

センチクバエ変態時における不要
自己組織の選択的排除機構の解析

—蛹体液細胞に特異的に出現する 200 kDa
蛋白に対する脂肪体側の結合因子の精製—

小林 秀 昭

①

博士論文

センチニクバエ変態時における不要

自己組織の選択的排除機構の解析

— 蛹体液細胞に特異的に出現する 200 kDa

蛋白に対する脂肪体側の結合因子の精製 —

東京大学大学院薬学系研究科

生命薬学専攻

小林 秀昭

目次

略語	
序章	1
第1節 形態形成を自己・非自己の識別で理解する	2
第2節 本研究について	3
図	5
第1章 200 kDa 蛋白に対する脂肪体側の結合因子の検索	7
第1節 結合の検出について	8
第2節 結合部位の検出	8
第3節 変態における結合量の変化	9
第4節 まとめと考察	10
図	11
第2章 結合因子精製のためのアッセイ系の構築	14
第1節 アッセイ系について	15
第2節 dot blot 法の構築	15
第3節 まとめと考察	16
図	17
第3章 結合因子の精製	20
第1節 精製の出発材料について	21
第2節 結合活性の膜画分への回収	21
第3節 結合活性の可溶化	21
第4節 精製	22
第5節 まとめと考察	23
図表	25
第4章 結合因子と 200 kDa 蛋白の結合について	31
第1節 結合因子と 200 kDa 蛋白の結合について	32
第2節 結合因子と 200 kDa 蛋白の結合の特異性	32
第3節 結合に与える各種の要因	32

第4節	まとめと考察	34
図		35
第5章	結合因子の局在	40
第1節	局在の解析	41
第2節	抗体の調製	41
第3節	変態過程における脂肪体上の結合因子の変動	42
第4節	3令幼虫における組織特異性	42
第5節	まとめと考察	42
図		44
第6章	200 kDa 蛋白について	46
第1節	構造解析について	47
第2節	NaBH ₄ 処理	47
第3節	PAS 染色	48
第4節	まとめと考察	48
図		49
総括		51
第1節	本研究で明らかにしたこと	52
第2節	今後の展望	53
図		55
材料と方法		56
REFERENCES		70
謝辞		72

略語

BIS	Buffered Insect Saline
BPB	Bromophenol Blue
BSA	Bovine Serum Albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
FCS	Foetal Calf Serum
IgG	Immunoglobulin G
kDa	Kilo Dalton
mAb	monoclonal antibody
MeOH	Methanol
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sol.	solution
TCA	Trichloroacetic Acid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane

第1節 形態形成を自己・非自己の識別で理解する

人間を始めとした複数の細胞・組織で構成される高等生物は、1個の受精卵から形態形成が始まり、複雑な完成された個体へと成長します。この形態形成過程において個体は外界から自分に必要な栄養等を取り込み自分を作り上げていくのと同時に、自分に害を与えるような異物は積極的に排除していくという、自己・非自己の識別が行われています。人間などの脊椎動物で見いだされている異物排除に働く免疫応答はこの自己・非自己の識別と捉えることが出来ます。しかし非自己である異物には雑多なものがあり、それらを統一的に理解することは出来ません。

そこで自己と非自己を識別する機構を明らかにするには自己に注目し、自己とは何か、という問いかけにまず答えることが重要であると思われます。これにより自己と非自己の識別という生物学的に重要な問題に解決の糸口が与えられると思われます。

形態形成過程ではこのような自己・非自己の識別の他に、自分を構成する組織に注目したとき、新たに必要となった組織の構築が行われる一方、不要になってしまった組織が排除されるということが起こっています(Lockshin, 1985)。この不要組織の排除という現象は自己組織が非自己化するという視点で捉えることが出来ます。形態形成のある過程をこの自己組織の非自己化と捉える視点は形態形成の理解に新たな視点を提供すると思われます。この視点に立つと自己というものの理解は、自己組織がどうやって非自己化するのかという側面を捉えれば自ずと明らかになってくるものと思われます。非自己化する前後でその組織を構成する大半の分子は同じはずですから、分子レベルで解析するには両者の違いを見いだすことにより、比較的容易に解答が引き出されてくるものと思われます。

この不要組織の排除という現象が顕著に見られるのが、完全変態昆虫の蛹の時期です(Bodenstein, 1950; Dean *et al.*, 1985; Sehna, 1985)。そこでこの蛹をモデル系として自己組織の非自己化の機構を明らかにし、自己とは何かという問いかけに答えていくことが出来ると思われます。

第2節 本研究について

そこで本研究では、形態形成を理解するために、この、自己とは何か、という問いかけに答えようと、この蛹のモデル系の分子レベルの解析を行いました。

まず用いたモデル系について説明します。

図1 A.には実験に用いたセンチクバエの変態の様子を示します。このように完全変態昆虫は、幼虫から蛹の時期を経て、成虫になります。この蛹の中では、新たに成虫組織の構築が進行すると同時に、その一方では不要になった幼虫組織の崩壊が起きます。B.には幼虫の主要な組織である脂肪体を示しています。脂肪体は脊椎動物の肝臓と腎臓に相当する組織で、幼虫の時にはこのように1つ1つの細胞が基底膜におおわれ数珠のようにつながって組織を構成しています。ところがひとたび蛹になると、脂肪体は1つ1つの細胞レベルにまでバラバラに崩壊します。ここで丸い玉のように見えるものが脂肪体を構成する細胞です。この蛹の時期に起こる、幼虫の主要な組織である脂肪体の崩壊という現象は、幼虫の時に自己であったものが変態に伴い非自己と化したと捉えることが出来ます。

この脂肪体の崩壊に関して、これまで私たちの研究室で得られた知見について図2で説明します。幼虫の時には基底膜におおわれ数珠のようにつながっていた脂肪体は、変態に伴い、基底膜が壊れ、1つ1つの細胞レベルにまで崩壊します。まずこの脂肪体の崩壊が蛹の体液細胞により引き起こされることが示されました(Kurata *et al.*, 1989)。この体液細胞は脊椎動物の白血球に相当する細胞です。ところが、この際崩壊を引き起こすのは蛹の体液細胞だけで、同じ体液細胞でも幼虫の体液細胞にはこのような活性はありませんでした。このことは、幼虫の時には脂肪体を自己組織として認識し、共存していた体液細胞が、変態に伴い、脂肪体を不要になった自己組織、即ち非自己、として認識し、攻撃するように変化することを示しています。体液細胞の何が変化したのか解析したところ、分子量 200 kDa の蛋白が細胞膜表面上に新たに出現してくることが明らかになりました(Kurata *et al.*, 1989)。そして、このように細胞表面に200 kDa 蛋白を持つようになった体液細胞は、分子量 29 kDa のシステインプロテアーゼを放出し、組織崩壊を引

き起こすことが示されています(Kurata *et al.*, 1990; Kurata *et al.*, 1992a; Kurata *et al.*, 1992b)。

そこで私は蛹の時期に起こる脂肪体の非自己化の機構を明らかにするために、この 200 kDa 蛋白に着目し、修士課程においてこの 200 kDa 蛋白の解析を行いました(Kobayashi *et al.*, 1990)。詳細は省略しますが、200 kDa 蛋白を精製するために、まずこの蛋白に対する特異的なモノクローナル抗体を調製しました(Kurata *et al.*, 1990)。抗体のスクリーニングは蛹体液細胞 200 kDa と反応し、幼虫の体液細胞とは反応しないことを指標にウエスタンブロットィング法により行いました。そして得られたモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロットィング法を精製の指標として用い、この 200 kDa 蛋白を精製しました。精製は蛹体液細胞をホモジナイズし、100,000 × g 超遠心により膜画分を調製しました。そして 1 M NaCl 存在下に可溶化し、100,000 × g 超遠心を行い可溶化膜画分を得ました。得られた可溶化膜画分を ゲル濾過 HW-65 により分画し精製標品を得ました。更にこのようにして得られた 200 kDa 蛋白が蛹体液細胞による脂肪体の崩壊を阻害することを見いだしました。以上のことからこの蛋白が蛹体液細胞による脂肪体の認識に関与していることを示唆しました。

以上の修士課程で得られた知見から、脂肪体上には 200 kDa 蛋白と結合する部位が存在することが予想されました。この結合部位は幼虫の時には自己として認識され(あるいは全く無視され)、変態に伴い非自己として認識されるようになる分子です。この 200 kDa 蛋白に対する結合部位を同定することは、自己組織がいかんして不要になった組織として、即ち非自己として認識されるようになるのか、という分子メカニズムを明らかにするために極めて重要です。そこで博士課程において本研究は、その 200 kDa 蛋白に対する結合部位を同定することを主要な目的として設定しました。以下の章で論じます。

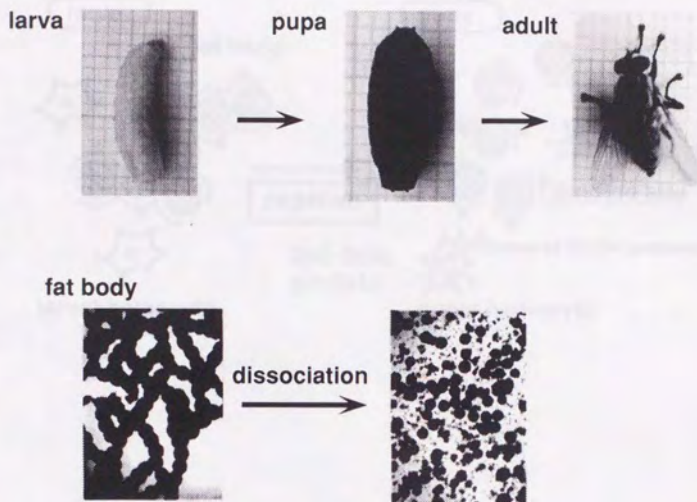


図1 センチクバエ(*Sarcophaga peregrina*)の変態

A. 完全変態昆虫であるセンチクバエは幼虫(larva)から蛹(pupa)を経て、成虫(adult)になります。

B. 幼虫の主要な組織である脂肪体(fat body)の変態における形態変化を示します。幼虫の時には数珠のように組織を構成している細胞が、変態に伴い1つ1つの細胞(丸い玉のように見えるもの)にまでバラバラに崩壊します。

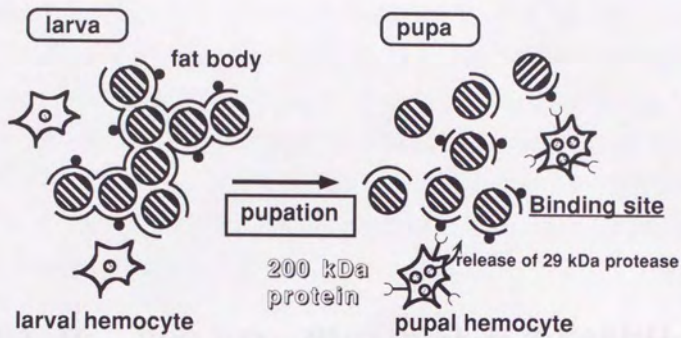


図2 変態過程における脂肪体崩壊の模式図

変態に伴い、新たに200 kDa 蛋白を細胞膜表面上に発現した蛹の体液細胞(pupal hemocyte)が脂肪体(fat body)を攻撃するようになります。体液細胞からは29 kDa protease が放出され、脂肪体は崩壊します。200 kDa 蛋白の認識先として、脂肪体側にその結合部位が考えられました。

第1章 200 kDa 蛋白質に対する脂肪体側の結合因子の検索

「本書で取り扱った分子生物学の基礎知識を踏まえて、読者各位へ最新の基礎知識を伝えること」を目的として、200 kDa 蛋白質、脂肪体側結合因子の検索に関する研究の経緯について述べている。また、200 kDa 蛋白質の検索に関する研究の経緯について述べている。また、200 kDa 蛋白質の検索に関する研究の経緯について述べている。

第1章 200 kDa 蛋白質に対する脂肪体側の結合因子の検索

「本書で取り扱った分子生物学の基礎知識を踏まえて、読者各位へ最新の基礎知識を伝えること」を目的として、200 kDa 蛋白質、脂肪体側結合因子の検索に関する研究の経緯について述べている。また、200 kDa 蛋白質の検索に関する研究の経緯について述べている。また、200 kDa 蛋白質の検索に関する研究の経緯について述べている。

「本書で取り扱った分子生物学の基礎知識を踏まえて、読者各位へ最新の基礎知識を伝えること」を目的として、200 kDa 蛋白質、脂肪体側結合因子の検索に関する研究の経緯について述べている。また、200 kDa 蛋白質の検索に関する研究の経緯について述べている。また、200 kDa 蛋白質の検索に関する研究の経緯について述べている。

第1節 結合の検出について

序章でも述べましたように、私は修士過程において、変態に伴い蛹体液細胞膜表面上に新たに出現してくる 200 kDa 蛋白が、脂肪体崩壊過程における蛹体液細胞による脂肪体の認識に関与していることを示唆しました(Kobayashi *et al.*, 1991)。この 200 kDa 蛋白に対する脂肪体上の相手側は自己組織の非自己化に関わる重要な分子と考えられます。従って 200 kDa 蛋白の認識する相手側(結合部位)を同定することは極めて重要です。そこでまず精製した 200 kDa 蛋白が脂肪体に結合するか検討しました。

第2節 結合部位の検出

方法について述べます。図3に示しますように、まず幼虫から脂肪体を摘出し、これに対し 25℃ で 200 kDa 蛋白を反応させました。その後、細胞表面に結合した 200 kDa 蛋白に対して、放射標識した抗 200 kDa 蛋白モノクローナル抗体 (^{125}I -抗 200 kDa 蛋白モノクローナル抗体) を 4℃ で反応させ、結合した ^{125}I -抗 200 kDa 蛋白モノクローナル抗体の量をガンマカウンターを用いて測定しました。モノクローナル抗体との反応が 4℃ でするので、検出される結合は脂肪体表面に対してのものと考えられます。直接 200 kDa 蛋白を標識し、結合した 200 kDa 蛋白を検出しない理由は、何種類か放射標識の方法を検討しましたが、うまく標識されなかったからです。

