

## 研究成果報告書

---

細胞質タンパク質におけるジスルフィド結合の新しい機能

---

16570092

平成 16 年度～平成 18 年度科学研究費補助金  
(基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成 19 年 5 月

研究代表者 小 谷 昌 司

新潟大学 自然科学系 教授

## はじめに

分泌タンパクや膜タンパクにはジスルフィド結合が多く存在しタンパク質の安定化に寄与している。これらのジスルフィド結合は小胞体内腔の酸化環境でタンパク質ジスルフィドイソメラーゼなどの働きで形成される。これに対し、細胞質は還元的な雰囲気であり、タンパク質がジスルフィド結合をもつ例はチオレドキシンなど酸化還元に関与するタンパクの反応過程に一過性に生じる場合に、ほとんど限られている。ところがわれわれは最近ラットの上皮細胞のFABP(C-FABP)に2個のジスルフィド結合を証明した。また硬骨魚類の肝臓のFABP(L-FABP)にはそれとは異なる位置に1個のジスルフィド結合が存在することも見いだした。一次構造が明らかで複数のシステイン残基を含むFABPについて、分子モデリング法で立体構造モデルを計算したところ、無類類(カワヤツメ)や軟骨魚類(サメ)のL-FABP、ほ乳類の末梢神経ミエリンのFABPにも同じ位置にジスルフィド結合が存在していることが判った。このように進化上遠く離れた生物間で空間的に近接してSS結合がかかり得る位置にシステイン残基が保存されていることは、このジスルフィド結合が何らかの生物学的に重要な役割を果たしていることを強く示唆している。本研究では従来ほとんど注目されていない細胞質タンパクにおけるジスルフィド結合の意義とその形成機構についての知見を得ることを目的としている。

一方、タンパク質におけるシステイン残基の役割はその高い反応性をもつチオール基による酵素の触媒部位残基、あるいはZnフィンガードメインなどにみられる金属イオンの配位子としての機能が主なものと考えられる。しかし、特に細胞質タンパクにはしばしば機能不明のシステイン残基をもつものが見られる。以前にわれわれはラット肝のFABPのシステイン残基にグルタチオンおよびシステインが混合ジスルフィド結合した分子種を報告したが、最近これらの分子種が試験管内でタンパク質分解酵素により急速に分解されることを見いだした。したがって、これが細胞内タンパク質の半減期を決定するシグナルの一つではないかと考えられるため、この点を明らかにしたい。

細胞質におけるジスルフィド結合の存在と意義については酸化還元に直接かかわるタンパク質以外では十分認識されていない。SS結合や混合ジスルフィドの形成しやすさはシステインの周辺のアミノ酸配列と立体構造上の位置で決まる酸化還元電位に拠っていると考えられるため、個々のタンパク質に固有のパラメータとみなし得る。したがってこれがタンパク質個別の寿命を決定する因子や酸化還元によるタンパク質機能調節機構の一つとして確立されることが期待される。

活性酸素分子種による酸化的ストレスとNF- $\kappa$ Bなどの転写因子の活性化やアポトーシスの誘導による生体防御については活発な研究が行われている。これらはペルオキシレドキシンの発見とともに国内生化学者の貢献が大きい。グルタチオン化反応は酸化ストレス時のプロテオーム解析の一環として注目されている。また最近大腸菌では酸化ストレスに対応してシステイン→ジスルフィド結合の変換による分子シャペロンの活性化が起こることが報告された。本研究ではタンパク質分子内、分子間ジスルフィド結合およびタンパク質と低分子チオール化合物との混合ジスルフィド生成という観点か

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 16 年度	1,700,000	0	1,700,000
平成 17 年度	800,000	0	800,000
平成 18 年度	700,000	0	700,000
総計	3,200,000	0	3,200,000

研究発表

（１）学会誌等

Oyama, Y. 他 Evidence for megalin-mediated proximal tubular uptake of L-FABP, a carrier of potentially nephrotoxic molecules. *Laboratory Investigations*. 85 (1) 522-531 (2005)

Saijoh, H.他 A novel cysteine protease inhibitor with lectin activity from the epidermis of the Japanese eel *Anguila japonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 141(1) 103-109

（２）口頭発表

（３）出版物

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

## 研究成果

蛋白質を構成するアミノ酸の中でシステインはもっとも高い求核反応性を持つ。そのため多数の酵素の触媒中心として機能しており、また Zn-フィンガー(Coleman et al., 1992)などに見られる金属原子の配位子としても機能していることが知られている。しかしその一方で、細胞内タンパク質においてその機能が不明のシステイン残基を持つものがしばしば見られる。このような化学的に反応性の高い遊離チオール基が存在することは、酸化及び重金属の非特異的結合などによる構造変化など、蛋白質自体にマイナスの効果をもたらす可能性が高いと思われる。それにもかかわらず、蛋白質そのものの機能とは無関係と考えられるシステイン残基が、多くの細胞内蛋白質で保存されている。このことは、これらのシステイン残基がそれぞれのタンパク質の未だ明らかにされていない特定の機能を有することを強く示唆するものである。

脂肪酸結合タンパク質 (fatty acid-binding protein : FABP) は分子量約 14-15kDa の長鎖脂肪酸と高い親和性をもつ細胞質可溶性タンパク質群であり、ミエリン P2 スーパーファミリーと呼ばれるマルチジーンファミリーを形成している(Kaikaus et al., 1990; Ockner, 1990; Spener and Borchers, 1992; Veerkamp et al., 1993; Veerkamp and Maatman, 1995)。FABP は組織特異的な細胞質タンパクであり、一次構造上の違いから、肝型 (L-FABP) (Takahashi et al., 1982)、腸型 (I-FABP) (Alpers et al., 1984)、心筋型 (H-FABP) (Sacchettini et al., 1986)、脂肪細胞型 (A-FABP) (Hunt et al., 1986)、脳型 (B-FABP) (Schoentgen et al., 1989)、上皮型 (C-FABP) (Madsen et al., 1992; Watanabe et al., 1994)、回腸型 (ileum-FABP) (Sacchettini et al., 1990)、末梢神経細胞型 (ミエリン P2 タンパク質) (Kitamura et al., 1980)が存在する。また、レチノール結合タンパク (Sundelin et al., 1985a)、レチノイン酸結合タンパク (Sundelin et al., 1985b) もこのファミリーに属する。これらの多くのものがシステイン残基をもつがその機能は明らかでない。

これらのタンパク質のなかでも L-FABP は他とは異なる性質をもつ。一般に FABP は脂肪酸と 1:1 のモル比で結合するのに対し、L-FABP は FABP1 モル当り 2 モルの脂肪酸を結合するとの報告がある (Cistola et al., 1989; Schroeder et al., 1993; Rolf et al., 1995)。しかし、内因性の分析比ではほぼ等モルの脂肪酸を結合している。また、脂肪酸以外の疎水性物質であるビリルビン (Cannon and Eacho, 1991)、アニノナフタレンスルホン酸 (Sugiyama et al., 1982)、アミノアゾ色素 (Ketterer et al., 1976) などと結合することから細胞毒性物質からの防御機能をもつとも考えられている。L-FABP はイオン交換クロマトグラフィーなどで数種類の分子種に分離され (Li and Ishibashi, 1992)、それらは翻訳後修飾によるものと考えられる。

細胞質内のシステイン残基を有するタンパク質はグルタチオンやシステインなどといった低分子チオール化合物と混合ジスルフィドを形成している場合があり、タンパク質機能を調節し

ている例が多数報告されている(杉山, 1988; Liang and Pelletier, 1988; Offermann et al., 1984)。この反応は細胞質が酸化的な雰囲気になると促進され、活性酸素などの酸化ストレスからチオール基を保護すると考えられている(Thomas et al., 1995)。最近このようなシステイン残基が酸化的ストレスにおける、シグナル伝達や転写調節に深く関わっていることが認識されてきている(Fratelli et al., 2002)。

われわれの研究室ではこれまでラット L-FABP における N 末端アセチル基の部分的脱離(Takahashi et al., 1983)、Asn-105 の脱アミドとペプチド結合の  $\beta$  カルボキシ基への転位(Odani et al., 1994)などを見いだしてきた。また Cys-69 へのシステインとの混合ジスルフィド結合などの翻訳後修飾を見だし(Odani et al., 1988)、プロテアーゼ感受性の増加を見いだした(Sato et al., 1996)。

