

β -ラクトグロブリンの構造と機能に関する
タンパク質工学的研究

片倉喜範

①

β -ラクトグロブリンの構造と機能に関する
タンパク質工学的研究

片倉喜範

目次

	ページ
緒言	1
第一章 部位特異的変異導入法による変異型 β -LGの作製	7-29
序	7
材料及び方法	11
結果	16
考察	25
第二章 変異型 β -LGの構造解析	30-80
序	30
材料及び方法	35
結果	39
考察	63
第三章 変異型 β -LGの機能解析	81-99
序	81
材料及び方法	84
結果	87
考察	95
第四章 変異型 β -LGの酵母における分泌量が、野生型 β -LGに比べて増大した原因に関する解析	100-139
序	100
材料及び方法	105
結果	116
考察	133
総合討論	140
参考文献	142-151
要約	152-156
謝辞	157

緒言

タンパク質のもつ機能は構造と密接に関わっており、タンパク質はそれぞれに特異的な立体構造を形成してはじめて機能することができる。それではそれぞれのタンパク質に固有な立体構造はどのように決定され、また保存されてきたのであろうか？

熱ショックタンパク質hsc70のATPアーゼドメインの立体構造は、アミノ酸配列上相同性のないヘキソキナーゼあるいはGアクチンの立体構造にきわめて酷似している(1, 2)。また酸素結合能という点で類似の機能を有するグロビン族のタンパク質(ヘモグロビン α 鎖、ヘモグロビン β 鎖、ミオグロビン及びレグヘモグロビン)は、ヘムを支えるアミノ酸以外のほとんどのアミノ酸が保存されていないにも関わらず、その立体構造は普遍に保たれている(3)。このようにアミノ酸配列に相同性が認められないようなタンパク質でも立体構造が非常に良く似ている場合がある。この事象を説明しうる仮説として次のようなものが考えられる。1) 同じ祖先型の遺伝子から進化してきた。2) 全く異なる祖先型の遺伝子から進化してきたが、立体構造の安定性を決める要因による制約から同じ構造に収斂した。後者の可能性はFinkelsteinらの提唱した”タンパク質の安定な立体構造は有限である”という説に基づいている(4)。最近ではこの考えから”inverse folding”つまり”ある特定のアミノ酸配列がとる立体構造を考える”のとは逆に”ある典型的な立体構造をとりうるようなアミノ酸配列はなにかを考える”ことに意味が求められている(5, 6)。さらにグロビン族の場合のように構造が機能との何らかの相関のもと保存されることもあり得る。つまり3) ある特定の機能発現に都合の良い立体構造が保存されたという可能性である。このような機能発現に直接関係している立体構造の例として、効率のよい機能発現に不可欠である立体構造を維持するために必要であると考えられている構造モジュール(モジュールとは球状ドメイン内部において

コンパクトな構造を形成しているセグメントをいう(7))あるいは機能発現に重要な特有の立体構造の維持に必要な共通配列であるEFハンド、ヘリックス・ターン・ヘリックス、Znフィンガー(8)などの”構造モチーフ”などを考えても良いだろう。機能と深く結びついた立体構造というもの現実には存在していると仮定することにより、類似の立体構造を有するタンパク質間でその機能が共有されていると考えることも可能である。例えば、hsp70の基質結合部位の立体構造は、主要組織適合抗原複合体クラスI (MHC class I) のペプチド結合部位の立体構造に似た構造であることが報告されている(9, 10)。上記の仮説をもとに考えると、未だ明らかとなっていないhsp70の基質認識機構がMHCクラスIの特異的ペプチド結合機構になぞらえて考えることが可能であることを示している。

このような機能発現に直接関連した立体構造の発見及び解明は、タンパク質工学的研究の最終的なゴールとされているタンパク質の*de novo*合成に対し多くの知見をもたらすこととなるであろう。これまでもコイルドコイル(11)、ヘリカルバンドル(12)、 β シート(13)あるいはTIMバレル(14)といった立体構造をもつタンパク質が*de novo*で創製されてはいる。確かに、インテグリン受容体への結合能を有するコイルドコイル(15)あるいはジチオスレイトール結合能を有する β シート(16)などの例はあるが、自由に目的の機能を付与させたタンパク質を合成することができるまでにはいたっていないのが現状である。そのため現時点では、タンパク質工学的手法を用い機能発現に対して何らかの役割を担っている立体構造の維持に重要な残基を同定するとともに、立体構造の変化がどのような機能上の変化を誘導するかあるいは立体構造の変化によりそのタンパク質の挙動がどのように変化しましたそのリガンドあるいは他のタンパク質による認識そして相互作用にどのような変化を誘導するかを詳細に解析し、機能発現と立体構造との密接な関係を明らかにする必要がある。

この観点から本研究では、8本の逆平行 β シートからなる β

バレル構造(樽状構造)を有し、また β バレル内に疎水性小分子を結合しうるとされているリポカリンファミリーに属するタンパク質である β -ラクトグロブリン(β -LG)に着目した。リポカリンファミリーに属するタンパク質は*in vivo*においては輸送タンパク質として機能しているものと考えられている。これまでに結晶化されたリポカリンファミリーのタンパク質としては、 β -LG(17, 18)、血清レチノール結合タンパク質(RBP)(19, 20)、インセクチシアニン(21)、ビリニン結合タンパク質(22)、major urinary protein(23)、 α -2u-グロブリン(23)、odorant binding protein(24)などが知られており、いずれのタンパク質もその特徴的な立体構造である β バレル構造を有することが明かとなっている。アミノ酸配列の相同性からは、 α -1-acid glycoprotein(25)、androgen dependent secretory protein(26)、アポリポタンパク質D(27)、aphrodisin(28)、human placental protein14(29)、 α 1-ミクログロブリン(30)、pyrazine-binding protein(166)などのタンパク質がリポカリンファミリーに属していると考えられている(Fig. 1)。報告されたほとんどのタンパク質でリガンドとしてレチノール、フェロモン、ホルモン、コレステロールなどの疎水性小分子が同定されている。唯一プロスタグランジンD合成酵素は、酵素活性を有するリポカリンとして知られている(31)。

リポカリンファミリーのアミノ酸配列の比較の結果(Fig. 1)、ほとんどのメンバーにおいて保存されている残基の存在が指摘されている(32)。 β -LGのアミノ酸配列をもとに残基番号を記載すると、N末近傍に存在する ^{17}Gly - ^{18}Xaa - ^{19}Trp 、C末近傍に存在する ^{97}Thr - ^{98}Asp - ^{99}Tyr 、 ^{124}Arg 、さらに ^{66}Cys と ^{160}Cys との間のS-S結合などが比較的良く保存されている。保存された配列 ^{17}Gly - ^{18}Xaa - ^{19}Trp 及び ^{97}Thr - ^{98}Asp - ^{99}Tyr はともに β バレルの底に位置していると考えられており(18)、 ^{19}Trp に相当するレチノール結合タンパク質中のTrp残基は疎水性クラスターを形成していると考えられている(19)。

b β -Lg: MKLLLAAL-ALYCGAQAALIVTQTRHGLDIOKVA...VYSLAMAASDI---SLLDAGSAPLRVYVYKFLPTPEIDLEI
pp14: MKLLLAALGVAVLVCVPPMDFIPTQKQLELFLKLA...RSHMAMATRIH---SLMAYLKAPLRVHITSLPPTFENHLEI
RBF: HENVMALVLLAAGQRIASERDCVSSIVYKHFDFKARF...GIAIAKDFDE---GLFLQDHI IAWFVSORHGIMHATAGR
INSEC: QDIYFYGYCFDVFVHGFPLSAPAF...GHIARLFLE---HEDQKCTIAEKYKVD-KFASVYNSFV
A1Mg: HRSGLGALLLLEACLAVRAGVYTFTHIIVQVGHFLES...TDLAIAISTYF---MKRIMDHWVSTVLGDEATEAFISM
OBP: M/VKLLVILVALGVYCAMHNLDISETSE...GKTLIVVADMF---FYAGDGSLEAFVQMGHGGDEQELKIIT
RBF: HVVHDGACFEVFKVIMFDKSHYH...GHEVAKYNS---VEKVGCMQAEYTFEG-KSVKVSNTYV
MuP: EAASSTRGNFVPEKIK...GHTIILASDRKE--KIENRNFPLRQIHVLEHNSLQVLFH
A2m: EAASSTRGNDVAFIK...GSIIVASNRKE--KIKENKSNVFMQHIIDLHNSLQVLFH
A1AG: QNFEPANITLGIITINTELKMLG...GTFMGAAFRDE--VFRQAVQTQTVEVFLTNLINSITIELR
AdsF: AVVDFDISEKFL...VEIAPASKMTTGLAHEEKSHAMVVKLKHLLALTTTY
ApoD: QAFHSGKCPVYVQSHVYVWVKY...GVEIEKIPPTF---EMRCKIQANYLSHNGKIKVNLG
Aphr: QDFAGLQ...GTTIVIAADNLE--KIEEGGLRFYFRHIDCVYKNSMSIET
PDS: MAALFHLMTGLVLGLLGLGFPQTPAQQDHTVQVNFQDQKFL...VYSAGLASNSGDFRE---KELLFMCQTVVAPSTEGOGLN
RBF: AQEKESRQHLSELS...GRTVYVIGSTNFE---KIQEGPFRVYVLDVDEKQTVDF

b β -Lg: LLQKWNDS...AQKKI IAKETKIP---AVFKIDA-----LHNSKVLVLD...GAKYLLFCHENSAA---PEQLVCCQLA
pp14: VLRHWNSN...VKKVLOGETNH---KFFKINVTY-----NHATLLE...DDDFPLCLEDDTT---PIQSMQOTLA
RBF: VELLSDMS...AMVGTTFEDFED---AKFMYKVVASPLQKQKQDIBHIT...GDFAFQVYSLRQHGKTCAGSYSPVFS
INSEC: SREY---VTHEGSELIATGAKYITKQKVTYTFEFG--QVFNREYVPL...RNTAYIYFKIDSH-DKRAHLSHAMLES
A1Mg: TSTHRSKQ...KETSDDAYEKTITD---DFLHNSDQSHITHE---SYVY...DEAIFALYKESSHHG--FTITAKLYG
OBP: FIVE-LDSE...GHTVYVQKGGDS---HYTDTYSG---RNYHVLV...GPIIFIRHNVNDES---GRQCIDLAVK
RBF: IHG---KVFYIAGTAYPADS---KIGKIVHRLTYG--GVTENVFFML...SKNVIIGYKYKDE-DKKHQDVEYVWVLE
MuP: TVR---DEL...SELSVADKTEKA---GEVSYTYG-----GHTFTI...GDFSLMMLHNSKE--GETFQMLGNYG
A2m: IRE---HSE...SELYLVAYKTFED---GEVYFVYD---GHTFTIL...GDRVYVPHLINFH--GETFQMLGNYG
A1AG: EFTQ-TDCC...VYVTHLQVREH---GTLKCALG-----ABE I FANL...VLEKHTFHLAFNLT---GDRHLSFYAE
AdsF: SE---HSE...VLEKVTATGGDP---AKFQVTLAS---GEKEVVV...ADLVYAIIDITSLVA--GAVRFTMLYLS
ApoD: EAD---GT...QNGLEGEATPVNLTFA---KLEVKFNFH---PSAPVIL...ADENYALVYSCSTCIQ--FHFDFMFLYS
Aphr: FYVI-TNKK...KETTIVGLKQNG---TVQTDFEG---NHIFQLV...HSDKVIYFNKMDRA---QGTDFMFLYVGE
PDS: TSTFLK...KETSVMVLPAGVFGQY---TNSFMHG---SFLHSV...HSDKVIYFNSKQTEG--GQDFMFLYVGE
RBF: YFVYKDKQ...KVTVMVFKATQDD---GTYVADYEG---QVFKIVSL...SRTHLVANNINVDH---QQTTELTELTV

b β -Lg: TPE-VDDEALEKFDKALKALPMHI-KLSFNPTLEED...RI
pp14: VLV-EDDEIMQGFIRAFRPLPHL-KYLLDLKQHEK...RF
RBF: DPMK---TETTRFLVYQKQKELCLERQVHRIENR...VSGRFSRNSL
INSEC: SKVLENDTKVYVRYLRTGCLIDASKFISNDFSEAL...VYSTTYSLTDGFRH
A1Mg: APO-LRKTLDQKRFVY-AGTGIPEGI-FMADRS...VQDSEFPELIFRVR
OBP: RED-LKAQAQKELRHLAEYHPIP---ENTQLVPTD...HQ
RBF: SKV-KTGEAKTAVENYLIQSPVDSQKLYSIFSKAA...AVN
MuP: EPD-LSSDIKEFPAQLCEHGIILR-ENIIDLNSANR...LQARE
A2m: TRD-LSSDIKEFARLCEAHGITS-ENIIDLTKDPL...LQARG
A1AG: EPD-LSELRKIFQQAQVVDGMD-ESIVFVYMTKDR...SEQQKQOLELEKTKKTKKDP
AdsF: SLD-DGSEALYHFKITSDNGFSE-TDLVYLKHLIT...KVLVQSAAESRP
ApoD: NPH-LPFTVVDLSLKNILTSNMIIV---KRMVTDQV...PKLS
Aphr: ONA-LTFEENELVQFAHEKKIFV-ENILMILATD...TFE
PDS: AQL-LKEELKEKFTYFSKDGQLTE-EDIVFLQFQFR...IQE
RBF: KLAVEDELEKFNKLTDEKIDKKNVFNLENNHPHPE

b β -Lg: bovine β -Lactoglobulin, pp14; human placental protein 14, RBF; retinol binding protein, INSEC; insecticysticanin, A1Mg; human ϵ_1 -microglobulin, OBP; rat otolymph binding protein, BPF; Biliin-binding protein, A2m; ϵ -2-microglobulin, A1AG; ϵ -1-acid glycoprotein, AdsF; androgen dependent secretory protein, ApoD; apolipoprotein D, Aphr; aphrodisia, PDS; prostaglandin D synthase, BPF; pyrazine-binding protein

Fig. 1 Sequence alignment of lipocalin family

また遺伝子構造も非常に似た構造を有していることが知られており(31), これら保存された残基は, エキソンとイントロンの境界に近い, 同じような位置にコードされていることが判明している(33).

本研究においては, タンパク質の構造及び機能の維持に対して, ある特定の残基が果たす役割を明らかにするため, 部位特異的変異導入法により変異型 β -LGを作製した(第一章). 部位特異的変異を導入する残基として, 本研究ではこれら保存された残基の中から β -LGの¹⁹Trpを選択した. この残基が, 特徴的な機能及び構造を有するリポカリンファミリー内で唯一完全に保存された残基であるとともに(Fig. 1), リポカリンファミリーと似た立体構造を有し, やはり疎水性小分子を結合するcellular retinoid/fatty acid binding proteinファミリーにおいても保存されていることから(19), その構造及び機能の維持に対して重要な残基であると考えられた. さらに, この残基がレチノールの結合に対して重要であるとする説と全く関与していないとする説の相反する二つの説が提出されており, この残基の機能維持における意義を, リポカリンファミリーではこれまで報告のない部位特異的変異導入法による新たな視点から明らかにすることを目的とした.

実際にその変異型 β -LGの構造及び機能が, 変異の導入に伴いどのように変化したか, 特に構造上の微妙な変化がどのような機能上の変化を引き起こすかについて詳細に解析した(第二章及び第三章). さらに変異型 β -LGの構造解析の手段として15種類の抗 β -LGモノクローナル抗体を用いることにより, 微細な構造変化を検出することが可能となり, 変異導入に伴う構造変化の程度あるいは構造変化を起こした領域に関して詳細な情報を得ることに成功した. これをもとにリポカリンファミリーの特徴であるその構造及び機能の維持に重要な残基の同定及び構造と機能との密接な相関関係を明らかにすることを試みた.

さらに変異型 β -LGで検出されたタンパク質としての属性

の変化が、*in vivo*における β -LGの機能にどのような影響を与えるかを解析することの一貫として、変異型 β -LGの酵母における分泌発現に焦点をあて研究を行った（第四章）。興味深いことに、ある変異型 β -LGではその酵母における分泌量が野生型 β -LGに比べ大幅に増大していることが見いだされた。一残基置換の導入に伴う微妙なタンパク質としての属性の変化に伴い、*in vivo*におけるそのタンパク質の挙動あるいは他のタンパク質との相互作用に変化が生じたことが示唆された。タンパク質としてのどのような属性の変化が、酵母細胞内におけるどのような挙動の変化を誘導し、あるいは他のタンパク質によるどのような認識の変化が生じ酵母における分泌量が変化したのか詳細に解析することを試みた。

序

部位特異的変異を導入する残基として、本研究ではリポカリンファミリーで唯一完全に保存された残基である β -LGの ^{19}Trp を選択した。この残基のレチノールとの結合に対する機能に関しては、X線結晶解析像をもとにした構造解析あるいは分光学的解析から様々に類推されてはいるが未だ結論はでない。またリポカリンファミリーと同じ様な立体構造を有するcellular retinoid/fatty acid binding proteinファミリーにおいても、この残基に相当するTrp残基が保存されており、 ^{19}Trp がリポカリンファミリーにおけるその特徴的な立体構造の維持に対して重要であると考えられた。そこでこの残基の構造及び機能維持における意義を、リポカリンファミリーではこれまで試みられていない部位特異的変異導入法により、新たな観点から明らかにすることを目的とした。

変異を導入する残基が ^{19}Trp と決定した時点で次に考えなければならないのは、どの残基に置換するかである。この際参考としたのは、各アミノ酸がタンパク質分子の構築に対する構造、機能の両面での寄与を総合した尺度として利用することのできる、立体構造既知のタンパク質群について集積されているアミノ酸置換傾向のデータである (Table1) (34)。これは、 β 構造、露出及び埋没領域に存在するTrpが、分子進化の中で許容されてきたそれぞれのアミノ酸への置換傾向を示している。さらに、アミノ酸選択の基準として、その側鎖の化学的性質 (官能基、電荷、水素結合能など) あるいは側鎖の大きさ、疎水性度と親水性度、二次構造の形成傾向なども考慮すべきである。それら一連の算出値をTable1に示した。これらの情報を鑑み、Trpに似た性質のアミノ酸としてPhe及びTyrを、あまり似ていない性質のアミノ酸の代表としてAlaを選択し以後の研究を行った。

	(34) #Replacement probability for Trp in β -sheet	for exposed Trp	for buried Trp	(35) %volume [A ³]	(36) eaccessible surface area[A ²]	(37,39,40) #hydrophobicity	(38) #hydration energy	(41) #tendencies for forming β -structure
Ala	0.014	0.033	0.020	88	113	1.8	1.54	0.83
Cys	0.000	0.001	0.003	108	146	2.5	-1.24	1.19
Asp	0.006	0.014	0.000	111	161	-2.5	-10.92	0.54
Glu	0.002	0.010	0.000	138	183	-2.5	-10.19	0.37
Phe	0.071	0.093	0.058	189	218	2.8	-0.76	1.38
Gly	0.049	0.041	0.005	60	85	-0.4	2.39	0.75
His	0.000	0.014	0.005	153	194	-3.2	-10.23	0.87
Ile	0.041	0.015	0.043	167	182	4.5	2.15	1.60
Lys	0.004	0.037	0.000	168	211	-3.9	-9.52	0.74
Leu	0.096	0.064	0.048	167	180	3.8	2.26	1.30
Met	0.006	0.004	0.014	162	204	1.9	-1.48	1.05
Asn	0.012	0.008	0.006	117	158	3.2	-9.68	0.89
Pro	0.018	0.018	0.000	122	193	-1.6	-	0.55
Gln	0.002	0.007	0.006	143	189	-3.5	-9.38	1.10
Arg	0.014	0.022	0.003	173	241	-4.5	-	0.93
Ser	0.014	0.025	0.005	89	122	-0.8	-5.06	0.75
Thr	0.008	0.021	0.002	116	146	-0.7	-4.88	1.19
Val	0.027	0.023	0.014	139	160	4.2	1.99	1.70
Trp	0.559	0.421	0.731	227	259	-0.9	-5.89	1.37
Tyr	0.051	0.109	0.037	193	229	-1.3	-6.11	1.47
-	0.004	0.021	0.002					

Table 1 Replacement probability for Trp residue (a) and chemical/physical properties of amino acids (b-f)

部位特異的変異導入法としてもっとも良く用いられているのは、変異部位を含むオリゴヌクレオチドと変異を導入したいタンパク質の遺伝子の全部あるいは一部が挿入された一本鎖鎖型DNAをアニーリングさせた後、T4DNAリガーゼの存在下DNAポリメラーゼを用いて二本鎖を形成させ、大腸菌に導入後、野生型と変異型を選択するという方法である(42)。しかしこの方法は、目的の変異体を得る効率が非常に低いという欠点があり、変異導入効率を上昇させるために様々な改良法が報告されている。例えば、gapped duplex法(43)、Kunkel法(44)、ダブルプライマー法(45)などであるが、その中でも、Eksteinらにより考案された方法(46) (oligonucleotide-directed *in vitro* mutagenesis: Amersham) は、その高収率と簡便さから現在では多くの研究者により利用されており、本研究においてもこの方法に基づき変異型 β -LGの作製を試みた。

大腸菌は、タンパク質工学の分野において異種タンパク質の大量生産を行う場合宿主として良く用いられている。しかしこの場合、組換え型タンパク質は往々にして細胞内に不溶性の封入体 (inclusion body) として生産され、精製操作と同時に unfolding/refolding 操作を行い、もとの立体構造を保持した組換え型タンパク質を得る努力がなされている。しかし、 β -LGにおいては、一度変性させるといかなる再生操作を経ても β -LGの特定の領域において完全な refolding が起こらないことが確認されている(47)。このように、多少なりとも天然型タンパク質と構造の異なるタンパク質を題材として、タンパク質の構造と機能の相関を詳細に解明することには限界があるものと考えられた。そこで、天然型タンパク質と限りなく近い構造を有した組換え型タンパク質を得るには、そのタンパク質を細胞外へ分泌させることが理想であると考え、本研究では、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (AH22株) を宿主として選択した。

酵母における分泌発現を行う発現ベクターとしては、 $2\mu\text{m}$ の複製起点を有する多コピー型プラスミド pYG100 を用いた。

pYG100は、解糖系遺伝子であるグリセルアルデヒド3'リン酸脱水素酵素のプロモーターをもち、このプロモーターはホスホグリセリン酸キナーゼやアルコール脱水素酵素のプロモーターと同様に強力な転写活性を有するものとして知られている。

また酵母において、異種タンパク質を分泌発現するために必須であるとされているシグナルペプチドは、 β -LG自身が分泌タンパク質であることから、 β -LG自身のシグナルペプチドを用いて分泌発現を行った。

当初の目的により、変異型 β -LGをできる限り穏和な条件により精製することを心がけた。ここで作製した変異型 β -LGは、変異の程度がそれほど大きくないので、その精製法は基本的に変異を導入していない野生型 β -LGの精製法に準じて行うこととした。厳密には、1残基置換によってもタンパク質の構造はわずかな変化を起こしており、その構造の差が精製過程において大きな挙動の変化となって現れることも否定できないが、野生型 β -LGの挙動を参考に、変異型 β -LGの挙動を注意深く観察することにより克服可能であると考えた。

材料及び方法

ウシ β -ラクトグロブリン (β -LG) —

天然型ウシ β -LG (遺伝変異体A)、還元カルボキシメチル化 (RCM) β -LGはArmstrongの方法に基づき調製した(48)。ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE)、あるいはSDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) により単一に精製されていることを確認後、以下の実験に使用した。 β -LGの還元カルボキシメチル化は、アミノ酸分析により確認を行った。 β -LG及びRCM β -LG溶液の濃度は、吸光係数 $\epsilon_{278}^{278\text{nm}}$ (278nm)=9.6 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ を用いて算出した(49)。

酵母及び培地—

酵母は *Saccharomyces cerevisiae* AH22株 (Mata, Leu2-3, Leu2-112, his4-519, can1) を用いた。AH22株は東大工学部・熊谷泉博士より譲り受けた。Leu⁺の形質転換体の選択には、0.67% yeast nitrogen base (アミノ酸不含有) (Difco, Detroit, MI)、10%ブドウ糖、0.5%硫酸アンモニウム、0.1%リン酸二カリウム、0.05%硫酸マグネシウム、0.05%塩化カリウム、0.002%硫酸第一鉄及び40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ L-ヒスチジンを含む合成最少培地 (YMM) を用いた(50)。酵母の形質転換時に用いる酵母完全培地 (YPD) の組成は、2% Bactopecton (Difco)、1% yeast extract (Difco)、2% ブドウ糖とした。

部位特異的変異導入法—

部位特異的変異導入法は、Ecksteinらの方法(46, 51)に基づき、oligonucleotide-directed *in vitro* mutagenesis kit (Amersham, Buckinghamshire, UK) を用いた。変異導入用オリゴヌクレオチド (23mer) は Applied Biosystems (Foster City, CA) model 391PCR-MATE DNA合成機を用いて合成した。¹⁹TrpをAla (W19A)、Phe (W19F)、Tyr (

W19Y) に置換するための変異オリゴヌクレオチドはそれぞれ以下のものを用いた。

Ala: 5'-CCGCCCTGACGCATGAGGAACC-3'

Phe: 5'-CCGCCCTGAAAGATGAGGAACC-3'

Tyr: 5'-CCGCCCTGAAATGATGAGGAAGG-3'

野生型との間で生じるミスマッチは下線により示した。

鋳型となる野生型 β -LGに相当する一本鎖DNA (ssDNA) は、M13KO7をヘルパーファージとして用い、pBB29により調製した(52)。変異オリゴヌクレオチドの5'-リン酸化は、50 pmolの合成変異オリゴヌクレオチド、10X T4ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液3 μ l、滅菌水25 μ l、10 mM ATP1 μ l及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ1 μ l存在下、全量30 μ lにて37°C 15分間行った。70°Cで10分間加熱し反応を停止させた。次にこの5'-リン酸化オリゴヌクレオチドを鋳型のssDNAにアニールさせた。アニールは、ssDNA 5 μ l、リン酸化変異オリゴヌクレオチド (~1.6 pmol/ μ l) 2.5 μ l、キットに付属の緩衝液1を3.5 μ l、滅菌水6 μ lを加え、70°C3分、さらに50°C3分間で行った。水中に10分間静置しアニールを安定化させた。ここに、塩化マグネシウム溶液5 μ l、dCTP α Sを含んだヌクレオチド混合液1を19 μ l、滅菌水を6 μ l、更にKlenow断片1.5 μ l、T4DNAリガーゼ2.4 μ lを加え16°Cで12時間静置することにより、変異DNAストランドの合成及ライゲーションを行った。これにより、野生型と変異型のハイブリッド二本鎖が合成された。次に、キットに付属のフィルターにより二本鎖の合成が不完全な一本鎖DNAを除去した。二本鎖DNAをエタノール沈殿後、真空乾燥し25 μ lの緩衝液2に溶解した。その10 μ lに65 μ lの緩衝液3及びdCTP α Sの導入された鎖を切断することのできない制限酵素NciI 0.625 μ lを加え、37°Cで90分間反応させることにより、野生型の鎖にニックを入れた。緩衝液4及び滅菌水で希釈したエキソヌクレアーゼIII 2 μ l、0.5 M 塩化ナトリウム及び緩衝液4を10 μ lを加え、37°Cで30分間反応させることにより、ニックの入った野生型の鎖を部分的に消化した。

70℃で15分間加熱することにより酵素を失活させた。部分消化したDNA (ギャップDNA) に、dCTP α Sは含まないヌクレオチド混合液2を13 μ l、塩化マグネシウム溶液5 μ l、DNAポリメラーゼI 0.86 μ l及びT4 DNAリガーゼ0.8 μ lを加え、16℃で3時間反応させることにより部分消化された野生型の鎖を、変異型の鎖を鋳型として再合成させ、変異型DNA二本鎖を合成した。エタノール沈殿により、未使用のヌクレオチドを除去し、dCTP α Sを含んだDNAでも容易に形質転換可能であるとされている大腸菌TG1株を形質転換した。得られた形質転換体のうち、正しく変異が導入された確率は約85~90%程度であった。

変異型cDNAの塩基配列は、Sequenase ver.2.0 kit (United States Biochemical社, Cleaveland, OH)を用い、マニュアルに従いサンガー法により確認した。酵母発現ベクターへの挿入法は、野生型 β -LG発現ベクター (pYBSS1) の作製法に準じて行った。つまり作製した変異型cDNAは、SacIとSmaIによる切断後、T4 DNAポリメラーゼにより平滑末端化した。酵母発現ベクターpYG100は、グリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素 (GAPD) のプロモーター及びターミネーターを有し、そのクローニング部位であるSall部位を平滑末端化し、先の断片を挿入することにより、変異型 β -LG発現プラスミド、pYBW19A (¹⁹TrpをAlaに置換した変異型 β -LG作製用)、pYBW19F (¹⁹TrpをPheに置換した変異型 β -LG作製用)およびpYBW19Y (¹⁹TrpをTyrに置換した変異型 β -LG作製用)を作製した(52, 53)。

酵母の形質転換

酵母の形質転換は、アルカリ金属法により行った(54)。単一コロニーからOD₆₆₀が1.0になるまで、30℃にて坂口プラスチックを用いて培養し、そのうちの一部をとり遠心分離後、滅菌水にて洗浄した。その菌体には0.5 mlの滅菌水と0.5 mlの0.2 M酢酸リチウムを加え、30℃にて一時間振盪培養した。培養後、

100 μ lずつ分注し（コンピーテント細胞），そこにDNAを約10 μ g加えた。30℃にて，30分間培養後，60%ポリエチレングリコール4000を100 μ l加え，よく攪拌しさらに30℃にて一時間培養した。42℃，5分間の熱処理後，滅菌水で2回洗浄し，YPDにてピベッティングにより懸濁し，30℃で一時間培養した。培養後，遠心分離にてYPDを除き，YMM（ヒスチジン含有）100 μ lにて，ピベッティングにより懸濁し，ヒスチジン含有YMM寒天培地にプレーティングした。

野生型及び変異型 β -LGの精製

形質転換した *S. cerevisiae* を，3 mlのYMM液体培地に植菌後30℃で4日間培養し，10 lまでスケールアップした。スケールアップ時は，前培養液の約2%程度を植菌することとした。10 lの培養液を遠心分離（5000 x g，15分），ろ過（ポアサイズ：0.8 μ m）後，上清を回収し，ペリコンラボカセット（ペリコン膜：PTGC 0LC M2，公称分子量限界10000，Millipore, Bedford, MA）を用いた限外ろ過により20倍濃縮した。さらに2 lの0.05 M イミダゾール緩衝液（pH 6.7）を用いたダイアフィルトレーションにより16倍に希釈した。この溶液を0.05 M のイミダゾール緩衝液（pH 6.7）で平衡化したDEAE-Sephacel（Pharmacia, Uppsala, Sweden）カラム（2.5×15cm）に供した。カラムを3ベッド体積のイミダゾール緩衝液で洗浄後，0から0.5 M NaClを含んだイミダゾール緩衝液の直線勾配で溶出を行った。野生型あるいは変異型 β -LGを含む画分は，脱イオン水に対して透析後，凍結乾燥を行った。この凍結乾燥物をリン酸緩衝生理食塩水（PBS：0.11 Mリン酸，0.4 M NaCl，0.02% Na₃N，pH 7.1）に溶解後，TSKgel G3000SW_{XL}（トソー，東京）を用いたサイズ排除高速液体クロマトグラフィー（HPLC）に供した。展開はPBSを用い，流速0.5 ml/minで行った。 β -LGを含む画分を透析後，透析乾燥し-20℃にて保存した。各精製過程において， β -LGを含む画分の検出はサンドイッチ酵素免疫測定法により行った。

サンドイッチ酵素免疫測定法 (サンドイッチELISA法) -

溶液中の β -LGの定量及び検出はサンドイッチELISA法により行った(52)。マイクロタイトレーションプレート (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) を2 mg/mlの抗 β -LGモノクローナル抗体 (mAb) 62A6で固相化後、天然型あるいは組換え型 β -LGを含む溶液を加え、室温で二時間静置した。固相化mAb 62A6に結合した β -LGは、アルカリフォスファターゼ (ALP: タイプVII-S, Sigma, St. Louis) 標識した抗 β -LG mAb 61C1(55)により、その基質である

-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムと反応させることで検出した。正しくフォールディングした β -LGの濃度は、ELISA値 (A_{405}) と天然型 β -LGの濃度の対数値をプロットすることにより得た濃度依存曲線をもとに決定した。

野生型及び変異型 β -LGの精製度の評価 -

以上の方法により精製された野生型及びW19Yの精製度を、逆相カラムを用いたHPLC及びSDS-PAGEを行ったゲルのCoomassie brilliant blue染色により確認した。

逆相カラムとしては、Vydac C18 protein&peptideカラム (Separations Group, Hesperia, CA) を用いた。溶媒としては、アセトニトリル-0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) 系を用い、アセトニトリルの0-80%への直線勾配により分離を行った。検出は、280nmにて行った。

SDS-PAGEはLaemmliらの方法に(56)に基づき、還元条件下にて行った。

結果

部位特異的変異導入法による変異型 β -LG cDNAの作製

15 TrpのAla, Phe及びTyrへの置換の方法として、本研究ではoligonucleotide-directed *in vitro* mutagenesis kit (Amersham)を用いて行った。このキットを用いた場合のアニール推奨温度は37°Cであったが、変異導入部位近傍に、変異導入プライマーと相同性のある領域が存在していたため、ここでは50°Cで行った。この方法による変異導入効率は、double-primer法などと比べて格段に高く85~90%程度であった。

ここで作製した変異型 β -LG cDNA, pBBW19A, pBBW19F及びpBBW19Yを平滑末端化した後、酵母発現ベクター(pYG100)に挿入した(Fig. 2)。それぞれの断片が正しい方向で挿入されているかは、PstIとHindIIIによる二重切断あるいはPstIとXbaIによる二重切断により確認した(Fig. 3)。