以上の方法により得られた結果を図4に示します。横軸には脂肪体に反応させた 200 kDa 蛋白の濃度を示し、縦軸には結合した抗体の量を示します。結合した ^{125}I -抗 200 kDa 蛋白モノクローナル抗体を実線で示し、 ^{125}I -コントロール抗体を点線で示します。コントロールの抗体はモノクローナル抗体と同じサブクラスのものを用いています。200 kDa 蛋白の結合はこれらの差になります。ここに示しますように 200 kDa 蛋白は用量依存的に脂肪体に結合することが分かりました。そしてほぼ 15 $\mu\text{g/ml}$ で飽和に達することが分かりました(Kobayashi *et al.*, 1991)。

以上の結果から、200 kDa 蛋白に対する特異的な結合部位が脂肪体表面に存在することが分かりました。また、用いた脂肪体は幼虫から摘出したものですから、この特異的な結合部位は幼虫の時からすでに脂肪体上に存在していることが分かりました。

第3節 変態における結合量の変化

次に結合因子の精製の出発材料を検討するために、変態に伴いその 200 kDa 蛋白の脂肪体に対する結合量がどのように変化するのか検討しました。これは *in vitro* での蛹体液細胞による脂肪体の崩壊で、幼虫の脂肪体の方が変態初期の脂肪体に比べ崩壊はするものの、その崩壊に時間がかかるという結果があるからです。このことは脂肪体側にも何らかの変化が生じていることを示唆しています。この変化が脂肪体側の結合因子の量的変動に関係している可能性が考えられました。

その結果を図5に示します。ステージは幼虫、変態直後の蛹（白蛹、囲蛹殻形成期）、変態後6時間目の3点をとっています。黒棒で200 kDa 蛋白を反応させたときの¹²⁵I-抗200 kDa 蛋白モノクローナル抗体の結合量を示し、網がけの棒で200 kDa 蛋白を反応させなかったときの¹²⁵I-抗200 kDa 蛋白モノクローナル抗体の結合量を示します。両者の差が外から加えた200 kDa 蛋白の結合量と考えられます。ここに示しますように変態初期のどのステージでも200 kDa 蛋白の結合はあまり変動なく見られることが分かりました。更に、200 kDa 蛋白を反応させなかったときのバックグラウンドが上昇することが分かりました。これは脂肪体に対し、200 kDa 蛋白を発現している蛹の体液細胞が結合しつつあることを示唆していると思われま。精製することを考えた場合、間接的に特異的なモノクローナル抗体を用いて200 kDa 蛋白の結合量を検出しているため、200 kDa 蛋白の混入は問題となります。そこで精製の出発材料は幼虫から摘出した脂肪体を用いることにしました。

第4節 まとめと考察

以上に示しましたように、200 kDa 蛋白質は幼虫の脂肪体に結合することが分かりました。そして200 kDa 蛋白質に対するこの結合部位が脂肪体表面に存在していることを示唆しました。

この結合部位を蛹体液細胞膜表面上の200 kDa 蛋白質が認識し、非自己として脂肪体を攻撃するようになるのではないのでしょうか。この仮説を検証するためにこの結合部位を精製し、その実体を明らかにする必要があります。

この実験系は生きた脂肪体に対する結合を見ているため、精製のアッセイ系にすることは出来ません。そこで次に精製を行うためにアッセイ系の構築を行うことにしました。

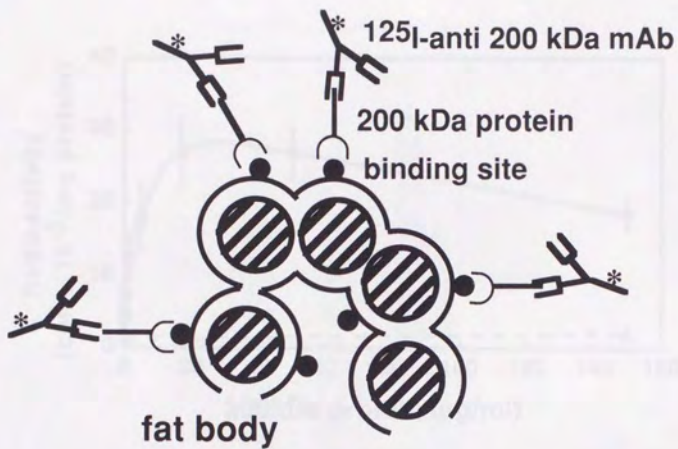


図3 結合因子の検出法

脂肪体に 200 kDa 蛋白を反応させ、結合した 200 kDa 蛋白を、放射標識した抗 200 kDa 蛋白モノクローナル抗体（以下では ^{125}I -anti 200 kDa mAb と略します）を用いて検出しました。

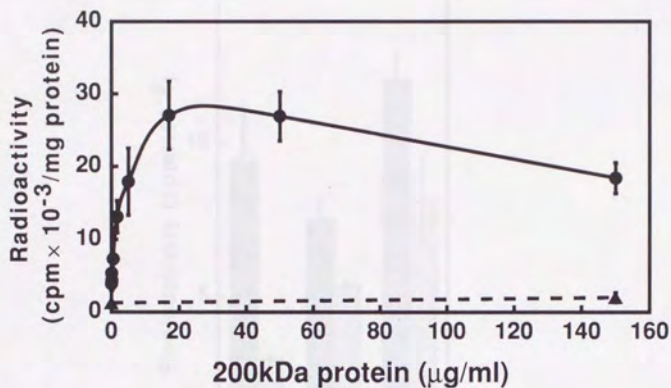


図4 脂肪体に対する200 kDa 蛋白の結合

横軸には脂肪体に反応させた200 kDa 蛋白の濃度を示します。縦軸には結合した200 kDa 蛋白を検出するために反応させた、抗体の結合量を示します。実線で200 kDa 蛋白を検出するために用いた ^{125}I -anti 200 kDa mAb を示し、点線でコントロールとして用いた ^{125}I -control IgG を示します。両者の差が200 kDa 蛋白の結合量を示します。

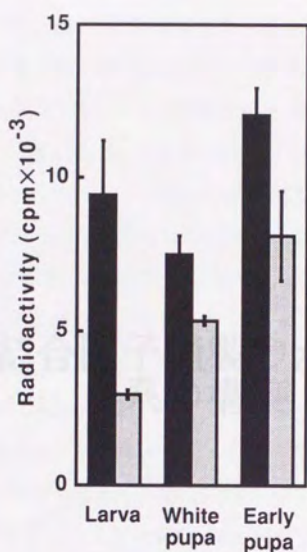


図5 変態における 200 kDa 蛋白の脂肪体に対する結合量の変動
 larva は幼虫から抽出した脂肪体、white pupa は変態直後の蛹から抽出した脂肪体、early pupa は変態後 6 時間目の初期の蛹から抽出した脂肪体をそれぞれ示します。縦軸には結合した ^{125}I -anti 200 kDa mAb の量を示します。黒棒で 200 kDa 蛋白を反応させたもの、網がけの棒で 200 kDa 蛋白を反応させなかったものを示します。両者の差が外から加えた 200 kDa 蛋白の結合量を示します。

第1節 アッセイ系について

アッセイ系としては dot blot 法を採用することにしました。アッセイ系の満たすべき条件としては、第1章で検出したものと同様な結合を反映していること、結合活性の定量化が出来ること、そして簡便であることの3つが必要です。

同様な結合を検出しているかについては、検出系が全く異なれば実際のところ分かりません。このためになるだけ同じものを検出出来るようにアッセイ系を構築する必要があります。そのためになるだけ蛋白を変性させない条件で結合を検出することと、200 kDa 蛋白との反応時に同じような条件で反応させることの2点を考慮する必要があります。

これらを満たす定量化のアッセイ系としては dot blot 法の他に、ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 法、リボソームへ蛋白を組み込みそれとの結合を見る系というものが考えられました。いずれの方法も目的の蛋白に対し、標識した蛋白等を反応させて検出するという点では同じです。しかし、目的の蛋白を固定化する方法がそれぞれ異なります。即ち、dot blot 法ではニトロセルロース膜に吸着させますし、ELISA 法ではプレートに吸着させます。また、リボソームへの組み込み系では、リボソームに組み込みます。固定化する方法が異なれば、固定される効率や蛋白の変性の度合いが異なってきます。まず、dot blot 法で検討したところ、結合活性が問題なく検出されたことから、dot blot 法を採用することにしました。

第2節 dot blot 法の構築

dot blot の方法について説明します(図6)。まずニトロセルロース膜に脂肪体ホモジネート等のサンプルを吸着させます。次にこれに対し 200 kDa 蛋白を反応させます。そして結合した 200 kDa 蛋白に対し¹²⁵I-抗 200 kDa 蛋白モノクローナル抗体を反応させ、結合した抗 200 kDa 蛋白モノクローナル抗体をガンマカウンターを用いて測定するという方法です。この方法により間接的に 200 kDa 蛋白の検

出が出来ます。

この系においても 200 kDa 蛋白が用量依存的に脂肪体ホモジネートに対し結合することを図 7 に示します。横軸には用いた 200 kDa 蛋白の濃度を示し、縦軸には結合した¹²⁵I-抗 200 kDa 蛋白モノクローナル抗体の結合量を示しますが、これは結合した 200 kDa 蛋白の量を意味しています。脂肪体ホモジネートに対する 200 kDa 蛋白の結合を実線で示し、コントロールの BSA への結合を点線で示します。両者の差が 200 kDa 蛋白の特異的な結合量を表しています。ここに示しますように 200 kDa 蛋白は用量依存的に脂肪体ホモジネートに対して結合し、ほぼ 20 μ g/ml で飽和に達することが分かりました。以上のことから、この系でも結合活性の検出が可能なが分かりました。

次に結合活性を定量的に検出出来るかどうか検討しました。図 8 にその結果を示します。今度は横軸に脂肪体ホモジネートの量をとっています。縦軸は 200 kDa 蛋白の結合量を表しています。実線で示しますように結合因子を含む脂肪体ホモジネートは用量依存的に 200 kDa 蛋白を結合し、30 μ g で飽和に達することが分かりました。更に点線で示します結合活性を含まない BSA では用量を増やしても 200 kDa 蛋白が結合しないことが分かりました。

以上の結果から脂肪体の用量依存的に 200 kDa 蛋白の結合が検出出来ることが分かりましたので、結合が飽和するまでの範囲内で検量線として用いることにより、定量的に 200 kDa 蛋白の結合活性が検出出来ることが分かりました。従って精製のアッセイ系として採用出来ると判断しました。

第 3 節 まとめと考察

この dot blot 法でも第 1 章で検出されたような 200 kDa 蛋白結合活性が脂肪体ホモジネートに対して検出されることが分かりました。更に、この方法で結合活性の定量化が出来ることが分かりました。以上のことからこの方法をアッセイの指標として用いることにより結合因子の精製が出来ると判断しました。そこでこの系を用いて 200 kDa 蛋白結合因子の精製を行うことにしました。

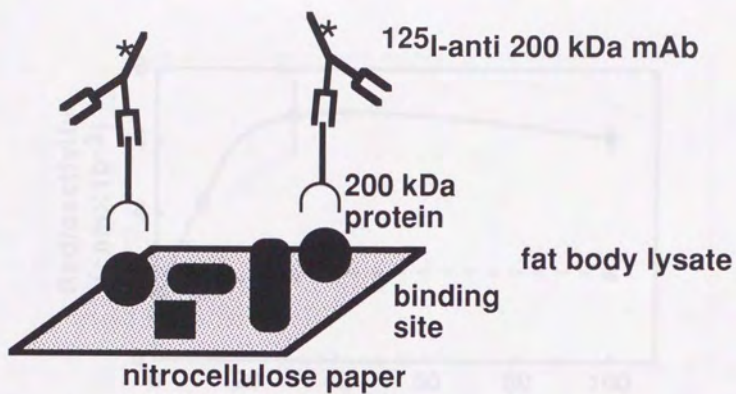


図6 dot blot法

方法はまず、ニトロセルロース膜にサンプルを吸着させ、これに対し 200 kDa 蛋白を反応させます。結合した 200 kDa 蛋白を放射標識した抗 200 kDa 蛋白モノクローナル抗体 (^{125}I -anti 200 kDa mAb)により検出しました。

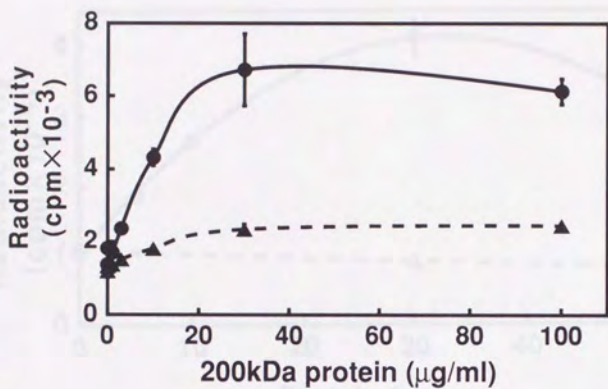


図7 dot blot 法を用いた 200 kDa 蛋白結合活性の検出

横軸には反応させた 200 kDa 蛋白の濃度を示します。縦軸には結合した ^{125}I -anti 200 kDa mAb の量を示しますが、これは結合した 200 kDa 蛋白の量を意味しています。実線で脂肪体ホモジネートに対する 200 kDa 蛋白の結合を示し、点線でコントロールの BSA に対する結合を示します。両者の差が 200 kDa 蛋白の特異的な結合量を示します。

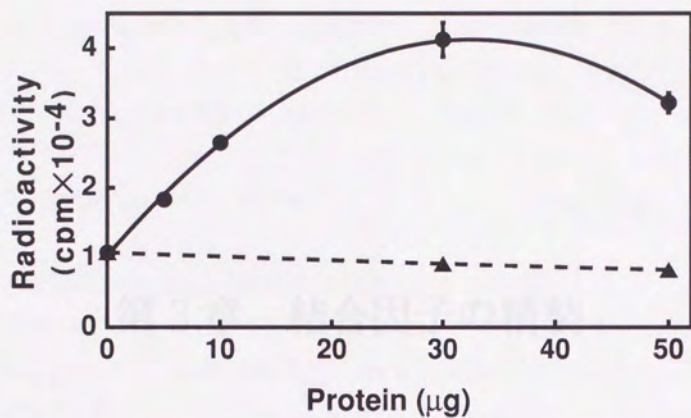


図8 dot blot法を用いた結合因子の定量

横軸にはニトロセルロース膜に吸着させた脂肪体ホモジネートの量(実線)、あるいはコントロールのBSAの量(点線)を示します。縦軸には結合した ^{125}I -anti 200 kDa mAbの量を示しますが、これは結合した200 kDa蛋白の量を意味しています。

