

可溶性レセプターの発現とレセプター、
リガンド分子の相互作用に関する研究

佐藤 淳

目次

| | | |
|-------|---|----|
| 第1章 | 緒論 | 1 |
| 1-1 | 緒言 | 1 |
| 1-2 | Low density lipoprotein (LDL) レセプターと Very low density lipoprotein (VLDL) レセプター | 2 |
| 1-3 | Bone marrow stromal cell antigen -1 (BST-1/CD157) | 5 |
| 1-3-1 | 総論 | 5 |
| 1-3-2 | ファージランダムペプチドライブラリー | 9 |
| 1-4 | BST-1とBST-1のADP ribosyl cyclase活性を特異的に 阻害するインヒビターSNP-1との結合解析 | 9 |
| 1-5 | スーパー抗原 Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) に 結合して、そのレセプター分子をミミックするペプチドの同定 | 11 |
| 1-6 | 本研究の目的と意義 | 12 |
| 第2章 | 活性型可溶性ヒトLow density lipoprotein (LDL)レセプター、 Very low density lipoprotein (VLDL) レセプターの発現 | 16 |
| 2-1 | 緒言 | 16 |
| 2-2 | 実験方法 | 17 |
| 2-2-1 | 試薬 | 17 |
| 2-2-2 | ヒトLDLレセプター発現ベクターの構築 | 17 |
| 2-2-3 | ヒトVLDLレセプター発現ベクターの構築 | 19 |
| 2-2-4 | Receptor-associated protein (RAP) 全長 発現用ベクターの構築 | 21 |
| 2-2-5 | 細胞培養および組換えバキュロウイルスの単離 | 21 |
| 2-2-6 | 組換えバキュロウイルスの昆虫細胞での発現 | 22 |
| 2-2-7 | 膜画分の調製 | 22 |
| 2-2-8 | ウエスタンブロッティング | 23 |
| 2-2-9 | リポ蛋白の ¹²⁵ Iでの標識化及びリガンドブロッティング | 23 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2-2-10 | Glutathion-S-Transferase (GST)-RAPを用いる リガンドブロッティング | 24 |
| 2-3 | 結果 | 25 |
| 2-3-1 | LDLレセプター発現組換えウイルスの作製 | 25 |
| 2-3-2 | LDLレセプターの昆虫細胞での発現 | 25 |
| 2-3-3 | 発現したLDLレセプターのリガンド結合能の確認 | 27 |
| 2-3-4 | VLDLレセプターの昆虫細胞での発現 | 27 |
| 2-3-5 | GST-RAPを用いるリガンドブロッティング | 29 |
| 2-3-6 | RAPとVLDLレセプターの細胞外ドメインとの共発現の検討 | 29 |
| 2-3-7 | RAPとLDLレセプターの細胞外ドメインとの共発現の検討 | 32 |
| 2-4 | 考察 | 32 |
| 2-5 | 結言 | 37 |
| 第3章 | 可溶性ヒトBone marrow stromal cell antigen-1 (BST-1/CD157) の発現と、ecto-ADP-ribosyl cyclase 活性を阻害するペプチド インヒビターの創製 | 40 |
| 3-1 | 緒言 | 40 |
| 3-2 | 実験方法 | 42 |
| 3-2-1 | 試薬 | 42 |
| 3-2-2 | ヒト可溶性BST-1発現ベクターの構築 | 42 |
| 3-2-3 | 昆虫細胞培養および組換えバキュロウイルスの単離 | 42 |
| 3-2-4 | 組換えバキュロウイルスの昆虫細胞での発現 | 44 |
| 3-2-5 | ウエスタンブロッティング | 44 |
| 3-2-6 | 可溶性BST-1の精製 | 44 |
| 3-2-7 | ファージランダムペプチドライブラリーの作製 | 45 |
| 3-2-8 | 可溶性BST-1結合ファージのスクリーニング | 45 |
| 3-2-9 | Phage ELISA | 47 |
| 3-2-10 | ADP-ribosyl cyclase 活性の測定 | 48 |
| 3-2-11 | cADP-ribose hydrolase活性の測定 | 48 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3-3 | 結果 | 48 |
| 3-3-1 | 可溶性BST-1の昆虫細胞での発現および精製 | 48 |
| 3-3-2 | 可溶性BST-1のADP-ribosyl cyclase 活性 | 49 |
| 3-3-3 | BST-1結合ファージのスクリーニング | 49 |
| 3-3-4 | 合成ペプチドによるファージと可溶性BST-1との結合阻害 | 52 |
| 3-3-5 | 合成ペプチドによるADP-ribosyl cyclase 活性阻害 | 57 |
| 3-3-6 | SNP-1のADP-ribosyl cyclase 活性阻害形式と 阻害物質定数 K_i 値 | 57 |
| 3-3-7 | SNP-1のcADP-ribose hydrolaseの活性阻害 | 60 |
| 3-3-8 | ファージSN-1、SN-16と可溶性CD38との結合 | 60 |
| 3-3-9 | SNP-1のCD38 ADP-ribosyl cyclase 活性に対する活性阻害 | 60 |
| 3-4 | 考察 | 63 |
| 3-5 | 結言 | 65 |
| | | |
| 第4章 | Bone marrow stromal cell antigen-1 (BST-1) の ecto-ADP-ribosyl cyclase活性阻害ペプチドSNP-1と BST-1との結合解析 | 66 |
| 4-1 | 緒言 | 66 |
| 4-2 | 実験方法 | 66 |
| 4-2-1 | 可溶性BST-1の発現、および精製 | 66 |
| 4-2-2 | 合成ペプチドの調製、及び精製 | 66 |
| 4-2-3 | BIAcoreによる結合解析 | 67 |
| 4-2-4 | 超遠心分析法による分子量の決定 | 67 |
| 4-2-5 | 等温滴定型熱量計 (Isothermal titration Calorimetry, ITC) を用いたSNP-1と可溶性BST-1の結合解析 | 69 |
| 4-3 | 結果 | 69 |
| 4-3-1 | BIAcoreを用いたSNP-1と可溶性BST-1との結合解析 | 69 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4-3-2 | BIACoreを用いたアラニン残基置換ペプチドと 可溶性BST-1との結合解析 | 71 |
| 4-3-3 | 超遠心分析法による分子量の決定 | 74 |
| 4-3-4 | 等温滴定型熱量計 (Isothermal titration Calorimetry, ITC)を 用いたSNP-1と可溶性BST-1の結合解析 | 74 |
| 4-4 | 考察 | 77 |
| 4-5 | 結言 | 79 |
| 第5章 | ファージライブラリー法を用いたりガンド分子に結合し、 そのレセプター分子をミミックするペプチドの同定 | 81 |
| 5-1 | 緒言 | 81 |
| 5-2 | 実験方法 | 81 |
| 5-2-1 | Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) の精製 | 81 |
| 5-2-2 | ファージランダムペプチドライブラリー | 82 |
| 5-2-3 | TSST-1結合ファージのスクリーニング | 82 |
| 5-2-4 | Phage ELISA | 84 |
| 5-2-5 | ペプチド合成 (Pep3) | 84 |
| 5-2-6 | Daudi 細胞からのMHCクラスII 分子 (HLA antigen DR7) の部分精製 | 84 |
| 5-2-7 | 合成ペプチド (Pep3) によるTSST-1とMHCクラスII分子 の結合阻害 | 85 |
| 5-3 | 結果 | 86 |
| 5-3-1 | TSST-1結合ファージの選択 | 86 |
| 5-3-2 | TSST-1結合ファージとレセプター分子MHCクラスIIの相同性 | 86 |
| 5-3-3 | 合成ペプチド (Pep3) によるファージクローンと TSST-1との結合阻害 | 91 |
| 5-3-4 | ファージ3と他のエンテロトキシン、サイトカイン との交差反応 | 91 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 5-3-5 | 合成ペプチド (Pep3) によるTSST-1とMHCクラスII分子 の結合阻害 | 91 |
| 5-4 | 考察 | 94 |
| 5-5 | 結言 | 99 |
| 第6章 | 結論 | 100 |
| 引用文献 | | 104 |
| 発表論文リスト | | 112 |
| 謝辞 | | 113 |

第1章 緒論

1-1. 緒言

生体内においては、レセプターとリガンド分子とが相互作用することによりシグナルが細胞内に伝達され、様々な生物学的機能が発現される¹⁾。従って、リガンド分子がレセプター分子を認識するメカニズムの解明は非常に重要であり、特に、疾患との関係が示唆されるレセプターとリガンド分子の相互作用については、医薬品の創製につながる情報となり得るものである。

本研究では、レセプターとリガンド分子との相互作用の解析を目的とした。さらに詳しくは、結晶構造解析に適した活性型可溶性レセプターの発現系の確立と、ファージディスプレイランダムペプチドライブラリー法を用いたレセプターとリガンド分子の相互作用の解析を目的とした。

レセプターとリガンド分子の相互作用を解析するためには、レセプター分子の大量調製が不可欠である。しかしながら、レセプター分子は膜蛋白であり、遺伝子組換え法を用いても、得られる量が限られること、さらに得られた膜蛋白を精製するためには、界面活性剤で可溶化しなくてはならず、この操作によりレセプター分子が、失活する機会が多いことなどの問題点がある。そこで、この問題を克服するために、レセプター分子全長を膜蛋白として発現する代わりに、細胞外領域を可溶性型レセプターとして発現する試みを行った。可溶性レセプターとして発現することにより、レセプター分子の大量発現、及び精製が容易になると同時に、得られた蛋白は結晶構造解析に適しているというメリットがある。次に、得られた可溶性レセプターをターゲットにして、ランダムファージペプチドライブラリー法でスクリーニングを行い、ターゲットレセプターに結合するペプチドリガンドを同定した。得られたペプチドリガンドは、ターゲットレセプターの有する酵素反応を阻害した。さらに、得られたペプチドリガンドを用いて、レセプターとペプチドリガンドとの相互作用を解析した。次に、ランダムファージペプチドライブラリー法をリガンド分子に適用して、レセプター分子をミミックする配列を同定し、得られた配列情報からレセプターとリガンド分子との相互作用を論じた。

本章では、まず各章で用いたレセプター分子と、リガンド分子に関する既知の知見について概説する。さらに、各章における研究の目的と意義について述べる。

1-2 Low density lipoprotein (LDL) レセプターとVery low density lipoprotein (VLDL) レセプター

LDLレセプターは細胞表面上の糖蛋白レセプターであり、LDLをエンドサイトーシスで細胞内に取り込み、血中コレステロール値を正常値に保つ働きをする²⁾。一方、1992年にLDLレセプターと高い相同性を持つことで発見されたVLDLレセプターは、LDLレセプターと高い相同性を有するにも関わらず、哺乳類での真の機能は未だ不明である³⁾。

LDLレセプターとVLDLレセプターは、1次配列から予想されるドメイン構造が極めて類似しており、以下に示す5つの機能ドメインを共有する⁴⁾(Fig.1-1)。

- 1) システイン残基が多く存在するリガンド結合部位：約40アミノ酸の繰り返し配列からなる。1つのシステインリピートには6個のシステイン残基が含まれる。
- 2) Epidermal growth factor (EGF) precursor の相同領域：EGF前駆体の細胞外ドメインと相同性を示す。Growth factor repeatと呼ばれるシステインに富んだ繰り返し配列が含まれ、エンドソームでリガンドを乖離する際に必要な領域と考えられている。
- 3) O-linked sugar の結合領域：セリン、スレオニンに富んだ領域であり、O-linked sugar の結合サイトである。機能は現在のところ不明である。
- 4) 膜貫通領域：細胞膜に局在するための領域である。
- 5) 細胞内領域：レセプター分子が細胞膜上のcoated pitに局在するために必要と考えられている共通配列 Phe-Asp-Asn-Pro-Val-Tyrのアミノ酸配列を含んでいる。

両者の構造上の違いは、リガンド結合部位において、LDLレセプターが7回のシステインリピートを有しているのに対して、VLDLレセプターは8回リピートから構成されている点である (Fig.1-2)。

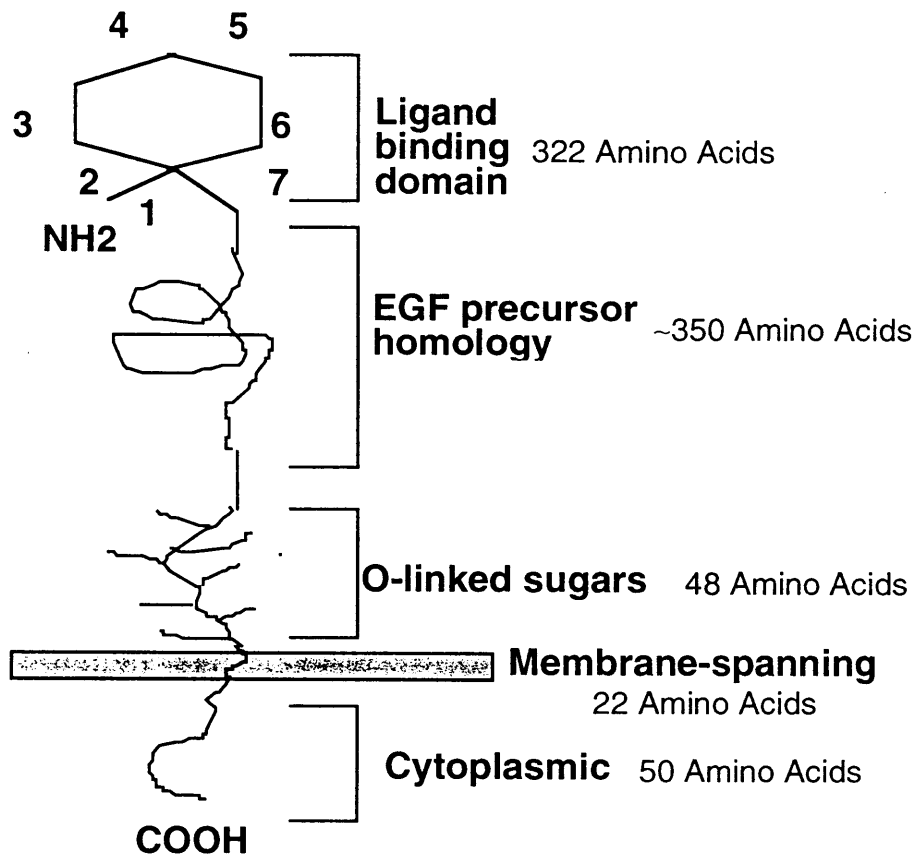


Figure 1-1 Model showing five domains in the structure of the LDL receptor

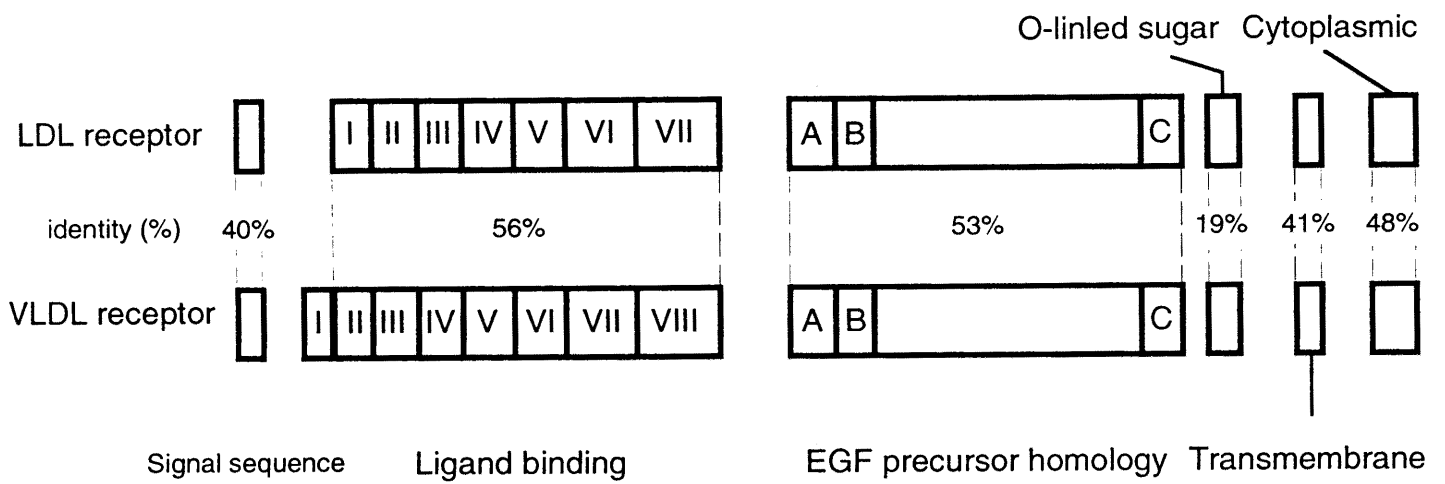


Figure 1-2 Five functional domains in the human VLDL and LDL receptors
 The number of identical residues (expressed as a percentage) in a given domain is indicated between the two receptors. The cysteine-rich repeats in the EGF precursor homology domains are lettered A to C.

一方、LDLレセプターは肝臓や副腎に高発現しているのに対して、VLDLレセプターは、心筋、骨格筋、脂肪組織、脳などに高発現しているという組織特異性の違いがある^{4,5})。さらに、LDLレセプターは、リガンドであるLDLや β -Very low density lipoprotein (β -VLDL)の添加により転写が抑制されるが、VLDLレセプターではこのような抑制は認められない³)。さらにLDLレセプターは、apoB100を含むLow density lipoprotein (LDL)、apoB100とapoE 両方を含む β -Very low density lipoprotein (β -VLDL)共に結合することができるが、VLDLレセプターは、apoEを含む β -VLDLにしか結合できないというリガンド特異性の違いがある⁶)。

LDLレセプタースーパーファミリーの一員であるLow density lipoprotein receptor related protein (LRP)の精製過程で発見された細胞内リガンドである39 kDa Receptor-associated protein (RAP)⁷)は、LDLレセプターとVLDLレセプターの両者に結合することが知られている。ヒトの成熟RAPは、323アミノ酸残基から成り、そのC末端には細胞内のERにとどまるためのアミノ酸配列HNELが存在しているので、主にERにとどまって機能すると考えられる。LRPに対するRAPの機能は、リガンド結合依存的におこるLRPの崩壊を防ぐ働きや、シャペロンとして直接LRPの分子フォールディングを改善する働きが提唱されているが、LDL、VLDLレセプターに対する機能は明白になっていない。また、LDLレセプターとRAPとの結合はKd値約250 nMと弱い⁸)のに対して、VLDLレセプターとの結合はKd値約0.7 nMと強く結合する⁹)違いがある。この親和性の違いが、どのような生理学的意義を示しているのかは不明である。

本研究では、LDLレセプターとVLDLレセプターの発現機構の違い、特に両レセプターの発現と細胞内リガンドであるRAPとの関係を解明することを目的として研究を行う。

1-3 Bone marrow stromal cell antigen -1 (BST-1/CD157)

1-3-1 総論

慢性関節リウマチ (RA) 患者由来の骨髄間質細胞株では、健常人由来のものと比較して、間質細胞依存性のマウスプレB細胞株であるDW34の増殖支持能が高まっていること

が観察された。さらに健常人と比較すると、RAや多発性骨髄腫 (MM) 患者の骨髄ストローマ細胞のプレB細胞株の増殖支持能が亢進していることが見いだされ、RA や多発性骨髄腫(MM) 患者の骨髄ストローマ細胞には、プレB細胞株の増殖支持能を促進する分子の存在が示唆された¹⁰⁾。このような骨髄ストローマ細胞に存在するプレB細胞株の増殖支持能を促進する分子は、IL-7、c-kitリガンド、Stem cell factor (SCF) 等がすでに知られていたが、1994年平野らによって新規な分子である骨髄間質細胞抗原-1 (Bone marrow stromal cell antigen-1 ; BST-1/CD157、以下BST-1と表記する) が単離された¹¹⁾(Fig.1-3)。

BST-1はC末端側に疎水性のシグナルペプチドを有するグリコシルフォスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型膜蛋白であり¹¹⁾、BST-1に対するポリクローナル抗体でBST-1を架橋刺激すると、細胞内分子がリン酸化あるいは脱リン酸化されることから、BST-1がシグナル伝達分子 (レセプター) として機能していることが考えられている¹²⁾。さらにヒトリンパ球抗原であるCD38と、アミノ酸レベルで約30%の相同性を有しており¹¹⁾、CD38と同様にADP-ribosyl cyclase活性と、ADP ribose hydrolase活性を有することが知られている¹³⁾。ADP ribosyl cyclase活性は、NADを環状ADPリボース(cADPR) に変換する酵素反応で、ADP ribose hydrolase活性は、環状ADPリボース(cADPR) を加水分解してADPリボースに変換する反応である。cADPRはイノシトール1,4,5-三リン酸 (IP₃) とは異なった機構で、細胞内Ca²⁺ストアからCa²⁺をリリースさせるセカンドメッセンジャーとして注目されている¹⁴⁾。CD38、BST-1ともに酵素の活性部位は細胞外に有り、cADPRが細胞膜を通過しにくいことを考えると、この細胞外に存在する酵素活性が、どのようにして細胞内Ca²⁺ストアからCa²⁺をリリースさせるのという機構の解明が期待される。また、リウマチ患者の関節間隙液や血清には、健常人と比較して有意に高い濃度の可溶性型BST-1の存在が示されており¹⁵⁾、この可溶性型BST-1の有するADP ribosyl cyclase活性と病態との関係が注目される (Fig.1-4)。しかし現在まで、BST-1のADP ribosyl cyclase活性を特異的に阻害するインヒビターが見いだされていないため、上記の問題点を明らかにすることができなかった。そこで本研究では、次節で説

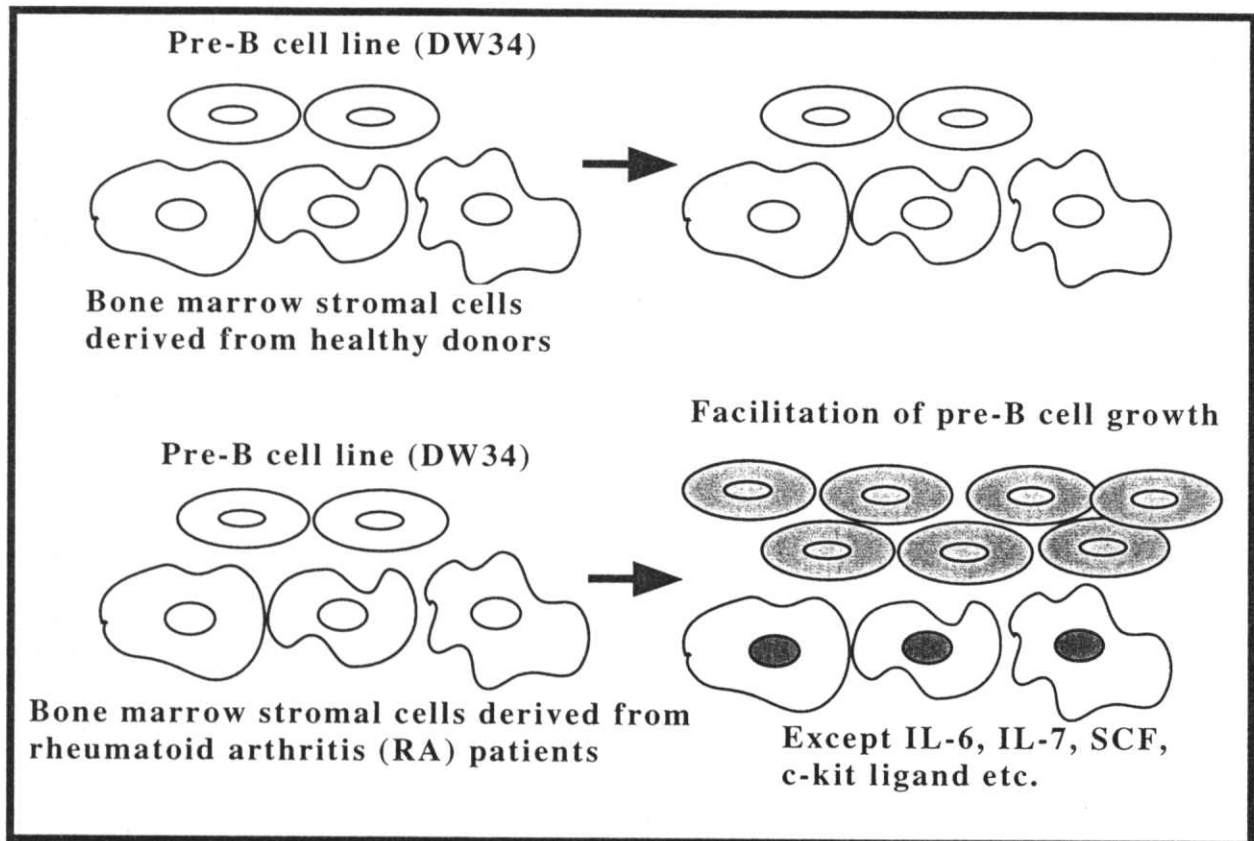
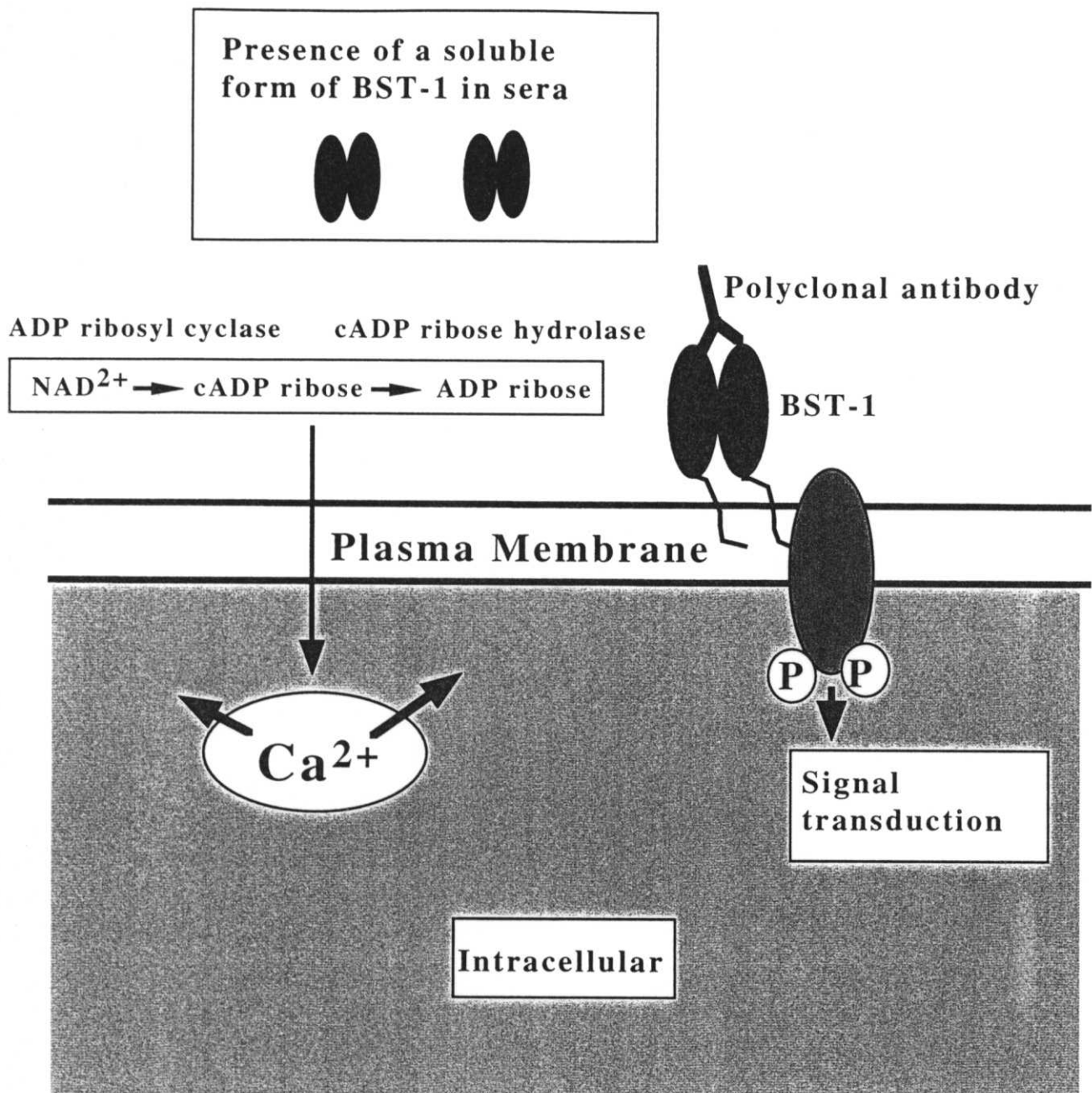


Figure 1-3 Bone Marrow Stromal Cell Antigen-1 (BST-1/CD157) facilitates pre-B-cell growth



- 1) Ecto-enzyme activities
- 2) GPI-anchored molecule
- 3) Receptor molecule
- 4) Elevated level of a soluble form of BST-1 in the sera of rheumatoid arthritis patients

Figure 1-4 Features of BST-1

明するファージランダムペプチドライブラリー法を用いて、BST-1のADP ribosyl cyclase活性を特異的に阻害する酵素インヒビターの創製を目的とする。

1-3-2 ファージランダムペプチドライブラリー

1985年 Smithらは、フィラメントスファージのminor coat proteinである pIIIタンパク質の遺伝子内に、制限酵素EcoRI遺伝子を挿入した変異体ファージを作製した。すると、この変異体ファージにおいて、EcoRIがpIIIタンパク質との融合蛋白としてファージ表面上に発現され、抗EcoRI抗体によって認識されることがわかった。しかも、pIIIタンパク質の機能は失われずに宿主への感染能は維持されていた¹⁶⁾。この事実は、制限酵素EcoRI遺伝子の代わりに、ランダムなペプチドをコードするDNAをpIII遺伝子に挿入すれば、ファージ表面上に発現したランダムペプチドライブラリーを構築できることを意味している¹⁷⁾。通常は、ランダムペプチド配列が6merから15mer位の長さを有するファージライブラリーを作製して使用する。このようなランダムな配列を有するライブラリー（通常は、約 10^8 の配列多様性がある）をターゲット分子と接触させ、ターゲット分子に特異的に結合するファージクローンをパニング法で選択し、目的とする配列を得る^{18, 19, 20)}(Fig.1-5)。この方法の特徴は、ターゲット分子の構造に関する知見がまったく無くても、ターゲット分子に結合する配列を選択することができる点にあり、今までにレセプター分子に作用するアゴニスト^{21,22)}、アンタゴニスト^{23,24)}あるいは酵素インヒビター²⁵⁾等の単離に関する報告がなされている。

1-4 BST-1とBST-1のADP ribosyl cyclase活性を特異的に阻害するインヒビター SNP-1との結合解析

前節では、ランダムファージディスプレイライブラリーから、Bone marrow stromal cell antigen-1 (BST-1) のecto-ADP-ribosyl cyclase 活性を阻害する新規ペプチドインヒビターSNP-1の創製を行った。このペプチドインヒビターは、BST-1のADP ribosyl cyclase活性を解析する有力なツールになると同時に、さらに強力なインヒビターを設計

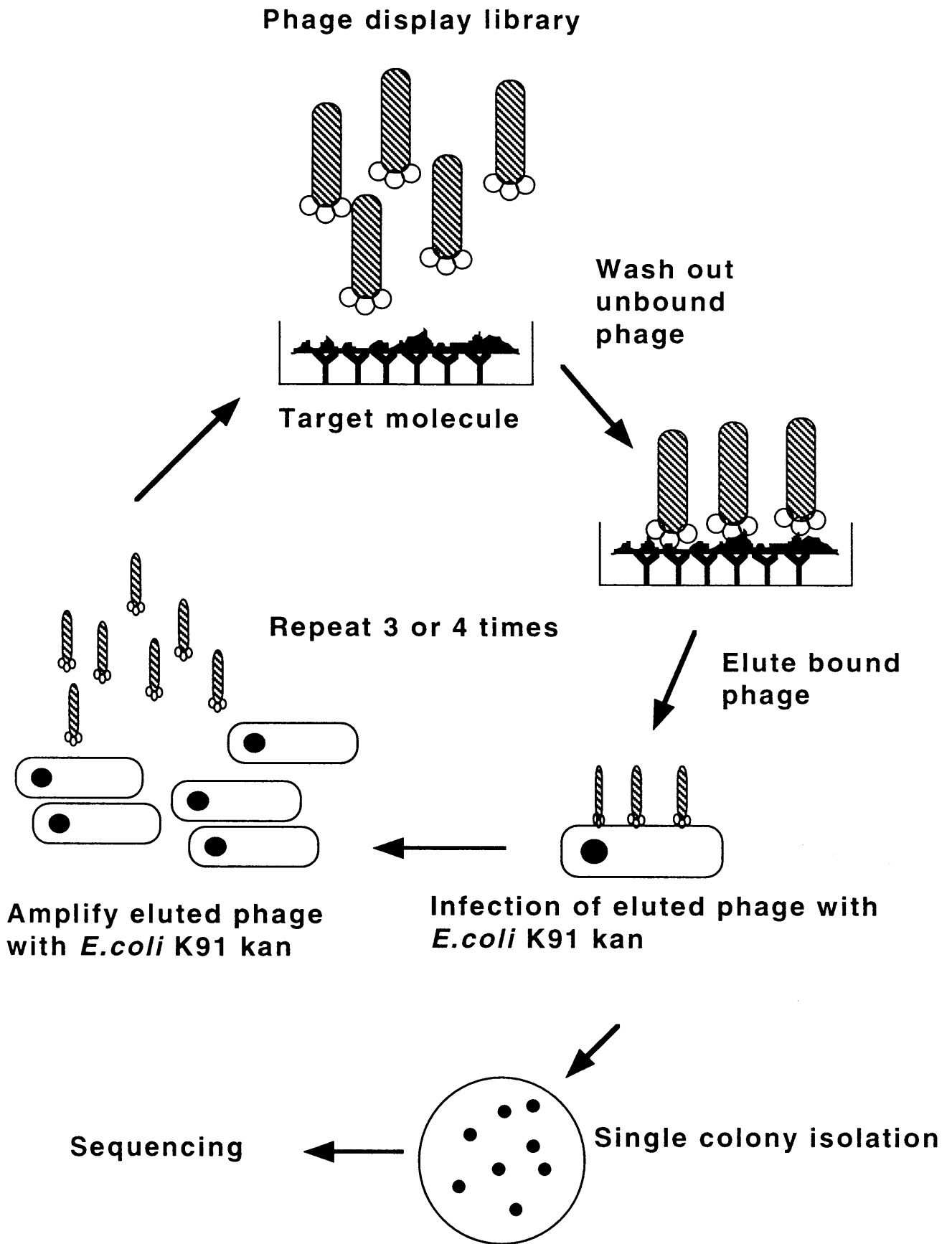


Figure 1-5 Procedure of biopanning

する際のリード配列になると考えられる。そこで本研究では、さらに強力なインヒビターを設計する際の基礎的知見を得ることを目的として、SNP-1とBST-1との結合を詳細に解析する。まず、得られたペプチドインヒビターSNP-1と、BST-1の結合解析を、表面プラズモン共鳴法 (BIAcore)²⁶⁾、Isothermal Titration Calorimetry 法^{27, 28)}を用いて行う。また、結合のStoichiometryを求めるために、可溶性のBST-1、ペプチドインヒビターSNP-1の溶液中の分子量を分析用超遠心機を用いた沈降平衡法²⁹⁾で決定する。さらに、SNP-1上の結合に重要なアミノ酸残基を同定するために、全てのアミノ酸残基をアラニンに置換したペプチドを化学合成で調製し、表面プラズモン共鳴法 (BIAcore)を用いて、可溶性BST-1との結合を解析する。これらの解析は、新たなインヒビターを設計する際の基礎的知見になるばかりでなく、BST-1のecto-ADP-ribosyl cyclase 活性を理解する上でも、重要な知見になると考えられる。

1-5 スーパー抗原 Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) に結合して、そのレセプター分子をミミックするペプチドの同定