L-FABP にはそれを発現する生物種に高度に保存されているシステイン残基が存在する。哺乳類では Cys-69 が、爬虫類では Cys-81、両生類では Cys-91、硬骨魚類では Cys-81 と Cys-92、Cys-98 をもつもの、Cys-81 と Cys-92 に保存されているものと Cys-81 だけを有するものの 3 パターンが確認されている。鳥類では chicken (*Gallus gallus*) の L-FABP で Cys-81 だけをもつもの(Cecilian et al., 1994)と、2 ケ所にシステインをもつものが 2 種(Murai et al., 2001)、報告されている(2 ケ所の位置は Cys-69 と Cys-81、Cys-81 と Cys-92)。一次構造上の位置の差はあれ、このようなシステイン残基の保存は遊離チオール基によるタンパク質機能の調節がなされていることを強く示唆している。本研究ではラット同様にシステインを 1 残基有するウシガエル(*Rana catesbeiana*) L-FABP (Baba et al., 1999)とタテガミトカゲ(*Anolis pulchellus*) L-FABP(Morales et al., 1995)を用いた実験を行い遊離のチオール基がタンパク質機能へ及ぼす影響を明らかにする事を目的とした。また、システインを 3 残基をもつズキの L-FABP において、それらがジスルフィド結合可能な距離に存在することが分かっている(Odani et al., 2001)。細胞質タンパクはその存在する還元的な雰囲気のため、ジスルフィド結合を形成することは稀であるとされている。細胞質タンパクのチオール基機能を明らかにする観点から、今回同じ硬骨魚類であるゼブラフィッシュ(*Brachydanio rerio*) の L-FABP において細胞内ジスルフィド結合形成の可能性を検証し、それによるタンパク質機能への影響を明らかにすることを試みた。

## 材料と方法

### [材料]

*Rana catesbeiana* ウシガエルおよび *Danio rerio* ゼブラフィッシュは吾妻実験動物より購入。Sephadex G75, Sephacryl S-200, S-100, DEAE Sephacel, RESOURCE Q カラムは Pharmacia の製品、限外濾過膜 YM-10 フィルターは Amicon の製品を使用した。制限酵素 *Bam*HI, *Nde*I は TaKaRa、DNA ポリメラーゼは AmpliTaq Gold (Applied Biosystems)、

アガロースは Seakem GTG agarose を使用した。

サーモライシン (*Bacillus thermoproteolyticus*) はペプチド研究所、カテブシン B (ウシ脾臓) は SIGMA、 $\alpha$ -キモトリプシン (ウシ膵臓) 及びカルボキシペプチダーゼ Y (yeast) は和光純薬より購入した。Tris, EDTA, PMSF, DTT, GSH, diamide その他試薬は、和光純薬, 同仁化学, ナカライテスクの特級試薬を使用した。

#### [方法]

##### ウシガエル肝脂肪酸結合タンパク質の精製

タンパク質の精製は馬場らの方法を参照した(Baba et al., 1999)。ウシガエルから摘出した肝臓 170 g をはさみで切断後、2 倍容量のホモゲナイズ緩衝液 (0.25M sucrose, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 50mM Tris-HCl pH8.0) とともにテフロンホモゲナイザーにより破碎した。これを 28,000×g で超遠心分離した上清を細胞質画分として用いた。

細胞質画分に硫酸アンモニウム 40%飽和になるように徐々に加え、スターラーで 30 分間、4℃でゆっくり攪拌した。これを 15,000×g で 20 分間遠心分離し、その上清を YM-10 フィルターを用いて限外濾過を行い濃縮した。

濃縮液を 10mM Tris-HCl (pH8.0) 1mM EDTA 緩衝液で平衡化した Sephacryl S-200 カラム (4.5×100cm) でゲル濾過した。各フラクションを SDS-PAGE にてタンパク質を検出し、低分子量タンパク質画分をプールし、YM-10 フィルターの限外濾過で濃縮後、10mM Tris-HCl (pH8.0) 1mM EDTA 緩衝液で平衡化した Sephacryl S-100 カラム (3×100cm) で再度ゲル濾過した。さらに、得られた低分子画分を 15mM Tris HCl, 1mM EDTA 緩衝液 pH8.0 で平衡化した RESOURCE Q カラムを用いてイオン交換クロマトグラフィーを行い非吸着画分を精製標本とした。吸着画分は 1M NaCl, 15mM Tris HCl, 1mM EDTA 緩衝液 pH8.0 で溶出した。

##### グラスアノール(*Anolis pulchellus*)肝臓脂肪酸結合組換えタンパク質の精製

グラスアノール肝臓脂肪酸結合タンパク質をコードする遺伝子のクローンはプエルトリコ大学の Morales 教授から分与されたものを使用した(Morales et al., 1995)。遺伝子配列をもとに制限酵素認識配列を含む特異的プライマーを設計し、PCR 法により目的の DNA を増幅した。

##### プライマー塩基配列

センスプライマー

5'-CGCTAGCCATATGGCATTCAACGG-3'

アンチセンスプライマー

5'-CGCTAGCCATATGGCATTCAACGG-3'

PCR産物を2.5%アガロースゲルで電気泳動し、EtBr染色し目的バンドを検出した。PCR産物はゲルから切り出し、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を使用し精製したものをinsertDNAとして使用した。プラスミドpET3aをQuantum Prep Plasmid Maxiprep Kit (Bio-Rad) を使用し大腸菌DH5 $\alpha$ から精製した。プラスミド及びinsertDNAを制限酵素で切断しライゲーションをおこなう。反応液を0.8%アガロースゲルで電気泳動し、EtBr染色した。バンドをゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を使用してプラスミドを抽出した。insertDNAをライゲーションしたプラスミドを大腸菌DH5 $\alpha$ へ、エレクトロポレーション法により形質転換した。エレクトロポレーションはMicroPulser (Bio-Rad) を使用した。プログラムはプリセットプログラムEc2、キューベットサイズは0.2cmを使用した。

-80℃にて凍結保存されているDH5 $\alpha$ を氷上で解凍し、緩やかに懸濁した。使用するキューベット及びマイクロチューブはあらかじめ氷上で冷却した。40 $\mu$ lのDH5 $\alpha$ に3 $\mu$ lのサンプルを入れ、緩やかに混合し氷上で約1分間保持した。混合液をキューベットに入れパルスかけた。パルス後直ちにキューベット内にSOCメディウムを1ml入れ、ピペティングでよく懸濁し、カルチャーチューブに懸濁液を移し37℃で1時間震盪培養した。培養液を $\times 1$ ,  $\times 10$ 遠心し沈澱した菌体の3種類に濃度を振ってLB寒天プレートにまき、37℃で一晩培養した。プレートのコロニーをひろい、ダイレクトPCRを行った。

PCR産物を2.5%アガロースゲルで電気泳動し、EtBr染色した。insertDNAがライゲーションされたプラスミドの形質転換の成否を、目的のバンドが検出されているかどうかで判断した。400bpのバンドが検出された大腸菌株を培養しQuantum Prep Plasmid Midiprep Kit (Bio-Rad) を使用してプラスミドを精製し、配列確認のためサイクルシーケンス法により塩基配列を決定した。

Insert DNAの入った精製プラスミドをBL21-Gold (DE3) Competent Cells (STRATAGENE) へ形質転換させ、目的タンパク質を発現させた。-80℃で凍結保存されているBL21を氷上で解凍し、緩やかに懸濁した。あらかじめ氷冷させた1.5mlチューブにBL21を50 $\mu$ lとプラスミド溶液を1 $\mu$ l (プラスミドは50ng/ $\mu$ lと5ng/ $\mu$ lに濃度を振った) を入れ、緩やかに懸濁した。氷上で30分間保持し、その後42℃に保ったウォーターバスで20秒間ヒートショックを与えた。氷上で2分間保持し、450 $\mu$ lのSOCメディウムとともに37℃で1時間震盪培養した。チューブを3000rpmで10分間程遠心し菌体を収集し、LB寒天プレートにまいた。コロニーを4mlのLBメディウム(50 $\mu$ g/mlアンピシリン)中で一晩培養した。培養液100 $\mu$ lを4mlのLBメディウム(50 $\mu$ g/mlアンピシリン)中でOD600値が0.6まで培養し、半分にわけた片方にだけIPTGを0.5mMになるように加え、引き続き両者をOD600値を0.9まで培養した。10000rpmで3分間遠心し、集菌した菌体を直接

