

博士論文

カイクガ前胸腺刺激ホルモンレセプターの
新規構造の解明とそのリガンドの調製

此上 祥史

目次

略号表

序論	1
第1章 カイコガ Torso の二量体構造の解明	
1-1. はじめに	11
1-2. 抗 FLAG 抗体に選択とカイコガ Torso の発現確認	11
1-3. カイコガ Torso は PTTH 刺激依存的に自己リン酸化する	11
1-4. カイコガ Torso の多量化を検出できる架橋剤の選択	12
1-5. カイコガ Torso は PTTH で刺激したときに「二量体」を形成している	12
1-6. カイコガ Torso はリガンド刺激前からジスルフィド架橋を介して二量体を形成している	13
1-7. カイコガ Torso の二量体形成に関与する分子間ジスルフィド架橋は細胞外領域には存在しない	13
1-8. カイコガ Torso の二量体形成に関与する分子間ジスルフィド架橋は膜貫通領域に存在する	14
1-9. C381/393/394F 変異体は PTTH 刺激に対して正常に応答しない	15
1-10. 野生型と C381/393/394F 変異体は細胞外領域の構造が異なる	16
第1章の考察とまとめ	17
第1章の図	20
第2章 PTTH 調製法の確立 - NMR を用いた相互作用解析に向けて -	
2-1. はじめに	30
2-2. カイコガ PTTH の分泌産生に適した分泌シグナル配列の選択	30
2-3. 二量体カイコガ PTTH を効率的に得られる培養時間の検討	31
2-4. 硫酸アンモニウムによるカイコガ PTTH の濃縮	32
2-5. Ni ²⁺ -NTA カラムクロマトグラフィーによる精製	33
2-6. ゲル濾過クロマトグラフィーによる精製	33
2-7. 逆相 HPLC による精製と最終精製品の純度と活性の確認	34
2-8. NMR スペクトルを用いたカイコガ PTTH の Torso 相互作用部位の解析に向けて	34
2-9. カイコガ PTTH の非標識クロレラ培地を用いた培養での発現確認	35
第2章の考察とまとめ	37
第2章の図	38
総括	49
実験の部	51
謝辞	62
引用文献リスト	64
発表論文	72

略号表

Bis-Tris; Bis(2-hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl)methane
BS³; Bis (sulfosuccinimidyl)suberate
BSA; Bovine serum albumin
CBB; Coomassie brilliant blue
cDNA; Complementary deoxyribonucleic acid
DTT; Dithiothreitol
EDTA; Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF; Epidermal growth factor
ERK; Extracellular signal-regulated kinase
FBS; Fetal bovine serum
HBS; HEPES-buffered saline
HEPES; 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid
HPLC; High performance liquid chromatography
HRP; Horseradish peroxidase
HSQC; Heteronuclear single-quantum correlation
IB; Immunoblotting
IgG; Immunoglobulin G
IP; Immunoprecipitation
MES; 2-Morpholinoethanesulfonic acid
MOPS; 3-Morpholinopropanesulfonic acid
NMR; Nuclear magnetic resonance
NTA; nitrilotriacetic acid
PAGE; Polyacrylamide gel electrophoresis
PCR; Polymerase chain reaction
PMSF; Phenylmethylsulfonyl fluoride
PTTH; Prothoracicotropic hormone
PVDF; Polyvinylidene difluoride
RNA; Ribonucleic acid
SDS; Sodium dodecyl sulfate
SS; Signal sequence
Sulfo-BSOCOES; Sulfo-bis[2-(sulfosuccinimidooxycarbonyloxy)ethyl]
Sulfo-DSG; Sulfo-disuccinimidyl glutarate
Sulfo-DST; Sulfo-disuccinimidyl tartarate
Sulfo-EGS; Sulfo-ethyleneglycol bis(sulfosuccinimidylsuccinate)
TBS; Tris-buffered saline
Tris; Tris(hydroxymethyl)aminomethane

序論

0-1. 昆虫の前胸腺刺激ホルモンとその働き

昆虫の前胸腺刺激ホルモン（Prothoracicotropic hormone; PTTH）は、脳内の二対の神経分泌細胞で産生される神経ペプチドで、脳に繋がっている側心体を通してアラタ体から体液中へ分泌されることが報告されている¹。体液中の PTTH は、前胸腺と呼ばれる器官に発現している細胞膜上の標的分子（レセプター）に作用して、細胞内のシグナル伝達経路を活性化することで、昆虫の脱皮ホルモンであるエクジソンの産生・分泌を促し、最終的にその昆虫の脱皮や変態などの現象を引き起こすことが知られている²。昆虫などの外骨格動物にとって脱皮・変態は昆虫が自身の体をより大きく成長させるための重要な発育過程であることから、PTTH はそれらの制御を担う非常に重要なペプチドホルモンの 1 つであると考えられている。

0-2. 前胸腺刺激ホルモンの構造

1990 年、カイコガ成虫の脳から単離精製された PTTH の N 端 13 残基のアミノ酸配列³をもとに cDNA の全塩基配列が同定され、224 個のアミノ酸残基から構成されるペプチド鎖として翻訳されることが明らかにされた⁴。その同定されたアミノ酸配列と、カイコガ PTTH の天然物の N 端領域のアミノ酸配列から、活性をもつ成熟体 PTTH は 109 個のアミノ酸残基からなるペプチド鎖で構成されていることが明らかになった（図 0-1）。さらに、カイコガ PTTH は一本のペプチド鎖内に 7 個の Cys 残基をもっており（図 0-2）、その鎖内で 3 本、鎖間で 1 本と計 7 本のジスルフィド架橋をもつ二量体構造をとっていることが明らかにされている^{5,6}

（図 0-3）。また、そのカイコガ PTTH の cDNA の塩基配列をもとにして、他の鱗翅目昆虫の PTTH 遺伝子がいくつか同定されているが⁷⁻¹⁴、カイコガ PTTH とのアミノ酸配列の同一性は 40～60% しかないことが明らかになっている（図 0-4）。例えば、カイコガの PTTH のアミノ酸配列は、タバコスズメガのものと 58% 一致するが、他の神経ペプチド、例えば、羽化ホルモン（Ecdysis hormone）^{15,16} では 81%、休眠ホルモン（Diapause hormone）^{17,18} では 83% のアミノ酸配列が一致することを考えると、PTTH のアミノ酸配列の相同性はかなり低いように思われる。しかし、立体構造の形成・維持に重要だと考えられるジスルフィド架橋を構成する Cys 残基の数や位置は非常によく保存されているので（図 0-4）、いずれの昆虫種の PTTH も似たような立体構造をとっているものと考えられる。

0-3. 前胸腺刺激ホルモンの交差活性

1990 年代、同定された cDNA の塩基配列をもとに、いくつかの昆虫種の PTTH がリコンビナントタンパク質として調製され、生理学的な研究に用いられるようになった。そこでは、リコンビナント PTTH の生物活性は、除脳蛹（蛹脱皮の直前に脳を取り出した蛹）や結紮幼虫（首の根本を縛った幼虫）など、脳から分泌される脱皮誘導因子を首から下に伝えることができなくなるようにした虫個体に対するアポリシス（脱皮時に見られる、表面のクチクラ層とその下の上皮細胞層の乖離）の誘導を観測することで、確認されてきた。そのような生物活性検定で、リコンビナントのカイコガ PTTH は、1 個体あたり 0.3 ng 以上でカイコガの脱皮を誘導することが報告されている^{19,20}。ところが、このカイコガ PTTH は 1000 ng を用いても同じ鱗翅目昆虫であるタバコスズメガの脱皮は誘導しなかった^{19,20}。一方で、リコンビナン

トのタバコスズメガ PTTH は 0.3 ng 以上でタバコスズメガの脱皮を誘導したが、1000 ng を用いてもカイコガの脱皮は誘導しなかった^{7,19,20}。このことは、PTTH が異なる昆虫種間で交差活性をほとんど示さない非常に高い標的特異性をもつペプチドホルモンであることを示している。したがって、PTTH のレセプターはリガンドの構造上の違いを厳格に認識しているものと考えられ、PTTH とそのレセプターとの相互作用は非常に魅力的な研究対象であるにもかかわらず、肝心の PTTH レセプターは長い間明らかにされてこなかった。

0-4. 前胸腺刺激ホルモンレセプターTorso の発見

そのような状況の中、2009 年、PTTH のレセプターが、ショウジョウバエの胚の前後軸を決定する因子として同定された遺伝子 *torso*²¹ の産物「Torso」であることが報告された²²。また、Torso は、細胞内領域にチロシンキナーゼドメインをもち、一本のペプチド鎖が細胞膜を一回だけ貫通するタイプのチロシンキナーゼ型レセプターファミリーに属することが明らかにされた（図 0-5）²³。チロシンキナーゼ型レセプターファミリーは、G タンパク質共役型レセプターファミリーなどと並んで細胞膜レセプターの主要なファミリーの 1 つであり²⁴、上皮成長因子（EGF）レセプターや、インスリンレセプターなどがこのレセプターファミリーに属している²⁵。一般に、チロシンキナーゼ型レセプターは、リガンド刺激に応じて、それら自身の細胞内領域の Tyr 残基をリン酸化（自己リン酸化）することで活性型となり、自己リン酸化をきっかけとして細胞内のシグナル伝達経路を活性化することが明らかにされている²⁵。しかし、この自己リン酸化は、1 つのレセプター分子が自己分子内の Tyr 残基をリン酸化するのではなく、2 つのレセプター分子の細胞内領域同士が近づき、パートナーの Tyr 残基をリン酸化しあう transphosphorylation であると報告されており²⁶、チロシンキナーゼ型レセプターは、二量体以上の多量体を形成しなければ、自己リン酸化しないと考えられている。この多量化の様式は、EGF レセプターのように、リガンド刺激に応じて非共有結合的に会合し二量化するものと²⁷⁻²⁹、インスリンレセプターのように、リガンド刺激前からジスルフィド架橋を介して多量化しているものとに分類される³⁰⁻³²。

PTTH のレセプターが Torso という膜一回貫通タイプのチロシンキナーゼ型レセプターであることが明らかになった以降でも、PTTH 刺激時に生じるレセプターTorso の多量化や自己リン酸化といった現象は全く調べられてこなかった。そこで、本研究では、カイコガ PTTH と Torso の相互作用解析に先駆けて、Torso がどのような性質を持ったチロシンキナーゼ型レセプターなのかを明らかにすることにした。その結果、カイコガ Torso が非常に珍しい二量体構造をもつことが明らかになったので、それについて第 1 章で報告する。

先に述べたように、PTTH⁴ も Torso²³ もそれら自身の実体は 1980 年代に見つかっていたにも関わらず、それらがリガンドとレセプターの関係にあることが明らかにされたのは 2009 年になってからのことであった²²。PTTH のレセプターの発見に長い歳月がかかった最大の原因は、リガンドである PTTH をリコンビナントタンパク質として調製するのが難しかったからであると考えられる。例えば、PTTH のレセプターが Torso であることを報告した論文でも、私たちの研究室で過去に調製したカイコガ PTTH を分与したものが使用されており²²、活性のあるリコンビナント PTTH を安定して供給できる研究室は、国内外でも限られている。大

腸菌で発現させたリコンビナント PTTH はいずれも沈殿してしまうため、これまでは、その沈殿物を何とか可溶化しリフォールディングすることで、活性のある可溶性タンパク質に変換していた^{6-8,19}。変性して沈殿したタンパク質をリフォールディングする一般的な手法については総説なども出されてはいるが^{33,34}、PTTH のように複数のジスルフィド架橋をもつタンパク質のリフォールディングは特に難しい技術や経験を要する。将来的に、PTTH の核磁気共鳴 (Nuclear magnetic resonance; NMR) スペクトルを測定して Torso との相互作用解析を行いたいと考えているので、NMR で観測可能な安定同位体で標識した PTTH を大量に調製したい。しかし、これまでのリフォールディングを行う手法では安定同位体標識 PTTH の効率的な調製は難しいと考え、リフォールディング操作を経ずに活性化のある PTTH を調製する手法を検討したので、その結果を第 2 章で報告する。

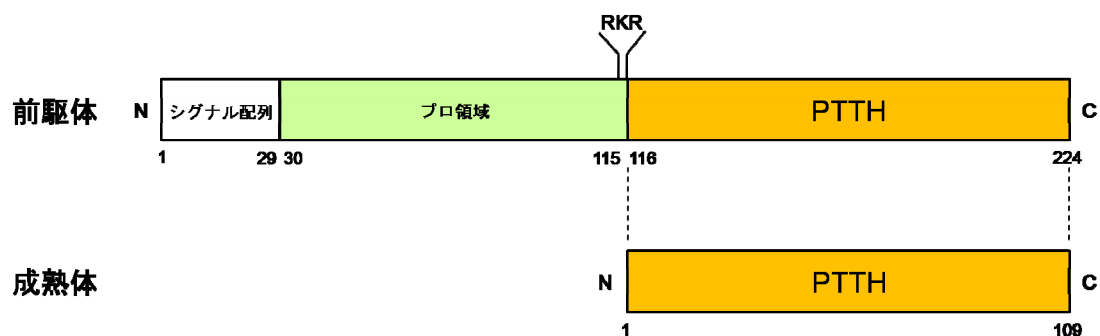


図 0-1. カイコガの PTH の前駆体タンパク質全長の模式図

カイコガ PTH の前駆体タンパク質は 224 個のアミノ酸残基で構成されている。カイコガの脳から単離精製された成熟体 PTH は、前駆体の 116 番目の Gly から 224 番目の Asn までに相当する。シグナル配列とプロ領域は細胞内小器官で切り離され、PTH が体液中へ分泌されると考えられている。プロ領域と PTH との境目には、塩基性アミノ酸が 3 残基連続した配列が存在する。

	10	20	30	40	50	60
カイコガ PTTH	GNIQVENQAI	PDPPCTCKYK	KEIEDLGENS	VPRFIETRNC	NKTQQPTCRP	PYICKESLYS
	70	80	90	100		
	ITILKRRETK	SQESLEIPNE	LKYRWVAESH	PVSVACLCTR	DYQLRYNNN	

図 0-2. カイコガ PTTH のアミノ酸配列

カイコガ PTTH のペプチド鎖は 109 個のアミノ酸残基から構成され、そのアミノ酸配列中には、赤色で示した 7 個の Cys 残基（15、17、40、48、54、96、98 番目）が存在する。また、黄色塗りで示した 41 番目から 43 番目には N 型糖鎖の付加配列が存在し、実際に、天然のカイコガ PTTH では 41 番目の Asn に糖鎖が付加されていることが報告されている^{5,35}。

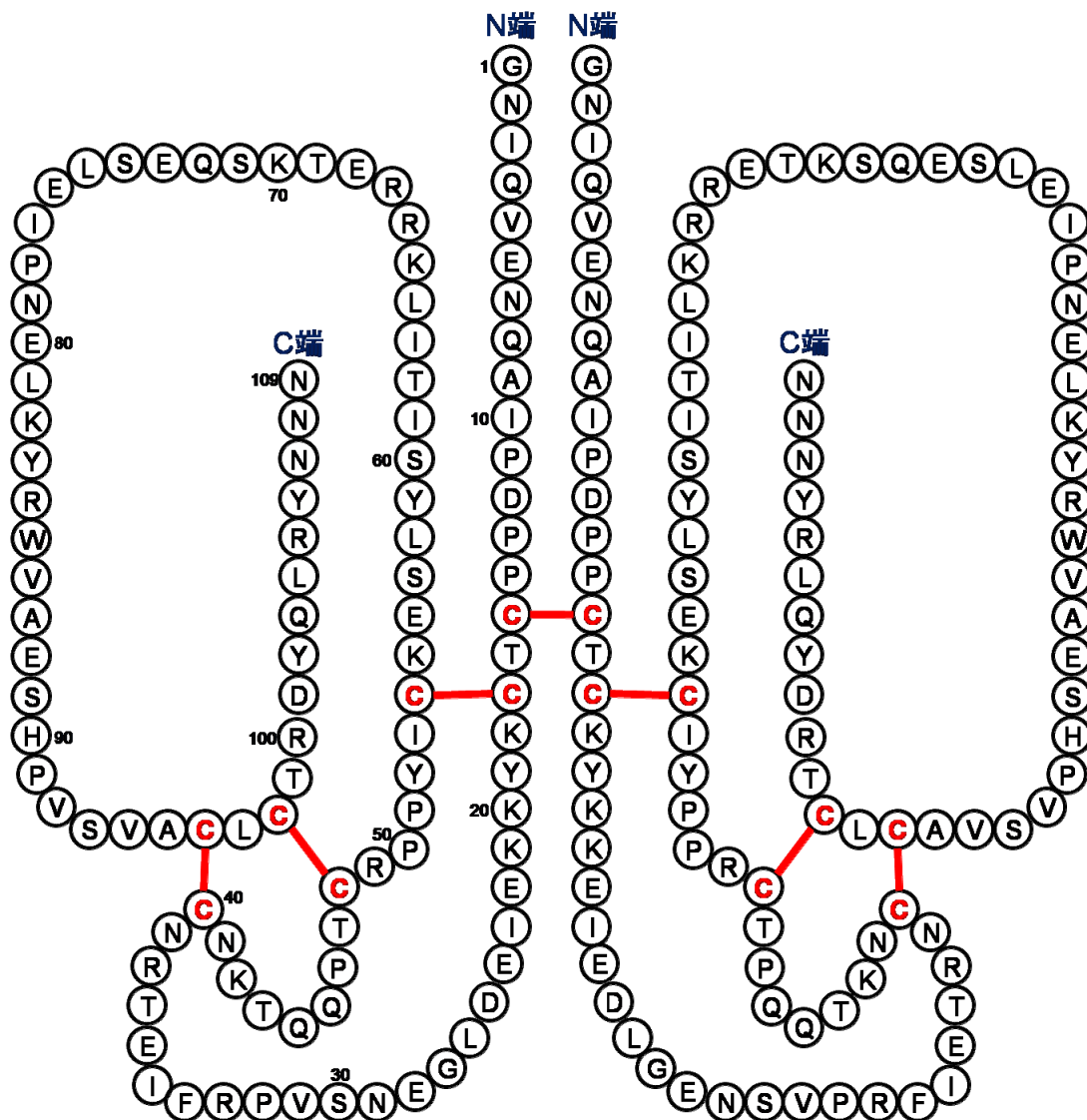


図 0-3. カイコガ PPTH の模式図

カイコガ PPTH はホモ二量体構造をとっており、一本のペプチド鎖内に 3 本 (Cys17–Cys54、Cys40–Cys96、Cys48–Cys98)、ペプチド鎖間に 1 本 (Cys15–Cys15') の、分子内に計 7 本のジスルフィド架橋をもつ。

カイコガ	1	GNIQVE---NQAIPDPPCTCKYKKEIEDLGENSEVPRFIETRNCNKTQQPTCRPPYICKESLYSI	61	
ヨトウガ	1	GNIKVGKHHNQAIPDPSACNPNTFQNWDETFQVRDIYTCCK---QSGPWYQCMENIYNL	61	
サクサン	1	GNIKR-----QNIIPDPPCSCGYTNETVDFFGENAFPRHVESRNCSELRQSSCLFPYVCKETLYDI	60	
ヤママユガ	1	GNIKR-----QNIIPDPPCSCGYTNETVDFFGENAFPRHVESRNCSELRQSSCLFPYVCKETLYDI	60	
セクロピアサン	1	GDIRREKH-NQAIDPPCTCGYTQTLLDFGKNAPRHVVTRNCSDLQQ-SCLFPYVCKETLYDV	63	
エリサン	1	GDLRREKH-NQAIDPPCSCGYTQTLLDFGKNAPRHVVTRNCSDQQ-SCLFPYVCKETLYDV	63	
タバコスズメガ	1	GNIKVEEY-NQAIPDPPCSCGYKKGFINLGENVFPSNIETINCSTNQQQSCPPYICKESIYEI	63	
オオタバコガ	1	GNIKVEKYNQALPDPPCAKCFSPNRTDLGENTYPRYIETRNCNQARQQSCRPYVCRENYYNI	64	
タバコガ	1	GNIKVEKYNQALPDPPCAKCFSPNRTDLGENTYPRYIETRNCNQARQQSCRPYVCRENYYNI	64	
アメリカタバコガ	1	GNIKVEKYNQALPDPPCAKCFSPNRTDLGENTYPRYIETRNCNQARQQSCRPYVCRENYYNI	64	
ニセアメリカタバコガ	1	GNIKVEKYNQALPDPPCAKCSSPNRTDLGENTYPRYVETRNCNQARQQSCRLPYVCRENYYNI	64	
シロイチモジヨトウ	1	GNIQVKKYNQALPDPPCTCNFSRAIEDFGENTYPRFVETGNCNQARQLACHRPYVCRENYYNL	64	
カイコガ	62	TILKRRETKSQESLE-IPNELKYRWVAESHPVSVACLCTRDYQLRYNN-----	109	カイコガ PTTH との 同一性
ヨトウガ	62	TVIKKKEVPHQYSQVILPAELQRKWWGEYRPIISVGCVCARDYYGTAN-----	108	42%
サクサン	61	SVLKRRQSTTOPSEK-VPNELKFRWIAEKWQISVGCVCCTRDYRDTINQD-----	107	52%
ヤママユガ	61	SVLKRRQSTTOPSEK-VPNELKFRWIAEKWQISVGCVCCTRDYRDTINQD-----	107	52%
セクロピアサン	64	NILKRRESATQISEE-VPRELKFRWIGEKWQISVGCVCCTRDYRNTTEDYQPRLLTKIVQQRDLS	125	44%
エリサン	64	NILKRRETSTQISEE-VPRELKFRWIGEKWQISVGCVCCTRDYRNTSTEDYQPRLL KIIQQRDLS	125	44%
タバコスズメガ	64	KILRRKSMAEKSLA-RPTDLEIGWVAESLPISVGCICCTRDYVI-----	106	58%
オオタバコガ	65	TIIRKKEFQNOATLEDIPHDLKFRWVAENYPVSVGCVCCTRDYYATEK-----	111	58%
タバコガ	65	TIIRKKEFQNOATLEDIPHDLKFRWVAENYPVSVGCVCCTRDYYATEK-----	111	58%
アメリカタバコガ	65	TIIRKKEFQNOATLEDIPHDLKFRWVAENYPVSVGCVCCTRDYYATEK-----	111	57%
ニセアメリカタバコガ	65	TIIRKKEFQNOATLDDMPHDLKFRWIAEYYPVSVGCVCCTRDYYATEK-----	111	53%
シロイチモジヨトウ	65	TVLKRREYQHQISSIDLPSDLKFRWIAEYRPVSVGCVCCTRDYYDIEN-----	111	55%

図 0-4. 鱗翅目昆虫の PTTH のアミノ酸配列の比較

カイコガ PTTH のアミノ酸配列と一致する部分を黒く反転させ、Cys 残基を赤色かつ黄色塗りで示した。各鱗翅目昆虫 PTTH のアミノ酸配列の、カイコガ PTTH との同一性は 40～60% 程度であるが、Cys 残基の数と位置はよく保存されている。

このアライメントの作成に用いた配列のアクセッション番号は以下の通り。カイコガ (*Bombyx mori*; NP_001037349.1) ; ヨトウガ (*Mamestra brassicae*; AB748456.1) ; サクサン (*Antheraea pernyi*; AAB05259.1) ; ヤママユガ (*Antheraea yamamai*; AAR23822.1) ; セクロピアサン (*Hyalophora cecropia*; AAG10517.1) ; エリサン (*Samia cynthia ricini*; AAA29964.1) ; タバコスズメガ (*Manduca sexta*; AAG14368.1) ; オオタバコガ (*Helicoverpa armigera*; AAP41131.1) ; タバコガ (*Helicoverpa assulta*; AAV41397.1) ; アメリカタバコガ (*Helicoverpa zea*; AAO18190.1) ; ニセアメリカタバコガ (*Heliothis virescens*; AAO18191.1) ; シロイチモジヨトウ (*Spodoptera exigua*; AAT64423.2)

カイコガ Torso 全長	シグナル配列				
	MYSEGKLSRV	FLIFAGFIIF	SLCGEVVSQR	YPPAPGLLKY	LEQDV ^C YSLY
	YYLN ^{WT} SLAD	^C KTNFEETGI	SDIPSTVKVR	^C QSKNSIRFE	TEPSEHWQLF
	ILMEHDFNDP	IPFTLIEPNN	VFGELITTAN	KEYQIWSTYL	DEYGTLDQWM
	EGPIVLKFDQ	RNQPPDDIKY	^N VTQEFQYII	^L GND ^S YTING	KFVW ^{NTT} GDR
	DL ^C FDIAN ^I ^C	QNTNMKHAKI	WPTAHPSFDV	ENLVLNDE ^C E	IHKVGIHGTT
	KHKYKTPS ^C F	ELPE ^C FLNNM	EPEIPQDVAI	AADQDLRGWW	NINVAWAKPH
	FQPEI ^{YN} VTV	RANMIRSIIL	^P G ^{NAT} ETTFR	NIPNTFLSAG	KI ^{YN} VS ^V YAI
	IGQKASHTSR	RAFTPGMLRW	^V WAGATAGAG	^{CA} AGG ^{LLA} AT	^{LL} CCGHRRAT
	SRVSQEDPDE	KTPKEDDVEI	IGIESGSADD	RWEVRS ^{DR} VL	^L HEVIGEGAF
	^G VVRG ^T LAP	^G GKSVAVKML	^K EFPSQEEVR	^S FRSEMELMK	^S VGAHPHVVS
	^L VGCCSGRKP	^L IVA ^{EY} CSRG	^D LLSYLRSSW	^D IIVSKHTAK	^Y NNNMDSMD
	^T SKLK ^{VH} KEH	^T KL ^{VV} NKLYE	^L QG ^{PC} ETELT	^P LDLLSFCRQ	^I AMGMEFLAA
	^N RIVHRDLAA	^R NVL ^V TEDKT	^L KIAD ^F GLSR	^D IYEENQYKQ	^K GNGKMPVKW
	^M ALES ^L TRRV	^Y TTQSDVWSF	^G VVIWEIVTV	^G GSPYPEVPA	^A RLVRS ^L RS ^G
	^Y RMPKPVNCS	^K PLYDIMRAC	^W NASPRDRPT	^F PELHQKLDD	^L LHSACANEY
	ITLEVDVDEA	PSTPKPQRYI	KMLIRGKLPW	SRESYERPVN	PTSNLYSSPP
	VIQTKTA				
					807