1-3では、Ecto-enzyme活性を有するレセプター分子BST-1にファージペプチドライブラリー法を適応することで、BST-1のADP ribosyl cyclase活性を特異的に阻害する酵素インヒビターSNP-1を単離した。このように、ファージペプチドライブラリー法を、酵素分子やレセプター分子に適用した例は数多く報告されているが、この方法をリガンド分子に適用した例は少ない。そこで、本研究では、リガンド分子をターゲットとしたファージライブラリー法によるスクリーニングを行う。すなわち、ファージライブラリー法をリガンド分子に適用することによって、レセプター分子をミミックするペプチドの同定が可能であるか検証することを目的とする。このコンセプトが可能であれば、リガンド-レセプター相互作用の解析の手法になると同時に、レセプター分子の低分子化につながる。さらに、得られる配列は、レセプター分子のアンタゴニストになり得ると考えられる。

リガンド分子としては、スーパー抗原であり、トキシンショック症候群、急性全身性感染症の主要毒素であるToxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) に注目した。スーパー抗原は、従来の抗原とは異なり、抗原提示細胞内におけるプロセッシングを経ることな

く、抗原提示細胞上のレセプター分子である主要組織適合性抗原クラスII 蛋白 (以下 MHC クラスII) に結合する^{30, 31)}。さらにスーパー抗原とMHC クラスIIとの複合体は、T細胞上に存在するT細胞レセプターのリガンドとして機能し、T細胞を異常に活性化させる³²⁾。この活性化されたT細胞は、自己免疫的な攻撃を引き起こし、いわゆる急性のトキシシンショックや、慢性疾患を引き起こすと考えられている (Fig.1-6)。従って、TSST-1 に結合して、そのレセプターであるMHC クラスIIとの結合を阻害するペプチドが得られれば、TSST-1によるT細胞の異常な活性化を押さえることが可能であり、トキシシンショック症状の治療に応用可能であると考えられる。

さらに、TSST-1とMHC クラスIIの複合体のX線結晶構造解析³³⁾はすでに報告されているので (Fig.1-7)、本研究で同定する配列と、X線結晶構造の情報を比較することで、レセプター分子をミミックする配列が得られるか確認できると考えられる。

1-6 本研究の目的と意義

本研究はレセプターとリガンド分子との相互作用を、遺伝子工学的な手法を用いて解析することを目的とする。さらに詳しくは、結晶構造解析に適した活性型可溶性レセプターの発現系の確立と、ファージディスプレイランダムペプチドライブラリー法を用いたレセプターとリガンド分子の相互作用の解析を目的とした。

第2章では、高い相同性を示し、類似のドメイン構造を有するにも関わらず異なる性質を示すLDLレセプターとVLDLレセプターに注目した。本研究では、可溶性LDLレセプターと可溶性VLDLレセプターの発現において、細胞内リガンドであるRAPがどのような機能をしているかを解明することを目的とする。この解析により、LDLレセプターとVLDLレセプターの発現機構の違いを説明できると期待される。さらに、昆虫細胞を用いて、結晶化に適した活性型可溶性レセプターの発現系の確立を目的とする。

第3章では、レセプターとして機能しており、ADP ribosyl cyclase活性を有するユニークな分子Bone marrow stromal cell antigen -1 (BST-1/CD157)に注目した。本研究では、結晶化に適した可溶性BST-1の大量発現と精製法の確立を目指す。さらに、ファージランダムペプチドライブラリー法を用いて、BST-1のADP ribosyl cyclase活性を特

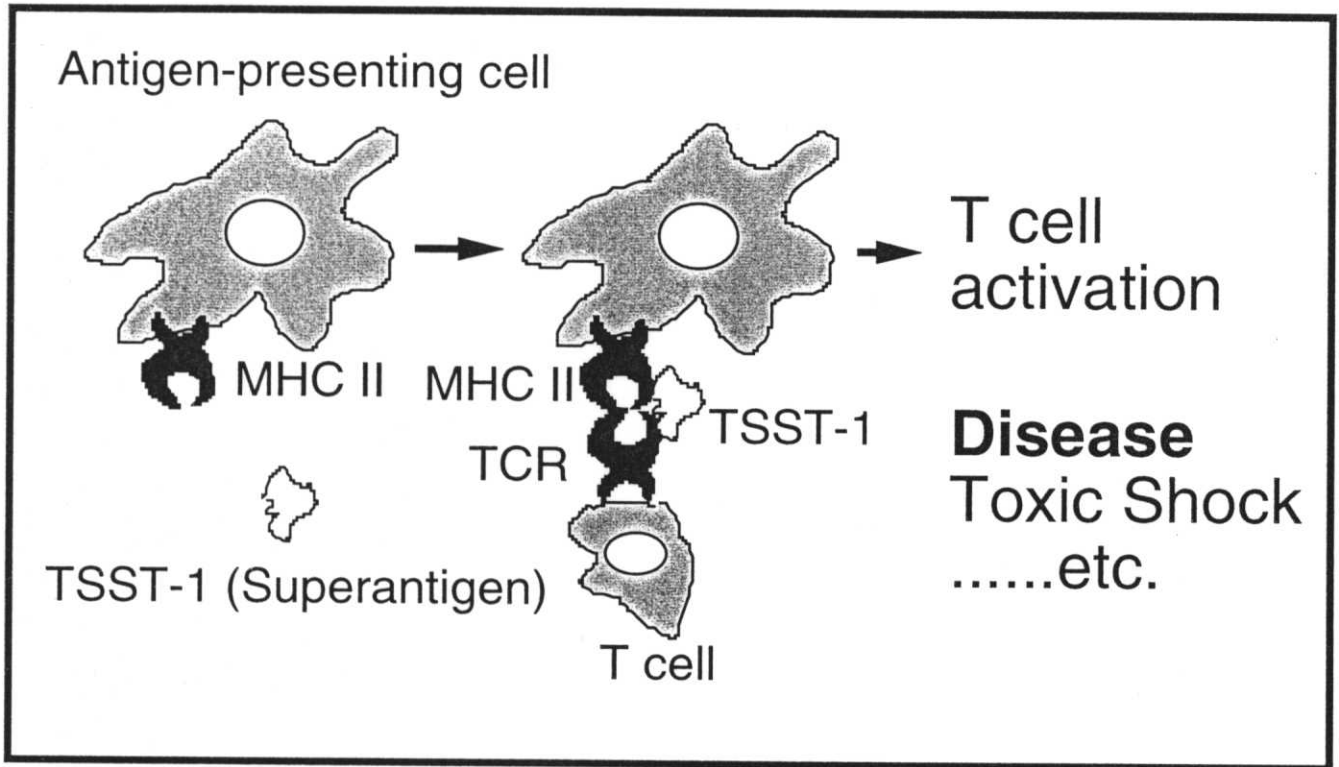


Figure 1-6 Mechanism of T cell activation by the superantigen, TSST-1



Figure 1-7 The three-dimensional structure of TSST-1 complexed with MHC class II (Kim, J. et al., 1994, Science 266, 1870-1874)
 The TSST-1 : MHC class II (DR1) complex viewed toward the MHC peptide binding site of DR1.
 The α and β subunits of DR1 are light blue and blue. The antigenic peptide is yellow and TSST-1 is red.

異的に阻害するペプチドリガンドの創製を目的とする。インヒビターの創製は、ADP ribosyl cyclaseの機能解析のための重要なツールになると考えられる。

第4章では、第3章で得られた酵素インヒビターであるSNP-1と、レセプター分子である可溶性BST-1との相互作用の解析を目的とする。これらの解析は、新たなインヒビターを設計する際の基礎的知見になるばかりでなく、BST-1のecto-ADP-ribosyl cyclase 活性を理解する上でも、重要な知見になると考えられる。

第5章では、スーパー抗原であり、トキシンショック症候群、急性全身性感染症の主要毒素であるToxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) に注目した。本研究では、ファージペプチドライブラリー法をリガンド分子であるTSST-1に適用することによって、レセプター分子であるMHCクラスIIをミミックする配列の同定が可能であるか検証することを目的とする。この方法により、リガンド-レセプター分子の相互作用が解析できると同時に、レセプターの低分子化が可能である。さらに、得られる配列は、レセプター分子のアнтаゴニストになり得ると期待される。

第6章では本研究で得られた知見をまとめる。

本研究は、レセプターとリガンド分子との相互作用を幅広く解析した基礎研究として極めて重要であり、意義深いものである。

第2章 活性型可溶性ヒトLow density lipoprotein (LDL)レセプター、 Very low density lipoprotein (VLDL) レセプターの発現

2-1 緒言

第2章では、脂質の取り込みに関するヒトLow density lipoprotein (LDL)レセプター、Very low density lipoprotein (VLDL) レセプターに着目し、その活性型可溶性レセプターの発現を試みた。第1章でも述べたように、LDLレセプターとVLDLレセプターは、1次配列から予想されるドメイン構造が極めて類似している。すなわち、システイン残基が多く存在するリガンド結合部位、Epidermal growth factor (EGF) precursorの相同領域、O-linked sugarの結合領域、膜貫通領域、細胞内領域の5つのドメインから構成されており、両者のアミノ酸相同性は、例えばリガンド結合部位では約56%に上る⁴⁾。しかしながら、LDLレセプターは肝臓や副腎に高発現しているのに対して、VLDLレセプターは、心筋、骨格筋、脂肪組織、脳などに高発現している違いがある^{4, 5)}。LDLレセプターは、リガンドである β -Very low density lipoprotein (β -VLDL)の添加により転写が抑制されるが、VLDLレセプターではこのような抑制は認められない³⁾。さらにLDLレセプターは、apoB100を含むLow density lipoprotein (LDL)、apoB100とapoE両方を含む β -Very low density lipoprotein (β -VLDL)共に結合することができるが、VLDLレセプターは、apoEを含む β -VLDLにしか結合できないというリガンド特異性の違いがある⁶⁾。また、両レセプターに結合する細胞内リガンド Receptor-associated protein (RAP)⁷⁾は、LDLレセプターと弱く結合するのに対して (Kd値約250 nM)⁸⁾、VLDLレセプターとは強く結合する (Kd値約0.7 nM)⁹⁾。本章では、これらの違いを分子レベルで明らかにすることを目的として、両可溶性レセプターの昆虫細胞での大量発現を試みた。LDLレセプターの細胞外ドメインは可溶性レセプターとして細胞培養上清中に分泌し、リガンドであるLDL、 β -VLDL共に結合することができた。これに対して、VLDLレセプターの細胞外ドメインは、細胞内に発現は認められたものの、細胞培養上清中には分泌されなかった。本章では、細胞外ドメインの発現パターン

の違いは、両レセプターの性質の違いを示すものとして注目し、VLDLレセプターの細胞外ドメインの分泌、活性化にはVLDLレセプターの細胞内リガンドであるReceptor-associated protein (RAP)⁷⁾が、重要な役割を担っていることを見いだした。

2-2 実験方法

2-2-1 試薬

制限酵素、修飾酵素類は、宝酒造社製、NEW ENGLAND BIOLABS社製のものを使用した。PCRプライマー等に使用した合成オリゴヌクレオチドは、サウデーテクノロジー社に合成依頼した。その他使用した試薬は、各実験方法に記載した。

2-2-2 ヒトLDLレセプター発現ベクターの構築

昆虫細胞での、LDLレセプター発現ベクターの構築の模式図をFig.2-1に示した。LDLレセプターに関しては、全長 (pLDLR-F)、O-linked sugar 結合部位を除いた細胞外ドメイン全長 (pLDLR-S1H)を発現するベクターを構築した。順番にその構築方法を説明する。

LDLレセプター全長発現ベクター (pLDLR-F) の構築 : LDLレセプター全長を含むcDNA断片2.9kbpは、pLDLR4³⁴⁾をXbaIとSmaIで消化してアガロースゲルより抽出、精製した。このcDNA断片2.9kbpを、pUC19 (宝酒造社製) の同じサイトに挿入した (pUCLDLR)。以下に示すオリゴヌクレオチドを化学合成してアニーリングしたのち、pUCLDLRのXhoI/SmaIサイトに挿入した (pUCLDLRHis)。

合成オリゴヌクレオチド :

5'-TCGAGACAGATGGTCAGTCTGGAGGATGACGTGGCGCATCACCATCAC
CATCACTAATAGCGGCCGCC-3'

5'-GGGGCGGCCGCTATTAGTGATGGTG
ATGGTGATGCGCCACGTCATCCTCCAGACTGACCATCTGTC-3'

アニーリングの条件は、各合成オリゴヌクレオチドを、50 ng/ μ lとなるように10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、100mM NaCl バッファーにサスペンドし、70°Cの湯浴につけ室温になるまで放置した。

作製したpUCLDLRHisを *Xba*I と *Sma*I で消化して、LDLレセプター全長を含むcDNA断片2.9kbpを、バキュロウイルス発現ベクターpVL1392 (PharMingen社製) の *Xba*I/*Sma*I サイトに連結した (pLDLR-F)。この発現ベクターには、C末端側に6残基のヒスチジンが付加されるようにデザインされている。

可溶性型LDLレセプター発現ベクター (pLDLR-S1H) の構築 : LDLレセプター全長を含むcDNA断片2.9kbpは、pLDLR4を *Xba*I と *Sma*I で消化してアガロースゲルより抽出、精製した。このcDNA断片2.9kbpを、pBluescript II KS⁻ (Stratagene社製) の同サイトに挿入した(pBSLDLR)。次に、pUCLDLRを鋳型DNAとして、以下に示すプライマーでPCRを行い、これらPCR産物を *Sph*I, *Sma*I で消化したのち、同サイトのpUC118 (宝酒造社製) にサブクローニングした。

pLDLR-S1Hセンスプライマー :

5'-CCCCTCGCCCAAGTTTACCTGCGC-3'

pLDLR-S1Hアンチセンスプライマー :

5'-TCCCCCGGGCGGCCGCTATTAGTGATGGTGATGGTGATGGG
CCTGCGCAGCCTCAGCCTCTGTGA-3'

なおPCRは、以下の条件で行った。

| | |
|----------------------|--------------------|
| 鋳型DNA | 50 ng分 |
| 10倍濃度PCR用バッファー | 10 μ l |
| 2.5mM dNTPs | 8 μ l |
| センスプライマー (20pmol) | 1 μ l |
| アンチセンスプライマー (20pmol) | 1 μ l |
| rTaq (宝酒造社製) | 0.5 μ l (2.5U) |

滅菌水で、全量100 μ lとした。

反応条件は、初めに95℃ 3分間DNAを変性し、続いて95℃ 1分、60℃ 1分、72℃ 1分を25サイクル行った。PCR産物は、1%のアガロースゲル電気泳動を行い、期待する長さのDNAが増幅していることを確認後、pUC118にサブクローニングしてシーケンスを確認した。

pLDLR-S1Hは、PCR産物を *SphI*、*NotI* で消化したDNA断片と、pBSLDLRを *XbaI* と *SphI* で消化した2.2kbpのDNA断片を、バキュロウイルス発現ベクターpVL1393 (PharMingen社製) の *XbaI* と *NotI* のサイトに3点ライゲーションして得た。なおpLDLR-S1Hは、C末端側に6残基のヒスチジンが付加されるようにデザインされている。この発現ベクターは、シグナル配列を含む形で、ヒトLDLレセプターのN末端側から720アミノ酸残基をコードしている³⁴⁾。

2-2-3 ヒトVLDLレセプター発現ベクターの構築

昆虫細胞での、VLDLレセプター発現ベクターの構築の模式図をFig. 2-1に示した。VLDLレセプターに関しては、全長 (pVLDLR-F)、O-linked sugar結合部位を除いた細胞外ドメイン全長 (pVLDLR-S) を発現するベクターを構築した。順番にその構築方法を説明する。

VLDLレセプター全長発現ベクター (pVLDLR-F) の構築： VLDLレセプター全長を含むプラスミドベクターphVR2 α^3) から、*PstI* と *SmaI* で消化して、70bpのDNA断片と、*SmaI* と *BamHI* で消化して3.2kbpのDNA断片を得た。これらDNA断片を、*PstI* と *BamHI* で消化したバキュロウイルス発現ベクターpVL1392 に3点で連結し、VLDLレセプター全長発現ベクターpVLhVRを得た。さらに、C末端側に6残基のヒスチジンを付加するために、pVLhVRを鋳型DNAとして、以下に示すプライマーでPCRを行った。なおPCRの条件は、LDLレセプターの場合と同じ条件を用いた。

pVLDLR-Fセンスプライマー：5'-GCAGTATCAGAGGTCAGTGTCCCCC-3'

pVLDLR-Fアンチセンスプライマー：5'-TCCCCGGGTCTAGACTATCAAT
GATGATGATGATGATGAGCTAGATCATCATCTGTGC-3'

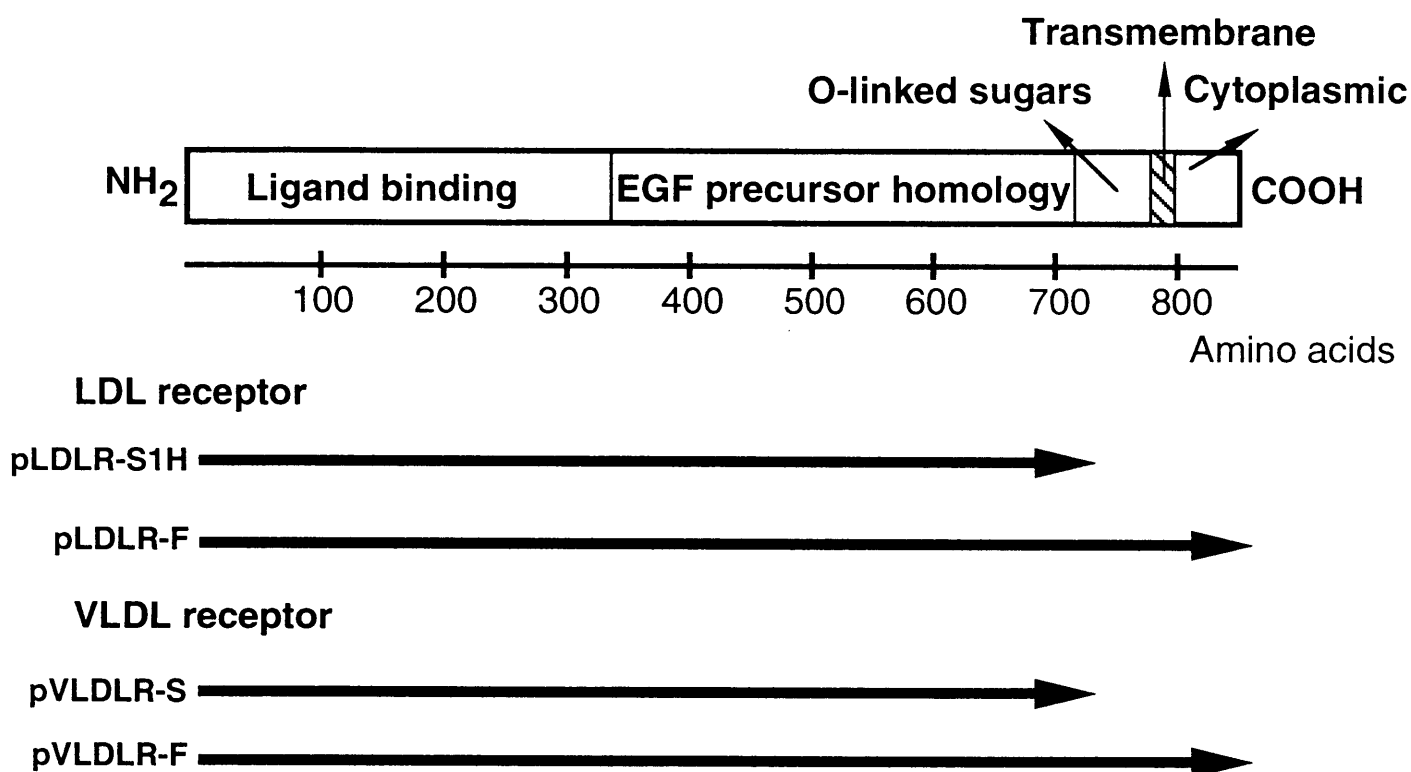


Figure 2-1 Construction of expression plasmids

A schematic diagram showing the constructs used in this study. Full-length (pLDLR-F or pVLDLR-F) and truncated receptors that have encoded the ligand binding and EGF precursor homology domains (pLDLR-S1H or pVLDLR-S) were expressed under the control of polyhedrin promoter in insects cells. (His)₆ tags were added to the C-termini of the expressed receptors.

得られたPCR産物を *Bgl*I と *Xba*I で消化後、pVLhVRの同サイトに連結した。この発現ベクターをpVLDLR-Fと命名した。

可溶性型VLDLレセプター発現ベクター (pVLDLR-S) の構築 : pVLDLR-Fを鋳型DNAとして、以下に示すプライマーでPCRを行い、これらPCR産物をTAクローニング法により pCRII (Invitrogen社製) にサブクローニングした (pVLDLPCRIIと命名)。なおPCRの条件は、LDLレセプターの場合と同じ条件を用いた。

pVLDLR-Sセンスプライマー : 5'-CAGTCTATGGTGCCAATAAATTCAC-3'

pVLDLR-Sアンチセンスプライマー :

5'-TCCCCCGGGTCTAGACTATCAATGATGATGATGATGATGTTGACAG
TCTCGGCCATTTTCCT-3'

pVLDLPCRIIを *Nhe*I と *Bam*HI で消化し、pVLhVRの同サイトに連結した。なお、可溶性型VLDLレセプター発現ベクター (pVLDLR-S) には、C末端側に6残基のヒスチジンが付加されるようにデザインされている。この発現ベクターは、シグナル配列を含む形で、ヒトVLDLレセプターのN末端側から750アミノ酸残基をコードしている³⁾。

2-2-4 Receptor-associated protein (RAP) 全長発現用ベクターの構築

可溶性VLDLレセプターとの共発現に用いるRAP全長発現用ベクターを、以下のように作製した。ラット由来のRAP cDNA全長を含むプラスミド II/45 39kDa rat cDNA³⁵⁾ を、*Xho*I で消化後 Klenow fragment で平滑末端化した。さらに、*Xba*I で消化し、RAP cDNA全長を含む1.5kbpの断片を得た。このDNA断片をバキュロウイルス発現ベクター pVL1392の *Xba*I / *Sma*I のサイトに連結して、Receptor-associated protein (RAP) 全長発現用ベクターpVL1392RAPを得た。

2-2-5 細胞培養および組換えバキュロウイルスの単離

昆虫細胞 および組換えバキュロウイルスの単離は、O'Reillyらの方法を参考に行った36)。夜盗蛾幼虫、*Spodoptera Frugiperda* の培養細胞であるSf9細胞の培養は、10%FBSを添加した IPL-41 insect 培地を用いた振盪培養、あるいは10%FBSを添加したTNM-FH培地を用いたモノレイヤー培養で行った。*Trichoplusia ni* の培養細胞であるTn5細胞の培養は、無血清培地であるSF900II (Gibco BRL社製) を用いたモノレイヤー培養で行った。培養温度は27°Cで行った。組換えウイルスは、1 μ gの発現ベクタープラスミドと0.1 μ gの線状野生型AcNPVウイルスDNA (PharMingen社製) とを、カチオン性脂質であるlipofectin (Gibco BRL社製)を用いて、Sf9細胞へco-transfectionすることにより得た。培養6日後、培地上清中に放出されるウイルスを段階希釈するプラークアッセイ法で単離して、シングルプラークを得た。発現に使用する高ウイルス力価なウイルスストック溶液は、感染効率 Multiplicity of infection (MOI) を0.1として、組換えバキュロウイルスをSf9細胞に感染させることにより得た。得られたウイルスストック溶液のウイルス力価 (タイター) は、上述したプラークアッセイ法を用いて測定した。

2-2-6 組換えバキュロウイルスの昆虫細胞での発現

Sf9細胞、あるいはTn5細胞をモノレイヤー培養で、細胞数 $1 \sim 1.5 \times 10^6$ /mlの細胞数に培養した。組換えバキュロウイルスを、感染効率 Multiplicity of infection (MOI) 10で感染させ、27°Cで72時間培養した。発現の確認は、細胞培養上清、あるいは以下に示す方法で調製したCell lysateを非還元状態でSDS-PAGEに泳動し、各レセプターの抗体で検出するウエスタンブロッティング法で行った。細胞は、氷冷したlysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH7.5, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1% Triton X100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml benzamidin, 10 μ g/ml trypsin inhibitor) を加え、氷上で30分反応させて可溶化した。その後17,000 x gで10分間遠心分離して、その上清をCell lysateとして使用した。

2-2-7 膜画分の調製

昆虫細胞からの膜画分の調製は、以下のように行った。まず、細胞をPBSで1回洗浄し、バッファM (PBS に1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml

leupeptin, 10 μ g/ml benzamidine, 10 μ g/ml trypsin inhibitorを加えたもの)に懸濁した。この細胞をテフロン製のホモジナイザーにいれ、細胞を破碎した後 1000 x g で5分間遠心して、破碎されていない細胞や、核画分を沈殿した。上清を100,000 x g で30分間超遠心して、沈殿してきたペレットを粗膜画分とした。ペレットは、バッファーMに懸濁した後、液体窒素で急速に凍結して使用するまで-80°Cで保存した。

2-2-8 ウェスタンブロッティング

細胞培養上清、Cell lysate、膜画分等のサンプルは、熱処理せずに、7.5%の SDS-PAGEに非還元状態で泳動した。泳動後、分離した蛋白を電氣的にニトロセルロースフィルター (Schleicher & Schuell 社製) に転写した。転写後、フィルターを1%ウシ血清アルブミンを含むブロッキングバッファー (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 1% ウシ血清アルブミン, 0.05% Tween 20) に室温で30分間浸してブロッキングした。LDL、VLDLレセプターに対するモノクローナル抗体を用いる場合は、1次抗体を0.5 μ g/mlの濃度で加えて、室温で2時間反応させた後、洗浄バッファー (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) で3回洗浄した。洗浄後、アルカリホスファターゼ標識の抗マウスIgG抗体を室温30分間反応させた。洗浄バッファー (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) で3回洗浄した後、アルカリホスファターゼ発色キットを用いて発色させた (Promega社製)。抗RAPポリクローナル抗体でブロッティングする場合は、1次抗体を2000倍に希釈して室温で2時間反応させた。2次抗体にはアルカリホスファターゼ標識抗ラビットIgG抗体 (Promega社製) を用いた。LDLレセプターを認識するモノクローナルC7抗体は、リガンド結合領域の第1番目のシステイン残基に富むリピート配列を認識するモノクローナル抗体である³⁷⁾。VLDLレセプターを認識するモノクローナル6B6抗体は、リガンド結合領域の第5番目と第6番目のシステイン残基に富むリピート配列の間のスペーサー配列を認識するモノクローナル抗体である。

2-2-9 リポ蛋白の¹²⁵Iでの標識化及びリガンドブロッティング

ラビット β -VLDLとヒトLDLの調製、及び塩化ヨウドを用いるリポ蛋白の¹²⁵Iでの標識化は、Goldsteinらが報告した方法³⁸⁾を用いて行った。発現させたレセプター分子が、リガンド分子に結合する活性型であるかどうかの判定は、簡便なりガンドブロッティング法を用いた。通常、可溶性レセプターが活性型であるかどうかを判定する方法は、例えば、Bioassayの系に可溶性レセプターを加えることにより阻害が観察されるか、あるいは可溶性レセプターとリガンド分子との結合乖離定数を、完全長レセプターのものと比較することにより論ずることができる。可溶性LDL、VLDLレセプターの場合には、Bioassayの系が存在しないため、リガンドブロッティング法を用いることで定性的に判断した。各標識リガンドを用いるリガンドブロッティングは、Danielらの方法³⁹⁾を用いた。このリガンドブロッティングは、リポ蛋白レセプターが、SDS存在下でも安定にリガンドであるリポ蛋白に結合できる性質を利用したものである。ウエスタンブロッティングと同様にSDS-PAGEで分離した蛋白を、電気的にニトロセルロースフィルター (Schleicher & Schuell 社製) に転写した後、フィルターを5%ウシ血清アルブミンを含むブロッキングバッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM KI, 2 mM CaCl₂, 5% ウシ血清アルブミン) に室温で30分間浸した。標識リガンドを10 μ g/mlの濃度になるように加え、室温で2時間反応させた。洗浄後、フィルターを風乾してオートラジオグラフィによりバンドを検出した。

2-2-10 Glutathion-S-Transferase (GST)-RAPを用いるリガンドブロッティング

大腸菌を用いたGST-RAPの発現、及びGlutathion-sepharoseカラム (アマシャムファルマシアバイオテク社製) を用いる精製は、Herzらの方法³⁵⁾で行った。GST-RAPを用いるリガンドブロッティングは、ウエスタンブロッティングと同様にSDS-PAGEで分離した蛋白を電気的にニトロセルロースフィルター (Schleicher & Schuell 社製) に転写したのち、18 nMの精製したGST-RAPを加え室温で2時間反応させた。その後、結合したGST-RAPは、1次抗体として抗GSTポリクローナル抗体 (アマシャムファルマシアバイオテク社製)、2次抗体としてHorseradish peroxidase標識抗ヤギIgG抗体

(Cappel社製) を用いて検出した。

2-3 結果

2-3-1 LDLレセプター発現組換えウイルスの作製

昆虫細胞での、LDLレセプター発現ベクターの構築の模式図をFig.2-1に示した。LDLレセプターに関しては、全長 (pLDLR-F)、O-linked sugar 結合部位を除いた細胞外ドメイン全長 (pLDLR-S1H)を発現するベクターを構築した。作製した組換えバキュロウイルスにより発現したレセプターは、全長レセプターをLDLR-F、O-linked sugar 結合部位を除いた細胞外ドメイン全長を発現したレセプターをLDLR-S1Hと命名した。LDLR-F、LDLR-S1Hは、Niキレートクロマトグラフィーでの精製等を考えて、C末端側に6残基のヒスチジンタグが付加されるようにデザインされている。

2-3-2 LDLレセプターの昆虫細胞での発現

LDLレセプターの昆虫細胞 (Sf9細胞)での発現は、モノクローナル抗体C7を用いたウエスタンブロッティング法で調べた。その結果を Fig.2-2 に示す。LDLR-Fを発現させたSf9細胞のCell lysateを用いたウエスタンブロッティングでは、110 kDaあたりに発現したバンドを検出した (lane3 in Fig.2-2-A)。このバンドは、膜画分でも濃縮して検出され、全長レセプターが、膜蛋白として発現していることを確認した (lane 1 in Fig.2-2-B)。

LDLレセプターの細胞外ドメインの発現に関しても、全長の場合と同様にモノクローナル抗体C7を用いたウエスタンブロッティング法で調べた。LDLR-S1Hを発現させたSf9細胞の細胞培養上清 (lane 1 in Fig.2-2-A)、及びCell lysate (lane 2 in Fig.2-2-A) 共に80 kDaあたりにバンドを検出した。したがって、LDLレセプターの細胞外ドメインは、可溶性型レセプターとして細胞培養上清中に分泌することが明らかとなった。Cell lysate中に検出されたレセプターは、細胞培養上清中に分泌した可溶性レセプターと比較して、分子量がやや小さく、バンドが広がっている。これは、糖鎖の不完全な付加によるものでないかと考えられる。

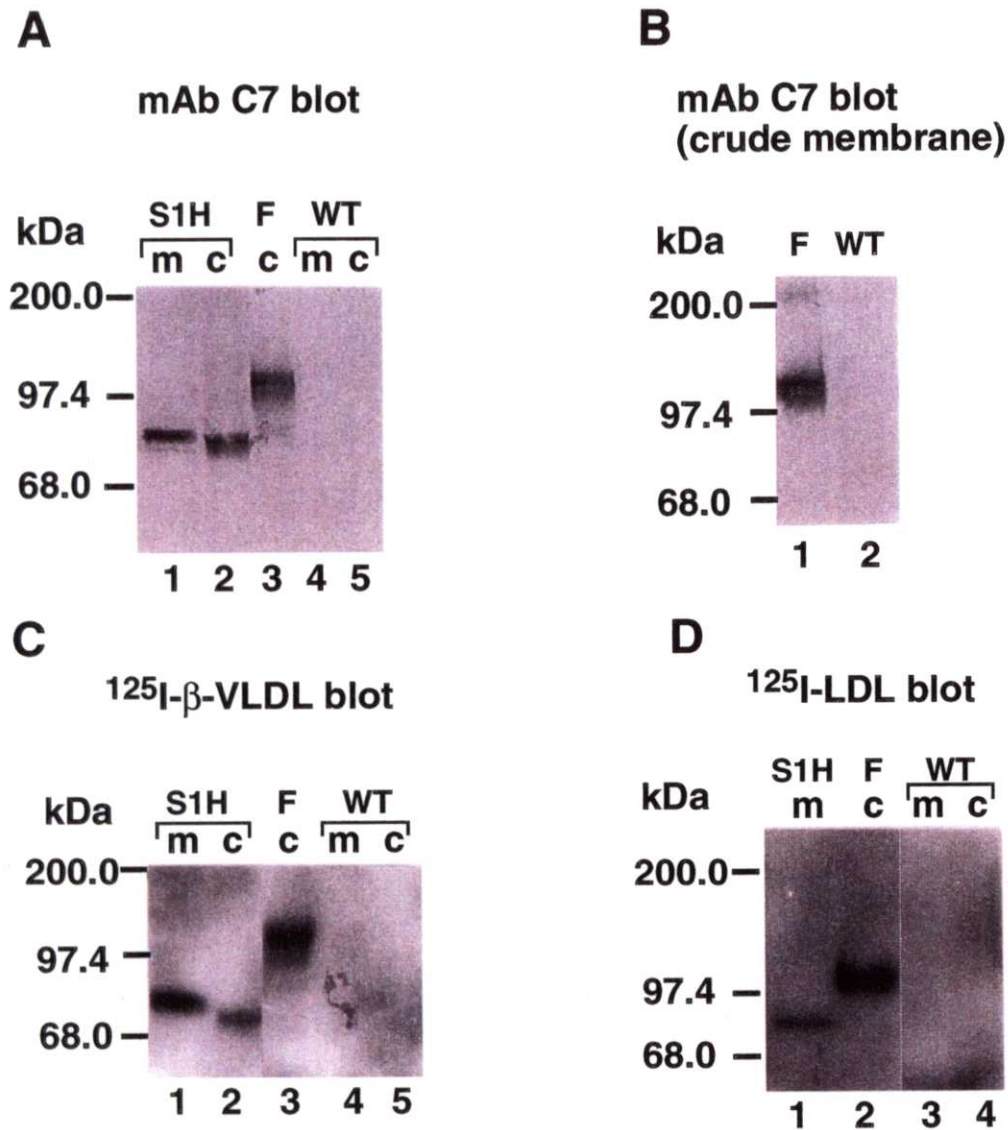


Figure 2-2 Expression of recombinant LDL receptors in insect cells

(A) Western blotting analysis for full-length and truncated LDL receptors. Sf9 cells were infected at 2.4×10^6 cells per ml with a multiplicity of 10 plaque-forming units per cell for each virus. Cells were harvested 72 h post-infection, and then cell lysates (c) and medium (m) were loaded onto a 7.5% SDS-polyacrylamide gel and analysed with mAb C7. Lanes 1 and 2, medium (m) and cell lysate (c) from cells infected with LDLR-S1H; lane 3, cell lysate (c) from cells infected with LDLR-F; lanes 4 and 5, medium (m) and cell lysate (c) from cells infected with wild type baculovirus AcNPVC2. (B) Western blotting analysis for crude membrane fractions of cells infected with the recombinant virus for the full-length LDL receptor. The crude membrane fraction from Sf9 cells infected either with LDLR-F (lane 1) or AcNPVC2 (lane 2) were loaded onto a 7.5% SDS-polyacrylamide gel and analysed with mAb C7. Each protein was used at 80 μg per lane. (C) Ligand blotting analysis of the recombinant LDL receptors with ^{125}I - β -VLDL. Medium (m) or cell lysates (c) from Sf9 cells infected with LDLR-S1H (lanes 1 and 2), LDLR-F (lane 3), and wild type baculovirus AcNPVC2 (lanes 4 and 5) were subjected to 7.5% SDS-PAGE under nonreducing conditions and transferred onto nitrocellulose. Nitrocellulose filters were incubated with ^{125}I - β -VLDL (1.0×10^3 cpm/ng). (D) Ligand blotting analysis of the recombinant LDL receptors with ^{125}I -LDL. Medium (m) or cell lysate (c) from Sf9 cells infected with LDLR-S1H (lane 1), LDLR-F (lane 2) and wild type baculovirus AcNPVC2 (lanes 3 and 4) were subjected to 7.5% SDS-PAGE under nonreducing conditions and transferred onto nitrocellulose filters. The filters were incubated with ^{125}I - β -LDL (2.0×10^2 cpm/ng).