SDS-PAGE にかけるインダクションがかかっているかを調べた。

#### 大量培養

目的遺伝子 cDNA をライゲーションしたプラスミドで形質転換した大腸菌株を 20mℓ の LB (50  $\mu$ g/mℓ アンピシリン) メディウムで一晩震盪し前培養とした。翌日 1ℓ の LB メディウム (50  $\mu$ g/mℓ アンピシリン) に前培養液を 1% 接種した。震盪培養し、OD600 値が 0.6 になった時点で IPTG を 0.5mM になるように加え、OD600 値が 0.9 になるまで続けた。5000rpm で 20 分間遠心し集菌した。24mℓ の Lysis 緩衝液で菌体を懸濁し-80℃で凍結させ、37℃のウォータースバスで震盪解凍する操作を 2 回行った。0.5M EDTA を 50  $\mu$ ℓ 加え、ソニケーションを行った。12000rpm で 20 分間遠心し、上清と沈澱にわけた。沈澱は Lysis 緩衝液で 2 回洗浄し、各ステップごとの溶液の一部を SDS-PAGE により分析した。

大腸菌懸濁液の上清画分を 10mM Tris-HCl (pH8.0) 1mM EDTA 緩衝液で平衡化した Sephacryl S-100 カラム (3×100cm) でゲル濾過した。各フラクションを SDS-PAGE にてタンパク質を検出し、純度の高い画分をプールしたものを YM-10 フィルターの限外濾過で濃縮後、50mM Tris-HCl (pH8.0) で平衡化した DEAE Sephacel カラム (1×5cm) で核酸を除去した。カラムの非吸着画分を精製標本とした。吸着画分は 1M NaCl で溶出した。

#### ゼブラフィッシュ肝脂肪酸結合タンパク質の精製

全長の遺伝子配列が明らかにされているので (Denovan-Wright et al., 2000)、RT-PCR により cDNA ライブラリーを作製し、制限酵素認識配列を含む特異的プライマーを設計し、PCR 法により目的の DNA を増幅した。ゼブラフィッシュを解剖し、肝臓組織を摘出した。0.8mℓ の isogen (Wako) とともにテフロンホモゲナイザーにより破碎した。5 分間室温保持した後、0.2mℓ のクロロホルムを加えて 12000rpm で 22 分間、4℃にて遠心し、水相を 12000rpm で 22 分間 4℃にて遠心し、水相に 3  $\mu$ ℓ の ethachinmate (Wako) と 0.8mℓ のイソプロパノールを加え、12000rpm で 22 分間 4℃にて遠心した。沈澱を 1mℓ の 70%エタノールで洗浄し、7500rpm で 5 分間 4℃にて遠心した。沈澱を乾燥させ DEPC 処理水に懸濁し、totalRNA solution とした。cDNA ライブラリー作成及び PCR は Ready-To-Go RT-PCR Beads (Amersham Biosciences) を使用した。

#### プライマー塩基配列

##### センスプライマー

5'-CGCTAGCCATATGGCCTTCAGCGG-3'

##### アンチセンスプライマー

5'-GCTGCTTAGGATCCTCAGATCTTCTTGC-3'

目的 cDNA を増幅しライゲーションしたプラスミドを大腸菌 DH5  $\alpha$  にエレクトロポレーション



ン法により形質転換した。エレクトロポレーションは MicroPulser (Bio-Rad) を使用した。プログラムはプリセットプログラム Ec2、キュベットサイズは 0.2cm を使用した。-80℃にて凍結保存されている DH5 $\alpha$  を氷上で解凍し、緩やかに懸濁した。使用するキュベット及びマイクロチューブはあらかじめ氷上で冷却した。40 $\mu$ l の DH5 $\alpha$  に 3 $\mu$ l のサンプルを入れ、緩やかによく混合し氷上で約 1 分間保持した。混合液をキュベットに入れパルスをかけた。パルス後直ちにキュベット内に SOC メディウムを 1ml 入れ、ピペティングでよく懸濁し、カルチャーチューブに懸濁液を移し 37℃で 1 時間震盪培養した。培養液を $\times$ 1、遠心し沈澱した菌体の 2 種類に濃度を振って LB 寒天プレートにまき、37℃で一晩培養した。プレートのコロニーをひろい、ダイレクト PCR を行った。PCR 産物を 2.5% アガロースゲルで電気泳動し、EtBr 染色した。insertDNA がライゲーションされたプラスミドの形質転換の成否を、目的のバンドが検出されているかどうかで判断した。400bp 付近にバンドの検出された大腸菌株を培養し Quantum Prep Plasmid Midiprep Kit (Bio-Rad) を使用してプラスミドを精製し、配列確認のためサイクルシーケンス法によりシーケンス解析した。-80℃で凍結保存されている BL21 を氷上で解凍し、緩やかに懸濁した。あらかじめ氷冷させた 1.5ml チューブに BL21 を 50 $\mu$ l とプラスミド溶液を 1 $\mu$ l (プラスミドは 5ng/ $\mu$ l と 2.5ng/ $\mu$ l に濃度を振った) を入れ、緩やかに懸濁した。氷上で 30 分間保持し、その後 42℃に保ったウォーターバスで 20 秒間ヒートショックを与えた。チューブを氷上で 2 分間保持し、450 $\mu$ l の SOC メディウムを加え 37℃で 1 時間震盪培養した。チューブを 3000rpm で 10 分間程遠心し菌体を収集し、LB 寒天プレートに播種する。コロニーを選抜し 4ml の LB メディウム (50 $\mu$ g/ml アンピシリン) 中で一晩培養した。培養液 100 $\mu$ l を 4ml の LB メディウム (50 $\mu$ g/ml アンピシリン) 中で OD600 値が 0.6 まで培養し、半分にわけた片方にだけ IPTG を 0.5mM になるように加え、引き続き両者を OD600 値を 0.9 まで培養した。12000rpm で 3 分間遠心し、集菌した菌体を直接 SDS-PAGE により電気泳動し、目的タンパクバンドの有無により誘導がかかっているかを調べた。

#### 大量培養

肝脂肪酸結合タンパクの cDNA をライゲーションしたプラスミドで形質転換した大腸菌株を 20ml の LB メディウム (50 $\mu$ g/ml アンピシリン) で一晩震盪し前培養とした。翌日 1l の LB メディウム (50 $\mu$ g/ml アンピシリン) に前培養液を 1% 接種した。震盪培養し、OD600 値が 0.6 になった時点で IPTG を 0.5mM になるように加え、OD600 値が 0.9 になるまで続けた。5000rpm で 30 分間遠心し集菌した。24ml の Lysis 緩衝液で菌体を懸濁し-80℃で凍結させ、37℃のウォーターバスで震盪解凍する操作を 2 回行った。0.5M EDTA を 50 $\mu$ l 加え、ソニケーションを行った。12000rpm で 20 分間遠心し、上清と沈澱にわけた。沈澱は Lysis 緩衝液で 2 回洗浄し、各ステップごとの溶液の一部を SDS-PAGE した。大腸菌懸濁液の上清

画分を 10mM Tris-HCl (pH8.0) 1mM EDTA 緩衝液で平衡化した Sephacryl S-100 カラム (3×100cm) でゲル濾過した。各フラクションを SDS-PAGE にてタンパク質を検出し、純度の高い画分をプールしたものを YM-10 フィルターの限外濾過で濃縮後、50mM Tris-HCl (pH8.0) で平衡化した DEAE Sephacel カラム (1×5cm) で核酸を除去した。カラムの非吸着画分を精製標本とした。吸着画分は 1M NaCl で溶出した。

#### アミノ酸分析

タンパク質を減圧乾固し、5.7N HCl を加え減圧封管下 110℃22 時間加水分解した。アミノ酸組成は日立 835 型アミノ酸分析計にて分析した。

#### SDS-PAGE

Laemmli(Laemmli, 1970)の方法をもとに Schagger(Schagger and von Jagow, 1987)らの Tris-Tricine 系で行った。分子量カーカーは Kaleidoscope Prestained Standards, Precision Protein Standards (共に Bio-Rad) を使用し、染色には Coomassie Brilliant Blue (Fulka) もしくはシルバーステインキット (ATTO) を使用した。

#### 逆相 HPLC

タンパク質及び酵素消化物は HPLC (LKB 2151 HPLC system) を用いて分画した。溶液 A (1%アセトニトリル, 0.062% トリフルオロ酢酸) から溶液 B (75%アセトニトリル, 0.05% トリフルオロ酢酸) への溶出グラジエントを用いた。カラムは CAPCELL PAK C8 (4.6×150mm) (SHISEIDO) を用いた。グラジエントは以下の設定のもとで行った。グラジエント 1 は主にタンパク質の溶出に、グラジエント 2 は主に酵素消化物の溶出に使用した。

グラジエント 1: 溶液 B 0-99% 40min

グラジエント 2: 溶液 B 0-99% 10min

#### グルタチオン化タンパク質の調製

##### チオール基の還元

20~100  $\mu$ M タンパク質溶液に DTT を 50mM になるように加え、1 時間 37℃でインキュベートした。その後 50mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH7.0), 0.5mM EDTA 緩衝液で平衡化した Sephadex G25 カラム (1×22cm) でゲル濾過を行いタンパク質と DTT を分離した。必要に応じて YM-10 フィルターを用いて濃縮した。