野生型及び変異型 β -LGの酵母による生産と大量培養液からの精製

野生型及び変異型 β -LG DNA 10 μ gによる、*S. cerevisiae* AH22株の形質転換の結果、約100ぐらいのコロニーが出現したが、野生型、変異型 β -LG間でその数に差はなかった。しかし、コロニーの出現する速度に差がみられ、W19Aの出現速度が野生型及び他の変異型 β -LGに比べ再現性良く速かった。

野生型及び変異型 β -LG精製のため、それぞれのcDNAを含むベクターにより形質転換した酵母を液体培地にて培養し、10 lまでスケールアップした。この培養液を遠心分離後、限外ろ過により濃縮した。損失をなくすため、このろ液をそのままイオン交換クロマトグラフィーに供することも試みたが、濃縮による塩濃度の上昇のためか、陰イオン交換樹脂であるDEAE-Sephacelへの吸着が起きなかったことから、ダイアフィルトレーション(57)によりイミダゾール緩衝液に対して希釈を

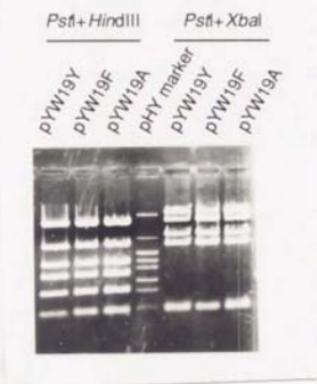


Fig. 3 Restriction endonuclease digestions of *pYW19Y*, *pYW19F* and *pYW19A*

行い、陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。野生型あるいは変異型 β -LGの陰イオン交換クロマトグラフィーによる画分により (Fig. 4)、それぞれの β -LGはいずれも同等のイオン強度 (約0.3 M 塩化ナトリウム) にて溶出された。また酵母由来の夾雑タンパク質のピークとは離れた位置で溶出されたことから、それら多くの夾雑タンパク質の除去には、どの β -LGについても成功していると考えられた。しかしW19Yを除き、絶対量としては吸光値でほとんどピークとして観察されない程度の量であり、さらに夾雑タンパク質の混入が考えられたため、他の手段による精製の必要があった。野生型、W19A及びW19Fの A_{280} 及びELISA値のプロファイルはどれも似通ったものであったが、W19Yのプロファイルでは、かなり多量のW19Yが溶出されたことを示していた。これは、W19Yが野生型に比べて酵母における発現量が5倍以上上昇していたという結果と合致していた (第四章)。なぜ、W19Yの発現量が野生型に比べて上昇したのかについては後の章で触れることとする。

サンドイッチELISA法により検出された、野生型及び変異型 β -LGを含む画分を透析・凍結乾燥後、更なる精製のためサイズ排除クロマトグラフィー (TSKgel G3000SW_{XL}) に供した。展開緩衝液としては、カラムへの吸着を防ぐためPBSを用いた。野生型及び変異型 β -LGをこのカラムに供した結果、いずれの β -LGに関しても、保持時間約20分で溶出されてきた (Fig. 5-peak 5)。ここでも、 β -LG以外に様々なピーク (peak 1, 2, 3, 4, 6) が観察され、夾雑タンパク質からの分離がこのカラムにより可能であることが示された。このプロファイルからもわかる通り、野生型及びW19Yは精製後十分量のタンパク質量が得られたが、W19AやW19Fではかなり少なかった。構造及び機能解析を行うためにはミリグラム単位の変異体タンパク質が必要であることから、後の解析では変異体タンパク質としてはW19Yを代表として用いることとした。得られた画分は、透析・凍結乾燥後 -20°C において保存し、後の実験に用いた。

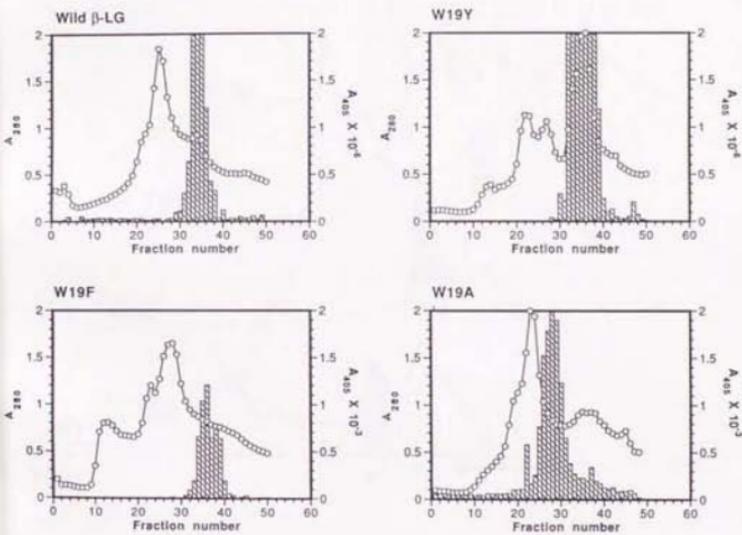


Fig. 4 Profiles of ion-exchange chromatography
of wild and mutant β -LGs
 A_{280} : circles, A_{405} : Bars

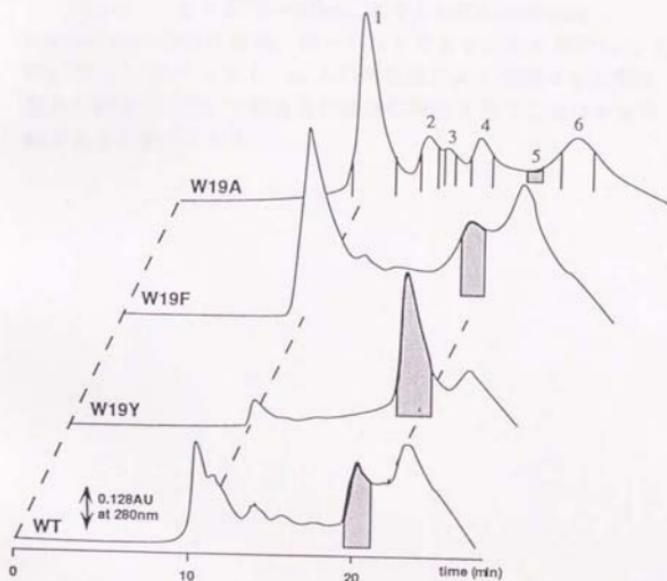


Fig. 5 Profiles of size-exclusion chromatography using TSKgel G3000SW_{XL}

野生型及びW19Yの精製度の確認

野生型及びW19Yの精製度の確認のため、Vydac C18 protein&peptideカラムを用いた逆相HPLCに供した結果、野生型 β -LG及びW19Yともほぼ同じ保持時間で単一ピークを示し (Fig. 6)、またSDS-PAGEによるゲルのCoomassie brilliant blue染色の結果、単一バンドであることが判明した (Fig. 7)。このことから、以上の精製法により精製された野生型及びW19Yを用いて構造及び機能の解析を行うことは十分可能であると考えられた。

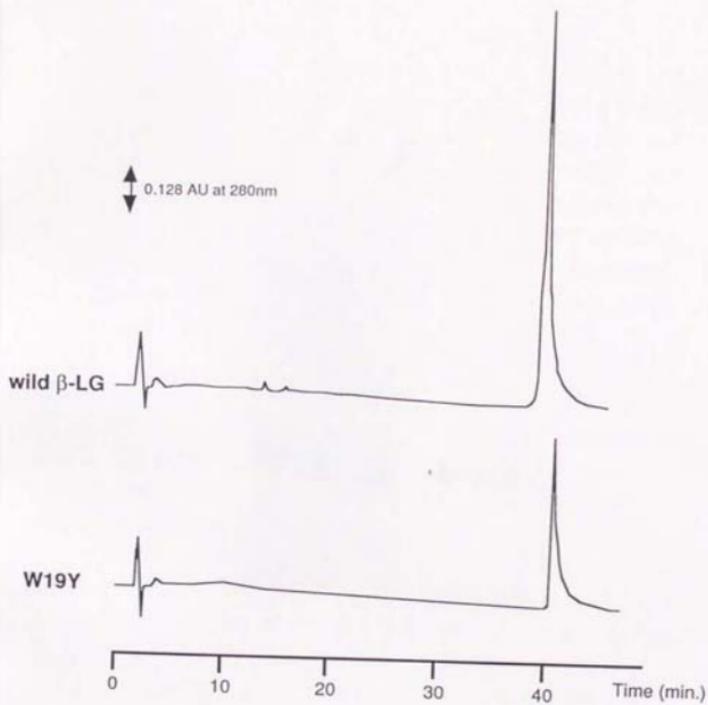


Fig. 6 Profiles of reverse-phase HPLC with a Vydac C18 protein & peptide column

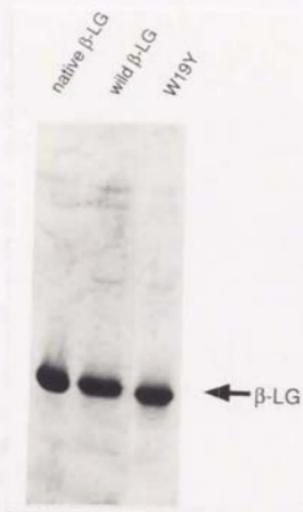


Fig. 7 Wild β -LG and W19Y were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (15% acrylamide)

考察

酵母を用いた変異型タンパク質生産一

これまでに酵母を宿主として用いた、組換え型タンパク質の生産については数多くの報告がなされている。天然型タンパク質とできる限り近い構造をもつ野生型タンパク質を得る目的で、本研究では酵母を宿主として選択したが、変異型タンパク質(W19FやW19A)では分泌量が大きく減少していた。これは、変異の導入に伴う変異型タンパク質上に生じた微妙な構造変化により、酵母細胞内で異常なタンパク質となり分泌が不能になったものと考えられた(第四章)。このため、構造維持に対して何らかの機能を有する残基を置換した場合には、その変異型タンパク質が酵母により分泌されなくなることがあることを留意しなければならない。その点だけを考えると、どのような変異型タンパク質でも原理上は生産可能である大腸菌の系は、様々な変異型タンパク質を作製したい場合には試みる価値があるものと考えられた。

さらに本研究と同じグリセルアルデヒド3'リン酸脱水素酵素のプロモーターを用いて分泌発現を試みた例として、ブタホスホリパーゼA₂(58)、植物由来のプレタウマチン(59)、ニワトリ卵白リゾチーム(53)などが知られている。野生型タンパク質の場合、その分泌発現量はブタホスホリパーゼA₂で約1.9 mg/lであり、本研究における野生型β-LGの分泌発現量(0.89 mg/l)はほぼ同等のレベルのものであることが判明した。しかし、アルコール脱水素酵素プロモーターを用いたマウス顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)の分泌発現量は50 mg/l、同様のプロモーターを用いたウシインターロイキン2では60 mg/l、さらにホスホグリセリン酸キナーゼプロモーターを用いたヒト神経成長因子では5 g/lもの分泌発現量が観察されている。その分泌発現量が、プロモーターの選択に左右されるのか、タンパク質自身の有する性質に左右されるのかは明らかではない。このことを明らかにし、物質生産法を確

立するためには様々な系により分泌発現を試みる事が重要であると考えられる。

変異型 β -LG の精製

野生型及び変異型 β -LG cDNA を含む各発現プラスミドにより形質転換を行った酵母を大量培養 (10 l) し、野生型 β -LG を酵母培養上清中から精製する方法に準じて変異型 β -LG の精製を試みた。つまり遠心分離・濾過後の培養上清を限外ろ過により20倍濃縮した。さらにイミダゾール緩衝液にて希釈後、陰イオン交換カラムに供した。塩化ナトリウムの直線勾配により溶出し、 β -LG を含む画分を透析・凍結乾燥後、サイズ排除クロマトグラフィーに供した。 β -LG を含む画分を透析・凍結乾燥することにより精製標品とした。

これまで、野生型 β -LG の精製法として抗 β -LG モノクローナル抗体を用いたアフィニティーカラムによる方法や培養上清を透析後、凍結乾燥し、体積を大幅に減少させてから以上のような精製を行う方法を試みた。アフィニティーカラムを用いた方法では、上記の方法により精製したものに比べて、精製した野生型 β -LG の構造が部分的に変性してしまっていることが確認された。これはアフィニティーカラムに吸着した β -LG の溶出のためになりに厳しい条件にさらされることにより、 β -LG の立体構造の一部に破綻が生じるためであると考えられた。このことから、 β -LG に関してはなるべく穏やかな条件で精製を行う必要があることが示された。また、実験操作上の扱い易さを考え、凍結乾燥によりまず体積を減らしてから精製を行うことも試みたが、大量の培養上清 (10 l) を完全に透析することは困難であり、透析乾燥後の標品中に多量の塩が残存していることが判明し、残存する高濃度の塩によるタンパク質の構造への影響が考えられたことからこの方法による精製も断念せざるを得なかった。

これらの点を踏まえて前述の方法により野生型及び変異型 β -LG の精製を試みた結果、野生型 β -LG では2 mg程度、

W19Yでは15 mg程度の精製標品が得られた。ところが、W19FやW19Aでは最終的な段階まで精製を進めると、その精製標品量は極めて少量であった。これはそれら変異型 β -LGの酵母における発現量自体が減少したためと考えられ、それと同時に変異を導入したことに伴う β -LGとしての挙動の変化により、野生型 β -LGと同様の方法では効率よく精製されないためであると考えられた。構造及び機能の解析のためには、ミリグラム単位のタンパク質量が必要であることから、以下の実験では、野生型 β -LG及び変異型 β -LGとしてはW19Yをその代表として用いることとした。

それぞれの β -LGの精製度を、SDS-PAGEを行ったゲルのCBB染色及び逆相カラムを用いたHPLCにより確認した。野生型 β -LG及びW19Yともいづれも95%以上の純度であると判断され、ここで精製された野生型 β -LG及びW19Yを用いて構造及び機能の解析を行うことは十分可能であると考えられた。

変異型タンパク質を生産する宿主としての酵母：その利点と欠点

酵母に関しては発酵工学及び培養工学的知見の蓄積が豊富で、さらに近年では膨大な遺伝学的知識を背景にして細胞学的、分子遺伝学的な解析が進み、大腸菌を用いる場合とほぼ同様の手法で物質生産に利用できる状況となってきた。また、高等真核生物由来のタンパク質を用いてタンパク質工学的研究を行う際、できる限り天然型タンパク質と同等の構造を保持した組換え型タンパク質を得るということを重視すると、細胞内構造、代謝経路、分泌経路、タンパク質の修飾などが高等生物と酷似しているという点から、酵母が宿主として選択されることが多い。

しかし、酵母細胞内におけるタンパク質分泌経路の複雑さから、導入する変異によっては異常なタンパク質として認識され、上清中に分泌されなくなる場合がある。この点は、タンパク質工学的研究を行う際に致命的な欠点となりかねない問題で

ある。このように変異導入に伴い分泌されなくなる場合、あるいは変異型タンパク質を大量に必要とする場合には、大腸菌を宿主として用いた系を試みる価値があると考えられる。最近では、大腸菌を用いた発現系も改良が加えられ、直接遺伝子を発現させるばかりでなく、ヒト成長ホルモンN末端側139アミノ酸残基(60)やインファージCII (N末端30アミノ酸残基) (61)などとの融合タンパク質として発現させる方法、 β -ラクタマーゼ(62)、アルカリホスファターゼ(63)あるいは外膜タンパク質OmpF(64)などのシグナルペプチドを発現させたいタンパク質のN末に挿入して、大腸菌の菌体外に分泌させる方法、あるいはタンパク質のN末にヒスチジンのクラスターを挿入し、ニコラムに通すことで簡便に目的のタンパク質を精製することができる方法(65)など様々な方法が考案されている。

しかし大腸菌を用いた組換え型タンパク質の生産では、産物への糖鎖付加や遺伝子イントロンの除去が起こらないことが問題となる。そこで最近ではバキュロウィルスを用いた昆虫細胞での組換え型タンパク質の大量生産が注目されている。また遺伝子を動物細胞に導入し発現させる技術の進歩から、動物細胞を用いた組換え型タンパク質の生産も試みられており、レセプターなどの発現クローニングのための手段として確立され、多くの成果が報告されている。しかしこれら培養細胞を用いた場合には、その培養に血清を用いることからどうしても費用がかさむことは無視することのできない欠点である。

また、*in vivo*では発現不能なタンパク質の調製手段として連続式無細胞タンパク質合成系も注目されている。mRNAを添加してタンパク質合成を行う無細胞系は、Nirenbergらにより大腸菌抽出液を用いて初めて報告された(66)。その後、コムギ胚芽、ウサギ網状赤血球から調製される無細胞系が確立され市販もされている。しかし、これらの無細胞系では翻訳反応時間が短く、合成されるタンパク質量も微量でありタンパク質の調製手段というよりは、翻訳あるいはプロセシング機構の解析に用いられてきたにすぎない。最近、Spirinらにより報告された

連続式無細胞タンパク質合成系では、タンパク質合成で消費されるアミノ酸やエネルギー源などの基質を連続的に反応槽へ供給すると同時に、生成タンパク質などを限外ろ過膜を通して系外へ取り出すことにより連続的にタンパク質の合成を行うことに成功している(67)。この方法により、ファージタンパク質、カルシトニン、ジヒドロ葉酸レダクターゼなどの酵素やグロビンなどを反応系1 mlあたり50 μ gから4 mg合成できたことが報告されている(68, 69)。基礎研究には応用範囲の広い技術として今後の進展が期待される。

このように組換え型タンパク質の生産手段には様々な系があるが、目的に応じ使い分けることが重要である。

序

タンパク質の機能は、その構造と密接に関係している。変異型タンパク質を作製し、特定残基の有する機能的意義を明らかにするためには、導入した置換が構造に対して及ぼす影響についてできる限り詳細にかつ正確に把握する必要がある。このためタンパク質の構造を解析する場合、2次構造含量を指標として評価するCDスペクトルの測定では、全体としての傾向は把握できるが、それぞれの残基の正確な位置さらには変異の導入に伴う微妙な構造変化及びその変異の影響が立体構造上どこまで及んでいるかというようなそれぞれの残基レベルでの情報は得られない。そのため、タンパク質工学的研究を行うためには原子レベルでの構造解析技術を駆使し、得られた情報をもとに構造と機能の相関を明らかにしていく必要がある。

タンパク質の立体構造を決定するための有力な手段としてはX線結晶構造解析及び核磁気共鳴(NMR)が知られている。タンパク質の立体構造解析に対する研究方法は両者で大きく異なっており、X線結晶構造解析では、タンパク質分子全体の大まかな構造から出発し、その後精密化を繰り返して微細構造を明らかにしていくのに対して、NMRではプロトン同士の近距離情報を数多く積み上げて、タンパク質分子全体の構造を明らかにしていくという点で対照的である。X線解析には結晶化という難関があり、溶液中のタンパク質から直接データが得られるNMRはこの点で優れていると考えられる。しかし現段階ではNMRは対象が分子量20000以下の分子に限られているため(70, 71)、構造解析の分解能あるいは精度という点ではX線解析がやや有利であると考えられている。この点を改良すべく最近では、 ^{15}N や ^{13}C などの安定同位体で標識したアミノ酸を特異的にタンパク質に取り込ませることにより確実にアミノ酸タイプの同定を行う方法、甲斐荘らにより報告された ^{13}C - ^{15}N 二重

標識法(72)あるいは安定同位体を均一に取り込ませ、安定同位体の化学シフトに従ってプロトンシグナルの編集を行う三次元NMRなどの開発により高分子量タンパク質の解析がある程度は可能となってきた(73-75)。

これらの方法を用いることにより、部位特異的変異導入法により作製された変異型タンパク質において認められる安定性の変化あるいは構造変化を説明しうるかという点とは限らない。X線結晶解析の結果から、溶液論的解析結果を定量的に解釈するのは一般的に難しく、アミノ酸置換により安定性が変化しても、X線結晶解析の結果からそのエネルギー変化を説明することは難しい。NMRでは、H、C、Nなどの各原子の磁気的環境を知ることができるので、アミノ酸置換による立体構造変化を検出する感度はNMRの方が高いが、NMRで検出できる変化がどのような立体構造変化に対応するかを見極めることは容易ではない。またそれぞれ、解析に要するタンパク質量は、X線結晶解析で10~100 mg、NMRで5~50 mg/mlとかなり大量にあるいは高濃度に必要であることも、これらの解析法を試みる際の制約となりうる。

そこで我々は、少量のタンパク質量で、高感度に、再現性良くタンパク質上に生じた構造変化、つまりアミノ酸置換により生じる微妙な構造変化を検出するための手段としてモノクローナル抗体(mAb)を用いることを考えた。これまでの研究から、熱変性した β -LGの構造をmAbをプローブとして用いて解析することにより、 β -LG分子上で、熱変性に対して構造変化を起こしやすい領域あるいは起こしにくい領域の同定を行っている(48)。また最近、一度変性させた β -LGをあらゆる方法で再生させても、ある特定の領域だけはrefoldingしえないということをmAbを用いて示し、分光学的性質あるいは生物活性などの変化としては現れないような微細な構造変化をmAbによって検出することに成功している(47)。

これまでも、チトクロームc(76)、アルカリホスファターゼ(77)、インターロイキン3(78)、HLA-A2(79)、influenza

virus hemagglutinin(80)あるいはStaphylococcal nuclease(81)などのタンパク質の構造解析の手段としてmAbが用いられてきている。いずれのタンパク質においても、mAbをプローブとして用いた構造解析法は、CDなどでは検出することのできない局所的で微細な構造変化を検出する有効な手段とされている(82)。タンパク質工学的手法を用いて作製した変異型タンパク質の解析においては、変異を導入した残基周辺ばかりでなく、一次構造上はなれた領域にまでその残基置換の影響が及び構造がわずかに乱れていることが確認されている。このように、mAbを用いた構造解析においては、特定領域の構造に関して高感度な情報が得られるということが特徴であると考えられる。

一般にmAbは抗原となるタンパク質の立体構造、つまり立体構造上ある特定の位置関係に存在するエピトープを認識している。ある条件により、タンパク質が完全に変性しないまでも構造変化を起こし、そのエピトープを形成する残基の空間配置が乱れると、mAbとタンパク質の親和性は変化を示す。そこで観察された微妙な親和性の変化を追跡することにより、そのエピトープ近傍の立体構造が変化したかどうかを判断することができる。具体的にいうと、これらmAbをプローブとして用いるタンパク質の構造解析の指標となるのは、天然型タンパク質に対するmAbの親和性と比較した場合の、構造を調べたいタンパク質に対するmAbの親和性の変化である。この親和性が天然型タンパク質に対するmAbの親和性と同等であれば、そのmAbの認識するエピトープ近傍の構造は天然型タンパク質と同等に保たれているものと考えられる。もしこの親和性が天然型タンパク質に対するものとは明らかに異なり、変性したタンパク質に対する親和性に近いような場合には、その領域の構造は変性しているものと判断することができる。この判断は、天然型タンパク質に対するmAbの親和性と変性したタンパク質に対するmAbの親和性は異なるという仮定のもとに成り立っている。実際大抵のmAbは天然型タンパク質と変性したタン

バク質を区別し、それぞれに対する親和性は異なっており、たとえその親和性の差が小さくても実験条件を検討することにより結果的に大きな差として観察することも可能である。それに加え、抗原-抗体反応つまりはタンパク質-タンパク質相互作用の鋭敏さから、mAbを用いた構造解析の高感度さは成り立っているものと考えられる。

特定領域における構造変化を正確に把握するためには、そのmAbのエピトープを局限化する必要がある。これまでmAbのエピトープを局限化するための試みとして、抗原であるタンパク質の酵素分解物あるいは化学処理分解物を用いて、mAbに対して親和性を有するフラグメントをエピトープとしてきたが、この方法によるエピトープの局限化には限界があり、必ずしもエピトープが決定できるわけではなかった。最近では合成ペプチド、特に10残基程度のペプチドをタンパク質全域にわたり、1残基づつずらして作製したペプチド（ピンペプチド法）を用いたエピトープマッピングも行われており、より正確なエピトープの局限化が可能となってきた。

しかし、タンパク質を抗原としてmAbを作製した場合、必ずしも自分の解析したいと思う領域あるいはタンパク質全体の構造を調べたい場合にはタンパク質全体を網羅するような領域をエピトープとした一連のmAbが得られるわけではない。どのエピトープを認識するmAbが得られるかは、抗原であるタンパク質の性質に依存した問題であり、自分の意のままに作製することはできないという欠点はある。この点を克服するため、最近では構造を調べたいと考えている領域（ペプチドフラグメント）にキャリアーを結合させ、作製した抗ペプチド抗体を構造解析のプロープとして用いる試みもなされている。抗ペプチド抗体の特異性は基本的に抗原としたペプチドフラグメントに限定されるため、エピトープの局限化も容易であるとともに、タンパク質上の様々な領域をエピトープとして認識するmAbの作製も原理的には可能であることから、タンパク質の全体構造を解析する手段としての抗ペプチド抗体に期待が寄せられる。

しかし、これら抗ペプチド抗体は、タンパク質を抗原として作製したmAbに比べ、もとのタンパク質に対する親和性は大きく低下することから、その後の解析において困難を招く場合もある。

そこで本研究においては、 β -LGの ^{19}Trp を置換したことによりどの程度の構造変化が生じたか、抗 β -LGmAbをプローブとして用いることにより詳細に解析することを試みた。さらに、 ^{19}Trp の置換の影響がどの程度一次構造上あるいは立体構造上離れた領域にまで及んでいるかを解析するため、比較的広い範囲にわたりそれぞれのエピトープを有する、特異性の異なる15種類のmAbを用いて構造解析を試みた。また、最終的な立体構造維持に対して ^{19}Trp が果たす機能的意義ばかりでなく、変性後再生させた変異型タンパク質の構造を同時に解析することにより、 ^{19}Trp が β -LGのrefoldingに対して果たす機能的意義についても解析することを目的とした。

材料及び方法

変異型 β -LG 溶液の濃度評価法—

変異型 β -LG においては、Trp 残基が Ala, Phe, Tyr 各残基に置換されているため、各変異型 β -LG の吸光係数は、芳香族アミノ酸数とそれぞれの残基の吸光度の積の総和を基に算出し(83)、これらの値を用いて精製した変異型 β -LG の濃度を評価した。それぞれの変異型 β -LG の吸光係数は、W19A では $6.52 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、W19F では $6.62 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、W19Y では $7.27 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ と算出された。

円二色性偏光 (CD) スペクトル—

CD スペクトルの測定は Jasco J-20 旋光分散計を用い、10 mm 厚のセルを用いて行った。それぞれのタンパク質の濃度は 0.41 mg/ml に調製し、溶媒としては PBS を用いた。測定条件は、Scan speed : 10 nm/min , wavelength expansion : 5 nm/min , sampling time : 0.5 , repeat times : 8 , scale : 5 mdegree/cm , time constant : 4 s , slit : 1 nm にて行った。野生型及び変異型 β -LG 溶液についてそれぞれ CD スペクトルを測定し、 5 nm 間隔でチャート上の読みを測定後、その値と感度 (スケール) から楕円率 ϕ を算出した。

$$\phi = \text{感度 (deg/cm)} \times \text{チャートの読み (cm)}$$

次に算出した楕円率は、平均残基楕円率 $[\theta]$ で表示することにより各種 β -LG における二次構造含量を評価した。

$$[\theta] = (M_0 \cdot \phi) / (100 \cdot C \cdot l) \quad (\text{degree} \cdot \text{cm}^2 / \text{dmol})$$

ここで、 M_0 は平均残基分子量 (113)、 C は g/ml 単位の溶質の濃度、 l は dm 単位のセルの光路長を示す(84)。

塩酸グアニジンによるタンパク質の変性過程の解析—(85, 86)

塩酸グアニジンによる変性過程は、 CD_{222} 値を測定することにより追跡した。 β -LG は様々な濃度の塩酸グアニジン存在

下, 5時間室温で静置した。変性の熱力学的パラメーターを算出するために, 二状態遷移の仮定に基づき変性曲線を解析し, 変性のGibbs自由エネルギー変化を, ある濃度の塩酸グアニジン存在下における未変性及び変性各画分を CD_{222} 値より想定し, 次の式に基づき算出した:

$$\Delta G_D = -RT \ln (\theta_f - \theta) / (\theta - \theta_0)$$

θ は222nmにおける分子楕円率, θ_f あるいは θ_0 はそれぞれ未変性, 変性状態における分子楕円率を示す。変性剤非存在下における変性の自由エネルギー変化, ΔG_D^0 はTanfordによる変性剤結合式により決定した(87):

$$\Delta G_D = \Delta G_D^0 - \Delta n \cdot RT (1+ka)$$

a は塩酸グアニジンの結合活性, Δn は未変性, 変性状態間での変性剤の結合部位数の差を示している。塩酸グアニジンの結合定数(k)は1.0として, 非線形最小二乗法により評価を行った。

モノクローナル抗体

各B細胞ハイブリドーマクローンをを用いて調製したマウス腹水中からの21B3, 31A4, 61B4, 61C1及び62A6からのモノクローナル抗体(mAb)の調製は以下に述べる方法に準じて行った(48, 88)。抗 β -LGモノクローナル抗体LG3.1, LG3.2, LG3.3, LG4.1, LG5.1, LG5.3, LG8.1, LG8.2, LG13.1及びLG16.1は, 農林水産省・畜産試験場・栗崎純一博士より供与された。モノクローナル抗体の精製は, プロテインG Superose HR 10/2 (Pharmacia/LKB)を用いたFPLCあるいはMAB Trap™GIIキット(Pharmacia/LKB)により行った。FPLCにおけるカラムの平衡化には, 20mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)を用いた。腹水は, 10000 x gで10分間遠心分離後, リン酸ナトリウム緩衝液で平衡化したSephadex G25を通過させて脂質を吸着させた後, 濾過(0.22 μ m)しFPLCに供した。溶出は0.1 M グリシン-塩酸(pH 2.7)を用いて行い, 溶出液は即座に1M Tris-塩酸(pH 8.0)により中

和した。硫酸アンモニウムを用いた塩析によりモノクローナル抗体を濃縮し、後の実験に用いた。同様に調製した腹水を MAb Trap™ GII キットを用い、説明書に基づき精製を行った。モノクローナル抗体の濃度は、吸光係数 $13.8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ を用い算出した。

競合酵素免疫測定法（競合ELISA法）による β -LGの立体構造解析

競合ELISA法以下に述べる方法で行った(48)。液相中に存在する組換え型 β -LG（野生型及び変異型）に対する各種mAbの結合能は、様々な濃度の組換え型 β -LGの存在下、固相化した β -LGに対して競合的に結合したmAbを、ALP標識したヤギ抗マウスイムノグロブリン（Cappel, Cochranville, PA）により検出することにより評価した。

天然型 β -LGの固相化は、 β -LGのPBS溶液を96穴プレート中にて静置することによって行い、その濃度は21B3, 31A4, 61C1, 62A6及び61B4を用いた場合は 0.1 mg/ml とし、その他のmAbを用いた場合は 0.001 mg/ml とした。21B3, 31A4, 61C1, 62A6及び61B4各種mAbは、天然型 β -LGに対して作製されたものであるのに対して、その他のmAbはキャリアーであるKLH（キーホールリンペットヘモシアニン）を結合させた β -LGのペプチド断片に対して作製されたものであるため、 β -LGに対する親和力が前記五つのmAbに比べて弱く、競合抗原による競合が起こりにくかった。そのために、固相化した β -LG量を減らすことで、同濃度の競合抗原存在下においても競合が生じるようにしたものである。競合抗原（組換え型 β -LG）濃度は、 $10 \mu\text{g}$ /ウェルを最高に、4倍希釈ずつ7段階の希釈系列を用いた。mAbは、非競合ELISA法にて A_{405} が $0.5 \sim 0.8$ 程度に発色する濃度に希釈して用いた。反応は30分から2時間程度行い、発色の程度の弱いものについては 4°C で遮光し一晩放置した。

さらに β -LGの $^{15}\text{Val}-^{29}\text{Ile}$ に相当するペプチド、あるいは

^{19}Trp をTyrに置換したペプチドを用い競合ELISA法を試みた。これらのペプチドは、Chiron Mimotopes Pty. Ltd. (Clayton, Victoria, Australia) より購入した。

野生型 β -LG 及び変異型 β -LG の変性及び再生

野生型及び変異型 β -LG の変性は、6M 塩酸グアニジンを含むPBS中に、各種 β -LG を2 mg/mlの濃度で溶解し、室温にて5時間静置することにより行った。変性 β -LG の再生は、4℃にてPBSに対して透析することにより行った。PBSの交換は4時間ごとに行った。

再生 β -LG 及び再生 W19Y の構造解析

透析により再生した各 β -LG 溶液は、280 nmにおける吸光値をもとに濃度を算出後、競合ELISA法に供した。競合ELISA法及びそれによる構造解析は前述の方法で行った。

結果

円二色性偏光 (CD) スペクトルによる二次構造含量の比較

野生型及び変異型 β -LG の有する全体的な構造を解析するために、まず野生型及び変異型 β -LG の二次構造含量の比較を、CD スペクトルの測定により行った (Fig. 8)。CD スペクトルの測定に伴う誤差を考慮に入れ、それぞれの β -LG に対して CD スペクトルの測定を三回行い、その度に得られた平均残基楕円率の平均をとり、それぞれの β -LG の CD スペクトルとした。CD スペクトルの測定は、200~260 nm にわたり行った。ここで得られた野生型 β -LG の CD スペクトルは、これまでに報告されている天然型 β -LG の CD スペクトルとほぼ同等のものであった。野生型及び W19Y のスペクトルは、210 nm 付近及び 200~205 nm 付近を除いて良く似たスペクトルを有していた。特に、タンパク質中の α -ヘリックス含量の算出が可能である 222 nm 付近の平均残基楕円率は両者でほぼ同等であった。

ディスク電気泳動による野生型及び変異型 β -LG の構造の比較

野生型及び変異型 β -LG 分子の集合状況に関する情報を得る目的で、分子の荷電状態及び分子としての大きさによる分離が可能であるディスク電気泳動を試みた。還元 SDS-PAGE を試みた結果 (第一章)、野生型と W19Y との間で大きな違いは見いだされなかったが、ディスク電気泳動では、明らかな違いが見いだされた (Fig. 9)。野生型 β -LG は、天然型 β -LG とほぼ同等の移動度を示し、分子種としてもほぼ均一な集団であり、荷電状況及び分子の大きさについても野生型とほぼ同等であることが判明した。しかし、W19Y は野生型に比べその移動度はわずかに小さく、またバンドも比較的拡散していた。Trp を Tyr に置換したことに伴うタンパク質分子全体としての見かけの pKa の変化も考えられるが、バンドが拡散したことは、

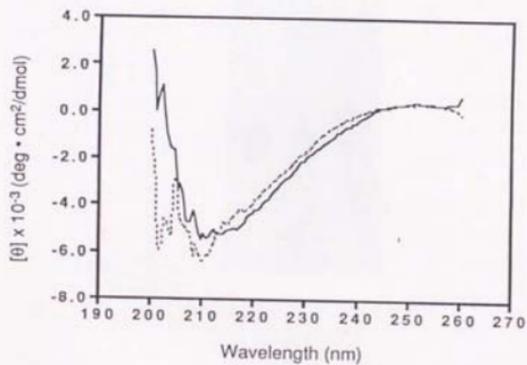


Fig. 8 Far-ultraviolet CD spectra for wild β -LG and W19Y in PBS
—: wild β -LG,: W19Y

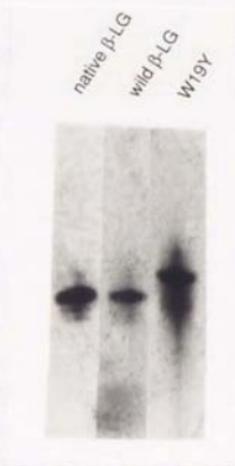


Fig. 9 Wild β -LG and W19Y were analyzed by Disc-polyacrylamide gel electrophoresis (7.5% acrylamide).