図 0-5. カイコガ Torso 全長のアミノ酸配列

カイコガ Torso は 807 個のアミノ酸残基から構成される 1 本のペプチド鎖として翻訳される。1～23 番目まではシグナル配列であり、370～394 番目が膜貫通領域（赤色塗り箇所）、さらに、449～749 番目までがキナーゼドメイン（緑色塗り箇所）とされている。細胞外領域（24～369 番目のアミノ酸まで）には 8 個の Cys 残基（46、61、81、203、210、239、259、265 番目）が存在し、N 型糖鎖が付加される可能性のある部位が 8 ヲ所ある（灰色塗り箇所）。また、膜貫通領域にも 3 個の Cys 残基（381、393、394 番目）が存在する。

第 1 章

カイコガ Torso の二量体構造の解明

1-1. はじめに

カイコガ PTTH でカイコガの前胸腺を刺激すると、前胸腺細胞内の細胞外シグナル制御キナーゼ (Extracellular signal-regulated kinase; ERK) のリン酸化が促進されることがすでに報告されている³⁶⁻³⁹。この現象は、カイコガ Torso を一過的に発現させたショウジョウバエ由来の S2 培養細胞を、カイコガ PTTH で刺激した場合にも観測される²²。これらの結果は、Torso は PTTH で刺激されると、結果として細胞内シグナル伝達経路下流の ERK のリン酸化を促進すること、また、Torso を介したこの一連のシグナル伝達過程は S2 培養細胞系を用いても再現可能であることを示している。

本研究では、S2 培養細胞に一過的に発現させたカイコガ Torso を用いて、カイコガ PTTH で刺激したときに見られる、Torso 自身の挙動 (状態変化) を調べることにした。しかしながら、カイコガ Torso に対する抗体は市販されていない。また過去に、共同研究先に抗カイコガ Torso 抗体の作製を依頼したことがあるが、特異性の高い抗体は得られなかった。そこで、カイコガ Torso 自身を簡便に検出するために、エピトープタグである FLAG タグ (DYKDDDDK) を付加して発現させることにした。その際に、PTTH が直接結合する細胞外領域よりも、細胞内領域にタグをつけた方が良いだろうと考え、FLAG タグ配列は C 端に付加することにした。

なお、この第 1 章でリガンド刺激に用いているカイコガ PTTH の調製法については第 2 章で報告する。

1-2. 抗 FLAG 抗体の選択とカイコガ Torso の発現確認

C 端に FLAG タグを付加したカイコガ Torso 全長 (TorsoFL-FLAG) の発現ベクター (pIZT-TorsoFL-FLAG) を S2 培養細胞にトランスフェクションし、ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS) を含む培地で 48 時間培養した。培養後、回収した S2 培養細胞を還元 SDS-PAGE (Laemmli ゲル⁴⁰) で分離した。

MBL 社の抗 FLAG 抗体#M020 を用いたときには、mock ベクター (空の pIZT ベクター) でトランスフェクションした場合にも複数のバンドが観測されたのに対して (図 1-1A)、同社の別の抗 FLAG 抗体#M185-3S を用いた場合には、pIZT-TorsoFL-FLAG でトランスフェクションしたときにのみ、バンドが 100 kDa 付近に観測された (図 1-1B)。TorsoFL-FLAG のアミノ酸配列から計算した分子量は約 90 kDa であることから、このバンドが S2 培養細胞に発現した TorsoFL-FLAG を示していると考えられた。本研究では、これ以降、抗 FLAG 抗体#M185-3S を用いて TorsoFL-FLAG のイムノブロッティングを行うことにした。

なお、アミノ酸配列から計算した分子量 (約 90 kDa) より、SDS-PAGE 上で観測された TorsoFL-FLAG の分子量 (約 100 kDa) が若干大きいのは、糖鎖が付加していることが原因かもしれない。実際、カイコガ Torso の細胞外領域には、N 型糖鎖が付加する可能性のある配列が 8 ヲ所存在する (図 0-5)。

1-3. カイコガ Torso は PTTH 刺激依存的に自己リン酸化する

TorsoFL-FLAG を発現させた S2 培養細胞から回収した膜画分を 10 nM のカイコガ PTTH で刺激した後、TorsoFL-FLAG を界面活性剤で膜から抽出し抗 FLAG 抗体で免疫沈降して、その

リン酸化を観測した。カイコガ PTTH で刺激することで、TorsoFL-FLAG の Tyr 残基のリン酸化が明らかに促進された (図 1-2)。ここでは、TorsoFL-FLAG を発現している細胞の膜画分を調製して PTTH 刺激を行っているので、これは S2 培養細胞内の細胞質に存在する他のチロシンキナーゼによる間接的なリン酸化ではなく、Torso 自身によるリン酸化 (自己リン酸化) であると考えられる。先の論文では、PTTH 刺激による Torso の活性化を (ERK のリン酸化の促進を観測することで) 間接的に確認していたが²²、本研究では、自己リン酸化の観点から、PTTH 刺激によるカイコガ Torso の活性化をより直接的に示すことができた。

1-4. カイコガ Torso の多量化を検出できる架橋剤の選択

カイコガ Torso が PTTH 刺激依存的に自己リン酸化を引き起こすことが明らかになったので、その自己リン酸化は、おそらく細胞膜上でカイコガ Torso が多量体を形成することで transphosphorylation が起きたためではないかと考えた。そのような細胞膜レセプターの多量体形成の検出には、タンパク質分子間を化学的に架橋する「架橋剤」の使用が有効である。そこで、TorsoFL-FLAG を発現させた S2 培養細胞を 10 nM PTTH で 10 分間刺激した後、スペーサーの長さが異なる 4 種類の架橋剤 (Sulfo-DST, BS³ (Sulfo-DSS), Sulfo-BSOCOES, Sulfo-EGS) (図 1-3A) で 10 分間処理し、還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離して、抗 FLAG 抗体を用いたイムノブロッティングでバンドを検出した。

Sulfo-DST, Sulfo-BSOCOES, Sulfo-EGS を用いたときには、110 kDa の位置に単量体 TorsoFL-FLAG を示すバンドしか観測されなかったが、BS³ を用いたときには、多量体 TorsoFL-FLAG を示すと考えられるバンドが 250~260 kDa 付近に観測された (図 1-3B)。よって、カイコガ Torso は PTTH で刺激したときに多量体を形成していることがわかった。

また、架橋剤で処理しなかった場合にも TorsoFL-FLAG は 110 kDa の位置にバンドを示した。もし PTTH と Torso との間で架橋が形成されれば、SDS-PAGE 上でバンドの位置が PTTH 1 分子につき約 14 kDa だけ高分子量側にシフトするはずなので、Sulfo-DST, Sulfo-BSOCOES, Sulfo-EGS では、Torso 分子同士の間だけでなく、PTTH との間でも架橋が形成されていないことがわかった。

1-5. カイコガ Torso は PTTH で刺激したときに「二量体」を形成している

次に、カイコガ Torso が PTTH で刺激したときに形成している多量体がいっぱい何量体なのかを調べることにした。そこで、SDS-PAGE 上で、できる限り正確にその多量体の分子量を見積もるために、より広範囲の分子量のタンパク質を分離でき、多量体 TorsoFL-FLAG のような比較的大きなタンパク質の分子量の見積もりにも適用可能な Tris-Acetate ゲルを採用した⁴¹。

また、使用する架橋剤の濃度を高くすると、分子内で様々な形で架橋剤と反応してしまうためか、バンドがスメアーになる傾向がみられた。そこで、まず、バンドがスメアーになることなく TorsoFL-FLAG の多量体を検出するのに必要な最小限の濃度を調べたところ、0.03 mM 以上の BS³ を用いれば架橋された多量体のバンドが観測可能であることがわかった (図 1-4A)。

TorsoFL-FLAG を発現させた S2 培養細胞を 10 nM のカイコガ PTTH で刺激後、0.03 mM BS³

で架橋処理を行い、還元 Tris-Acetate SDS-PAGE で分離したところ、TorsoFL-FLAG の多量体および単量体を示すバンドはそれぞれ 236 kDa、105 kDa の位置に観測された (図 1-4B)。この結果から、TorsoFL-FLAG を PTTH で刺激したときに観測された多量体は「二量体」であると考えられた。

1-6. カイコガ Torso はリガンド刺激前からジスルフィド架橋を介して二量体を形成している

TorsoFL-FLAG を発現させた S2 培養細胞をカイコガ PTTH で刺激せずに 0.3 mM BS³ で架橋処理を行い、還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離したところ、PTTH で刺激したときと同じように二量体を示すバンドが観測された (図 1-5A)。これは、TorsoFL-FLAG の二量体形成がリガンド刺激非依存的であることを示している。さらに、カイコガ PTTH による刺激も BS³ による架橋処理も行わずに、TorsoFL-FLAG を非還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離したところ、二量体を示すバンドが強く観測された (図 1-5B)。TorsoFL-FLAG が還元 SDS-PAGE 上では架橋処理を施さないと単量体のバンドしか示さないこと (図 1-3B) を考え合わせると、TorsoFL-FLAG の二量体形成は、還元によって切断されるジスルフィド架橋を介したものであると考えられる。

一般に、カイコガ Torso のような一本鎖のチロシンキナーゼ型レセプター、例えば EGF レセプターは、リガンド刺激後に非共有結合的な会合によって二量体を形成する²⁷⁻²⁹。カイコガ Torso の二量体形成に見られる「リガンド刺激非依存的な多量体形成」、「ジスルフィド架橋を介した多量化」という特徴はむしろインスリンレセプターに似ている。しかし、インスリンレセプターは、Torso のような一本鎖のチロシンキナーゼ型レセプターではなく、2 本の α 鎖と 2 本の β 鎖との計 4 本のペプチド鎖から構成されるチロシンキナーゼ型レセプターである³⁰⁻³²。

さらに、カイコガ PTTH 刺激の有無で、二量体 TorsoFL-FLAG を示すバンドも単量体を示すバンドも、検出された位置に変化はなかった (図 1-5A)。このことから、BS³ でも、PTTH-Torso 複合体間には架橋していないことがわかった。おそらく、カイコガ PTTH と Torso とが複合体を形成しているときには、リガンド-レセプター間で架橋が形成されるのに適当な距離にそれぞれの遊離のアミノ基 (Lys 残基の側鎖やペプチド鎖の N 端) が存在しないのだろう。

1-7. カイコガ Torso の二量体形成に関与する分子間ジスルフィド架橋は細胞外領域には存在しない

二量体形成に関わる分子間ジスルフィド架橋が存在する部位を明らかにするために、カイコガ Torso の C 端からアミノ酸配列の一部を徐々に削っていった一連の変異体を設計し (図 1-6A)、S2 培養細胞に発現させて、非還元 SDS-PAGE で解析することにした。

まず、細胞内領域のチロシンキナーゼドメインの一部と C 端の tail を欠損させた変異体 $\Delta K1$ (1-589) と $\Delta K2$ (1-531) のうち、 $\Delta K1$ では発現が確認され、約 155 kDa、300 kDa、430 kDa の位置にバンドが観測されたが (図 1-6B の左のパネルの左から 2 番目のレーン)、 $\Delta K2$ は発現が見られなかった (図 1-6B の左のパネルの左から 3 番目のレーン)。次に、キナーゼドメイン全てと C 端の tail を欠損させた変異体 $\Delta K3$ (1-438) は発現が確認され約 60 kDa、110 kDa、

180 kDa の位置にバンドが観測されたが (図 1-6B の左のパネルの左から 4 番目のレーン)、膜貫通領域の直後までのアミノ酸配列をもち、細胞内領域を全て欠損した変異体 Δ IC (1-398) は発現が見られなかった (図 1-6B の左のパネルの左から 5 番目のレーン)。さらに、膜貫通領域の直前までのアミノ酸配列をもち、膜貫通領域と細胞内領域を全て欠損した EC 変異体 (1-366) は、細胞のライセートには発現が見られなかったが、培地中に分泌されていることが確認され、約 52 kDa の位置のみにバンドが観測された (図 1-6B の右のパネル)。

発現が確認された Δ K1、 Δ K3、EC のアミノ酸配列から計算した分子量はそれぞれ 65 kDa、48 kDa、40 kDa であり、糖鎖の付加も考慮するとそれぞれ約 75 kDa、58 kDa、50 kDa の位置に単量体のバンドが観測されるはずである。実際に、 Δ K1 は還元 Bis-Tris SDS-PAGE 上で約 75 kDa の位置にバンドが観測されたので (図 1-6C)、155 kDa のバンドは二量体、300 kDa と 430 kDa のバンドはそれ以上の数の Torso 分子が会合した高分子量の多量体を示していると考えられる。また、 Δ K3 (1-438) の 60 kDa のバンドは単量体、110 kDa のバンドは二量体、そして 180 kDa のバンドは高分子量の多量体を示しており、EC の 52 kDa のバンドは単量体を示していると考えられる。これらの結果は、膜貫通領域周辺も含む Δ K1 や Δ K3 には二量体形成能が残っているが、細胞外領域だけの EC はジスルフィド架橋を介した二量体を形成しないことを示している。

また、 Δ K1 や Δ K3 では、二量体のバンド以外に、単量体や高分子量の多量体を示すバンドも観測された。 Δ K3 の大部分が単量体として観測された理由はわからないが、高分子量の多量体が観測された原因は、細胞内領域を大きく削ったせいだと考えられる。チロシンキナーゼドメインは一般に N 端の小さな lobe と C 端の大きな lobe からなるグロビュラーな構造をとっていることが、他のタンパク質のキナーゼドメインの結晶構造から明らかにされており⁴²、そのドメインの半分以上を削ったことで細胞内領域における立体障害が減少し、二量体より高分子量の多量体が形成しやすくなったのだろうと思われる。チロシンキナーゼ型のレセプターではないが、Wnt のレセプターである Xfz3 や、E-カドヘリンは細胞内領域を削ることで多量体を形成しやすくなることが報告されている^{43,44}。

EC が二量体を形成せず、 Δ K1、 Δ K3 には二量体形成能が残っているという結果から、カイコガ Torso 二量体間のジスルフィド架橋形成に関わるジスルフィド架橋は膜貫通領域周辺に存在し、細胞外領域に存在する 8 個の Cys 残基 (Cys46、Cys61、Cys81、Cys203、Cys210、Cys239、Cys259、Cys265) は分子間ジスルフィド架橋の形成には関与しないものと考えられた。

1-8. カイコガ Torso の二量体形成に関与する分子間ジスルフィド架橋は膜貫通領域に存在する

カイコガ Torso の膜貫通領域には 3 つの Cys 残基 (Cys381、Cys393、Cys394) が存在している (図 0-5)。これらの Cys 残基の二量体間のジスルフィド架橋への関与を調べるために、それら 3 つ全てを、比較的側鎖の構造の似ている Ala に置換した C381/393/394A 変異体を作製し、S2 培養細胞に一過的に発現させた。しかし、C381/393/394A 変異体は還元 Bis-Tris SDS-PAGE 上でバンドを示さず (図 1-7A の左のレーン)、発現が確認できなかった。おそら

く、Cys を Ala のようなあまり疎水性が高くないアミノ酸残基に置換すると、Torso の膜貫通領域の性質が変わってしまって発現に影響を与えてしまったのだろう。

そこで、膜貫通領域における疎水性を考慮して、まずは、381 番目の Cys を Leu、Phe、Trp に置換した変異体 (C381L、C381F、C381W) を作製し、それらを S2 培養細胞で一過的に発現させてみた。各変異体を発現させた細胞のライセートを、還元 Bis-Tris SDS-PAGE で解析してみたところ、まず、C381F 変異体では、110 kDa の位置に野生型 Torso と同程度の濃さの単量体のバンドが現れた (図 1-7B の左から 1 番目と 4 番目のレーン)。これに対して、C381L 変異体も 110 kDa の位置に単量体のバンドを示したが (図 1-7B の左から 3 番目のレーン)、野生型に比べて発現レベルは非常に低かった。さらに、C381W 変異体では発現は見られなかった (図 1-7B の左から 5 番目のレーン)。これらの結果から、Torso 膜貫通領域の性質を変えずに Cys を置換するには Phe を用いるのがよいと考えられた。

381 番目の Cys 残基の置換実験の結果にもとづき、膜貫通領域の 3 つの Cys 全てを Phe に置換した C381/393/394F 変異体を作製した。C381/393/394F 変異体を S2 培養細胞に一過的に発現させ、その細胞のライセートを還元 Bis-Tris SDS-PAGE で解析したところ、約 110 kDa の位置に単量体のバンドが観測され (図 1-7C)、発現がみられた。さらに、野生型 Torso と同じように (図 1-7D の左のレーン)、非還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離したところ、C381/393/394F 変異体では単量体のバンドしか観測されず (図 1-7D の右のレーン)、この変異体は分子間ジスルフィド架橋を介した二量体を形成しないことがわかった。よって、カイコガ Torso の二量体形成に関わる分子間ジスルフィド架橋は膜貫通領域に存在することが明らかになった。

1-9. C381/393/394F 変異体は PTTH 刺激に対して正常に応答しない

カイコガ Torso は膜貫通領域にあるジスルフィド架橋を介して二量体を形成しているという非常に稀な特徴をもつことが明らかになったので、その分子間ジスルフィド架橋の役割を調べてみることにした。

まず、S2 培養細胞に一過的に発現させた C381/393/394F 変異体を 10 nM のカイコガ PTTH で刺激して自己リン酸化の有無を調べたところ、野生型と同様に、C381/393/394F 変異体でも自己リン酸化が起こっていた (図 1-8A の右のレーン)。しかし、野生型では、PTTH で刺激しないときには自己リン酸化がほとんど観測されないのに対して (図 1-8A の左のレーン)、C381/393/394F 変異体では、PTTH で刺激しなくても刺激した場合と同等のレベルの自己リン酸化が観測された (図 1-8A の真ん中のレーン)。この結果は、C381/393/394F 変異体が PTTH 刺激前からすでに自己リン酸化していることを示している。よって、カイコガ Torso は、膜貫通領域の分子間ジスルフィド架橋を失うと、自発的に自己リン酸化してしまうことが明らかになった。

たとえ自発的であっても、C381/393/394F 変異体が自己リン酸化するには「二量化」している必要があるが、C381/393/394F 変異体は分子間ジスルフィド架橋を介した二量体を形成していなかった (図 1-7D)。そこで、C381/393/394F 変異体を一過的に発現させた S2 培養細胞を架橋剤 BS³ で処理し還元 Bis-Tris SDS-PAGE で解析してみたところ、PTTH で刺激しても刺激しなくても約 240~250 kDa の位置に二量体を示すバンドが観測された (図 1-8B)。これは、

C381/393/394F 変異体が、PTTH 刺激の有無に関わらず非共有結合的な会合により二量体を形成していることを示している。よって、カイコガ Torso は、膜貫通領域の分子間ジスルフィド架橋がなくてもリガンド刺激前から非共有結合的に会合し二量体を形成していることが明らかになった。逆に言えば、分子間ジスルフィド架橋は、リガンド刺激によらない非共有結合的な会合を防ぐことで、自発的な自己リン酸化を抑制していると考えられる。おそらく、膜貫通領域の分子間ジスルフィド架橋が、二量体内での 2 分子の Torso を、自発的な自己リン酸化が起こらないような適切な配置に保っているのだろう。

さらに、C381/393/394F 変異体を一過的に発現させた S2 培養細胞を 10 nM カイコガ PTTH で刺激し、細胞内の ERK のリン酸化を観測した。対照として野生型を発現させた S2 培養細胞では PTTH で刺激すると細胞内の ERK のリン酸化が明らかに促進されたにも関わらず (図 1-8C の左のパネル)、C381/393/394F 変異体を発現させた S2 培養細胞では、PTTH で刺激しても刺激しなくても、細胞内の ERK のリン酸化のレベルに変化はなかった (図 1-8C の右のパネル)。この結果から、カイコガ Torso は、膜貫通領域の分子間ジスルフィド架橋を失うと、たとえリガンドによる刺激を受けても ERK のリン酸化に繋がる細胞内シグナル経路の活性化を引き起こせなくなってしまうことが明らかになった。

1-10. 野生型と C381/393/394F 変異体は細胞外領域の構造が異なる

カイコガ Torso 膜貫通領域の分子間ジスルフィド架橋が二量体内での Torso 2 分子の適切な配置を維持しているのであれば、その分子間架橋の有無で二量体の構造が異なってくるのではないかと考えた。そこで、分子間架橋をもつ野生型カイコガ Torso あるいは分子間架橋を欠く C381/393/394F 変異体を発現させた S2 培養細胞を、スパーサーの長さが異なる 3 種類の親水性の架橋剤 (Sulfo-DSG, BS³, Sulfo-EGS) で処理し、還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離して、抗 FLAG 抗体を用いたイムノブローディングでバンドを検出した。

分子間ジスルフィド架橋をもつ野生型は、Sulfo-DSG や BS³ で架橋処理を行ったときには、二量体のバンドを示したが、Sulfo-EGS で架橋処理を行ったときには二量体のバンドは示さず、単量体のバンドのみを示した (図 1-9 の左のパネル)。一方で、分子間ジスルフィド架橋を欠く C381/393/394F 変異体は、Sulfo-DSG や BS³ だけでなく、Sulfo-EGS で架橋処理を行ったときにも二量体のバンドを示した (図 1-9 の右のパネル)。よって、分子間架橋の有無で架橋剤に対する反応性が明らかに異なることがわかった。この実験で用いた架橋剤はいずれも親水性で膜に侵入・透過しないことから⁴⁵⁻⁴⁷、これらの結果は、膜貫通領域の分子間ジスルフィド架橋の有無で、Torso 細胞外領域の構造が異なることを示している。

野生型カイコガ Torso は膜貫通領域の分子間ジスルフィド架橋を介して二量体を形成していることから、その膜近傍領域同士は互いに接近していると考えられる。いずれの架橋剤も、アミノ基と反応して架橋を形成することから、おそらく膜近傍領域に存在する遊離のアミノ基 (例えば Lys341 や Lys354 の側鎖) の相対的な配置が分子間ジスルフィド架橋の有無で異なり、その結果として架橋剤に対する反応性に違いが見られたのではないかと考えられる。

第 1 章の考察とまとめ

カイコガ Torso はまったく新しい二量体構造をとっている

カイコガ Torso はそのアミノ酸配列から、当初、単純な一本鎖のチロシンキナーゼ型レセプターであると予想していた。そのため、EGF レセプターのように、リガンド刺激後に非共有結合的な会合によって二量体を形成するだろうと考えていた²⁷⁻²⁹。しかし、カイコガ Torso は、PTTH 刺激前から、ジスルフィド架橋を介して二量体を形成していることが明らかになった。リガンド刺激前からジスルフィド架橋を介して多量化しているチロシンキナーゼ型レセプターとしては、インスリンレセプターが知られている。しかし、インスリンレセプターの分子間ジスルフィド架橋は、全て細胞外領域に存在する^{30-32,48}。それに対して、カイコガ Torso は分子間ジスルフィド架橋を膜貫通領域にもつことが明らかになった。カイコガ Torso は、チロシンキナーゼ型レセプターとしてはまったく新しい二量体構造をとっていることが明らかになった。また、野生型のカイコガ Torso の非還元 SDS-PAGE では、PTTH 刺激によって、二量体よりも大きい多量体のバンドが観測されなかったことから、少なくとも野生型ではリガンド刺激によって二量体よりも大きい多量体は形成しないと考えられる。

膜貫通領域の酸化還元状態がどのようになっているのかは、よくわかっていないが、膜貫通領域の分子間ジスルフィド架橋を介して多量化している膜タンパク質は、カイコガ Torso 以外でも報告がある。例えば、ニューロトロピンのレセプターの 1 つである p75^{NTR} は、チロシンキナーゼ型のレセプターではないが、膜一回貫通タイプの膜タンパク質であり、膜貫通領域の分子間ジスルフィド架橋を介して二量体を形成している⁴⁹。

また、チロシンキナーゼ型レセプターでは報告されていないが、G タンパク質共役型レセプターやイオンチャネルなどの膜貫通領域にある Cys 残基は、パルミトイル酸という脂肪酸が付加（パルミトイル化）されていることがある。Cys の側鎖がパルミトイル化されると疎水性が高くなり、細胞膜への局在や機能の制御に影響を与えることが報告されている⁵⁰。カイコガ Torso の膜貫通領域にある Cys がパルミトイル化されているかどうかはわからないが、3 つの Cys 残基全てを Phe に置換した変異体 C381/393/394F もきちんと細胞膜上に発現していたことから、もし Torso がパルミトイル化されていたとしても、少なくともそれが細胞膜への局在に必須の修飾ではないと考えられる。

本研究では、カイコガ Torso 自身を簡便に検出するために、C 端に FLAG タグを付加したカイコガ Torso をショウジョウバエ由来の S2 培養細胞に一過的に発現させるという実験系を用いた。おそらく、培養細胞発現系は、発現量などに点において、天然のカイコガの前胸腺における状況とは大きく異なっていると考えられる。本研究でも、カイコガ前胸腺で発現している Torso も PTTH 刺激前からジスルフィド架橋を介して二量化しているのか調べたかったのだが、1-1 項で述べたように、特異性・力価が高い抗カイコガ Torso 抗体を入手することができなかった。本研究で、カイコガ Torso の細胞外領域をもち（24 番目から 366 番目まで）、培養液中に可溶性タンパク質として分泌発現される EC 変異体が作製できたので、今後、EC 変異体を大量に調製しそれを抗原にしてよい抗体が作製できれば、実際のカイコガ前胸腺で

