

カイコ前胸腺刺激ホルモンの糖鎖構造と
受容体に関する研究

永田 晋治

カイコ前胸腺刺激ホルモンの糖鎖構造と 受容体に関する研究

永 田 晋 治

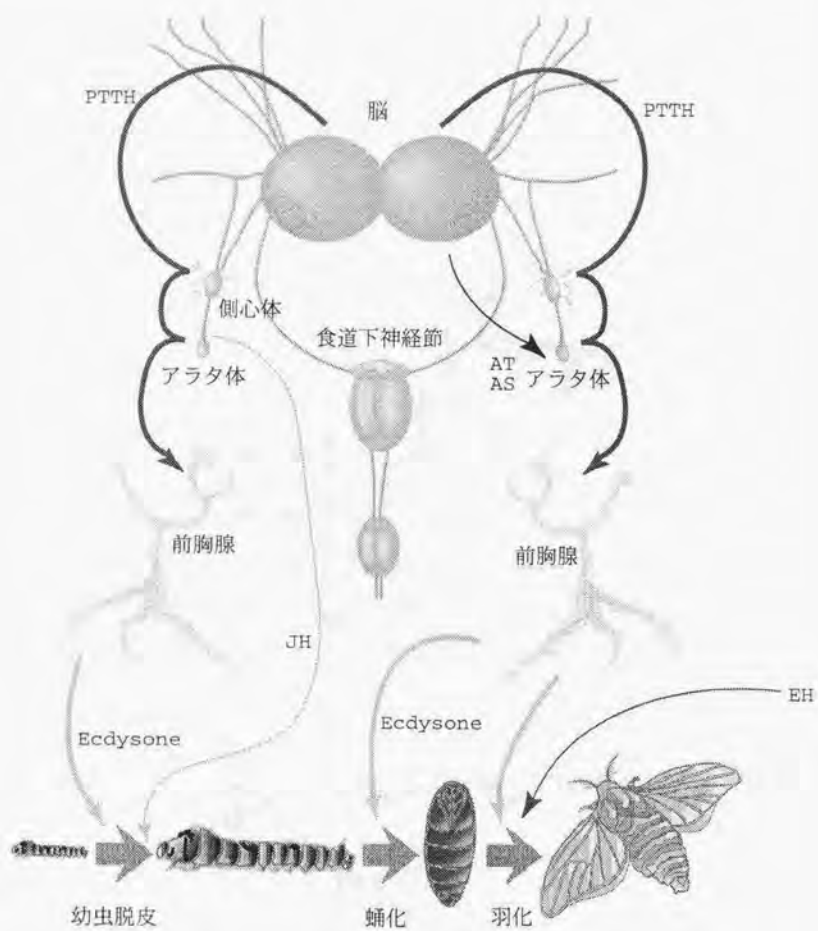
目 次

序論	1
第1部 カイコPTTHの糖鎖構造解析	16
第1章 バキュロウィルス発現系を用いたPTTHの大量発現	17
第2章 バキュロウィルス発現カイコPTTHの糖鎖構造解析	23
第3章 天然PTTHの糖鎖構造決定	38
第4章 糖鎖の有無によるPTTH活性の違い	46
第5章 まとめおよび考察	49
第2部 カイコPTTH受容体の解析	55
第1章 カイコPTTH受容体の性質	57
第2章 カイコ前胸腺cDNAライブラリーの構築	63
第3章 カイコPTTH受容体のスクリーニング	72
第4章 まとめおよび考察	88
総括	94
実験の部	101
参考文献	121
謝辞	127

序論

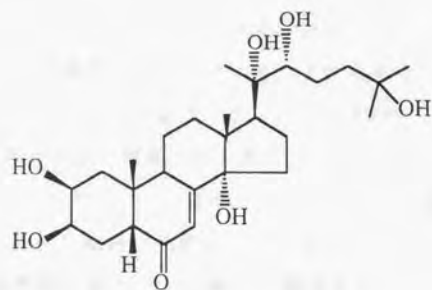
蝶や蛾は成長に伴い幼虫、蛹、成虫とあたかも別の生き物のように姿を変える。昆虫の脱皮、変態は多くの科学者を魅了するには十分な現象であった。その研究の歴史は古く、今から70年以上も前、1922年になされたKopećの発見に始まる。マイマイガの幼虫を用いた彼の実験の結論は、「変態を誘導するホルモンが脳から分泌されている」というものであった¹⁾。その後多くの昆虫生理学者による、様々な器官を摘出、移植する実験形態学的手法研究から、変態現象を司る重要な器官として脳、前胸腺、アラタ体の3器官が見い出され、それらの器官からそれぞれホルモンが分泌されていることが確認された。脳からはKopećが示唆した前胸腺刺激ホルモン (Prothoracicotropic hormone, PTH)、前胸腺からは脱皮ホルモン (Molting hormone, MH、エクジソン)、アラタ体からは幼若ホルモン (Juvenile hormone, JH) がそれぞれ分泌されている。図0-1は現在も支持されている変態現象の内分泌支配のクラシカルスキームである。エクジソンはPTHにより、JHはアラタ体刺激ホルモン (アラトトロピン) により分泌が促進される。エクジソンの分泌によって脱皮は進行するが、幼虫体内のJHの濃度に依存して幼虫脱皮、または蛹脱皮が運命づけられる。成虫になるまで6回脱皮をするカイコの場合、体内のJH濃度が高い1~4齢幼虫は幼虫脱皮し、JHの分泌が抑えられる5齢では蛹脱皮をする。

上記の脱皮変態を支配している各ホルモンの構造は、1965年にエクジソン²⁾、1967年にJH³⁾ が図0-2のように決定された。図0-2からも明らかのように、エクジソンとJHは有機溶媒に可溶性ホルモンである。PTHも当初は末梢ホルモンであるエクジソンやJHと同様に有機溶媒に可溶性低分子化合物であると考えられていた。しかし、PTHはその後水溶性のホルモンであり、エクジソンやJHとは明らかに性質の異

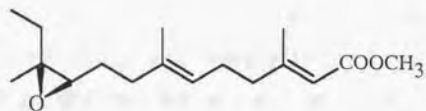


PTH:前胸腺刺激ホルモン
 AT:アラタ体刺激ホルモン
 AS:アラタ体抑制ホルモン
 JH:幼若ホルモン
 EH:羽化ホルモン

図 0-1 昆虫の脱皮、変態のクラシカルスキーム



ecdysone



JH-II

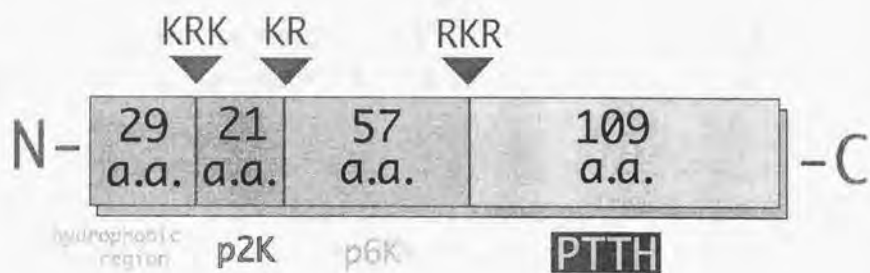
図 0-2 ecdysone と juvenile hormone (JH-II) の構造

なるものであることがわかった。その後、多くの研究者の努力にも関わらず、PTTHはタンパク質であると推定されただけで単離構造決定には至らなかった⁴⁻¹²⁾。また、PTTHが昆虫の体内で非常に微量にしか存在していなかったことも構造決定を困難にした原因となっていた。

PTTHの精製法に関する研究は、日本において1960年頃に始められた。1970年代になって当研究室も参加するようになり、その後主要な貢献をなした。脳内に存在するPTTHの微量性を克服するため、カイコを材料として精製単離が行われた。日本においてカイコは古くから研究されており、養蚕業で大量に入手することが可能であったため、PTTHを精製するのに好都合な昆虫であった。1987年にはカイコ頭部50万頭から16段階の精製の精製工程を経て、ついに5.4 μ gのPTTHが単離された¹³⁾。その後、300万頭のカイコ頭部からの精製単離を行い、アミノ酸配列分析の結果、最終的に104残基からなるペプチド鎖のアミノ酸配列が決定された¹⁴⁾。しかし、得られたPTTHのアミノ酸配列の41残基目のアミノ酸とC末端の数残基は未同定のままであった。後にPTTHのcDNAクローニングが行われ、未同定であったC末端のArg-Tyr-Asn-Asn-Asnの配列と41残基目のアミノ酸がAsnであることが決定された¹⁵⁾ (図0-3)。この41残基目から始まるAsn-Lys-Thrの配列はいわゆるN-結合型糖鎖付加のコンセンサス配列であったことや、アミノ酸配列の解析中に41残基目のアミノ酸が見い出されなかったことから、41残基目のAsnには糖鎖が付加していることが示唆された。しかし、その糖鎖構造を解析するためには天然から得られるPTTHが微量であるため、未決定のままであった。

一次構造が決定されたカイコPTTHはその後、大腸菌を用いた大量発現系が開発され、この発現カイコPTTHを用いてジスルフィド結合の架橋様式が解析された。その結果、カイコPTTHはペプチド中に存在する7つのシステイン残基がペプチド鎖内で3対、ペプチド鎖間で1対のS-S架橋をもつホモダイマー構造をとっていることが明らかにな

cDNA Structure of *Bombyx* PTH



```

ATCGTTCAGITGAGTATCCAGCATCCAATCAAGCTGCTGACCGAATATATTAGTCAITTTGTGTAGCCATATET 80
      MYTRKDFLNLIELLYAII 16
ATGATAGTGGAGTCAATTEGTCFAAAGCGTAGCGCTGAAGAAAAACAGACGTGGGTGGTTTTATGGTAGAAGACCA 160
      MTPQSFVYKAVVALKRKRPDVGGFHVEDQ 43
ACGCACACATAAAAGTCACAATACATGATGAAAAGAGCAAGAAATGAGCTTTTGACAGATAAGAAACUTCAGCCCGA 240
RTHKSKSHNYMMKRARRNDVLAQKENVRV 69
ATGTTTTCGAAAGCAATCTTTTACCCAGAGAGAGAAAGAAATTTGCTCCCTTGAATAGTATTATAGCAATATG 320
      WPPYVTEPFVMDISVPEISSLLELVDTANN 96
PTHAGKAKGATTTTATLTGTTAATAGTTCGGTTGAAALGAGACTTGAAAAAGCGAAACATTCAAGTTGAAAACCA 400
      JRNQVSLLDWSSVETRTRKRGNIQVENQ 123
AGCTATTCGGATCCACCTTGCACCTGCAAAATACAAGAAAGAAATAGAAGACTTGGCGGAAAACCTCTGTCCACGCTTCA 480
      AIPDPPCTCKYKKEIEDLGENSVPRF 149
TTGAAACCAGAACTGTAATAAAACACAACAGCCGACTTGTGACCCCCCTACATTTGCAAAAGAAAGTTATACAGTATA 560
      IETRNCNKQTQQPTCRPPYICKESLYSI 176
ACTATTTAAAAAAGGGAACTAAATCGCAGGAGTCTCTCGAGATACC GAATGAATGAAATATCGATGGGTGGCGGA 640
      TILKRRETKSQESLEIPNELKYRWVAE 203
ATCTCACCCGTCAGCGTGGCGTGTGTGTACAAGAGACTACCACTACGATATAATAATAATTAATTGTTTTGACTTA 720
      SHPVSVACLCTRDYQLRYNNN* 224
AGCCTGATGATTTGTTCCGAATCGAATTTATTTAATTAATTTATACAATAAAGCTTATATTTAAAAATTAATGATAATCAA 800
      TTTTAATTAACCAAATGAAAAAATAAAAAATTCCTCGGATTTTGGTTTTAGTGCTGGTACATTACAGGAAGCACT 880
GTTTTGCTAGGCLAGATGTTAGTAGATCAATACAGTTTTGATGCTTACCTTGAAAGCTGGCTCTTATTATACTATTCAA 960
ATAAGATTATATAGTAAATATATTATGTATATCTATTAATATTAAGACACAAATTTAAA 1022
    
```

図0-3 カイコPTH cDNAの構造

った¹⁶⁾ (図0-4)。カイコPTTHの7つのシステイン残基と決定されたS-S架橋様式は、図0-5のようにTGF- β スーパーファミリーのそれと似ていることが明らかとなった。TGF-スーパーファミリーには、TGF- β (トランスフォーミング成長因子)をはじめ、PDGF (血小板由来成長因子)やBMP (骨形成タンパク質)、NGF (神経栄養因子)などの一連の増殖成長因子が含まれる。これらの分子の構造上の共通点は、ペプチド鎖内に3対のジスルフィド結合を有し、ホモダイマー構造をとっていることである。このS-S架橋様式は、図に示すようにペプチド鎖内の3対のS-S結合のうち、2対のS-S結合で形成された空間をもう一つのS-S結合が貫いているような、シスチンノット構造¹⁷⁾という特徴的な構造をとっている。また、TGF- β スーパーファミリーの一連の分子で保存されている疎水性のアミノ酸の位置は、カイコPTTHにおいても保存されていた。二次構造においても β シートに富んでいることも、カイコPTTHと共通する。カイコPTTHの立体構造は未だ明らかにされていないが、TGF- β スーパーファミリーと同様の立体構造をとることが予想される。

カイコ以外の鱗翅目昆虫では、エリ蚕¹⁸⁾、エビガラスズメ¹⁹⁾、タバコスズメガ²⁰⁾からPTTH様ペプチドをコードしている遺伝子がクローニングされている。それぞれの一次配列は、カイコPTTHとのアミノ酸レベルでの相同性は60%以下と低いが、立体構造上重要なペプチド鎖内の7つのシステイン残基やN-結合型糖鎖付加のためのコンセンサス配列が保存されている (図0-6)。また、遺伝子の解析から前駆体ペプチドとして合成され、プレプロ部分が切断された後、成熟ペプチドになると予想されることも、共通点として挙げられる。カイコPTTHの場合は、224残基のペプチドとして合成されプレプロ体が切断され109残基の活性を有する成熟ペプチドとなる。クローニングされた各種の大腸菌で発現させたPTTH様ペプチドの同種に対する生物検定では、エリ蚕では0.3ng、エビガラスズメとタバコスズメガでは

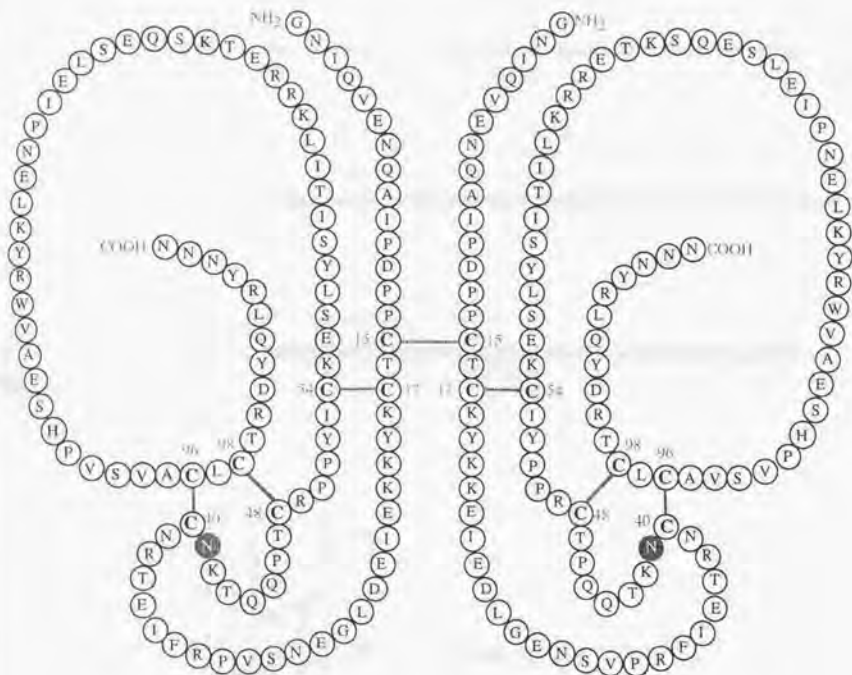


図0-4 カイコPITHのS-S架橋様式

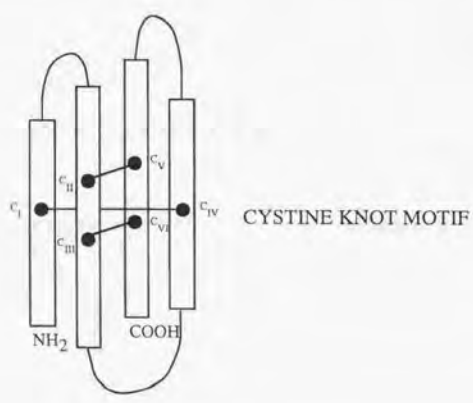
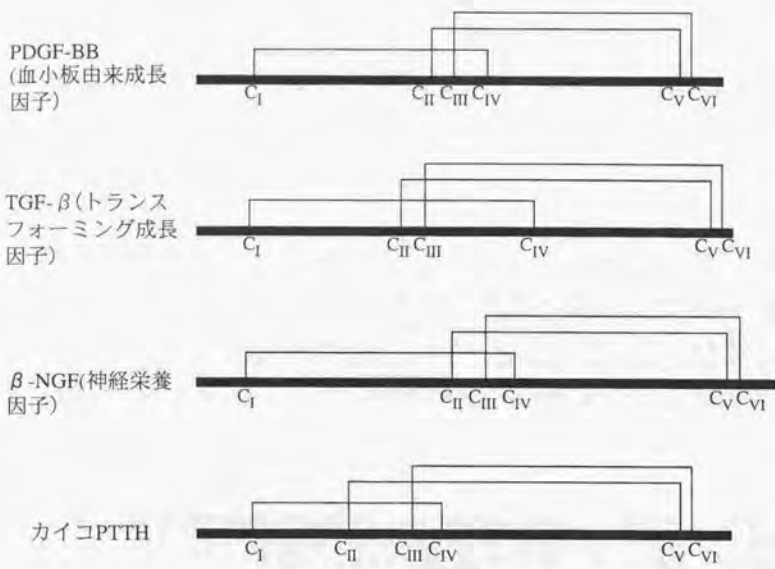


図0-5 TGF- β スーパーファミリーの保存されているシステイン残基



・PTTH本体のN末を1とする

図0-6 鱗翅目昆虫のクローニングされた前胸腺刺激ホルモン

ingでPTTH活性を示した。しかし、種間の交叉活性は認められなかった。つまり、PTTHには種特異性があることが明らかとなった。

既に述べたが、カイコ頭部から精製したPTTHのアミノ酸配列の解析やcDNAのクローニングからカイコPTTHの41残基目のAsnにはN-結合型糖鎖が付加していることが示唆されている。大腸菌で発現したPTTHの活性は天然から精製したPTTHよりもその比活性が若干低いことが知られている。また、クローニングされた他種のPTTH様ペプチドの配列中にも糖鎖付加配列が保存されている。このことからPTTHに付加している糖鎖にも何らかの役割があると考えられる。また、カイコPTTHの一次構造解析において、糖鎖構造が唯一明らかにされていない残された点であることから、本論文の第一部ではカイコPTTHに付加している糖鎖構造を解析した。

糖タンパク質の糖鎖には主にAsn残基に付加するN-結合型糖鎖とSer、Thr残基に付加するO-結合型糖鎖の2種類がある。これらの糖鎖はゴルジ体に存在している糖修飾酵素により修飾されるため、一般に同じタンパク質に付加している糖鎖でもその構造は一様ではない。この性質、すなわちマイクロヘテロジェネイティー（微小不均一性）が存在するため、糖鎖構造解析は困難なものとされている。また、糖鎖を構成する糖もマンノース、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、フコースと限られていることも、糖鎖構造解析を難しくさせている。構成している単糖の分子量はヘキソースが180でありN-アセチルヘキソサミンは221であるため、質量分析からではその構成する糖の種類までは明らかにできない。NMRを用いたとしても、糖鎖の微小不均一性により、最終的な構造決定は困難と考えられる。また、mgオーダーのサンプルが必要であるため、大量の精製された糖タンパク質が必要とされる。さらに、不均一な糖鎖を精密に分離することは非常に難しい。以上の理由で糖鎖構造の解析は困難なものであった。ところが、糖鎖構造研究を行う上で最大の問題で

あった構造解析技術の微量化の問題が近年の2つの発見により解決された。その一つは、*N*-結合型糖鎖を遊離させる酵素の発見であり²²⁾、もう一つはピリジルアミノ化による糖鎖の蛍光標識の開発である²³⁾。これらの発見により糖鎖の構造研究の微量化、迅速化が可能になった。糖鎖の還元末端をピリジルアミノ化することで、逆相HPLCを用いれば糖鎖の厳密な分離が可能となり、また検出限界も数10pmolまで下げることができるようになった。このピリジルアミノ化糖鎖の性質を利用し、糖鎖構造解析法として、二次元糖鎖マップ法が開発された²⁴⁾。この方法は、ピリジルアミノ化糖鎖がODSカラムとアミド吸着カラムの両方に吸着されることを利用しており、それら2種類のカラムを使ったHPLCの溶出時間からピリジルアミノ化糖鎖の二次元的な座標を与えるというものである。現在では、100種類以上の糖鎖の二次元上の座標が決定されており、二次元糖鎖マップ法を用いて微量で糖鎖構造解析が可能となった²⁵⁾。

カイコPTTHは天然から微量しか得られないという問題点を抱えている。その微量性を考慮して、まず糖鎖の付加が期待されるバキュロウィルス発現系によって発現させたカイコPTTHを用いて糖鎖の構造解析を行った。この際、1pmolで測定可能なTOF-MSによる質量解析をピリジルアミノ化糖鎖による構造解析と組み合わせることにより、糖鎖構造解析法のさらなる微量化を図った。詳細は第一部で述べる。

ところで、カイコPTTHは脳の背側側方部2対の神経分泌細胞で合成され軸索を通り側心体を經由しアラタ体から分泌される²⁶⁾。カイコPTTHの遺伝子をもとにして作製したプローブを用いた、脳におけるノーザンブロッティングや*in situ*ハイブリダイゼーションでの結果から、PTTHが上記の通り脳内の神経分泌細胞で合成されていることが明らかにされている¹⁶⁾。成長を追ったノーザンブロッティングの結果では、PTTHは脳内で時期特異的に合成されているのではなく、恒常的に産生されていることが明らかにされている。ただし、PTTHは転

写、翻訳後の調節機構が存在することが示唆されていることから、PTTHのペプチドとしての発現量はmRNAの発現量とは必ずしも一致しないと考えられる。このことはPTTH抗体を用いて開発されたPTTHの高感度な定量法を用いて、体液中のPTTH濃度を成長を追って測定した実験によって確認されている³⁷⁾。すなわち、体液中のPTTH濃度はmRNAの発現量とは異なり、脱皮、変態の直前に高くなっていることが明らかとなった(図0-7)。また、PTTHが概日周期をもって分泌されていることもこの実験から明らかにされている。このようにPTTHの分泌機構は、詳細に明らかにされてきている。

上述の分泌機構とは対照的に、PTTHの前胸腺に対する作用の分子メカニズムは、はるかに不明な点が多い。PTTHによる細胞応答と細胞内情報伝達経路の研究は、アメリカにおいてタバコスズメガを実験昆虫として行われている²⁸⁻³²⁾。それは、(1)前胸腺に脳抽出物を加えると細胞内のCa²⁺濃度が上昇し、エクジソンの分泌のためには細胞外にCa²⁺が存在していることが必要である。また、Caイオノフォアを加えると、エクジソンの分泌が促進される。その後カルモジュリンキナーゼが活性化される。(2)PTTHの刺激により前胸腺細胞内のcAMPの濃度が上昇する。cAMPのアナログであるジブチリルcAMPの投与によりエクジソンの分泌が促進される。(3)PTTH刺激により前胸腺内のある特定のタンパク質がリン酸化される。そのタンパク質はS6リボソームタンパク質と、ヒートショックタンパク質(hsp70)や未同定であるp100タンパク質がその主なタンパク質である。それらは(2)のcAMPにより活性化されたA-キナーゼによるものであることは明らかにされている。これらの結果から、Gilbertらは前胸腺における細胞内情報伝達経路を図0-8のように提唱している³⁴⁾。しかし、これらの研究ではCaMKの活性化からcAMP上昇へと連がる情報伝達経路が明らかにされていないことや、タバコスズメガの研究で用いられているPTTHとは精製単離されているものではなく、脳の

粗抽出物を用いていることなどが問題点として挙げられる。これらタバコスズメガを用いた研究で使われているPTTHとは、以下のような性質のものである。タバコスズメガの脳内では、分子量約7kDaのsmall PTTHと分子量約27kDaのbig PTTHの2つのPTTH様活性物質の存在が示されている²⁴⁾。これらのうちbig PTTHは幼虫期、蛹期の前胸腺に対してPTTH活性を示すのに対し、small PTTHは幼虫期の前胸腺に対してのみ活性を示す。また、結紮幼虫を用いた生物検定では、big PTTHの分子量に相当する画分のみ活性が見られた。これらのことから、big PTTHが本来のタバコスズメガPTTHであると考えられている。ところが、その単離には至っていない。細胞内情報伝達の実験で用いられているPTTHとは脳からのbig PTTHに相当する粗抽出画分であり、細胞内情報伝達系がPTTH特異的に起こっているかどうかは疑問が残る。実際に脳の粗抽出物とPTTHの両者の刺激による前胸腺細胞内のcAMP量の測定をカイコで行ったところ、細胞内cAMP量の上昇はともに見られるものの、その上昇量が脳抽出物を用いた場合ではPTTHを用いた場合と比較して10倍以上になるという結果が得られている。この結果は、脳抽出物には前胸腺細胞内のcAMP量を上昇させる物質が、PTTHの他にも存在していることを示唆している²⁵⁾。つまり、カイコを用いた実験ではタバコスズメガの研究で提唱されている図0-7の様な細胞内情報伝達経路は確かなものであるとは言えない。しかし、これらの実験結果を解釈すると、生体内でのエクジソンの合成分泌のためには複数の因子が関与していることが示唆される。このようにPTTHによる細胞内情報伝達の研究には問題点や課題が多く残されている。

PTTH分子が前胸腺の細胞膜上の受容体に結合し、細胞内へそのシグナルが伝達され、エクジソンが合成分泌されるが、その詳細については上述の通り未だ不明な点が多い。そこで、昆虫の脱皮変態の分子メカニズムの解明を最終目的とし、PTTHの受容からエクジソン合成

