

相同構造をもつ蛋白質における機能変換

武田 茂樹

①

博士論文

相同構造をもつ蛋白質における
機能変換

指導教官 三浦謹一郎教授

東京大学大学院 工学系研究科 工業化学専攻 三浦研究室

第一種博士課程 87171 武田茂樹

(1991年3月)

目 次

第 1 章	序論 蛋白質の研究と蛋白質工学	1
第 2 章	研究材料とした α -ラクトアルブミンとリゾチームについての解説 および本論文における実験の背景とその目的	
2-1	リゾチームと α -ラクトアルブミン	6
2-2	本研究における目的とその理論背景 エキソンシャッフリング仮説とモジュール仮説	1 4
2-3	本研究における実験的背景	1 8
第 3 章	ヤギ α -ラクトアルブミンの大腸菌での発現とその活性発現	
3-1	大腸菌におけるヤギ α -ラクトアルブミン発現ベクター の構築とその発現	2 3
3-2	組換え体 α -ラクトアルブミンの精製と活性発現	2 8
3-3	ヤギ α -ラクトアルブミンの大腸菌における単独発現 の試み	3 8
第 4 章	ヤギ α -ラクトアルブミン改変体蛋白質の作製	
4-1	ニワトリリゾチームとの構造相同性に基づく α -ラクトアルブミン改変体の設計	4 6
4-2	α -ラクトアルブミン改変体遺伝子の作製	6 2
4-3	改変体蛋白質の発現と単離精製	6 5
4-4	改変体蛋白質の性質の検討	7 2

第 5 章	酵母におけるヤギ α -ラクトアルブミンの発現と発現産物の性質の 検討	
5-1	酵母におけるヤギ α -ラクトアルブミン発現ベクター の構築	85
5-2	ヤギ α -ラクトアルブミンの酵母による発現と精製	88
5-3	酵母により産成された組換え体 α -ラクトアルブミン の性質の検討	91
第 6 章	酵母における大量発現系構築の試み	
6-1	酵母 5S-rRNA 構造遺伝子のクローニング	97
6-2	ゲノム挿入型発現ベクターの構築	100
6-3	ゲノム挿入型ベクターによるヤギ α -ラクト アルブミンとニワトリリゾチームの発現	103
第 7 章	総括および考察	
7-1	総括	106
7-2	考察	107
第 8 章	一般的な実験操作	
8-1	菌体の取り扱いなど	116
8-2	DNA に関する実験操作	118
8-3	蛋白質に関する実験操作	123
引用文献		129
謝辞		134

第1章 序論 蛋白質の研究と蛋白質工学

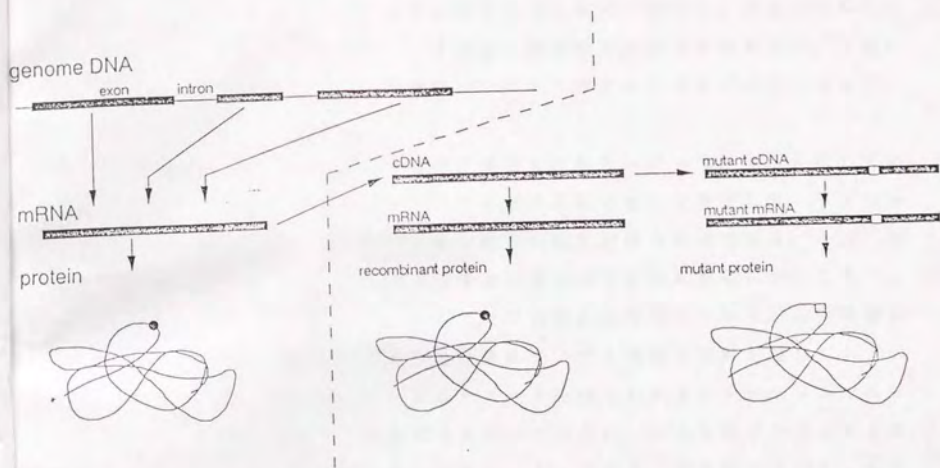
その現在と未来

蛋白質は生体内においてきわめて多くの働きを担っており、その種類も多種多用である。生体内反応の触媒や制御、情報の伝達、運動、細胞骨格の形成といった、“生きる”ことの維持や変化のすべてにかかわっている。また、蛋白質はそれ自身が他の蛋白質の発現や構造形成にかかわっており、さらに環境の変化につれて対応できるように相互にネットワークを形成している。すなわち、それぞれの蛋白質および蛋白質間の相互作用を研究することは、すべての生物において共通する“生きる”ことの仕組みを理解することであるといえる。蛋白質の研究の歴史は古いが、それはまさに蛋白質がいかに生体にとって重要であるか、また生体がいかに蛋白質を使いこなしているかを理解してきた歴史であるとも言えるだろう。

分子生物学の発達により、親から子へと受け継がれる遺伝子(DNA)からmRNAを介して蛋白質が作られるという遺伝情報発現の仕組みの大筋が解明され、またDNAを操作する技術の進歩とともに蛋白質についての理解は飛躍的に進んだと言える。遺伝子のクローニングと異種細胞での遺伝子の発現が行えるようになると、一次構造の解明だけでなくそれぞれの蛋白質のもつ機能についての分子論的な研究がより積極的に行えるようになった。蛋白質のある部分だけをつくりかえて蛋白質のある部分の(全体における)機能的役割を研究することは、それまでは酵素的にあるいは化学的に蛋白質を修飾する方法がとられていたが、これらの方法はすべての蛋白質に同じように適応できるものではなく、蛋白質を自由に作り替えることは蛋白質化学の研究者にとっての大きな夢であった。

この夢を実現し、それまでの酵素的、化学的な蛋白質の改変を“古典的手法”にかえてしまったのが蛋白質工学である。蛋白質工学とは主に遺伝子工学的にDNAの構造を改変し、それにより一次構造の異なった蛋白質を作り、天然にない性質の蛋白質を生み出すことにより蛋白質の構造と機能について研究する手法のことである¹⁾。この手法は開発と同時に多くの蛋白質において応用されいままでも天然には存在しなかった、基質特異性の異なる酵素やより安定な蛋白質などが生み出された。またそれを通して蛋白質の構造と機能について、それまでは知られ

ていなかった多くの知見が明らかになった (図 1-1)。



(図 1-1) 生体内における蛋白質の合成と組換え体蛋白質の発現に関する概念図

点線の左側は通常真核細胞における蛋白質合成におけるセントラルドグマを示した
 また、右側は外来遺伝子の導入によるその発現と、変異体蛋白質の発現を模式的に示した

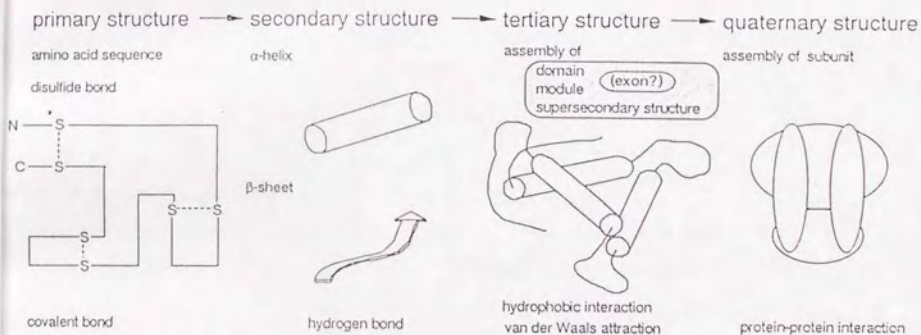
しかしながら、これまでに行われてきた蛋白質工学のほとんどは、構造や機能のよくわかった蛋白質に対し、機能部位を別の構造に“置換”したり、よく似た蛋白質を参考にもとの蛋白質を“改変”したものであり、まったく新しい蛋白質をゼロから設計したものではない。これはまだ蛋白質の構造形成に関与する物理的、化学的な相互作用のすべてが明らかになったわけではなく、どのようにして蛋白質を“設計”していったらよいか暗黒模索の中にあるからである。とはいえ、蛋白質化学の研究者はこの問題においていくつかのアプローチ法をもっている。

一つは理論的な分子設計のための分子間相互作用の一つ一つを明らかにしていく方法である。完全な蛋白質における分子設計理論の確立をめざして、すでに蛋白質工学的実験による蛋白質の安定性の新しい知見が得られつつある。また、物理化学的測定法の進歩により蛋白質の構造形成における相互作用についても、しだいに明らかになってきている。さらに分子内相互作用だけでなく、四次構造形成における蛋白質どうしの分子間相互作用についても同様に検討が続けられている。しかしながら、高性能のコンピューターを駆使したシミュレーションであっても蛋白質の構造のすべてを理解できるわけではない。巨大な分子である蛋白質にかかわる相互作用はきわめて多くの要因をもっており、その数ははかりしれない。

もう一つのアプローチは経験的な分子設計のための一般的な構造分析、推論手段の構築である。その代表例が蛋白質の構造についてのデータベースの構築であろう。経験的な視点が有効であると思われる理由は、アミノ酸が縮合したポリペプチドのすべてが機能をもった蛋白質になりうるわけではない、という点にある。蛋白質が機能を持つためには正確な三次元的な構造を保つことが必要であるが、でたらめなアミノ酸配列を持つポリペプチドはほとんどこのようなきちんとした三次構造を持つことは不可能である。すなわち、天然に存在する蛋白質の一次構造の中には正確な高次構造を形成するための必然性が隠されているわけであるから、理論的な分子間の相互作用の解明だけでなく一次構造の分析による経験的な分子構築は蛋白質の分子としての巨大さを考慮すれば、きわめて現実的かつ効果的な方法といえる(図1-2)。

こうしたことの積み重ねにより、蛋白質の構造と機能についての一般的な法則

性が明らかになれば、蛋白質の三次構造、四次構造を予測したり、設計したりできるようになるであろう。さらには人間が自由に機能蛋白質を設計し、その働きや動きを分子レベルで自由に制御できる日がおとずれるかもしれない。こうした人工機能蛋白質の登場によって可能になる技術は、穏和な条件での化学反応の実現、医薬品への応用、分子素子の開発など、計り知れないものがある。いまや蛋白質工学は生命の神秘を解明するだけでなく新たな技術への第一歩となっているのである。



(図1-2) 蛋白質の構造における階層性とそこに働いていると考えられる物理的相互作用についての概略図

先に述べた分子生物学の発達は、還元論的唯物論の完全な勝利であった。それにとまなう生物機械説は、ある意味では生物と無生物の境界をなくしてしまったといえる。もし、蛋白質化学および蛋白質工学により生命現象の多くをつかさどる蛋白質の全てが明らかにされ、同様にその他の生体構成成分についても理解が進めば、人類は生命を自在に操れるようになるのであろうか。生命の神秘を追求することは魅惑的なことであり、その究極を手にしてみたいものである。そう思う一方で生命は複雑な機械ではなく、いつまでもどこかに神秘性を持ち続けているほしいとも考えてしまう。しかしながら、生命の神秘に到達し、神に近づいた日の心配をするのは私の思い上がりであろう。

第2章 研究材料とした α -ラクトアルブミンとリゾチームについての解説 および本論文における実験の背景とその目的

本研究では機能蛋白質の設計をめざした蛋白質の構造と機能の研究を蛋白質工学的手法により行うこととし、その題材として α -ラクトアルブミンとリゾチームを使用することとした。本研究で行った実験内容について解説するまえに、まず題材とした2つの蛋白質についての解説と本研究における背景を述べる。

2-1 リゾチームと α -ラクトアルブミン

リゾチームは、古くはフレミングが鼻汁、唾液、涙、卵白に強力な溶菌作用を見だし、その因子をリゾチームと命名したことにその研究の端を発している。しかし、それ以前からすでにニワトリ卵白に含まれる強力な溶菌力は酵素によるものであることが知られており、きわめて古くから研究されている蛋白質である。また、酵素としては初めてX線結晶解析が行われた蛋白質で、それ以外にもあらゆる方法で詳細にその作用機構、蛋白化学的性質などが調べられてきている。リゾチームの作用はこのように溶菌活性を示すことであるが、その本質は菌体の細胞壁を加水分解することにある。すなわち、細菌細胞壁の糖鎖はN-アセチルムラミン酸とN-アセチルグルコサミンの繰り返しから成り立っているが、リゾチームはこの間の β -1, 4結合を加水分解することのできる酵素である。

リゾチームは微生物から動植物界まで広く分布しており、分子量及び基質特異性から数種類に分類されている¹⁾。その中で構造と機能相関が詳細に研究されてきたものは、C-型リゾチームであるニワトリ卵白及びヒトリゾチームとバクテリオファージT4のリゾチームでありDNA組換え技術を用いた蛋白質工学的実験もこの両者に限られている。T4-リゾチームは分子量16800でN-アセチルムラミン酸にペプチドが結合した部分を主に加水分解する基質特異性を示す。また、今回本研究で取り上げたニワトリ卵白リゾチームや、その蛋白質工学的研究において参考とされているヒトリゾチームが代表例である、C-型

(chicken-type) リゾチームと呼ばれているものは、約分子量14500で、N-アセチルムラミン酸とN-アセチルグルコサミン間の β 1 \rightarrow 4結

合以外に、甲殻類の殻を構成しているN-アセチルグルコサミンのホモポリマーであるキチンや、その誘導体であるグリコールキチンを加水分解することもできる。

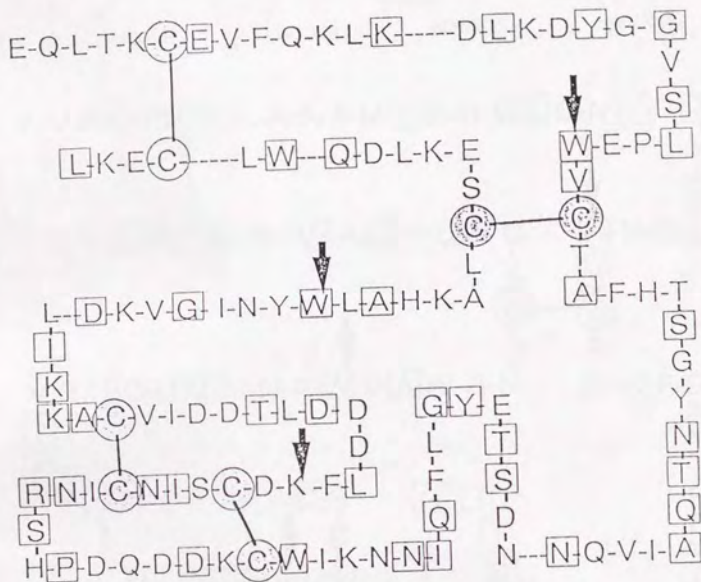
T4-リゾチームについては、Matthews等を中心として遺伝子工学的変換体の作製とその立体構造解析の研究が精力的に進められている^{2,3)}。しかしながら、彼らの仕事は主としてアミノ酸置換と蛋白質の安定性、物性の変化の構造的考察が中心となっている。これは現在の蛋白質のアミノ酸置換による性質の変化をある程度理論的に考察が可能なものの1つが熱安定性の変換であることによっている。

C型リゾチームではニワトリとヒトリゾチームを対象として国外で数グループ、国内で4グループがそれぞれの角度から遺伝子工学的変換研究を展開している。どの研究グループも酵母を宿主とした分泌発現系を利用して変換体の作製を行っている。特に、ニワトリリゾチームは、Phillips等により酵素として最初にX線結晶解析による立体構造が提出された研究を背景として⁴⁾、数多くの多面的な研究が現在まで行われており⁵⁾、改変体を作製するにあたって多くの情報に恵まれている。それ故、蛋白質の構造と機能変換をアミノ酸置換により基礎的に研究するにはやはり格好の実験材料である。機能解析という面で見るとこの酵素の基質が複雑な構造をした糖の多量体であること、加水分解活性以外に糖の転移反応が同時に起こること、また、生体高分子を加水分解する酵素に良く観察される多量体基質の結合様式が何種類も存在することなどから、適当な低分子合成基質がなく酵素の反応速度論的研究がやりにくい欠点がある⁵⁾。

一方、本研究で取り上げたもう一つの蛋白質である α -ラクトアルブミンは、は乳類の乳腺で特異的に発現するカルシウム結合蛋白質でガラクトシルトランスフェラーゼとともにラクトース合成酵素を構成している。ガラクトシルトランスフェラーゼは単体でUDP-ガラクトースにN-アセチルグルコサミンを転移させて、N-アセチルラクトサミンとUDPが生じる反応を触媒する酵素である。ところがここに α -ラクトアルブミンが存在すると、 α -ラクトアルブミンはガラクトシルトランスフェラーゼと結合し、別の反応、すなわちUDP-ガラクトースにグルコースを転移させて、ラクトースとUDPが生じる反応を触媒するようになる。すなわち、 α -ラクトアルブミンはガラクトシルトランスフェラーゼ

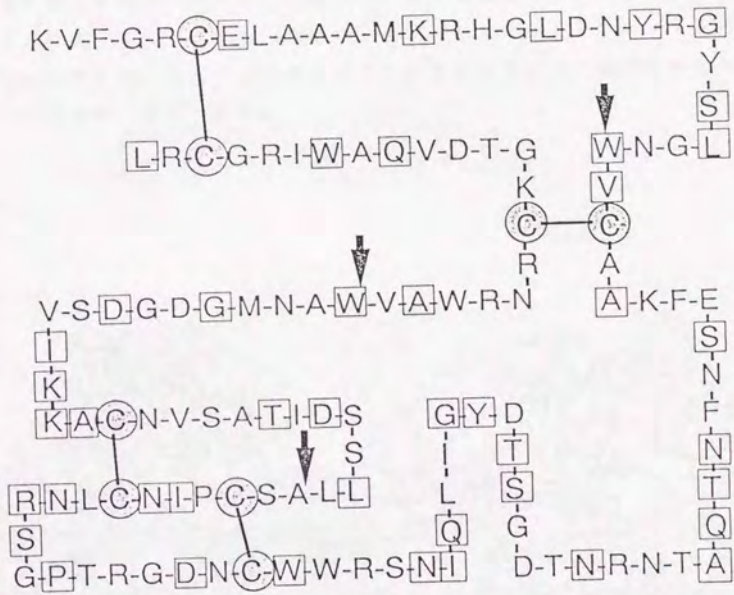
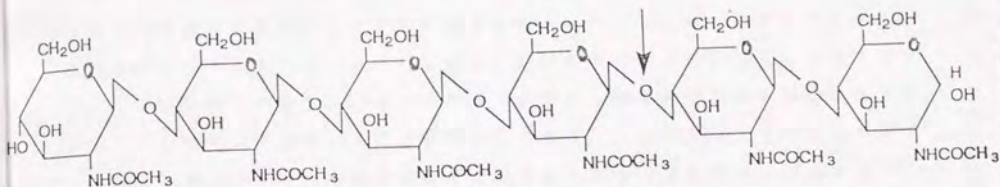
の修飾蛋白質として働くわけである⁶⁾。これらの反応にはいずれの場合もマンガ
ンイオンの存在がその活性発現に必須であることが知られているが、先に述べたよ
うに、活性のある α -ラクトアルブミン自体にも1分子のカルシウムイオンが結
合していることが知られており、その結合位置も一次構造上で同定されている⁷⁾。
しかしながら、その構造、機能相関については、いくつかの化学修飾などの研究
がなされているのみであり⁸⁾、ほとんど明らかにはされていない。

本論文では、蛋白質工学の材料としてC-型のリゾチームであるニワトリ卵白
リゾチームとヤギの α -ラクトアルブミンに注目した。この2つの蛋白質は、い
ままで述べてきたように機能的にはまったく異なる蛋白質である。ところがアミ
ノ酸配列にはきわめて高い相同性があり、アミノ酸の欠損をみとめて並び合わせ
るとヤギ α -ラクトアルブミン123残基のうち54残基がニワトリ卵白リゾチ
ームと同じアミノ酸である。また、両者ともジスルフィド結合を4つもち、分子
量の割にジスルフィド結合の数が多し蛋白質であるが、その掛かり方がまったく
同じようになっているのである(図2-1、図2-2)。すなわち一次構造上
においてはおたがいにきわめてよく似ているわけである⁹⁾。



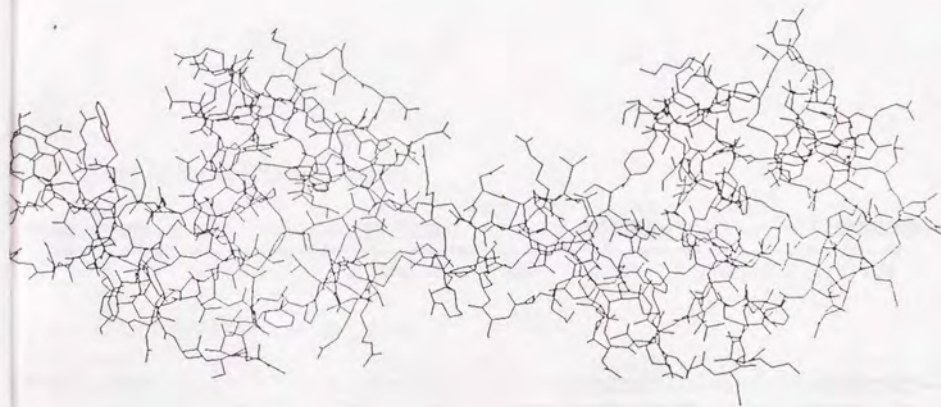
(図 2-1) ヤギ α -ラクトアルブミンの一次構造

□はニワトリリゾチームと同一のアミノ酸残基
 ○は両方で保存させているジスルフィド結合
 矢印はゲノム上でイントロンの挿入されている位置
 リゾチームとの比較で残基の欠損が考えられる部位は
 -----で示した。



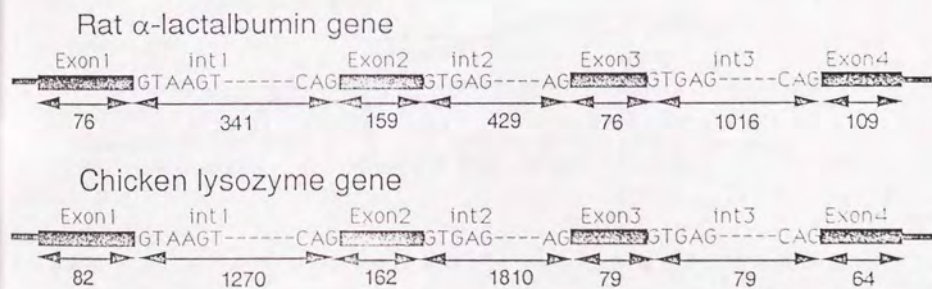
(図 2-2) ニワトリリゾチームの一次構造
 □はα-ラクトアルブミンと同一のアミノ酸残基
 ○は両方で保存させているジスルフィド結合
 矢印はゲノム上でイントロンの挿入されている位置
 図の上にはN-アセチルグルコサミンの6量体の構造を示した。矢印で示した位置はリゾチームによって加水分解される結合

また、その高次構造についてはニワトリ卵白リゾチームが酵素としてはじめてX線結晶解析がなされたという古い歴史を持つものに対し、 α -ラクトアルブミンはいまだにヒビのものについて比較的低い分解能で分析が成功しているにすぎない。しかしながらそれでも、 α -ヘリックスや β -構造の様子などは卵白リゾチームときわめてよく似ていることが分かっており、そのため α -ラクトアルブミンの構造を卵白リゾチームのものにあてはめることができるので、卵白リゾチームの構造をもとにした α -ラクトアルブミンの予想構造はかなり高分解能まで精密化されている¹⁰⁾。すなわち、卵白リゾチームと α -ラクトアルブミンの高次構造は重ねあわせて、残基を置き換えることができるほどよく似ていると考えられているのである(図2-3)。



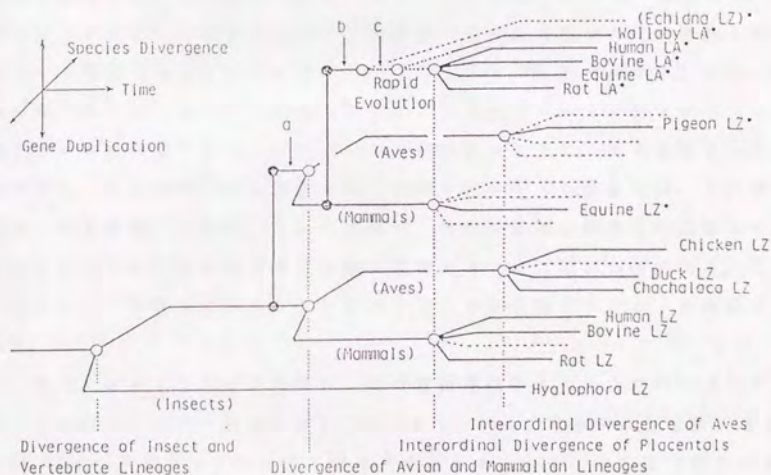
(図2-3) ニワトリリゾチーム(左)とヒビ α -ラクトアルブミン(右)の三次構造を示したコンピュータグラフィックス

これに加えて注目すべきことはこのような蛋白質の構造だけでなく、遺伝子上の構造も両者はよく似ているという点である。真核生物において蛋白質の構造遺伝子は、いくつかのエキソンと呼ばれる蛋白質のアミノ酸配列を実際にコードしている部分が、イントロンと呼ばれる蛋白質の情報とは無関係な部分によって分けられてゲノムDNA中に存在している。卵白リゾチームも α -ラクトアルブミンも4つのエキソンが3つのイントロンによって分けられているが、そのエキソンの大きさやイントロンが挿入されている位置が両者できわめてよく似ているのである(図2-4)¹¹⁾。



(図2-4) ラットの α -ラクトアルブミン(上)とニワトリリゾチーム(下)のゲノムにおける遺伝子構造(文献11より)

このようなことからこの2つの蛋白質は同じ祖先遺伝子から別々の蛋白質に進化した例として注目されている。ほ乳類が誕生して乳中に多くのラクトースを含ませるためにラクトース合成酵素が生まれ、このときに遺伝子重複により生じたいくつかのリゾチーム遺伝子のうちの 하나가 α -ラクトアルブミンの遺伝子に進化したと考えられており、この2つの蛋白質が分化したのは2億年前とも、8千万年前とも言われている(図2-5)¹²⁾。



(図2-5) α -ラクトアルブミンとリゾチームの分子進化を示した概念図
横軸は年代、縦軸は遺伝子重複を示す。(文献13より)

2-2 本研究における目的とその理論背景

エキソンシャッフリング仮説とモジュール仮説

現在では、なんの背景もなく新しい機能蛋白質を設計することは残念ながらあまり見込みがない。そこで本研究においては新しい機能蛋白質をデザインするための前段階として、その設計における指針をさぐるため、ある蛋白質(=ヤギα-ラクトアルブミン)を出発点として考え、これに新しい機能(=リゾチーム機能)をもたせることを目標とした。そのためには数残基程度の置換だけでなく、比較的大きな置換を導入することも当初から計画されていた。しかしながら、改変体の作製において改変体の構造を推定するために行われる、コンピューターグラフィックス上での構造の比較などは置換が多くなるにつれ元の構造を保っているという保証がなくなってくるので、しだいにその評価がむずかしくなり参考にならなくなってくる。コンピューター上での構造のシミュレーションもまだ開発途上といった状態である。したがって、本研究のように、あるまとまった領域においてまとまった単位での置換を導入することを考えた場合には、どの領域を選ぶか、何を単位とするか、という意味で、単なる構造の相同性や比較といったものだけではない、指針となるべき別の理論あるいは仮説が必要である。こうしたものとして、本研究ではエキソンシャッフリング仮説とモジュール仮説を参考とした。

エキソンシャッフリング仮説は、なぜ構造遺伝子がイントロンによって分断されているのか、という疑問に対してGilbertによって提唱された仮説である¹⁴⁾。Gilbertは、イントロンの上で不等交叉が起きるとエキソンの並び順を変えるので、その結果エキソンがかき混ぜ(exon shuffling)をひき起こし、新しい機能をもった蛋白質の出現に役だったと考えた。この仮説により、イントロンによって構造遺伝子が分断されている理由が説明できるだけでなく、分子進化の上でもまったく新しい蛋白質がどのように生じてくるかを説明することができる。また、この仮説に基づいてさらに考えると、エキソンを部品として機能蛋白質を組み立てることが可能であるならば、イントロンの存在部位がでたらめであっては不都合である。蛋白質は一見複雑な立体構造をもっているが、これをでたらめに切断してつなぎあわせ、新しい蛋白質をつくったとしても安定で効率の

よい蛋白質ができるとは考えにくい。エキソンが蛋白質の構造や機能の単位（部品）であるならば、エキソンのかき混ぜによってできる蛋白質はその構造も安定になりやすく、新しい機能をもつ蛋白質を容易に創造できたであろう。このような考え方から、遺伝子の構造であるエキソンが蛋白質の構造や機能のユニットと関係があるとする仮説が生じた。これらの仮説は、いくつかの蛋白質でドメインや次に解説するモジュールがそれぞれのエキソンごとにコードされていることが指摘されるようになり注目されるようになった。実際、一群の遺伝子から mRNA の成熟過程でイントロンのスプライシングのされかたにより多くの蛋白質が生じる、オルタナティブスプライシングの例がいくつか見つかってきている¹⁵⁾。これはエキソンの組合せにより何種類かの蛋白質が作れることの例と考えることもできよう。

また近年、蛋白質の構造についての議論においても、二次構造と三次構造の間にいくつかの構造や機能のユニットが存在するだろうという考え方から、蛋白質の構造に立脚したいくつかの仮説が提唱されている。以前から知られていたドメインというユニットは、蛋白質によってはプロテアーゼによる限定分解などによって、構造や機能を保持したまま単離できるのでこうしたものの最もはつきりしているものである。また、このドメインをさらに小さな単位として、郷らによってモジュールという単位が提唱されている¹⁶⁾。このモジュールという仮説は、主鎖炭素間の距離の分析から考え出された構造的なユニットで、二次構造の単位とまったく別の構造単位でありほぼ20残基前後からなる空間的なまとまりをもった構造を指すが、モジュールどうしが会合するための疎水的な部位と溶媒に接するための親水的な部分からなることが多いとしている点など、蛋白質をいくつかのユニットのよせあつめであるとする考え方の代表例である。また、逆に二次構造の考え方を拡張し、いくつかの二次構造が集まりから考えられた超二次構造という仮説は¹⁷⁾、カルシウム結合部位におけるE-Dハンドのように実際に機能の異なる蛋白質の間であっても共通して見られるので一次構造のみから経験的に高次構造を予想する場合には欠かせないものとなってきている。