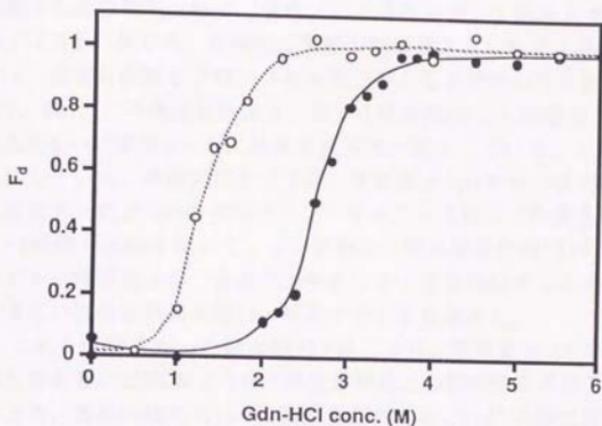
W19Yの溶液状態における集合状態が、野生型 β -LGに比べ均一でなく、分子として不安定であると推定した。

塩酸グアニジンを用いた β -LGの変性過程の解析と安定性の評価

塩酸グアニジンによる β -LGの変性過程を、塩酸グアニジン濃度に対する CD_{222} 値の変化を追跡することにより行った (Fig. 10)。不安定なタンパク質の変性過程を追跡するためには、尿素などのような他の変性剤を用いるよりも、塩酸グアニジンを用いた場合の方が、よりGibbs自由エネルギー変化 (ΔG) と塩酸グアニジン濃度が直線関係を示すことが知られていることから(89)、ここでは変性剤として塩酸グアニジンを用いた。野生型 β -LGはこれまで報告されているように、塩酸グアニジンによる変性に対してシグモイド曲線を描き、未変性状態から変性状態へ二状態遷移であることを示している。この結果からは、folding中間体の存在は観察されなかった。W19Yについても、野生型と同様に二状態遷移を示したことから、変性曲線の解析から水中における変性のGibbs自由エネルギー変化 (ΔG_{50}°) の算出が可能であることが示唆された。

Tanfordらによる変性剤結合式を基に、それぞれの β -LGの変性剤非存在下における変性の自由エネルギー変化 (ΔG_{50}°) を、 CD_{222} 値を基に算出した。野生型 β -LGの ΔG_{50}° は11.2 kcal/molで、これまでに報告されている β -LGの ΔG_{50}° 値に良く合致した(90)。ところが、W19Yの ΔG_{50}° は、野生型 β -LGの ΔG_{50}° に比べ大きく低下し、4.3 kcal/molであった。また、野生型 β -LGの未変性状態から変性状態への遷移を示す塩酸グアニジン濃度は約2.5 Mであったが、W19Yでは大幅に低濃度側にシフトし、約1.2 Mであった。このことは、 ^{19}Trp への変異の導入により、 β -LGの全体構造の安定性が大幅に低下したことを意味している。

野生型及び変異型 β -LGに対する15種類の抗 β -LGmAbの結合



	ΔG_d^{100} (kcal/mol)	midpoint of transition (M)
wild β -LG	11.2	2.5
W19Y	4.3	1.2

Fig. 10 Gdn-HCl-induced unfolding curves for wild β -LG and W19Y

● : wild β -LG, ○ : W19Y

The ratio of an unfolding fraction was calculated from the equation $F_d = (\theta_f - \theta) / (\theta_f - \theta_u)$, where θ represents the CD value at 222nm at a given concentration of Gdn-HCl, and θ_f and θ_u are the CD values for the folded and unfolded states, respectively at a given concentration of Gdn-HCl. The ΔG_d^{100} values for wild β -LG and W19Y calculated from these unfolding curves are also given.

これまで当研究室において、天然型 β -LGを免疫原として作製された数種のmAbは、変性/再生過程を通じて再生させた β -LG上に生じた、局所的で微妙な立体構造上の変化を検出する、非常に鋭敏なプローブとなりうることを報告してきた(47, 48)。この構造解析法は、抗 β -LG mAbの、天然型 β -LGあるいは変性 β -LGに対する親和性が異なっていることを基にしている。本研究においては、天然型 β -LGあるいはKLHに結合させた β -LGのペプチドフラグメントに対して作製された15種類のmAbを用いて、より詳細に、野生型及びW19Yにおける立体構造上の、分光学的解析によっては検出することのできない微妙な差異を検出・解析することを試みた。

これらmAbを用いた競合ELISA法により、変異型 β -LGの野生型あるいはRCM β -LGへの立体構造上の類似性を評価するため、各種mAbのW19Yに対する親和性と、mAbの野生型あるいはRCM β -LGとの親和性とを比較し、そのmAbのW19Yに対する親和性が、野生型あるいはRCM β -LGのどちらに対する親和性に近いあるいは同等であるかを評価した。この競合ELISA法において、一定濃度のmAbと様々な濃度の試料とした β -LGとを含む溶液を静置した。プレートのウェルに固相化された β -LGに対するmAbの競合的な結合は、試料とした競合抗原濃度と固相化された β -LGに結合したmAbの量をプロットした結合曲線から評価した。ここで用いたRCM β -LGは、部分的にはあるが大きく変性した β -LGを代表するものとして用いている。RCM β -LGの構造が十分破壊されていることは、CDスペクトルにより確認済みである。

ここで用いた15種類のモノクローナル抗体の結合特異性をTable2に示した。mAb61B4, 62A6, 61C1, 21B3及び31A4は天然型 β -LGを免疫原として作製されたmAbであり、前者3つのmAbは天然型 β -LGと強く結合し、後者2つのmAbは変性 β -LGと強く結合する。それに対して、LG3.1, LG3.2, LG3.3, LG4.1, LG5.1, LG5.3, LG8.1, LG8.2, LG13.1及

mAb	Immunogen	Binding specificity	Peptide region important for binding to mAb
61B4	native β -LG	native β -LG >> RCM β -LG	¹²⁵ Thr- ¹³⁵ Lys
62A6	native β -LG	native β -LG >> RCM β -LG	close to ¹²⁵ Thr- ¹³⁵ Lys
61C1	native β -LG	native β -LG > RCM β -LG	close to ¹⁵ Val- ²⁹ Ile
21B3	native β -LG	native β -LG << RCM β -LG	¹⁵ Val- ²⁹ Ile
31A4	native β -LG	native β -LG << RCM β -LG	⁸ Lys- ¹⁹ Trp
LG3.1	²⁵ Ala- ³⁴ Ala+KLH	native β -LG < RCM β -LG	²⁸ Asp- ³⁴ Ala
LG3.2	²² Leu- ³⁸ Pro+KLH	native β -LG < RCM β -LG	²⁸ Asp- ³⁶ Ser
LG3.3	²² Leu- ³⁶ Ser+KLH	native β -LG < RCM β -LG	³¹ Leu- ³⁶ Ser
LG4.1	³² Leu- ⁴⁶ Leu+KLH	native β -LG < RCM β -LG	³⁵ Gln- ⁴² Tyr
LG5.1	⁴² Tyr- ⁵⁶ Ile+KLH	native β -LG < RCM β -LG	ND
LG5.3	⁴² Tyr- ⁵⁶ Ile+KLH	native β -LG < RCM β -LG	ND
LG8.1	⁷² Ile- ⁸⁶ Ala+KLH	native β -LG < RCM β -LG	⁸⁰ Ala- ⁸³ Lys
LG8.2	⁷² Ile- ⁸⁶ Ala+KLH	native β -LG < RCM β -LG	⁷⁹ Pro- ⁸⁵ Asp
LG13.1	¹¹⁹ Cys- ¹³³ Leu+KLH	native β -LG < RCM β -LG	¹²² Leu- ¹²⁸ Val
LG16.1	¹⁴⁹ Leu- ¹⁶² Ile+KLH	native β -LG < RCM β -LG	ND

ND: not determined

Table 2 Properties of anti- β -LG monoclonal antibodies

びLG16.1各種mAbは、それぞれに対応する β -LG由来の合成ペプチドフラグメントに、キャリアーであるKLHを結合させたものを免疫原としたものであるため、天然型 β -LGに対する結合能は弱く、変性 β -LGに対して強い結合能を示した。このように変性 β -LGを強く認識するmAbは、試料とする β -LGの構造が破壊あるいは乱れている場合に、その β -LGとの結合力が増大することを意味しており、構造が乱れているということに関しては有用な情報を提供しうる、構造解析のためのより優秀なプローブになりうるものと考えられた。

これらmAbの結合特異性は、比較的 β -LG全体にわたっており、しかも立体構造を強く認識するmAbも3種あることから、 β -LGに生じた微細な構造変化を、局所的なレベルでばかりでなく、全体的なレベルでも評価可能であると考えられた。 β -LGの構造に関して、さらに詳細で、確実な情報を得るためには、各種mAbの結合特異性を局限化する必要があるが、これまでその局限化に未だ成功していないものに関しては、これまでの情報に従う(mAb 62A6, 61C1)とともに抗ペプチド抗体(LG5.1, LG5.3及びLG16.1)に関しては、その免疫原であるペプチドを、多少長い領域ではあるが結合領域とし、構造変化を起こしている領域を評価した(Table 2)。

これらmAbを用いて競合ELISA法を試みた結果、mAb61B4, 62A6, 61C1及びLG16.1のW19Yに対する結合能は、RCM β -LGに対する結合能とは大きく異なり、野生型 β -LGに対する結合能とほぼ同等であった(Fig. 11)。野生型と比べたW19Yに対するmAbの結合能の変化は、結合能の増大という変化と、減少という変化により観察された。mAb31A4, LG5.3, LG8.2及びLG13.1のW19Yに対する結合能は、野生型及びRCM β -LGに対する結合能のどちらも同等でない、その中間の結合能を示した(Fig. 12)。その他のmAb21B3, LG3.1, LG3.2, LG3.3, LG4.1, LG5.1及びLG8.1のW19Yに対する結合能は、野生型 β -LGに対する結合能に比べはるかに強く、ほぼRCM β -LGに対する結合能と同等であった(Fig. 13)。

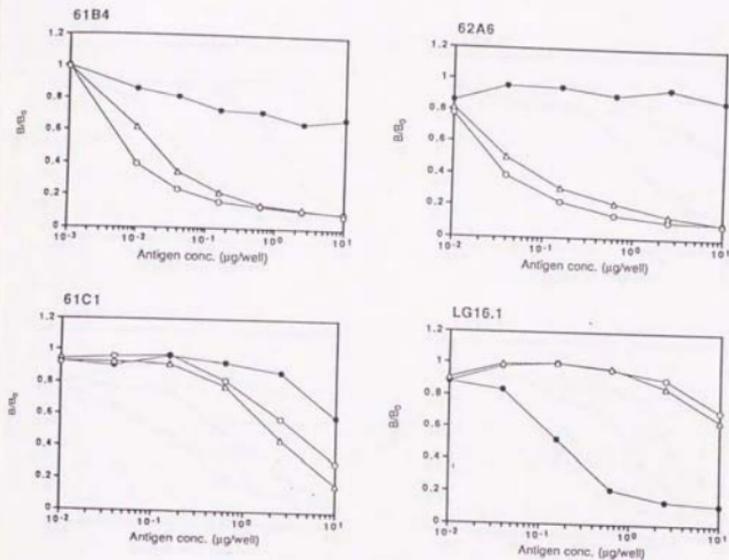


Fig. 11 Binding curves for mAbs to wild β -LG, RCM β -LG and W19Y. B/B_0 is the ratio of the absorbance in the last step of ELISA in the presence of various concentrations of a competitive antigen to the absorbance in the absence of the competitive antigen.

○: wild β -LG, △: W19Y, ●: RCM β -LG.

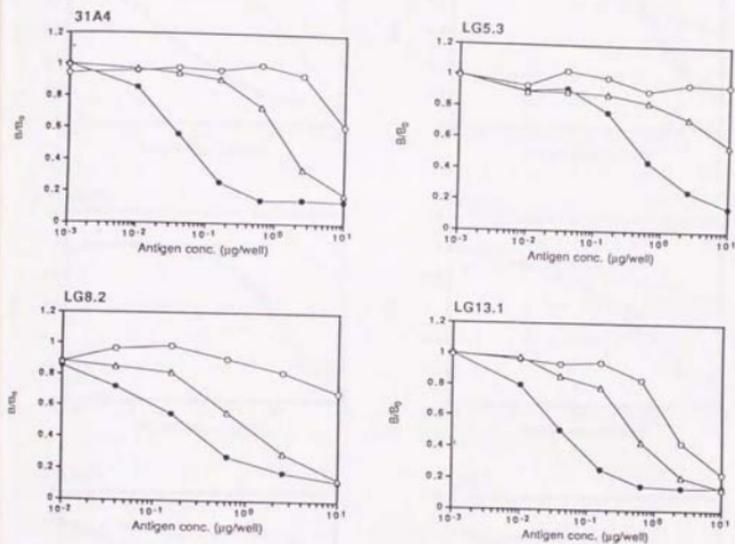


Fig. 12 Binding curves for mAbs to wild β -LG, RCM β -LG and W19Y. B/B_0 is the ratio of the absorbance in the last step of ELISA in the presence of various concentrations of a competitive antigen to the absorbance in the absence of the competitive antigen.

○ : wild β -LG, △ : W19Y, ● : RCM β -LG.

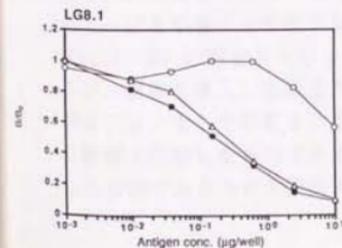
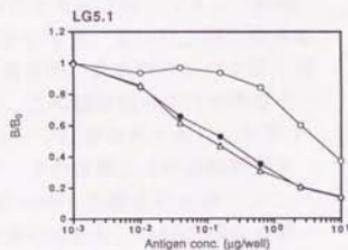
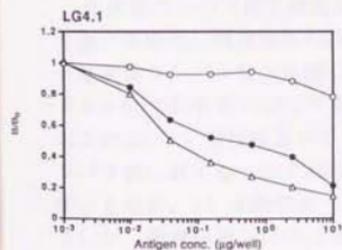
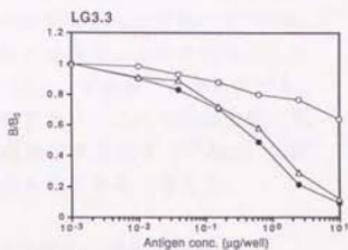
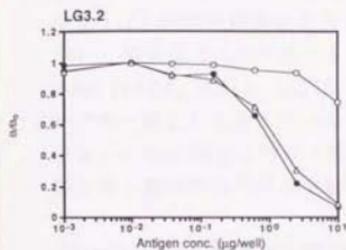
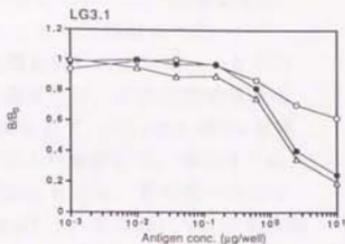
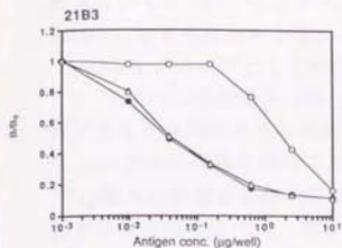


Fig. 13 Binding curves for mAbs to wild β -LG, RCM β -LG and W19Y.
 O : wild β -LG, Δ : W19Y, \bullet : RCM β -LG.

野生型 β -LG に比べたいずれの結合能の変化も、各種 mAb の W19Y に対する結合能の増大という変化で観察された。

mAb をプローブとして用いた構造解析により明らかとなった、 ^{19}Trp への変異導入に伴う構造変化が、どの程度大きなものであるかを判断するための対照として、 ^{129}Asp を Ala に置換した D129A の構造を同様の方法により解析した。W19Y では、 ^{19}Trp 置換の影響が比較的広い範囲にわたり、野生型 β -LG に対する結合能に比べて、多くの mAb で、その W19Y に対する結合能について違いが観察されたが、D129A に対しては、野生型 β -LG と同等の結合能を示す mAb がほとんどであった (Fig. 14)。野生型 β -LG に対するものとは異なった結合能を示した mAb (61B4, 62A6, LG13.1) は、いずれも ^{129}Asp をエピトープの一部として含んでいるものであり、これらの結合能の低下は、mAb の結合に対して直接重要である残基 (^{129}Asp) の置換に伴う直接的な効果を反映したものであると考えた。

^{19}Trp の Tyr への置換が mAb21B3 の結合に及ぼす影響

変異型タンパク質の構造解析のためのプローブとして mAb を用いる場合、構造解析の指標として用いるのは、野生型あるいは変性タンパク質と比較した場合の、変異型タンパク質に対する mAb の結合能の変化である。この結合能の変化が観察されるのは、1) 置換残基がエピトープに含まれており、変異タンパク質に対する mAb の結合が、その置換により直接影響を受ける場合、2) 置換残基が直接 mAb との結合には関与していないが、置換の導入に伴う構造変化により、mAb の結合が影響を受ける場合である。置換を導入した残基がその mAb のエピトープを形成する残基でない場合には、観察される結合能の変化は、2) の影響を反映したものであると考えられるが、置換を導入した残基がエピトープを形成する残基である場合には、そこで観察される結合能の変化が 1)、2) どちらの影響を反映したものであるのか、あるいは双方の影響を反映したものであるのかを評価する必要がある。

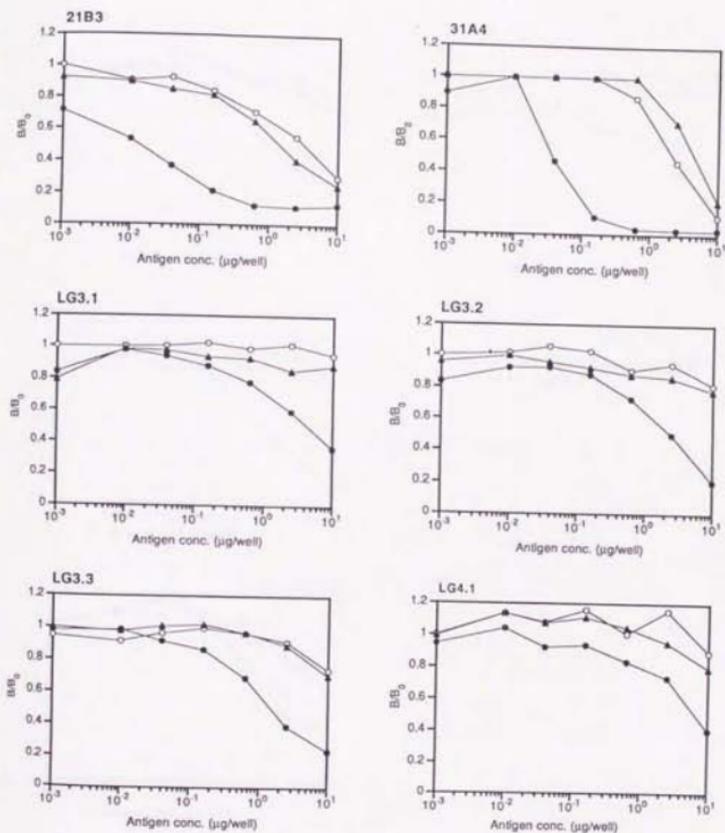


Fig. 14-1 Binding curves for mAbs to wild β -LG (open circle), RCM β -LG (closed circle) and D129A (closed triangle).

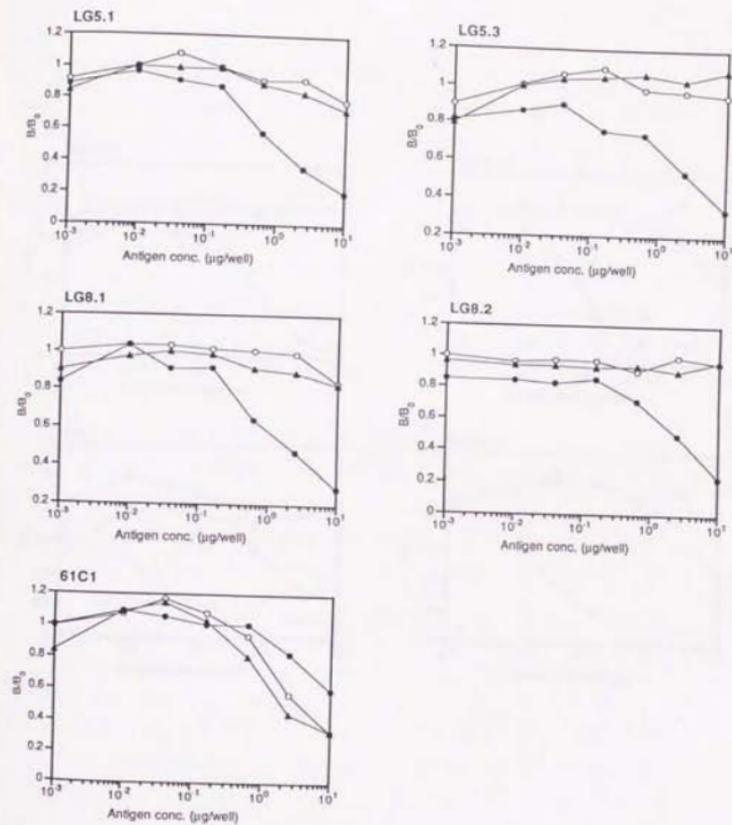


Fig. 14-2 Binding curves for mAbs to wild β -LG (open circle), RCM β -LG (closed circle) and D129A (closed triangle).

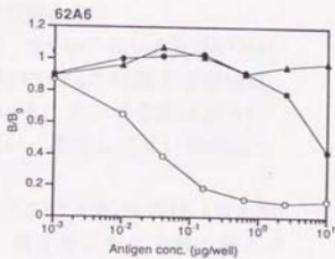
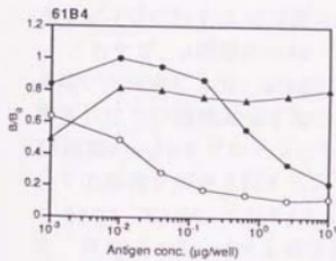
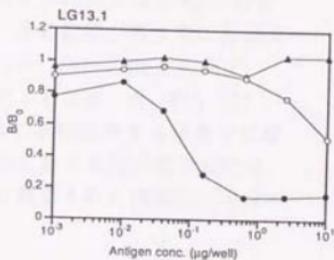
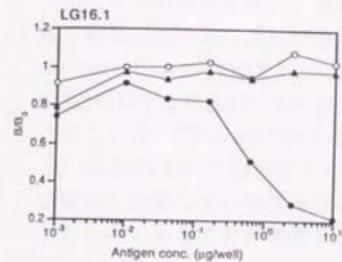


Fig. 14-3 Binding curves for mAbs to wild β -LG (open circle), RCM β -LG (closed circle) and D129A (closed triangle).

今回用いた15種類のmAbのうち、 ^{19}Trp をそのエピトープの一部として含んでいるものは21B3であり、21B3の場合に上記の1)、2) どちらの影響を反映したものであるのか評価することを試みた。このために、21B3のエピトープの一部を含むと考えられているペプチドフラグメント ($^{15}\text{Val}-^{29}\text{Ile}$) について、野生型に相当するものと、 ^{19}Trp をTyrに置換したW19Yに相当するものを合成し、そのそれぞれに対する21B3の結合能を競合ELISA法により評価した。その結果、野生型に相当する $^{15}\text{Val}-^{29}\text{Ile}$ と ^{19}Trp をTyrに置換した $^{15}\text{Val}-^{29}\text{Ile}$ との間で、21B3に対する結合能に違いは見いだされなかった (Fig. 15)。このことは、 ^{19}Trp は21B3との結合に直接関与する残基ではなく、21B3において観察されたW19Yに対する結合能の変化は、間接的な効果つまり残基置換により誘導された構造変化を反映したものであることが判明した。

再生 β -LGに対する15種類のmAbの結合能一

これまで、4種類のmAb (21B3, 31A4, 62A6及び61B4) を用いた研究により、mAb21B3及び31A4の認識する領域は、再生しにくい領域として知られている。そこで今回はさらに11種類のmAbをプローブとして用い、再生しにくい領域についての詳細な解析を試みた。

61C1, 61B4, 62A6, LG5.3, LG13.1及びLG16.1各mAbの、再生 β -LGに対する結合能は、野生型に対する結合能とほぼ同等であった (Fig. 16)。mAb21B3, 31A4, LG3.1, LG3.2, LG3.3, LG4.1, LG5.1, LG8.1及びLG8.2の再生 β -LGに対する結合能は、野生型 β -LGに対する結合能とは違いが認められた (Fig. 17-1, 2)。しかし、再生 β -LGに対するいずれのmAbの結合能も、RCM β -LGに対する結合能と同等のレベルにまで変化したものではなく、野生型及び再生 β -LGに対する結合能の中間を示した。

再生W19Yに対する15種類のmAbの結合能一

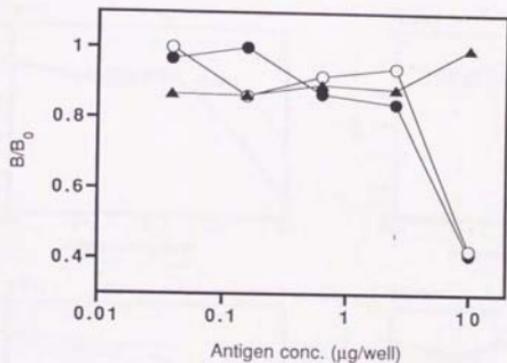


Fig. 15 Binding curves of mAb 21B3 to the peptide fragment 15-29 of β -LG and that having ^{19}Tyr substituted for ^{19}Trp
 ● : peptide corresponding to 15-29 of wild β -LG, ○ : peptide corresponding to 15-29 of W19Y, bearing a substitution at ^{19}Trp by Tyr, ▲ : peptide derived from α_{s1} -casein (negative control).

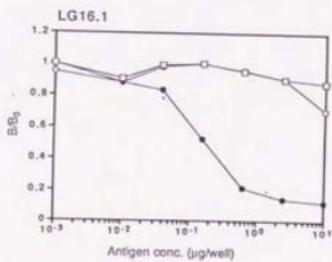
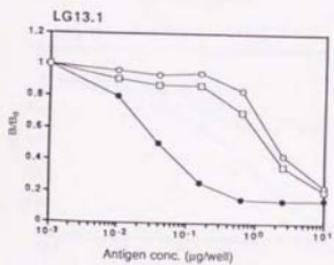
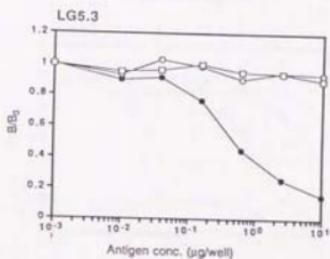
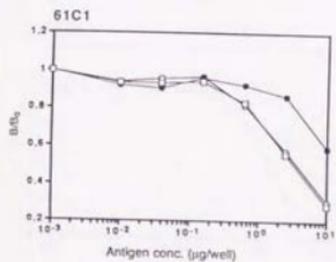
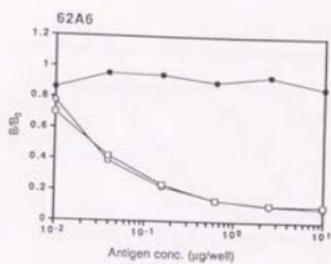
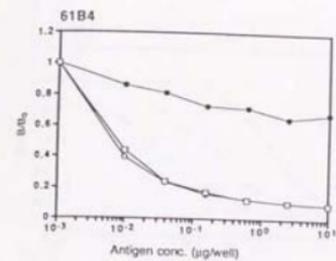


Fig. 16 Binding curves for mAbs to wild, refolded and RCM β -LG.
 ○: wild β -LG, □: refolded β -LG, ●: RCM β -LG.

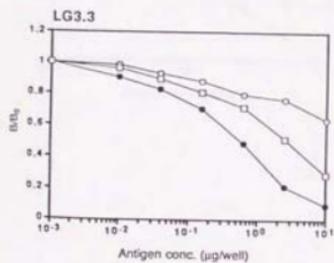
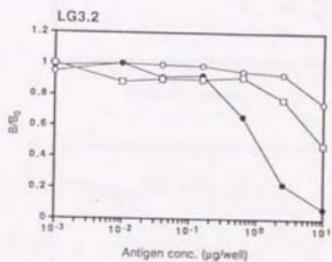
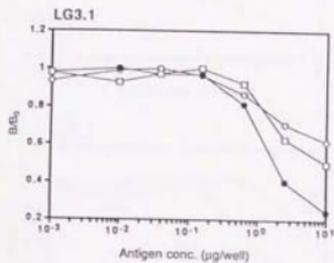
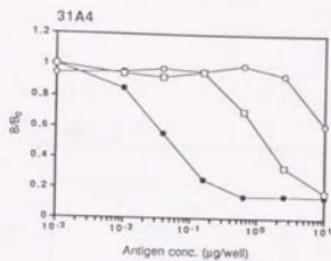
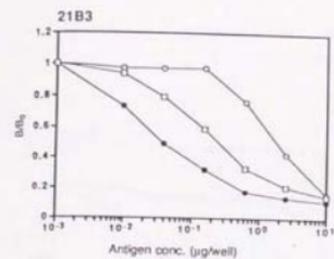


Fig. 17-1 Binding curves for mAbs to wild, refolded and RCM β -LG.
 ○: wild β -LG, □: refolded β -LG, ●: RCM β -LG.

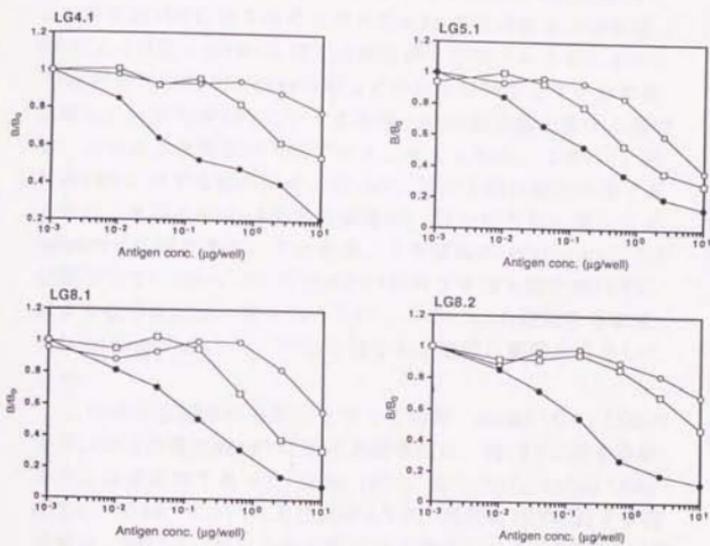


Fig. 17-2 Binding curves for mAbs to wild, refolded and RCM β -LG.
 O: wild β -LG, \square : refolded β -LG, \bullet : RCM β -LG.