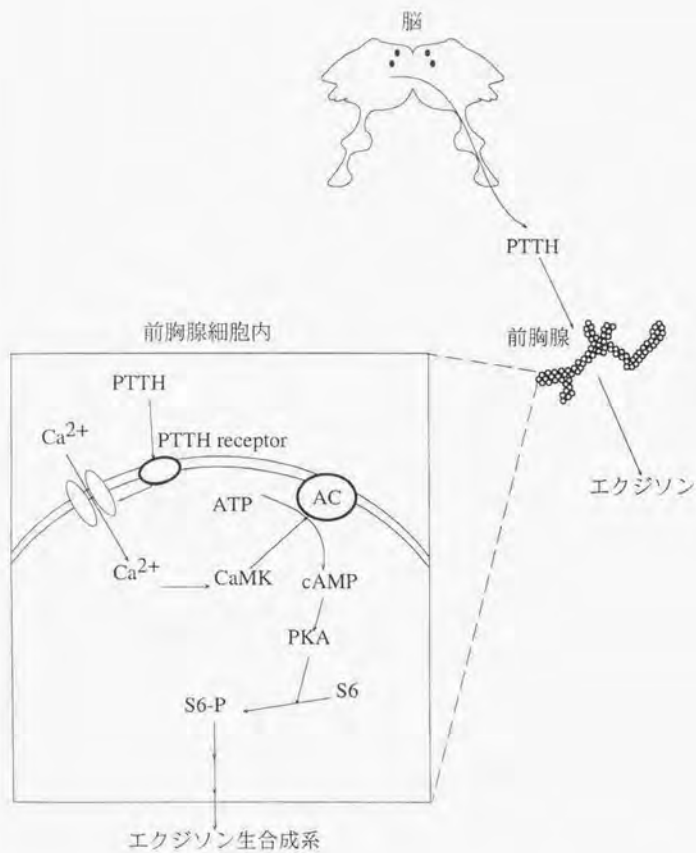


図0-7 タバコスズメガの前胸腺細胞内情報伝達経路

へと連がる細胞内情報伝達経路の研究の第一歩として、本論文の第二部ではカイコPTTHの受容体の同定、およびその受容体遺伝子のクローニングを試みた。

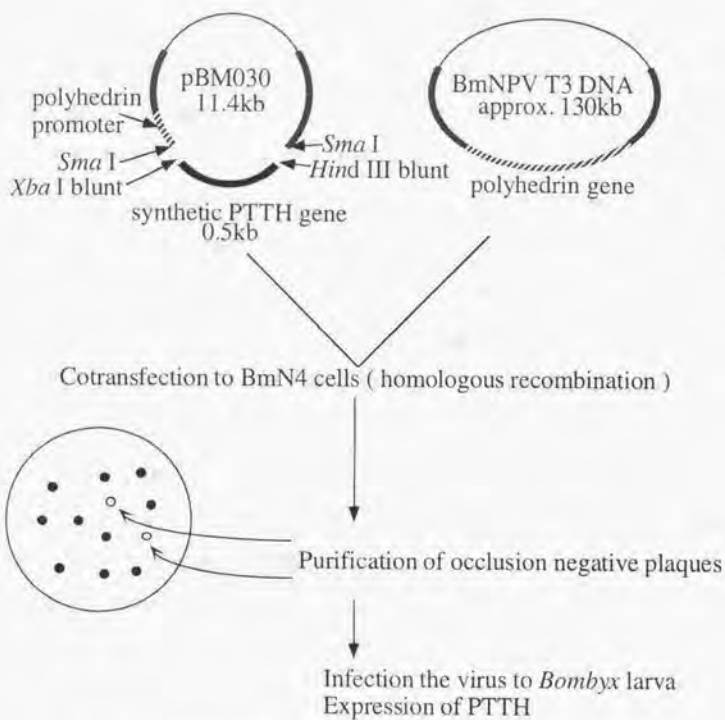
第1部 カイコPTTHの糖鎖構造の解析

天然物を用いたペプチド側の解析からは41残基目のアミノ酸が同定できなかったこと、およびcDNAの解析から41残基目にはAsnがコードされ、それに続くLys-Thrの配列がN-グリコシレーションのコンセンサス配列(Asn-Xxx-Ser/Thr)であることから41残基目のAsnにはN-結合型糖鎖の付加が予想されていた。また、大腸菌発現系を用いて得られた活性型PTTHが天然物に比べ約半分の比活性しか持たないことから、糖鎖が活性にも何らかの役割を有すると考えられる。そこで、天然から得られるPTTHの41残基目のAsnに糖鎖が付加していることを明らかにするとともに、その糖鎖構造を決定することを目的に実験を行った。糖鎖の構造解析にあたっては天然から得られるPTTHが微量であることから、まず天然物と類似の糖鎖構造を付加することが期待されるバキュロウイルス発現システム³⁶⁾で得られたPTTHを用いて糖鎖構造解析法を確立し、その糖鎖構造を決定した。次に、その糖鎖構造解析法を用いることによってカイコ蛾頭部180万頭から精製した天然PTTHの糖鎖構造を決定した。

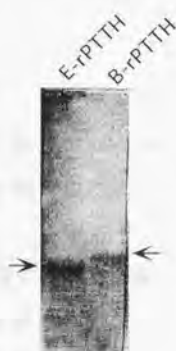
カイコPTTHについては既に大腸菌を用いた大量発現系が確立されているが¹⁰⁾、この発現系を用いた場合、発現産物への糖鎖付加は起こらない。近年、バキュロウイルスの核多角体の主要構成タンパク質であるポリヘドリンのプロモーターの下流に外来遺伝子を導入した組換え体ウィルスを調製し、この組換え体ウィルスを昆虫培養細胞または幼虫に感染させ、外来タンパク質を発現させることが可能となった³⁰⁾。この発現系の特徴として(1)CHO細胞などの動物培養細胞で発現させた場合と同様、糖鎖や脂肪酸の付加、リン酸化など翻訳後の修飾が本来のタンパク質と同じように起こること、(2)従来動物細胞を用いた発現系に比べ、極めて高収量で発現タンパク質を得られることなどが知られている。本実験ではカイコに感染するバキュロウイルスの一種、カイコ核多角体病ウイルス(BmNPV)を用いてPTTH発現系を構築し、幼虫へ感染させることによって糖鎖の付加したPTTHの大量発現を行った。

1-1 発現系の構築と幼虫への感染

図1-1(a)のように、カイコPTTH前駆体のうち成熟PTTHである109残基のペプチドをコードしているDNA配列の上流にシグナルペプチド配列(sarcotoxin 1Aのシグナルペプチド)がコードされるようにDNAを設計した。シグナル配列を付加することによりカイコ幼虫に感染させた場合は体液中にPTTHが分泌され、また培養細胞に感染させた場合は培養液に分泌されることが期待された。このDNA配列をBmNPVへのトランスファーベクターであるpBM030のSma Iサイトに挿入した。このトランスファーベクター



(a) カイコPTTH発現バキュロウィルスの構築の方法



(b) E-rPTTHとB-rPTTHの抗カイコPTTH抗体による Western blotting

図 1-1 組み換え体バキュロウィルスの構築と発現カイコPTTHのwestern blotting

のSma Iサイトは、野生型のバキュロウィルスのポリヘドリンをコードする塩基配列で挟まれており、野生型のバキュロウィルスと相同組み換えが可能となっている。そこで、カイコPTTHのDNA配列を含むトランスファーベクターのプラスミドとBmNPV (T3株) とをBmN4細胞にコトランスフェクトし、相同組換えにより組換え体ウィルスBmNPV/PTTHを構築した。組換え体ウィルスの純化はカイコ培養細胞を用いたブランクアッセイ法で行った。

この組換え体ウィルスをカイコの5齢幼虫0日目 (5齢脱皮当日) に皮下注射で感染させ、発現量が最大である感染後3日目の体液を回収した。感染させた8匹のカイコから約3mlの体液を採取した。回収した感染後のカイコ体液についてウェスタンブロッティングを行ったところ、大腸菌発現カイコPTTHよりわずかに分子量の大きいバンドが得られた (図1-1(b))。これは、糖鎖付加によるものと期待された。

1-2 発現PTTHの精製

バキュロウィルス発現PTTH (以降、B-rPTTHと呼ぶ) の精製は、図1-2(a)に示したような方法で行った。まず、BmNPV/PTTHで感染させたカイコ体液をアセトン沈殿および逆相のオープンカラムで粗精製した後、4段階の逆相および陽イオン交換カラムを用いたHPLCによる精製を行いB-rPTTHを単離した。各段階のHPLCの溶出パターンを図1-2(b)~(e)に示した。最終的に、感染させた8匹のカイコ幼虫から1.4mg (BSA換算) のB-rPTTHを単離することができた。同じ量のカイコPTTHをカイコの頭部から得ようとすれば約1億頭ものカイコが必要となる。また大腸菌の発現系を用いた場合、約200mlの培地から得られるカイコ

感染3日目のカイコ幼虫の体液

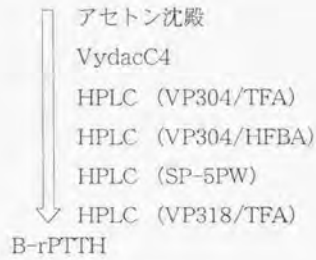


図1-2 (a) バキュロウイルスカイコPTTHの精製スキーム

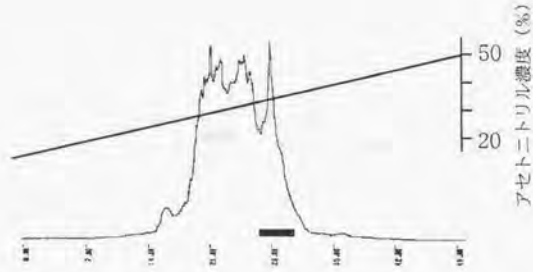


図1-2 (b) HPLC (VP304/TFA) の溶出パターン

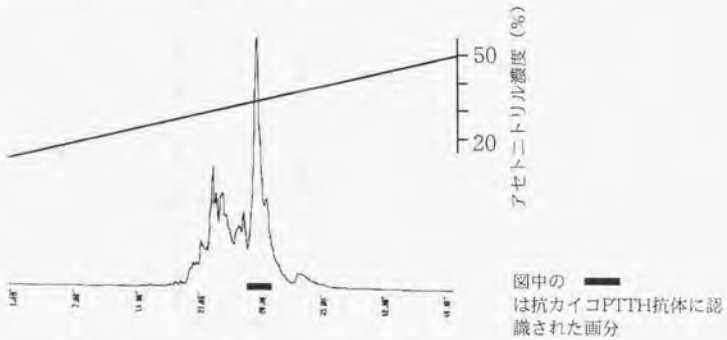


図1-2 (b) HPLC (VP304/HFBA) の溶出パターン

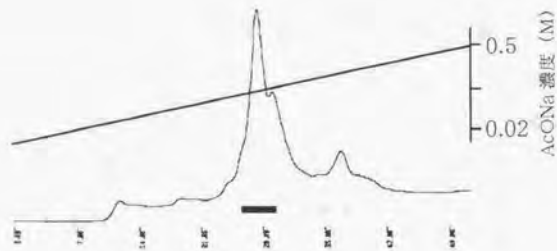


図 1-2 (d) HPLC (SP-5PW) の溶出パターン

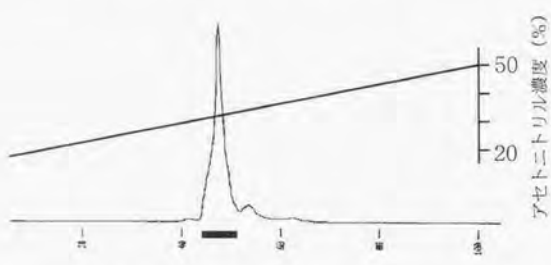


図1-2(e) HPLC (VP318/TFA) の溶出パターン

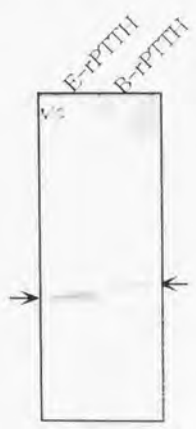


図1-2 (f) 単離したB-rPITHのWestern blotting

PTTH量に相当するものであり、バキュロウィルス発現系がいかに効率の良い発現系であるかがわかる。ただし、単離したB-rPTTHは抗カイコPTTH抗体によるウェスタンブロッティングの結果から、モノマーの形で発現されていると考えられた。また単離したB-rPTTHのアミノ酸配列分析を行ったところ、グリシンから始まるカイコPTTHと同じN末端のアミノ酸配列を与えたことから、予想通りシグナルペプチドは感染した宿主細胞中で切断されたと思われる。ウェスタンブロッティング（図1-2(f)）では、大腸菌を用いた発現カイコPTTH（以下E-rPTTHと呼ぶ）よりB-rPTTHの方がわずかに分子量の大きい位置にバンドが見られた。このバンドの差は糖鎖の付加によるものであると考えられた。

第2章 バキュロウイルス発現カイコPTTHの糖鎖構造解析

2-1 バキュロウイルスおよび大腸菌で発現したカイコPTTHのペプチドマッピング

B-rPTTHに糖鎖が付加していることを確認するためB-rPTTHを還元カルボキシメチル化後、リジルエンドペプチダーゼで消化し逆相HPLCで分析した。また、還元カルボキシメチル化したE-rPTTHも同様にリジルエンドペプチダーゼ消化し、ペプチドフラグメントの溶出パターンを比較した。その結果、B-rPTTH由来のフラグメントはE-rPTTHのものと同じ位置に溶出されたが、図1-3中、矢印で示したフラグメントのみ溶出位置が異なっていた。アミノ酸配列分析の結果、予想通りこれらのピークはいずれも41残基目のAsnを含むフラグメントであることが明らかになった。さらに、B-rPTTH由来のフラグメントでは41残基目のAsnに相当するサイクルでいかなるPTHアミノ酸も検出されなかった。また、逆相HPLC上ではB-rPTTH由来のフラグメントの方がE-rPTTH由来のフラグメントよりも溶出位置が前であった。一般に糖鎖は水酸基が多く親水性が高いため、同じペプチドでも糖鎖が付加することによって逆相HPLCでは溶出が早くなると予想される。したがって、B-rPTTH由来のこのペプチドには糖鎖が付加しているものと考え、TOF-MSを用いた質量分析を行うことにした。

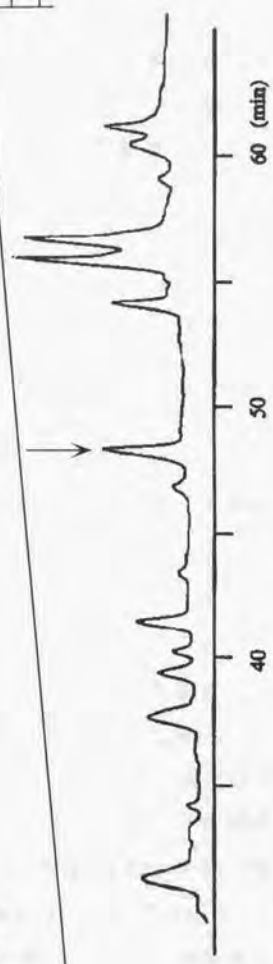
2-2 糖ペプチドフラグメントおよびエキソおよびエンドグリコシダーゼ消化物の質量分析

2-1で得られたB-rPTTH由来の糖ペプチドフラグメントと思わ

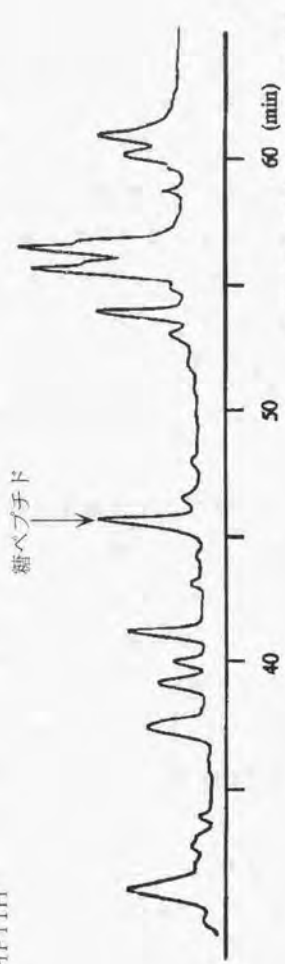
アセチルリシド濃度 (%)

50
20

E-rPTTH



B-rPTTH



・ 図中の矢印はそれぞれ41残基目のAsnを含む
糖ペプチドフラグメントであった。

図1-3 E-rPTTHとB-rPTTHのリジエンダーベプチダーゼ消化物の逆相HPLCからの溶出パターン

れるピークについてTOF-MSを用いた質量分析を行なった。その結果、E-rPTTH由来のフラグメントでは m/z 2524.8 (アミノ酸配列から2523と計算される) にプロトンが付加した擬分子イオンピークが観察されたのに対し (図1-4(b))、B-rPTTH由来のペプチドフラグメントではそれより約900大きい3402.7に擬分子イオンピークが観察された (図1-4(a))。そこで、この分子量の違いが41残基目のAsnに付加している糖鎖に由来していることを確認するため、AsnとN-結合型糖鎖との間の結合を切断するPNGase Fでこのペプチドフラグメントを消化し、その消化物についてTOF-MSによる分析を行ったところ、約900の分子量の減少が認められた (図1-4(c))。したがって、B-rPTTH由来のフラグメントには分子量約900のN-結合型糖鎖が付加しているものと考えられた。

次に、付加している糖鎖の構造を推定するためにいくつかのエキソおよびエンドグルコシダーゼによる糖ペプチドフラグメントの消化を行い、その消化物について同様にTOF-MS分析による分子量の変化をみた。その結果、N-結合型糖鎖のN-アセチルグルコサミンキトビオース部位のグルコシル結合を切断するEndo F₂で消化した場合は、消化前に比べ分子量が528小さくなり、しかもPNGase Fの消化物と比較すると分子量が約350大きい2874.2に擬分子イオンピークが観察された (図1-5(a))。この360という値はGlcNAcとFucの分子量の和に相当し、この酵素の基質特異性からAsnにはGlcNAcが、さらにそのGlcNAcにはFucが結合していると考えられた。消化後に減少した分子量は、ヘキソースが2個とN-アセチルヘキソサミン1個分に相当する。すなわち、酵素の基質特異性からN-アセチルグルコサミンとマンノースがそれぞれ1個と

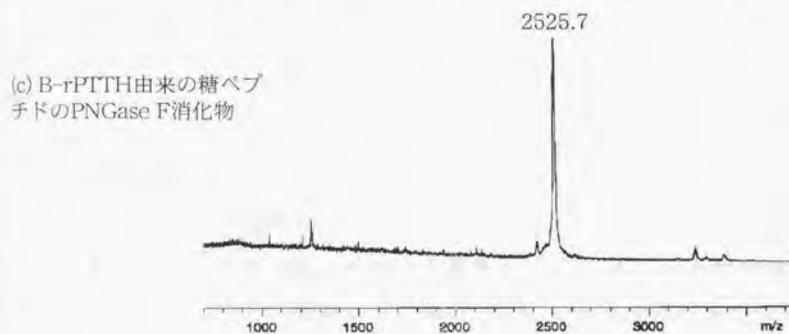
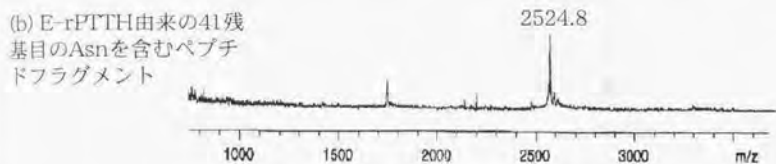
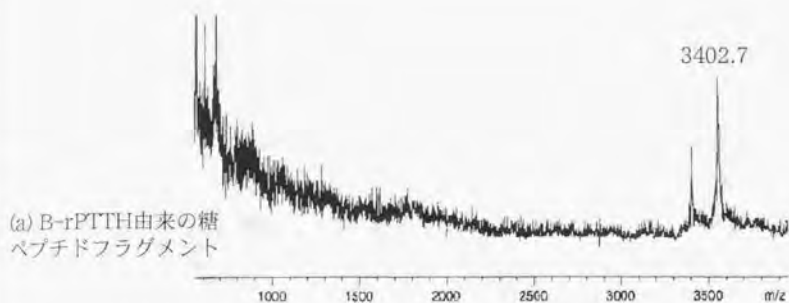


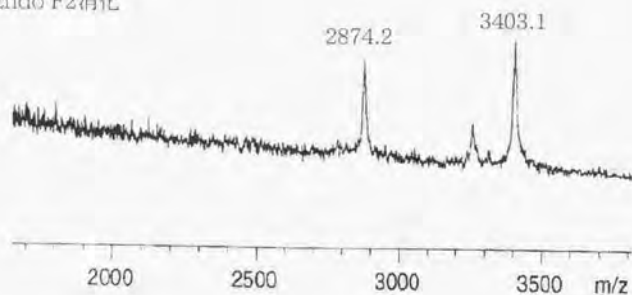
図 1-4 B-rPTTH由来糖ペプチドのTOF-MSを用いた質量解析

ヘキソースが1個分に相当する分子量である。また、 α -マンノシダーゼで消化した場合は、元の糖ペプチドよりもMan 1つ分（分子量162）小さい3240.2に分子イオンピークが観察されたことから、この糖鎖の非還元末端には α -Manが1つ結合していると思われる（図1-5(b)）。以上のエキソおよびエンドグルコシダーゼによる分子量の変化と酵素の基質特異性からB-rPTTHの糖鎖構造は図1-6に示す構造であると推定した。しかし、これらの実験からでは図1-6に*で示した β -Manに付加する非還元末端の α -Manの結合様式と還元末端のN-アセチルグルコサミンに付加しているFucの結合様式を決定することができなかった。そこで、この結合様式を決定するために糖ペプチドフラグメントから糖鎖を切り出し、ピリジルアミノ化後、HPLCによる分析（二次元糖鎖マップ）を行うことにした。

2-3 ピリジルアミノ化糖鎖の二次元糖鎖マップ

2-1で得られた糖ペプチドをPNGase Fで消化することで遊離させた糖鎖をBio-Gel P2カラムで脱塩後、ピリジルアミノ化した。ピリジルアミノ化反応で用いた過剰試薬をSephadex G-10で除いた後、得られたピリジルアミノ化糖鎖をODSおよびアミド吸着カラムを用いたHPLCで分析した。図1-7にB-rPTTH由来のピリジルアミノ化糖鎖のODSカラム（図1-7(a)）およびアミド吸着カラム（図1-7(b)）による溶出パターンを示した。また、標準物質として長さの異なる β 1-6結合をもつグルコースオリゴマーのピリジルアミノ化物を用い、その溶出位置をもとにそれぞれのピリジルアミノ化糖鎖の溶出位置をグルコースユニット（以下g.u.と略す）として示した。一般に、エキソグリコシダーゼで消化後のピリジルアミノ化糖鎖の溶出位置の変化をみることによって、消化前に結合して

(a) Endo F2消化



(b) α -マンノシダーゼ消化

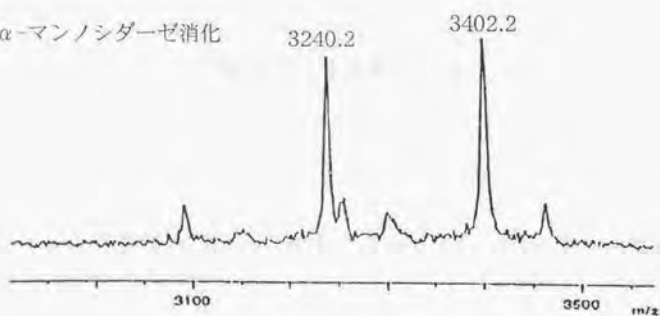
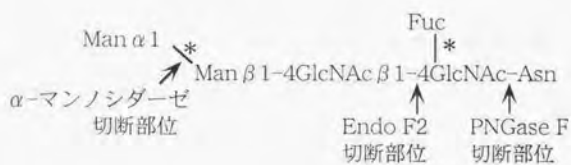


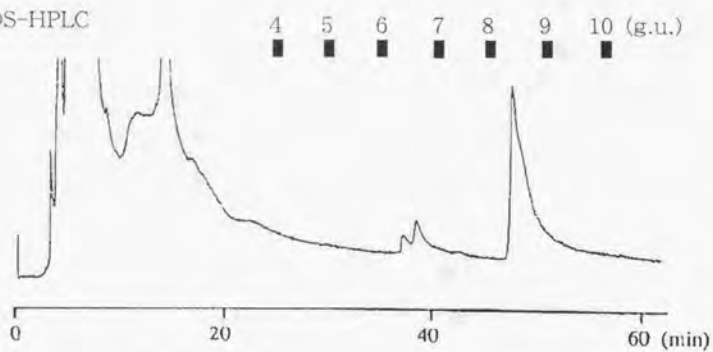
図1-5 B-rPTTH由来の糖ペプチドのEndoF2 (a)、 α -マンノシダーゼ (b) 消化物のTOF-MSを用いた質量解析



* は各酵素の基質特異性から決定できなかった結合部位

図 1-6 TOF-MSによる分子量測定から推定されるB-rPTHの糖鎖構造

(a) ODS-HPLC



(b) アミド吸着カラム-HPLC

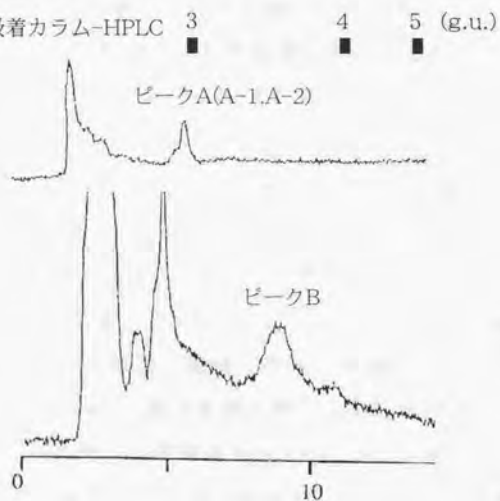


図 1-7 B-rPTTHのピリジルアミノ化糖鎖のHPLCの溶出パターン

いた糖の結合様式を決定することができる。例えばODSカラムの場合では α -マンノシダーゼで消化すると α -Manが1-2結合していた場合0.1g.u.、1-3結合していた場合0.3g.u.、1-6結合していた場合0.6g.u.溶出位置が早くなるのがこれまでの数多くの糖鎖構造解析の結果をもとに明らかになっている²¹⁾。そこで、B-rPTTHのペリジルアミノ化糖鎖のうちメインピークBについて、末端の α -Manを切断する α -マンノシダーゼおよび末端の α -Fucを切断する α -フコシダーゼを用いて消化した。その結果、 α -マンノシダーゼ消化では溶出位置が0.6g.u.早くなった(図1-8(b))。したがって非還元末端の α -Manは1-6結合していると考えられる。また α -マンノシダーゼでさらに長時間消化しても溶出位置に変化がなかったことから、ピークBの糖鎖の非還元末端には α -Manが一つ結合しているのみであり、これは糖ペプチドをエキソグリコシダーゼ消化した後のTOF-MSの分析結果とも一致した。さらにアミドカラムでは1.2g.u.分溶出位置が早くなっていたため α -Manは一つ付加していることを裏付けた(図1-9(b))。