第1節 精製の出発材料について

以下では結合因子の精製について述べます。精製の出発材料は 800 匹の幼虫から抽出した脂肪体を用いました。脂肪体の抽出は 1 匹ずつ顕微鏡下で解剖することにより行いました。このため一度に処理出来る量は限られましたので、少しずつ -80℃ に蓄えて量の確保を行いました。

第2節 結合活性の膜画分への回収

まず結合活性が脂肪体非可溶性画分に回収されることについて述べます。方法は脂肪体ホモジネートを $100,000 \times g$ の超遠心により分画を行いました。図 9 にその結果を示します。縦軸には特異的な 200 kDa 蛋白の結合を示します。カラム 1 に脂肪体ホモジネートに対する 200 kDa 蛋白の結合量を示し、カラム 2 に非可溶性画分に対する結合量、カラム 3 に可溶性画分に対する結合量をそれぞれ示します。ここに示しますように結合活性は非可溶性画分に主に回収されることが分かりました。このことはこの系で検出している結合因子が膜蛋白であることを示唆しています。これは第 1 章で検出された結合活性が細胞表面にあると示唆された結果と一致しますので、同じものを検出しているという重要な根拠になると思われます。そこで次に非可溶性画分（膜画分）からの可溶化法を検討しました。

第3節 結合活性の可溶化

9 種類の可溶化剤 (Sodium Deoxycholate(NaDOC), Triton X-100(TX-100), Nonidet P-40(NP-40), Sodium Dodecyl Sulfate(SDS), NaCl, KCl, Guanidine/HCl, Urea, Ammonium sulfate) を検討したところ、可溶化には guanidine/HCl が最も有効であることが分かりました。そこで可溶化に用いる guanidine/HCl の濃度の検討を行いました。各濃度で 5 時間、4℃ で可溶化を行い $100,000 \times g$ の超遠心により 1 回目抽出可溶化膜画分を得ました。次に一晩、4℃ で可溶化を行い $100,000 \times g$ の超遠心によ

り2回目抽出可溶化膜画分と抽出残渣を得ました。

図10にその結果を示します。横軸には可溶化に用いた guanidine/HCl の濃度を示し、縦軸には可溶化前の非可溶性画分（膜画分）に対する 200 kDa 蛋白の結合量を 100 % としたときの活性の回収率を示します。ここに示しますように、主要な結合活性は 1 M 以上の guanidine/HCl により1回目の抽出操作で主に回収されることが分かりました。この時の回収率は 200 % でした。回収率が 100 % を越えたのは、非可溶性画分では膜がリポソームを形成したりして、結合活性が十分に露出していなかったからと思われます。また非可溶性画分の再抽出（2回目抽出可溶化膜画分）では結合活性は殆ど可溶化されることが分かりました。従って可溶化については 1.5 M guanidine/HCl を用いて1回の抽出操作で膜画分から可溶化を行うことにしました。以下ではこの方法で得られた可溶化膜画分を精製に用いました。

第4節 精製

精製についてのまとめを表1に示します。精製はまず可溶化膜画分に対して 0.5 M NaCl 存在下ゲル濾過 HW-65 を行い、活性画分を得ました。次に 100,000 × g で超遠心を行い、ゲル濾過の過程で不溶化した蛋白を除去しました。この条件で主要な結合活性は上清中に残存しました。この得られた上清に対し、6 M urea 存在下に透析を行い脱塩しました。その後、DEAE-TOYOPEARL 陰イオン交換クロマトグラフィーを pH 7.9 の条件で行いました。この条件では結合活性は主要な蛋白の挙動とは異なり、非吸着画分に回収されました。次に得られた非吸着画分を pH 6.8 のバッファーで希釈し Heparin-TOYOPEARL カラムを行いました。以上の精製法により比活性は可溶化膜画分から 2000 倍上昇し、その時の回収率は 13 % でした。なお活性は、可溶化膜画分 0.1 μ l に対する 200 kDa 蛋白の結合量を 1 unit とした相対量として定義しました。結合活性の定量化に用いた検量線の一例を図11に示します。このような検量線をアッセイ毎に同時に作成し活性の定量化を行いました。

図12に最終ステップである Heparin-TOYOPEARL カラムの溶出の挙動を示します。活性の溶出パターンをA.に示し、その時の電気泳動のパターンをB.に示します。A.では●で活性の溶出パターンを示し、○で各フラクションの塩濃度を示します。カラムにサンプルを0 M NaCl で吸着させた後、NaCl のグラジエントで溶出しました。その結果、活性は fr.12 から溶出しはじめ、その時の塩濃度はほぼ160 mM でした。各フラクションについて電気泳動を行ったところ、220 kDa と230 kDa の2本のバンドがこの結合活性の挙動とほぼ一致することが分かりました。従って、この220 kDa と230 kDa の蛋白が結合因子の実体であると考えられました。また、これらの分子については電気泳動上で主要な成分にまで精製されていることが分かりました。

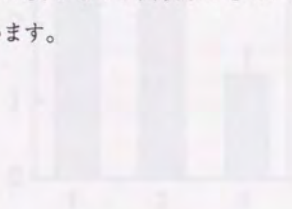
これら2つの蛋白が結合活性の実体であるかどうかを更に検討しました。別の原理のカラムクロマトグラフィーであるゲル濾過 HW-75 を用いて確認した結果を図13に示します。A.に活性の溶出パターンを示し、B.にはその電気泳動のパターンを示します。なおこのクロマトグラフィーを行うにあたって、活性の安定化のためにアプライサンプルにはBSAを添加しています。その結果、このカラムにおいても再び電気泳動上の220,230 kDa のバンドの挙動と fr.12,13 を中心とした結合活性の溶出はほぼ一致することが分かりました。従ってこれら分子が結合因子の実体であることが確認されました。また、220,230 kDa 蛋白の電気泳動上のバンドの強度からこれらの分子は1対1で結合していると考えられます。このゲル濾過においてこの結合因子は分子量2,000 kDa のBlue Dextran より高分子側に溶出されましたので、分子量は2,000 kDa 以上であることが分かりました。従って結合因子は数分子が会合して存在していることが考えられます。

第5節 まとめと考察

以上の方法により結合因子が精製されることが分かりました。そしてその分子量は220,230 kDa の高分子蛋白質であることが分かりました。Native な状態でのこの結合因子の存在は、ゲル濾過の結果から、それらの分子が数分子ずつ1対1で

会合して分子量 2,000 kDa 以上の巨大分子を形成していることが示唆されました。しかしながら巨大分子形成については、ここで精製したものが膜蛋白であると思われしますので、慎重に判断する必要があると思います。精製の途中で分子間の -S-S- 結合を生成したという可能性があります。しかし、少なくとも 6 M urea 存在下にゲル濾過を行いましたので単なる凝集ではないと思われれます。

またここで精製してきたものが dot blot 法で最初に検出していた活性を主に担う実体であるかについては、精製の途中段階で回収率の低いステップがある (HW-65、Heparin-TOYOPEARL) ことから分からないと思います。しかし各ステップでは、回収された活性の主要なものを回収してきていることから恐らく問題ないのではないかと考えています。



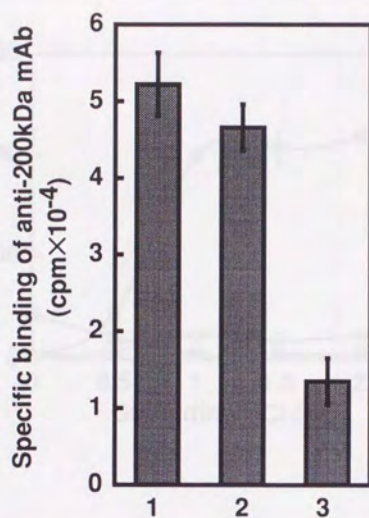


図9 脂肪体ホモジネートの超遠心分画

脂肪体ホモジネートを $100,000 \times g$ の超遠心により非可溶性画分と可溶性画分に分画し、結合因子の回収を検討しました。縦軸には特異的な 200 kDa 蛋白の結合量を示します。カラム 1 に脂肪体ホモジネート、カラム 2 に非可溶性画分、カラム 3 に可溶性画分をそれぞれ示します。

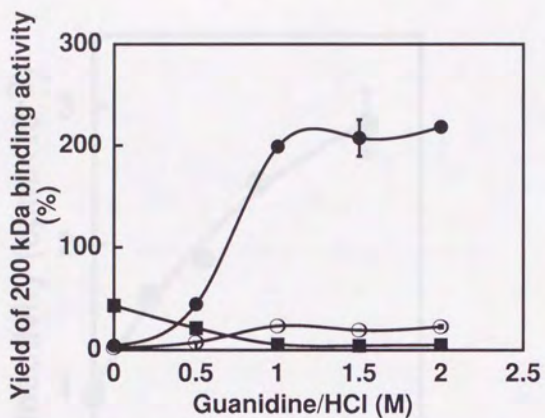


図10 結合因子の guanidine/HCl による脂肪体非可溶性画分 (膜画分) からの可溶化脂肪体膜画分を guanidine/HCl により可溶化しました。その時の guanidine/HCl の濃度を横軸に示し、縦軸には脂肪体膜画分での 200 kDa 蛋白結合活性を 100 % とした時の活性の回収率を示します。●で1回目抽出可溶化膜画分、○で2回目抽出可溶化膜画分、■で抽出残渣をそれぞれ示します。

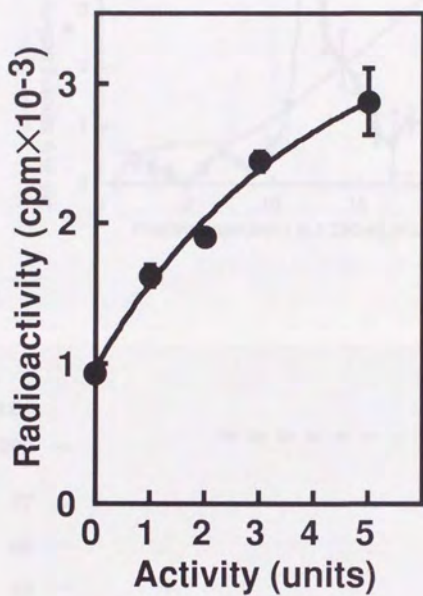


図 1 1 結合活性の定量化に用いた検量線の例

可溶性膜画分 $0.1 \mu\text{l}$ に対する 200 kDa 蛋白の結合量を 1 unit と定義しました。横軸には可溶性膜画分の用量を示し、縦軸には結合した ^{125}I -anti 200 kDa mAb の量を示しますが、これは結合した 200 kDa 蛋白の量を意味しています。毎回このような検量線を作成することにより定量化しました。

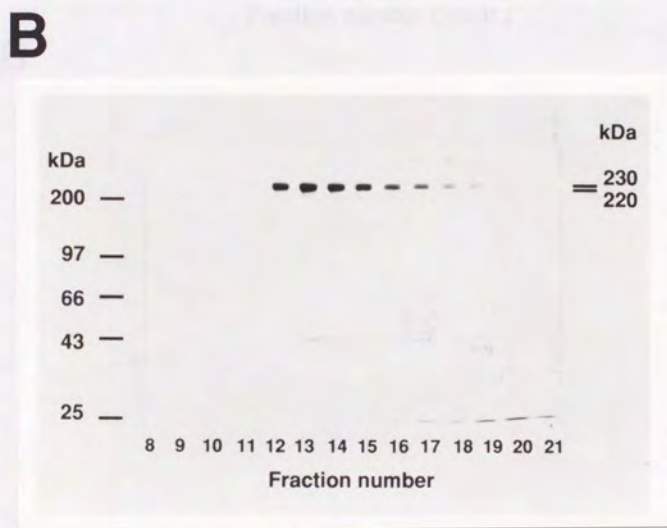
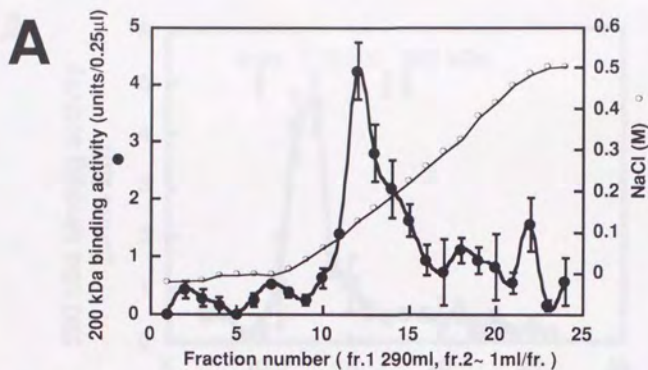


図12 Heparin-TOYOPEARL カラムの溶出

DEAE-TOYOPEARL 非吸着画分を希釈後、Heparin-TOYOPEARL カラムにアプライし、NaCl のグラジエントにより活性を溶出させました。

A. 結合活性の溶出の挙動

横軸にフラクション番号を示し、縦軸には●で結合活性、○で NaCl 濃度をそれぞれ示します。

B. 蛋白の溶出の挙動

結合活性溶出付近の電気泳動のパターンを示します。分離ゲルは 10% のものを用いました。

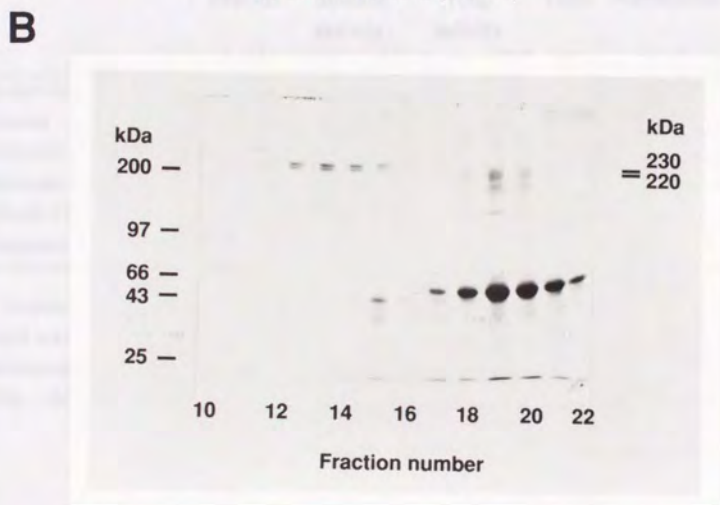
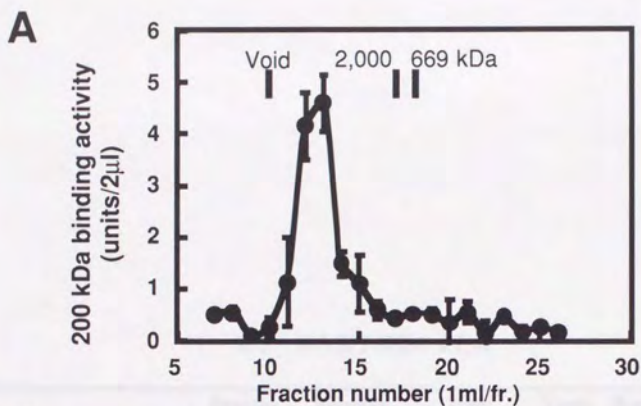