2-3-3 発現したLDLレセプターのリガンド結合能の確認

次に発現したLDLレセプターと、リガンドであるラビット β -VLDLあるいは、ヒトLDLとの結合をリガンドブロッティング法で調べた。細胞培養上清中に分泌した可溶性レセプター LDLR-S1Hは、 ^{125}I - β -VLDL (lane 1 in Fig.2-2-C) と ^{125}I -LDL (lane 1 in Fig.2-2-D) 共に結合した。同様に、全長LDLレセプターは、 ^{125}I - β -VLDL (lane 3 in Fig.2-2-C) と ^{125}I -LDL (lane 2 in Fig.2-2-D) 共に結合した。電気泳動上では、分子量に差があったCell lysate 中のLDLR-S1Hと、細胞培養上清中に分泌したLDLR-S1Hは、両者とも ^{125}I - β -VLDLと結合した (lanes 1 and 2 in Fig.2-2-C)。

2-3-4 VLDLレセプターの昆虫細胞での発現

LDLレセプターの細胞外ドメインが、活性型可溶性レセプターとして昆虫細胞で発現分泌したので、同様の方法でVLDLレセプターの細胞外ドメインと、全長を発現するベクターを構築した。作製した組換えバキュロウイルスにより発現したレセプターは、全長レセプターをVLDLR-F、O-linked sugar 結合部位を除いた細胞外ドメイン全長を発現したレセプターをVLDLR-Sと命名した。VLDLレセプターの昆虫細胞 (Sf9細胞) での発現は、モノクローナル抗体6B6を用いたウエスタンブロッティング法で調べた。その結果をFig.2-3 に示す。VLDL-Fを発現させたSf9細胞のCell lysateを用いたウエスタンブロッティングでは、110 kDa あたりに発現したバンドを検出した (lane 3 in Fig.2-3-A)。このバンドは、膜画分でも濃縮して検出され、全長レセプターが、膜蛋白として発現していることを確認した (lane 2 in Fig.2-3-B)。VLDLレセプターの細胞外ドメイン (VLDLR-S) の発現は、LDLレセプターの場合とは異なり、細胞培養上清 (lane 1 in Fig.2-3-A) には検出されず、Cell lysate中の分子量約80 kDaの蛋白として検出された (lane 2 in Fig.2-3-A)。さらに、このバンドは膜画分でも濃縮して検出されたことから (lane 1 in Fig.2-3-B)、VLDLレセプターの細胞外ドメインは、昆虫細胞では、細胞外に分泌されずに細胞内に留まって発現していることが判明した。この細胞内に発現したVLDLR-Sのリガンド結合能を調べたところ、このレセプター分子は ^{125}I - β -VLDL とは結合しないことが判明した (lane 7 in Fig.2-6)。さらに、全長VLDLレセプター (VLDLR-F)も ^{125}I - β -VLDL とは結合しなかった (データ省略)。

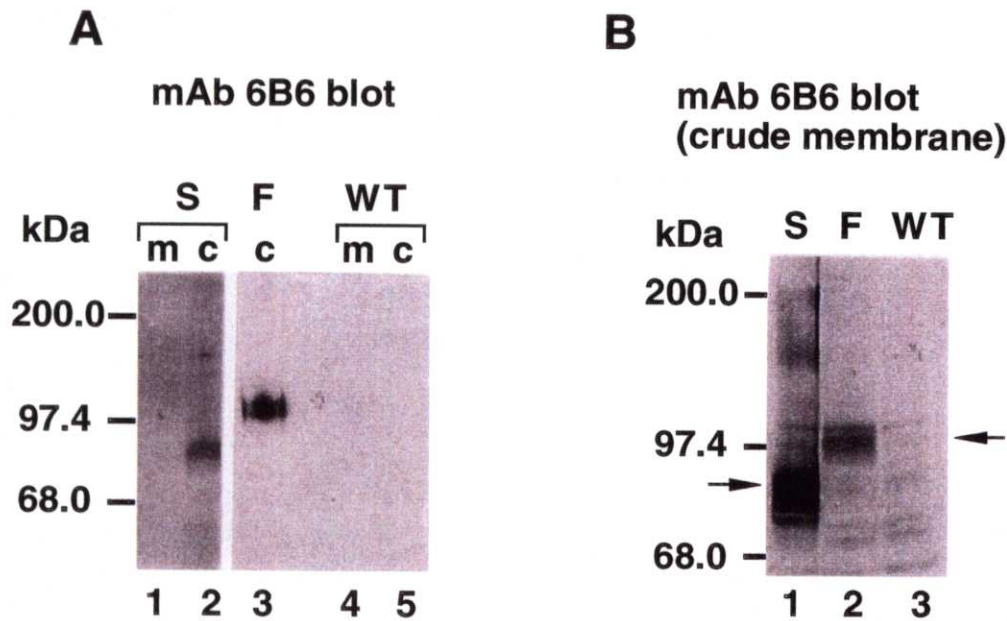


Figure 2-3 Expression of recombinant VLDL receptors in insect cells
 (A) Western blotting analysis for full-length and truncated VLDL receptors. Sf9 cells were infected at 2.4×10^6 cells per ml with a multiplicity of 10 plaque-forming units per cell. Cells were harvested 72 h post-infection, and medium (m) or cell lysates (c) were subjected to 7.5% SDS-PAGE and analysed with mAb 6B6. Lanes 1 and 2, medium (m) and cell lysate (c) from cells infected with VLDLR-S; lane 3, cell lysate (c) from cells infected with VLDLR-F; lanes 4 and 5, medium (m) and cell lysate (c) from cells infected with wild type baculovirus AcNPVC2. (B) Western blotting analysis for crude membrane fraction of full-length and truncated VLDL receptors. lane 1, crude membrane fraction from Sf9 cells infected with VLDLR-S; lane 2, crude membrane fraction from Sf9 cells infected with VLDLR-F; lane 3, crude membrane fraction from cells with wild AcNPVC2. Samples were loaded onto a 7.5% SDS-polyacrylamide gel and analysed with mAb 6B6. Samples of lysates and medium represented 8.0×10^5 cells and 4.8×10^4 cells. Each membrane protein was used at $80 \mu\text{g}$ per lane.

2-3-5 GST-RAPを用いるリガンドブロッキング

VLDLレセプターの細胞外ドメイン及び、全長レセプターは、リガンドである¹²⁵I-β-VLDLとは結合しなかったため、次にLDLレセプター、VLDLレセプターの細胞内リガンドとして知られている Receptor-associated protein (RAP) との結合をリガンドブロッキング法で調べた。レセプターに結合したGST-RAPの量を比較するために、2枚のブロッキングフィルターを用意した。1枚は抗体で検出するウエスタンブロッキングを行い、もう1枚はGST-RAPブロッキングを行った。その結果をFig.2-4に示す。C7抗体を用いたウエスタンブロッキングで、ほぼ同程度のシグナルを示した可溶性レセプターLDLR-S1Hと全長レセプターLDLR-Fは (lanes 5 and 6 in Fig. 2-4-B)、GST-RAPブロッキングでも同様のシグナルを示した (lanes 1 and 2 in Fig. 2-4-A)。VLDLレセプターの場合は、全長VLDLレセプターは¹²⁵I-β-VLDLとは結合しなかったにもかかわらず、GST-RAPと強く結合した (lane 3 in Fig. 2-4-A)。6B6抗体を用いたウエスタンブロッキングで、VLDLレセプターの細胞外ドメインVLDLR-Sと全長レセプターVLDLR-Fは、ほぼ同程度のシグナルを示したのに対して (lanes 7 and 8 in Fig. 2-4-C)、GST-RAPブロッキングでは、VLDLレセプターの細胞外ドメインVLDLR-Sのシグナルは、全長レセプターVLDLR-Fのシグナルと比較してかなり弱かった (lanes 3 and 4 in Fig. 2-4-A)。以上の結果とVLDLレセプターの細胞外ドメインVLDLR-Sは、¹²⁵I-β-VLDLとは結合しなかった事実を考え合わせると、VLDLレセプターの細胞外ドメインは、不活性型として発現していることが明らかとなった。

2-3-6 RAPとVLDLレセプターの細胞外ドメインとの共発現の検討

LDLレセプタースーパーファミリーの細胞内リガンドであるRAPは、LDLレセプタースーパーファミリーに属するLDL receptor-related protein (LRP) のシャペロン様分子として機能していることが報告されている^{41, 42})。そこで、RAPがVLDLレセプターに関しても、シャペロン様分子として機能し得るかを調べるため、RAPとVLDLレセプターの細胞外ドメインVLDLR-Sとの共発現系を試みた。RAPの発現は、抗RAPポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッキングにより確認した (lane 8 in Fig.2-5-A)。昆虫細胞 (Sf9細胞) において、RAPとVLDLレセプターの細胞外ドメインとの共発現によっ

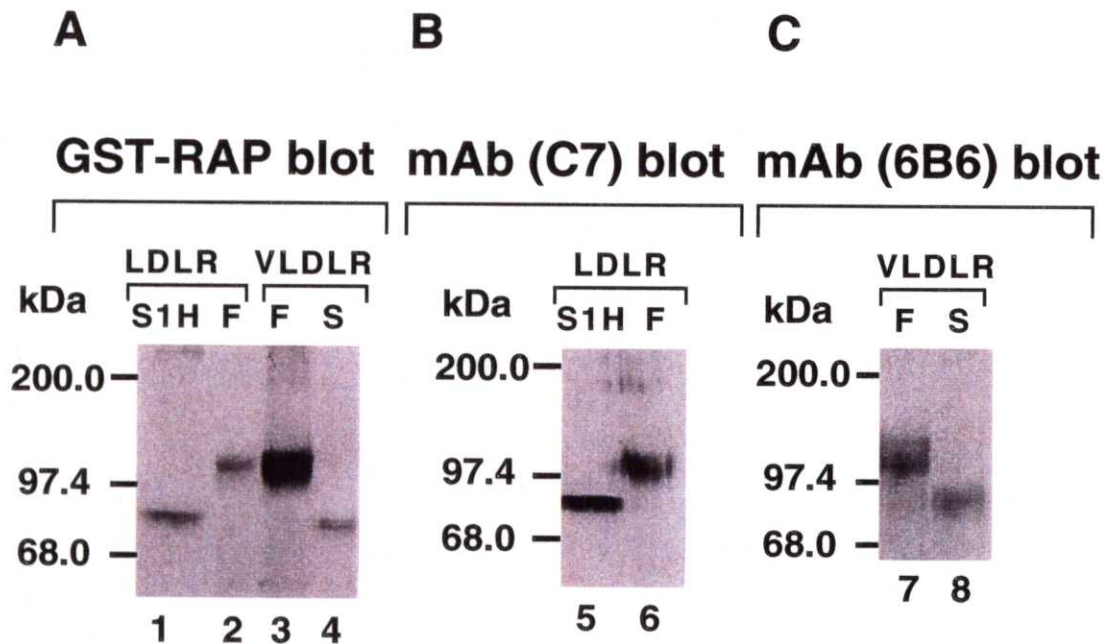


Figure 2-4 Ligand blotting analysis of recombinant LDL and VLDL receptors with GST-RAP

(A) GST-RAP blotting analysis. Medium from Sf9 cells infected with LDLR-S1H (lane 1) or the crude membrane fraction from Sf9 cells infected either with LDLR-F (lane 2), VLDLR-F (lane 3) or VLDLR-S (lane 4) were analysed by 7.5% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose. The filters were incubated with GST-RAP (18 nM) in the presence of 2 mM Ca²⁺. After being washed, filters were incubated with goat anti-GST antibodies followed by incubation with anti-goat horseradish peroxidase conjugated antibodies. Each membrane protein was used at 80 µg per lane. Samples of medium represented 4.8 x 10⁴ cells. For comparison, Western blotting analyses with mAbs C7 (B) and 6B6 (C) were shown. (B) Western blotting analysis with mAb C7. Medium from Sf9 cells infected with LDLR-S1H (lanes 5) or the crude membrane fraction from Sf9 cells infected with LDLR-F (lanes 6). (C) Western blotting analysis with mAb 6B6. The crude membrane fraction from Sf9 cells infected either with VLDLR-F (lane 7) or VLDLR-S (lane 8).

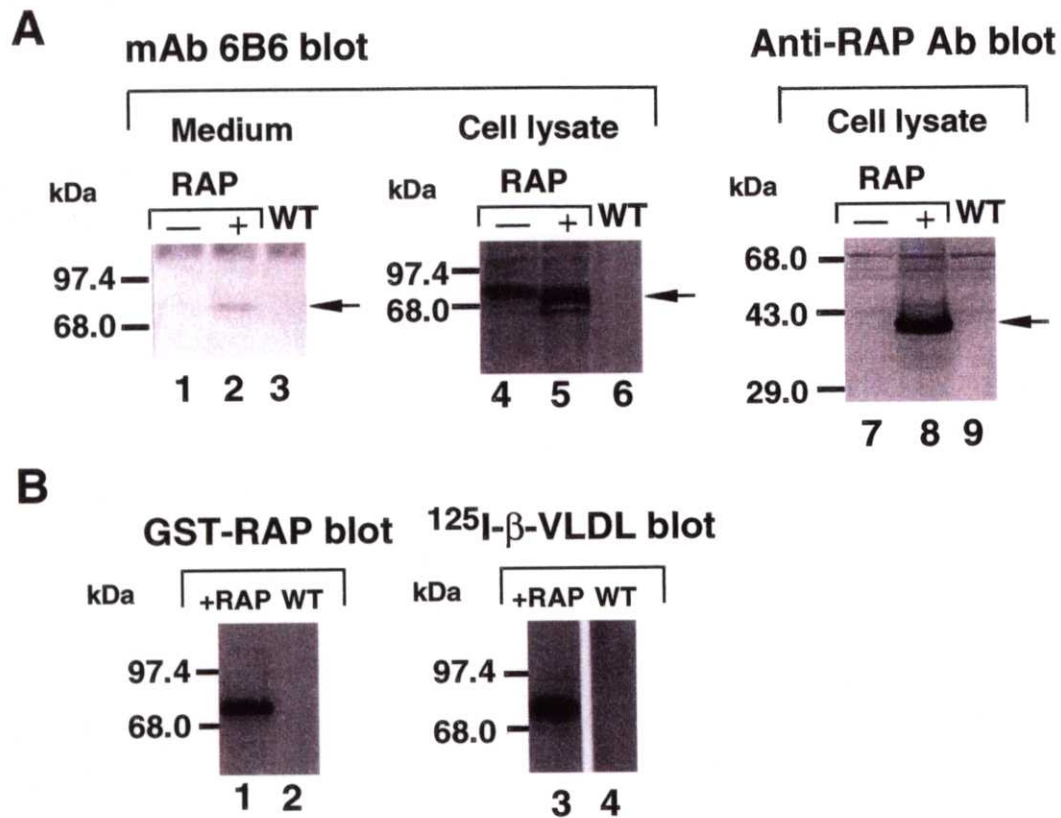


Figure 2-5 Coexpression of RAP facilitates secretion of the truncated VLDL receptor

(A) Western blotting analysis for coexpression of RAP with the truncated VLDL receptor (left-hand and center panels). Sf9 cells were infected at 2.4×10^6 cells per ml with a multiplicity of 10 plaque-forming units per cell. Cells were harvested 72 h post-infection and medium (m) or cell lysates (c) were subjected to 7.5% SDS-PAGE and analyzed with mAb 6B6. Medium from cells infected with VLDLR-S alone (lane 1, -RAP), coinfecting with both RAP recombinant virus and VLDLR-S (lane 2, +RAP), and infected with wild type baculovirus AcNPVC2 (lane 3). Cell lysates from cells infected with VLDLR-S alone (lane 4, -RAP), coinfecting with both RAP recombinant virus and VLDLR-S (lane 5, +RAP), and infected with AcNPVC2 (lane 6). Western blotting analysis for expression of RAP (right-hand panel). Cell lysates (c) were analysed by 10% SDS-PAGE under reducing conditions and Western blotting with anti-RAP antibodies. Cell lysates from Sf9 cells infected with VLDLR-S alone (lane 7, -RAP), coinfecting with both RAP recombinant virus and VLDLR-S (lane 8, +RAP), and infected with AcNPVC2 (lane 9).

(B) Binding of GST-RAP and ^{125}I - β -VLDL to the secreted VLDL receptor. Medium from Sf9 cells coinfecting with both RAP recombinant virus and VLDLR-S (lanes 1 and 3, +RAP), and infected with AcNPVC2 (lanes 2 and 4). GST-RAP (left-hand panel) and ^{125}I - β -VLDL (right-hand panel) blotting were shown. Samples of lysates and medium represented 8.0×10^5 cells and 4.8×10^4 cells.

て、可溶性VLDLレセプターが細胞培養上清に分泌した (lane 2 in Fig.2-5-A)。この現象は、他の昆虫細胞株であるTn5でも確認した (データ省略)。細胞内におけるVLDLR-Sの発現は、RAPとの共発現に関係なく同程度であった (lanes 4 and 5 in Fig.2-5-A)。次に、細胞培養上清に分泌した可溶性VLDLレセプターが、リガンドであるGST-RAPあるいは、¹²⁵I-β-VLDLと結合することができるかを調べた。分泌した可溶性VLDLレセプターは、GST-RAPと結合した (lane 1 in Fig.2-5-B)。さらにこの可溶性VLDLレセプターは¹²⁵I-β-VLDLと結合することができた (lane 3 in Fig.2-5-B)。次に、細胞外に分泌せず、細胞内に留まった形で発現したVLDLR-Sについても、リガンド分子との結合能を調べた。RAPと共発現したVLDLR-Sと、共発現しないVLDLR-Sは、どちらも膜画分に発現が認められた (lanes 1 and 2 in Fig.2-6)。イムノブロッティング法では、RAPと共発現しないVLDLR-Sが、RAPと共発現したVLDLR-Sよりも強いシグナルを示したのに対し、GST-RAPブロッティングでは、RAPと共発現したVLDLR-Sのみにシグナルが検出された (lane 5 in Fig.2-6)。同様に、RAPと共発現したVLDLR-Sのみが、¹²⁵I-β-VLDLと結合することができた (lane 8 in Fig.2-6)。以上の結果から、RAPと共発現することによって、VLDLレセプターの細胞外ドメインは培地中に分泌することができ、かつリガンドと結合できる活性型として発現することが明らかとなった。

2-3-7 RAPとLDLレセプターの細胞外ドメインとの共発現の検討

2-3-6で、RAPと共発現したVLDLレセプターの細胞外ドメインが、細胞培養上清に活性型可溶性レセプターとして分泌することが示された。次に、RAPの発現が、LDLレセプターの細胞外ドメインの発現に影響を与えるかを調べた。なお、LDLレセプターの細胞外ドメインの発現は、モノクローナル抗体C7でイムノブロッティング法を用いて調べた。VLDLレセプターの場合とは異なり、RAPとの共発現により、可溶性LDLレセプターの培養上清への分泌は特に変化が見られなかった (lanes 1 and 2 in Fig.2-7)。さらに、Cell lysateにおいても発現量の変化は認められなかった (lanes 4 and 5 in Fig.2-7)。

2-4 考察

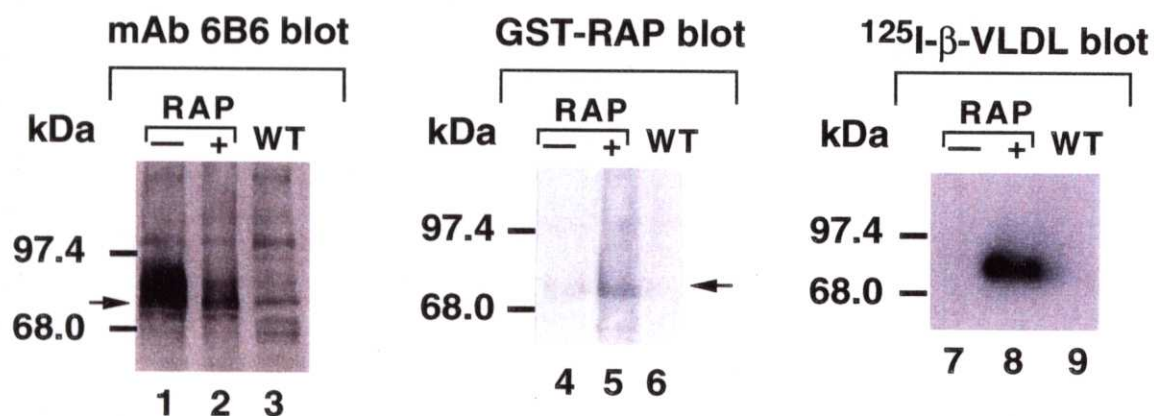


Figure 2-6 Coexpression of RAP facilitates ligand binding of the intracellular truncated VLDL receptor

The crude membrane fraction from Sf9 cells infected with VLDLR-S alone (lanes 1, 4 and 7, -RAP), coinfecting with both RAP recombinant virus and VLDLR-S (lanes 2, 5 and 8, +RAP), or infected with wild type baculovirus AcNPVC2 (lanes 3, 6 and 9) were analysed by 7.5% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose. Western blotting (left-hand panel), GST-RAP blotting (center panel) and ^{125}I - β -VLDL blotting (right-hand panel) analyses were shown. Each membrane protein was used at 80 μg per lane.

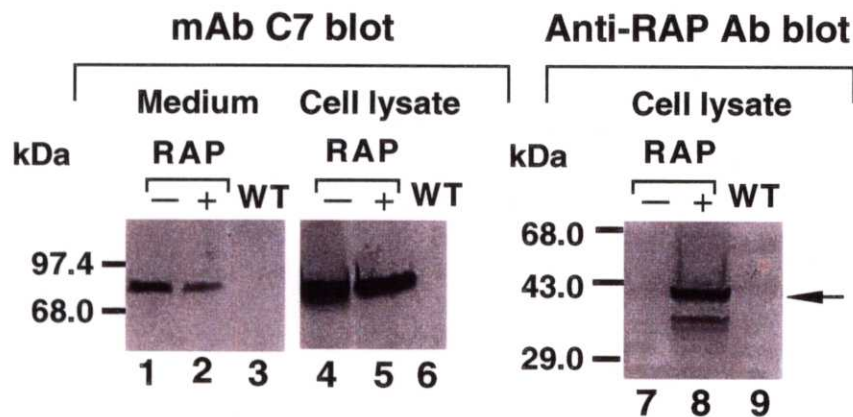


Figure 2-7 No enhancing effect of RAP coexpression on the expression of secreted and intracellular truncated LDL receptor

Western blotting analysis for coexpression of RAP with the truncated LDL receptor (left-hand and center panels). Sf9 cells were infected at 2.4×10^6 cells per ml with a multiplicity of 10 plaque-forming units per cell. Cells were harvested 72 h post-infection and medium or cell lysates were subjected to 7.5% SDS-PAGE and analysed with mAb C7. Medium from cells infected with LDLR-S1H alone (lane 1, -RAP), coinfecting with both RAP recombinant virus and LDLR-S1H (lane 2, +RAP), and infected with wild type baculovirus AcNPVC2 (lane 3). Cell lysates from cells infected with LDLR-S1H alone (lane 4, -RAP), coinfecting with both RAP recombinant virus and LDLR-S1H (lane 5, +RAP), and infected with AcNPVC2 (lane 6). Western blotting analysis for expression of RAP (right-hand panel). Cell lysates (c) were subjected to 10% SDS-PAGE under reducing conditions and analysed by Western blotting with anti-RAP antibodies. Cell lysates from cells infected with LDLR-S1H alone (lane 7, -RAP), coinfecting with both RAP recombinant virus and LDLR-S1H (lane 8, +RAP), and infected with wild type baculovirus AcNPVC2 (lane 9).

LDLレセプターとVLDLレセプターは、1次配列から予想されるドメイン構造が極めて類似している。しかしながら、両レセプターとも、リガンドとの結合形式は正確には理解されていない。LDLレセプターに関しては、遺伝子欠失を用いた実験により、N末端側のシステインに富むリピート構造領域が、リガンドとの結合に重要であることが示されている^{42, 43})。このシステインに富むリピート構造領域は、COS細胞で発現させると、細胞培養上清中に分泌されることが報告されている⁴⁴)が、この可溶性レセプターがリガンドと結合する活性型かどうかは明らかではない。最近では、システインに富むリピート構造領域のみを大腸菌で大量発現させ、リフォールディングすることにより、リガンドであるapoE3と結合する活性型可溶性LDLレセプターの大量生産の報告があった⁴⁵)。可溶性LDLレセプターに関しては、以上のようにいくつかの報告があるのに対して、可溶性VLDLレセプターに関する報告は今まで無かった。そこで、両レセプターの違いを分子レベルで明らかにすることと、結晶構造解析に適したレセプター分子を調製する目的で、可溶性レセプターの昆虫細胞での大量発現を試みた。その際、両可溶性レセプターは、発現、特に分泌に関しての挙動が異なることを見いだした。LDLレセプターの細胞外ドメインは、細胞培養上清に分泌したのに対して、VLDLレセプターの細胞外ドメインは分泌しなかった。この原因として、まずVLDLレセプターのシグナル配列が昆虫細胞で認識されないために、可溶性レセプターが分泌しない可能性を考えた。そこで、VLDLレセプターのシグナル配列を、LDLレセプターのシグナル配列と交換して発現を試みたが、可溶性レセプターは発現しなかった(データ省略)。次にVLDLレセプターの細胞外ドメインが、昆虫細胞では不活性型として発現しており、その結果として、細胞外に分泌しない可能性を考えた。全長LDLレセプターと可溶性LDLレセプターは、細胞内リガンドであるRAPに対して同様の結合能を示した。全長VLDLレセプターは、¹²⁵I-β-VLDLとは結合できないにも関わらずRAPと強く結合した。この現象の説明としては以下のことが考えられる。昆虫細胞で発現した全長VLDLレセプターは、部分的に正しいフォールディングをとっていないため、¹²⁵I-β-VLDLとは結合できない。しかし、シャペロン様分子であるRAPは、部分的に正しいフォールディングをとっていない分子を認識して結合する性質があるため、昆虫細胞で発現した全長VLDLレセプターに結合したのではないかと推察している。

全長VLDLレセプターは、全長LDLレセプターと比較してRAPに強く結合した。このことはBatteyらの報告と一致する⁹⁾。一方、分泌せず細胞内に留まる形で発現したVLDLレセプターの細胞外ドメインは、全長VLDLレセプターと比較して、RAPとの結合が弱かった。さらに、¹²⁵I- β -VLDLとは結合できなかった。以上より、VLDLレセプターの細胞外ドメインは、昆虫細胞で不活性型として発現していると結論した。

RAPは、LDLレセプタースーパーファミリーに属するLDL receptor-related protein (LRP) のシャペロン様分子として機能していることが報告されている^{40, 41)}。そこで、RAPのVLDLレセプターに対するシャペロン様分子としての機能を期待して、VLDLレセプターの細胞外ドメインとRAPとの共発現系を試みた。その結果、活性型可溶性VLDLレセプターの分泌に成功した。Buらは、LRPに関して、膜貫通部分を欠失させたミニレセプターを構築し、RAPとの共発現により可溶性レセプターが分泌することを報告している⁴⁰⁾。この結果は、今回VLDLレセプターで得られた結果と同様であった。従って、RAPのVLDLレセプターにおける機能は、RAPのLRPにおける機能と同様に分子シャペロン様の働きをしていることが推定される。すなわち、VLDLレセプターの細胞外ドメインの分子フォールディングを直接改善するか、あるいは細胞内において、リガンド分子の結合依存的におこるレセプター分子の崩壊を防いでいることが考えられた。その結果として、VLDLレセプターの細胞外ドメインが、活性型可溶性レセプターとして分泌できたと考えている。RAPノックアウトマウス⁴⁶⁾において、VLDLレセプターの心筋における発現は、レセプター分子のプロセッシングが不十分で、細胞内の小胞体に留まる現象が認められた。しかしながら、他の臓器では、VLDLレセプター分子のプロセッシングに変化は認められず、レセプター分子は細胞膜 (Plasma membrane) まで輸送されていた。さらに、RAPを高発現したトランスジェニックマウスでは、野生型のマウスと比較して、心筋におけるVLDLレセプターのプロセッシングに変化は認められなかった⁴⁶⁾。以上の結果から、*in vivo* では、RAPが直接にVLDLレセプターの分子フォールディングを改善するというよりも、RAPが必要であるかどうかを決定する因子の存在、あるいは、RAPに代わる別の因子の存在が推定される。LRPの場合、リガンドであるapoEを高発現すると、リガンド依存的にレセプター分子の崩壊が起きることが報告されている。このような場合

には、RAPはおそらく真のリガンド分子が細胞内で新しく合成されたレセプター分子に結合する前にレセプター分子に結合して、リガンド結合依存的なレセプター分子の崩壊を防ぐ働きをするのであろう。したがって、今回用いた昆虫細胞が、VLDLレセプターのリガンド様分子を発現しているために、RAPがリガンド依存性のレセプター分子の崩壊を防ぐ働きをしたという可能性も考えられる。その点に関しては、他の細胞株、例えばCHOや繊維芽細胞 (fibroblast) についても、今回と同様の現象がおこるか確かめる必要があると考えられる。また、他のLDLレセプタースーパーファミリーに属するレセプター分子が、同様の機構で発現制御されているのかという点にも興味を持たれる。この点に関して、VLDLレセプターと性質が近く、脳に高発現しているApo E レセプター²⁴⁷⁾の細胞外ドメインの発現を昆虫細胞で試みたが、培地中には分泌しなかった (データ省略)。

最近、X線構造解析により、LDLレセプターのリガンド結合領域内のリピート構造5が報告された⁴⁸⁾。従来リポ蛋白と、LDLレセプターとの結合は、リポ蛋白の正に帯電しているアミノ酸残基と、LDLレセプターの負に帯電しているアミノ酸残基の静電相互作用により結合していると説明されていた。しかしながら、X線構造解析で明らかになった事実は、5番目のリピート部位で負に帯電しているすべてのアミノ酸残基は、Ca²⁺ イオンと相互作用しており、従来の考えでは説明がつかないことが分かった (Fig. 2-8)。従って、レセプターとリガンドとの相互作用をX線構造解析で明らかにするためには、リガンド結合領域の部分的な構造を調べるのではなく、リガンド結合領域全域を含む細胞外ドメインの構造を調べる必要がある。したがって、今回得られた活性型可溶性LDLレセプター、VLDLレセプターは、構造解析に適した材料であると考えられる。

2-5. 結言

本章では、LDL、VLDL両可溶性レセプターの昆虫細胞での発現を試みた。LDLレセプターの細胞外ドメインは可溶性レセプターとして細胞培養上清中に分泌し、リガンドであるLDL、 β -VLDL共に結合することができた。これに対して、VLDLレセプターの細胞外ドメインは、細胞内に発現は認められたものの、細胞培養上清中には分泌しなかった。細胞内リガンドであるReceptor-associated protein (RAP) とVLDLレセプターの細胞

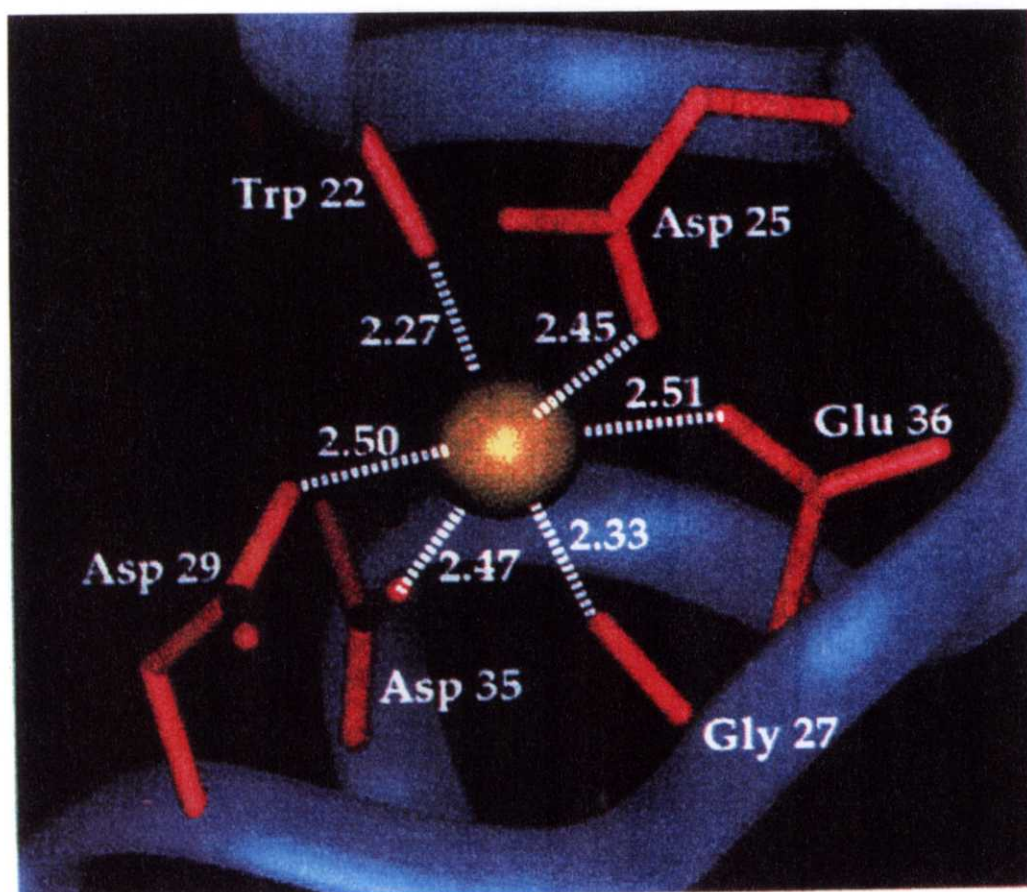


Figure 2-8 The structure of the ligand binding repeat 5 (LR5) of the LDL receptor (Fass, D. et al., 1997, Nature 388, 691-693)

Side chains involved in Ca^{2+} coordination are superimposed on a ribbon trace of the LR5 backbone. The yellow ball shows the position of the Ca^{2+} ion.