エキソンシャッフリング仮説に照らし合わせると、ニワトリリゾチームとα-ラクトアルブミンは先に述べたその遺伝子上の類似性から、こうした蛋白質の構造や機能と遺伝子構造としてのエキソンという単位とにおける関連性を実験的に

議論できる数少ない対象の1つである。蛋白質工学的手法が開発されて以来、蛋白質の改変実験は多くの蛋白質において適応されてきたが、そのほとんど全ては蛋白質の構造や機能に注目して改変部位が決定されており、遺伝子構造であるエキソンに注目した例はほとんどない。エキソンが蛋白質の構造や機能の単位であるならば、エキソンの移動により機能変換が可能かも知れない。

また、エキソンに注目した改変を先のエキソンシャッフリングによる蛋白質の進化という仮定に基づいた観点でとらえると、このような改変は人工的にエキソンシャッフリングを起こしたと考えることもできる。自然界における進化の過程でエキソンシャッフリングが生じ仮定の中間体として生じる遺伝子が発現した場合、その遺伝子産物はもとの蛋白質の活性を保持しているのであろうか。エキソンが構造や機能の単位であっても、ばらばらの部品を集めてきたものが活性のある蛋白質となるのであろうか。構造遺伝子が偽遺伝子になってしまわないために、また変異体蛋白質が進化に参加し続けるためには、発現し、なんらかの活性を保持していることが必要であるように思われるが、これを実際の実験において確認することは困難な問題である。

モジュール仮説についても、ニワトリリゾチームは5つのモジュールから成り立っているという議論がすでに成されている¹⁸⁾。それによると、ほとんどエキソンとモジュールは同一の部位にその区切りがあり、第2エキソンのみが2つのモジュールから成っているとされている。すなわち、3つのイントロンが28、82、108番目のアミノ酸残基に対応する部分に挿入されているのに対し、モジュールは1~30、31~55、56~84、85~108、109~129として同定されている(図2-6)。さらにモジュール2と3の境界においてはイントロンがあったものが進化の過程で失われたとする考え方も提唱されている。これらのモジュールはそれぞれが疎水的な部分と親水的な部分からなり、それぞれの親水的な部分は分子表面に露出していて、疎水的な部分はモジュールどうしが接触する部分に相当する。したがって、ニワトリリゾチームにおいては蛋白質分子がモジュールの集合体から形成されているという仮説はきわめてよくあてはまっている。また、リゾチームの機能の点からこのモジュール構造を検討すると、活性触媒残基であるG1u35とAsp52はともにモジュール2に存在し、基質糖鎖結合部位はモジュール2からモジュール5に散在している。もし、モジュ

ール2のみであった原始的なリゾチームに他のモジュールが加わって安定な蛋白質および効率的な活性作用を獲得したとすれば、モジュール単位での移植により、リゾチーム機能を他の蛋白質、たとえば α -ラクトアルブミンにもたせることが可能かもしれないわけである。

Module	Residues	Segment encoded by exon	Catalytic site ¹	Contact sites of the substrate	Contact rings of the substrate
M1	1-30	1-28	Glu-35, Asp-52	Phe-34, Glu-35, Asn-37, Asn-44, Asp-52 Gln-57, Asn-59, Trp-62 Ile-98, Asp-101, Ala-107, Trp-108 Arg-114	D, E, F
M2	31-55	28-82			
M3	56-84				
M4	85-108				
M5	109-129	108-129			

(図2-6) ニワトリリゾチームにおけるイントロンの挿入位置とモジュール構造と同定された位置の比較(文献17より)

しかしながら、リゾチームから α -ラクトアルブミンが進化する過程でこのようなエキソンシャッフリングないしはモジュール間でのつなぎかえが起こったとするのはおそらく間違いであろう。なぜならば、そのような置き換えが起こっていないからこそ遺伝子上での相同性が保たれているのであり、 α -ラクトアルブミンへの進化は分子進化における従来の考え方にそくした、ゲノムDNA上での塩基の置換の積み重ねによって生じてきたものであろう。またリゾチームから α -ラクトアルブミンへの進化はきわめて速いものであったであろうとされているので、リゾチームから α -ラクトアルブミンへの進化には強い淘汰圧がかかっていたのであろうと考えられる。とはいえ、この2つの蛋白質を先に述べたような分子進化的な過程における仮説を実験的に検証するモデルとして取り上げることはきわめて興味深いことと考えている。

本論文ではこうした観点から、きわめてよく似ているが機能のまったく異なるニワトリリゾチームとヤギ α -ラクトアルブミンという2つの蛋白質を材料として蛋白質工学の手法を用い、蛋白質の構造と機能についての研究を行った。その内容は主に大腸菌と酵母による活性型組換え体 α -ラクトアルブミンの発現、精製系の確立についての章と α -ラクトアルブミンにおける改変体および卵白リゾチームとのハイブリッド蛋白質の作製とその性質の検討についての章から構成されている。

2-3 本研究における実験的背景

本論文における実験が始まる前からすでに、熊谷らを中心として当研究室ではニワトリリゾチームとヤギ α -ラクトアルブミンにおける蛋白質工学的実験にむけて、かなりの準備が進んでいた。

まず、 α -ラクトアルブミンにおいては、すでにヤギのもののcDNAがクローニングされていた^{1,2)}。また、その蛋白質工学的実験にむけて大腸菌における発現についての予備実験と、いくつかのcDNA上における改変がなされていた。

大腸菌での発現の予備実験により、大腸菌で大量発現するブタアデニレートキナーゼとの融合蛋白質としてヤギ α -ラクトアルブミンが発現する可能性のあること、その際に3'側の非翻訳領域のほとんどを取り除く必要があることが明か

となっていた。また、ニワトリリゾチームの触媒残基周辺に相当する部分などを α -ラクトアルブミン cDNA 上でニワトリリゾチーム型に改変したいくつかの DNA の調製がはじまっていた。

また、ニワトリリゾチームにおいては、その cDNA のクローニングだけでなく、すでに蛋白質工学的実験が行われ、それにより多くの新しい知見が明らかとなっていた²⁰⁾²¹⁾。

ニワトリリゾチームの発現系は、酵母を宿主としたものであった。酵母菌として *Saccharomyces cerevisiae* pep 5c を、発現ベクターとして酵母の酸性フォスファターゼのプロモーターをもった pAM82 によるものと、酵母菌としては *Saccharomyces cerevisiae* AH22 を、発現ベクターとして酵母のグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼのプロモーターとターミネーターを持った pYG100 を用いたものである。これらのベクターは大腸菌とのシャトルベクターであり、大腸菌体内ではアンピシリン耐性遺伝子をマーカーに使用することができる。また、酵母においては、Leu2 遺伝子をマーカーとして持っている。さらにこのベクターが酵母菌体内で安定に増殖できるように酵母における代表的なプラスミド、2 μ m プラスミド DNA の複製開始点を組み込んだものである。

改変実験としては、化学修飾の結果に注目した、Trp62 における改変実験が発表されていた。Trp62 は N-プロモコハク酸イミドや 2-ニトロフェニルスルフェニルクロリドなどのトリプトファン修飾試薬との反応性が高い残基である。pH 4.5 でリゾチームに N-プロモコハク酸イミドを反応させるとこの Trp62 はモル比 1:1 で容易に酸化され酵素活性はほとんど消失する²²⁾。オゾンによる酸化は反応条件によってかなり異なるが水溶液中、低温下で低濃度のオゾンにより注意深く酸化すると Trp62 がかなり優先的に酸化されて N'-ホルミルキヌレニンになって酵素活性はかなり低下する。さらにこの N'-ホルミルキヌレニンを持ったリゾチームを凍結状態で塩酸により脱ホルミル化してキヌレニンにするともとの 62 番目に Trp を持つリゾチームの約 80% まで酵素活性が回復する²³⁾。こうしたことから、62 番目の残基がリゾチームの活性に大きく関与しているであろうということが知られている。また、N-アセチルグルコサミン 3 量体とニワトリ卵白リゾチームの複合体の X 線結晶解析の結果から

は、Trp 62とN-アセチルグルコサミンの間に水素結合ができていとされている²⁴⁾。

改変実験はニワトリリゾチームより溶菌活性が4倍ほど高いヒトリゾチームが参考とされ、62番目をTrpからヒトリゾチームとおなじTy rへの改変が行われ、さらにPhe、His変異体についても同様に実験が行われた。

CM-ト-ヨーパール650Mを用いたクロマトグラフィーによって精製された変異体リゾチームは、Ty r改変体においてMicrococcus lysodeikticus懸濁液の濁度を指標とした溶菌活性は62番目がTrpである天然型のものよりも1.8倍ほどに上昇し、グリコールキチンを加水分解する活性は逆に低下した。したがって、このような変異によりニワトリリゾチームがヒトリゾチームにその性質が近づいたことが示された。また、Phe、His変異体の溶菌活性は、反応の初速度を62番目がTrpである野生型の卵白リゾチームの最適pHであるpH 6.2と比較してみると62番目をTy rにしたものよりもさらに高まり、野生型のものに比べ、2倍以上であった。また、溶菌活性においてはこのように62番目の部位にはより小さな芳香環が存在するものが有利であるという結果になる一方で、可溶性で電荷を持たず6位がグリコール化されてN-アセチルグルコサミンなどに比べて大きくなっている、グリコールキチンを基質とした時は、Phe改変体、His改変体ともかなり活性が低くなり、全体的な基質特異性が野生型やTy r改変体よりも高くなることとなった。この現象はHis改変体において最も顕著で大変興味深い。したがって、62番目の部位は活性の強さを左右するだけでなく、基質特異性にも影響を与えているという、興味深い事実が明らかとなっていた。

本論文における実験は、こうした多くの実験的蓄積と背景の上で始まった。

-19
-10
-1 1

GGGGTAAACAAAATGATGCTCTTGTCTCTCTGCTCCTGGTAGGCATCCTATTCCACGCCACCCAGGCTGAACAA
 1 10 20 30 40 50 60 70

LeuThrLysCysGluValPheGlnLysLeuLysAspLeuLysAspTyrGlyGlyValSerLeuProGluTrpVal
 TTAACAAAATGTGAGGTGTTCCAGAAAGCTGAAGGACTGAAGGACTACGGAGGTGTCAGTTTGCCTGAATGGGTC
 80 90 100 110 120 130 140 150

CysThrAlaPheHisThrSerGlyTyrAspThrGlnAlaIleValGlnAsnAsnAspSerThrGluTyrGlyLeu
 TGTACTGCATTTTCATACCAGTGGTTATGACACACAAGCCATAGTACAAAACAATGACAGCACAGAATATGGACTC
 160 170 180 190 200 210 220

PheGlnIleAsnAsnLysIleTrpCysLysAspAspGlnAsnProHisSerArgAsnIleCysAsnIleSerCys
 TTCCAGATAAATAATTAATTTGRTGCAAGAGCACCAGAACCCTCACTCAAGGAACATCTGTAACATCTCCTGT
 230 240 250 260 270 280 290 300

AspLysPheLeuAspAspAspLeuThrAspAspIleValCysAlaLysLysIleLeuAspLysValGlyIleAsn
 GACAAGTTCCTGGATGATGATCTTACTGATGACATTGTGTGCCAAGAAGATCTGGATAAAGTAGGAATTAAC
 310 320 330 340 350 360 370

TyrTrpLeuAlaHisLysAlaLeuCysSerGluLysLeuAspGlnTrpLeuCysGluLysLeu
 TACTGGTGGCCCATAAAGCACTCTGTTCTGAGAAGCTGGATCAGTGGCTCTGTGAGAAGTGTGAAACACCTGCT
 380 390 400 410 420 430 440 450

GTCTTTGCTGCTTCTGCTCTCTTCTGTTCTGGAACCTCCTTGCCCCCTGGCTACCTCGTTTTGCTTCTTTGTA
 460 470 480 490 500 510 520

CCCCCTGAAGCTAACTCGTCTCTGAGCCCTGGCCCTGTAGTGATGATGGACATGTAAGGACTAATCTCCAGGGA
 530 540 550 560 570 580 590 600

TGGCTGAATGGTCTCGGGACATTTGACCCCTGCTCGGTGCCTCTGATAGCACTTTTAAATGCAACAGTGCATATT
 610 620 630 640 650 660 670

CCACCTTCTGCTCTGAATAAAGGCCCTGATCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 680 690 700 710 720

(図 2-6) ヤギ α-ラクトアルブミン cDNA の遺伝子構造

pkk-1 1 10 20 30 40 50 60 70 80 90
 pls-1 GTACGACACTGGCAACATGAGGTCTTTGCTAATCTTGGTGCTTGCTTCCTGCCCTGGCTGCTCTGGGGAAAGTCT
 Gene * AGTCCCCTGTGT
 Protein MetArgSerLeuLeuIleLeuValLeuCysPheLeuProLeuAlaAlaLeuGlyLysValP
 -18 -15 -10 -5 -1 1
 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
 TTGGACGATGTGAGCTGGCAGCAGCTATGAAGCGTCACGGACTTGATAACTATCGGGGATACAGCCTGGGAAACTGGGTGTGTGCCCGCAAAATTCGAGAG
 G
 heGlyArgCysGluLeuAlaAlaAlaMetLysArgHisGlyLeuAspAsnTyrArgGlyTyrSerLeuGlyAsnTrpValCysAlaAlaLysPheGluSe
 5 10 15 20 25 30 35
 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290
 TAACITCAACACCCAGGCTACAAACCGTAACACCGATGGGAGTACCAGCTACCGAATCCTACAGATCAACAGCCGCTGGTGGTGCACGATGGCCAGSACC
 rAsnPheAsnThrGlnAlaThrAsnArgAsnThrAspGlySerThrAspTyrGlyIleLeuGlnIleAsnSerArgTrpTrpCysAsnAspGlyArgThr
 40 45 50 55 60 65
 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390
 CCAGGCTCCAGGAACCTGTGCAACATCCCGTGCTCAGCCCTGCTGAGCTCAGACATAACAGCGAGCGTGAACACTGCCGGAAGAAGATCGTCAGCGATGGA
 FroGlySerArgAsnLeuCysAsnIleProCysSerAlaLeuLeuSerSerAspIleThrAlaSerValAsnCysAlaLysLysIleValSerAspGlyA
 70 75 80 85 90 95 100
 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490
 ACCGATGAACCGCTGGGTCGCCCTGGCCGAACCGCTGCAAGGGCACCGACGTCAGAGGCTGGATCAGAGGCTGCCGGCTGTGAGGAGCTGCCCGCCCGG
 G T A
 snGlyMetAsnAlaTrpValAlaTrpArgAsnArgCysLysGlyThrAspValGlnAlaTrpIleArgGlyCysArgLeuSTOP
 105 110 115 120 125 129
 500 510 520 530 540 550 560 570 580
 CCGCCCGCTGCACAGCCGGCGCTTTGCGAGCGCGACGCTACCCGCTGGCAGTTTTAAACGCATCCCTCATTAAACGACTATACGCCAAAAA...AA
 CGCCAAA...AA

(図 2-7) ニワトリリゾチーム cDNA の遺伝子構造

第3章 ヤギ α -ラクトアルブミンの大腸菌での発現とその活性発現¹⁾

α -ラクトアルブミンはいくつかの種においてその遺伝子がすでに単離されていたが、その組換え体としての発現の報告はされていなかった。そこでまず、すでに当研究室で単離されていたヤギ α -ラクトアルブミンの遺伝子を用いて、その発現系を構築することとした。

3-1 大腸菌におけるヤギ α -ラクトアルブミン発現ベクターの構築とその発現

すでに当研究室において α -ラクトアルブミンの改変体の1つが、大腸菌で高発現することが知られているブタアデニレートキナーゼとの融合蛋白質として発現することが示唆されていた。そこで野生型の α -ラクトアルブミンにおいて、同様に発現ベクターを構築した。

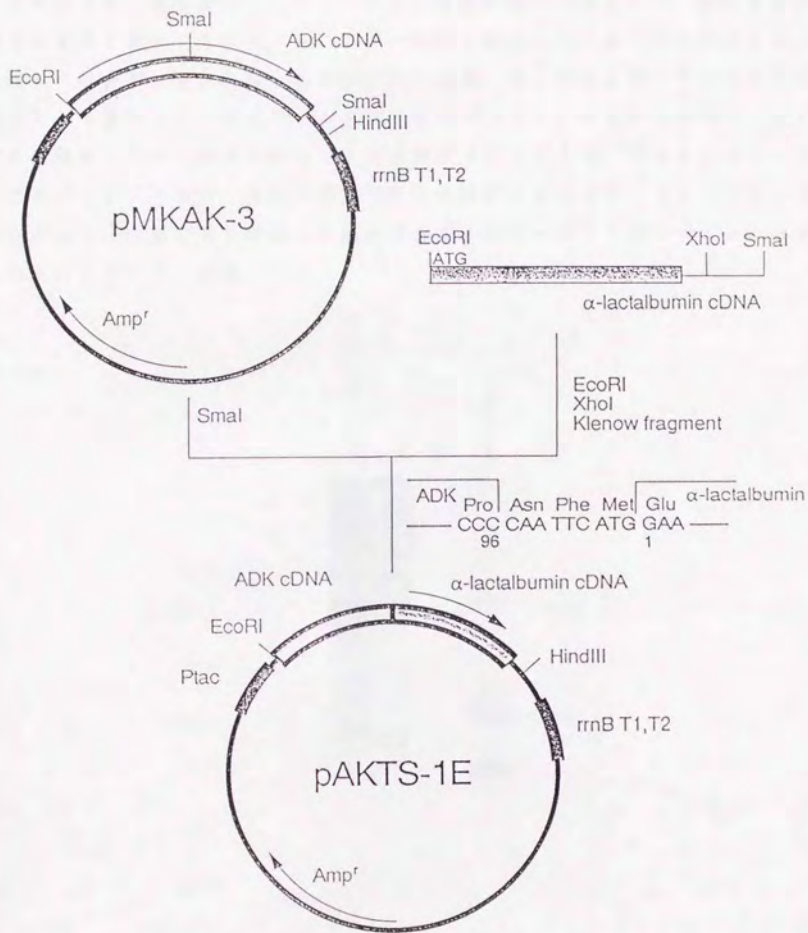
ブタアデニレートキナーゼを大腸菌で高発現させることのできるベクター pMKA K-3 は、大腸菌の強力なプロモーターである tac プロモーターと rrnB のターミネーター、さらに pUC18 由来の複製開始点をもち、SD 配列と蛋白質合成開始点の ATG との間を 8 塩基とし、さらにその ATG コドンを 2 つならべることによりアデニレートキナーゼをきわめて大量に発現できるように工夫されている²⁾。この発現ベクターを利用して、アデニレートキナーゼとの融合蛋白質として α -ラクトアルブミンを発現させるためにまず 3' 側非翻訳領域をできるだけ少なくできるように工夫した。3' 側非翻訳領域の大腸菌における発現の際の影響は、ニワトリ卵白リゾチーム³⁾、グイズ storage 蛋白質、preglycinin⁴⁾、インターロイキン-2⁵⁾などで調べられており、3' 非翻訳領域が存在すると発現量がいずれも低下することがわかっている。そこで、ヤギ α -ラクトアルブミンの場合にも 3' 非翻訳領域をできるだけ少なくするため、この領域中にある RsaI 切断部位以降を除去することとした。こうしたことはすでに発現の試みが当研究室で始まった頃から考慮されており、この RsaI 切断部位に、XhoI リンカーを挿入することによって XhoI 切断部位に改変されている cDNA がすでに構築されてあったので、この遺伝子を発現ベクター構築の

出発材料とした（図 3 - 1）。



(図 3 - 1) ヤキ α - ラクトアルブミン cDNA の塩基配列と Xho I 切断部位の挿入された場所

まず、 α -ラクトアルブミン cDNA 上のシグナルペプチドの直後に E c o R I 切断部位と M e t 1 残基分の A T G コドン部位特異的変異により導入した。これは、融合蛋白質として発現させた時にシグナルペプチドをもたない、成熟した α -ラクトアルブミンの部分と臭化シアン分解によって融合蛋白質から切り離すためである。幸い、ヤギの α -ラクトアルブミンにはシグナルペプチドの N 末端 2 残基以外には M e t が存在しないため、臭化シアン分解によって成熟型の α -ラクトアルブミン自身が分解されることはない。部位特異的変異法は 33mer からなる合成 DNA 5' - T G T T A A T T G T T C C A T G A A T T C C T G G G T G G C - 3' をミュートーションプライマーとして、M13 ファージの 1 本鎖 DNA を用いて行なった。このようにして単離した変異の導入された cDNA をもつ M13 ファージ 2 本鎖 DNA を E c o R I および X h o I で消化してから平滑末端とし、電気泳動的にシグナルペプチドの部分除去した α -ラクトアルブミン cDNA を単離した。また pMK-2 のほうは S m a I で消化することにより、アデニレートキナーゼの 96 残基目以降の部分を取り除いた。この両者を T4 リガーゼで連結したもので大腸菌を形質転換し、生じたコロニーのなかから、アデニレートキナーゼの N 末端 96 残基の後ろに M e t 1 残基を含んだ α -ラクトアルブミン cDNA が正しい方向に組み込まれているものを選択し、これを p A K T S - 1 E X と名付けた (図 3-2)。



(図3-2) 大腸菌におけるα-ラクトアルブミン融合蛋白質発現ベクターの構築

この発現ベクター pAKTS-1EX で大腸菌 JM105 を形質転換し、生じたコロニーを一夜培養したものを SDS-電気泳動で分析すると、融合蛋白質と思われる分子量約 24000 のバンドが顕著に増加していることが確認できた。発現した融合蛋白質は菌体を超音波破碎した後、遠心分離を行うことにより沈澱画分として回収され、菌体内で封入体となっていることが明かとなった。また、この沈澱を 7%ギ酸中で臭化シアン分解することにより、天然のヤギ α -ラクトアルブミンと SDS-電気泳動上で同じ移動度をもつポリペプチドが得られた。したがって、計画どおり発現した融合蛋白質から α -ラクトアルブミンが分離できたものと考えた (図 3-3)。

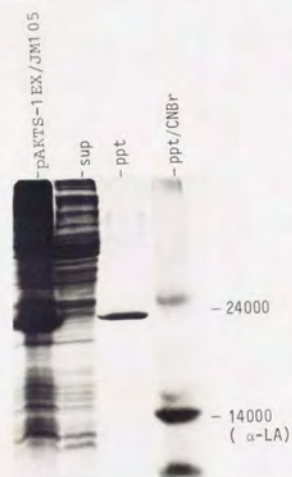


図 3-3 α -ラクトアルブミン融合蛋白質の大腸菌における発現

左から、pAKTS-1EX で形質転換した大腸菌 JM105
 その超音波破碎物の遠心上清
 超音波破碎物の沈澱物
 沈澱物を臭化シアンで分解した物
 天然のヤギ α -ラクトアルブミン

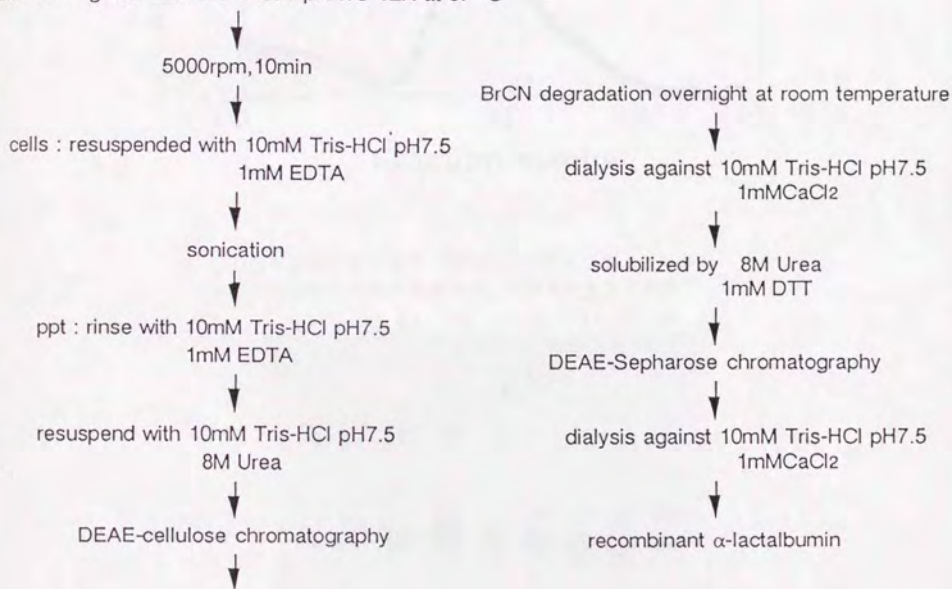
3-2 組換え体 α -ラクトアルブミンの精製と活性発現

この場合のように、大腸菌で外来遺伝子を封入体として発現した場合は、蛋白質を天然のものと同じ様な構造まで再生しなければならない。一般的に大腸菌で発現させた蛋白質が菌体内で沈澱となってしまい封入体を形成してしまう例はかなり多い。また、野生型では可溶性画分として発現しても変異体では封入体となってしまう例もあり、どうすれば封入体にならずに高発現させることができるかについては絶対的な法則性は見いだされていない。ただし、発現量を減らしたり、培養の温度を比較的低温すると可溶性のまま発現する可能性が高いようである。

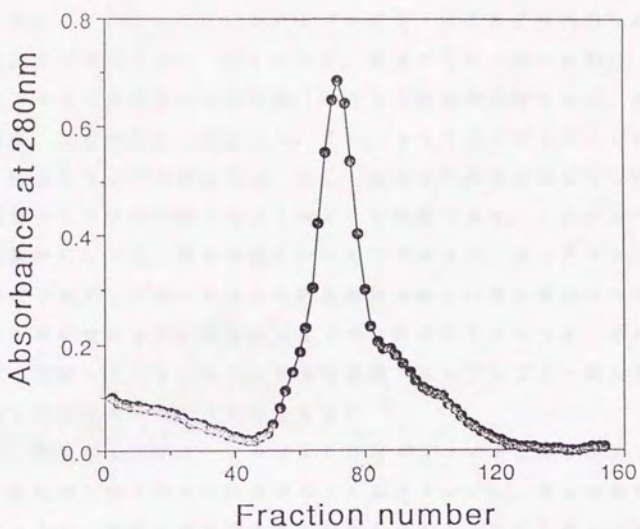
α -ラクトアルブミンを融合蛋白質としてではあるが発現させることができたので、 α -ラクトアルブミン部分を単離精製し、活性のある状態にまで再生することを試みた。大腸菌JM109を発現ベクターpAKTS-1EXで形質転換し、37℃でアンピシリンを1 lあたり200 mg含むL-培地で一夜培養してから、超音波破碎し、遠心分離によって沈澱画分として封入体となった融合蛋白質を回収した。この沈澱を10 mM Tris-HCl pH 7.5の緩衝液で数回洗浄してからこの緩衝液に懸濁し、さらに最終濃度で8 Mになるように尿素を加えた。これにより融合蛋白質が可溶化されるのでこれを遠心した上清を8 M尿素、10 mM Tris-HCl pH 7.5の緩衝液で平衡化したDEAEセルロースクロマトグラフィー(23 mm x 150 mm)にかけた。その後カラムを平衡化した時の緩衝液で洗浄してから、8 M尿素、0.5 M NaCl、10 mM Tris-HCl pH 7.5の緩衝液を200 mlほど流して融合蛋白質を溶出した。この画分に最終濃度6%になるようにトリクロ酢酸を加え融合蛋白質を再び沈澱として回収した。この沈澱を70%ギ酸に溶かし、臭化シアンを加えて室温で一夜反応させ、臭化シアン分解によって α -ラクトアルブミン部分をアデニレートキナーゼN末端部分と切り離した。反応後、透析によりギ酸や臭化シアンなどの反応試薬を除き、その後再度8 M尿素、1 mM ジチオスレイトール、10 mM Tris-HCl pH 7.5の緩衝液で変性可溶化して、同じ緩衝液で平衡化したDEAEセファロースクロマトグラフィー(23 mm x 150 mm)にかけた(図3-4)。この状態から緩衝液中のNaCl濃度を連続的に0 Mから0.5 Mまで全量200 mlで変化させ、2 mlずつ分画すると α -ラクトアル

ブミンは NaCl の濃度が約 0.3 M の付近で溶出されてきた。SDS-電気泳動で分析するとこの α -ラクトアルブミンは天然のヤギ α -ラクトアルブミンと同じ泳動度を示し、成熟型の α -ラクトアルブミンであることが確認できた。これらの α -ラクトアルブミン画分を 1 mM の CaCl_2 を含んだ緩衝液に対して透析すると可溶性 α -ラクトアルブミン溶液を得ることができた。

2 liter overnight culture of JM105 / pAKTS-1EX at 37°C

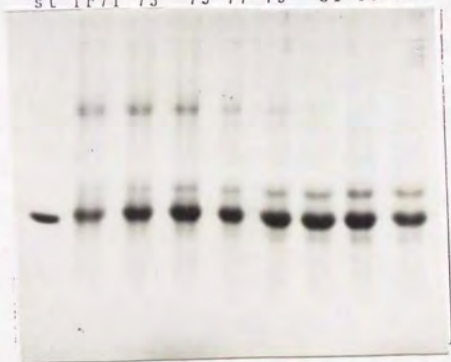


組換え体ヤギ α -ラクトアルブミンの精製スキーム



SDS-PAGE of DEAE-Sepharose
chromatography fractions

st fr 71 73 75 77 79 81 83 85

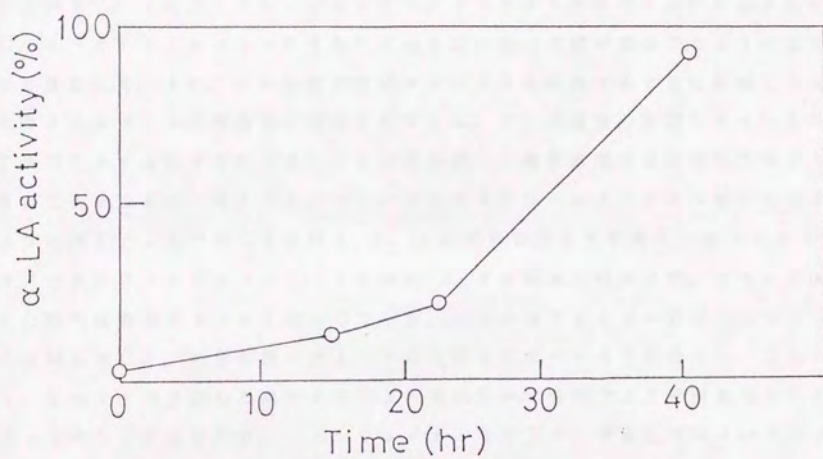


(図 3-4) DEAE-セファロースによる組換え体ヤギ α -ラクト
アルブミンの精製

このようにして精製した α -ラクトアルブミンはまだ変性状態なので、活性をもつ状態にまで再生しなければならない。再生のためには一般的に、尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤の量、これらの変性剤の除きかた、蛋白質濃度、pH、温度、などが微妙に影響する。また、 α -ラクトアルブミンのようにジスルフィド結合が存在する場合には、正しい組合せで結合が起こらなければならずこれらの条件を理想的に整えることはかなり困難である。したがってすべての蛋白質が実験的に可溶化、再生可能というわけではなく、 α -ラクトアルブミンと相同蛋白質であるリゾチームはこの再生操作が難しい蛋白質の一つである⁶⁾。このような条件が整わないと変性剤存在下では可溶化していても、それを除くと再び蛋白質が沈澱してしまったり、可溶化状態であってもごく一部の蛋白質のみが活性を出すのみであったりする場合も多い。