もジスルフィド架橋を介して二量体を形成していることを確認できるようになるだろう。

また、PTTH 刺激によって Torso 自身が活性化（自己リン酸化）し、それによって細胞内のシグナル経路が活性化（ERK のリン酸化が促進）されることが観測されたことから、C 端に FLAG タグを付加したこと自体は、少なくとも Torso のリガンド刺激に対する応答には影響しなかったものと考えている。

カイコガ Torso の膜貫通領域に存在する分子間ジスルフィド架橋は、正常なリガンド応答性を維持するのに必要である

本研究で、膜貫通領域の Cys を様々なアミノ酸に置換した変異体を作製して発現を検討したことで、膜貫通領域の分子間架橋を欠く C381/393/394F 変異体の作製に成功した。野生型 Torso とこの変異体との比較により、カイコガ Torso の膜貫通領域にある分子間ジスルフィド架橋が、自発的な自己リン酸化を抑え、リガンド刺激に対する正常な応答性を維持していることを明らかにした。このようなリガンド刺激なしに起こってしまう自己リン酸化を抑制する機構は他のチロシンキナーゼ型レセプターでも見られる。例えば、EGF レセプターでは、細胞外領域を削るとリガンド刺激によらない自発的な自己リン酸化が引き起こされることが報告されている²⁶。EGF レセプターでは、リガンドが結合していないときには、約 620 個のアミノ酸残基で構成される大きな細胞外領域が 2 分子のレセプターの接近を妨げて二量化を抑制することで自発的な自己リン酸化を抑え、リガンドが結合してはじめて細胞外領域がスリムな構造に変化して二量化・自己リン酸化が起こると考えられている。それに対して、約 340 個のアミノ酸残基で構成される比較的小さな細胞外領域をもつカイコガ Torso では、2 分子のレセプターの接近を妨げる程の大きさが細胞外領域にはないので、代わりに膜貫通領域の分子間ジスルフィド架橋が二量体内で 2 分子のレセプターを適切な配置に保つことで、リガンド刺激によらない自発的な自己リン酸化を抑制しているものと思われる。

本研究で行った架橋剤処理では、野生型カイコガ Torso や C381/393/394F 変異体と PTTH との間には架橋がかからなかった。野生型は、リガンド刺激依存的に自己リン酸化が観測されたので、PTTH と結合していると考えられるが、リガンド刺激依存的な応答を示さない C381/393/394F 変異体が実際に PTTH と結合しているかどうかはわからない。今後、表面プラズモン共鳴などを用いて Torso がどの程度の親和性で PTTH と結合するのか、また野生型と変異体との間でその親和性に差が見られるかなどを明らかにする予定である。

また、C381/393/394F 変異体では自発的に自己リン酸化したにもかかわらず、たとえ PTTH で刺激をしても細胞内の ERK のリン酸化を促進しなかった。これは、C381/393/394F 変異体では、野生型でのリガンド刺激依存的な自己リン酸化における Tyr 残基とは異なる Tyr 残基がリン酸化されているためかもしれない。ショウジョウバエの Torso では、細胞内領域にある 6 個の Tyr 残基が自己リン酸化されることが報告されている⁵¹。その 6 残基のうち、Tyr767 と Tyr772 はチロシンキナーゼドメインのいわゆる活性化ループ（Ala758 から Ala787 まで）に存在し、これら 2 つの Tyr 残基を Phe に置換すると、ショウジョウバエ Torso の自己リン酸化は著しく低下することが報告されている⁵¹。カイコガ Torso では、野生型のリガンド刺激依存的な自己リン酸化であっても、C381/393/394F 変異体の自発的な自己リン酸化であっても自己リ

ン酸化自体は起こっていることから、ショウジョウバエ Torso の Tyr767 と Tyr772 に相当する Tyr633 と Tyr638 はリン酸化されているものと考えられる。一方、ショウジョウバエ Torso では、Tyr630 がリン酸化されることで、細胞内シグナル伝達経路において ERK の上流に位置しているアダプタータンパク質 Corkscrew がリクルートされることが報告されている^{52,53}。カイコガ Torso では、おそらく Tyr541 あるいは Tyr542 がショウジョウバエ Torso の Tyr630 に相当し、それは野生型のリガンド刺激依存的な自己リン酸化ではリン酸化されているが、C381/393/394F 変異体の自発的な自己リン酸化ではリン酸化されていないと考えられる。また、カイコガ Torso は細胞内領域に 15 個の Tyr 残基を持つことから、自発的な自己リン酸化で本来の野生型 Torso におけるリン酸化部位とは異なる Tyr 残基がリン酸化され、ERK には繋がらない別の細胞内シグナル伝達経路が活性化されている可能性はあるかもしれない。カイコガ Torso の自己リン酸化部位の同定は重要で興味深い研究テーマの 1 つである。例えば、15 個の Tyr 残基を 1 つずつ Phe に置換した一連の変異体を作製し、その自己リン酸化や細胞内シグナル経路の活性化を調べれば、細胞内経路の活性化に関わる自己リン酸化部位を決定することができるだろう。また、野生型と C381/393/394F 変異体の自己リン酸化部位を比較すれば、ERK のリン酸化に重要な Tyr 残基を同定することが可能となるだろう。

カイコガ PTTH と Torso との相互作用解析には膜貫通領域を含む Torso 全長を用いるべきである

本研究を行っている途中、2015 年 11 月にカイコガ PTTH と Torso 細胞外領域の一部 (24–287) との複合体の X 線結晶構造が報告された⁵⁴。報告された結晶構造では、2 分子の Torso 細胞外領域が 1 分子の PTTH を挟み込むように結合している。一方、溶液中では、Torso 細胞外領域のみでは単量体として存在し、PTTH を加えると、1 分子の PTTH と 1 分子の Torso 細胞外領域との複合体を形成している。これは、1 つ目の Torso と PTTH の解離定数 (K_{d1}) が 4.1 ± 1.1 nM であるのに対して、2 つ目の Torso と PTTH の解離定数 (K_{d2}) は 2.1 ± 0.2 μ M しかないことが原因である。カイコガ Torso が 10 nM のカイコガ PTTH できちんと活性化されることや過去の知見^{6,19-21,55}から考えるとこの K_{d2} の値は大きすぎる（親和性が低すぎる）ように思われる。私の研究では、膜貫通領域の分子間ジスルフィド架橋の有無で PTTH と直接相互作用する細胞外領域の構造が明らかに異なっていたことから、細胞外領域のみでは、分子間ジスルフィド架橋がないために PTTH がズレて Torso に結合してしまい、本来の結合状態を反映していないのではないかと考えている。よって、PTTH との相互作用の解析には、分子間ジスルフィド架橋が存在する膜貫通領域も含む Torso (Δ IC は発現されなかったもので、例えば全長) を用いる必要がある。

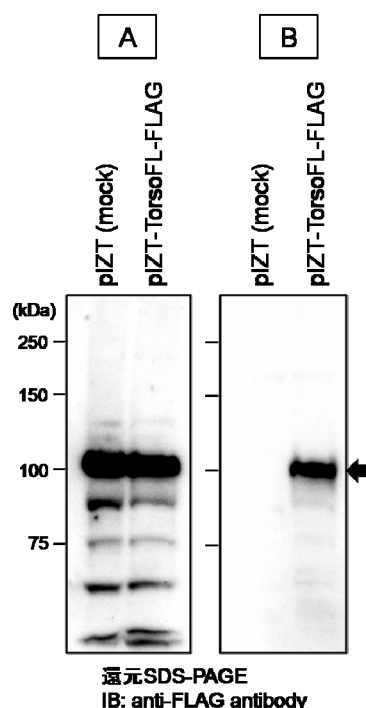


図 1-1. S2 培養細胞に一過的に発現させたカイコガ Torso を検出するための抗 FLAG 抗体の選択

C 端に FLAG 配列を付加したカイコガ Torso 全長 (TorsoFL-FLAG) を発現させた S2 培養細胞を SDS-PAGE のサンプルバッファーで直接可溶化し、還元 SDS-PAGE (7% Laemmli ゲル) で分離した。

[A] 抗 FLAG 抗体 #M020 (MBL 社製、ラビット IgG) を一次抗体に使用してイムノブロットを行った。空の pIZT ベクター (mock) でトランスフェクションした場合でも、約 100、85、75、68、50 kDa の位置にバンドが観測された。

[B] 抗 FLAG 抗体 #M185-3S (MBL 社製、マウス IgG) を一次抗体に使用してイムノブロットを行った。pIZT-TorsoFL-FLAG をトランスフェクションした場合にのみ、100 kDa の位置にバンドが観測された。TorsoFL-FLAG のアミノ酸配列から計算した分子量は 90 kDa なので、#M185-3S を用いたときに 100 kDa の位置に観測されたバンド (黒色矢印) は TorsoFL-FLAG を示していると考えられる。

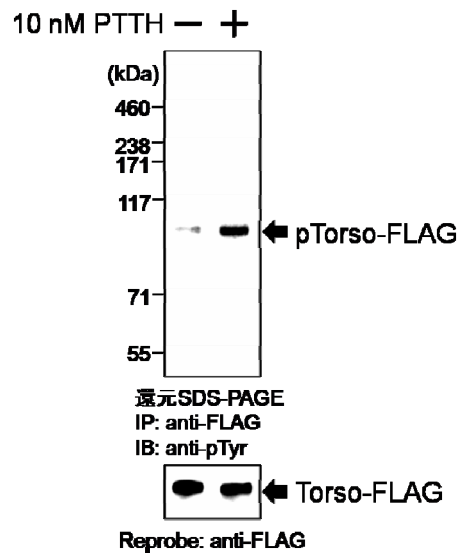


図 1-2. PTTH 刺激依存的なカイコガ Torso の自己リン酸化

TorsoFL-FLAG を発現させた S2 培養細胞の細胞膜画分を調製し、10 nM のカイコガ PTTH で刺激した。刺激後の S2 培養細胞から界面活性剤で可溶化した TorsoFL-FLAG を抗 FLAG 抗体で免疫沈降させ、Tyr 残基のリン酸化を抗 pTyr 抗体で検出した。pTorso-FLAG の矢印は、リン酸化された TorsoFL-FLAG のバンドの位置を示す。

PTTH で刺激しなかった場合（左のレーン）に比べて、カイコガ PTTH で刺激した場合（右のレーン）には、明らかに TorsoFL-FLAG の自己リン酸化が促進されていた。

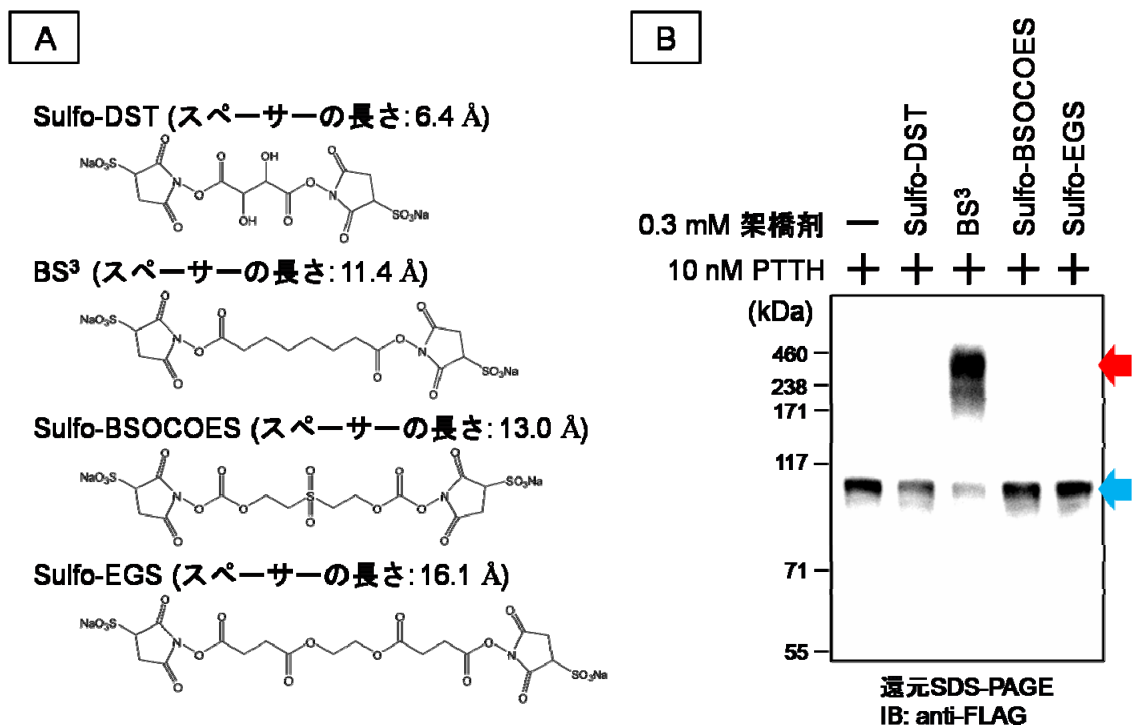


図 1-3. S2 培養細胞の細胞膜上に発現させたカイコガ Torso の PTTH 刺激時の多量体形成
TorsoFL-FLAG を発現させた S2 培養細胞を 10 nM のカイコガ PTTH で刺激した後、0.3 mM のスペーサーの長さが異なる 4 種類の架橋剤で処理し、還元 Bis-Tris SDS-PAGE で解析した。

[A] 使用した 4 種類の架橋剤は、いずれも両端に *N*-ヒドロキシスクシンイミド基をもち、遊離のアミノ基と反応して架橋を形成する。また、Sulfo 化されていて親水性なので、これらの架橋剤は細胞膜に侵入したり透過したりすることはできない。

[B] BS³ を用いたときのみ、架橋された多量体 TorsoFL-FLAG のバンド（赤色矢印）が検出された。それ以外の架橋剤では単量体 TorsoFL-FLAG のバンド（水色矢印）しか観測されず、その位置は、架橋剤で処理しなかった場合と変わりがなかった。

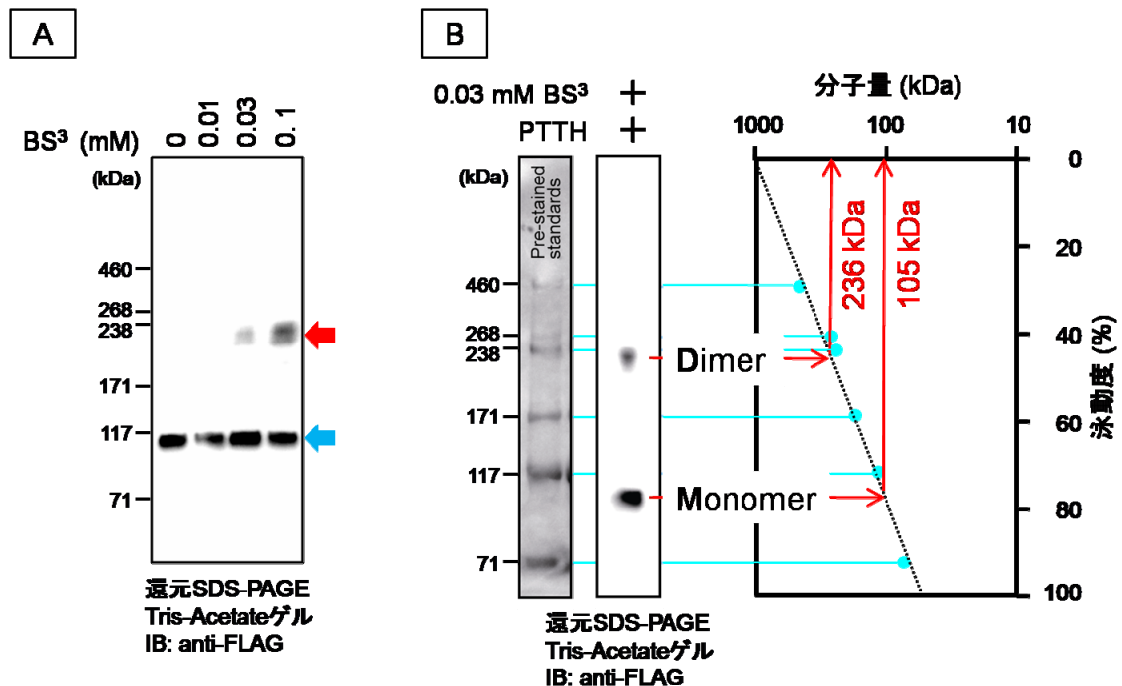


図 1-4. カイコガ Torso が細胞膜上で形成している多量体の分子量の算出

[A] TorsoFL-FLAG を発現させた S2 培養細胞を 10 nM の PTTH で刺激した後、様々な濃度の BS³ で処理し、還元 Tris-Acetate SDS-PAGE で解析した。0.03 mM 以上の BS³ を用いたときには多量体を示すバンド（赤色矢印）が観測されたが、0.01 mM 以下の BS³ では多量体のバンドは観測されずに単量体を示すバンド（水色矢印）のみが観測された。

[B] 多量体 TorsoFL-FLAG の正確な分子量を見積もるために、TorsoFL-FLAG を発現させた S2 培養細胞を 10 nM の PTTH で刺激した後、低濃度（0.03 mM）の BS³ で処理してから還元 Tris-Acetate SDS-PAGE で解析した。多量体、単量体を示すバンドは、それぞれ 236 kDa、105 kDa の位置に観測された。したがって、TorsoFL-FLAG は「二量体」を形成しているものと思われる。

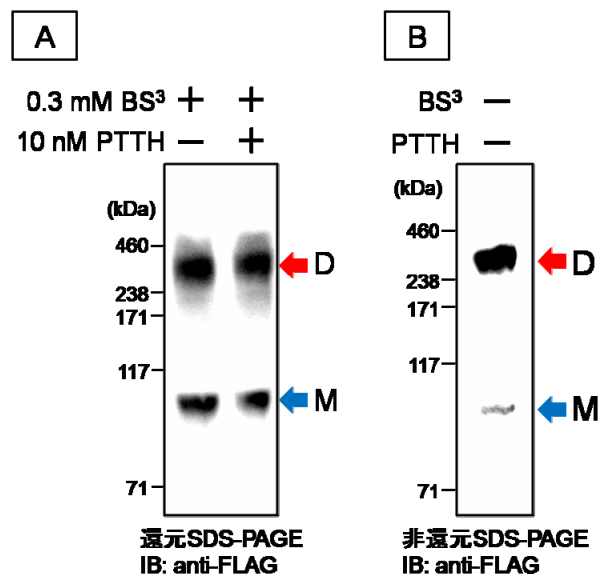


図 1-5. カイコガ Torso の二量体形成のリガンド刺激非依存性

[A] TorsoFL-FLAG を発現させた S2 培養細胞をカイコガ PTTH で刺激せずに、0.3 mM BS³ で架橋処理を行い、還元 Bis-Tris SDS-PAGE で解析した。PTTH で刺激しなくても、刺激したときと同様に、単量体 TorsoFL-FLAG を示すバンド（青色矢印 M）の他に、二量体を示すバンド（赤色矢印 D）がはっきりと観測された。

[B] TorsoFL-FLAG を発現させた S2 培養細胞を、カイコガ PTTH による刺激や BS³ による架橋処理を行わずに、非還元 Bis-Tris SDS-PAGE で解析した。単量体を示すバンド（青色矢印 M）もわずかに観測されたが、二量体を示すバンド（赤色矢印 D）がはっきりと観測された。

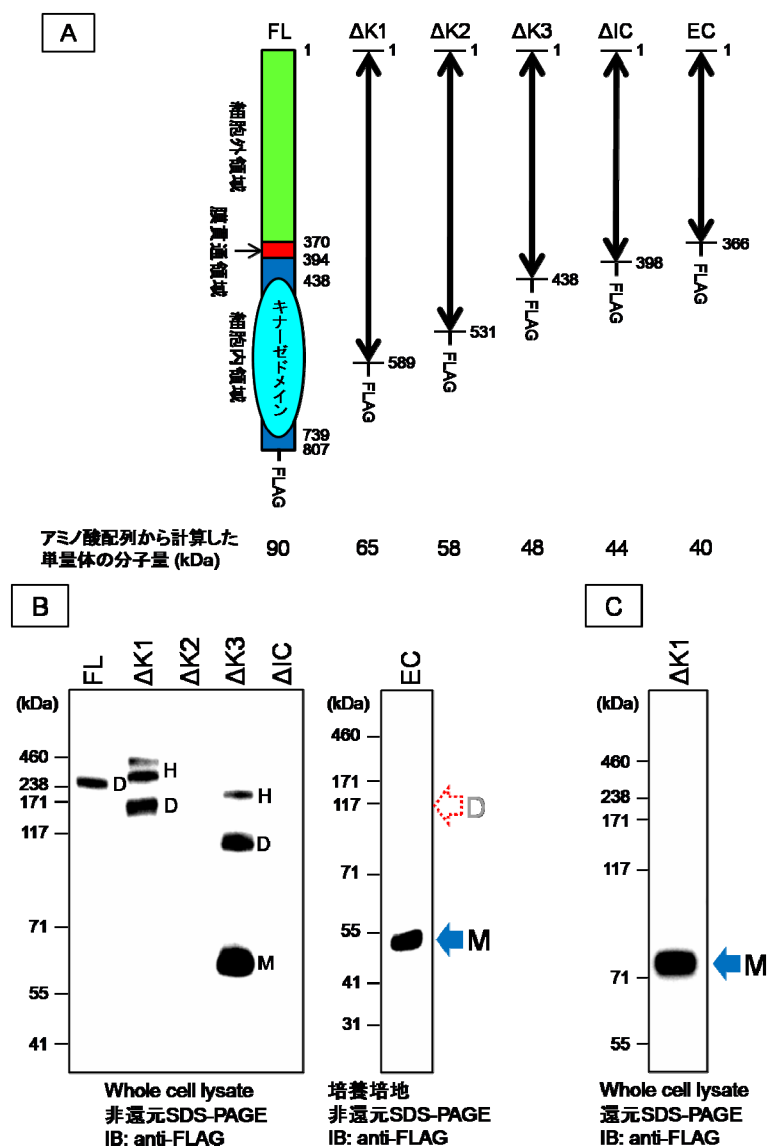


図 1-6. 一部の配列を失ったカイコガ Torso 変異体の二量体形成

[A] 二量体形成に関与する分子間ジスルフィド架橋の存在部位を明らかにするために、カイコガ Torso の C 端からアミノ酸配列の一部を徐々に削った一連の変異体を設計した。なお、検出を簡便に行うために、いずれの変異体も C 端に FLAG タグを付加した。

[B] 各変異体を S2 培養細胞で一過的に発現させ、非還元 Bis-Tris SDS-PAGE で解析した。なお、膜貫通領域をもつ変異体は細胞のライセートを（左のパネル）、膜貫通領域をもたない変異体は培養液を（右のパネル）解析に供した。ΔK1 は、155 kDa の位置に二量体のバンド (D) を示し、300 kDa と 430 kDa の位置に高分子量の多量体のバンド (H) を示した。ΔK2 はバンドを示さず、発現が見られなかった。ΔK3 は、60 kDa の位置に単量体のバンド (M) と、110 kDa の位置に二量体のバンド (D) とを示し、さらに、180 kDa の位置に高分子量の多量体のバンド (H) を示した。ΔIC はバンドを示さず、発現は見られなかった。細胞外領域のみしか持たない EC は、非還元 SDS-PAGE 上で、52 kDa の位置に単量体のバンド（青色矢印 M）のみを示した。

[C] ΔK1 を還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離すると、75 kDa の位置に単量体を示すバンド（青色矢印 M）のみが観測された。

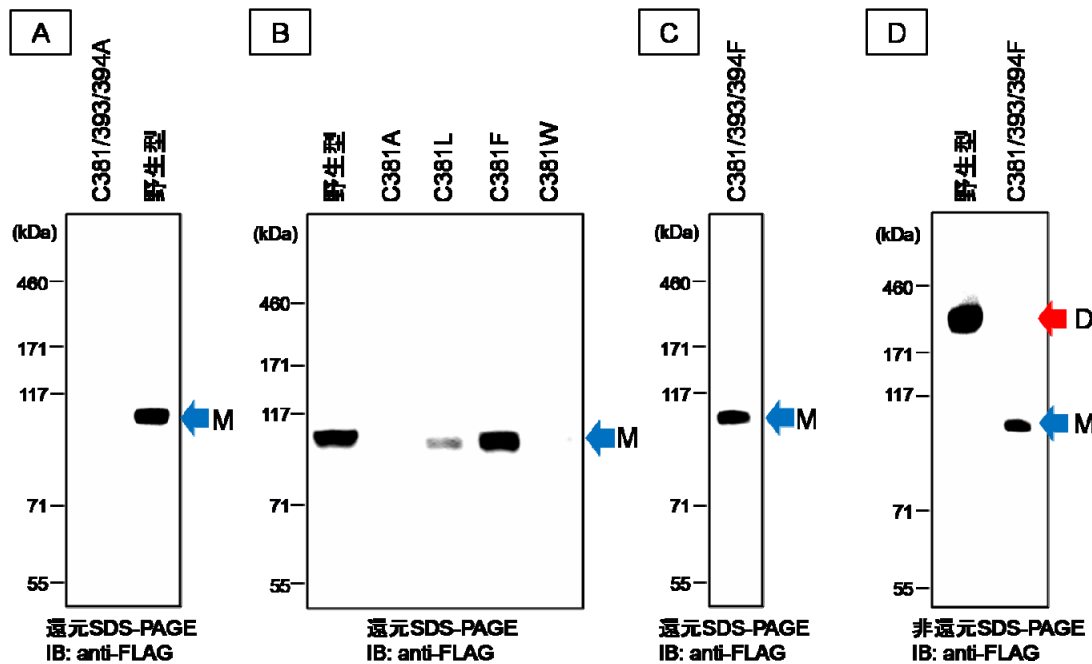


図 1-7. カイコガ Torso の膜貫通領域の Cys を Phe に置換した変異体のジスルフィド架橋を介した二量体形成能

[A] 膜貫通領域にある 3 つの Cys 残基全てを Ala に置換した C381/393/394A 変異体は、還元 Bis-Tris SDS-PAGE 上でバンドを示さなかった。これに対して、野生型は、これまで通り 110 kDa の位置に単量体のバンド（青色矢印 M）を示した。

