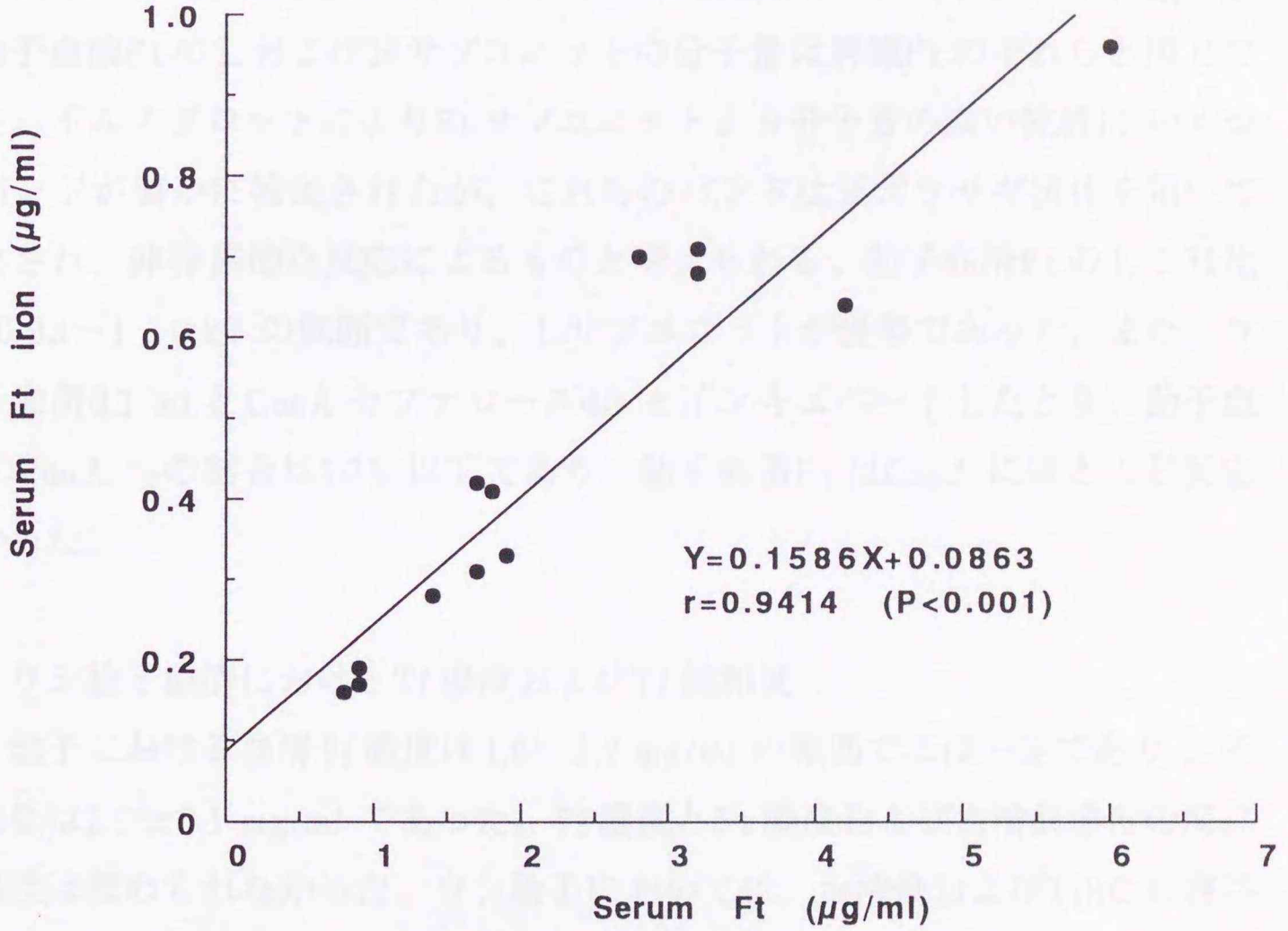


Fig. 12. Relation between serum Ft and serum Ft iron concentrations.

により求められるFt 鉄含量は血清Ft 濃度にかかわらず約20% と一定であった。

Fig. 13 に示すように血清鉄に占める血清Ft 鉄の割合は8.8～28.5% の範囲であり（平均値：17.8±6.0%）、血清Ft 濃度と有意に対数関数的に相関した。

［5］ウシ胎子血清Ft のサブユニット

Fig. 14 はウシ胎子血清6 ロットおよびウシ脾臓Ftのイムノブロット像を示す。胎子血清FtのLおよびHサブユニットの分子量は脾臓Ftのそれらと同じであった。イムノブロットによりFtサブユニットより分子量の高い位置にいくつかのバンドが僅かに検出されたが、これらのバンドは正常ウサギ抗体を用いても検出され、非特異的な反応によるものと考えられる。胎子血清FtのL：H比は1：0.03～1：0.27 の範囲であり、Lサブユニットが優勢であった。また、ウシ胎子血清0.1 ml とConA セファロース4B とインキュベートしたとき、胎子血清FtのConA への結合は10% 以下であり、胎子血清Ft はConA にほとんど反応しなかった。

［6］ウシ胎子血清におけるTf 濃度およびTf 飽和度

ウシ胎子における血清Tf 濃度は1.8～2.2 mg/ml の範囲でほぼ一定であり、その平均値は2.0±0.1 mg/ml であった。Tf 濃度とFt 濃度および血清鉄濃度の間には相関性は認められなかった。ウシ胎子においては、血清鉄およびTIBC に寄与するFt 鉄の割合が高いので、Tf 飽和度は