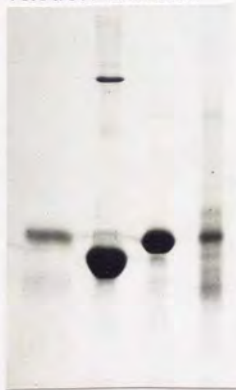
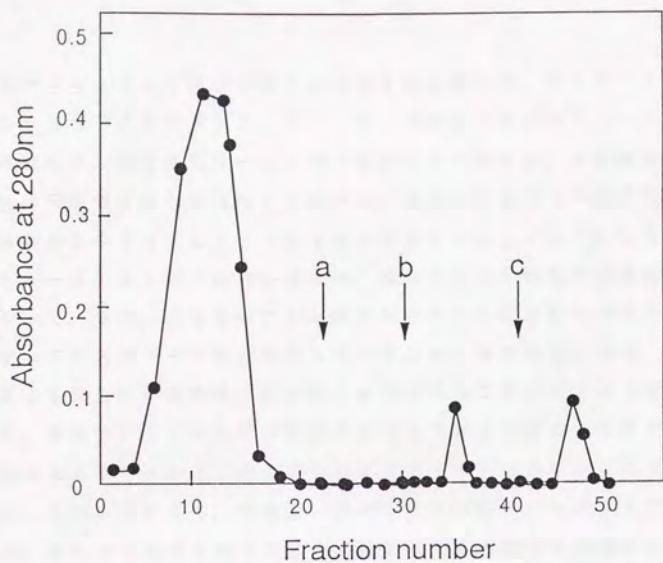
しかし、天然の α -ラクトアルブミンはジスルフィド結合を還元してしまわなければ、変性剤を加えたり加熱処理により変性させても、もとの条件にもどすことによりほとんど全部が再生することが知られている⁷⁾。したがって、ジスルフィド結合が正しい組合せで構成されれば、大腸菌で発現させた α -ラクトアルブミンであっても天然のものと同様な活性を持つものが得られるであろうと考えた。また、以前より生体内には蛋白質のジスルフィド結合を掛け代える活性のある蛋白質があることが知られている。大腸菌由来のチオレドキシンはこうしたものの一つで、ジスルフィド結合をもつ蛋白質の再生のために最近よく使われるようになってきた⁸⁾。

そこでこのチオレドキシンを精製した変性 α -ラクトアルブミン溶液に加え、活性の回復を調べた。5 mgのチオレドキシんにモル比で1/10量のジチオスレイトールを加えて30分間37°Cで放置することにより、チオレドキシンの一部を還元しておいた。また先に精製した α -ラクトアルブミン1.5 mgを10 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM CaCl₂の緩衝液15 mlに α -ラクトアルブミンが溶かしておき、両者を混合した。これを30°Cで40時間放置するとガラクトシルトランスフェラーゼ存在下でのラクトース合成酵素活性が分光学的な活性測定法により観察できた。すなわち、活性を回復した α -ラクトアルブミンが生じたことが確認できた(図3-5)。



(圖 3-5) 組換え体 α -ラクトアルブミンの活性の発現における
タイムコース

さらにこの活性をもった α -ラクトアルブミンのみを、チオレドキシシ、 α -ラクトアルブミン混合液から精製することをフェニルセファロースクロマトグラフィーにより試みた。先に述べたように α -ラクトアルブミンはカルシウム結合蛋白質であるが、EDTAによりカルシウムを除いてしまうとほとんどイオン強度のない状態でもフェニルセファロースの樹脂に吸着するようになることが知られている⁹⁾。これは、カルシウムイオンが α -ラクトアルブミンからはずれた時に、 α -ラクトアルブミンのきわめて疎水性の高い領域が露出するようになるためと思われる。また、この状態で再びカルシウムを添加すると先に吸着した α -ラクトアルブミンが特異的に溶出されてくる。そこで活性の回復した α -ラクトアルブミンを含むチオレドキシシとの混合液に、最終濃度50 mMになるようにEDTAを加え α -ラクトアルブミンからカルシウムイオンを取り除いておき、50 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM EDTAで平衡化したフェニルセファロースクロマトグラフィー(13 mm x 90 mm)にかけた。さらに平衡化した時の緩衝液でカラムを洗浄してから、50 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM CaCl_2 の緩衝液に代え、その後蒸留水でカラムを洗浄した。これらを1.5 ml ずつ分画した画分をSDS-電気泳動で分析すると非吸着画分にはチオレドキシシが回収され、カルシウムイオン存在下や、蒸留水では α -ラクトアルブミンが溶出されたことがわかった(図3-6)。



(図 3-6) フェニルセファロースクロマトグラフィーによる活性型組換え体
α-ラクトアルブミンの精製

矢印の画分から以下の緩衝液で溶出した

a) 50 mM Tris-HCl pH 7.5

b) 50 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM CaCl₂

c) H₂O

電気泳動は左から野生型 α-ラクトアルブミン

非吸着画分

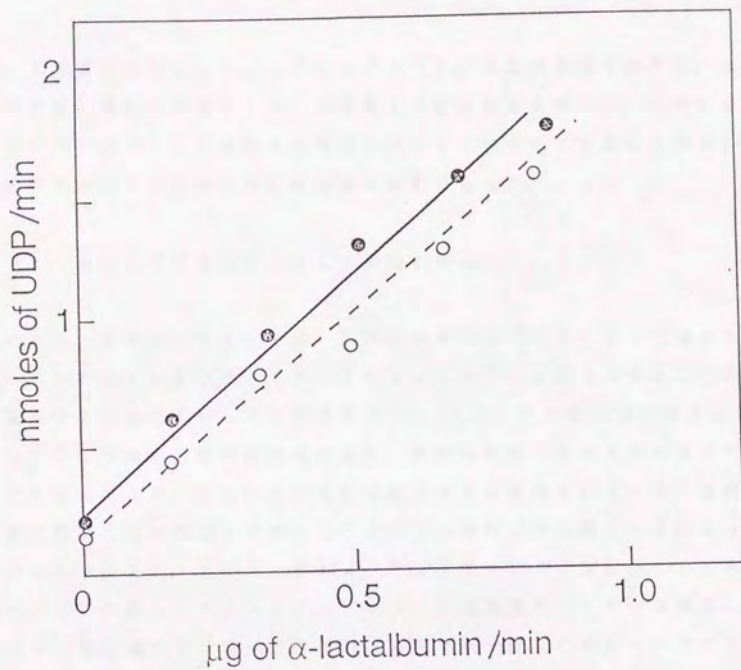
カルシウムイオンによる溶出画分

蒸留水による吸着画分

このカルシウムイオン存在下で溶出された画分の、 α -ラクトアルブミン活性、すなわちガラクトシルトランスフェラーゼ存在下でのラクトース合成酵素の活性を測定した。活性測定は分光学的な方法により行った。その結果、この画分の比活性は天然のものとはほぼ同じであった。またこれをアミノ酸配列分析にかけるとN末端からGlu-Gln-Leu-Thr-Lys-()-Glu-Val-Phe-Glnという配列が得られ、天然のものと同じN末端配列をもつことがわかった。なお、6番目にアミノ酸が回収されなかったのはここにシステインが存在してジスルフィド結合を作っているためと思われる。また、アミノ酸分析の結果でも野生型の蛋白質とはほぼ同じ結果を得ることができた(図3-7)。こうして、最終的に11の大腸菌培養液から15mgの融合蛋白質が回収され、また活性のある α -ラクトアルブミンにまで再生できたものはこのうち1.5mgであった。このようにして、野生型においては、大腸菌で α -ラクトアルブミンを発現させ、それを天然のものと同じ比活性を持つものにまで回復することができるようになった(図3-8)。

アミノ酸	n a t i v e	r e c o m b i n a n t	期待値
Asp	21.6	21.8	22
Thr	6.0	6.2	6
Ser	5.7	6.8	6
Glu	13.6	18.5	13
Pro	2.5	1.8	2
Gly	5.6	8.0	5
Ala	5.2	5.5	5
Cys	6.9	5.9	8
Val	5.3	5.8	6
Met	n. d.	0.4	0
Ile	6.6	6.1	8
Leu	<u>13</u>	<u>13</u>	13
Tyr	3.0	2.7	4
Phe	3.3	3.4	4
His	3.0	2.7	3
Lys	13.0	13.0	13
Trp	n. d.	n. d.	4
Arg	1.0	1.3	1

(図3-7) 精製された組替え体 α -ラクトアルブミンのアミノ酸組成
 Leuを13個とした時の相対値で表した。



(図 3-8) 精製された組換え体 α-ラクトアルブミンの活性測定

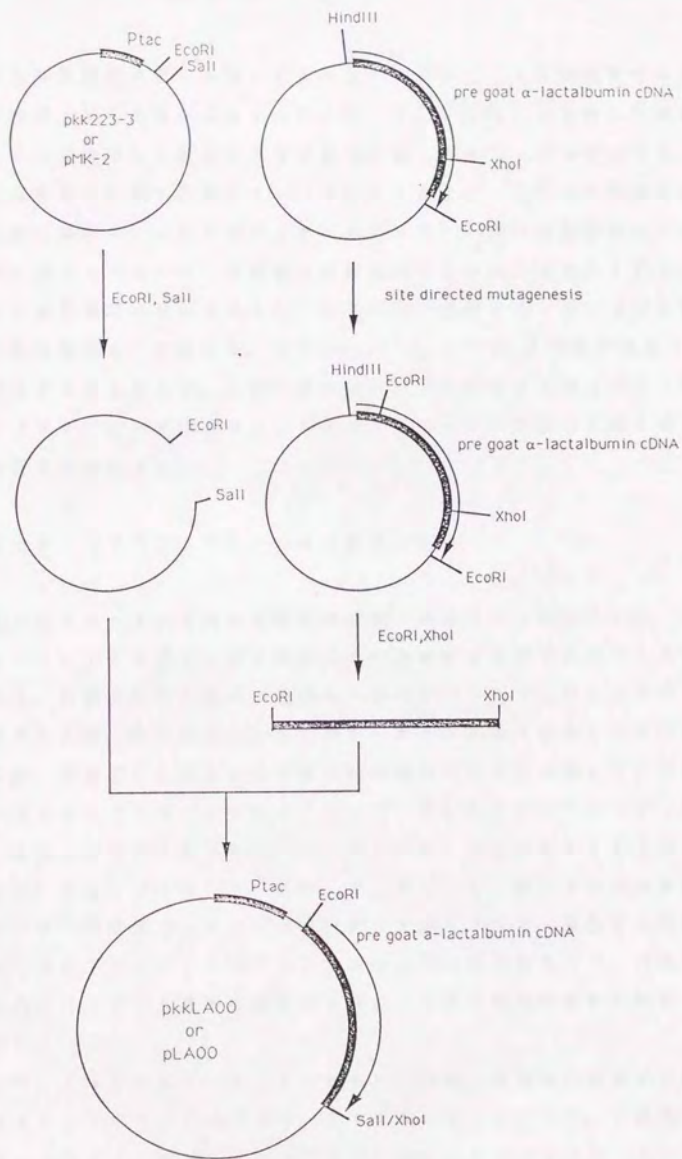
- が天然のヤギ α-ラクトアルブミン
- が組換え体 α-ラクトアルブミン

3-3 ヤギ α -ラクトアルブミンの大腸菌における単独発現の試み

また、大腸菌におけるヤギ α -ラクトアルブミンの直接発現も試みた。直接発現においては、精製を簡略化することを考えて分泌発現を試みた。しかしながら、大腸菌はクローニングした遺伝子の発現に最もよく使われているにもかかわらず、 α -ラクトアルブミン単体での分泌発現は困難であった。

3-3-1 tacプロモーターによる発現の試み

発現ベクターpKK223-3は、大腸菌の強力なプロモーターであるtacプロモーターとrrnBのターミネーターもっており、JM109などの大腸菌で外来遺伝子を高発現させることができる¹⁰⁾。また、その改良型であるpMK-2は、pUC18由来の複製開始点をもち、菌体内でのプラスミドのコピー数を増加させることにより、さらに高発現が可能ないように設計されている。事実、融合蛋白質の発現に用いたブタアデニレートキナーゼはこのpMK-2によって大量発現が可能である²⁾。そこで、ヤギ α -ラクトアルブミン前駆体cDNAをこれらのベクターに挿入して α -ラクトアルブミン発現用のベクターを構築した。この際、5'側においてはすべての非翻訳領域を取り除くために α -ラクトアルブミン前駆体の翻訳開始コドンであるATGの前に、EcoRI切断部位を22merの合成DNA 5'-GACATCATGAATTCTACCCCGG-3'をプライマーとして用いた部位特異的変異により導入した。また、3'側非翻訳領域は融合蛋白質の場合と同じようにXhoI切断部位を利用してその2/3を取り除いた。すなわち、EcoRIを新たに導入したcDNAをEcoRIとXhoIで消化してから、pkk223-3およびpMK-2をEcoRI、SalIで消化したものとT4リガーゼで連結し、直接発現用のベクター、pkkLA00およびpLA00を作製した(図3-9)。



(図 3 - 9) 発現ベクター p k k L A 0 0 および p L A 0 0 の構築

これらの発現ベクターを用いて α -ラクトアルブミンを発現させることを試みた。大腸菌 JM109 をこれらのベクターで形質転換し、単離したコロニーをアンピシリンを含む L-培地で一夜培養した後、菌体内、ペリプラズム、培養上清の中から SDS-電気泳動とイムノブロットイングによりその発現の有無を調べた。しかしながら、どちらのベクターを用いても、調べた画分ののいずれにも有為な α -ラクトアルブミンの発現は観察されなかった。また、IPTG を添加することによる発現の誘導も試みた。形質転換大腸菌をアンピシリンを含む L-培地で対数増殖期まで培養した。OD_{600nm} = 0.3 ~ 0.5 で最終濃度 1 mM になるように IPTG を加えた。この大腸菌についても同じように SDS-電気泳動とイムノブロットイングにより α -ラクトアルブミンの発現の有無を調べたが、発現は観察されなかった。

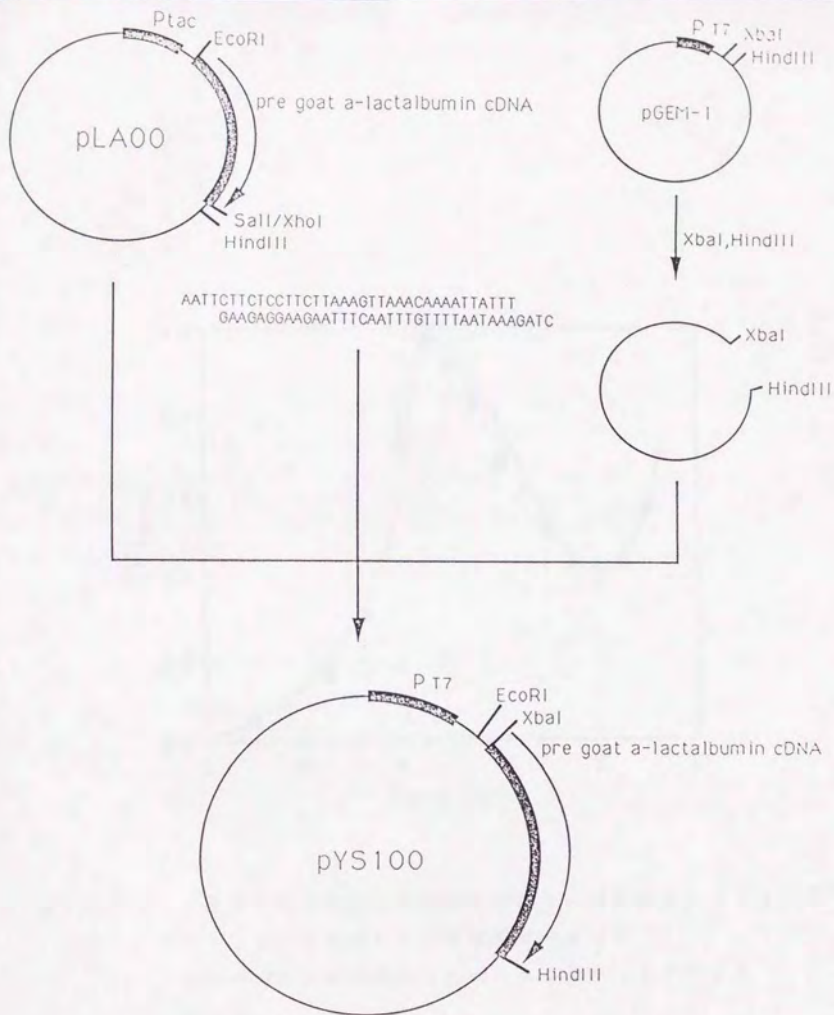
3-3-2 T7 プロモーターによる発現の試み

tac プロモーターを使った発現は困難であることがわかったが、これは発現した α -ラクトアルブミンが大腸菌菌体に悪影響を及ぼすためである可能性が考えられた。外来遺伝子の発現の促進のためにプラスミド上に tac プロモーターを存在させれば、菌体内の tac プロモーターの総数はかなりの数にのぼることになるが、このような場合には発現の制御機構は正常に作動しない可能性がある。すなわち tac プロモーターはリプレッサー蛋白質とインデューサー物質により発現、非発現の制御を受けるが、インデューサー物質である IPTG を加えない場合でも、tac プロモーターに対してリプレッサー蛋白質が十分量なければ、リプレッサー蛋白質は tac プロモーターを抑えきれず、蛋白質は発現してしまう。 α -ラクトアルブミンはカルシウム結合蛋白質であるので、発現した場合には菌体内のカルシウム濃度に異常をきたし、正常な菌体の生育が阻害されるかもしれない。

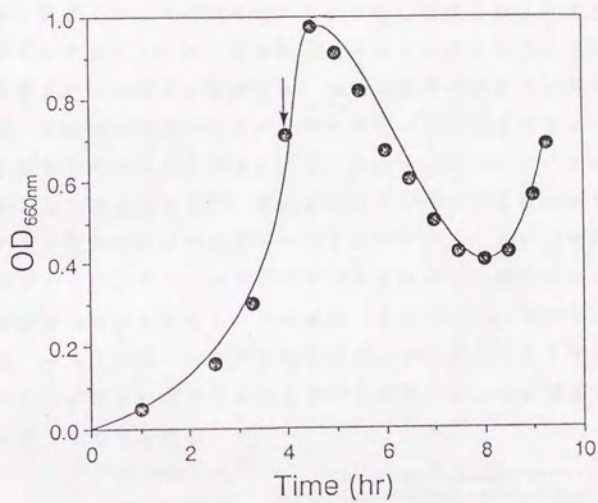
そこで、tac プロモーターよりもさらに発現、非発現の制御が正確に行うことのできる T7 フェージのプロモーターを用いることとした。大腸菌 BL21 (DE3) にはゲノム DNA 上に T7 フェージの RNA ポリメラーゼが挿入されており、これは tac プロモーターの支配下におかれている。さらに、発現ベクタ

- pGEM-1にはT7ファージのプロモーターがあり、このT7ファージのRNAポリメラーゼはこのプロモーターを利用してmRNAを合成できる。したがって、この宿主-ベクター系を用いるとT7プロモーターの支配下で外来遺伝子を発現させることができる。さらに、T7ポリメラーゼはtacプロモーターの支配下にあるので、これに対するインデューサーであるIPTGで発現を制御できることになる。pkk223-3やpMK-2の場合と異なるのは、制御すべきtacプロモーターがゲノム上にしか存在しないため、リプレッサー蛋白質による発現の制御が正確に行われるという点である¹¹⁾。

まず、ヤギ α -ラクトアルブミン前駆体cDNAはpLA00をEcoRI、HindIIIで消化した物から電気泳動的に単離した。ベクター側としてはpGEM-1をXbaI、HindIIIで消化したものを調製した。さらに両者を連結させるために量末端にXbaIとEcoRIの切断部位を持つようなリンカーを合成DNAにより作製した。またこの合成DNAリンカーにおいては、T7ポリメラーゼによる転写効率をあげる効果があるとされている配列を導入することにより、発現量の増加をねらった¹²⁾。この三者を連結して発現ベクターpYS100を作製した(図3-10)。



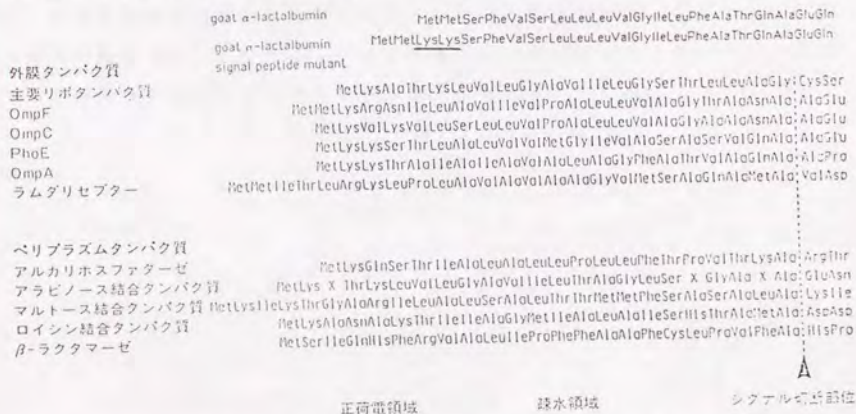
(圖 3-10) 發現ベクター pYS100 の構築



(図 3-11) pYS100 によって形質転換された大腸菌 BL21 (DE3) の IPTG の添加による増殖阻害のようす
 矢印の時間に最終濃度 1 mM になるように IPTG を加えた

3-3-3 シグナルペプチドの改変

BL21 (DE3) と pYS100 という宿主-ベクター系を用いた場合には IPTG の添加によって形質転換大腸菌の生育が阻害された。この現象を先に述べたように大腸菌菌体内で発現した α -ラクトアルブミンが菌体の生育をなんらかの原因により阻害するために起きたと考えると、発現した α -ラクトアルブミンの分泌効率をあげるにより菌体内における α -ラクトアルブミン量を下げ、生育阻害の効果をやわらげることができ、安定に発現させることができる可能性がある。また、分泌発現においてはシグナルペプチドの構造によってその分泌効率はかなり影響を受けることが予想される。大腸菌におけるシグナルペプチドの構造を比較すると (図3-12)、その多くが N 末端に正電荷をもち、その後に疎水的なアミノ酸残基が並ぶ配列をもつことがわかる。しかしながら、ヤギ α -ラクトアルブミンのシグナルペプチドには N 末端側に正電荷がないことから、このことが分泌効率を低下させている可能性が考えられた。そこで 25 mer の合成 DNA 5' - A T T C A T G A T G A A A A A T C C T T T G T C - 3' をプライマーとした部位特異的変異により N 末端側に Lys 2 残基を導入した発現ベクター pYS200 を作製した。



正電荷領域 疎水領域 シグナルペプチド終位

(図3-12) 大腸菌におけるシグナルペプチドとヤギ α -ラクトアルブミンのシグナルペプチドの比較 (文献13より)

この発現ベクター pY S 2 0 0 を用いて α -ラクトアルブミンを発現させることを試みた。pY S 1 0 0 における発現実験の場合と同様に、大腸菌 BL 2 1 (DE 3) を pY S 2 0 0 で形質転換して単離したコロニーをアンピシリンを含む L-培地で培養し、IPTG を添加することにより発現の誘導を試みた。OD_{600nm} = 0.5 ~ 0.8 で最終濃度 1 mM になるように IPTG を加え、この大腸菌について SDS-電気泳動とイムノブロッティングにより α -ラクトアルブミンの発現の有無を調べた。この場合もやはり pY G 1 0 0 における場合とまったく同じように形質転換大腸菌の生育は IPTG の添加後、いったん阻害されその後再び分裂を再開することがわかった。この生育が阻害されていると考えられる菌体について SDS-電気泳動とイムノブロッティングにより α -ラクトアルブミンの発現を検討したが、発現は観察されなかった。このように、シグナルペプチドの改良を試みても α -ラクトアルブミンの発現系を確立することはできなかった。

以上のように、 α -ラクトアルブミンのみを大腸菌で大量に発現させる系を確立することは、さまざまな試みにもかかわらずできなかった。こうした発現方法における問題はおそらく α -ラクトアルブミン cDNA や mRNA の遺伝子構造、あるいは菌体内での発現した α -ラクトアルブミンの安定性などにあると思われるが、その具体的な問題点は不明である。ただし、再現性が得られなかったものの、発現が観察されたこともあったので培養条件の検討などにより α -ラクトアルブミンの発現を安定化させることが可能であると考えている。

第4章 ヤギ α -ラクトアルブミン改変体蛋白質の作製

α -ラクトアルブミンの発現、精製系が確立した時点で、本論文の主たる目的である改変体蛋白質の作製を計画した。改変体蛋白質の設計にあたっては α -ラクトアルブミンの構造を出発点として、何らかのリゾチームとしての機能をもった蛋白質への機能改変を目標とした。ただし、この場合におけるリゾチーム機能とは溶菌活性、糖鎖加水分解活性、特異的糖鎖認識・結合活性などのリゾチームのもつ蛋白質としての性質のすべてを指している。また、以後において蛋白質の一次構造における残基番号はニワトリリゾチームにおけるものとし、 α -ラクトアルブミンについては残基の欠損を考慮してニワトリリゾチームと対応させた場合の残基番号として表現することとする。

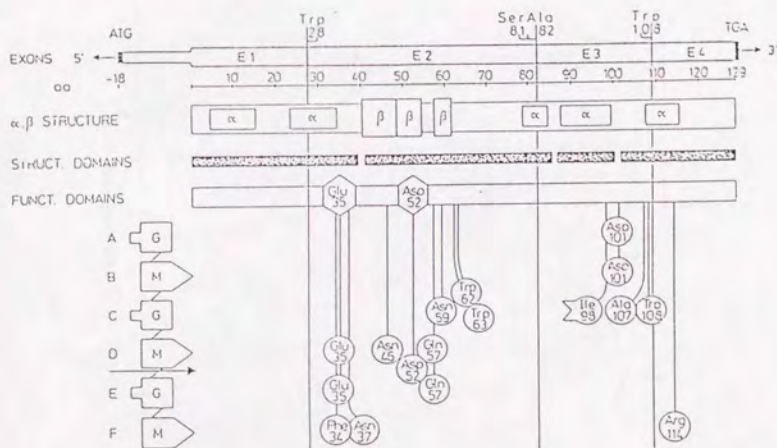
4-1 ニワトリリゾチームとの構造相同性に基づく α -ラクトアルブミン改変体の設計

4-1-1 ニワトリリゾチームの機能において重要と考えられている構造

ニワトリリゾチームは酵素として初めてX線結晶解析が行われた蛋白質であり、化学修飾などの方法とあわせてその反応様式はかなりよく解析されている。特に基質糖鎖との結合に関与しているとされている残基としては、以下の13残基が指適されており¹³⁾、これらを α -ラクトアルブミンの改変において特に考慮した(図4-1)。

P h e 3 4	主鎖COとサブサイトFのO6H
G l u 3 5	活性触媒残基 側鎖OHとサブサイトDのO1 主鎖COとサブサイトEのNH
A s n 3 7	側鎖NH ₂ とサブサイトFのO6
A s n 4 6	主鎖NHとサブサイトEのNH
A s p 5 2	活性触媒残基

- Gln 57 主鎖NHとサブサイトEのO3
側鎖NH2とサブサイトDのO6
- Asn 59 主鎖NHとサブサイトCのCO
- Trp 62 側鎖とサブサイトBのアセトアミド基
側鎖NHとサブサイトCのO6
- Trp 63 側鎖NHとサブサイトCのO3およびアセトアミド基
- Asp 101 側鎖OとサブサイトAのNH
側鎖OとサブサイトBのOH
- Ala 107 主鎖COとサブサイトCのNH
- Trp 108 側鎖とサブサイトCのCH2
- Arg 114 側鎖NH2とサブサイトFのO1
側鎖NH2とサブサイトFのO5