W19Yに対する15種類のmAbの結合能を、野生型及びRCM β -LGに対する結合能と比較することにより、最終的な β -LGの立体構造の維持に対して ^{19}Trp が果たす役割について解析してきた。ここでは、変性後、透析により再生させたW19Y（再生W19Y）を用い、再生W19Yに対する結合能の変化を解析した。再生W19Yに対するそれぞれのmAbの結合能を、野生型、RCM β -LG及びW19Yに対する結合能と比較することにより、 ^{19}Trp が β -LGのrefoldingに対しどのように関与しているかを解析した。再生W19Yに対する各種mAbの結合能の変化に基づき、次のような解釈が可能であると考えられる、つまり1) 再生W19Yに対する結合能が、W19Yに対する結合能と同等であるもの；そのmAbの認識する領域は、 ^{19}Trp の有無に関わらずrefolding可能である、すなわち、その領域のrefoldingに ^{19}Trp は関与していない、2) 再生W19Yに対する結合能がW19Yに対する結合能に比べ変化したもの；そのmAbの認識する領域のrefoldingにおいて、 ^{19}Trp が何らかの重要な機能を果たしている。

このような観点から解析を行った結果、mAb61C1, LG5.3及びLG8.2の再生W19Yに対する結合能は、W19Yに対する結合能にほぼ同等であった（Fig. 18）。ところが、mAb31A4, 61B4, 62A6, LG13.1及びLG16.1の、再生W19Yに対する結合能は、W19Yに対する結合能に比べ変化し、よりRCM β -LGに近い結合能を示した（Fig. 19）。W19Yに対する結合能がすでにRCM β -LGに対する結合能にほぼ同等であったmAb21B3, LG3.1, LG3.2, LG3.3, LG4.1, LG5.1及びLG8.1の、再生W19Yに対する結合能は、W19Yの変性/再生に伴う結合能の変化、つまり野生型 β -LGに近い結合能を示すことはなく、やはりRCM β -LGとほぼ同等の結合能を示した（Fig. 20）。

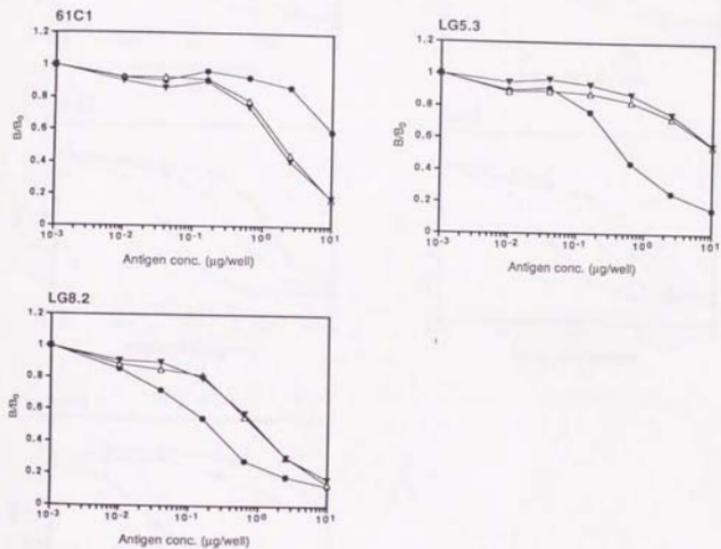


Fig. 18 Binding curves for mAbs to W19Y, refolded W19Y and RCM β -LG.
 Δ : W19Y, \blacktriangledown : refolded W19Y, \bullet : RCM β -LG.

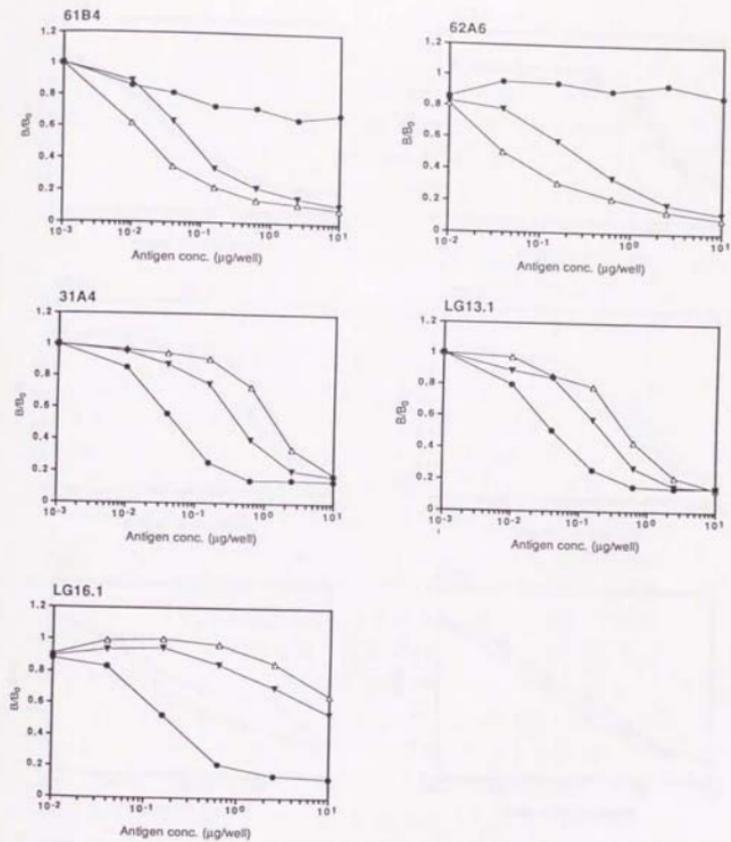


Fig. 19 Binding curves for mAbs to W19Y, refolded W19Y and RCM β-LG.
 △: W19Y, ▼: refolded W19Y, ●: RCM β-LG.

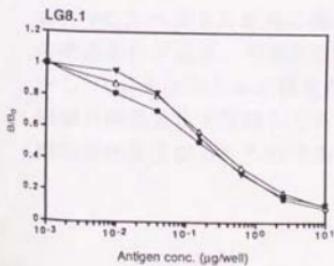
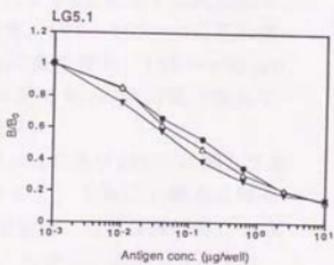
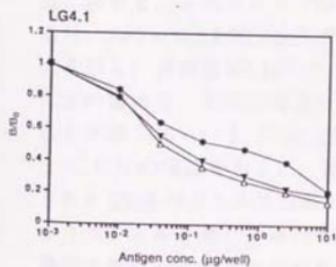
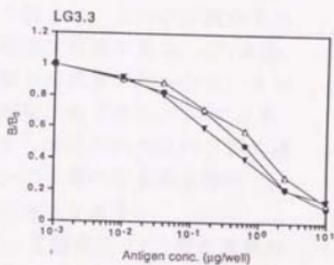
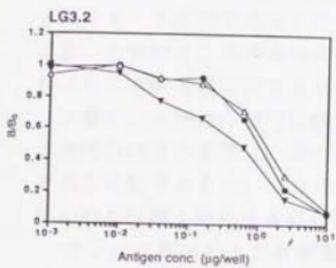
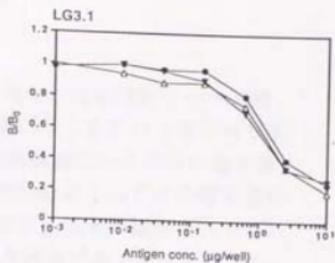
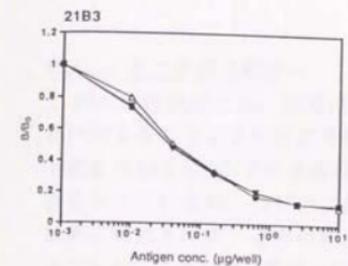


Fig. 20 Binding curves for mAbs to W19Y, refolded W19Y and RCM β -LG.
 Δ : W19Y, \blacktriangledown : refolded W19Y,
 \bullet : RCM β -LG.

CDによる二次構造解析—

円二色性偏光とは、左及び右円偏光が光学活性な分子と相互作用することにより生じる現象をいう。タンパク質のペプチド結合は240 nm以下の遠紫外部波長領域にいくつかの電子遷移をもっているが、ペプチド結合の状態によってその電子遷移状態は変化を示す。その結果、この波長領域で観測されるCDスペクトルはタンパク質の主鎖の基本構造である α ヘリックス、 β シート、不規則構造などによって異なり、タンパク質分子上に生じた微妙な二次構造の変化の追跡が可能である。CDは異なった二次構造を区別するという面での感度の良さから、タンパク質の二次構造の研究に頻りに利用されてきた。CDによる二次構造研究の長所は、その容易さと低濃度のタンパク質溶液で測定可能であることであり、タンパク質の有する全体的で、平均的な性質を観察するには適した方法である。

タンパク質の二次構造によって特異的なCD帯が遠紫外部に現れる。 α ヘリックスは最も大きなCDを示す二次構造であり、222 nmと208 nmに負の極大、191~193 nmに正の極大を示し、 β 構造は216~218 nmに負の極大、195~200 nmに正の極大を、不規則構造は195~200 nmに負の極大を示すことが知られている (Fig. 21) (91)。

これらの情報をもとに、野生型 β -LG及びW19Yに関して得られたCDスペクトルを比較してみると、ともに β 構造に特有なスペクトルを有し、W19Yは野生型 β -LGとほぼ同等の二次構造を維持していることがわかる。しかし、200 nm近傍でW19Yのスペクトルが負に極小を示していることから、何らかの構造変化が起き、不規則化した構造の存在が示唆された。しかし、CDスペクトルの測定だけでは、その不規則構造がどの領域の構造変化を反映したものであるか、あるいはどの程度の構造変化を反映したものであるかは判断することはできない。

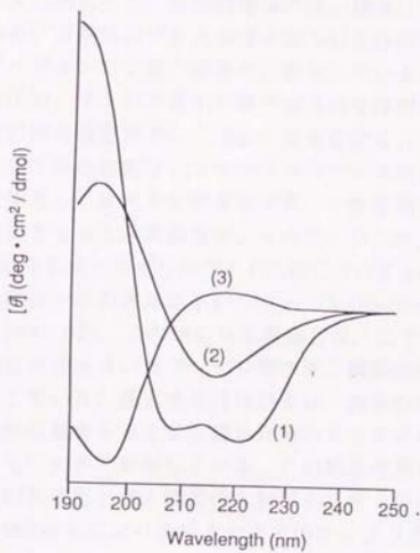


Fig. 21 CD spectra of α -helix (1), β -sheet (2), and random structure (3)

変異型 β -LGの安定性が大きく低下した一

タンパク質の安定化に寄与しているエネルギーとしては、1) 静電的相互作用、2) ファンデルワールス相互作用、3) 水素結合、4) 疎水性相互作用、5) 共有結合 (S-S結合) などが考えられる (Table 3)。静電的相互作用としては、タンパク質表面から少し埋もれた、実効誘電率の低い環境に存在する塩結合(92)あるいは電荷及び永久双極子間の相互作用による安定化エネルギーがタンパク質の安定化に寄与しているものと考えられている(93)。タンパク質中の原子が占める体積の割合は、一定の半径の球を最密充填した場合の割合に近く、その結果、一つ一つとしては比較的弱いファンデルワールス相互作用もタンパク質全体としては大きな寄与を示す。中性子線結晶解析により同定可能となった水素結合は、 α ヘリックスや β シートなどの二次構造を形成したポリペプチド主鎖に存在する確率が高い。この水素結合一本の寄与は $\Delta G = -1 \sim -3$ kcal/molであるとされている(94, 95)。この他にも水素結合は、二つのベンゼン環間の相互作用あるいはベンゼン環水素と酸素の相互作用としても寄与している。疎水性相互作用とは、疎水性基が水をさけて分子内部に集まろうとする相互作用のことをいい、タンパク質の安定化に大きく寄与している。この相互作用はファンデルワールス相互作用と疎水性基の水和エネルギーの寄与からなっており、Millerらにより提唱された式(96)によりその概算値は算出可能である(97)。タンパク質はS-S結合を形成することにより、変性状態のコンホメーションのエントロピー (S) が減少し安定化すると考えられている(98)。それに対して、タンパク質が安定化するのは変性状態のエントルピー (H) が増加するためであるという考えもある(99)。これらエネルギーとコンホメーションのエントロピー、ひずみのエネルギーなどが相殺した結果、いずれのタンパク質も未変性状態は変性状態よりもわずかに5~15 kcal/mol安定であるにすぎない。なぜタンパク質の ΔG が10 kcal/mol程度しかなく、どのようなタンパク質でも同じような値であるのかは謎とされている。

Table 3 Estimated values of stabilizing energy for β -lactoglobulin⁽¹⁶⁷⁾

Stabilizing factor	Stabilizing energy (kcal/mol)
Conformational entropy	+534~+1620
Electrostatic interaction	~0 (offsetted)
van der Waals interaction ⁽³⁶⁾	-380
Hydrogen bond	-55~-725
Hydrophobic interaction ^(97,168)	buried surface area = 19712 Å ² -0.024 x 19712 = -473
Net stabilizing energy	-11.76 ⁽⁹⁰⁾

本研究においては、 ^{19}Trp を Tyr に置換したことに伴う β -LGの安定性の変化を、ポリペプチド主鎖の二次構造含量を反映するとされている CD_{222} 値の塩酸グアニジン濃度依存的な変化を追跡することにより解析した。野生型 β -LGの水中における変性のGibbs自由エネルギー変化 ($\Delta G_{\text{fold}}^{\text{app}}$) は、11.2 kcal/molとなり、Raymondらにより報告された値と良く一致した(90)。W19Yの $\Delta G_{\text{fold}}^{\text{app}}$ は、野生型 β -LGの $\Delta G_{\text{fold}}^{\text{app}}$ に比べ6.9 kcal/mol減少していた。さらに、未変性状態から変性状態へ移行する遷移塩酸グアニジン濃度は、野生型 β -LGで2.5 M、W19Yでは1.2 Mであった。これほど大きな安定性低下はなにが原因となって引き起こされたのであろうか？

これまでであるタンパク質における残基置換とそれに伴う安定性の変化に関しては、T4ファージリゾチーム(100, 101)、トリプトファン合成酵素 α サブユニット(102)、バルナーゼ(103)、およびバクテリオファージジーンVタンパク質(103)を用いて精力的に研究されてきた。置換残基の、もとの残基に対するどのような性質の変化がタンパク質の安定性の変化に大きな影響を与えうるのか？順を追って考えてみると (Table1)、1) 疎水性の変化；アミノ酸残基の疎水性を測る尺度としては、溶媒移送ギブス自由エネルギー (Glyに対する有機溶媒から水への移送エネルギー) (104)やOMHスケール (optimal matching hydrophobicity) (105)が提唱されているが、今回のような芳香族アミノ酸の置換の場合には、それぞれの値と ΔG との間で比例関係が成り立たないことが知られていることから、ここから直接判断することはできない。しかし、Trp及びTyrに対するそれぞれの値にそれほど大きな差はなく、今回観察されたほどの違いを生み出すほどの疎水性の違いがあるとは考えられない。2) 容積の変化；Table1からTrpとTyrの間ではそれほど顕著な容積の差がないことから、これが原因で分子内部のバックリングが変化しそれとともに安定性が低下したとも考えられない。3) 溶媒露出表面積の変化；溶媒露出表面積の変化はそのまま疎水的相互作用の変化となることが知られて

いるが、これもTrpとTyrの間では大きな差はない。4) 静電的相互作用の変化；タンパク質内部の疎水性の低下は静電的エネルギーの低下を引き起こす可能性のあることが示唆されている(106)。分子内部に存在するTrpをTyrに置換することで分子内部の疎水性が低下し、静電的エネルギーが低下した可能性は考えられる。5) 温度因子の小さい構造に存在する残基の置換；温度因子の小さいつまり硬い構造に存在する残基は安定性に重要であるとされている(107)。しかしTrpの存在する領域は、mAbをプローブとして用いた実験から熱に対して比較的不安定な領域であると考えられていることから(48)、この可能性は低いものと考えられる。6) 水素結合；タンパク質の立体構造全体としての変化は微細であるにも関わらず、一本の水素結合の欠落に伴う置換残基周辺のわずかな構造変化が結果的に安定性に大きな影響を与えることが知られている(101)。

これら安定性の低下を引き起こしうる原因を総合し、W19Yにおける安定性の低下の原因を考えてみると、RBPにおける¹⁹Trpに相当するTrp残基は、水素結合ネットワークを形成していることが知られていることから(19)、¹⁹Trp残基の置換に伴う水素結合の欠落が主要な原因の一つとして考えられる。つまり、¹⁹Trpを中心として形成されている水素結合ネットワークは、タンパク質全体の安定性を維持するために重要であると考えられた。

変異型cellular retinol binding protein IIを用いたアクリルアミドによるStern-Volmer分析の結果、¹⁹Trpに相当する⁹Trp残基は全体的な構造の維持に関与している残基であるとされているが、全体的な構造の安定性を維持するという形で関与しているかどうかは明らかにされていない(108)。しかし¹⁹Trpに相当する⁶Trp残基をTyrに置換した変異型fatty acid binding proteinにおいては、その変性剤に対する安定性は水中における変性の自由エネルギー変化に換算すると約1.0 kcal/molほどの低下しか観察されていない(109)。以上の2つのタンパク質はリポカリンファミリーと近縁のcellular retinoid/fatty acid

binding proteinファミリーに属している。このファミリーにおける¹⁹Trpに相当するTrp残基は全体的な構造の維持に対して何らかの機能を有してはいるが、安定性の維持という点ではそれほど重要な残基ではないと考えられる。本研究においてβ-LGにおける¹⁹Trp残基は、β-LGの安定性の維持に対して重要な残基の一つであることが明らかとなったことから、リポカリンファミリーとcellular retinoid/fatty acid binding proteinファミリーではその保存されたTrp残基の有する機能、特にタンパク質の全体的な構造の安定な維持に果たす機能に関しては両者で異なる可能性が示唆された。

¹⁹Trpの置換の影響はかなり広い範囲に及んでいた (mAbをプローブとした構造解析) -

β-LGにおける¹⁹Trpはβバレルの底に位置し(18)、またRBPにおいて¹⁹Trpに相当するTrp残基は疎水性クラスターを形成していると考えられていることから(19)、この残基は¹⁹Trp近傍の局所的な構造の維持に重要であると考えられた。また、W19Yの安定性は野生型β-LGに比べ大きく減少していたことから、¹⁹Trpの置換の影響が全体的な構造にも及んでいるものと考えられた。そこで、一連の抗β-LGmAbをプローブとして用いて、野生型β-LG及びW19Yの¹⁹Trpを中心とした領域あるいは¹⁹Trpから離れた領域の立体構造の比較を試みた。

mAbの野生型あるいは変異型β-LGに対する結合能の差は、次のように解釈可能である：置換残基をそのエピトープの一部として含んでいるmAbの、変異型β-LGに対する親和性が野生型β-LGに対する親和性と異なるような場合、その違いは置換残基の側鎖の変化あるいはエピトープ近傍の構造変化によるものであると考えられる。しかし、置換残基(今回の場合は¹⁹Trp)をエピトープの一部として含んでいないmAbの場合、親和性の変化は抗原抗体反応に対する¹⁹Trp置換の直接的な効果を反映するものではなく、置換残基から離れた領域に生じた構造変化を示すものである。本研究では、前者に属するmAb

として21B3が挙げられる。21B3にて観察された親和性の変化が、直接的な効果を反映したものであるか、間接的な効果を反映したものであるかをピンペプチドを用いて検証した結果 (Fig. 15), ^{19}Trp のTyrへの置換は、抗原抗体反応自体に影響を与えないことつまり ^{19}Trp は21B3の β -LGへの結合に対して重要な残基でないことが明らかとなった。このことから、21B3で観察された親和性の変化はそのまま間接的な効果つまり ^{19}Trp の置換に伴う構造変化を反映したものであると考えられた。その他のmAbはすべて後者に当てはまることから、いずれのmAbの親和性の変化も ^{19}Trp 置換に伴う構造変化を反映していると判断できた。各種mAbのW19Yに対する親和性の変化の様子はTable4に総括した。

1. 置換残基 (^{19}Trp) 近傍の立体構造 (Fig. 22) :

一次構造に沿って ^{19}Trp からTyrへの置換の影響をみると、mAb21B3, LG3.1, LG3.2, LG3.3, LG4.1, 及びLG5.1のW19Yに対する親和性は、野生型 β -LGに対する親和性と大きく異なりほぼRCM β -LGに対する親和性と同等であったことから、 ^{15}Val から ^{56}Ile にかけて大きな構造変化が起きていると考えられた。しかし、LG5.3のW19Yに対する親和性は、野生型及びRCM β -LGに対する親和性の中間を示したことから、 ^{42}Tyr から ^{56}Ile にかけては部分的に野生型 β -LGに近い構造を保持していることが示唆された。さらに、N末領域 (^8Lys - ^{19}Trp) を認識するmAb31A4の親和性も野生型及びRCM β -LGに対する親和性の中間を示したことから、 ^{19}Trp の置換の影響はN末にまではそれほど及んでいないと判断できた。つまり、 ^{19}Trp の置換の影響はN末方向よりはC末方向に顕著で、 ^{19}Trp は ^{19}Trp のC末側が形成する立体構造の維持にとって重要な残基であると考えられた。言い換えると、Aストランド中央の残基である ^{19}Trp の置換により、N末のランダムコイル部分はそれほど大きな影響は受けていないが、A, B, 及びCストランドの構造が大きく乱れたことが観察され、 ^{19}Trp がA, B,

Table 4 Summary of binding abilities of mAbs to W19Y, D129A, renatured β -LG and renatured W19Y.

mAb	W19Y	D129A	renatured β -LG	renatured W19Y	domain
61B4	wild ¹⁾	N.C. ²⁾	wild	intermediate	I
62A6	wild	N.C.	wild	intermediate	II
61C1	wild	wild	wild	W19Y	I
21B3	RCM ³⁾	wild	intermediate ⁴⁾	N.D. ⁵⁾	I
31A4	intermediate (+) ⁶⁾	wild	intermediate (+)	intermediate (++) ⁶⁾	I
LG3.1	RCM	wild	intermediate	N.D.	I
LG3.2	RCM	wild	intermediate	N.D.	I
LG3.3	RCM	wild	intermediate	N.D.	I
LG4.1	RCM	wild	intermediate	N.D.	I
LG5.1	RCM	wild	intermediate	N.D.	I
LG5.3	intermediate	wild	wild	W19Y	I
LG8.1	RCM	wild	intermediate	N.D.	I
LG8.2	intermediate (++)	wild	intermediate (+)	W19Y	I
LG13.1	intermediate	N.C.	wild	intermediate	II
LG16.1	wild	wild	wild	intermediate	II

- 1): The binding ability of mAb to this β -LG was almost the same as that to wild β -LG.
- 2): The binding of mAb to the coated β -LG was not competed by this β -LG.
- 3): The binding ability of mAb to this β -LG was almost the same as that to RCM β -LG.
- 4): The binding ability of mAb to this β -LG was between wild and RCM β -LG.
- 5): The binding ability of mAb to this β -LG was not altered by refolding.
- 6): The binding ability of intermediate (++) of mAb to this β -LG was closer to that to RCM β -LG than that of intermediate (+).
- 7): I: The epitope of this mAb is contained in A, B, and C-strands.
- 8): II: The epitope of this mAb is contained in H-strand, α -helix and the C-terminal region.

及びCストランドが形成する立体構造の維持にとって重要な残基であると考えられた。また、LG5.3のW19Yに対する反応性から、Cストランドは、A、Bストランドと同程度に大きな構造変化を受けているわけではなく、LG5.3により認識される領域は部分的に野生型 β -LGに近い構造を維持していると考えられた。つまり、CストランドはW19Yの構造がRCM β -LG様の構造から野生型 β -LG様の構造へ回復する境界であると考えられた。

この保存されたTrp残基がリボカリンファミリー内で疎水性のクラスターを形成しているという知見と併せて考えると(19)、疎水性クラスター中のたった一残基の置換によりクラスター構造が破壊され、水素結合を介して安定化されている β ストランドの立体構造が、水素結合の欠落ととも破壊されたものと判断された。つまり、 ^{19}Trp の置換の影響が一次構造に沿って伝わったわけではなく、 ^{19}Trp の置換に伴うクラスターの破壊とともにAストランドが構造変化を起こし、Aストランドと水素結合を介して安定化されているBストランドさらにはBストランドと水素結合を介して安定化されているCストランドの構造が破壊され、Aストランドの構造変化が、立体構造上近接し、さらに水素結合により結ばれているB、Cストランドに伝わったものと考えられた。

2. ^{19}Trp からは一次構造上も立体構造上も離れた領域の立体構造：

^{80}Ala — ^{83}Lys 領域を認識するLG8.1のW19Yに対する親和性は、野生型 β -LGに対する親和性とは大きく異なり、RCM β -LGに対する親和性とほぼ同等であった。一方、 ^{79}Pro — ^{85}Asp を認識するLG8.2のW19Yに対する親和性は、野生型 β -LGとRCM β -LGに対する親和性の中間であった。Dストランドを認識するmAbは得られなかったことから、Dストランドの構造について論じることはできない。しかし、上記の項で観察されたようなA、B、Cストランドの大きな構造変化は、一部Eストラ

ンドにおいても観察されるが (LG8.1), LG8.2のW19Yに対する親和性はある程度野生型 β -LGに対する親和性に近づいており, A, B, Cストランドで観察された構造変化がEストランドまで完全には伝わっておらず, ここでもW19Yが野生型 β -LGに近い構造をとり始めているものと判断された. 逆に言うと, ^{19}Trp の置換の影響は, A, Bストランド及びCストランドの一部にまで及び, CストランドとEストランドにかけて少しずつ構造が回復を始めていると考えられた.

3. ^{19}Trp から一次構造上は離れているが, 立体構造上は近い領域の立体構造:

LG13.1のW19Yに対する親和性は野生型及びRCM β -LGに対する親和性の中間を示し, LG13.1の認識する ^{122}Leu - ^{128}Val 領域はわずかに構造変化を起こしていることが判明した. その他のmAb61B4, 62A6, LG16.1の親和性はほぼ野生型 β -LGに対する親和性と同等であり, ^{125}Thr - ^{135}Lys 及び ^{149}Leu - ^{162}Ile の構造はほぼ野生型 β -LGに近い構造を維持していると考えられた.

このことから, A, B, Cストランドで観察された構造変化が, 一部Hストランドにも伝わっていることが示された. RBPに関する研究から(19), Hストランドは6本の水素結合を介してAストランドと相互作用をしていることが示されていること及びA, B, Cストランドで観察された構造変化はEストランドにおいて一部緩和され, 構造の回復が観察されたことから判断して, Aストランドの構造変化が直接水素結合を介してHストランドに伝わったものと考えられた. それ以外の領域, つまり α ヘリックス, Hストランドと α ヘリックスの間のループ, Iストランド及びC末端の構造は, ほぼ野生型 β -LGと同等の構造を維持していることが明らかとなった. α ヘリックスは, 比較的Aストランドに近く存在しているが, α ヘリックスとAストランドの間の水素結合は観察されておらず, そのために構造変化も α ヘリックスまで伝わらないものと考えられた.

このように¹⁹Trp置換に伴う構造変化は一次構造に沿って伝わり、Aストランドが構造変化を起こし、さらにAストランドの構造変化が、水素結合により相互作用している隣接したあるいは立体構造的に近い位置にあるβストランドに伝わるものと考えられた。

また¹⁹Trp以外の領域に変異を導入した変異型β-LG (D129A) では構造変化が全く観察されなかったことから、W19Yで観察された構造変化は¹⁹Trpに特異的なものであると考えられた。このことから¹⁹Trpは、A、B、Cストランドを中心とする立体構造を維持するために重要な残基の一つであると考えられた。

β-LG分子は構造維持及びfoldingに関して二つのドメイン様構造からなる？ (Fig. 23) -

天然型β-LGを塩酸グアニジンにて変性後、透析により再生し、その再生β-LGの立体構造を同様にmAbをプローブとして用い解析した。これまでの研究で21B3により認識される領域は、いかなる方法によってもrefoldingしないことが確認されている(47)。本研究においては、さらに11種類のmAbを用いてより詳細な解析を試みた。その結果、21B3、31A4、LG3.1、LG3.2、LG3.3、LG4.1、LG5.1、LG8.1及びLG8.2にて、再生β-LGに対する親和性と天然型β-LGに対する親和性との間に違いが観察された (Fig. 17)。これは、変性/再生操作によりrefoldingすることのできない領域が、⁶Lys-⁵⁶Ileとかなり広い範囲にわたっていることを示している。また、その他のmAbの再生β-LGに対する親和性はほぼ天然型β-LGに対する親和性と同等であったことから (Fig. 16)、¹²²Leu-¹³⁵Lysあるいは¹⁴⁹Leu-¹⁶²Ileは完全に天然型β-LGと同等の立体構造を維持しているものと考えられた。

ここでrefoldingしにくい領域とされた⁶Lys-⁵⁶IleはA、B、Cストランドに相当し、W19Yで構造変化が認められた領域に一致した。つまりこの領域は微妙な相互作用の乱れにより構造

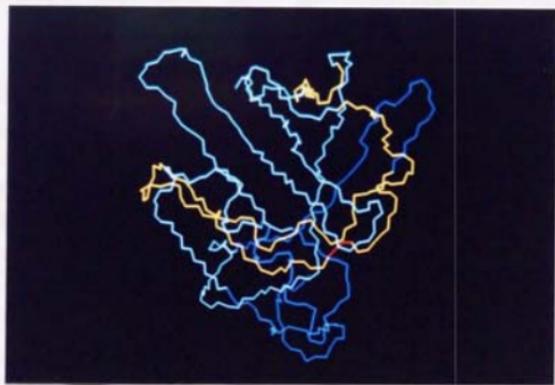
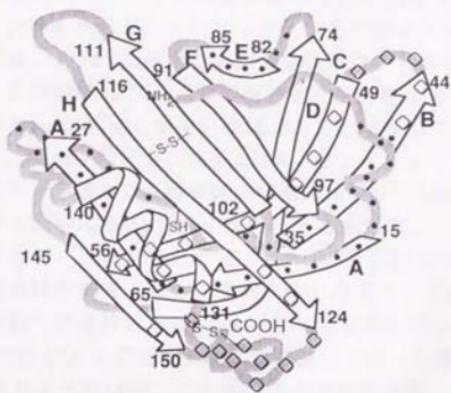


Fig. 23 The conformational change detected in refolded β -LG.

The region (○) was almost the same as wild β -LG. (blue line in the photo)
 The region (•) was intermediate. (yellow line in the photo)

変化しやすく、さらに一度変性するとrefoldingしにくい領域であると考えられた。またrefoldingが完全に進行する領域とされた、Hストランド、 α ヘリックス、その間のループ及びC末端領域は、W19Yにおいても構造変化が認められなかったことから、この領域は ^{19}Trp 近傍の構造変化の影響は受けにくく、変性してもrefoldingしやすい領域であると考えられた。このことから、A、B、CストランドとHストランド、 α ヘリックス、その間のループ及びC末端領域は構造維持及びrefoldingに関してそれぞれ別のfoldingドメイン様の構造を形成していることが示唆された。これまでの研究で、21B3及び31A4のエピトープ近傍構造は熱変性に対して構造変化しやすく、未変性状態から変性状態への遷移温度は67~68°Cであるのに対し、61B4及び62A6のエピトープ近傍構造は構造変化しにくく遷移温度は80°Cとされてきた(48)。この遷移温度はそれぞれのドメインの構造としての"堅さ"を示す指標となりうるものと考えられた。

構造維持に対して ^{19}Trp の影響を受けない領域が、refoldingに関しては何らかの影響を受けている (Fig. 24) -

天然型 β -LGの場合と同様に、W19Yを変性後、透析により再生し、もとのW19Yの構造まで巻き戻ることができるかどうかを検証した。この際、すでに構造がRCM β -LGと同等のレベルまで乱れている、21B3、LG3.1、LG3.2、LG3.3、LG4.1、LG5.1、LG8.1のエピトープ近傍の構造は、変性/再生過程を経ても構造が回復することはなかった (Fig. 20)。LG5.3及びLG8.2の認識するエピトープ近傍は、 ^{19}Trp の置換に伴い完全には乱れていないが、野生型とRCM β -LGの中間の構造を有する領域である。この領域はW19Yの変性/再生に伴いもとのW19Yの構造にまでrefoldingするということは (Fig. 18)、これらの領域の構造維持に対して ^{19}Trp は重要な機能を果たしているが、refoldingに関しては ^{19}Trp は少なくともW19Yの構造にまで巻き戻するためにはなんら機能していないと判断された。

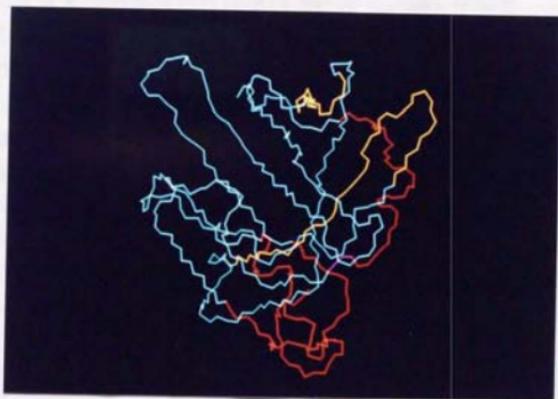
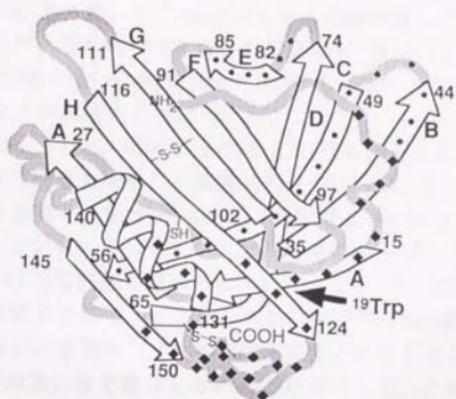


Fig. 24 The regions unable to refold in W19Y.

The region (♦) was unable to refold after unfolding. (red line in the photo.)

The region (•) was able to refold. (yellow line in the photo.)