$$\frac{\text{血清鉄}-\text{Ft 鉄}}{\text{TIBC}-\text{Ft 鉄}} \times 100$$

により計算した〔30〕。Tf 飽和度は54.8～91.7% と大きく変動し、血清Ft 濃度と有意に対数関数的に相関した（Fig. 15）。

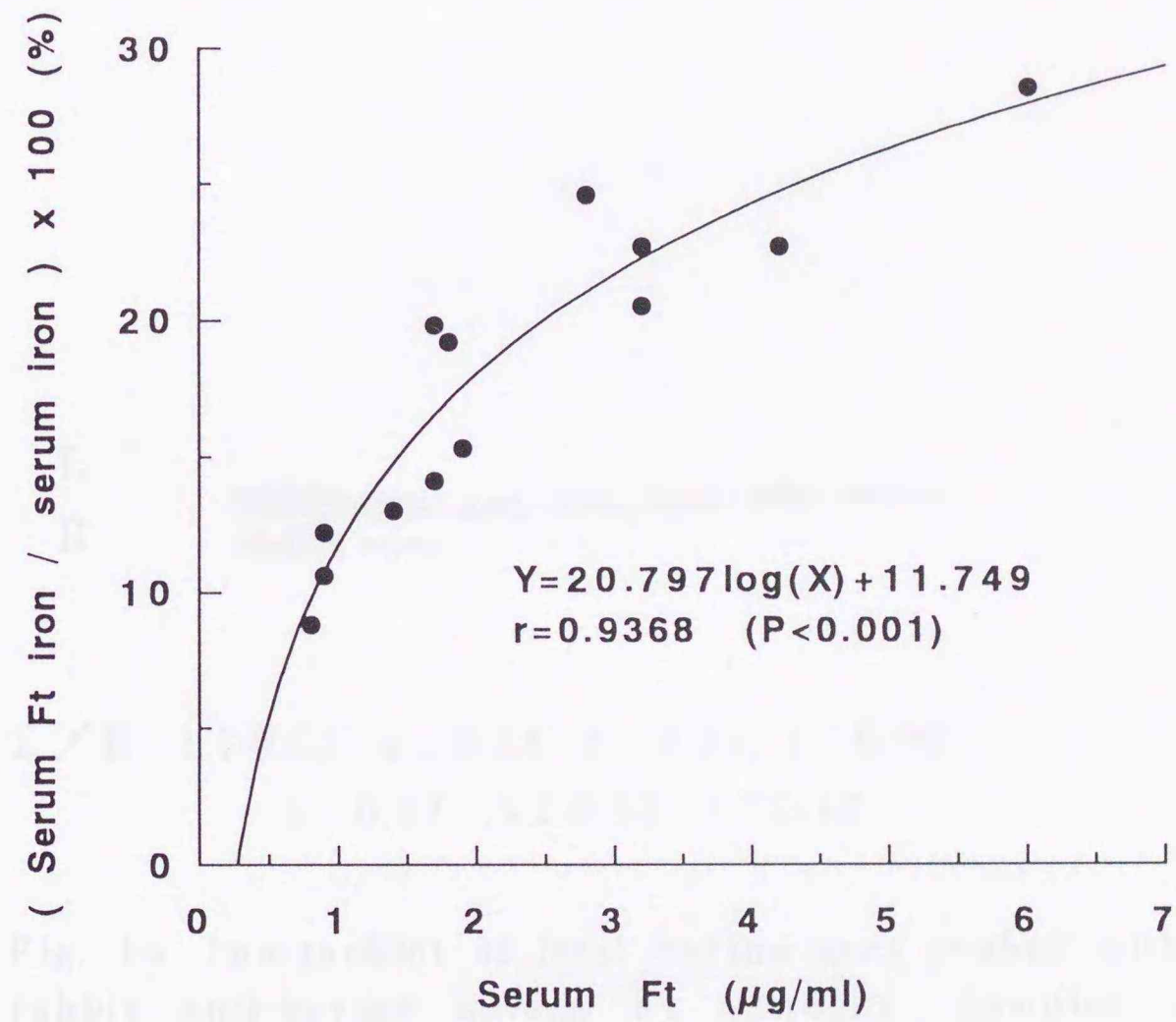


Fig. 13. Relation between serum Ft concentration and the percentage of serum Ft iron to total serum iron.

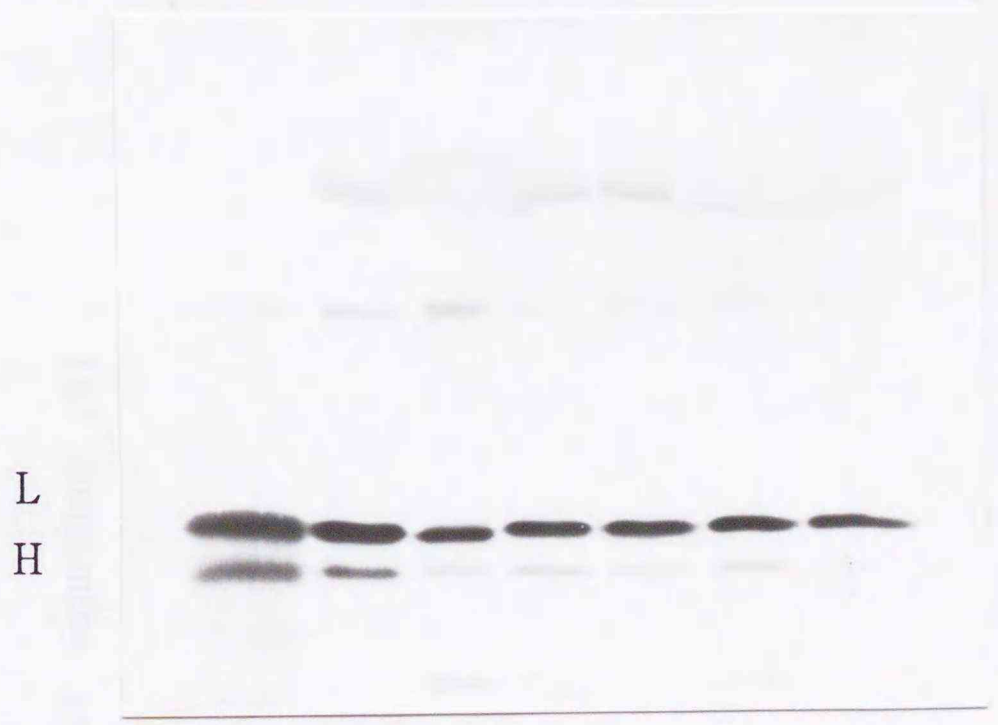


Fig. 14. Immunoblot of fetal bovine sera probed with a rabbit anti-bovine spleen Ft antibody. Samples are purified spleen Ft (100ng, lane 1) and fetal bovine sera (lanes 2-7). L and H are Ft subunits. Anode at bottom.