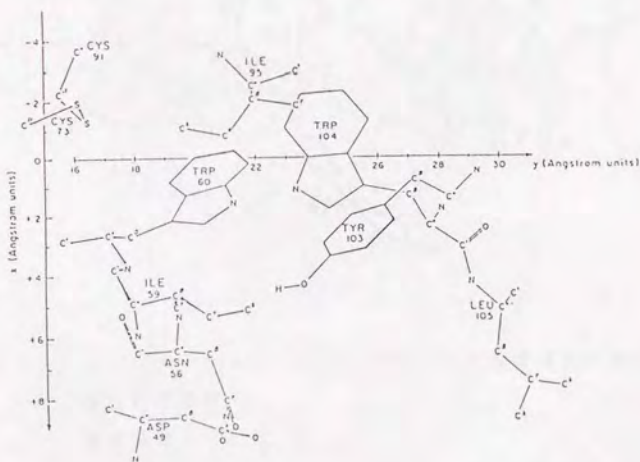
(図4-1) ニワトリリゾチームと基質糖鎖の結合の模式図

文献2より

4-1-2 α -ラクトアルブミン改変体の設計において考慮された一次構造上の部位

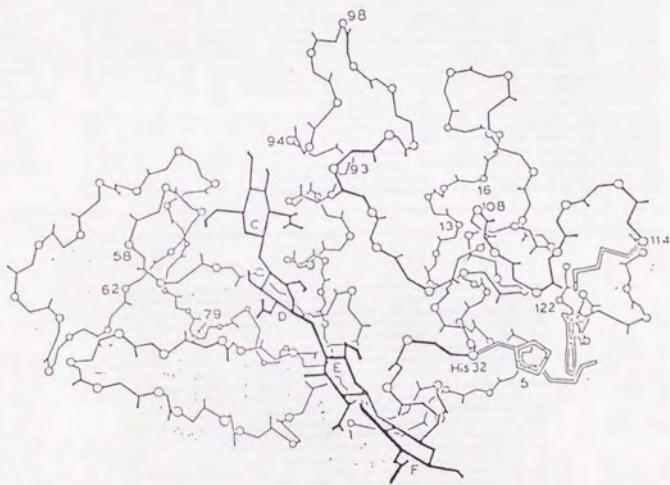
4-1-2-1 Tyr 107

ニワトリリゾチームとヒビの α -ラクトアルブミンで、両蛋白質のX線結晶解析の結果から考えられる立体構造を比較すると、ニワトリリゾチームの基質結合部位に、 α -ラクトアルブミンの場合ではTyr 107の側鎖のフェノール基が突き出していることがわかる。この点については α -ラクトアルブミンのX線結晶解析の結果が得られる前から指摘されていた³⁾。すなわち、 α -ラクトアルブミンの三次構造上にリゾチームの基質となる糖鎖をあてはめようとするとサブサイトCとサブサイトDの間にこのTyr 107の側鎖がぶつかり、糖鎖は α -ラクトアルブミンとは結合できないことが予想される(図4-2、図4-3)。そこで α -ラクトアルブミンにリゾチーム機能をもたせるためには、このTyrを α -ラクトアルブミン型のAlaにする必要があると考えた。



(図4-2) α -ラクトアルブミンのクレフトの部分の残基

文献4より(残基番号は α -ラクトアルブミンのもの)



(図 4-3) α -ラクトアルブミンにリゾチームの基質糖鎖を当てはめた
 場合の想像図
 文献 5 より

4-1-2 Ile 62

ニワトリリゾチームの Trp 62 は溶菌活性において大きな影響があることが過去においては化学修飾によって、近年では当研究室による蛋白質工学的実験によって報告されている（前述、第2章参照）が、 α -ラクトアルブミンではこの部位が Ile となっている。また、当研究室におけるニワトリリゾチームにおける蛋白質工学的実験によれば、この部位を他のアミノ酸に置換したものは基質糖鎖との結合定数が減少することが知られている。すなわち、結合定数は Trp 62 の場合がもっとも大きいのである。したがって、溶菌活性においてだけでなく、基質糖鎖との結合においてもこの部位は重要と考えられる。それだけでなく、ニワトリリゾチームが基質糖鎖と結合した時には、Trp の蛍光スペクトルに変化が生じることがわかっている⁷⁾ので、この部位を Trp に変換することにより、その Trp を蛍光プローブとして使うことができる。このようなことから、Ile 62 を Trp に改変することとした。

4-1-3 活性触媒残基、Asp 35、Glu 52

ニワトリリゾチームにおいて Asp 35、Glu 52 の2つの残基は活性触媒残基であり、溶菌活性、糖鎖加水分解活性において最も重要な残基である⁸⁾。この部位は α -ラクトアルブミンではそれぞれ Thr 35、Asp 52 となっているので溶菌活性、糖鎖加水分解活性を α -ラクトアルブミンにもたせるためにこの部位を α -ラクトアルブミン型からニワトリリゾチーム型に改変することとした。ただし、 α -ラクトアルブミンとニワトリリゾチームの間で残基の対比を行う場合、 α -ラクトアルブミンに残基の欠損があるためニワトリリゾチームの Asp 35 に対応する残基として、 α -ラクトアルブミンでは His 34 をあてはめることもできる。すると、 α -ラクトアルブミンにおいても、His は pH によっては荷電をもつことができるし、Asp 52 はニワトリリゾチームの Glu 52 にくらべメチレン基が一つ短いだけであるから、この2つの残基の配置しただけでは加水分解反応が可能と考えることもできるかも知れない。しかし、ニワトリリゾチームにおける研究では、Asp 35、Glu 52 を一方でも他の残基に

置き換えたり、これらに化学修飾を行ったりすると急激に溶菌活性が減少することが知られており⁹⁾、溶菌活性発現においては他の化学構造は許されないようである。ただし、これらの過去においての実験では、溶菌活性がまったくなくなってしまうことはほとんどの場合においておこらない。数%の溶菌活性は残っているようである。こうした溶菌活性がどのようにして発現されたものかは、ある意味では興味深い問題である。

4-1-4 第2エクソン

α -ラクトアルブミンとリゾチームは蛋白質構造だけでなく遺伝子構造においても類似性があること、エクソンが蛋白質構造においても構造や機能の単位になっているという説があることは前に述べた通りである。

第2エクソンは活性触媒残基を含む多くのリゾチーム基質糖鎖結合残基を含んでおり、リゾチーム活性においてきわめて重要な部分をコードしているので、これらの仮説によれば第2エクソンがリゾチームにおける構造や機能の本質的な部分であるかもしれない。

また、第2エクソンは二つのモジュールから成っているとされている¹⁰⁾。もし、第2エクソンが二つに分かれていては都合が悪い要素が分子進化上存在するとすれば、エクソンシャッフリング仮説やモジュール仮説を検証する上できわめて興味深いと言える。したがって、第2エクソンがリゾチーム活性の最小単位として成り立つかどうかは、重要な問題と考えている。

4-1-5 第3エクソン

第2エクソンだけでなく、第3エクソンにも Asp101、Trp108 など基質糖鎖との結合に関与しているいくつかの残基が含まれている。したがって第2エクソンのみではリゾチームとしては機能せず、これに第3エクソンが加わることが絶対に必要であるかも知れない。

また、 α -ラクトアルブミンにおけるカルシウム結合部位は第3エクソンにコードされている。 α -ラクトアルブミンにおいてはカルシウムイオンによる蛋白質の安定化作用はきわめて大きいものであることがわかっている¹¹⁾。

したがって、カルシウム結合部位およびその周辺、すなわち第3エキソン部分の置換による変異体蛋白質の安定性の変化を観察することにより、さらにその効果を調べることができるだろう。

溶菌活性においては、当研究室におけるニワトリリゾチームの蛋白質工学的実験によると Asp101 を Gly に置換すると溶菌活性が上昇するという報告があり、この部位の重要性が証明されている。

4-1-2 実際には作製し、解析した改変体における構造上の特徴

4-1-2-1 α -L A (2)

最も小さな置換を α -ラクトアルブミンに導入した例として、Ile62およびTyr107の2残基をそれぞれ α -ラクトアルブミン型からニワトリリゾチーム型に改変した改変体を作製した。この改変体では、ニワトリリゾチームの活性触媒残基であるGlu35とAsp52は α -ラクトアルブミン型のままとなっているため溶菌活性や糖鎖加水分解活性はほとんど期待できない。しかし、糖鎖との結合を阻害すると考えられるTyr107の側鎖をAlaに改変することにより取り除き、基質糖鎖との結合における蛍光プローブとしてTrp62を導入してあるので、糖鎖との特異的な結合というリゾチーム機能は獲得できる可能性があると考えた。

この2つの変異が導入された α -ラクトアルブミンを以下 α -L A (2)と記述することとする(図4-5)。

4-1-2-2 α -L A (10)

α -L A (2)は活性触媒残基は α -ラクトアルブミン型のままであるので、活性触媒残基であるGlu35と、Asp52の α -ラクトアルブミンに導入した改変体を別に設計した。設計においては α -L A (2)において考慮された2残基と活性触媒残基2残基以外にも、基質糖鎖との結合にかかわると考えられる

残基はできるだけ導入することとした。そこで、ヤギ α -ラクトアルブミン cDNA 上で存在する 2 カ所の RsaI 切断部位のあいだの 41bp を合成 DNA によってニワトリリゾチームの cDNA 配列に置換した。こうして結果的に以下の 10 残基が導入できた改変を作製した。

Thr 31 Ala, Phe 33 Lys, His 34 Phe
Thr 35 Glu, Gly 37 Asn, Tyr 38 Phe
Ile 43 Thr, Glu 52 Asp, Ile 62 Trp
Tyr 107 Ala

この改変体蛋白質は、 α -ラクトアルブミンとニワトリリゾチームの間で蛋白質上のホモロジーがきわめて高いので、さきに述べたリゾチームにおける基質糖鎖と結合に関与している 13 残基の内、すでに Arg 114 以外の 12 残基をもった構造となっている。

この 2 つの変異が導入された α -ラクトアルブミンを以下 α -LA (10) と記述することとする (図 4-6)。

4-1-2-3 α -LA (EX2)

先に述べた議論にしたがいニワトリリゾチームの第 2 エキソンの重要性に注目して、この第 2 エキソンを α -ラクトアルブミンの第 2 エキソンと交換した改変体蛋白質を作製した。ただし、遺伝子操作上の都合で、このハイブリッド蛋白質においては第 2 エキソンともに 83 番から 86 番の部分の遺伝子構造がリゾチーム型になっている。これにより Phe 83 Leu, Asp 85 Ser, Asp 86 Ser、(α -ラクトアルブミンの Leu 84 はニワトリリゾチームでも Leu) という変異が導入されてしまった。この部分はカルシウム結合部位になっているのでこの変異体はカルシウムイオンは結合できないと予想される。また、リゾチームの基質糖鎖と結合に関与している残基に注目すると、13 残基の内 Arg 114 以外の 12 残基をもった構造となっていて、この点だけを考えると α -LA (10) とまったくかわらないことになる。しかし、 α -LA (10) のように機能面からだけ必要な残基をピックアップしてその部分だけを導入しても構造に蛋白質としての高次構造を成立できない可能性もある。これに対し、 α -L

A (EX2) のようにユニットとしてまとまった置換を導入することによりこのような構造的に不足した変異を補うことができる可能性がある。また、遺伝子構造であるエクソンの単位による置換で蛋白質の機能の移植が可能であることが示されれば、エクソンシャッフリングの仮説を実験的に支持することができるだけでなく、今後の蛋白質工学における蛋白質の設計戦略としてこのような方法を取り入れることが有効であることを示すことができる。

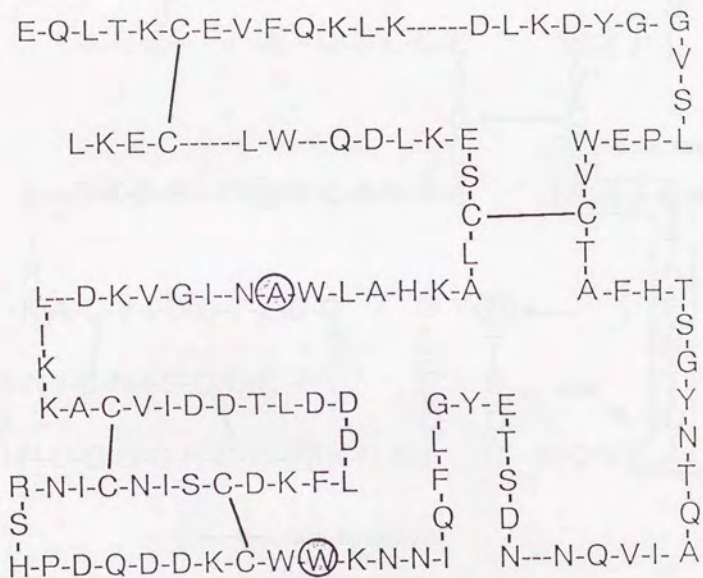
この2つの変異が導入された α -ラクトアルブミンを以下 α -LA (EX2) と記述することとする (図4-7)。

4-1-2-4 α -LA (EX2, 3)

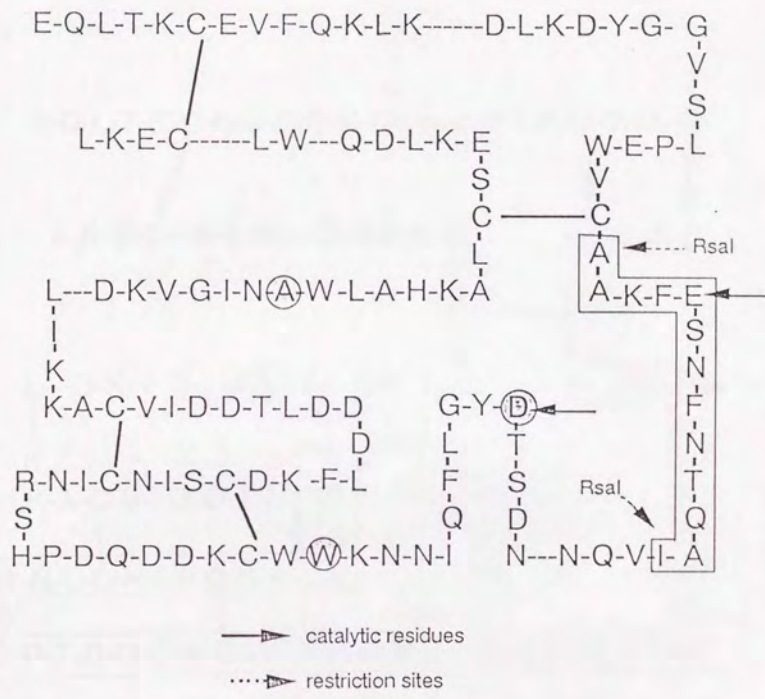
α -LA (EX2) に対し、第2エクソンだけでなく、第3エクソンによってコードされている部分構造の影響を議論するため、第2、第3エクソンの両者を α -ラクトアルブミンとニワトリリゾチームの間で入れ換えた改変体を作製した。しかしながら、大腸菌においてこの改変体を発現させた場合に、融合蛋白質を臭化シアンで分解しなければならないので、この第3エクソンに存在するMet105をあらかじめ α -ラクトアルブミン型のIleに改変しておいた。なお、この部分の残基はヒトリゾチームなどにおいてもIleとなっており、この変異により溶菌活性が阻害されることはないと考えられる。この改変体はきわめて大きな置換を導入しており、もはや α -ラクトアルブミンよりはニワトリリゾチームのほうによく似ている。しかし、基質糖鎖と結合に関与している残基だけに注目した時には、13残基の内Arg114以外の12残基をもった構造となっていて、 α -LA (10)、 α -LA (EX2) と同等のままである。したがって、この改変体とこれら2つの改変体の性質を比較することにより、ニワトリリゾチームにおける第3エクソン部分の構造の役割を検討できるかもしれない。ただし、ニワトリリゾチームにおける第2、第3エクソン部分だけからなるペプチドはほとんどリゾチーム活性を示すことができないという報告もあり¹²⁾、これだけ大きな置換を導入してもなお、改変体にリゾチーム機能をもたせることができない可能性もある。

この変異が導入された α -ラクトアルブミンを以下 α -LA (EX2, 3) と

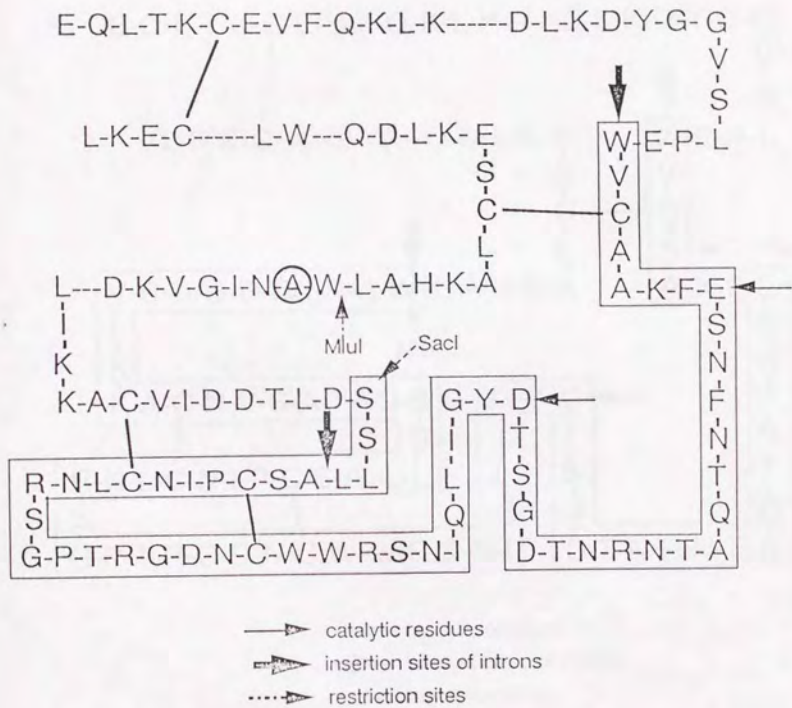
記述することとする (図 4 - 8) 。



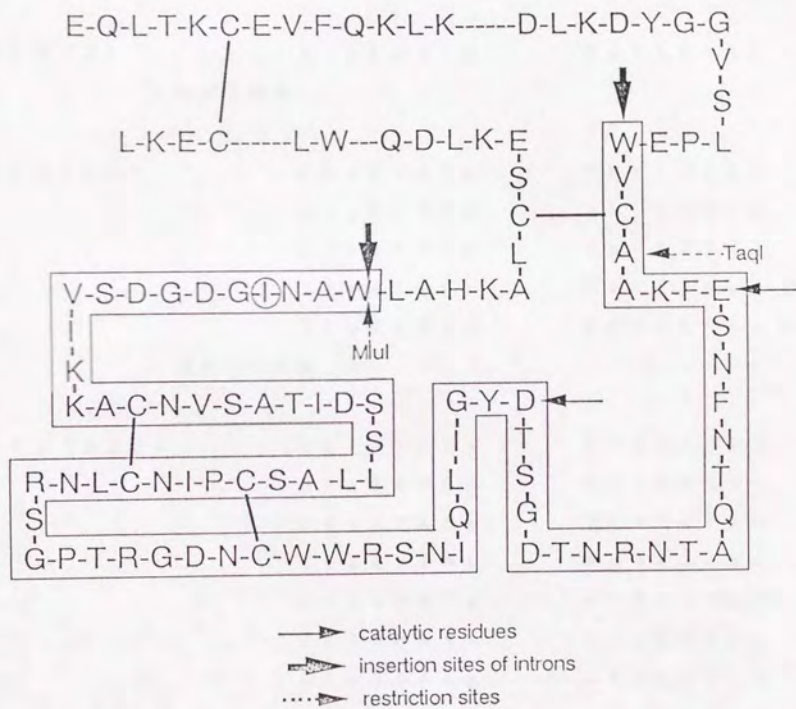
(図 4 - 5) α -L A (2) の一次構造



(図 4-6) α -LA(10) の一次構造



(图 4-7) α -LA (EX2) の一次構造



(図4-8) α -LA (EX2, 3) の一次構造

作製した組換え体 α -ラクトアルブミンの一覧表

α -L A

野生型 α -ラクトアルブミン

α -L A (2)

I l e 6 2 T r p

T y r 1 0 7 A l a

合計 2 残基

α -L A (10)

T h r 3 1 A l a

P h e 3 3 L y s

H i s 3 4 P h e

T h r 3 5 G l u

G l y 3 7 A s n

T y r 3 8 P h e

I l e 4 3 T h r

G l u 5 2 A s p

I l e 6 2 T r p

T y r 1 0 7 A l a

合計 10 残基

α -L A (EX2)

T h r 3 1 A l a

P h e 3 3 L y s

H i s 3 4 P h e

T h r 3 5 G l u

G l y 3 7 A s n

T y r 3 8 P h e

I l e 4 3 T h r

V a l 4 4 A s n

G l n 4 5 A r g

4 7 T h r i n s e r t

A s n 4 8 A s p

A s p 4 9 G l y

G l u 5 2 A s p

L e u 5 5 I l e

P h e 5 6 L e u

A s n 6 0 S e r

L y s 6 1 A r g

I l e 6 2 T r p

L y s 6 5 A s n

A s p 6 7 A s n

G l n 6 8 A r g

A s p 6 9 T h r

H i s 7 1 G l y

I l e 7 5 L e u

S e r 7 9 P r o

A s p 8 1 S e r

L y s 8 2 A l a	P h e 8 3 L e u
A s p 8 5 S e r	A s p 8 6 S e r
T y r 1 0 7 A l a	

合計 31 残基

α - L A (E X 2 , 3)	T h r 3 1 A l a	P h e 3 3 L y s
	H i s 3 4 P h e	T h r 3 5 G l u
	G l y 3 7 A s n	T y r 3 8 P h e
	I l e 4 3 T h r	V a l 4 4 A s n
	G l n 4 5 A r g	4 7 T h r i n s e r t
	A s n 4 8 A s p	A s p 4 9 G l y
	G l u 5 2 A s p	L e u 5 5 I l e
	P h e 5 6 L e u	A s n 6 0 S e r
	L y s 6 1 A r g	I l e 6 2 T r p
	L y s 6 5 A s n	A s p 6 7 A s n
	G l n 6 8 A r g	A s p 6 9 T h r
	H i s 7 1 G l y	I l e 7 5 L e u
	S e r 7 9 P r o	A s p 8 1 S e r
	L y s 8 2 A l a	P h e 8 3 L e u
	A s p 8 5 S e r	A s p 8 6 S e r
	L e u 8 8 I l e	A s p 9 0 A l a
	A s p 9 1 S e r	I l e 9 2 V a l
	V a l 9 3 A s n	l e u 9 9 V a l
	1 0 0 S e r i n s e r t	L y s 1 0 2 G l y
	V a l 1 0 3 A s p	T y r 1 0 7 A l a

合計 40 残基

4-2 α -ラクトアルブミン改変体遺伝子の作製

4-1-2-1 α -LA (2)

本研究が始まった時点ですでに、野生型 α -ラクトアルブミンの cDNA を M13 ファージのベクターに組み込んだ mpTS-1EX に対して部位特異的変異によって Tyr107Ala の変異が導入された遺伝子、mpTS-11EX が作製されていた。そこで野生型 α -ラクトアルブミンの場合と同様に、このベクターにさらに大腸菌での融合蛋白質での発現に必要な EcoRI 切断部位および Met を導入する変異を部位特異的変異によって行い、その後 EcoRI、XhoI で消化し、平滑末端としてから、生じた約 550 bp の断片を電気泳動的に精製し、発現ベクター pMKAK-3 を SmaI で消化したベクターと連結して、ヤギ α -ラクトアルブミンに Tyr107Ala の変異が導入された変異体を発現させることのできるベクター、pAKTS-11EX を作製した。さらにこの発現ベクター上で 5'-ATAATAAATGGTGGTGC AA-3' をプライマーとして部位特異的変異を行うことにより α -LA (2) を発現させることのできるベクター pAKTS-12WEX を作製した。

4-1-2-2 α -LA (10)

本研究が始まった時点ですでに、 α -ラクトアルブミン cDNA にリゾチームの活性触媒残基である Glu35 周辺と、Asp52 の部分に変異を導入した改変体の発現ベクター pAKTS-19EX が作製されてあった。これは、M13 ファージベクター上で作製された mpTS-19EX に含まれる変異体 cDNA を野生型の α -ラクトアルブミンなどと同じようにして発現ベクターに組み込んだ物である。mpTS-19EX は、mpTS-11EX に Glu52Asp の変異を部位特異的変異によって導入し、さらに α -ラクトアルブミン cDNA 上の 2カ所の RsaI 切断部位の間の 41 bp を合成 DNA によってニワトリリゾチーム型に改変することにより Thr31Ala、Phe33Lys、His

34 Phe, Thr 35 Glu, Gly 37 Asn, Tyr 38 Phe, Ile 43 Thr といった変異を一度に導入したものである。

この変異体 cDNA に、さらに Ile 62 Trp の変異を導入するために、発現ベクター pAKTS-19EX に 5' - ATAA TAA ATGGTGGTGC AA - 3' をプライマーとして部位特異的変異を行った。この α -LA (10) を発現させることのできるベクターを pAKTS-110WEX とした。

4-1-2-3 α -LA (EX2)

α -LA (EX2) を発現させることのできるベクター pAKTS-E2EX は、 α -LA (EX2, 3) の発現ベクター pAKTS-kkEX (後述) と、 α -LA (2) の発現ベクター pAKTS-12WEX の間で、翻訳領域中に存在する Sac I, Mlu I 切断部位の間を交換することにより作製した。ただし、pAKTS-12WEX 上にはこの Sac I 切断部位が存在しないため、5' - TCAGTAAAGATCTGAGCTCAGGAACCTTGTC - 3' をプライマーとして pAKTS-12WEX に部位特異的変異を行い、この Sac I 切断部位を導入した。この Sac I 切断部位をもつ pAKTS-12WEX (Sac I) を Sac I と Mlu I で消化し、その結果生成される約 60 bp の断片を電気泳動的に精製した。また、pAKTS-kkEX をやはり Sac I と Mlu I で消化し、その結果精製されるベクター側の約 3.2 kb の断片を電気泳動的に精製した。この両者を連結して α -LA (EX2) を大腸菌で発現させることのできるベクターを作製し、それを pAKTS-E2EX とした。

このようにして変異体遺伝子を作製したため、この第2エクソンを交換した改変体蛋白質においては第2エクソン以外にも C 末端側 4 残基分の遺伝子構造がニワトリリゾチーム型になってしまった。

4-1-2-4 α -LA (EX2, 3)

α -LA (EX2, 3) を発現させる際には、発現した融合蛋白質を臭化シア

ンで分解しなければならないので、Met105を α -ラクトアルブミン型のIleに改変する必要があった。そこでニワトリリゾチームのcDNAを含むベクター、pkk-1において5'-GAAACGGCATCAACGCGT-3'をプライマーとして部位特異的変異を行った。その後、このベクターをTaqIとMluIで消化し、その結果精製されるエクソン2と3を含む約220bpの断片を電気泳動的に精製した。 α -ラクトアルブミン側としては、pAKTS-19EXをEcoRIで完全に消化してから、TaqIで限定分解して、生成された約380bpの断片を電気泳動的に精製した。また、pAKTS-kkEXをEcoRIとMluIで消化し、その結果精製されるベクター側の約2.5kbの断片を電気泳動的に精製した。この3者を連結して、これをpAKTS-kkEXとした。これにより、Ala31からTrp108までの遺伝子構造をニワトリリゾチームのものに置換することができたが、第2エクソンでコードされる領域はTrp28からである。ただしTrp28、Val29、Cys30はニワトリリゾチームでもヤギ α -ラクトアルブミンでも共通であるので、このベクターにより発現させることのできる改変体はニワトリリゾチームの第2エクソンから第3エクソンまでにコードされる部分の構造を持つことになる。したがって、このpAKTS-kkEXにより α -LA(EX2, 3)を大腸菌で発現させることにした。

4-3 改変体蛋白質の発現と単離精製

作製した発現ベクターを用いて、野生型 α -ラクトアルブミンと同じように大腸菌により改変体蛋白質を発現させた。なお、第5章で述べるように α -ラクトアルブミンの発現系としては大腸菌による方法のほかに酵母を用いた系も確立した。改変体の作製において、この2つの発現系のうち大腸菌による発現系を用いた理由は、酵母による発現では蛋白質は活性型で発現するものの、1残基アミノ酸を置換しただけで、まったく蛋白質が発現しなくなる場合があることが、他の蛋白質（特に、当研究室のニワトリリゾチームにおける変異体の発現）において示されているからである。変異体蛋白質が発現できない場合がある理由は、おそらく構造的に不安定な蛋白質は酵母菌体内で分解されてしまうためであろうと考えられている。ハイブリッド改変体のように多くの置換を導入した場合には、蛋白質全体の構造はかなり不安定になることも予想されたので、酵母では発現されない可能性もありうると考えた。これに対し、大腸菌の発現系では融合蛋白質は菌体内で封入体として沈殿しているため、菌体に分解されることはないと考えられる。

発現ベクターで形質転換した300 mg/lのアmpiシリンを含むL培地で大腸菌JM109を37℃で一夜浸透培養（160 rpm、15 hr以上）してから6000 rpm 10分間集菌し、10 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM EDTAで懸濁した後、これを180 W、10分間超音波破砕した。その後これを6000 rpmで10分間遠心して封入体となっている融合蛋白質を沈殿として回収した。次にこの沈殿を8 M尿素、10 mM Tris-HCl pH 7.5で可溶化し、この緩衝液で平衡化したDEAE-セファロースカラム（23 mm x 150 mm）にチャージした。融合蛋白質は平衡化緩衝液に加えNaClを含んだ緩衝液を用いて、全量200 mlの0 Mから0.5 MまでのNaClの連続濃度勾配によって溶出し、2 mlずつ分画した。そのうち、融合蛋白質を含む画分を集め、これに最終濃度6%となるようにトリクロロ酢酸を加えて、沈殿として融合蛋白質を回収した（図4-10）。

精製した融合蛋白質は、70%ギ酸に溶かして1%の2-メルカプトエタノールを加えてからで臭化シアンを加え、室温で一夜反応させた。これにより α -ラ

クトアルブミン部分が融合蛋白質から分離できるので、10 mM Tris-HCl pH 7.5 に対して透析を繰り返してギ酸や臭化シアンを除いた。このとき、沈澱が生じることもあるが尿素を最終濃度 8 M になるように加えて、再びこれを可溶化し、8 M 尿素、10 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM CaCl_2 で平衡化した DEAE-セファロースカラム (23 mm x 150 mm) にチャージした。その後 α -ラクトアルブミン改変体を平衡化緩衝液に加え NaCl を含んだ緩衝液で、全量 200 ml の 0 M から 0.5 M までの NaCl の連続濃度勾配によって溶出し、2 ml ずつ分画した (図 4-11)。その後、 α -ラクトアルブミン改変体を含む画分を 1 M 尿素、10 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM CaCl_2 に対して透析してからこの緩衝液で平衡化したセファクリル S-200 カラム (体積約 350 ml、流速 2 ml/min) にチャージして、これを 2 ml ずつ分画してさらに精製した (図 4-12)。こうして精製された α -ラクトアルブミン改変体は SDS-電気泳動的に単一の標品にまで精製できた (図 4-13)。ただし、 α -LA (EX 2, 3) (第 2、第 3 エキソンを導入したハイブリッド改変体) においては融合蛋白質の状態と、臭化シアン分解後の 2 度のイオン交換クロマトグラフィーにおける担体として、S-セファロースを用い、その際には緩衝液として 8 M 尿素、30 mM 酢酸ナトリウム pH 5.0 を用いて、NaCl の濃度勾配は 0 M から 0.5 M とした。(カラムの体積や分画方法は同じ)