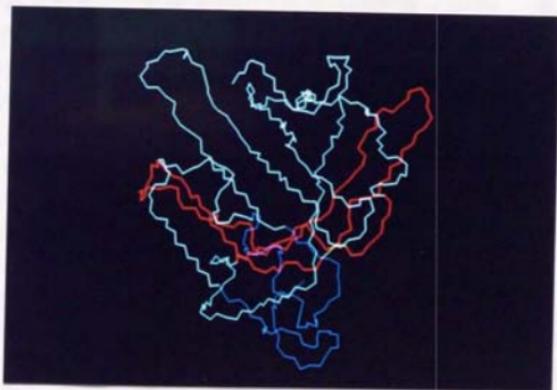
W19Yを用いた構造解析から、31A4の認識する領域の最終的な構造の維持に対して¹⁹Trpは何らかの機能を有していると考えられたが、再生W19Yを用いた結果から (Fig. 19), ⁶Lys-¹⁹Trp領域のrefoldingに関しても¹⁹Trpは何らかの機能を有していることが示唆された。

さらに、61B4, 62A6, LG13.1及びLG16.1を用いて、再生W19Yの構造を解析した結果 (Fig. 19), A, B, Cストランドとは独立したfoldingドメインを形成していると考えられたHストランド、 α ヘリックスとその間のループ、C末端領域は、W19Yの最終的な構造の維持に関し、A, B, Cストランドにより形成されるドメインからは独立し、¹⁹Trpの置換の影響を受けないにも関わらず、W19Yを変性/再生させるともとのW19Yの構造にまで回復しないことが判明した。このことは、このドメインの最終的な立体構造の維持に対して重要でないと考えられていた¹⁹Trpが実は、Hストランド、 α ヘリックスとその間のループ、C末端領域のrefoldingには何らかの機能を果たしていることを示唆している。このことは、*in vivo*におけるfoldingと*in vitro*におけるrefoldingの間の微妙な差異により生じた変化であると考えられた。

以上得られた結果を2つのドメインの構造という観点からまとめるとTable5のようになる。それぞれのドメインを別々にエピトープとして認識する大抵のmAbの親和性は協調して変化しており、確かに β -LGが2つのドメインからなると推測することができた。このように、変異型 β -LGあるいは様々な条件下における β -LGを用い、mAbをプローブとして局所単位の微妙な構造変化を追跡することにより、球状タンパク質でありながら、その領域により構造の維持に対する安定性あるいはrefoldingのしやすさが異なることが明らかとなった。

Table 5 The conformation of the domain I and II in β -LG.

Domain	refolded β -LG	W19Y	refolded W19Y
I: A, B, C-strand (red line)	intermediate	RCM β -LG	RCM β -LG
II: H-strand, α -helix, C-terminal (blue line)	wild β -LG	wild β -LG	intermediate



第三章 変異型 β -LGの機能解析

序

β -LGがレチノールを結合する部位については、様々な説が提唱されている。一つは、レチノールが β バレル内に結合し、 ^{19}Trp がレチノール結合部位を形成しているとする説である(17)。この結合部位は β -LGのX線結晶解析のデータから、レチノールを結合したRBPをもとに座標変換し、model-buildingによりレチノールを結合させた β -LGを構築後、同定されたものである。(17)。これによると、 β バレルのcalyxの底に存在する ^{19}Trp がレチノール結合部位を形成しており、レチノールから10Åの距離にあると考えられた。ここで提唱された結合部位は、ほぼ同じ構造を有するRBPのレチノール結合部位と立体構造的には同じ部位であった(24)。また β -LGのレチノール結合能に関しては様々な研究、特に分光学的な研究が盛んに行われ、レチノールを結合させた β -LGの吸収スペクトル及び蛍光スペクトルの観察から結合部位はTrpを含んでおり、レチノールの β イオン環との間に複雑なエネルギーの遷移が存在することが示唆され(110)、Trpがレチノールの結合に何らかの形で関与していると考えられていた。

β -LGに*in vitro*でレチノールを結合させ、アポ体とホ口体の電子密度差を算出した結果、別のレチノール結合部位として β バレルとは異なる分子表面のポケットの存在が示唆された。このことは β -LGとRBPではレチノールの結合様式に違いがあることを意味しており(18)、このことを支持する実験結果としては次のようなものが挙げられる。1) β -LGに結合したレチノールは、RBPに結合したレチノールに比べアルコール脱水素酵素により容易に分解されてしまう。2) β -LGに結合したレチノールは他のレチノイドにより容易に置換されてしまう。3) 回転緩和時間の測定からレチノールは β -LGの比較的flexibleな領域に結合している(110)。4) β -LGに結合したレ

チノールの発する蛍光収量は、RBPに結合したレチノールの発する蛍光収量の約1/2である(110)。5) β -LGあるいはRBPからレチノールへのエネルギー遷移の効率が異なる(111)。つまり、 β -LGのレチノール結合様式はRBPのものとは異なっているという仮説が提出された。

さらに β -LGの β バレルの中にレチノールを結合させるという操作をmolecular dynamics simulationにより行い、アポ体とホロ体及びレチノールを結合させた直後と安定化した後で大きく揺らぐ領域を同定することにより、 β -LGにはレチノール結合部位が二つ存在するという報告もなされている(112)。 β -LGにはレチノール結合部位が二つ存在するという考えは、 β -LGに対してレチノールとEllipticineあるいはprotoporphyrin IXが同時に別々の領域に結合するという実験事実からも示唆されていた(113, 114)。さらに、同じくリポカリンファミリーに属するmajor urinary proteinと α -2u-グロブリンはほぼ同等の立体構造を維持しながら、そのリガンド結合部位は微妙に異なることが報告されており(23)、またodorant binding proteinではダイマーの境界にリガンドを結合することが知られている(24)ことから、立体構造及びその機能、 β -LGとRBPに関していえばレチノール結合能が同じであれば結合部位も同じであると考えるのは正しい論理展開であると言いがたい。

このように β -LGの結晶構造が明らかとなっていながら、そのレチノール結合部位については直接的な証明がこれまでなされていない。それはレチノールを結合したホロ体の β -LGの結晶体がこれまで得られていないということが主な原因であるとされている。またもともと β -LGは、そのレチノール結合能に関して様々な研究が展開され、その後X線結晶解析によりRBPとの立体構造上の類似性が指摘されたことから、レチノール結合様式に関してもRBPになぞらえて考えられることが多かった。しかし現時点までに集積された実験事実を鑑みると、 β -LGとRBPとはそのレチノール結合様式に違いがあると考

える方が自然であると思われ、レチノールを結合したRBPをもとにmodel-buildingされた結果同定された β -LGにおけるレチノール結合部位及びレチノールの結合に対する ^{19}Trp の機能については改めて別の視点から問い直す必要があると思われた。

本研究においては、 ^{19}Trp を置換した変異型 β -LGを用い、レチノールの結合に対する ^{19}Trp の関与について検証した。さらに前章において観察された微細な構造変化がレチノールの結合に対してどのような影響を及ぼしているかについても明らかにすることを試みた。これまでリポカリンファミリーにおいては、変異型タンパク質を用いてそのリガンド結合部位を形成あるいはリガンド特異性を決定する残基の同定はなされておらず、ここで作製した変異型 β -LGを用い解析を行うことにより ^{19}Trp の機能的意義に関して新たな情報が得られるものと考えられた。

材料及び方法

レチノール結合性試験—

レチノールが β -LGに結合したときに発する蛍光を利用した蛍光滴定実験は、Hitachi 650-10S蛍光分光光度計を用いて行った。レチノール (All-*trans*-retinol, Sigma) の野生型、変異型 β -LGに対する飽和結合試験は、Fugateらの滴定法(110)を一部改変して行った。600 pmolの β -LGを含む1 mlの溶液に、25 pmolのレチノールを含む1 μ lのエタノール溶液を添加後、混和し暗所で1分間静置した。蛍光強度は、励起波長342 nm (バンドパス4 nm)、発光波長475 nm (バンドパス4 nm)により測定し、比蛍光強度は、それぞれの飽和蛍光強度を1.0として算出した。結果は、蛍光滴定法により解析した(115)。単一の結合部位の見かけの解離定数 (K'_d) は、式<1>に示したmass-law方程式を基に、線形最小二乗法を用い算出した(115)。

$$P_0 \alpha = (R_0/n) (\alpha / 1 - \alpha) - K'_d/n < 1 >$$

ここで、 α はレチノールの結合していない結合部位面分を、 R_0 は全レチノール濃度、 P_0 は全タンパク質濃度を示している。 α は、滴定曲線上のそれぞれの点で式<2>を用いて算出した。

$$\alpha = (F - F_{\max}) / (F_0 - F_{\max}) < 2 >$$

ここで、 F はあるレチノール濃度における蛍光強度を、 F_{\max} は全 β -LGがレチノールで飽和した時点における蛍光強度、 F_0 は初期蛍光強度を示している。

レチノール濃度依存的な、475 nmで発光してくる励起スペクトルの測定は、野生型及び変異型 β -LG 600 pmol存在下、レチノールを25 pmolずつ加え、その各点において475 nmで発光する励起スペクトルを測定した。

β -LGに結合したレチノール由来の励起スペクトルの測定—

β -LGに対するレチノールの結合に対して、 ^{19}Trp が直接レチノールの β イオン環とのエネルギー遷移を通じて、レチノ

ール分子の安定化に寄与しているかを検証するため、 β -LGに結合したレチノール由来の475 nmにおける励起スペクトルを測定した。 β -LGに結合したレチノール分子の励起は、340 nm付近で起こるはずであるが、励起した β -LG中の芳香族アミノ酸からの励起エネルギー遷移が起こっているとすると、280 nmで励起された β -LGの芳香族アミノ酸由来のエネルギーがレチノールの β イオン環に遷移後発光したことを示す、励起スペクトル上のピークが観察されるはずである。

野生型及び変異型 β -LG 5.5 nmol存在下、レチノールを6.0 nmol加え、 β -LGに結合したレチノールが475 nmで発光する際の励起スペクトルを250~400 nmで測定した。この際対照として、タンパク質中の芳香族アミノ酸から、結合したレチノールへの励起エネルギー遷移が観察される血清レチノール結合タンパク質 (The binding site Ltd., Birmingham, UK) を用いた。

β -LGに結合したレチノールのアルコール脱水素酵素に対する反応性

β -LGに結合したレチノール分子のアルコール脱水素酵素に対する反応性は、レチノールのアルコール基が、アルコール脱水素酵素により分解されたことに伴う蛍光強度の減少を測定することにより行った。レチノール-タンパク質複合体は、0.5 mgの野生型 β -LGあるいはW19Y、27 nmolのレチノール、140 μ molのKClをPBS中で混和することにより形成させた。終体積2 mlの複合体を室温で15分間静置後、0.2 μ lのNAD (Sigma)、2 μ molのビルビン酸ナトリウム、7ユニットの乳酸脱水素酵素 (Sigma)、0.1ユニットのアルコール脱水素酵素 (Sigma) を加えた。励起波長、発光波長をそれぞれ、342 nm、475 nmに設定し、前述の方法に準じて、アルコール脱水素酵素により分解されていないレチノールの蛍光強度を、1あるいは5分間隔で測定した。結果は、アルコール脱水素酵素添加時 (時間: 0) におけるレチノール由来の蛍光強度を100%

結果

レチノール結合性試験—

β -LGの生理機能は未だ明らかとなっていないが、 β -LGは疎水性小分子を結合するとされているリポカリンファミリーに属しており、実際レチノールは β -LGに結合することがこれまでに報告されている。そこで、レチノールの β -LGへの結合に対する ^{19}Trp 残基の役割を評価するため、W19Yに対するレチノールの結合活性を測定した。レチノールは溶液中においてほとんど蛍光をもたないが、 β -LGに結合することにより、蛍光強度が大幅に増大することが知られている。この蛍光強度の増大は、レチノールが β -LGに結合することにより、レチノール分子の剛性 (rigidity) が増大すること、特にポリエン鎖部分よりむしろ β -イオン環においてその剛性 (rigidity) が増大することにより引き起こされるものと考えられている。この性質から、レチノール濃度依存的な蛍光強度の変化を測定することにより、レチノールの β -LGへの結合を追跡することが可能である。レチノールの野生型 β -LGあるいはW19Yに対する濃度依存的な結合曲線により、レチノールの飽和は、ほぼ同濃度のレチノールを加えた時点で観察された (Fig. 25)。蛍光滴定法に基づき、レチノールの野生型 β -LG及びW19Yに対する見かけの解離定数 (K'_d) を算出したところ、野生型 β -LGに関して得られた値は、Fugateらにより報告された値とほぼ一致した(110)。さらに野生型 β -LGとW19Yの間の K'_d 値がほぼ同等であったことから、W19Yは野生型 β -LGと同様に効率的にレチノールを結合しうることが判明した。このことは ^{19}Trp は、蛍光滴定法により観察しうるような形で、レチノールの β -LGに対する結合に対し必須ではないことを示唆している。

レチノールが結合した β -LG複合体の励起スペクトル—

そこで、レチノールの結合に対する ^{19}Trp の関与を明らかと

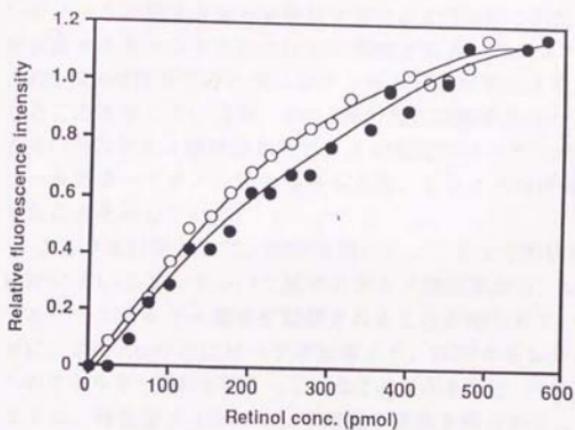


Fig. 25 Ability of wild β -LG and W19Y to enhance all-*trans*-retinol fluorescence. ●: wild β -LG, ○: W19Y. The apparent dissociation constants (K'_d) calculated from these curves are also given.

するため、 β -LGからレチノールへのエネルギー遷移を観察した。このエネルギー遷移は、 β -LGに対するレチノールの結合を安定化すると考えられており、 β -LG中の芳香族アミノ酸残基において励起されたエネルギーが、レチノールの β -イオン環に遷移し、蛍光を発するという現象である。蛍光波長を、レチノールの発する蛍光を観察するため475 nmに固定し、励起波長をスキャンすることにより観察される、励起スペクトル上の340 nm付近のピークはレチノール自身が励起され、発光したことを示しているが、280 nm付近に観察されるピークは β -LG中のアミノ酸が励起され、その励起エネルギーが、レチノールの β -イオン環へ遷移した後、レチノールが発光したことを示している。

ここでは対照として、RBPを用いた。これまでの研究でRBPにおいては、タンパク質中のアミノ酸残基から、レチノールへのエネルギー遷移が観察されることが知られている。確かに、280 nm付近にピークが観察され、RBPからレチノールへのエネルギー遷移が起こっていることが示された (Fig. 26)。さらに、野生型 β -LGについて同様の実験を行ったところ、微弱ではあるが β -LG由来のピークが観察され、 β -LGからレチノールへのエネルギー遷移が β -LGにおいても起こっていることが示された (Fig. 26)。このエネルギー遷移はこれまで ^{19}Trp により担われているものと考えられていた。ところが、W19Yについても280 nm付近にW19Y由来のピークが観察されたことから、 β -LGからレチノール分子へのエネルギー遷移に対して ^{19}Trp は直接的な機能を担っておらず、レチノール分子の結合あるいはその安定化に対して ^{19}Trp が直接重要な役割を果たしていないことがこの実験からも明らかとなった。

しかし、280 nm付近で観察された β -LGあるいはW19Y由来のピークは、ほぼ同等の励起波長において観察されているに関わらず、340 nm付近で観察される、それぞれの β -LGに結合したレチノール自身の発する蛍光の強度及びその蛍光強度を与える波長に違いがみられた。すなわち、W19Yに結合した

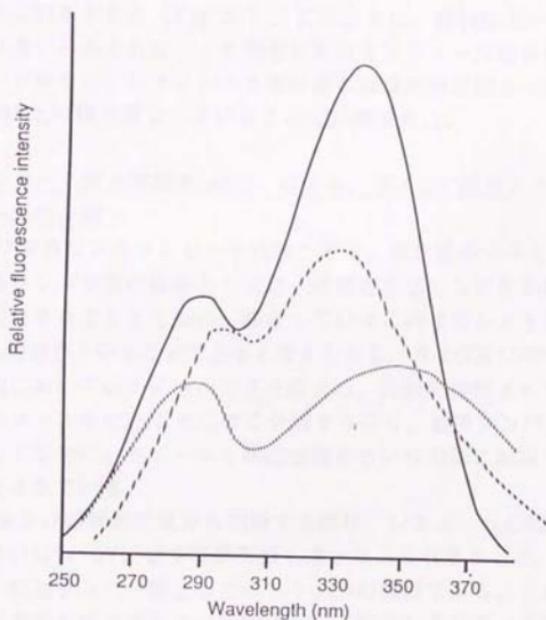


Fig. 26 Fluorescence excitation spectra of wild β -LG, W19Y and RBP, which were complexed with all-*trans*-retinol. Emission was at 475 nm. — : RBP : wild β -LG : W19Y

レチノール自身の発する蛍光強度は野生型 β -LGに比べて半減し、W19Yに結合したレチノール自身の発する蛍光最大波長は、野生型 β -LGに比べてred-shiftを示した。W19Yに結合したレチノールの発する蛍光強度の半減は、加えるレチノール濃度依存的に観察された (Fig. 27)。このことは、親和性という点では違いのみられなかった両者におけるレチノール結合様式に違いが存在し、レチノールを取り囲む環境が野生型 β -LGとW19Yとの間で異なっていることが示唆された。

アルコール脱水素酵素(ADH)による、 β -LGに結合したレチノールの分解

リボカリンファミリーを代表とする、疎水性小分子を輸送するタンパク質の機能としては、特異的なリガンドを高親和性で結合することとともに、結合しているこのリガンドを外部からの攻撃から守ることであると考えられる。 β -LG及びRBPは、体内においてレチノール分子を結合し、比較的分解されやすいレチノールをADHなどによる分解から守り、輸送タンパク質として安定にレチノールを標的組織あるいは細胞に輸送するものとされている。

見かけの解離定数から判断する限り、レチノールの野生型あるいはW19Yに対する親和性に違いはみられなかった。そこで、輸送タンパク質としてのもう一つの機能である、リガンドの安定性を維持するという観点から、結合したリガンドの安定性がどの程度保たれているのかについて野生型及びW19Yについて解析した。

結合したレチノールの加水分解酵素 (ADH) による消化速度あるいは消化率を求めることにより、野生型 β -LG及びW19Y間で、それぞれに結合したレチノールの安定性を比較した。レチノールのADHによる消化作用は、NAD及び肝アルコール脱水素酵素存在下における、酵素的酸化作用によるレチノールの消失に伴う蛍光強度の減少を、時間を追って測定することにより評価した。W19Yに結合したレチノールは、野生型 β

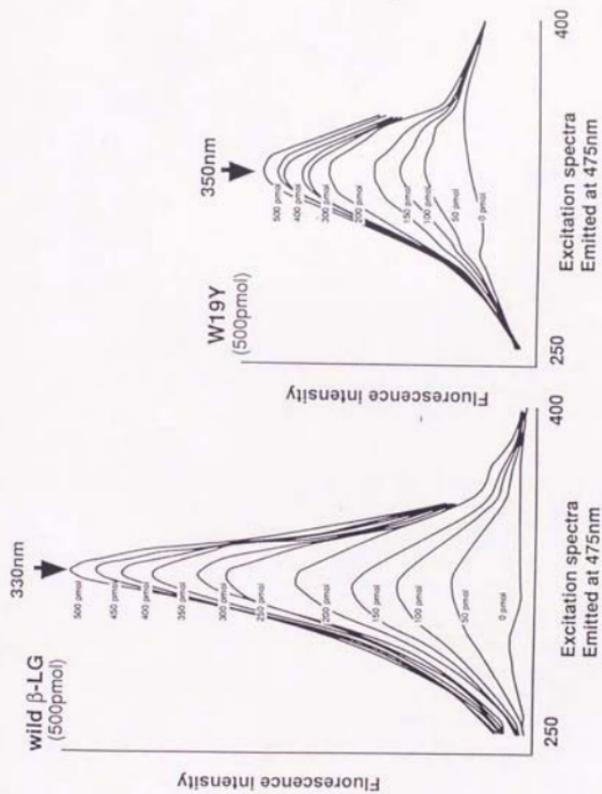
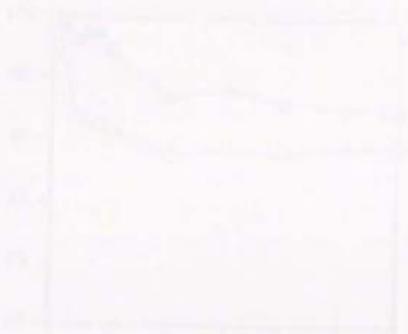


Fig. 27 The dependency of fluorescence excitation spectra of wild β -LG and W19Y on the concentration of added all-*trans*-retinol.

-LGに結合したレチノールに比べ、より迅速に酸化された (Fig. 28)。このことは、W19Yに結合したレチノールは、野生型 β -LGに結合したレチノールよりも不安定であることを意味している。



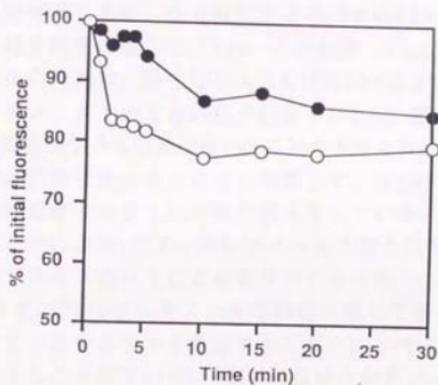


Fig. 28 Reactivity of retinol- β -LG complexes with liver alcohol dehydrogenase. Retinol- β -LG complexes were formed in PBS containing of either wild β -LG (●) or W19Y (○), all-*trans*-retinol, and KCl. The complexes were then incubated at room temperature after supplementation with NAD, sodium pyruvate, lactic dehydrogenase and liver alcohol dehydrogenase.

考察

W19Yは野生型 β -LGとほぼ同等のレチノール結合能を有していた—

まず、レチノールの β -LGへの結合に対する ^{19}Trp 残基の機能を評価するため、蛍光滴定法に基づきW19Yに対するレチノール結合能を測定した(110)。この結果 (Fig. 25)、1) レチノールの飽和は、野生型 β -LG及びW19Yにおいてほぼ同濃度のレチノールを加えた時点で観察され、2) 算出されたレチノールの野生型 β -LG及びW19Yに対する見かけの解離定数(K'_d)はほぼ同等であったことから判断して、W19Yは野生型 β -LGとほぼ同等のレチノール結合能を有していることが判明した。このことにより、 ^{19}Trp がレチノールの結合に対して不可欠な残基ではないということが明らかとなった。

つぎに ^{19}Trp がレチノールの結合に対して何らかの機能を果たしているかどうかを確認するために、レチノールの結合を安定化するとされている(110) β -LGからレチノールへのエネルギー遷移を観察した。このエネルギー遷移は蛍光波長を475 nmに固定し、励起波長を250 nmから400 nmまでスキャンした場合に280 nm付近にピークとして観察される。RBP及び野生型 β -LGで観察されたタンパク質中の芳香族アミノ酸からレチノールの β イオン環へのエネルギー遷移は、W19Yにおいても観察された (Fig. 26)。このことから、 β -LGに結合したレチノールを安定化すると考えられていた β -LGからレチノールへのエネルギー遷移は、 ^{19}Trp だけにより担われているわけではないことが明らかとなった。つまり ^{19}Trp 残基はレチノールの結合に対して直接的な機能を果たしてはいないと考えられた。

以上の結果から、レチノールの結合部位がPapizらの予測した β バレル内であるのか(17)あるいはMonacoらの予測した分子表面のポケットであるのか(18)、その同定は不可能ではあるが、少なくともリボカリンファミリー内で完全に保存された残

基である¹⁹Trpは、 β -LGとレチノールとの結合に関しては、不可欠で直接的な機能を担っているわけではないことが明らかとなった。X線結晶解析に基づきレチノールが β バレルの中に結合し、その結合に対し¹⁹Trpが重要な役割を演じているとしたPapizらの予測(17)及びレチノールは β バレルではなく分子表面のポケットに結合するとしたMonacoらの考え(18)を併せてこの結論を解釈すると、1) レチノールは β バレルに結合しているが、¹⁹Trpはレチノールの結合に対して直接的な機能を果たしていないかあるいは2) レチノールは分子表面のポケットに結合し、¹⁹Trpはレチノールの結合に対して直接機能していないという二つの可能性が考えられた。この点に関しては次の項でさらに考察を行うこととする。

それぞれ別の疎水性小分子を結合するリポカリンファミリー内で唯一完全に保存された残基である¹⁹Trpが、異なるリガンドの特異性を決定しあるいはそのリガンドの結合に重要であるとは考えにくく、その意味でも β -LGの¹⁹Trp残基がレチノールの結合に対して重要でないことは妥当であると考えられる。確かにリポカリンファミリーと同じ様な立体構造(β clam構造)を有し、また疎水性小分子を結合するとされているretinoid/fatty acid binding proteinファミリーにおいても β -LGの¹⁹Trpに相当するTrp残基は保存されており(cellular retinol binding protein IIでは⁹Trp、fatty acid binding proteinでは⁶Trp)、¹⁹F-NMRを用いたTrp残基の機能解析に関する研究から、そのTrp残基は直接レチノールの結合には関与しておらず、それとは異なる¹⁰⁷Trp残基がレチノールの結合には重要であるとされている(116-108)。このことから、リポカリンファミリーあるいはretinoid/fatty acid binding proteinファミリーにおいて同様に保存されたTrp残基が、リガンドの結合に対して直接的な関与はしていないという点で両者に共通していることを、リポカリンファミリーに属するタンパク質でははじめて明らかとすることができた。

¹⁹Trpはβ-LGに結合したレチノールの安定性の維持に関与している—

野生型β-LG及びW19Yに対するレチノールの結合能の測定から、¹⁹Trpはレチノールの結合に対して直接的な関与はしていないことが明らかとなった。cellular retinoid/fatty acid binding proteinにおいても、β-LGの¹⁹Trpに相当する⁹Trp残基は、レチノールの結合に対して直接的な関与はしていないことが示されている。しかし、レチノールが結合することにより⁹Trp残基に¹⁹F-NMR上でわずかな化学シフトが観察されることから、レチノールの結合に対して何らかの機能を有していると考えられている(117)。そこで、この二つのプロテインファミリー内で完全に保存された残基である¹⁹Trpがレチノールの結合に対してどのような機能を有しているかを蛍光励起スペクトルの測定から詳細に解析した。

レチノール分子はβ-LGあるいはRBPに結合し、レチノール自身の分子としての剛性 (rigidity) が増大するに伴い、その蛍光収量が増大することが知られている(118)。ところが本研究において用いた変異型β-LGであるW19Yにレチノールが結合した場合、その蛍光収量は野生型β-LGに結合したレチノールの約1/2に低下し、さらに最大励起波長は長波長側にシフトしていた。蛍光収量の減少は、結合しているレチノール分子の動き (mobility) の上昇の結果、励起されたエネルギーの蓄積効率が減少、つまり励起エネルギーの非放射性崩壊効率の増大により起こると考えられている(118, 119)。また、RBPを用いた研究から、RBPに結合したレチノールの励起及び発光スペクトルがβ-LGに結合したレチノールに比べ短波長側にシフトしているのは、RBPではβ-LGに比べレチノールがより非極性な環境に結合していることを意味しているとされている(118)。これらの研究をあわせてW19Yについて得られた結果 (蛍光収量の減少と最大励起波長の長波長側へのシフト) を考えると、W19Yに結合したレチノール分子の剛性 (rigidity) が減少し、W19Yに結合したレチノールに対する溶媒分子の接

近効率 (accessibility) が増大したことによるものと判断することができる。このことは、W19Yにおいてレチノールを取り囲む環境が微妙に変化し、W19Yに結合しているレチノール分子が不安定化されていることを意味している。

実際に、W19Yに結合したレチノールは、野生型 β -LGに結合したレチノールに比べ、アルコール脱水素酵素により酸化分解されやすくなっていた。

以上得られた結果を ^{19}Trp のレチノールの結合に対する機能的意義という観点から考えてみると、 ^{19}Trp はレチノールの結合に対して直接的な役割を担ってはいないが、結合したレチノールの剛性 (rigidity) を維持し、また溶媒分子が近づかないようにレチノール結合部位の構造を保つことにより、結合したレチノールを安定化し、アルコール脱水素酵素などによりレチノールが分解されることを防ぐために重要であると考えられることができる。

β -LGにおけるレチノール結合部位はどこか？

前述のようなレチノール結合部位の環境の変化は、 ^{19}Trp の置換に伴う構造変化により引き起こされていると考えられる。

^{19}Trp の置換により構造変化を示した領域はA、B、Cストランドであったことから、A、B、Cストランドが β -LGにおけるレチノール結合部位の一部を形成しているものと判断することができる。また構造変化の観察されなかった領域であるHストランド、 α ヘリックス及びその間のループ、C末端部分はレチノールの結合に関与していないと考えられた。このことから

^{19}Trp は、 β -LGにおけるレチノール結合部位の構造を保ち、レチノールが安定に維持されるために重要な機能を有する残基の一つであると考えられた。

レチノールが β バレルあるいは分子表面のポケットいずれに結合しているかを以上の結果だけから判断することは不可能である。しかし、A、B、Cストランドをその結合部位の一部としている β バレル説では、A、B、Cストランドにおける構

造変化がそのままレチノールを取り囲む環境の変化であると考えることが可能である。分子表面ポケット説ではそのレチノール結合部位は、 ^{136}Phe 、 ^{139}Ala — ^{143}Leu 、 ^3Val — ^5Gln 、 ^{105}Phe — ^{106}Cys 、 ^{117}Leu — ^{119}Cys 及び ^{95}Leu から形成されていることから(18)、ここで観察された構造変化と直接結びつけて議論することはできない。そのためには ^{19}Trp によりこの領域の構造がどの程度影響を受けるか、あるいはA、B、Cストランドの形成する立体構造がレチノール結合部位の一部として含まれていないかなどの解析を待たなければならない。

第四章 変異型 β -LGの酵母における分泌量が、野生型 β -LGに比べて増大した原因に関する解析。

序

^{19}Trp の残基置換の影響は、 β -LGの構造及び機能における前述のような変化ばかりでなく、酵母における分泌発現量にも大きな変化を誘導した。すなわち ^{19}Trp をPheやAlaに置換した場合にはその分泌量は大きく減少したにも関わらず、Tyrに置換した場合にはその分泌量は野生型 β -LGに比べ5倍以上増大した。タンパク質にある変異を導入することによりその変異型タンパク質が分泌されなくなる例というのは数多く報告されており、正しいfoldingのできないタンパク質 (malformed protein) は細胞内に蓄積し、分泌不能な凝集体 (aggregate) を形成すると考えられている。ところが、タンパク質の翻訳領域に変異を導入し、それに伴いその変異型タンパク質の酵母あるいは動物細胞における分泌量が増大したという例は限られた数の報告しかなされておらず、その原因も未だに明らかにされていない。このようにたった1残基の置換が、しかも ^{19}Trp 残基をどの残基に置換するかにより分泌量が増減するという現象は、分泌タンパク質の有するどのような特徴により、あるいはそれにより誘導された*in vivo*におけるそのタンパク質の挙動のどのような変化により説明しうるか解析することは、タンパク質の分泌あるいはfolding機構に関し知見を提供しうると考えた。

変異導入に伴い分泌量が増大したタンパク質としては、チトクロームP450g及びヒトリゾチームが知られている。チトクロームP450gの酵母における分泌量は、チトクロームP4502Cファミリーで完全に保存された残基である ^{180}Ser をCysに置換することに伴い4~6倍増大すると報告されている(120)。ヒトリゾチームでは、 ^{77}Cys と ^{95}Cys をとともにAlaに置換し、S-S結合を除去するに伴い8倍程度増大することが確認

されている(121). チトクロームP450gの分泌量増大は, *in vivo*におけるタンパク質の安定性が増大したことによるとされている. 対してヒトリゾチームでは分泌量増大の原因を説明すべく精力的に研究が行われている. その結果変異型リゾチームの分泌量増大は分泌効率あるいは分泌速度の増大が原因であると推察されている(121, 122). その分泌効率の増大を引き起こすタンパク質としての特徴の変化は次の二点であると考えられている, 1) コンパクトな立体構造をとりやすくなった(123), 2) 立体構造はほとんど変化していないが(124), 安定性は大きく低下しunfolding速度は増大していた(125). この両タンパク質においても, 分泌量増大を引き起こす原因としてのタンパク質の属性の変化に対しては一部反する考えが提唱されており, 分泌量増大を引き起こす直接的な原因が本当に存在するか, 存在するとしたらどのような変化であるのか明確な答えは出されていない. 本研究では分泌量増大を引き起こしたW19Yを用い, 上記二つのタンパク質との異同を考慮に入れつつ, W19Yにおけるたった1残基の置換がどのような変化を誘導し, またタンパク質としての属性の変化が酵母細胞内におけるどのような挙動の変化を引き出し, 分泌量増大に至ったかを詳細に解析することを試みた.

