

第2章

バキュロウイルスー昆虫細胞系を用いて

発現させた h A R の精製とその特性

[はじめに]

従来より A R はポリオール経路の key enzyme として糖尿病研究者の注目を集めてはいたが、動物組織から精製される A R 酵素蛋白は比較的微量である。また、精製途中で生じる酵素の失活、アミノ酸残基の修飾、ペプチド結合の切断、酸化によるジスルフィド結合の形成に伴う A R の活性化と阻害剤に対する不応 (44~46) などは A R の詳細な characterization を困難なものにするばかりか、新しい A R 阻害剤の開発においても障害となっている。したがって、大量かつ、安定な A R の供給源を確保することは糖尿病慢性合併症の研究に大きく貢献するのみならず、種々の A R 阻害剤を開発する際には、スクリーニングテスト用標準酵素蛋白として使用できるので、治療的意義も大きい。さらに、将来的には酵素蛋白を結晶化し、X線回析によって3次元構造を分析し、活性中心に相補的な、強力かつ副作用の軽微な A R 阻害剤をデザインする道が開かれる。

米国ではいくつかの研究室でラットの A R c DNA を大腸菌に導入し、発現させる実験を行っているが、いずれも A R の大量発現には成功していない。さらに、発現系に大腸菌を用いているために、真核細胞と同一の蛋白修飾が起こらないという欠点があり、正確で詳細な A R の characterization を行ううえでは、やや難がある。そこで、このような問題点を解決するために、我々はバキュロウイルスー昆虫細胞発現系に注目した。

昆虫ウイルスであるバキュロウイルスは従来、殺虫剤としての応用を期待されていたが、近年、発現ベクターとしての可能性が示され (47)、細菌から動植物まで、また、可溶性蛋白から膜蛋白質まで、由来も性質をも異にするさまざまな組換え蛋白質が

この系で作られている（48～52）。発現ベクターとして用いられているバキュロウイルスは、核多角体病ウイルス（NPV）に属する *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*（AcNPV）とカイコNPVであり、いずれもポリヘドリンと呼ばれる核封入体構成蛋白質を細胞内で産生する。我々が用いたAcNPVでは、ウイルス感染末期に細胞総蛋白質の25%以上をポリヘドリンが占めるといわれ（53）、しかもポリヘドリンはウイルスの増殖に必須ではない。これらの特徴から、ポリヘドリン遺伝子を目的の蛋白質cDNAに組換え、強力なポリヘドリンプロモーターによって目的とする蛋白質を大量に発現させる系が開発されている。

バキュロウイルスは120kbと大きいゲノムを持つため、外来遺伝子を直接ウイルスに導入することは難しい。そこでポリヘドリン遺伝子とその上流および下流領域のそれぞれ2～3kbを含むゲノム断片をクローニングし、転移ベクター（pAcYM1）が構築された（54）。外来遺伝子はポリヘドリンプロモーター直後のクローニングサイトに導入される。転移ベクターは野生株AcNPVゲノムとともに蛾（*Spodoptera frugiperda*）の小腸培養細胞（SF9）に co-transfectionされ、細胞内で homologous recombination が生じて、野生株ゲノムのポリヘドリンプロモーター直後に目的とする蛋白質cDNAが組み込まれる（図3）。ポリヘドリン封入体を形成する野生株ウイルスプラークと、封入体を形成しない組換え体プラークとの光学的性質の差を目視、あるいは実体顕微鏡下で確認する。目的とする感染細胞をクローニングし、大量に培養して、目的蛋白質の精製材料とする。理由は不明であるが、発現した蛋白質は感染細胞内のみならず、培養液上清中にも出てくる場合が多いので、これを精製の出発材料とすれば夾雑蛋白質も少なく、容易に目的蛋白質を高度に精製できる。さらに、バキュロウイルス-昆虫細胞系を用いて発現させた哺乳類の蛋白質は、細菌や酵母の系と異なり、本来その蛋白質が存在する組織中と同様のプロセッシングや修飾を期待することができる。

[方法]