##### グルタチオン化

還元したタンパク質に GSH を 1mM、diamide を 2mM になるように加え、37℃で 1 時間インキュベートした。50mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH7.0), 0.5mM EDTA 緩衝液で平衡化した Sephadex G25 カラム (1×22cm) でゲル濾過で脱塩した。必要に応じて YM-10 フィルターを用いて濃縮した。

##### グルタチオン化タンパク質のチオール基の再還元

グルタチオン化したタンパク質に DTT を 50mM になるように加え、37℃で 1 時間インキュベートした。50mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH7.0) ,0.5mM EDTA 緩衝液で平衡化した Sephadex G25 カラム (1×22cm) でゲル濾過で脱塩した。必要に応じて YM-10 フィルターを用いて濃縮した。

#### Native-PAGE

分離ゲル: 12%アクリルアミド,0.3%Bis-アクリルアミド,0.375M Tris-HCl (pH8.8)。濃縮ゲル:5%アクリルアミド,0.3%Bis-アクリルアミド,0.125M Tris-HCl(pH6.8)。泳動は 120V 定電圧、60 分間

#### 過ギ酸酸化

90%ギ酸と過酸化水素水を 19:1 の割合いで混合し、室温で 1 時間反応させ過ギ酸を作製した。タンパク質溶液に等量の過ギ酸を加え、0℃で 2 時間反応させた。反応溶液の減圧固化と DW への再懸濁の操作を 2 回行いギ酸を除去した。後、300  $\mu$ l の 10mM 酢酸緩衝液(pH5.5) に溶解し、日立 835 型アミノ酸分析計、陰イオン交換樹脂カラムを使用し、システイン酸用プログラムにて分析を行った(Odani *et al.*, 1988)。

#### 酵素消化

FABP-SSG, FABP-SH それぞれに対し、タンパク質量の 1/10-1/50 量のプロテアーゼを加え、経時的にサンプル溶液からその一部を取り、C8 (4.6×35mm) カラムの逆相 HPLC で溶出した。溶出グラジエントは前出のグラジエント 2 (溶液 B 0-99% 10min) に設定した。溶出ピークの高さを測定し、反応前のタンパク質ピークを基準にして残存 FABP 量を定量した。詳細な反応系は次表に示した。

#### 酵素消化の反応系

	プロテアーゼ	タンパク質量	緩衝液	pH	反応系	酵素量
Rana FABP	cathepsinB	1nmol	50mM酢酸	5.0	500 $\mu$ l	3 $\mu$ g
	chymotrypsin	1nmol	50mMリン酸	7.0	500 $\mu$ l	1 $\mu$ g
	thermolysin	1nmol	50mMリン酸	7.0	500 $\mu$ l	1 $\mu$ g
Anolis FABP	carboxypeptidaseY	1nmol	50mM酢酸	6.0	100 $\mu$ l	1 $\mu$ g
	chymotrypsin	1nmol	10mMトリス	8.0	100 $\mu$ l	1 $\mu$ g
	thermolysin	1nmol	50mMリン酸	7.0	100 $\mu$ l	1 $\mu$ g

#### 脱脂

Lipidex (SIGMA) を 0.8×9.5cm カラムに詰め濾過する事で、タンパク質に結合した内因性の脂肪酸の除去を行った(Glatz and Veerkamp, 1983)。

脂肪酸の蛍光誘導体 (*cis*-parinaric acid) を用いた結合活性測定

2  $\mu$ M のタンパク質溶液 (50mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH7.0) ,0.5mM EDTA 緩衝液) 2m $\ell$  に 0.5mM *cis*-parinaric acid 溶液を 2  $\mu$  $\ell$  ずつ加えていき、その都度、蛍光強度を測定した。蛍光測定は日立 F-3010 型蛍光光度計を使用した。310nm で励起し 415nm の蛍光強度を測定した(Wilkinson and Veerkamp, 1983; Baba et al., 1999)。

ジスルフィド結合の形成

ゼブラフィッシュ L-FABP 20  $\mu$ M に diamide を 2mM になるように加え、37℃で 1 時間インキュベートした。反応溶液を 50mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH7.0) ,0.5mM EDTA 緩衝液で平衡化した Sephadex G25 カラム (1×22cm) でゲル濾過を行いタンパク質と diamide を分離した。必要に応じて YM-10 フィルターを用いて濃縮した。

システイン残基のアルキル化

酸化または還元したゼブラフィッシュ L-FABP を凍結乾燥し、5mM EDTA、6M グアニジン、1M Tris-HCl 緩衝液 (pH8.5) 中で 55℃にて 3 時間変性させた。その後、20mM ヨード酢酸で 30 分暗所でアルキル化をおこなった。反応溶液を逆相 HPLC にてタンパク質ピークを分出し脱塩をおこなった。アミノ酸の加水分解用 5.7N HCl に 0.1%メルカプトエタノールを加えた。変性の際の 10mM DTT の有無により比較をおこなった。

結果

ウシガエル肝脂肪酸結合タンパク質の精製

ウシガエル肝臓細胞質分画の Sephacryl S-200 カラムの溶出パターンを図 1-A に示した。各フラクションの一部の SDS-PAGE によって検出された下線部の低分子画分を集めて濃縮し、Sephacryl S-100 カラムにて二度目のゲル濾過をおこなった。Sephacryl S-100 カラムの溶出パターンを図 1-B に示す。馬場らの報告により、Sephacryl S-100 の低分子画分にはアシル CoA 結合タンパク (ACBP) が存在することが判明している。Sephacryl S-100 カラムの各フラクションの一部を SDS-PAGE によって検出した下線部を低分子画分をプールし、濃縮し、イオン交換クロマトグラフィー(図 2)をおこなった。湿重量 170g の肝臓組織から約 7mg の L-FABP が得られた。精製タンパク質のアミノ酸分析結果を表 1 に示した。

トカゲ肝臓脂肪酸結合タンパク質の精製

Puerto Rico 大学 Morales 教授より恵与された *Anolis pulchellus* L-FABP 遺伝子クローンに相補的プライマーによる PCR をおこない、約 400bp の DNA を増幅した。サイクルシーケンシング法によるシーケンス結果により目的遺伝子配列をもった DNA 断片を増幅を増幅

した。またプライマーにライゲーションした DNA 断片のシークエンス結果により目的遺伝子配列をもった組換えプラスミドを作製し、大腸菌での大量培養をおこなった。溶菌、遠心後の上清画分の Sephacryl S-100 カラムの溶出パターンを図 3 に示した。SDS-PAGE によって検出された下線部のフラクションをブールし濃縮したものを DEAE Sephacel カラムによる陰イオン交換クロマトグラフィーをおこなった。非吸着画分を集めて濃縮し、精製標本とした。培養液 20 から約 19mg の L-FABP が得られた。精製タンパク質のアミノ酸分析結果を表 2 に示した。

#### ゼブラフィッシュ肝脂肪酸結合タンパク質の精製

ゼブラフィッシュ肝臓組織から抽出した totalRNA から RT-PCR 法により約 400bp の DNA 断片を増幅した。プライマーにライゲーションした DNA 断片のシークエンス結果により目的遺伝子配列をもった組換えプラスミドを作製し、大腸菌での大量培養をおこなった。溶菌、遠心後の上清画分の Sephacryl S-100 カラムの溶出パターンを図 4 に示した。SDS-PAGE によって検出された下線部のフラクションをブールし濃縮したものを DEAE Sephacel カラムによる陰イオン交換クロマトグラフィーをおこなった。非吸着画分を集めて濃縮し、精製標本とした。培養液 20 から約 3.3mg の L-FABP が得られた。精製タンパク質のアミノ酸分析結果を表 3 に示した。

#### グルタチオン化タンパク質の調製

ウシガエル及びトカゲの L-FABP に DTT を高濃度で作用させシステインのチオール基を還元させた (FABP-SH)。還元させたタンパク質に diamide の存在下で GSH を反応させ、グルタチオン化タンパク質を作製した (FABP-SSG)。ウシガエルの FABP-SH と FABP-SSG を Native-PAGE の挙動変化の結果を図 5 に示した。またトカゲの FABP-SSG を過ギ酸酸化し、アミノ酸分析計のシステイン酸プログラムで分析した結果を図 6 に示した。以後の実験に使用する FABP-SH は、FABP-SSG の混合ジスルフィド結合を DTT による還元にて切断し、グルタチオンを除去したものを使用した。今回の結果から、結合した GSH は DTT による還元力ですみやかに脱離することが分かった。