[B] 膜貫通領域の 3 つの Cys のうち 381 番目の Cys のみを、Ala (C381A)、Leu (C381L)、Phe (C381F)、Trp (C381W) に置換した変異体を S2 培養細胞で一過的に発現させ、還元 Bis-Tris SDS-PAGE で発現を確認した。C381A 変異体と C381W 変異体は、バンドを示さず、発現が確認されなかった。C381L は、110 kDa の位置に単量体のバンド（青色矢印 M）を示したものの、野生型に比べて発現レベルはかなり低かった。それらに対して、C381F を発現させた場合には、110 kDa の位置に野生型と同程度の発現量のバンドを示した。

[C] 膜貫通領域にある 3 つの Cys 残基全てを Phe に置換した C381/393/394F を S2 培養細胞に一過的に発現させ、還元 Bis-Tris SDS-PAGE で解析したところ、110 kDa の位置に単量体のバンド（青色矢印 M）を示した。

[D] 野生型を非還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離すると、240~250 kDa の位置に二量体のバンド（赤色矢印 D）が現れたが、C381/393/394F 変異体では、100~110 kDa の位置に単量体のバンド（青色矢印 M）のみが現れた。したがって、C381/393/394F 変異体は、ジスルフィド架橋を介した二量体を形成しないことがわかった。

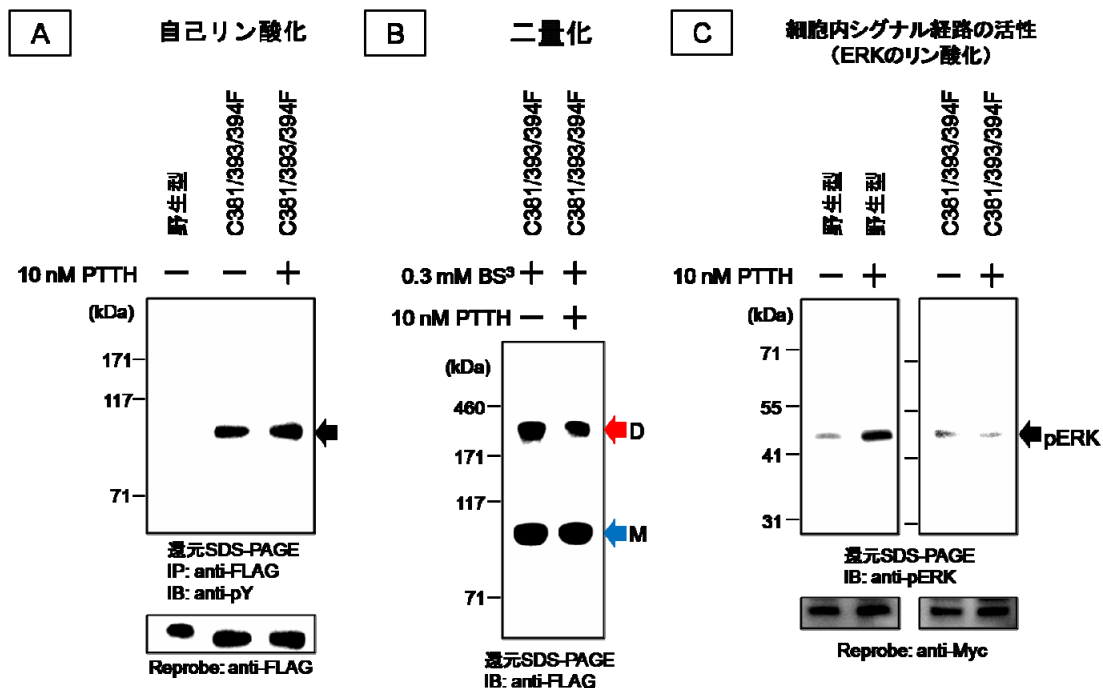


図 1-8. 膜貫通領域の分子間ジスルフィド架橋を欠く C381/393/394F 変異体の自己リン酸化・二量化・細胞内シグナル経路の活性化

[A] C381/393/394F 変異体を一過的に発現させた S2 培養細胞の膜画分を 10 nM カイコガ PTTH で刺激し、図 1-2 と同様にして、その自己リン酸化を調べた。黒色矢印はリン酸化された Torso を示す。C381/393/394F 変異体は PTTH で刺激しなくても自発的に自己リン酸化していた。

[B] C381/393/394F 変異体を S2 培養細胞で一過的に発現させ、10 nM のカイコガ PTTH で刺激した後、0.3 mM BS³ で架橋処理を行い、還元 Bis-Tris SDS-PAGE で解析した。C381/393/394F 変異体は PTTH 刺激の有無にかかわらず、単量体のバンド（青色矢印 M）の他に二量体のバンド（赤色矢印 D）を示した。

[C] 野生型カイコガ Torso あるいは C381/393/394F 変異体を S2 培養細胞に一過的に発現させ、10 nM のカイコガ PTTH で刺激した後、還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離し、ERK のリン酸化を調べた。pERK の矢印は、リン酸化された ERK のバンドの位置を示す。野生型 Torso を発現させた S2 培養細胞では、PTTH で刺激すると ERK のリン酸化の促進が確認されたのに対して（左のパネル）、C381/393/394F 変異体を発現させた S2 培養細胞では、たとえ PTTH で刺激しても ERK のリン酸化は促進されなかった（右のパネル）。

なお、現有の抗 ERK 抗体では、ショウジョウバエ S2 培養細胞内の ERK をほとんど認識しなかったため、C 端に c-Myc タグを付加したショウジョウバエの ERK をカイコガ Torso とともに共発現させ、ローディングコントロールとした。この手法は、先行研究でも採用されている²²。

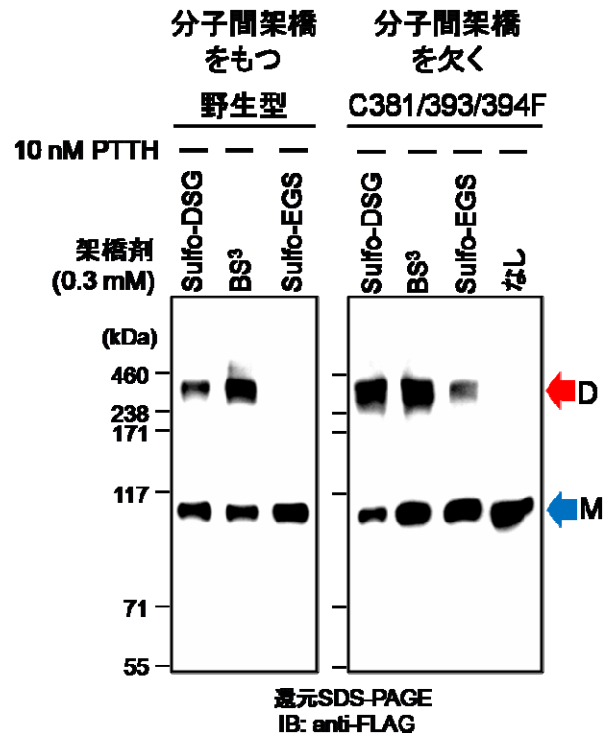


図 1-9. 分子間架橋をもつ野生型 Torso と分子間架橋を欠く C381/393/394F 変異体の架橋剤に対する反応性の違い

野生型 Torso あるいは C381/393/394F 変異体を S2 培養細胞で一過的に発現させ、0.3 mM のスペーサーの長さが異なる 3 種の架橋剤 (Sulfo-DSG (スペーサーの長さ: 7.7 Å)、BS³ (11.4 Å)、Sulfo-EGS (16.1 Å)) で処理し、還元 Bis-Tris SDS-PAGE で解析した。野生型の場合、Sulfo-DSG や BS³ で架橋処理を行ったときには二量体のバンド (赤色矢印 D) が観測されたが、Sulfo-EGS で架橋処理を行ったときには二量体のバンドは観測されず単量体のバンド (青色矢印 M) のみが観測された (左のパネル)。一方で、C381/393/394F 変異体の場合には、Sulfo-DSG や BS³ で架橋処理を行ったときだけでなく Sulfo-EGS で架橋処理を行った場合にも二量体のバンドが観測された (右のパネル)。

第2章

PTTH 調製法の確立

- NMR を用いた相互作用解析に向けて -

2-1. はじめに

序論で述べたように、カイコガ PTTH は分子内に 7 つのジスルフィド架橋を持ち、鎖間ジスルフィド架橋を介してホモ二量体を形成しているペプチドホルモンである (図 0-3) ^{5,6}。このように数多くのジスルフィド架橋をもつタンパク質を大腸菌で発現させると沈殿してしまうことが多い。実際に、いろいろな昆虫種の PTTH を大腸菌で発現させると沈殿してしまうことが知られており、これまでは、活性のあるリコンビナント体を得るために沈殿してしまった産物をリフォールディングさせることにより調製を行ってきた ^{6-8,19}。しかし、ジスルフィド架橋を数多く含むタンパク質のリフォールディング操作は煩雑で高度な技術や経験を要するため、本研究では、そのようなリフォールディング操作を行わずに活性のある PTTH を調製したいと考えた。

PTTH の発現に有効と思われる発現宿主を検索したところ、PTTH と同じように分子内にジスルフィド架橋をもつヒトインターロイキン-2 ⁵⁶、ヒト上皮成長因子 ⁵⁷、イヌ顆粒球コロニー刺激因子 ⁵⁸ などを、活性のある可溶性タンパク質として発現することに成功した事例としてブレビバチルス菌が報告されていた ⁵⁹。ブレビバチルス菌は、産生したリコンビナントタンパク質を可溶性タンパク質として液体培地中へ分泌する能力を有しており、特に、*Brevibacillus choshinensis* HPD31 株 (以下、ブレビバチルス菌) は、より多くのタンパク質を分泌できることが報告されていた ⁶⁰。そこで、ブレビバチルス菌にカイコガ PTTH をリコンビナントタンパク質として分泌させ、リフォールディング操作を行わずに、活性のある可溶性タンパク質として調製する方法を検討することにした。

なお、最近では、高等生物の培養細胞を宿主として PTTH を産生することも報告されている ⁵³。しかし、本研究では、最終的に PTTH を NMR 測定で観測可能な安定同位体 (¹³C、¹⁵N) で標識してレセプターとの相互作用を解析することを目的としているので、安定同位体標識をより簡便に行うことができるバクテリアを宿主としたリコンビナントタンパク質産生系を採用することにした。

また、天然のカイコガ PTTH には Asn41 に糖鎖が付加していることが報告されているが ^{5,35}、ブレビバチルス菌で発現させたタンパク質には糖鎖修飾が起らないと考えられている。このことから、ブレビバチルス菌でカイコガ PTTH を調製すると糖鎖が付加されないと思われるが、カイコガ PTTH に付加されている糖鎖は PTTH の脱皮誘導活性に必須ではないことが報告されているので ³⁵、Torso との相互作用を解析する上では問題ないだろう。

2-2. カイコガ PTTH の分泌産生に適した分泌シグナル配列の選択

これまで、ブレビバチルス菌を用いて分子内に複数のジスルフィド架橋をもつタンパク質を可溶性タンパク質として発現した事例が数多く報告されているが ^{55-58,61}、PTTH の発現例は報告されておらず、PTTH を分泌産生するための条件検討は行われてこなかった。そこでまず、ブレビバチルス菌でカイコガ PTTH を効率よく分泌発現させるために、リコンビナントタンパク質の分泌産生に大きく影響する分泌シグナル ⁶² の検討を行った。カイコガ PTTH の N 端に、ブレビバチルス属細菌のタンパク質に由来する入手可能な 4 種の分泌シグナル配列 (SS1、SS2、SS3、SS4) をそれぞれ付加し、C 端には精製や検出を簡便に行うために His₆ タグ配列

を付加した（図 2-1）。異なる分泌シグナル配列をもつ PTTH-His₆ の各発現ベクターで形質転換したブレヴィバチルス菌を 24 時間前培養し、その前培養液の一部を 10 mg/L のネオマイシンを含む TM 培地（TMNm 培地）に植え継いでさらに 48 時間本培養を行った。培養後の培養液を還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離し、分泌された PTTH-His₆ のバンドを抗 His タグ抗体を用いたイムノブロッティングで検出した。その結果、SS1、SS2、SS3 では約 15 kDa の位置にバンドが観測された（図 2-2A の左から 1～9 番目のレーン）。PTTH-His₆ の 1 本のペプチド鎖（単量体）の分子量をアミノ酸配列から計算すると 13.6 kDa なので、これらの 15 kDa のバンドは単量体 PTTH-His₆ を示しているものと考えられた。

実験は分泌シグナルごとに $n=3$ （コロニー#1～3）で行い、分泌シグナル SS1 のコロニー#1 のバンドの強度を 1 として、各バンドの強度をデンストメトリックに算出した。分泌シグナルごとに、3 つのバンドの相対強度の平均を棒グラフで、標準偏差をエラーバーで示した（図 2-2B）。SS1 を分泌シグナルに用いたときにも培地中に PTTH-His₆ が分泌発現されていることが観測されたが、それに比べて、SS2 や SS3 を用いたときにはより多くの PTTH-His₆ が培地中に分泌されていた。また、SS4 は SS2 を改変して開発された分泌シグナル配列にも関わらず、SS4 を用いたときには PTTH-His₆ の培地への分泌は観測されなかった。やはりカイコガ PTTH の分泌発現の場合にも、分泌シグナル配列の影響を強く受けることが判明し、本研究では、より多くの PTTH-His₆ を分泌発現した SS2 を PTTH 発現用の分泌シグナルとして採用することにした。

2-3. 二量体カイコガ PTTH を効率的に得られる培養時間の検討

すでに述べたように、天然のカイコガ PTTH はジスルフィド架橋を介したホモ二量体を形成していることが報告されている⁵。そこで、分泌シグナルに SS2 を用いてブレヴィバチルス菌から培地中に分泌発現させた PTTH-His₆ を非還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分析し、抗 His タグ抗体を用いたイムノブロッティングで検出を行うことにより、カイコガ PTTH がホモ二量体として発現しているかどうかを確認した（図 2-3A）。分泌発現された PTTH-His₆ は、非還元 SDS-PAGE 上で 15 kDa、28 kDa、42 kDa、50 kDa の位置にバンドを示し、50 kDa のバンドよりも高分子量側には強いスメアーなバンドも観測された。還元 SDS-PAGE では 15 kDa の位置に単量体 PTTH-His₆ を示す単一のバンドが観測されたことから（図 2-2A）、非還元 SDS-PAGE 上で 15 kDa の位置に観測されたバンドは単量体、28 kDa のバンドはジスルフィド架橋を介して二量体を形成した PTTH-His₆ のバンドであると考えられる。また、42 kDa や 50 kDa の位置に観測されたバンドや、それらのバンドよりも高分子量側に観測されたスメアーなバンドはさらに高分子量の多量体 PTTH-His₆ に由来するものと考えられる。この結果から、培地へ分泌された PTTH-His₆ には天然と同じ二量体だけではなく、単量体や高分子量多量体も含まれていることが明らかになった。

そこで、分泌される PTTH-His₆ のうち、二量体が培地中により多く分泌される培養時間を検討することにした。形質転換したブレヴィバチルス菌を 24 時間前培養し、その前培養液の一部を 10 mg/L のネオマイシンを含む TM 培地（TMNm 培地、培地の詳しい組成は実験の部に記載した）に植え継いでさらに本培養を行った。3 時間ごとに回収した培養液を非還元 Bis-Tris

SDS-PAGE に供して、分泌された PTTH-His₆ の多量化状態を解析した。図 2-3B で観測されたバンドの強度から、二量体 PTTH-His₆ は培養時間 27~30 時間の培養液に最も多く含まれていることがわかった。それに対して、単量体 PTTH-His₆ は培養時間 21~24 時間の培養液に多く含まれており、高分子量の多量体 PTTH-His₆ は培養時間の経過とともに増加していくことがわかった。また、培養液中の総タンパク質濃度を測定したところ、培養時間の経過にともなう、ほぼ直線的に増加していた (図 2-3B)。これらの結果から、27 時間より長く培養を行っても培養液に含まれる二量体 PTTH-His₆ の量はほとんど増加せず、むしろ高分子量の多量体 PTTH-His₆ やブレヴィバチルス菌自身に由来する分泌タンパク質が増加してしまうだけだと考えた。そこで、本研究では、カイコガ PTTH (天然型二量体) の産生に適した培養時間として 27 時間を採用することにした。

2-4. 硫酸アンモニウムによるカイコガ PTTH の濃縮

次のカラム精製での取り扱いを簡便にするために、培養液中に分泌された PTTH-His₆ を硫酸アンモニウムで沈殿させて濃縮しておくことにした。培養液に、各飽和濃度になるように硫酸アンモニウムを加えて二量体 PTTH-His₆ が沈殿する濃度を調べたところ、30%飽和濃度では沈殿せず、80%飽和濃度では沈殿することがわかった (図 2-4)。この結果から、まず培養液に 30%飽和濃度になるように硫酸アンモニウムを加えて二量体 PTTH-His₆ 以外の沈殿するものを除き、その上清に硫酸アンモニウムをさらに加えて 80%飽和濃度にするることによって PTTH-His₆ を沈殿させることにした (図 2-5A)。予想通り、30%飽和濃度の硫酸アンモニウムでは二量体 PTTH-His₆ は全て上清画分に回収され (図 2-5B の左から 2 番目のレーン)、30%飽和硫酸アンモニウムによって高分子量多量体の一部が沈殿画分として除去されていた (図 2-5B の左から 3 番目のレーン)。80%飽和濃度の硫酸アンモニウムでは、二量体 PTTH-His₆ は上清画分には観測されず (図 2-5B の左から 4 番目のレーン)、全て沈殿画分に回収された (図 2-5B の左から 5 番目のレーン)。培養液 1 L 分を上記のように処理することによって得られた 80%飽和濃度の沈殿画分を 40 mL の HEPES-buffered saline (HBS) に再溶解することで、25 倍に濃縮された二量体 PTTH-His₆ の試料溶液を調製することができた。

硫酸アンモニウムを用いた沈殿および再溶解によって試料溶液をかなり濃縮することができたので、この時点で初めて、硫酸アンモニウム分画の各画分の非還元 SDS-PAGE を抗 His タグ抗体を用いたイムノブロッティングではなく、Coomassie brilliant blue (CBB) で染色してみた (図 2-5C)。実際に、抗 His タグ抗体を用いたイムノブロッティングで PTTH-His₆ の単量体や二量体が検出されたア、イ、オの画分には薄いながらもそれらのバンドが CBB 染色でも検出することができた (図 2-5C の左から 1、2、5 番目のレーン)。残念ながら、この硫酸アンモニウムによる分画では、PTTH-His₆ とそれ以外の夾雑タンパク質とを分けて沈殿させることはできなかった。これらに対して、イムノブロッティングで非常に強く検出された PTTH-His₆ の高分子量多量体のスメアーなバンドは CBB 染色ではまったく観測されないことがわかった (図 2-5C)。理由はわからないが、PTTH-His₆ の高分子量多量体は抗 His タグ抗体に対して非常に親和性が高くイムノブロッティングで染まりやすくなっているようだ。CBB 染色から判断すれば、イムノブロッティングでスメアーなバンドが検出された高分子量多量

体の実際の含量はかなり低いのではないかとと思われる。

2-5. Ni^{2+} -NTA カラムクロマトグラフィーによる精製

まず、C 端に付加した His₆ タグに対して親和性のある Ni^{2+} -NTA カラムクロマトグラフィーを用いて培地から回収したカイコガ PTTH-His₆ を精製することにした。濃縮された PTTH-His₆ の試料溶液（培養液 500 mL 相当分）を Ni^{2+} -NTA カラムに注入し、20 mM イミダゾールを含む緩衝液でカラムを洗浄した後、イミダゾール濃度を 20 mM から 500 mM まで直線的に増加させて溶出したところ、図 2-6A のようなクロマトグラムが得られた。各溶出フラクションは全て非還元 Bis-Tris SDS-PAGE でチェックを行った。代表的な溶出フラクションの分析結果を図 2-6B に示した。イミダゾール濃度 220~290 mM（フラクション#3 付近）で多くの二量体 PTTH-His₆ が溶出していたが、フラクション#3 には、約 27 kDa の位置に二量体 PTTH-His₆ を示すバンドだけでなく、約 14 kDa の位置に単量体 PTTH-His₆ を示すバンドも観測された（図 2-6B の左から 2 番目のレーン）。 Ni^{2+} -NTA カラムクロマトグラフィーにより、二量体 PTTH-His₆ を多く含む溶出画分が、培養液 1 L あたり 12 mL 得られた。この溶出画分は、非還元 Bis-Tris SDS-PAGE の CBB 染色で見ると PTTH-His₆ 以外のタンパク質、例えば、菌体そのものから定常的に分泌されているタンパク質はほとんど除かれていたが、二量体 PTTH-His₆ に加えて単量体 PTTH-His₆ も含まれていることが明らかになったので、次に、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて PTTH-His₆ の二量体と単量体とを分けることにした。

2-6. ゲル濾過クロマトグラフィーによる精製

Ni^{2+} -NTA カラムクロマトグラフィーで得られた二量体 PTTH-His₆ を多く含む溶出画分 12 mL（培養液 1 L 相当分から回収）をゲル濾過カラムに供するために、濃縮を目的として、いったん 80%飽和濃度の硫酸アンモニウムで沈殿させてから 0.6 mL の HBS に溶かし込み 20 倍に濃縮した試料溶液を調製した。好都合なことに、沈殿を再溶解したときに、二量体 PTTH-His₆ はほぼすべてが再溶解されるのに対して、単量体 PTTH-His₆ は比較的再溶解されにくかった（図 2-7）。

濃縮した試料溶液をゲル濾過クロマトグラフィーで分離したところ、図 2-8A のようなクロマトグラムが得られ、溶出体積 5.8~7.4 mL（ピーク I）、8.8~10.4 mL、（ピーク II）、11~12 mL（ピーク III）におもな 3 つのピークが観測された。11 個の代表的な溶出フラクションを非還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分析した結果を図 2-8B に示した。まず、溶出フラクション# 1~3 は 15 kDa の位置にバンドを強く示したので、ピーク I は単量体 PTTH-His₆ の溶出ピークであることがわかった。これに対して、溶出フラクション# 6~8 は 27 kDa の位置にバンドを強く示したので、ピーク II が目的の二量体 PTTH-His₆ の溶出ピークであることがわかった。また、溶出フラクション# 9~11 は非還元 SDS-PAGE 上で顕著なバンドを示さなかったので、ピーク III は SDS-PAGE から抜けてしまうより低分子のペプチドの溶出ピークだと考えられた。このゲル濾過クロマトグラフィーでは、分子量がより小さな単量体 PTTH-His₆ の方が二量体 PTTH-His₆ よりも先に溶出されたことから、単量体 PTTH-His₆ は溶液中では、非共有結合的な会合によりみかけの分子量がもっと大きな凝集体を形成しているものと考えられる。80%飽

和濃度の硫酸アンモニウムの沈殿画分から単量体 PTTH-His₆は再溶解されづらかったこと(図 2-7) を考え合わせると、単量体 PTTH-His₆は二量体 PTTH-His₆と比べて凝集しやすい性質をもつのだろう。

2-7. 逆相 HPLC による精製と最終精製品の純度と活性の確認

ゲル濾過クロマトグラフィーの溶出ピーク II は二量体 PTTH-His₆ を多く含んでいたが、わずかに単量体 PTTH-His₆ も含まれていたため(図 2-8B の左から 6~8 番目のレーン)、さらに逆相 HPLC を用いて精製を行うことにした。ゲル濾過クロマトグラフィーの溶出ピーク II (1.6 mL) を逆相カラムに注入し、移動相のアセトニトリル濃度を 5% から 50% まで上昇させて、吸着したタンパク質を溶出させたところ、図 2-9A のようなクロマトグラムが得られた。溶出時間 31.1 min の肩にあるピーク(図 2-9A の緑色矢印)と溶出時間 31.6 min のピーク(図 2-9A の赤色矢印)とを分取し、非還元 Bis-Tris SDS-PAGE で解析した。31.1 min のピークは単量体 PTTH-His₆ と二量体 PTTH-His₆ の両方のバンドを示したのに対して(図 2-9B の左のパネル)、31.6 min のピークは二量体 PTTH-His₆ のバンドのみを示したので(図 2-9B の右のパネル)、31.1 min のピークは単量体 PTTH-His₆ の溶出ピークであり、31.6 min のピークが二量体 PTTH-His₆ の溶出ピークであることが明らかになった。

非還元 SDS-PAGE 上でほぼ単一のバンドを示した二量体 PTTH-His₆(図 2-9B の右のパネル)の一部を逆相 HPLC で再検定したところ、ほぼ単一のピークを示した(図 2-9C)。また、精製した二量体 PTTH-His₆ を用いて S2 培養細胞に一過的に発現させたカイコガ Torso を刺激したところ、自己リン酸化を促進することが確認された(図 2-9D)。これらの結果から、最終精製品の二量体 PTTH-His₆ は高純度に精製されており、カイコガ Torso を活性化することがわかった。