(I) バキュロウイルスー昆虫細胞発現系

SF9細胞への遺伝子導入法、バキュロウイルスのタイトレーション、目的とする感染細胞の選択は、基本的に文献(55)に従った。

① SF9細胞への遺伝子導入

pAcYM1のクローニングサイトにEcoRIリンカーを用いてhARcDNAを挿入した。これをAcNPVとともに、リン酸カルシウム法を用いてSF9細胞にco-transfectionした。10%FCSを含むGrace培地(GIBCO)中で28℃、3~5日間培養した後、上清を採取し、その中に含まれるウイルスをタイトレーションした。

② ウイルスのタイトレーション

1.5~2.0×10⁶個のSF9細胞を径35mmのディッシュにまいて吸着させ、その上から段階希釈したウイルス溶液を100μl滴下した。さらに、培養液を含む3%アガロース液を2ml重層し、固めた後、28℃で3日間培養し、0.01%のニュートラルレッドを含むPBSを1ml重層し、さらに1晩培養した。プラークはニュートラルレッドを取り込まない領域として認識される。その数からウイルスのpfuを算出した。

③ プラークスクリーニング

SF9細胞で覆われた径150mmのディッシュ10枚に①で得たウイルス溶液100pfuずつ加え、②と同様に培養した。4日目に目視と実体顕微鏡とによって、ポリヘドリンを産生していないプラークを選択し、採取して培養液中に入れた。培養液中に放出されたウイルスをタイトレーションし、再びSF9細胞に感染させ、全てのプラークにポリヘドリンが含まれない状態になるまでこの操作を繰り返し、組換えウイル

スをクローニングした。

④大量培養

SF9細胞をローラーボトル中で浮遊細胞として増殖させ、③で得られた組換えウイルスを感染させ、4日間培養し、その培養上清を採取した。感染細胞と培養上清の一部とをサンプルとしてSDS-PAGEを行い、感染細胞内にポリヘドリン蛋白質のバンドが検出されないこと、培養上清に目的とする蛋白質と考えられるバンドが検出されることを確認した。

(II) 組換えhARの精製

(I)の④で得られたhARを含む培養液上清に、2-MEが5mMとなるように加え、精製時まで4℃で保存した。

2mMDTTを含む20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)で平衡化したSephadex G-25 columnを用いて培養上清を脱塩し、Centriprep-10 (Amicon)によって濃縮した後、同じ緩衝液で平衡化したMatrix gel orange A column (Amicon)にアプライした。カラムを同緩衝液で充分洗った後、hARを0.2mMのNADPHを含む同緩衝液で溶出した。

蛋白質濃度はプロテイン・アッセイキット (Bio-Rad) で測定した。

酵素活性測定は、150 μ M NADPH、10mM glycer aldehydeを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)中、25℃で行い、ARによるNADPHの酸化を340nmにおける吸光度の減少として測定した。一方、glycer aldehydeを加えずに測定した吸光度の減少をNADPHの非特異的酸化として、その値を差し引いた。

(III) 組換えhARの特性

① 分子量

Laemmli の方法 (56) に基き、12.5% のゲルで、SDS-PAGE を行い、銀染色 (57) した。

② 等電点

Phast system (LKB-Pharmacia) を用いて、水平等電点電気泳動を行い、クマシー R 350 で染色した。

③ N 端のプロセッシングと修飾

精製した hAR 蛋白を直接、自動アミノ酸シーケンサー (Applied Biosystem Model 477A) にアプライしたところ、N 端はブロックされていた。そこで、hAR の Cys 残基をヨードアセトアミドによってアルキル化 (58) した後、6M グアニジン存在下に 2M ヒドロキシルアミン (pH 9.0) と 45°C、4 時間インキュベートし、Asn-9 と Gly-10 間のペプチド結合を切断した (59、図 4)。生じた N 端側のペプチドを C18 カラムを用いた逆相 HPLC によって精製し、0.1mM DTT を含む 10mM リン酸緩衝液中で、N-アシルアミノ酸遊離酵素 1 単位を作用させた。遊離した N 端の修飾されたアミノ酸を C18 カラムを用いた逆相 HPLC にアプライし、その retention time をメチオニン、アラニン、アセチルアラニン、メチルアラニンの標準物質の retention time と比較することによって、同定した。さらに、N 端のアミノ酸から修飾基を解離させるために、0.1% TFA 存在下で 60°C、1 時間インキュベートし、再び C18 カラムを用いた逆相 HPLC によって解析した。また、deblocking された N 端側のペプチドは自動アミノ酸シーケンサーによって解析した。