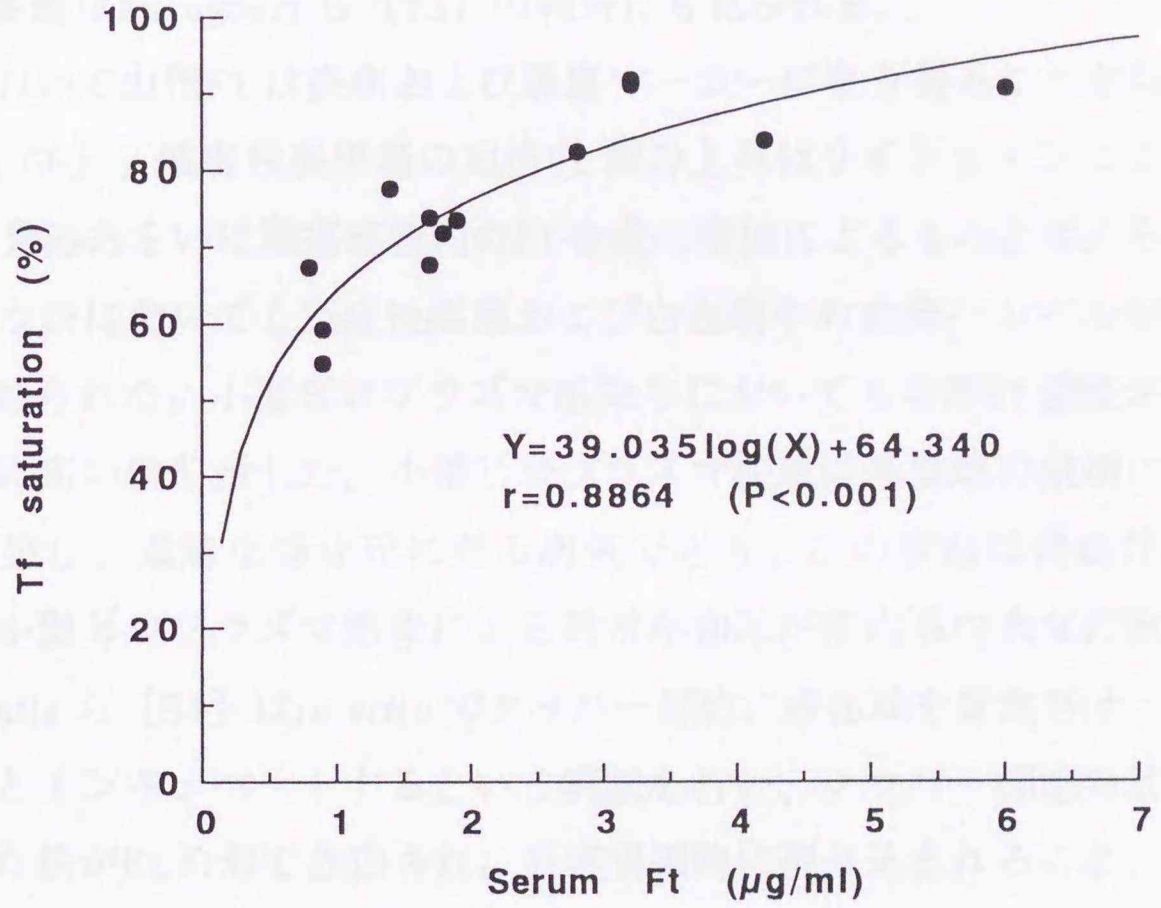


Fig. 15. Relation between Tf saturation and serum Ft level.

〈考察〉

Furugouriおよび彼の共同研究者はラジオイムノイアッセイで測定した健常な成牛の平均血清Ft濃度は約40ng/mlであると報告している〔23, 43〕。第二章で開発したABC 法ELISA で測定した2才以上の健常な成雌牛の血清Ft濃度は48±28 ng/ml であり、Furugouri らの報告した血清Ftレベルとの間に大きな差は見られなかった。ウシ血清Ft濃度は個体間で大きな差が見られたが、この変動はFurugouri ら〔23〕の報告にも見られる。

ヒトにおいて血清Ft は炎症および腫瘍マーカーになり得ることが報告されている〔26, 66〕。腫瘍性疾患時の血清Ft 値の上昇はサイトカインによる網内系細胞のFt分泌あるいは腫瘍細胞内のFt合成の増加によるものと考えられている〔66〕。ウシにおいても炎症性疾患および白血病牛の血清Ftレベルが高くなることが認められた。小型ピロプラズマ感染牛においても血清Ft濃度が健常牛に比べ非常に高い値を示した。小型ピロプラズマ疾患は赤血球の破壊により重度の貧血を呈し、重篤な場合死に至る病気である。この貧血は溶血性貧血であり、また小型ピロプラズマ感染による異常赤血球が網内系の大食細胞に処理される。Sibille ら〔54〕は*in vitro* でクッパー細胞に赤血球を貪食させ、その後肝実質細胞とインキュベートするという実験を行い、クッパー細胞の貪食により処理された鉄がFtの形で放出され、肝実質細胞に取り込まれること、および取り込まれたFtのタンパク質殻はライソゾームで分解され、Tf で見られるようなリサイクル過程〔15〕を経ないことを明らかにした。彼らの知見は網内細胞系、特に脾臓細胞で貪食された赤血球のヘモグロビン鉄もFt 鉄で放出され、門脈を経て肝臓へ移行し、肝実質細胞に取り込まれることを示唆する。したがって、小型ピロプラズマ感染牛における血清Ft濃度の上昇は赤血球破壊が著しく亢進し、過剰に産生されたFt が血中に遊離されたことに因ると考えられる。

Furugouriら〔23〕は妊娠4～9 ヵ月の母牛の血清Ftレベルは約35 ng/ml、血清鉄レベルは約1.7 μg/ml で比較的変動が小さいことを報告している。本研究で測定された市販ウシ胎子血清13 ロットの平均血清Ft濃度は母牛より約65 倍高く、また、平均血清鉄濃度も母牛に比べ約40% 高いことが明らかになった。ヒトにおいても胎児の血清Ftおよび血清鉄濃度はいずれも母親より高いことが報告されている〔1,20〕。ウシ胎子における血清Tf飽和度は60～

95% と高く、これは17 週令以上のヒト胎児で報告されているTf 飽和度60～95％〔20〕と一致する。ヒト胎児の血清Ft濃度および胎児/母親血清Ft比は胎齢とともに上昇し、出生時に最も高い値（血清Ft：80～290 ng/ml, 胎児/母親血清Ft比：6～10）に達することが報告されている〔1, 31, 51, 55〕。市販胎子血清はと畜場で胎齢3 ヵ月以上の胎子から採取し、プールされたものがロットとして販売されているので（JRH Biosciences 社の製品情報）、妊娠期間中の胎子の血清Ft、血清鉄およびTf 濃度の変化を本研究から知ることはできない。1週齢の子牛の平均血清Ft濃度が14 ng/ml〔44〕と報告されており、出生前後に胎子内の血清Ftが著しく減少することが考えられ、胎子内血清Ftが母牛または胎盤に移行し易くなると思われる。

ウシ胎子血清Ftは約20% の高い鉄含量を有し、血清鉄に占めるFt鉄の割合も平均約18% と高いことから、ウシ胎子においては血清Ftが鉄輸送に大きく関与していることが推察される。ヒト胎児血清Ftの鉄含量は測定されていないため、血清鉄に占めるFt鉄の割合は明らかではないが、血清Ftレベルが最も高くなる分娩時においてFt鉄含量が約20% と仮定しても、Ft鉄は血清鉄の僅か2～4% を占めるにすぎない〔31, 51, 62〕。

Worwood および彼の共同研究者は正常ヒト血清中のFtが高い割合でConA と結合することから〔14, 67〕、ヒト血清Ftは組織FtのHおよびL鎖の他に糖鎖が付加されたサブユニットを含むことを明らかにした。しかしながら、ウシ胎子血清FtのほとんどがConA と反応しなかった。したがって、ウシ胎子血清Ftは糖鎖を含まないと考えられる。

Lamparelli ら〔34〕は妊娠モルモットに^{59}Fe および^{125}I ラベルした組織Ftを静脈内投与し、5 時間後に^{59}Fe の71% が胎盤および胎子に移行したが、^{125}I は全く胎子には移行せず、21 時間までにそのほとんど全てが母親の尿中に現われたことを報告している。したがって、ウシ胎子血清中に高濃度に存在するFtは母親由来ではないと推察される。血清Ft濃度は体内貯蔵鉄量と正の相関性を示すことから〔2, 29, 44, 56, 57〕、ウシ胎子血清の高いFt レベルはウシ胎子内の高い貯蔵鉄量を反映すると考えられる。