図13 HW-75ゲル濾過カラムの溶出

Heparin-TOYOPEARL カラムで精製した結合因子を HW-75ゲル濾過カラムにアプライし、結合活性と蛋白の溶出の挙動の一致を検討しました。

A. 結合活性の溶出の挙動

横軸にフラクション番号を示し、縦軸には結合活性を示します。

B. 蛋白の溶出の挙動

結合活性溶出付近の電気泳動のパターンを示します。分離ゲルは 10% のものを用いました。なおアプライサンプルには、活性の安定化のために BSA を添加しています。

表1 結合因子精製のまとめ

	Protein (mg)	Specific activity (units/ μ g)	Total activity (units $\times 10^{-3}$)	Yield (%)	Purification (fold)
Solubilized membrane	277	1.31	363	100	1
HW-65	12.2	12.5 \pm 0.3	152 \pm 4	42 \pm 1	9.5 \pm 0.2
100,000 \times g sup	0.652	245 \pm 34	160 \pm 22	44 \pm 6	187 \pm 26
Dialysis	0.692	224 \pm 12	155 \pm 8	43 \pm 2	171 \pm 9
DEAE-TOYOPEARL	N.D.	N.D.	133 \pm 6	37 \pm 2	N.D.
Heparin-TOYOPEARL	*0.019	2600	49	13	2000

* Protein was estimated by the CBB staining of SDS-PAGE of the active fractions.
1 unit was defined the binding of the 200kDa protein to the 0.1 μ l of the solubilized membrane.

N.D. : Not determined

第3章 結合因子と 200 kDa 蛋白の結合について

第3章で報告した結合因子について、200 kDa 蛋白は結合因子の結合を 10^{-6} M 以下で阻害しました。また結合因子は 10^{-6} M 以下で結合した 200 kDa 蛋白を 10^{-6} M 以下で阻害しました。また結合因子は 10^{-6} M 以下で結合した 200 kDa 蛋白を 10^{-6} M 以下で阻害しました。また結合因子は 10^{-6} M 以下で結合した 200 kDa 蛋白を 10^{-6} M 以下で阻害しました。

第3章 結合因子と 200 kDa 蛋白の結合について

第4章 結合因子と 200 kDa 蛋白の結合について

第4章で報告した結合因子について、200 kDa 蛋白は結合因子の結合を 10^{-6} M 以下で阻害しました。また結合因子は 10^{-6} M 以下で結合した 200 kDa 蛋白を 10^{-6} M 以下で阻害しました。また結合因子は 10^{-6} M 以下で結合した 200 kDa 蛋白を 10^{-6} M 以下で阻害しました。

第4章で報告した結合因子について、200 kDa 蛋白は結合因子の結合を 10^{-6} M 以下で阻害しました。また結合因子は 10^{-6} M 以下で結合した 200 kDa 蛋白を 10^{-6} M 以下で阻害しました。また結合因子は 10^{-6} M 以下で結合した 200 kDa 蛋白を 10^{-6} M 以下で阻害しました。

第4章 結合因子と 200 kDa 蛋白の結合について

第4章で報告した結合因子について、200 kDa 蛋白は結合因子の結合を 10^{-6} M 以下で阻害しました。また結合因子は 10^{-6} M 以下で結合した 200 kDa 蛋白を 10^{-6} M 以下で阻害しました。

第1節 結合因子と 200 kDa 蛋白の結合について

第3章で精製した結合因子について、200 kDa 蛋白との結合の特性を dot blot 法を用いて検討しました。まず非特異的に 200 kDa 蛋白を結合するような精製上の artifact を排除するために特異的な結合であるか検討しました。次に生体内で起こりうる反応を検討するために、結合に与えるイオン強度、pH、2価金属イオン要求性 (EDTA による阻害) について調べました。

第2節 結合因子と 200 kDa 蛋白の結合の特異性

精製した結合因子と 200 kDa 蛋白の結合が特異的であるか dot blot 法を用いて検討しました。

まず検討に用いる結合因子の量の検討を行いました。方法は精製した結合因子の量を変化させてニトロセルロース膜上に吸着させ、一定濃度の 200 kDa 蛋白 ($1 \mu\text{g/ml}$) を反応させました。そして結合した 200 kDa 蛋白を ^{125}I -抗 200 kDa 蛋白モノクローナル抗体を用いて検出しました (図 1 4)。その結果、結合因子は用量依存に 200 kDa 蛋白を結合し、 10ng/dot で飽和に達することが分かりました。そこで 5ng/dot で以下の実験を行うことにしました。

次に、結合が特異的なものであるかどうか検討を行いました。図 1 5 にその結果を示します。縦軸は結合した 200 kDa 蛋白の量を示し、横軸は系に投入した 200 kDa 蛋白濃度を示します。このように結合因子に対する 200 kDa 蛋白の結合は用量依存に増加し、 $10 \mu\text{g/ml}$ で飽和に達することが分かりました。このことは結合因子と 200 kDa 蛋白の結合が特異的なものであることを意味します。

第3節 結合に与える各種の要因

次に結合に与えるイオン強度および pH の影響について dot blot 法を用いて検討しました。

まず図16にイオン強度の影響について示します。結合因子と200 kDa 蛋白を反応させる時だけNaCl濃度を变化させました。横軸には200 kDa 蛋白と反応させたときの塩濃度を示し、縦軸には結合した200 kDa 蛋白の量を示します。結合因子に対する200 kDa 蛋白の結合量を実線で示し、コントロールのBSAに対する結合量を点線で示します。このように結合には50 mM NaClを中心として至適イオン強度があることが分かりました。

次に図17にpHの影響について示します。結合因子と200 kDa 蛋白を反応させる時だけpHを变化させました。横軸には結合因子と200 kDa 蛋白の反応時のpHを示し、縦軸には200 kDa 蛋白の結合量を示します。上の実線が結合因子に対する200 kDa 蛋白の結合量を示し、下の点線がコントロールのBSAに対する結合量を示します。このように結合にはpH 7.5を中心として至適pHがあることが分かりました。

至適イオン強度、至適pHは生体内のそれらと一致しませんが、生体内のそれぞれの条件下で結合しうることは分かりました。このことから生体内においても200 kDa 蛋白と結合因子は相互作用しうるものと思われれます。至適が生体内のものと一致しないことについては、実際そうであるのか、アッセイ系の問題なのかの2つの可能性が考えられます。

最後に2価金属イオン要求性について検討しました。これは2価金属が脂肪体崩壊のある過程に必要であることが示されているからです(Kurata *et al.*, 1989)。その結果を図18に示します。横軸にはEDTAの濃度を示し、縦軸には結合した200 kDa 蛋白の量を示しています。このようにEDTAの濃度依存的に結合因子に対する200 kDa 蛋白の結合は阻害され、15 mM EDTAで結合量が半分以下になることが分かりました。このことから2価金属イオン要求性であることが示唆されました。しかしここで用いているEDTAの濃度は生体内に存在している2価金属イオンの濃度より10倍以上高いと思われれます。

第4節 まとめと考察

200 kDa 蛋白と精製した結合因子の結合が特異的であることが分かりましたので、dot blot 法上での結合活性を有する実体を精製してきたことが分かりました。しかし主要な結合活性を担う実体かどうかは依然問題点として残ります。これについては直接 200 kDa 蛋白を標識する方法を見だし、kd 値で判断する等の別の方法を行って確認していく必要があります。

生体内で結合し得るかについては、イオン強度、pH に限ってみれば相互作用しうることが dot blot 法を用いた解析から示されました。このことから意味のある結合因子を精製したことが示唆されたと思われます。但しこのアッセイ系で判断していいのかという疑問は残ります。

2 価金属イオン要求性については高 EDTA 濃度ながら必要であることが示唆されました。高 EDTA 濃度ではじめて結合の阻害が見られるのは、dot blot 法でそのニトロセルロース膜に対する非特異的な吸着を抑えるために使用している skim milk に問題があるからと考えています。それは skim milk 中のカゼインが Ca 結合蛋白質だからです。このためニトロセルロース膜と結合した skim milk 中の Ca をキレートするには、はるかに大量の EDTA が必要です。このことから 2 価金属イオン要求性についてはアッセイ系の問題があるため、skim milk のようなものを使わない方法で更にはっきり示していく必要があります。今後の解析が必要ですが、この結果は生体内に存在するクエン酸や Ca^{2+} によりこの結合が制御されている可能性を示唆していると思われます。つまり崩壊する組織と崩壊しない組織の区別にこの 2 価金属イオンの存在が関与している可能性もあり、今後の解析に考慮する必要があると思われます。

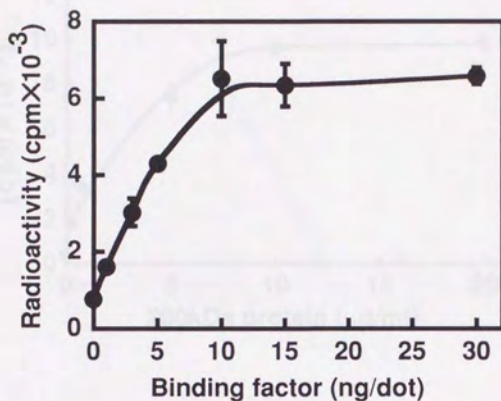


図14 検討に用いる結合因子の量の検討 (dot blot 法)

一定量の 200 kDa 蛋白(1 μ g/ml)を反応させた時の、結合の飽和に達するまでの結合因子の量の検討を行いました。ニトロセルロース膜に吸着させた結合因子の量を横軸に示し、縦軸には結合した ¹²⁵I-anti 200 kDa mAb の量を示しますが、これは結合した 200 kDa 蛋白の量を意味しています。

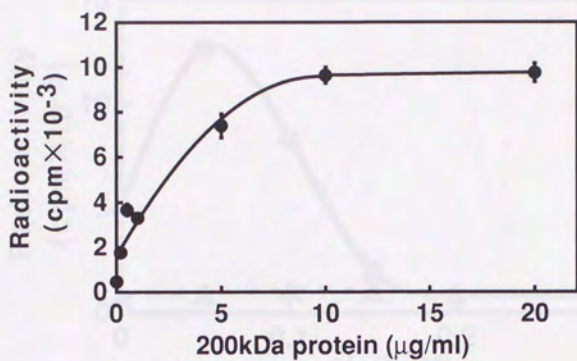


図15 精製した結合因子に対する200 kDa 蛋白の結合 (dot blot 法)

5ng の結合因子に対し、200 kDa 蛋白の濃度を変えて反応させ、200 kDa 蛋白の結合を検討しました。横軸には反応させた200 kDa 蛋白の濃度を示し、縦軸には結合した ¹²⁵I-anti 200 kDa mAb の量を示しますが、これは結合した200 kDa 蛋白の量を意味しています。

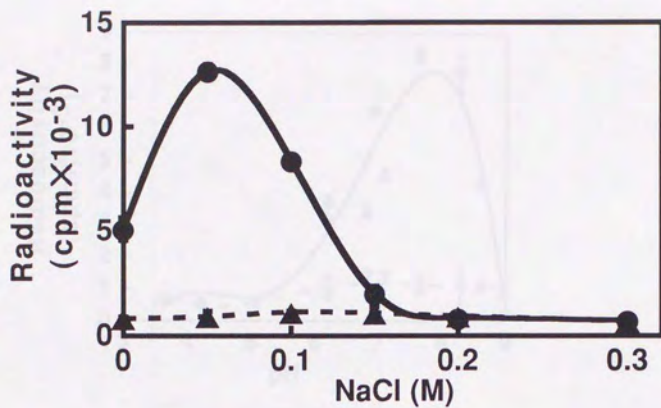


図16 結合因子と200 kDa 蛋白の結合に及ぼす NaCl 濃度の影響
 ニトロセルロース膜に吸着させた結合因子に対して 200 kDa 蛋白を反応させる時のみ、NaCl 濃度を変化させました。実線で結合因子を示し、点線でコントロールの BSA を示します。横軸には反応させた NaCl の濃度、縦軸には結合した ¹²⁵I-anti 200 kDa mAb の量を示しますが、これは結合した 200 kDa 蛋白の量を意味しています。

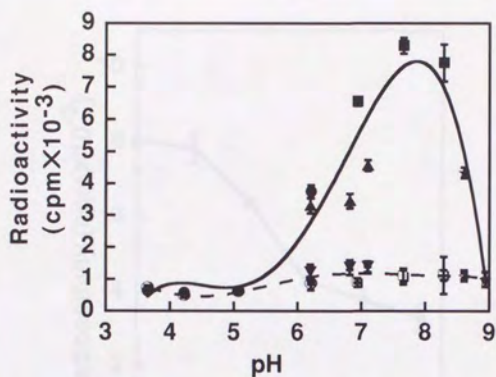


図17 結合因子と200 kDa 蛋白の結合に及ぼす pH の影響

ニトロセルロース膜に吸着させた結合因子に対して 200 kDa 蛋白を反応させる時のみ、pH を変化させました。実線で結合因子を示し、点線でコントロールの BSA を示します。横軸には反応させた pH、縦軸には結合した ¹²⁵I-anti 200 kDa mAb の量を示しますが、これは結合した 200 kDa 蛋白の量を意味しています。用いた緩衝液は以下の通りです。