外ドメインの共発現を試みたところ、活性型可溶性VLDL レセプターの分泌が認められた。このことから、VLDL レセプターの細胞外ドメインの活性化には、細胞内リガンドであるReceptor-associated protein (RAP) が、重要な役割を担っていることが明らかとなった。以上のことから、VLDLレセプターの蛋白成熟化や、細胞内局在を支配する因子が、LDLレセプターのものとは異なることが推察された。

第3章 可溶性ヒトBone marrow stromal cell antigen-1 (BST-1/CD157)の発現と、ecto-ADP-ribosyl cyclase 活性を阻害するペプチドインヒビターの創製

3-1 緒言

第3章では、レセプター分子として機能していることが推定され、さらに、ecto-enzyme活性を有するユニークな分子であるヒトBone marrow stromal cell antigen-1 (BST-1/CD157)に着目した。BST-1は、リウマチ患者由来の骨髄ストローマ細胞が、健常人のものと比較して、マウス由来のpreB細胞 (DW34)の増殖能を上昇させるという事実に基づいてクローン化されたGPIアンカー型の膜蛋白である^{10, 11)}。したがって、リウマチ疾患との関連が示唆される分子であり、事実、慢性関節リウマチ患者の血清中からは、高濃度の可溶性BST-1が高頻度に検出される¹⁵⁾。また、BST-1に対するポリクローナル抗体でBST-1を架橋反応させると、細胞内の分子がチロシンリン酸化を起こすことから、この分子がシグナル伝達に関わるレセプター分子として機能することが推定されている¹²⁾。さらにBST-1はecto-enzyme活性として、NADからcADPRを合成するADP-ribosyl cyclaseと、cADPRを加水分解してADPRに変換するcADPR hydrolase活性を有する¹³⁾(Fig. 3-1)。特にADP-ribosyl cyclase活性によって合成されるcADPRは、IP₃とは異なった機序で細胞内のCa²⁺ストアーから、Ca²⁺をリリースさせるセカンドメッセンジャーとして機能する重要な分子である¹⁴⁾。最近になってcADPRに関する報告がいくつか発表されているが^{49, 50, 51, 52, 53, 54)}、その機能は、まだ十分には解明されていないのが現状である。この分子自体細胞膜を通過しにくいいため、細胞外領域で合成されたcADPRが、どのような機構で細胞内に入り、細胞内のCa²⁺をリリースさせるのかはまだ解明されていない。さらに、リウマチの病態と、BST-1のecto-enzyme活性との関係も解明されていない。このような研究が進まない原因としては、BST-1のecto-enzyme活性に対するインヒビターが、今まで見

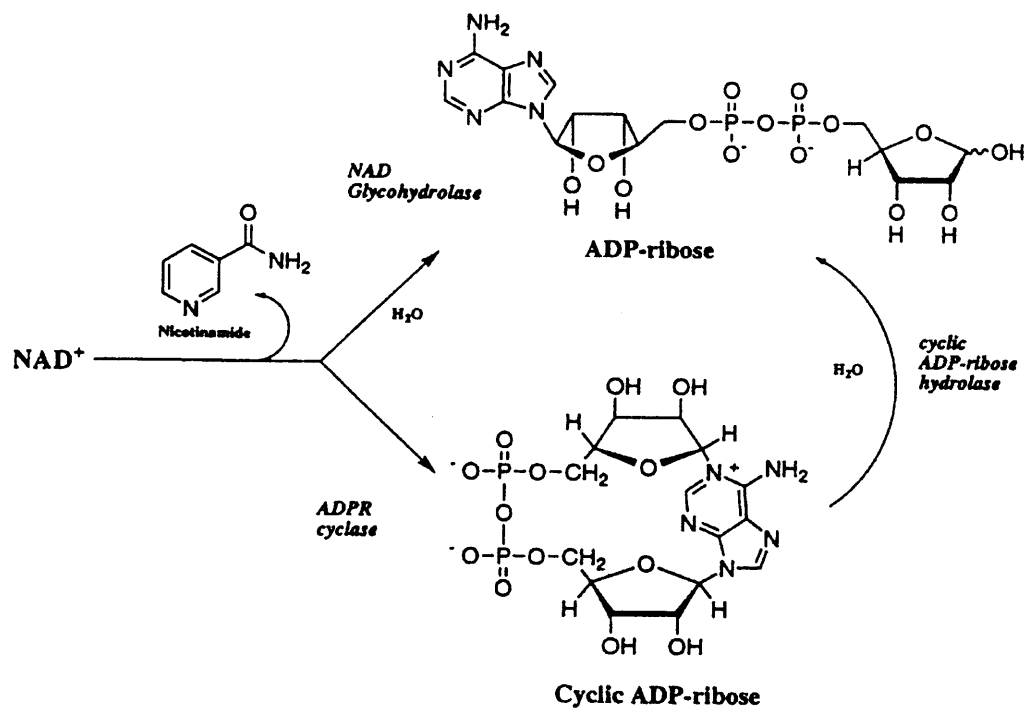


Figure 3-1 Enzymic synthesis of ADP-ribose and cADP-ribose

いだされていないことがその一因であると考えられる。本章では、このユニークなレセプター分子の機能解析と、結晶化に適する可溶性レセプターの発現系を確立する目的で、昆虫細胞を用いた活性型可溶性BST-1の大量発現を試みた。さらに、得られた精製BST-1を用いて、BST-1のecto-enzyme活性を阻害するインヒビターを創製することを目的とした。すなわち、精製BST-1をターゲットにして、15アミノ酸残基からなるファージディスプレイランダムペプチドライブラリー¹⁷⁾をスクリーニングした。その結果、BST-1のADP-ribosyl cyclase活性、及びcADP-ribose hydrolase 活性を特異的に阻害するペプチドインヒビターSNP-1の単離に成功した。

3-2 実験方法

3-2-1 試薬

制限酵素等の試薬は、宝酒造社製、NEW ENGLAND BIOLABS社製のものを使用した。合成ペプチドは、サワデーテクノロジー社に合成依頼した。その他の試薬は、各実験方法に記載した。

3-2-2 ヒト可溶性BST-1発現ベクターの構築

昆虫細胞での、可溶性BST-1の発現ベクターは、以下のように構築した。BST-1の可溶性蛋白として予想されるアミノ酸1から297番目までの配列を含むプラスミド（シグナル配列を含み、298番目のThrを、終止コドンに変えたもの）p Δ 63-BOS¹¹⁾を、EcoRV/XbaIで消化して、1.0 kbpのフラグメントをアガロースゲルより精製した。このDNA断片を、バキュロウイルス発現ベクターであるpVL1393 (PharMingen社製)のSmaI/XbaIサイトに連結し、可溶性BST-1発現ベクターpVL1393BST-1solを得た (Fig.3-2-A)。

3-2-3 昆虫細胞培養および組換えバキュロウイルスの単離

昆虫細胞の培養、および発現ベクターpVL1393BST-1solを用いた組換えバキュロウ

(A)



(B)

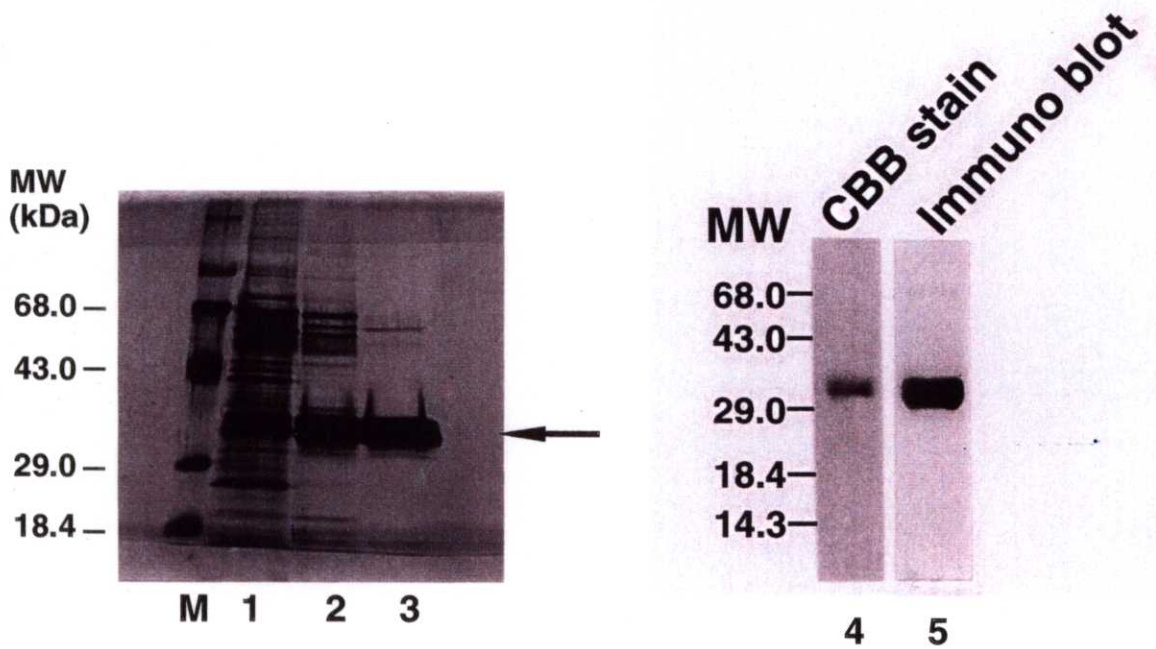


Figure 3-2 Expression of a soluble form of BST-1 (sBST-1) in insect cells

(A) Schematic representation of the construct used in this study. A predicted soluble form of BST-1, which was prepared by introducing a stop codon at Thr 298, was expressed under the control of polyhedrin promoter in insect cells. SP represents a native signal peptide of BST-1. (B) Purification of sBST-1 (left panel). sBST-1 secreted into the medium (lane 1) was purified to homogeneity by ion-exchange chromatography (lane 2) and dye ligand chromatography (lane 3). Silver staining was shown. Analysis of purified sBST-1 by SDS-PAGE (right panel). One μg of purified sBST-1 was subjected to a 12% SDS-PAGE under reducing conditions. Coomassie Brilliant Blue staining (lane 4) and immunoblotting analysis (lane 5) were shown.

イルスの単離は、2-2-5で述べた方法で行った。

3-2-4 組換えバキュロウイルスの昆虫細胞での発現

無血清培地であるSF900II (Gibco BRL社製) を用いて、Tn5細胞をモノレイヤー培養した。細胞数が、 $1\sim 1.5 \times 10^6$ /mlに達したとき、組換えバキュロウイルスを、感染効率 Multiplicity of infection (MOI) 1で感染させ、27°Cで72時間培養した。発現の確認は、細胞培養上清を還元状態で熱処理した後、SDS-PAGEで泳動し、BST-1に対するポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティング法で行った。

3-2-5 ウエスタンブロッティング

細胞培養上清液、及び精製BST-1のサンプルは、還元状態で熱処理して12%のSDS-PAGEに泳動した。泳動後、分離した蛋白を電氣的にニトロセルロースフィルター (Schleicher & Schuell社製) に転写した。転写後、フィルターを1%ウシ血清アルブミンを含むブロッキングバッファー (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 1% ウシ血清アルブミン, 0.05% Tween 20) に室温で30分間浸した。BST-1に対するポリクローナル抗体を1000倍希釈の濃度で加えて、室温2時間反応させたのち、洗浄バッファー (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) で3回洗浄した。洗浄後、アルカリホスファターゼ標識の抗ウサギIgG抗体を室温30分間反応させた。洗浄バッファー (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) で3回洗浄した後、アルカリホスファターゼ発色キットを用いて発色させた (Promega社製)。

3-2-6 可溶性BST-1の精製

細胞培養液上清に分泌してくる可溶性BST-1を、20 mM酢酸バッファー(pH5.0)で5倍に希釈した。希釈した培養液を孔径0.45 μm のフィルターにかけて不溶物を取り除いた後、陽イオン交換カラム (POROS社製 50HSカラム)で、1Mまでの直線的なNaClグラジエントをかけて精製した。可溶性BST-1は、塩濃度約300 mM付近に溶出した。その後、BST-1を含む分画を、20 mM酢酸バッファー (pH5.0) に透析した後、Hi-trap

Blueカラム（アマシャムファルマシアバイオテク社製）で精製した。カラムに吸着したBST-1を、まず100mM NaClを含む20 mM酢酸バッファー（pH5.0）で洗浄した後、500mM NaClを含む20 mM酢酸バッファー（pH5.0）で溶出した。この操作で、SDS-PAGE上、クーマシー染色で単一バンドを示す精製BST-1が得られた。

3-2-7 ファージランダムペプチドライブラリーの作製

ファージランダムペプチドライブラリーの作製は、Scottらの方法¹⁷⁾に準じて行った（Fig.3-3参照）。ファージミドベクター（Fuse5）に挿入するランダムな15アミノ酸配列に相当する2本鎖DNAを作製するため、図で示したランダムなDNA配列を含む合成オリゴヌクレオチドをまず調製した。このランダム配列を有するオリゴヌクレオチドを鋳型として、ビオチン標識されたプライマーを設定し、PCR法で末端ビオチン化した2本鎖DNAを調製した。得られた2本鎖DNAを、制限酵素*Bgl*Iで消化した後、ストレプトアビジン固相化アガロースを用いて、ビオチン結合した末端配列を除去した。ランダム配列を有する*Bgl*Iで消化した2本鎖DNAは、*Sfi*Iで完全消化したFuse5にT4DNAリガーゼで連結した。このように調製したDNAを、エタノール沈殿とゲルろ過スピンカラム（Chroma Spin-400, Clontech社製）で精製し、Electroporation法で、大腸菌MC1061に導入した。得られた形質転換株を、テトラサイクリンを含むLB培地で一晚培養し、培養上清中にファージを放出させた。ファージは、ポリエチレングリコール/NaClで沈殿して、高濃度のファージライブラリーとした。これにより、最終的に 2×10^8 のクローンを含むライブラリーを作製した。

3-2-8 可溶性BST-1結合ファージのスクリーニング

BST-1結合ファージのスクリーニングには、96穴のマイクロプレート（Nunc社製）を使用した。BST-1に対するモノクローナル抗体であるBEC7^{12, 55)}を、10mMリン酸バッファー（pH 7.0）に溶解し、 $3 \mu\text{g}$ /ウエルの濃度で4℃一晚反応させ、ウエルに固相化した。PBSで洗浄後、精製した可溶性BST-1を10mMリン酸バッファー（pH 7.0）に溶解し、 $5 \mu\text{g}$ /ウエルの濃度で4℃一晚反応させ抗体に結合した。ブロッキング剤（1%

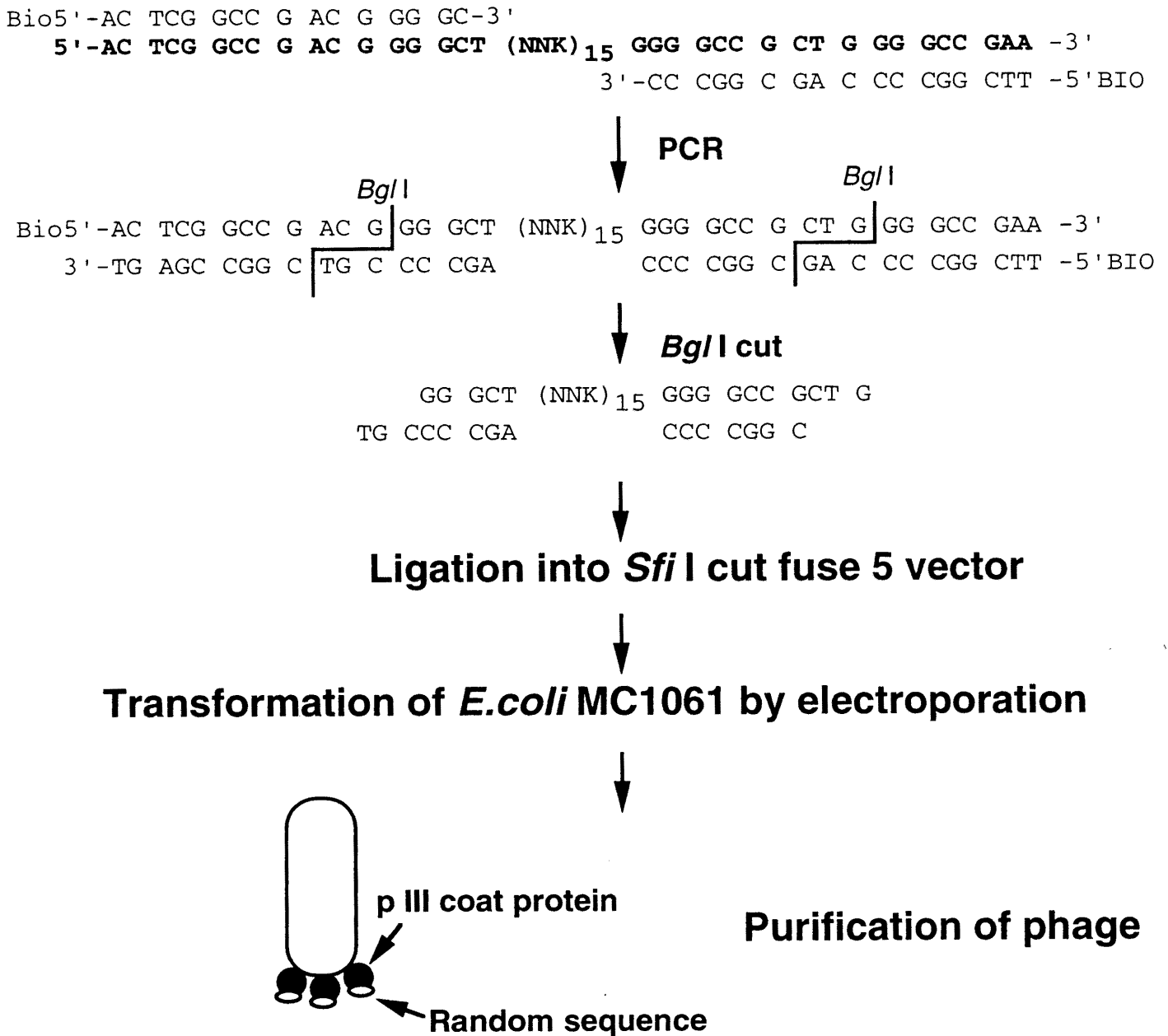


Figure 3-3 Construction of a random peptide phage library

The fuse vector and an *E. coli* host strain (K91 kan) were kindly provided by Dr. G. P. Smith (University of Missouri, Columbia). Degenerate DNA inserts were prepared essentially as described by Scott et al¹⁷⁾ with the exception that the insert encodes 15 random amino acid instead of 6. The fuse 5 vector (5 µg) was cut with *Sfi*I and then ligated overnight with *Bgl*II-digested degenerate fragments with T4 DNA ligase. The ligated fuse 5 was purified with precipitation by ethanol and on a spin column (CHROMA Spin-400, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) and then electroporated into *E. coli* MC1061 cells. The library contains 2×10^8 random peptide phage clones.

BSA、10mM リン酸バッファー (pH 7.0)) で、室温 1 時間ブロッキングした後、抗体 BEC7 に結合するファージを除去するために、まず、3-3-7 で作製したライブラリー (10^{12} バイロンのファージ数) を、希釈バッファー (1% BSA、10mM リン酸バッファー (pH 7.0)、1mM $ZnCl_2$) に希釈して、抗体 BEC7 だけが固相化してあるウエルで室温 1 時間反応させ、抗体 BEC7 に結合するファージを吸収した。次に、この操作で結合しなかったファージを、BST-1 が固相化されているウエルに移し、室温で 1 時間反応させた。洗浄バッファー (10mM リン酸バッファー (pH 7.0)、0.05%(v/v) Tween20) で、10 回洗浄後、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の BSA を含む 0.1M Glycine-HCl (pH 2.2) で結合したファージを溶出した。溶出後、1M Tris-HCl (pH 9.5) で中和した後、大腸菌 K91kan に感染させ、ファージを増幅した。このパニング操作を 3 回繰り返して、濃縮してくるファージを選択した。

3-2-9 Phage ELISA

選択濃縮したファージを、再び大腸菌 K91kan に感染させ、テトラサイクリンを含む LB プレート上で、シングルコロニーを形成させた。各コロニーをテトラサイクリンを含む LB 培地にうえて、一晚培養した。翌日上清 $5 \mu\text{l}$ (ファージ粒子 $10^9 \sim 10^{10}$ バイロンを含む) を直接 ELISA に使用した。ELISA の作製、および測定方法は以下の様に行った。BST-1 に対するモノクローナル抗体である BEC7 を、10mM リン酸バッファー (pH 7.0) に溶解し、 $0.1 \mu\text{g}/\text{ウエル}$ の濃度で 4°C 一晚反応させ、ウエルに固相化した。PBS で洗浄後、精製した可溶性 BST-1 を 10mM リン酸バッファー (pH 7.0) に溶解し、 $0.3 \mu\text{g}/\text{ウエル}$ の濃度で 4°C 一晚反応させ抗体に結合した。可溶性の BST-1 あるいは CD38 を抗体を介さず直接ウエルに固相化するときには、それぞれの精製蛋白を $0.3 \mu\text{g}/\text{ウエル}$ の濃度で 4°C 一晚反応させてウエルに結合した。ブロッキング剤 (1% BSA、10mM リン酸バッファー (pH 7.0)) で、室温 1 時間ブロッキングした後、上記上清 $5 \mu\text{l}$ (ファージ粒子 $10^9 \sim 10^{10}$ バイロン) を加え、室温で 1 時間反応させた。洗浄バッファー (10mM リン酸バッファー (pH 7.0)、0.05%(v/v) Tween20) で、3 回洗浄後、西洋わさびペルオキシダーゼ標識の M13 ファージ抗体 (アマシャムファルマシアバイオテク社製) を室温 30 分反応させた。3 回洗浄後、基質 TMB (3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン) で発色させ、450 nm の吸光度を測定した。ELISA で陽性と判定したクローンは、ファージの 1 本鎖 DNA を

Smithらの方法²⁰⁾で抽出して、サイクルシーケンシング法で塩基配列を決定した。

3-2-10 ADP-ribosyl cyclase 活性の測定

ADP-ribosyl cyclase 活性の測定は、NAD⁺のアナログであるNGD⁺ (Sigma社製) を用いる方法で測定した⁵⁶⁾。ADP-ribosyl cyclase 活性により、NGD⁺は、蛍光物質であるCyclic GDP-リボースに変換される。このCyclic GDP-リボースはNAD⁺から生成されるCyclic ADP-リボースとは異なり、加水分解されにくいのが特徴である。したがって、この方法により、BST-1のADP-ribosyl cyclase 活性のみを測定することができる。精製した可溶性BST-1、あるいは可溶性CD38を50mM MES (pH 6.0)、1 mM ZnCl₂ を含むバッファー中で、NGD⁺と25°Cで反応させた。生成してくるCyclic GDP-リボースは、300 nmの波長で励起すると、410 nmの波長の蛍光を発するので、この蛍光強度を蛍光分光光度計 (F-4500、日立社製) で測定した。

3-2-11 cADP-ribose hydrolase活性の測定

cADP-ribose hydrolase活性の測定は、HPLCを用いるHirataらの方法¹³⁾で行った。50 μg/mlの可溶性BST-1と20 μMのcADP-リボース (Sigma社製) を、37°Cで4時間反応させた。反応後、残存するcADP-リボースと、加水分解によって生成してくるADP-リボースは、陰イオン交換カラムPL-SAX 1000A (Polymer laboratories 社製) を用いて分離した。その分離は、流速0.5ml/min、0.02M から0.51M のNH₄HCO₃ を用いた直線グラジエントで行った。残存するcADP-リボースと、加水分解によって生成してくるADP-リボースの濃度は、260 nmの吸光度でモニターリングして、両物質のHPLC上での総面積を100%としたときの、各物質の相対面積比で表した。

3-3 結果

3-3-1 可溶性BST-1の昆虫細胞での発現および精製

Fig. 3-2-Aに示した様に、BST-1のアミノ酸残基1-297をコードするcDNAを、polyhedrinプロモーターの下流につないだ発現ベクター (pVL1393BST-1sol) を構築し、昆虫細胞 Sf9を用いて可溶性BST-1を発現させた。可溶性BST-1は細胞培養上清中に分泌した。次に、分泌した可溶性BST-1を容易に精製するために、培地を血清入りのものから無血清培地 SF900II (Gibco BRL社製) に変更し、細胞株は分泌に適しているTn5に変更して、大量発現を行った。発現後、培養上清を銀染色すると、30kDa付近に発現した可溶性BST-1のバンドを検出することができた (lane 1 in Fig. 3-2-B)。さらに、陽イオン交換カラム (lane 2 in Fig. 3-2-B)、Blueカラム (lane 3 in Fig. 3-2-B) を用いて精製し、最終的に、SDS-PAGE上でクーマシー染色すると、ほぼ単一のバンドにまで精製することができた (lane 4 in Fig. 3-2-B)。このバンドは、BST-1に対するポリクローナル抗体に反応し、目的の蛋白であることを確認した (lane 5 in Fig. 3-2-B)。

3-3-2 可溶性BST-1のADP-ribosyl cyclase 活性

精製した可溶性BST-1が、活性型であるかを確認するために、NGD⁺ を用いたADP-ribosyl cyclase 活性測定を行った。その結果をFig. 3-4に示す。可溶性BST-1 (5.0 $\mu\text{g/ml}$) に基質であるNGD⁺ を100 μM 加えると、蛍光強度が直線的に増加した。NGD⁺のみを加えBST-1を加えない場合や、BST-1を加えNGD⁺を加えない場合には蛍光強度の増加は認められず、特異的な酵素活性を確認した。次に、NGD⁺に対するMichaelis定数 (K_m 値) を求めるため、基質濃度と生成速度との関係を調べた (Fig. 3-5)。酵素解析ソフト'Enzyme kinetics' (Trinty Software社) を用いて、 K_m 値を求めたところ、 $610 \pm 10.2 \mu\text{M}$ ($n=3$)であった。

3-3-3 BST-1結合ファージのスクリーニング

BST-1のecto-enzyme活性を阻害するインヒビターを創製することを目的として、3-3-1で精製した可溶性BST-1をターゲットとして、15アミノ酸のランダムファージディスプレイライブラリーをスクリーニングした。スクリーニングに際して、可溶性

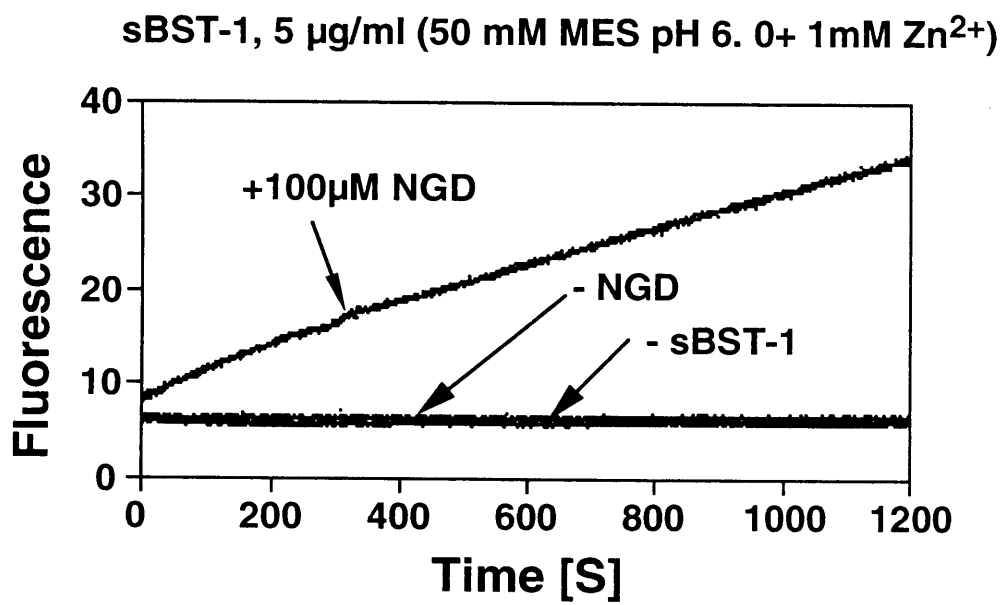
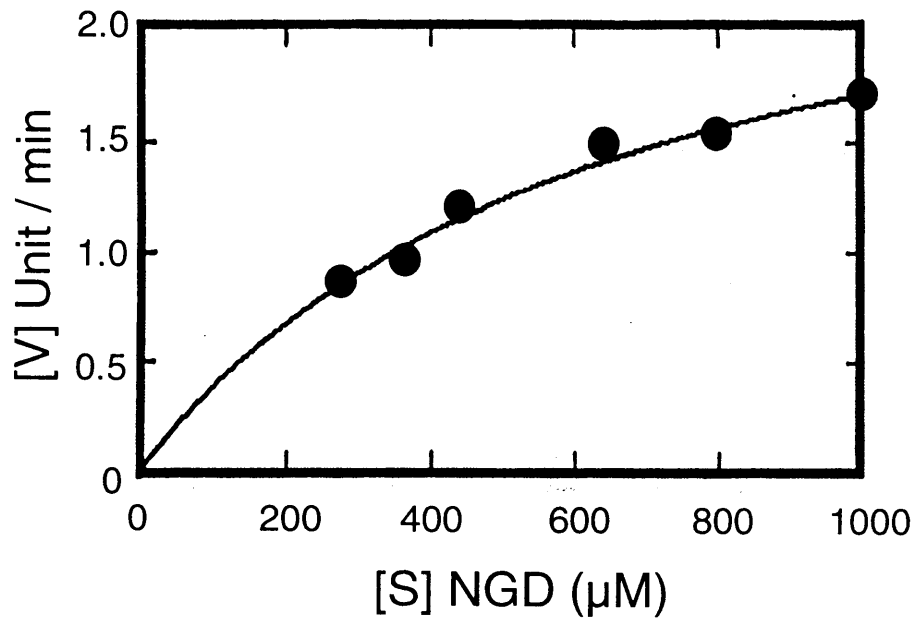
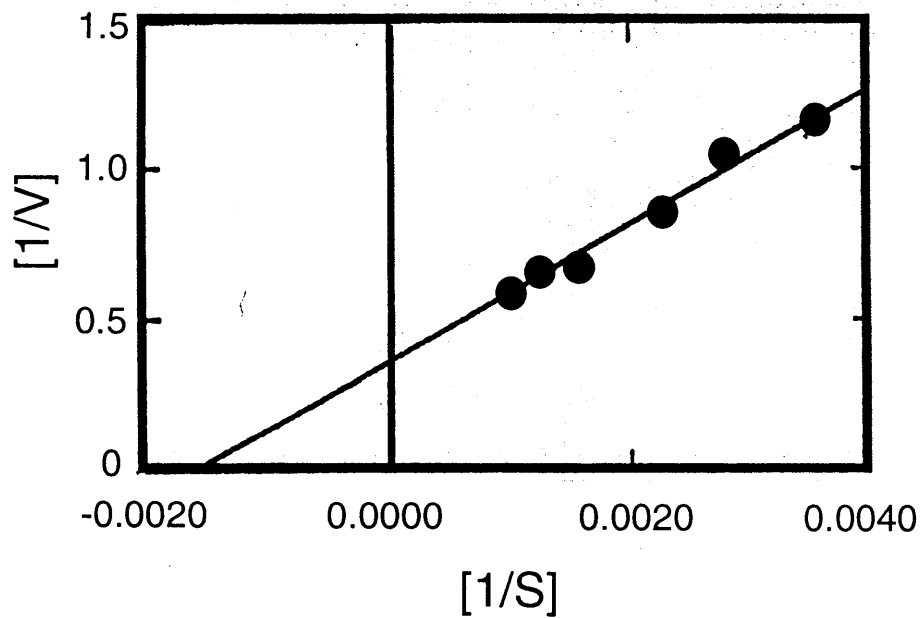


Figure 3-4 Spectrofluorimetric assay of ADP ribosyl cyclase of sBST-1

A**B****Figure 3-5 Kinetics of ADP-ribosyl cyclase activity of sBST-1**

(A) The effect of substrate concentrations (300-1000 μM) on the initial velocity of ADP-ribosyl cyclase activity of sBST-1 (1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was displayed.

(B) Lineweaver-Burk plot of the data in (A) : $1/V$ versus $1/S$ for the product cGDP-ribose.

The K_m value of ADP-ribosyl cyclase for NGD^+ is $610 \pm 10 \mu\text{M}$ ($n=3$).

BST-1の固相化方法を2種類検討した。すなわち、可溶性BST-1を直接マイクロプレートに物理吸着して固相化する方法と、BST-1に対する2種類のモノクローナル抗体(BEC7とRF3)を介して固相化する方法を試みた。Fig. 3-6で示した方法で、3回パニングを行い、さらにPhage ELISA法で、濃縮してきたファージの反応性の確認を行った結果、モノクローナル抗体 BEC7を介してBST-1を固相化した条件についてのみBST-1に特異的に結合するファージが得られた。Fig. 3-7 にPhage ELISA法の結果を示す。代表的なファージクローンSN-1（後述）について示したが、このクローンは、昆虫細胞、およびCHOで生産したどちらの可溶性BST-1にも特異的に結合した。これに対して、陰性コントロールのファージは結合を示さなかった。可溶性BST-1を直接マイクロプレートに物理吸着して固相化する方法でパニングした場合には、陽性クローンは得られなかったにもかかわらず、Phage ELISA法では、ファージSN-1は、マイクロプレートに直接固相化した可溶性BST-1を認識して結合した。Phage ELISA法で、陽性と判断した8クロンの塩基配列を解析したところ、7クローンは同一の配列を有しており、このファージをSN-1と命名した。残りの1クローンはSN-16と命名した(Table 1)。この2つの配列の間には、相同性は全く認められなかった。

3-3-4 合成ペプチドによるファージと可溶性BST-1との結合阻害

スクリーニングによって得られた2つの配列(SN-1とSN-16)を、化学合成により調製し、各合成ペプチドをSNP-1、SNP-16と命名した。SNP-1は、水溶性であり、水系のバッファーに10 mg/mlの濃度まで溶解可能であるのに対して、SNP-16は疎水性であり、以降の実験はDMSOに溶解して行った。作製したペプチドが、ファージと可溶性BST-1との結合を阻害することができるかをPhage ELISA法で調べた。結果をFig. 3-8に示す。SNP-1は、ファージSN-1と可溶性BST-1との結合を11 μ Mの濃度で完全に阻害した。SNP-16は、ファージSN-16と可溶性BST-1との結合を11 μ Mの濃度で部分的に阻害した。55 μ M加えた陰性コントロールペプチド(SNP-1のN末端側からC末端側の配列を逆に合成したもの)は、結合阻害を示さなかった。SNP-1は、ファージSN-16と可溶性BST-1との結合を11 μ Mの濃度で完全に阻害し、SNP-16は、ファージSN-1と可溶性BST-1との結合を11 μ Mの濃度で部分的に阻害した。このことから、両ファージ

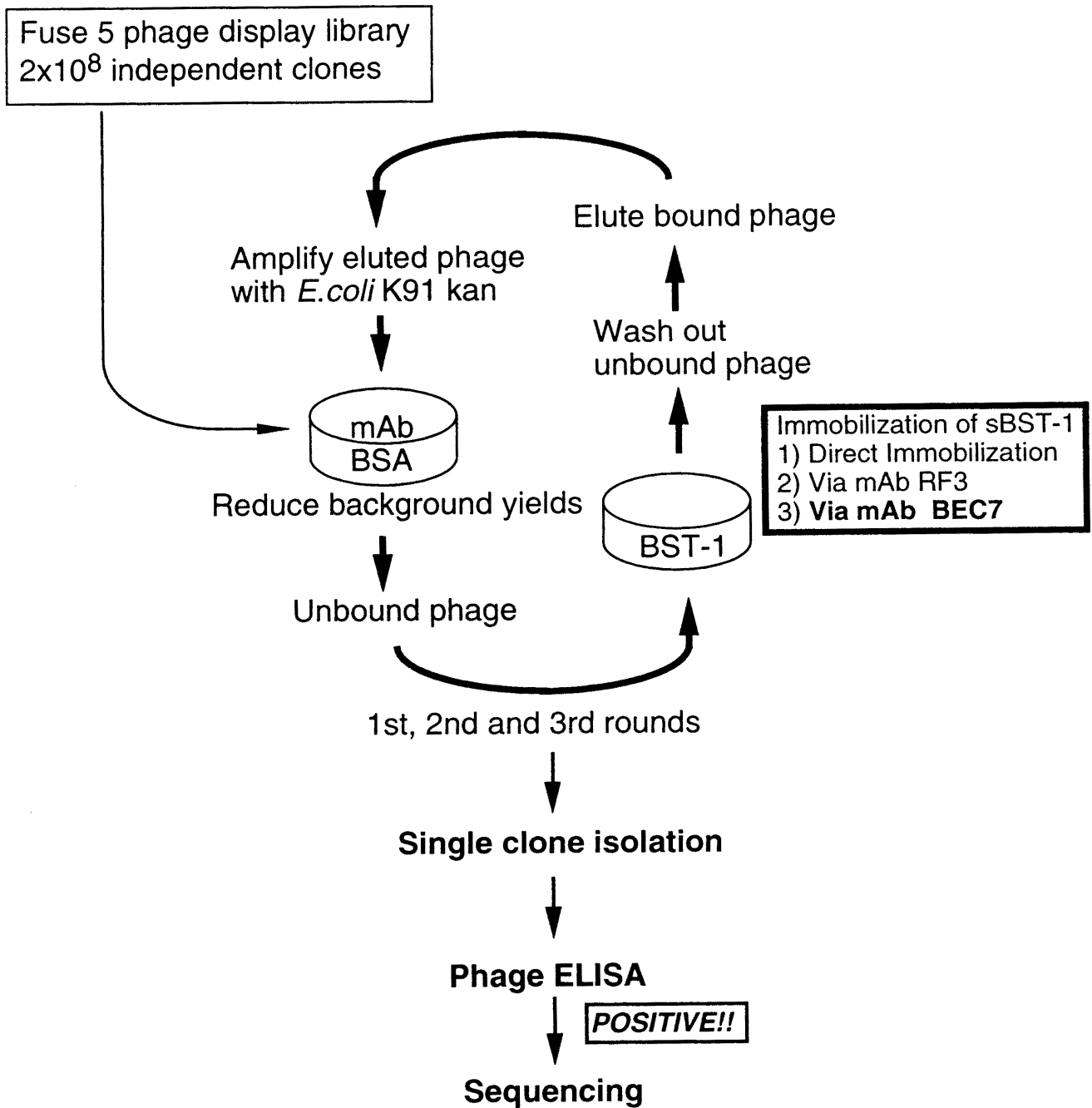


Figure 3-6 Procedure for isolating sBST-1 binding phage

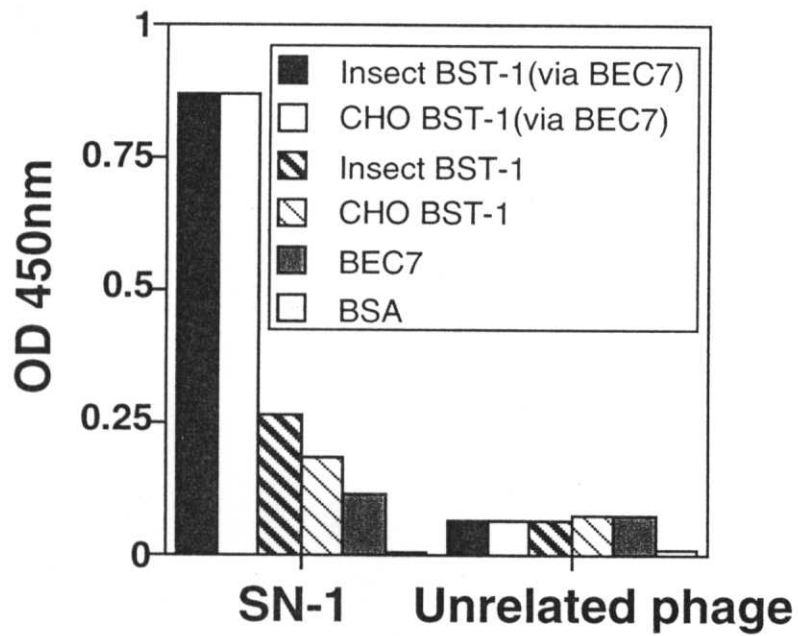


Figure 3-7 Specific binding of phage SN-1 to sBST-1

After three rounds of biopanning, supernatants of individual clones were used directly for analysis by phage ELISA. One representative clone (SN-1) that specifically binds to sBST-1 is shown. Unrelated phage does not show any reactivity with sBST-1.