〈小括〉

2才以上の雌牛の妊娠期間中における血清Ft値は妊娠1ヵ月齢から下降し、妊娠5ヵ月齢では非妊娠牛（平均値±SD=46±28 ng/ml, n=69）の約1/2までに減少した。その後上昇傾向に転じたが、2才以上の非妊娠牛のFtレベルまで達しなかった。炎症性疾患（553±530 ng/ml, n=7）、白血病（149±130 ng/ml, n=14）および小型ピロプラズマ病（415±337 ng/ml, n=13）において血清Ft値は非常に高い値を示した。これらの結果はウシ血清Ftは炎症および腫瘍マーカーになること、および小型ピロプラズマ発症牛においては網内系が活性化をされることを示唆する。市販ウシ胎子血清13ロットにおけるFtレベルは800～6,000 ng/mlの範囲であった。免疫沈降反応により測定した血清Ft鉄濃度は0.16～0.96 μg/mlの範囲であった。Ft鉄含量はFt濃度にかかわらず約20%と高値を示し、Ft鉄は血清鉄の8.8～28.5% を占めた。Ft鉄含量と血清Ft濃度の間には高い正の相関性が認められた（r=0.9398, $p<0.001$）。胎子血清中のFtのConAへの結合はほとんど見られなかった。血清FtのLおよびH鎖の分子量は脾臓Ftのそれらと同じであり、L鎖が優勢であった。血清Tf濃度は1.8～2.2 mg/mlとほぼ一定であったが、Tf飽和度は54.8～91.7% と大きく変動した。血清Ft濃度とTf飽和度の間には高い相関性（r=0.8864, $p<0.001$）が認められた。以上の結果から、ウシ胎子は高い鉄貯蔵レベルを有すること、および血清Ftは胎子血液循環系の鉄輸送に寄与することが示唆された。

〈総括〉

Ftは24 量体で分子量約48 万の鉄貯蔵タンパク質である。Ftは細胞内タンパク質であるが、血中にも微量に存在する。血清Ft 濃度は体内貯蔵鉄量の指標であり、また炎症および腫瘍性疾患で上昇する。さらにヒト胎児の血清Ft レベルも妊娠の進行とともに上昇するが、ヒト以外の動物の胎子における胎子Ftについての情報は全くない。従来より、血清あるいは血漿にFt 結合タンパク質が存在し、Ftの免疫学的測定に影響を与えることが示唆されていた。本研究ではウシFtの構造と病態生理学的意義を明らかにする目的で、まず、ウシ組織Ftの分子性状を明らかにした。次にウシおよびウマFt の免疫学的測定法を確立し、これに対する血清および血漿の阻害効果を調べた。そして、この測定法を用いて健常牛および各種疾病牛の血清Ft 濃度を測定した。さらにウシ胎子血清Ftの分子性状を明らかにし、胎子血清Ftの胎子循環血液系における生理学的役割について検討した。これらの成績については以下の如く要約される。

1）SDS-PAGE においてウシFt サブユニットの移動度が他の哺乳類Ftサブユニットに比べ逆であるのは何に起因するかを明らかにするために、ウシ脾臓λgt11 cDNAライブラリーから分離したウシFtサブユニットcDNA クローンの塩基配列を決定し、演繹されたウシFtサブユニットのアミノ酸配列を既報の他の哺乳類Ft サブユニットのアミノ酸配列と比較した。HおよびL 鎖はそれぞれ180 および174 アミノ酸残基で構成され、アミノ酸配列から算出されたH鎖の分子量は20,920、L 鎖は19,856 であった。ウシH鎖とヒト、ラットおよびマウスFt H鎖の間の相同性はそれぞれ91%、92% および93% と高かった。HおよびL 鎖間のアミノ酸配列の相同性は54% であった。ウシL 鎖はウマ、ヒトおよびウサギFt L 鎖と同じアミノ酸残基数であり、ウシとウマ、ヒトおよびウサギのL 鎖の配列比較ではそれぞれ24 個（配列相同性, 86%）、28 個（84%）および23 個（87%）のアミノ酸置換が見られたが、アミノ酸あるいはペプチドの挿入または欠失は認められなかった。ウシFt サブユニットはConA と反応しなかった。バキュロウイルス-昆虫細胞発現系で発現させたHおよびL 鎖をSDS-PAGE により解析したところ、発現HおよびL 鎖の移動度はウシ脾臓Ftのそれらと全く同じであった。以上の結果から、SDS-PAGE においてウシL 鎖が他の哺乳類L 鎖に比べ非常に遅く泳動されるのは、構造的、機能的に異なっている

ためではなく、これらのＬ鎖へのSDS の結合量の違いに起因すると推察される。

2）ウマFt免疫測定に及ぼす血清の影響を、２種のサンドイッチELISA システムを用いて調べた。システムＡでは、一次抗体としてアフィニティ精製抗ウマ脾臓Ft抗体を、二次抗体としてALP 標識精製抗体を用い、システムＢでは全抗血清および酵素標識全抗血清をそれぞれ用いた。ウマ血清に添加した精製ウマ脾臓Ftの回収率は、いずれのシステムでも非常に低かった（システムＡで50～71%，システムＢで42～79%）が、血清を75℃で15 分間加熱処理することによりシステムＡ での回収率は改善された（90～96%）。しかしながら、システム Ｂ における回収率は加熱処理によっても十分には改善されなかった（75～83%）。新生子馬および成馬の血清Ft 測定値は、血清の加熱処理により著しく上昇した。これらの結果はウマ血清にはFt免疫測定法を阻害する熱に不安定な物質が存在することを示唆する。

3）ELISA システムＡにより測定したウマ血漿のFt 測定値は血清のそれよりも10～50% 低いFt値を示したが、両者を加熱処理（75℃, 15 min）することにより、これらのFt測定値は上昇し、ほぼ同じ値を示した。ウマ血清に添加したウマフィブリノーゲンは、Ft測定値を著しく低下させた。また、フィブリノーゲンにはFt免疫測定を阻害し、Ftと結合することが見出された。以上の結果から、フィブリノーゲンはFt免疫測定を阻害する血漿特異的Ft結合物質であることが結論づけられた。

4）ABC 法を用いてウシ血清Ft測定のためのELISA を開発した。硫安を含む緩衝液で希釈した血清（最終濃度：0.46 M）のFt 測定値は硫安を含まない同緩衝液で希釈した血清のそれより有意に高い値を示したが、血漿Ft測定値は硫安の影響を受けなかった。硫安存在下および非存在下のいずれにおいても血漿は血清より有意に低いFt値を示した。血清に添加したウシ脾臓Ftの回収率は39～57% と低かったが、硫安を添加することにより91～109% に改善された。しかし、血漿における回収率は硫安存在下でも73～87% と低かった。これらの結果はウシ血清および血漿にFt免疫測定を阻害するFt結合物質が存在することを示唆する。