#### プロテアーゼ感受性の比較

ウシガエル及びトカゲの FABP-SH, FABP-SSG 両者に酵素消化をおこない、プロテアーゼに対する感受性を比較した (図 7-8)。実験の結果、ウシガエル及びトカゲ共に、遊離のシステインをもつ FABP-SH と比較してグルタチオンが結合した FABP-SSG のプロテアーゼ感受性の増加が認められた。今回おこなった実験の中で最も顕著な相違が認められたのは、ウシガエルのタンパク質にキモトリプシンを反応させた場合であった。またトカゲのタンパク質にカルボキシペプチダーゼ及びまたはキモトリプシンを作用させた場合ではプロテアーゼ消化の促進と考えられる結果が得られた。

## 分子内ジスルフィド形成

ゼブラフィッシュの L-FABP を酸化して分子内にジスルフィド架橋を形成させた (FABP-SS)。システイン残基のアルキル化をおこないアミノ酸分析した結果、DTT を加えて変性させたものはタンパク質量の倍の量のカルボキシメチルシステインが検出され、DTT を加えなかったタンパク質ではカルボキシメチルシステインは検出されなかった。これらの結果から、酸化反応は 1 時間内に完了していることも分かった。その後、分子内ジスルフィドを形成したタンパク質を還元し、遊離のチオール基をもつタンパク質 (FABP-SH) を調製した。しかし、同様のアルキル化後のアミノ酸分析の結果、カルボキシメチルシステインがタンパク質量の 2 倍量は検出されなかった。

## FABP-SH, FABP-SSG 及び FABP-SS におけるリガンド結合活性の比較

*cis-parinaric acid* は短波長の励起光を照射すると長波長側の蛍光を発する蛍光性の脂肪酸であり、バラ科などの植物の種子から単離される天然の脂肪酸である。その蛍光はタンパク質と結合すると著しく上昇するので、蛍光プローブとして利用されるものである。ウシガエルとトカゲの FABP-SH, FABP-SSG およびゼブラフィッシュの FABP-SH, FABP-SS において *cis-parinaric acid* を用いたりガンド結合活性の測定をおこなった。得られたデータを Prism (Graph Pad Software Inc.) ソフトウェアを使ってグラフ化した (図 9、11-12)。ウシガエルの L-FABP は精製して脱脂したものを使った実験もおこなった (図 10)。ウシガエルとトカゲの FABP-SH, FABP-SSG 及び Native FABP の間には *cis-parinaric acid* の結合親和性に大きな差は認められなかった (*Rana* FABP の  $K_d$  値 : FABP-SH;  $1.7 \mu\text{M}$ , FABP-SSG;  $1.6 \mu\text{M}$ , Native FABP;  $1.2 \mu\text{M}$ ) (*Anolis* FABP の  $K_d$  値 : FABP-SH;  $1.9 \mu\text{M}$ , FABP-SSG;  $1.9 \mu\text{M}$ )。しかし、ゼブラフィッシュの FABP-SH と FABP-SS においては結合活性に差が生じているものと思われる (Zebrafish FABP の  $K_d$  値 : FABP-SS;  $3.6 \mu\text{M}$ , FABP-SH;  $7.8 \mu\text{M}$ )。FABP-SH において親和性低下が確認できた。

## 考察

### ウシガエル L-FABP の精製

湿重量 170g のウシガエルの肝臓組織から約 7mg の L-FABP が得られた。精製にあたり、2 回のゲル濾過をおこなったが、いずれの低分子画分にもメラニンなどのポリフェノール化合物と考えられる夾雑物質の妨害のため、紫外吸収による L-FABP の検出は不可能であった。これらの物質は引き続きおこなった陰イオン交換クロマトグラフィーにより除去可能であった。このことから、肝臓で大量の色素を合成する動物種では、予め陰イオン交換樹脂で処理したサイトゾルをゲル濾過するのが適切であると考えられる。

### 組換えタンパク質の発現と精製

タテガミトカゲ、ゼブラフィッシュにおいて大腸菌での大量発現をおこない、それぞれ 20 の LB 培地から約 19mg の L-FABP を、約 3.3mg の L-FABP が得られた。ゲル濾過クロマトグラフィーの L-FABP 画分をプールし紫外吸収スペクトルを測定したところ、タテガミトカゲ、ゼブラフィッシュ両者の場合において 260nm あたりに吸収極大が見られた。これは核酸成分による吸収によるものと考えられ、陰イオン交換クロマトグラフィーによる除去をおこなった。pH8.0 の 50mM Tris-HCl で平衡化したカラムにおいて両 L-FABP は吸着せずに溶出された。吸着画分は NaCl により溶出され、その吸収極大は 260nm であった。収量から端的に、タテガミトカゲの L-FABP の大量発現及び精製に成功したといえる。

#### グルタチオン化タンパク質の調整

精製したウシガエルとタテガミトカゲの L-FABP を使い、グルタチオン化タンパク質を調製した。ウシガエル L-FABP のグルタチオン化は SDS を含まない Native な PAGE による挙動の変化で確認できた。これはグルタチオン結合によって生じる正味の負電荷がひとつ増えることにより還元型のタンパク質より酸性側に移動することによって生じるものである。12% のポリアクリルアミドを使用してチャージがひとつ異なる分子種で移動度の差は顕著であった。これは Native-PAGE での泳動が翻訳後修飾の検出に非常に有効であることが示されるものである。タテガミトカゲの L-FABP においても同様の組成によるゲルで電気泳動したところ、分離ゲル内にタンパク質が進入せず、電気泳動は出来なかった。これはタテガミトカゲの L-FABP が塩基性のタンパク質であることが原因と思われる。タテガミトカゲの pI 値は SIB のサイトのタンパク質パラメーターによる計算では 8.67 である（ウシガエルの L-FABP は pI : 6.84 である）。今後塩基性のタンパク質の Native-PAGE の緩衝液組成の検討が必要と思われる。よってタテガミトカゲの L-FABP のグルタチオン化は、過ギ酸酸化によるグルタチオンスルホン酸として検出にすることにした。この分析により、グルタチオン化した L-FABP に等量のグルタチオンが結合していることが定量出来た。分析のサンプルは逆相 HPLC によって分出をおこなったので、反応溶液中の過剰の試薬は除去されている。分析によって検出されたグルタチオンスルホン酸はグルタチオン化された L-FABP 由来のものと考えられる。

細胞内でのグルタチオンとタンパク質の結合は混合ジスルフィド結合として、細胞内の酸化型グルタチオン (GSSG) と還元型グルタチオン (GSH) の濃度比に依存する。細胞内が酸化的な雰囲気になると混合ジスルフィドの形成が促進され、タンパク質のチオール基を保護すると考えられている。還元的条件でこの結合が容易に分離することから、この翻訳後修飾は、活性酸素などの酸化的ストレスからタンパク質を保護していると考えられる。

その一方で、グルタチオンのチオール基への結合がタンパク質機能を調節している例が存在する(杉山, 1988; Liang and Pelletier, 1988; Offermann et al., 1984)。今回の実験とラットの例を総合すると、L-FABP におけるタンパク質機能の調節が、酸化的な条件におけるグルタ

チオンとの混合ジスルフィド結合によってなされていると考えられる。

#### 酵素消化によるプロテアーゼ感受性の比較と構造比較

調製したウシガエルとタテガミトカゲのグルタチオン化 FABP (FABP-SSG) とそれを還元した還元型 FABP (FABP-SH) を使った酵素消化の結果、双方で FABP-SSG のプロテアーゼ感受性の増加を確認出来た。これが一番顕著な例はウシガエル FABP にキモトリプシンを反応させたときのもので、FABP-SH がその構造を 90%以上保っている間に FABP-SSG はそのほとんどが消化されている結果となった。タテガミトカゲの場合では、キモトリプシン及びカルボキシペプチダーゼ Y の反応において明らかな酵素消化の促進を見出せた。ウシガエルとタテガミトカゲでの結果の違いとそれらに反応させる酵素の種類での結果の相違は、グルタチオンが結合しているシステインの一次構造上の違いに由来する立体構造上での位置の違いになんらかの関係があるものと思われる。脊椎動物における L-FABP のシステインの位置を表 4 に示した (Takahashi et al., 1982; Wolfrum et al., 1997; Perozzi et al., 1993; Chan et al., 1985; Rolf et al., 1995; Cecilian et al., 1994; Morales et al., 1995; Baba et al., 1999; Henry and Melton, 1998; Denovan-Wright et al., 2000;