一方、 α -フコシダーゼ消化の場合、アミド吸着カラムで0.4g.u.、ODSカラムでは2.0g.u.溶出位置が早くなった(図1-9(a)、図1-8(a))。 α -Fucが1-3結合の場合、アミド吸着カラムで1.5g.u.遅くなり、ODSカラムで1.0g.u.溶出位置が早くなるのが、また、1-6結合の場合、アミド吸着カラムで0.4g.u.、ODSカラムで2.0g.u.溶出位置が早くなるのが知られており²¹⁾、 α -フコシダーゼ消化の結果から α -Fucは1-6結合していると考えられる。以上の結果から、B-rPTTHに結合している糖鎖は結合様式を含め、図1-10の構造であると決定した。さらに、決定した構造が正しいことを確認するため、ODSカラムを用いたHPLCで標品(ペリジルアミノ化物)と比較したところ、溶出位置が完全に一致

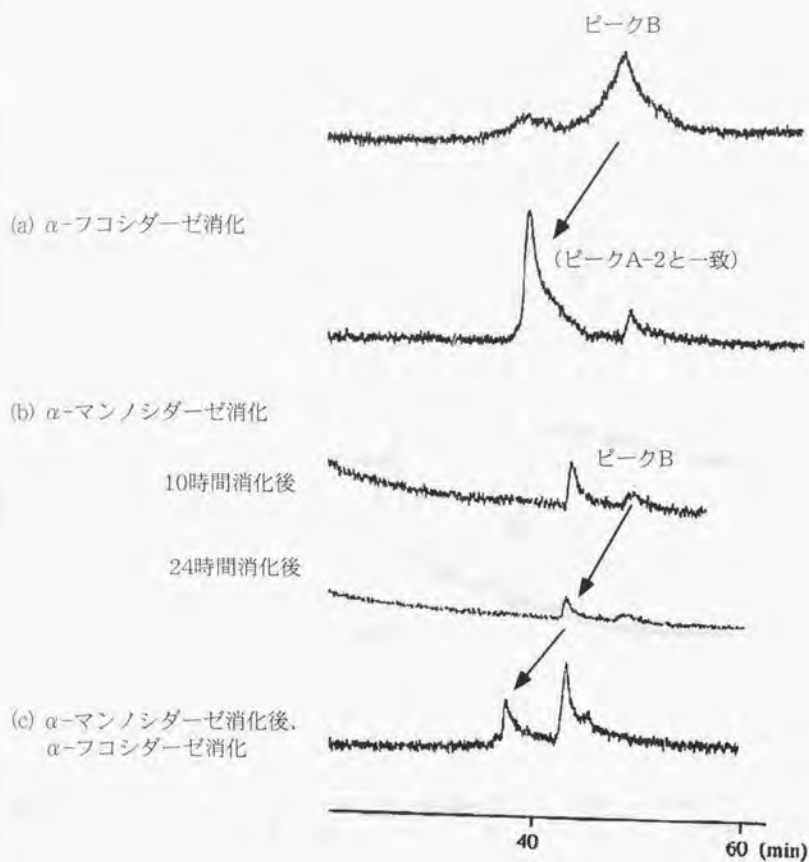


図 1-8 B-rPTTH由来のピリジルアミノ化糖鎖の α -マンノシダーゼ(b)、 α -フコシダーゼ(a)消化物のODS-HPLCの溶出パターン

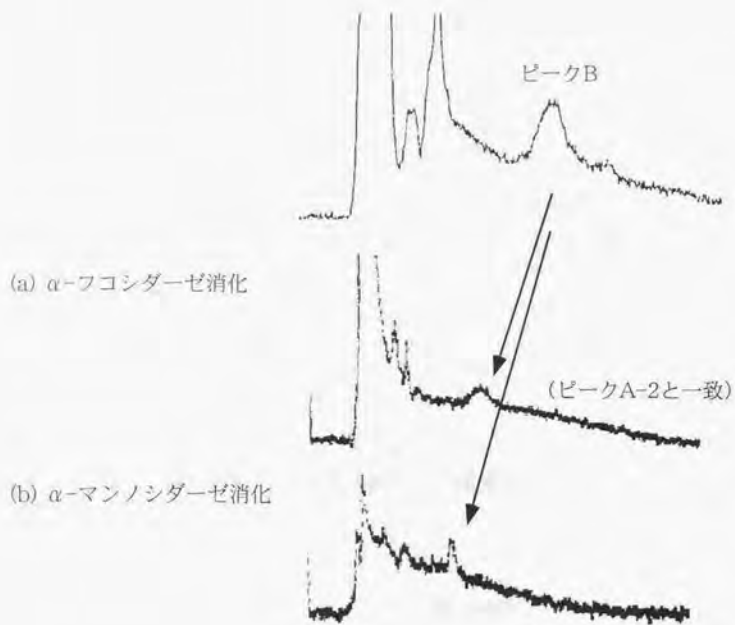


図 1-9 B-rPTTH由来のピリジルアミノ化糖鎖の α -マンノシダーゼ(b)、 α -フコシダーゼ(a) 消化物のアミド吸着カラム-HPLCの溶出パターン

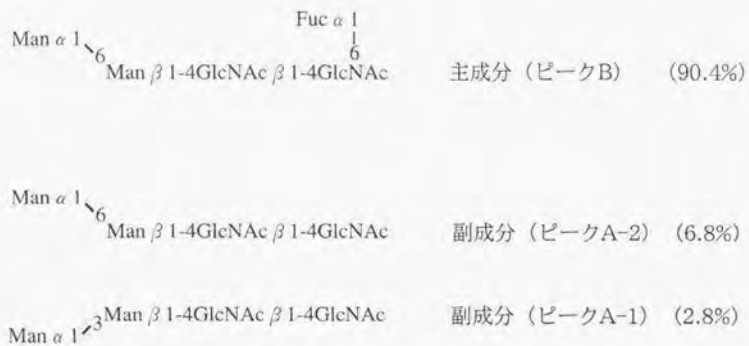


図 1-10 B-rPTTHの糖鎖構造

した（図1-11）。また、図1-8で見られたピークAの糖鎖はメインの糖鎖（ピークB）を α -フコシダーゼ消化したものとアミド吸着カラムおよびODSカラムで溶出位置が一致したため、この糖鎖構造は図1-10に示した糖鎖にFucが付加していないものであると判断した（二次元糖鎖マップ図1-12を参照）。

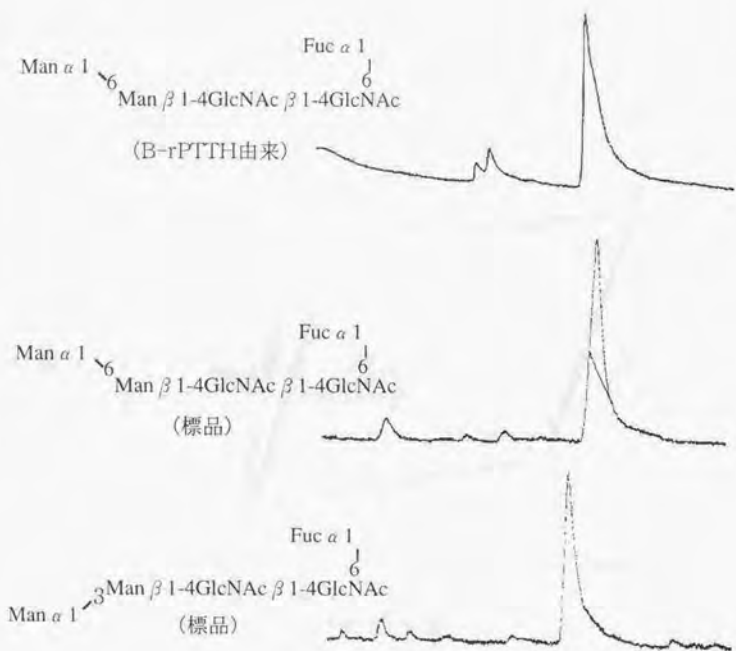
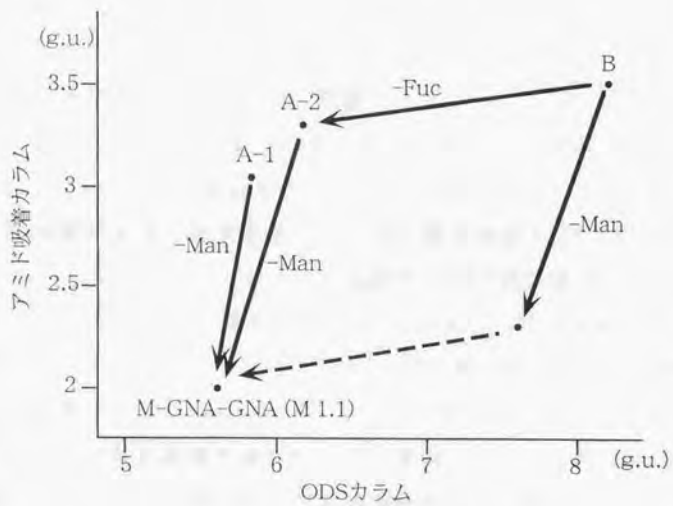


図 1-11 標品を用いたB-rPTTH由来の糖鎖構造の同定
 それぞれのピリジルアミノ化糖鎖のODS-HPLCの溶出パターン



・実線は実験で確認したマップ上の移動
 点線は実験では確認していない

図 1-12 B-rPTTH由来のピリジルアミノ化糖鎖の二次元糖鎖マップ

第3章 天然PTTHの糖鎖構造解析

天然のカイコPTTHの糖鎖構造を解析するため、新たに180万頭分のカイコ成虫頭部からPTTHの精製を行った。天然PTTHの糖鎖構造解析は基本的には第2章で述べたB-rPTTHの糖鎖構造解析の方法を用いたが、B-rPTTHに比べ、天然PTTHが微量であるため、二次元糖鎖マップ上でB-rPTTHの糖鎖との比較をもとに天然物カイコPTTHの糖鎖構造を決定した。

3-1 天然物カイコPTTHの精製

片岡らの方法¹¹⁾と同様の精製方法でカイコPTTHの精製を行った(図1-13)。各精製段階でのPTTHの検定法として、11段階までは除脳蛹による生物検定法を、それ以降は抗カイコPTTH抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、PTTHが含まれる分画を検出した。なお、11段階目ではSephadex G-75によるゲル濾過の代わりにオープンカラムのVydac C4を用いた。16段階の精製により最終的に117 μ gのカイコPTTHを得ることができた。得られたPTTHは最終段階の逆相HPLCで複数のピークとして溶出されたが、ウェスタンブロッティングの結果をもとにこれらをすべて合わせて糖鎖構造解析に用いることにした。

3-2 天然PTTHの糖ペプチドフラグメントの分取と質量分析による糖鎖構造解析

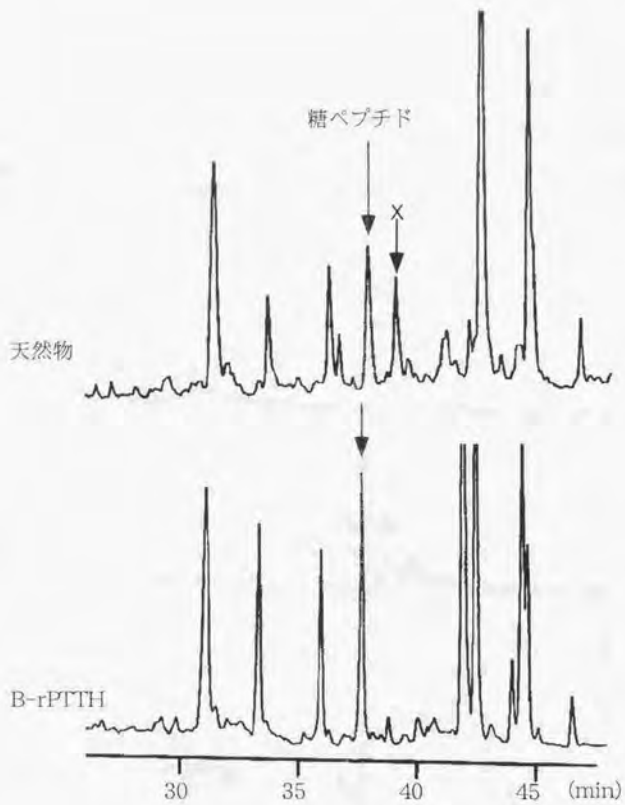
3-1で得られた天然由来のカイコPTTHを2-1で述べた方法と同様に還元カルボキシメチル化後、リジルエンドペプチダーゼ消化し、B-rPTTHと同様に逆相HPLCでフラグメントペプチドを分取した。その結果、天然PTTH由来のペプチドフラグメントとB-rPTTH由

カイコ成虫180万頭由来の頭部



図1-13 天然カイコPTTHの精製スキーム
16段階の精製ステップにより117 μ gのPTTHを得た
カイコの品種は鐘和を用いた

束のペプチドフラグメントの溶出パターンはN末端およびC末端に相当するフラグメントを除き、ほぼ同じであった(図1-14)。天然PTTHではN末端およびC末端フラグメントは複数のピークとして溶出されたが、これは精製した天然PTTHのなかにN末端およびC末端から数残基のアミノ酸が欠失したものが存在するためである。また、41残基目のAsnを含むと思われるフラグメントはB-rPTTH由来の糖ペプチドと同じ溶出位置に溶出された。しかしながら、E-rPTTH(糖鎖を持たない大腸菌発現型PTTH)由来の41残基目のAsnを含むフラグメントと同じ溶出位置にもピークが見られた。このピークについてTOF-MSによる分子量の測定から糖鎖の付加していない41残基目のAsnを含むフラグメントであることが明らかになった。したがって、天然PTTHには糖鎖が付加されていないペプチド鎖も存在していると考えられる。また、これらのピークの高さから糖鎖をもつペプチドと糖鎖をもたないペプチドの割合はほぼ1:1であった。さらに他のフラグメントペプチドについてもTOF-MSによる分子量測定を行い、それぞれのペプチドが各リジルエンドペプチダーゼフラグメントの分子量に一致することを確認した。次に、得られた糖ペプチドと思われるピークについてTOF-MSを用いた質量分析を行ったところ、B-rPTTH由来の糖ペプチドフラグメントとほぼ同じ m/z 3401.4に擬分子イオンピークが観察された。さらにこの糖ペプチドを2-2と同じく、3種類のエキソまたはエンドグルコシダーゼで消化し、分子量の変化を測定した。その結果、AsnとN-結合型糖鎖の間を切断する酵素PNGase F処理では約900の分子量の減少が、Endo F₂で処理では約527の分子量の減少が、 α -マンノシダーゼ処理では約162の分子量の減少が観測された(図1-15)。これらの結果はB-rPTTH由来の糖ペプチドにつ



Xは糖鎖を有さない41残基目のAsnを含むペプチドフラグメント

図 1-14 天然物PTTHとB-rPTTHのペプチドマップ

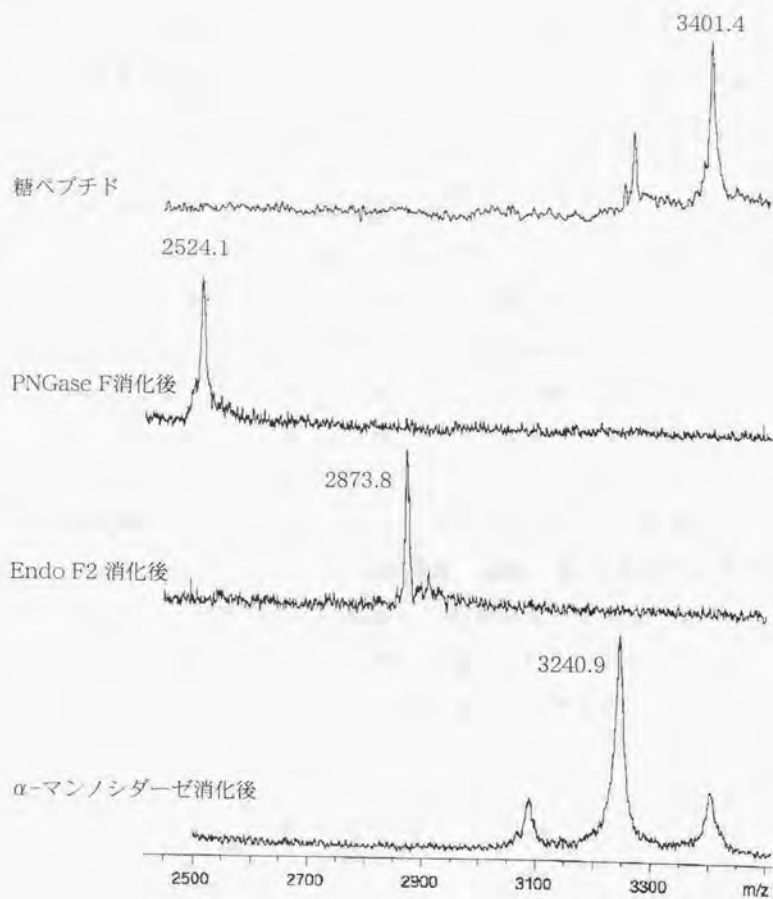


図 1-15 天然カイコPTTH由来の糖ペプチドのTOF-MSを用いた質量解析

いて得られた結果とほぼ同じであり、天然PTTHに結合している糖鎖もB-rPTTHの糖鎖と同じものである可能性が高いと考えられた。そこで、天然PTTH由来の糖鎖をピリジルアミノ化し、二次元糖鎖マップによりB-rPTTHと比較することにした。

3-3 天然カイコPTTHの糖鎖構造決定（二次元糖鎖マップ）

2-3で述べた方法に従い、糖ペプチドをPNGase Fで消化することで遊離させた糖鎖をBio-Gel P2カラムで脱塩後、ピリジルアミノ化した。ピリジルアミノ化反応で用いた過剰試薬をSephadex G-10で除いた後、得られたピリジルアミノ化糖鎖をODSカラムを用いたHPLCで分析した。その結果、ピリジルアミノ化糖鎖はODSカラムでは8.3g.u.の位置に溶出され、B-rPTTH由来のピリジルアミノ化糖鎖と一致した（図1-16）。ピリジルアミノ化糖鎖のODSカラムを用いたHPLCの溶出位置は、糖鎖の結合様式に依存する。したがって、天然PTTHの糖鎖はその結合様式を含め、B-rPTTHと同じ、図1-17に示した構造であると結論した。天然物の場合もフコースを有さない糖鎖が、副成分として含まれていた。

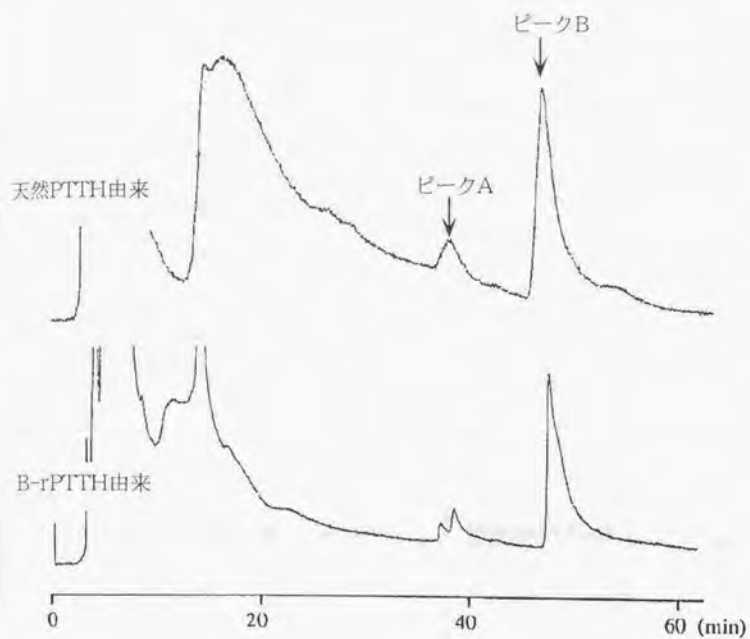


図 1-16 天然物とB-rPTTHのピリジルアミノ化糖鎖のODS-HPLCの溶出パターン

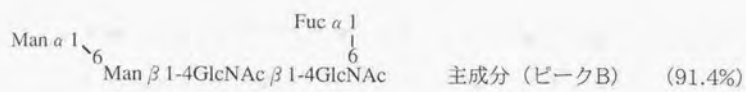


図 1-17 天然由来カイコPTTHの糖鎖構造

第4章 糖鎖の有無によるPTTH活性の違い

糖鎖の有無でPTTH活性に違いがあるのかどうかを明らかにするため、カイコの除脳蛹を用いた生物検定を用い、天然PTTH、E-rPTTH（大腸菌発現型）およびB-rPTTH（バキュロウイルス発現型）のPTTH活性を調べた。

4-1 発現PTTHの調製

大腸菌を用いて発現したE-rPTTHは石橋の方法¹⁹⁾にしたがい、空気酸化により活性型ダイマーにリフォールディングした。一方、バキュロウイルスを用いて発現したB-rPTTHは同じ空気酸化による方法ではダイマーにリフォールディングすることはできなかった。また、非還元条件下、SDS電気泳動でB-rPTTHがダイマーに相当する位置にバンドが見られることから、電気泳動の前処理中にダイマー形成が起きた可能性があると考え、10%グリセロール中で70℃で15分加熱したところ一部がダイマーになることが分かった。そこで、同様の処理を行い、逆相HPLCでダイマー型B-rPTTHを精製し生物検定に用いた。

4-2 カイコPTTHの除脳蛹を用いた生物検定

生物検定には、除脳後15日目の除脳蛹を用いた。外観上成虫化の最も早い変化の指標として翅のアポリシスによって活性を判定した。アポリシスとはエクジソンの作用により古いクチクラが真皮細胞層から剥離する現象であり、この除脳蛹検定の場合は蛹のクチクラから翅脈が剥離することをいう。除脳蛹に試料を注射してからアポリシスを起こすまでの日数に応じて、3、4、5、6日目にアポリシスが見られたものにそれぞれ4、3、2、1点を与えその平均点を活性

の指標とした。なお平均点2.0点の活性を与えるPTTH量を1unitとした。図1-18は天然PTTH、B-rPTTH、E-rPTTHの濃度反応曲線である。このグラフが示すように糖鎖の付加している天然PTTHおよびB-rPTTHはともに1unitが0.32ngであったのに対し、E-rPTTHの1unitは0.59ngであった。B-rPTTHの比活性は天然PTTHと同等であり、糖鎖が付加していることでPTTHの比活性は約2倍高くなると考えられた。また、糖鎖の無いE-rPTTHも天然PTTHやB-rPTTHの約1/2の活性があることから糖鎖はPTTH活性に必須ではないが、何らかの役割を持っているものと思われる。

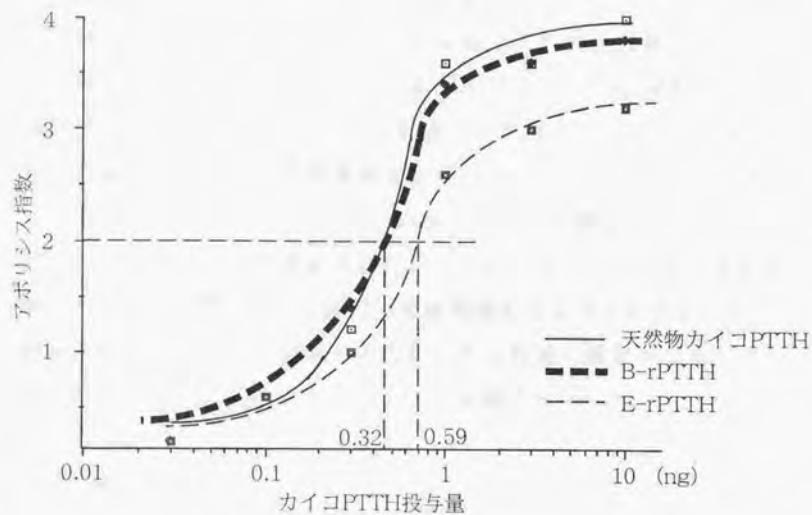


図 1-18 カイコPTHの生物検定

第5章 まとめおよび考察

5-1 まとめ

第1章ではカイコの幼虫を宿主としたバキュロウイルス発現系を用いカイコPTTHの大量発現を試みた結果、糖鎖の付加したカイコPTTHの大量発現系を確立した。第2章ではバキュロウイルス発現PTTHに糖鎖が付加していることを確認し、その糖鎖構造を決定した。構造解析方法としては、従来のピリジルアミノ化糖鎖の二次元糖鎖マップ法とTOF-MSによる質量分析を組み合わせることにより、微量の試料に対する糖鎖構造解析法を確立した。その方法を用いて第3章では、カイコ成虫180万頭から精製単離したカイコPTTHに付加している糖鎖構造を決定した。さらに第4章では天然物およびB-rPTTH、E-rPTTHの除脳蛹を用いた生物検定を行い、糖鎖の付加している天然物およびB-rPTTHは、糖鎖の付加していないE-rPTTHよりも活性が強いことを明らかにした。

5-2 考察

カイコの脳由来のPTTHとバキュロウイルス発現系を用いた発現カイコPTTHは同じ糖鎖構造を有するという結果が得られた。天然物のカイコPTTHは脳の神経分泌細胞で生産されるのに対して、バキュロウイルスの宿主細胞は主に脂肪細胞とされている³⁷⁾が、両者において付加する糖鎖構造が同じであることから、これらの細胞には同じ糖鎖修飾機構があると考えられる。また、この糖鎖構造は他の種のN-結合型糖鎖の共通配列である $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ よりもさらにマンノースが1分子小さいものであることも非常に興味深い。ここでは糖鎖の生合成的見地からみたカイコ細胞内のN-結合型糖鎖の