こうして精製された改変体蛋白質は変性状態なので野生型 α -ラクトアルブミンの場合と同じように、これを活性型蛋白質に巻戻す手段が必要である。野生型や α -ラクトアルブミンの場合にはこの過程にチオレドキシンを過剰量加えることで巻戻しの効率をあげることができた。しかし、チオレドキシンを加えてしまうと、巻戻し反応中の α -ラクトアルブミン改変体の濃度が見積れなくなってしまうこと (α -ラクトアルブミン改変体のいくつかは不安定で、巻戻し操作中に変性、沈澱してしまう。)、巻戻し操作の後にチオレドキシンを除く操作が必要なことなどからこの方法が最もよいとはかぎらない。野生型ニワトリリゾチームにおいては還元、変性状態からの巻戻しがかなり研究されており、これらの方法を参考にして α -ラクトアルブミン改変体の巻戻し条件を検討した^{1,2)}。

その結果、最終的に精製した α -ラクトアルブミン改変体を 8 M 尿素、

25 mM Tris-HCl pH 7.5 の緩衝液中で 50 mM ジチオスレイトール
で室温中、30 分間還元してから、1 M 尿素、25 mM Tris-HCl
pH 7.5、4 mM システイン、0.4 mM シスチンの緩衝液に対して一夜透析す
ることにより徐々に尿素を除き、最後に 50 mM リン酸緩衝液 pH 6.2 に対し
て透析すると、いくつかの改変体においては溶菌活性が見られることがわかった。
また、最後のリン酸緩衝液に対する透析は、比較的長時間行ったほうが高い比活
性が得られることがわかった。

Over night culture of JM109 transformant at 37°C

↓
cells : resuspended with 10mM Tris-HCl pH7.5
1mM EDTA

↓
sonication

↓
ppt : rinse with 10mM Tris-HCl pH7.5
1mM EDTA

↓
resuspend with 10mM Tris-HCl pH7.5
8M Urea

↓
DEAE-Sepharose chromatography

↓
BrCN degradation over night at room temperature

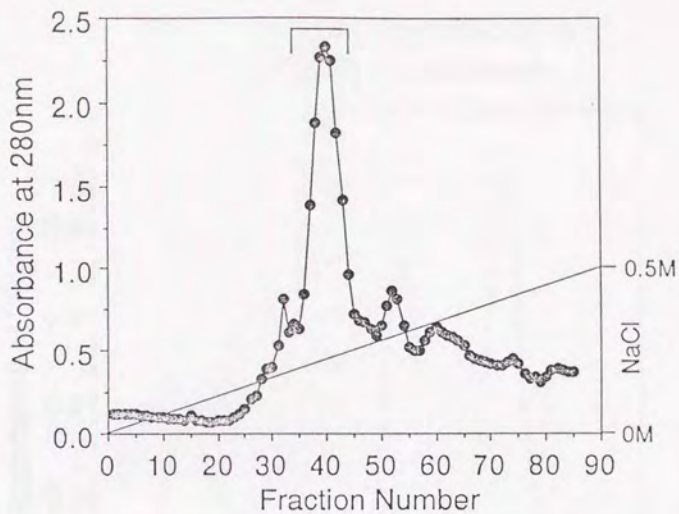
↓
dialysis against 10mM Tris-HCl pH7.5

↓
DEAE-Sepharose chromatography
in 8M Urea

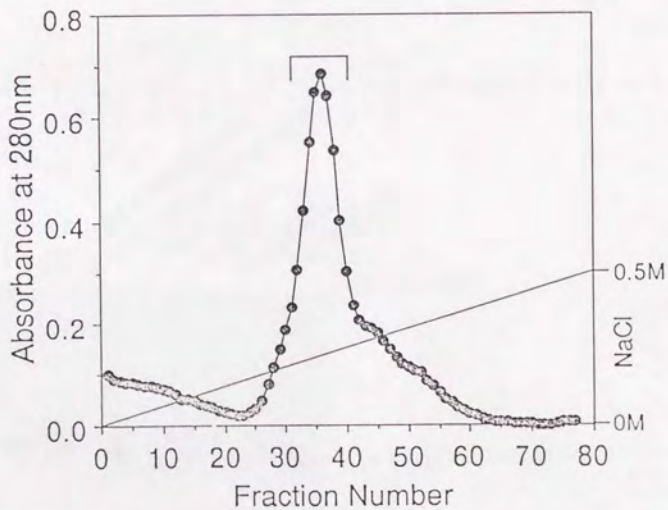
↓
Sephacryl S-200 chromatography
in 1M Urea

↓
purified denatured α -lactalbumin

(図 4 - 9) 改変体蛋白質の精製スキーム

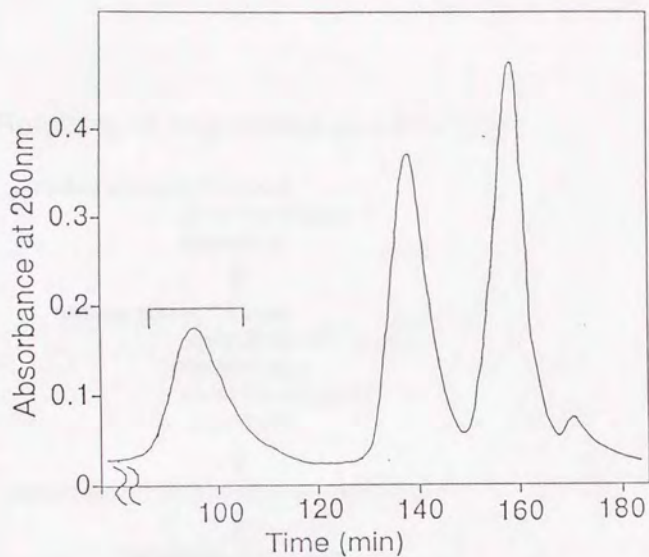


(図 4 - 1 0) α -L A (E X 2) を含む融合蛋白質の
DEAE-セファロースによる精製

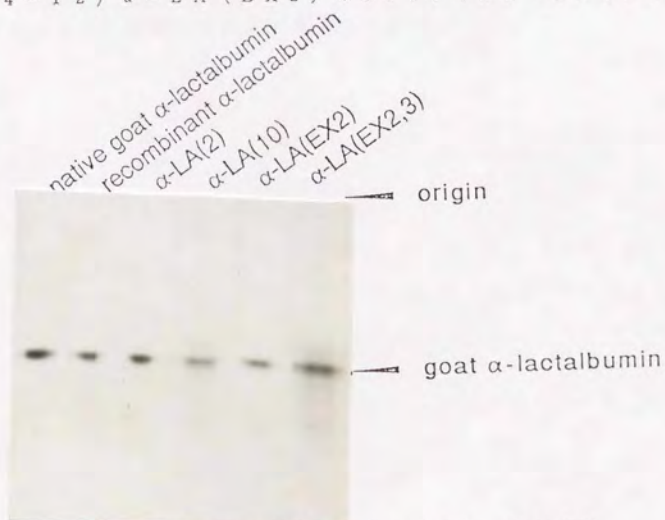


(図 4 - 1 1) α -L A (E X 2) の DEAE-セファロースによる精製

Sephacryl S-200 chromatography
of engineered α -lactalbumin

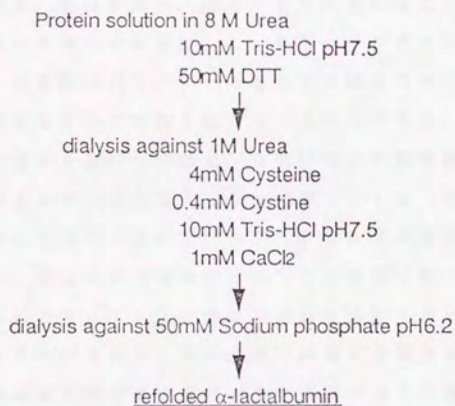


(図 4-1 2) α -LA (EX 2) のセファクリル S-200 による精製



(図 4-1 3) 精製された改変体蛋白質の SDS-電気泳動

Refolding of engineered α -lactalbumin



(図 3 - 1 4) 改変体蛋白質の巻戻しの手順

4-4 改変体蛋白質の性質の検討

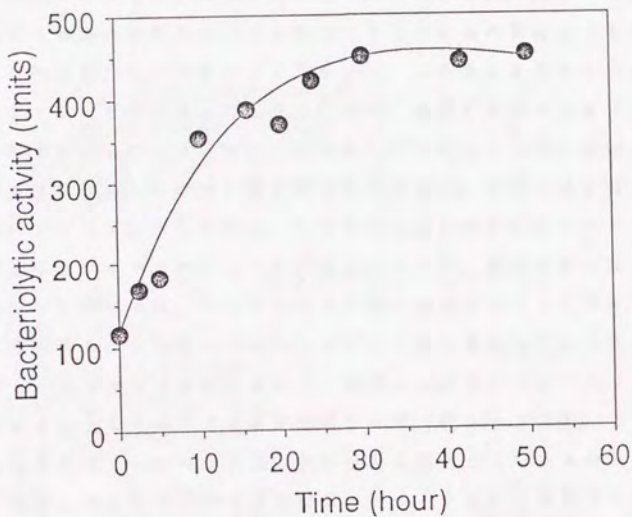
4-4-1 改変体における溶菌活性の発現

それぞれの改変体において、透析の各段階における変性剤の濃度、還元剤の種類や濃度、蛋白質濃度、温度、pHなどに注目して巻戻し条件を検討し、溶菌活性が見られないかを検討した。各種のリゾチーム機能の中で溶菌活性に注目したのは、溶菌活性がリゾチームとしての機能の中で定義的なものであるだけでなく、活性測定も容易で感度も優れているからである。

種々条件を検討した結果、さきに述べた段階的な透析による巻戻し条件下において第2エクソンを導入した改変体 α -L A (EX 2)を精製後、最終的にリン酸緩衝液に対して透析を行うと、わずかではあるが溶菌活性が見られることがわかった。次にこの溶菌活性の発現を経時的に調べたてみると(図4-15)、1M尿素の含まれている状態から透析を開始してから活性がほぼ最高に達するまでに約30時間という、かなり長い時間が必要であった。このことは、こうした改変体蛋白質の折り畳み過程がきわめてゆっくり進行することを示していると思われる。蛋白質の折り畳み過程においてはいろいろな巻戻り状態と変性状態を繰り返しながら最も安定な状態にまで移行して行くと思われるので、実際の透析による塩交換にかかる時間以上に活性の回復が遅れるのであろう。 α -ラクトアルブミンやニワトリリゾチーム以外の蛋白質においても、透析により変性剤を除くことによる巻戻しを行ったときにはこのように長い時間が必要な場合がときどき起こるようである。

また、第2、第3エクソンを導入した改変体 α -L A (EX 2, 3)は、やはりこの条件下で溶菌活性を発現したが、蛋白質濃度が比較的低い濃度でないと変性、沈殿してしまい、この蛋白質はかなり不安定なものであった。また、 α -L A (2)および α -L A (10)は検討した各種巻戻し条件下で有為な溶菌活性を発現することはなかった。

Refolding time course of engineered protein



The lytic activity of each protein was measured on the basis of decrease in turbidity of the *Micrococcus lysodeikticus* cell suspension.

The initial rate of the turbidity decrease at 540nm in 1.0ml of 50mM sodium phosphate buffer (pH6.2) was monitored at 25°C.

(図4-15) α -LA (EX2) における溶菌活性発現のタイムコース

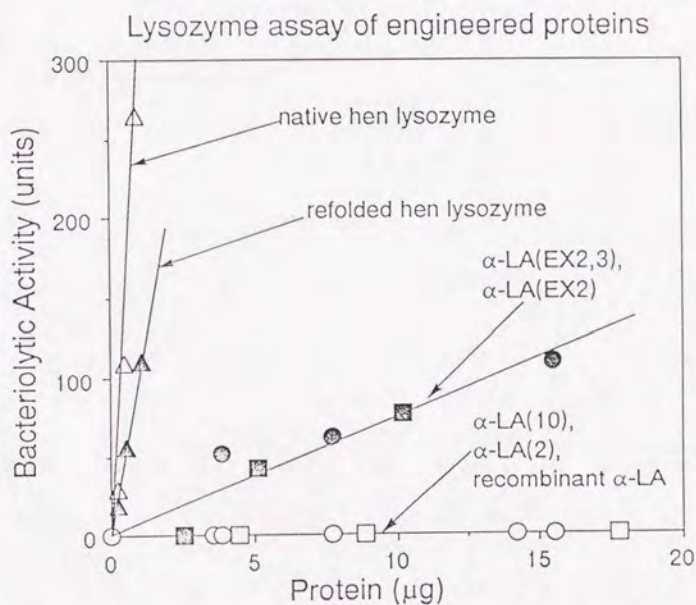
4-4-2 各種変異体蛋白質における溶菌活性の測定

α -L A (EX 2) において溶菌活性の発現が観察されたので、まったく同じ条件下で同時に各改変体について巻戻しを行い、それぞれの溶菌活性を測定した。この場合において、リン酸緩衝液に対して透析を開始してから30時間後溶菌活性を測定した。 α -L A (EX 2) および α -L A (EX 2, 3) における比活性は約2%とかなり低いものであった(図4-16)。実際の測定においては、溶菌活性の測定におけるバックグラウンドはこれらの測定値(540 nmにおける吸光度の減少)の1/4~1/5なので、この値は有為なものといえる。比活性がかなり低いものとなってしまったのは、巻戻しを行った後に活性型蛋白質のみを単離するにいたっていないためであり、2%という比活性はこれらの改変体のもつ活性を評価した場合の最小値と考えられる。巻戻し混合物中の蛋白質の不均一性について検討するために、この巻戻し混合物をC₁₈カラムをもちいた逆相高速液体クロマトグラフィーで分析してみると、改変体蛋白質はブロードなピークとなって溶出され、いろいろな分子種が存在することが予想された。また、巻戻し混合物を50 mMのジチオスレイトールで還元してから分析するとこのピークはもっとシャープなものとなり、巻戻し混合物にはジスルフィド結合の掛かり方がいろいろなものがあると示唆された(図4-17)。したがって、巻戻し混合物中のごく一部の分子種のみが活性を発現しているものと考えた。したがって、巻戻し混合物の中から活性型蛋白質のみをさらに精製できれば、改変体蛋白質の真の比活性が求められるであろう。

また、先にも述べたようにこれらの多くの置換を導入したハイブリッド改変体に対し α -L A (10) では、リゾチームにおける活性触媒残基を導入してあるにもかかわらず、溶菌活性を検出することはできなかった。

また、nativeなニワトリリゾチームを一度変性、還元したものをまったく同じ条件下で巻戻したものは約36%の活性を回復したにとどまった。ニワトリリゾチームの巻戻しにおいては、変性、還元後の巻戻し条件はかなりくわしくわかっている。これらの条件下では80~90%のリゾチームが巻戻すことができ¹²⁾、今回用いた条件は野生型ニワトリリゾチームにとっては満足すべき巻戻し条件ではなかった。しかし、 α -L A (EX 2) や α -L A (EX 2, 3) とい

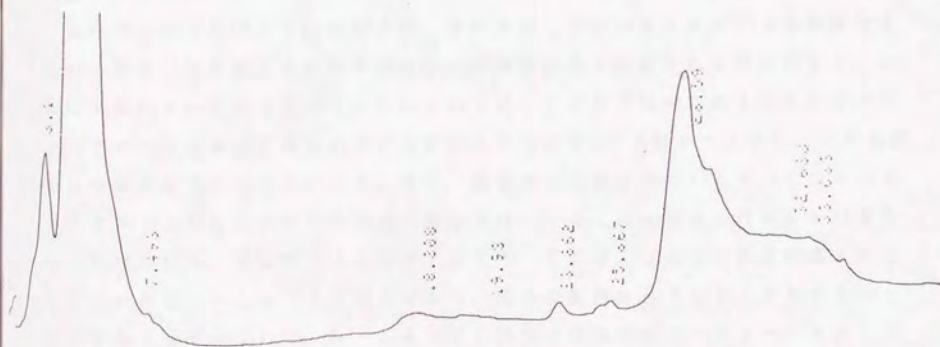
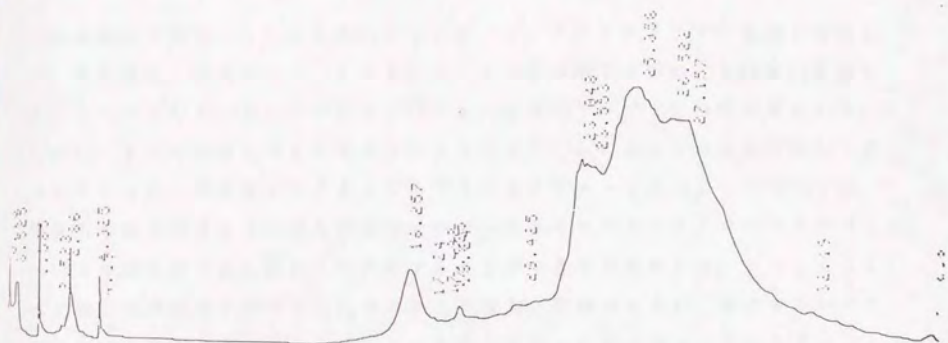
った改変体においては、再現性よく溶菌活性を発現したのはこの条件だけなので、改変体における最適の巻戻し条件は野生型ニワトリリゾチームにとっての最適条件とは異なっていると考えた。またこうしたことは、改変体ごとに最適なこの巻戻し条件が異なることを示していると考えられる。したがって、ニワトリリゾチームをまったく同じ条件下で巻戻した場合の巻戻し混合物が約36%の活性もつことからこれらの改変体の比活性を見積って、5%と考えることもできるが、これが正当な評価となるかどうかは、疑問点が多い。



The lytic activity of each protein was measured on the basis of decrease in turbidity of the *Micrococcus lysodeikticus* cell suspension.

The rate of the turbidity decrease at 540nm in 1.0ml of 50mM sodium phosphate buffer (pH6.2) was monitored at 25°C at three different protein concentrations.

(図4-16) 各種改変体蛋白質の溶菌活性の測定



(図4-17) 巻戻した α -LA (EX2) の逆相系高速液体クロマト
 グラフィーによる分析

上はDTTを加える前、下はDTTを加えた後の結果

下の図で7分以前に溶出されているのはDTTと思われる。

検出は280nmの吸光度により行った。

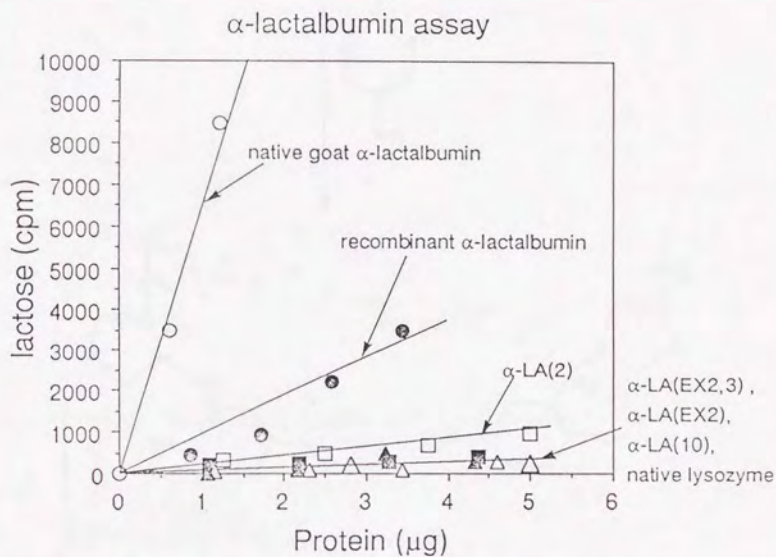
4-4-3 α -ラクトアルブミン活性測定

溶菌活性を測定したおなじ標品について、 α -ラクトアルブミン活性を測定した。その結果、野生型の α -ラクトアルブミンには約12%の、2残基の置換を導入した α -L A (2) では約5%の、 α -ラクトアルブミン活性が見られた。しかし、その他の改変体と天然のニワトリリゾチームにおいては有為な活性は見られなかった。野生型 α -ラクトアルブミンおよび α -L A (2) については、発現系の章で行ったEDTA存在下でのフェニルセファロースクロマトグラフィーにより活性型の蛋白質のみを単離することができると思われる。 α -L A (2) の正確な比活性がどのぐらになるかは興味ある問題であるが、現在までにそれを検討することはできていない。この条件下巻戻した野生型 α -ラクトアルブミンの巻戻し混合物の比活性から、それを見積ると42%となる。しかし、改変体における溶菌活性の見積と同じように、この値の評価はかなり難しいものである(図4-18)。

α -ラクトアルブミンにおいても、その活性、すなわちラクトース合成促進活性に必要な一次構造上の部位の解析が化学修飾により検討された報告がある。これによると α -ラクトアルブミンにおいてHis 34が化学修飾されると α -ラクトアルブミン活性が失われることが知られており¹²⁾(図4-19)、この部位が活性に重要と考えられている。また、現在までに知られているすべての α -ラクトアルブミンにおいてこの部位が保存されていることからこのHisの重要性が示唆される。改変体の1次構造をみると、このHis 34に置換が導入されていないのは α -L A (2)のみであり、他の改変体はHis 34 Pheという置換が起こっているため、 α -L A (2)以外の改変体において α -ラクトアルブミン活性が失われてしまった原因がこの部位の置換にあると考えることができよう。

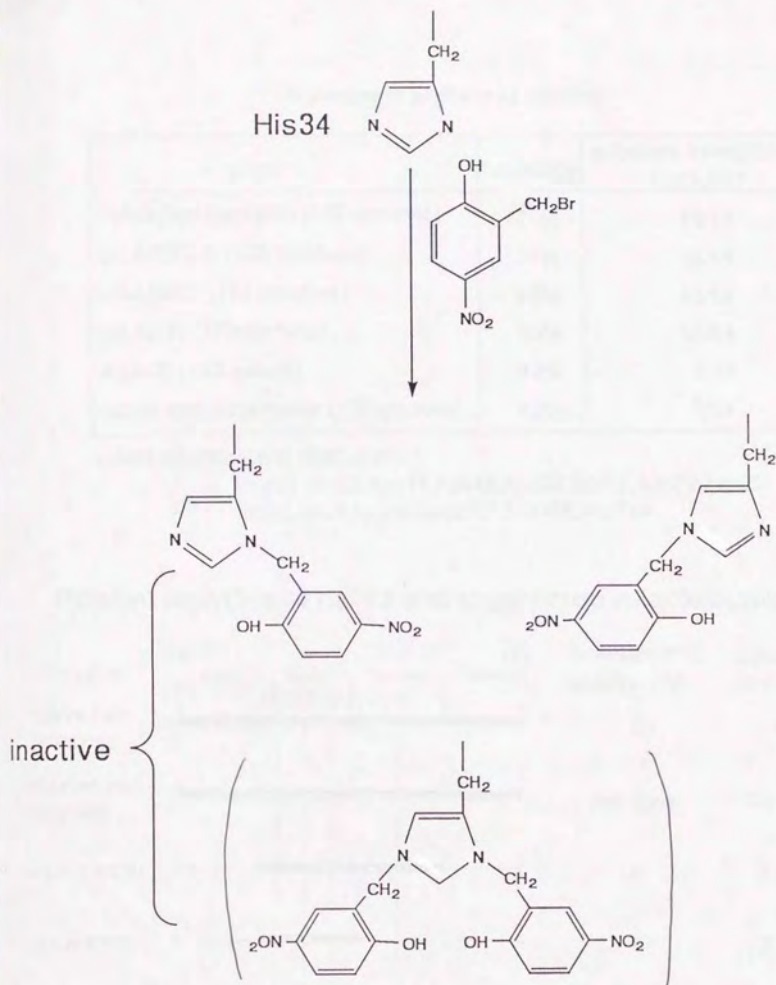
α -L A (2) においては各種の α -ラクトアルブミンが完全に保存しているTyr 107がAlaに改変されてしまっているが、それでもわずかではあるが α -ラクトアルブミン活性を保持していることから、このTyr 107は α -ラクトアルブミン活性においては本質的な残基ではないことがわかった。なぜ、このTyrが α -ラクトアルブミンにおいて保存されている残基であるかは、興味

ある問題である。



The lactose synthase assay was performed with UDP-(¹⁴C)galactose and 0.001 units galactosyltransferase at several protein concentrations at 37°C, 10 min.

(図 4 - 1 8) 各種改変体蛋白質における α-ラクトアルブミン活性の測定



(図 4 - 1 9) α -ラクトアルブミンの化学修飾による His 3 4
の役割の検討の結果

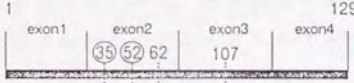

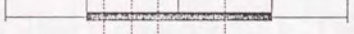
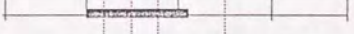
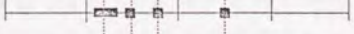
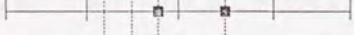
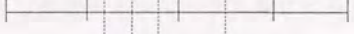
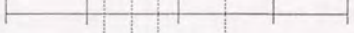
Summary of engineered proteins

proteins	homology	substrate interaction residues*
native hen lysozyme (129 residues)	100%	14/14
α -LA(EX2,3) (125 residues)	74%	13/14
α -LA(EX2) (124 residues)	66%	13/14
α -LA(10) (123residues)	50%	13/14
α -LA(2) (123residues)	43%	9/14
native goat lactalbumin (123residues)	42%	7/14

substrate interaction residues* :

Phe34, Glu35, Asn37, Asn46, Asp52, Gln57, Asn59, Trp62,
Trp63, Ile98, Asp101, Ala107, Trp108, Arg114

Relative activities of native and engineered α -lactalbumins

Proteins	1 exon1 exon2 exon3 exon4 129	α -lactalbumin activity (%)	Lysozyme activity (%)
native hen lysozyme		0	100
refolded hen lysozyme		not done	36 (100)
α -LA(EX2,3)		0	2 (5)
α -LA(EX2)		0	2 (5)
α -LA(10)		0	0
α -LA(2)		5 (41)	0
recombinant goat α -lactalbumin		12 (100)	0
native goat α -lactalbumin		100	0

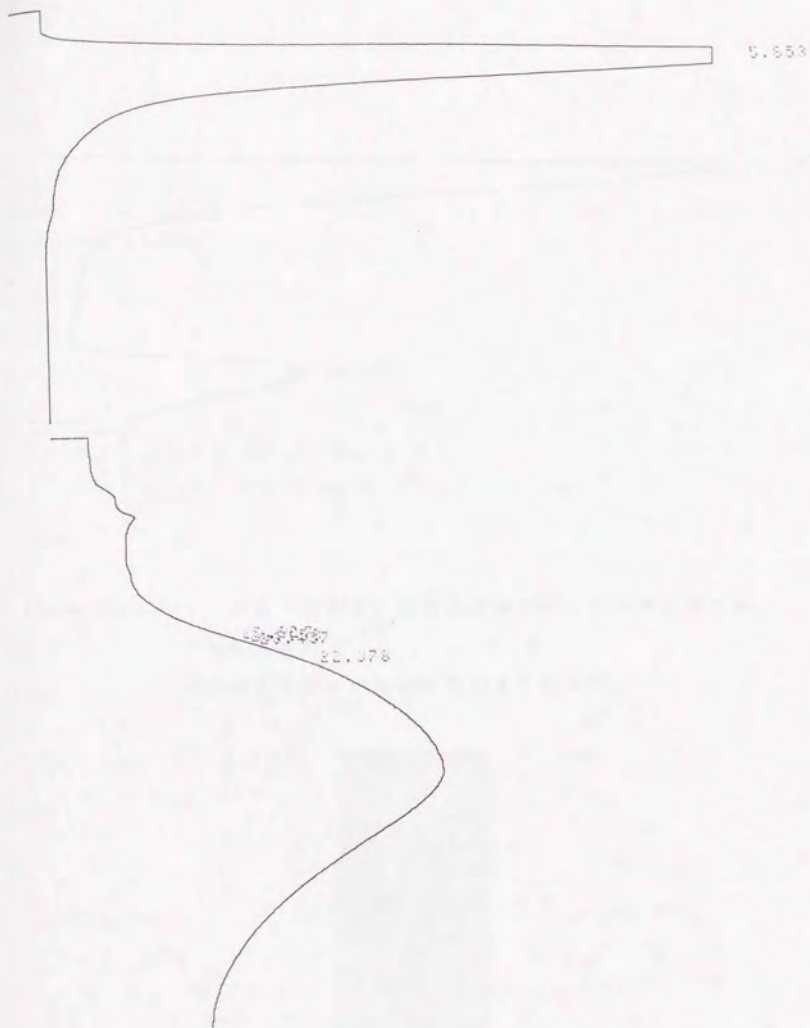
4-4-4 アフィニティークロマトグラフィーによる活性型改変体蛋白質精製の試み

活性測定の前で述べたように、改変体における活性型蛋白質の精製は改変体蛋白質のもつ正確な比活性を検討するためにぜひとも解決しなければならない問題である。 α -L A (2) については α -ラクトアルブミン活性を保持しているため、野生型 α -ラクトアルブミンの場合と同様に、EDTA存在下でのフェニルセファロースクロマトグラフィーによりこの問題が解決できる可能性がある。また、 α -L A (EX2)、 α -L A (EX2, 3) においては、リゾチーム活性をわずかながら持つことを応用し、リゾチームの基質を利用したアフィニティークロマトグラフィーを作製すれば、この問題を解決できるだろうと考えた。