5）血清Ftレベルは2 才以上の健常な非妊娠牛の血清Ft 値（平均値±SD=46±28 ng/ml, n=69）に比べて、白血病（149±130 ng/ml, n=14）、炎症性疾患

（553±530 ng/ml, n=7）および小型ピロプラズマ病（415±337 ng/ml, n=13）において有意に高い値を示した。これらの結果から、ウシ血清Ftは炎症および腫瘍マーカーになり得ること、および小型ピロプラズマ発症牛の高Ftレベルは網内系の活発な赤血球の貧食に起因することが示唆された。

6）市販ウシ胎子血清13ロットにおけるFtレベルは800～6,000 ng/mlの範囲であった。免疫沈降反応により測定した血清Ft鉄濃度は0.16～0.96 μg/mlであった。Ft鉄含量はFt濃度にかかわらず約20%と高値を示し、Ft鉄は血清鉄の8.8～28.5%を占めた。Ft鉄含量と血清Ft濃度の間には高い正の相関性が認められた（r=0.9398, $p<0.001$）。胎子血清FtはConAにほとんど結合しなかった。血清FtのHおよびL鎖の分子量は脾臓Ftのそれらと同じであり、L鎖が優勢であった。血清Tf濃度は1.8～2.2 mg/mlとほぼ一定であったが、Tf飽和度は54.8～91.7%と大きく変動した。血清Ft濃度とTf飽和度の間には高い相関性（r=0.8864, $p<0.001$）が認められた。以上の結果から、ウシ胎子は高い鉄貯蔵レベルを有すること、および血清Ftは胎子血液循環系の鉄輸送に寄与することが示唆された。

〈謝辞〉

本研究の遂行にあたり、終始有益な御助言および御指導を頂いた北里大学獣医畜産学部獣医生理化学講座の山本晋二教授および渡辺清隆助教授に厚く感謝いたします。ウマまたはウシ血液（血清）サンプルを供与して頂いた北里大学獣医畜産学部家畜病理学講座の吉川堯教授、同大学附属家畜病院元病院長川村清市教授、同大学附属八雲牧場牧場長の千秋達道教授および同大学附属牡鹿牧場牧場長高瀬勝吾教授並びにタイヘイ牧場の六郎田靖様（青森県八戸市）および山口共済連合会の尾崎由佳先生に深く感謝いたします。pAcYM$_1$、*E. coli* JM105、Sf 細胞およびバキュロウイルスを分与して頂き、さらに発現実験を指導して頂いた北里大学獣医畜産学部家禽疾病学講座の中村政幸教授および竹原一明助教授に深く感謝いたします。

本論文を御校閲頂いた北海道大学獣医学研究科比較形態機能学講座生化学教室の斉藤昌之教授、同教室の木村和弘助教授、同診断治療学講座獣医外科学教室の藤永徹教授、岩手大学農学部獣医学科家畜生理学講座の首藤文栄教授に深く感謝致します。

〈引用文献〉

1. Abbas, A., Snijders, R. J. M., Sadullah, S., and Nicolaides, K. H. Fetal blood ferritin and cobalamin in normal pregnancy. *Fetal Diagn. Ther.* **9**: 14-18 (1994).
2. Addison, G. M., Beamish, M. R., Hales, C. N., Hodgkins, M., Jacobs, A., and Llewellin, P. An immunoradiometric assay for ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. *J. Clin. Pathol.* **25**: 326-329 (1972).
3. Andrews, S. C., Arosio P., Bottke, W., Briat, J.-F., von Darl, M., Harrison, P. M., Laulhère, J.-P., Levi, S., Lobreaux. S., and Yewdall, S. J. Structure, function, and evolution of ferritins. *J. Inorg. Biochem.* **47**: 161-174 (1992).
4. Arosio, P., Adelman, T. G., and Drysdale, J. W. On ferritin heterogeneity. Further evidence for heteropolymers. *J. Biol. Chem.* **253**: 4451-4458 (1978).
5. Avrameas, S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde: Use of conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry* **6**: 43-52 (1969).
6. Beaumont, C., Dugast, I., Renaudie, F., Souroujon, M., and Grandchamp, B. Transcriptional regulation of ferritin H and L subunits in adult erythroid and liver cells from the mouse. Unambiguous identification of mouse ferritin subunits and *in vitro* formation of the ferritin shells. *J. Biol. Chem.* **264**: 7498-7504 (1989).
7. Beaumont, C., Torti, S. V., Torti, F. M., and Massover, W. H. Novel properties of L-type polypeptide subunits in mouse ferritin molecules. *J. Biol. Chem.* **271**: 7923-7926 (1996).
8. Bellotti, V., Arosio, P., Cazzola, M., Cozzi, A., Levi, S., Meloni, F., and Zappone, E. Characteristics of a ferritin-binding protein present in human serum. *Br. J. Haematol.* **65**: 489-493 (1987).
9. Bothwell, T. H., Pribilla, W. F., Mebust, W., and Finch, C. A. Iron metabolism in the pregnant rabbit. Iron transport across the placenta. *Am. J. Physiol.* **193**: 615-622 (1958).
10. Boyd, D., Vecoli, C., Belcher, D. M., Jain, S. K., and Drysdale, J. W. Structural and functional relationships of human ferritin H and L chains deduced from cDNA clones. *J. Biol. Chem.* **260**: 11755-11761 (1985).
11. Cetinkaya, N., Lengemann, F. W., and Kogan, P. Isolation, purification and characterization of bovine spleen ferritin. *Comp. Biochem. Physiol.* **80B**: 773-778 (1985).
12. Collawn, J. F., Jr., Gowan, L. K., Crow, H., Schwabe, C., and Fish, W. W. Isolation and partial amino acid sequence of three subunit species of porcine spleen ferritin: Evidence of multiple H subunits. *Arch. Biochem. Biophys.* **259**: 105-113 (1987).
13. Covell, A. M., Jacobs, A., and Worwood, M. Interaction of ferritin with serum: Implications for ferritin turnover. *Clin. Chim. Acta* **139**: 75-84 (1984).
14. Cragg, S. J., Wagstaff, M., and Worwood, M. Detection of a glycosylated subunit in human serum ferritin. *Biochem. J.* **199**: 565-571 (1981).