修飾機構を考察する。

N-結合型糖鎖の生合成経路の詳細は古くから研究されているため、先ずその生合成経路^{18,19)}を簡単に説明する。*N*-結合型糖鎖の生合成はペプチドのようにゲノムにコードされている情報をもとに翻訳されるのではなく全て酵素反応によって合成されるために、不均一な構造を持つという性質が生じる。この*N*-結合型糖鎖生合成経路と糖鎖修飾関連酵素を図1-19に示す。糖鎖生合成の第1段階は、 $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ の形の糖鎖構造が粗面小胞体の膜に結合しているドリコールと呼ばれる脂質上で生合成される(ここまでの生合成をアッセンプリーと呼ぶ)。次に粗面小胞体内で翻訳されてくるタンパク質のうち Asn-X-Ser/Thr というアミノ酸配列を基質として、膜に結合していた糖鎖-ドリコールから糖鎖の部分が転移し Asn と共有結合する。粗面小胞体内で Glc_3 がグルコシダーゼI, IIの作用で除かれてから、ゴルジ体に輸送される。ゴルジ体内には糖を1つずつ切断するグリコシダーゼが、また内膜には糖を1つずつ結合させる糖転移酵素が結合している。輸送された糖タンパク質はそこで先ずマンノシダーゼI, IIにより $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ にまで消化される(これらのグリコシダーゼ消化の行程をトリミングという)。その後各種糖転移酵素による修飾でそれぞれの糖鎖構造が形成される。グリコシダーゼや糖転移酵素の局在もそれぞれ明らかになっており、例えばマンノシダーゼI, IIは粗面小胞体の近傍に位置するシスゴルジ体に局在しているし、またフコース転移酵素は粗面小胞体から遠いトランスゴルジ体に局在している。このようにして生合成される*N*-結合型糖鎖は、その形状から(1)高マンノース型(2)複合型(3)混合型の3種類に分けられる。また図1-19に示すように糖鎖の生合成に関与する酵素の阻害剤も多く知られていおり、それを用

いた研究により糖鎖の糖転移の順位も明らかになっている。例えば血中糖タンパク質のN-結合型糖鎖でよく見られる構造は複合型糖鎖が付加するが、複合型糖鎖の生合成は先ずマンノシダーゼI、IIによりトリミングされ、その後N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIで複合型糖鎖の各修飾が開始する。このN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIは複合型糖鎖の生合成を制御している酵素であることも明らかにされている。すなわち、この糖転移酵素が働き次の糖の付加が開始される。

では、カイコPTTHの糖鎖構造を生合成的見地から考えると、どのような糖修飾関連酵素が必要となるのであろうか。本実験で得られた糖鎖構造を考えたとき、実にゴルジ体内にはマンノシダーゼI、IIとフコシルトランスフェラーゼのみで生合成されることになる。細胞種により異なるが通常糖転移酵素だけでも最低5種類は存在していると考えられるので、カイコの細胞（PTTHの分泌される脳内の分泌細胞やバキュロウイルス感染の宿主細胞である脂肪細胞）では進化上糖鎖修飾関連酵素がかなり制限されたと考えられる。それではこの糖鎖構造はカイコPTTHに特有なものなのであろうか。カイコの幼虫を宿主としたバキュロウイルス発現システムによる他の糖タンパク質の糖鎖構造も解析されており、例えばヒトインターフェロン- α の糖鎖構造も本実験で得られたものと同じであった。すなわち、これらの糖鎖構造研究から、カイコの細胞では発現される糖タンパク質に関係なく糖鎖修飾機構が働いていることが示唆される。実験的証明はされていないが、カイコには酸性糖であるシアル酸を付加するシアリルトランスフェラーゼや複合型糖鎖の生合成を制御しているN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIが欠損していると言われている²¹⁾。カイコでの発現産物の糖鎖にはシアル酸の付加や複合型の糖鎖が認められないため、これらの酵素の欠

損の可能性は非常に大きいと考えられ、他にも欠損している糖鎖生合成関連酵素が存在するという可能性は大きい。ところが、最近カイコ細胞のゴルジ体画分に存在する、糖修飾に関わる酵素を解析した実験によると、カイコの細胞内には今まで欠損していると考えられた上記の一連の糖転移酵素の存在が確認されている（ただし、シアル酸転移酵素は欠損していた）¹⁰⁰。すなわち、カイコの細胞自体には糖修飾に関する酵素が備わっており、カイコの細胞で複合型糖鎖や混合型糖鎖の付加する潜在能力があることを意味している。それでは、カイコの体液中に存在する分泌タンパク質の糖鎖はどのような構造をしているのであろうか。カイコ体液を採集し、脱塩後、凍結乾燥をしてさらに無水ヒドラジンで糖鎖を遊離させた。反応後、*N*-アセチル化をし、ピリジルアミノ化糖鎖を合成しその糖鎖構造を解析した。図1-20はODSのHPLCの溶出パターンを示している。これらの糖鎖構造はカイコPTTHに付加している糖鎖構造と非常に類似しており、複合型糖鎖や混合型糖鎖の存在は見い出されなかった。すなわち、カイコの細胞の糖転移酵素活性は何らかの機構により抑制されていることが示唆された。

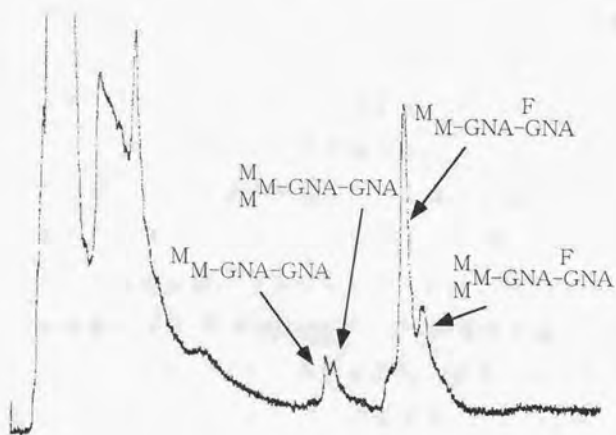


図 1-20 カイコ幼虫体液中の全糖タンパク質の糖鎖をピリジルアミノ化し、そのODS-HPLCの溶出パターンした。各糖鎖構造はそれぞれのピークのものである。

第2部 カイコPTTH受容体の解析

受容体の構造を明らかにするためには、EGF受容体やインスリン受容体のようにリガンドと結合するタンパク質を精製し、そのアミノ酸配列をもとにコードする遺伝子をクローニングするという方法がある。ところが、受容体は一般的に発現量が低くその精製には大量の材料が必要となる。そこで受容体の精製を行わず、直接受容体の遺伝子を明らかにする方法が開発された。そのひとつとして、本論文でも行った動物細胞を用いた発現クローニング法がある。この方法は、動物細胞系で発現させることが可能な良質なcDNAライブラリーさえあれば遂行できる。1990から1993年にかけてこの方法を用いて様々な受容体遺伝子が明らかにされた。例えば、サイトカインの受容体遺伝子⁽¹⁾⁻⁽³⁾や増殖因子⁽⁴⁾⁻⁽⁶⁾の受容体遺伝子がこの発現クローニング法を用いて明らかにされた。昆虫のペプチドホルモンの受容体遺伝子についても、この方法を用いて1994年にタバコスズメガの利尿ホルモン受容体遺伝子がクローニングされた⁽⁷⁾。昆虫ペプチドホルモン受容体遺伝子のクローニングが成功したのはこの1例しかないが、昆虫の受容体遺伝子を哺乳類の細胞系で発現させること、さらに発現した受容体が機能することも十分可能であることが実証された。PTTHの標的器官である前胸腺は全長が1~2mm程度の小さい組織で、約1000個の細胞から構成されているため、前胸腺を大量に採集しタンパク質側からカイコPTTHの受容体の構造を解析するという事は困難なものと考えられた。したがって、カイコPTTH受容体の構造を解析するには遺伝子をクローニングするしか方法はなく、そのためには、この発現クローニング法が適していると考えられる。そこで、第二部ではカイコ受容体の性質を明らかにするとともに、カイコPTTHの受容体遺伝子のクローニ

ングを試みた。

PTTHの作用機序に関する研究は、カイコと同じ鱗翅目昆虫であるタバコスズメガを用いて進められているが、これまでにPTTH刺激による前胸腺細胞内への Ca^{2+} の流入やcAMPの濃度の上昇や、特定のタンパク質のリン酸化などが明らかになったにすぎない。また、これらの研究で用いられたPTTHは、純化されたものではなく、脳抽出物または部分精製物をPTTHとして用いているために、それらの試料に含まれるPTTH以外の他の因子の影響を無視することができない。本研究では現時点で唯一純粋なPTTHを使用することができるカイコを材料にPTTH受容体の構造を明らかにすることを目指した。また、PTTH受容体を明らかにすることは、PTTHの細胞内情報伝達系や、エクジソンの生合成および分泌機構の分子レベルでの解明ための大きな前進になると考えている。

第1章 カイコPTTH受容体の性質

2-1-1 放射性ヨード化PTTHの作成

前胸腺細胞に存在するPTTH受容体は、前胸腺がわずか1,000個程度の細胞から構成されていることを考えると、その存在量は極めて少ないことが予想される。そのためPTTH受容体の分子量、結合定数などの基本的な性質を明らかにするためには受容体分子を高感度で検出するための標識リガンドが必要である。そこで、最も検出感度が高いと考えられる放射性ヨード (^{125}I) によるPTTHの標識を行なった。標識には大腸菌で発現させたカイコPTTHを石橋らの方法にしたがって空気酸化し、活性型であるホモダイマーにしたものを用いた。

まず、カイコPTTHをホウ酸緩衝液中に溶解し、Iodogenおよび放射性ヨード化ナトリウムを混合することによりヨード化を行った。次に、未反応のPTTHおよび過剰の試薬類を除くため逆相HPLCによる精製を行った。図2-1にHPLCの溶出パターンを示したが、非標識PTTHのほか、標識PTTHと思われるブロードなピークが認められた。標識PTTHのピークがブロードになった原因としてPTTH分子中に存在する5個のチロシン残基のうち異なる位置のチロシン残基が標識されたり、標識されたチロシン残基の数が異なるためであると思われる。得られたヨード化PTTH (以下 ^{125}I -PTTHと記す) は 5.0×10^7 cpm/ μg と非常に放射比活性が高かった。さらに得られた ^{125}I -PTTHをSDS-PAGEにより分析したところ、図2-2に示すように分子量約3万付近に放射活性が検出されたことから ^{125}I -PTTHは活性型であるホモダイマー構造を保っていると考えられた。また、同様に非放射性ヨードを用いてヨード化PTTHを作製し、除脳蛹を用いた成虫化活性および前胸腺を用いた

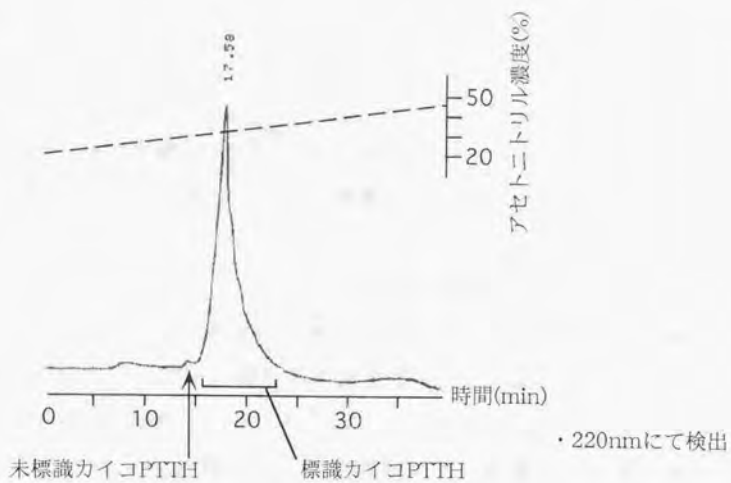


図 2-1 ヨード化PTHのHPLC溶出パターン

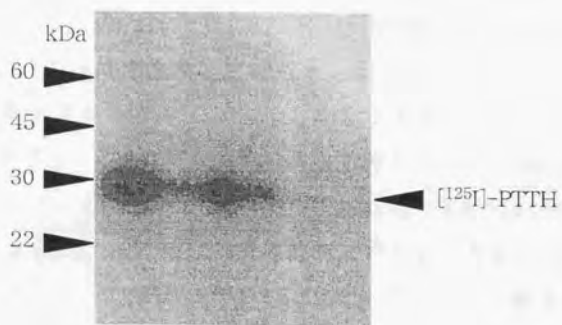


図 2-2 ヨード化PTHのSDS-PAGE

エクジソン分泌促進活性を調べたところ、ヨード化されていないPTTHの約半分の活性を維持していた。以後、この $[^{125}\text{I}]$ -PTTHを用いてPTTH受容体の性質を調べた。

2-1-2 結合実験およびそのスキッチャード解析

前胸腺上に存在するPTTH受容体とPTTHとの親和性およびPTTH受容体タンパク質の発現量を明らかにするため、2-1-1で作製した $[^{125}\text{I}]$ -PTTHを用いて以下の結合実験を行った。用いた前胸腺はPTTHに対して感受性が高く、エクジソン合成分泌量が高い、5齢幼虫6日目（吐糸直前）のものを用いた。50頭分の前胸腺を1測定分とし、インセクトリンガー液中で、前胸腺と $[^{125}\text{I}]$ -PTTHをインキュベートした。洗浄後、遠心分離により沈澱として得られた前胸腺の γ 線を測定し、その値を前胸腺に結合した全結合量とした。また、非標識PTTHを $[^{125}\text{I}]$ -PTTHの100倍量加え、同様の実験を行い、非特異的結合量を求めた。各濃度における全結合量から非特異的結合量を引いた特異的結合量とし、得られた結果を図2-3に示した。この図から $[^{125}\text{I}]$ -PTTHと前胸腺上に存在する受容体との結合は約500pMで飽和していると考えられる。また、この結合実験の結果をスキッチャード解析したところ図2-4に示す一本の直線が得られた。したがって、前胸腺上に存在するPTTHの受容体は一種類であり、その直線の傾きから解離定数は54 pmolであることが明らかとなった。また、一对の前胸腺が2,000細胞から構成されているとすると、一細胞あたり16,000分子のPTTH受容体が発現している計算になる。これまで明らかになっている高親和性の受容体の解離定数はいずれも10~数100pMであることから、前胸腺上に存在しているPTTH受容体も親和性の高い受容体に分類される。

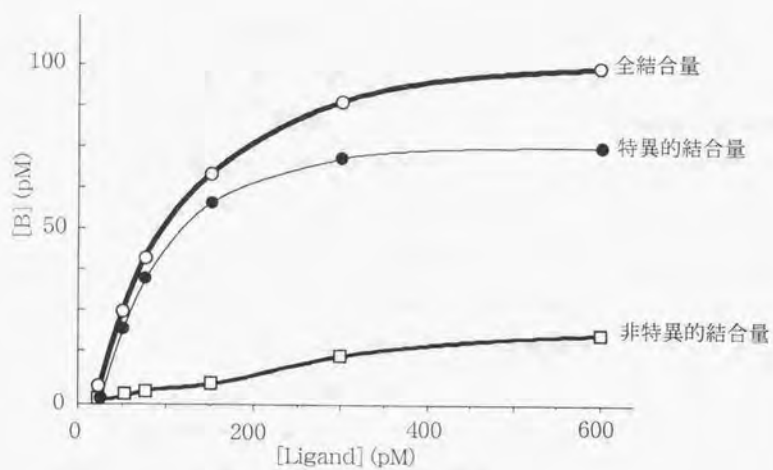


図 2-3 カイコPTTHの結合実験

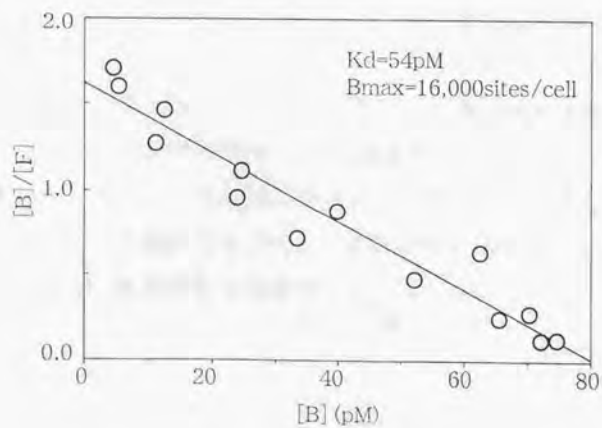


図 2-4 カイコPTTHのスキヤッチャード解析

2-1-3 架橋実験

次にPTTH受容体の分子量を明らかにするために受容体と $[^{125}\text{I}]$ -PTTHとの架橋実験を行った。2-1-2の結合実験と同様にカイコ5齢6日目の幼虫約300匹分から摘出した前胸腺をインセクトリンガー液中で $[^{125}\text{I}]$ -PTTHとインキュベートした。洗浄後、化学架橋剤としてBS³を加え、複合体を形成していると思われる $[^{125}\text{I}]$ -PTTHと受容体を架橋した。1%SDSで可溶化した後、SDS-PAGEにより $[^{125}\text{I}]$ -PTTHと受容体複合体の分子量を推定した(図2-5)。また、検出されたバンドがPTTHと特異的に結合した受容体であることを確認するため、100倍量の非標識PTTHを加えた実験も同時に行った。その結果、分子量約90,000付近に $[^{125}\text{I}]$ -PTTH-受容体複合体と考えられるバンドが検出され、このバンドは非標識PTTHを加えることによって消失した。カイコPTTHの分子量が約30,000であることから、PTTH受容体の分子量は約60,000であると思われる。また、還元状態においても同じ位置にバンドが検出されたことから、PTTH受容体はジスルフィド結合によるサブユニット構造を持たないと考えられる。さらに、5齢期の成育段階の違うカイコ前胸腺を用いて同様の架橋実験を行ったところ、 $[^{125}\text{I}]$ -PTTHと受容体複合体と考えられるバンドは成長に伴い濃くなっており、吐糸期に最高になることが明らかになった(図2-6)。この結果をもとに、第2章で行うcDNAライブラリーの材料として、吐糸直前の前胸腺を用いることにした。

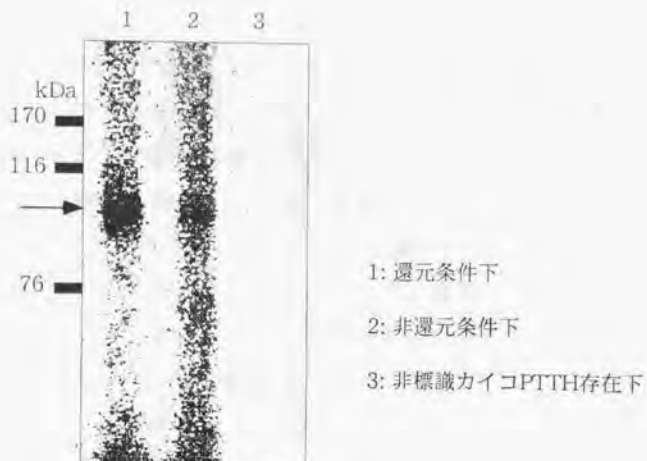


図 2-5 $[^{125}\text{I}]$ -PTTHを用いた化学架橋実験

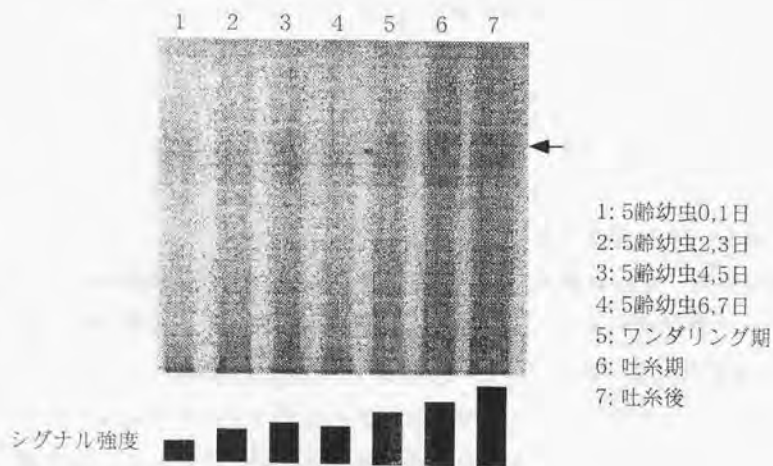


図 2-6 成長を追った $[^{125}\text{I}]$ -PTTHを用いた化学架橋実験

第2章 カイコ前胸腺cDNAライブラリーの構築

第1章の実験からPTTH受容体の分子量、解離定数など基本的な性質を明らかにすることができた。また、吐糸直前の前胸腺には1匹あたり 3.0×10^7 個の受容体が存在していると考えられることから、タンパク側から受容体のアミノ酸配列を明らかにしようとした場合、10 pmolの受容体を得るためには最低20万匹の前胸腺を集める必要があり、現実的ではない。そこで、受容体の構造を遺伝子側から明らかにすることを考え、COS7細胞を用いた発現クローニング法によるPTTH受容体遺伝子のクローニングを行うことにした。そのため、COS7細胞での発現が可能なpME18Sベクターを用いたカイコ前胸腺cDNAライブラリーを構築した。用いたpME18Sベクターの特徴としては、大腸菌内での自己複製開始点としてColE1、動物細胞内での自己複製できるようにSV40の複製開始点があり、大腸菌および動物細胞内での増幅が可能である。また、このベクターはラージT抗原を発現しているCOS7細胞内で高い転写活性を持たせるために強力なSR α プロモーターを有している。さらに、このベクターには形質転換株を選択するためベクター内にアンピシリン耐性遺伝子の配列も組み込まれている(図2-7)。

ところで、PTTH受容体をクローニングするためにはその材料となる前胸腺を集めることがまず必要である。前胸腺は第一気門の内側に存在する全長わずか数mmの小器官であり、実体顕微鏡下での解剖を必要とする。そのため1日にせいぜい100匹の前胸腺を摘出するのが限界であり、豊富な材料を用いてcDNAライブラリーを構築することは不可能である。前任者は約半年間かけて集めた5,000対の前胸腺を材料として、 6×10^6 クローンのcDNAライブラリーを構築したが、このライブラリー中にはインサートを含まないブラ

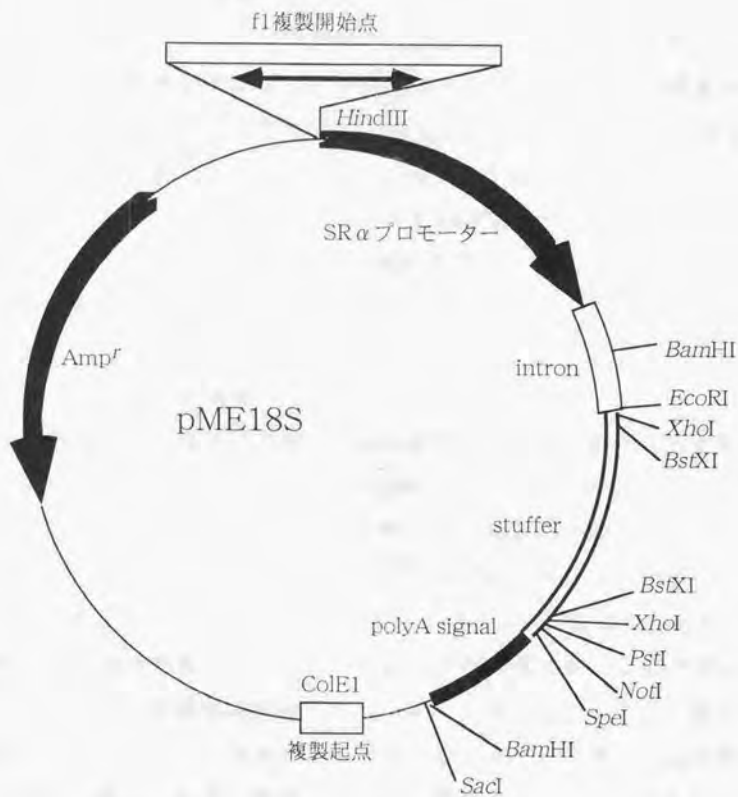


図2-7 プラスミドpME18Sの制限酵素地図

スミドが約半数含まれていたこと、また、インサートの大きさも1kb以下のものも含まれていたことから、受容体cDNAをクローニングするためのcDNAライブラリーとしては不相当であることが分かった。そのため、いかに少量の前胸腺から、質の良い（長いインサートを高頻度で持つ）、サイズの大きなライブラリーを構築するかを課題に、様々な条件を変え、30回以上のライブラリー作製を試みた。その結果、わずかに100匹の前胸腺から 1.0×10^8 以上のサイズで、しかも1kb以上のインサートを90%の確立で含む前胸腺cDNAライブラリーを再現性良く構築できるようになった。以下に、それぞれのステップでの工夫を述べる。

2-2-1 少量の前胸腺からのmRNAの精製

cDNAライブラリーを構築するにあたり、その材料となるmRNAの抽出法は、常法ではAGPC法¹⁸⁾やホットフェノール法¹⁹⁾を用いて、或いは塩化セシウムの濃度密度勾配による超遠心分離を用いて全RNAを抽出後、ポリTを結合させている担体を用いて抽出する。カイコ前胸腺から常法でmRNAの抽出を行うと、抽出されるmRNA量及びcDNAを合成する際の逆転写効率が非常に悪いことが分かった。例えば、前胸腺の破碎方法についてであるが、小さな組織を粉碎するのに良く用いられるホモジナイザーやブレンダーでは前胸腺の形状を残しており、細胞レベルまで粉碎することが不可能であった。この場合カイコ1000匹由来の前胸腺から最終的にmRNAとして得られたのはわずかに1 μ gであった。また、液体窒素で凍らせ乳鉢などで粉碎を試みたがその回収率も非常に悪かった。そこで前胸腺の粉碎方法を工夫する必要があると考え、グアニジンイソチオシアネートを変性剤とした溶液中で、前胸腺を粉碎するためにシリンジを数回通すことを試みた。シリンジは最初は18ゲージを用い、徐々

に27ゲージまでシリンジの径を細くしていった。この方法で前胸腺を粉碎し、超遠心器を用いて全RNAを得て、定量を行ったところ、50匹分の前胸腺から約50 μ gの全RNAが抽出された。この結果は、100匹~200匹で目的のmRNAが期待されることになる。さらに上記のように粉碎した前胸腺から全RNAを抽出する過程を経ないで、直接mRNAを抽出した。更にもう一度ポリTを結合させている担体を用いてmRNAを抽出した。二度同様の操作を繰り返した理由は、一度のオリゴdTを用いてmRNAを抽出したときよりもmRNAの収率は60%程度に低くなるものの逆転写の効率が2倍以上高くなったためである。