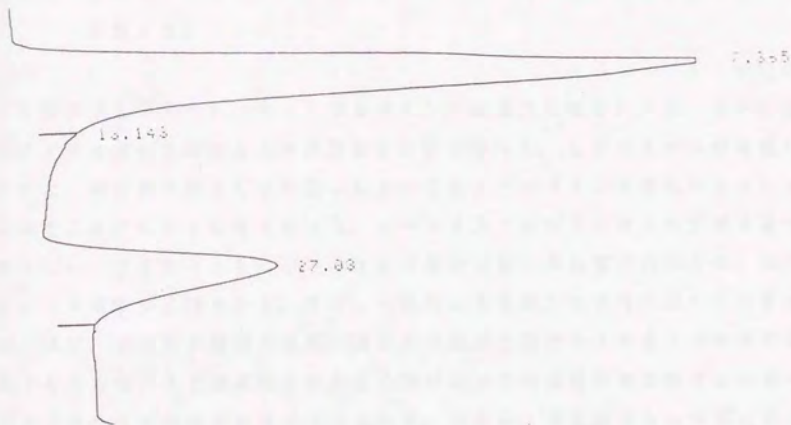
このような目的におけるアフィニティークロマトグラフィーとして、ニワトリリゾチームの基質であるキチンをセライトに吸着させた担体を作製した¹²⁾。まず、キチン粉末を4.2% NaOHに懸濁し、30℃、3時間放置した。この懸濁液を濾過してから、沈澱を3.5倍量の粉碎氷片と乳鉢中で混合し、乳棒で押し付けるようによく練り合わせた。懸濁状態のキチンが透明になってきたところで、14% NaOHで希釈し、遠心してこのアルカリ処理したキチンを沈澱として回収した。こうして調製したアルカリ処理キチンと、100メッシュのふるいを通して粒子径をそろえたセライトを1:2の重量比で混合し、よく練り合わせた。これをデカンテーションを繰り返して、蒸留水でよく洗浄して、4℃で保存した。このキチン-セライトの担体を高速液体クロマトグラフィー用のカラムにつめてから、1M酢酸で十分に洗浄し、0.1M酢酸ナトリウム(pH 5.5)、0.5M NaClで平衡化した。なお、このアフィニティークロマトグラフィーは基質を担体としているため、加水分解反応が起きてキチン分解されてしまうとカラムの性能が変化してしまう。これを防ぐため、加水分解反応がカラム内で起こらないように以下の実験はカラムの温度を0~4℃まで冷却して行った。

こうして作製したキチンの吸着した担体を持ちいて、改変体蛋白質の分析を行った。分析条件は0.1M酢酸ナトリウム(pH 5.5)、0.5M NaClで平衡化した後、1M酢酸が0から100%になるような連続的な濃度勾配を60分間で行き、流速は0.5 ml/minとした。この条件下でヤギ α -ラクトアルブ

ミンを分析するとヤギ α -ラクトアルブミンは5分ほどの位置に溶出され、非吸着画分に回収された。これに対し、ニワトリリゾチームは40分ほどにブロードなピークとなって溶出され、吸着画分に回収された(図4-20)。また、この吸着画分からは溶菌活性が確認できた。このようにして、作製した担体がリゾチームに対するアフィニティークロマトグラフィーとして使用できることが確認できた。さらに、 α -L A (EX2) を巻戻した後、同様の分析を行うと、多くの蛋白質が非吸着画分に回収されたが、ごく一部の蛋白質は吸着画分に回収することができた(図4-21)。この吸着画分をSDS-電気泳動により分析すると、確かにこの吸着画分に α -L A (EX2) が存在することが確認できたので、この吸着画分こそが正確に巻戻った溶菌活性をもつ活性型 α -L A (EX2) であると判断した(図4-22)。しかしながら、この画分からは溶菌活性は回収されず、50 mMリン酸緩衝液 pH 6.2 に対してこれを透析すると蛋白質は沈澱してしまった。これは、 α -L A (EX2) がニワトリリゾチームほど安定でないため、この担体に吸着したものを溶出させるために酸性条件下にすると α -L A (EX2) が変性してしまうためと考えられた。また、この分析において吸着画分に回収された蛋白質量は、分析を行った蛋白質の約2%になるので、分析を行う前の巻戻し混合物の溶菌活性がニワトリリゾチームの約2%であったこととあわせて考えると、正確に巻戻ることができた活性型 α -L A (EX2) の溶菌活性はかなり高いものと考えられる。しかしながら、この分析では溶出条件が適切ではなく溶出において改変体に変性してしまうため、 α -L A (EX2) の正確な比活性は求めることができなかった。



(図 4 - 2 0) ヤギ α - ラクトアルブミンとニワトリリゾチームの
 アフィニティークロマトグラフィーにおける挙動
 上がヤギ α - ラクトアルブミン
 下がニワトリリゾチーム



(図 4-2 1) α -LA (EX 2) のアフィニティークロマトグラフィー
における挙動

検出は 280 nm の吸光度により行った。



(図 4-2 2) α -LA (EX 2) におけるアフィニティークロマトグラフィー
吸着画分の SDS-電気泳動による分析

右から吸着画分と野生型 α -ラクトアルブミン

第5章 酵母におけるヤギ α -ラクトアルブミンの発現と発現産物の性質の検討¹⁾

大腸菌によるヤギ α -ラクトアルブミンの発現系の確立により、 α -ラクトアルブミンにおいて蛋白質工学的研究が可能になった。しかしながら野生型においてさえ、融合蛋白質として発現した α -ラクトアルブミンを活性をもったものに巻戻すことがかなり困難であった。 α -ラクトアルブミンはこれまでも述べてきたように、分子量のわりにジスルフィド結合が多い蛋白質であるので、この過程はかなり微妙な操作となる。また、一般的にも巻戻しの操作においては蛋白質濃度、温度、変性剤の種類や濃度、還元剤の種類や濃度などの多くの条件が関与すると考えられ、また改変体を作製した際にこれらの条件が改変体ごとにおいてそれぞれ異なる可能性があると考えられる。さらに、活性型となった蛋白質のみを精製する方法も難しい問題である。エクソン単位でヤギ α -ラクトアルブミンとニワトリリゾチームを組換えた例においても活性がみられたものの、それが極めて低いものしか得られなかったのは、活性型のみを精製するためのアフィニティークロマトグラフィーが開発できなかったことにもよると考えている。

ニワトリリゾチームにおいては大腸菌菌体内で不溶性顆粒として発現したものを70%程度まで巻戻すことができる条件が開発されているが²⁾、蛋白質工学の実験は、そのほとんどすべてが酵母によって活性型として発現した蛋白質においてなされている。

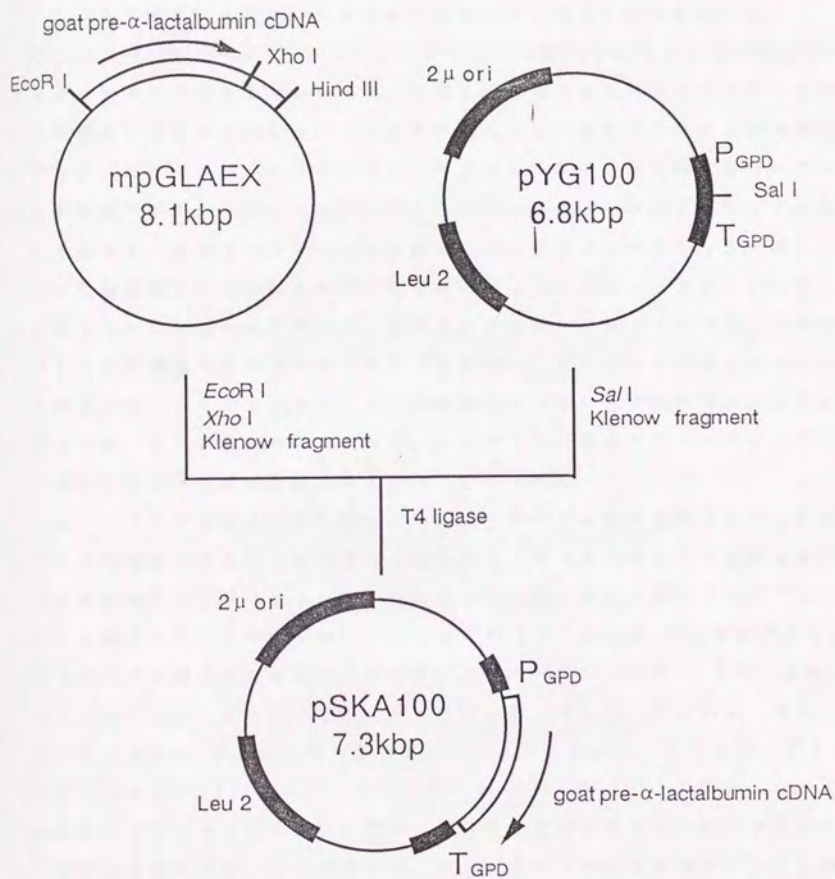
以上のことから、 α -ラクトアルブミンを活性型として発現させることのできる発現系を構築することが今後の実験に極めて重要なことと考えた。このような発現系としては α -ラクトアルブミンとよく似たニワトリリゾチームにおいて成功している酵母を宿主とした系が適当と考え、実験を行った。

5-1 酵母におけるヤギ α -ラクトアルブミン発現ベクターの構築

まず最初にニワトリリゾチームとまったく同じ発現系を検討した。すなわち、宿主酵母菌としてはロイシン要求性である *Saccharomyces Cerevisiae* AH 22 (a, leu2, his4, can1) を用い、発現ベクターとしては pYG100 を用いた。こ

の発現ベクターは大腸菌のため遺伝子マーカーとしてアンピシリン耐性遺伝子を、酵母のための遺伝子マーカーとしてLeu2遺伝子を、さらに酵母における増殖の安定化のために酵母のプラスミドである2 μ mプラスミドDNAの複製開始点をそれぞれ組み込んであるシャトルベクターである。また、外来遺伝子の発現のために、酵母の糖代謝系の酵素であるグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼのプロモーターとターミネーターを含んでいる³⁾。

pYG100においては、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼのプロモーターとターミネーターのあいだにSalIの切断部位があるので、この部位にヤギ α -ラクトアルブミン前駆体のcDNAを組み込むこととした(図5-1)。しかしながら大腸菌における発現の場合と同様、cDNAの非翻訳領域は α -ラクトアルブミンの発現に悪影響をあたえる可能性があるため、cDNAにおける3'側非翻訳領域の約2/3を、大腸菌の発現の場合と同じようにRsaIの切断部位に挿入したXhoI切断部位を利用して取り除くこととした。また、5'側においてはすべての非翻訳領域を取り除くために α -ラクトアルブミン前駆体の翻訳開始コドンであるATGの前にEcoRI切断部位を22merの合成DNA 5'-GACATCATGAATTCTACCCCGG-3'を用いた部位特異的変異により導入した。このようにして調製したcDNAを含むベクターをEcoRI、XhoIで消化した後、平滑末端としてから、 α -ラクトアルブミン前駆体cDNA部分を電気泳動的に単離した。最後に単離したヤギ α -ラクトアルブミン前駆体のcDNAとpYG100をSalIで消化してから平滑末端とした両者をT4DNAリガーゼで連結したもので大腸菌JM109を形質転換し、得られたコロニーの中から正しい方向に α -ラクトアルブミンcDNAが組み込まれたプラスミドを選択し、pSKA100とした。



(図 5 - 1) 酵母におけるヤギα-ラクトアルブミンの発現ベクターの構築

5-2 ヤギ α -ラクトアルブミンの酵母による発現と精製

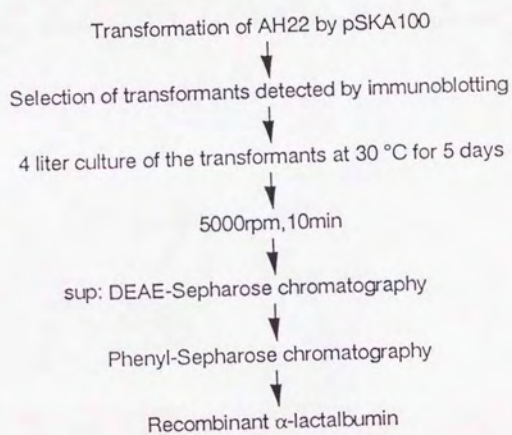
こうして得られた発現ベクター pSKA100 により形質転換した *Saccharomyces cerevisiae* AH22 を 2 ml の最小培地である YMM 培地 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の His を含む) で 30°C で 2 晩培養すると、いくつかのコロニーから培養した培養液上清からは、ウサギの抗ウシ α -ラクトアルブミン抗体によるイムノブロッティングによりヤギ α -ラクトアルブミンが分泌生産されていることが確認できた。しかしながら、多くのコロニーは α -ラクトアルブミンを分泌しておらず、分泌するコロニーは全体の 10% ほどでしかなかった。同じベクターで形質転換しているにもかかわらず多くのコロニーが α -ラクトアルブミンを分泌していない理由は不明だが、酵母における α -ラクトアルブミンの発現は、なんらかの理由で不安定であるのかもしれない。またイムノブロッティングによる解析では、ペリプラズム画分および細胞質中にはいずれのコロニーにも α -ラクトアルブミンは検出されなかった。したがって、発現した α -ラクトアルブミンのほとんどすべてが分泌されていると考えられた。

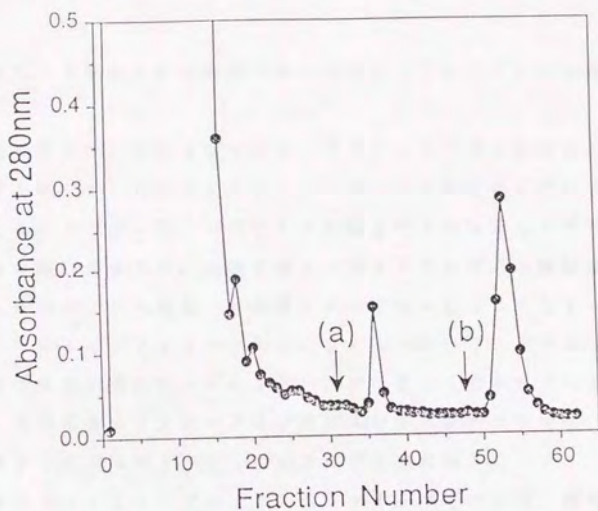
α -ラクトアルブミンを分泌していることがわかった培養液はさらに 50 ml の YMM 培地でさらに 2 晩培養し、最後に 2 l の YPD 培地で 5 日間培養した。この培養液を 5000 rpm で 5 分間遠心した後、その上清をミリポアフィルターで濾過して、これに 1 M Tris-HCl pH 8.0 を最終濃度 50 mM になるように加えてから 50 mM Tris-HCl pH 7.5 で平衡化した DEAE-セファロースカラムにチャージした。その後、50 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM EDTA でカラムを洗浄し、50 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM EDTA、0.5 M NaCl で溶出した。この溶出画分のうち 280 nm の吸光度から蛋白質を含むと思われる画分を集めた。この画分は培地中のほとんどの蛋白質、および培地中の色素を含んでいるものの SDS-電気泳動による分析で α -ラクトアルブミンが存在することが確認できた。

この溶出画分を 50 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM EDTA で平衡化したフェニルセファロースカラムにチャージした。その後、平衡化に使用した緩衝液でカラムを洗浄してから 50 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM CaCl₂ で溶出し、それにつづいて蒸留水で溶出した。すべての画分につ

いて SDS-電気泳動による分析を行ったところ、CaCl₂で溶出した画分には α-ラクトアルブミンのみが存在していた。このようにして、組換え体 α-ラクトアルブミンを電気泳動的に単一なものにまで精製することができた。なお、最終的な精製標品の収量は約 50 μg / l であり、残念ながら発現量はかなり低いものであった (図 5-2)。

Purification of recombinant α-lactalbumin





(1) (2) (3) (4)



(図 5-2) フェニルセファロースクロマトグラフィーによる
組換え体 α -ラクトアルブミンの精製とその SDS-電気泳動
(a) の画分から CaCl_2 を含む緩衝液で溶出し、
(b) の画分から H_2O で溶出した。

電気泳動は 1) 非吸着画分

2) CaCl_2 による溶出画分

3) H_2O による溶出画分

4) ヤギ α -ラクトアルブミン

今回の発現に用いたcDNAはヤギ α -ラクトアルブミン前駆体のものであるから、シグナルペプチドはヤギ α -ラクトアルブミンのものをそのまま用いている。そこで、このヤギのシグナルペプチドが酵母によって正しくプロセスされているかどうかを確認するため、組換え体 α -ラクトアルブミン精製標品のアミノ酸配列分析を行った。その結果、N末端よりGlu-Gln-Leu-Ther-Lys-()-Glu-Val-Phe-Gln-という、ヤギのものから期待されとうりの配列が得られ、プロセッシングは正しく行われていることがわかった。なお、6残基目にPTH-アミノ酸が回収されなかったのは、この部位のCysがジスルフィド結合をつくっているためと思われる。

また、このヤギ α -ラクトアルブミンのシグナルペプチドは、酵母由来の分泌性蛋白質が本来持っているシグナルペプチドや、酵母においてやはり正しくプロセスされることが知られているニワトリリゾチームのものなどくらべてもほとんど相同性が見られず、この結果は興味深いものである(図5-3)。おそらく酵母のシグナブペプチダーゼはかなり広い認識能力を持っているのであろう。なお、菌体内およびペリプラズム画分からはイムノプロットイングにより α -ラクトアルブミンが検出できなかつたことから、 α -ラクトアルブミンの分泌発現量の低さがシグナルペプチドの構造によるものとはいえないであろう。すなわち、ヤギ α -ラクトアルブミンの発現の場合には、菌体内やペリプラズム画分に α -ラクトアルブミンが残っていないので、シグナルペプチドがヤギのものであるために分泌効率が悪いのではなく、それ以前の前駆体自身の発現量が少ないものと考えられる。なお、ニワトリリゾチームなどの酵母における発現の場合には、酵母菌体内やペリプラズム画分に前駆体または成熟型の蛋白質の一部が分泌されずに残っている。分泌効率を上げることによりこうした蛋白質を分泌させることができれば、発現量を増やすことができる。こうした観点からシグナブペプチドを改変させた実験例がいくつかあるが、発現量を増加させることに成功した例は少なく、分泌効率を上げる試みは困難な問題と思われる。

α -1	MRFPSIFTAVLFAASSALA	A
SUC2	MLLQAFLLLAGFAAKISA	S
SUC7	MLLQAFNPLLAGFAAKISA	L
goat α -lactalbumin	MMSFVSLLLVGILFHATQA	E
cheken lysozyme	MRSLLILVLCFLPLAALG	K

(図 5-3) 酵母で認識されることがわかっているシグナルペプチドの比較

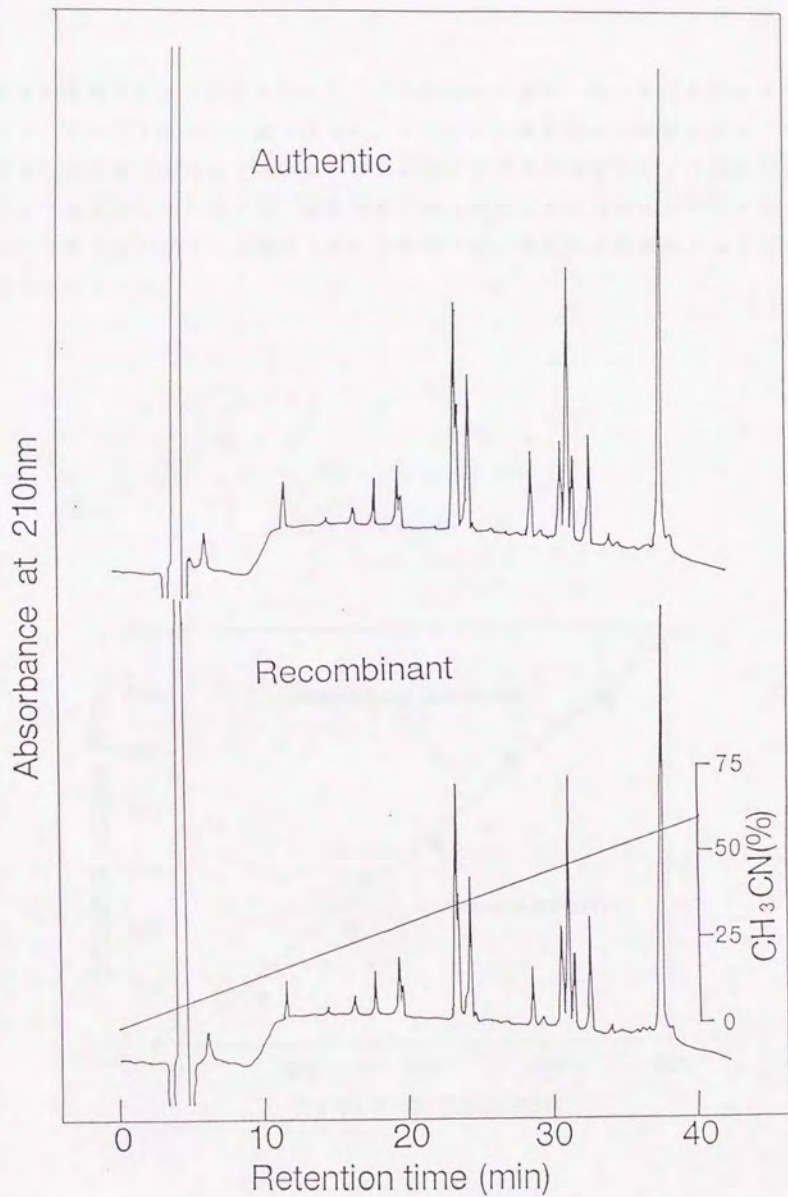
さらに、ヤギ α -ラクトアルブミンには一次構造上に45番目からAsn-A
sp-Thr-という構造があり、糖鎖がN-グリコシド結合により結合するこ
とのできる構造を持っている。実際にこの部分には、ウシの α -ラクトアルブミ
ンの場合では一部の物に糖鎖が結合していることが知られている⁴⁾。そこで酵母
によって産成された組換え体 α -ラクトアルブミンの翻訳後修飾の有無を検討し
た。6N定沸点塩酸、1%フェノール存在下で、110℃、24時間加水分解し
た後、アミノ酸組成分析を行うと、ヤギのものとはほぼ同じ結果となりアミノ種も
検出されなかった(図5-4)。さらに、HPLCによる一次元ペプチドマップ
により、ヤギのものと組換え体との比較をおこなった。まず、ジスルフィド結合
の交換を防ぐためシステインの還元カルボキシメチル化をおこなった⁵⁾。

10 nmole の α -ラクトアルブミンを8M尿素で変性させて、含まれるシ
ステインの100倍量の2-メルカプトエタノールを加え室温で2時間還元した。
その後、やはりシステインの100倍量の1Mモノヨード酢酸/1M水酸化ナトリ
ウム溶液を加えてシステインをカルボキシメチル化した。反応開始1時間後に2
-メルカプトエタノールの原液を加えて反応を停止させ、ただちに10 mM
Tris-HCl pH 8.0の緩衝液に対して透析した。なお、このカルボキシ
メチル化から透析までの過程は蛋白質のヨウ素による修飾を防ぐために、すべて
遮光して行った。こうして得られた還元カルボキシメチル化 α -ラクトアルブミ
ンを2M尿素、10 mM Tris-HCl pH 8.0の緩衝液中で、重量比で
1/100のリシルエンドペプチダーゼを加えることにより、37℃、6時間消
化した。これによりリジン残基のC末端側で切断されたジスルフィド結合をもた
ない α -ラクトアルブミンの分解物が得られたことになるので、このペプチド混
合物をC₁₈カラムを用いた逆相系HPLCにより分離した。このペプチド混合物
の分離パターンは天然のヤギ α -ラクトアルブミンのものとまったく同一であり、
糖鎖の付加といった翻訳後の修飾は起こっていないことがわかった(図5-6)。

アミノ酸	native	recombinant	期待値
Asp	21.6	22.8	22
Thr	5.6	5.6	6
Ser	4.8	5.0	6
Glu	13.3	13.4	13
Pro	1.8	1.7	2
Gly	5.3	5.6	5
Ala	5.1	5.2	5
Cys	0.4	0.1	8
Val	5.7	5.7	6
Met	0.1	n.d.	0
Ile	7.3	7.3	8
Leu	<u>13</u>	<u>13</u>	13
Tyr	3.9	3.8	4
Phe	3.9	4.3	4
His	4.0	5.4	3
Lys	12.4	12.6	13
Trp	n.d.	n.d.	4
Arg	1.0	1.1	1

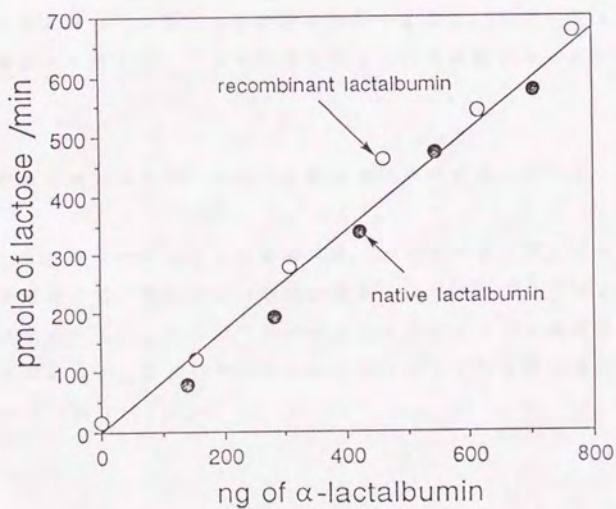
(図5-4) 酵母で発現させた組換え体 α -ラクトアルブミンのアミノ酸分析

Leuを13個とした時の相対値で表した。



(図 5-5) 酵母で発現させた組換え体 α -ラクトアルブミンの
一次元ペプチドマップ

最後に組換え体 α -ラクトアルブミンの比活性を測定した。活性の測定はラジオアイソトープを用いた方法で行った。これにより精製された組換え体 α -ラクトアルブミンは天然の物とほとんど同じ活性をもつことがわかった(図5-6)。こうして発現量は低いながら、構造的にも機能的にも天然の物とまったく同じヤギ α -ラクトアルブミンを酵母を用いて発現させ、さらに単離精製することができるようになった。



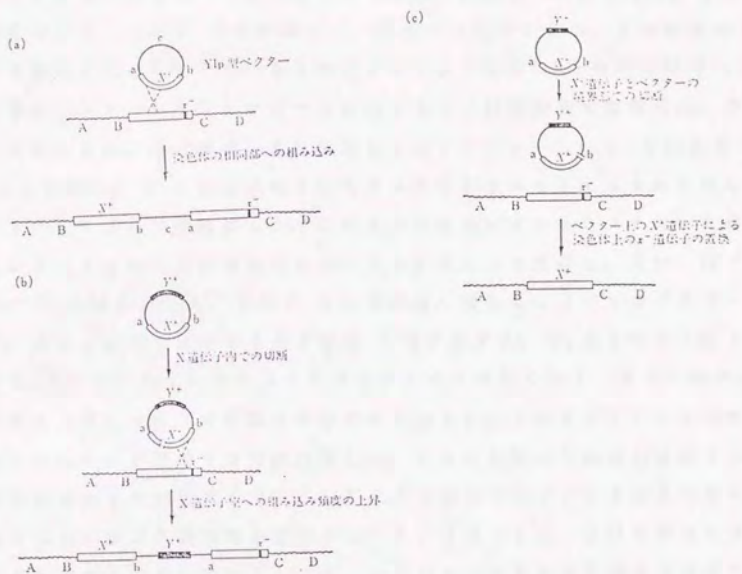
(図5-6) 酵母で発現させた組換え体 α -ラクトアルブミンの活性測定

第6章 酵母における大量発現系構築の試み

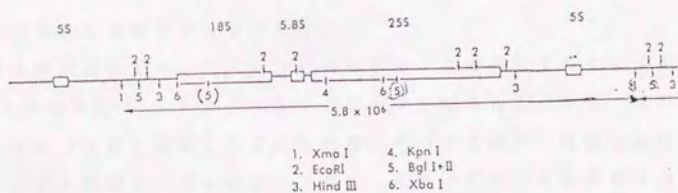
酵母において活性型の α -ラクトアルブミンを分泌発現させることができたがその発現量はまったく同じ系を用いたニワトリリゾチームの場合の1/10にすぎなかった。この程度の発現量では十分な蛋白質工学的実験および考察をすることができないと考え、発現量を増加させることを試みた。発現量の増加はある程度培養条件の検討により可能であるとされているが、精密に培養条件を検討していくことは培養設備の関係からかなり困難なことと考え、ベクター系を検討することとした。また、宿主酵母(AH22)-発現ベクター(pYG100)においてはニワトリリゾチームにおいて、その5'側非翻訳領域の改変、またはシグナルペプチドの改変といった発現量増加の試みがなされているが、きわだった増加は観察されていない。そこでプラスミド型のベクターであるpYG100をゲノム挿入型ベクターに改造することにより、発現量の増加をねらった。ゲノムDNA上における挿入部位は、コピー数が格段に多く、発現も効率的に行われているリボソームRNA(rRNA)構造遺伝子中とした。すでに5S-rRNA部位に外来遺伝子を挿入し、それを発現させたという報告があったのでこれを参考とした¹⁾。

6-1 酵母における5S-rRNA構造遺伝子のクローニング

ベクターをゲノム内に挿入する場合には、ベクター上に挿入させる部分と相同的な配列を用意して、菌体内で相同的組換えを起こさせることによる方法が一般的である(図6-1)。そこでベクター上に5S-rRNA構造遺伝子そのものを配置することとし、最初にそれに必要な5S-rRNA構造遺伝子のクローニングを行った(図6-2)。



(図 6-1) 酵母菌体内における相同組換えによる外来遺伝子のゲノム中への挿入 (文献 2 より)



(図 6-2) 酵母における rRNA 構造遺伝子の構造 (文献 3 より)

まず、酵母のゲノムDNAを精製した⁴⁾。YPD培地で酵母菌AH22を培養し、これを3000rpm、5分間遠心して菌体を沈澱として回収した。菌体を50mMEDTA pH7.5で懸濁して、再度3000rpm、5分間遠心することにより菌体を洗浄してから、50mMEDTA pH9.0に再度懸濁して、1/45量の2-メルカプトエタノールを加えて15分間室温で放置した。その後、3000rpm、5分間遠心した沈澱を1Mソルビトール、0.1MEDTA pH7.5に懸濁し、0.1mg/mlになるようにZymolyase6000を加え、37℃で90分間放置した。これにより酵母はスフェロプラストになるので、4000rpm、5分間遠心してこれを沈澱として回収し、再び1Mソルビトール、0.1MEDTA pH7.5に懸濁後、遠心してスフェロプラストを洗浄した。次にこのスフェロプラストを0.1MEDTA、0.15MNaClに懸濁して0.1mg/mlになるようにプロテイナーゼKを加え、さらに最終濃度で1%になるようにラウリル硫酸ナトリウムを加えた。これを37℃で3時間放置してからさらに60℃で30分間放置した。こうした操作で細胞は破壊され、DNAが放出されるので室温まで冷やしてから水飽和フェノールを加えてゆるやかに混合することにより蛋白質を変性させ、3000rpm、20分間遠心することにより水相中に核酸を回収した。ゲノムDNAは巨大な分子構造を持つため、物理的破壊に弱い。ゲノムDNAを切断しないように注意しながらこの水相を分取してここに冷エタノールを加えてゆくとゲノムDNAが沈澱してくるので、これをガラス棒でまきとることにより回収した。これをガラス棒ごと10mM Tris-HCl pH7.5、1mMEDTAにつけておくと、ゲノムDNAが溶けたのでこれを精製ゲノム溶液とした。

rRNA構造遺伝子は、ゲノムDNAをBglIIで消化することにより、約4.4kbpと約4.5kbpの2つの断片に分離されるので³⁾、精製したゲノムDNAをBglIIで消化し、この分子量に相当する部分を電気泳動的に精製した。このDNA断片を、BamHIで消化したpUC18とT4DNAリガーゼを用いて連結し、rRNA構造遺伝子を含むであろうDNAライブラリーを作製した。