Table 1 BST-1 binding sequences isolated from a phage display library

| Clone | Sequence | Frequency* |
|-------|------------------|------------|
| SN-1 | HSQISGKYQRYLKDA | 7/8 |
| SN-16 | DDVVYTNIAHKWGRRE | 1/8 |

*Number of times each sequence was independently isolated.

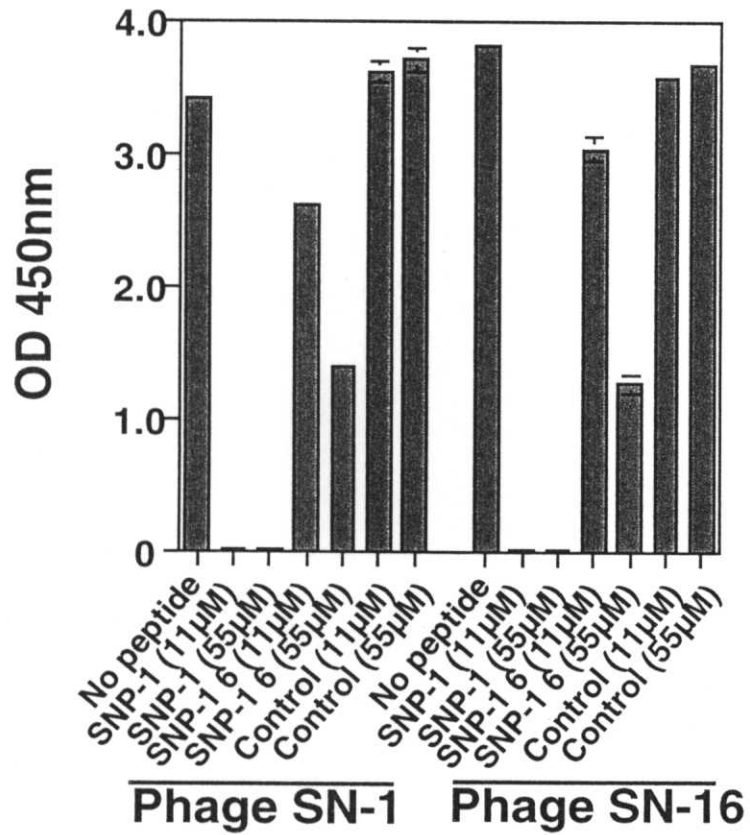


Figure 3-8 Inhibition of selected phage binding to sBST-1 by synthetic peptides, SNP-1 and SNP-16

Phage SN-1 and SN-16 were incubated in sBST-1-coated wells, with or without the indicated peptides. Absorbances at 450 nm are shown. Each of the data was calculated from 4 wells (means \pm S.D.).

のBST-1認識部位は、少なくともオーバーラップしていることが示唆された。

3-3-5 合成ペプチドによるADP-ribosyl cyclase 活性阻害

スクリーニングにより得られた配列が、BST-1のADP-ribosyl cyclase 活性を阻害することができるかを、NGD⁺を用いた蛍光法で調べた。その結果をFig. 3-9に示す。25℃において、4 μg/mlの可溶性BST-1と、300 μMのNGD⁺を反応させると、Cyclic-GDP-リボースの生成により、蛍光強度は直線的に増大した。5分後、20 μMのSNP-1をこの系に加えると、蛍光強度の増加は完全に消失し、酵素活性を完全阻害した。一方、20 μM陰性コントロールペプチド（SNP-1のN末端側からC末端側の配列を逆に合成したもの）をこの系に加えた場合には、酵素活性に全く影響を及ぼさなかった。インセット内には、10 mM DTTによって、BST-1のADP-ribosyl cyclase 活性が完全に消失する様子を示した。CD38のADP-ribosyl cyclase 活性は、還元化状態で活性が消失すると報告されており⁵⁷⁾、BST-1のADP-ribosyl cyclase 活性も同様の挙動を示した。20 μMのSNP-16を使って、同様の実験を行った場合には、活性阻害は全く見られなかった（データ省略）。

3-3-6 SNP-1のADP-ribosyl cyclase 活性阻害形式と阻害物質定数 K_i 値

ペプチドインヒビターSNP-1の活性阻害形式と、阻害物質定数 (K_i 値)を求めるために、ペプチドインヒビターの濃度 $[I]$ を変えて、NGD⁺の基質濃度と、cGDP-riboseの生成速度（蛍光強度の増大）との関係を調べた。Fig. 3-10-Aにその結果を示す。ペプチドインヒビターの濃度 $[I]$ の増大と共に、cGDP-riboseの生成速度（蛍光強度の増大）は低下した。SNP-1の活性阻害形式を求めるために、Fig. 3-10-Aの結果から、縦軸にcGDP-riboseの生成速度 V の逆数を、横軸にインヒビターの濃度 $[I]$ をプロットするDixon plotを行った。(Fig. 3-10-B)。得られた直線は平行に並び、この結果、SNP-1の活性阻害形式は、BST-1と基質NGD⁺の複合体をSNP-1が認識して阻害する不拮抗型阻害 (Uncompetitive inhibition)であった。さらに、阻害物質定数 K_i 値を求めるために、縦軸に基質濃度 $[S]$ / cGDP-riboseの生成速度 V を、横軸にインヒビターの濃度

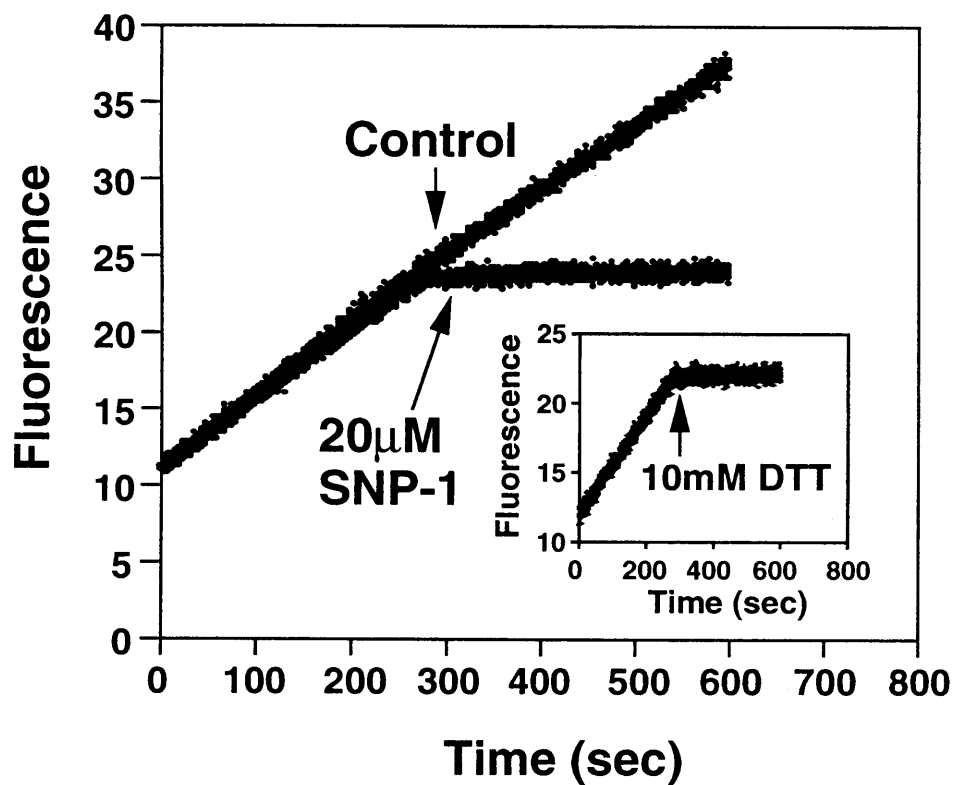


Figure 3-9 Inhibition of ADP-ribosyl cyclase activity of sBST-1 with a synthetic peptide, SNP-1

NGD⁺ (300 μM) was incubated with sBST-1 (4 μg/ml) in a buffer containing 50 mM MES (pH 6.0), 1 mM ZnCl₂ at 25 °C, and the fluorescence at 410 nm (excited at 300 nm) was monitored. After incubation for 5 min, 20 μM control or SNP-1 peptide was added. The inset shows inhibition of ADP-ribosyl cyclase by 10 mM DTT.

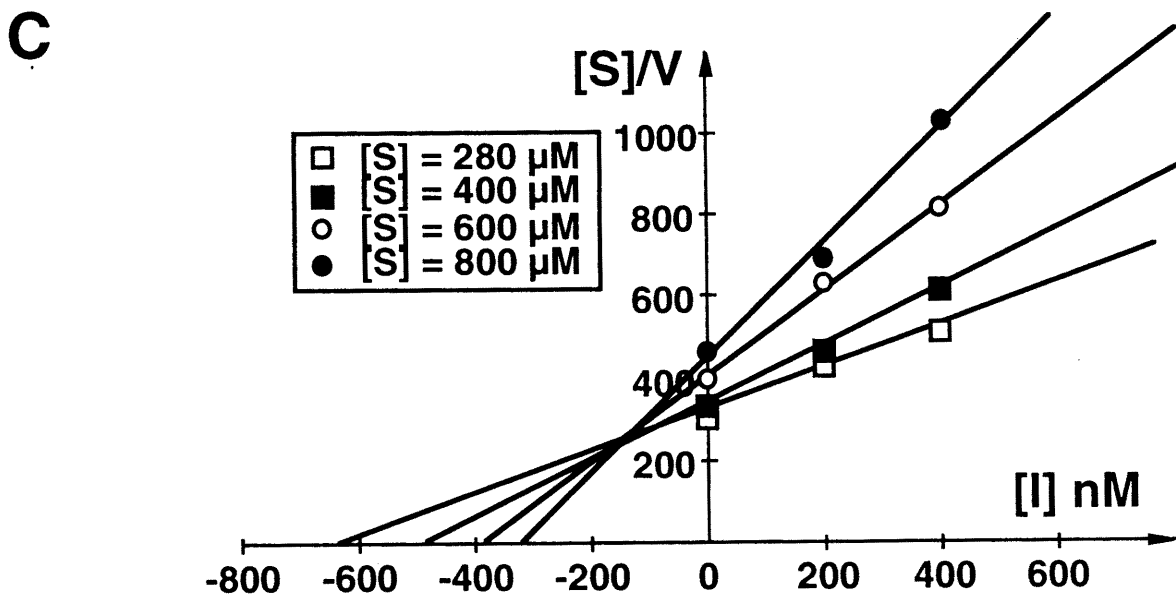
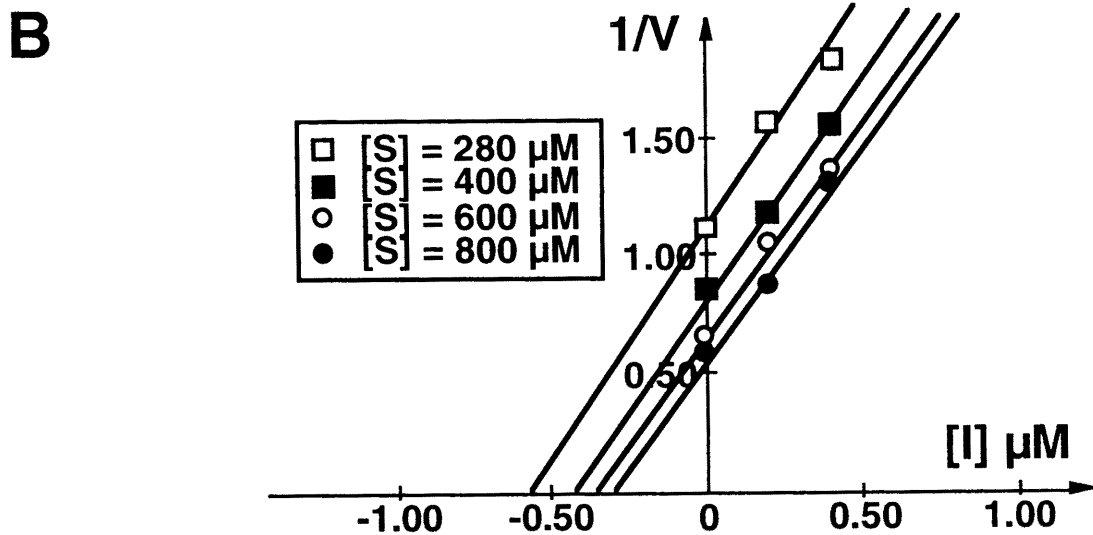
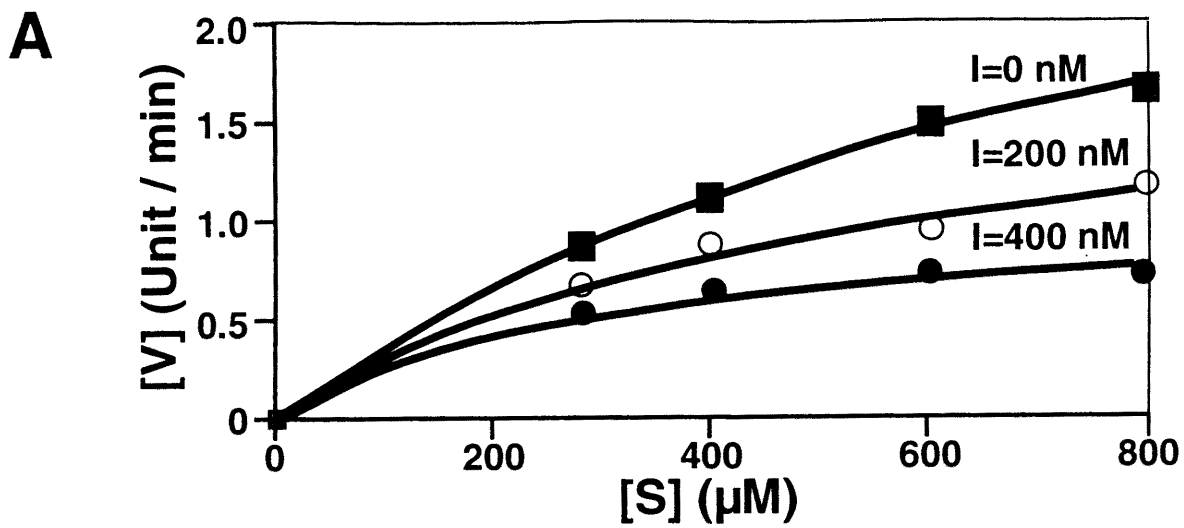


Figure 3-10 Kinetics of ADP-ribosyl cyclase activity of sBST-1 in the presence of SNP-1

(A) sBST-1 (1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was incubated for 10 min with various concentrations of NGD^+ in the presence of 200 nM or 400 nM SNP-1. The product cGDP-ribose was monitored fluorimetrically with an excitation wavelength of 300 nm and an emission wavelength of 410 nm. (B) Dixon plot of the data in (A): $1/V$ versus $[I]$ at different fixed concentrations of NGD^+ . (C) Dixon plot of the data in (A): $[S]/V$ versus $[I]$ at different concentrations of NGD^+ .

[I]をプロットした (Fig. 3-10-C)。4本の直線は、1点で交差し、このときのX軸の値が阻害物質定数 K_i 値であり、 180 ± 40 nM ($n=3$)と求められた。

3-3-7 SNP-1のcADP-ribose hydrolaseの活性阻害

SNP-1がBST-1のcADP-ribose hydrolase 活性を阻害することができるかを、cADP-riboseを基質としたHPLC法で調べた。この方法は、cADP-ribose hydrolase 活性により産生するADP-riboseと基質のcADP-riboseを陰イオン交換カラムで分離し、解析する方法である。その結果をFig. 3-11に示す。SNP-1を加えない条件では、約75%のADP-riboseが産生した。20 μ Mのコントロールペプチドを加えた場合では、ペプチドを加えない場合と同様約75%のADP-riboseが産生し、反応に影響しないことが示された。これに対して、SNP-1を0.5 μ M、2 μ M、20 μ Mと加えた場合には、濃度依存的に産生するADP-riboseの量が減少し、SNP-1がBST-1のcADP-ribose hydrolase 活性を阻害することが示された。

3-3-8 ファージSN-1、SN-16と可溶性CD38との結合

第1章で述べたように、ヒトでADP-ribosyl cyclase 活性とcADP-ribose hydrolase 活性を有している分子は、BST-1とCD38である。両分子のアミノ酸相同性は約33%であり、BST-1に存在する9カ所のシステイン残基が、CD38ですべて保存されていることから、両分子の構造が類似していると考えられる。そこで、今回得られたファージクローン SN-1、SN-16が、可溶性CD38¹²⁾と交差反応するかをPhage ELISA法で調べた。その結果をFig. 3-12-Aに示す。ファージSN-1、SN-16は、固相化した可溶性CD38とは、全く結合しなかった。

3-3-9 SNP-1のCD38 ADP-ribosyl cyclase 活性に対する活性阻害

ファージクローン SN-1、SN-16は、可溶性CD38と結合しないことがPhage ELISA法で示された。さらにこの事実を確認するために、ペプチドSNP-1が、CD38のADP-ribosyl cyclase 活性を阻害しないかを、NGD⁺を用いた蛍光法で調べた。Fig. 3-12-

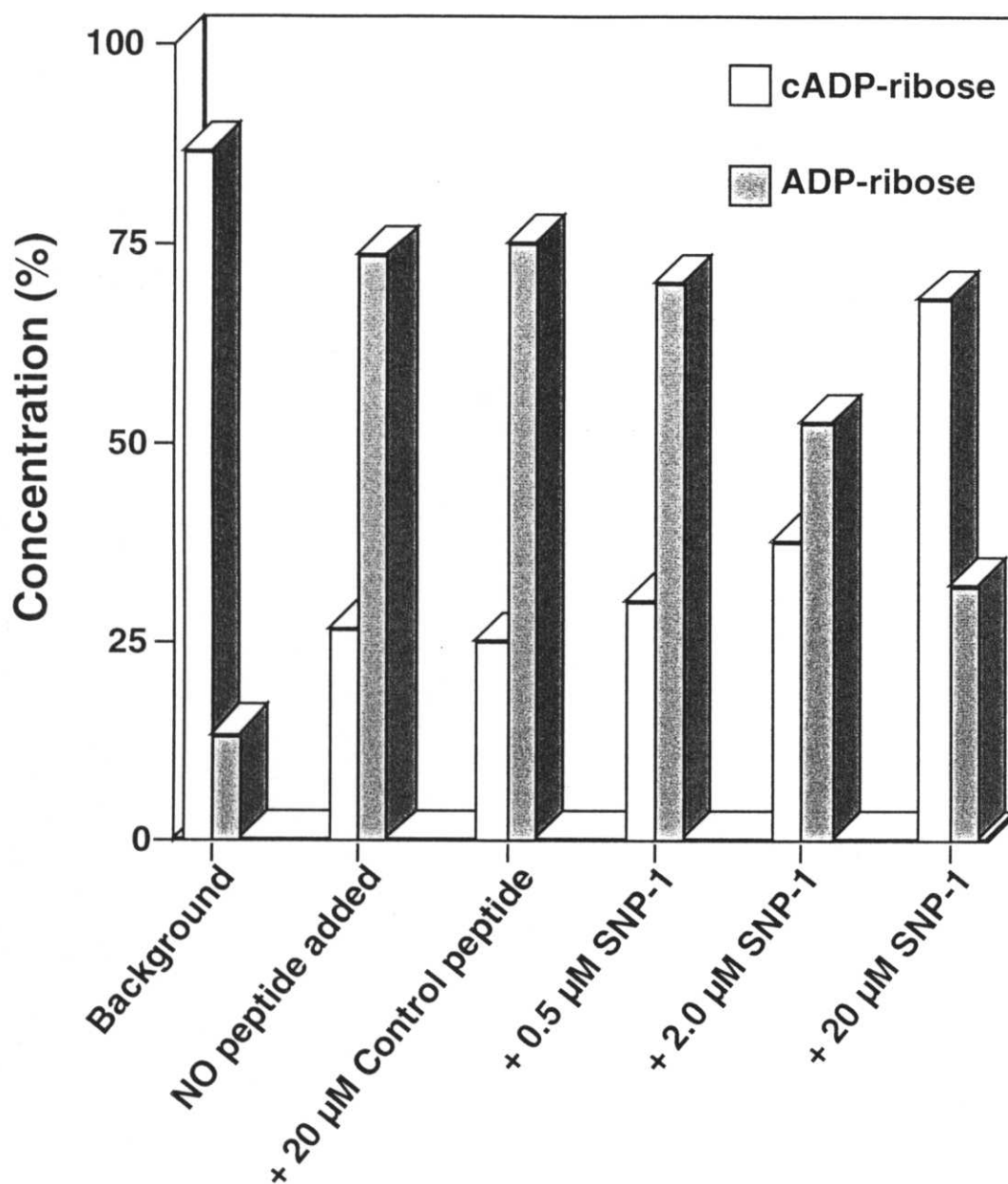


Figure 3-11 The inhibition of cADP-ribose hydrolase activity by SNP-1 sBST-1 (50 μg/ml) was incubated at 37 °C for 4 h with 20 μM cADP-ribose in the presence or absence of SNP-1. cADP-ribose and ADP-ribose were separated on an anion-exchange column. Concentrations of cADP-ribose and ADP-ribose are represented as the percentage of their peak area on HPLC (100% represents the total area of two peaks of cADP-ribose and ADP-ribose). Hydrolyzed products during the incubation of cADP-ribose only was expressed as a background yield.

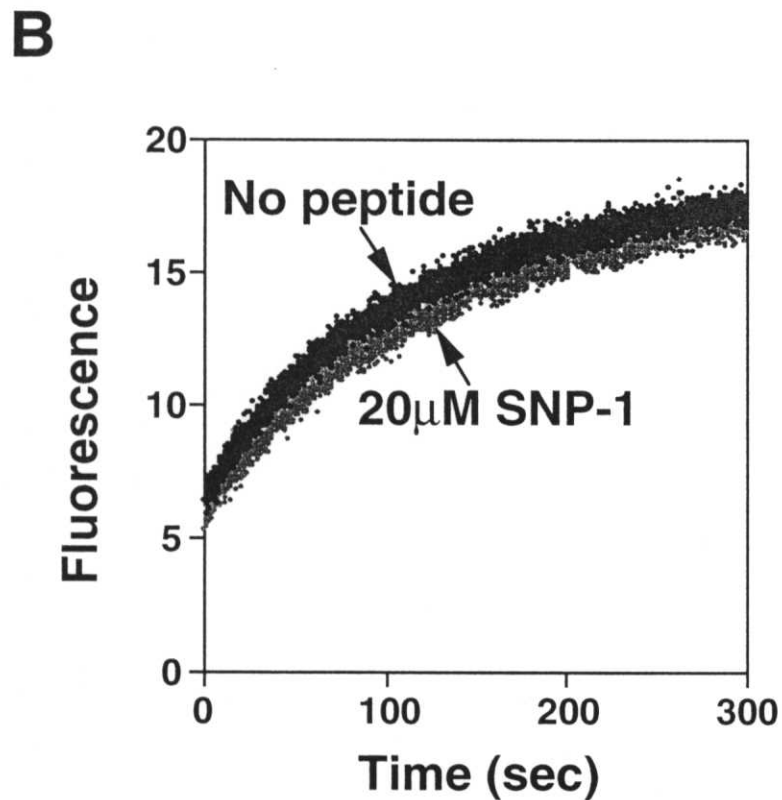
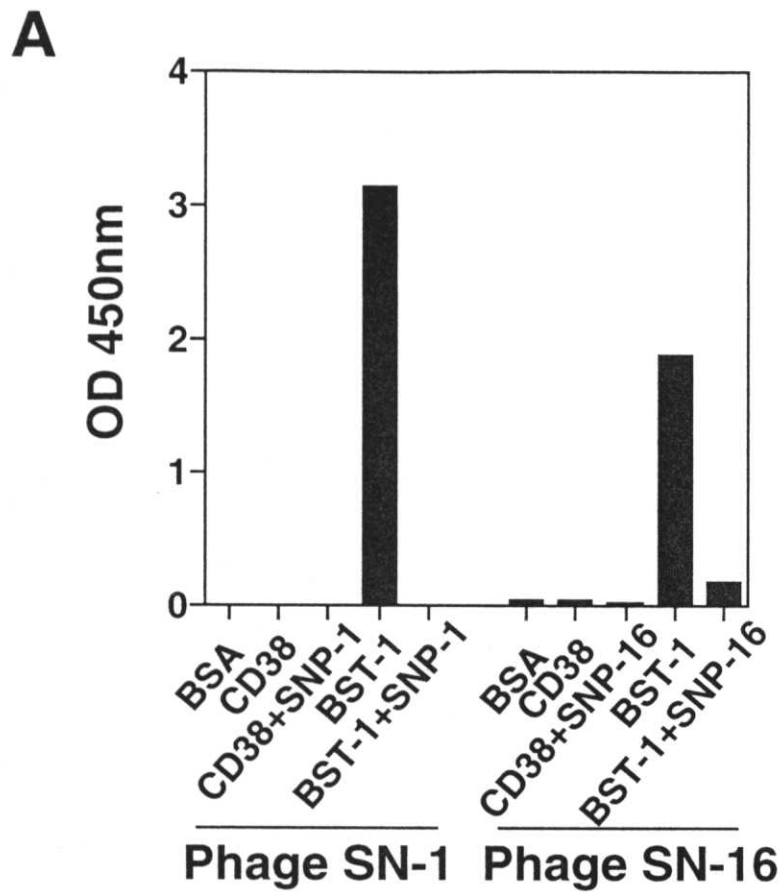


Figure 3-12 No inhibitory effect of SNP-1 on ADP-ribosyl cyclase activity of a soluble form of CD38 (sCD38) (A) The failure of phage SN-1 and SN-16 to cross-react with sCD38 is shown. As a control, phage SN-1 and SN-16 recognized immobilized sBST-1, and their bindings were inhibited by the addition of corresponding synthetic peptides. The data represent means from duplicate wells. (B) The absence of any inhibitory effect of SNP-1 on ADP-ribosyl cyclase activity of sCD38 is shown.

Bに示したように、20 μ MのSNP-1は蛍光強度の増加に影響を与えなかった。すなわち、SNP-1はCD38のADP-ribosyl cyclase活性を阻害せず、BST-1に特異的なインヒビターであることが示された。

3-4 考察

従来、cADP-riboseに関する実験は、cADP-riboseが細胞膜を通過できないことから、細胞にcADP-riboseを注入したり、細胞から分離した細胞膜画分を用いて行われてきた。あるいは、cADP-riboseの誘導體であり、アンタゴニストである8-amino-cADP-ribose⁵⁸⁾を細胞内に注入することで、その機能を明らかにしようとする試みが主なものであった。ヒトにおいては、cADP-riboseはBST-1やCD38の細胞外領域に存在するecto-enzymeによって合成され、何らかの形で細胞内に取り込まれ、細胞内のCa²⁺ストアーから、Ca²⁺を放出すると考えられる。しかしながら、細胞外領域に存在するecto-enzyme活性により合成されたcADP-riboseが、実際に細胞内のCa²⁺を放出するかという事実に関しては、残念ながら証明されていない。その一因は、ecto-enzyme活性を特異的に阻害するインヒビターが今まで見いだされていないためである。そこで、本章ではBST-1のecto-enzyme活性を阻害するインヒビターを創製するために、まずBST-1のecto-enzyme活性を有する細胞外領域を昆虫細胞で発現し、次にこの領域と結合するペプチドリガンドを、ファージライブラリーから探索しようと試みた。

cADP-riboseが細胞に入り込むメカニズムに関しては、以下に示すいくつかの説明がなされている。細胞膜にcADP-riboseのレセプターか、トランスポーターが存在しているか、GPIアンカー分子であるBST-1がそれ自身、あるいは他の分子とともにInternalizationすることが考えられる。GPIアンカー型分子のInternalizationの可能性については、例えばCD48やCD59が、細胞内に存在するG蛋白と共に免疫沈降されることから、Internalizationして分子内に存在することが推測されている⁵⁹⁾。さらに、ムスカリン性アセチルコリンレセプターは、G蛋白を介して、ADP-ribosyl cyclaseと相互作用していることが知られている⁶⁰⁾。CD38に関しては、基質であるNAD⁺あるいはリガンドをミミックするアゴニスチックな抗体によるInternalizationが報告されてい

る^{61, 62)}。このことから、CD38の酵素活性は細胞内で行われているとも考えられる。もしBST-1もCD38と同様に基質、あるいはリガンド依存性のInternalizationが起これば、BST-1の酵素阻害ペプチドであるSNP-1が、現在は未知であるBST-1のリガンドとの結合、あるいは、BST-1を介したシグナル伝達を阻害することができるかということにも興味を持たれる。

BST-1はリウマチ患者の骨髄ストローマ細胞に対するモノクローナル抗体を用いてクローン化された分子であり、リウマチとの関係が示唆される。事実、リウマチ患者の血清中には、高濃度の可溶性BST-1が高頻度に検出される¹⁵⁾。したがって、本章で得られたペプチドは、BST-1の有するecto-enzyme活性と、リウマチ病態との関係を明らかにするツールとして有用であろう。

本章では、ファージディスプレイ法を用いて、BST-1の酵素インヒビターを見いだした。この方法は、ターゲットとする分子の構造に関する情報が無くとも適用が可能であり、蛋白質-蛋白質の相互作用を調べるのに有用な方法である。得られたペプチド配列と相同性を有する蛋白質をデータベースで検索したが、該当するものは見つからなかった。SNP-1は、BST-1の有するecto-enzymeに対して特異的なインヒビターであり、他の分子(たとえばCD38)が有するADP-ribosyl cyclase 活性との差別化に有用であろう。また、同様の方法で、ファージディスプレイライブラリーから他の分子のADP-ribosyl cyclase 活性に特異的なインヒビターを単離することも可能であると考えられる。

SNP-1は、基質であるNAD⁺が存在しない状態でもBST-1に結合可能であるにもかかわらず、BST-1のecto-enzyme活性に対しては、不拮抗阻害を示した。一般に、不拮抗阻害とはインヒビターが、酵素と基質の複合体のみを認識する阻害形式であり、SNP-1が、基質の存在しない状態でもBST-1に結合可能な事実とは相反する。これに関しては、SNP-1が基質存在下でインヒビターとして働くときと、基質のない状態でBST-1に結合する場合は、BST-1に対する結合形式が異なる可能性が考えられる。あるいは、抗体BEC7を介して固相化されたBST-1の構造が、基質とBST-1の複合体の構造に似ていることも考えられる。不拮抗阻害は、複数の基質が関係する酵素反応でしばしば観察され

ることが知られており⁶³⁾、BST-1が、ADP-ribosyl cyclaseと、cADPR hydrolase 活性を有することが、SNP-1の不拮抗阻害に反映されているのかもしれない。将来的には、BST-1のADP-ribosyl cyclaseと、cADPR hydrolase活性の違いを認識できるようなインヒビターを見いだすことにより、2種類の酵素反応のメカニズムをより詳細に理解することができると期待される。

3-5 結言

ecto-enzyme活性を有するユニークなレセプター分子であるヒトBone marrow stromal cell antigen-1 (BST-1/CD157)に着目し、昆虫細胞を用いた可溶性BST-1の大量発現系、及び精製法を確立した。さらに得られた活性型の可溶性BST-1を標的にして、ランダムファージライブラリーからBST-1に結合し、かつBST-1のecto-enzyme活性を阻害するペプチドインヒビターを見いだした。このインヒビターは特異的なADP-ribosyl cyclase インヒビターの初めての報告である。このペプチドインヒビターは、ヒトでBST-1と同じecto-enzyme活性を有するCD38 とは交差反応を示さず、BST-1に特異的であった。以上より、ファージディスプレイライブラリー法は、標的分子の構造に関する情報がなくてもターゲット分子に結合するペプチドリガンドの創製が可能であり、極めて有用な技術であることが示された。

第4章 Bone marrow stromal cell antigen-1 (BST-1) のecto-ADP-ribose cyclase活性阻害ペプチドSNP-1とBST-1との結合解析

4-1 緒言

第3章では、ランダムファージディスプレイライブラリーから、Bone marrow stromal cell antigen-1 (BST-1) のecto-ADP-ribose cyclase 活性を阻害する新規ペプチドインヒビターSNP-1を単離した。このペプチドインヒビターは、さらに強力なインヒビターを設計する際のリード配列になると考えられる。そこで本章では、SNP-1とBST-1との結合をより詳細に解析することを目的とした。まず、得られたペプチドインヒビターSNP-1と、BST-1の結合解析を、表面プラズモン共鳴法 (BIAcore)²⁶⁾、Isothermal Titration Calorimetry 法^{27, 28, 64)}を用いて行った。また、結合のStoichiometryを求めるために、可溶性BST-1、ペプチドインヒビターSNP-1の溶液中の分子量を分析用超遠心機を用いた沈降平衡法²⁹⁾で決定した。さらに、結合に重要な働きをしているSNP-1上のアミノ酸残基を同定するために、全てのアミノ酸残基をアラニンに置換したペプチドを化学合成で調製し、表面プラズモン共鳴法 (BIAcore)を用いて、可溶性BST-1との結合を解析した。この解析により、インヒビターとBST-1との結合が明らかになると同時に、さらに強力なインヒビターを設計する際の基礎的知見が得られるものと期待される。