15. Crichton, R. R. and Charloteaux-Wauters, M. Iron transport and storage. *Eur. J. Biochem.* **164**: 485-506 (1987).
16. Daniels-McQueen, S., Ray, A., Walden, W. E., Ray, B. K., Brown, P. H., and Thach, R. E. Nucleotide sequence of cDNA encoding rabbit ferritin L chain. *Nucleic Acids Res.* **16**: 7741 (1988).
17. Dickey, L. F., Sreedharan, S., Theil, E. C., Didsbury, J. R., Wang, Y. -H., and Kaufman, R. E. Differences in the regulation of messenger RNA for housekeeping and specialized-cell ferritin. A comparison of three distinct ferritin complementary DNAs, the corresponding subunits, and identification of the first processed pseudogene in amphibia. *J. Biol. Chem.* **262**: 7901-7907 (1987).
18. Douglas, T. A., Renton, J. P., Watts, C., and Ducker, H. A. Placental transfer of iron in the sow (*Sus domesticus*). *Comp. Biochem. Physiol.* **43A**: 665-671 (1972).
19. Felgner, P. L., Gadek, T, R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., and Danielsen, M. Lipofectin: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 7413-7417 (1987).
20. Fletcher, J. and Suter, P. E. N. The transport of iron by the human placenta. *Clin. Sci.* **46**: 209-220 (1969).
21. Ford, G. C., Harrison, P. M., Rice, D. W., Smith, J. M. A., Treffry, A., White, J. L., and Yariv, J. Ferritin: Design and formation of an iron-storage molecule. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **B304**: 551-565 (1984).
22. Furugouri, K. Ferritin, iron and total iron-binding capacity of the serum from Holstein young steers in prolonged undernutrition. *Jpn. J. Vet. Sci.* **46**: 859-865 (1984).
23. Furugouri, K., Miyata, Y., and Shijimaya, K. Ferritin in blood serum of dairy cows. *J. Dairy Sci.* **65**: 1529-1534 (1982).
24. Granick, S. Ferritin. I. Physical and chemical properties of horse spleen ferritin. *J. Biol. Chem.* **146**: 451-461 (1942).
25. Harvey, J. W., Asquith, R. L., Sussman, W. A., and Kivipelto, J. Serum ferritin, serum iron, and erythorocyte values in foals. *Am. J. Vet. Res.* **48**: 1348-1352 (1987).
26. Hazard, J. T. and Drysdale, J. W. Ferritinaemia in cancer. *Nature* **265**: 755-756 (1977) .
27. Heusterspreute, M and Crichton, R. R. Amino acid sequence of horse spleen apoferritin. *FEBS Lett.* **129**: 322-327 (1981).
28. Hsu, S.-M., Raine, L., and Fanger, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Hisotchem. Cytochem.* **29**: 577-580 (1981).
29. Jacobs, A., Miller, F., Worwood, M., Beamish, M. R. and Wardrop, C. A. Ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. *Br. Med. J.* 4: 206-208 (1972).
30. Kakuta, K., Orino, K., Yamamoto, S., and Watanabe, K. High levels of ferritin and its iron in fetal bovine serum. *Comp. Biochem. Physiol.* **118A**: 165-169 (1997).
31. Kaneshige, E. Serum ferritin as an assessment of iron stores and other hematologic parameters during pregnancy. *Obstet. Gynecol.* **57**: 238-242 (1981).

32. Kitts, P. A., Ayres, M. D., and Possee, R. D. Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. *Nucleic Acids Res.* **18**: 5667-5672 (1990).
33. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685 (1970).
34. Lamparelli, R. D. V., Friedman, B. M., MacPhail, A. P., Bothwell, T. H., Phillips, J. I., and Baynes, R. D. The fate of intravenously injected tissue ferritin in pregnant guinea-pigs. *Br. J. Haematol.* **72**: 100-105 (1989).
35. Laufberger, M. V. Sur la cristallisation de la ferritine. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **19**: 1575-1582 (1937).
36. Leibold, E. A., Aziz, N., Brown, A. J. P., and Munro, H. N. Conservation in rat liver of light and heavy subunit sequences of mammalian ferritin. Presence of unique octopeptide in the light subunit. *J. Biol. Chem.* **259**: 4327-4334 (1984).
37. Levi, S., Luzzago, A., Cesareni, G., Cozzi, A., Franceschinelli, F., Albertini, A., and Arosio, P. Mechanism of ferritin iron uptake: Activity of the H-chain and deletion mapping of the ferro-oxidase site. A study of iron uptake and ferro-oxidase activity of human liver, recombinant H-chain ferritins, and of two H-chain deletion mutants. *J. Biol. Chem.* **263**: 18086-18092 (1988).
38. Levi, S., Yewdall, S. J., Harrison, P. M., Santambrogio, P., Cozzi, A., Rovida, E., Albertini, A., and Arosio, P. Evidence that H- and L-chains have co-operative roles in the iron-uptake mechanism of human ferritin. *Biochem. J.* **288**: 591-596 (1992).
39. Linder, M. C., Nagel, G. M., Roboz, M., and Hungerford, D. M., Jr. The size and shape of heart and muscle ferritins analyzed by sedimentation, gel filtration, and electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **256**: 9104-9110 (1981).
40. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275 (1951).
41. Luzzago, A., Arosio, P., Iacobello, C., Ruggeri, G., Capucci, L., Brocchi, E., de Simone, F., Gamba, D., Gabri, E., Levi, S., and Albertini, A. Immunochemical characterization of human liver and heart ferritins with monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* **872**: 61-71 (1986).
42. Mertz, J. R. and Theil, E. C. Subunit dimers in sheep spleen apoferritin. The effect on iron storage. *J. Biol. Chem.* **258**: 11719-11726 (1983).
43. Miyata, Y. and Furugouri, K. Serum ferritin concentration of dairy bulls: Determination by radioimmunoassay and enzyme immunoassay *Jpn. J. Vet. Sci.* **49**: 783-789 (1984).
44. Miyata, Y. and Furugouri, K. The relationship between serum ferritin concentration and tissue non-heme iron or tissue ferritin in dairy cattle. *Jpn. J. Vet. Sci.* **49**: 1157-1159 (1987).
45. Murray, M. T., White, K., and Munro, H. N. Conservation of ferritin heavy subunit gene structure: Implications for the regulation of ferritin gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 7438-7442 (1987).