これらの結果から、ブレヴィバチルス菌に分泌発現させた PTTH-His₆ を、3 種のカラムクロマトグラフィーを組み合わせることで、活性のある二量体 PTTH-His₆ として調製できることが明らかになった。そこで、本研究で確立した手法を用いてブレヴィバチルス菌の培溶液 5 L から二量体 PTTH-His₆ を大量調製したところ、1.02 mg の最終精製品を得ることができた。

2-8. NMR スペクトルを用いたカイコガ PTTH の Torso 相互作用部位の解析に向けて

PTTH 上の Torso との相互作用部位の解明には、NMR スペクトル測定を用いた解析手法が有効である。もし、Torso を少しずつ滴定していくことで変化する安定同位体標識された PTTH の NMR シグナルを観測することができれば、Torso と相互作用する PTTH の残基を特定することができる。

そこでまず、安定同位体で標識した PTTH の調製に先立って、今回調製した非標識のカイコガ PTTH-His₆ の NMR スペクトルをきれいに測定できるかどうかを確認することにした。重水(D₂O)で調製した 2 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)中で 1.2 mg/mL の PTTH-His₆ (二量体として約 50 μM) の ¹H-NMR スペクトルを測定したところ、図 2-10A のような NMR スペクトルが観測された。6.5 ppm よりも低磁場側に観測された NMR シグナルは、芳香族のプロトンや水素結合などによって重水素(D)と交換せずに残ったアミドのプロトンのシグナ

ルを示していると考えられる。さらに、5.0~3.0 ppm にはアミノ酸残基の α -プロトン、3.0 ppm よりも高磁場側にはメチレンやメチル基のプロトンのシグナルが観測されているものと思われる。各シグナルの正確な帰属は、 ^{13}C 、 ^{15}N で標識されたカイコガ PTTH を調製し、多次元 NMR を用いて解析しなければわからないが、この一次元 ^1H -NMR スペクトルを見たかぎりでは、シャープなシグナルが広い範囲の化学シフトに分散していることから、調製した PTTH-His₆ は、変性状態ではなく、一定の立体構造を保持しているように思われる（もし、変性しているとアミノ酸レベルのシグナルを単に足し合わせたようなスペクトルとなり、狭い範囲の化学シフトにシグナルが集中してしまう）。

さらに、 ^1H と天然に存在する ^{13}C 核との間の二次元 [^1H , ^{13}C]-Hetero-nuclear single quantum coherence (HSQC) スペクトルを測定したところ、40 時間程度の測定で図 2-10B に示す良好な S/N 比のスペクトルを得ることができた。 ^{13}C の天然存在率が約 1%であることを考えると、安定同位体 (^{13}C 、 ^{15}N) で標識された PTTH-His₆ が調製できれば ^{13}C 核自体の濃度は 100 倍となり、理論上、同じ S/N 比のスペクトルを得るのに 100² 分の 1 の測定時間で済ませることができる (40 時間→14.4 秒)。これは、複雑な多次元 NMR をいろいろ組み合わせて測定してもわずか数日で帰属のための測定を終えることができることを示している。連鎖帰属法によって、PTTH-His₆ のシグナルの帰属さえできてしまえば、安定同位体標識された PTTH-His₆ に徐々に Torso を滴定しながら PTTH 側のシグナルの変化を観測することで、PTTH 上の Torso との相互作用部位を特定することができるだろう。

2-9. カイコガ PTTH の非標識クロレラ培地を用いた培養での発現確認

本研究でカイコガ PTTH の調製に用いたブレビバチルス菌は、 ^{13}C や ^{15}N などで標識されたアミノ酸を含むクロレラ培地で培養することで、産生したタンパク質を比較的容易に安定同位体標識できることが報告されている^{66,67}。そこで、まず非標識のクロレラ培地を用いてブレビバチルス菌を培養し、これまでの TM 培地と同様に PTTH-His₆ を分泌発現できるかどうか確認した。

PTTH-His₆ の発現ベクターで形質転換したブレビバチルス菌を TM 培地で 24 時間前培養し、その前培養液の一部をクロレラ培地に植え継いでさらに 27 時間本培養を行った。培養後の培養液を還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離し、分泌された PTTH-His₆ のバンドを CBB 染色で検出した。その結果、約 15 kDa に PTTH-His₆ のバンドが観測された (図 2-11A の左から 1~3 番目のレーン)。また、PTTH-His₆ のバンドの強度から TM 培地で培養したときの 3 分の 1 ぐらいの発現量があることがわかった (図 2-11A の左から 4~6 番目のレーン)。よって、5 L の安定同位体標識したクロレラ培地を用いてブレビバチルス菌を培養し、約 0.3 mg の安定同位体標識した二量体 PTTH が得られると予想される。先に行った見積もりから長くとも 1~2 週間の現実的な長さの測定時間で PTTH と Torso との相互作用解析に必要な一通りの NMR スペクトルを測定することができるだろう。

また、共同研究者が行ったヨトウガ PTTH のブレビバチルス菌での分泌発現において、N 端と C 端の数残基のアミノ酸および His₆ タグを削ることで発現量が大きく増加することが見出されている。そこで、カイコガ PTTH でも、N 端 6 個と C 端 7 個のアミノ酸残基を削った

His₆ タグを持たない変異体 (Δ N6C7 変異体) を作製し、シグナル配列 SS2 を用いてブレヴィバチルス菌で分泌発現させた。クロレラ培地で 27 時間培養した培養液を還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離して分泌された Δ N6C7 変異体を CBB 染色で検出したところ、12 kDa の位置にバンドが観測された (図 2-11B)。アミノ酸配列から、 Δ N6C7 変異体の 1 本のペプチド鎖 (単量体) の分子量は 11.2 kDa と算出されるので、12 kDa のバンドは還元された単量体の Δ N6C7 変異体を示しているものと考えられる。 Δ N6C7 変異体は、そのバンドの強度から、クロレラ培地で全長の PTTH-His₆ を分泌発現させたときの約 2 倍の発現量があり (図 2-11A の左から 1~3 番目のレーン)、TM 培地で PTTH-His₆ を分泌発現させたときと比べても、その 3 分の 2 程度の発現量があることがわかった (図 2-11A の左から 4~6 番目のレーン)。よって、もし全長の PTTH-His₆ ではなくて Δ N6C7 変異体でも Torso との相互作用解析が可能ならば、3 L 程度の安定同位体標識したクロレラ培地でも、十分量の二量体 PTTH を産生することができるだろう (経済的にも現実的である)。

さらに、 Δ N6C7 変異体を含む培養液を非還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離してバンドを CBB 染色で検出したところ、22 kDa に二量体の Δ N6C7 変異体を示すと考えられるバンドが観測された (図 2-11C)。これにより、クロレラ培地を用いて培養を行った場合でも、分泌発現した Δ N6C7 変異体は二量体を形成することが確認できた。

過去に、カイコガの脳から天然の PTTH が単離精製されたとき、N 端や C 端が本来のものよりも短くなった PTTH の分子種がいくつも観測され、それらのように末端が削られた PTTH にも脱皮誘導活性が見られたことから、N 端や C 端のアミノ酸残基は PTTH の生物活性に必須ではないと考えられている⁶⁸。全長の PTTH の代わりに Δ N6C7 変異体を用いても Torso との相互作用解析を行うことは可能だろう。

第2章の考察とまとめ

本研究で確立した手法では、TM 培地 5 L から、1.02 mg の二量体カイコガ PTTH を調製することに成功した。大腸菌発現系のようにリフォールディング操作を行う必要はなく、1 L の培養液から約 0.2 mg の二量体カイコガ PTTH を再現性良く調製できるので、安定同位体標識を行うときには特に有効な調製法だと考えられる。

また、本研究で調製した二量体カイコガ PTTH は、S2 培養細胞に発現させたカイコガ Torso の自己リン酸化を引き起こし、生物活性があることを定性的には確認できた。しかし、それが天然のカイコガ PTTH とほぼ同等の活性をもつのかどうかについては調べることができなかった。天然の PTTH はカイコガの脳中に約 3 ng という極めて微量しか含まれておらず⁶⁹、天然から大量にカイコガ PTTH を精製することは難しいが、今後、せめて今回調製したカイコガ PTTH のリコンビナント体の有効活性濃度が昆虫体内で検出される濃度と同じレベルにあるのかについては確認を行いたい。

本研究でブレヴィバチルス菌を用いて調製した PTTH の ^1H -NMR スペクトルを測定した結果、シャープな NMR シグナルが、広い範囲の化学シフトに分散して観測されたことから、調製した PTTH は変性状態ではない一定の立体構造を保持していることがわかった。また、たとえ非標識体であっても、天然に存在する ^{13}C 核との間に S/N 比の高い $[^1\text{H}, ^{13}\text{C}]$ -HSQC スペクトルを観測することができた。安定同位体標識された PTTH であれば、帰属のための複雑な多次元 NMR で、同程度の S/N 比のスペクトルを得ることは可能であると考えている。

さらに、組換えタンパク質の安定同位体標識に用いるクロレラ培地でも、TM 培地と遜色ない量の PTTH を産生することができた（PTTH 全長でも 3 分の 1 程度、 ΔN6C7 変異体であれば 3 分の 2 程度の産生量があった）。今後、安定同位体標識したアミノ酸を含むクロレラ培地を用いて PTTH を大量に調製し、様々な多次元 NMR スペクトルを測定してシグナルの帰属を行った後、カイコガ Torso の滴定によって変化するシグナルが同定できれば、カイコガ PTTH 上の Torso 結合部位を原子レベルで決定することができるだろう。

カイコガ PTTH とそれ以外の鱗翅目に属する昆虫の PTTH との間で一次構造を比較しても、アミノ酸残基の保存性の低い部位が複数ヵ所存在するため（Cys17～Cys48 の間、Cys54～Cys96 の間、Cys98 以降の C 端）（図 0-4）、それだけでは標的昆虫種特異性を担うアミノ酸残基を特定することは難しい。しかし、NMR スペクトル測定で Torso との相互作用部位を明らかにすることができれば、標的特異性を担っている可能性のあるアミノ酸残基をかなり絞り込むことができるだろう。



ブレビバチルス菌用の
分泌シグナル配列

分泌シグナル	アミノ酸配列	由来
SS1	MKTIRTGMMTLAALAVLGTNVVSA	<i>B. choshinensis</i> のプロテアーゼインヒビター (BbrPI) ⁶³
SS2	MKKVVNSVLASALALTVPMAFA	<i>B. brevis</i> の細胞壁タンパク質 (MWP) ⁶⁴
SS3	MSISVRFKSLIALLMTVVFLVPSSAFA	<i>B. choshinensis</i> の22 kDaの機能未知タンパク質 (P22)
SS4	MKKRRVNSVLLLLLLASALALTVPMAFA	SS2の配列を改変した分泌シグナル配列 ⁶⁵

図 2-1. ブレビバチルス菌に分泌産生させた PTTH-His₆ の模式図

カイコガ PTTH 自身の分泌シグナルとプロ領域の配列は削り、配列の N 端にブレビバチルス属細菌のタンパク質に由来する 4 種の分泌シグナル配列 (SS1、SS2、SS3、SS4) を付加した。また、精製・検出を簡便に行うために、C 端には His₆ タグ配列を付加した。

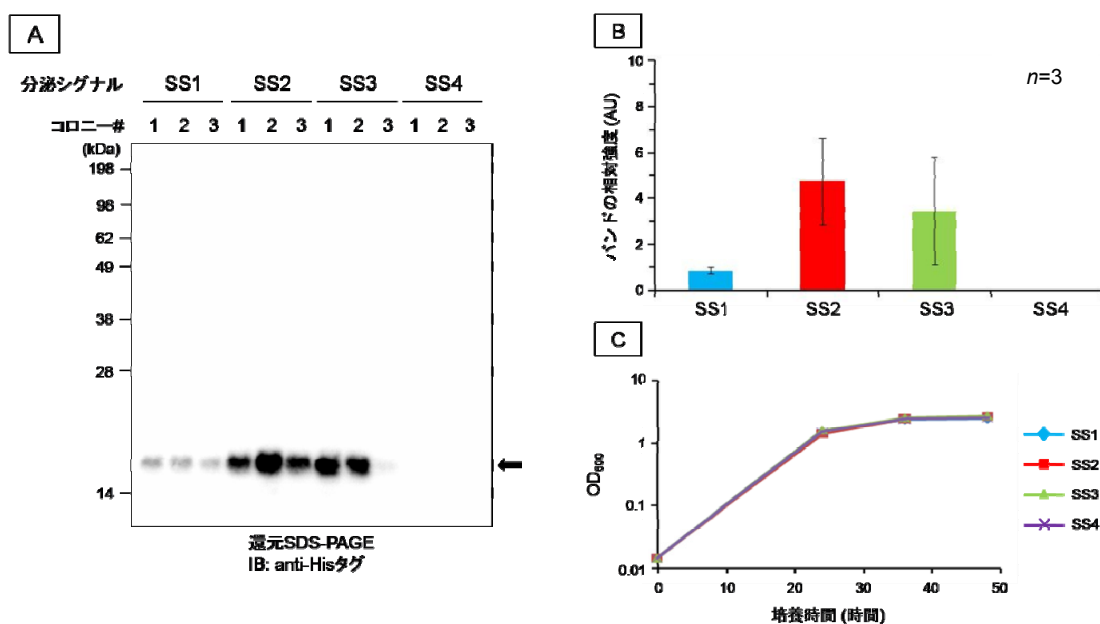


図 2-2. N 端に付加する分泌シグナルの違いによる PTTH-His₆ の分泌状況の比較

[A] N 端に 4 種の異なる分泌シグナル (SS1~SS4) を付加した PTTH-His₆ の発現ベクターで形質転換したブレヴィバチルス菌から、それぞれ 3 つのコロニーを選んで 48 時間培養し、その培養液各 5 μ L を還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離して、抗 His タグ抗体を用いたイムノブロッティングでバンドを検出した。各 SS1、SS2、SS3 では、約 15 kDa に PTTH-His₆ のバンドが観測されたが (黒色矢印)、SS4 では発現が見られなかった。

[B] [A] の各バンドの強度をデンストメトリックに算出し、SS1 のコロニー#1 の PTTH-His₆ のバンドの強度を 1 として、分泌シグナルごとにコロニー#1~3 のバンドの相対強度の平均を棒グラフで、標準偏差をエラーバーで示した ($n=3$)。

[C] 各培養液の 24 時間、36 時間、48 時間培養時点での濁度 (OD₆₀₀) を測定し、分泌シグナルごとの平均を培養時間に対してプロットした。分泌シグナルが違っていてもブレヴィバチルス菌の増殖自体にはほとんど変化はなかった。

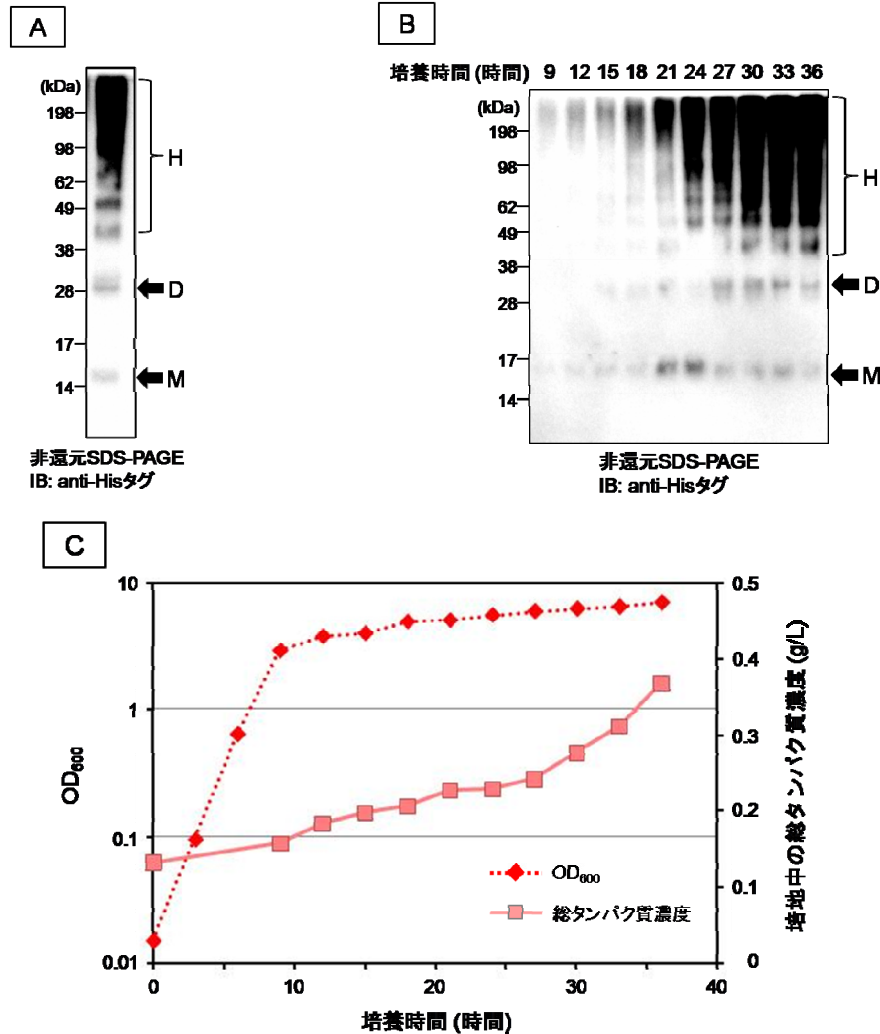


図 2-3. 培養時間にもなう分泌発現されたカイコガ PTTH の多量化状態の変化

[A] 分泌シグナルに SS2 をもつ PTTH-His₆ を発現するブレヴィバチルス菌を 36 時間培養し、培地中に分泌発現された PTTH-His₆ を非還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離して、抗 His タグ抗体を用いたイムノブロッティングで検出を行った。15 kDa に単量体 PTTH-His₆ のバンド (矢印 M) が観測され、28 kDa に二量体 PTTH-His₆ のバンド (矢印 D) が観測された。また、42 kDa、50 kDa やそれらよりも高分子量の位置により大きな多量体 PTTH-His₆ のバンド (H) が観測された。

[B] 形質転換したブレヴィバチルス菌を培養し、培養開始 9 時間後から 3 時間ごとに培養液の一部を回収して、非還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離し、抗 His タグ抗体を用いたイムノブロッティングでバンドを検出した。単量体 PTTH-His₆ のバンド (矢印 M) は 21~24 時間で最も強く観測され、二量体 PTTH-His₆ のバンド (矢印 D) は 27~30 時間で最も強く観測された。また、高分子量多量体 PTTH-His₆ のスメアーなバンド (H) は培養時間の経過につれて濃くなっていた。

[C] 3 時間ごとに培養液の一部を回収し、その濁度 (OD₆₀₀) と総タンパク質濃度をブラッドフォード法で測定した。培養液の濁度 (OD₆₀₀) を培養時間に対して片対数プロットすると、およそ 9 時間で対数増殖期が終わり定常期に入ることがわかった (赤色点線)。また、培養液中の総タンパク質濃度を培養時間に対してプロットすると、培養時間の経過につれて総タンパク質濃度が直線的に増加することがわかった (ピンク色実線)。

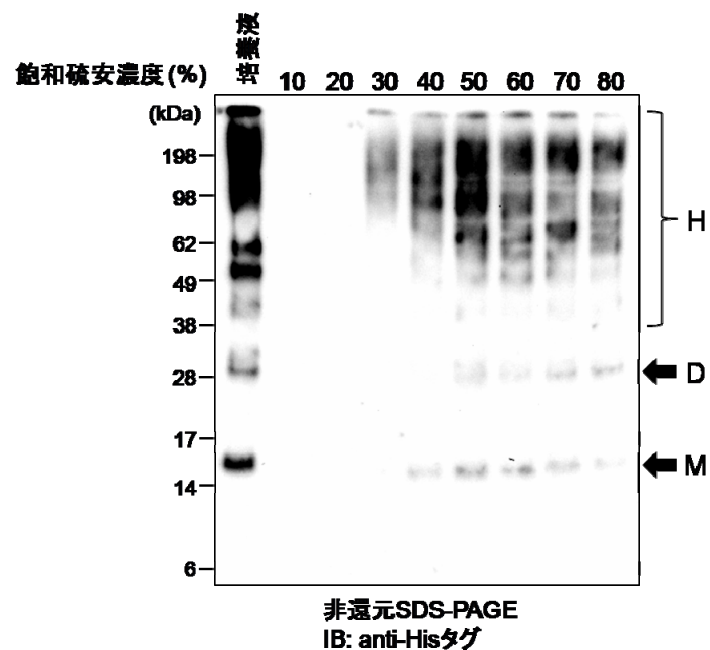


図 2-4. PTTH-His₆ を硫酸アンモニウムで沈殿濃縮するための条件検討

各飽和濃度になるように PTTH-His₆ が分泌された培養液に硫酸アンモニウムを加えて沈殿させた後、沈殿を HBS に再溶解した。再溶解したサンプルを非還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離して、抗 His タグ抗体を用いたイムノブロッティングで検出を行った。

二量体 PTTH-His₆ (矢印 D) は 30%飽和濃度では沈殿せず、50%飽和濃度以上で沈殿することがわかった。逆に 80%飽和濃度の硫酸アンモニウムを用いれば、より多くの二量体 PTTH-His₆ が沈殿画分に回収されることがわかった。また、30%飽和濃度では、高分子量多量体 PTTH-His₆ (H) の一部を沈殿させることができることもわかった。

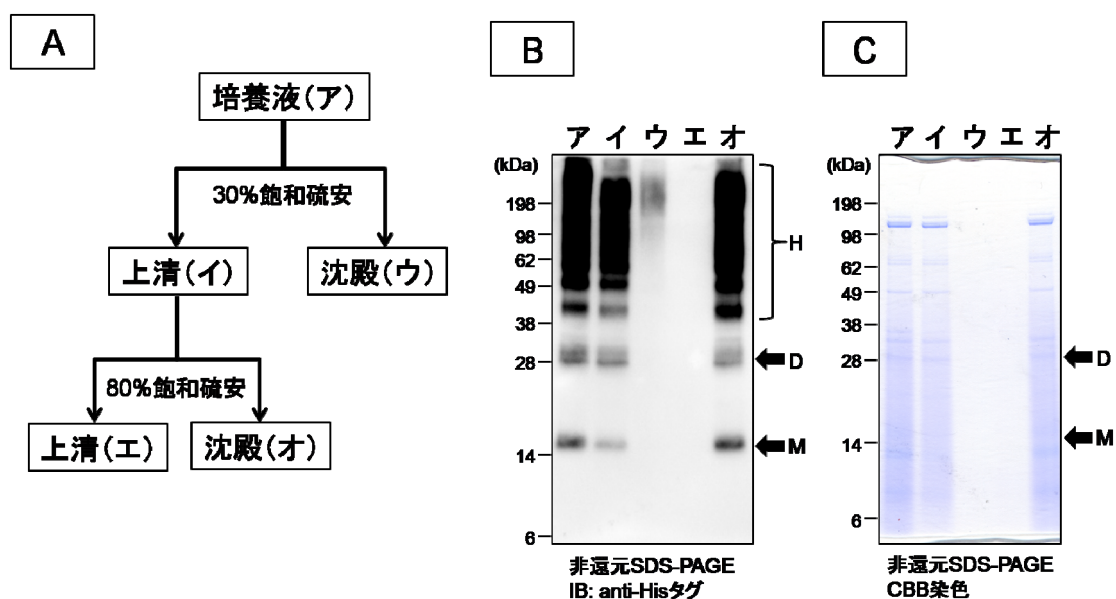


図 2-5. 培養液中のカイコガ PTTH の硫酸アンモニウム沈殿による分画・濃縮

[A] 培養液 (ア) に 30%飽和濃度になるように硫酸アンモニウムを加えて沈殿するもの (ウ) を除き、その上清 (イ) に 80%飽和濃度となるように硫酸アンモニウムをさらに加えて二量体 PTTH-His₆ を沈殿 (オ) として回収した。

[B] 各画分を非還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離して、抗 His タグ抗体を用いたイムノブロッティングでバンドを検出した。30%飽和濃度の硫酸アンモニウムでは、二量体 PTTH-His₆ (矢印 D) は全て上清画分 (イ) に回収され、高分子量多量体 PTTH-His₆ (H) の一部が沈殿画分 (ウ) に行った。上清 (イ) に対して、80%飽和濃度となるように硫酸アンモニウムをさらに加えたところ、二量体 PTTH-His₆ は全て沈殿画分 (オ) に回収された。

[C] 各画分を非還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離して、CBB 染色でバンドを検出した。二量体 PTTH-His₆ (矢印 D) や単量体 PTTH-His₆ (矢印 M) がわずかに観測されたのに対して、高分子量多量体 PTTH-His₆ を示すバンド (イムノブロッティングでの H に相当するもの) は観測されなかった。実際には、高分子量多量体 PTTH-His₆ は培養液中に少量しか存在しないのだろう。