4-2 実験方法

4-2-1 可溶性BST-1の発現、および精製

昆虫細胞を用いた可溶性BST-1の発現は、3-2-4で示した方法を用いた。発現した蛋白は3-2-6で示した方法で精製した。

4-2-2 合成ペプチドの調製、及び精製

SNP-1 及び、アラニン置換ペプチドは (株) 東レリサーチセンターに依頼して合成し

た。ペプチドは、逆相クロマトグラフィーで精製し、純度95%以上であることを確認した。

4-2-3 BIAcoreによる結合解析

精製した可溶性BST-1を10 mM 酢酸バッファー(pH 5.0)に懸濁し、2000から3600 resonance unit (RU) に相等する可溶性BST-1を、アミンカップリングキット (アマシャムファルマシアバイオテック) を用いて、CM5チップ (アマシャムファルマシアバイオテック) に直接固相化した。非特異的結合を差し引くために、別のフローセルには、アミンカップリングキットによって、アミノ基をブロックしただけのセルを用意した。それぞれの実験で示されている濃度のSNP-1、あるいはアラニン置換ペプチドをMBSバッファー (20 mM MES、150 mM NaCl、3.4 mM EDTA、0.005% Tween 20) に懸濁し、40 μ l/mlの速度でチップ上に流した。結合実験は25°Cで行った。固相化した可溶性BST-1は、10 mM HClで再生して使用した。速度論の解析は、BIAcoreに付属の解析ソフトウェア-BIA evaluation 3.0の、nonlinear fit (1 : 1 binding with mass transfer)を用いた。また、平衡状態での結合の解析は、Scatchard plotを用いて行った。

4-2-4 超遠心分析法による分子量の決定

SNP-1、および可溶性BST-1の溶液中での分子量を分析用超遠心機 (Beckman XL-I) を用いた沈降平衡法により決定した。SNP-1、および可溶性BST-1は、50 mM MES (pH 6.0)、100mM NaClの溶液にそれぞれ200 μ M、10 μ Mの濃度になるよう懸濁し、Table 2 に記載された回転速度で25°C、20時間遠心し、平衡状態に達するまで沈降させた。波長280 nmの吸光度の勾配を測定し、18時間から20時間の間、吸光度のパターンに変化を生じていなかったことから、沈降平衡に達していると判断した。溶液の密度は、実際に測定した値1.008g/mlを使用した。SNP-1の偏比容は、構成アミノ酸残基の偏比容の重量平均から求めた⁶⁵⁾。可溶性BST-1の偏比容は、以下のように算出した。可溶性BST-1に糖鎖が付加されていないと仮定した場合のアミノ酸配列から算出される偏比容は、0.728 ml/gである。cDNA配列から見積もられる分子量 (30.5 kDa)と、TOF Mass スペクトラムにより求められる分子量 (33.5 kDa) の差は、糖鎖によるものと考えられる

Table 2. Molecular weight as determined by sedimentation equilibrium analysis

Constants used for the analysis are partial specific volume of 0.724 mL/g for SNP-1 and 0.718 mL/g for sBST-1; ρ (the density of the sample solution) = 1.008 g/mL. Partial specific volume of sBST-1 was calculated with the assumption of 10% glycosylation for sBST-1.

| Peptide | Rotor speed (rpm) | Molecular weight (Da) | Average |
|---------|-------------------|-----------------------|-----------------|
| SNP-1 | 40000 | 2020 | 1960 \pm 68.0 |
| | 42000 | 1820 | |
| | 50000 | 2030 | |
| sBST-1 | 8000 | 64000 | 65600 \pm 950 |
| | 12000 | 65600 | |
| | 16000 | 67300 | |

ので、可溶性BST-1には重量で約10%の糖鎖が結合しているものと考えられる。糖鎖の平均偏比容を0.630 ml/gとして計算すると⁶⁶⁾、糖鎖を考慮したときの可溶性BST-1の偏比容は以下の式から計算される。

$$(1 \times 0.63 + 9 \times 0.728) / 10 = 0.718 \text{ ml/g}$$

この値を使って、分子量の計算を行った。データは付属のソフトウェアOriginを用いて単一理想分子種モデルとして解析した。

4-2-5 等温滴定型熱量計 (Isothermal titration Calorimetry, ITC)を用いた SNP-1と可溶性BST-1の結合解析

ITCによる測定は、MicroCal社のOmega titration Calorimetryを用いてWisemanらにより述べられている方法²⁷⁾で行った。SNP-1と可溶性BST-1は、別々に20 mM MES (pH 6.0)の溶液に対して透析を行い、溶液組成を均一にした。2 mlの10 μM可溶性BST-1に対して、400 μMのSNP-1を5 μlずつ3分おきに滴定し、熱量の変化を20℃で測定した。得られた熱量の積算は付属のソフトウェアOriginにより計算し、結合モデルから理論曲線を得た。

4-3 結果

4-3-1 BIAcoreを用いたSNP-1と可溶性BST-1との結合解析

まず、NAD⁺非存在下でのSNP-1と可溶性BST-1との結合を、表面プラズモン共鳴法 (BIAcore) を用いて解析した。2000RUの可溶性BST-1を、そのアミノ基を用いてCM5チップに固相化した。400 nMから1000 nMの濃度のSNP-1を、可溶性BST-1が固相化されたチップ上に流した。その時のセンサーグラムをFig. 4-1-Aに示す。濃度依存的に結合するSNP-1の量が増加した。またこの結合の特異性を確認するために、SNP-1のC末端からN末端側に合成したコントロールペプチドを、1000 nMの濃度でチップ上に流した。このコントロールペプチドは、可溶性BST-1との結合性を示さないことから、SNP-1の結合特異性が確認された。400 nMから1000 nMの濃度において、結合は平衡に達し

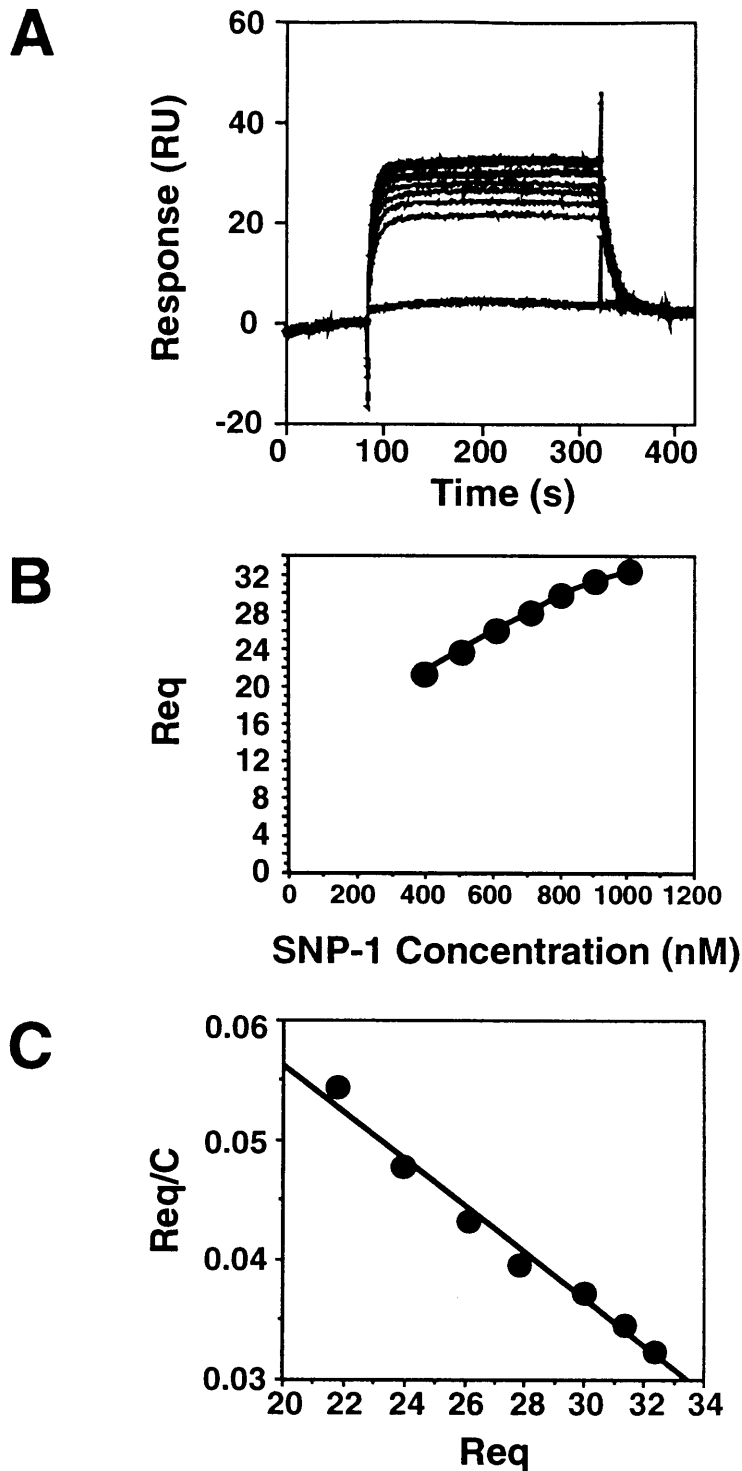


Figure 4-1 BIAcore analysis of SNP-1 binding to immobilized sBST-1

(A) Sensorgrams showing the interaction of SNP-1 with immobilized sBST-1. 2000 RU of sBST-1 was directly immobilized on the surface of sensorchip CM5. SNP-1 at concentrations ranging from 400 nM to 1000 nM (lower to upper curves: 400, 500, 600, 700, 800, 900 and 1000 nM) was injected onto the sensorchip at a flow rate of 40 μ L/min. A control peptide at 1000 nM was injected as a negative control (bottom curve). (B) Equilibrium binding data (Req versus C) obtained in A. Req: RU of SNP-1 bound at equilibrium, C: concentrations of SNP-1 injected. (C) Scatchard plot analysis of data in (B). The equilibrium dissociation constant (K_d) was calculated from the slopes of the fitted line ($K_d = 500 \pm 35$ nM).

ていたため、各濃度を横軸に、特異的結合量を縦軸にプロットした結合曲線を示した (Fig. 4-1-B)。さらにこの結合曲線から、Scatchard plotを用いて平衡乖離定数 K_d 値を算出した (Fig. 4-1-C)。Scatchard plotは、直線性を示し、その傾きから平衡乖離定数 $K_d=500\pm 35$ nM ($n=3$)と求められた。次に付属の解析ソフトウェア—BIA evaluation 3.0を用いて、結合速度定数(k_{on})、乖離速度定数(k_{off})を求め、その値から乖離定数 K_d 値を算出した。その結果をTable 3 に示す。NAD⁺非存在下では、結合速度定数(k_{on})は $1.4\pm 0.3\times 10^5$ ($M^{-1}s^{-1}$)、乖離速度定数(k_{off})は 0.073 ± 0.015 (s^{-1})と求められた。 k_{on} と k_{off} から算出される K_d 値は、 520 ± 20 nMであり、Scatchard plotから算出された平衡乖離定数 $K_d=500\pm 35$ nMとよく一致した。

次に、1 mM NAD⁺存在下でのSNP-1と可溶性BST-1との結合を測定した。NAD⁺存在下では、結合速度定数(k_{on})は 1.4×10^5 ($M^{-1}s^{-1}$)、乖離速度定数(k_{off})は 0.091 (s^{-1})と求められた。 k_{on} と k_{off} から算出される K_d 値は650 nMであり、この値はScatchard plotから算出された平衡乖離定数 $K_d=350$ nMとほぼ一致していた。さらに、この結果はNAD⁺非存在下でのSNP-1と可溶性BST-1との結合とほぼ同等であり、表面プラズモン共鳴法 (BIAcore) を用いて解析した場合には、NAD⁺の存在による結合の違いは認められなかった。

4-3-2 BIAcoreを用いたアラニン残基置換ペプチドと可溶性BST-1との結合解析
結合に重要な働きをしているSNP-1上のアミノ酸残基を同定するために、全てのアミノ酸残基をアラニンに変換したペプチドを用意し、可溶性BST-1との結合をBIAcoreを用いて調べた。2800 RUの可溶性BST-1を、アミンカップリングキット (アマシャムファルマシアバイオテック) を用いて、CM5チップ (アマシャムファルマシアバイオテック) に直接固相化した。4-2-1で、SNP-1と可溶性BST-1との結合の平衡乖離定数 $K_d=500\pm 35$ nM と求められたため、各アラニン変換ペプチドの濃度をその乖離定数と同じ濃度である500 nMにして、チップ上に流した。その時のセンサーグラム (Fig. 4-2-A) と、結合量 (Fig. 4-2-B)を示す。アミノ酸残基#1、#3、#6、#13、#14をアラニンに置換したペプチド(以下、アラニン残基に変換したアミノ酸残基の番号でペプチド

Table 3 Kinetic rate constants of various SNP-1 derivatives binding to BST-1

ND refers to values that could not accurately be determined because both association and dissociation constants are very rapid. Eq, equilibrium.

| | k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$) | k_{off} (s^{-1}) | K_d (nM) Off/On | K_d (nM) Eq |
|--|------------------------------|------------------------|----------------------|------------------|
| SNP-1(-NAD ⁺) | $1.4 \pm 0.3 \times 10^5$ | 0.073 ± 0.015 | 520 ± 20 | 500 ± 35 |
| SNP-1(+NAD ⁺) ^a | 1.4×10^5 | 0.091 | 650 | 350 |
| <u>Ala scan peptides^a</u> | | | | |
| #1 | ND | ND | ND | 2020 |
| #3 | 1.6×10^5 | 0.066 | 410 | 450 |
| #6 | 9.4×10^4 | 0.056 | 600 | 740 |
| #13 | 1.3×10^5 | 0.060 | 460 | 530 |
| #14 | 3.0×10^5 | 0.18 | 600 | 560 |

^a Representative data obtained in two independent experiments are shown.

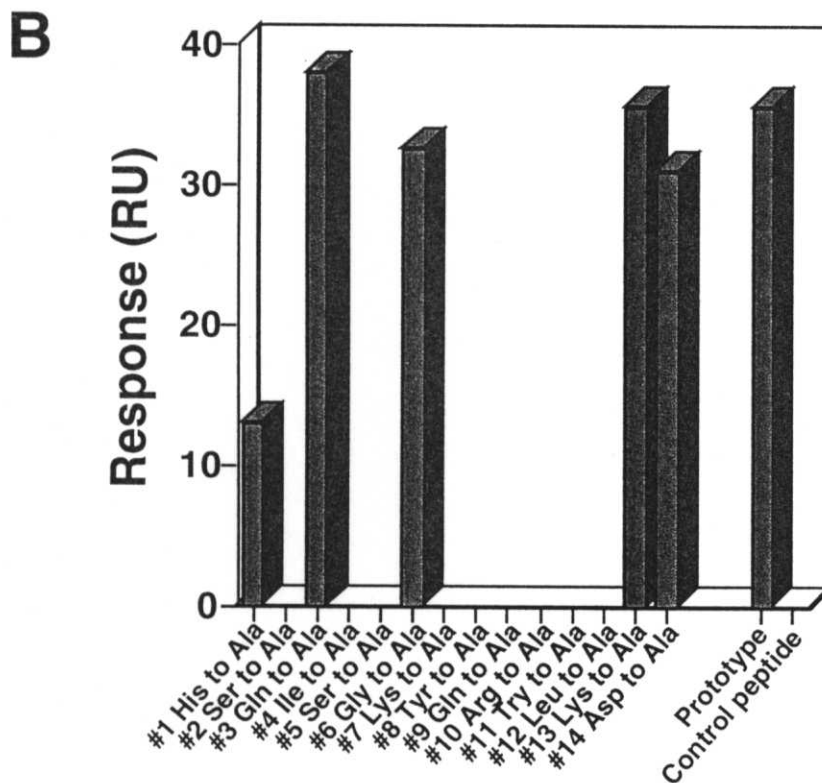
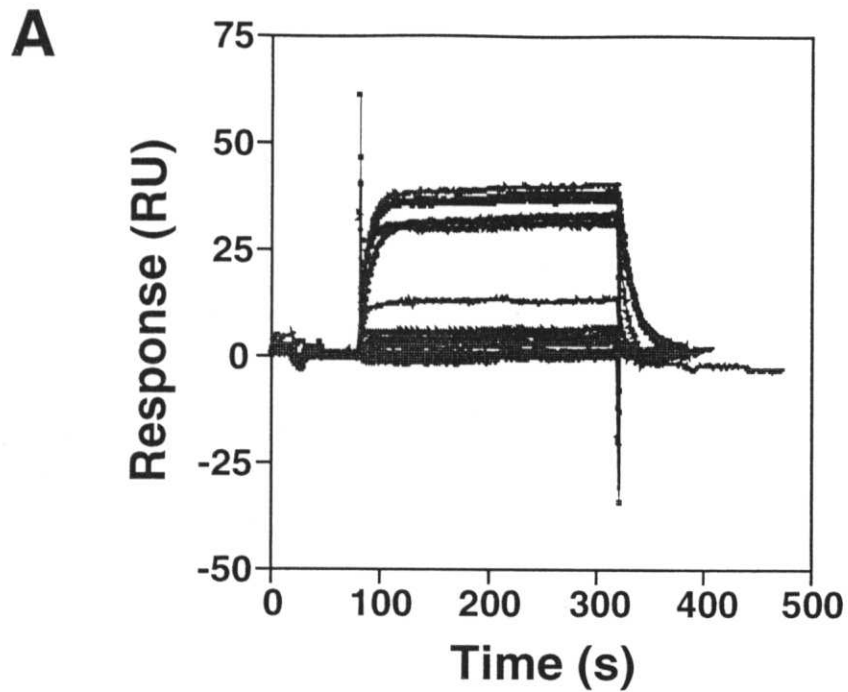


Figure 4-2 Comparative analysis of alanine-substituted SNP-1 binding to immobilized sBST-1 in BIAcore 2800 RU of sBST-1 was directly immobilized on the surface of sensorchip CM5. Alanine replacement peptides at the concentrations of 500 nM were injected onto the sensorchip at a flow rate of 40 μ L/min. (A) Sensorgrams showing the interaction of alanine-substituted SNP-1 with immobilized sBST-1 (lower to upper curve: #1 His \rightarrow Ala, #6 Gly \rightarrow Ala, #14 Asp \rightarrow Ala, #13 Lys \rightarrow Ala, prototype SNP-1 and #3 Gln \rightarrow Ala). The other curves were considered as being not detectable at a concentration of 500 nM in BIAcore. (B) Binding capacities of alanine-substituted SNP-1. The replacement of #1 His, #3 Gln, #6 Gly, #13 Lys and #14 Asp with Ala showed binding capacities to immobilized sBST-1 at the concentration of 500 nM.

を表す) 以外は検出限界以下であった。この結果から、アミノ酸残基#2、#4、#5、及び#7から#12までの部位が結合に重要な部位と考えられた。結合が得られたペプチドに関しては、結合平衡から乖離定数 K_d を求めた。Fig.4-2-Cの左パネルには、各濃度に対する結合量を、右パネルにはScatchard plotを示した。ペプチド#1、#3、#6、#13、#14の乖離定数 K_d は、それぞれ2020 nM、450 nM、740 nM、530 nM、560 nMと算出された。N末端側のヒスチジン残基をアラニン残基に置換した場合は、結合親和性が約1/4に低下したが、他の残基をアラニン残基に置換した場合は、SNP-1とほぼ同等の結合を示した。次に付属の解析ソフトウェア-BIA evaluation 3.0を用いて、結合速度定数(k_{on})、乖離速度定数(k_{off})を求め、その値から乖離定数 K_d 値を算出した。その結果をTable 3 に示す。ペプチド#1に関しては、結合速度定数(k_{on})、乖離速度定数(k_{off})とも非常に速い反応であり、算出不能であったが、他のペプチドに関しては、 k_{on} と k_{off} から算出される K_d 値は、Scatchard plotから算出された平衡乖離定数 K_d とほぼ一致した結果が得られた。

4-3-3 超遠心分析法による分子量の決定

分析用超遠心機 (Beckman XL-I) を用いて、溶液中のSNP-1、可溶性 BST-1の分子量を求めた。Table 2 に示した3種類の異なるローター速度で測定を行い、分子量は吸光度勾配を単一理想分子種として分析することにより計算した (Fig. 4-3)。沈降平衡法から得られたSNP-1の分子量は 1960 ± 68.0 であり、可溶性 BST-1の分子量は 65600 ± 950 であった。アミノ酸配列から求められるSNP-1の推定分子量は1800であり、TOF MASSスペクトラムから得られた可溶性 BST-1の分子量は、約33500であった (データ省略)。この結果から溶液中では、SNP-1はMonomer、可溶性 BST-1はDimerで存在していると考えられる。

4-3-4 等温滴定型熱量計 (Isothermal titration Calorimetry, ITC)を用いた SNP-1と可溶性BST-1の結合解析

溶液中でのSNP-1と可溶性BST-1との乖離定数 K_d と、Stoichiometryを求めるためにカロリメトリーによる測定を行った。SNP-1を可溶性BST-1に滴定した場合には、

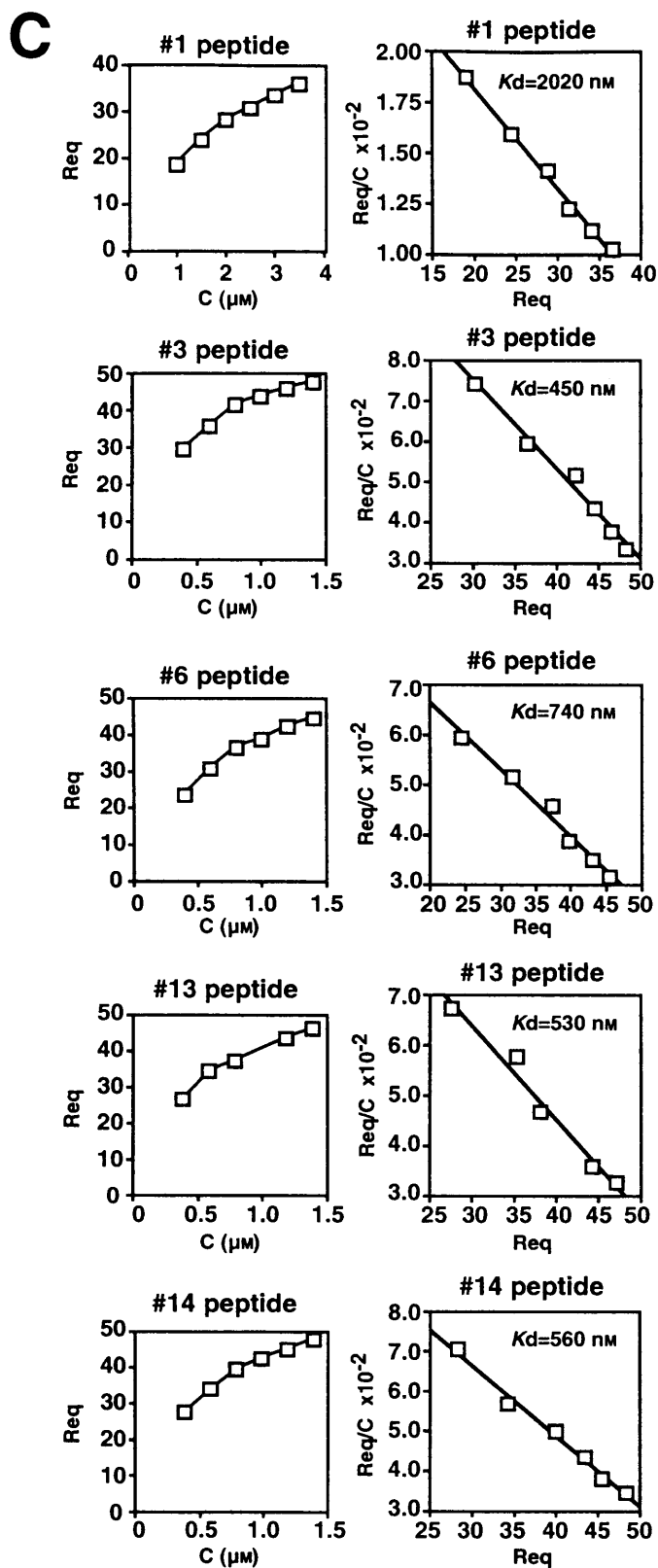


Figure 4-2 Comparative analysis of alanine-substituted SNP-1 binding to immobilized sBST-1 in BIAcore (C) Equilibrium binding and Scatchard plots of alanine-substituted SNP-1. Equilibrium binding data (left panel) and Scatchard plot analyses (right panel) are shown. 2800 RU of sBST-1 was directly immobilized on the surface of sensorchip CM5. Various concentrations of alanine-substituted peptides (1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 and 3.5 μ M of #1 His \rightarrow Ala peptide; 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 and 1.4 μ M of #3 Gln \rightarrow Ala, #6 Gly \rightarrow Ala and #14 Asp \rightarrow Ala peptides; 0.4, 0.6, 0.8, 1.2 and 1.4 μ M of #13 Lys \rightarrow Ala peptide) were injected onto the sensorchip at a flow rate of 40 μ L/min. K_d values were calculated from the slopes of the fitted line.

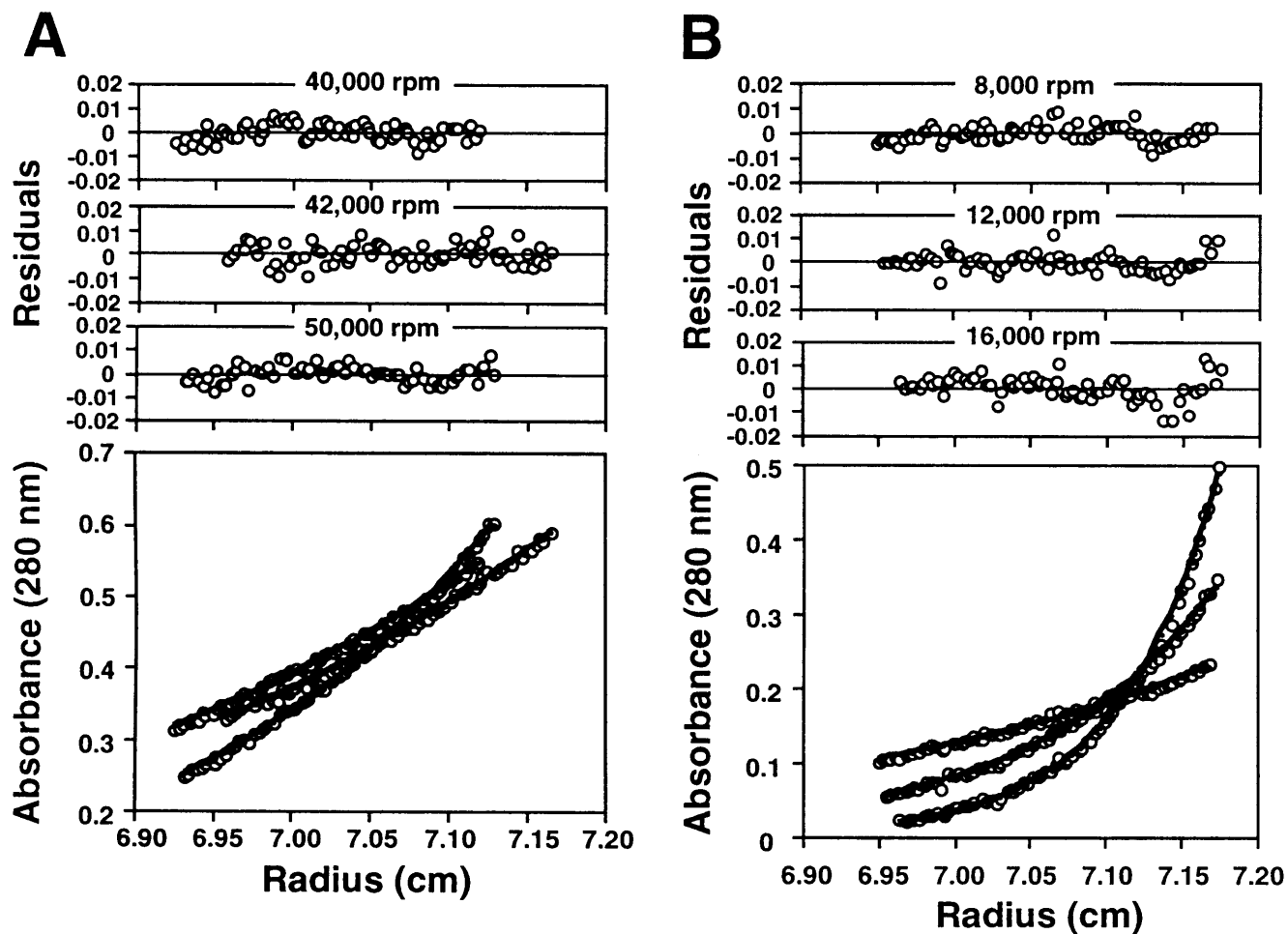


Figure 4-3 Sedimentation equilibrium analysis of SNP-1 alone and sBST-1 alone
 Measurements were made using 200 μ M SNP-1 (A) or 10 μ M sBST-1 (B) in 50 mM MES (pH 6.0) and 100 mM NaCl at 25 $^{\circ}$ C. The data fit well to an ideal single-species model.

発熱反応が得られた (Fig. 4-4上)。SNP-1をインジェクションした時に発生する熱量を積算し、付属のソフトでフィッティングを行うと理想曲線が得られる (Fig. 4-4下)。この理想曲線から得られる乖離定数 $K_d=210$ nM、結合エンタルピー変化 $\Delta H=-18$ kcal / mol、Stoichiometry $N=0.8$ molSNP-1 / mol 可溶性BST-1であった。可溶性BST-1は、溶液中でDimerを形成することから (4-3-3 参照)、溶液中では、SNP-1と可溶性BST-1は2 : 2で結合すると考えられる。

4-4 考察

ランダムファージディスプレイライブラリーから得られたBST-1のADP-ribosyl cyclase活性阻害ペプチドであるSNP-1は、新規のADP-ribosyl cyclaseインヒビターである。BST-1とSNP-1の結合状態を詳細に検討することは、さらに強力なインヒビターを創製する際の知見になるばかりでなく、BST-1のecto-enzyme活性を理解する上でも重要であると考えられる。

BST-1とSNP-1の結合を検討するために、始めに表面プラズモン共鳴法 (BIAcore) を用いた解析を行った。BIAcoreの特徴は、蛋白質-蛋白質の相互作用を微量でしかもラベルすることなく、リアルタイムに観察できることである⁶⁷⁾。BIAcoreを用いて正しい速度論的解析を行うためには、センサーチップに固相化した可溶性BST-1が結合能を有していることと、再生に用いる10 mM HClで、可溶性BST-1が失活しないことが必要である。Fig. 4-1-Aに示したように、可溶性BST-1はCM5チップに固相化しても、SNP-1との結合能を有していた。さらに、10 mM HClで再生を行っても、再現性あるデータが得られ、可溶性BST-1は再生洗浄プロセスを繰り返しても、安定であると考えられた。以上より、表面プラズモン共鳴法 (BIAcore)は、可溶性BST-1とSNP-1の結合を解析するのに有効な手法であると考えられる。SNP-1のC末端からN末端側に合成した陰性コントロールペプチドをインジェクションした場合は、固相化BST-1との結合が観察されなかったことから、BIAcoreを用いてBST-1とSNP-1の特異的な結合が観察されていると考えられる。さらに、結合速度定数(k_{on})、乖離速度定数(k_{off})から算出された乖離定数 K_d 値は、結合平衡であるScatchard plotから算出された平衡乖離定数 K_d とほぼ一致した

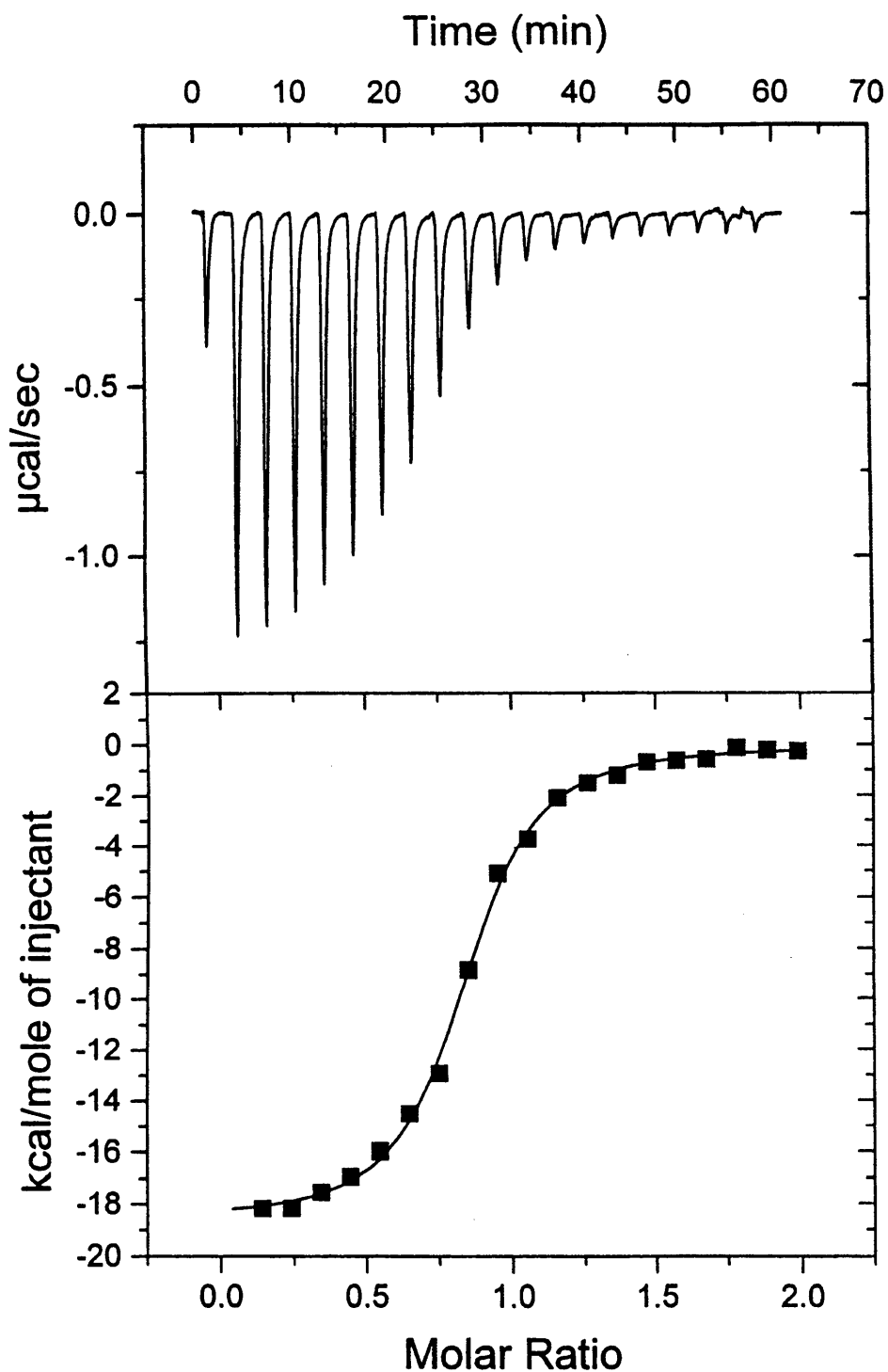


Figure 4-4 Calorimetric titration of SNP-1 with sBST-1

The top panel shows the raw heat signal for 20 injections of 5 μL aliquots of 400 μM SNP-1 into the sample cell containing 2.0 mL of 10 μM sBST-1 at 20 $^{\circ}\text{C}$. The signal in calories/s for each injection was integrated and then the heat of dilution for the titration of SNP-1 into buffer without sBST-1 was subtracted from the y-axis value of each point of the curve (the lower panel).