2-2-2 cDNAの合成

上記の方法に従って精製したmRNAを用い、キットなどを用いずにライブラリーを作製した。何故ならば、ライブラリー作製の市販のキットでは材料として最低限1~5 μ gのmRNAを必要とし、また酵素類とくに逆転写酵素などを選択できないためである。そこで、前胸腺由来のcDNAライブラリーを構築するためにはGubler-Hoffmannの変法であるリンカープライマー法⁵⁹⁾を採用し、各種酵素反応を忠実にかつ高い効率で行わせることを考えライブラリーを作製した。その概略は、図2-8の通りである。

まず、逆転写酵素としては、superscript IIを用いた。この酵素は通常のAMLV由来の逆転写酵素より高温で反応が可能なことやcDNAの伸長が長いとされているために採用した。また逆転写のプライマーとしては、開始メチオニンから始まる長いクローンを得るため、ランダムヘキサマーを0.074 μ g使用した。逆転写酵素を加える前37℃で5分間プライマーとアニールさせ、逆転写酵素を加えて37℃で30分間反応させた後、さらに酵素を加えて45℃で1時間

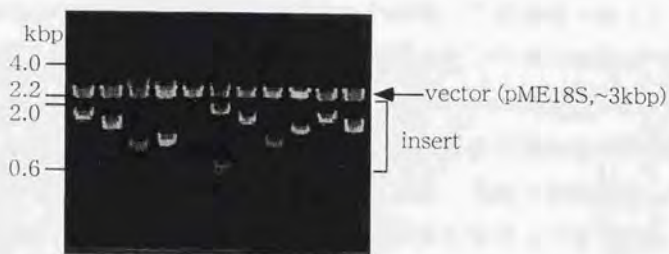
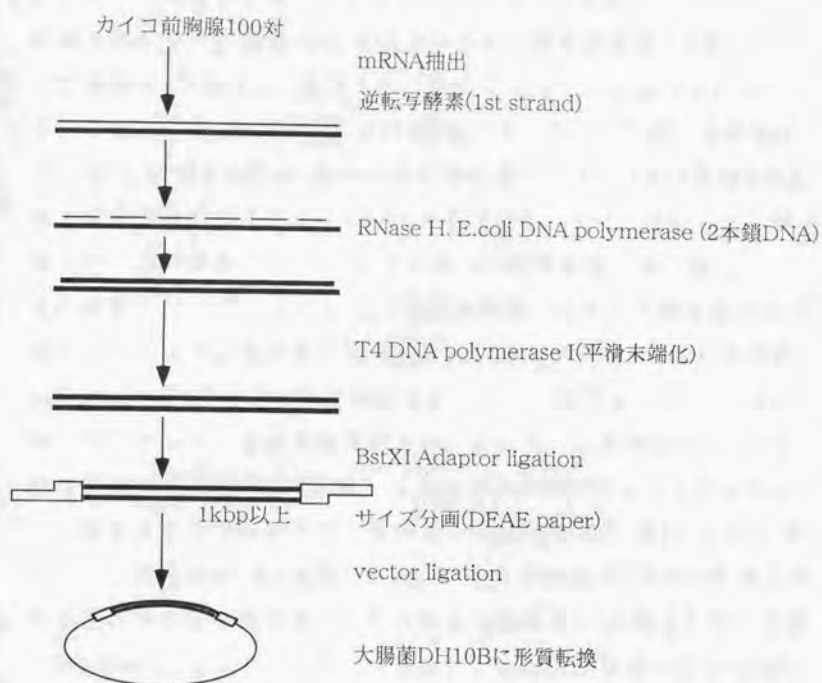


図 2-8 cDNAライブラリー構築の概略

反応させた。

次に、二本鎖にするためにDNAポリメラーゼIを用いて16℃で2時間反応させた。通常20℃付近で行うこの酵素反応を、16℃で行った理由は5'側と3'側がループ構造を取ることを避けるためである。また、このDNAポリメラーゼIは、次に用いるT4DNAポリメラーゼIと同様にDNase活性を有するためである。次に二本鎖DNAの末端を平滑化するためにT4DNAポリメラーゼIを用いて反応を行った。この酵素もDNase活性をもつため酵素量を最小限にし、反応時間も10分間とした。この反応は理論上はセンス鎖を完全に伸長しているはずであるが、この酵素のプライマーが、RNase HによるmRNAの部分消化物であるため、センス鎖のとくに5'側が平滑末端になっていない可能性がある。そこで、二本鎖DNAの末端を平滑化するためにT4DNAポリメラーゼIを用いて反応を行った。この酵素はセンス鎖の合成に用いたDNAポリメラーゼIよりもポリメラーゼ活性が約100倍高く、上記の通り本酵素はDNase活性を有するため酵素量を極力抑え、しかも反応時間を10分間とした。合成したcDNAをベクターへ挿入する前に、cDNAが合成されているか否かを確認するため、cDNAの一部を鋳型とシアクチンとelongation factorのPCRを行った。これに用いたセンス及びアンチセンスプライマーの間の配列にはイントロンを含んでおり、もし染色体由来のDNAが混在していた場合、増幅されてくるDNAは予想より大きくなるが、上記に述べた方法では染色体DNAは混在していないことが明らかとなった。また、増幅されたDNAが電気泳動上単一に観察されたため、逆転写反応も効率よく伸長したことが明らかとなった。

2-2-3 cDNAのサイズ選択とベクターへの挿入

次に発現ベクターと結合させるため、得られた2本鎖cDNAと制限酵素サイト*Bst*XIをもつアダプターをライゲーションした。このアダプターを用いた理由は、この制限酵素が12塩基認識であり、その認識配列は、非パリンδροームのCCANNNNN↓NTGGであるためである。本実験で用いた発現用ベクターには、この*Bst*XIサイトが2カ所あり、ベクター同士の結合ができないように設計されている。また、cDNAにこの配列に相補するようなアダプターを結合すればcDNA同士の結合も防ぐことができるのである(図2-9)。

ところで、PTTH受容体の分子量は比較的大きいことから、目的のPTTH受容体遺伝子の比率を上げ、スクリーニングの効率を良くするために、cDNAのサイズ分画を行った。アダプターを連結させたcDNAをアガロースゲル電気泳動に供し、1kbp以下に相当する部分のゲルを切り落とした後、10kbp付近にDEAEペーパーを挟み、逆方向に電気泳動させることにより1~10kbpのcDNAを得た。得られたcDNAをSR α プロモーターを持つプラスミドpME18S、またはSV40プロモーターをもつpcDNA1/Ampの*Bst*XIサイトに挿入した。

2-2-4 大腸菌への形質転換

エレクトロポレーション法により大腸菌DH10Bに形質転換した。上記の通りに各種酵素の性質に従い反応を順次行った。その結果、 7.2×10^6 、 9.2×10^6 のクローンを持つプラスミドライブラリーを構築した。得られたクローンのうちランダムに10クローンのインサートを調べた結果、全てにインサートが挿入されており平均長が1.5kbpであった。中には3kbp以上のものも含まれていた。このライブラリーはカイコPTTHの受容体をクローニングする上で十分なものであると考え、以下のスクリーニングを遂行した。この方法に

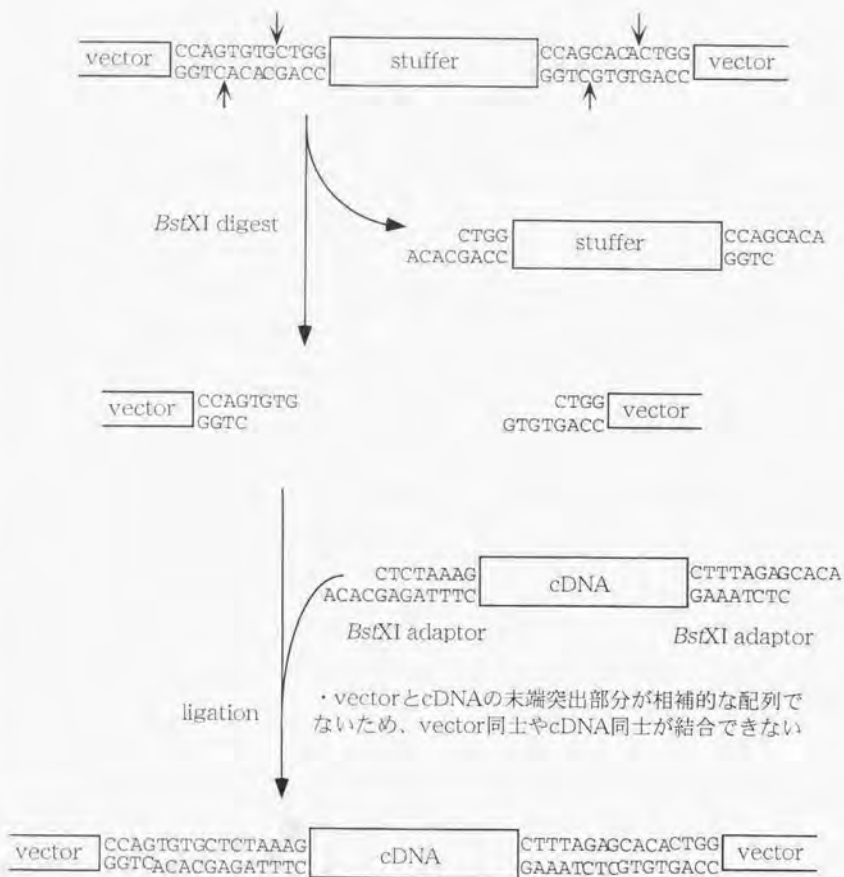


図 2-9 非パリンδροーム型*Bst*XI部位

よってカイコ100匹から0.5 μ gのmRNAを得て、さらに上記の方法で合成したcDNA量の約半分量で市販のキットに相当するかそれ以上のプラスミドcDNAライブラリーが構築された。

第3章 カイコPTTH受容体のスクリーニング

一般に受容体をコードしている遺伝子をクローニングする際に、タンパク質のアミノ酸配列をもとに予想されるDNA配列が利用できないとスクリーニングすることができない。そのような場合、アミノ酸配列の情報を必要としない遺伝子クローニング系として、本論文で用いている発現クローニング法がある。動物細胞を用いた発現クローニングによる受容体のスクリーニング方法としては、以下のように大きく二通りに分けることができる。(1) 目的の受容体遺伝子を単離するために、cDNAライブラリー全体を動物細胞にトランスフェクトして目的のタンパク質を発現している細胞を抗体などを用いてセルソーターやパニング法³¹⁾を用いてcDNAを回収することにより目的のcDNAを濃縮していく方法。(2) cDNAをサブプールに分け目的の遺伝子が含まれているプールを探し、陽性のプールをさらに小さなプールに分けていくことにより目的のcDNAを得る方法。上記の(1)の方法では、パニング法やソーティング法が、(2)の方法では、放射性ラベルしたリガンドを用いたバインディング法やフィルムエマルジョン法³²⁾が代表的である。そこで、本論文では、迅速で比較的効率良くかつ高度の技術を必要としない、パニング法、ソーティング法、バインディング法を用いてPTTHの受容体のスクリーニングを行った。以下にその詳細を述べる。

2-3-1 [¹²⁵I]-PTTHとの結合を指標にしたスクリーニング

第2章で作製したカイコ前胸腺由来のcDNAライブラリーを150クローン/wellとなるように96穴タイタープレートに植菌した。培地に7%DMSOを加え一晚培養後、そのまま-80℃に凍結し、マスタープレートとして保存した。

まず、一次スクリーニングとして、2プール（300クローン）分を1試料としてマスタープレートから大腸菌を植菌し、培養後、プラスミドを抽出した。一方、50%コンフルエントになるように6穴プレートに播いておいたCOS7細胞に抽出したプラスミドをDEAEデキストラン法で形質導入した。形質導入3日後に培地を除き、2-1-1で作製した10nMの $[^{125}\text{I}]$ -PTTHを含むPBS中、4℃で2時間インキュベートした。洗浄後、各実験区の細胞をトリプシン消化することで培養器から遊離させ、遠心分離で細胞を集め、放射活性を測定した（図2-10）。その結果、一次スクリーニングを行なった約1,000実験区（30万クローンに相当する）のうち、ほとんどのプールが 340 ± 20 cpmであるのに対し、23個のプールでは400cpm以上の放射活性が認められた。これらを陽性プールと判断して二次スクリーニングを行うことにした。

二次スクリーニングでは、陽性プールをマスタープレートから1well（150クローンに相当する）ずつ一次スクリーニングと同様にCOS7細胞に形質導入した。また二次スクリーニングは2連で行った。したがって一次スクリーニングで陽性であったプールについては合計3回の実験を行なったことになる。二次スクリーニングの結果、コントロールで 370 ± 30 cpmであったのが、D64のプールは514cpm、710cpmであり、またJ83のプールでは、480cpm、508cpmの放射活性がそれぞれに認められた。そこで、これらのプールを陽性クローンが含まれるプールと判断して三次スクリーニングを行った。

三次スクリーニングでは二次スクリーニングで陽性であったプールについて40クローン/wellとなるようにマスタープレートからサブプールを作成した。96プール（約4,000クローン）を二連で同様にCOS7細胞に形質導入し、結合活性を測定したが、有意な差のあ

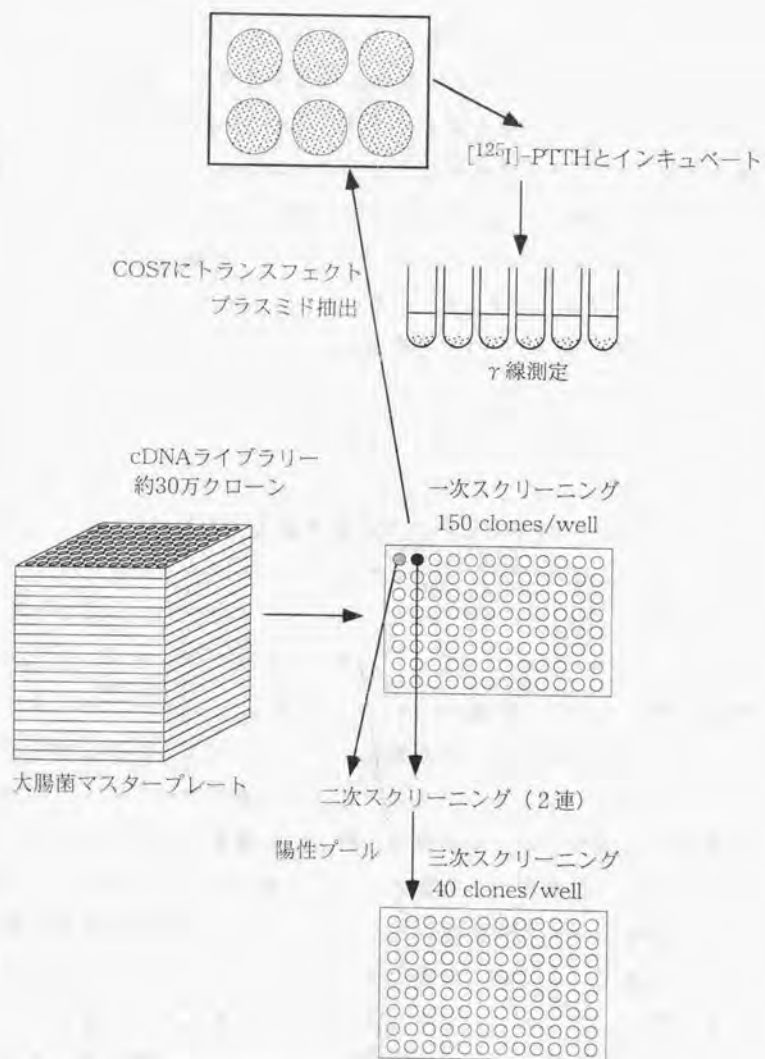


図 2-10 $[^{125}\text{I}]\text{-PTTH}$ との結合を用いたスクリーニング

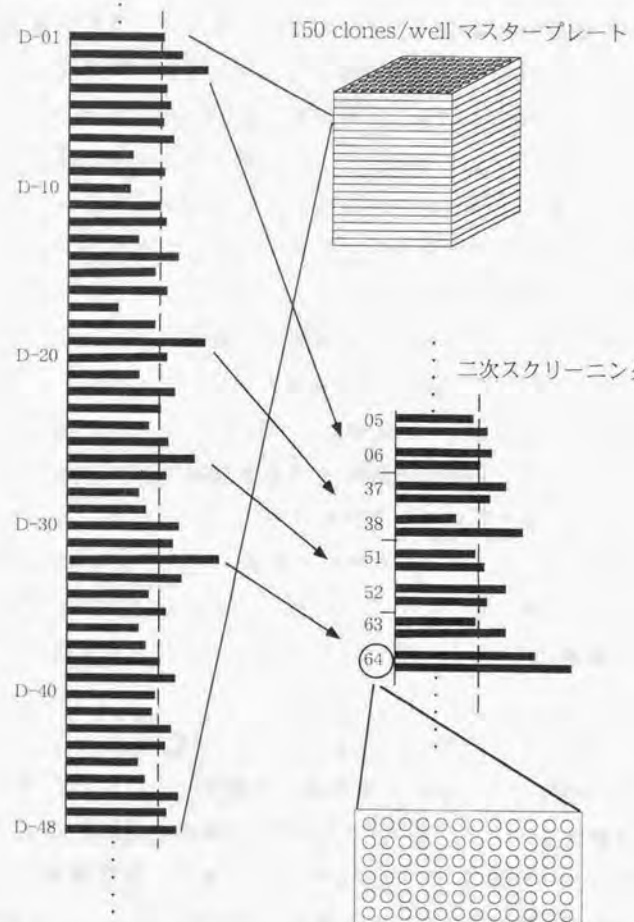
るサブプールは得られなかった。(図2-11)

このスクリーニング法の難点は、 γ 線測定の際のバックグラウンドとなる非特異的結合を各実験区で揃えることが難しく、また、陽性が陰性かの判定を行う際の放射活性の違いが小さいことが挙げられる。また、ネガティブなコントロール実験は行えるが、陽性を陽性と判断できるかどうか難しいと思われる。本実験の際にも一次スクリーニングで陽性クローンを見落としている可能性も否めない。また、一次スクリーニングに用いた1プールの150クローンとしたこと、行ったスクリーニングが合計で30万クローンであったことなど、今後検討を要する点は多い。

2-3-2 バニング法によるスクリーニング

1987年にSeedらにより考案されたバニング法⁶¹⁾は、細胞膜上のタンパク質をクローニングするための画期的な方法として発表された。その概略は図2-14に示したとおりである。実際の操作としては、まず、動物細胞発現ベクターで作製されたcDNAライブラリーを発現細胞に導入し、cDNAライブラリー由来のタンパク質を細胞上に発現させる。次に目的とした細胞膜タンパク質を発現している細胞を、そのタンパク質に対する抗体をコートしたプレート上に付着させ、残りの細胞を除く。付着した細胞を可溶化させ、細胞中に含まれているプラスミドを回収し、大腸菌に形質転換させる。大腸菌内で増幅させたプラスミドを再び動物細胞に導入し、同様の操作を繰り返すことにより、目的とする細胞膜上のタンパク質をコードしている遺伝子を濃縮できる。本実験では、カイコPTTH受容体に対する抗体が無いので、Seedらの方法を応用し、リガンドであるカイコPTTHをビオチン化し、抗ビオチン抗体をコートしたプレートを用いて濃縮することにした。

一次スクリーニング



— は放射活性を表す

三次スクリーニング
40clones/well マスタープレート

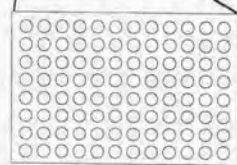


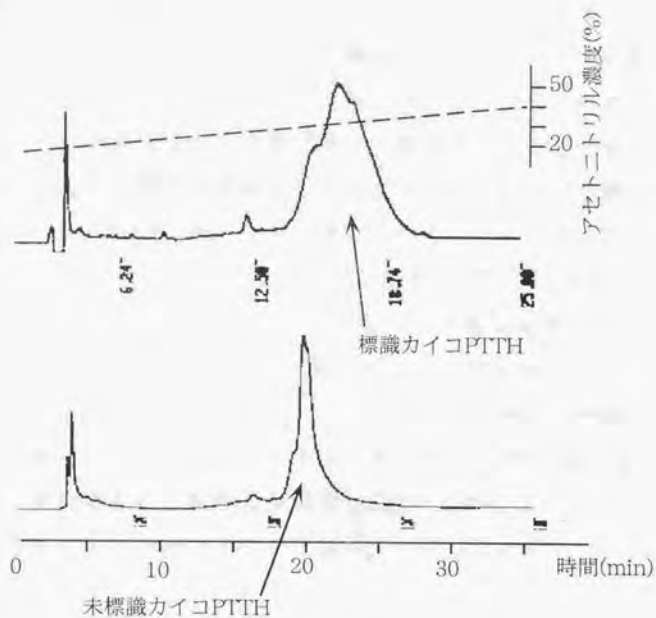
図 2-11 $[^{125}\text{I}]$ -PTTHを用いた受容体のスクリーニング

(1) ビオチン化PTTHの作製

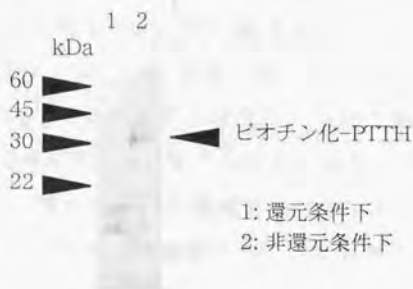
大腸菌で発現させた活性型のカイコPTTHをホウ酸緩衝液中に溶かし、スクシンイミジルエステルを架橋剤としてビオチン化を行った。反応後、ビオチン化PTTHから未反応のPTTHを除くため逆相のHPLCで精製を行った(図2-12(a))。得られたHPLCの溶出パターンではビオチン化PTTHは未反応のPTTHに比べてかなりブロードであった。その原因としてビオチン化の際に用いた試薬がN末端のアミノ基のみならず、リジンのε-アミノ基と反応するため複数のビオチン化PTTHが生成したものと考えられた。また、得られたビオチン化PTTHをSDS-PAGEに供し、メンブレンにブロッティング後、HRP標識したアビジンにて検出したところ、分子量が約30k付近に一本のバンドが検出された(図2-12(b))。また、前胸腺によるエクジソン分泌促進活性を調べたところ、ビオチン化PTTHは非標識のPTTHの3分の2程度の比活性を維持していた。反応生成物中に非標識PTTHが入っていないことから、ビオチン化による大幅な活性の減少はなかったものとし、以下のバニングの実験に用いた。

(2) ビオチン化PTTHを用いたバニング

第2章で作製したカイコ前胸腺由来のcDNAライブラリー(1.0 x 10⁶クローン)から調製した全プラスミドをCOS7細胞に形質転換し、2日間培養した後、ビオチン化PTTHを加えてインキュベートすることにより、受容体を発現していると思われる細胞にビオチン化PTTHを結合させた。細胞を数回洗浄後、抗ビオチン抗体をコードしているプレート上でインキュベートし、細胞表面にビオチン化PTTHをもつ細胞をプレート上に付着させた。培地を除き、さらに同じ培地を数回加えてプレート上に付着しなかった細胞を除いた後、



(a) ビオチン化PTHのHPLCからの溶出パターン



(b) Western blotting

図2-12 ビオチン化PTHのHPLCからの溶出パターン(a)とWestern blotting(b)

プレートに付着した細胞をHirt法⁴⁾で可溶化させ、プラスミドを抽出した。回収したプラスミドを再び大腸菌に形質転換し、増幅をした。増幅されたプラスミドを大腸菌から抽出し、COS7細胞に導入し、次のサイクルのパニングを行った(図2-13)。その結果、パニングの回数が増すごとに抗ビオチン抗体をコートしたプレートに付着する細胞が増えたため、目的とするカイコPTTH受容体遺伝子をコードしているプラスミドが濃縮されていると考えられた。図2-14はパニングの各サイクルで回収されたプラスミドをインサートの両端にある*Xho*Iで消化し、アガロース電気泳動を行なった結果である。3回目のパニング以降、バンドのパターンがほぼ同じであり、パニングの回数を増すごとに各バンドが徐々に明瞭になっている。特に、約1.5kbp付近のバンドは3回目以降、最も濃いバンドとして検出された。しかしながら、5回以上のパニングを行ってもその電気泳動パターンに変化は見られなかった。そこで、6回目のパニングで回収したプラスミドを用いてサブライブラリーを作製し、このライブラリーからランダムに12クローンを選び、インサートの両端の塩基配列、約300bpを解析した。その結果、12クローン中3クローンが両端の長さは異なるが、同じ配列を持つことが明らかとなった。これら3クローンはcDNA合成の際にランダムプライマーを用いたことおよびcDNAの伸長が十分でなかったために生じた、同じmRNA由来のcDNAであると考えられた。また、パニング法によって同一のmRNA由来のcDNAが濃縮されたことから、これらのcDNAにコードされているタンパク質がPTTH受容体である可能性が高いと考え、これらクローンのうち最長の1.8kbpのインサートについてその全塩基配列を解析した。しかし、塩基配列から推定されるアミノ酸配列中には細胞膜を貫通すると考えられる疎水性アミノ酸で構成されている領域は認められなかったことから、受容体タン

パニング法の原理

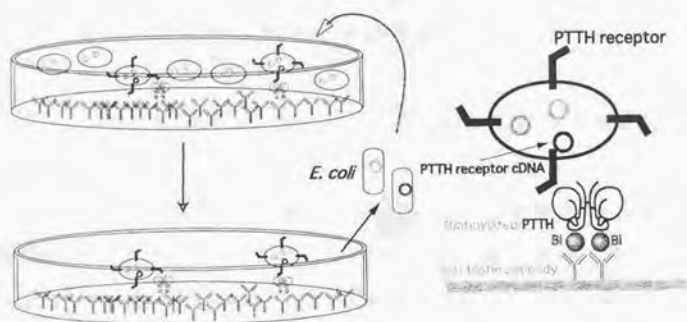


図 2-13 パニング法の原理

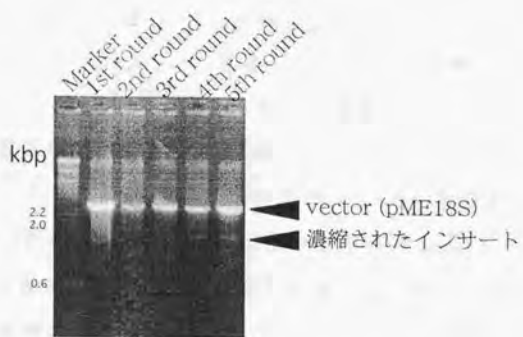


図 2-14 パニング法によるcDNAの濃縮

バク質である可能性は低いと考えられた。また、得られた塩基配列および推定されるアミノ酸配列をNCBIで検索したところ、ファルネシルトランスフェラーゼのβサブユニットと高い相同性を持つことが明らかになった。したがってこのcDNAにコードされているタンパク質はPTTH受容体ではないと判断した。