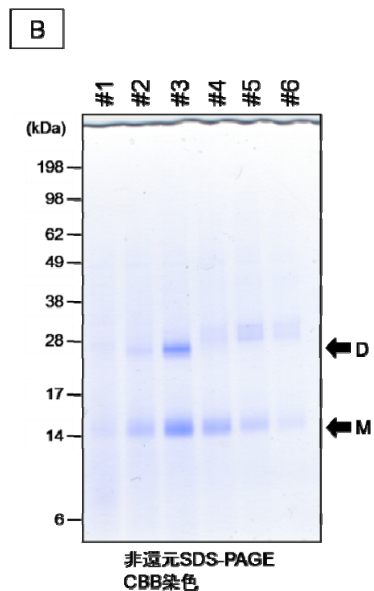
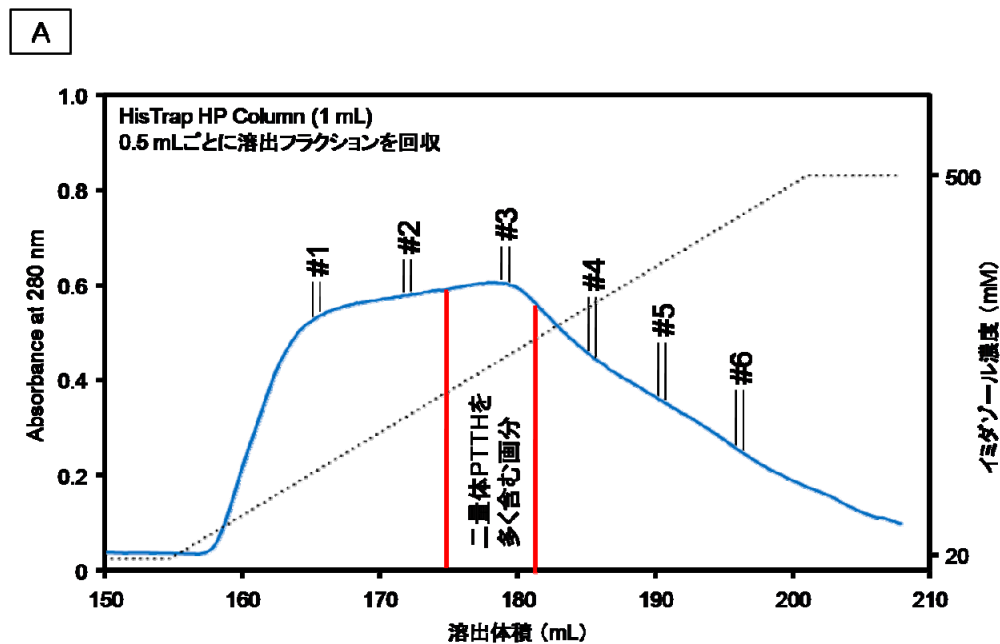


図 2-6. Ni^{2+} -NTA カラムクロマトグラフィーによる二量体 PTTH-His₆ の精製

[A] 硫酸アンモニウム沈殿で濃縮した二量体 PTTH-His₆ の試料溶液（培養液 500 mL 相当分）を Ni^{2+} -NTA カラムに注入し、イミダゾールの濃度を 20 mM から 500 mM までリニアに上昇させることによって（黒色破線）、カラムに吸着したタンパク質を溶出させた。溶出したタンパク質は 280 nm の吸光度でモニターした（青色実線）。

[B] 溶出フラクションのうち代表的なもの（#1～6）の CBB 染色した非還元 Bis-Tris SDS-PAGE を示した。二量体 PTTH-His₆ のバンド（矢印 D）は溶出フラクション#3 で強く観測され、単量体 PTTH-His₆（M）は溶出フラクション# 2～5 にかけて幅広く溶出していることがわかった。

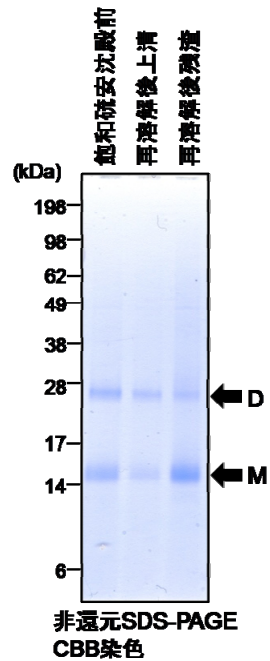


図 2-7. ゲル濾過クロマトグラフィーに向けた硫酸アンモニウム沈殿による試料の濃縮

Ni^{2+} -NTA カラムクロマトグラフィーの二量体 PTTH-His₆ を多く含む溶出フラクション (100 μL 相当分) に、80%飽和濃度となるように硫酸アンモニウムを加えて PTTH-His₆ を沈殿させた。その沈殿を 100 μL の HBS に再溶解し、遠心分離して上清と残渣に分けた。二量体 PTTH-His₆ のほとんどが再溶解後の上清画分に回収されたが、単量体 PTTH-His₆ はあまり回収されなかった。再溶解後の残渣に、単量体 PTTH-His₆ を示すバンドが強く観測された。

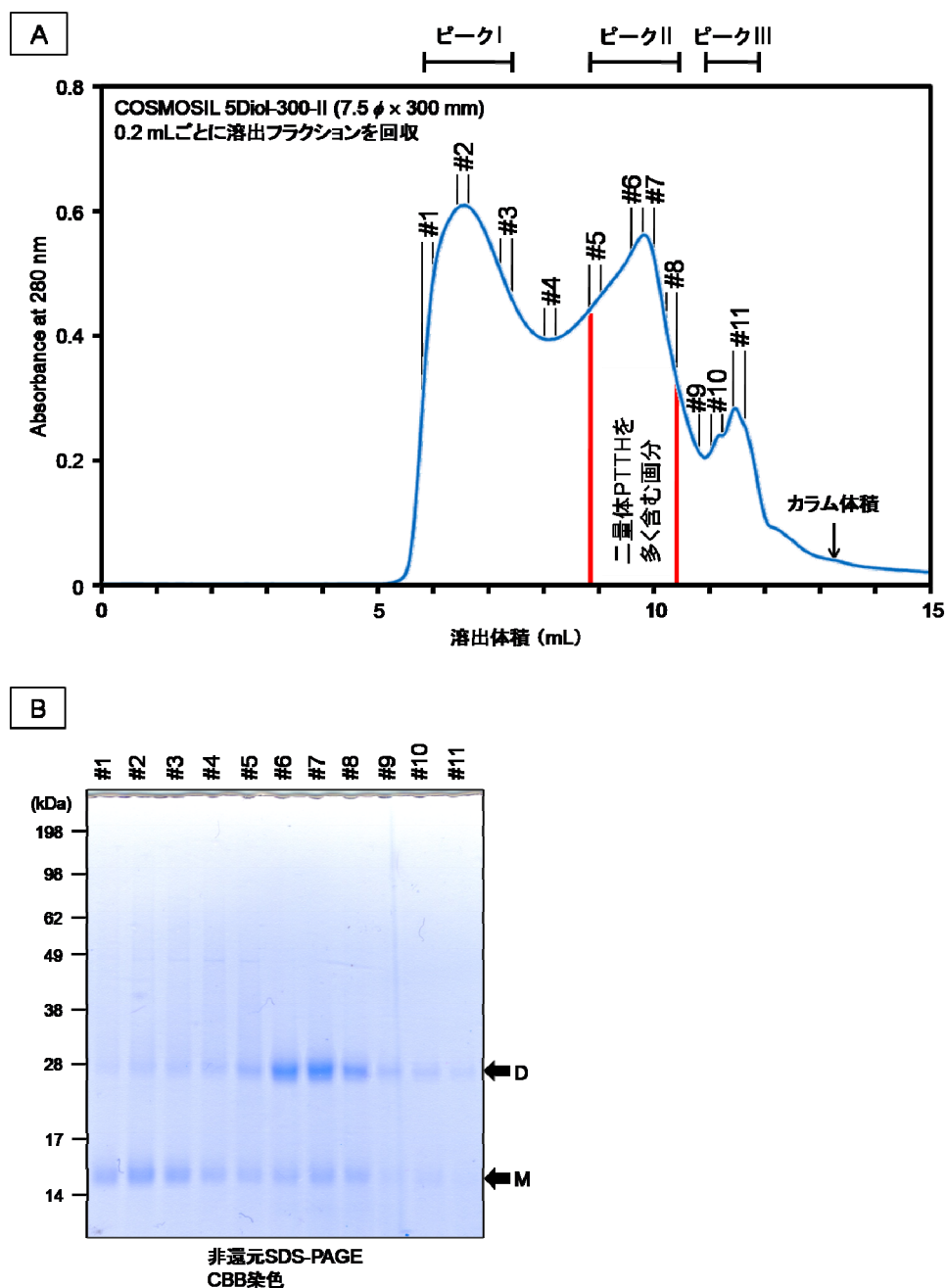


図 2-8. ゲル濾過クロマトグラフィーによる二量体 PTTH-His₆ の精製

[A] 硫酸アンモニウム沈殿で濃縮した二量体 PTTH-His₆ の試料溶液（培養液 1 L 相当分）をゲル濾過カラムに供し、流速 1 mL/min で HBS を流してカラムからタンパク質を溶出させた。溶出したタンパク質を 280 nm の吸光度でモニターしたところ（青色実線）、おもに 3 つのピーク（Ⅰ～Ⅲ）が観測された。

[B] 代表的な溶出フラクション（#1～11）を非還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離して、CBB 染色でバンドを検出した。溶出フラクション# 1～3（ピークⅠ）で単量体 PTTH-His₆ のバンド（矢印 M）が、溶出フラクション# 6～8（ピークⅡ）で二量体 PTTH-His₆ のバンド（矢印 D）が強く観測された。一方で、溶出フラクション# 9～11（ピークⅢ）では顕著なバンドは観測されなかった。

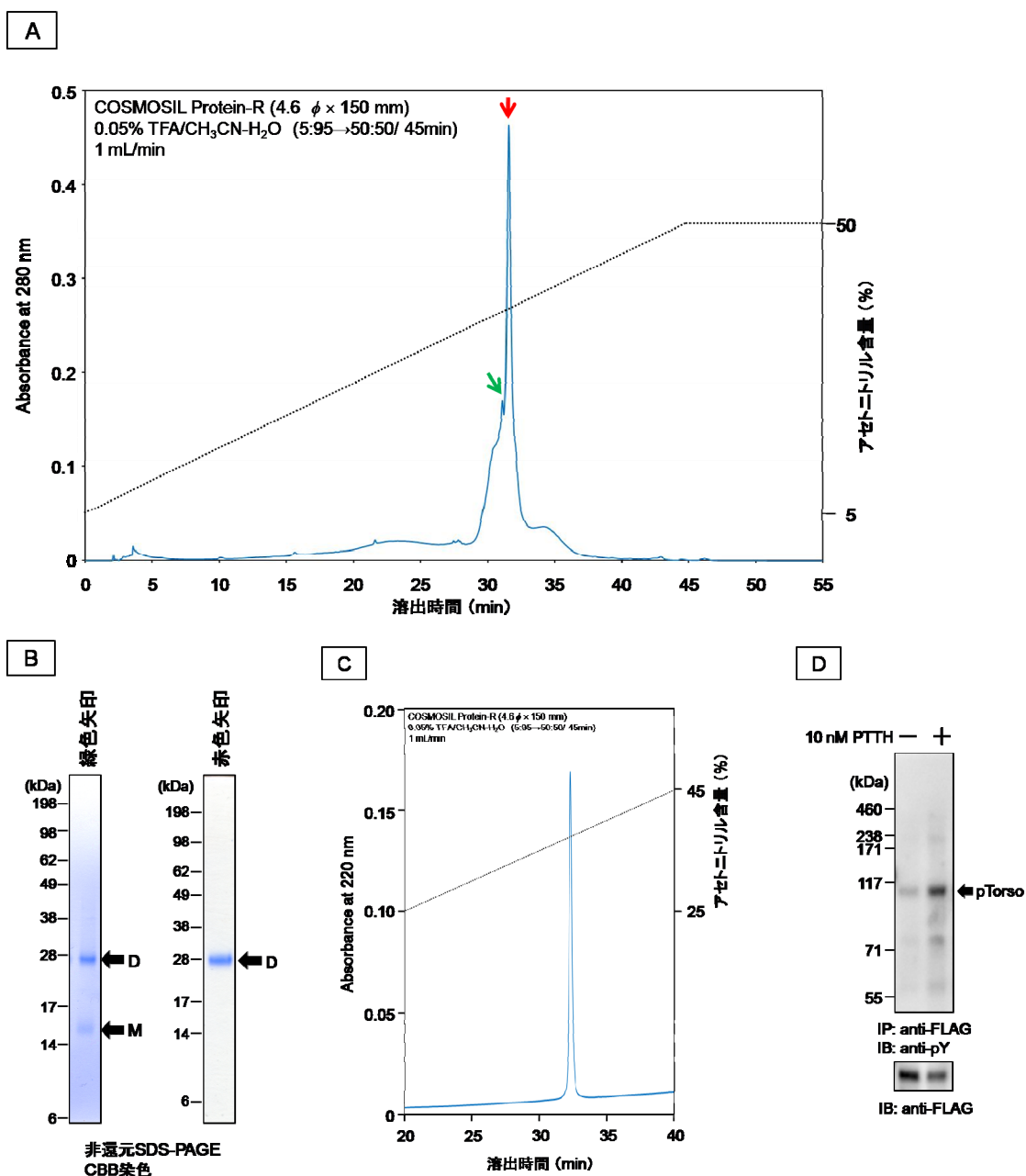


図 2-9. 逆相 HPLC による二量体 PTTH-His₆ の精製と、最終精製品の純度と活性の確認

[A] ゲル濾過クロマトグラフィーの溶出ピーク II (図 2-8A) を逆相カラムに注入した後、アセトニトリルの含量を 5% から 50% までリニアに上昇させ (黒色破線)、カラムに吸着したタンパク質を溶出させた。溶出したタンパク質を 280 nm の吸光度でモニターした (青色実線) ところ、メインのピーク (赤色矢印) の前に小さなピーク (緑色矢印) が肩となって重なっていた。

[B] [A] の緑色矢印と赤色矢印 2 つの溶出ピークを分取して非還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離し、CBB 染色でバンドを検出した。緑色矢印の溶出ピークでは単量体 (矢印 M) と二量体 (矢印 D) PTTH-His₆ のバンドが観測され、赤色矢印の溶出ピークでは二量体 PTTH-His₆ のバンド (矢印 D) のみが観測された。

[C] 赤色矢印の溶出ピークの一部を 220 nm の吸光度でモニターしながら逆相 HPLC で再検定したところ、ほぼ単一のピークを示した。

[D] 精製した二量体 PTTH-His₆ を用いて S2 培養細胞に発現させたカイコガ Torso を刺激したところ、自己リン酸化の促進が確認できた。

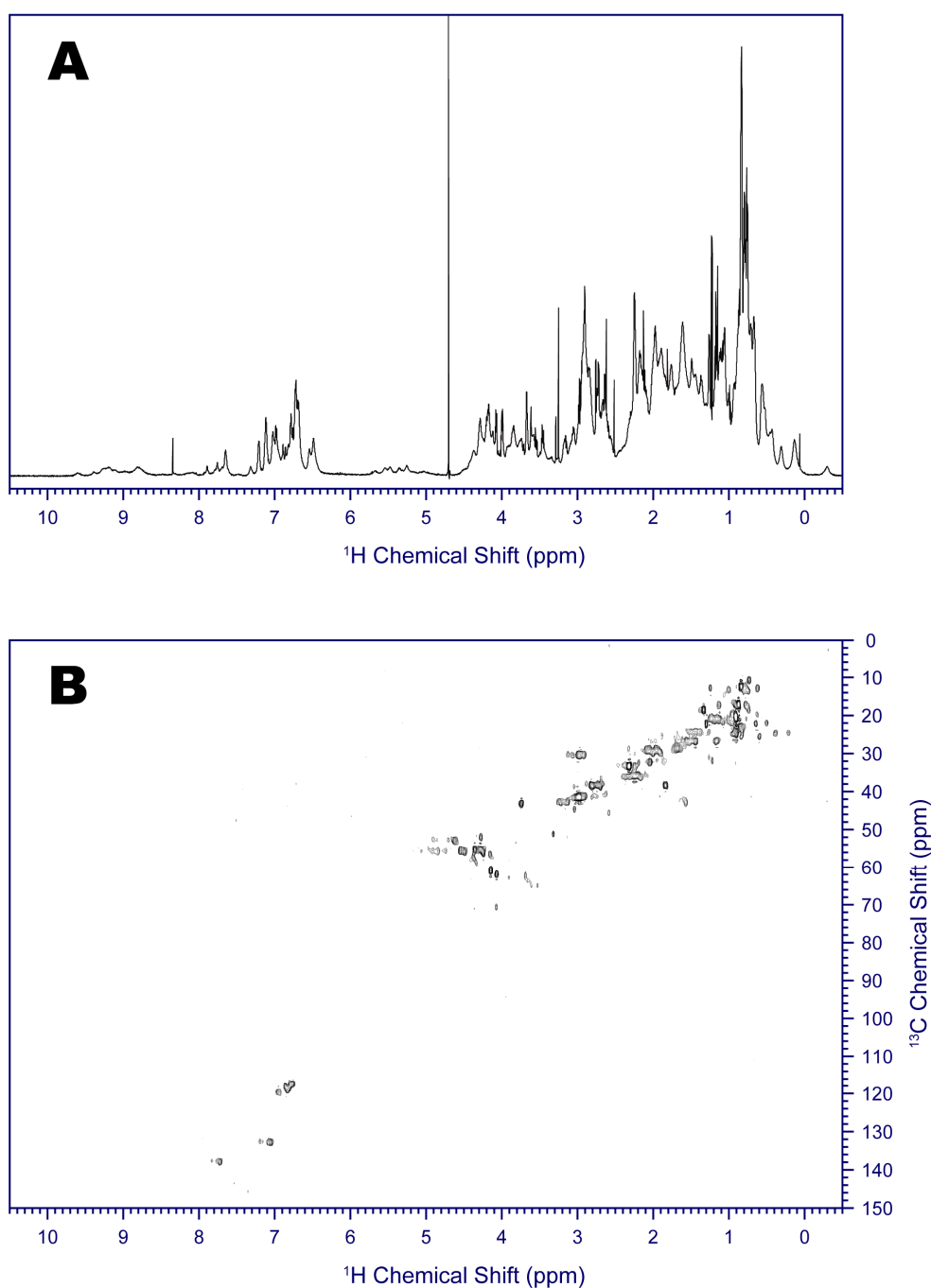


図 2-10. 精製した非標識カイコガ PTTH-His₆ の NMR スペクトル

濃度 : 1.2 mg/mL (二量体として約 50 μM)、溶媒 : 2 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0、重水 (D₂O))、測定温度 : 25°C。

[A] 一次元 750 MHz ¹H-NMR スペクトル。

[B] ¹H 核と天然に存在する ¹³C 核との二次元 [¹H, ¹³C]-HSQC スペクトル。

※ HSQC とは、Hetero-nuclear single quantum coherence の略で、¹H 核とその核に直接結合した他核との化学シフトの相関を測定することができる二次元 NMR スペクトルの代表的な測定法の一つ。

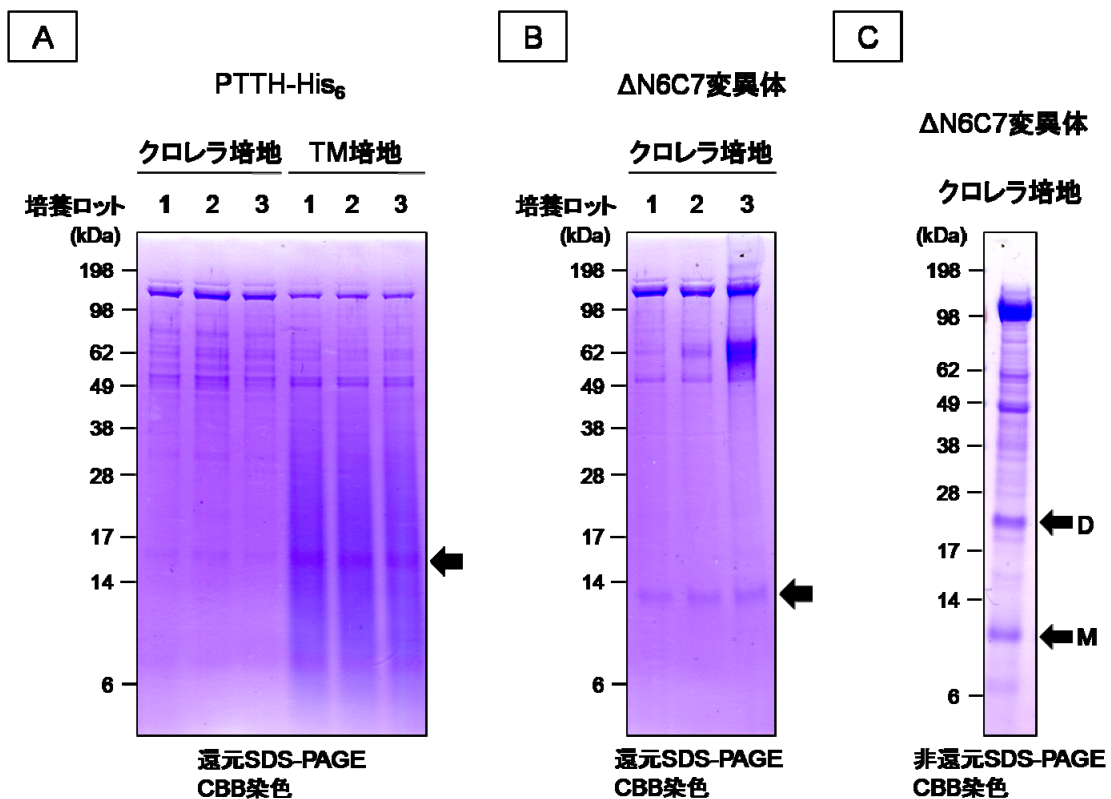


図 2-11. 非標識クロレラ培地を用いたカイコガ PTTH の分泌発現

[A] 分泌シグナルに SS2 を用いて PTTH-His₆ を発現するブレヴィバチルス菌をクロレラ培地で 27 時間培養し、培地中に分泌発現された PTTH-His₆ を還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離して CBB 染色でバンドを検出した。約 15 kDa の位置に PTTH-His₆ のバンド (黒色矢印) が観測された。クロレラ培地で培養した場合、PTTH-His₆ の発現量は TM 培地で培養したときに比べて 3 分の 1 程度であった。

[B] 分泌シグナルに SS2 を用いて $\Delta N6C7$ 変異体を発現するブレヴィバチルス菌をクロレラ培地で 27 時間培養し、培地中に分泌発現された $\Delta N6C7$ 変異体を還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離して CBB 染色でバンドを検出した。約 12 kDa に $\Delta N6C7$ 変異体のバンド (黒色矢印) が観測された。[A] と比較して $\Delta N6C7$ 変異体の発現量は、TM 培地で培養したときに発現した PTTH-His₆ の 3 分の 2 程度、同じクロレラ培地で培養して発現した PTTH-His₆ の 2 倍程度であった。

[C] $\Delta N6C7$ 変異体を発現するブレヴィバチルス菌をクロレラ培地で 27 時間培養し、培地を凍結乾燥で 5 倍に濃縮してから非還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離して CBB 染色でバンドを検出した。約 11 kDa に単量体の $\Delta N6C7$ 変異体のバンド (黒色矢印 M) が観測され、約 22 kDa に二量体の $\Delta N6C7$ 変異体のバンド (黒色矢印 D) が観測された。

総括

本研究で、カイコガ Torso が、PTTH 刺激前から膜貫通領域に存在する分子間ジスルフィド架橋を介して二量化しているという、チロシンキナーゼ型レセプターとしてはまったく新しい構造をとっていることを明らかにした。また、その分子間ジスルフィド架橋を失うと、リガンド刺激に対する正常な応答性を失ってしまったり、細胞外領域の構造が変化してしまったりすることから、この膜貫通領域の分子間ジスルフィド架橋はリガンドとの相互作用にも大きく影響する可能性が示された。したがって、PTTH と Torso との相互作用の解析には、Torso の細胞外領域だけでなく膜貫通領域をも含む全長を用いる必要があるだろう。比較的小さな細胞外領域 (~350 残基) をもつカイコガ Torso は、膜貫通領域の分子間ジスルフィド架橋で二量化し、リガンドとの接触面を増やすことにより、比較的大きなリガンド・カイコガ PTTH (109 残基×2) を厳格に認識できているのかもしれない。

カイコガ Torso は膜タンパク質であり、全長の Torso は不溶性で水溶液中に均一に分散させることは難しく、NMR スペクトル測定における滴定実験などにはそのままでは適用できない。しかし、近年、ナノディスクと呼ばれるリン脂質と膜骨格タンパク質からなる複合体に埋め込むことで、膜タンパク質を水溶液中で均一に分散させる手法が報告されている^{70,71}。S2 培養細胞の膜画分から、ドデシルマルトシドやオクチルグルコシドなどの界面活性剤を用いてカイコガ Torso を変性させずに取り出してナノディスクに移して埋め込むことができれば、カイコガの Torso 全長を用いて PTTH との相互作用解析を行うことができるようになるだろう。

Torso のようなリガンド刺激前からジスルフィド架橋を介して多量化しているチロシンキナーゼ型レセプター (例えばインスリンレセプター) では、リガンド刺激によってさらに会合するのではなく、立体構造変化が生じることで細胞内領域のキナーゼドメイン同士が互いに近づき自己リン酸化しあうと考えられているが、その詳細は明らかにされていない。インスリンレセプターが 2 本の α 鎖と 2 本の β 鎖からヘテロ四量体を形成している複雑な構造をとっているのに比べて、カイコガ Torso は二本のペプチド鎖でホモ二量体を形成している比較的単純な構造をとっている。カイコガ Torso の活性化機構 (自己リン酸化機構) を明らかにすることができれば、インスリンレセプターのようにリガンド刺激前からジスルフィド架橋を介して多量化しているチロシンキナーゼ型レセプターの活性化機構を明らかにするための有益な情報を得ることができるようになるだろう。