Di Pietro et al., 1997; Odani et al., 2001)。またラット、ウシガエル、及びタテガミトカゲの L-FABP の立体構造モデルを図 13 に示した。先に述べた通り、ラットは Cys-69 を有し、ウシガエルは Cys-92、タテガミトカゲは Cys-81 をもっている。これは L-FABP に高度に保存されたシステインとおもわれ、タンパク質機能への関連が予測されるものである。今回の結果は、以前佐藤らがおこなったラットの実験の結果と同様の傾向を示しており、システインへのグルタチオン化がタンパク質分解のシグナルとして、もしくは構造の不安定化に起因するタンパク質分解酵素への感受性の増加が示される。また現象が、保存されたシステインの一次構造上の位置の違いに関わらず L-FABP に普遍的な機能であることが示唆される。

ラット L-FABP の細胞内濃度は 7-10 倍に及ぶ日内周期が知られており、この L-FABP の急速な代謝回転は独特のタンパク質分解システムが機能していることが考えられる。同じような現象が他の生物種でも生じている可能性はある。今回の結果が示す L-FABP のグルタチオン化によるプロテアーゼ被分解性の増加は、ラット同様に、他の動物種でも肝臓内の分解システムにグルタチオン化が関与していることを示唆している。今回 FABP-SH は一度グルタチオン化を受けたタンパク質を使用しているので、調整段階で生じたタンパク質の変性による感受性増加という不安要素は無いと思われ、信頼出来る結果であることも付け加えたい。

#### 分子内ジスルフィド形成の可能性

精製したゼブラフィッシュの L-FABP を酸化させたところ、ジスルフィド結合が形成された。



ゼブラフィッシュの FABP-SS とスズキの L-FABP の分子モデリングを図 14 に示した。細胞質タンパクはその存在する環境の還元的な雰囲気によりジスルフィド結合形成は稀であるとされている。しかし、スズキの L-FABP で示される通り、システインをふたつ以上もつ細胞内タンパク質において S-S 結合を形成している分子も存在する。今回使用したゼブラフィッシュの L-FABP は生体から精製することが困難なため、組換えタンパク質として大腸菌で発現させたものを精製したものである。しかるに実際の生体内でこのような状態にあるかはこの結果からは判断出来ない。しかし同じ硬骨魚類の L-FABP でありかつ同じ位置にシステイン残基を有するタンパク質でありその可能性は十分にあるとおもわれる。今回の結果自体は、このタンパク質が生体内でジスルフィド結合を形成している可能性を示すものである。また S-S 結合形成確認のためにおこなったアルキル化では S-S 結合を還元した FABP-SH を作製しこれも分析したところ、DTT を加えずに変性させたもので予想されるモル数の半数程度しかカルボキシメチルシステインを検出出来なかった。この結果から一度形成された分子内ジスルフィド結合がこのタンパク質においては容易に切断されにくいとも考えられる。反応系内の DTT はタンパク質量に対して大過剰であるが、分子内のチオール基同士の距離が近接しているためすべてのジスルフィド結合の切断にいたらなかったとも考えられる。還元剤の濃度と反応時間、温度等のさらなる検討の予知があると思われる。

#### 混合ジスルフィド及び分子内ジスルフィドの脂肪酸結合活性への影響

ウシガエルとタテガミトカゲの FABP-SSG と FABP-SH における *cis*-parinaric acid の親和性は両種とも数値的 (Kd 値) には大きな変化は見られなかった。このことはグルタチオンの結合によってリガンドの結合活性が変化しないことを意味するものであり、Cys-81 (ウシガエル) または Cys-92 (タテガミトカゲ) のチオール基は脂肪酸の結合には関与していないことが示唆される。これはラットの結果と同じ傾向にありプロテアーゼ実験と同様、システインの一次構造上の差はあれ、L-FABP に保存されるシステインへのグルタチオン化は結合活性に影響を与えず、またその位置にあるチオール基が脂肪酸結合に直接影響しないことが示される。

また、ウシガエル、タテガミトカゲと同様にゼブラフィッシュの FABP-SS とジスルフィド結合を還元した FABP-SH における *cis*-parinaric acid による結合活性測定をおこなったところ FABP-SH のほうが FABP-SS より結合活性が低下していた。これは調整の際の大過剰な試薬による変性の可能性も考えられるが、分子内ジスルフィド結合が立体構造の安定化を生じることとを考慮すると、生体内では架橋されたタンパク質であり還元によって立体構造が不安定になる機能の可能性も示唆される。システインをひとつ有する L-FABP における結果からも考慮するとゼブラフィッシュの L-FABP の Cys-81 と Cys-92 もリガンドの結合には関わっておらず分子の構造安定性に関与していると思われる。

#### *C. elegans* 組換え脂肪酸結合タンパクの調製

## 材料

*C. elegans* mixed stage 1st strand cDNA ライブラリは新潟大学医学部第二生化学教室藤井博士の恵による。

## 方法

### 組換え体の作製

予測ヌクレオチド配列から、プラスミドベクター pET3a のマルチクローニングサイトの制限酵素サイトを含むインサートを増幅する為、sense 側に NdeI、antisense 側に BamHI の制限酵素サイトを含んだプライマーを作製した。*C.elegans* mixed stage cDNA に対し RT-PCR を行った。反応液と反応条件は下に記す。2.5%アガロースゲル電気泳動で発現と量を確認した。反応生成物を大量に得る為、2 回目の PCR を行った。2 回目の反応液は、1 回目の反応液組成の cDNA 5 $\mu$ l を、1 回目の PCR 反応液 2 $\mu$ l に変え、滅菌水 37 $\mu$ l で行った。反応条件は変更無し。2 回目の反応チューブ 2~3 本分を QiAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) で 1 本に精製し、エタノール沈澱を行い、これをインサートとした。pET3a のクローニングサイトにライゲーションし、DH5  $\alpha$  に形質転換してベクターを増幅したあと、BL21(DE3)に形質転換してタンパク質を発現させた。以上の操作は、前節の脊椎動物脂肪酸結合タンパクの組換え体調製とおおむね同一であるので、詳細は省略する。

### primer 一覧

#### FAB-5

sense 5' cgc tag cca tat ggc atc tat gaa tga ctt tat cg 3'

antisense 5' gct gct tag gat cct tat tct ctc tcc cac tcg cg 3'

#### FAB-6

sense 5' cgc tag cca tat ggt ttc cat gaa ag 3'

antisense 5' gct gct tag gat cgg tta tcc ctt ata g 3'

#### FAB-7

sense 5' cgc tag cca tat gtc tca aga att cgt tgg acg ct 3'

antisense 5' ccg ctc gag cgg cta ttc gc 3'

#### FAB-8

sense 5' cgc tag cca tat gtc tgc tga aca att tgt ggg tc 3'

antisense 5' gct gct tag gat ccc tat tca cga ata tag gca cg 3'

#### FAB-9

sense 5' cgc tag cca tat gcc aat tca aac cg 3'

antisense 5' gct gct tag gat cct tag gca gcc ttc tcg tag ac 3'

### 発現タンパクの精製

タンパクが上清に有ると確認された場合 (FAB-3.7.8.9)

破碎菌体液の遠心上清を YM-10 (amicon) フィルターを用いて限外濾過濃縮。

タンパクが沈殿に有ると確認した場合 (FAB-1.2.4.5.6.7)

沈殿を同体積のグアニジン塩酸塩を加えて攪拌し、12000rpm 20min 遠心後、低温室で上清を 50mM Tris-HCl 1mM EDTA (pH 8.0) で徐々に 10 倍に希釈した。遠心を行い、上清を YM-10 (amicon) フィルターを用いて限外濾過。

#### ゲル濾過

Sephacryl S-100 (3.5 × 100cm, Pharmacia) カラム又は Sephadex G-75 (5 × 100cm, Pharmacia) カラムで 10mM Tris-HCl 1mM EDTA buffer pH8.0 で行った。サンプルは、流速は PERISTA PUMP(ATTO) で調節し 9.4ml/h 以下で流した。検出器は EM-1 エコノ UV モニター(BIO RAD)、チャートは 2210 RECORDER 2-channel (LKB BROMMA) で描き、フラクションコレクター 2211 SUPER RAC (LKB BROMMA) に接続した。

#### 濃縮

YM-10 (amicon) を用いて 350ml 用、50ml 用で限外濾過した。セントリプレップ (amicon) 、セントリコン(amicon)で 2,000g で濃縮した。量に応じて使った。

HPLC (高速液体クロマトグラフィー; 液クロ)

C8 (CAPCELL PAK C8, 4.6 × 150mm, SHISEIDO)逆相カラムで溶液 A から溶液 B への溶出グラジエントを用いた。目的に応じて使用した。