結果が得られたことから、正しい速度論的解析が得られていると考えられる⁶⁸⁾。また BIAcoreで得られた乖離定数 $K_d=500\pm 35$ nMは、Isothermal titration Calorimetryを用いて解析した溶液中の乖離定数 $K_d=210$ nMともほぼ一致していた。

BST-1のADP-ribosyl cyclase活性は、 NAD^+ を基質としてcADPリボースを合成する。インヒビターであるSNP-1はこの反応を阻害するので、 NAD^+ 存在下と非存在下では可溶性BST-1に結合する形式が異なる可能性が考えられた。しかし、BIAcoreを用いた解析では、1 mM NAD^+ の存在にかかわらず、結合速度定数(k_{on})、乖離速度定数(k_{off})、乖離定数 K_d はほぼ一致した結果が得られ、違いは見いだされなかった。

アラニンスキャンニングの結果から、SNP-1のアミノ酸残基#2、#4、#5、及び#7から#12までの領域が結合に重要な部位と同定された。さらに、アミノ酸残基#1をヒスチジンからアラニンに変換すると、乖離定数 K_d の値が500 nMから2020 nMに上昇し、結合親和性が約1/4となったことから、N末端側も結合に関与していると示唆される。

分析用超遠心機を用いた解析では、溶液中ではSNP-1はMonomer、可溶性BST-1はDimerで存在していることが示された。可溶性BST-1がDimerを形成する結果は、ゲルろ過法や、光散乱法で得られた結果と一致した(データ省略)。AplysiaのADP-ribosyl cyclaseは、BST-1とアミノ酸レベルで約30%の相同性を示し、10カ所存在するシステイン残基がすべて保存されていることから⁶⁹⁾、両者の構造は類似していることが示唆される。最近、X線構造解析の結果から、AplysiaのADP-ribosyl cyclaseはDimerを形成していることが明らかとなった⁶⁹⁾。従って、可溶性BST-1が溶液中でDimerを形成しているという事実は、AplysiaのADP-ribosyl cyclaseとBST-1の構造が類似しているということを支持する結果であろう。BST-1のdimerizationと、酵素活性との関係にも興味を持たれる。

4-5 結言

SNP-1と可溶性BST-1との結合を、表面プラズモン共鳴法(BIAcore)、等温滴定型熱量計(Isothermal titration Calorimetry)を用いて解析した。表面プラズモン共鳴法(BIAcore)では、乖離定数 $K_d=500\pm 35$ nM、Isothermal titration Calorimetryで

は、乖離定数 $K_d=210$ nMと算出された。アラニンスキャンニング法を用いた解析では、SNP-1のアミノ酸残基#2、#4、#5、及び#7から#12までの領域が結合に重要な部位と同定された。超遠心分析法を用いた解析では、可溶性BST-1は溶液中でDimerを形成することが明らかとなった。以上の知見は、さらに強力なインヒビターを創製する際の知見になるばかりでなく、BST-1のecto-enzyme 活性を理解する上でも重要であると考えられる。

第5章 フェージライブラリー法を用いたリガンド分子に結合し、そのレセプター分子をミミックするペプチドの同定

5-1 緒言

第3章では、フェージランダムペプチドライブラリーから、レセプター分子に結合し、そのecto-enzyme活性を阻害するペプチドインヒビターの同定を行った。このように、フェージライブラリー法をレセプター分子^{70, 71)}や、糖鎖^{72, 73)}、接着分子^{74, 75)}、抗体^{76, 77, 78, 79)}に適用した報告は数多くあるが、リガンド分子に適用した例は少ない。そこで、本章ではターゲット分子として、リガンド分子に焦点を絞って、フェージライブラリー法を適用した。すなわち、フェージライブラリー法をリガンド分子に適用することによって、レセプター分子をミミックするようなペプチドの同定が可能であるか検証することを目的とした。この方法は、レセプターとリガンド分子の相互作用の解析に役立つと同時に、レセプターの低分子化に応用可能である。さらに、得られる配列は、レセプター分子のアンタゴニストになり得ると考えられる。リガンド分子としては、スーパー抗原であり、トキシンショック症候群、急性全身性感染症の主要毒素である Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1)^{80, 81)}に注目した。スーパー抗原とは、従来の抗原とは異なり、抗原提示細胞内におけるプロセッシングを経ることなく、抗原提示細胞上のレセプター分子である主要組織適合性抗原クラスII 蛋白 (以下 MHC クラスII) に結合する^{30, 31)}。このMHC クラスIIとの複合体は、T細胞上に存在するT細胞レセプターのリガンドとして機能し、T細胞を異常に活性化するいわゆるトキシンショック症候群を引き起こす³²⁾。従って、リガンドであるTSST-1と、レセプターであるMHC クラスIIの結合を阻害するペプチドが得られれば、T細胞の活性化を抑えることができ、トキシンショック症候群の治療薬として応用可能である。

5-2 実験方法

5-2-1 Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) の精製

TSST-1の精製は、五十嵐らによって報告されている方法⁸²⁾を用いて行った。臨床での分離株である黄色ブドウ球菌 FRI1169株を、NZアミン/イースト抽出液培地 (4% NZアミン、0.5% イーストエクストラクト、10 mg/L ニコチン酸、0.5 mg/L チアミン塩酸、NaOHでpH6.8に調製) で、30℃、48時間培養した。培養液を遠心分離して、TSST-1を含む培地上清を蒸留水で5倍に希釈した。塩酸でpH5.0に調製し、あらかじめ10 mMリン酸-クエン酸 バッファー(pH5.0)で平衡化した陽イオンカラムSP-セファデックスC25 (アマシャムファルマシアバイオテク社) にバッチ法で吸着させた。10 mMリン酸-クエン酸 バッファー(pH5.0)で担体を洗浄後、20 mMリン酸バッファー(pH8.0)でTSST-1を溶出した。次に、透析によりTSST-1を含む溶液を20 mMエタノール-アミンバッファー (pH9.4) に交換し、アマシャムファルマシアバイオテク社のクロマトフォーカシング (PBE94)で精製した。得られたTSST-1はSDS-PAGE上で単一バンドとして確認され、純度は95%以上と考えられる (Fig. 5-1)。精製したTSST-1は、ウサギに接種するとトキシンショックを引き起こすことを確認した (データ略)。

5-2-2 フェージランダムペプチドライブラリー

第3章 3-2-7で作製した15merのフェージランダムペプチドライブラリーを使用した。

5-2-3 TSST-1結合フェージのスクリーニング

スクリーニング方法は、第3章3-2-8に記載の方法に準じて行った。まず、精製TSST-1をPBS溶液に5 µg/mlの濃度に溶解し、直径35 mmのポリスチレンシャーレ (ファルコン社製) に2 ml入れて、4℃一晩放置して物理的吸着で固相化した。PBS溶液で1回洗浄後、ブロッキング剤 (50 mM Tris-HCl pH 8.0、150 mM NaCl、0.5% BSA)で室温1時間ブロッキングした。非特異的に結合するフェージを除去するために、まずライブラリー(10¹²バイロン) を400 µlの希釈バッファー [TBS (50 mM Tris-HCl pH 8.0、150 mM NaCl)、0.5% Tween20]に懸濁し、ブロッキング剤でブロッキングしたシャーレの中で室温1時間反応させた。この操作で結合しなかったフェージをTSST-1が固相化されたシャーレに移し、室温で1時間反応させた。その後、洗浄液 [TBS (50

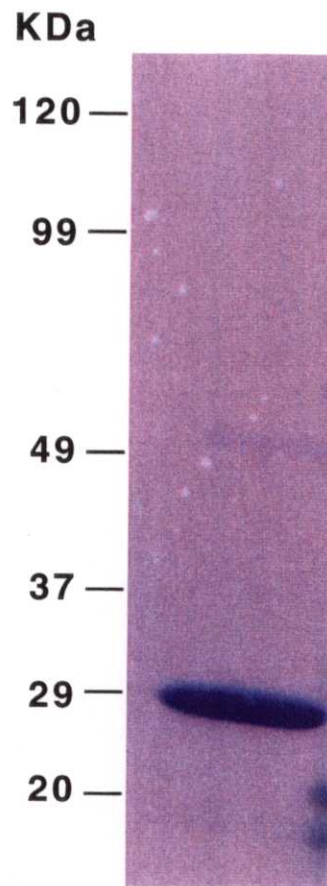


Figure 5-1 Analysis of purified TSST-1 by SDS-PAGE
Purified TSST-1 (5 μg) was subjected to SDS-PAGE (4-20%) under reducing conditions. Coomassie Brilliant Blue staining is shown.

mM Tris-HCl pH 8.0、150 mM NaCl)、0.5% Tween20]で10回洗浄し、3-2-8記載の方法で結合したファージを溶出した。この操作を3回繰り返して、濃縮してくるファージを選択した。

5-2-4 Phage ELISA

Phage ELISAは3-2-9記載の方法に準じて行った。変更点は、TSST-1、他のエンテロトキシンやサイトカインは、1 µg/mlの濃度で直接マイクロプレートのウエルに固相化したことと、バッファーは、10 mMリン酸バッファー (pH 7.0) の代わりにPBSを使用したことである。合成ペプチドを用いたファージクローンとTSST-1の結合阻害実験では、記載した濃度のペプチドを、ファージとTSST-1とを結合させる際に加えて反応させた。得られたファージの塩基配列の決定は、3-2-9記載の方法で行った。

5-2-5 ペプチド合成 (Pep 3)

塩基配列を決定した12クローンのうち、最も高頻度で得られた配列 (ファージ3) を基にして、化学合成でペプチドを調製した (サワディーテクノロジー社に依頼)。得られた15アミノ酸の配列の前後に、スペーサーとしてファージミドベクター由来の2アミノ酸残基 (グリシンとアラニン) を付加した19アミノ酸の合成ペプチドを調製した (Pep 3と命名)。その配列は以下の式で示される。

NH₂-GADRSYLSFIHLYPELAGA-COOH

得られたペプチドは逆相液体クロマトグラフィーで精製し、95%以上の純度であることを確認した。なおコントロールペプチドとしては、C型肝炎ウイルスのコア蛋白質のN末端側24アミノ酸のペプチドを用いた⁸³⁾。

5-2-6 Daudi 細胞からのMHCクラスII分子 (HLA antigen DR7)の部分精製

Daudi 細胞からのMHCクラスII分子 (HLA antigen DR7)の部分精製は、Kaufmanらが報告している方法⁸⁴⁾を参考にして行った。培養したDaudi 細胞をPBSで洗浄後、溶解バッファー (20 mM Tris-HCl pH 8.0、0.1 mM PMSF)に懸濁した。細胞は凍結、融解

を2回繰り返すことにより破壊し、4,000g、5分間遠心した。上清画分を、55,000g、1時間遠心してMHCクラスII分子を含む膜画分を沈殿させた。沈殿したペレットを、1% Triton X-100を含む20 mM Tris-HCl pH 8.0、0.1 mM PMSFに懸濁して、氷上、30分間で可溶化した。その後、非可溶性画分を遠心で沈殿し(330,000g、30分間)、MHCクラスII分子を含む可溶性画分を得た。可溶性画分を、0.1% Triton X-100を含む20 mM Tris-HCl pH 8.0、0.1 mM PMSFで平衡化したDEAE-toyopearl 650 M カラム(東ソー社製)にかけ、MHCクラスII分子を吸着させた。0.1% デオキシコール酸ナトリウム塩を含む20 mM Tris-HCl pH 8.0、20 mM NaCl、0.1 mM PMSFで洗浄した後、0.1% デオキシコール酸ナトリウム塩を含む20 mM Tris-HCl pH 7.0、200 mM NaCl、0.1 mM PMSFで溶出した。その後、溶出画分を0.1% デオキシコール酸ナトリウム塩を含む20 mM Tris-HCl pH 7.0、200 mM NaCl、0.1 mM PMSFで平衡化したConcanavalin A (Con A) カラム(アマシャムファルマシアバイオテク社)で精製した。溶出は、1M メチルー α -D-マンノピラノシドを含む0.1% デオキシコール酸ナトリウム塩、20 mM Tris-HCl pH 7.0、200 mM NaCl、0.1 mM PMSFで行った。さらに溶出画分は、0.1% デオキシコール酸ナトリウム塩を含む20 mM Tris-HCl pH 8.0、0.1 mM PMSFに透析した。部分精製したMHCクラスII分子は、抗MHCクラスIIモノクローナル抗体(TH14B、VMRD社)を用いたイムノブロッティングで確認した。

5-2-7 合成ペプチド(Pep3)によるTSST-1とMHCクラスII分子の結合阻害

5-2-6で部分精製したMHCクラスII分子を約1 μ g/mLの濃度に調製して、96穴マイクロプレートのウェルに100 μ lずつ入れ、4 $^{\circ}$ C一晩放置して固相化した。このプレートを、0.5% BSAでブロッキングして、MHCクラスII分子固相化プレートとした。Pep3によるTSST-1とMHCクラスII分子の結合阻害を調べるため、まず、希釈液(0.25% BSAおよび0.05% Tween20を含むPBS) 100 μ lにTSST-1を1ng、Pep3あるいはコントロールペプチドを、0、0.5、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0 μ Mの濃度で加えて、25 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。洗浄液(0.05% Tween 20を含むPBS)で3回洗浄した後、3000倍希釈したビオチン標識した抗TSST-1モノクローナル抗体を25 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。洗浄液で3回洗浄した後、5000倍希釈したアビジン-HRPを、25 $^{\circ}$ Cで15分反応させた。

洗浄液で3回洗浄した後、発色剤(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)を加え、25℃で15分反応させた。1M硫酸で反応を停止し、マイクロプレートリーダーで450 nmの吸光度を測定した。

5-3 結果

5-3-1 TSST-1結合ファージの選択

精製したTSST-1をターゲットにして、15 merのファージライブラリーをスクリーニングした。本章では、TSST-1は抗体を介して固相化せず、直接シャーレに物理吸着させてスクリーニングに用いた(Fig.5-2)。BSAでブロッキングしたシャーレに非特異的に結合するファージを除くために、まずライブラリーをBSAでブロッキングしたシャーレで反応させ、結合しないファージをTSST-1と反応させた。この操作はTSST-1結合ファージを得るためには有効で、このステップを省略した場合には、TSST-1に特異的に結合するファージは得られなかった。3回パニングを行った後、ランダムに16クローンを選択し、Phage ELISAを行った。3クローン(1、6、10)を除く13クローンが反応性を示し、さらにこの系にTSST-1を1 μ g加えた場合には、全例で結合の阻害が観察され、TSST-1に対する結合の特異性が確認された(Fig. 5-3)。13クローンのうち、12クローンの塩基配列を決定した。4つの配列が得られ、芳香族アミノ酸を多く含んでいた以外には、各配列に相同性は認められなかった(Table 4)。ファージ3が最も多く出現し(12配列中8配列)、残りのクローンはそれぞれ1配列のみの出現であった。

5-3-2 TSST-1結合ファージとレセプター分子MHCクラスIIの相同性

得られたTSST-1結合ファージの配列と、MHCクラスII分子の配列の相同性を検討した。MHCクラスII分子は、 α 鎖と β 鎖のヘテロダイマーからなるレセプター分子である。得られた4配列と α 鎖との相同領域は認められなかったが、 β 鎖にファージ8との相同領域を2カ所見いだした(Fig. 5-4)。 β 鎖のアミノ酸配列57番目から62番目の領域(ドメインA)とアミノ酸配列188番目から193番目(ドメインB)の2カ所である。TSST-1とMHCクラスII分子の複合体は既にX線構造解析が報告されており、ドメインBは両分子の

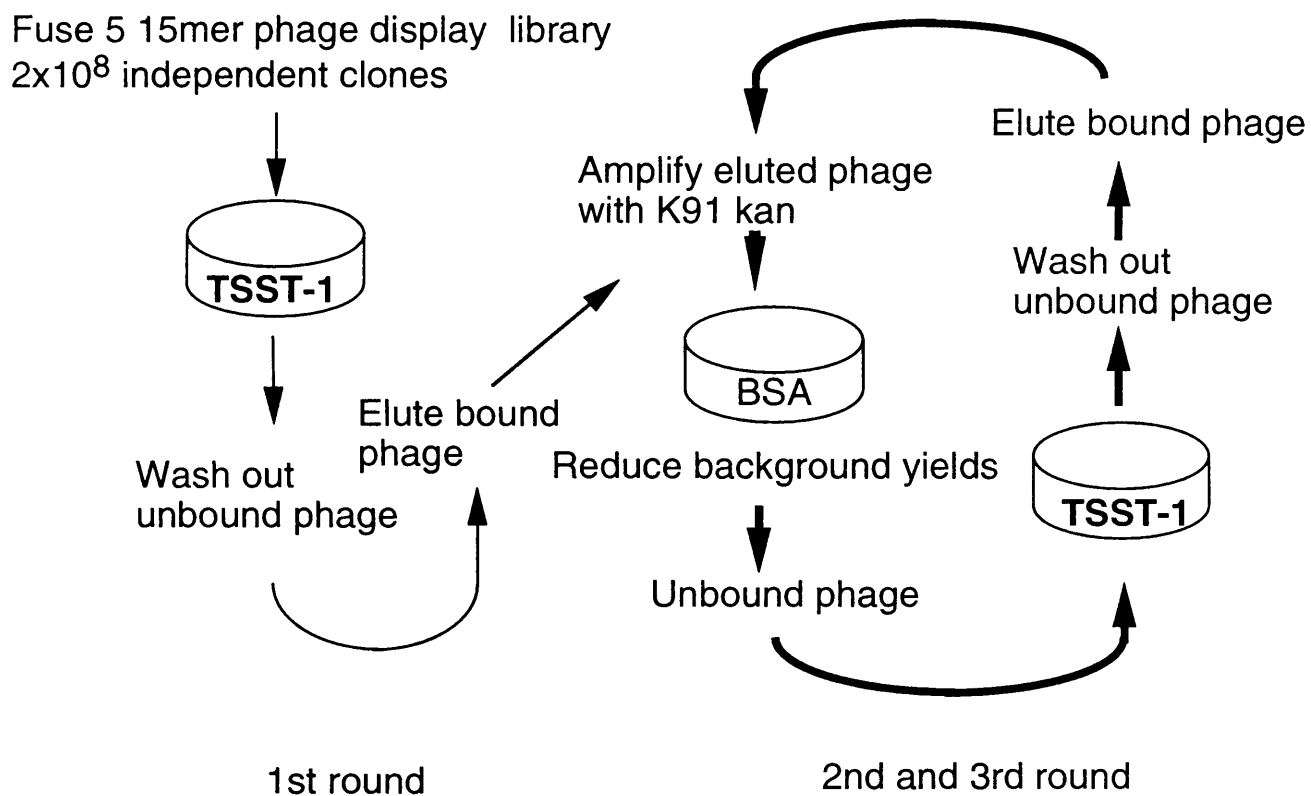


Figure 5-2 Procedure for isolating TSST-1 binding phage

Approximately 10^{12} virions of a phage display library was allowed to bind to TSST-1-coated dishes for 1h at room temperature. After the 1st round of biopanning, bound phage were transferred to the Petri dishes coated with BSA alone to absorb background yields in the 2nd and 3rd round.

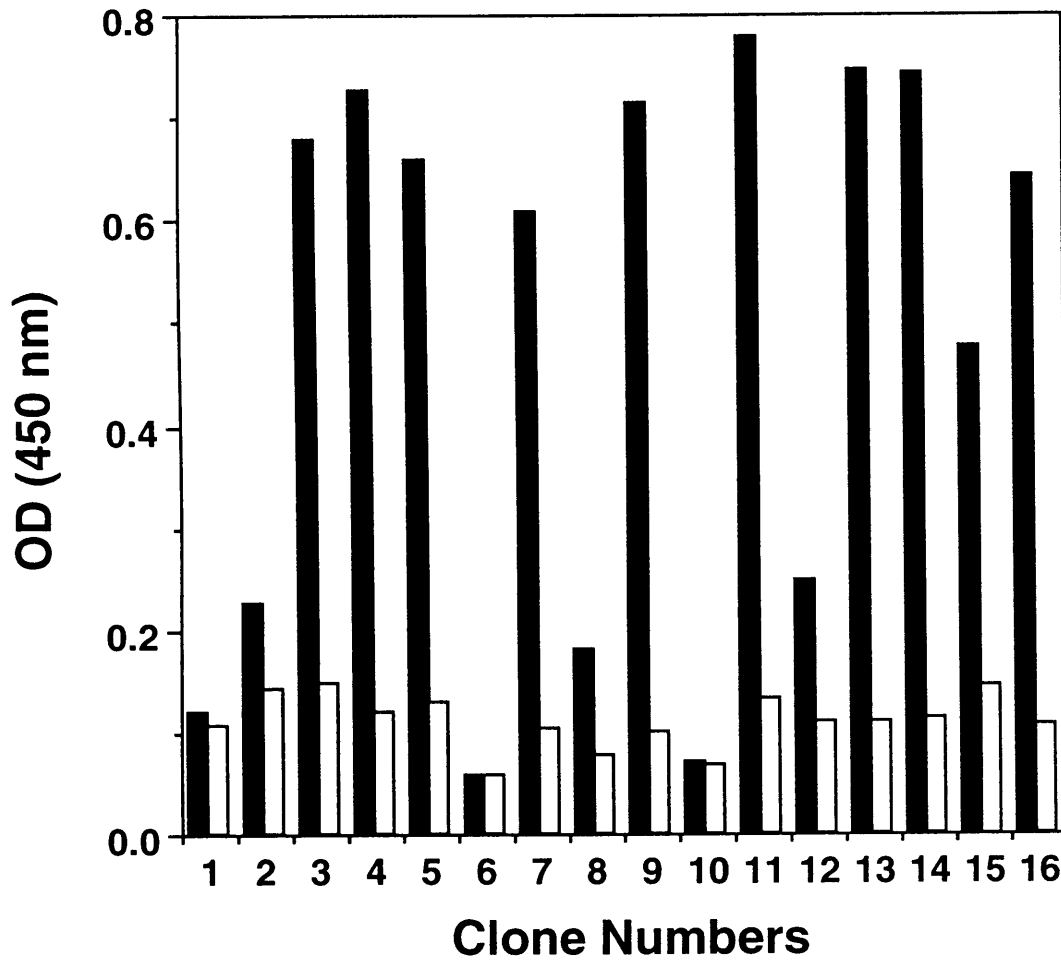


Figure 5-3 Selection of TSST-1 binding phage by an ELISA
 Sixteen clones from the third round biopanning were randomly selected to confirm the affinity and specificity by an ELISA. Absorbances at 450 nm in a non-competitive ELISA (solid bars) and a competitive ELISA (open bars) were shown. In a competitive ELISA, 1 μ g of native TSST-1 were added to each well to compete with the immobilized TSST-1 for binding to individual phage.

Table 4 TSST-1 binding sequences isolated from a phage display library

| Clone | Sequence | Frequency* | Aromatic residues** |
|---------|-----------------|------------|---------------------|
| Phage3 | DRSYLSFIHLYPELA | 8/12 | 3/15 (20%) |
| Phage11 | SARLWAEYLPLYRHM | 2/12 | 3/15 (20%) |
| Phage2 | FNGGAQMGWDYYWFF | 1/12 | 7/15 (47%) |
| Phage8 | WDAMYWNWRSVSEFH | 1/12 | 5/15 (33%) |

* Number of independent clones isolated from a phage display library.

** Number of aromatic residues included in the sequence.

| | | | | |
|--------------|---|--------|-----------------|----------|
| | | 56 | | 70 |
| High | [| DR5 | P*EE*** | SQKDFLED |
| | | DR7 | PV*ES** | SQKDILED |
| | | DQ1 | PA*E*** | SQKDILER |
| |] | DQ3 | PA*E*** | SQKEVLER |
| Intermediate | [| DR1 | P**E*** | SQKDLLEQ |
| | | DRW53 | P**E*** | SQKDLLER |
| Low | [| DPW2 | PA*E*** | SQKDILEE |
| |] | DPW4 | PA*E*** | SQKDILEE |
| | | Phage8 | WDAMYWNWRSVSEFH | |
| High | [| DR5 | TSPLTVE**AR** | SA |
| | | DR7 | MSPLTVE**AR** | SA |
| | | DQ1 | QSPITVE**AQ** | SA |
| |] | DQ3 | QNPIIVE**AQ** | SA |
| Intermediate | [| DR1 | TSPLTVE**SAR** | SA |
| | | DRW53 | MSPLTVQ**SAR** | SA |
| Low | [| DPW2 | DSPVTVE**KAQ* | DSA |
| |] | DPW4 | DSPVTVE**KAQ* | DSA |
| | | | 181 | 195 |

Figure 5-4 Multiple amino acid sequence alignment of phage8 and the β chain of MHC class II molecules

Sequences derived from the β chain of MHC class II molecules were arranged according to consensus sequences with phage8 and affinity for TSST-1⁸⁸) [high affinity: DR5, DR7, DQ1 and DQ3; intermediate affinity: DR1, DRW53; low affinity: DPW2 and DPW4]. Consensus sequences were boxed. Numbering indicates amino acid position in mature β chain of MHC class II molecules. Asterisks indicate identical amino acids corresponding to the underlined sequences of phage8. Boxed amino acid residue 189 and 193 might be possible amino acid substitutions associated with the affinity for TSST-1 (see in the Discussion section).

結合ドメインとしては報告されていないが、ドメインAに含まれるアミノ酸残基Tyr-60とGln-64は、TSST-1のGln-73と水素結合していると報告されている³³⁾ (Fig. 5-8)。したがって、ファージ8の配列が、MHCクラスII分子上のドメインAとドメインBからなる3次構造をTSST-1結合サイトとしてミミックしていると考えると大変興味深い。

5-3-3 合成ペプチド (Pep3) によるファージクローンとTSST-1との結合阻害

一番高頻度に出現したファージ3の配列を基にして、19merのペプチドPep3を化学合成した。このペプチドが、得られた4種類のファージクローンとTSST-1の結合を阻害することができるかをPhage ELISA法で調べた。コントロールペプチドを10 µg加えても結合は阻害されなかったが、Pep3を加えると、全てのファージクロンの結合が阻害された (Fig. 5-5)。この結果は、各ファージクローンが認識するTSST-1上の領域が、少なくともオーバーラップしている可能性を示唆している。

5-3-4 ファージ3と他のエンテロトキシン、サイトカインとの交差反応

ランダムペプチドライブラリーより単離されたクロンの反応特異性に関しては、今まで余り報告されていない。そこで、他のエンテロトキシン、あるいはサイトカインとの反応交差性をPhage ELISA法で調べた。代表的なファージクローンであるファージ3を用いた結果をFig. 5-6に示す。他のエンテロトキシンであるStaphylococcal enterotoxin A (SEA)、SEB、SECには結合性を示さなかった。またサイトカインであるInterleukin 6 (IL-6)、IL-8、Interferon inducible protein 10 (IP-10)、Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)には交差反応性を示さなかった。以上より、ファージ3はTSST-1を特異的に認識していると考えられる。

5-3-5 合成ペプチド (Pep3) によるTSST-1とMHCクラスII分子の結合阻害

ファージ8の配列が、MHCクラスII分子との配列相同性を有しており、ファージ8とファージ3とのTSST-1上の結合サイトが共通であると考え、ファージ3の配列が、MHCクラスII分子をミミックしている可能性が高い。このことを確かめるために、ファージ3の配列を含む合成ペプチドPep3が、TSST-1とMHCクラスII分子の結合を阻害するこ

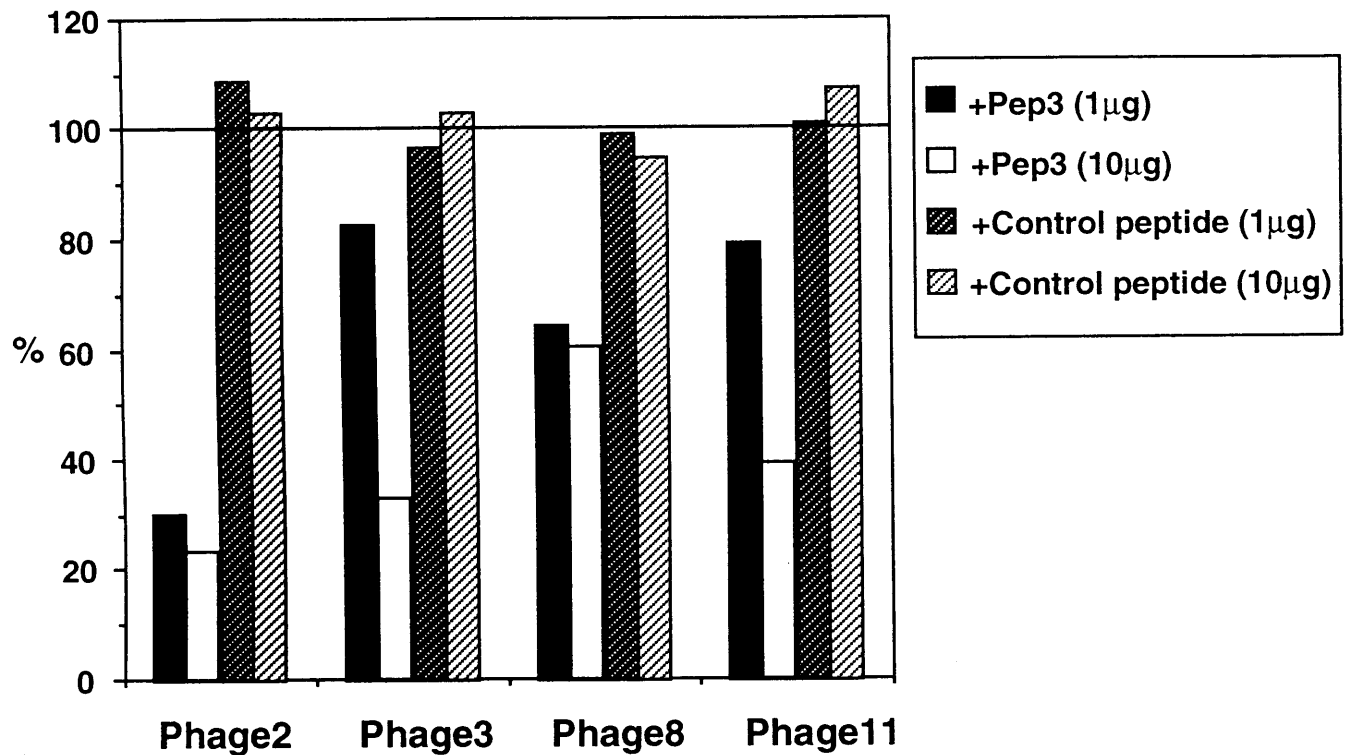


Figure 5-5 Inhibition of selected phage binding to TSST-1 by a synthetic peptide (pep3)

A synthetic peptide (pep3) was used to compete with four isolated phage for binding to the immobilized TSST-1. Relative absorbance values at 450 nm were shown. One hundred percent corresponds to absorbance values at 450 nm in a non-competitive ELISA (in the absence of pep3). The data represent means from duplicate wells.

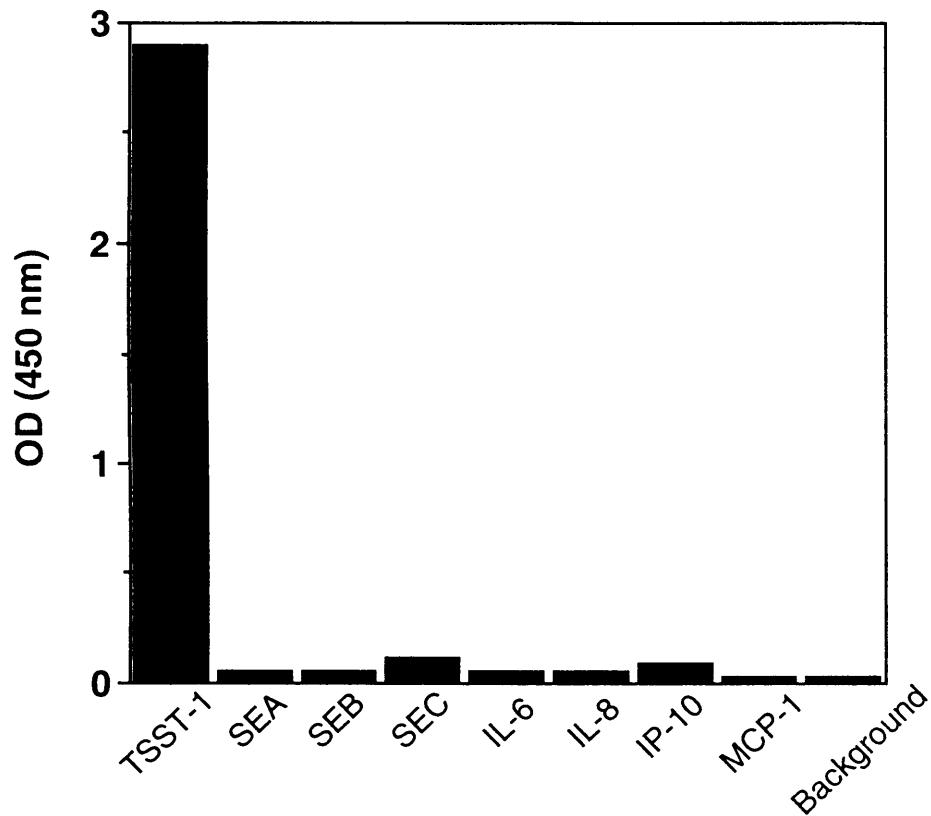


Figure 5-6 Cross-reaction of phage3 with other SEs and cytokines
 Approximately 10^{10} virions of phage3 were tested to confirm the specificity in a phage ELISA. Absorbances at 450 nm were shown. Reactivity in a BSA-coated well was expressed as a background value. The data represent means of duplicate wells.

とが可能であるかをELISA法で調べた。Fig. 5-7 に示したように、TSST-1とMHCクラスII分子の結合は、Pep3によって濃度依存的に阻害された。一方、コントロールペプチドでは結合阻害は認められなかった。コントロールとして、250 μ MのPep3は、TSST-1とビオチン化抗TSST-1抗体との結合を阻害することはなかった（データ略）。このデータは、Pep3が、MHCクラスII分子のTSST-1との結合部分をミミックしていることを示唆するものである。

5-4 考察

抗体やレセプター分子は、ファージライブラリーのターゲット分子として数多くの報告があるが、リガンド分子をターゲットにして、この技術を適用した報告はほとんどないのが現状である。本章では、リガンド分子としてスーパー抗原であるTSST-1に着目し、ファージライブラリーからこの分子に結合して、レセプターであるMHCクラスIIをミミックするような配列が得られるかどうか検証した。このアプローチによって、スーパー抗原TSST-1と、MHCクラスIIの結合を明らかにするような配列が得られる可能性がある。この点に関しては、レセプター分子であるMHCクラスII分子をターゲットとすることも可能であると考えられる。しかし、MHCクラスII分子は、他のスーパー抗原や、抗原ペプチドとの結合を行う多機能なレセプター分子であるので、この分子を標的にしてスクリーニングしても、必ずしもTSST-1との結合に関与する配列が得られるとは限らないと考えた。事実、Hammerらは、MHCクラスII分子のHLA-DR1を標的として、ファージライブラリーをスクリーニングし、この分子に結合する抗原ペプチドの配列を報告している⁸⁵⁾。

ファージディスプレイライブラリーを作製する際、ランダムな配列の両端にシステイン残基を導入して、環状構造をとるように設計したライブラリーから、標的分子に高親和性を示す配列が得られたとの報告がある⁸⁶⁾。そこで、TSST-1に関してもこのようなライブラリーでのスクリーニングを試みたが、TSST-1に結合する配列は得られなかった（データ略）。本章で得られた4配列にシステイン残基が含まれていないことと、得られた配列がミミックしていると考えられるMHCクラスII分子の β 鎖の領域には、システイン残基が含まれない事実から考えて、この方法は、TSST-1結合ファージを得るには有効でない

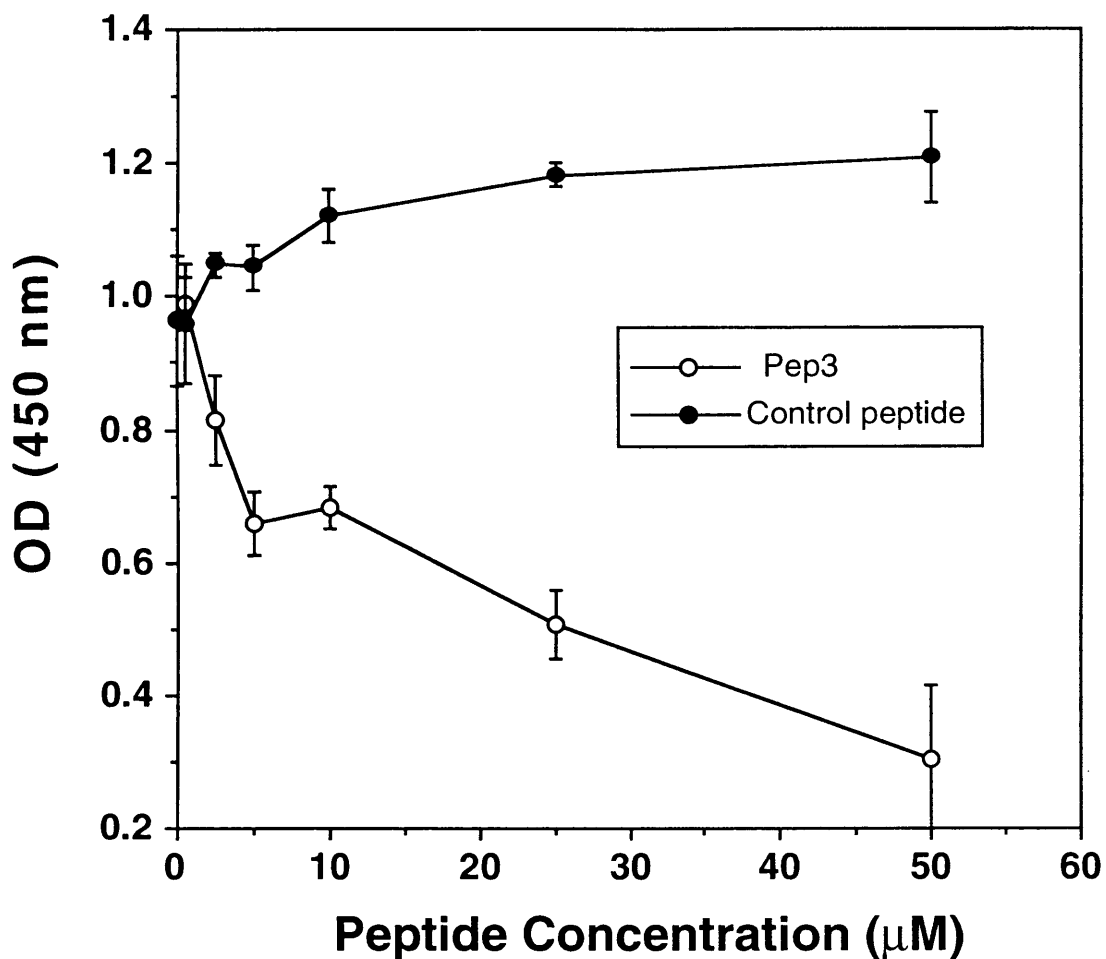


Figure 5-7 Competition between pep3 and MHC class II molecules for binding to TSST-1.