(3) サプライブラリーの $[^{125}\text{I}]$ -PTTHとの結合を指標にしたスクリーニング

5回目のパニングで回収したプラスミドを形質転換したCOS7細胞が、6回目のパニングでもプレート上に強く付着したことから、このプラスミド中にはPTTH受容体をコードしているcDNAを持つプラスミドが濃縮されていると考えられる。しかしながらパニングの回数を増やしても回収されるインサートの電気泳動パターンに変化がないことから、パニングによってこれ以上PTTH受容体cDNAの濃縮は困難と考え、5回目のパニングで回収したプラスミドを用いてサプライブラリーを作製し、2-3-1と同様に $[^{125}\text{I}]$ -PTTHとの結合を指標にスクリーニングを行なった。作製したサプライブラリーからランダムに300クローンを選び、プラスミドを増幅後、COS7細胞に形質転換した。形質転換したCOS7細胞と $[^{125}\text{I}]$ -PTTHとの結合を測定したところ、インサートを持たないプラスミドを形質転換したCOS7細胞では 330 ± 30 cpmであったが、サプライブラリー由来のプラスミドを形質転換したものでは420 cpm以上のものが12区あった。このうち測定値が高い12クローンについてその塩基配列を解析したが、得られた配列は12クローン中で重複した配列は認められず、それぞれが異なったものをコードしている塩基配列であった。また、いずれも受容体をコードしているとは考えられなかった。

2-3-3 FACSを用いたスクリーニング

(1) FITC-PTTHの作製

大腸菌で発現させた活性型のカイコPTTHをホウ酸緩衝液に溶かし、スクシンイミジルエステルを架橋剤としたFITC化を行った。反応後、FITC化PTTHから未反応のPTTHを除くため逆相のHPLCで精製を行った(図2-15)。得られたHPLCの溶出パターンではFITC化PTTHは未反応のPTTHに比べかなりブロードであった。その原因としてFITC化の際に用いた試薬がN末端のアミノ基のみならず、リジンの ϵ -アミノ基と反応するため複数のFITC化PTTHが生成したものと考えられた。また、前胸腺を用いたエクジソン分泌促進活性を調べたところ、FITC化PTTHは非標識のPTTHの3分の2程度の比活性を維持していた。反応生成物中に非標識PTTHが入っていないことから、FITC化による大幅な活性の減少はみられなかったものとし、以下のFACSを用いたスクリーニング実験に用いた。

(2) FACS(自動細胞分離解析装置)を用いたスクリーニング

FACSの装置としてベクトン社のVantageを用いた。受容体を発現しているCOS7細胞にはFITC-PTTHが結合して蛍光強度が増すことを利用し、FACSを用いた細胞のソーティングを行い、プラスミドの濃縮を試みた(図2-16)。前胸腺由来のcDNAライブラリー(1.0×10^6 クローン)由来の全プラスミドを形質転換したCOS7細胞を2日間培養した後、FITC-PTTHとインキュベートした。この細胞約200万個を蛍光強度の強さを指標にソーティングし、インサートを持たないプラスミドを形質転換したCOS7細胞に比べ蛍光強度が高い約20,000細胞を得た。得られた細胞を可溶化後、

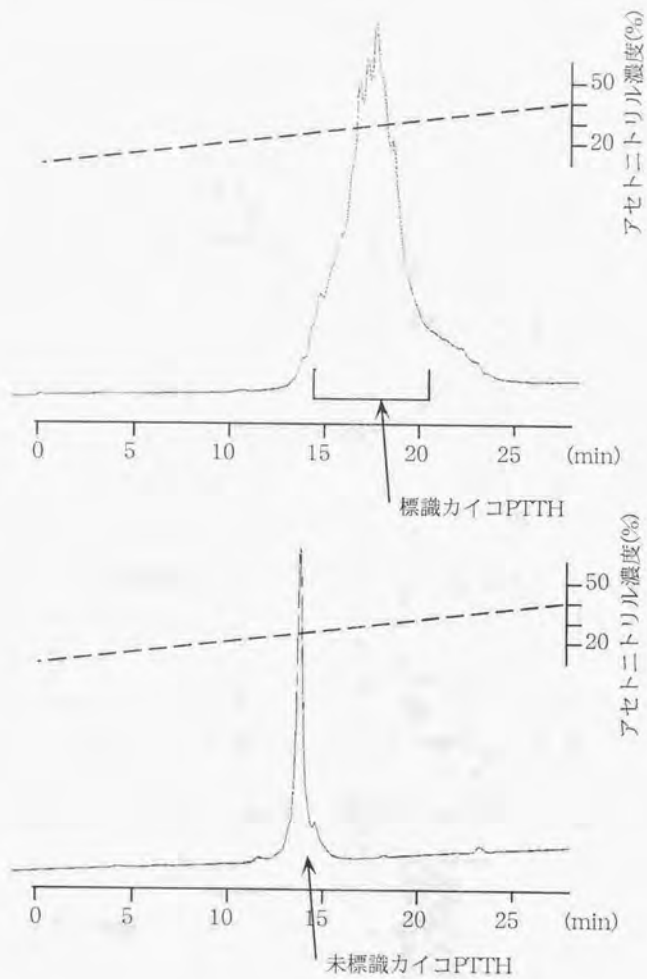
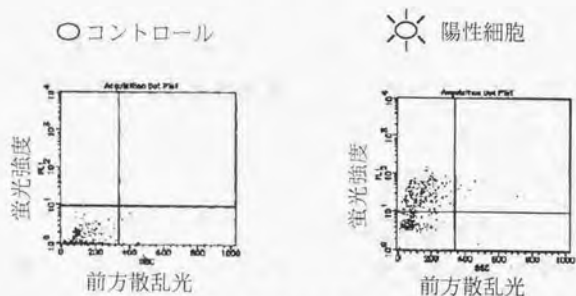
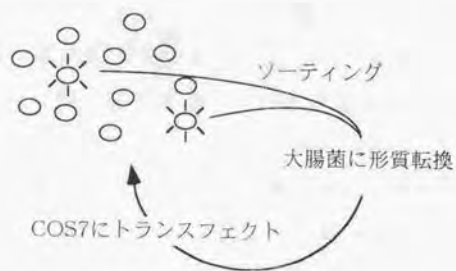


図 2-15 FITC標識PTHのHPLCからの溶出パターン



・コントロールと陽性細胞の蛍光と前方散乱光のdot plot

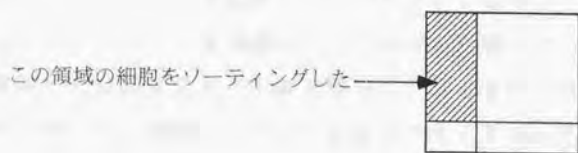
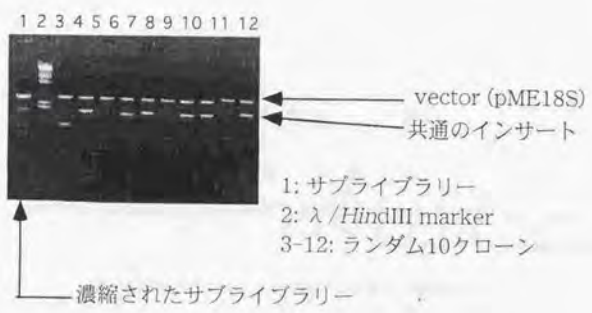
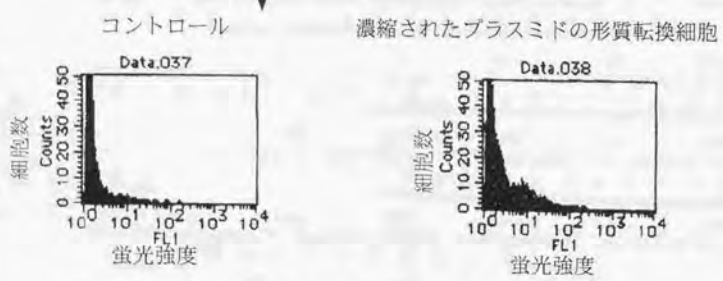


図 2-16 FACSを用いたスクリーニング (原理)

プラスミドを回収し大腸菌に形質転換した。さらに大腸菌によって増幅したプラスミドをCOS7細胞に形質転換し、同様の方法でソーティングを行った。その結果、2回のソーティングにより約1.8kbpのインサートを有するプラスミドが濃縮された(図2-17)。このプラスミドの塩基配列を解析したところ、ビオチン化PTTHを用いたパニングと同様、膜を貫通していると思われるアミノ酸配列はコードされていなかった。また、得られた配列をNCBIで検索したところ、相同性が認められるタンパク質は見い出されなかった。また、このcDNAがコードしているタンパク質中にはC-X-K-C-X₂-Cという繰り返し配列が4回存在しており(図2-18)、さらに開始メチオニンに続くシグナル配列がないことから細胞質内で機能する構造タンパク質の一種ではないかと思われる。また、このプラスミドを単独でCOS7細胞に形質転換すると、FITC-PTTHとのインキュベーションを行わなくても、FACSでの蛍光強度が増加することが分かった。さらに細胞内部の蛍光に由来する側方散乱光(SSC)の変化も見られたため、このプラスミドにコードされているタンパク質は細胞表面に存在するのではなく、細胞内に大量発現されている可能性が高い。また、前胸腺は自家蛍光を持つ細胞であり、蛍光強度の増加をもとにFACSを用いてソーティングを行った場合、このような細胞内の蛍光強度を増加させるタンパク質をコードするcDNAを濃縮する危険性があり、蛍光標識リガンドを用いたFACSによる受容体遺伝子の濃縮には注意が必要であると思われる。



濃縮された共通のインサートを有するプラスミドをCOS7細胞に形質転換した



・コントロールと濃縮されたプラスミドの形質転換細胞の蛍光強度による細胞数のヒストグラム

図 2-17 FACSを用いたスクリーニング (結果)

10 20 30 40 50 60
 CATTCCGAAC^TTAAGCAATGAGTCAAGCGTTTGCTACAAGTGCAACCGGACCGGGCATT
 F R T * A M S S S V C Y K C N R T G H F
 70 80 90 100 110 120
 TCGCGCGGAATGCACGCAGGGGGCGTGGTGTGCGGGGATTCCGGTTTCAATCGGCAAC
A R E C T Q G G V V S R D S G F N R Q R
 130 140 150 160 170 180
 GTGAGAAGTGTTC AAGTGCAACCGCACAGGACACTTTGCGAGGATTCAGGAAGAGGCTG
 E K C S S A T A Q D T L R G L Q E E A D
 190 200 210 220 230 240
 ACCGTTGCTACAGATGTAACGGCACGGGCACATAGCGCGGAGTGCACAGAGCCCGG
R C Y R C N G T G H I A R E C A Q S P D
 250 260 270 280 290 300
 ACGAGCCGTGCGTGTACAAC^TGCAACAAGACGGGCCACATCGCACGGAAC^TGTCCCGAGG
 E P S C Y N C N K T G H I A R N C P E G
 310 320 330 340 350 360
 GGGGCGGGAGTCTGCGACGCAGACCTGCTATAACTGCAACAAGTCCGGCCACATCTCCC
 G R E S A T Q T C Y N C N K S G H I S R
 370 380 390 400 410 420
 GCAACTGTCCCGACGGCACC AAGACGTGCTACGGTGTGGGCAAGCCCGGCCACATCTCGC
N C P D G T K T C Y V C G K P G H I S R
 430 440 450 460 470 480
 GCGAGTGCAGCAGGGCGGAACTAGCCGCAGCCACCTGTCTCCCTTACAATCAACTAT
E C D E A R N * P Q P P C L P Y N Q L C
 490 500 510 520 530 540
 GTATATTATGATGCCACGCACGGACGATAAGCAAAGGACGCCACGGCGACACACGATAA
 I L * C H A R T I S K G R H A R H T I T

■ は繰り返しの配列

図 2-18 FACSのスクリーニングで濃縮されたクローンの塩基配列と、
 推定アミノ酸配列

第4章 まとめおよび考察

2-4-1 まとめ

カイコの前胸腺細胞上に存在するPTTHの受容体は分子量約60,000で、解離定数54pmolの親和性の高いものであり、前胸腺の1細胞当たり、16,000個の受容体が発現されていることを明らかにした。次に受容体をコードしている遺伝子を得るために、リンカープライマー法に沿って前胸腺のcDNAライブラリーを作製した。この作製法で、従来の100倍以上の高効率で前胸腺100対からプラスミドcDNAライブラリーを構築することができた。また、作製したcDNAライブラリーを用いて、発現クローニング法でカイコPTTH受容体のスクリーニングを試みた。

2-4-2 考察

第2部においてはPTTHの受容体の性質を調べそのクローニングを試みた。第1章では、その性質を調べた。前胸腺の細胞は、培養細胞のように単純に細胞膜により細胞が形成されているだけでなく、結合組織章鞘でおおわれているために、受容体を前胸腺細胞から得ること、つまり可溶化させることは技術的に困難であった。このことはタバコスズメガの利尿ホルモン(DH)の受容体をマルピギー管から可溶化させる場合でも同じであった。その研究によると、通常の界面活性剤であるTritonX-100などでは効率よく可溶化されず、CHAPSやタウロコール酸のような両親媒性のステロイド骨格を持つ界面活性剤でのみ、受容体分子が効率よく可溶化されている³¹⁾。カイコPTTHの受容体に関してもさらに可溶化条件の検討が必要と思われる。また、そのために前胸腺に存在しているPTTHの受容体が本当に本論文で得られたように一種類しかない、とは断定で

きない。すなわち、受容体の架橋実験やスキッチャード解析ではカイコの受容体は一種類という結果が得られているものの、以下に示すようなカイコPTTHの細胞内情報伝達の様々な実験を考慮すると、最低でも2種類の受容体が存在するようと思われるからである。まずカイコPTTHによるエクジソン合成分泌は、カイコ5齢後半の幼虫の前胸腺を用いると、百日咳毒素により阻害される³⁴⁾。また、PTTH刺激によりCa²⁺の細胞内への流入が観察される。ところが、カイコ5齢前半の幼虫の前胸腺を用いるとPTTH刺激により細胞内のcAMP量が上昇する³⁵⁾。前者の結果を考慮すれば、PTTHの受容体がGタンパク質共役型であり、効果器としてはホスホリパーゼCであり、その後Kチャンネルが開きそれに伴いCaチャンネルが開くと考えるのが一般的である。この場合細胞内のcAMP量は抑えられることはあったとしても、上昇することは一概には言えない。後者の場合もGタンパク質共役型の受容体であると考えられるが、効果器としては、アデニルシクラーゼであり細胞内のcAMP量を上昇させると考えることが順当であろう。これらのことを考慮すると、PTTHの受容体はGタンパク質共役型の受容体ではあるが、異なるGタンパク質と共役している受容体が存在していることを示唆している。すなわち、PTTH受容体は、ヘテロ3量体のGタンパク質と共役していると思われるが、そのうちの α サブユニットが成育段階により異なったものが利用されていると考えられる。このことから、PTTHに対する受容体は最低でも2種類以上は存在すると考えられるわけである。

第2章ではPTTH受容体のクローニングを試みたが、クローニングすることはできなかった。上記の通りカイコPTTHの受容体はGタンパク質共役型であると考えられるが、それを基にその相同性からPCR法を用いてクローニングすることは困難であると考えられる。

このタイプの受容体は膜を7回貫通しているものが多い。構造上の類似性は見られるものの、アミノ酸レベルではその機能や共役しているGタンパク質の種類が同じであってもその相同性は高くはない。また、その中でも膜貫通領域に若干アミノ酸レベルで相同性が見られるものの、その相同性を基にしたファミリーは十数種類にも及ぶ。この情報から、PCRを行い全長をクローニングしてPTTHとの結合を調べるというよりは、常法に従い動物細胞を用いた発現クローニングを行う方が受容体を得られる可能性は高いと考え本論文ではこの方法で実験を進めた。

作製したライブラリーが良質なものであるか否かは、第2章の結果から考えて十分に良質なものであると思われる。本論文から得られた受容体の分子量から、これをコードしている遺伝子は最低でも1.5kbp以上はあると考えられるが、本論文で作製したライブラリーは1kbp以上のcDNAを用いて作製したのでこの点に関しては問題はないと思われる。使用したベクターであるが開始メチオニンを認識し動物細胞内で発現させることができるため、開始メチオニンから始まるタンパク質をコードするcDNAを得るためmRNAを逆転写するためのプライマーとしてランダムプライマーを用いた。また、このベクターのプロモーターは開始メチオニンでなくても、つまりコードしているタンパクの途中のメチオニンからも翻訳される可能性がある。昆虫の開始メチオニンは動物細胞でも問題なく認識され翻訳が始められている。タバコスズメガの利尿ホルモンの受容体もこの動物細胞を用いて行われており、また種々のキイロシヨウジョウバエの遺伝子も発現されている。これらのことから、ベクターおよびcDNAに関しては問題はないと考えられる。

受容体の解離定数を考えると受容体のスクリーニングには動物細胞を用いた発現クローニング法を適用できるはずである。上記のよ

うにPTTH受容体はGタンパク質と共役していることが示唆されているが、動物細胞にGタンパク質が発現されていなかったとしても、リガンドであるPTTHとは、結合すると考えられる。例えばインテグリン受容体もGタンパク質共役型受容体であるが、その共役しているGタンパク質が発現されていない場合は、発現されている場合よりリガンドとの結合能が10分の1になるだけである⁵⁰⁾。本論文ではそのことを考慮して、細胞にリガンドを加えてからさらに化学架橋剤を用いて細胞膜上に共有結合させているため、修飾したPTTHを用いたスクリーニングに関しては問題はないと考えられる。パニング法に関しては、リガンドを結合させるときの非特異的吸着を防ぐために100 μ gのBSAを加えたが、BSAの代わりに血清を加えた場合では異なった結果が得られた。この場合、パニングの回数を多くしても細胞へのトランスフェクトの方法を変えても、抗ピオチン抗体をコートしたプレートに付着する細胞数は増加しなかった。リガンドを細胞と反応させる条件は検討する余地があるかも知れないが、例えば非特異的吸着を防いでも細胞接着に関わるような細胞膜上のタンパク質をコードしている遺伝子が濃縮されてくる可能性がある。しかし本論文ではそのような結果も得られなかった。実験上では、このスクリーニング系で一番要所となるのは、細胞への形質導入の部分であるが、パニングで数回の洗浄にも関わらずプラスミドが回収できることや、本論文で用いたトランスフェクトの方法で β -ガラクトシダーゼをコードしたプラスミドを形質導入した際、細胞はX-Galを添加すると細胞が青く染まることから形質導入はうまくいっていることがわかる。結論として、根本的にこのスクリーニング系がPTTH受容体をクローニングする上で不適であるか、本論文で用いたcDNAライブラリーには受容体をコードする遺伝子は含まれていないのか、それとも技術的に失敗しているのかはわからない。

い。すなわち、カイコPTTHの受容体をクローニングするためには、新たに何らかの工夫が必要と考えられる。

その打開策として、ライブラリー構築に関しては前胸腺特有の遺伝子が含まれるように他の器官とのサブトラクトしたライブラリーを作製する方法がある⁵⁷⁾。このサブトラクトライブラリーを構築するためには、前胸腺をさらに集める必要があるが、PTTH受容体をはじめ興味深い遺伝子が得られる可能性もある。また、この方法ではランダムに塩基配列を読むことにより受容体と思われる候補遺伝子を得た後、動物細胞に形質導入することによりリガンドとの結合を見るという方法が可能となる。この方法でT細胞レセプター⁵⁸⁾や、最近でもロイコトリエンの受容体遺伝子⁵⁹⁾がクローニングされている。前胸腺細胞のサブトラクトライブラリーを作製するには、どの細胞とサブトラクトすればよいかという問題がある。しかし、どの組織を用いてサブトラクトしても、前胸腺内の構造タンパク質や生存するのに必要なタンパク質をコードした遺伝子は除かれるため、PTTHの受容体の遺伝子が濃縮されることになると考えられる。

次に動物細胞を用いた発現系が良くないとすると、他の発現系を考える必要がある。例えば、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた発現系を用いて、電気生理的にスクリーニングすることが考えられる。ところが、この発現系を用いてクローニングするためにはPTTH刺激による細胞応答をさらに研究する必要があると考えられる。スクリーニングにリガンドとの結合をもとに行う方法でよいか、という問題に関しては、本論文で用いたCOS7細胞自体にはPTTHは結合しないことが明らかとなっており、結合可能な受容体が細胞上に発現されていれば特異的に細胞にリガンドと結合するはずである。結合を用いない系とすれば、PTTH刺激による細胞内へのCa²⁺の流入を指標にスクリーニングを行うことが考えられる。最近では

その方法をもちいて、カプサイシンのチャンネル型受容体が得られている¹⁰⁾。しかし、この方法を用いる場合でも上記の通り、細胞内情報伝達経路をもっと詳細に研究する必要があると考えられる。以上のようにカイコPTTHの受容体をクローニングするためには何らかの新しい手法を導入し、根本的な問題点を解決する必要がある。また、そのためには受容体分子自身および受容体と相互作用する周辺分子の情報を得る必要があると考えられる。

分子構造を解析する研究は、解析機器や解析法の開発と進歩とともに発展してきた。カイコPTTHの分子構造も、その進歩とともに明らかにされてきた。歴史をたどれば、カイコPTTHは高速液体クロマトグラムの開発で微量性物質を効率よく精製することが可能となりはじめて単離され、次に気相式シーケンサーの開発で、微量しか単離できなかったPTTHのアミノ酸配列が明らかにされた。本論文の第一部では最近発展してきた糖鎖構造解析技術を利用してカイコPTTHの化学構造のうち未決定部分として残されていた糖鎖構造を明らかにすることを試みた。

まず、第1章では天然物と類似の糖鎖を付加することが期待されるバキュロウイルス発現システムを用いてPTTHの大量発現を行った。成熟カイコPTTHのすぐ上流にシグナルペプチドを付加したバキュロウイルス発現用ベクターを構築し、野生型のバキュロウイルスとの相同組換えにより組換え体ウイルスを作製した。この組換え体ウイルスをカイコ幼虫に感染させ、感染後3日目のカイコ幼虫8頭から3mlの体液を採取し、6段階の精製法により、1.4mgのバキュロウイルス発現カイコPTTH (B-rPTTH) を得た。単離したB-rPTTHは天然PTTHおよび大腸菌発現PTTH (E-rPTTH) と同じくGlyから始まるN末端配列を与えたが、ウェスタンブロッティングでは還元条件下でE-rPTTHよりもわずかに大きな分子量を示し、期待した糖鎖の付加が起こっていると推定された。

次に、第2章ではB-rPTTHおよびE-rPTTHをリジルエンドペプチダーゼで消化し、逆相HPLCを用いてペプチドマッピングを行った。その結果、41残基目のAsnを含むペプチドフラグメントのみ溶出位置が異なり、さらにB-rPTTH由来のフラグメントが

E-rPTTH由来のものより分子量が約900大きいことが質量分析により確かめられた。また、B-rPTTH由来のフラグメントをPNGase Fで消化した場合も分子量が約900低下したことから、このフラグメントは分子量約900のN-結合型糖鎖を有していると考えられた。次に、この糖ペプチドを数種類のエキソおよびエンドグリコシダーゼで消化し、消化による分子量の変化と各グリコシダーゼの基質特異性から、付加している糖鎖構造を推定した。さらに未決定であった2カ所の結合様式を決定するために、糖ペプチドから糖鎖を切り出し、ピリジルアミノ化後、HPLCによる二次元糖鎖マップ法を用いて結合様式を決定した。

続く第3章では天然PTTHの糖鎖構造を決定するため、180万頭のカイコ蛾頭部から合計117 μ gのPTTHを精製した。精製したPTTHのリジルエンドペプチダーゼ消化物をHPLCにより分析したところ、B-rPTTHの場合と同じ溶出位置に糖ペプチドと思われるフラグメントが溶出された。次に得られた糖ペプチドを各種グリコシダーゼで消化した後、TOF-MS測定を行ない、その分子量の変化から糖鎖構造を推定した。その結果、天然のPTTHの糖鎖構造はB-rPTTHと同一の構造であることが示唆された。そこで、B-rPTTHと同様に糖ペプチドから糖鎖を切り出し、ピリジルアミノ化後、ODSカラムを用いたHPLCにより分析したところ、その溶出時間が完全に一致した。したがって、天然PTTHに付加している糖鎖の構造はB-rPTTHのものと同であると判断した。

さらに第4章ではカイコPTTHの除脳蛹を用いた生物検定によりE-rPTTHの比活性は0.32ng/unitと天然PTTHと同等であり、E-rPTTHは0.59ng/unitであったことから、糖鎖が付加することによって比活性が約2倍高くなることを明らかにした。また、糖鎖をもたないE-rPTTHも天然PTTHやB-rPTTHの約1/2の活性が

あることから糖鎖はPTTH活性に必須ではなく、体内での安定性などに関わっているのではないかと思われる。

以上第一部の結果によりカイコPTTHの構造上残されていた糖鎖構造を明らかにすることによってカイコPTTHの一次構造はすべて決定することができた。

ところで、PTTHの化学構造は確定されたものの、PTTHが司る脱皮、変態の研究の現状は、図0-1で表されているクラシカルスキームを逸脱していない。つまり、脱皮、変態という生命現象のしくみで明らかになっているのは、分子→組織→個体という線で結ばれるアウトラインに過ぎない。分子レベルでのPTTHの研究を発展させるためには、このクラシカルスキームをさらに細胞レベルへと細分化させる必要がある。PTTH→前胸腺細胞→エクジソンという脱皮、変態において中枢的な働きをするPTTHの分子レベルでの作用機序についてはあまりにも不明な点多すぎる。そこで、前胸腺におけるPTTHのエクジソン合成および分泌促進機構の分子レベルでの解明を目的とし、その第一歩として本論文第二部ではPTTHの受容体の解析と受容体遺伝子のクローニングを試みた。