こうして作製したDNAライブラリーで大腸菌JM109を形質転換し、生じたコロニーに対してコロニーハイブリダイゼーションを行うことにより、酵母

rRNA構造遺伝子を含んだpUC18をもつ菌体を選択した。コロニーハイブリダイゼーションにおけるプローブとしては酵母5S-rRNAの構造の一部と同じ塩基配列をもつ合成DNA 5'-AGAAAGCACCGTTTCCCGTC-3'を合成し⁵⁾、これを³²Pで標識することにより使用した。この菌体からプラスミドを調製すると、確かに約4.5kbpの断片が挿入されており、さらにDNAの塩基配列を確認すると酵母5S-rRNAと同じ配列をもつことがわかった。こうして得られた、酵母5S-rRNA構造遺伝子をもつプラスミドをpSRN101とした。酵母ゲノム中にはrRNA構造遺伝子が約600コピー存在するので⁶⁾、目的の遺伝子は比較的簡単にクロニングできた。

また、このクロニングされたDNA断片をもちいてゲノム挿入型ベクターを構築するうえで、pUC18上のマルチクロニングサイトのSmaI切断部位がじゃまになること、またEcoRI切断部位近傍にXhoI切断部位が存在すると便利なことから、以下のような操作を行った。pSRN101をKpnIで切断し、その後T4DNAポリメラーゼを用いて平滑末端とした。さらにこれにXhoIリンカーを連結、挿入した。pUC18のマルチクロニングサイトにおいてKpnI切断部位とSmaI切断部位は一部重複しているため、これによりKpnIおよびSmaI切断部位は消失する。また、XhoIリンカーの挿入により新たにXhoI切断部位が導入できた。こうして作製されたベクターをpSRN101Xとした。

6-2 ゲノム挿入型発現ベクターの構築

pYG100には、このベクターがプラスミドとして安定に存在できるように酵母由来の2 μ プラスミドにおける複製開始点が挿入されている。したがって、このままではプラスミドとしての状態がかなり安定であり、ゲノム内にベクターが挿入型されることが予想されたので、複製開始点周辺を除去し、同時に相互組換えに必要な5S-rRNA構造遺伝子を導入することとした。

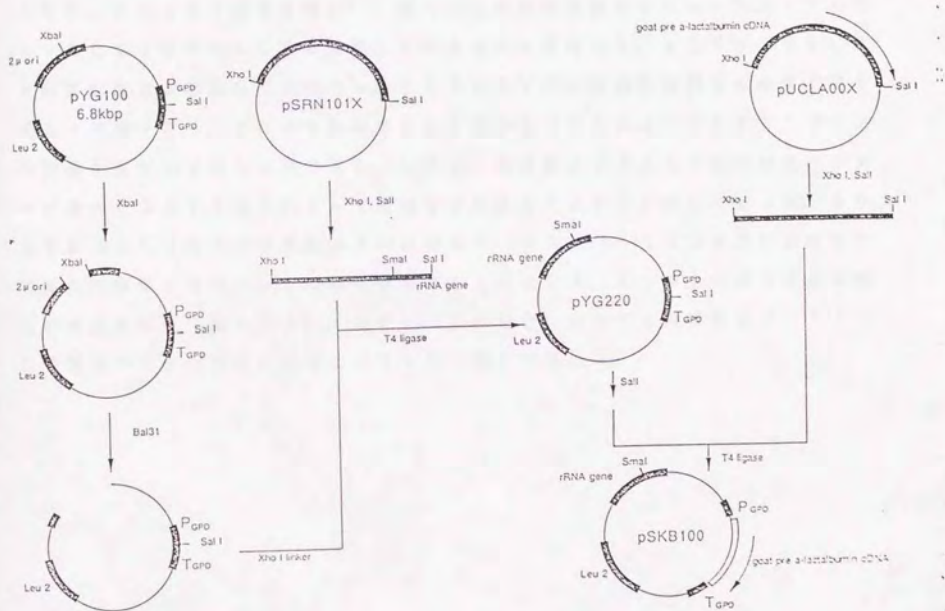
まず、pYG100において酵母における2 μ プラスミド由来の複製開始点近傍に存在すると考えられるXbaI切断部位をこの酵素で切断した⁷⁾。その後、Bal31ヌクレアーゼで消化することによりこのXbaI切断部位から両側約

400~500bpを除去した。さらにこれを平滑末端としてから、XhoIリンカーを挿入しXhoI切断部位を導入した。これにより、発現ベクターとしてのプロモーターとターミネーターを保持してはいるが、酵母菌体内では安定に複製できないと考えられるベクターpYG120を作製した。

このXhoI切断部位に5S-rRNA構造遺伝子を挿入するため、pSRN101XをSalI、XhoIで消化して生じる約4.5kbpの断片を電気泳動的に精製し、XhoIで消化したpYG120と連結し、これをpYG220とした。この時、5S-rRNA構造遺伝子の挿入された向きは、pYG100由来で、外来遺伝子の発現の際に利用されるグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼのプロモーターと同じ向きであった。

さらに、このグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーターとターミネーターの間に存在するSalI切断部位にヤギ α -ラクトアルブミン前駆体cDNAを挿入した。 α -ラクトアルブミンcDNA側はM13ファージ上で開始コドンATGの直前にEcoRI切断部位を、また3'非翻訳領域中にXhoI切断部位をもつヤギ α -ラクトアルブミンcDNAを含むベクターをXhoIで消化してから平滑末端とし、さらにEcoRIで消化したものをpUC18のEcoRI、SmaI部位に挿入したのから調製した。このベクターにさらにEcoRI部位にXhoIリンカーを挿入してXhoI、SalIで消化することによりcDNAを単離できるようにしたベクターをpUCLA00Xとした。このpUCLA00XをXhoI、SalIで消化して単離したヤギ α -ラクトアルブミン前駆体のcDNAとpYG220をSalIで消化した両者をT4DNAリガーゼで連結したもので大腸菌JM109で形質転換し、得られたコロニーから正しい方向に α -ラクトアルブミンcDNAが組み込まれたものを選択し、pSKB100とした(図6-3)。

また、同じようにしてインペルターゼのシグナルペプチドをもつニワトリリゾチームのcDNAを挿入し、ニワトリリゾチームを発現できるようにした発現ベクターpSKB200を作製した。

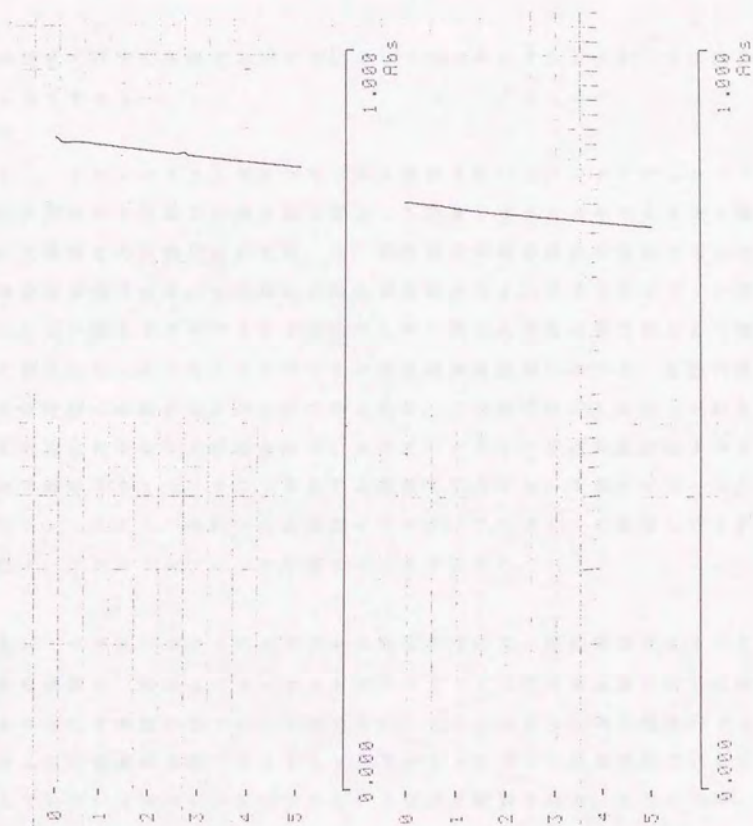


(図6-3) 酵母におけるゲノム挿入型発現ベクター pSKB100 の構築

6-3 ゲノム挿入型ベクターによるヤギ α -ラクトアルブミンとニワトリリゾチームの発現

作製した発現ベクター pSKB100 および pSKB200 による形質転換を行う際には、ゲノム挿入型とするために大量に調製したこれらの DNA を、Sma I で消化してから使用した。これによりこれらのベクターは 5'-rRNA 構造遺伝子部分を両末端に持つ直鎖の DNA 断片とすることができる。この Sma I で切断した pSKB100 または pSKB200 により酵母菌 AH22 を酢酸リチウム法で形質転換し⁷⁾、得られた形質転換酵母から α -ラクトアルブミンまたはリゾチームを分泌発現しているものを選択した。pSKB100 により形質転換された酵母のコロニーのうち7つを YMM 培地で培養した培養上清をイムノブロッティングにより分析すると2つのものからは α -ラクトアルブミンの発現がわずかながら確認できた。しかし、発現量はプラスミド型の発現ベクターである pSKA100 によって発現させた場合とほとんど同じであった。また、pSKB200 により形質転換された酵母のコロニーのうち3つを YMM 培地で培養した培養上清について溶菌活性を測定したところ、1つのものからは溶菌活性が検出された(図6-4)。ただし、この場合においても発現量はプラスミド型の発現ベクターを用いた場合とまったく同じであった。

こうして p Y G 2 2 0 に外来遺伝子を挿入することにより、その外来遺伝子を発現させることができることがわかった。しかしながら、 α -ラクトアルブミンにおいてもリゾチームにおいても、分泌発現における発現量の大きな増加は見られなかった。また、形質転換酵母全体における、分泌発現している形質転換酵母の頻度もプラスミドベクター型のものほとんど同じであった。したがって、プラスミド型からゲノム挿入型のベクターに改変しても発現量の上昇は観察されなかった。ただし、現在までの実験においては、ベクターがゲノム DNA 内に計画どおり挿入されていること、およびその挿入されたコピー数については検討していないので、p S K B 1 0 0 および p S K B 2 0 0 は菌体内でプラスミドのまま存在している可能性も否定できない。すなわち、p Y G 1 0 0 をゲノム挿入型ベクターとするために酵母における 2μ プラスミド由来の複製開始点近傍を B a 1 3 1 ヌクレアーゼで消化することにより除去したが、これが不十分で複製開始点が除去しきれていない可能性もある。この場合には α -ラクトアルブミンおよびリゾチームにおいて p Y G 1 0 0 を発現ベクターとして使用した場合と発現量が変わらないことは当然である。今後はパルスフィールドゲル電気泳動ならびにサザンハイブリダイゼーションにより p S K B 1 0 0 および p S K B 2 0 0 がゲノム内に挿入されているかどうかを検討する予定である。



(図 6-4) プラスミド型発現ベクター (左) と
ゲノム挿入型発現ベクター (右) による
ニワトリリゾチームの発現量の比較

第7章 総括および考察

7-1 総括

本研究で行った実験およびそれによって明らかにすることができた内容は以下のとおりである。

1) ヤギ α -ラクトアルブミンを大腸菌を用いて、ブタアデニレートキナーゼのN末端96残基との融合蛋白質として発現させることができる系を構築した。この大腸菌での発現においては、3'側非翻訳領域の除去が重要であったが、その理由は不明である。さらにこの融合蛋白質から α -ラクトアルブミン部分を単離し、 α -ラクトアルブミンを天然のものと同じ比活性の蛋白質として精製する系を確立した。 α -ラクトアルブミンの単離精製過程において、変性状態の蛋白質を活性型に巻戻すことが必要であったが、この際にはジスルフィド結合をかけかえる活性のあることが知られているチオレドキシンを過剰量添加することがきわめて有効であった。また、EDTA存在下でのフェニルセファロースクロマトグラフィーにより、巻戻った活性型 α -ラクトアルブミンと変性したままの非活性型 α -ラクトアルブミンを分離することができた。

2) ヤギ α -ラクトアルブミンを酵母を用いて、分泌発現させることのできる系を構築し、発現した α -ラクトアルブミンを天然の蛋白質と同じ比活性を持つものとして単離精製することができた。しかしながら、同じ発現ベクターにより得られた形質転換体であっても α -ラクトアルブミンを発現しているコロニーとしていないコロニーが存在するという現象が観察された。またこの際、分泌発現においては乳類であるヤギ由来のシグナルペプチドが、バクテリアである酵母においても正確に認識されることがわかった。また、糖鎖の付加などの翻訳後修飾も起こっていないことを確認した。

3) ヤギ α -ラクトアルブミンとニワトリリゾチームの蛋白質上および遺伝子状の構造における類似性に注目して、 α -ラクトアルブミンにリゾチーム機能

をもたせることを目標としたいいくつかの改変体蛋白質を作製し、これらの性質を検討した。作製した改変体蛋白質のなかで、ニワトリリゾチームにおける第2エキソンに相当する部分の構造を α -ラクトアルブミンに導入した改変体蛋白質 α -L A (EX2)は、わずかではあるが溶菌活性を示すようになりこの第2エキソン部分のペプチド構造は溶菌活性を示すのに最低限必要な構造をすべて含んでいると考えられる。しかしながら、これらの構造が溶菌活性を示すための最小限の構造であるかどうかは不明である。

4) 作製した改変体のうち、活性部位ならびに基質糖鎖との結合に重要と考えられるほとんど残基を含んだ α -L A (10)は溶菌活性を示すことができなかったのに対し、エキソン単位でこれらの部分を導入した α -L A (EX2)は溶菌活性を示すことができた。すなわち、 α -L A (EX2)は溶菌活性を発現するのに最小な機能部位のすべてを含んでおり、構造的にも α -L A (10)よりも活性型の構造になりやすいと考えられる。したがって、本研究は遺伝子構造の単位であるエキソンが、蛋白質の構造や機能における小単位ごとをコードしているというエキソンシャフリングの仮定を実験的に支持するものである。

7-2 考察

α -ラクトアルブミンはほ乳類由来の蛋白質であるためか、バクテリアでこれを大量に発現させることは困難で、大腸菌においてこれを単独発現させることは現在までに成功していない。この原因についてはいろいろな要因がからんでいると考えられる。そのうちのいくつかを列挙してみると、コドンの使用頻度、プロモーターの働き方、mRNAの安定性や構造、SD配列と開始コドンとの距離、発現した α -ラクトアルブミンの安定性やそれが菌体にあたえる影響などである。ただし、発現の制御系を整えたpYS100を用いた発現実験では誘導物質の添加により宿主大腸菌の増殖の阻害が観察されたので、この場合にはヤギ α -ラクトアルブミンの発現がまったく起こらなかったわけではなく、発現した α -ラクトアルブミンが菌体に有害で、発現をおこした大腸菌のみが選択的に増殖できない状態になったものと考えられる。こうした現象の原因としては、特に α -ラク

トアルブミンはカルシウム結合蛋白質であるので発現した際に菌体内のカルシウムイオンをキレートしてしまう可能性があり、 α -ラクトアルブミンの発現が菌体にとって有害である可能性は十分に考えられるであろう。カルシウムイオンはセカンドメッセンジャーとして細胞内の活動においてきわめて重要な働きをもつので、菌体内のカルシウムイオンの濃度の変化はその生育に大きな影響をあたえるはずである。本研究においては、大腸菌における α -ラクトアルブミンの単独発現を試みる際に、シグナルペプチドが付加したままでの発現を試み、ペリプラズム画分または菌体外への分泌をねらい、こうした効果を軽減できるようにしたが、それでも単独発現系を構築することはできなかった。大腸菌においては分泌系がそれほど発達していないので分泌が不十分であり、菌体内に残った α -ラクトアルブミンが菌体の生育を阻害した可能性や、ヤギ由来のシグナルペプチドが大腸菌ではまったく機能しなかった可能性などが考えられる。したがって、シグナルペプチドの改変や、培地中へのカルシウムイオンの積極的な添加などによって大腸菌においても α -ラクトアルブミンが単独で発現できる可能性があると考えている。また、融合蛋白質としての発現に3'非翻訳領域の除去が必須であったように、DNAならびにRNAとしての構造も大きな要因であろう。融合蛋白質の発現において3'非翻訳領域の除去が必要だった理由は明かではないが、5'側や3'側の非翻訳領域は、もとの細胞内でなんらかの発現調節機構をもっていた可能性も考えられ、異種細胞中ではこうした調節が起こらないため正常に発現できないのかもしれない。したがって外来遺伝子を大量に発現させたい場合には、翻訳領域のみとすることが発現効率をあげる一般的な方法であろう。

酵母における発現においても発現量をあげるために問題点となっていることがらもおそらくおなじような点であろう。さらに酵母における発現では、おなじプラスミドによる形質転換体でありながら、あるコロニーは α -ラクトアルブミンを発現しているが別のコロニーは発現していないという現象を起こしており、外来遺伝子の発現における問題の複雑さを示している。このようなコロニーの不均一性はおなじ発現系をもちいたリゾチームの場合にはほとんど見られないことであり、コロニーの状態、すなわちきわめて微妙な培養条件がその発現に大きく影響していることを示しているとおもわれる。したがって、 α -ラクトアルブミンの酵母における発現量は微量であったが、培養条件の検討によりかなり改善され

るのではないだろうか。また、酵母においてはいろいろな菌種が単離されているので、宿主としてもちいる菌種を検討することも重要であろう。リゾチームにおいては、その発現量の多い形質転換体の単離が行われたという報告があり興味深い問題である¹⁾。

改変体の作製においては、 α -L A (2) と α -L A (10) においては、リゾチームにおいて現在までに解明されている知見をもとにその変異部位を決定した。しかしながら、 α -L A (10) においては、溶菌活性に重要と思われる残基のほとんどを含んでいながら、溶菌活性を示すものにまで巻戻すことはできなかった。このことは改変体の作製における戦略を考える上で、いくつかの重要な問題を含んでいる。なぜ、おおくの努力にもかかわらず α -L A (10) が溶菌活性を示すものにまでいたらなかったのかを考えてみよう。もっとも考えられるのは、巻戻しの条件が適切でないとする考え方である。この考え方は、細かく議論するならば、溶菌活性に必要な一次構造的な条件は現在までに知られている知識ですでに十分であるが、それらの残基がきちんとした立体構造をとることができないとする考え方といえる。また、ここで議論すべき立体構造が全体的なものをさすか局所的なものをさすかで、さらに問題となる視点がちがってくることになる。

全体的な立体構造を形成できないということは蛋白質の安定性という点に問題があることになる。すなわち、 α -L A (10) は活性型の蛋白質の立体構造が不安定なため、または不活性型の蛋白質の構造が安定なため、巻戻りにくい、または巻戻ることのできない蛋白質になってしまった可能性である。蛋白質の安定性における分子表面に露出した残基の役割に関しては、リゾチームそのものを用いた部位特異的変異による報告があり²⁾、親水的な残基から疎水的な残基への置換は、蛋白質分子の不安定化を引き起こすことが知られている。また、分子内部に埋もれている残基の置換は蛋白質分子を形作るためのパッキング状態の変化や疎水的相互作用の変化を引き起こすであろう。 α -L A (10) に導入した変異の中で、このような残基側鎖のもつ性質をもっとも大きく変化させてしまった変異としては P h e 3 3 L y s という改変があげられる。P h e 3 3 は触媒残基である G l u 3 5 に近く、かなり親水的な部分にあるので、親水的な側鎖を持つ L y s への改変が蛋白質の安定性を決定的に変化させたとはいえないが、 α -L

A (10) に導入した変異が親水性を増加させる方向に偏っており、疎水的な相互作用が不十分になって蛋白質が不安定化してしまい、巻戻りにくい、または巻戻ることのできない蛋白質になってしまったと考えることができる。しかしながら、出発点である α -ラクトアルブミンと目標とするリゾチームの立体構造はきわめてよく似ており、導入した変異もニワトリリゾチームを見本としたものである。さらに α -L A (10) よりもさらに置換を導入した α -L A (EX2) は溶菌活性を示すのであるから、全体としての立体構造は構築可能なのではないだろうか。また、巻戻しの条件においても種々の条件を検討した結果、ニワトリリゾチームにおいても、改変体である α -L A (EX2) であっても、わずかではあるが溶菌活性を示すことができる状態にまで巻戻すことができている、本研究で行った条件がまったく蛋白質の性質を無視したものであったとは考えにくい。

もし α -L A (10) が立体構造を形成できる蛋白質であるならば、 α -L A (10) における巻戻し混合物のなかにも、ごく一部は立体構造を保っているものがあるはずである。そのような分子種がなぜ溶菌活性を示すことができなかったのであろうか。そこで議論すべき対象となるのが、全体的な立体構造ではなく、局所的な構造についてである。局所的な構造とは、全体的な主鎖の折り畳まれ方のような構造に対して、側鎖の向きのような微細な構造のことをさすとすると、活性発現においてはこの局所的な構造の変化こそが重要であると考えられる。したがって、 α -L A (10) においては局所的な構造が整わない要因が構造的に存在した可能性はありうるであろう。 α -L A (10) においては改変残基として、ニワトリリゾチームにおける機能面からのみ重要と考えられる残基をピックアップし置換をおこなっただけなので、活性触媒残基を導入したとはいえそれらが正しい方向をむいてくれるという保証はまったくないからである。また、蛋白質は溶液中では石のように堅いものではなく、ゆらぎをもった構造をしているとされている。とくにリゾチームにおいては基質結合部位のクレフトが大きくゆらぐことが知られており、 α -L A (10) がこのような柔軟性までを持ち合わせることはできたかどうかはきわめて疑問である。さらに、 α -ラクトアルブミンにおいてはモルテングロビュールという非活性型の構造が存在することが知られている²³。このモルテングロビュール構造は2次構造などには変化がなく、活性型蛋白質と熱力学的に区別がつかないにもかかわらず活性をもつことのでき

ない分子種であり、 α -L A (10) はこのような構造に落ち込んでしまったと考えることもできる。このように局所的な構造までを議論することは、やはり巻戻しをおこなった蛋白質においては不可能であり、発現系を含めた実験系を整備することが重要であったといえるであろう。しかしながら、蛋白質工学的実験を行う上で理想的な発現系は一般的には現在のところ存在しない。ニワトリリゾチームにおいても酵母による発現においても改変体によってはきちんとした構造をとっていない改変体が得られたり⁴⁾、まったく発現がおこらない場合があったりするので、このような改変体蛋白質の構造的な議論は蛋白質工学における一般的な問題と言える。

これらとまったく別の考え方は、 α -L A (10) はきちんとした立体構造をとることができたとしても溶菌活性をもつことができないとする考え方である。すなわち、きわめてよく研究されているニワトリリゾチームにおいてさえ、その構造および機能的な酵素活性発現の機構のすべては理解されてはいないのであって、改変体の設計として α -L A (10) は不十分であるとする考え方である。このような考え方にそくして再度 α -L A (10) の1次構造を考えると、ニワトリリゾチームにおけるThr 47の部位における残基の欠損は無視できないものがある。Thr 47は活性触媒残基であるAsp 52につながるターン構造の手前にあり、この部位に残基の欠損が生じることによりAsp 52が正しい配置をとれない可能性が考えられる。 α -ラクトアルブミンとリゾチームの立体構造の比較では、この部位に残基の欠損があってもその前後の主鎖の構造はそれほど変化がないとされているが⁵⁾、おそらくAsp 52の配置は溶菌活性において絶対的なものであるであろうから、本研究においてはこの欠損を軽視するべきではなかったと考えている。また、我々の知り得ていない溶菌活性にきわめて重要な残基の存在については、そうした考え方も無視できないが本研究における結果から議論することは困難であろう。

α -L A (10) に溶菌活性をもたせることのできなかった理由はこのようにいくつもの可能性が考えられるが、どのような考察が打倒であるかは不明であり、それを実験的に検討することもきわめて困難である。また、今後の機能蛋白質の設計において、このような例はいくつも生じることであろう。いずれにせよ、 α -L A (10) では溶菌活性がなく、 α -L A (EX2) では溶菌活性を生じる

ということは、 α -L A (10)における変異で不十分な点を α -L A (EX2)でさらに導入された変異が補っていることになり、特に大きな置換を導入する際の戦略として、活性に重要と思われる残基のみを拾い上げて導入するのではなく、そのような部分をユニットとして置換する必要がある、その際に遺伝子構造であるエクソンの単位が参考になることが本研究で示されたといえるであろう。

さらに、本研究でエクソンの単位に注目するきっかけとなったエクソンシャッフリング仮説について考えてみると、エクソンシャッフリング仮説においてはイントロンの存在や新しい性質をもった蛋白質が生み出されてくる過程をうまく説明しているように思われる。シャッフリングされた遺伝子は発現していなければ偽遺伝子になってしまうであろうから、分子進化に参加することのできる蛋白質は、なんらかの形で発現していると考えられる。では、そのシャッフリングによって生じた遺伝子によってコードされる蛋白質はどんなものであろうか。シャッフリングされた時点ではなんの活性ももたず、一定の変異の導入が蓄積されてある活性をもったものとなるまで、ほとんど不活性な蛋白質が無意味なまま発現されつづけることが可能なのだろうか。それとも、シャッフリングされた時点ですでになんらかの活性を持っていることが可能なのだろうか。本研究におけるエクソン単位でのハイブリッド蛋白質の作製は人工的なエクソンシャッフリングとみることでもできる。したがって、こうしたハイブリッド改変体である α -L A (EX2)や α -L A (EX2, 3)がわずかではあるがリゾチーム活性を保持していたことは、エクソンシャッフリングで生じる遺伝子が発現した場合でも、もとの蛋白質の機能を保持している場合がありうることを、実験的に示したと考えることもできよう。進化を理解するための仮定について実験的な検証を行うことは多くの場合困難であるので、こうした点からも本研究は意義深いものと考えている。

さらに、これまでの実験の解説の中ではほとんど議論できなかつたいくつかのことがらについて述べてみたい。まず、最小の変異を導入した α -L A (2)についてであるが、この改変体を作製したねらいは、リゾチーム基質糖鎖との結合能を獲得させることにあった。しかしながら、適切なアフィニティークロマトグラフィーが開発できなかつたため、 α -L A (2)にこのような機能が付加されたかどうかを十分に検討することができなかつたことはきわめて残念である。

アフィニティークロマトグラフィーについては、C-型リゾチームの基質であるキチンを担体に結合させたものを作製したが、これを α -L A (EX 2) に使用した場合には、吸着した蛋白質を酸性条件下で溶出するため、溶出された改変体が変性してしまい活性測定に使用できなかった。適切なアフィニティークロマトグラフィーの開発は α -L A (2) の性質の検討において不可欠なものである。そこでさらに短い基質糖鎖ならびにその類似体、あるいは菌体のペプチドグリカンそのものなどをリガンドとして、これらを用いることにより適切なアフィニティークロマトグラフィーを開発することも今後検討していきたい。また α -L A (2) において、現在までに知られている α -ラクトアルブミンのすべてにおいて保存されているTyr 107を置換しても α -ラクトアルブミン活性が保持されていたことは興味深い事実である。 α -ラクトアルブミンの三次元構造をみると、Tyr はリゾチームにおける基質糖鎖結合クレフトに飛び出しており、クレフトをささえるつかえぼうのようである。したがって、 α -L A (2) の熱安定性やゆらぎの状態などの性質には変化が生じていると思われる。が、本研究によりこの部位のTyr 107が α -ラクトアルブミンの活性に決定的な残基ではないことがわかった。 α -ラクトアルブミンはガラクトシルトランスフェラーゼと結合してその活性を示すので、活性に最も重要な部位の一つはガラクトシルトランスフェラーゼとの接触部位であろう。化学修飾による検討により α -ラクトアルブミン活性に必須とされたHis 34は、このような両蛋白質同士の接触面に存在する可能性が高い。今後、 α -ラクトアルブミン自体の構造や機能に関する蛋白質工学的実験が行われることを期待する。

また、 α -ラクトアルブミンがカルシウム結合蛋白質であることは何度もふれてきたが、改変体のカルシウム結合能についてはほとんど検討することができなかった。 α -L A (2) と α -L A (10) はカルシウム結合部位が残っており、 α -L A (EX 2)、 α -L A (EX 2. 3) はその部分に置換が導入されてしまっている。本来ならば、前者2種の改変体にはカルシウムが結合し、それによる安定化効果が生じていると考えられる。各種改変体の巻戻しの過程においてはカルシウムイオンが添加されているが、改変体ごとにカルシウムイオンの結合の有無を検討できなかったことは残念であった。 α -ラクトアルブミンだけでなく、リゾチームの中にもカルシウムイオンを結合する物があることが知られているほ

か、ヒトリゾチームに α -ラクトアルブミンのカルシウムイオン結合部位を導入した蛋白質工学的実験もあり、 α -ラクトアルブミンのカルシウム結合蛋白質としての性質も興味深いものがある。

改変体蛋白質は巻戻しを行った後でも不安定なことが多かったが、特に α -L A (EX 2, 3)は巻戻しの時間内に沈殿となっていってしまうため、きわめて扱いにくい蛋白質であった。これは、 α -ラクトアルブミンが酸性蛋白質であるのに対し、リゾチームが塩基性蛋白質であることから、その両者を半分ずつ受け継いだ α -L A (EX 2, 3)は当電点が中性付近になってしまい、難溶性蛋白質になってしまったものと思われる。この α -ラクトアルブミンとリゾチームのあいだにおける電荷のちがいは、リゾチームが溶菌活性を発現するにあたってその正電荷で菌体と静電結合することが重要であるとされていることを考えると、溶菌活性の測定においては無視できない差異である。 α -L A (EX 2)や α -L A (EX 2, 3)の溶菌活性がきわめて低いものであったことは、こうした表面電荷の問題も関与していると考えられる。すなわち、分子表面に露出している残基において負電荷を持った残基が多いうちは、活性触媒残基などを導入しても高い溶菌活性は得られるはずがなく、かえって電荷の影響を受けることなく加水分解反応についてだけ検討できる、合成基質に対する活性の方が高い比活性を得られるかもしれない。今後、このような検討並びに高い感度を持ったリゾチームに対する合成基質の開発が望まれる。