MHC class II molecules, which were partially purified from Daudi cells, were coated on each well of a microtiter plate (1 µg/ml). TSST-1(10 ng/ml) were incubated with the immobilized MHC class II in the presence of pep3 at the indicated concentrations. The biotinylated monoclonal anti-TSST-1 antibody and avidin-horseradish peroxidase conjugates were then used as described in Materials and Methods. The data represent means ± SD from triplicate wells.

と考えた。

ファージ8の配列とMHCクラスII分子のβ鎖には、相同領域が2カ所見いだされた。β鎖のアミノ酸配列57番目から62番目の領域(ドメインA)と、アミノ酸配列188番目から193番目(ドメインB)の2カ所である。X線構造解析の結果から³³⁾、ドメインBはTSST-1とMHCクラスII分子との結合領域として報告されていないが、ドメインAは結合領域として報告されている部位である(Fig. 5-8)。ファージ8が、MHCクラスII分子と同じ形式でTSST-1に結合するとは限らないが、ドメインBは、今まで報告されていない新しい結合部位である可能性がある。X線構造解析では、結晶を得るためにMHCクラスII分子の膜貫通部位を欠失させた可溶性蛋白を使用している。ドメインBは膜貫通部分に比較的近い位置にあること⁸⁷⁾。構造解析に用いた結晶は、TSST-1との結合で低親和性を示すHLA-DR1を使用している⁸⁸⁾などの理由から、X線構造解析では、ドメインBを結合部位として同定できなかった可能性が考えられる。あるいは、X線構造解析の結果では、ドメインAは抗原ペプチドと相互作用しており、TSST-1がこの抗原ペプチドのC末端側と結合していることから³³⁾、ファージ8は、抗原ペプチドとMHCクラスII分子のβ鎖の複合体をミミックしている可能性も考えられる。

TSST-1とMHCクラスII分子の結合に関しては、MHCクラスII分子のアミノ酸配列の違い(polymorphism)から、TSST-1はHLA-DR、DQには結合するが、DPには結合しないと報告されている⁸⁸⁾。そこで、ファージ8とMHCクラスII分子との相同部位を、TSST-1との親和性別にアラインメントした(Fig. 5-4)。興味深いことにドメインAの領域では、MHCクラスII分子とTSST-1との親和性の違いと、アミノ酸配列の違いには特に相関は認められない。一方、ドメインBの領域では、189番目と、193番目のアミノ残基に違いが認められた。TSST-1に高親和性を示すグループ(DR5, DR7, DQ1, DQ3)では、189番目と193番目のアミノ酸残基がファージ8と同じであるのに対して、低親和性を示すDPW2、DPW4は、ファージ8とは異なり189番目のアミノ酸残基がLys、193番目のアミノ酸残基がAspであった。さらに、中程度の親和性を示すDR1、DRW53の189番目のアミノ酸残基はArgがSerに変わっていた。以上より、もしドメインBが、X線構造解析で明らかにされていない新規なTSST-1とMHCクラスII分子の結合部位である

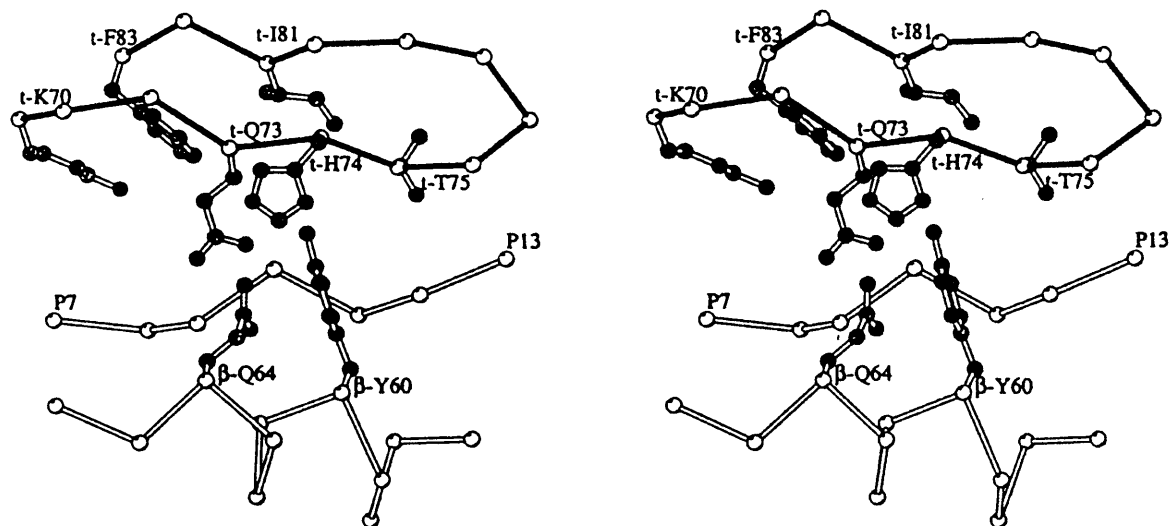


Figure 5-8 Stereo view of the contact region in TSST-1 : MHC class II (Kim, J. et al., 1994, Science 266, 1870-1874)
 MHC class II and TSST-1 C α chains are indicated by light bonds and dark bonds.

とすると、この領域のアミノ酸配列の変異によって、TSST-1とMHCクラスII分子の結合親和性を説明できるかも知れない。

X線構造解析の結果から、TSST-1の構造はSEBに類似していることが報告されている(89, 90)。また、TSST-1とSEAはMHCクラスII分子の結合に関して、競合することが報告されている⁹¹⁾。以上のことから、各スーパー抗原のMHCクラスII分子結合部位は、構造的に類似していることが考えられる。さらに、本章で得られたファージ3は、TSST-1上のMHCクラスII分子結合部位を認識するクローンであると考えられることから、このファージクローンが、他のエンテロトキシンを認識する可能性が考えられた。しかし、Phage ELISAの結果から、ファージ3は、他のエンテロトキシンとの交差反応を示さなかった。この現象は、TSST-1とSEBは構造が類似しているが、MHCクラスII分子上の認識部位は、完全に同一ではないこと⁹²⁾、またSEAに関しては、MHCクラスII分子の β 鎖よりむしろ α 鎖との結合が、TSST-1とMHCクラスII分子の結合とオーバーラップしているという報告⁹¹⁾と一致する。

TSST-1はX線構造解析の結果から、N末端側に存在する β バーレル構造がMHCクラスII分子の結合に関与していると報告されている³³⁾。さらに、TSST-1のアミノ酸39番目から68番目の配列が、TSST-1とMHCクラスII分子の結合を阻害したことから、この領域がMHCクラスII分子の結合に関与していることが考えられる⁹³⁾。本章で得た配列は、TSST-1上のMHCクラスII分子結合部位を認識するから、この配列が、TSST-1のN末端側に存在する β バーレル構造を認識する可能性が考えられる。この可能性を証明するためには、TSST-1のアミノ酸39番目から68番目の配列が、TSST-1と今回得られたファージクローンとの結合を競合阻害することができるかを調べる必要がある。

スーパー抗原は、抗原ペプチドとは異なり、プロセッシングされることなくMHCクラスII分子の外側に結合して^{30, 31)}、T細胞を活性化する³²⁾。スーパー抗原によって、活性化されたT細胞はサイトカインなどの分泌を伴い、例えば、トキシンショック症候群の原因になる^{94, 95)}。すなわち、スーパー抗原とMHCクラスII分子の結合は、病態を引き起こす際の重要なステップになっている。本章で得られたPep3は、TSST-1とMHCクラス

II分子の結合を濃度依存的に阻害した。従って、この配列は、トキシンショック症候群に対する治療薬の候補となり得るものである。また、本章で示した方法は、他のスーパー抗原にも適用可能であり、各スーパー抗原に特異的なペプチドリガンドの単離が可能であろう。

5-5 結言

リガンド分子であるTSST-1を標的にして、この分子に結合する配列をファージライブラリーから選択した。得られた配列は、レセプター分子であるMHCクラスIIとの相同部位を示し、さらにTSST-1とMHCクラスIIとの結合を濃度依存的に阻害した。以上より、リガンド分子を標的にしたファージライブラリー法の適用により、レセプター分子をミミックする配列の単離が可能であることが示された。この方法は、リガンド-レセプター分子の相互作用を解析する有益なアプローチであると同時に、レセプター分子の低分子化法としても有用であると考えられる。

第6章 結論

本研究は、レセプター分子とリガンド分子の相互作用を解析することを目的とした。レセプター分子は膜蛋白であり、遺伝子組換え法を用いても、得られる量が限られること、さらに得られた膜蛋白を精製するためには、界面活性剤での可溶化操作が必要であり、この操作によりレセプター分子が失活する場合が多いことなどの問題点がある。そこで本研究では、この問題を克服するために、レセプター分子の細胞外ドメインを可溶性型レセプターとして発現する試みを行った。本論文の第2章では、LDL、VLDLレセプターの細胞外ドメインを可溶性型レセプターとして昆虫細胞で発現させた。その発現様式の違いから、VLDLレセプターの細胞外ドメインの分泌、活性化には細胞内リガンドであるRapが関与していることを見いだした。本論文の第3章では、レセプター分子として機能しているBST-1の可溶性型レセプターの大量発現系、精製法を確立した。さらに、得られた可溶性レセプターをターゲットにして、ランダムファージペプチドライブラリーでスクリーニングを行い、ターゲットレセプターに結合するペプチドリガンドを同定した。得られたペプチドリガンドは、BST-1が有するADP-ribosyl cyclase活性を特異的に阻害した。第4章では、第3章で得られたペプチドリガンドと可溶性レセプターとの結合を詳細に解析した。第5章では、ファージランダムペプチドライブラリー法をリガンド分子に適用し、レセプター分子をミミックする配列が同定できるかを検証した。以下、各章で得られた知見をまとめる。

第2章では、脂質の取り込みに関わるヒトLow density lipoprotein (LDL)、Very low density lipoprotein (VLDL) レセプターに着目し、昆虫細胞を用いて細胞外ドメインを可溶性レセプターとして発現させた。LDLレセプターの場合は、細胞外ドメインは可溶性レセプターとして培地上清中に分泌し、リガンドである¹²⁵I-LDLと¹²⁵I-β-VLDL共に結合した。一方、VLDLレセプターの場合は、細胞外ドメインは細胞内に発現は認められたものの、培地上清中に分泌せず、かつリガンドである¹²⁵I-β-VLDLとも結合しなかった。次に、LDLレセプタースーパーファミリーの細胞内リガンドであるReceptor-associated protein (RAP)に注目した。この分子は、LDLレセプタースーパーファミリーのLDL

receptor-related protein (LRP)の分子シャペロンとして機能することが報告されている。そこで、RAPのVLDLレセプターに対する機能を調べるため、VLDLレセプターの細胞外ドメインとの共発現系を試みた。この共発現系において、可溶性VLDLレセプターは細胞外に分泌し、リガンドである¹²⁵I-β-VLDLと結合した。さらにRAPとの共発現によって、分泌せず細胞内に留まる形で発現したレセプター分子もリガンドである¹²⁵I-β-VLDLと結合したことから、RAPとの共発現によってレセプター分子が活性型になったと考えた。以上より、VLDLレセプターの細胞外ドメインの活性化及び分泌には、細胞内リガンドであるRAPが関与していることを明らかにした。この結果、結晶構造解析に適した活性型可溶性VLDLレセプターの大量発現系が確立できた。

第3章では、レセプターとして機能していることが示唆され、さらにectoenzyme 活性を有するヒトBone marrow stromal antigen-1 (BST-1/CD157, 以下BST-1)に着目した。この分子は、NAD からcADPリボース(cADPR)を合成するADP-ribosyl cyclaseと、cADPRを加水分解してADPリボースに変換するcADPR hydrolase活性を有する。このユニークな分子の機能解析を行うために、結晶構造解析に適した可溶性型BST-1の大量発現系を昆虫細胞で確立した。可溶性BST-1は培地中に分泌し、この分泌した可溶性BST-1を、陽イオン交換クロマトグラフィー、ブルーアフィニティークロマトグラフィーで、95%以上の純度に精製した。次に、精製した可溶性BST-1をターゲットとして、15アミノ酸残基からなるファージディスプレイランダムペプチドライブラリをスクリーニングした。その結果、BST-1に結合するペプチドリガンド(SNP-1と命名)が得られ、このペプチドはBST-1のADP-ribosyl cyclase活性を不拮抗型で阻害した。阻害物質定数 $K_i=180 \pm 40$ nMであった。SNP-1は、CD38のADP-ribosyl cyclase活性は阻害しなかった。以上より、得られたペプチドリガンドSNP-1は、BST-1のADP-ribosyl cyclase活性阻害に特異的であり、セカンドメッセンジャーcADPRの機能を解析するための有力なツールになると考えられる。

第4章では、第3章で得られた新規 ADP-ribosyl cyclaseインヒビターSNP-1と可溶性BST-1との結合解析を、バイオセンサーBIAcore、Isothermal titration calorimetry

(ITC)、分析用超遠心器を用いて行った。さらに、結合に重要なアミノ酸残基を決定するために、Ala scanning analysisを行った。可溶性BST-1とSNP-1の結合をBIAcoreを用いて解析した結果、結合速度定数(k_{on})、乖離速度定数(k_{off})から算出される乖離定数 $K_d = k_{off}/k_{on} = 520 \pm 20$ nMで、この値はScatchard plotから求めた平衡乖離定数($K_d^{eq} = 500 \pm 35$ nM)とよく一致した。分析用超遠心器を用いた解析では、溶液中ではSNP-1はmonomer、可溶性BST-1はdimerで存在することが示された。ITCを用いたSNP-1とBST-1との結合stoichiometryは、モル比で0.8 : 1であり、算出された分子量から、2 : 2で結合すると推定された。また、ITCを用いて算出した結合乖離定数 K_d 値は210 nMであり、BIAcoreの結果とも一致していた。SNP-1の全てのアミノ酸残基をAlaに変えたAla scanning analysisの結果、N末端からのアミノ酸 2、4、5、7から12番目の部位が結合に重要な残基と同定された。これらの情報は、インヒビターを改変していく際の重要な知見になると考えられる。

第5章では、ランダムペプチドライブラリー法をレセプター分子ではなく、リガンド分子に適用し、レセプター分子をミミックしたペプチドリガンドがこの方法で得られるかを検証した。ターゲット分子としては、スーパー抗原であるToxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1)を選択した。スクリーニングの結果、TSST-1に結合する配列が4種類得られた。得られた配列を基にして化学合成したペプチド(Pep-3と命名)は、リガンドTSST-1とそのレセプターであるMHC class IIとの結合を濃度依存的に阻害した。さらに得られた配列のなかに、MHC class IIの β 鎖との相同部位が2カ所認められた。以上よりランダムペプチドライブラリーから得られたTSST-1に結合する配列は、TSST-1のレセプターであるMHC class IIをミミックしたものであると結論した。レセプター分子をターゲットとせず、リガンド分子をターゲットとするランダムペプチドライブラリースクリーニング法は、レセプターとリガンド分子の相互作用を調べるのに有用な手段であると同時に、レセプター分子の低分子化法として有用であることが示された。

本研究は、活性型可溶性レセプターの発現から、ランダムファージペプチドライブラリー法を用いたペプチドリガンドの同定、ペプチドリガンドとレセプター分子の結合解析、

さらに、ランダムファージペプチドライブラリー法によるレセプター分子のミミックの創製までを行ったものであり、レセプターとリガンド分子の相互作用の解析に関する基礎研究として、極めて意義深いものである。

引用文献

- (1) Hulme, E. C. (1992) Receptor-ligand interactions, a practical approach, Oxford University Press, New York.
- (2) Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1986) *Science* 232, 34-47.
- (3) Sakai, J., Hoshino, A., Takahashi, S., Miura, Y., Ishii, H., Suzuki, H., Kawarabayashi, Y. and Yamamoto, T. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 2173-2182.
- (4) Jingami, H. and Yamamoto, T. (1995) *Curr. Opin. Lipidol.* 6, 104-108.
- (5) Yamamoto, T., Takahashi, S., Sakai, J. and Kawarabayashi, Y. (1993) *Trends Cardiovasc. Med.* 3, 144-148.
- (6) Takahashi, S., Kawarabayashi, Y., Nakai, T., Sakai, J. and Yamamoto, T. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9252-9256.
- (7) Strickland, D. K., Ashcom, J. D., Williams, S., Battey, F., Behre, E., McTigue, K., Battey, J. F. and Argraves, W. S. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 13364-13369.
- (8) Medh, J. D., Fry, G. L., Bowen, S. L., Pladet, M. W., Strickland, D. K. and Chappell, D. A. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 536-540.
- (9) Battey, F. D., Gåfvels, M. E., FitzGerald, D. J., Argraves, W. S., Chappell, D. A., Strauss III, J. F. and Strickland, D. K. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 23268-23273.
- (10) Kaisho, T., Oritani, K., Ishikawa, J., Tanabe, M., Muraoka, O., Ochi, T. and Hirano, T. (1992) *J. Immunol.*, 12, 4088-4095.
- (11) Kaisho, T., Ishikawa, J., Oritani, K., Inazawa, J., Tomizawa, H., Muraoka, O., Ochi, T. and Hirano, T. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5325-5329.
- (12) Okuyama, Y., Ishihara, K., Kimura, N., Hirata, Y., Sato, K., Itoh, M., Lee, B. O. and Hirano, T. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228, 838-845.

- (13) Hirata, Y., Kimura, N., Sato, K., Ohsugi, Y., Takasawa, S., Okamoto, H., Ishikawa, J., Kaisho, T., Ishihara, K. and Hirano, T. (1994) FEBS Lett. 356, 244-248.
- (14) Lee, H. C. (1996) Recent Prog. Horm. Res. 51, 355-388.
- (15) Lee, B. O., Ishihara, K., Denno, K., Kobune, Y., Itoh, M., Muraoka, O., Kaisho, T., Sasaki, T., Ochi, T. and Hirano, T. (1996) Arthritis Rheum. 39, 629-637.
- (16) Smith, G. P. (1985) Science 228, 1315-1317.
- (17) Scott, J. K. and Smith, G. P. (1990) Science 249, 386-390.
- (18) 西徹、鶴井博理、佐谷秀行 (1993) 実験医学、11、95-100.
- (19) 石川大、瀧孝雄 (1997) 細胞工学、16、1821-1828.
- (20) Smith, G. P. and Scott, J. K. (1993) Methods Enzymol. 217, 228-257.
- (21) Wrighton, N. C., Farrell, F. X., Chang, R., Kashyap, A. K., Barbone, F. P., Mulcahy, L. S., Johnson, D. L., Barrett, R. W., Jolliffe, L. K. and Dower, W. J. (1996) Science 273, 458-463.
- (22) Cwirla, S. E., Balasubramanian, P., Duffin, D.J., Wagstrom, C.R., Gates, C. M., Singer, S. C., Davis, A. M., Tansik, R. L., Mattheakis, L. C., Boytos, C. M., Schatz, P. J., Baccanari, D. P., Wrighton, N. C., Barrett, R. W. and Dower, W. J. (1997) Science 276, 1696-1699.
- (23) Goodson, R., J., Doyle, M., V., Kaufman, S., E. and Rosenberg, S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 7129-7133.
- (24) Doorbar, J. and Winter, G. (1994) J. Mol. Biol. 244, 361-369.
- (25) Bonin, P.D., Bannow, C.A., Smith, C.W., Fischer, H.D. and Erickson, L.A. (1998) J. Pept. Res. 51, 216-225.
- (26) 夏目 徹、永田 和宏 (1995) 実験医学、13、85-91.

- (27) Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F., and Lin, L. N. (1989) *Anal. Biochem.* 179, 131-137.
- (28) 深田 はるみ (1997) *蛋白質 核酸 酵素*, 42, 2108-2112.
- (29) 有坂 文雄 (1998) *蛋白質 核酸 酵素*, 43, 2238-2244.
- (30) Uchiyama, T., Imanishi, K., Saito, S., Araake, M., Yan, X.-J., Fujikawa, H., Igarashi, H., Kato, H., Obata, F., Kashiwagi, N. and Inoko, H. (1989) *Eur. J. Immunol.* 19, 1803-1809.
- (31) Dellabona, P., Peccound, J., Kappler, J., Marrack, P., Benoist, C. and Mathis, D. (1990) *Cell* 62, 1115-1121.
- (32) Kappler, J., Kotzin, B., Herron, L., Gelfand, E. W., Bigler, R. D., Boylston, A., Carrel, S., Posnett, D. N., Choi, Y. and Marrack, P. (1989) *Science* 244, 811-813.
- (33) Kim, J., Urban, R. G., Strominger, J. L. and Wiley, D. C. (1994) *Science* 266, 1870-1874.
- (34) Yamamoto, T., Davis, C. G., Brown, M. S., Schneider, W. J., Casey, M. L., Goldstein, J. L. and Russell, D. W. (1984) *Cell* 39, 27-38.
- (35) Herz, J., Goldstein, J. L., Strickland, D. K., Ho, Y. K., and Brown, M. S. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 21232-21238.
- (36) O'reilly, D. R., Miller, L. K. and Luckow, V. A. (1994) *Baculovirus Expression Vectors*, Oxford University Press, Oxford.
- (37) Beisiegel, U., Schneider, W. J., Goldstein, J. L., Anderson, R. G. W. and Brown, M. S. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 11923-11931.
- (38) Goldstein, J. L., Basu, S. K., and Brown, M. S. (1983) *Methods Enzymol.* 98, 241-260.
- (39) Daniel, T. O., Schneider, W. J., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 4606-4611.

- (40) Bu, G. and Rennke, S. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 22218-22224.
- (41) Bu, G. and Schwartz, A. L. (1998) *Trends Cell Biol.* 8, 272-276.
- (42) Esser, V., Limbird, L. E., Brown, M. S., Goldstein, J. L. and Russell, D. W. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 13282-13290.
- (43) Russell, D. W., Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 21682-21688.
- (44) Driel, I. R. V., Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 9533-9538.
- (45) Simmons, T., Newhouse, Y. M., Arnold, K. S., Innerarity, T. L. and Weisgraber, K. H. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 25531-25536.
- (46) Willnow, T. E., Rohlmann, A., Horton, J., Otani, H., Braun, J. R., Hammer, R. E. and Herz, J. (1996) *EMBO J.* 15, 2632-2639.
- (47) Kim, D. H., Iijima, H., Goto, K., Sakai, J., Ishii, H., Kim, H. J., Suzuki, H., Kondo, H., Saeki, S. and Yamamoto, T. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 8373-8380.
- (48) Faas, D., Blacklow, S., Kim, P. S. and Berger, J. M. (1997) *Nature* 388, 691-693.
- (49) Mészáros, L. G., Bak, J. and Chu, A. (1993) *Nature* 364, 76-79.
- (50) Takasawa, S., Nata, K., Yonekura, H. and Okamoto, H. (1993) *Science* 259, 370-373.
- (51) Kuemmerle, J. F. and Makhoulouf, G. M. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 25488-25494.
- (52) Wu, Y., Kuzma, J., Maréchal, E., Graeff, R., Lee, H. C., Foster, R. and Chua, N.-H. (1997) *Science* 278, 2126-2130.
- (53) Willmott, N., Sethi, J. K., Walseth, T. F., Lee, H. C., White, A. M. and Galione, A. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 3699-3705.

- (54) Galione, A. and White, A. (1994) *Trends. Cell Biol.* 4, 431–436.
- (55) Ishihara, K., Okuyama, Y., Lee, B. O., Itoh, M., Nishikawa, K. and Hirano, T. (1997) in *Leukocyte typing VI* (Kishimoto, T. et al., eds.) pp. 1086–1089, Garland Publishing Inc. New York
- (56) Graeff, R. M., Walseth, T. F., Fryxell, K., Branton, W. D. and Lee, H. C. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 30260–30267.
- (57) Inageda, K., Takahashi, K., Tokita, K., Nishina, H., Kanaho, Y., Kukimoto, I., Kontani, K., Hoshino, S. and Katada, T. (1995) *J. Biochem. (Tokyo)* 117, 125–131.
- (58) Walseth, T. F., Aarhus, R., Kerr, J. A. and Lee, H. C. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 26686–26691.
- (59) Solomon, K. R., Rudd, C. E. and Finberg, R. W. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6053–6058.
- (60) Higashida, H., Yokoyama, S., Hashii, M., Taketo, M., Higashida, M., Takayasu, T., Ohshima, T., Takasawa, S., Okamoto, H. and Noda, M. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 31272–31277.
- (61) Zocchi, E., Franco, L., Guida, L., Piccini, D., Tacchetti, C. and De Flora, A. (1996) *FEBS Lett.* 396, 327–332.
- (62) Funaro, A., Reinis, M., Trubiani, O., Santi, S., Di Primio, R. and Malavasi, F. (1998) *J. Immunol.* 160, 2238–2247.
- (63) Prince, N. C. and Stevens, L. (1989) *Fundamentals of Enzymology*, Oxford Science publications, New York
- (64) Livingstone, J. R. (1996) *Nature* 384, 491–492.
- (65) Perkins, S. J. (1986) *Eur. J. Biochem.* 157, 169–180.
- (66) Pennica, D., Lam, V. T., Weber, R. F., Kohr, W. J., Basa, L. J., Spellman, M. W., Ashkenazi, A., Shire, S. J. and Goeddel, D. V. (1993) *Biochemistry* 32, 3131–3138.

- (67) 夏目 徹 (1999) 実験医学、17、788-789.
- (68) Schuck, P. and Minton, A. P. (1996) Trends Biochem. Sci. 21, 458-460.
- (69) Prasad, G. S., McRee, D. E., Stura, E. A., Levitt, D. G., Lee, H. C., and Stout, C. D. (1996) Nat. Struct. Biol. 3, 957-964.
- (70) Goodson, R. J., Doyle, M. V., Kaufman, S. E. and Rosenberg, S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 7129 -7133.
- (71) Renschler, M. F., Bhatt, R. R., Dower, W. J. and Levy, R. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3623-3627.
- (72) Oldenburg, K. R., Loganathan, D., Goldstein, I. J., Schultz, P. G. and Gallop, M. A. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5393-5397.
- (73) Scott, J. K., Loganathan, D., Easley, R. B., Gong, Y. and Goldstein, I. J. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5398-5402.
- (74) Koivunen, E., Gay, D. A. and Ruaslahti, E. (1993) J. Biol. Chem. 268, 20205-20210.
- (75) Healy, J. M., Murayama, O., Maeda, T., Yoshino, K., Sekiguchi, K. and Kikuchi, M. (1995) Biochemistry 34, 3948-3955.
- (76) Scott, J. K. and Smith, G. P. (1990) Science 249, 386-390.
- (77) Miceli, R. M., DeGraaf, M. E. and Fischer, H. D. (1994) J. Immunol. Methods. 167, 279-287.
- (78) Cwirla, S. E., Peters, E. A., Barrett, R. W. and Dower, W. J. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6378-6382.
- (79) Zhong, G., Smith, G. P., Berry, J. and Brunham, R. C. (1994) J. Biol. Chem. 269, 24183-24188.
- (80) Bergdoll, M. S., Crass, B. A., Reiser, R. F., Robbins, R. N. and Davis, J. P. (1981) Lancet i, 1017-1021.

- (81) Schlievert, P. M., Shands, K. N., Dan, B. B., Shmid, G. P. and Nishimura, R. D. (1981) *J. Infect. Dis.* 143, 509-516.
- (82) Igarashi, H., Fujikawa, H., Usami, H., Kawabata, S. and Morita, T. (1984) *Infect. Immun.* 44, 175-181.
- (83) Sato, A., Sho, Y., Nakamura, H., Kinitomo, T. and Arima, T. (1994) *J. Med. Virol.* 44, 88-91.
- (84) Kaufman, J. F. and Strominger, J. L. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 6304-6308.
- (85) Hammer, J., Takacs, B. and Sinigaglia, F. (1992) *J. Exp. Med.* 176, 1007-1013.
- (86) O'Neil, K. T., Hoess, R. H., Jackson, S. A., Ramachandran, N. S., Mousa, S. A and DeGrado, W. F. (1992) *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 14, 509-515.
- (87) Gorga, J. C., Horejsi, V., Johnson, D. R., Raghupathy, R. and Strominger, J. L. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 16087-16094.
- (88) Scholl, P. R., Diez, A., Karr, R., Sekaly, R. P., Trowsdale, J. and Geha, R. S. (1990) *J. Immunol.* 144, 226-230.
- (89) Acharya, K. R., Passalacqua, E. F., Jones, E. Y., Harlos, K., Stuart, D. I., Brehm, R. D. and Trater, H. S. (1994) *Nature* 367, 94-97.
- (90) Prasad, G. S., Earhart, C. A., Murray, D. L., Novick, R. P., Schlievert, P. M. and Ohlendorf, D. H. (1993) *Biochemistry* 32, 13761-13766.
- (91) Pontzer, C. H., Russell, J. K. and Johnson, H. M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 125-128.
- (92) Thibodeau, J., Cloutier, I., Lavoie, P. M., Labrecque, N., Mourad, W., Jardetzky, T. and Sekaly, R.-P. (1994) *Science* 266, 1874-1878.
- (93) Soos, J. M., Russel, J. K., Jarpe, M. A., Pontzer, C. H. and Johnson, H. M. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191, 1211-1217.

- (94) Ikejima, T., Dinarello, C. A., Gill, D. M. and Wolff, S. M. (1984) *J. Clin. Invest.* 73, 1312-1320.
- (95) Grossman, D., Cook, R. G., Sparrow, J. T., Mollick, J. A. and Rich, R. R. (1990) *J. Exp. Med.* 172, 1831-1841.

発表論文リスト

- 1) **Atsushi Sato**, Jun Kazami, Terukatsu Arima, Haruji Nakamura & Tetsunosuke Kunitomo, 'Molecular cloning of the immunodominant regions of hepatitis C virus type III and IV by immunoscreening.' (1993) *Acta virol.* 37, 132-142.
- 2) **Atsushi Sato**, Nobuo Ida, Mari Ishikawa, Kazuhiro Tanahashi, Haruji Nakamura, Yukihiko Sho, Terukatsu Arima & Tetsunosuke Kunitomo, 'A sensitive serodiagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection with two non-fused peptides: comparison of antibody responses detected with a newly developed assay and a commercial second-generation test.' (1993) *Microbiol. Immunol.* 37, 295-304.
- 3) **Atsushi Sato**, Yukihiko Sho, Haruji Nakamura, Tetsunosuke Kunitomo & Terukatsu Arima, 'Immune responses of blood donors to peptides of various lengths and those with genotypic sequence variations corresponding to the N-terminal portion of the core protein of hepatitis C virus.' (1994) *J. Med. Virol.* 44, 88-91.
- 4) **Atsushi Sato**, Haruji Nakamura, Yukihiko Sho & Terukatsu Arima, 'Quantitation of anti-hepatitis C virus antibodies in interferon-treated patients by S29/S4 ELISA.' (1995) *J. Med. Virol.* 47, 226-230.
- 5) **Atsushi Sato**, Nobuo Ida, Mayumi Fukuyama, Keishi Miwa, Jun Kazami & Haruji Nakamura. 'Identification from a phage display library of peptides that bind to toxic shock syndrome toxin-1 and that inhibit its binding to MHC class II molecules.' (1996) *Biochemistry* 35, 10441-10447.
- 6) Tomoyuki Okamoto, Naohiro Sekiyama, Mieko Otsu, Yoshimi Shimada, **Atsushi Sato**, Shigetada Nakanishi & Hisato Jingami, 'Expression and purification of the extracellular ligand binding region of metabotropic glutamate receptor subtype 1.' (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 13089-13098.
- 7) **Atsushi Sato**, Sumie Yamamoto, Katsuhiko Ishihara, Toshio Hirano & Hisato Jingami, 'Novel peptide inhibitor of ecto-ADP ribosyl cyclase of bone marrow stromal cell antigen-1 (BST-1/CD157),' (1999) *Biochem. J.* 337, 491-496.
- 8) **Atsushi Sato**, Yoshimi Shimada, Joachim Herz, Tokuo Yamamoto & Hisato Jingami, '39-kDa receptor-associated protein (RAP) facilitates secretion and ligand binding of extracellular region of very-low-density-lipoprotein receptor : implications for a distinct pathway from low-density-lipoprotein receptor.' (1999) *Biochem. J.* 341, 377-383.
- 9) **Atsushi Sato**, Sumie Yamamoto, Naoko Kajimura, Masayuki Oda, Jiro Usukura & Hisato Jingami, 'Inhibitor peptide SNP-1 binds to a soluble form of BST-1/CD157 at a 2 : 2 stoichiometry.' (1999) *Eur. J. Biochem.* 264, 439-445

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始、ご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科 堀之内末治教授、東京大学先端科学研究センター 軽部征夫教授、池袋一典講師に心より感謝申し上げます。

本研究を実施するに際して、その機会を与えてくださり、貴重なご指導と多くのご教示を賜りました、京都大学名誉教授 生物分子工学研究所 志村令郎所長、生物分子工学研究所機能解析プロジェクト部門長 陣上久人博士に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり貴重なご指導を賜りました、大阪大学医学部 平野俊夫教授、石原克彦助教授、東北大学遺伝子実験施設 山本徳男教授、名古屋大学医学部 臼倉治郎助教授、テキサスサウスウエスタン医科大学 Joachim Herz 助教授、東レ(株)医療材事業部 中村春次博士に厚く御礼申し上げます。

本研究の実験及び解析にご指導とご援助を賜りました、生物分子工学研究所機能解析プロジェクト 島田良美氏、山本寿美枝氏、生物分子工学研究所構造解析プロジェクト 梶村直子氏、東京理科大学 生命科学研究科 織田昌幸博士、東レ(株)化成品研究所 風見潤博士、東レ(株)先端研究所 井田伸夫博士、福山真弓氏、三和敬史氏、キリンビール(株)医薬探索研究所 岡本智之博士、科学技術振興事業団 月田細胞軸プロジェクト 大津見枝子氏に心から感謝申し上げます。

また終始温かく見守り、御激励並びにご助言をいただきました、生物分子工学研究所、並びに東レ(株)先端研究所 医療システム研究室の皆様方各位に深謝いたします。

本研究の遂行、並びに本論文のまとめにあたり、終始ご激励賜りました、東レ(株)医薬研究所 佐藤奈穂子氏に厚く感謝いたします。