第1章では前胸腺に存在するPTTH受容体の性質を明らかにするためにPTTH感受性の時期である吐糸直前の5齢幼虫から抽出した前胸腺を材料に、 ^{125}I で標識したPTTHを用いて結合実験を行った。その結果をスキッチャード解析したところ、1本の直線関係が得られたことから前胸腺に存在するPTTH受容体は1種類であり、解離定数は54 pMと極めて親和性が高いことが明らかとなった。また、前胸腺の一細胞あたり約16,000個の受容体分子が存在していると考えられた。一方、架橋実験から受容体の分子量は約70,000であり、ジスルフィド結合によるサブユニット構造はとっ

ていないと考えられた。

第2章では前胸腺を材料にPTTH受容体の構造をタンパクレベルで明らかにすることは不可能であると考え、遺伝子側からの解析を行うためにcDNAライブラリーを構築した。その際、COS7細胞を用いた発現クローニングを行えるように、ベクターとして動物細胞発現用でSR α プロモーターを有するpME18Sを用いた。前胸腺は1対あたりわずか約1,000個の細胞から構成されているため少量の材料から効率良く、しかも質の良いライブラリーを構築するため、mRNAの精製法、反応条件などを様々に変えてcDNAライブラリーの構築を試みた。その結果、最終的にわずか100匹のカイコの前胸腺から 7.2×10^6 の組み換え体を含むライブラリーを作製することに成功した。このライブラリーは1kbp以上のインサートが90%以上の割合で含まれており、PTTH受容体をスクリーニングするのに十分であると考えられた。

続く第3章ではカイコPTTH受容体をクローニングするために行なった以下の3つの方法によるスクリーニングの結果を述べた。

(1) 125 I-PTTHとの結合を指標にしたスクリーニング

構築したcDNAライブラリーを150クローンずつサブプールに分け、COS7細胞に形質転換し、COS7細胞と 125 I-PTTHとの結合を指標にスクリーニングを行った。合計約2千プール(30万クローン)のスクリーニングを行った結果、1つのサブプールに 125 I-PTTHとの結合活性が認められた。しかし、このサブプールをさらに細かく分けスクリーニングしたが、陽性プールを得ることが出来なかった。

(2) バニング法によるスクリーニング

構築したcDNAライブラリー全体をCOS7細胞に導入し、3日間培養後、ビオチン化PTTHを添加し、洗浄後抗ビオチン抗体をコーティングしたプレート上に付着させた。付着した細胞からプラス

ミドを回収、大腸菌に形質転換し、増幅させた後、再びCOS7細胞に導入し、PTTH受容体cDNAの濃縮を試みた。その結果、5回のパニングによる濃縮でプレート上に付着する細胞数は順次増加し、回収したプラスミドの泳動パターンから特定サイズのプラスミドが濃縮されていることがわかった。しかし、さらに2回のパニングを行ってもその電気泳動パターンは変化せず、複数のバンドが認められたため、濃縮されたサブライブラリーからランダムに12クローンを選び、塩基配列を解析した。その結果、3クローンが長さが異なる同一のcDNAをコードしているプラスミドであることが明らかとなった。そこで一番長い1.8kbpのインサートを有するプラスミドの全塩基配列を解析したが、受容体の特徴をもつタンパク質はコードされておらず、得られた塩基配列および推定されるアミノ酸配列をNCBIで検索したところ、ファルネシルトランスフェラーゼの β サブユニットと高い相同性を持つことが明らかになった。

(3) FACSを用いたスクリーニング

受容体を発現しているCOS7細胞にはFITC-PTTHが結合して蛍光強度が増すことを利用し、FACSを用いた細胞のソーティングを行い、プラスミドの濃縮を試みた。前胸腺由来のcDNAライブラリー由来の全プラスミドを形質転換したCOS7細胞を2日間培養した後、FITC-PTTHとインキュベートした。この細胞を蛍光強度の強さを指標にソーティングし、インサートを持たないプラスミドを形質転換したCOS7細胞に比べ蛍光強度が高い細胞を得た。得られた細胞からプラスミドを回収し、大腸菌によって増幅した後、再びCOS7細胞に形質転換し、同様の方法でソーティングを行った。その結果、2回のソーティングにより約1.8kbpのインサートを有するプラスミドが濃縮が認められた。このプラスミドの塩基配列を解析したところ、ビオチン化PTTHを用いたパ

ニングと同様、膜を貫通していると思われるアミノ酸配列はコードされていなかった。また、得られた配列をNCBIで検索したところ、相同性が認められるタンパク質は見い出されなかった。また、このcDNAがコードしているタンパク質中にはC-X-K-C-X_n-Cという繰り返し配列が存在しており、さらに開始メチオニンに続くシグナル配列がないことから細胞質内に存在する構造タンパク質の一種ではないかと思われる。

以上の3種類のスクリーニング法によるPTTH受容体のクローニングを試みたが、最終的に目的の受容体cDNAを得ることはできなかった。今後PTTH受容体遺伝子のクローニングのためには、COS7細胞発現系を用いた別のスクリーニング法を試みるとともに、*Xenopus* oocytes発現クローニング法など全く別の方法を試みる必要があると思われる。

ところでカイコPTTHの化学構造は、構造解析機器や構造解析法の常に最先端の技術を駆使して行われた。ところが、受容体の分子生物学的手法を用いた解析法は、既に10年近くも以前に確立されていた方法であるにも関わらず、カイコなど大型昆虫を用いても前胸腺というPTTHの標的組織が小さかったために、その方法を利用することができなかったと考えられる。実際、本論文の研究のかなりの時間を、カイコの飼育と前胸腺摘出のための解剖の時間に裂いた。試行錯誤の上、発現クローニングを行う際に用いるcDNAプラスミドライブラリーをカイコわずか100匹分の前胸腺から構築することに成功したことは、今後前胸腺の時期特異的なcDNAライブラリーやアラタ体のような小さな器官のcDNAライブラリーを構築する際に、非常に有用な技術となると確信している。また、この方法は昆虫に限らず小さな器官のcDNAライブラリーを作製する場合でも利用可能であると考えられる。しかし、カイコPTTH受容体のクローニングは、5、6年前の分子生物

学の技術によようやく追いついたところである。

第二部の考察にも述べたように、実際に行ったカイコPTTH受容体のスクリーニング法は、PTTHの細胞内情報伝達経路をはじめとする細胞応答に関する知見があまりにも乏しいため、スクリーニング方法に工夫を施すことができなかった。得られたPTTH受容体に関する確実な知見としては、PTTHが前胸腺細胞に高い親和性があることだけであった。したがって、現時点ではPTTH受容体のクローニングのためには、たとえその方法が本実験に適していなくても動物細胞を用いた発現クローニング法を用いるのが正攻法であると考えられる。今後は、本論文で行った実験のさらなる検討を行ったうえで、カイコPTTH受容体が明らかにされることを期待する。また、それによって今後の脱皮、変態の分子レベルの機構が解明されることを期待する。

実験の部

カイコPTTHの精製

群馬県是蚕種協同組合より交尾後のカイコ雄成虫（品種、鐘和）を譲り受けた。-30℃にて保存したカイコの頭部を切断し-20℃で保存したものを抽出材料として用いた。1回の抽出には1128g（15万頭分）を用い、合計で180万頭分からカイコPTTHを抽出した。

アセトン粉末

282g（3.75万頭分）のカイコ頭部を冷アセトン（-20℃、2.2リットル）中でポリトンホモジナイザーにて粉碎し吸引濾過後沈殿物を回収した。この操作を4回行った（15万頭分）。

80%エタノール抽出

得られたアセトン粉末を80%エタノール（4℃、2.2リットル）中で粉碎し吸引濾過後の沈殿物を回収した。この操作を3回繰り返した。

2%食塩水抽出

得られた沈殿物に2%食塩水（4℃、3.3リットル）を加え氷上で時々攪拌しながら1時間放置した。これを4℃、3500rpmで20分間遠心分離しその上清を回収した。沈殿物に対しては、3リットルの2%食塩水を加え同様に遠心分離し上清を回収した。この操作を2回繰り返した。

熱処理

回収した上清を300mlのナスフラスコに分注し沸騰湯浴で10分

間加熱した。その後氷水上で急冷させた。これを遠心分離し沈殿物を除いた。

硫酸沈殿

回収した上清に1.7リットルに850gの硫酸アンモニウムを加え完全に溶解させた。4℃にて一晩静置した後、遠心分離で沈殿物を回収した。

アセトン沈殿

硫酸沈殿の沈殿物に800mlの水を加え完全に溶解させた後、430mlの冷アセトン(-20℃)を加え30分間氷上に静置させた。遠心分離で沈殿物を除き、上清に540mlの冷アセトンを加えた。同様に遠心分離で沈殿物を回収した。アセトンをドライヤーで除き、80mlの水に懸濁させ-20℃で保存した。(crude PTTHと呼ぶ)

Sephadex G-50 (55X80mm)

crude PTTH 2回分(30万頭分)に0.5Mトリス溶液を加え、pHを8.5に調整した。

溶出バッファー 0.2M AcONa (pH 7.0) / 2%ブタノール
20ml毎に分取し、着色した画分から30本(600ml)を活性区として回収した。

DEAE-Sepharose CL-6B (31X400mm)

Sephadex G-50の活性区をそのまま、0.05MAcONa (pH7.0) で平衡化したDEAE-Sepharose CL-6Bカラムに吸着させて同溶媒500ml、500mlの0.5MAcONa (pH5.2)、500mlの1MAcONaで溶出した。素通り区及び初期溶媒で溶出し

た画分を活性区とした。

CM-Sepharose CL-4B

上記の活性区を酢酸でpH 5.2に調整した後、水で4倍に希釈し0.05M AcONa (pH 5.2)で平衡化したカラムに吸着させた。同緩衝液を500ml溶出した後、0.05M AcONa/0.1M NaCl(500ml)で溶出し、さらに0.05M AcONa/0.1M NaCl(500ml)と0.05M AcONa/0.5M NaCl(500ml)のグラジエント溶出した。最後に0.05M AcONa/0.5M NaCl(500ml)で溶出した。1画分20mlで回収し、生物検定で活性区を判定した。流速はペリスタポンプで調節して20ml/hrで行った。

Octyl-Sepharose CL-6B

上記の活性区を4M酢酸アンモニウム溶液にし、カラムに吸着させた。0.2M酢酸アンモニウム水溶液を200ml流し、次いで0.2M (300ml)と4M酢酸アンモニウム (300ml)でグラジエント溶出を行った。4M酢酸アンモニウム200ml溶出させた。さらに4M酢酸アンモニウム (200ml)と40%アセトニトリル/4M酢酸アンモニウム (300ml)でグラジエント溶出を行った。最後に同溶媒 (200ml)で溶出した。1分画20mlで回収し、生物検定で活性区を判定した。流速はペリスタポンプで調節して吸着は20ml/hr、溶出は50ml/hrで行った。ここまでのオープンカラムによる精製は全て4℃の低温室にて行った。

Vydac C4 カートリッジ (10g)

上記の活性区をTFAで酸性にしてから水で4倍に希釈し担体に吸着させた。10%アセトニトリル/0.1%TFAで洗浄後50%アセトニ

トリル/0.1%TFAで溶出させた。この10%~50%アセトニトリル/0.1%TFA溶出区を回収し活性区とした。

HPLC-Develosil C。

分取用のHPLCで20%~50%アセトニトリル/0.1%TFAをリニアグラジエントにて80分間で溶出させた。流速は5ml、検出は225nmで行い、2分毎に分取した。

HPLC-VP 304

分取用のHPLCで20%~50%アセトニトリル/0.1%HFBAをリニアグラジエントにて60分間で溶出させた。流速は5ml、検出は225nmで行い、2分毎に分取した。

HPLC-SP-5PW

分析用のHPLCで0.02M~0.5M AcONa (pH 5.2)/10%アセトニトリルをリニアグラジエントにて50分間で溶出させた。流速は1ml、検出は280nmで行い、1分毎に分取した。

HPLC-VP 318

分析用のHPLCで20%~50%アセトニトリル/0.1%TFAをリニアグラジエントにて60分間で溶出させた。流速は1ml、検出は280nmで行い、ピーク毎に分取した。

上記の精製過程において、VydacC4カートリッジの精製までを除脳蛹を用いた生物検定を行い、その後は、抗カイコPTTH N末端ノクローナル抗体を用いたWestern blottingでPTTH画分を得た。

バキュロウイルスによるカイコPTTHの発現

バキュロウイルスのストック溶液を 10^8 p.f.u.になるような 50μ lを5齢0日目のカイコ幼虫に注射した。25℃で3~4日飼育した。感染後の幼虫の体液を回収し発現産物とした。

バキュロウイルス発現カイコPTTHの精製

アセトン沈殿、Vydac C4 カートリッジ (10 g) を上記の天然物カイコPTTHの精製に基づいて行った。

以下の精製はHPLCで行い、1) VP 304-TFA系、2) VP 304-HFBA系、3) SP-5PW、4) VP 318-TFA系の4段階の精製で単離した。各々、溶出の条件は天然物のカイコPTTHの精製と同様に行った。

BmNPV/PTTHのストックウィルスの作製

6×10^6 個の培養細胞BmN4にカイコPTTH発現用バキュロウイルスBmPTTHをM.O.I.=0.1となるように加え、8~9日培養する。1000rpm、5分間遠心分離し細胞を除き、上清をストックウィルスとして-80℃で保存した。

カイコPTTHのリジルエンドペプチダーゼによるペプチドマッピング

150μ gのカイコPTTHを 100μ lの6M尿素、0.5Mトリス・塩酸 (pH8.5) に溶かしDTT 1mgを加え45℃、45分間加熱し還元した。室温に戻してからヨード酢酸ナトリウム3mgを加え室温にて避光で20分間静置した。水で 500μ lに希釈してからリジルエンドペプチダーゼ 1μ g加え、37℃で一晩消化させた。

分析用HPLCで0~40%アセトニトリル/0.1%TFAを80分間のリニアグラジェントで溶出させた。流速は $1 \text{ml}/\text{min}$ で、220nm

で検出した。カラム温度は40℃で行った。

糖ペプチドからの糖鎖の遊離

糖鎖の付加しているフラグメントは上記の条件で45分から50分
の間に溶出されるのでその画分を回収し、凍結乾燥後0.1Mトリス
・塩酸 (pH8.6) にとかしPNGase F(2.5 munits)加え37℃一
晩消化させた。

糖鎖の単離

酵素消化し糖鎖を遊離させた反応液をBio-Gel P-2カラム (8i.d.X450mm) に添加した。水で溶出した。ポイド容よりわずかに遅れ溶出されるので、ポイド容より8ml分を糖鎖画分とし回収後凍結乾燥した。

糖鎖のピリジルアミノ化

凍結乾燥後の単離した糖鎖をカップリング剤50 μ l加え90℃15分
反応させた。さらに還元剤を3 μ l加え、90℃90分間反応させた。
室温に戻し0.2mlの水を加え反応を止めた。

カップリング剤:1gの2-アミノピリジンを分析用の塩酸(0.65ml)
に溶かし用いた。10倍の水で希釈しpHが6.8になる。-20℃で保
存した。

還元剤:20mgのNaBH₃CNを12 μ lの水に溶かし、軽く遠心をし
てその上清を用いた。

ピリジルアミノ化糖鎖の脱塩

Sephadex G-10 (10i.d.X450mm) にピリジルアミノ化した
反応液 (250 μ l) を添加し10mM炭酸アンモニウム溶出した。ポ

イド容付近に溶出するのでそこから5mlの画分を回収し凍結乾燥した。

ピリジルアミノ化糖鎖のHPLCを用いた構造解析（二次元糖鎖マップ法）

二次元糖鎖マップは、ODSカラムとアミド吸着カラムにて解析を行った。それぞれの溶出条件は下記の通りに行った。

ODSカラム (Senshu-Pak ODS-H 1251 4.6 i.d.x250mm)

A液 10mMリン酸クエン酸緩衝液 (pH3.8)

B液 A液に0.5%ブタノールを含んだもの。

リニアグラジェントでA液100%からB液50%、60分間で溶出した。

アミド吸着カラム (TSK-amid-80 4.6 i.d.x250mm)

A液 3%酢酸をトリエチルアミンにてpH7.2に調整した。

B液 100%アセトニトリル

A液:B液を35:65から50:50にリニアグラジェントで60分間で溶出させた。検出は、蛍光検出器を用い励起波長320nm放射波長400nmで行った。

二次元糖鎖マップのユニット数はPA化グルコースオリゴマー（生化学工業）を用いて決定した。

エキソグルコシダーゼ消化	緩衝液	pH
反応温度	ユニット数	
(1)マンノシダーゼ消化	20mMAcONa	4.5
25	10mu	
(2)フコシダーゼ消化	20mMAcONa	5.5

25	10mu		
(3)ガラクトシダーゼ消化	100mMリン酸-クエン酸	3.5	
37	10mu		
(4) <i>N</i> -アセチルヘキソサミニダーゼ消化			
	AcONa	5.5	
37	10mu		

エンドグリコシダーゼ消化

(1)PNGase F 消化	Tris・塩酸	8.6
37	0.1mu	
(2)Endo F ₂ 消化	AcONa	5.0
37	1.0u	

Man α 1-6Man β 1-4GNA β 1-4 (Fuc α 1-6) GNA-PA、およびMan α 1-3Man β 1-4GNA β 1-4 (Fuc α 1-6) GNA-PAの作製

生化学工業よりY-227、Y228を購入し*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ、マンノシダーゼ、ガラクトシダーゼ、*N*-アセチルヘキソサミニダーゼの4段階の酵素消化により逐次消化を行い作製した。

Time-of-flight-Mass Spectrometry (TOF-MS)分析機による質量測定

糖ペプチドフラグメントの質量分析の際は加速電圧を20kVで行いマトリックスはCCA(α -cyanocinnamic acid)を用いた。なおキャリブレーションにはアンジオテンシンIIとインスリンを用いた。

除脳蛹の作製

蛹化から1時間以内の蛹を1時間から2時間10℃に置いた後、水で10分から15分間麻酔をし、鋭利なピンセットで他の器官を傷つけたり取ったりしないよう心がけ脳だけを抜き取りロウで傷口を塞いだ。活性測定には、除脳後13日から15日後にアポリシスの起きていない除脳蛹を用いた。

除脳蛹アッセイ

除脳してから15日目の除脳蛹を除脳蛹を作製したときと同様麻酔をしてから、除脳蛹の第3体節に注射器で試料を体内に注入した。傷口はロウで塞いだ。試料は乾燥品を1検体10 μ l相当の0.1Mトリス塩酸緩衝液pH8.0に溶かして使用した。3日後に翅脈が蛹のクチクラ層から剥離すること（アポリシス）で活性を判定した。除脳蛹に試料を注射してからアポリシスを起こす日数に応じて、3・4・5・6日目にアポリシスが見られたものに4・3・2・1点を与えその平均点を活性の指標とした。本実験においては、1濃度に5匹を使った。なお、2点を与えるのに必要な量を1unitと定義した。

第2部

前胸腺の採集

カイコとしては、J122X115を用いた。カイコは25℃湿度60%で、明16時間暗8時間の条件で育てた。前胸腺は摘出直前に10分間程度水にカイコ幼虫を浸し麻酔させ、実体顕微鏡下で摘出した。摘出方法は、第二体節の背側から頭部に向けて真っ直ぐに切開し左手に持っているピンセットで皮膚を押さえ、右側のピンセットで前胸腺後方の付け根をはずしその部分を押さえ、さらに前胸腺が途中で切れないよう左手のピンセットを用いて頭部の方向に前胸腺を手繰り寄せ前胸腺を全長得た。摘出した前胸腺は、余分な水分を除いた後、ドライアイスを用いて急速凍結させた。結合実験及び架橋実験を行う場合はインセクトリンガー液あるいはグレース培地に浸した。mRNAを抽出する場合は、抽出する直前まで-80℃で前胸腺を融解させないように保存した。

ヨード化PTTHの作製

大腸菌発現産物のカイコPTTH10 μ gを10mMホウ酸、0.1% Tween20 (pH8.2)の緩衝溶液10 μ lに溶かした。上記の緩衝溶液中のPTTHを10 μ g、Iodogen (Pierce) の入っているチューブに移し懸濁させ、さらに放射性ヨード化ナトリウムを加え、氷上で10分間反応させた。反応後、100 μ lの1%TFA水溶液を加えて反応を停止させた。上記の反応液が酸性であることを確認後、直接逆相のHPLCに供した。得られたヨード化PTTHは適宜分注し、-20℃で保存した。

逆相HPLC

HPLCは日本分光のガリバーを用いた。カラムはPegasil-ODS (4.6i.dX150mm)を用いた。アセトニトリル濃度20%から50%までのリニアグラジェントで溶出させた。220nmで検出した。

cDNAプラスミドライブラリーの構築

mRNA抽出

200 μ lの変性液 (4M グアニジンイソチオシアネート、1mM メルカプトエタノール、100mM トリス (pH8.0)、10mM EDTA) を凍結していた前胸腺のチューブに加え、22ゲージのシリンジに数回通した。0.1% DEPC (ジエチルピロカーボネート) で処理した水 (以下D/Wと略す) で5倍に希釈した後、25ゲージ、27ゲージと同様の操作を行った。液をシリンジで通すとき力が必要なくなるまで根気よく行った。30 μ lの5M NaCl溶液を加えさらに27ゲージのシリンジで数回通した。この溶液に200 μ lのoligo dTラテックス (宝酒造) を加え、65°C 10分間インキュベート後、3分間氷上に静置し、RNAを変性させた。その後、37°Cで、10分間インキュベートした。その後、室温にて16000rpmで遠心した。沈澱を200 μ lのwashing buffer (1M NaCl、10mM トリス (pH8.0)、5mM EDTA、0.1% SDS) で洗浄し、遠心してラテックス粒子を沈澱にした。さらに、この操作を2回繰り返した。沈澱のラテックス粒子を100 μ lのTEに懸濁し、65°C 10分間インキュベートし遠心後上清をmRNA溶液とした。この操作をもう一度行い、合わせて200 μ lのmRNA溶液にした。この溶液に200 μ lのElution buffer (TE緩衝液) と、200 μ lのoligo dTラテックスを加え上記の流れの操作を行い (Washing bufferの操作は1回に省略した)、最終的に得られたmRNA溶液に10 μ lのグリコーゲン溶液 (10 μ g)

と20 μ lの3M酢酸ナトリウム溶液と600 μ lのエタノールを加え、 -80°C にて15分間静置した。その後、16000rpmで遠心分離し上清を捨て、沈澱を70%エタノールで洗浄した。洗浄後上清を除き、風乾させた。その直後にDNAに逆転写させない場合は -80°C にてエタノールが入っている状態で保存した。

逆転写酵素による一本鎖DNAの合成

上記の通り調製したmRNA (0.5 μ g) を10 μ lのD/Wに溶かし、 65°C で10分間インキュベートした後、氷で急冷し変性させた。そのmRNA溶液に氷冷した2 μ lの0.1M DTTと2 μ lの10mM dNTPと4 μ lのX5buffer (酵素に添付の) と1 μ lのプライマー (ランダムヘキサマー、ファルマシア、0.074 μ g) を加えた。室温で10分間プライマーとmRNAをアニールさせた後、Superscript II (GIBCO) を1 μ l加えた。 37°C で30分間反応させ、さらに酵素を0.5 μ l加えて 45°C で1時間反応させた。

二本鎖DNAの合成

上記の反応後、その反応液に101 μ lのD/W、13 μ lのX10 DNA polymerase I buffer、2 μ lの10mM dNTP、5.5 μ lの0.1M DTTを加え、氷上に5分間静置した。この混液に0.5 μ lのRNase Hと8 μ lの*E. coli* DNA polymerase I (TAKARA) を加え 16°C で2.5時間インキュベートした。反応後150 μ lのフェノールクロロホルム溶液を加えvortexし、室温で16000rpm遠心した。上清を別のチューブに移し、14 μ lの3M酢酸ナトリウム溶液と400 μ のエタノールを加え、 -80°C で15分間静置した。その後20分間16000rpmで遠心し、上清を捨てた。この沈澱に70%エタノールを加えて、15分間遠心し上清を完全に捨てた。

二本鎖DNAの平滑末端化

上記のDNAの沈澱に、10 μ lのX10 T4DNA polymerase I buffer、10 μ lの1%BSA溶液、78 μ lの水を加え、氷上で5分間静置した。そこに2 μ lのT4 DNA polymerase I(TAKARA)を加え37℃で10分間反応した。反応後100 μ lのフェノールクロロホルム溶液を加えvortexし、室温で16000rpm遠心した。上清を別のチューブに移し、7 μ lの3M 酢酸ナトリウム溶液と226 μ lのエタノールを加え、-80℃で15分間静置した。その後20分間16000rpmで遠心し、上清を捨てた。この沈澱に70%エタノールを加えて、15分間遠心し上清を完全に捨てた。

*Bst*XIアダプターライゲーション

上記の二本鎖DNAを12 μ lのTE溶液に溶かし、そのうち4 μ lを次の反応に用いた残りは-20℃にて保存した。4 μ lの二本鎖DNA溶液に4 μ lのX5 ligation buffer、2 μ lの*Bst*XIアダプター (2 μ g, Invitrogen)、9 μ lの水を加え、氷上に5分間静置した。その後、1 μ lのT4 DNA ligase (high concentration, GIBCO)を加え8℃で4時間から一晩反応させた。反応後、65℃で20分間インキュベートし、酵素を失活させた。

アガロース電気泳動及びDEAE paperを用いたcDNAのサイズ分画

上記の反応液にX10 loading bufferを4 μ l加えて、0.9%アガロースゲルの電気泳動に供した。120mAで2時間泳動後、一緒に泳動したマーカースをもとに、1kbp以下に相当する部分を切り落とした。次に、10kbp付近にDEAE paper (Wattman, 3WW)を挟み、

電気泳動を120mAで2時間逆流させた。DNAの吸着したDEAE paperを取り出し、DEAE paperをそこに穴の空いた0.5mlのチューブに入れ、DEAE paper上に100 μ lのTE溶液を加え、遠心分離により洗浄した。この洗浄の操作を4回行った。その後、50 μ lのSTE溶液を加え5分間静置した。遠心してこの溶出液を回収した。この溶出の操作を2回行った。2回の溶出液(100 μ l)に、100 μ lのフェノールクロロホルム溶液を加えvortexし、室温で16000rpm遠心し上層を別のチューブに移した。この操作を2回行った。この操作で短いcDNAと過剰のアダプターは除けているはずであるが、完全にするために上層のDNA溶液をスピncラム(CHROMA SPIN 400、CLONETECH)に供した。1900rpmで5分間遠心しDNA溶液を溶出した。