Buffer	Binding factor	BSA
Citrate	●	○
Phosphate	▲	▼
Tri	■	□
Carbonate	◆	◇

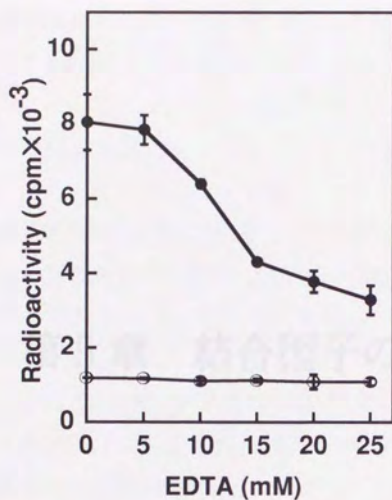


図18 結合因子と200 kDa 蛋白の結合に及ぼす EDTA の影響

ニトロセルロース膜に吸着させた結合因子に対して 200 kDa 蛋白を反応させる時のみ、EDTA の濃度を変化させました。●で結合因子を示し、○でコントロールの BSA を示します。横軸には反応させた EDTA の濃度、縦軸には結合した ¹²⁵I-anti 200 kDa mAb の量を示しますが、これは結合した 200 kDa 蛋白の量を意味しています。

…… 物理と化学の境界に…… 物理と化学の境界に…… 物理と化学の境界に……

…… 物理と化学の境界に…… 物理と化学の境界に…… 物理と化学の境界に……

…… 物理と化学の境界に…… 物理と化学の境界に…… 物理と化学の境界に……

第5章 結合因子の局在

…… 物理と化学の境界に…… 物理と化学の境界に…… 物理と化学の境界に……

…… 物理と化学の境界に…… 物理と化学の境界に…… 物理と化学の境界に……

…… 物理と化学の境界に…… 物理と化学の境界に…… 物理と化学の境界に……

…… 物理と化学の境界に…… 物理と化学の境界に…… 物理と化学の境界に……

…… 物理と化学の境界に…… 物理と化学の境界に…… 物理と化学の境界に……

第1節 局在の解析

精製した結合因子について局在を調べることにより、この結合因子の存在意義について考察することになりました。

第2節 抗体の調製

抗体を調製する動物はマウスを用いることにしました。これは結合因子の量的確保が難しかったので、少量の抗原で抗体を得ることの出来る動物を用いる必要があったからです。

最初は精製標品を電気泳動し、CBBによる染色の後、220,230 kDaの位置のバンドを切り出して5 μ g程度ずつ2匹のマウスにゲルのまま免疫を行いました。この方法により1週間毎に4回免疫を行いましたが、抗体は得られませんでした。抗体が出来たかどうかについてはウェスタンブロットリング法により確認しました。この得られなかった原因としてはゲルから結合因子が出ないから有効な抗原量としては少なかつたという可能性と、種を越えてこの結合因子が保存されているため抗原となり得ないという可能性がありました。

前者の可能性を考えて、今度は電気泳動を行わずに免疫しました。蛋白濃度が低いためTCA沈澱を行うことにより濃縮し、サンプルを調製しました。1週間毎に4回免疫を行ったところ、今度は抗体を得ることが出来ました。しかし得られた抗体はtiterが低いため、量的に多い蛋白に対して非特異的な吸着をウェスタンブロットリング上で起こしました。そこで精製結合因子を用いて affinity purificationを行いました。その結果特異的な抗体が調製出来ました。

以下の実験では、このようにして得られた特異的な抗体を用いたウェスタンブロットリング法により行いました。

第3節 変態過程における脂肪体上の結合因子の変動

3令幼虫あるいは各ステージの蛹から顕微鏡下で脂肪体を抽出することによりサンプルを調製しました。各サンプルについて50 μg ずつ電気泳動を行い、ウェスタンブロットング法で解析した結果を図19に示します。各レーンの数字は変態後の経過時間を示します。なお larva と書いてあるレーンは3令幼虫のものを示します。検出されたバンドが結合因子を示します。このように結合因子は3令幼虫の時期から確かに存在し、蛹になってから6時間目までは存在していますが、その後減少し10時間目以降においてはほとんど消失することが分かりました。このことから結合因子は変態に伴い消失することが分かりました。

第4節 3令幼虫における組織特異性

3令幼虫から各組織を抽出することによりサンプルを調製しました。各サンプルについて50 μg ずつ電気泳動を行い、ウェスタンブロットング法で解析した結果を図20に示します。結合因子は脂肪体 (fat body)、成虫原基 (disc) に存在し、体液細胞 (hemocyte) には存在しないことが分かりました。このことからこの結合因子を持つ組織と持たない組織があることが分かりました。

第5節 まとめと考察

脂肪体の崩壊は体液細胞の放出する29 kDaのプロテアーゼによって引き起こされますが、この放出は蛹となってから6時間目(変態後6時間目)頃から起こります(Kurata *et al.*, 1992b)。そしてほとんどの脂肪体は29時間目には崩壊します。この知見と合わせて考えると、結合因子の変態に伴う消失は、体液細胞からのプロテアーゼの放出と時間的相関があるように思われます。従って結合因子はこのプロテアーゼにより速やかに分解させられている可能性があります。また、結合因子の消失は脂肪体の組織崩壊に先だって起こることから、この結合因子は数珠

のように脂肪体を構成する細胞をつなぎ止めているのではなく、200 kDa 蛋白による認識に主要な存在意義があるのではないかと思われます。

結合因子は将来成虫組織となる成虫原基にも存在していることが分かりました。このことから、ここで精製した結合因子は、変態に伴い、崩壊する組織と崩壊しない組織を識別するようなものではない、という可能性が示唆されました。しかし成虫原基では、変態に伴い、成虫原基を覆っている表皮が剥離するという現象がみられます。生体内ではこの過程にこの結合因子が関与しているのかも知れません。

体液細胞中に結合因子が検出されないのは、体液細胞が攻撃する側だからだと思います。どのような過程を経て幼虫型の体液細胞から蛹型の体液細胞に変化するのか分かっていませんが、脂肪体のような不要組織を攻撃する側（体液細胞）では別の形（形態変化、蛹型体液細胞の造血組織からの大量放出など）で集団の変化が起こっているものと思われます。

この結合因子について脂肪体の崩壊の機構を越えて、どこまで普遍化出来るかについては、更に解析を行う必要があります。

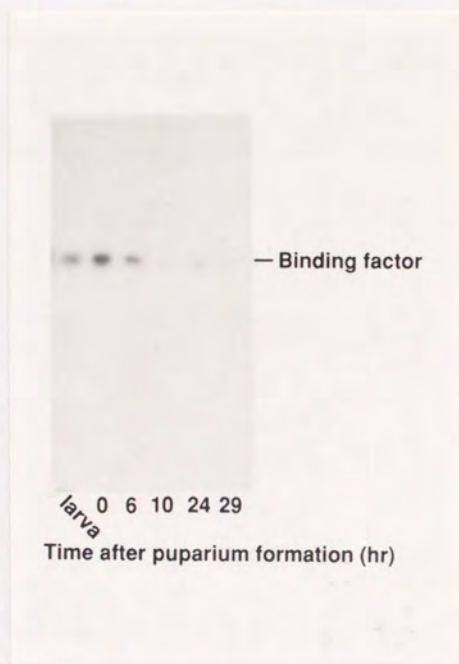


図19 変態過程における脂肪体上の結合因子の量的変動
 幼虫から変態初期の蛹まで経時的に脂肪体を摘出し、抗結合因子抗体を用いたウェスタ
 プロットティング法により結合因子の量的変動を解析しました。各レーンはそれぞれ脂肪
 体を 50 μ g ずつ電気泳動しました。各レーンの下の数字は変態後の経過時間を示し、
 larva は幼虫の脂肪体を示します。

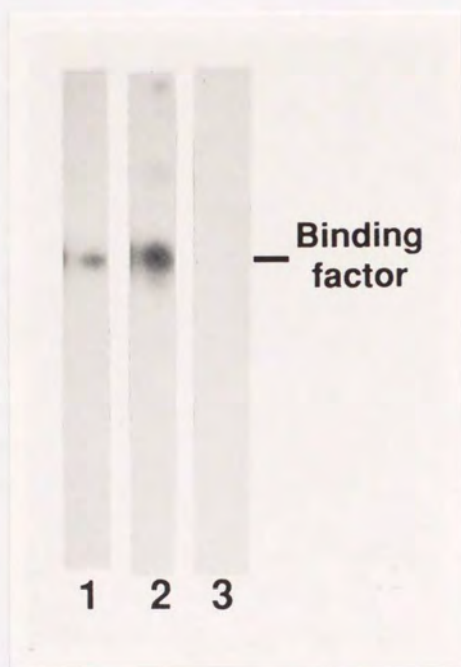


図20 幼虫各組織における結合因子の存在

幼虫から各組織を抽出し、50 μ g ずつ電気泳動し、抗結合因子抗体を用いたウェスタンブロットング法により結合因子の存在量を解析しました。lane 1 は脂肪体、lane 2 は成虫原基、lane 3 は体液細胞をそれぞれ示します。

第1節 構造解析について

私は修士過程でこの 200 kDa 蛋白を精製し、この蛋白が蛹体液細胞による脂肪体の認識に関与していることを示唆しました(Kobayashi *et al.*, 1991)。更にこの蛋白に対する脂肪体側の結合因子を精製してきたことについてはこれまで述べてきた通りです。このように 200 kDa 蛋白は結合因子と同様、非自己化した脂肪体の崩壊という現象で重要な位置を占める蛋白です。そこでこの蛋白の構造を明らかにすることは重要です。

構造解析はその蛋白部分の構造を明らかにすることと、修飾部分を明らかにすることの2つに大別出来ます。こうして得られた知見をもとにして、その機能部位の限定などの研究が進んでいくものと思われれます。

蛋白部分の構造解析として cDNA cloning が共同研究者により現在進行中ですのでここでは割愛します。私は蛋白構造以外に糖鎖構造を持つか検討することにしました。

第2節 NaBH₄ 処理

O-グリコシド型糖鎖を持つか NaBH₄ を用いてまず検討しました。方法は 200 kDa 蛋白に対して最終濃度 265 mM で NaBH₄ を 37 °C で 5 分間反応させました。反応の終結は HCl を加えることにより行いました。予め NaBH₄ の処理時間を検討したところ、37 °C、5 分間以内という非常に速い速度で分解することが分かりました。この NaBH₄ 処理により分解産物として抗原的にクロスする 150,110 kDa の蛋白が生成することが分かりました(図 2 1)。これらの分子は蛹体液細胞にも検出されています。このことから 110 kDa の分子に O-グリコシド型糖鎖が結合し、150,200 kDa の分子になるという可能性が示唆されました。しかし一般に 2 ~ 3 日処理している(Spino, 1972)ことを考えると分解が非常に速いので、別の結合が還元されて切断されたと考える方が妥当かも知れません。そこで次に糖鎖の別の検出法である PAS 染色により糖鎖の検討を行いました。

第3節 PAS 染色

PAS 染色は Zacharius ら(1969)の方法に従い行いました。

その結果 200 kDa 蛋白は PAS 染色されないことが分かりました (図 2 2)。150,110 kDa の蛋白に対し糖鎖が結合し 200 kDa 蛋白を形成しているのであれば 200 kDa 蛋白は染色されてもいいと思われました。以上の結果から 200 kDa 蛋白に糖鎖がないことが示唆されました。しかしながら PAS による染色は直接糖鎖を検出しているわけではないので、染色されない糖鎖を持っているという可能性は排除出来ません。

第4節 まとめと考察

以上の結果から 200 kDa 蛋白には糖鎖があるとははっきり言えないと思われま
す。しかしここで見いだしました NaBH_4 による速やかな分解は何かユニークな付
加部位を持つことを示唆していると思います。また分解産物とほぼ同一の分子量
の 150,110 kDa 蛋白が蛹体液細胞中にも存在していますので、このサイズ変化の原
因を追究し、このサイズ変化部分の部位の役割を今後解析していくことは、200
kDa 蛋白と 150,110 kDa 蛋白の関係を考える上で重要であると思われま

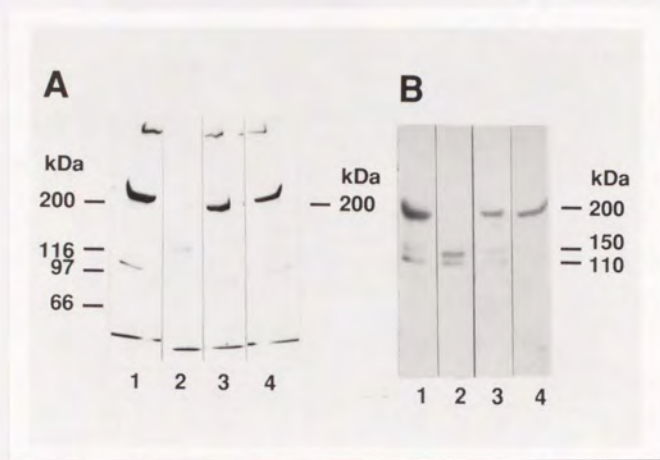


図2-1 200 kDa 蛋白の NaBH₄ 処理

200 kDa 蛋白に対し 37 °C で NaBH₄ 処理を 5 分間行いました。反応の停止には HCl を加えました。生成産物は電気泳動により確認しました。

A. に電気泳動像を示し、B. に ¹²⁵I-anti 200 kDa mAb を用いたウェスタンブロッティング法による解析の結果を示します。lane 1 には未処理の 200 kDa 蛋白を示し、lane 2 には NaBH₄ 処理したサンプル、lane 3 には NaBH₄ を加えずに 37 °C で 5 分間処理した後に、予め NaBH₄ と HCl を混ぜ合わせたものを加えたもの、lane 4 には同じ時間何も処理せずに氷上に放置したサンプルをそれぞれ示します。