今回の改変体蛋白質の設計においては、エキソンシャッフリング仮説とモジュール仮説を参考とした。前者においては α -L A (EX 2)ならびに α -L A (EX 2, 3)を作製し、その性質の検討を行うことによりその仮説を支持する結果を得ることができた。しかし、さらに後者の仮説について考え合わせると、モジュール仮説による分析ではニワトリリゾチームの第2エキソンは2つのモジュールから成っているとされている。したがって、第2エキソン全体ではなく、活性触媒残基であるG 1 u 3 5およびA s p 5 2を含むモジュール2のみの α -ラクトアルブミンへの導入でも α -L A (EX 2)と同等あるいはそれ以上の溶菌活性の導入が可能かもしれない。この点については現在こうした改変体の作製を進めており、この結果によりモジュール仮説におけるさらなる議論ができるものと考えている。

最後に、本研究においては α -ラクトアルブミンとニワトリリゾチームの構造、機能相関を参考にしていくつかの改変体を作製したが、以上のように α -ラクトアルブミンとリゾチームの両者の活性をもったものは得られなかった。しかしながら、ハリモグラのリゾチームには α -ラクトアルブミン活性があるとの報告もあり、両者の活性を持ち合わせた改変体の作製も可能なのかもしれない。ハリモグラは卵で生まれ、母乳で育つ種であるからまさしくリゾチームから α -ラクトアルブミンが生じた進化の分岐点に位置する種であり、今後、このリゾチームの構造が明らかにされることを切望するものである。

第8章 一般的な各種実験操作について

8-1 菌体の取り扱いなど

8-1-1 大腸菌について

大腸菌の培養は主にL-培地をもちいて、液体培地に接種した場合には一夜37℃で振とう培養することにより、寒天培地に接種した場合にはやはり一夜37℃で放置することにより行った。また、形質転換体の培養の場合にはオートクレーブの終わったL-培地の中に50mg/lとなるようにアンピシリンを加えて使用した。

L-培地	Bacto tryptone	10g
	Yeast extract	5g
	NaCl	10g

以上を蒸留水に溶かして1lとし、水酸化ナトリウムでpH7.2としたものをオートクレーブして用いた。寒天培地とする場合にはこれにAgar 12gを加えて使用した。

大腸菌の形質転換の方法は主にTSS法にしたがった¹⁾。大腸菌の一夜培養液1mlを50mlのL-培地に接種してOD_{600nm} = 0.3~0.4まで培養した。これを集菌し、TSS溶液10mlに懸濁して0.2mlずつ分注した。これをcompetent cellとして液体窒素で凍結して-80℃で保存した。形質転換の際にはこのcompetent cellを水中で解凍し、プラスミドを加えて水中で1時間程度おき、42℃で90秒加熱してから0.8mlのL-培地を加えて45分37℃で保温した。これを集菌し、0.2ml程度のL-培地に懸濁してアンピシリンを含むL-培地のプレートにまき、37℃で一夜培養した。

TSS 溶液 以下のものを無菌的に混合して使用した。

20% ポリエチレングリコール	25ml
1M MgCl ₂	2.5ml
ジメチルスルホキシド	2.5ml
2.5倍濃度のL-培地	20ml

8-1-2 酵母について

酵母の培養は選択培地としてYMM培地を、栄養培地としてYPD培地を用いて、液体培地に接種した場合には30℃で3日から5日、振とう培養することにより、寒天培地に接種した場合には5日程度30℃で放置することにより行った。

YPD培地	Bacto pepton	2g
	Yeast extract	1g
	NaCl	2g

以上を蒸留水に溶かして100mlとしたものをオートクレーブして用いた。寒天培地とする場合にはこれにAgar 12gを加えて使用した。

YMM培地	Yeast nitrogen base	0.7g
	Glucose	2g
	His	2mg

以上を蒸留水に溶かして100mlとしたものをオートクレーブして用いた。寒天培地とする場合にはこれにLeucine bioassay medium 0.25g、Agar 12gを加えて使用した。

形質転換の方法は主に酢酸リチウム法により行った²⁾。2mlの酵母培養液を50mlのYPD培地に接種して $OD_{600nm} = 0.6$ 程度まで(約4~6時間)培養した。これを3000rpm、5分間遠心して菌体を回収し、25mlの蒸留水に懸濁した。再度遠心して回収した菌体を5mlの酢酸リチウム溶液に懸濁して1時間30℃で振とうした。その後遠心して回収した菌体を0.5mlの酢酸リチウム溶液に懸濁

してcompetent cellとした。このcompetent cellを0.1mlとり、10 μ lのプラスミドを加えて30℃で30分間放置した。これにさらに0.7mlとり再度30℃で30分間おいてから42℃で5分間加熱し、その後3000rpmで3分間遠心した。この沈澱を0.2mlの蒸留水で懸濁してから遠心して菌体を洗浄し、再度0.1mlの蒸留水に懸濁したものをYMM培地のプレートにまき、30℃で保温した。

8-2 DNAに関する実験操作

8-2-1 各種制限酵素および修飾酵素による処理

DNAに対する各種制限酵素および修飾酵素による処理は、主にManiatisら条件および各種酵素製造メーカーの提示した条件に従った。Buffer交換の際にはTE飽和フェノール/クロロホルム(1:1)処理、クロロホルム/イソアミルアルコール(2.4:1)処理、エタノール沈澱の処理を行った。

8-2-2 アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動は、担体として0.8~1.5%アガロースゲルを用い、40mMトリス酢酸緩衝液 pH8.0、1mMEDTAを泳動液とし、ブROMフェノールブルーの泳動度を指標として100V定電圧下で行った。泳動後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色し紫外線照射下でDNAを検出した。

電気泳動用緩衝液 (TAE緩衝液)

50倍濃度の保存溶液として以下のように調製し、用事希釈して使用した。

Tris Base	242g
氷酢酸	57.1ml
0.5M EDTA (pH8.0)	100ml

以上のものを蒸留水で溶かして1lとした。

8-2-3 大腸菌からのプラスミドの調製

大腸菌からのプラスミドの調製はManiatisらのアルカリ-SDS法に従った³⁾。1.5mlの形質転換体大腸菌一夜培養液を集菌後、アルカリ条件下SDS存在下で溶菌させ、酢酸カリウムで中和したものの上清をTE飽和フェノール/クロロホルム(1:1)処理、クロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)処理、エタノール沈澱の処理を行い、これにRNase Aを作用させた後ポリエチレングリコール存在下でプラスミドDNAを沈澱させて回収した。また、特に大量調製を行った場合には塩化リチウムによるRNAとの分別沈澱も併用した。

菌体懸濁溶液	50mM glucose	
	25mM Tris HCl (pH8.0)	
	10mM EDTA (pH8.0)	
菌体溶解溶液	0.2N NaOH	
	1% SDS	
酢酸カリウム溶液	5M potassium acetate	60ml
	氷酢酸	11.5ml
	蒸留水	28.5ml
ポリエチレングリコール溶液	20% ポリエチレングリコール	
	2.5M NaCl	
塩化リチウム溶液	5M LiCl	
	10mM Tris HCl (pH8.0)	

8-2-4 コロニーハイブリダイゼーション

大腸菌のコロニーハイブリダイゼーションの方法は、Maniatisらの方法に従った⁴⁾。ニトロセルロースフィルター上で培養した形質転換大腸菌をSDS処理、アルカリ処理した後、このフィルターをクエン酸緩衝液(6xSSC)、リン酸緩衝液(2xSSPE)で中和したものを減圧下、80℃で処理することによりDNAをフィルター上に固定した。その後、菌体の残骸を除き、プレハイブリダイゼーションを37℃で1時間行い、³²Pで標識した2pmole程度のDNAプローブを加えて45℃~50℃の適当な温度で一晩ハイブリダイゼーションを行った。このフィルターをクエン酸緩衝液(6xSSC)中、37℃で30分間洗浄してからオートラジオグラフィを行い、ポジティブクローンを選択した。

SDS処理溶液

10% SDS

アルカリ処理溶液

0.5M NaOH

1.5M NaCl

クエン酸緩衝液(6xSSC): 20xSSCを3倍希釈して使用した。

20xSSC	sodium citrate(3Na)	175.3g
--------	---------------------	--------

	NaCl	88.2g
--	------	-------

蒸留水を加えて溶かし、1lとした。

リン酸緩衝液(2xSSPE): 20xSSPEを10倍希釈して使用した。

20xSSPE	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	27.6g
---------	---	-------

	NaCl	175.3g
--	------	--------

	EDTA	7.4g
--	------	------

蒸留水を加えて溶かし、1lとした。

ハイブリダイゼーション溶液

6XSSC

5Xデンハルト溶液

0.1% SDS

デンハルト保存溶液 (50XDenhard't solution)

1%牛血清アルブミン

1%フィコール

1%ポリビニルピロリドン

8-2-5 部位特異的変異

部位特異的変異はM13ファージを用いた1本鎖DNAによる方法と、プラスミドを用いた2本鎖DNAによる方法を併用した。

1本鎖DNAによる方法はKramerらの方法に従った⁵⁾。変異を加える遺伝子をM13ファージのベクターmp9 (アンバー変異を含む) に組み込み、ファージから1本鎖DNAを調製した。また、アンバー変異を持たないmp9のRF2本鎖DNAを、変異を加える遺伝子が挿入された部分で切断しておき、これら両者とミューテーションプライマーを混合した。これを100℃、5分間加熱後、放冷してアニールさせた。これをKlenow酵素とT4DNAリガーゼで修復、連結してから非許容性大腸菌に導入した。得られたブランクから1本鎖DNAを調製し、ミューテーションプライマーをプローブとしたハイブリダイゼーションを行い、形質転換体を選択した。

2本鎖DNAによる方法はInouyeらの方法に従った⁶⁾。変異を加える遺伝子を含むプラスミドにおいて、変異を導入する領域を除去したプラスミドと薬剤耐性遺伝子の一部を除去したプラスミドを調製し、これら両者とミューテーションプライマーを1:1:500の割合で混合した。これを100℃、5分間加熱後、放冷してアニールさせた。これをKlenow酵素とT4DNAリガーゼで修復、連結してから大腸菌に導入した。得られた形質転換体についてミューテーションプライマーをプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションを行い、変異型プラスミドをもった形質転換体を選択し、これから変異体プラスミドを調製した。

8-2-6 DNAの化学合成

1本鎖DNA断片の化学合成は固相 β -シアノエチルホスホアミダイト法により、アプライドバイオシステム社DNA自動合成機381Aを用いて行った。ジメトキシトリチル基で5'末端が保護されたDNA鎖をアンモニアによってカラム担体(CPG)から遊離させ、55℃、6時間の反応で塩基およびリン酸部分の脱保護を行った。これを逆相系高速液体クロマトグラフィーで精製してから80%酢酸で5'末端の保護基を脱保護した。さらにこれを再度逆相系高速液体クロマトグラフィーで精製して精製DNA標品とした。

8-2-7 DNAの塩基配列の決定

DNAの塩基配列の決定はダイデオキシ法により行い⁷⁾、主に宝酒造(株)の7-デアザシーケンスキットを使用して付属のプロトコールに従って行った。なお、プライマーとしては上記の方法で合成、精製したDNA断片を用いた。また、DNA断片の電気泳動は8M尿素、7%ポリアクリルアミドゲルにより行った。泳動後、ゲルを10%酢酸、10%メタノールで固定してから乾燥し、オートラジオグラフィーを行った。

40%アクリルアミド保存用液

アクリルアミドモノマー	38.0g
ビス-アクリルアミド	2.0g
蒸留水を加えて溶かし、全量を100mlとする。	

電気泳動用緩衝液(TBE緩衝液)

5倍濃度の保存溶液として以下のように調製し、用事希釈して使用した。

Tris Base	27.5g
0.5M EDTA (pH8.0)	20ml

以上のものを蒸留水で溶かして1 lとした。

8-3 蛋白質に関する実験操作

8-3-1 蛋白質の濃度決定および定量

蛋白質水溶液の濃度の決定は主に分光学的に行った。280 nmにおける吸光度を測定し、吸光係数を用いて算出した。吸光係数としては、ヤギ α -ラクトアルブミンに関しては $E_{280\text{nm}}^{1\%} = 20.3^{(8)}$ 、ニワトリリゾチームに関しては $E_{280\text{nm}}^{1\%} = 26.4^{(9)}$ という値を用い、改変体蛋白質においてはヤギ α -ラクトアルブミンの値に対し、改変した芳香族アミノ酸の280 nmにおける分子吸光係数の値を考慮した。

また、DNAなどの共雑物の混入が考えられる場合、あるいは蛋白質濃度がうすい場合にはLowry法による蛋白質の定量を行った⁽¹⁰⁾。1 mlのサンプルに2%デオキシコール酸を8.3 μ l加え、15分間放置した後トリクロロ酢酸を最終濃度6%になるように加えて蛋白質を沈澱させた。遠心により沈澱を回収し、1 mlの炭酸ナトリウム-硫酸銅溶液に溶かし、2倍に希釈したフェノール試薬を加えて室温で30分間放置して発色させたものの750 nmにおける吸光度から蛋白質量を算出した。標準蛋白質としてはヤギ α -ラクトアルブミンまたはニワトリリゾチームそのものを持ちいた。

炭酸ナトリウム-硫酸銅溶液

2% Na_2CO_3 /0.2N NaCl : 0.5% CuSO_4 /1% 酒石酸ナトリウム
= 50 : 1 (V/V)

8-3-2 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動はトリス緩衝液を用いるLaemmliの方法に従った⁽¹¹⁾。濃縮ゲルはアクリルアミド濃度5%、pH 6.8とし、分離ゲルはアクリルアミド濃度18.75%、pH 8.8とした。濃縮ゲルでは100Vで、

分離ゲルでは200Vで泳動し、マーカーとしてのせたブロムフェノールブルーの泳動度を指標とした。電気泳動終了の後、Coomassie Brilliant Blueで染色し、さらに10%酢酸、10%メタノールで脱色して蛋白質を検出した。

30%アクリルアミド保存溶液

アクリルアミドモノマー	58.4g
ビス-アクリルアミド	1.6g

蒸留水を加えて溶かし、全量を200mlとする。

濃縮ゲル保存溶液

0.5M Tris HCl pH6.8
0.4% SDS

Tris Base	15.14g
SDS	1.0g

蒸留水を加えて溶かし、HClでpH6.8とした後、全量を200mlとする。

分離ゲル保存溶液

1.5M Tris HCl pH8.8
0.4% SDS

Tris Base	90.86g
SDS	2.0g

蒸留水を加えて溶かし、HClでpH8.8とした後、全量を500mlとする。

サンプル溶解用緩衝液

Glycerin	4.0g
SDS	1.15g
Glycine	14.4g

蒸留水を加えて溶かし、HClでpH6.8とした後、全量を50mlとする。

泳動用緩衝液

Tris Base	3.0g
SDS	1.0g
Glycine	14.4g

蒸留水を加えて溶かし、全量を1lとする。

染色液

クマシーブリリアントブルー R 2 5 0	2.5g
メタノール	500ml
酢酸	100ml

蒸留水を加えて1lとする。

脱色液

メタノール	100ml
酢酸	100ml

蒸留水を加えて1lとする。

8-3-3 イムノプロットイング

蛋白質試料をSDS-電気泳動した後、電気泳動的にニトロセルロースフィルターに転写した。このフィルターを3%ウシ血清アルブミン溶液で中で放置してから洗浄し、1次抗体（抗ウシ α -ラクトアルブミン・ウサギ抗血清）を結合させた。これを洗浄してから2次抗体（ヤギのアルカリフォスファターゼ結合・抗ウサギIgG）を結合させた。洗浄後、酵素基質（NBT, BICP）を加えて染色した。

転写用泳動液

Tris Base	12.1g
-----------	-------

Glycine	57.6g
メタノール	800ml
蒸留水	3200ml

洗浄用緩衝液

10mM Tris HCl pH8.0
150mM NaCl
0.5% Tween20

ブロッキング溶液

洗浄用緩衝液に3%のウシ血清アルブミンを加えて使用した。

アルカリフォスファターゼ発色用緩衝液

100mM Tris HCl pH9.5
5mM MgCl ₂

8-3-4 α-ラクトアルブミン活性の測定

α-ラクトアルブミン活性測定は分光学的方法とラジオアイソトープを用いた方法を併用した。

分光学的測定法はFitzgeraldらの方法に従った¹²⁾。
活性測定の直前に以下のように試薬を混合する。

250mM Glycylglycine pH8.5	200 μl
100mM MnCl ₂ .	
2M KCl	50 μl
Assay mixture	100 μl
Pyruvate kinase.	
Lactate dehydrogenase (Sigma)	10 μl
Phosphoenolpyruvate solution	10 μl

100mM CaCl₂ 10 μ l

Sample 600~610 μ l (数100ng程度)

これを12000rpm、5分間遠心した後、galactosyltransferase solutionを10 μ l加えて25℃で340nmの紫外吸収の減少を10分間測定する。このうち、測定開始後の5分後と10分後の吸収の差から活性を計算する。必要がある場合にはgalactosyltransferase solutionを加える前に同様の測定を行いbackgroundとした。

Assay mixture

UDP-galactose 6mg

Glucose 144mg

NADH 4.8mg

蒸留水で溶かして4mlとし、-80℃に保存した。

Phosphoenolpyruvate solution

3.2mgをはかりとり、100 μ lの蒸留水で溶かして-80℃に保存した。

galactosyltransferase solution (Sigma)

5unitをはかりとり、1.6mlの蒸留水で溶かして100 μ lずつ-80℃に保存した。

Pyruvate kinase, Lactate dehydrogenase (Sigma)

懸濁液を蒸留水で用事10倍に希釈して使用した。

ラジオアイソトープを用いた方法はBrewらの方法に従った¹³⁾。

活性測定の直前に以下のように試薬を混合する。

20mM Tris HCl pH7.5

20mM Glucose

4mM MgCl₂ 957 μ l

6mg/ml UDP-galactose 30 μ l

5unit/1.6ml galactosyltransferase 10 μ l

25 μ Ci/ml (14 C)UDP-galactose 3 μ l

この混合液を90 μ lとり、サンプルを10 μ l (数100 ng程度)加えて37°Cで10分反応させ、その後水中に移して反応を止めた。これを2mlのAG1-X8カラムにチャージしてさらに0.5mlの蒸留水でカラムを洗浄した。カラムを通した溶液をルマジエル(シンチレーター)10mlと混合して液体シンチレーションカウンターで測定した結果から活性を計算した。

8-3-5 リゾチーム活性の測定

リゾチームの活性測定は*Micrococcus lysodeikticus*の乾燥菌体を50mMリン酸緩衝液pH6.2に懸濁したものの1mlに蛋白質試料をいれ、540nmの濁度の減少を5~10分間観察することにより行った。

8-3-6 アミノ酸組成分析

アミノ酸分析は減圧下、6N塩酸により24時間110°Cで加水分解したものを日立アミノ酸分析計L-8500で分析することにより行った。Ty rの回収率が悪い場合には1%のフェノールを加水分解時に加えた。

8-3-7 アミノ酸配列分析

アミノ酸配列分析はアブライドバイオシステム社プロテインシーケンサー473Aによって行った。

第 1 章

- 1) D.L.Oxender, C.F.Fox eds., Protein Engineering,
Alan R. Liss, New York, (1987)

第 2 章

- 1) 生化学辞典 (今堀和友、山川民夫監修) p1333, 東京化学同人,東京, (1984)
- 2) Mattews, B.W., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 84, 6663, (1987)
- 3) Matsumura, M., Mature, 334, 406, (1988)
- 4) Blake, C.C.F., Johnson, L.N., Mair, G.A., North, A.C.T., Phillips, D.C.,
Sarma, V.R., Proc.R.Soc.London Ser.B, 167, 378, (1967)
- 5) Imoto, T., Johnson, L.N., North, A.C.T., Phillips, D.C., Rupley, J.A.
The Enzymes (ed.Boyer, P.D.).665 Academic Press Inc., New York, (1972)
- 6) K.Brew and R.L.Hill, Rev.Physiol.Biochem. Pharmacol., 72, 105, (1975)
- 7) D.I.Stuart, K.R.Acharya, N.P.C.Walker, S.G.Smith, M.Lewis and
D.C.Phillips, Nature, 324, 84, (1986)
- 8) T.E.Barman, Eur. J. Biochem., 83, 465, (1978)
- 9) K.Brew, T.C.Vanaman and R.L.Hill, J. Biol. Chem., 242, 3747, (1976)
- 10) K.R.Acharya, D.I.Stuart, N.P.C.Walker, M.Lewis and D.C.Phillips,
J. Mol. Biol., 208, 99, (1989)
- 11) P.K.Qasba and S.K.Safaya, Nature, 308, 377, (1984)
- 12) E.M.Prager and A.C.Wilson, J. Mol. Evol., 27, 326, (1988)
- 13) K.Nitta and S.Sugai, Eur. J. Biochem., 182, 111 (1989)
- 14) W.Gilbert, Nature, 271, 501, (1978)
- 15) S.Tonegawa, Nature, 302, 575, (1983)
- 16) M.Go, Nature, 291, 90, (1981)
- 17) S.T.Rao and M.G.Rossman, J. Mol. Biol., 76, 241, (1973)
- 18) M.Go, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1964, (1983)
- 19) I.Kumagai, E.Tamaki, S.Kakinuma and K.Miura, J. Biochem.,
101, 511, (1987)
- 20) I.Kumagai, S.Kojima, E.Tamaki and K.Miura, J. Biochem., 102, 733, (1987)
- 21) Kumagai, I., Miura, K., J. Biochem., 105, 946, (1989)

- 22) K. Hayashi, T. Imoto, G. Funatsu and M. Funatsu, *J. Biochem.*, 58, 227, (1965)
- 23) N. Yamasaki, T. Tsujita, F. Sakiyama, K. Narita, *J. Biochem.*, 80, 409, (1976)
- 24) C. C. F. Blake, L. N. Johnson, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips and V. R. Sarma, *Proc. R. Soc. London Ser. B.*, 167, 378, (1967)

第 3 章

- 1) I. Kumagai, S. Takeda, T. Hibino and K. Miura, *Protein Engineering*, 3, 449, (1990)
- 2) H. Kaji, I. Kumagai, A. Takeda, K. Miura and T. Samejima, *J. Biochem.*, 105, 143, (1989)
- 3) T. Miki, T. Yasukochi, H. Nagatani, M. Furuno, T. Orita, H. Yamada, T. Imoto and T. Horiuchi, *Protein Engineering*, 4, 327, (1987)
- 4) S. Utsumi, C-S. Kim, T. Sato, and M. Kito, *Gene*, 71, 349, (1988)
- 5) T. Sato, H. Matui, S. Shibahara, T. Kobayashi, Y. Morinaga, N. Kashima, S. Yamasaki, J. hamuro and T. Taniguchi, *J. Biochem.*, 101, 525, (1987)
- 6) 鍋島成泰、大川秀明、蛋白質核酸酵素 臨時増刊 遺伝子操作 1990, 2688, (1990)
- 7) K. Nitta, N. Kita, K. Kuwajima and S. Sugai, *Biochem. Biophys. Acta.*, 490, 200, (1977)
- 8) V. P. Pigiet and B. J. Schuster, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 83, 7643, (1986)
- 9) L. Lindahl and H. J. Vogel, *Anal. Biochem.*, 140, 394, (1984)
- 10) J. Brosius, *Gene*, 27, 161, (1984)
- 11) F. W. Studier and B. A. Moffatt, *J. Mol. Biol.*, 189, 113, (1986)

第 4 章

- 1) T. Imoto, L. N. Johnson, A. C. T. North, D. C. Phillips and J. A. Rupley, *Enzymes*, 7, 665, (1971)

- 2) A. Jung, A. E. Sippel, M. Grez and G. Schutz, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 77, 5759, (1980)
- 3) R. H. Richardson and K. Brew, J. Biol. Chem., 255, 3377, (1980)
- 4) Warm, Biochemistry, 13, 768, (1974)
- 5) R. H. Richardson and K. Brew, J. Biol. Chem., 255, 3377, (1980)
- 6) K. Nitta and S. Sugai, Eur. J. Biochem., 182, 111, (1989)
- 7) T. Imoto, L. S. Forster, J. A. Rupley and F. Tanaka, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 69, 1151, (1972)
- 8) C. C. F. Black, L. N. Johnson, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips, and V. R. Sarma, Proc. R. Soc. London Ser. B, 167, 378, (1967)
- 9) B. A. Malcolm, S. Rosenberg, M. J. Corey, J. S. Allen, A. Baetselier, J. F. Kirsch, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 86, 133, (1989)
- 10) M. Go, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80, 1964, (1983)
- 11) M. Ikeguchi, K. Kuwajima and S. Sugai, J. Biochem., 99, 1191, (1986)
- 12) 第 1 2 回分子生物学会 佐々木幸生、沢野博志、河本恭子、橘秀樹、仙台 (1989)
- 13) T. E. Barman, Eur. J. Biochem., 83, 465, (1978)
- 14) H. Yamada, T. Fukumura, Y. Ito, T. Imoto, Anal. Biochem., 146, 71, (1985)

第 5 章

- 1) S. Takeda, E. Tamaki, K. Miura and I. Kumagai, Biochem. Biophys. Res. Commun., 173, 741, (1990)
- 2) 鍋島成泰、大川秀朗、蛋白質核酸酵素 臨時増刊 遺伝子操作 1990, 2688, (1990)
- 3) A. Miyahara, T. Imamura, M. Araki, K. Sugawara, N. Ohtomo and K. Mastubara, J. Virol., 59, 176, (1986)
- 4) T. E. Barman, Biochem. Biophys. Acta, 214, 242, (1970)
- 5) C. H. W. Hirs, Methods Enzymol., 11, 199, (1967)

第 6 章

- 1) T. S. Lopes, J. Klootwijk, A. E. Veenstra, P. C. van der Aar, H. van Heerikhuizen, H. A. Raue and R. J. Planta, *Gene*, 79, 199, (1989)
- 2) 原島俊、大島泰治、*化学と生物*, 21, 126, (1983)
- 3) G. I. Bell, L. J. Degnnero, D. H. Gelfand, R. V. Bishop, P. Valenzuela and R. V. Rutter, *J. Biol. Chem.*, 252, 8118, (1977)
- 4) D. R. Cryer, R. Eccleshall and J. Marmur, *Methods in Cell Biol.*, 12, 39, (1975)
- 5) P. Valenzuela, G. I. Bell, F. R. Masiari, L. J. Degennaro and W. J. Rutter, *Nature*, 267, 641, (1979)
- 6) J. W. Szostak and R. Wu, *Plasmid*, 2, 536, (1979)
- 7) J. R. Broach, V. R. Guarascio, M. Jayaram, *Cell*, 29, 227, (1982)

第 7 章

- 1) M. E. Digan, S. V. Lair, R. A. Brierley, R. S. Siegel, M. E. Williams, S. B. Ellis, P. A. Kellaris, S. A. Provow, W. S. Craig, G. Velicelebi, M. M. Harpold and G. P. Thill, *Bio/Technology*, 7, 160, (1989)
- 2) B. A. Malcolm, K. P. Wilson, B. W. Matthews, J. F. Kirsch and A. C. Wilson, *Nature*, 345, 86, (1990)
- 3) M. Ohgushi, A. Wada, *FEBS lett.*, 164, 21, (1983)
- 4) M. Kikuchi, Y. Yamamoto, Y. Taniyama, K. Ishimaru, W. Yoshikawa, Y. Kaisho and M. Ikehara, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 9411, (1988)
- 5) K. R. Acharya, D. I. Stuart, N. P. C. Walker, M. Lewis and D. C. Phillips, *J. Mol. Biol.*, 208, 99, (1989)
- 6) K. E. Hopper and H. A. McKenzie, *Mol. Cell. Biochem.*, 3, 93, (1974)

第 8 章

- 1) C. T. Chung, S. L. Niemela, and R. H. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*,

- 86, 2172, (1989)
- 2) H. Itoh, Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura, *J. Bacteriol.*, 153, 163, (1983)
 - 3) J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, *Molecular Cloning*, 1, 25, (1989)
 - 4) J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, *Molecular Cloning*, 1, 90, (1989)
 - 5) W. Kramer and H.-J. Fritz, *Methods Enzymol.*, 154, 350, (1987)
 - 6) Y. Morinaga, T. Franceschini, S. Inouye and M. Inouye, *Bio/Technology*, 2, 636, (1984)
 - 7) F. Sanger, S. Nicklen and A. R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74, 5463, (1977)
 - 8) T. Imoto, L. N. Johnson, A. C. T. North, D. C. Phillips and J. A. Rupley, *Enzymes*, 7, 665, (1971)
 - 9) T. Segawa and S. Sugai, *J. Biochem.*, 93, 1321, (1983)
 - 10) A. Bensadoun and D. Weinstein, *Anal. Biochem.*, 70, 241, (1976)
 - 11) U. K. Lamli, *Nature*, 227, 680, (1970)
 - 12) D. K. Fitzgerald, B. Colvin, R. Mawal and K. E. Ebner, *Anal. Biochem.*, 36, 43, (1970)
 - 13) K. Brew, T. C. Vanaman and R. L. Hill, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 59, 491, (1987)

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました本学教授三浦謹一郎博士に深く感謝いたします。

研究を進めるにあたり、終始有益な御指導、御助言を賜りました本学助教授熊谷泉博士に深く感謝いたします。

折りに触れ適切な御助言を賜りました本学助手小島修一博士、DNA合成等に関して御指導を賜りました本学助手平尾一郎博士に深く感謝いたします。

ヤギ α -ラクトアルブミンを供与していただいた北海道大学理学部須貝新太郎博士、桑島邦博博士に感謝いたします。

本研究をまとめるにあたり、共同実験者として協力していただきました砂田太氏、長田真理子女史、谷本朋陽氏、椎橋由佳女史、島瀬奏子女史、前仲勝実氏に感謝いたします。

具体的な実験操作において有益な御助言を賜りました青山学院大学理工学部助手梶裕之博士に感謝いたします。

日頃いろいろな面で協力していただきました当研究室の方々に感謝いたします。

精神的、経済的に私を支えて下さいました両親、親戚、友人の方々に感謝いたします。