変異を導入することにより分泌不能となるタンパク質としては, 糖鎖のついていないtissue plasminogen activator (tPA) (126), 細胞外ドメインに変異を導入したインスリンレセプター(127), 変異型herpes simplex virus type I envelope protein(128)など数多く知られている. 一般に, 正常にfoldingすることのできないmalfoldなタンパク質は小胞体内に蓄積し分泌されない. このmalfoldなタンパク質の分泌不能のメカニズムについては最近特に注目を集め, そこに主に関与していると考えられているのがimmunoglobulin heavy chain binding protein (BiP) である. 分泌タンパク質の*in vivo*でのfoldingを補助するmolecular chaperone(129-131)であるBiPは, 小胞体内で分泌タンパク質と結合する. そのタンパク

質が正常にfoldingすれば解離するが、malfoldなタンパク質であると、その解離が起こらず安定に結合し続け、それに伴いfreeなBiP量が減少するとBiPの転写が促進される(132, 133)。malfoldなタンパク質が小胞体に蓄積すると、つまりfreeなBiP量が減少すると活性化されるBiPプロモーター上のシスエレメントも同定されており(134, 133)、さらに小胞体内でのfreeなBiP量の減少を感知し、その情報をERから核へ伝えるセリン/スレオニンキナーゼ様タンパク質 (Ern1pあるいはIre1p)も同定されている(135, 136)。このように、malfoldなタンパク質の小胞体内での蓄積と分泌不能のメカニズムについては多くのことが明らかとなってきた。

それでは分泌不能という現象への関与が明らかとなりつつあるBiPが、W19Yで観察されたような分泌量の上昇に何らかの形で関与していることはあり得ないだろうか。その関与に関しては二通りの可能性が考えられる。1) BiPの発現量が低下しそれに伴いタンパク質の分泌量が増大する可能性。これまでの研究でアンチセンスRNAによりBiPの発現を抑制すると分泌タンパク質量が上昇し(126)、またその逆にBiPを過剰に発現させると分泌タンパク質量が減少することが知られている(137)。このことは確かにBiPの発現量低下がタンパク質分泌量増大を引き起こした例であると考えられる。分泌量の増大したW19Yにこの可能性をあてはめると、例えば β -LGとBiPとの間の相互作用効率が β -LGへの変異の導入に伴い低下し、その結果freeなBiP量が増大することにより、BiPの発現量が負に制御され分泌量増大が引き起こされたと考えることも可能である。またこのBiP発現量の低下を引き起こすシグナルとしては、freeなBiP量の変化以外のものである可能性も十分考えられる。2) BiPの発現量が増大しそれに伴いタンパク質の分泌量が増大する可能性。上述のようにBiPの発現量は、小胞体内にmalfoldなタンパク質が蓄積しfreeなBiP量が減少することにより増大する。この際malfoldなタンパク質とBiPとは安定な(stable)会合を起こし、解離はしないと考えられている。

しかし正常な分泌タンパク質とBiPとの間の相互作用は一時的なもの (transient) であるとされており、その結合と解離を繰り返すことでタンパク質がfoldingすると考えられている (138)。W19Yについて考えてみると、 β -LGとBiPとの間の相互作用効率の変異の導入に伴い上昇し、その結果freeなBiP量が減少することによりBiPの発現が促進される。ただしこの際、W19YとBiPとの会合は安定なものではなく一時的なもので、W19Yのfoldingが潤滑に進行することにより分泌量増大が引き起こされたとも考えられる。

同様に小胞体内タンパク質であるProtein disulfide isomerase (PDI) は、*in vitro*においてタンパク質のfoldingの律速段階の一つであるS-S結合のかけかえを触媒する酵素である (139)。PDIはBiPと同様に小胞体内でのmalfoldなタンパク質の蓄積によりその発現が促進されることが知られている (136)。またPDIはBiPと全く同様に発現制御されるわけではないことも知られていることから (140)、何らかの形でしかもBiPとは異なった機構に基づき、分泌タンパク質の分泌効率に寄与している可能性も考えられた。

以上のようにタンパク質の分泌あるいはfoldingにおいて、小胞体内で中心的な役割を演じていると考えられているBiPとPDIを例に挙げ、W19Yの分泌効率上昇に対する関与を推察した。

さらに酵母における分泌タンパク質の膜透過に関与していると考えられているタンパク質はこれまでに多数報告されている。小胞体膜内腔に存在し膜透過に直接関与していると考えられているSec61p, Sec62p, 及びDnaJホモログであるSec63p (141)、*in vivo*においてタンパク質のERやミトコンドリアへの輸送あるいはプレタンパク質を輸送可能な構造に保つのに必要であるとされ、細胞質に存在しているhsp70 (142) などはその代表である。Sec61pは哺乳類あるいはバクテリアにそのホモログの存在が指摘され (143)、Sec61pを介した膜透過は進化的に保存されたプロセスであると考えられている。こ

のSec61pはSec62p, Sec63pと複合体を形成し, BiPとの複雑な相互作用の後にポリペプチドの膜透過を完遂させることが報告されている(141, 144). 細胞質に存在するhsp70には, DnaJホモログであるYDJ1pによりそのポリペプチドとの親和性あるいはATP活性が制御されているSsa1/2p(145-147), リボゾームと会合しタンパク質合成を補助するSsb1/2p(148), ミトコンドリアへの輸送を補助するSsc1p(149)などが知られている.

タンパク質の膜透過は翻訳と同時 (co-translational) あるいは翻訳終結後 (post-translational) に起こる(150). 膜透過が起こるチャンネルは受動的なポアであり(151), タンパク質の膜透過はbrownian ratchetにより駆動され(152), 小胞体内でのシャペロンとの結合・folding・糖鎖付加・S-S結合の形成などによりはじめて完遂すると考えられている(152, 153). このようにタンパク質の膜透過は受動的な過程であり, 実際多くのタンパク質は膜透過を完遂せず, 細胞質に投げ出されてしまうと報告されている(154). つまりタンパク質の膜透過効率はシャペロンとの相互作用, foldingなどの効率に依存して変化するものと考えられる. その際細胞質に投げ出されたタンパク質と結合し, 膜透過可能な構造を維持させているのがSsa1p~4pである(153). このうちSsa1pは細胞質にタンパク質が蓄積することによりその発現量が増大することが知られており(155), Ssa1pの発現量を追跡することによりタンパク質の膜透過効率の変化がもとで引き起こされた分泌効率の変化に対し何らかの知見が得られるものと考えた.

以上のような推測を確かめるために, 野生型 β -LG及びW19Yを産生する酵母におけるBiP, PDI及びSsa1pの発現量をmRNAレベルで解析した.

材料及び方法

酵母培養上清中に存在する β -LG量の定量

酵母培養上清中に存在する組換え体 β -LGの検出及び定量は、前述のサンドイッチELISA法により行った(52)。培養上清中に存在する β -LGの定量には、酵母最少寒天培地上に、形質転換の約一週間後に出現したコロニーから、3 mlの液体最少培地に植菌し、約4日間培養した培養液を用いた。標準 β -LG溶液(1 mg/ml)及びサンプル培養液の希釈は、PBS-Tween (0.05% Tweenを含んだPBS)で行った。標準 β -LG溶液は、 $10^4 \sim 10^6$ mg/mlにわたり、 $10^{0.2}$ 倍希釈の希釈系列を作製し、その濃度に対して405 nmにおける吸光値をプロットすることにより標準曲線を作製した。サンプル培養液は $3^1 \sim 3^7$ 倍希釈にわたり、3倍希釈を行い、同様に滴定曲線を作製した。ELISA値(A_{405})が0.8となる点における標準液の濃度と、サンプル培養液の希釈倍率を標準曲線及びサンプル培養液の滴定曲線から推定し、培養液中に存在する β -LG量を定量した。

高発現クローンの選択及び保存法

同じプラスミドで形質転換を行い、さらには、同じプレート上に存在するコロニー間でもその分泌する β -LG量に違いが見い出された。そのため、それぞれのプラスミドで形質転換を行った酵母の分泌する β -LG量の定量をいくつかのクローンについて行い、もっとも高発現のクローンを凍結保存し、同じロットを用いて以下の実験を行うことを試みた。5~10個のコロニーから、3 mlのYMMに植菌し、3~4日後に分泌されている β -LG量をサンドイッチELISA法により定量を行い、最も発現量の多いものをスケールアップ後、以後の実験に供した。最も発現量の多いロットについては、その培養液を15%グリセロール1 ml中に100 μ l程懸濁し、液体窒素で急速に凍結後、 -80°C にて保存した。再現性を保つために、RNAの調製にはここで凍結保存したロットを常に利用した。

酵母からのRNAの抽出

前日に OD_{600} が約0.2となるようにスケールアップした酵母培養液100 mlを、 OD_{600} が約1.0になるまで30°Cで振盪培養し、対数増殖初期の細胞からRNAを抽出した。その培養液を1500×gで遠心分離後、氷冷したPBSで細胞を洗浄した。さらに1500×gで遠心分離後、安定化緩衝液A (1M ソルビトール、50 mM リン酸カリウム緩衝液 pH 7.8, 10 mM 塩化マグネシウム、2 mM ジチオスレイトール (DTT)) 1 mlに懸濁し、30°Cで10分静置した。1500×g、5分遠心分離後、安定化緩衝液B (1 M ソルビトール、25 mM リン酸カリウム緩衝液 pH 7.8, 25 mM コハク酸ナトリウム緩衝液 pH 5.5, 1 M 塩化マグネシウム、2 mM ジチオスレイトール) 400 μ lに再懸濁した。ここにRNaseインヒビターであるRNasin (40ユニット/ μ l) (Promega, Madison, WI) を2 μ l加え、30°Cで2分間静置した。安定化緩衝液B100 μ lに懸濁したザイモリエース (生化学工業、東京) 10 mgを加え更に30°C、30分静置した。プロトプラスト化したことを顕微鏡下で確認後、20% SDSを50 μ l加え、室温で2分間静置することにより、細胞を完全に破壊した。粘性が出て白濁したその溶液を、水飽和フェノールで一回、水飽和フェノール/クロロホルム (水飽和フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール=25:24:1) で水層が透明になるまで抽出を繰り返し除タンパク質を行い、最後にクロロホルム (クロロホルム:イソアミルアルコール=24:1) により抽出を行った。得られた水相に1 mlのエタノールを加え、15000×gの遠心により核酸を沈殿させた。沈殿に4 M 塩化リチウム 200 μ lを加え、ピペティングにより高分子量RNA以外の核酸をほぼ完全に溶解させた。1000×g (6500 rpm) の遠心で沈殿を回収後、200 μ lのTES緩衝液 (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.5% SDS) を加え沈殿を完全に溶解した。溶液中の塩は、クロロホルムで抽出する (遠心は10000×gで行った) ことにより除いた。得られた水相に、20 μ lの3 M 酢

酸ナトリウム、400 μ lのエタノールを加え、全RNAを沈殿させた。15000 \times g、10分間で遠心することにより沈殿を回収し、真空乾燥後、DEPC処理水（0.1%二炭酸エチル水）に溶解し、全RNAサンプルとした。

ノーザンブロット分析-(156)

ノーザンブロット分析には、1.2%アガロース/6.7%ホルムアルデヒドのゲルを用いた。1.2 gのアガロースを72 mlの滅菌水に懸濁後、電子レンジにて加温溶解し、55 $^{\circ}$ Cまで冷却した。そのゲル溶液に10 mlの10 \times 泳動緩衝液（0.2 M 3-Morpholinopropanesulfonic acid (MOPS), 10 mM EDTA, 10 mM 酢酸ナトリウムpH 7.0) と18 mlの37%ホルムアルデヒドを加えよく混和後、更に10分間冷却した。45 $^{\circ}$ C程度まで冷却したゲル溶液をゲル作製板に注ぎ、45~1時間放置した。ゲルの厚さは3~4 mm程度とした。

1~10 μ gの全RNAを含むRNA溶液4 μ lに、脱イオン化ホルムアミド10 μ l、ホルムアルデヒド4 μ l、10 \times 泳動緩衝液2 μ l、400 μ g/mlのエチジウムブロマイド2 μ lを加え完全に混和した。65 $^{\circ}$ Cで10分間加熱しRNAを変性させた後、氷上で急冷して安定化した。2 μ lのdye溶液（50%グリセロール、0.5 mM EDTA pH 8.0, 0.25% ブロモフェノールブルー、0.25% キシレンシアノール、0.1%二炭酸エチル）を加え、1 \times 泳動緩衝液中3 V/cmで泳動を行った。電気泳動後、ゲルを滅菌水で10分間洗浄後、20 \times SSC（3.0 M 塩化ナトリウム、0.3 M クエン酸ナトリウム）中に15分間浸した。滅菌水に10分間、20 \times SSCに10分間浸し、振盪しておいたニトロセルロース膜（BA-S85；Schleicher&Schuell, Keene, NH）にキャピラリー法に基づき12時間以上転写を行った。転写後の膜は、3MMペーパー上にて完全に乾燥するまで静置した（約1時間）。その膜を80 $^{\circ}$ C 2時間、真空で乾熱後、プレハイブリダイゼーション液（5 \times SSC, 50%ホルムアミド、5 \times Denhalt's溶液(157)、0.5% SDS；この溶液25 mlに対して1 mg/mlのサケ精子DNA 500 μ l

を電子レンジで500ワット2分間加熱後、急速に氷冷して加えた。)の入ったビニール袋に浸し密閉した。42°Cで2時間静置後、そのブレハイブリダイゼーション液に、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (Amersham, PB10205) にて標識したプローブを加え更に42°Cで12時間以上静置し、ハイブリダイゼーションを行った。プローブの作製には、ランダムプライマー-DNAラベリングキット(宝酒造、京都)を用いた。膜の洗浄は1×SSC, 0.1% SDS溶液で42°C, 15分を2~3回、更に65°Cで30分間行った。露光及び現像は、X線フィルム(Fuji)あるいはBAS2000イメージングプレート(Fujix)を用いて行った。検出されたバンドの定量は、BAS2000イメージアナライザー(Fujix)あるいはNIH image1.45画像解析ソフトを用いて行った。

in vitro 転写・翻訳系一

バクテリオファージSP6のRNAポリメラーゼプロモーターが、マルチクロニング領域のすぐ上流に配置されており、*in vitro*での効率的なRNA合成用のテンプレートとして利用されているpSP65プラスミドを、*in vitro*転写物作製のためのクロニングベクターとして用いた。pSP65プラスミドは東京大学農学部微生物学研究室より供与された。5'脱リン酸化処理を施したpSP65のSacI切断物に、pBB29, pBBW19Y, pBBW19F, pBBW19Aの各SacI切断物を挿入することにより、それぞれpSPWt, pSPW19Y, pSPW19F, pSPW19Fを得た。プラスミドに挿入された断片の方向の確認は、SmaIで切断することにより行った。これらのプラスミドを常法に基づき大量に調製し(157)、転写のための鋳型とした。

まずrun-off転写物作製のため、プラスミドに挿入された野生型及び変異型 β -LG cDNAの3'下流が、平滑末端となるように終止コドンの31塩基下流のSmaI部位で切断し、鋳型プラスミドの直線化を行った。SmaI部位の切断には鋳型プラスミド10 μg を用い、フェノール/クロロホルム抽出、クロロホルム抽出後、1/10容の3 M 酢酸ナトリウム(pH 7.0)及び2容のエ

タノールを加え、遠心分離及び真空乾燥後、10 μ lのDEPC処理水に溶解した（直線化鋳型プラスミド）。この1 μ lに対して、5 \times 転写至適化緩衝液（200 mM Tris-HCl pH7.5, 30 mM 塩化マグネシウム, 10 mM スペルミジン, 50 mM 塩化ナトリウム）4 μ l, 100 mM DTT 2 μ l, RNasin 0.5 μ l, 10 mM ATP, 10 mM GTP, 10 mM UTP, 10 mM CTP各1 μ lずつ, DEPC処理水7.5 μ l, SP6 RNAポリメラーゼ（宝酒造, 35ユニット/ μ l）1 μ lを加え、全量20 μ lにて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応を行った（Promega, Riboprobe II Core Systemテクニカルマニュアルを参照した）。フェノール/クロロホルム抽出、クロロホルム抽出後、1/10容の3 M 酢酸ナトリウム（pH 7.0）及び2容のエタノールを加え、-70 $^{\circ}$ Cにて30分以上静置した。遠心分離により合成されたRNAを回収し、真空乾燥後20 μ lのDEPC処理水に溶解した。最終的なRNA濃度は0.5 μ g/ μ l程度であった。

ここで合成したRNAを用いて、*in vitro*翻訳を試みた。*in vitro*転写されたRNA 2 μ l（約1 μ g）に10 μ lのウサギ網状赤血球ライセート（N90Y; Amersham）、10 μ lのDEPC処理水、0.2775 MBqの³⁵S-メチオニン（SJ.1515, Amersham）を加え、30 $^{\circ}$ Cで60分間静置し*in vitro*翻訳を行った。

さらに、ミクロソーム膜をこの反応系に加えることにより、*in vitro*でのタンパク質のプロセッシング効率あるいは膜透過効率の比較を試みた。上記の反応系にイヌ脾臓ミクロソーム膜（N.270; Amersham）を10 μ l加え、同様に*in vitro*タンパク質合成反応を行った。

ミクロソーム膜存在下、非存在下におけるそれぞれの反応液を水中に10分間置くことにより反応を停止させ、その一部をLaemmliの方法に準じ、15%アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEに供した。残りの画分には1容のグリセロールを加え、-20 $^{\circ}$ Cにて保存した。SDS-PAGE終了後、ゲルを直接乾燥させ、オートラジオグラフィーに供した。

分子量マーカーは、高分子量レンジ用RainbowTMマーカー（Amersham）を用いた。

ウェスタンブロット分析

ウェスタンブロット分析に用いたサンプルとしては、酵母培養上清画分と酵母細胞内画分を用いた。前述の方法で凍結保存しておいた野生型及び変異型 β -LGの各高発現ロットから、3 mlの酵母最少培地に植菌後、3日間培養した酵母培養液を3000 \times gで遠心分離後、その上清を酵母培養上清画分とした。遠心分離によって回収した菌体を1容の氷冷PBSに懸濁し、mRNAの抽出の際と同様の方法でスフェロプラスト化後、SDSにより細胞を破壊することにより、酵母細胞内画分とした。

電気泳動は、還元条件あるいは非還元条件下でLaemmli法を基にSDS-PAGEを行った。酵母培養上清画分あるいは酵母細胞内画分に対してそれぞれ1容の2 \times サンプル緩衝液（還元条件下では5%v/vの2-メルカプトエタノールを加え、非還元条件下では2-メルカプトエタノールは加えない。）を加え、95 $^{\circ}$ C5分間煮沸後、電気泳動に供した（非還元条件下では37 $^{\circ}$ C30分静置した）。泳動後、セミドライ型プロットング装置ミリポットSDE（Millipore）を用い、使用説明書に従い、immobilon膜（PVDF膜、Millipore）にタンパク質の転写を行った。その膜を1%ウシ血清アルブミン・フラクシオンV（生化学工業、東京）/PBS-Tweenに浸し、1時間室温にて静置することにより膜のブロッキングを行った。PBS-Tweenで膜を洗浄後、一次抗体としてPBS-Tweenで希釈した抗 β -LG mAb21B3約5 μ gを加え、1時間室温にて静置した。同様に、PBS-Tweenにて洗浄後、PBS-Tweenで希釈した西洋ワザビパーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG（CappelTM Research product, Durham, NC）5 μ lを加え1時間室温で遮光静置した。PBS-Tweenで洗浄後、化学発光基質（ECLウェスタンブロットング検出システム；RPN2106, Amersham）を用い、X線フィルム上にて β -LGの検出を行った。ECLを用いた発色法は、使用説明書に準じて行った。露光は、バンドの強さに応

じて15秒から2分程度行った。

分子量マーカーは、プレステインSDS-PAGEスタンダード (Low range, BioRad, Richmond, CA) あるいはRainbow™ マーカー (高分子量レンジ, Amersham) を用いた。

パルス/チェイス実験(120, 122)

それぞれの発現プラスミドで形質転換を行った酵母を、100 mlの合成選択培地でOD₆₀₀が1.0になるまで培養後、遠心分離により集菌し、1 mlのYMMで2回洗浄した。1 mlのYMMで懸濁した後、4 μ CiのTran³⁵S-label (ICN Biomedicals Inc, CA) を加え、30°C5分間パルスを行った。遠心分離により集菌後、標識停止溶液 (0.7% yeast nitrogen base without amino acid, 2% グルコース, 30 mM メチオニン, 5 mM システイン) 1 mlを加え、チェイスを開始した。一定時間ごとに、50 μ lずつ分取し、遠心分離により菌体を除いた。この上清に、抗 β -LGマウス抗血清20 μ lを加え、4°Cで一晩振盪し、抗原-抗体複合体を形成させた。ここに、固定化した *Staphylococcus aureus* 菌体10%懸濁液 (IgGSORB, The enzyme center, MA) を400 μ l加え、室温で1時間振盪することにより免疫沈降物を形成させた。1000 \times gの遠心により得た沈殿をPBS-Tweenで4回洗浄後、2-メルカプトエタノールを含んだサンプル緩衝液で完全に混和し、95°C5分間煮沸し、上清チェイス画分とした。

チェイス開始時において、酵母細胞内で標識されている β -LG量を、全標識 β -LG量とした。各チェイス時間において分泌された β -LG量は、ここで求めた全標識 β -LG量に対する比によって表現した。この β -LGの調製のために、まずチェイス開始時に50 μ lを標識酵母培養液より分取し、遠心分離後、YMMにて3回洗浄した。その菌体に、100 μ lの煮沸緩衝液 (2% SDS, 0.15 M Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8.0, 5% 2-メルカプトエタノール, 更に使用直前にPMSF (終濃度2 mM; フェニルメチルスルフォニルフルオリド)) を加え、

5分間煮沸した。そこに、900 μ lのTNET緩衝液 (1% TritonX-100, 140 mM 塩化ナトリウム, 1 mM EDTA pH 8.0, 50 mM Tris-HCl pH 8.0), PMSF (終濃度: 2 mM) 及びロイペプチン (終濃度: 0.2 mg/ml) を加えた。15000 Xg, 10分間遠心後、その上清に抗 β -LG抗血清を同様に20 μ l加え、この後の免疫沈降後の操作は、前述と同様の方法で行った。

サンプル緩衝液にて煮沸を行った、各時間における上清チェイス画分及びチェイス開始時における細胞内画分をSDS-PAGEに供した。泳動後ゲルを直接乾燥させ、BAS2000イメージングプレートを用いて露光及び現像を行い、さらにバンドの定量を行った。分子量マーカーはRainbowマーカーを用いた。

動物細胞 (COS-7細胞) による野生型及び変異型 β -LGの分泌発現一

動物培養細胞であるCOS-7細胞を用いて、野生型及び変異型 β -LGの分泌発現を試みた。COS-7細胞での分泌発現には、リンホカイン受容体遺伝子の、COS-7細胞における発現クローニングを目的として開発された、pME18Sを用いた。このベクターは東大・医科研横田崇博士より供与された。このベクターはSR α プロモーターを持ち、COS-7細胞での複製が可能であり、高コピー数ベクターであるpUCの複製起点を持つことから、少量の培地からトランスフェクションに必要な量のDNAの精製が容易であることが知られている。

まず、pME18SをEcoRI及びXbaIで切断後、野生型及び変異型 β -LG cDNAのEcoRI, XbaI切断断片を挿入した。目的の断片が挿入されているかどうかは、PstIで切断することにより確認した。アルカリ-SDS法(157)に基づき調整したプラスミドを用いてCOS-7細胞の形質転換を試みた。

形質転換は、DEAE-デキストラン法により行った(158)。形質転換の前日に植えつきを行い $2\sim 5 \times 10^5$ 個/5 mlとなるように10%ウシ胎児血清 (GIBCO, Gaithersburg, MD) を含

んだ、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, 9.5 g/l ニッスイDMEM2, 3.7 g/l 重炭酸ナトリウム, 10 mM HEPES, 4 mM L-グルタミン, 5×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール, 100U/ml ベニシリン (萬有製薬, 東京), 100 μ g/ml ストレプトマイシン (明治製薬, 東京)) に懸濁後, 半径6cmのディッシュ (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) にて培養した。70~80%コンフルーエントに達したときに培地交換 (DMEM + 10% FCS) を行い, 1 M HEPES pH 7.1 20 μ l を加えた。ここで形質転換に用いるDNA 0.1~2 μ g を含む溶液に滅菌水を加え全量を80 μ l とし, そこに, 50 mg/ml DEAE-デキストラン (Pharmacia) 20 μ l を加えよく攪拌しておく。この溶液 100 μ l と 100 mM クロロキン (Sigma) 2 μ l を細胞に加えた後, 37°C, 二酸化炭素5%存在化で培養した。2時間後, 10%ジメチルスルホキシド (DMSO, ガスクロ用, 和光) を含むPBS (一) (8 g/l 塩化ナトリウム, 0.2 g/l 塩化カリウム, 1.15 g/l リン酸水素二ナトリウム, 0.2 g/l リン酸二水素カリウム) 2 ml を加え, 2分間培養後PBS (一) にて細胞を洗浄し, 引き続き5%FCSを含んだDMEMで4~5日間培養を行った。

培地中に分泌された β -LGの定量は前述したように, サンドイッチELISA法により行った。培養上清の保存は, -20°Cにて行った。

プロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI), 熱ショックタンパク質 (Hsp70; SSA1), 免疫グロブリン重鎖結合タンパク質 (BiP) 各種mRNA量の比較

酵母における*in vivo*でのfoldingに関与していると考えられているタンパク質の中で, 本研究ではPDI (小胞体), SSA1 (細胞質), BiP (小胞体) が, 酵母細胞質内あるいは小胞体内におけるquality controlにどのように関与しているかをノーザンプロット分析により解析した。

酵母PDI遺伝子は, 生物化学研究室水永博士より供与された。酵母PDI全長遺伝子を挿入されたプラスミドpUC18 (

6-6A) をまず *Bam*HI で切断し、約5kbの断片を精製後さらに *Kpn*I 及び *Pst*I で二重切断を行った。アガロース電気泳動によりそれぞれの断片を分離後、約2.6kbの断片を Geneclean II キットを用いて精製し、ランダムプライマー-DNAラベリングキット(宝酒造)及び [α - 32 P]dCTPを用いて標識を行いノーザンブロット用のプローブとした。

BiP及びSSA1は報告されている塩基配列を基に、まず RT-PCR法で目的の断片を増幅するためのプライマーを設計した(155, 159)。

BiP :

5'-ACTACTGCAGCAGACTAAGCGCTGGCAAGC-3'
(+鎖: 12-31)

5'-ACTACTGCAGGACACTTACTTCTACACGG-3'
(-鎖: 440-459)

SSA1 :

5'-AGCACTGCAGCTTTGCTAATGATCGTGTGG-3'
(+鎖: 54-73)

5'-ACTACTGCAGCGTGTTCTTCCTTACCCTTC-3'
(-鎖: 558-577)

これらプライマーの合成は、Cyclone plus DNA synthesizer (MiliGen/Bioserch, Burlington, MA) を用いて行った。プライマーの精製は、オリゴバックEX (Millipore) を用いた。鋳型DNAとアニールする部位が20塩基対、非アニール部位が10塩基対とし、非アニール部位である増幅断片の両端に *Pst*I サイトを導入した。プライマー中の *Pst*I サイトは下線で示した。これらのプライマーを用いてRT-PCR法により、BiP, SSA1 DNA断片の増幅を試みた。鋳型としたRNAは、野生型 β -LGで形質転換した酵母から抽出した全RNAを用いた。この鋳型RNA 1 μ gに (-) 鎖側に相当するプライマー10pmol (1 μ l), 10 \times Avian myeloblastosis virus (AMV) 由来逆転写酵素用緩衝液 (0.5 M Tris-HCl pH 8.3, 0.1 M 塩化マグネシウム, 0.5 M 塩化カリウム, 10 mM DTT, 100 μ g/mlウシ

血清アルブミン) 2 μ lを加え、滅菌水にて全量を16.5 μ lとした。この溶液を95°Cで2分間加熱後、氷冷し、42°Cで30分間アニールをした。ここに、25 mM dNTP混合液 (Pharmacia) 1 μ l, 10 mM スペルミジン塩酸塩1 μ l, RNasin (Promega) 1 μ l, 10ユニット/ μ lのAMV逆転写酵素 (International Biotechnologies, Inc., New Haven, CT) 0.5 μ lを加え42°C 1時間逆転写反応を行い、cDNAのファーストストランドを合成した。90°C5分間煮沸後、氷冷し酵素の失活及びRNA鎖と合成したcDNA鎖を解離させ、PCRの鋳型とした。

この鋳型1 μ lに滅菌水18 μ l, 10 \times Taq緩衝液 (酵素に添付されたものを用いた), 1 mM dNTP混合液2.5 μ l, (+) 鎖, (-) 鎖に相当するプライマー10 pmolずつ, Taqポリメラーゼ (ニッポンジーン, 東京) 0.4ユニットを加え、全量25 μ lでPCRを行った。PCRは、94°C30秒 (変性), 55°C20秒 (アニール), 72°C2分 (伸長反応) で、30サイクル行った。反応後、*Pst*Iにより切断を行い、反応液の一部を取りアガロース電気泳動により合成された断片の大きさを確認後、GeneClean IIを用い目的の断片の精製を行った。その断片を、*Pst*I切断後5'脱リン酸化処理を施したpSP65ベクターに挿入した。サンガー法によりそれぞれ増幅された断片の塩基配列を決定した結果、それぞれ目的の遺伝子が増幅されたものであることが判明した。このそれぞれのDNAを常法に基づき大量調製後(157), *Pst*I切断したものを鋳型とし、ランダムプライマー-DNAラベリングキット (宝酒造) 及び $[\alpha$ -³²P]dCTP (Amersham) を用い、標識を行い、ノーザンプロット用のプローブとした。

ノーザンプロット及びハイブリダイゼーションは前述の方法に準じて行った。露光及び現像はBAS2000イメージングアナライザーを用いて行い、併せてバンドの定量も行った。

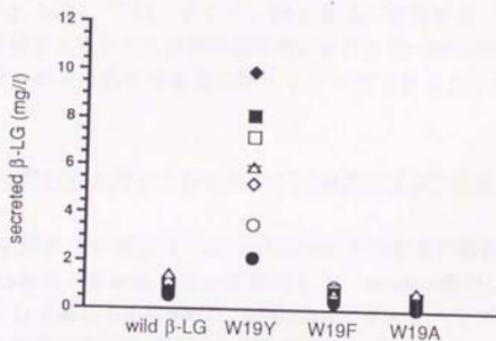
結果

酵母培養上清中に分泌発現された野生型及び変異型 β -LG量の比較

野生型及び変異型 β -LG cDNAを含む酵母発現プラスミドを前述の方法により作製し、アルカリ金属法に基づき酵母 (*S. cerevisiae*, AH22株) の形質転換を行った。ヒスチジン含有合成選択培地 (YMM) にて4日間培養後、サンドイッチELISA法により培養上清中に分泌された各種 β -LG量を定量した。それぞれロット間の分泌量のばらつきを考慮して、5~10個のコロニーを無作為に選択し培養を行った。その結果、W19Yの分泌量 (6.08 ± 2.68 mg/l) は野生型 β -LG (0.90 ± 0.21 mg/l) に比べ、5倍以上上昇していた。しかし、W19F及びW19Aの分泌量は野生型 β -LGに比べ減少し、それぞれ 0.70 ± 0.21 mg/l、 0.48 ± 0.20 mg/lであった (Fig. 29)。W19Yの分泌量は、コロニー、ロットあるいは培養時間の違いに関わらず常に野生型 β -LGに比べて増大していた。またW19Aの分泌量は、常に野生型 β -LGよりも減少し、ロットによってはまったく分泌していないものも存在した。

酵母菌体内に存在する野生型及び変異型 β -LG mRNA量の比較

全RNA量を正確に測定するため、調整したRNA溶液に沈殿が存在していないことを確認後、100倍希釈した溶液の OD_{260} 値から全RNA溶液の濃度を正確に決定した ($1OD_{260} = 40 \mu$ g/ml)。全RNA各 2μ gを、6.7%ホルムアミドを含んだ1.2%アガロースゲルを用いた電気泳動により分画後、キャピラリー法に基づきニトロセルロース膜に転写した。 β -LG mRNAを検出するためのプローブとしては、 19 Trp部位に導入した変異の影響を排除するため、変異導入部位を含まない533bpのPstI断片をランダムプライマーラベリングキットにより 32 P標識して用いた。洗浄の条件は、 $45^\circ\text{C} \cdot 5$ 分間、 $45^\circ\text{C} \cdot 20$ 分間、 65



β -LG	amount of secreted β -LG (mg/l)
wild	0.903 ± 0.209
W19Y	6.085 ± 2.68
W19F	0.697 ± 0.213
W19A	0.479 ± 0.199

Fig. 29 The amount of wild and mutant β -LGs secreted into a supernatant of yeast cultures.