④ C 端のプロセッシング

精製した hAR の Cys 残基を 8M 尿素中でヨードアセトアミドによってアルキル

化し、水で4倍に希釈した後、hARの1/50重量のTPCK-トリプシン(Worthington Biochemical)を加え、37℃で2時間インキュベートした後、さらに同量のTPCK-トリプシンを加え、18時間インキュベートした(60)。これを、20 mM塩化カルシウムを含む50 mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.2)で平衡化したアンヒドロトリプシンアガロースカラム(61)にアプライし、素通りした分画を採取した。さらにこれをC18カラムを用いた逆相HPLCにかけ、C端側のペプチドを高度に精製したのち、自動アミノ酸シーケンサーで解析した。

⑤ 糖鎖の結合

hARのアミノ酸配列には、N-glycosylation siteの consensus sequence (1文字表記で、N-X-T)が含まれており、Asn-242に糖鎖が結合している可能性がある(図4)。そこで、同部に糖鎖が結合しているかどうかを検討するために、N-glycosidase F (Boehringer-Mannheim Biochemica)を作用させ、その後のSDS-PAGEでの泳動度の変化を観察する方法(62)と、同部を含むペプチド断片を精製し、自動アミノ酸シーケンサーで直接、解析するという2つの方法を用いた。

hAR 100 μ gを0.1% SDS、5 mM DTTを含む50 mMリン酸ナトリウム緩衝液中で5分間煮沸し、n-octylglucosideを1%になるように加え、さらにN-glycosidase Fを12単位加え、37℃で1晩インキュベートした。SDS-PAGEのサンプル用緩衝液を加えることによって反応を止め、そのままSDS-PAGEにアプライした。

Asn-242の直前に存在するAsp-231とPro-232間のペプチド結合(図4)を切断するために、hAR 1 mgを15 mM HCl中で110℃、5分間処理した(63)。その後、Sephadex G-25 columnにて脱塩し、22.5%のSDS-PAGEを行い、セミドライプロット方式(Sartoblot II)を用いてPVDF膜(Millipore)に転写し、0.1%アミドブラックにて染色した。分子量からAsn-242を含むと考えられるバンドを切り取り、自動アミノ酸シーケンサーで解析した。

⑥ 酵素学的検討

NADPH、glyceraldehydeの濃度をさまざまに変化させAR活性を測定することによって、両者に対する K_m 、 K_{cat} などを算出した。また、glyceraldehyde以外の基質に関しても、同様に検討した。さらに、硫酸イオンがこれらのパラメーターに及ぼす影響もあわせて検討した。

⑦ AR阻害剤の効果

さまざまなAR阻害剤の存在下にARの酵素活性を測定し、その IC_{50} 値を求めた。

[結果]

(I) バキュロウィルス-昆虫細胞系によるhARの発現

図5に示すように、組換えの起こったウィルス(AcAR)に感染した細胞内では、ポリヘドリンは産生されず、代わりにhARが大量に発現していることが確認された。また、野生株AcNPVに感染したSF9細胞の培養液上清にはポリヘドリンは検出されなかったのに対して、AcARに感染したSF9細胞の培養上清中にはhARが含まれていた。

(II) 組換えhARの精製

図6にMatrix gel orange A columnを用いたアフィニティークロマトグラフィーのelution profileを示す。hAR以外のほとんどの蛋白質はカラムに吸着されずに溶出した。一方、カラムに吸着したhARは、0.2 mMのNADPHによって、特異的に溶出さ