ベクターライゲーション

上記の溶出液に*Bst*XI消化したベクター(pME18S、pcDNA1/Amp)を1 μ l(0.5 μ g)とtRNAを1 μ l(10 μ g)と10 μ lの3M酢酸ナトリウム溶液と250 μ lのエタノールを加え、80 $^{\circ}$ Cで15分間静置した。その後20分間16000rpmで遠心し、上清を捨てた。この沈澱に70%エタノールを加えて、15分間遠心し上清を完全に捨てた。この沈澱物を50 μ lのligation bufferに溶かし、1 μ lの100mM ATP溶液を加え、氷上で5分間静置した。その後、T4 DNA ligaseを1 μ l加え14 $^{\circ}$ Cで8時間から一晩反応した。反応後、65 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベートし、酵素を失活させた。

エレktロポレーション法を用いた大腸菌への形質転換

上記の反応液に100 μ lのフェノールクロロホルム溶液を加えvortexし、室温で16000rpm遠心し上層を別のチューブに移した。

この溶出液に10 μ lの3M 酢酸ナトリウム溶液と250 μ lのエタノールを加え、-80℃で15分間静置した。その後20分間16000rpmで遠心し、上清を捨てた。この沈澱に70%エタノールを加えて、15分間遠心し上清を完全に捨て風乾させた。この沈澱物を3 μ lの水に溶かし、1 μ lずつ分注した。このDNA溶液に25 μ lのコンピテントセル (DH10B)を加え、0.2cm gapのキュベットに移した。2.5kV、200 Ω の条件で、エレクトロポレーションした (gene pulsor, Bio-Rad)。通電直後に37℃に温めておいたSOC培地を加え、その後37℃で1時間インキュベートした。

cDNAライブラリーの評価

形質転換後の大腸菌 (3ml) から50 μ lを450 μ lのLB培地に加え、以降10倍ずつ希釈した。この希釈液を5つ (10⁶希釈まで) 作り、アンピシリンを含むLB寒天培地に50 μ lずつ植菌し、37℃で一晩培養した。コロニーの数を数えライブラリーの評価をした。また、得られたコロニーのうちでランダムに10コロニーのプラスミドを抽出し、そのインサートを調べた。

プラスミドの抽出法

アルカリSDS法を用いて行った。

COS7細胞の培養

COS7細胞は、DMEM (10%のウシ胎児血清 (FBS), GIBCO) を加え、抗生物質としてゲンタマイシンを50 μ g/mlとなるように加えたもので培養した。培養条件は、37℃、5%CO₂気下で培養した。コンフルエントにならないよう、細胞は2~3日ごとに継代した。

COS7細胞へのトランスフェクション

(1) DEAEデキストラン法によるトランスフェクション (6 well プレーツの場合)

2日後に50%コンフルエツとなるように、細胞を植えた。50%コンフルエツの細胞を無血清のDMEMで3回洗浄し、0.6mlのDEAEデキストラン液を細胞に上層した。DEAEデキストラン液には10 μ lのプラスミド (1 μ g) 溶液を加えてある。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で4から8時間培養後、DEAEデキストラン液を除き10%グリセロール/DMEMを静かに上層し、室温で2分間静置した。無血清のDMEMで2回洗浄し、4mlの血清、ゲンタマイシン入りのDMEMで37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で3日間培養した。培養後、種々のスクリーニングを行った。

(2) エレクトロポレーション法によるトランスフェクション

対数増殖期の細胞をトリプシン消化によりバラバラにして、900rpmの遠心により、細胞を沈殿させた。細胞をK-PBSで2回洗浄後、10⁶細胞/mlとなるようにCOS7細胞をK-PBSに懸濁した。細胞懸濁液190 μ lと、プラスミド10 μ lを混合し、0.4cm gapのキュベットに移し、氷上にて10分間静置した後エレクトロポレーションした。通電後10分間室温で静置し、培養用のDMEMを加え、プレートに移し37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で3日間培養した。培養後、種々のスクリーニングを行った。

(3) プロトプラストフュージョン法によるトランスフェクション
1日目・・・cDNAライブラリーを含むグリセロールストックの大腸菌をアンピシリンを含む培地 (100ml) に植菌した。OD₆₀₀の値が0.5になるまで37 $^{\circ}$ Cで培養した後、500 μ lのクロラムフェニコール溶液を加え、37 $^{\circ}$ Cでさらに10~15時間培養した。また翌日80%

コンフルエントとなるように6cmのプレート6枚にCOS7細胞を植えた。

2日目・・・大腸菌を5000rpmで遠沈させ上清の培地を完全に除き、10mlの20%スクロース、50mM Tris (pH8.0) に懸濁した。懸濁液に1mlのリゾチーム溶液を加え氷上にて5分間静置した。0.25M EDTA溶液を2ml加えさらに5分間氷上にて静置した。2mlの50mM Tris (pH8.0) を加え37℃で5分間インキュベートした。氷上に戻し20mlの10%スクロース、10mM MgCl₂を含むDMEMを穏やかに加えた(プロトプラスト溶液)。COS7の培地を除き、上述で得られたプロトプラスト溶液を1プレートに5mlずつ加えた。スイング式の遠心器の上にプレートを乗せ、室温で2000rpm10分間遠心した。緩く細胞上にプロトプラストが着いている状態を保つように上清を静かに除き、50%PEG1450/DMEM溶液を上層した。2分後に、PEG溶液を除き無血清のDMEMで2回洗浄した。細胞の培地を血清とゲンタマイシンを含む培地に変え、37℃、5%CO₂で5時間培養した。細胞の培地を4mlの血清、ゲンタマイシン入りのDMEMを交換し、37℃、5%CO₂で3日間培養した。培養後、種々のスクリーニングを行った。

ヨード化PTTHの結合によるスクリーニング

マスタープレートの作製

cDNAライブラリーを含む大腸菌のグリセロールストックを150クローン/wellとなるようにアンピシリンと7%DMSO入りの培地で希釈し、大腸菌を96wellのプレートに植えた。このプレートを20枚用意し、37℃で一晩培養した。

結合実験によるスクリーニング

6 wellのプレートでトランスフェクトした細胞を100 μ g BSA/ml PBSで1回洗浄し、ヨード化PTTHを入れたBSA入りPBSを0.7ml上層し、4℃で2時間静置した。BSA入りのPBSで3回洗浄後、37℃に温めておいたトリプシン溶液1mlを加え細胞をプレートから剥離させた。PBSをさらに1ml加え、細胞を回収し、放射活性を測定した。

パニング法を用いたスクリーニング

ビオチン化PTTHの作製

大腸菌発現産物のカイコPTTH10 μ gを10mM bicarbonate、0.1% Tween20 (pH8.2)の緩衝液10 μ lに溶かした。上記の緩衝溶液中のPTTHを10 μ gに、EZ-link-biotin (Pierce)を加え、氷上で10分間反応させた。反応後、100 μ lの1% TFA水溶液を加えて反応を停止させた。上記の反応液が酸性であることを確認後、直接逆相のHPLCに供した。得られたビオチン化PTTHは4℃で保存した。

抗ビオチン抗体をコートしたプレートの作製

ポリスチレン製の細胞用でないプレートに10mM Tris (pH9.5)で抗体を10 μ g/mlに調製した抗体溶液を1プレートにつき3ml入れた。室温で2時間後、抗体溶液を除き、0.15M NaCl溶液を1プレートにつき3mlで2回洗浄した。5%血清を含むPBSを1プレートにつき3ml入れ、室温で2時間静置した。溶液を除きしよ直前まで-20℃にて保存した。

パニング法

トランスフェクトしたCOS7細胞を100 μ g/mlのBSAの入った

PBSで1回洗浄し、5mMEDTAを含むPBSを上層し室温で数分間静置し、細胞をプレートから剥離した。900rpmの遠心により細胞を沈殿させ上清を除き、100 μ gビオチン化PTTH/mIBSA入りPBSを1mlで懸濁させ、氷上で2時間静置した。化学架橋剤BS³を10 μ g加えてさらに氷上で30分間静置した。過剰の架橋剤の反応を20 μ lの1M Tris溶液で止め、BSA入りのPBSで3回洗浄後、細胞を回収した。BSA入りのPBSで細胞を懸濁した後上記の通り作製した抗ビオチン抗体をコートしたプレートに上層し、室温で2時間静置した。1プレートには3mlのBSA入りのPBSで懸濁した約10⁶個の細胞が入るようにした。この時点で細胞の付着を観察できる。付着した細胞をBSA入りのPBSで3回洗浄し、0.4mlのHirt溶液(1% SDS, 10mM トリス, 5mM NaCl)をプレートに入れ数分間静置後、付着した細胞を溶解した。溶解液を回収し1.5mlのチューブに移し、0.1mlの5M NaCl溶液を加え、5時間から一晩氷上に静置した。15分間16000rpmで遠心し、上清に1 μ lのtRNAと500 μ lのフェノールクロロホルム溶液を加えvortexし、室温で16000rpm遠心した。上清を別のチューブに移し、1mlのエタノールを加え、-80 $^{\circ}$ Cで15分間静置した。その後20分間16000rpmで遠心し、上清を捨てた。この沈殿に70%エタノールを加えて、15分間遠心し上清を完全に捨て風乾した。沈殿のDNAを2 μ lの水に溶かし、50 μ lのコンピテントセルDH10Bと混合しエレクトロポレーション法により、大腸菌に回収したプラスミドを形質転換した。形質転換された評価のために用いた大腸菌以外は200mlのアンピシリンを含むLB培地に植菌し、37 $^{\circ}$ Cで10から15時間培養した。培養した大腸菌の一部はグリセロールを10%となるように加え、-80 $^{\circ}$ Cで保存し、残りは、プラスミドを抽出した。形質転換の評価が10⁴以上になるようにパニングの操作を繰り返し、この大腸菌あるいはプラスミド

を用いてCOS7細胞にトランスフェクトした。

参考文献

- 1 Kopeć, S. Studies on the necessity of the brain for the inception of insect metamorphosis. *Biol.Bull.*1922. 42. p323
- 2 Butenandt, A. and Kalson, P. (1965) *Z.Naturforsch.*, 8B, 389.
- 3 Hoppe, W. and Huber, R. Insektenverpuppungshormons Ecdyson mit der automatisierten Falmolrkulmethode. *Chem.Ber.* 1965.98. p2403
- 4 Roller, H., Dahm, K.H., Sweely, C.C. and Trost, B.M. Structure of the juvenile hormone. *Angew.Chem, Intern.ed.* 1967, 6. p179
- 5 Kobayashi, M. and Kirimura, J. The brain hormone in the silkworm, *Bombyx mori*. *Nature.* 1958. 181. p1217
- 6 Kirimura, J., Saito, M. and Kobayashi, M. Steroid hormone in an insect, *Bombyx mori*. *Nature.* 1962. 195. p729
- 7 Kobayashi, M. and Yamazaki, M. The proteinic brain hormone in an insect, *Bombyx mori*. *L.Appl.Ent.Zooll.* 1966. 1. p53
- 8 Yamazaki, M. and Kobayashi, M. Purification of the proteinic brain hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *J.Insect Physiol.* 1969. 15. p1981
- 9 Ichikawa, M. and Ishizaki, H. Brain hormone in the silkworm, *Bombyx mori*. *Nature.* 1961. 198. p933
- 10 Ichikawa, M. and Ishizaki, H. Proteinic nature in the brain hormone of insects. *Nature.* 1963. 198. p308
- 11 Ishizaki, H. and Ichikawa, M. Purification of the brain hormone in insects. *Biol.Bull.* 1969. 133. p355
- 12 Williams, C. The present status of the brain hormone. in *Insect and Physiology* (ed. by Beament, J.W.L. and Treherne, J.E. Edinberg: Oliver and

Boyd.) 1967. p133

13 Hiroshi Kataoka, Hiromichi Nagasawa, Akira Isogai, Saburo Tamura, Akira Mizoguchi, Yuko Fujiwara, Chise Suzuki, Hironori Ishizaki and Akinori Suzuki. Isolation and partial characterization of a prothoracicotropic hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Agric.Biol.Chem.* 1987. 51. p1067

14 Hiroshi Kataoka, Hiromichi Nagasawa, Akira Isogai, Hironori Ishizaki and Akinori Suzuki. Prothoracicotropic hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: amino acid sequence and simeric structure. *Agric.Biol.Chem.* 1991. 55. p73

15 Atsushi Kawakami, Hiroshi Kataoka, Tadanori Oka, Akira Mizoguchi, Mina Kimura-Kawasaki, Tadashi Adachi, Masahumi Iwai, Hiromichi Nagasawa and Akinori Suzuki. Molecular cloning of the *Bombyx mori* prothoracicotropic hormone. *Science* 1990. 247. p1333

16 Jun Ishibashi, Hiroshi Kataoka, Akira Isogai, Hironao Saegusa, Yoshimasa Yagi, Akira Mizoguti, Hironori Ishizaki and Akinori Suzuki. Assignment of disulfide bond location in prothoracicotropic hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: ahomodimeric peptide. *Biochemistry.* 1994. 33. p5912.

17 Michael P. Schlunegger and Markus G. Gruter. *Nature.* 1992. 358. p430.

18 安達 卓, 鈴木昭憲, 石崎宏矩, エリサン *Samia cynthia ricini* 前胸腺刺激ホルモン (PITH) 遺伝子の構造と発現, 第25回日本発生物学会講演要旨集, 1992, p 128

19 河野 強, 私信

20 塩野谷基子 東京大学農学生命科学研究科修士論文 1997

21 松林秀貴, Lynn M. Liddiford. 私信

- 22 Noriko Takahashi. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 1977. 76. p1194
- 23 Hase S., Hara S. and Matushina M. *Jour. Biochem.* 1979. 85. p217.
- 24 Noboru Tomiya, Junichi Awaya, Masayasu Kurono, Satoshi Endo, Yoji Arata and Noriko Takahashi. *Annal. Biochem.* 1988. 171. p73.
- 25 S.Yamamoto, S. Koyama, H. Takemoto, S. Hara, Y. Kyougoku and T. Ikenaka. *Jour. Biochem.* 1986. 1. p100.
- 26 Akira Mizoguchi, Tadanori Oka, Hiroshi Kataoka, Hiromichi Nagasawa, Akinori Suzuki and Hironori Ishizaki. Immunohistochemical localization of prothoracico-tropic hormone-producing neurosecretary cells in the brain of *Bombyx mori*. *Devel. Growth & Differ.* 1990. 32. p591.
- 27 溝口 明 私信
- 28 G.C.Hayes, D.P.Muehleisen, W.E. Bollenbacher and R.D.Watson. Stimulation of ecdysteroidogenesis by small prothoracicotropic hormone: role of calcium. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1995. 115. p105.
- 29 Rybczynski, R. and Gilbert L.I. Changes in general and specific protein synthesis that accompanly ecdysteroid synthesis in stimulated prothoracic glands of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 1994. 24. p175.
- 30 Song, Q., and Gilbert, L.I. Calmodulin and casein kinase II in the brain and prothoracic glands of *Manduca sexta*. in "*Insect Neurochemistry and Neurophysiology-1993*." p149.
- 31 Song, Q., and Gilbert, L.I. S6 phosphorylation results from prothoracicotropic hormone stimulation of insect prothoracic glands: a role for S6 kinase. *Devel. Genetics.* 1994. 15. p332.
- 32 Robert Rybczynski and Lawrence I. Gilbert. Prothoracicotropic hormone-regulated expression of hsp 70 cognate protein in insect prothoracic gland. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1995. 115. p73

33 M. A. O'Brien, E. J. Katahira, M. K. Thomas, Larry W. Arnold, Geoffrey Houghton and W. E. Bollenbacher. *Jour. Neurosci.* 1988. 8. p3247.

34 W. E. Bollenbacher, E. J. Katahira, M. A. O'Brien, L. I. Gilbert, M. K. Thomas, N. Agui and A. H. Baumhofer, Insect prothoracicotropic hormone: evidence for two molecular forms. *Science.* 1984. 224. p1243.

35 高宮正也 私信

36 Miyajima A, Schreurs J, Otsu K, Kondo A, Arai K, Maeda S. Use of the silkworm, *Bombyx mori*, and an insect baculovirus vector for high-level expression and secretion of biologically active mouse interleukin-3. *Gene.* 1987. 58. p273-281.

37 丹生谷博, 前田進, バキュロウィルスベクター. 組織培養. 1988. 14. p112.

38 Kornfeld, R. and Kornfeld, S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 1985. 54. p631.

39 Kelley W. Moremen, Robert B. Trimble and Annette Herscovics. Glycosidase of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway. *Glycobiology.* 1994. 4. p113.

40 神保 充 私信

41 Rikiro Fukunaga, Etsuko Ishizaki-Ikeda, Yoshiyuki Seto and Shigekazu Nagata. Expression cloning of a receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor. *Cell.* 1990. 61. p341.

42 Samuel Davis, Thomas H. Aldrich, David M. Valenzuela, Vivien Wong, Mark E. Furth, Stephen P. Squinto and George D. Yancopoulos. The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science.* 1991. 253. p59.

43 Honda Z, Nakamura M, Miki I, Minami M, Watanabe T, Seyama Y,

Okado H, Toh H, Ito K, Miyamoto T. Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. *Nature* 1991. 349. p342.

44 D'Andre, A. D., Lodish, H. F. and Sambrook, J. Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell*. 1989. 57. p277.

45 Hara T, Miyajima A. Two distinct functional high affinity receptors for mouse interleukin-3 (IL-3). *EMBO J* 1992 .11.p1875.

46 Kitamura T, Sato N, Arai K, Miyajima A. Expression cloning of the human IL-3 receptor cDNA reveals a shared beta subunit for the human IL-3 and GM-CSF receptors.. *Cell* 1991 .66. p1165.

47 Jeff reagan. Expression cloning of an insect diuretic hormone receptor. *Jour. Biol. Chem.* 1994. 269. p9.

48 Chomezynsky, P., and Sacchi, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987. 162. p156.

49 Maniatis.T. Molecular cloningg Sambrook second edition. Laboratory Manual. Cold Spring Harbor. ed.

50 Kobori, M. and Nojima, H. *Nuc. Acids. Res.* 1993. 21. p2782.

51 B. Seed and A. Arffo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987. 84. p8573. A. Arffo and B. Seed. *EMBO Jour.* 1987. 6. p3313.

52 Gearing, D. P. et. al. *EMBO Jour.* 1989. 8. p336

53 *ガイマニユアルシリーズ* .4. 遺伝子クローニング実験法 横山 崇編集

54 Reagan, J. D., Li, J. P., Carney, R. N., and Kramer, S. J. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 1993. 23. p135.

55 スカルラトス. G. デドス 私信

56 Takeshi Ishihara, Shun Nakamura, Yoshito Kaziro, Takayuki Takahashi, Kenji Takahashi and Shigekazu Nagata. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the secretin receptor. *The EMBO Journal*. 1991. 7. p1635.

57 John Wiley & Sons. *Current protocols in molecular biology*; 5.8.6-5.8.13. 1987

58 Yanagi Y, Yoshikai Y, Leggett K, Clark SP, Aleksander I, Mak TW A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. *Nature* 1984. 308. p145

59 T. Yokomizo, T. Izumi, K. Chang, Y. Takuwa and T. Shimizu A G-protein coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature*. 1997. 387. p620.

60 Michael J. Caterina, Mark A. Schumacher, Makoto Tominaga, Tobias A. Rosen, Jon D. Levine and David Julius. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997. 389. p816.

謝辞

本研究を行うに当たり、東京大学農学生命科学研究科生物有機化学研究室鈴木昭憲教授、長澤寛道教授、作田庄平助教、同分子生命工学研究室片岡宏誌助教には、直接ご指導を賜り、心より感謝いたします。また、同生物有機化学研究室内の中山二郎助手にも感謝いたします。

第1部の糖鎖構造決定には、三重大学工学部生物工学研究室小林淳助手には、カイコPTTH発現バキュロウィルスの構築を手掛けていただき、そのウィルスを頂きました。心より感謝いたします。本研究に用いたカイコの卵、幼虫は東京農工大学普後一教授、スカラトス・G・デドス氏、理化学研究所松本正吾博士に提供していただきました。心より感謝いたします。また、糖鎖構造解析法の技術的な指導をしていただきました奈良先端科学技術大学院大学磯貝彰教授、明治製薬医薬品開発部の大山真氏に感謝いたします。バキュロウィルスに関し興味深い情報を提供していただいたカルフォルニア大学デービス校前田進準教授に感謝いたします。TOF-MSの微量解析に関する技術面の情報を提供していただいた日本ブルカー社 菲沢崇氏には大変お世話になり感謝いたします。

第2部のcDNAライブラリーの構築からスクリーニング法は東京大学分子細胞研究所人工細胞・細胞合成研究室の原助教、田中稔博士、東京大学農学生命科学研究科分子生命工学研究室依田幸司教授、野田陽一助手、橋本仁志氏に御教示頂きました。感謝いたします。PTTH受容体の解析は住友化学の井口晴久氏に協力を頂き感謝致します。また、本論文で用いましたカイコPTTHの大腸菌発現産物は分子生命工学研究室内の松林秀貴氏に協力していただき感謝いたします。

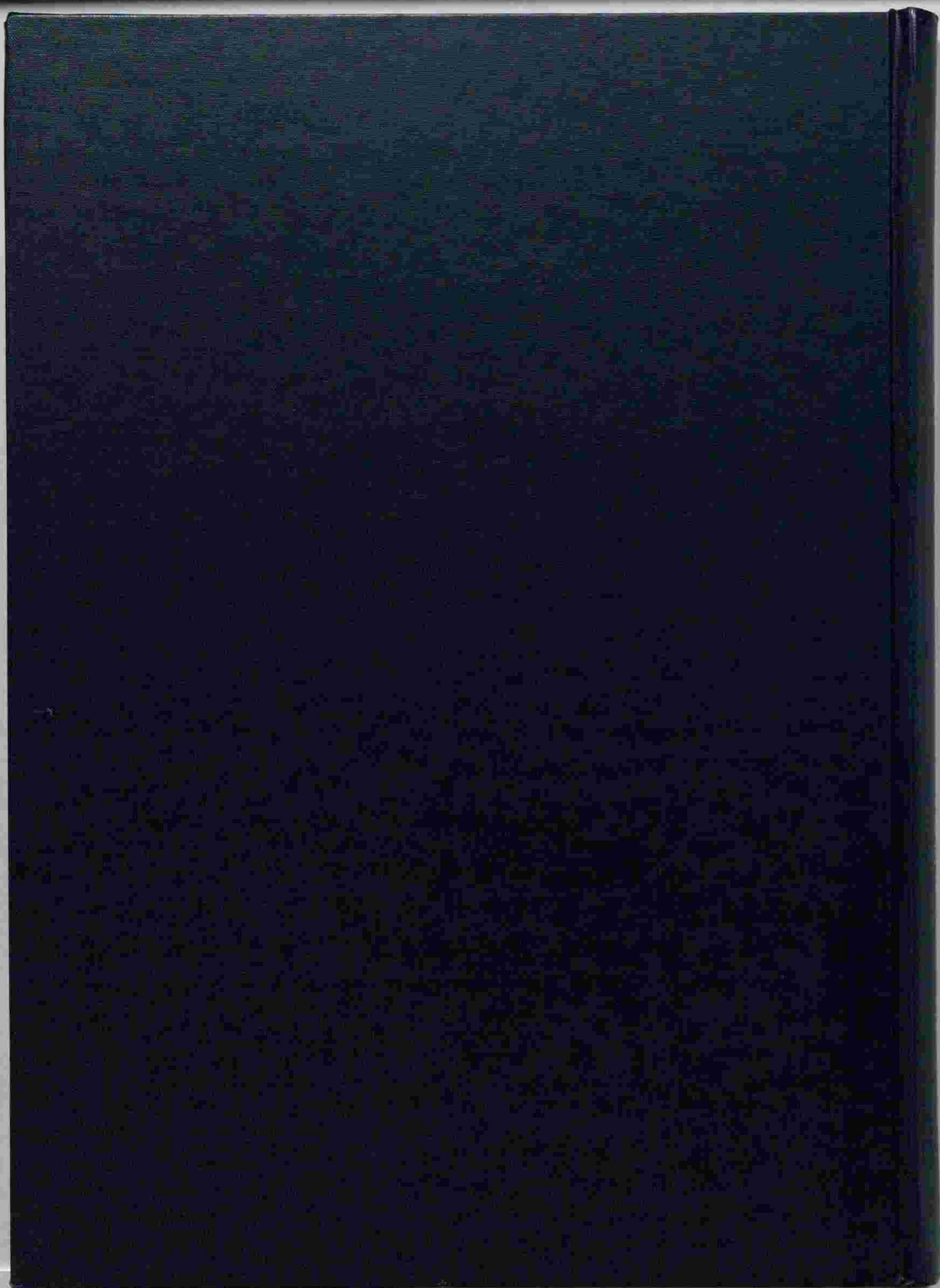
本論文全般に渡り、実験の理解としてだけでなく様々なアイデアを提供していただきました奈良先端科学技術大学院大学柴博史助手には心より感謝いたします。

本実験を行うにあたって最も大変で、神経、体力を要するカイコの飼育を快く協力を頂いた分子生命工学研究室の高宮正也氏には心より感謝いたします。特に最後の1年間はほとんど彼が飼育した最高級のカイコから前胸腺を摘出いたしました。また、エクジソンのラジオイムノアッセイも行ってもらいました。さらに、本実験を通して特に第二部においては、筆者の過酷な実験に対し良く理解をし、技術的精神的サポートをしていただきました。改めて感謝したいと思います。

最後になりましたが、本研究が行われた東京大学農学生命科学研究科生物有機化学研究室のOBの方々をはじめ、在学生の皆様にも心より感謝いたします。また、同分子生命工学研究室の皆様にも感謝の意を表します。また、日本の昆虫ホルモンの研究をされている諸先生方をはじめ、日々研究をされている方々には励ましの言葉を常々頂き感謝いたします。

東京大学、大学院在学中の自分に起こった様々な出来事や自分をとりまく環境に感謝するとともに、将来の自分の研究生命の基礎となり発展するよう精進致したいと思います。

この場をお借りして、今まで私の心の支えとなった故永田洋一氏、不規則な研究生活の理解はなかったが、私の研究姿勢の良き理解者であり、今までの生活を支援して下さった永田純子氏の両親には心より感謝致します





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

C Y M

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

© Kodak, 2007 TM, Kodak