溶液 A 1% アセトニトリル、0.062% TFA

溶液 B 75% アセトニトリル、0.05% TFA

グラジエント 1: 溶液 B 0-99% 40min

グラジエント 2: 溶液 B 0-99% 60min

グラジエント 3: 溶液 B 0-99% 90min

グラジエント 4: 溶液 B 0-60% 60min 60-99% 10min

等電点の差によるタンパクの分離

ゲル濾過の後、目的タンパクが含まれているフラクションに大きさの異なるタンパクが 2 つ含まれていた場合、開始のメチオニンがアミノ酸配列の中にないか調べ、等電点を計算し、等電点の差で分離した。目的タンパクは、ほとんど陰イオン側の pH だった。DEAE Sephacel (2.0 × 8.0cm, Pharmacia) を使い、GRADICON III(ATTO) ポンプではじめ A 溶液 20mM Tris-HCl pH8.0 を流しピークを回収した後、B 溶液 20mM Tris-HCl 1M NaCl pH8.0 へのグラジエントをかけてピークを回収した。それぞれのピークを液クロ後、アミノ酸分析を行う。

吸光度スペクトル

タンパク溶液を分光光度計(320 Spectrophotometer,HITACHI)で、Ab240-340nm のスペクトルを描いた。スペクトルから、タンパク溶液の純度を確認した。核酸などが含まれていると考えられた場合は、核酸除去を行った。

#### 核酸除去(陰イオン交換クロマトグラフィー)

DEAE Sephacel (1.2×6.0cm, Pharmacia) を使い、ポンプで 20mM Tris-HCl (pH 8.0) で 220S Spectrophotometer(HITACHI) で吸光度をチャートし、核酸などをカラムに吸着させ、素通りしたタンパクを回収し、濃縮した。

#### 脱脂

Lipidex 1000 hydroxyalkoxypropyl dextran Sigma Type VI (0.8×9.5 cm, Shigma) カラムをメタノールで洗浄後、滅菌水を流し、次にリン酸 buffer (50mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5mM EDTA pH 7.0) で平衡化し行った。検出器からのチャートを見ながら、タンパクを回収し、濃縮した。

#### 蛍光法による脂質結合親和性の測定

精製したタンパクをリン酸 buffer で、1  $\mu$ M タンパク溶液をキュベットに作る。DAUDA、ANS は、1  $\mu$ M、0.5  $\mu$ M、0.25  $\mu$ M エタノール溶液を、脂肪酸などのリガンドは、0.25mM エタノール溶液を作製した。蛍光光度計 (F-2500 型,HITACHI) を使用した。タンパク溶液、タンパク溶液と脂肪酸の蛍光プローブ DAUDA 又は ANS を 1:1 で混合した溶液の蛍光波長、励起波長を測定する。始め励起波長を固定し、タンパクは280nm、タンパクと DAUDA は335nm、タンパクと ANS は 370nm で蛍光波長スペクトルを測定する。次に得られた蛍光ピークで励起波長のスペクトルを測定する。それぞれのピークの励起波長/蛍光波長を用いて、タンパク溶液に DAUDA 又は ANS を滴定し、蛍光強度を測定して飽和曲線を得た。Prism (GraphPad Software) でグラフを描き、K<sub>d</sub> 値を B<sub>max</sub> から算出した。DAUDA 又は ANS の K<sub>d</sub> 値の低い(結合親和性が高い)方をタンパクと 1:1 の割合で結合させ、脂肪酸やオレイル CoA 等を一定時間毎(15~25 秒)にシリンジで一定量 (1~0.5  $\mu$ l) 加えていき、脂肪酸蛍光プローブが脂肪酸に置換される事による蛍光強度の減少を測定した。レチノイン酸とレチノールについては、直接タンパク液に加えていき、タンパクそのものの励起波長/蛍光波長で測定し、トリプトファンの蛍光強度の減少、結合による蛍光強度の増加で測定した。レチノールは光による消光が激しい為、部屋を暗くし、入れたら即測定した。Prism でグラフを描いた。また、加えたリガンド量を対数値に直し、Prism の one site competition、K<sub>i</sub> calculation で 蛍光プローブの濃度、K<sub>d</sub> 値を入力し K<sub>i</sub> 値を出した。それぞれの実験でタンパク溶液を含まないリン酸 buffer に滴定したものを測定し、ブランクとした。測定データからブランクを差し引き、真のデータとして用いた。

#### CD(Circular Dichroism) の測定

サンプルとして上記で調整した FAB-1~9 タンパクを用いて、0.2mg/ml タンパク溶液 5mM Tris-HCl 0.5mM EDTA pH8.0 又は、5mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05mM EDTA pH 7.0 を 500  $\mu$ l 調整した。吸光度スペクトルと分光光度計(Smart Spec 3000, BioRad)での Ab280、320 測定から純度の高いことを確認し濃度を調整した。0.2 Micro Nylon Membrane (CORNING) に通して、ゴミなどを除去した。測定には、約 200  $\mu$ l 用いた。農学部の Circular Dichroism Spectroscopy(円二色分散計,日本分光)で測定した。電源を入れる前に窒素ガスを流して分光器全体に置換し、電源を入れてから約 2h 後に測定を開始した。窒素ガスは、測定時も常に 4l/min で流し、20℃で行った。cell 0.1cm、Range 205-260nm、Resolution 0.05nm、band width 1.0nm、Sensitivity 50mdeg、Speed 50nm/min、Response 2sec、で行い、4 回スキンの平均を測定した。buffer でブランクを測定後、セルを少量のサンプルで共洗いした後サンプルを入れた。サンプルデータからブランクを差し引いた値を測定データとした。測定データを楕円率で光学定数に変換した。変換はコンピューターの標準解析の演算で、セル長と平均残基モル濃度(=1000\*構成残基数\*秤量濃度(g/ml)/分子量)を入力し、分子楕円率(平均残基楕円率)がコンピューターによって算出した。出たデータは、SSE-338W 型タンパク質二次元構造解析プログラム(日本分光)で Yang 式(Yang, J.T. et al.;1986)を用いて処理した。解析を実行しグラフを描いた。グラフはデータ、データに近似のモデルタンパク、データとモデルタンパクの差を示した。コンピューターにより、予め登録されているモデルタンパクとの比較から、ヘリックス構造、ベータ構造、ターン構造、ランダム構造の割合を出した。

#### 分子系統樹の作製

FAB-1~9 と *Rat* の上皮 (Epidermis)、脂肪細胞 (Adipocyte)、心臓 (Heart)、網膜 (Retina)、脳 (Brain)、ミエリン (Myelin)、睾丸 (Testis)、腸(Intestine)、肝臓 (Liver)、回腸 (Ileum)、*Ascaris*、*Echinococcus*、*Shistosoma* の脂肪酸結合タンパク質と *Rat* のレチノイン酸結合タンパク質 (Retinoic acid BP)、レチノール結合タンパク質 (Retinol BP) のアミノ酸配列の比較を一次構造配列プログラム Clustal W を使用して行った。このアライメントデータを基に N-J 法(Saitou,N., and Nei,M.,1987)又は UPGMA 法(Sokal, R.,and Sneath, P.H.A.,1963)を用いて系統樹の作製を行った。

#### FAB-1~9 アミノ酸配列の比較

FAB1~9 のアミノ酸配列を Clustal W で並べて配置した。

### 結 果

#### FAB-1 の精製

組換え体培養、集菌後、Lysis buffer で懸濁した。菌体を破碎し、遠心を行い、沈澱を Lysis buffer で洗浄しながら、上清と沈澱に分けた。SDS-PAGE により、沈澱にタンパクの存在を確認した為、グアニジン処理後、濃縮して Sephacryl S-100 カラムでゲル濾過を行った。

SDS-PAGE を行い)、タンパクの存在するフラクションの検討をつけ、液クロ後、アミノ酸分析 を行い、目的タンパクがあるフラクションをプールした(図 1)。吸光度とスペクトル測定により、不純物が少ないタンパクと判断した。0.2M のタンパク溶液を用いて CD 測定を行った。dauda、ANS 結合蛍光測定を行い、lyso PC、lyso PE 、lyso PS、cholesterol sulfate の置換測定を行った。

#### FAB-2 の精製

組換え体培養、集菌後、Lysis buffer で懸濁した。菌体を破碎し、遠心を行い、沈澱を Lysis buffer で洗浄しながら、上清と沈澱に分けた。SDS-PAGE により、沈澱にタンパクの存在を確認した為、グアニジン処理後、濃縮して Sephacryl S-100 カラムでゲル濾過を行った。SDS-PAGE を行い、目的タンパクがあるフラクションをプールした。液クロ後、アミノ酸分析 (表 1) を行い、吸光度とスペクトル測定により、不純物が少ないタンパクと判断した。0.2M のタンパク溶液を用いて CD 測定を行った。dauda、ANS 結合蛍光測定を行い、lyso PC、lyso PE 、lyso PS、cholesterol sulfate の置換測定を行った。