れた。100 ml の培養液上清から約80%の収率で5 mg以上のhARが精製され、この精製方法が極めて有効であることが示された。

(III) 組換え hAR の特性

① 分子量

組換え hAR とヒト筋肉より精製された AR (64) とは SDS-PAGE において泳動距離が等しかった (図5、図7、A)。

② 等電点

組換え hAR とヒトの筋肉より精製された AR とは、等電点電気泳動において同じ pI を示した (図7、B)。

③ N端のプロセシングと修飾

N-アシルアミノ酸遊離酵素によって遊離したアミノ酸の逆相 HPLC における retention time は、アセチルアラニンのそれと一致した (図8、A、B)。さらに、同物質を 0.1% TFA 存在下で 60℃、1時間インキュベートすることにより、新たに、アラニン、酢酸と考えられるピークが検出された (図8、C)。したがって、組換え hAR の N端アミノ酸はアセチルアラニンであると同定された。また、deblocking 後の N端側のペプチドのアミノ酸配列は、1文字表記にて、S-R-L-L-L-Nであった (図9、A)。また、Met は検出されなかった。

④ C端のプロセシング

アンヒドロトリプシンカラムと C18カラムによる HPLC とによって精製された C端側のペプチド (図10) のアミノ酸配列は、1文字表記にて、V-(C)-A-L

-L-S-(C)-T-S-H-K-D-Y-P-F-H-E-E-Fであった(図9、B)。

⑤ 糖鎖の結合

hARをN-glycopeptidase Fで処理しても、SDS-PAGEにおける泳動度は変化しなかった。一方、陽性対照として用いた ovalbumin は、N-glycopeptidase F 処理によって、明らかに泳動度が亢進した(図11、A)。また、Asn-242を含むペプチドを自動アミノ酸シーケンサーによって解析したところ、Asn-242に当たるサイクルで、Asnが高収率で検出された(図11、B)。したがって、少なくとも大部分の組換えhARのAsn-242に、糖鎖は結合していないと結論された。

⑥ 酵素学的検討

さまざまな基質や補酵素NADPHに対する組換えhARの K_m 、 K_{cat} 、 K_{cat}/K_m と、硫酸イオンの影響を表1にまとめた。

⑦ AR阻害剤の効果

組換えhAR(RHAR)、ヒト睾丸AR(HT)、ラット睾丸AR(RT)、ラット水晶体AR(RL)、ウサギ水晶体AR(RaL)それぞれに対する、さまざまなAR阻害剤の IC_{50} を表2にまとめた。

[考察]

従来より、NADPHやNADPを補酵素とする酵素の精製には、補酵素のアナログであるさまざまな色素を結合したアフィニティーカラムが用いられてきたが、hAR

の精製には Matrix orange A column によるアフィニティークロマトグラフィーが極めて有効であることが示された。AR 以外に NADPH を補酵素とする酵素はほとんど全て SF9 細胞内に存在する。したがって、培養液上清中に hAR が含まれており、その他の NADPH 要求酵素と隔絶されていることも、精製を非常に容易にする要因の 1 つである。SF9 細胞中に産生された蛋白質がどのような機構で細胞外に移動するのかに関してはよくわかっていない。AcAR に感染した SF9 細胞が崩壊して細胞内の hAR を培養液中に放出するという可能性はある。しかしながら、野生株の AcNPV に感染した SF9 細胞の培養液上清中にはポリヘドリンが検出されないことを考えると、細胞崩壊によって放出される hAR は存在したとしてもごく微量であり、hAR が培養液中に移動する主要な機序とは考えにくい。いずれにしても、培養液上清中に hAR が大量に含まれており、精製のステップが簡略で、短時間で終了するということは、精製蛋白質の収率の向上、さらには、精製途中で生じるさまざまな蛋白質の変性、修飾の防止につながる。しかも大量の酵素蛋白質を背景にして、hAR の分子量、等電点、1 次構造、さまざまな基質や AR 阻害剤に対する親和性などを正確、かつ詳細に検討することができる。

組換え hAR の分子量、等電点はヒト組織中の AR のそれと同一であった。さらに、1 次構造の解析の結果、N 端のメチオニンがプロセッシングにより切り放されており、次のアラニンがアセチル化されて、成熟蛋白質の N 端となっていた。C 端はプロセッシングも残基の修飾も受けていなかった。Asn-242 に関しては、N-glycosylation の consensus sequence が存在するにも拘らず、糖鎖が結合していなかった。これらの 1 次構造解析の結果は牛の水晶体から精製された AR に関して行われた 1 次構造解析の結果と全く一致した (68)。したがって、バキュロウイルス-昆虫細胞系で発現させた hAR は哺乳類と同一の蛋白修飾を受けており、ヒト組織中の AR とも同一分子であると考えられる。組換え hAR に糖鎖が結合していなかったのは SF9 細胞にその能力がなかったからというわけではない。脊椎動物と昆虫細胞とでは、糖鎖の構造は多少異なるけれども、多くの報告がバキュロウイルス-昆虫細胞系で発現させた蛋白質には糖鎖が結合することを示している (69~70)。牛の水晶体 AR においても、N-glycosylation