本研究で、カイコガ Torso が膜貫通領域にある分子間ジスルフィド架橋に支えられた二量体を形成していることを明らかにしたことで、PTTH との相互作用解析にはカイコガ Torso 全長を用いるべきであることが明らかになったこと、また安定同位体標識にも適用可能なリガンド PTTH の調製法を確立したことは、PTTH と Torso との相互作用解析に向けて大きな前進になったと考えている。今後、安定同位体標識した PTTH に対して、ナノディスクに埋め込んだ Torso を滴定しながら NMR スペクトルを測定することで、PTTH 上の Torso との相互作用部位を決定したいと考えている。さらに将来的には、NMR の解析結果から導き出された相互

作用部位の一部を他の昆虫種の PTH の配列と入れ替えたキメラ PTH を作製しその標的昆虫種に対する脱皮誘導活性を測定・比較することで、標的特異性を担うアミノ酸残基を特定したいと考えている。

実験の部

第 1 章の実験

カイコガ Torso 遺伝子のクローニング

カイコガ Torso 遺伝子を抽出するために、九州大学大学院の伴野豊先生よりご提供いただいたカイコガ P50 系統の 5 齢幼虫ワンダリング期 2 日目（5 齢幼虫 9 日目で蛹化の直前）の個体から前胸腺を摘出した。RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を使用して、すり潰した前胸腺から RNA を抽出した。混入した DNA をあらかじめ DNase I (QIAGEN) で分解してから RNA を精製し、オリゴ(dT)₁₈ プライマー (Fermentas) と SuperScript[®] III 逆転写酵素 (Invitrogen) を用いて cDNA に逆転写した。調製した cDNA をもとに、Takara EX Taq[®] (タカラバイオ) を用いた PCR によりカイコガ Torso 遺伝子を増幅した。なお、本研究で用いたプライマーのリストは末尾の表に示した。増幅した cDNA 断片を Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて精製し、Ligation-Convenience Kit (ニッポンジーン) を使用して、pGEM[®]-T Easy ベクター (Promega) に導入した。ライゲーションしたベクターで大腸菌 DH5α を形質転換し、100 mg/L のアンピシリンを含む LB プレート培地上で、形質転換体を選択した。得られた形質転換体を 100 mg/L のアンピシリンを含む LB 培地に植え、37°C、180 rpm で 16 時間振とう培養した。増殖させた形質転換体を回収し、FastGene Plasmid Mini Kit (日本ジェネティクス) を用いてベクターを抽出・精製した。カイコガ Torso 遺伝子の塩基配列は BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて PCR を行い、3130xl Genetic Analyzer で分析した。

カイコガ Torso 遺伝子の配列は、4 つのクローンで完全に一致したが、その遺伝子にコードされたアミノ酸配列のうち 9 つの残基は、UniProt で公開されているものとは異なっていた (L8S、K9R、V73I、K177Q、H431R、E487K、S528C、D547N、S600A)。アミノ酸配列におけるこれらの差異は、遺伝子を抽出したカイコガの系統の違いに由来するものと思われる。

カイコガ Torso 全長と変異体の発現ベクターの作製

クローニングしたカイコガ Torso 遺伝子の cDNA をテンプレートにして、KOD -plus-あるいは KOD FX (東洋紡) を用いた PCR によって、C 端に FLAG タグをコードする配列を有する DNA 断片を増幅した。増幅断片を *spe* I と *Xho* I (タカラバイオ) で酵素消化して pIZT/V5-His ベクター (Invitrogen) に導入した。ただし、EC 変異体は分泌タンパク質として培地中へ産生され、細胞膜上に発現した野生型 Torso や他の変異体に比べて大きく希釈されてしまったため、EC 変異体遺伝子については、ショウジョウバエ S2 培養細胞において異種タンパク質をより高レベルで発現させるために開発された pMT/V5-His ベクター (Invitrogen) に遺伝子を導入することにより、さらに効率のよい高発現系を構築した。

カイコガ Torso 全長とその変異体の発現

カイコガ Torso 全長とその変異体の挙動 (状態変化) を観測するために、ショウジョウバエ S2 培養細胞 (Life Technologies) における一過的な発現系を利用した。リポフェクタミン LTX Reagent (Life Technologies) を用いて S2 培養細胞を処理し、各発現ベクターまたは空ベクタ

ー (mock) を細胞内にトランスフェクションした。トランスフェクションした後、S2 培養細胞は FBS (AusGeneX) と抗生物質 (和光純薬) を含む *Drosophila* Schneider's 培地中で、25°C、24 時間培養した。EC 変異体以外の発現では、血清を含まない *Drosophila* Schneider's 培地中で、さらに細胞を 24 時間培養してスタベーション (血清飢餓) を施した。EC 変異体の発現では、金属イオン感受性のショウジョウバエメタロチオネインプロモーターをもつ pMT ベクターを用いたので、細胞を 0.5 mM の CuSO₄ を含む無血清 *Drosophila* Schneider's 培地中で、さらに 48 時間培養してタンパク質産生を誘導した。

SDS-PAGE とイムノブロッティング

電気泳動中におけるジスルフィド架橋のリアレンジメントを避けるため⁷²、特に記述のない限り、発現させたタンパク質は全て、中性 pH の Bis-Tris SDS-PAGE (NuPAGE® Bis-Tris ゲル、Life Technologies) で分析した。EC 変異体以外は MOPS-SDS ランニングバッファーを用いて 4–12% Bis-Tris ゲルで分離し、分子量が比較的小さい EC 変異体は MES-SDS ランニングバッファーを用いて 12% Bis-Tris ゲルで分離した。還元条件下で、架橋されたカイコガ Torso 多量体の分子量をより正確に見積もるときには、より広範囲のタンパク質の分離が可能で分子量の大きなタンパク質の分子量の値も比較的正确に見積もることができる NuPAGE® Novex® 3–8% Tris-Acetate ゲル (Life Technologies) を使用した。

SDS-PAGE ゲル上で分離したタンパク質を FluoroTrans® PVDF 膜 (Pall Corporation) に転写した後、5% スキムミルクを含む TBS-T (0.05 % Tween 20 を含む Tris-buffered saline) を用いて、PVDF 膜のブロッキングを行った。ただし、リン酸化タンパク質を検出する場合には、ブロッキングには、スキムミルクではなく 5% bovine serum albumin (BSA) を含む TBS-T を用いた。タンパク質を検出する一次抗体には、抗 FLAG 抗体 (マウスモノクローナル抗体、#M185-3S, Lot. 002、医学生物学研究所)、抗リン酸化 Tyr 抗体 (PY99) (マウスモノクローナル抗体、#SC-7020, Lot. G0913, Santa Cruz Biotechnology)、抗リン酸化 44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/ Tyr204) 抗体 (ウサギポリクローナル抗体、#9101, Lot. 27, Cell Signaling Technology)、抗 c-Myc 抗体 (9E10) (マウスモノクローナル抗体、#SC-40, Lot. B1313, Santa Cruz Biotechnology) を使用した。二次抗体には、HRP-linked 抗マウス IgG 抗体 (#7076, Lot. 31, Cell Signaling Technology) あるいは HRP-linked 抗ウサギ IgG 抗体 (#7074, Lot. 20, Cell Signaling Technology) を用いた。タンパク質のバンドの検出には ImmunoStar® LD (和光純薬) を用い、PVDF 膜の撮影には ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad) を用いた。

架橋実験

架橋剤 Sulfo-DST、BS³、Sulfo-EGS は、Thermo Fisher Scientific から購入した。Sulfo-BSOCOES は INDOFINE Chemical Company、Sulfo-DSG は ProteoChem から購入した。

カイコガ Torso あるいはその変異体を発現させた S2 培養細胞を 700 × g、4°C で 15 分間遠心分離して回収し、20mM の HEPES 緩衝液 (pH7.4) で 3 回洗浄した後、同じ緩衝液に再懸濁した。終濃度 10 nM の二量体 PTHH-His₆ (カイコガ PTHH) あるいは milli Q 水を加えて 10 分間インキュベーションを行った後、各架橋剤で 10 分間処理した。架橋剤の濃度は、通常、

終濃度 0.3 mM を用いたが、架橋されたカイコガ Torso 多量体の分子量をより正確に見積もる場合には、終濃度を 0.03 mM まで低下させることにより架橋された Torso のバンドがスメアーになるのを防いだ。終濃度 50 mM のグリシンを加えて架橋反応を停止させた後、 $10,000 \times g$ 、 4°C で 2 分間遠心分離して細胞を回収し、0.5 M DTT を含む SDS サンプルバッファーで回収した細胞を直接溶解した。

自己リン酸化アッセイ

野生型カイコガ Torso あるいはその C381/393/394F 変異体を発現させた S2 細胞を超音波で破碎して細胞ホモジネートを調製し、 $103,000 \times g$ 、 4°C で 90 分間超遠心分離して膜画分を回収した。その膜画分を HBS と *Drosophila* Schneider's 培地の 1 : 1 (v/v) 混合溶液（以降、再懸濁緩衝液と呼ぶ）に再懸濁し、終濃度 10 nM のカイコガ PTTH あるいは milli Q 水を加えて 10 分間インキュベーションを行った。膜画分を 1% Triton X-100、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、5 mM EDTA、1 mM PMSF、ホスファターゼインヒビターカクテル（ナカライテスク）を含む再懸濁緩衝液中で氷上に 15 分間静置して可溶化した。可溶化した膜画分を $20,000 \times g$ 、 4°C で 5 分間遠心分離して細胞デブリを除き、その遠心上清に終濃度 0.01 $\mu\text{g/mL}$ の抗 FLAG 抗体（マウスモノクローナル抗体、#M185-3S, Lot. 002、医学生物学研究所）を加えて、 4°C で 1 時間転倒混和した。そこに Protein A/G PLUS-Agarose (#sc-2003, Santa Cruz Biotechnology) を加えて 4°C でさらに 1 時間転倒混和することで免疫沈降を行った。免疫沈降したものを、1% Triton X-100 と 0.5% デオキシコール酸ナトリウムとを含む HBS で 3 回洗浄してから、免疫沈降したタンパク質を 150 $\mu\text{g/mL}$ の DYKDDDDK ペプチド（和光純薬）で溶出し、還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離した。リン酸化された Tyr 残基を認識する抗体を用いたイムノブロットティングで Torso の自己リン酸化を検出した。

ERK のリン酸化アッセイ

現有の抗 ERK 抗体では、ショウジョウバエ S2 培養細胞内の ERK をほとんど検出できなかったため、カイコガ Torso とともに、C 端に c-Myc タグを付加したショウジョウバエの ERK (DmERK-c-Myc) をローディングコントロールの検定用に S2 培養細胞に共発現させた。この手法は、先行研究でも採用されている²²。ショウジョウバエの ERK 遺伝子は、カイコガ Torso 遺伝子を調製したのと同様の手法により、ショウジョウバエ由来である S2 培養細胞から調製し、pIZT/V5-His ベクターに導入した。

野生型カイコガ Torso あるいは C381/393/394F 変異体の発現ベクターと DmERK-c-Myc の発現ベクターで同時にトランスフェクションを行った S2 培養細胞を $700 \times g$ 、 4°C で 15 分間遠心分離して回収し、自己リン酸化アッセイで用いたものと同じ再懸濁緩衝液に再懸濁した。その細胞を再懸濁した溶液に、終濃度 10 nM のカイコガ PTTH あるいは milli Q 水を加えて 20 分間インキュベーションを行った後、1% Triton X-100、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、5 mM EDTA、1 mM PMSF、ホスファターゼインヒビターカクテル（ナカライテスク）を含む再懸濁緩衝液中で氷上に 15 分間静置して可溶化した。 $20,000 \times g$ 、 4°C で 5 分間遠心分離して細胞デブリを除き、その遠心上清を総タンパク質濃度が 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ になるように HBS で希釈し

た。1 レーンあたりの総タンパク質量が 10 μ g となるように試料を 4-12% Bis-Tris ゲルにロードし、MES-SDS ランニングバッファーで泳動して還元 SDS-PAGE を行った。リン酸化された ERK を認識する抗体を用いたイムノブロッティングで ERK のリン酸化を検出した。また、抗 c-Myc 抗体を用いてリプローブし、DmERK-c-Myc を検出することで、ローディングコントロールをとった。

第 2 章の実験

カイコガ PTTH の発現ベクターの作製

カイコガ PTTH をブレヴィバチルス菌に分泌発現させるために、タカラバイオから市販されている pBIC ベクター (pBIC1、pBIC2、pBIC3、pBIC4) を利用した。4 種の pBIC ベクターは、それぞれブレヴィバチルス属細菌のタンパク質に由来する異なるシグナル配列の遺伝子を含んでいる (図 2-1)。

共同研究者が過去に作製した大腸菌発現用の、C 端に His₆ タグ配列が付加されたカイコガ PTTH の発現ベクター (pHKT-BmPTTH-His₆) をテンプレートにして、KOD -plus- (東洋紡) を用いた PCR によって、N 端と C 端に pBIC ベクターとオーバーラップする配列を有する DNA 断片を増幅した。なお、用いたプライマーは末尾の表に記載した。増幅断片 (約 20~30 ng) と各 pBIC ベクター (100 ng) を混合してブレヴィバチルス菌 (タカラバイオ) に導入し、菌体内で相同組み換えを起こさせることにより増幅断片を pBIC ベクターに組み込んだ⁷³。なお、増幅断片と pBIC ベクターのブレヴィバチルス菌への導入の詳細についてはタカラバイオの製品プロトコルに従った。FastGene Plasmid Mini Kit (日本ジェネティクス) を用いて、ブレヴィバチルス菌からカイコガ PTTH 発現ベクターを抽出・精製し、カイコガ PTTH 遺伝子の塩基配列は BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて PCR を行い、3130xl Genetic Analyzer で確認した。

SDS-PAGE とイムノブロッティング

電気泳動中のジスルフィド架橋のリアレンジメントを避けるために⁷²、発現させた C 端に His₆ タグをもつ全てのカイコガ PTTH は、中性 pH の Bis-Tris SDS-PAGE (NuPAGE[®] Bis-Tris ゲル、Life Technologies) で分析した。還元条件で分離する試料は、0.5 M DTT を含む SDS サンプルバッファー中で 30 分間ボイルして、非還元条件で分離する試料は、DTT を含まない SDS サンプルバッファー中で 5 分間ボイルした。還元・非還元条件ともに、MES-SDS ランニングバッファーを用いて 12% Bis-Tris ゲルで分離した。SDS-PAGE ゲル上で分離したタンパク質は、通常の CBB 染色またはイムノブロッティングで検出した。

イムノブロッティングでは、一次抗体には抗 His タグ抗体 (マウスモノクローナル抗体、#M089-3S、Lot.014、医学生物学研究所) を使用し、二次抗体には、HRP-linked 抗マウス IgG 抗体 (#7076、Lot. 31、Cell Signaling Technology) を用いた。タンパク質のバンドは ImmunoStar[®] LD (和光純薬) で検出して ChemiDoc[™] XRS+ (Bio-Rad) で撮影を行い、検出したバンドのデンストメトリックな解析には Image Lab v. 4.0.1 ソフトウェア (Bio-Rad) を用いた。

カイコガ PTTH 分泌発現のためのシグナル配列の選択

C 端に His₆ タグを付加したカイコガ PTTH (PTTH-His₆) の各発現ベクターで形質転換したブレヴィバチルス菌を、10 mg/L のネオマイシンを含む TM 培地⁷⁴ (10 g/L BBLTM PhytoneTM Peptone (Becton Dickson)、5 g/L エルリッヒカツオエキス (極東製薬)、粉末酵母エキス S (和光純薬)、10 g/L グルコース、10 mg/L FeSO₄ · 7H₂O、10 mg/L MnSO₄ · 4H₂O、1 mg/L ZnSO₄ · 7H₂O、pH 7.0) に植菌し、120 rpm で振とうしながら 30°C、24 時間前培養を行った。その前培養液の濁度 (OD₆₀₀) を測定した後、OD₆₀₀ の値が 1.5 になるように TM 培地で希釈した。希釈した前培養液を、10 mg/L のネオマイシンを含む TM 培地 (TMNm 培地) でさらに 100 倍希釈し、120 rpm で振とうしながら 30°C、48 時間本培養を行った。本培養の培養液を回収し、10,000 × g、4°C で 2 分間遠心分離して菌体を除き、その遠心上清を還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離した。His タグを認識する抗体を用いたイムノブロッティングで培地へ分泌発現された PTTH-His₆ を検出した。

二量体カイコガ PTTH が効率的に得られる培養時間の検討

PTTH-His₆ を発現するブレヴィバチルス菌を TMNm 培地に植菌し、120 rpm で振とうしながら 30°C、24 時間前培養を行った。その前培養液の濁度 (OD₆₀₀) を測定した後、OD₆₀₀ の値が 1.5 になるように TM 培地で希釈した。その希釈した前培養液 1 mL を、TMNm 培地 100 mL に植え継ぎ、120 rpm で振とうしながら 30°C で本培養を行った。培養開始から 3 時間ごとに本培養液の一部を回収して濁度 (OD₆₀₀) を測定後、10,000 × g、4°C で 2 分間遠心分離して菌体を除き、遠心上清を回収した。回収した培養液上清中の総タンパク質濃度をブラッドフォード法で測定した後、保存中のジスルフィド架橋のリアレンジメントを避けるために、終濃度 10 mM の N-エチルマレイミドを加えて遊離の SH 基を保護した。培養液上清を非還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離し、His タグを認識する抗体を用いたイムノブロッティングで培地へ分泌発現された PTTH-His₆ を検出した。

カイコガ PTTH を発現するブレヴィバチルス菌の大量培養と硫酸アンモニウム沈殿

PTTH-His₆ を発現するブレヴィバチルス菌を TMNm 培地に植菌し 120 rpm で振とうしながら 30°C、24 時間前培養を行った。その前培養液の濁度 (OD₆₀₀) を測定した後、OD₆₀₀ の値が 1.5 になるように TM 培地で希釈した。その希釈した前培養液 1 mL をずつ、TMNm 培地 100 mL × 10 本に植え継ぎ、120 rpm で振とうしながら 30°C、27 時間本培養を行った。本培養液 1 L を回収し、9,000 × g、4°C で 5 分間遠心分離して菌体を除き、遠心上清 960 mL を得た。培養液上清 960 mL に、169 g の硫酸アンモニウムを溶解して 30%飽和濃度の硫酸アンモニウム溶液とし、4°C で 1 時間攪拌した。30%飽和濃度の硫酸アンモニウム溶液を 9,000 × g、4°C で 15 分間遠心分離して沈殿物を除き、30%飽和硫酸アンモニウム上清画分 1040 mL を回収した。30%飽和硫酸アンモニウム上清画分 1040 mL に、さらに 370 g の硫酸アンモニウムを溶解して 80%飽和濃度の硫酸アンモニウム溶液とし、4°C で 12 時間攪拌した。80%飽和濃度の硫酸アンモニウム溶液を 9,000 × g、4°C で 15 分間遠心分離して上清を除き、80%飽和硫酸アンモニウム沈殿画分を回収した。

二量体カイコガ PTTH の精製

Ni²⁺-NTA カラムクロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーは、ÅKTA explorer 10S (GE ヘルスケア) を使用して行い、溶出したフラクションは Frac-950 (GE ヘルスケア) を用いて分取した。逆相 HPLC は、Prominence HPLC システム (島津製作所) を用いて行った。

【Ni²⁺-NTA カラムクロマトグラフィー】

培養液 500 mL に相当する 80%飽和硫酸アンモニウム沈殿画分を 20 mL の HBS (pH 7.0) に再溶解し 25 倍に濃縮した。その再溶解濃縮液を 9,000 × g、4°C で 15 分間遠心分離して残渣を除いた。再溶解液上清を 0.22 μm のフィルター (Millex[®]-GP、Merck Millipore) で濾過し、His-Trap HP 1 mL (GE ヘルスケア) に注入した。150 mL のバッファーA (20 mM HEPES、150 mM NaCl、20 mM イミダゾール、pH 7.0) でカラムを洗浄した後、バッファーB (20 mM HEPES、150 mM NaCl、500 mM イミダゾール、pH 7.0) を用いて、イミダゾール濃度を 20 mM から 500 mM まで 48 分かけてリニアに上昇させて、カラムに吸着したタンパク質を溶出させた。なお、流速 1 mL/min でバッファーを送液し、溶出したタンパク質は 280 nm の吸光度でモニターし、0.5 mL ずつ分取した。各溶出フラクションを非還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離し、CBB 染色で溶出したタンパク質を検出して、二量体 PTTH-His₆ の溶出位置を調べた。

【ゲル濾過クロマトグラフィー】

Ni²⁺-NTA カラムクロマトグラフィーにより、培養液 1 L 相当の試料から 12 mL の二量体 PTTH-His₆ を多く含む画分が得られたので、6.8 g の硫酸アンモニウムを溶解して 80%飽和濃度の硫酸アンモニウム溶液とし、4°C で 16 時間攪拌した。80%飽和濃度の硫酸アンモニウム溶液を 9,000 × g、4°C で 15 分間遠心分離して上清を除き、80%飽和硫酸アンモニウム沈殿画分を回収した。80%飽和硫酸アンモニウム沈殿画分を 0.6 mL の HBS に再溶解し 20 倍に濃縮した。その再溶解液を 15,000 × g、4°C で 15 分間遠心分離して残渣を除いた。再溶解液上清を 0.22 μm のフィルター (0.22 μm GV DURAPORE[®]、Merck Millipore) で濾過し、COSMOSIL 5Diol-300-II (内径 7.5 mm × 長さ 300 mm、粒子径 5 μm、細孔径 300 Å、ナカライテスク) に注入した。バッファー (20 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.0) を流速 1 mL/分で送液し、溶出したタンパク質は 280 nm の吸光度でモニターし、0.2 mL ずつ分取した。各溶出フラクションを非還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離し、CBB 染色で溶出したタンパク質を検出して、二量体 PTTH-His₆ の溶出位置を調べた。

【逆相 HPLC】

ゲル濾過クロマトグラフィーにより、培養液 1 L 相当の試料から 1.2 mL の二量体 PTTH-His₆ を多く含む画分が得られたので、0.22 μm のフィルター (0.22 μm GV DURAPORE[®]、Merck Millipore) で濾過し、COSMOSIL Protein-R (内径 4.6 mm × 長さ 150 mm、粒子径 5 μm、細孔径 300 Å、ナカライテスク) に注入した。移動相 A (0.05% TFA/CH₃CN-H₂O (5 : 95)) と移動相 B (0.05% TFA/CH₃CN-H₂O (50 : 50)) を用いて、CH₃CN 含量を 5%から 50%まで 45 分かけてリニアに上昇させ、さらに 10 分間 50% CH₃CN 含量の移動相を送液して、吸着したタンパク質を溶出させた。なお、流速 1 mL/分で移動相を送液し、溶出したタンパク質は 280 nm の吸光度でモニターを行った。分取した溶出ピークの一部を非還元 Bis-Tris SDS-PAGE で

分離し、CBB 染色で溶出したタンパク質を検出して、最終精製品の純度を確認した。また、分取した溶出ピークの一部を、COSMOSIL Protein-R に注入し、上と同じ条件で 220 nm の吸光度でモニターしながら再検定することで逆相 HPLC でも最終精製品の純度を確認した。

これら一連の精製手法を適用することで、最終的に 5 L の培養液から 1.02 mg の二量体 PTTH-His₆ を調製することができた。

二量体カイコガ PTTH の非標識体の NMR スペクトル測定

ゲル濾過 (COSMOSIL 5Diol-300-II) を用いて、調製した二量体 PTTH-His₆ の溶媒を 2 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に交換した。その試料を凍結乾燥した後、重水 (D₂O) に再溶解し 1.2 mg/mL (二量体として約 50 μM) の試料溶液を調製した。試料の NMR スペクトルは Bruker Avance 750 (750 MHz、クライオプローブ使用) を用いて、温度 25°C で測定した。今回の測定では、一次元 ¹H-NMR スペクトルは 42 分間、二次元 [¹H, ¹³C]-HSQC スペクトルは 40 時間の測定時間がかかった。

カイコガ PTTH 分泌発現の TM 培地と非標識クロレラ培地との比較実験

PTTH-His₆ あるいは N 端 6 残基と C 端 7 残基のアミノ酸配列を削った His₆ タグ配列をもたないカイコガ PTTH (ΔN6C7 変異体) の遺伝子配列を導入した pBIC2 ベクターで形質転換したブレヴィバチルス菌を TMNm 培地に植菌し、120 rpm で振とうしながら 30°C、24 時間前培養を行った。その前培養液の濁度 (OD₆₀₀) を測定した後、OD₆₀₀ の値が 1.5 になるように TM 培地で希釈した。希釈した前培養液を、10 mg/L のネオマイシンを含む非標識クロレラ培地 (クロレラ工業) あるいは TM 培地でさらに 100 倍希釈し、120 rpm で振とうしながら 30°C、27 時間本培養を行った。本培養液を回収し、10,000 × g、4°C で 2 分間遠心分離して菌体を除き、その遠心上清を還元 Bis-Tris SDS-PAGE で分離した。CBB 染色で培地へ分泌発現された PTTH-His₆ やその変異体を検出した。