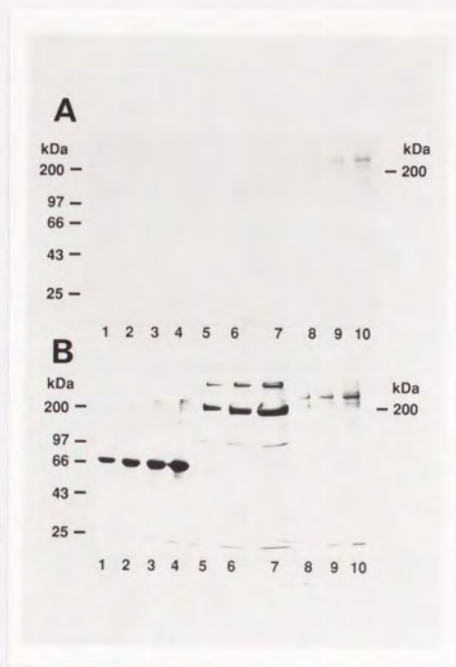


図2 200 kDa 蛋白のPAS染色

200kDa 蛋白を電気泳動し、PAS染色を行いました。

A. にPASによる染色像を示し、B. にCBBによる染色像を示します。lane 1-4にBSAを示し、それぞれ1,2,3,4 μ g泳動しています。lane 5-7は200 kDa 蛋白を示し、それぞれ1,2,4 μ g泳動しています。lane 8-10はThyroglobulinを示し、それぞれ1,2,4 μ gを泳動しています。BSAは糖鎖を持っていない蛋白のコントロール (PASで染色されない) として、Thyroglobulinは糖鎖を持っている蛋白のコントロール (PASで染色される) として用いました。

第1節 本研究で明らかにしたこと

私は形態形成過程における不要組織の排除を自己組織の非自己化という、これまでにない視点で捉えることにより形態形成を理解しようと研究を行ってきました。その結果、センチニクバエ変態時における幼虫の主要な組織である脂肪体の崩壊に関し新たな知見を見いだすことが出来ました。

まず修士課程で蛹体液細胞膜表面上に特異的に出現してくる分子量 200 kDa の蛋白を精製し(Kobayashi *et al.*, 1991)、この蛋白が蛹体液細胞による脂肪体の認識に関与していることを示唆しました。この結果を受けて博士課程では、この 200 kDa 蛋白が脂肪体に結合することを見だし、脂肪体側に結合部位が存在していることを示しました。

次にこの結合部位の同定を行うために精製のためのアッセイ系の構築を行い、dot blot 法を確立しました。そしてこの方法をアッセイの指標として結合因子の精製を行いました。その結果、脂肪体非可溶性画分に主に結合活性が回収されることが分かり、結合因子が膜蛋白であることを示唆しました。非可溶性画分を guanidine/HCl により可溶化した後、HW-65、超遠心分画、DEAE-TOYOPEARL、Heparin-TOYOPEARL の各操作により、結合因子として分子量 220,230 kDa の蛋白を精製しました。そして結合因子と 200 kDa 蛋白の結合の特性を dot blot 法を用いて検討したところ、その結合は特異的であり、生体内イオン強度、pH で起こりうることを示唆しました。更に結合因子の局在を検討したところ、脂肪体に確かに幼虫の時期から存在し、蛹化に伴い消失していくことが分かりました。

以上のことから脂肪体の崩壊は次のように考えられると思われます(図 2 3)。変態に伴い蛹体液細胞膜表面上に新たに分子量 200 kDa の蛋白が出現します(Kurata *et al.*, 1989)。そしてこの蛋白を介して蛹体液細胞が脂肪体を不要になった組織として認識するようになります。この認識先としてここで精製した分子量 220, 230 kDa の結合因子が考えられます。認識された脂肪体は蛹体液細胞から放出される 29 kDa プロテアーゼにより消化され組織の崩壊が起きます(Kurata *et al.*, 1992b)。また同時にこのプロテアーゼは結合因子も速やかに消化し、蛹体液細胞

が不必要に何度も崩壊途中にある脂肪体を認識しないようにしているものと思われます。

つまり、幼虫の主要な組織である脂肪体の崩壊という、発生過程で不要になった自己組織の非自己化の過程は、変態に伴い体液細胞膜表面上に新たに出現してくる 200 kDa 蛋白が、幼虫の時から脂肪体上に存在しているこの分子量 220,230 kDa の結合因子を蛹の時期に正しく認識することが重要であると思われます。このように自己組織の非自己化の機構に関する分子レベルの視点を提供した点に本研究の意義があると思います。尤も、十分に示されていない点は多々あり、今後の解析が必要です。これについては次節で議論します。

更に、成虫原基中にもこの結合因子が存在することが分かりました。この意味については現在のところよく分かりませんが、成虫原基が発生する際に不必要になる表皮の剥離にこの結合因子が関与しているのかも知れません。

最後に 200 kDa 蛋白側の解析として、 NaBH_4 処理(Spiro, 1972)により非常に速い時間で 150,110 kDa の分子になることが分かりました。このことから何かユニークな付加部位を 200 kDa 蛋白が持っていることを示唆しました。

第2節 今後の展望

前節で述べたモデル、意義については本研究により得られた知見と矛盾しない範囲内で考察しています。従ってまだまだ不十分な点が多くあります。今後はまずこの不十分な点について解析を進めていくことが重要です。

結合因子が本当に生体内で意味のある結合をするのかを明らかにする必要があります。このために特異的なモノクローナル抗体を調製し、確かに脂肪体表面に存在しているか蛍光抗体法により検討します。これにより結合が起こり得ることを確認します。次に *in vitro* で蛹体液細胞による脂肪体の崩壊が起こります(Kurata *et al.*, 1989)が、この崩壊が結合因子に対する特異的なモノクローナル抗体で阻害されるか検討します。この結果が得られて初めて機能分子であると言えると思います。

次に、成虫原基についてその存在意義を明らかにする必要があります。このためにこの結合因子の存在場所を蛍光抗体法により明らかにします。そして表面にあれば *in vitro* で成虫原基を発生させる (Kawaguchi *et al.*, 1991) 際に蛹体液細胞を添加し発生に及ぼす影響を検討します。表皮の剥離に関与しているのであれば発生はよりスムーズにいくのではないのでしょうか。このような検討はこの結合因子が崩壊する組織と崩壊しない組織を識別しているという仮定に立っていますが、別の視点としてこの結合因子は蛹体液細胞が変態時に組織を認識するためにあって (幼虫の時に自己であることを示すために、存在している組織が全て持っている)、実際の崩壊は蛹体液細胞の放出する 29 kDa プロテアーゼの基質を持っているか否かによるという仮定です。このような視点でも解析は必要と思われます。この場合このプロテアーゼで成虫原基が崩壊するか検討することが最初の実験になります。

以上のような実験によりこの結合因子の存在意義がはっきりした後は、どこまでこの現象が普遍化できるか検討することが重要です。このためにはモノクローナル抗体や cDNA を用いた別の系での存在の検討や、一次構造の比較による類似分子の検索が有用な手段となり得ます。

このようにしてこの研究を発展させ、形態形成を理解するために自己とは何かという問いかけに更に答えていくことが今後の課題です。

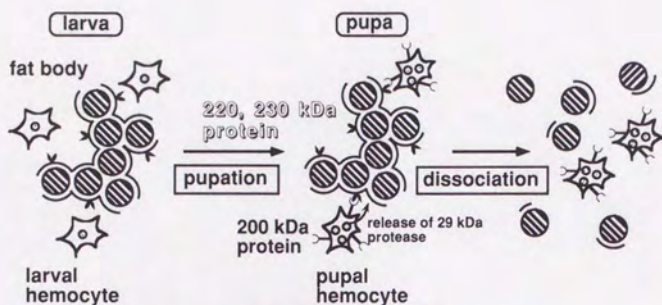


図 2 3 脂肪体崩壊の模式図

本研究を通して、脂肪体上に存在する、200 kDa 蛋白に対する結合因子を精製し、分子量 220,230 kDa の蛋白からなることを明らかにしました。そしてこの結合因子は幼虫の時から既に存在していることを明らかにしました。幼虫の時から存在しているこの 220,230 kDa の結合因子を、変態に伴い新たに蛹の体液細胞膜表面上に出現してくる 200 kDa 蛋白が認識し、脂肪体を崩壊させる活性を持つ 29 kDa プロテアーゼを体液細胞から放出させているものと思われます。また一度認識された結合因子は、不必要に何度も認識されないようすみやかに分解させられているものと思われます。

(1) 生体試料

1. センチクバエ (*Sarcophaga peregrina*)

センチクバエの飼育は Ohtaki(1966)の方法に従いました。

3 令幼虫 (最終令) の体表を水で濡らしておく、環状線からの ecdysone の分泌が抑制されて蛹化しませんが、体表を乾燥させ 27 °C に放置すると 16 時間目から蛹化し始めます。これを利用して、変態 (蛹化) を同調させることが出来ます。このようにして同調した幼虫或いは蛹を得ました。なお本文中、幼虫とは 3 令幼虫を指し、蛹とは変態 (蛹化) 初期のものを指します。

2. 体液細胞

幼虫或いは蛹を氷冷後、頭部を切断除去し、insect saline (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂) 中に体液をしぼり、4 °C で 100 × g、5 分間遠心し、体液細胞を沈澱として回収しました。洗浄は insect saline を用い、同様の遠心条件で 2 回行いました。

3. 脂肪体

幼虫を氷冷後、頭部を切断除去し、胴体部分について insect saline 中で表皮をひっくり返し、内部を露出させた後、実体顕微鏡下で脂肪体を摘出しました。蛹については、頭部、尾部を切断除去し、頭部から尾部にかけて外皮に切れ込みを入れ、内部を露出させた後、実体顕微鏡下で脂肪体を摘出しました。

4. 成虫原基

幼虫を氷冷後、頭部を切断し、insect saline 中で頭部の表皮をひっくり返し、実

体顕微鏡下で肢原基、翅原基の根元をピンセットで摘むことによって摘出しました。

(2) 200 kDa 蛋白

1. 200 kDa 蛋白の精製 (Kobayashi *et al.*, 1991)

精製の出発材料は変態後 10 時間目の蛹の体液細胞 4×10^8 cells を用いました。まず体液細胞を protease inhibitor (1 mM PMSF, 0.1 mg/ml Leupeptin, 0.1 μ g/ml Pepstatin) を含む BIS (10 mM Tris/HCl pH 7.9, 1 mM CaCl_2 , 5 mM KCl, 0.13 M NaCl) 2 ml に懸濁し、氷上でガラスホモジナイザーで粉碎しホモジネートを得ました。

ホモジネートを遠心 ($100 \times g$, 1 分, 4 $^\circ\text{C}$ を 2 回) により脱核し、その上清を超速心 ($100,000 \times g$, 30 分, 4 $^\circ\text{C}$) し、BIS で 1 回洗浄しました。得られた沈澱を膜画分としました。膜画分調製後、protease inhibitor を含む BIS + 1 M NaCl buffer (10 mM Tris/HCl pH 7.9, 1 mM CaCl_2 , 5 mM KCl, 1.13 M NaCl) 8 ml に懸濁し、4 $^\circ\text{C}$ で一晚 shaking し、可溶化を行いました。可溶化膜画分は超速心 ($100,000 \times g$, 30 分, 4 $^\circ\text{C}$) 後の上清としました。

可溶化膜画分 2.8 ml を 10 mM Tris/HCl pH 7.9, 1 mM CaCl_2 , 5 mM KCl, 1 M NaCl で平衡化した HW-65 (TOSOH, TSKgel TOYOPEARL HW-65F, Fine, 1.0×120 cm, 約 90 ml) カラムにアプライし、1.4 ml ずつ分画しました。

精製の各ステップについて 200 kDa 蛋白は抗 200 kDa 蛋白モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットティング法 (Towbin *et al.*, 1979) によりモニターし、蛋白量は Lowry らの方法 (1951) により定量しました。

高濃度の 200 kDa 蛋白が必要な場合は DE 52 (Whatman) カラムを用いて濃縮しました。HW-65 で得られたフラクションを 10 mM Tris/HCl pH 7.9, 1 mM CaCl_2 , 5 mM KCl で 20 倍に希釈し DE 52 カラムにアプライしました。0.1 M NaCl 溶液で洗浄後、0.5 M NaCl 溶液で溶出しました。

200 kDa 蛋白の精製は全てのステップについてサンプルは凍結せず、常に 4 $^\circ\text{C}$ で

保存しました。

2. NaBH_4 処理(Spiro, 1972)

200 kDa 蛋白 120 μg /480 μl に 2 M NaBH_4 73 μl を加え (最終濃度 265mM)、37 $^\circ\text{C}$ で 5 分間反応させました。1 N HCl 110 μl を加えほぼ中和し反応を止め、氷上に放置しました。

生成産物は電気泳動(Laemmli, 1970)及び Western blot 法(Towbin *et al.*, 1979)により検出しました。

3. PAS 染色 (Periodic acid-Schiff 染色法) (Zacharius *et al.*, 1969)

電気泳動したゲルを 50 ml の 12.5 % TCA につけ、室温で 30 分間反応させ、ゲル中の蛋白を固定しました。DDW で洗浄後、50 ml の 1 % 過ヨウ素酸 - 3 % 酢酸につけ、室温で 50 分間反応させました。この酸化処理により糖分子中の diol 構造が酸化開裂し、アルデヒド基が生成します。DDW でよく洗浄した後、50 ml の Schiff 試薬を室温で 50 分間遮光し反応させました。Schiff 試薬中の塩基性フクシンとアルデヒド基で亜硫酸イオン存在下で発色団を形成します。その後、0.5 % メタ重亜硫酸カリウムで洗浄し、更に DDW で洗浄し過剰の染色を除きました。

Schiff 試薬の調製(McGuckin *et al.*, 1958)は DDW 200 ml、濃塩酸 (c.HCl) 2.1 ml、メタ重亜硫酸カリウム ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 1.6 g を混合し攪拌溶解しました。塩基性フクシン 0.8 g を加え、しばらく攪拌しました。この段階で全ての塩基性フクシンは溶解せず一部は残ります。茶さじ 1~2 杯の活性炭を加え、数分間攪拌後に濾紙で濾過しました。これを透明になるまで 3~4 回繰り返しました。これにより試薬中の未反応フクシンが除かれ、無色のフクシン-スルホン酸型だけになります。調製後、褐色瓶に入れ 4 $^\circ\text{C}$ 暗所に保存しました。

(3) 抗 200 kDa 蛋白モノクローナル抗体

1. 抗 200 kDa 蛋白モノクローナル抗体 (Kurata *et al.*, 1991)