site の consensus sequence が存在するにも拘らず糖鎖が結合していないことから、糖鎖の結合のシグナルは特定のアミノ酸配列だけで決定されるのではないのかもしれない。また、糖鎖が結合するゴルジ体の中の環境においてはARのAsn-242は蛋白質分子の内側にたたまこまれているのかもしれない。

組換え hAR の各基質に対する K_m 値に関しては、D-glucose と D-galactose では高値をとり、D-xylose と D-glucuronate では mM のオーダーであり、DL-glyceraldehyde では最小値であった。補酵素 NADPH に対する K_m 値は $4 \mu M$ であった。これらの値はヒトの胎盤 (71、72) あるいは脳 (73) から精製された AR の値と同等である。組換え hAR の、さまざまな基質に対する K_{cat} 、 K_{cat}/K_m も、ヒト筋肉から精製された AR (64) で求められた値と同等であった。また、高濃度の硫酸イオンは hAR の DL-glyceraldehyde や D-glucose に対する K_m 、 K_{cat} を明らかに上昇させた。また、基質が飽和濃度で存在するときには、高濃度の硫酸イオンは hAR の活性を約 2 倍に上昇させる (66、73)。硫酸イオンが hAR に及ぼす影響の分子機構は不明であり、また、使用している硫酸イオンの濃度が非生理的に高いので、実際に細胞内で起こる現象ではない。しかし、hAR が周囲の状況に応じて、基質や補酵素との親和性が変化し、活性化し得るということは重要な所見である。従来より、hAR は酸化によって活性化し、しかも AR 阻害剤の効果が減弱するといわれている (44~46)。この現象は強力なチオール基保護剤である DTT を添加することによって阻止できることから、hAR に本来存在しないジスルフォニル結合が酸化によって生じ、hAR の 3 次元構造が変化したためと考えられる。同様な現象は、糖尿病で障害された組織中で細胞の還元力が低下し、生理的なチオール基保護剤であるグルタチオンが減少した場合に起こり得ると考えられ (74)、糖尿病組織中で報告されている AR の活性化と AR 阻害剤に対する不応の 1 つの説明となっている。

今回の組換え hAR に対する AR 阻害剤の効果に関する検討は、DTT 存在下の還元状態でのみ行い、その結果を従来の報告に見られるデータと比較している。組換え AR については、Epalrestat に対する IC_{50} 以外はほぼ、ヒト辜丸から精製された AR と同

様の IC_{50} 値とあってよい。従来より、ARの阻害剤に対する IC_{50} は種間、同種組織間、あるいは研究室間でも異なっており、これらの相違が真の種間、組織間のARの相違によるものであるのか、ARの精製時、あるいは、保存期間中に生じた酸化、変性によるものであるのかは今後の検討を待たなければならない。しかしながら、今回、バキュロウイルスー昆虫細胞系によって大量かつ、簡便にヒト組織中と同一のAR蛋白質を非変性、非酸化状態で供給することが可能になった。この組換えhARは糖尿病性慢性合併症の研究を行ううえで、あるいは、新たなAR阻害剤を開発する際のスクリーニングを行ううえで、貴重な標準蛋白質標品となり得ると思われる。

[小括]

バキュロウイルスー昆虫細胞系を用いてhARを発現させ、簡便に、かつ大量に精製する方法を確立した。組換えhARに関して、分子量、等電点、蛋白プロセッシング、N端アミノ酸の修飾、糖鎖の有無、酵素学的指標、阻害剤に対する IC_{50} などを検討した結果、ヒト組織中のARと同一分子であると考えられ、今後、糖尿病性合併症の研究や新たなAR阻害剤のスクリーニングテストを行ううえで、大きな貢献をし得ると思われる。