℃・20分間で行った。酵母28S rRNA量を対照とし、各mRNA存在量の比較を行った。NIHイメージ画像解析ソフトを用いて、各バンドの定量を行ったところほぼ同等であり、酵母菌体内に存在する野生型及び変異型各mRNA量に差は見いだされなかった (Fig. 30)。このことから、野生型及び変異型各 β -LGを分泌発現するそれぞれの酵母菌体内における各mRNA存在量は、それぞれの β -LGの分泌量に関わらず一定であることが判明した。

in vitro翻訳系を用いた野生型及び変異型 β -LGの翻訳効率の比較

野生型及び変異型 β -LG mRNAの転写効率及び翻訳効率を *in vitro* 転写・翻訳系を用いて評価した。*in vitro* 翻訳において鋳型として用いるmRNAは、SP6RNAポリメラーゼプロモーターの下流に各cDNA断片を挿入後、バクテリオファージSP6RNAポリメラーゼにより *in vitro* において合成したものをを用いた。またこの際、野生型及び変異型 β -LG各cDNAからのmRNAの合成を定量的に行うことにより、各転写効率の比較も併せて行った。

それぞれのcDNAが挿入されたプラスミドベクターを平滑末端化後、吸光値から正確な濃度を決定した。各直線化プラスミド1 μ gを鋳型として用い、テクニカルマニュアルに従い *in vitro* 転写を試みた。フェノール/クロロホルム抽出後、エタノール沈殿及び真空乾燥を行い20 μ lのDEPC水に溶解した。一部をとりOD₂₆₀から、濃度を検定したところいずれも約0.5 μ g/ μ l程度であった。そのうちの4 μ lを取り、 β -LG mRNA検出用のプローブを用いてノーザンプロット分析を行うことにより各 β -LG mRNAの転写効率の比較を試みた。その結果、いずれのmRNAも単一バンドを示し、また同分子量の各mRNAが検出された (Fig. 31)。NIHイメージ画像解析ソフトを用いて、各バンドの定量を行ったところほぼ同量であったことから、野生型及び変異型 β -LG各mRNAの転写効率は、*in vitro*

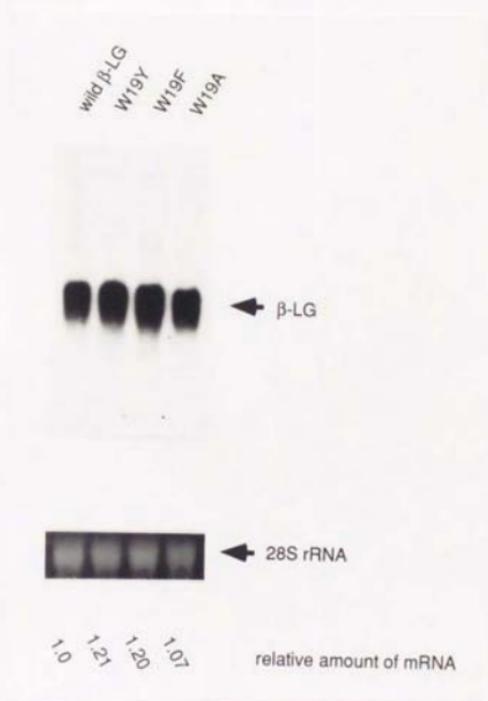


Fig. 30 Northern blot analysis of the yeast cell RNA transformed with respective expression plasmids. 8 μ g aliquots of total RNA were electrophoresed on a 1.2% agarose gel under denaturing conditions, transferred to nitrocellulose membrane, and hybridized with a 32 P-labeled *Pst*I fragment of β -LG cDNA. The relative amounts of each mutant β -LG mRNA were expressed as the ratio to that of wild β -LG mRNA.

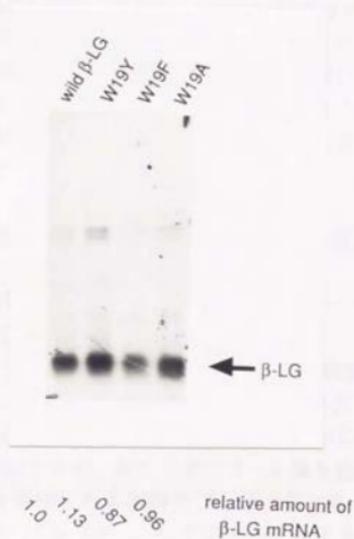


Fig. 31 Northern blot analysis of the wild and mutant β -LG mRNAs transcribed *in vitro* by using a SP6 promoter in a pSP65 plasmid. The relative amounts of each β -LG mRNA were expressed as the ratio to that of wild β -LG mRNA.

の系を用いてみる限りほぼ同等であった。

*in vitro*で作製したmRNAを鋳型として次に*in vitro*翻訳を試みた。*in vitro*転写されたmRNA各1 μ gをウサギ網状赤血球ライセートに加え、 35 S標識メチオニン存在下、30°C・60分間反応を行った。反応液のうち5 μ lをとり、15%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEに供し、ゲルを乾燥後オートラジオグラフィーを行った。いずれの翻訳産物も単一バンドを示した (Fig. 32)。NIHイメージ画像解析ソフトを用い、各バンドの定量を行ったところほぼ同量であった。このことから、野生型及び変異型各 β -LGの翻訳効率は、*in vitro*の系でみる限り同等であることが判明した。

マイクロゾーム膜を用いた野生型及び変異型 β -LGの膜透過効率の比較

さらに、*in vitro*翻訳反応系にイヌ膵臓マイクロゾーム膜を加え、*in vitro*における野生型及び変異型 β -LGの、*co-translational*なプロセッシング効率を比較した。翻訳後マイクロゾーム膜を通過し、シグナルペプチドを切断された各 β -LGは、電気泳動ゲル (15%アクリルアミド) 上明らかに判別しうるバンドとして検出された。またマイクロゾーム膜を通過せず、シグナルペプチドを保持したままの各プレ β -LGと考えられるバンドも検出された (Fig. 33)。シグナルペプチドを切断された各 β -LG (成熟体 β -LG) 量と切断されていない各 β -LG (プレ β -LG) 量を、NIHイメージ画像解析ソフトを用いて定量し、その比を求めプロセッシング効率を比較した。野生型 β -LGと比較した場合のW19Yのプロセッシング効率は同等かあるいはわずかに低下していた。さらにW19F特にW19Aにおいて、野生型 β -LGに比べそのプロセッシング効率の低下が観察された。以上のことから、ウサギ網状赤血球ライセート及びイヌ膵臓マイクロゾーム膜を用いた*in vitro*プロセッシングの系において、野生型及び変異型 β -LGの間でプロセッシング効率すなわち膜透過効率にわずかな差が存在することが示唆された。

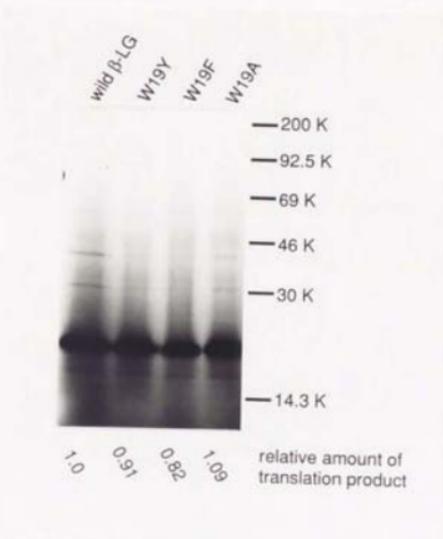


Fig. 32 *In vitro* translation of the wild and mutant β -LG RNAs, which were transcribed *in vitro*, with rabbit reticulocyte lysates. SDS-PAGE (15% acrylamide) were done under the reducing condition. The relative amounts of each translation product were expressed as the ratio to that of wild β -LG.

酵母において分泌発現させた野生型及び変異型 β -LGの局在性

酵母培養上清中に分泌された各 β -LG量及び細胞内に存在する各 β -LG量を定量的に比較するため、あるいは酵母細胞内に存在する各 β -LGの存在状態を比較するために、前述の方法により調製した各 β -LGの酵母培養上清画分及び酵母細胞内画分をそれぞれウェスタンブロット分析に供した。それぞれの画分に2-メルカプトエタノールを加え、煮沸することにより還元条件下で調製したサンプルは、それぞれのサンプルの定量的な比較を行う場合に用いた。また2-メルカプトエタノールを加えずに、37°C・30分間静置することにより非還元条件下で調整したサンプルは、酵母細胞内に存在する各 β -LGの存在状態の比較を行う場合に用いた。15%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEにより各タンパク質を分離後、PVDF膜に転写した。化学発光基質を用いることにより膜に転写された β -LGを検出した。一次抗体としては還元・非還元いずれの条件においても、変性した β -LGをより強く認識する抗 β -LGモノクローナル抗体21B3を用いた。

還元条件下において調製したサンプルを用いたウェスタンブロット分析の結果をFig. 34に示した。酵母培養上清中の各 β -LG量をNIHイメージ画像解析ソフトを用い比較したところ、野生型 β -LG量に比べ、W19Y量は2.24倍増大していたが、W19FやW19Aは培養上清中に検出されなかった。ここで観察されたW19Yの分泌量増大率は、サンドイッチELISA法により定量した結果と比べわずかに低下していた。次に、酵母細胞内に存在する各 β -LG量を、同様の方法により定量したところ、野生型 β -LG量に比べW19Y量は大きく減少し、野生型 β -LGのわずかに約8%程度であった。酵母細胞内に存在するW19Y量が、野生型 β -LG量に比べ大きく減少し、培養上清中に存在するW19Y量が野生型 β -LG量に比べ増大していたことから、W19Yの酵母細胞内における分泌効率が増大したことが示唆さ

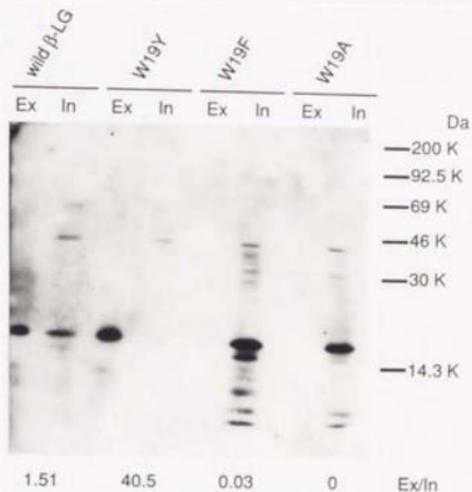


Fig. 34 Western blot analysis of the culture supernatant (Ex) and cell extract (In) of 3-day cultures of yeast transformants expressing wild and mutant β -LGs. SDS-PAGE was carried out under reducing condition using 15% acrylamide gel. Secretion efficiencies are expressed as the ratio of β -LG in the supernatants to that inside the cell.

れた。また、酵母細胞内に存在するW19F量やW19A量は、野生型 β -LG量に比べ多く、数本のバンドが同時に検出された。このことから、分泌不能な変異型 β -LG、W19FやW19Aは酵母細胞内において凝集体を形成しているかあるいはプロテアーゼにより分解されていると考えられた。

非還元条件下において調製したサンプルを用いたウェスタンブロット分析の結果をFig. 35に示した。還元条件下で野生型 β -LGとW19Yにおいて培養上清画分で検出されたバンドはここでも単一バンドを示した。しかし、野生型 β -LG及びW19Yの酵母細胞内画分は、量的には野生型 β -LGの方が多いがともに二本のバンドを示した。分子量的には同じでありながら、集合状態の違う分子が存在しているものと考えられた。さらに、W19F及びW19Aの酵母細胞内画分は、非還元条件下において拡散状態のバンドとなり、単一の分子種として存在せず、凝集した状態あるいはプロテアーゼにより分解された状態で存在していることがここで明らかに示された。

パルス/チェイス実験による野生型及び変異型 β -LGの分泌効率の比較

それぞれの発現プラスミドで形質転換を行った酵母を、 OD_{600} が1.0になるまで培養し、 ^{35}S 標識メチオニン及びシステイン混合物を加え、5分間培養することによりパルスを行った。過剰量の無標識メチオニン及びシステインを加えることによりパルスを停止させ、同時にチェイスを開始した。チェイス開始後、10, 30, 60, 120, 180, 240分後に培養上清を回収した。この上清に抗 β -LG抗血清を加えることにより、 β -LG特異的に抗原-抗体複合体を形成させた後、プロテインAを細胞表面上にもつ、固定化した*Staphylococcus aureus*菌体をさらに加えることにより免疫沈降物を形成させ、培養上清中に存在する β -LGを特異的に沈降させた。十分洗浄後、15%アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEに供し、確認されるバンドの強さを分泌された β -LG量とした。チェイス開始時の酵母細胞内

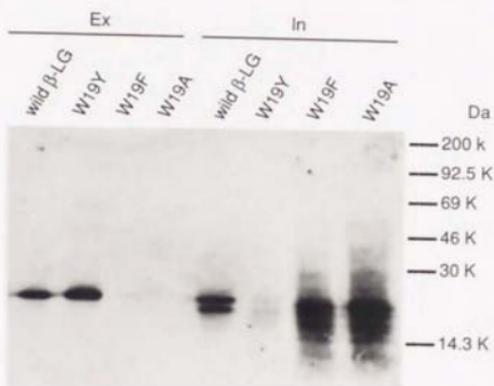


Fig. 35 Western blot analysis of the culture supernatant (Ex) and cell extract (In) of 3-day cultures of yeast transformants expressing wild and mutant b-LGs. SDS-PAGE was carried out under non-reducing condition using 15% acrylamide gel.

画分をサンプルとして供したSDS-PAGEにおいて検出されたバンドの強さを、全標識 β -LG量とした。

野生型及び変異型 β -LGに関して調製した、各チェイス時間における培養上清をサンプルとした免疫沈降物を、SDS-PAGEに供した結果をFig. 36に示した。さらに、それぞれの β -LGについて、チェイス開始時の酵母細胞内画分を試料とした免疫沈降物を同様にSDS-PAGEに供し、そこで検出された全標識 β -LG量を基準として、上清中に分泌された β -LGの割合を表したものをFig. 37に示した。バンドの強さの定量には、イメージングプレートBAS2000を用いた。

Fig. 36, 37から、明らかにW19Yの分泌速度が野生型 β -LGに比べ上昇していることが判明し、チェイス後比較的はやい時期からW19Yの分泌が観察された。W19Fについては、分泌速度は野生型 β -LGとそれほど変わらないにも関わらず、最終的に分泌されるW19F量が減少していることが明らかとなった。W19Aは、W19Fとは異なり、培養上清中に全く分泌されないことが判明した。以上の結果からW19Yについては分泌速度の上昇により、酵母における分泌量が増大したものと考えられた。また、分泌の観察されなかったW19FやW19Aについても、分泌されない原因は異なっていることが示唆された。

野生型及び変異型 β -LGを分泌発現する酵母菌体内に存在する、プロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI)、熱ショックタンパク質 (Hsp70: SSA1)、免疫グロブリン重鎖結合タンパク質 (BiP) 各mRNA量の比較

野生型及び変異型 β -LGcDNAを含む発現プラスミドを用い形質転換を行った酵母細胞より、前述の方法に基づき全RNAを調製した。OD₂₆₀値に基づきそれぞれの全RNA溶液の濃度を正確に決定した後、各全RNA 8 μ gを6.7%ホルムアルデヒドを含む1.2%アガロースゲルによる電気泳動に供した。ノーザンプロット分析は前述の方法に準じて行った。PDIは酵母PDI全長遺伝子を含むプラスミド6-6AをBamHI、PstI及びKpnI切断

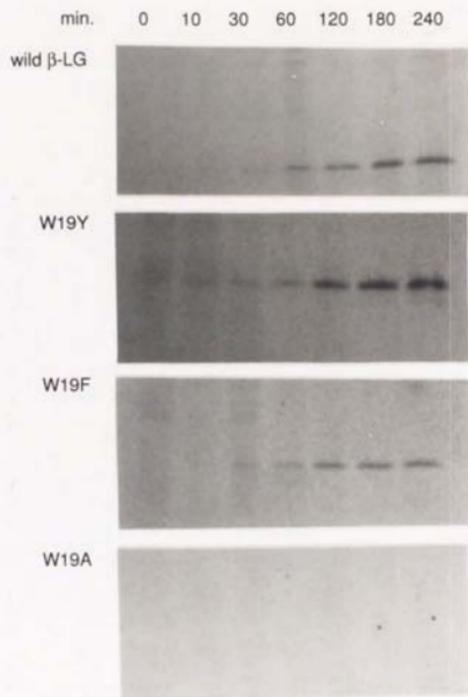


Fig. 36 Secretion kinetics of wild and mutant β -LG in yeast. Yeast transformants were pulsed and chased with methionine and cysteine, followed by immunoprecipitation using anti- β -LG antiserum. Immunoprecipitants from the culture supernatants were analyzed by SDS-PAGE using 15% acrylamide gels. The chase times are indicated at the top.

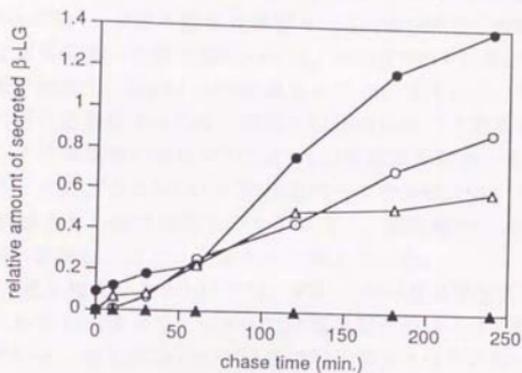


Fig. 37 Secretion kinetics of wild and mutant β -LGs in yeast. The radioactivity of each band (Fig. 36) corresponding to β -LG was quantified using an imaging plate. The secretion rates of wild and mutant β -LG are shown. The results are expressed as the ratio of each β -LG secreted at each time point with respect to that remaining inside the cell at time zero.
 ○: wild β -LG, ●: W19Y, △: W19F, ▲: W19A

により得られた約2.6kbの断片を、SSA1及びBiPは報告されている塩基配列をもとにRT-PCR法に基づき、酵母全RNAから増幅したそれぞれ約500及び450bpの断片をプローブとして用いた。

BAS2000イメージアナライザーを用いたバンドの定量的結果 (Fig. 38)、分泌不能な変異型 β -LG (W19F及びW19A)により形質転換した酵母細胞中では、PDI及びBiPの各mRNA存在量が増大し、SSA1 mRNA量もわずかに増大していた。これら二種の変異型 β -LGは、酵母小胞体内において凝集体を形成し、その凝集体の存在がPDI及びBiPの転写を促進したものと考えられた。またSSA1 mRNA量のわずかな増大は、Fig. 33で観察された膜透過効率の低下に伴い、細胞質内にW19FやW19Aが蓄積したことによるものと考えられた。

分泌量が増大したW19Yでは、PDI mRNA量は野生型 β -LGに比べわずかに減少し、BiP mRNA量は野生型 β -LGに比べ増加していた。またSSA1 mRNA量は野生型 β -LG及びW19FやW19Aに比べ際だって増大していた。

一残基置換により誘導された β -LGの構造及び安定性の変化が、酵母細胞により認識され、そのfolding及び分泌が複雑な制御を受けている可能性が示唆された。

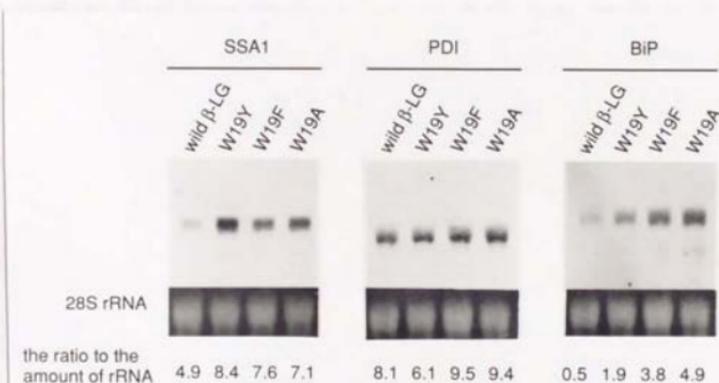


Fig. 38 Northern blot analysis of the yeast cell RNA transformed with respective plasmids. 8 μ g aliquots of total RNA were electrophoresed on a 1.2% agarose gel under denaturing conditions, transferred to nitrocellulose membrane, and hybridized with each 32 P-labeled probe of SSA1, PDI and BiP DNAs. The relative amount of each mRNA were expressed as the ratio to that of 28S rRNA.

考察

1残基の置換により酵母における分泌量が増大した一

正しくfoldingした β -LGのみを検出可能であるサンドイッチELISA法により、酵母培養上清中に分泌された野生型及び変異型 β -LG量を定量した結果、W19Yの分泌量(6.08 \pm 2.68 mg/l)は野生型 β -LG(0.90 \pm 0.21 mg/l)に比べ5倍以上増大していた。逆にW19FとW19Aの分泌量(0.70 \pm 0.21 mg/l及び0.48 \pm 0.20 mg/l)は野生型 β -LGに比べ減少していた(Fig. 29)。このようにたった1残基の置換に伴い、分泌量が増減する現象は序で示した2, 3の報告があるのみである。第二章における構造解析をもとに明らかとなった、残基置換に伴うタンパク質としての属性の変化により、酵母細胞内におけるそのタンパク質の挙動がどのように変化するかあるいは*in vivo*におけるfoldingあるいは分泌を補助するタンパク質(シャペロン)による認識にどのような変化が生じるかを研究することは、未だ明らかとはなっていない*in vivo*におけるタンパク質のfolding及び分泌機構に対し何らかの新たな知見を提供しうるものである。

遺伝子からタンパク質が合成されるまでの間で、変異導入に伴う効率の変化は認められなかった一

変異導入に伴う遺伝子レベルでの変化を解析するため、転写効率、mRNA存在量及び翻訳効率の比較を試みた。*in vitro*転写系による転写効率の比較の結果(Fig. 31)、野生型 β -LGと変異型 β -LGの間に違いは見いだされなかった。プロモーターの強さあるいはプロモーターから転写開始点までの距離が原因となり転写効率が変わることがないように、酵母において分泌発現を行うベクターと野生型及び変異型 β -LG cDNAのそのベクターへの挿入法はすべて同一にした。このことから、導入した変異により直接転写効率が上昇することはないと判断できた。酵母細胞内におけるmRNA存在量をノーザンブロット

分析により比較した結果 (Fig. 30), ここでも野生型及び変異型 β -LG間では差は見いだされなかったことから、変異導入に伴い mRNA の安定性が変化していないことが示された。さらにこのことからそれぞれの cDNA を挿入された発現プラスミドベクターの酵母細胞内における安定性及びコピー数にも違いがないと判断できた。さらに *in vitro* 翻訳系を用いた翻訳効率の比較の結果 (Fig. 32), 野生型及び変異型 β -LG 間には差は見いだされなかった。以上の結果から、野生型及び変異型 β -LG 各 cDNA からそれぞれのタンパク質が合成されるまでの過程で、変異の導入に伴うその効率の変化は認められなかった。つまり W19Y の分泌量増大の原因は、変異導入に伴うタンパク質としての属性の変化が原因であると予測された。

変異導入に伴うタンパク質としての属性の変化と膜透過効率

第二章で述べたように、分泌量の増大した W19Y の安定性は野生型 β -LG に比べ大きく減少し、また ^{19}Trp を中心とする領域の構造が野生型 β -LG に比べて乱れた構造となっていた。このことは、タンパク質としての柔軟性 (flexibility) の増大を示唆するものである。二次構造あるいは三次構造における柔軟性 (flexibility) の増大したタンパク質の膜透過効率が増大する可能性について、*in vitro* におけるプロセッシング効率をもとに検討した結果 (Fig. 33), 分泌量増大 β -LG である W19Y の膜透過効率が増大することはなく、かえってわずかに減少していた。

この章の序でも述べたように、タンパク質の膜透過は brownian ratchet により駆動される受動的な過程であり、膜透過効率は、小胞体内でのシャペロンとの結合・そのタンパク質の folding・糖鎖付加あるいは S-S 結合の形成などの翻訳後修飾などの効率に大きく左右されると考えられる (152)。タンパク質としての柔軟性 (flexibility) の増大は上記のような様々な過程の効率を上昇させる可能性があると考えられたが、*in vitro* プロセッシングの系を用いて判断する限り (Fig. 33), タ

ンパク質としての柔軟性 (flexibility) の増大が直接タンパク質の膜透過効率を増大させるとはいえないことが明らかとなった。さらに、正しいfoldingが起らないと考えられるW19FやW19Aではプロセシング効率が低下し、膜透過不全がこれら変異型 β -LGの分泌量減少の原因の一つである可能性が考えられた。しかし、この*in vitro*プロセシングの系が*in vivo*の膜透過を正しく反映しているかあるいは酵母において観察された分泌量増大という現象が、ウサギ網状赤血球とイヌ脾臓マイクロゾームを用いた*in vitro*の系においても再現されているかという疑問は未だに存在し、より*in vivo* (酵母) に近い形で膜透過効率を議論する必要がある。

分泌効率及び分泌速度の比較

野生型及び変異型 β -LGの分泌効率を比較するために、酵母培養上清中に分泌された各 β -LG量及び細胞内に残存している各 β -LG量をウェスタンブロット分析により測定した (Fig. 34)。その結果分泌量の増大したW19Yでは、細胞内画分に対する上清画分の比 (Ex/In比) は、野生型 β -LGに比べ明らかに増大していた。一方分泌量の減少したW19FやW19Aでは、上清画分ではほとんど認められず細胞内画分に多くのバンドが検出され、このことはW19FやW19Aが酵母細胞内で凝集体を形成していることを示すものである。ここで観察された分泌量増大 β -LGにおけるEx/In比の増大は、やはり分泌量の増大した変異型リゾチームにおいても観察されており、Ex/In比の増大はそのタンパク質の分泌効率の増大を示すものであるとされている (121, 123)。またこのEx/In比の増大つまり分泌効率の増大は、タンパク質としての柔軟性 (flexibility) あるいは*in vivo*におけるそのタンパク質のコンパクトな構造のとり易さが原因であるとされている。

W19YのEx/In比が野生型 β -LGに比べ大きく増大していたことから、W19Yにおいてもその酵母における分泌効率が増大したことにより分泌量が増大したと考えられた。またW19Yの

分泌効率が增大した原因としては、変性剤に対する安定性の研究よりその安定性が野生型 β -LGに比べて大幅に減少していることが明らかとなっていることから(第二章)、W19Yのタンパク質としての柔軟性(flexibility)の増大が考えられた。またmAbを用いたW19Yの構造解析の結果、W19Yは野生型 β -LGに比べ¹⁹Trpの近傍の立体構造がわずかに乱れており、タンパク質としては野生型 β -LGに比べほぐれた構造を維持していることが推測された。このことから、W19Yが*in vivo*において野生型 β -LGと同様にコンパクトな構造を維持しているとは考えにくく、またコンパクトな構造をとりやすいにもかかわらず分泌量が増大しない変異型リゾチームも報告されていることから判断して(123)、*in vivo*において、そのタンパク質がコンパクトな構造を保っているか、多少ほぐれた構造をしているかということだけでは、分泌量の変化を必ずしも説明することはできないと考えられた。

それではこの分泌効率の上昇という現象は、*in vivo*におけるW19Yのどのような挙動の変化により引き起こされたのだろうか?変異の導入に伴い起こりうる変化としては、*in vivo*におけるタンパク質の安定性の変化、プロテアーゼによる消化効率の変化、folding速度の変化などが考えられる。そこで本研究ではそれぞれの β -LGの酵母における分泌速度の比較を行った。分泌速度は、パルス/チェイス法に基づき一定時間内に酵母培養上清中に分泌される各 β -LG量を定量することにより比較した。その結果(Fig. 36, 37)、分泌量の減少したW19FとW19Aでその挙動に違いが観察された。W19Aは酵母からは全く分泌されないが、W19Fではその効率が低下してはいるが最終的には標識された全W19Fの内その40%程度が分泌されていた。W19Fの分泌量はサンドイッチELISA法においてはほとんど検出不可能なレベルであったことから判断して、W19Fは酵母上清中で非常に不安定で、培養中に分解されるものと考えられた。また分泌量の増大したW19Yでは明らかに野生型 β -LGに比べ酵母における分泌速度が上昇していることが判明し

た。このことからウェスタンブロット分析により観察された W19Yの分泌効率の増大は、W19Yの酵母における分泌速度の増大がその原因の一つであることが明らかとなった。この分泌速度の増大とは具体的にはどのオルガネラにおける、どのような過程の速度が増大したことを意味しているかは定かではないが、リゾチームを用いた研究では小胞体において分泌速度増大タンパク質は分泌可能な構造をとりやすいことが原因ではないかと推察されている(122)。また小胞体内で合成されたタンパク質の分泌速度を決める律速段階は、ERを出るとき (exit from ER) であるとされている(160)。確かにリゾチームを用いた研究においても、細胞内に残存している野生型リゾチームの多くはERに存在しているのに対し、分泌量増大变異型リゾチームでは、その多くがERからゴルジ体へかけて分布していることが確認されている(122)。さらにそのERを出るときの速度はそのタンパク質のfolding速度に依存していると考えられていることから(160)、分泌速度の変化はそのタンパク質のfoldingの速度の変化により説明しうるものであるかもしれない。しかし、タンパク質は*in vivo*においては*in vitro*におけるfoldingとは異なり、様々な他のタンパク質 (シャペロン) の補助のもとfoldingを行うことから、*in vivo*におけるfolding速度がこれらシャペロンとの相互作用の変化により左右されることも十分考えられ、分泌速度が変化した正確な原因を究明するためには、タンパク質の属性の変化から誘導されるそのタンパク質の挙動の変化ばかりでなく、他のタンパク質との相互作用の変化をも考慮に入れて考える必要がある。

Folding及び分泌を補助するタンパク質であるBiP, PDI及びSsa1pの関与

W19Yの分泌量増大に、folding及び分泌を補助するタンパク質であるBiP, PDI及びSsa1pがどのように関与しているかあるいはしていないかを解明するための手始めとして、それぞれのmRNAの転写がどのような制御を受けているかを解析した。

序でも述べたように、BiP及びPDI各mRNAは小胞体にmalfoldなタンパク質が蓄積することにより誘導され、Ssa1mRNAは細胞質にタンパク質が蓄積することにより誘導されることが報告されている。本研究では分泌量の増大したW19Y、分泌量の減少したW19FとW19Aさらに野生型 β -LGを分泌発現している酵母から全RNAを抽出し、上記各mRNAの存在量をノーザンブロット分析により比較検討した。その結果、分泌量の減少したW19FとW19Aでは、野生型 β -LGに比べBiPmRNA量が大きく増大し、PDI及びSsa1各mRNA量もわずかながら増大していた。先の酵母細胞内画分のウェスタンブロット分析の結果と併せて考えると、W19F及びW19Aは酵母小胞体内において凝集体を形成していることが示唆された。またW19FやW19Aの膜透過効率の減少に伴い（Fig. 33）、細胞質画分にW19FやW19Aがわずかながら蓄積し、Ssa1 mRNAの転写が促進されたものと考えられた。

つぎに分泌量の増大したW19YではPDI mRNA量がわずかに減少し、BiP及びSsa1 mRNA量が野生型 β -LGに比べ増大していた。PDI mRNA量がなぜわずかに減少したかは定かではないが、W19Yの分泌量増大に対してPDIが何らかの形で関与している可能性が示唆された。BiP mRNA量が増大する原因は、小胞体内におけるfreeBiP量の減少であるとされている。malfoldなタンパク質の場合、タンパク質とBiPとの間の相互作用は安定で解離しないことからfreeBiPが減少すると考えられてきたが、W19YにおけるBiPmRNA量の増大はどのように説明可能であろうか？BiPmRNA量の増大がfreeBiP量の減少が原因であると考えると、W19YとBiPとの間の相互作用効率が野生型 β -LGに比べ上昇し、しかもその相互作用が安定なものではなく一般の分泌タンパク質との間で検出される一時的なものであるとすると、相互作用効率が増大した分だけW19Yのfolding効率も増大したと考えられる。一方BiPmRNA量がfreeBiP量の減少により誘導されるのはmalfoldなタンパク質の場合のみであるとする、W19Yに生じた何らかの属性の変

化をBiPが見分けそれにより誘導されたとも考えられる。さらにSsa1 mRNAはW19Yにおいて野生型 β -LGに比べ増加していた。これは1) 細胞質内にW19Yが蓄積していることを意味している可能性と2) それ以外の新たな原因つまりW19Yの示す何らかの挙動の変化によりSsa1の転写が制御されている可能性が考えられる。1) を説明する仮説として次の様なものが考えられる。SRPを介したco-translationalな膜透過が多くのW19Yで完遂されずに細胞質に投げ出される。しかしSsa1pとの相互作用効率の上昇したW19Yは細胞質においてSsa1pにより補助され、その結果細胞質中のfreeなSsa1p量が減少しSsa1mRNAが誘導されるとともに、post-translationalな膜透過をスムーズに行うことができるようになる。W19Y以外の各 β -LGはW19Yと同様に細胞質に投げ出されても、Ssa1pとの相互作用がW19Yほど効率よく起こらないため、Ssa1 mRNAの誘導もかからず、post-translationalな膜透過も促進されない。

しかしここで観察された各mRNAの変動から直接それらタンパク質の分泌量増大に対する関与を正確に推察することは不可能である。各タンパク質とW19Yとの相互作用の変化を直接観察する必要があると思われる。

このようにfolding及び分泌に関与するシャペロンのW19Yの分泌量増大に対する関与を正確に把握するためには、野生型 β -LGと比較した場合の各シャペロンとW19Yとの間の相互作用の変化を知る必要がある。これまでBiPを代表にしてその結合特異性が精力的に研究されているが未だそのコンセンサスは得られていないのが現状である(161-165)。今後の研究の進展が期待される領域である。

総合討論

本研究では、変異の導入に伴い生じた構造変化を詳細に解析し、そこで観察された微妙な変化が機能に対してどのような影響を及ぼし、また酵母細胞内における存在状態あるいは挙動にどのような変化を誘導したかを解析してきた。

それではW19Yは、¹⁹Trpへの変異の導入に伴い、どの程度野生型 β -LGとは異なるタンパク質となったのであろうか？機能的変化としては、リガンド結合部位の構造がわずかに変化し、結合したリガンドが不安定化していることが観察されたが、リガンドとの親和性にはそれほど大きな変化はなく劇的な変化が生まれているとは考えられない。しかしmAbとの親和性を指標にW19Yに生じた変化を評価すると、野生型 β -LGとは大きな違いがあると判断できる。mAbとの親和性の変化とは、タンパク質-タンパク質相互作用の変化であり、相互作用するタンパク質からは全く別のタンパク質として認識されていると考えられる。同様に、酵母を用いた実験からも、酵母細胞内においては野生型とは全く別のタンパク質として存在あるいは認識されているのかも知れない。機能的にはそれほど大きな変化を示していないにも関わらず、他のタンパク質との相互作用あるいは*in vivo*における挙動あるいは*in vivo*における他のタンパク質による認識に大きな変化が誘導されていた。このことは、機能的にはほとんど違いの観察されないタンパク質においても、*in vivo*において全く異なるタンパク質として存在しあるいは認識されている可能性を示唆するものである。

mAbを相手としたタンパク質間相互作用の変化は、W19Yに生じた構造変化が原因であるが、*in vivo*におけるW19Yの挙動の変化あるいはmolecular chaperoneなどの他のタンパク質による認識の変化は、W19Yに生じたどのような変化が引き金となって引き起こされたのであろうか？W19Yに生じた局所的な三次元構造の変化やタンパク質としての安定性の変化だけでは説明することのできない、*in vivo*でのfoldingの変化、

molecular chaperoneとの相互作用の変化などが考えられる。構造や安定性の変化によりタンパク質としてどのような属性の変化が誘導され、それによりどのような認識の変化を生み出したか、今後の展開が待たれる。

最後に、リボカリンファミリーに属するタンパク質にとって¹⁹Trpはどのような意義をもち、そして保存されてきたのであろうか？W19Yを用いた研究から、そのリガンドであるレチノールの結合能には、野生型 β -LGとの間でほとんど差が認められないが、レチノールを取り囲む環境にわずかな変化が見いだされ、結合しているレチノールの安定性も低下していた。さらにW19Y自身の安定性も大きく低下していた。リボカリンファミリーに代表される輸送タンパク質にとっては、結合するリガンドの安定性はもちろん、自身の安定性を確保することにより、標的となる細胞あるいは組織にリガンドを安定に運ぶことが重要な機能であると考えられる。 β -LGを用いた本研究から、リガンドを安定に結合し、そしてタンパク質自身の安定性をも維持しうる残基として、¹⁹Trpが進化上保存されてきたものと考えられた。

参考文献

1. K. M. Flaherty, D. B. McKay, W. Kabsch, K. C. Holmes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5041-5045 (1991).
2. P. Bork, C. Sander, A. Valencia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7290-7294 (1992).
3. M. F. Perutz, *Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins* (Cambridge University Press, Cambridge, 1989).
4. A. V. Finkelstein, O. B. Ptitsyn, *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **50**, 171-190 (1987).
5. J. M. Thornton, T. P. Flores, D. T. Jones, M. B. Swindells, *Nature* **354**, 105-106 (1991).
6. K. Yue, K. Dill, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4163-4167 (1992).
7. M. Go, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 1964-1968 (1983).
8. A. Klug, D. Rhodes, *Trends Biochem. Sci.* **12**, 464-469 (1987).
9. F. Rippmann, W. R. Taylor, J. B. Rothbard, N. M. Green, *EMBO J.* **10**, 1053-1059 (1991).
10. M. F. Flajnik, C. Cancel, J. Kramer, M. Kasahara, *Immunogenetics* **33**, 295-300 (1991).
11. E. Kitami, T. Horiuchi, Y. Oda, M. Oobatake, H. Nakamura, T. Tanaka, *FEBS Lett.* **298**, 233 (1992).
12. C. P. Hill, D. H. Anderson, L. Wesson, W. F. Degrado, D. Eisenberg, *Science* **249**, 543 (1990).
13. J. S. Richardson, D. C. Richardson, *Trends Biochem. Sci.* **14**, 304 (1989).
14. K. Goraj, A. Renard, J. A. Martial, *Protein Eng.* **3**, 259 (1990).
15. M. Engel, R. W. Williams, B. W. Erickson, *Biochemistry* **30**, 3161 (1991).