200 kDa 蛋白に対するモノクローナル抗体の調製は当教室倉田と共に、私はウェスタンブロットリング法によるスクリーニングを行いました。ハイブリドーマの調製法については Kurata *et al.*(1991) を参照。

スクリーニングは、ウェスタンブロットリング法(Towbin *et al.*, 1979)により、蛹体液細胞膜画分 200 kDa 蛋白と反応し、幼虫体液細胞膜画分蛋白とは反応しないことを指標に行いました。蛹体液細胞は蛹化後 6 時間目のものを用いました。まず、蛹体液細胞膜蛋白 50 μ g、幼虫体液細胞膜蛋白 100 μ gを、各々ベタで 7.5 % SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行いました (Laemmli,1970)。泳動後、transfer buffer(190 mM Gly, 25 mM Tris, 20 % MeOH, 0.02 % SDS)を用いて 4 $^{\circ}$ C, 280 mA, 4 時間の条件でニトロセルロース膜 (BA-85, Schleicher and Schuell) 上に蛋白を転写しました。その後、skim milk sol.(10 mM Tris/HCl pH 7.9, 0.01 % sodium azide, 5 % skim milk (no fat, Difco))でブロッキングしました。このようにして得られたニトロセルロース膜を短冊状に切断し、各小片を、各々ハイブリドーマの上清と 2 時間室温で反応させました。反応後 rinse sol.(10 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100, 0.01 % sodium azide, 0.5 % skim milk)で洗浄し、ヨード標識した抗マウス抗体 (125 I-anti mouse IgG) と 1 時間室温で反応させました。そして rinse sol. で洗浄した後、Kodak XAR film を用いてオートラジオグラフィーをとりました。200 kDa 蛋白の位置にオートラジオグラム上でシグナルが検出されたものを positive としました。同様の方法をスクリーニング (一次、二次) およびクローニング (連続して 2 回行った) のアッセイで行いました。

モノクローナル抗体の精製(McCauley *et al.*, 1973)はハイブリドーマをマウス腹腔で培養して得られた腹水から行いました。腹水 10 ml に 13.3 ml の氷冷飽和硫酸 pH 8 を 4 $^{\circ}$ C でゆっくり添加しました。室温で 15 分間攪拌し、10,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 20 分間遠心し沈澱を得ました。リン酸緩衝液 (40 mM K-phosphate buffer pH 8, 30 mM NaCl) 3 ml を加え沈澱を溶解し、リン酸緩衝液中で透析し脱塩しました。リン酸

緩衝液で平衡化した DE 52 (Whatman) カラムにアプライし、非吸着画分を得ました。ここで得られた非吸着画分を精製 IgG としました。純度は電気泳動により主要な成分にまで精製されたことを確認しました。

2. モノクローナル抗体のヨード化

クロラミン T 法 (Hunter *et al.*, 1962) により行いました。モノクローナル抗体 20 μg (PBS(-) 50 μl 中) に Na^{125}I 19 mBq と Chloramine T 50 μl (1 mg/ml 0.5 M phosphate buffer pH 7.5) を加えよく混合し、室温で 1 分間放置しました。NaHSO₃ 100 μl (2 mg/ml) を加え反応を止め、その後 ^{125}I が蛋白に非特異的に吸着するのを防ぐために NaI (2 mg/ml) 10 μl を加えてよく混合しました。反応溶液を PBS(-) で平衡化した Sephadex G-10 カラム (6 ml) にアプライし、0.5 ml ずつ分取しました。分画に用いたチューブにはあらかじめ 10% BSA 10 μl を加えておき、溶出してきた蛋白が非特異的に吸着したりするのを防ぎました。各フラクションの一部をとり、ガンマカウンターで放射活性を測定し、void に標識蛋白が溶出してくることを確認し、活性フラクションをプールしました。蛋白が確かにヨード化されていることは電気泳動を行い、lane を 3 mm ずつ断片化し、各小片をガンマカウンターで放射活性を測定することにより確認しました。

(4) 脂肪体に対する 200 kDa 蛋白の結合

1. 脂肪体に対する 200 kDa 蛋白の結合

摘出した脂肪体 1/2 匹分を各チューブに入れ、25 °C で 3 時間 200 kDa 蛋白と FCS 溶液 (5% FCS, 0.13 M NaCl, 5 mM KCl, 5 mM CaCl₂) 0.4 ml 中で反応させました。FCS 溶液 0.5 ml で 2 回洗浄し、最終容量 100 μl とした後、ヨード標識した抗 200 kDa 蛋白モノクローナル抗体 (^{125}I -anti 200 kDa mAb) 15 kBq を加え、4 °C で 1 時間反応させました。FCS 溶液 0.5 ml で 4 回洗浄し、脂肪体を別のチューブに

移し、結合した放射活性をガンマカウンターにより測定しました。

(5) dot blot 法

1. 脂肪体ホモジネートの調製

脂肪体 800 匹 (約 30 ml) に対し protease inhibitor (1 mM PMSF, 50 μ g/ml Leupeptin, 1 μ g/ml PepstainA) を含む citrate buffer (10 mM Na-citrate buffer pH 6, 5 mM KCl, 0.13 M NaCl) 約 10 ml を加え、氷上でガラスホモジナイザーで粉碎し、更に同 buffer を加えホモジネート 50 ml を得ました。

なお実験によりこのスケールは適宜変更しました。

2. dot blot 法

脂肪体ホモジネートを 1 cm² 角のニトロセルロース膜(BA-85, Schleicher and Schuell) にスポットしました。この時、各スポット時の容量は 15 μ l に出来る限り揃えるようにしました。Citrate buffer, rinse sol. (0.5 % skim milk, 5 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 0.13 M NaCl) で 1 回ずつ洗浄し、blocking sol.(5 % skim milk, 5 mM KCl, 5 mM CaCl₂) で室温 1 時間ブロッキングしました。その後、200 kDa 蛋白を rinse sol. 1 ml 中で 4 $^{\circ}$ C、一晚反応させました。各ニトロセルロース膜を 1 つにまとめ、rinse sol. で室温で 4 回洗浄しました。20 枚のニトロセルロース膜当たり 19 kBq ¹²⁵I-anti 200 kDa mAb /5 ml rinse sol. となるように抗 200 kDa 蛋白モノクローナル抗体を加え、室温で 1~2 時間反応させました。rinse sol. で室温で 7 回洗浄し、ニトロセルロース膜に結合した放射活性をガンマカウンターで測定しました。

(6) 結合因子の精製

1. 非可溶性画分 (膜画分) の調製

(5) 1. により得られた脂肪体ホモジネート 50 ml を超遠心 ($100,000 \times g$, 30 分, 4°C) し沈澱を得ました。Citrate buffer (10 mM Na-citrate buffer pH 6, 5 mM KCl, 0.13 M NaCl) 40 ml を加え、沈澱をほぐし再度超遠心することにより沈澱を洗いました。得られた沈澱を protease inhibitor (1 mM PMSF, 50 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 1 $\mu\text{g/ml}$ PepstainA) を含む citrate buffer に 30 ml となるように懸濁し、軽くガラスホモジナイザーでホモジナイズしたものを非可溶性画分 (膜画分) としました。

2. Guanidine/HCl による可溶化

(可溶化の条件検討)

膜画分 250 μl に対し、guanidine/HCl 水溶液 100 μl と citrate buffer 50 μl を加え、 4°C で 6 時間可溶化しました。超遠心 ($100,000 \times g$, 30 分, 4°C) により可溶化画分と非可溶化画分に分画しました。非可溶化画分からの再抽出は guanidine/HCl 水溶液 100 μl と protease inhibitor (1 mM PMSF, 100 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 1 $\mu\text{g/ml}$ PepstainA) を含む citrate buffer 300 μl を加え、沈澱を vortex でほぐした後 4°C で一晩可溶化しました。再度超遠心により分画し、非可溶性画分は sonication により citrate buffer 中に懸濁しました。

(精製)

膜画分 30 ml に citrate buffer 9 ml と 8 M guanidine/HCl 水溶液 9 ml を加え、5 時間以上 4°C で可溶化を行いました。その後超遠心 ($100,000 \times g$, 30 分, 4°C) し、約 40 ml の可溶性画分を得、これを可溶化膜画分として 4°C に保存しました。

以下のステップは全て 4°C で行い、サンプルは凍結させずに常に 4°C で保存しました。

3. 活性の定量

(5) 2. dot blot 法を多少改変して活性の定量を行いました。standard は可溶

化膜画分 0.1 μ l に対する 200 kDa 蛋白の結合量を 1 unit としました。各実験を行う度に standard をとり、活性の定量化を行いました。

まず可溶化膜画分を 1 cm² 角のニトロセルロース膜にスポットしました。この時、各スポット時の容量は 15 μ l に出来る限り揃え、また blotting 時のイオン強度は 0.5 M guanidine/HCl としました。各ニトロセルロース膜を合わせ、citrate buffer で 3 回 (合わせて 1.5 時間以上) 洗い脱塩した後、rinse sol. (0.5 % skim milk, 5 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 0.13 M NaCl) で 1 回洗い、blocking sol. (5 % skim milk, 5 mM KCl, 5 mM CaCl₂) で室温 1 時間ブロッキングしました。その後、1 μ g/ml の 200 kDa 蛋白を rinse sol. (20 枚のニトロセルロース膜当たり 5 ml) 中で 4 $^{\circ}$ C、一晚反応させました。rinse sol. で室温で 4 回洗浄し、20 枚のニトロセルロース膜当たり 19 kBq ¹²⁵I-anti 200kDa mAb / 5 ml rinse sol. となるように抗 200 kDa 蛋白モノクローナル抗体を加え、室温で 1 時間反応させました。Rinse sol. で室温で 5 回洗浄し、ニトロセルロース膜に結合した放射活性をガンマカウンターで測定しました。Urea の入っているサンプルについて測定する場合は standard にも同量の urea を加えました。

4. HW-65

可溶化膜画分 10 ml を 0.5 M NaCl, 5 mM KCl, 10 mM citrate pH 6 で平衡化した HW-65 (TOSOH, TSKgel TOYOPEARL HW-65F, 1.5 \times 120 cm, 約 200 ml) にアブライしました。カラムからの溶出は 4.5 ml ずつ分画しました。この操作をのべ 4 回行いました。活性 fraction はほぼ 100 ml 得られました。

5. 100,000 \times g

HW-65 で得られた活性 fraction は buffer 交換を行ったため不溶物が出ました。そこで超遠心 (100,000 \times g, 30 分, 4 $^{\circ}$ C) を行いました。活性は主に可溶性画分に回収されました。

6. 透析

100,000 × g 超遠心上清画分 (可溶性画分) 約 100 ml を、500 ml の透析 buffer (6 M urea, 50 mM Tris/HCl pH 7.9, 5 mM KCl, 5 mM CaCl₂) で 4 回透析しました。透析膜は分子量 100,000 cut のもの (SPECTRA/POR CE Membrane MWCO 100,000) を用いました。回収はおおよそ 75 ml ありました。

7. DEAE-TOYOPEARL

6 M urea, 50 mM Tris/HCl pH 7.9, 5 mM KCl, 5 mM CaCl₂ で平衡化した DEAE-TOYOPEARL (TOSOH, TSKgel DEAE-TOYOPEARL650S) 3 ml に透析サンプルをアプライし、ほぼ 70 ml の非吸着画分を得ました。

8. Heparin-TOYOPEARL

DEAE-TOYOPEARL の非吸着画分約 70 ml を 3 倍容量の 6 M urea, 50 mM Tris/HCl pH 6.8, 5 mM KCl, 5 mM CaCl₂ で希釈し、1 ml の Heparin-TOYOPEARL (TOSOH, TSKgel AF-Heparin-TOYOPEARL650M) カラムにアプライしました。6 M urea, 50 mM Tris/HCl pH 6.8, 5 mM KCl, 5 mM CaCl₂ で洗い、更に 50 mM Na-phosphate pH 6.8, 5 mM KCl で洗いました。その後 50 mM Na-phosphate pH 6.8, 5 mM KCl の buffer を用いて 0 M から 0.5 M まで NaCl のグラジエントで溶出しました。最後は 0.5 M NaCl, 50 mM Na-phosphate pH 6.8, 5 mM KCl で溶出しました。非吸着画分は約 280 ml を 1 つにプールしましたが、吸着画分については 1 ml ずつ分画しました。この時電気泳動用に一部を分取した後、最終濃度 50 μg/ml となるように活性の安定化のために BSA を添加しました。Dot blot 法による活性測定後、活性 fraction はプールしました。

9. HW-75

6 M urea, 50 mM Tris/HCl pH 7.9, 5 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 0.5 M NaCl で平衡化した HW-75(TOSOH, TSKgel TOYOPEARL HW-75F) カラム (26 ml) に Heparin-TOYOPEARL カラムの活性画分 0.6 ml をアプライし、1 ml ずつ分画しました。

(7) 結合因子と 200 kDa 蛋白の結合

1. 用いる結合因子の量の検討

Heparin-TOYOPEARL 活性画分を結合因子の精製標品として用いました。以下の実験で用いる結合因子の量の検討をまず行いました。

(6) 3. とほぼ同様な方法で dot blot 法を行いました。精製した結合因子を用いた点が異なります。精製標品中には BSA が 50 μ g/ml で含まれていますので、サンプルの希釈系列は 50 μ g/ml BSA, 0.13 M NaCl, 50 mM Na-phosphate pH 6.8, 5 mM KCl の buffer で作成しました。その結果、ほぼ 10 ng/dot で飽和に達しましたので、5 ng/dot で以下の実験に用いることにしました。

2. 結合因子と 200 kDa 蛋白の結合

200 kDa 蛋白と反応させる時の 200 kDa 蛋白の濃度を変えて実験しました。この時、blocking 操作から 200 kDa 蛋白の反応終了までは 24 穴プレートを用いて 1 穴につき、溶液 1 ml とニトロセルロース膜 2 枚を入れました。Control の BSA の量は、結合因子の精製標品中に含まれているのと同量の 500 ng/dot としました。