46. Niitsu, Y., Goto, Y., Arisato, N., Sasaki, K., and Kohgo, Y. Ferritin-binding proteins in serum. *Br. J. Haematol.* **68**: 496-497 (1988).
47. Niitsu, Y. and Listowsky, I. Mechanisms for the formation of ferritin oligomers. *Biochemistry* **12**: 4690-4695 (1973).
48. Orino, K., Eguchi, K., Nakayama, T., Yamamoto, S., and Watanabe, K. Sequencing of cDNA clones that encode bovine ferritin H and L chains. *Comp. Biochem. Physiol.* **118B**: 667-673 (1997).
49. Orino, K., Saji, M., Ozaki, Y., Ohya, T., Yamamoto, S., and Watanabe, K. Inhibitory effects of horse serum on immunoassay of horse ferritin. *J. Vet. Med. Sci.* **55**: 45-49 (1993).
50. Orino, K., Yamamoto, S., and Watanabe, K. Fibrinogen as a ferritin-binding protein in horse plasma. *J. Vet. Med. Sci.* **55**: 785-787 (1993).
51. Rios, E., Lipschitz, D. A., Cook, J. D., and Smith, N. J. Relationship of maternal and infant iron stores as assessed by determination of plasma ferritin. *Pediatrics* **55**: 694-699 (1975).
52. Santambrogio, P., Cozzi, A., Levi, S., and Arosio, P. Human serum ferritin G-peptide is recognized by anti-L ferritin subunit antibodies and concanavalin-A. *Br. J. Haematol.* **65**: 235-237 (1987).
53. Santambrogio, P. and Massover, W. H. Protein heterogeneity in rabbit liver ferritin: Two types of molecular dimers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **148**: 1363-1369 (1987).
54. Sibille, J.-C., Kondo, H., and Aisen, P. Interactions between isolated hepatocytes and Kupffer cells in iron metabolism: A possible role for ferritin as an iron carrier protein. *Hepatology* **8**: 296-301 (1988).
55. Siimes, A. S. I. and Siimes, M. A. Changes in the concentration of ferritin in the serum during fetal life in singletons and twins. *Early Hum. Dev.* **13**: 47-52 (1986).
56. Smith, J. E., Moore, K., Boyington, D., Pollmann, D. S., and Schoneweis, D. Serum ferritin and total iron-binding capacity to estimate iron storage in pigs. *Vet. Pathol.* **21**: 597-600 (1984) .
57. Smith, J. E., Moore, K., Cipriano, J. E., and Morris, P. G. Serum ferritin as a measure of stored iron in horses. *J. Nutr.* **114**: 677-681 (1984).
58. Smith, J. E., Moore, K., and Schoneweis D. Coulometric technique for iron determinations. *Am. J. Vet. Res.* **42**: 1084-1085 (1981).
59. Takeda, S., Ohta, M., Ebina, S., and Nagayama, K. Cloning, expression, and characterization of horse L-ferritin in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1174**: 218-220 (1993).
60. Theil, E. C. Ferritin: Structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 289-315 (1987) .
61. Theil, E. C. Regulation of ferritin and transferrin receptor mRNAs. *J. Biol. Chem.* **265**: 4771-4774 (1990).
62. van Eijk, H. G., Kroos, M. J., Hoogendoorn, G. A., and Wallenburg, H. C. S. Serum ferritin and iron stores during pregnancy. *Clin. Chim. Acta* **83**: 81-91 (1978).
63. Watanabe, K., Sakashita, Y., Orino, K., and Yamamoto, S. Identification of bovine serum transferrin phenotypes by polyacrylamide gel isoelectric focusing (PAGIEF). *J. Vet. Med. Sci.*

56: 421-423 (1994).
64. Watanabe, K., Sohara, T., Takeda, M., Ueno, K., Suzumura, N., Rokurouda, Y., Rokurouda, I., and Yamamoto, S. Difference in content ratio of components among horse serum transferrin variants. *Jpn. J. Vet. Sci.* **51**: 969-974 (1989).
65. Watanabe, K., Yahikozawa, S., Orino, K., and Yamamoto, S. Immunological cross-reaction between lactoferrin and transferrin. *J. Vet. Med. Sci.* **57**: 519-521 (1995).
66. Worwood, M. Serum ferritin. *CRC. Critical Rev. Clin. Lab. Sci.* **10**: 171-204 (1979).
67. Worwood, M., Cragg, S. J., Wagstaff, M., and Jacobs, A. Binding of human serum ferritin to concanavalin A. *Clin. Sci.* **56**: 83-87 (1979).
68. Worwood, M., Cragg, S. J., Williams, A. M., Wagstaff, M., and Jacobs, A. The clearance of ^{131}I-human plasma ferritin in man. *Blood* **60**: 827-833 (1982).
69. Wustefeld, C. and Crichton, R.R. The amino acid sequence of human apoferritin. *FEBS Lett.* **150**: 43-48 (1982)
70. Yamada, H. and Gabuzda T. G. Interaction between rabbit erythroblast ferritin and normal plasma proteins. *Blood* **43**: 875-883 (1974).

BIOCHEMICAL STUDIES ON BOVINE FERRITIN

Kouichi Orino

Laboratory of Biochemistry,
School of Veterinary Medicine and Animal Sciences,
Kitasato University, Towada, Aomori 034,
Japan

Ferritin (Ft) is an iron-storage protein with a molecular weight of 480,000. Ft is an intracellular protein but also present in serum. Serum Ft concentration reflects the amount of storage iron in the body, and increases in inflammatory and malignant diseases. Fetal serum Ft level increases as gestation progresses, but there has been no information about the fetal serum Ft in the animals other than humans. It has been suggested that serum or plasma contains Ft-binding proteins which can inhibit immunoassay of Ft. The aims of this study are to clarify the molecular structure of bovine Ft and to assess the pathophysiological significance of the serum Ft. For this, first, I studied the molecular properties of bovine tissue Ft. Next, I investigated inhibitory effects of serum and plasma of bovine and horse on ELISA of their Fts. Finally, I measured the serum Ft level of bovine with various diseases and also of bovine fetus. The results are summarized as follows:

1) In order to clarify what causes the reversed mobility of bovine Ft subunits compared to other mammalian Ft subunits by SDS-PAGE, the full-length cDNA clones for bovine Ft H(eart)- and L(iver)-type subunits were isolated from a bovine spleen λgt11 cDNA library using anti-Ft subunit antibodies and sequenced. The bovine H and L chains were composed of 180 and 174 amino acid residues with calculated molecular weights of 20,920 and 19,856, respectively, based on amino acid sequences of the H and L chains deduced from their cDNA sequences. These molecular weights of the H and L chains of bovine Ft contrast with those of the H and L chains of the Ft determined by SDS-PAGE (H : 18 kDa; L : 21 kDa). The H and L chains have 54% amino acid sequence homology. On the other hand, amino acid sequence of the H chain shows 91, 92, and 93% homologies with those of human, rat, and mouse H chains, respectively. The bovine L chain consists of the same amino acid residue number as horse, human, and rabbit L chains, and amino acid sequence of the L chain also displays high homologies with those of horse, human, and rabbit L chains (86, 84, and 87%, respectively), with 24, 28, and 23 amino acid substitutions,

respectively. These sequence comparisons showed that there were neither insertion of amino acid(s) or peptide(s) in the bovine L nor deletion. On lectin blotting, bovine Ft subunits did not react with concanavalin A, suggesting that these subunits do not contain carbohydrate chain. When bovine Ft H and L chains were expressed in *Spodoptera frugiperda* cells using a baculovirus expression system, the expressed H and L chains showed the almost same mobilities as the respective chains of bovine spleen Ft on SDS-PAGE. These results suggest that the much slower mobility of bovine L chain compared to other mammalian L chains on SDS-PAGE may result from significant differences in the binding affinity of SDS to these L chains.

2) To confirm the effects of horse serum on immunoassay of horse Ft, two sandwich ELISA systems were developed. In System A, affinity-purified antibody to horse spleen Ft and its conjugate with alkaline phosphatase were used as the first and the second antibodies, respectively. In System B, whole antiserum and its conjugate with the enzyme were used. The recoveries of horse spleen Ft added to horse sera were very low in both systems (50-71% in System A; 42-79% in System B). However, heat treatment of the sera at 75 ℃ for 15 min improved the recoveries (90-96%) in System A, although the recoveries in System B were not improved sufficiently by the same treatment (75-83%). The apparent Ft concentrations of adult and newborn horse sera increased by heat treatment of the samples. These results indicate that horse serum contains a heat-unstable substance(s) which inhibits the immunoassay of horse Ft.