表. 本研究で用いたプライマーリスト

実験	配列
第 1 章	
カイコガ Torso 遺伝子の	
クローニング	
Forward primer	ATGTATTCGGAAGGTAAA
Reverse primer	TCACGCGGTTTATGTTT
カイコガ Torso 全長	
Forward primer	TTTACTAGTATGTATTCGGAAGGTAAA
Reverse primer	AAACTCGAGTCACTTGTATCGTCATCCTTGTAGTCGCCGCCCGCGGTTTATGTTTGT
ΔK1 変異体	
Forward primer	TTTACTAGTATGTATTCGGAAGGTAAA
Reverse primer	AAACTCGAGTCACTTGTATCGTCATCCTTGTAGTCACGACAGAAAGAGAGTA
ΔK2 変異体	
Forward primer	TTTACTAGTATGTATTCGGAAGGTAAA
Reverse primer	AAACTCGAGTCACTTGTATCGTCATCCTTGTAGTCCCAAGAGCATCTCA
ΔK3 変異体	
Forward primer	TTTACTAGTATGTATTCGGAAGGTAAA
Reverse primer	AAACTCGAGTCACTTGTATCGTCATCCTTGTAGTCCCGGTCCGAGCGTAC
ΔIC 変異体	
Forward primer	TTTACTAGTATGTATTCGGAAGGTAAA
Reverse primer	AAACTCGAGTCACTTGTATCGTCATCCTTGTAGTCGCGGCGGTGTCCACA
EC 変異体	
Forward primer	TTTACTAGTATGTATTCGGAAGGTAAA
Reverse primer	AAACTCGAGTCACTTGTATCGTCATCCTTGTAGTCGCCTGGAGTAAAAGCT
C381/393/394A 変異体	
Forward primer	CGCAACGATCTGGTAAACAC
Reverse primer	GACAATACAACTAAGATTTAGTCAG
mutation primer	CTGCTGGCCGCAGGACACCGCCGCGCT
mutation primer	TCCTGCGGCCAGCAGGGTGGCCGC
mutation primer	GCGGGGGCAGCGGCGGGGGGGCTG
mutation primer	CGCCGCTGCCCCCGCGCCTGCCGT
C381A 変異体	
Forward primer	CGCAACGATCTGGTAAACAC
Reverse primer	GACAATACAACTAAGATTTAGTCAG
mutation primer	GCGGGGGCAGCGGCGGGGGGGCTG
mutation primer	CGCCGCTGCCCCCGCGCCTGCCGT

C381L 変異体	
Forward primer	CGCAACGATCTGGTAAACAC
Reverse primer	GACAATACAACTAAGATTTAGTCAG
mutation primer	GCGGGGCTCGCGGCGGGGGGGCTG
mutation primer	CGCCGCGAGCCCCGCGCCTGCCGT
C381F 変異体	
Forward primer	CGCAACGATCTGGTAAACAC
Reverse primer	GACAATACAACTAAGATTTAGTCAG
mutation primer	GCGGGGTTCGCGGCGGGGGGGCTG
mutation primer	CGCCGCGAACCCCCGCGCCTGCCGT
C381W 変異体	
Forward primer	CGCAACGATCTGGTAAACAC
Reverse primer	GACAATACAACTAAGATTTAGTCAG
mutation primer	GCGGGGTGGGCGGCGGGGGGGCTG
mutation primer	CGCCGCCCACCCCCGCGCCTGCCGT
C381/393/394F 変異体	
Forward primer	CGCAACGATCTGGTAAACAC
Reverse primer	GACAATACAACTAAGATTTAGTCAG
mutation primer	CTGCTGTTCTTCGACACCGCCGCGCT
mutation primer	TGTCCGAAGAACAGCAGGGTGGCCGC
mutation primer	GCGGGGTTCGCGGCGGGGGGGCTG
mutation primer	CGCCGCGAACCCCCGCGCCTGCCGT
ショウジョウバエ ERK	
遺伝子のクローニング	
Forward primer	ATGGAGGAATTTAATTCG
Reverse primer	CTTAAGGCGCATTGTC
DmERK-c-Myc	
Forward primer	TTTGAGCTCATGGAGGAATTTAATTCG
Reverse primer	CCCTCTAGATCACAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCGCCGCCAGGCGCATT GTCTGG
第 2 章	
SS1-PTTH-His ₆	
Forward primer	AACGTGGTATCGGCTGGCAACATTCAAGTTGAA
Reverse primer	CATCCTGTAAAGCTTATTAGTGATGGTGATGGTGATGATTATTATTATATCGTAGTTG
SS2-PTTH-His ₆	
Forward primer	CCCATGGCTTTCGCTGGCAACATTCAAGTTGAA
Reverse primer	CATCCTGTAAAGCTTATTAGTGATGGTGATGGTGATGATTATTATTATATCGTAGTTG

SS3-PTTH-His ₆	
Forward primer	AACGTGGTATCGGCTGGCAACATTCAAGTTGAA
Reverse primer	CATCCTGTTAAGCTTATTAGTGATGGTGATGGTGATGATTATTATTATATCGTAGTTG
<hr/>	
SS4-PTTH-His ₆	
Forward primer	AGTTCCGCATTGCTGGCAACATTCAAGTTGAA
Reverse primer	CATCCTGTTAAGCTTATTAGTGATGGTGATGGTGATGATTATTATTATATCGTAGTTG
<hr/>	
SS2-ΔN6C7 変異体	
Forward primer	CCCATGGCTTTGCTAACCAAGCTATTCCGGAT
Reverse primer	CATCCTGTTAAGCTTTTATTAGTAGTCTCTGTACACAAA

謝辞

本研究は、東京大学大学院・新領域創成科学研究科・先端生命科学専攻・分子認識化学分野で行った。

分子認識化学分野 片岡宏誌教授には、恵まれた研究環境を与えていただきました。なかなか順調に研究が進まない中でも私の自主性を尊重して下さい、自由に研究を進めさせていただきました。心より御礼申し上げます。

分子認識化学分野 永田晋治准教授には、研究に対する考え方や進め方など多くのことを教えていただきました。また、ディスカッションにおいて様々な面からご指摘いていただいたおかげで、より深く実験結果に向き合うことができました。心より御礼申し上げます。

分子認識化学分野 齋藤一樹客員共同研究員には、本研究を進めるにあたり、大変多くのアイデアを提案していただき、ディスカッションにも常にお付き合いいただきました。限られた時間の中で何に重点を置いて研究を進めるのか、実験結果とどう向き合って次の実験に繋げるのかなど研究者として非常に重要なことを厳しくも温かくご指導していただきました。また、分子認識化学分野に配属された当初から、実験の指導以外の部分でも大変お世話になりました。心より御礼申し上げます。今後とも長いお付き合いになることと思いますが、研究者として成長することで少しでも恩返しできればと思います。

九州大学大学院・農学研究院・遺伝子資源開発研究センター 伴野豊准教授（ナショナルバイリソースプロジェクト）には、カイコガ Torso 遺伝子のクローニングに用いたカイコガ P50 系統をご提供していただきました。心より御礼申し上げます

分子認識化学分野 荻原麻理特別研究員には、カイコガの Torso とショウジョウバエの ERK 遺伝子のクローニングをご指導いただきました。とくに、カイコガ前胸腺の摘出には全面的にご協力いただきました。心より御礼申し上げます。

農業・食品産業技術総合研究機構・高度解析センター生体高分子解析チーム 山崎俊正チームリーダーには、カイコガ PTTH の NMR スペクトルを測定していただきました。心より御礼申し上げます。

東京大学大学院・農学生命科学研究科・応用生命化学専攻・食品生物構造学研究室 永田宏次准教授には、PTTH のブレビバチルス菌での分泌発現に関する情報を教えていただきました。心より御礼申し上げます。

引場樹里博士には、S2 培養細胞の培養に関してご指導いただきました。心より御礼申し上げます。

楊易文さんには、カイコガ PTTH の調製法の確立に関して全面的にご協力いただきました。心より御礼申し上げます。

分子認識化学分野 山下雄佑さんには、 $\Delta N6C7$ 変異体の作製にご協力いただきました。心より御礼申し上げます。

星川珠莉さんには、大腸菌発現用の C 端に His₆ タグ配列が付加されたカイコガ PTTH の発現ベクター (pHKT-BmPTTH-His₆) を分与していただきました。心より御礼申し上げます。

分子認識化学分野の皆様には大変お世話になりました。恵まれた実験環境で、研究者としての基盤を築けたことを心から幸せに思います。

最後になりましたが、忙しいことを理由にして実家にほとんど帰らない私をずっと支え続けてくれた家族に心より感謝いたします。

引用文献リスト

1. Mizoguchi, A., Oka, T., Kataoka, H., Nagasawa, H., Suzuki, A., Ishizaki, H. Immunohistochemical localization of prothoracicotropic hormone-producing neurosecretory cells in the brain of *Bombyx mori*. *Develop. Growth Differ.*, 1990, **32**, 591–598.
2. Marchal, E., Vandersmissen, H.P., Badisco, L., Van, de Velde, S., Verlinden, H., Iga, M., Van, Wielendaele, P., Huybrechts, R., Simonet, G., Smagghe, G., Vanden, Broeck, J. Control of ecdysteroidogenesis in prothoracic glands of insects: a review. *Peptides*, 2009, **31**, 506–519.
3. Kataoka, H., Nagasawa, H., Isogai, A., Tamura, S., Mizoguchi, A., Fujiwara, Y., Suzuki, C., Ishizaki, H., Suzuki, A. Isolation and partial characterization of a prothoracicotropic hormone of the silk worm, *Bombyx mori*. *Agric. Biol. Chem.*, 1987, **51**, 1067–1076.
4. Kawakami, A., Kataoka, H., Oka, T., Mizoguchi, A., Kimura-Kawakami, M., Adachi, T., Iwami, M., Nagasawa, H., Suzuki, A., Ishizaki, H. Molecular cloning of the *Bombyx mori* prothoracicotropic hormone. *Science*, 1990, **247**, 1333–1335.
5. Kataoka, H., Nagasawa, H., Isogai, A., Ishizaki, H., Suzuki, A. Prothoracicotropic hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: amino acid sequence and dimeric structure. *Agric. Biol. Chem.*, 1991, **55**, 73–86.
6. Ishibashi, J., Kataoka, H., Isogai, A., Kawakami, A., Saegusa, H., Yagi, Y., Mizoguchi, A., Ishizaki, H., Suzuki, A. Assignment of disulfide bond location in prothoracicotropic hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: a homodimeric peptide. *Biochemistry*, 1994, **33**, 5912–5919.
7. Shionoya, M., Matsubayashi, H., Asahina, M., Kuniyoshi, H., Nagata, S., Riddiford, L.M., Kataoka, H. Molecular cloning of the prothoracicotropic hormone from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2003, **33**, 795–801.
8. Wei, Z.J., Zhang, Q.R., Kang, L., Xu, W.H., Denlinger, D.L. Molecular characterization and expression of prothoracicotropic hormone during development and pupal diapause in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *J. Insect Physiol.*, 2005, **51**, 691–700.
9. Xu, J., Su, J., Shen, J., Xu, W. Molecular characterization and developmental expression of the gene encoding the prothoracicotropic hormone in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Sci. China C Life Sci.*, 2007, **50**, 466–472.

10. Xu, W.H., Denlinger, D.L. Molecular characterization of prothoracicotropic hormone and diapause hormone in *Heliothis virescens* during diapause, and a new role for diapause hormone. *Insect Mol. Biol.*, 2003, **12**, 509–516.
11. Xu, W.H., Rinehart, J.P., Denlinger, D.L. Structural characterization and expression analysis of prothoracicotropic hormone in the corn earworm, *Helicoverpa zea*. *Peptides*, 2003, **24**, 1319–1325.
12. Mizoguchi, A., Ohsumi, S., Kobayashi, K., Okamoto, N., Yamada, N., Tateishi, K., Fujimoto, Y., Kataoka, H. Prothoracicotropic hormone acts as a neuroendocrine switch between pupal diapause and adult development. *PLoS. One*, 2013, **8**, e60824.
13. Sauman, I., Reppert, S.M. Molecular characterization of prothoracicotropic hormone (PTTH) from the giant silkworm *Antheraea pernyi*: developmental appearance of PTTH-expressing cells and relationship to circadian clock cells in central brain. *Dev. Biol.*, 1996, **178**, 418-429.
14. Sehna, F., Hansen, I., Scheller, K. The cDNA-structure of the prothoracicotropic hormone (PTTH) of the silkworm *Hyalophora cecropia*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2002, **32**, 233-237.
15. Kono, T., Nagasawa, H., Isogai, A., Fugo, H., Suzuki, A. Amino acid sequence of eclosion hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Agric. Biol. Chem.*, 1987, **51**, 2307-2308.
16. Kataoka, H., Troetschler, R.G., Kramer, S.J., Cesarin, B.J., Schooley, D.A. Isolation and primary structure of the eclosion hormone of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, **146**, 746-750.
17. Imai, K., Konno, T., Nakazawa, Y., Komiya, T., Isobe, M., Koga, K., Goto, T., Yaginuma, T., Sakakibara, K., Hasegawa, K., Yamashita, O. Isolation and Structure of Diapause Hormone of the Silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, 1991, **67**, 98-101.
18. Xu, W.H., Denlinger, D.L. Identification of a cDNA encoding DH, PBAN and other FXPRL neuropeptides from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and expression associated with pupal diapause. *Peptides*, 2004, **25**, 1099-1106.
19. 松林秀貴、鱗翅目昆虫前胸腺刺激ホルモン（PTTH）の大量発現・精製と生物活性、1999年、東京大学修士論文

20. Nagata, S., Kataoka, H., Suzuki, A. Silk moth neuropeptide hormones: prothoracicotropic hormone and others. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2005, **1040**, 38-52.
21. Klingler, M., Erdélyi, M., Szabad, J., Nüsslein-Volhard, C. Function of torso in determining the terminal anlagen of the *Drosophila* embryo. *Nature*, 1988, **335**, 275-277.
22. Rewitz, K.F., Yamanaka, N., Gilbert, L.I., O'Connor, M.B. The insect neuropeptide PTTH activates receptor tyrosine kinase torso to initiate metamorphosis. *Science*, 2009, **326**, 1403-1405.
23. Sprenger, F., Stevens, L.M., Nüsslein-Volhard, C. The *Drosophila* gene torso encodes a putative receptor tyrosine kinase. *Nature*, 1989, **338**, 478-483.
24. Ben-Shlomo, I., Hsu, S. Y., Rauch, R., Kowalski, H.W., Hsueh, A.J.W. Signaling receptome; a genomic and evolutionary perspective of plasma membrane receptors involved in signal transduction. *Sci. STKE*, 2003, **2003**, re9.
25. Schlessinger, J. Receptor tyrosine kinases: legacy of the first two decades. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2014, **6**, a008912.
26. Honegger, A.M., Kris, R.M., Ullrich, A., Schlessinger, J. Evidence that autophosphorylation of solubilized receptors for epidermal growth factor is mediated by intermolecular cross-phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1989, **86**, 925-929.
27. Fanger, B.O., Austin, K.S., Earp, H.S., Cidlowski, J.A. Cross-linking of epidermal growth factor receptors in intact cells: detection of initial stages of receptor clustering and determination of molecular weight of high-affinity receptors. *Biochemistry*, 1986, **25**, 6414-6420.
28. Cochet, C., Kashles, O., Chambaz, E.M., Borrello, I., King, C.R., Schlessinger, J. Demonstration of epidermal growth factor-induced receptor dimerization in living cells using a chemical covalent cross-linking agent. *J. Biol. Chem.*, 1988, **263**, 3290-3295.
29. Fanger, B.O., Stephens, J.E., Staros, J.V. High-yield trapping of EGF-induced receptor dimers by chemical cross-linking. *FASEB. J.*, 1989, **3**, 71-75.
30. Jacobs, S., Cuatrecasas, P. Disulfide reduction converts the insulin receptor of human placenta to a low affinity form. *J. Clin. Invest.*, 1980, **66**, 1424-1427.

31. Czech, M.P., Massague, J., Pilch, P.F. The insulin receptor: structural features. *Trends Biochem. Sci.*, 1981, **6**, 222-225.
32. Xu, Q.Y., Paxton, R.J., Fujita-Yamaguchi, Y. Substructural analysis of the insulin receptor by microsequence analyses of limited tryptic fragments isolated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis in the absence or presence of dithiothreitol. *J. Biol. Chem.*, 1990, **265**, 18673-18681.
33. Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I., Arakawa, T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.*, 2003, **28**, 1-8.
34. Chow, M.K., Amin, A.A., Fulton, K.F., Fernando, T., Kamau, L., Batty, C., Louca, M., Ho, S., Whisstock, J.C., Bottomley, S.P., Buckle, A.M. The REFOLD database: a tool for the optimization of protein expression and refolding. *Nucleic Acids Res.*, 2006, **34**, D207-212.
35. Nagata, S., Kobayashi, J., Kataoka, H., Suzuki, A. Structural determination of an *N*-glycan moiety attached to the prothoracicotrophic hormone from the silkworm *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2014, **78**, 1381-1383.
36. Rybczynski, R., Bell, S.C., Gilbert, L.I. Activation of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) by the insect prothoracicotrophic hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2001, **184**, 1-11.
37. Rybczynski, R., Gilbert, L.I. Prothoracicotrophic hormone stimulated extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity: the changing roles of Ca^{2+} - and cAMP-dependent mechanisms in the insect prothoracic glands during metamorphosis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2003, **205**, 159-168.
38. Lin, J.L., Gu, S.H. In vitro and in vivo stimulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) by the prothoracicotrophic hormone in prothoracic gland cells and its developmental regulation in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 2007, **53**, 622-631.
39. Rewitz, K.F., Larsen, M.R., Lobner-Olesen, A., Rybczynski, R., O'Connor, M.B., Gilbert, L.I. A phosphoproteomics approach to elucidate neuropeptide signal transduction controlling insect metamorphosis. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2009, **39**, 475-483.
40. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**, 680-685.

41. Cubillos-Rojas, M., Amair-Pinedo, F., Tato, I., Bartrons, R., Ventura, F., Rosa, J.L. Simultaneous electrophoretic analysis of proteins of very high and low molecular mass using Tris-acetate polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 2010, **31**, 1318-1321.
42. Stamos, J., Sliwkowski, M.X., Eigenbrot, C. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 46265-46272.
43. Carron, C., Pascal, A., Djiane, A., Boucaut, J.C., Shi, D.L., Umbhauer, M. Frizzled receptor dimerization is sufficient to activate the Wnt/ β -catenin pathway. *J. Cell. Sci.*, 2003, **116**, 2541-2550.
44. Ozawa, M., Kemler, R. The membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain prevents dimerization and negatively regulates adhesion activity. *J. Cell. Biol.*, 1998, **142**, 1605-1613.
45. Wang, K., Richards, F.M., Reaction of dimethyl-3,3'-dithiobispropionimidate with intact human erythrocytes. Cross-linking of membrane proteins and hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 1975, **250**, 6622-6626.
46. Staros, J.V. *N*-hydroxysulfosuccinimide active esters: bis(*N*-hydroxysulfosuccinimide) esters of two dicarboxylic acids are hydrophilic, membrane-impermeant, protein cross-linkers. *Biochemistry*, 1982, **21**, 3950-3955.
47. Staros, J. V. Membrane-impermeant crosslinking reagents: probes of the structure and dynamics of membrane proteins. *Acc. Chem. Res.*, 1988, **21**, 435-441.
48. Sparrow, L.G., McKern, N.M., Gorman, J.J., Strike, P.M., Robinson, C.P., Bentley, J.D., Ward, C.W. The disulfide bonds in the C-terminal domains of the human insulin receptor ectodomain. *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 29460-29467.
49. Vilar, M., Charalampopoulos, I., Kenchappa, R.S., Simi, A., Karaca, E., Reversi, A., Choi, S., Bothwell, M., Mingarro, I., Friedman, W.J., Schiavo, G., Bastiaens, P.I., Verveer, P.J., Carter, B.D., Ibáñez, C.F. Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers. *Neuron*, 2009, **62**, 72-83.
50. Resh, M.D. Palmitoylation of ligands, receptors, and intracellular signaling molecules. *Sci. STKE*, 2006, **2006**, re14.

51. Gayko, U., Cleghon, V., Copeland, T., Morrison, D.K., Perrimon, N. Synergistic activities of multiple phosphotyrosine residues mediate full signaling from the *Drosophila* Torso receptor tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, **96**, 523-528.
52. Cleghon, V., Gayko, U., Copeland, T.D., Perkins, L.A., Perrimon, N., Morrison, D.K. *Drosophila* terminal structure development is regulated by the compensatory activities of positive and negative phosphotyrosine signaling sites on the Torso RTK. *Genes Dev.*, 1996, **10**, 566-577.
53. Li, W.X. Functions and mechanisms of receptor tyrosine kinase Torso signaling: lessons from *Drosophila* embryonic terminal development. *Dev. Dyn.*, 2005, **232**, 656-672.
54. Jenni, S., Goyal, Y., von Grotthuss, M., Shvartsman, S.Y., Klein, D.E. Structural Basis of Neurohormone Perception by the Receptor Tyrosine Kinase Torso. *Mol. Cell*, 2015, **60**, 941-952.
55. Yamanaka, N., Hua, Y.J., Mizoguchi, A., Watanabe, K., Niwa, R., Tanaka, Y., Kataoka, H. Identification of a novel prothoracicostatic hormone and its receptor in the silkworm *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 14684-14690.
56. Takimura, T., Kato, M., Ohta, T., Yamagata, H., Udaka, S. Secretion of Human Interleukin-2 in Biologically Active Form by *Bacillus brevis* Directly into Culture Medium. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1997, **61**, 1858-1861.
57. Miyauchi, A., Ebisu, S., Uchida, K., Yoshida, M., Ozawa, M., Tojo, T., Kadowaki, K., Takagi, H. Pilot scale production of a recombinant human epidermal growth factor, secreted by *Bacillus brevis*, using expanded bed adsorption. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, **21**, 208-214.
58. Yamamoto, A., Iwata, A., Saito, T., Watanabe, F., Ueda, S. Expression and purification of canine granulocyte colony-stimulating factor (cG-CFS). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2009, **130**, 221-225.
59. Udaka, S., Yamagata, H. Protein secretion in *Bacillus brevis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1993, **64**, 137-143.
60. Takagi, H., Kadowaki, K., Udaka, S. Screening and characterization of protein-hyperproducing bacteria without detectable exoprotease activity. *Agric. Biol. Chem.*, 1989, **53**, 691-699.

61. Panda, A.K., Bisht, S.S., DeMondal, S., Senthil, Kumar, N., Gurusubramanian, G., Panigrahi, A.K. *Brevibacillus* as a biological tool: a short review. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2014, **105**, 623-639.
62. Onishi, H., Mizukami, M., Hanagata, H., Tokunaga, M., Arakawa, T., Miyauchi, A. Efficient production of anti-fluorescein and anti-Lysozyme as single-chain anti-body fragments (scFv) by *Brevibacillus* expression system. *Protein Expr. Purif.*, 2013, **91**, 184-191.
63. Shiga, Y., Hasegawa, K., Tsuboi, A., Yamagata, H., Udaka, S. Characterization of an extracellular protease inhibitor of *Bacillus brevis* HPD31 and nucleotide sequence of the corresponding gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, **58**, 525-531.
64. Adachi, T., Yamagata, H., Tsukagoshi, N., Udaka, S. Multiple and tandemly arranged promoters of the cell wall protein gene operon in *Bacillus brevis* 47. *J. Bacteriol.*, 1989, **171**, 1010-1016.
65. Sagiya, Y., Yamagata, H., Udaka, S. Direct high-level secretion into the culture medium of tuna growth hormone in biologically active form by *Bacillus brevis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1994, **42**, 358-363.
66. Tanio, M., Tanaka, T., Kohno, T. ¹⁵N isotope labeling of a protein secreted by *Brevibacillus choshinensis* for NMR study. *Anal. Biochem.*, 2008, **373**, 164-166.
67. Tanio, M., Kusunoki, H., Kohno, T. ¹H, ¹³C and ¹⁵N backbone resonance assignments of the monomeric human M-ficolin fibrinogen-like domain secreted by *Brevibacillus choshinensis*. *Biomol. NMR Assign.*, 2014, **8**, 207-211.
68. 片岡宏誌、カイコ前胸腺刺激ホルモンに関する研究、1986 年、東京大学博士論文
69. Mizoguchi, A., Ohashi, Y., Hosoda, K., Ishibashi, J., Kataoka, H. Developmental profile of the changes in the prothoracicotropic hormone titer in hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*: correlation with ecdysteroid secretion. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2001, **31**, 349-358.
70. Bayburt, T.H., Grinkova, Y.V., Sligar, S.G. Self-assembly of discoidal phospholipid bilayer nanoparticles with membrane scaffold proteins. *Nano Lett.*, 2002, **2**, 853-856.
71. Denisov, I.G., Grinkova, Y.V., Lazarides, A.A., Sligar, S.G. Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer Nanodiscs with controlled size. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 3477-3487.

72. Saito, K., Yasuo, I., Uchimura, H., Koide-Yoshida, S., Mizuguchi, T., Kiso, Y. Verification of protein disulfide bond arrangement by in-gel tryptic digestion under entirely neutral pH conditions. *Proteomics*, 2010, **10**,1505-1509.
73. Tokunaga, M., Mizukami, M., Yamasaki, K., Tokunaga, H., Onishi, H., Hanagata, H., Ishibashi, M., Miyauchi, A., Tsumoto, K., Arakawa, T. Secretory production of single-chain antibody (scFv) in *Brevibacillus choshinensis* using novel fusion partner. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, **97**, 8569-8580.
74. Tanaka, R., Hashimoto, M., Ishibashi, M., Tokunaga, H., Taura, S., Mizukami, M., Miyauchi, A., Tokunaga, M. Secretion of *Escherichia coli* DsbA and DsbC proteins from *Brevibacillus choshinensis*: stimulation of human epidermal growth factor production. *Biotechnol. Lett.*, 2001, **23**, 1853-1857.

発表論文

Tadafumi Konogami, Yiwen Yang, Mari H. Ogihara, Juri Hikiba, Hiroshi Kataoka, Kazuki Saito.
Ligand-dependent responses of the silkworm prothoracicotropic hormone receptor, Torso, are maintained by unusual intermolecular disulfide bridges in the transmembrane region.
Scientific Reports, 2016, **6**, 22437.