3. NaCl の影響

(7) 2. とほぼ同様ですが、結合因子と 200 kDa 蛋白との反応時のみ NaCl の

濃度の変更のみ行いました。

4. pHの影響

(7) 2. とほぼ同様ですが、結合因子と 200 kDa 蛋白との反応時のみ緩衝液と添加する NaCl 濃度(0.1 M)を変更しました。緩衝液は pH 3,4,5,6 で 0.2 M citrate buffer、pH 6,7,8 で 0.2 M phosphate buffer、pH 7,8,9 で 0.5 M Tris buffer、pH 9,10 で 0.2 M carbonate buffer を原液として用いました。反応時には最終濃度 20 mM とし、反応後に pH を測定し (HORIBA, pH METER F-14)、実際の pH を求めました。

5. EDTA の影響

(7) 2. とほぼ同様ですが、結合因子と 200 kDa 蛋白との反応溶液を変更しました。反応溶液は 0.1 M Tris/HCl pH 6.8, 5 mM KCl, 0.5% skim milk, 5 mM NaCl (200 kDa 蛋白水溶液からの持ち込み)、1 μ g/ml 200 kDa protein に各濃度の EDTA を添加しました。

(8) 結合因子の局在

1. 抗体の調製

約 5~10 μ g の結合因子を含む Heparin-TOYOPEARL 精製標品は約 2 ml あり、このままでは容量が多いため免疫出来ません。そこで TCA 沈澱により濃縮しました。サンプルに 1/10 容量の 100% (W/V) の TCA を加え、4 $^{\circ}$ C で一晩放置しました。10,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 15 分間の遠心により蛋白を沈澱として回収しました。上清を除去後、TCA を除去するために氷冷アセトン を 2 ml 加え、再度遠心し沈澱を得ました。室温に放置し、沈澱を乾燥させ、140 μ l の PBS(-)(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄) と Complete Freund Adjuvant 140 μ l を添加し、

ソニケーションし、エマルジョン 300 μ l を作りました。1 ml のシリンジに入れ（針は TERUMO 22G \times 1 1/4"）、マウス 1 匹に免疫しました。シリンジに dead volume があるため、約 200 μ l 分のみ免疫出来ました。2 回目以降の免疫には Complete Freund Adjuvant の代わりに Incomplete Freund Adjuvant を用いました。免疫は計 4 回行いました。

尾動脈を切断し 150 μ l 採血しました。37 $^{\circ}$ C, 1 時間放置し血餅を作り、4 $^{\circ}$ C, 8 時間放置し血餅を凝集させました。3,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10 min. で遠心し血餅を沈澱させ抗血清を得ました。

抗血清の affinity purification は次のようにしました。結合因子を電気泳動シゲルからニトロセルロース膜 (BA-85, Schleicher and Schuell) へ、transfer buffer (190 mM Gly, 25 mM Tris, 20 % MeOH, 0.02 % SDS) 中で wet type の transfer 装置を用い 300 mA、4 時間、氷水冷しながら tranfer を行いました。Transfer 後、一部をアミドブラック染色液 (0.1 % Amide Black 10B, 45 % MeOH, 10 % acetic acid) で染色することにより、結合因子の含まれている部分を同定し、切り取り、rinse sol. (10 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100, 0.01 % sodium azide, 0.5 % skim milk) で洗浄し、5 % skim milk sol. (10 mM Tris/HCl pH 7.9, 0.01 % sodium azide, 5 % skim milk (no fat, Difco)) で 1 時間 blocking しました。抗血清 30 μ l を rinse sol. 2 ml で希釈し、この中で 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させました。反応後 rinse sol. で 3 回室温で洗浄し、ニトロセルロース膜を細かく切り、1.5 ml tube に入れました。0.2 M Gly/HCl pH 2.8 を 0.5 ml 加え、激しく 3 分間 voltex を行い結合した抗体を引きはがしました。1 N KOH を少しずつ添加し中和し、1 % BSA-PBS(-) を 50 μ l 加え非特異的蛋白の吸着を抑えるようにしました。得られたサンプルを分注し -20 $^{\circ}$ C に保存しました。

2. ウェスタンブロット法 (Towbin *et al.*, 1979)

電気泳動で分離した蛋白は、ゲルからニトロセルロース膜 (BA-85, Schleicher and Schuell) へ、transfer buffer (190 mM Gly, 25 mM Tris, 20 % MeOH, 0.02 % SDS)

中でwet type の transfer 装置を用い 300 mA、4 時間、氷水中で transfer を行いました。Transfer 後、ニトロセルロース膜を rinse sol.(10 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100, 0.01 % sodium azide, 0.5 % skim milk) で洗浄し、5 % skim milk sol.(10 mM Tris/HCl pH 7.9, 0.01 % sodium azide, 5 % skim milk (no fat, Difco)) で 1 時間 blocking しました。そして、ニトロセルロース膜を洗浄し一次抗体と反応させました (4 °C、一晩)。一次抗体は affinity purify した抗結合因子抗体 100 μ l を rinse sol. 2 ml で希釈したものを用いました。Rinse sol. で室温でよく洗浄した後、放射標識した二次抗体 (74 kBq、¹²⁵I-anti mouse IgG) と室温で 2 時間反応させました。Rinse sol. でよく洗浄した後、フィルターを乾燥させ、Kodak XAR film を用いてオートラジオグラフィーをとりました。

(9) その他

1. 蛋白定量

蛋白定量は、Lowry らの方法 (1951) に従いました。

2. 電気泳動法 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

Laemmli の方法 (1979) に従いました。試料は、SDS-sample buffer(18 mM Tris/HCl pH 6.8, 2 % SDS, 0.005 % BPB, 2 % 2-Mercaptoethanol, 10 % glycerol) 中で熱処理 (75 °C, 20 分) し、変性させました。電気泳動後のゲルは、Fairbanks らの方法 (1971) で染色しました。

蛋白濃度の低いサンプルについては、TCA を用いて濃縮しました。サンプルに 1/10 容量の 100 % (W/V) の TCA を加え、4 °C で一晩放置しました。10,000 \times g, 4 °C, 15 分間の遠心により蛋白を沈澱として回収しました。上清を除去後、TCA を除去するために氷冷アセトンを最初のサンプルと同量加え、再度遠心し沈澱を得ました。室温に放置し、沈澱を乾燥させたものを濃縮サンプルとしました。

REFERENCES

- Bodenstein, D. (1950) The postembryonic development of *Drosophila*. In *Biology of Drosophila* (Edited by Demerec M.), pp.275-367. Hafner, New York.
- Dean, R.L., Locke, M. and Collins, J.V. (1985) Structure of the fat body. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Edited by Kerkur, G.A. and Gilbert, L.I.), Vol.3, pp.155-210. Pergamon Press, Oxford.
- Fairbanks, G., Steck, T.L. and Wallach, D.F.H. (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**, 2606-2617.
- Hunter, W.M. and Greenwood, F.C. (1962) Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* **194**, 495-496.
- Kawaguchi, N., Komano, H., and Natori, S. (1991) Involvement of *Sarcophaga* lectin in the development of imaginal discs of *Sarcophaga peregrina* in an autocrine manner. *Dev.Biol.* **144**, 86-93.
- Kobayashi, H., Kurata, S., and Natori, S. (1991) Purification of the 200 kDa hemocyte membrane protein of *Sarcophaga peregrina* and its specific interaction with fat body. *Insect Biochem.* **21**, 512-522.
- Kurata, S., Komano, H., and Natori, S. (1989) Dissociation of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) fat body by pupal haemocytes *in vitro*. *J.Insect Physiol.* **35**, 559-565.
- Kurata, S., Saito, H., and Natori, S. (1990) Participation of hemocyte proteinase in dissociation of the fat body on pupation of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *Insect Biochem.* **20**, 461-465.
- Kurata, S., Kobayashi, H., and Natori, S. (1991) Participation of a 200 kDa hemocyte membrane protein in dissociation of the fat body on metamorphosis of *Sarcophaga*. *Dev.Biol.* **146**, 179-185.
- Kurata, S., Saito, H., and Natori, S. (1992a) Purification of a 29-kDa hemocyte proteinase of *Sarcophaga peregrina*. *Eur.J.Biochem.* **204**, 911-914.

- Kurata,S., Saito,H., and Natori,S. (1992b) The 29-kDa hemocyte proteinase dissociates fat body at metamorphosis of *Sarcophaga*. *Dev.Biol.* **153**, 115-121.
- Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lockshin,R.A. (1985) Programmed cell death. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Edited by Kerkut,G.A. and Gilbert,L.I.), Vol.2, pp.301-317. Pergamon Press, Oxford.
- Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L. and Randall,R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.biol.Chem.* **193**, 265-275.
- McGuckin,W.F., and McKenzie,B.F. (1958) An improved periodic acid fuchsin sulfite staining method for evaluation of glycoproteins. *Clin.Chem.* **4**, 476-483.
- McCauley,R., and Racker,E. (1973) Separation of two monoamine oxidases from bovine brain. *Molecular and Cellular Biochemistry* **1**, 73-81.
- Ohtaki,T. (1966) On the delayed pupation of the flesh fly, *Sarcophaga peregrina* Robineau-Desvoidy. *Jap.J.med.Sci.Biol.* **19**, 97-104.
- Sehnal,F. (1985) Morphology of insect development. *Ann.Rev.Ent.* **30**, 89-109.
- Spiro,R.G. (1972) Study of the carbohydrates of glycoproteins. In *Methods in ENZYMOLOGY* (Edited by Ginsburg,V.),Vol.28, pp.3-43. Academic Press, Inc., New York.
- Towbin,H., Staehelin,T., and Gordon,J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **76**, 4350-4354.
- Zacharius,R.M., Zell,T.E., Morrison,J.H. and Woodlock,J.J. (1969) Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal.Biochem.* **30**, 148-152.

謝辞

本論文を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて下さり、研究に対する御理解と御指導を賜りました東京大学薬学部微生物薬品化学教室、名取俊二教授に深い感謝と敬意の念を表します。

本研究に対し、終始暖かく厳しい御指導をして頂きました九州大学薬学部、関水久教授に心から感謝いたします。

本研究に対し、常に有益な御助言、御批判を頂きました東京大学薬学部、久保健雄講師、東京大学薬学部、駒野宏人助手に心から感謝致します。

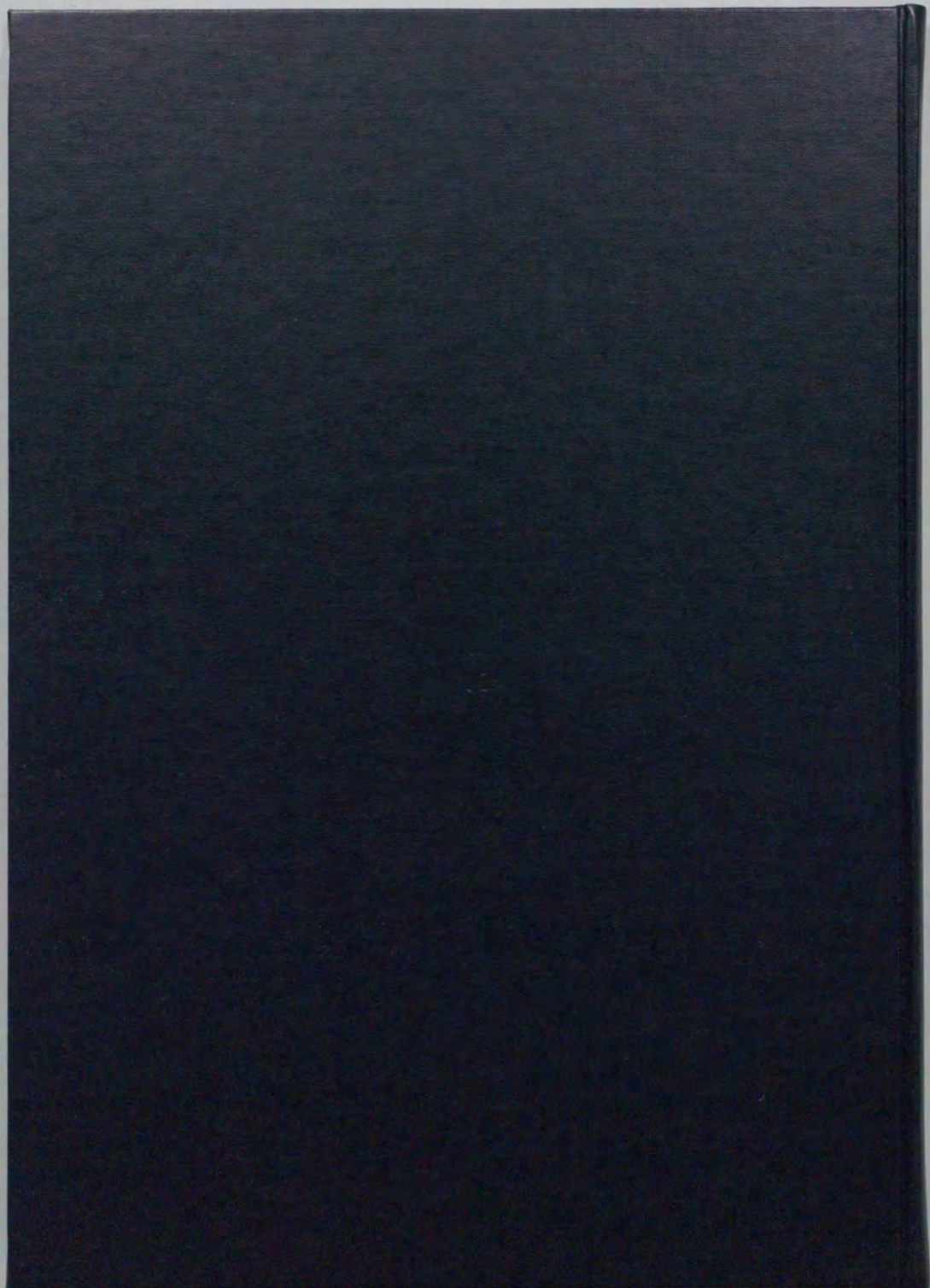
本研究を行う端緒を与えて頂き、研究を遂行する上での考え方を学ばせて頂きました東京大学薬学部、倉田祥一朗助手に感謝致します。

また、実験を進めるにあたり、有益な討論をして頂きました東京大学薬学部微生物薬品化学教室の皆様にご感謝致します。

本研究は日本学術振興会特別研究員の研究奨励金の援助を受けて行われたものです。

1993年1月20日

小林 秀昭



inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

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