16. R. Moser, S. Frey, K. Munger, T. Hehlhans, S. Klausner, H. Langan, E. -L. Winnacker, R. Mertz, B. Gutte., *Protein Enz.* 1, 339 (1987).
17. M. Z. Papiz, L. Sawyer, E. E. Eliopoulos, A. C. T. North, J. B. C. Findlay, R. Sivaprasadarao, T. A. Jones, M. E. Newcomer, P. J. Kraulis, *Nature* 324, 383-+385 (1986).
18. H. L. Monaco, G. Zanotti, P. Spadon, M. Bolognesi, L. Sawyer, E. E. Eliopoulos, *J. Mol. Biol.* 197, 695-706 (1987).
19. S. W. Cowan, M. E. Newcomer, T. A. Jones, *Proteins* 8, 44-61 (1990).
20. M. E. Newcomer, T. A. James, J. Aqvist, J. Sundelin, U. Eriksson, L. Rask, P. A. Peterson, *EMBO J.* 3, 1451-1454 (1984).
21. H. M. Holden, W. R. Rypniewski, J. H. Law, I. Rayment, *EMBO J.* 6, 1565-1570 (1987).
22. R. Huber, M. Schneider, I. Mayr, R. Müller, R. Deutzmann, F. Suter, H. Zuber, H. Falk, H. Kayser, *J. Mol. Biol.* 198, 499-513 (1987).
23. Z. Bocskei, C. R. Groom, D. R. Flower, C. E. Wright, S. E. V. Phillips, A. Cavaggioni, J. B. C. Findlay, A. C. T. North, *Nature* 360, 186-188 (1992).
24. H. L. Monaco, G. Zanotti, *Biopolymers* 32, 457-465 (1992).
25. Y. Liao, J. M. Taylor, J. L. Vannice, G. A. Clawson, E. A. Smuckler, *Mol. Cell. Biol.* 5, 3634-3639 (1985).
26. D. E. Brooks, A. R. Means, E. J. Wright, S. P. Singh, K. K. Tiver, *J. Biol. Chem.* 261, 4956-4961 (1986).
27. D. Drayna, et al., *J. Biol. Chem.* 261, 16535-16529 (1986).
28. W. J. Henzel, et al., *J. Biol. Chem.* 263, 16682-16687 (1988).
29. M. Julkunen, M. Seppala, O. A. Janne, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8845-8849 (1988).

30. B. Akerstrom, L. Logdberg, *Trends Biochem. Sci.* 15, 240 (1990).
31. M. Igarashi, A. Nagata, H. Toh, Y. Urade, O. Hayaishi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5376-5380 (1992).
32. A. C. T. North, *Int. J. Biol. Macromol.* 11, 56-58 (1989).
33. S. Ali, A. J. Clark, *J. Mol. Biol.* 199, 415-426 (1988).
34. J. Overington, D. Donnelly, M. S. Johnson, A. Sali, T. L. Blundell, *Prot. Sci.* 1, 216 (1992).
35. A. A. Zamyatnin, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 24, 109-123 (1975).
36. C. Chothia, *J. Mol. Biol.* 105, 1-14 (1976).
37. J. Kyte, R. F. Doolittle, *J. Mol. Biol.* 157, 105-132 (1982).
38. R. Wolfenden, L. Andersson, P. M. Cullis, C. C. B. Southgate, *Biochemistry* 20, 849-855 (1981).
39. M. Oobatake, T. Ooi, *Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto. Univ.* 66, 433-445 (1989).
40. M. Oobatake, T. Ooi, *J. Biochem.* 104, 433-439 (1988).
41. P. Y. Chou, G. D. Fasman, *Adv. Enzymol.* 47, 45-148 (1978).
42. M. J. Zoller, M. Smith, *Nucleic Acids Res.* 10, 6487 (1982).
43. W. Kramer, V. Drutsa, H. Jansen, B. Kramer, M. Pflugfelder, *Nucleic Acids Res.* 12, 9441 (1984).
44. T. A. Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1985).
45. P. Carter, H. Bedouelle, G. Winter, *Nucleic Acid Res.* 13, 4431 (1985).
46. J. W. Taylor, J. Ott, F. Eckstein, *Nucleic Acids Res.* 13, 8765-8785 (1985).
47. M. Hattori, A. Ametani, Y. Katakura, M. Shimizu, S. Kaminogawa, *J. Biol. Chem.* 268, 22414-22419, (1993).
48. S. Kaminogawa, M. Shimizu, A. Ametani, M. Hattri, O. Ando, S. Hachimura, Y. Nakamura, M. Totsuka, K. Yamauchi, *Biochim. Biophys. Acta* 998, 50-56 (1989).

49. R. Townend, T. T. Helscovits, H. E. Swaisgood, S. N. Timasheff, *J. Biol. Chem.* 239, 4196 (1964).
50. K. Ichikawa, K. Komiya, K. Suzuki, T. Nakahara, Y. Jigami, *Agric. Biol. Chem.* 53, 2687-2694 (1989).
51. K. L. Nakamaye, F. Eckstein, *Nucleic Acids Res.* 14, 9679-9698 (1986).
52. M. Totsuka, Y. Katakura, M. Shimizu, I. Kumagai, K. Miura, S. Kaminogawa, *Agric. Biol. Chem.* 54, 3111-3116 (1990).
53. I. Kumagai, K. Miura, *J. Biochem.* 105, 946-948 (1989).
54. H. Ito, Y. Fukuda, K. Murata, A. Kimura, *J. Bacteriol.* 102, 733 (1983).
55. 田坂捷雄, 浜島義博, (免疫実験操作法X) 3165 (1980).
56. U. K. Lamml, *Nature* 227, 680 (1970).
57. 高橋健治, 高井義美, 太田隆久, 鈴木結一編集, (新生化学実験講座 1タンパク質I分離・精製・性質)(1990) 東京化学同人.
58. C. J. Van Den Bergh, A. C. A. P. A. Bekkers, P. De Geus, H. M. Verheij, G. H. De Haas, *Eur. J. Biochem.* 170, 241 (1987).
59. L. Edens, I. Bom, A. M. Ledebouer, M. Y. Toonen, C. Visser, C. T. Verrips, *Cell* 37, 629 (1984).
60. M. Ikehara, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4695 (1986).
61. K. Nagai, H. C. Thogerson, *Nature* 309, 810 (1984).
62. K. Talmadge, S. S., W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3369 (1980).
63. T. Oka, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7212 (1985).
64. N. Nagahari, S. Kanaya, K. Munakata, Y. Aoyagi, S. Mizushima, *EMBO J.* 4, 3589 (1985).
65. R. Janknecht, G. de Martynoff, J. Lou, R. A. Hipkind, A. Nordheim, H. G. Stunnenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8972-8976 (1991).
66. M. W. Nirenberg, J. H. Matthaei, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- U.S.A.* 47, 1588 (1961).
67. A. S. Spirin, V. I. Baranov, L. A. Ryabova, S. U. Ovodov, Y. B. Alakhov, *Science* 242, 1162 (1988).
 68. V. I. Baranov, I. Y. Morozov, S. A. Ortlepp, A. S. Spirin, *Gene* 84, 463 (1989).
 69. L. A. Ryabova, S. A. Ortlepp, V. I. Baranov, *Nucleic Acids Res.* 17, 4412 (1989).
 70. G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *Science* 252, 1390 (1991).
 71. M. P. Williamson, J. P. Waltho, *Chem. Soc. Rev.* 227, (1992).
 72. M. Kainosyo, T. Tsuji, *Biochemistry* 21, 673 (1982).
 73. D. A. Torchia, S. W. Sparks, A. Bax, *Biochemistry* 27, 5135 (1988).
 74. D. Marion, L. E. Kay, S. W. Sparks, D. A. Torchia, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* 111, 1515 (1989).
 75. P. C. Driscoll, G. M. Clore, D. Marion, P. T. Wingfield, A. Gronenborn, *Biochemistry* 29, 3542 (1990).
 76. J. F. Collawn, C. J. A. Wallace, A. E. I. Proudfoot, Y. Paterson, *J. Biol. Chem.* 263, 8625-8634 (1988).
 77. M. F. Hoylaerts, J. L. Millán, *Eur. J. Biochem.* 202, 605-616 (1991).
 78. N. A. Lokker, N. Rao Movva, U. Strittmatter, B. Fagg, G. Zenke, *J. Biol. Chem.* 266, 10624-10631 (1991).
 79. K. T. Hogan, C. Clayberger, E. J. Bernhard, S. F. Walk, J. P. Ridge, P. Parham, A. M. Krensky, V. H. Engelhard, *J. Immunol.* 142, 2097-2104 (1989).
 80. J. M. White, I. A. Wilson, *J. Cell. Biol.* 105, 2887-2896 (1987).
 81. A. M. Smith, D. C. Benjamin, *J. Immunol.* 146, 1259-1264 (1991).
 82. M. E. Goldberg, *Trends Biochem. Sci.* 16, 358-362 (1991).
 83. R. K. Scopes, *Anal. Biochem.* 59, 277-282 (1974).

84. 中島嘯躬, 野本明男, 松橋道生, 三浦謹一郎, 村松正実編集, (新基礎生化学実験法 5), 100-107 (1989)丸善.
85. 油谷克英, 中村春木著 (応用化学講座11 蛋白質工学) (1991),朝倉書店.
86. 濱口浩三著, (改訂蛋白質機能の分子論) (1990)学会出版センター.
87. C. Tanford, L. G. Bunville, Y. Nozaki, *J. Am. Chem. Soc.* 81, 4032-4036 (1959).
88. S. Kaminogawa, M. Hattori, O. Ando, J. Kurisaki, K. Yamauchi, *Agric. Biol. Chem.* 51, 797-802 (1987).
89. D. Shortle, A. K. Meeker, S. L. Gerring, *Arch. Biochem. Biophys.* 272, 103-113 (1989).
90. F. Raymond, J. Greene, C. N. Pace, *J. Biol. Chem.* 249, 5388-5393 (1973).
91. N. Greenfield, G. D. Fasman, *Biochemistry* 8, 149 (1980).
92. D. E. Anderson, W. J. Becktel, F. W. Dahlquist, *Biochemistry* 29, 2403 (1990).
93. A. Wada, H. Nakamura, *Nature* 293, 757 (1981).
94. A. R. Fersht, *Trends Biochem. Sci.* 12, 301 (1987).
95. B. A. Shirley, P. Stanssens, U. Hahn, C. N. Pace, *Biochemistry* 31, 725 (1992).
96. S. Miller, J. Janin, A. M. Lesk, C. Chothia, *J. Mol. Biol.* 196, 641 (1987).
97. F. M. Richards, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 6, 151 (1977).
98. C. N. Pace, G. R. Grimsley, J. A. Thomson, B. J. Barnett, *J. Biol. Chem.* 263, 11820 (1988).
99. A. J. Doig, D. H. Williams, *J. Mol. Biol.* 217, 389 (1991).
100. M. Matsumura, W. J. Becktel, B. W. Matthews, *Nature* 334, 406-410 (1988).
101. T. Alber, T. Alber, S. Dao-pin, K. Wilson, J. A. Wozniak, S. P. Cook, B. W. Matthews, *Nature* 330, 41-46 (1987).
102. K. Yutani, K. Ogasawara, Y. Sugino, A. Matsushiro, *Nature*

267, 274-275 (1977).

103. J. T. Kellis Jr, K. Nyberg, A. R. Fersht, *Biochemistry* 28, 4914-4922 (1989).
104. Y. Nozaki, C. Tanford, *J. Biol. Chem.* 246, 2211-2217 (1971).
105. R. M. Sweet, D. Eisenberg, *J. Mol. Biol.* 171, 479-488 (1983).
106. K. Yutani, K. Ogasawara, K. Aoki, T. Kakuno, Y. Sugino, *J. Biol. Chem.* 259, 14076-14081 (1985).
107. T. Alber, S. Dao-pin, J. A. Nye, D. C. Muchmore, B. W. Matthews, *Biochemistry* 26, 3754-3758 (1987).
108. B. C. Locke, J. M. MacInnis, S. Qian, J. I. Gordon, E. Li, G. R. Fleming, N. C. Yang, *Biochemistry* 31, 2376-2383 (1992).
109. I. J. Ropson, C. Frieden, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7222-7226 (1992).
110. R. Fugate, P. Song S, *Biochim. Biophys. Acta* 625, 28-42 (1980).
111. D. S. Goodman, R. B. Leslie, *Biochim. Biophys. Acta* 260, 670-678 (1972).
112. W. Gu, J. W. Brady, *Protein Engineering* 5, 17-27 (1992).
113. G. Dodin, M. Andrieux, H. A. Kabbani, *Eur. J. Biochem.* 193, 697-700 (1990).
114. E. Dufour, M. C. Marden, T. Haertlé, *FEBS Lett.* 277, 223-226 (1990).
115. U. Cogan, M. Kopelman, S. Mokady, M. Shinitzky, *Eur. J. Biochem.* 65, 71-78 (1976).
116. E. Li, S. Qian, L. Nader, N. C. Yang, A. Avignon, J. C. Sacchettini, J. I. Gordon, *J. Biol. Chem.* 264, 17041-17048 (1989).
117. E. Li, S. Qian, N. C. Yang, A. Avignon, J. I. Gordon, *J. Biol. Chem.* 265, 11549-11554 (1990).
118. S. Futterman, J. Heller, *J. Biol. Chem.* 247, 5168-5172

- (1972).
119. D. G. Stump, R. S. Lloyd, F. Chytil, *J. Biol. Chem.* 266, 4622-4630 (1991).
 120. M. B. Faletto, P. Linko, J. A. Goldstein, *J. Biol. Chem.* 267, 2032-2037 (1992).
 121. Y. Taniyama, Y. Yamamoto, M. Nakao, M. Kikuchi, M. Ikehara, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152, 962-967 (1988).
 122. F. Omura, M. Otsu, M. Kikuchi, *Eur. J. Biochem.* 205, 551-559 (1992).
 123. F. Omura, Y. Taniyama, M. Kikuchi, *Eur. J. Biochem.* 198, 477-484 (1991).
 124. K. Inaka, Y. Taniyama, M. Kikuchi, K. Morikawa, M. Matsushima, *J. Biol. Chem.* 266, 12599-12603 (1991).
 125. Y. Taniyama, K. Ogasawara, K. Yutani, M. Kikuchi, *J. Biol. Chem.* 267, (1992).
 126. A. J. Dorner, M. G. Krane, R. J. Kaufman, *Mol. Cell. Biol.* 8, 4063-4070 (1988).
 127. D. Accili, T. Kadowaki, H. Kadowaki, L. Mosthaf, A. Ullrich, S. I. Taylor, *J. Biol. Chem.* 267, 586-590 (1992).
 128. S. K. Wooden, L. -J. Li, D. Navarro, I. Qadri, L. Pereira, A. S. Lee, *Mol. Cell. Biol.* 11, 5612-5623 (1991).
 129. 福岡伸一, (生化学) 65, 338-362 (1993).
 130. M. Gething, J. Sambrook, *Nature* 355, 33-45 (1992).
 131. T. A. Rapoport, *Science* 258, 931-936 (1992).
 132. Y. Kozutsumi, M. Segal, K. Normington, M. Gething, J. Sambrook, *Nature* 332, 462-464 (1988).
 133. K. Kohno, K. Normington, J. Sambrook, M. Gething, K. Mori, *Mol. Cell. Biol.* 13, 877-890 (1993).
 134. K. Mori, A. Sant, K. Kohno, K. Normington, M. -J. Gething, J. F. Sambrook, *EMBO J.* 11, 2583-2593 (1992).
 135. K. Mori, W. Ma, M. Gething, J. Sambrook, *Cell* 74, 743-756

- (1993).
136. J. S. Cox, C. E. Shamu, P. Walter, *Cell* 73, 1197-1206 (1993).
 137. A. J. Dorner, L. C. Wasley, R. J. Kaufman, *EMBO J.* 11, 1563-1571 (1992).
 138. T. H. Nguyen, D. T. S. Law, D. B. Williams, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1565-1569 (1991).
 139. R. B. Freedman, *Cell* 57, 1069-1072 (1989).
 140. C. Tachibana, T. H. Stevens, *Mol. Cell. Biol.* 12, 4601-4611 (1992).
 141. S. L. Sanders, K. M. Whitfield, J. P. Vogal, M. D. Rose, R. W. Schekman, *Cell* 69, 353-365 (1992).
 142. R. J. Dechaies, B. D. Koch, M. Werner-Washburne, E. A. Craig, R. Schekman, *Nature* 332, 800-805 (1988).
 143. D. Görlich, S. Prehn, E. Hartmann, K. Kalies, T. A. Rapoport, *Cell* 71, 489-503 (1992).
 144. D. Feldheim, J. Rothblatt, R. Schekman, *Mol. Cell. Biol.* 12, 3288-3296 (1992).
 145. D. M. Cyr, X. Lu, M. G. Douglas, *J. Biol. Chem.* 267, 20927-20931 (1992).
 146. A. J. Caplan, D. M. Cyr, M. Douglas, *Cell* 71, 1143-1155 (1992).
 147. E. A. Craig, K. Jacobson, *Cell* 38, 841-849 (1984).
 148. R. J. Nelson, T. Ziegelhoffer, C. Nicolet, M. W. Washburne, E. A. Craig, *Cell* 71, 97-105 (1992).
 149. E. A. Craig, J. Kramer, J. Shilling, M. Werner-Washburne, S. Holmes, J. Kosc-Smithers, C. M. Nicolet, *Mol. Cell. Biol.* 9, 3000-3008 (1989).
 150. D. S. Yaver, S. Motoba, D. M. Ogrzyziak, *J. Cell. Biol.* 116, 605-616 (1992).
 151. C. E. Ooi, J. Weiss, *Cell* 71, 87-96 (1992).
 152. S. M. Simon, C. S. Peskin, G. F. Oster, *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. USA* **89**, 3770-3774 (1992).
153. P. Mayinger, D. I. Meyer, *EMBO J.* **12**, 659-666 (1993).
 154. P. D. Garcia, J. Ou, W. J. Rutter, P. Walter, *J. Cell. Biol.* **106**, 1093-1104 (1988).
 155. K. Normington, K. Kohno, Y. Kozutsumi, M. Gething, S. J., *Cell* **57**, 1223-1236 (1989).
 156. K. M. Rosen, E. D. Lamperti, L. Villa-Komaroff, *BioTechnique*, **8**, 398-403 (1990).
 157. J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, Molecular cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).
 158. 鈴木結一, 崎山文夫, 太田隆久編集, (新化学実験講座1タンパク質VI 合成及び発現) pp.249, (1992) 東京化学同人.
 159. T. D. Ingolia, M. R. Slater, E. A. Craig, *Mol. Cell. Biol.* **2**, 1388-1398 (1982).
 160. E. H. Kaji, H. F. Lodish, *J. Biol. Chem.* **268**, 22195-22202 (1993).
 161. G. C. Flynn, T. G. Chappell, J. E. Rothman, *Science* **245**, 385-390 (1989).
 162. G. C. Flynn, J. Pohl, M. T. Flocco, J. E. Rothman, *Nature* **353**, 726-730 (1991).
 163. T. Langer, C. Lu, H. Echols, J. Flanagan, M. K. Hayer, F. U. Hartl, *Nature* **356**, 683-689 (1992).
 164. S. J. Landry, R. Jordan, R. McMacken, L. M. Gierasch, *Nature* **355**, 455-457 (1992).
 165. P. Parham, *Trends Biochem. Sci.* **16**, 357-358 (1991).
 166. R. Tirindelli, J. N. Keen, A. Cavaggioni, E. E. Ellipoulos, J. B. C. Findlay, *Eur. J. Biochem.* **185**, 569-572 (1989).
 167. T. E. Creighton, *Proteins*, pp.327, (1984), W.H. Freeman and Company, New York.
 168. D. C. Teller, *Nature*, **260**, 729(1976)

要約

<序>

タンパク質のもつ機能は構造と密接に関わっており、タンパク質の構造変化は、タンパク質の機能発現にとって重大な変化を誘導しうる。ただし、構造変化の大きさと機能に与える影響の大きさととの関係は必ずしも明らかでない。特定のタンパク質の構造と機能の相関を正しく評価するためには、タンパク質の構造に起きた微細な変化を高精度に検出するとともに、その変化がタンパク質の機能発現に対してどのような変化を誘導しているかについて、様々な視点からの研究により見いださなければならない。タンパク質工学的手法により作製した変異型タンパク質を用い、ある特定残基がタンパク質の構造及び機能の維持に果たす意義を評価する手法は非常に有効ではあるが、特定残基のアミノ酸置換に伴う直接的な変化とともに、変異を導入した残基近傍の構造変化などの間接的な変化をも正確に把握し、それらにより誘導される機能変化との相関を知ることにより初めて、その残基の機能的意義が明らかとなる。

ウシ β -ラクトグロブリン (β -LG) は、8本の逆平行 β -シートからなる β -バレル構造を有し、機能的にも疎水性小分子 (レチノール) を結合するという特徴から、リボカリンファミリーに属することが知られている。リボカリンファミリーに属するタンパク質はこれまで数多く報告されているが、構造と機能の相関あるいはその維持に重要な役割を果たす残基について解析された例は少ない。 ^{19}Trp はリボカリンファミリー内で唯一完全に保存された残基である。そこで本研究では、 ^{19}Trp がその特徴的な構造や機能の維持および分泌にどのように関与するのか詳細に解析した。

<変異型 β -LGの構造解析>

^{19}Trp は、リボカリンファミリーと類似した β -ストランドトポロジーを有するcellular retinoid/fatty acid binding

proteinファミリーにおいても保存されており、その特徴的な構造の維持に重要な残基であると考えられてきた。そこで部位特異的変異導入法により、 ^{19}Trp をTyrに置換した変異体W19Yを酵母を用いて作製し、 ^{19}Trp の構造維持における意義を評価した。

W19Yに大きな構造変化は起きていないことを、円二色性偏光スペクトルの測定により確認した。しかし変性剤に対するW19Yの安定性は野生型に比べ大きく低下 ($\Delta\Delta G_{\text{D}}^{\text{H}2\text{O}} = 6.9\text{kcal/mol}$) しており、 β -LG全体の構造維持に何らかの破綻をきたしていることが明らかとなった。そこで、 β -LG分子に生じた微細な構造変化の検出に有効なプローブとなりうることが知られている15種類のモノクローナル抗体 (mAb) を用いて (1)、さらに詳細な構造解析を試みた。その結果、 ^{129}Asp をAlaに置換した変異型 β -LG (D129A) では観察されなかった構造の乱れが、W19Yでは ^{19}Trp を中心として比較的広い範囲にわたり観察された。その置換の影響は、一次構造に沿ってみると ^{15}Val から ^{56}Ile の領域で認められ、 ^{19}Trp のN末側よりもC末側が形成する高次構造の維持に重要であると考えられた。また局所の構造ばかりでなく、 ^{19}Trp から一次構造上も立体構造上も離れた領域において微妙な構造変化が観察された。ここで構造変化が観察された ^{19}Trp を中心とする領域は、in vitroではrefoldingしにくい領域として知られており (1)、この領域は、巻き戻りにくく、構造変化しやすい領域であると判断できた。さらにW19Yのin vitro refoldingでは、 ^{19}Trp は一次構造上は離れているが立体構造上は近い、さらに別の領域のrefoldingにも重要であることが示された。

<変異型 β -LGの機能解析>

これまで、レチノールの結合に対し ^{19}Trp は中心的な機能を果たしているとする説と全く関与していないとする説が提出されている。前者は、レチノール-レチノール結合タンパク質複合体を基にしたmodel-buildingから、後者はapo体、holo体そ

それぞれの β -LG間の電子密度差の算出から示唆されている。そこで、 ^{19}Trp がレチノールの結合に不可欠な残基であるかどうかを、W19Yを用い解析した。さらに、ここで観察された微細な構造変化が、レチノールの結合に対してどのような影響を及ぼすかについても併せて解析した。

野生型及びW19Yについてレチノール結合性を検討した結果、レチノールの飽和はほぼ同等の濃度で観察され、それをもとに算出したレチノールの野生型及びW19Yに対する解離定数はほぼ同等であった。また、 β -LG中の芳香族アミノ酸からのレチノール分子への励起エネルギーの遷移は、野生型及びW19Yでともに観察され、レチノール分子を安定化させるといわれているこのエネルギー遷移が ^{19}Trp により担われているわけではないことが明らかとなった。以上のことから、 ^{19}Trp がレチノールの結合に対して不可欠な残基ではないことが示された。そこで、さらに ^{19}Trp の機能的意義を明らかにするため、結合したレチノールを取り囲む環境を、結合したレチノールの励起スペクトルを測定することにより評価した。その結果、W19Yに結合したレチノールの励起スペクトルは、red-shiftを示し、強度も半減した。このことは、W19Yに結合したレチノールのmobilityが増大し、溶媒分子のaccessibilityが増大したことを意味している。確かに、W19Yに結合したレチノールは野生型に比べ、アルコール脱水素酵素により分解されやすくなっていた。

これらのことから、 ^{19}Trp はレチノールの結合に直接重要なわけではなく、 β -LG全体の構造の安定性、及び結合したレチノール分子の安定性の維持に重要な残基であることが判明した。ここで観察されたレチノール結合部位の環境の変化は、mAbにより検出されたW19Y分子の微妙な構造の歪みにより説明されうるものと考えられ、 β -LG分子の微妙な構造変化が、機能的変化を誘導しうることが示された。

<変異型 β -LG (W19Y) の酵母における分泌量増大の原因解

析>

¹⁹Trpへの残基置換の影響は、 β -LGの構造及び機能における上記のような変化ばかりでなく、酵母における分泌発現量にも大きな変化を誘導した。すなわちW19Yでは野生型 β -LGに比べ分泌量が5倍以上増大し、PheやAlaに置換したW19FやW19Aはほとんど分泌されなかった。このように、あるタンパク質における残基置換が、酵母における分泌量増大を導いたという例は数少ない。⁷⁷Cysと⁹⁵CysをAlaに置換し、S-S結合を欠失させた変異型リゾチーム(C77/95A)では酵母における分泌量増大が観察され、それはS-S結合の欠失に伴うタンパク質としてのmolecular flexibilityの増大が原因であろうと考えられている。そこで本研究では、W19Yの酵母における分泌量増大の原因解明を試みた。

ノーザンブロット分析により、野生型及び変異型 β -LG(W19Y, W19F, W19A)間で酵母におけるmRNA存在量に違いは見いだされなかった。in vitro翻訳系を用いた実験から、各 β -LG間で翻訳効率に差がないことが判明した。マイクロゾーム存在下でin vitro翻訳を行うことにより、それぞれの β -LGの膜透過効率を比較した結果、ここでも違いは見いだされなかった。酵母培養上清あるいは酵母菌体内に存在する各 β -LG量をウェスタンブロット分析により解析したところ、酵母菌体内に存在するW19Y量は野生型に比べ大きく減少していた。パルス/チェイス実験により、培養上清に分泌される速度を比較したところ、W19Yの分泌速度は野生型 β -LGに比べ上昇していた。以上の結果を併せると、W19Yの分泌効率が野生型 β -LGに比べ上昇していると考えられた。さらに、タンパク質のfoldingや分泌に関与していると考えられている、SSA1、BiP及びPDIの各mRNA量をノーザンブロット分析により解析したところ、W19YではSSA1 mRNA量が、W19FやW19AではBiP及びPDI各mRNA量が増大していた。malfoldなタンパク質が小胞体に蓄積することにより、BiPやPDIの転写が促進されることが知られていることから、W19FやW19Aでは小胞体において分泌

不能な凝集体を形成していることが示唆された。さらにW19Yの酵母における分泌量増大に関しては、W19Yのmolecular flexibilityの増大が、酵母小胞体内での移行速度を増大させたと考えられ、さらにSSA1などの関与が示唆された。以上のことから、一残基置換により誘導された変異型 β -LGの微妙な構造あるいは安定性の変化に伴い、置換残基をもつ各々の β -LGが酵母菌体内においてはそれぞれ全く異種のタンパク質として存在あるいは認識されている可能性が示唆された。

<まとめ>

以上の結果から、リボカリンファミリー内で唯一完全に保存された¹⁹Trpは、¹⁹Trpを中心とする局所の構造ばかりでなく、全体の構造を維持するため、あるいはレチノールを取り囲む環境を維持するために重要な機能を有する残基の一つであると考えられた。リガンドを結合し、標的組織あるいは細胞にリガンドを安定に輸送することがキャリアータンパク質としての機能であると考え、以上のような機能的意義を有する¹⁹Trpは、 β -LGがキャリアータンパク質として安定に機能するために進化的に保存されてきた可能性がある。

1. Hattori, M., Ametani, A., Katakura, Y., Shimizu, M., and Kaminogawa, S. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 22414-22419

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なるご指導と暖かい励ましのお言葉を賜りました東京大学農学部農芸化学科畜産物利用学研究室、上野川修一教授に深く感謝いたします。

実験材料を提供していただき、この研究を行う機会を与えてくださいました学習院大学理学部生命分子科学研究所・所長三浦謙一郎教授に厚くお礼申し上げます。また懇切丁寧なご指導を賜り、多くのご助言をいただきました東京大学工学部熊谷助教授に深く感謝いたします。

貴重な抗βラクトグロブリンモノクローナル抗体を提供していただき、多くの貴重なご助言を賜りました農林水産省・畜産試験場・栗崎純一博士に深く感謝します。

酵母プロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) 遺伝子を提供していただき、数々のご助言を賜りました恵泉女学園大学・水永武光教授及び東京農工大学・館川宏之博士に厚くお礼申し上げます。

動物細胞発現ベクター、pME18Sをご提供いただきました東京大学医科学研究所分子生物部門横田崇助教授に感謝します。

ノーザンブロット分析の手法を懇切丁寧に教えていただいた東京大学農学部農芸化学科栄養化学研究室・喜田聡君に深く感謝します。

BAXの利用に際し、いつも快く教えていただいた東京大学農学部酵素学研究室鎌田健司君に厚くお礼申し上げます。

共同実験をしていただいた明治乳業中央研究所・永渕真也君、貴重な結果を出していただいた佐藤英一郎君に深く感謝いたします。

貴重な時間を割きいつでも快く討論に応じ、貴重な助言をいただいた西島謙一君に厚くお礼申し上げます。

貴重な助言と多くの励ましのお言葉をいただいた当研究室八村敏志助手、久辰辰博助手に深く感謝いたします。

モノクローナル抗体を用いた実験法について多くのご助言をいただき、また私生活面でも私のよき兄貴分としていろいろと心をかけていただいた東京農工大学・服部誠博士に深く感謝いたします。

本研究を着手した当初から常によき相談相手となり、懇切丁寧なご指導と暖かい励ましの言葉を多くいただいた戸塚護助手に厚くお礼申し上げます。

最後の最後までこの論文の作製に尽力していただき、研究者としてのものの考え方、そしてそれを正確に言葉としてまとめあげることの大切さを身をもって教えていただいた、当研究室船谷章夫助教授に心から感謝の意を表します。

最後に、本論分の完成にあたり、心の支えとなってくれた今岡明美さんに心から感謝します。