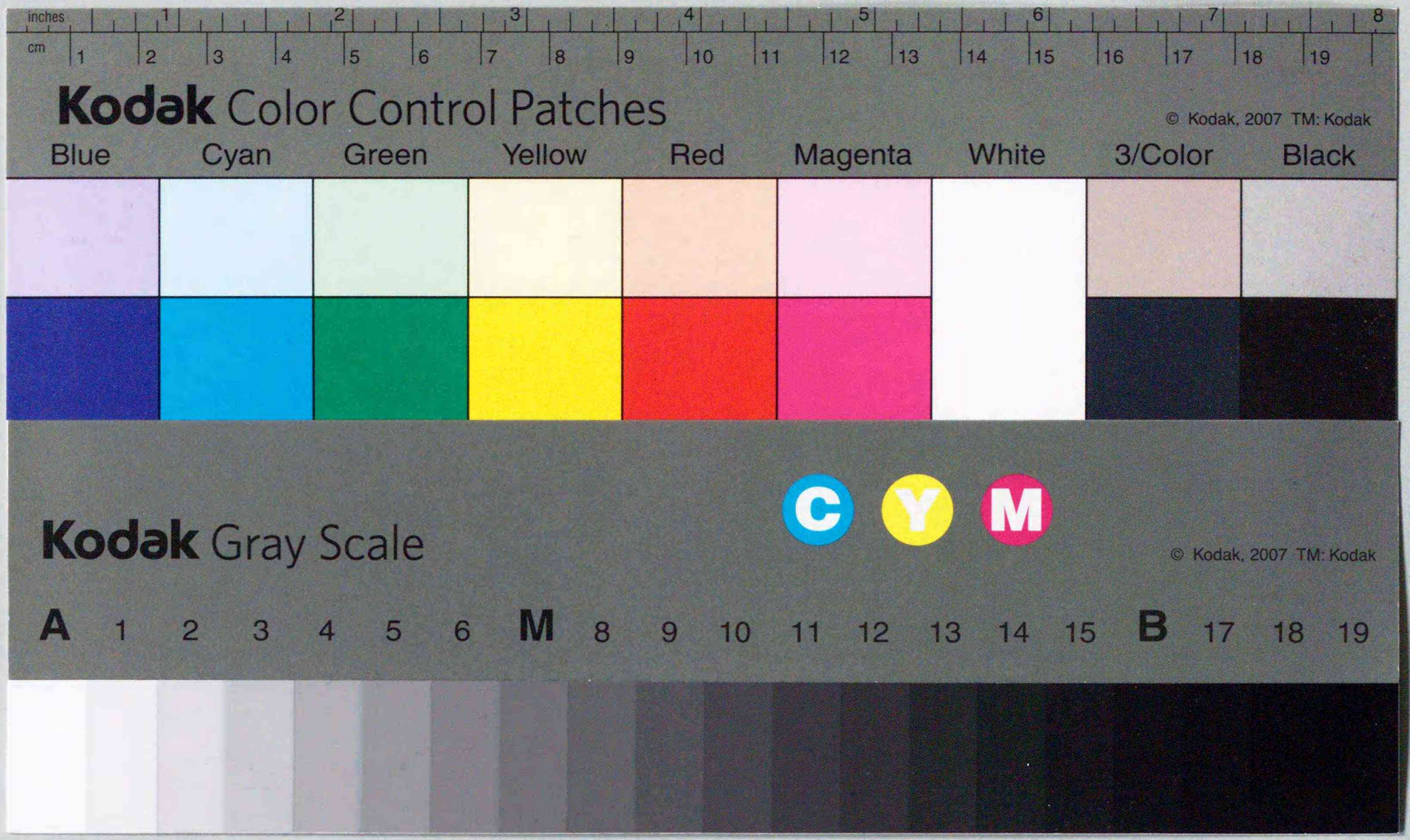
3) Ft concentrations of horse plasma determined by System A were 10-50% lower than those of the sera. However, Ft concentrations of plasma and serum were elevated to the almost same levels by heat treatment. The apparent Ft concentrations in horse sera were markedly decreased by adding horse fibrinogen to the sera. It was also found that horse fibrinogen bound to spleen Ft and inhibited the immunoassay of this protein. From these results, it is concluded that horse fibrinogen is a plasma-specific Ft-binding protein which inhibits the assay.

4) A highly sensitive ELISA for bovine serum Ft was developed using avidin-biotin complex technique. Estimated Ft concentrations of bovine sera were increased when the serum samples were diluted with an ELISA buffer containing 0.5 M ammonium sulfate, whereas those of bovine plasma were not affected by ammonium sulfate, being lower than those of serum samples. The recoveries of bovine spleen Ft added to bovine sera were low

(39-57%), but were improved by the addition of ammonium sulfate to the sera (91-109%). However, in plasma, the recoveries were still low even after the addition of ammonium sulfate (73-87%). These results indicate that bovine serum and plasma contain Ft-binding proteins which disturb the immunoassay of bovine Ft.

5) Serum Ft concentrations of cows with leukemia (n=14), inflammatory diseases (n=7), and theileriasis (n=13) were significantly higher (149 $\pm$ 130, 553 $\pm$ 530, and 415 $\pm$ 337 ng/ml, respectively) than non-pregnant cows over 2 years old (46 $\pm$ 28 ng/ml, n=69). These results suggest that bovine serum Ft may be inflammation and malignant markers and that high Ft levels of theileriasis caused by *Theileria sergenti* result from the activation of reticuloendothelial system.

6) To elucidate physiological roles of serum Ft in bovine fetal circulation, the levels of Ft and its iron in fetal bovine sera were estimated. In 13 lots of commercial fetal bovine sera, the Ft levels ranged between 800 and 6,000 ng/ml. The serum Ft iron concentration measured by a quantitative immunoprecipitation technique ranged from 0.16 to 0.96 μg/ml, and the iron content of Ft was about 20% regardless of serum Ft concentration. The percentage of Ft iron to total serum iron ranged from 8.8 to 28.5%, and correlated significantly with Ft concentration (r=0.9368, $p<0.001$). No significant proportion of the Ft in fetal serum bound to concanavalin A. Immunoblotting showed that the molecular sizes of H- and L-type subunits of fetal serum Ft were identical to those of H and L subunits of adult bovine spleen Ft (H : 18 kDa, L : 21 kDa), respectively, and that the L subunit predominated. Serum transferrin level was relatively constant (1.8-2.2 mg/ml), whereas transferrin saturation varied from 54.8 to 91.7%. There was a significant correlation between serum Ft concentration and transferrin saturation (r=0.8864, $p<0.001$). These findings demonstrate that bovine fetus has the elevated iron stores and that serum Ft may contribute to the iron transport in the fetal circulation.


inches
cm
Kodak Color Control Patches
© Kodak, 2007 TM: Kodak
Blue
Cyan
Green
Yellow
Red
Magenta
White
3/Color
Black
Kodak Gray Scale
C
Y
M
© Kodak, 2007 TM: Kodak
A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19