#### FAB-3 の精製

組換え体培養、集菌後、Lysis buffer で懸濁した。菌体を破碎し、遠心を行い、沈澱を Lysis buffer で洗浄しながら、上清と沈澱に分けた。SDS-PAGE により、上清にタンパクの存在を確認した為、濃縮して Sephacryl S-100 カラムでゲル濾過を行った。SDS-PAGE を行い、目的タンパクが分かれなかった為、本来沢山ある出てくると考えられるフラクションをプールした。不純物を除去する為、DEAE カラム(1.5×20cm)に 20mM Tris-HCl pH8.0 でタンパクを通し、素通り液を濃縮して Sephacryl S-100 カラムでゲル濾過を行った。目的タンパクがあるフラクションをプールした。液クロ後、アミノ酸分析 を行い、吸光度とスペクトル測定により、不純物が少ないタンパクと判断した。0.2M のタンパク溶液を用いて CD 測定を行った。dauda、ANS 結合蛍光測定を行い、lyso PC、lyso PE 、lyso PS、cholesterol sulfate の置換測定を行った。

#### FAB-4 の精製

組換え体培養、集菌後、Lysis buffer で懸濁した。菌体を破碎し、遠心を行い、沈澱を Lysis buffer で洗浄しながら、上清と沈澱に分けた。SDS-PAGE により、沈澱にタンパクの存在を確認した為、グアニジン処理後、濃縮して Sephacryl S-100 カラムでゲル濾過を行った。SDS-PAGE を行い、目的タンパクがあるフラクションをプールした。液クロ後、アミノ酸分析 を行い、吸光度とスペクトル測定により、不純物が少ないタンパクと判断した。0.2M のタ

ンパク溶液を用いて、CD 測定を行った。dauda, ANS 結合蛍光測定を行い、lyso PC、lyso PE、lyso PS、cholesterol sulfate の置換測定を行った。

#### FAB-5 の精製

組換え体を作製し、培養、集菌後、Lysis buffer で懸濁した。菌体を破碎し、遠心を行い、沈澱を Lysis buffer で洗浄しながら、上清と沈澱に分けた。SDS-PAGE により、沈澱にタンパクの存在を確認した為、グアニジン処理後、濃縮して Sephacryl S-100 カラムでゲル濾過を行った。SDS-PAGE を行い、タンパクの存在するフラクションの検討をつけ、液クロ後、アミノ酸分析を行い、目的タンパクがあるフラクションをブールした。吸光度とスペクトル測定により、不純物が少ないタンパクと判断し、脱脂を行った。吸光度から濃度を計算し、蛍光測定を行った。0.2M のタンパク溶液を用いて、CD 測定を行った。

#### FAB-6 の精製

当初、約 200bp の短い配列と考えていたが、PCR やシーケンスや0検討した結果、約 400bp の配列と判断した。組換え体を作製し、培養、集菌後、Lysis buffer で懸濁した。菌体を破碎し、遠心を行い、沈澱を Lysis buffer で洗浄しながら、上清と沈澱に分けた。SDS-PAGE により、沈澱にタンパクの存在を確認した為、グアニジン処理後、濃縮して Sephacryl S-100 カラムでゲル濾過を行った。SDS-PAGE を行い、タンパクが存在するフラクションの検討をつけ、液クロ後、アミノ酸分析(表 2)を行い、目的タンパクがあるフラクションをブールした。吸光度とスペクトル測定により、不純物が少ないタンパクと判断し、脱脂を行った。吸光度から濃度を計算し、蛍光測定を行った。0.2M のタンパク溶液を用いて、CD 測定を行った。

#### FAB-7 の精製

配列中に BamHI 制限酵素サイトが存在した為、プライマーは BamHI サイトの代わりに XhoI サイトを付けて設計し、XhoI サイト BamHI サイトが付いたリンカーを付けてライゲーションし、組換え体を作製した。培養、集菌後、Lysis buffer で懸濁した。菌体を破碎し、遠心を行い、沈澱を Lysis buffer で洗浄しながら、上清と沈澱に分け、SDS-PAGE を行った。前培養の結果から、あまりタンパクが採れない事が考えられた為、上清とグアニジン処理した沈澱を Sephacryl S-100 カラムでゲル濾過を行った。SDS-PAGE を行い、タンパクが分かれていないことが確認された。フラクションを全部回収し、限外濾過後、25% 硫酸塩析後、上清を 80% 硫酸塩析し、沈澱を DW に溶解し、遠心後、Sephacryl S-100 カラムでゲル濾過を行った(図 7)。SDS-PAGE を行い、タンパクが存在するフラクションの検討をつけ、ブールした(図 7)。吸光度とスペクトル測定により、核酸などが含まれているタンパク溶液と判断し、

DEAE カラムによる核酸除去の後、脱脂を行った。液クロ後、アミノ酸分析 を行い、蛍光測定を行った。0.2M のタンパク溶液を用いて、CD 測定を行った。

#### FAB-8 の精製

組換え体を作製し、培養、集菌後、Lysis buffer で懸濁した。菌体を破碎し、遠心を行い、沈澱を Lysis buffer で洗浄しながら、上清と沈澱に分けた。SDS-PAGE により、上清にタンパクの存在を確認した為、濃縮して Sephacryl S-100 カラムでゲル濾過を行った (図 8)。SDS-PAGE を行い、タンパクの存在するフラクションの検討をつけ、プールした (図 8)。吸光度とスペクトル測定により、核酸などが含まれているタンパク溶液と判断し、DEAE カラムによる核酸取りの後、脱脂を行った。液クロ後、アミノ酸分析 を行い、蛍光測定を行った。0.2M のタンパク溶液を用いて、CD 測定を行った。

#### FAB-9 の精製

組換え体を作製し、培養、集菌後、Lysis buffer で懸濁した。菌体を破碎し、遠心を行い、沈澱を Lysis buffer で洗浄しながら、上清と沈澱に分けた。SDS-PAGE により、上清にタンパクの存在を確認した為、濃縮して Sephadex G-75 カラムでゲル濾過を行った。SDS-PAGE を行い、タンパクの存在するフラクションの検討をつけプールした。濃縮し、吸光度を測定後、アミノ酸分析 を行い、蛍光測定を行った。0.2M のタンパク溶液を用いて、CD 測定を行った。

#### 蛍光測定

1  $\mu$ M タンパク溶液、タンパク溶液と脂肪酸の蛍光誘導体 DAUDA 又は ANS を 1 : 1 で混合した溶液の蛍光波長、励起波長を測定した。得られた励起波長/蛍光波長を用いて、1  $\mu$ M タンパク溶液に脂肪酸の蛍光プローブ DAUDA、ANS を滴定し、それぞれ飽和曲線が得られた。その結果から、Prism で Bmax から Kd 値を算出した。DAUDA 又は ANS 間で Kd 値の低い (結合親和性が高い) 方をタンパク溶液と 1 : 1 に混ぜ、一定時間毎に一定量リガンドを加えた。脂肪酸蛍光プローブが脂肪酸に置換される事による蛍光強度の減少を測定した。レチノイン酸とレチノールについては、直接蛋白溶液に加えていき、タンパクそのものの励起波長/蛍光波長で測定し、トリプトファンの蛍光強度の減少、結合による蛍光強度の増加で測定した。加えたりガンド量を対数値に直し、Prism の one site competition、Ki calculation で蛍光誘導体の濃度、Kd 値を入力し Ki 値を出した。

#### CD(Circular Dichroism) の測定

農学部の Circular Dichroism Spectroscopy(円二色分散計,日本分光)で測定した。サンプルデータからブランクを差し引いた値を測定データとした。測定データをコンピューターを用い



て楕円率で光学定数に変換した。標準解析の演算で、セル長と平均残基モル濃度(=1000\*構成残基数\*秤量濃度(g/ml)/分子量)を入力し、分子楕円率(平均残基楕円率)がコンピューターによって算出した。出たデータは、SSE-338W 型タンパク質二次元構造解析プログラム(日本分光)で処理し、解析を実行しグラフを描いた。グラフはデータ、データに近似のモデルタンパク、データとモデルタンパクの差を示した。コンピューターにより、予め登録されているモデルタンパクとの比較から、ヘリックス構造、ベータ構造、ターン構造、ランダム構造の割合を出した。

以上の結果より、いずれもネイティブな立体構造を保持し、生物活性を有する組換えタンパクが得られたことが明らかになった。これらのうち、システイン残基をもつものについて、前章と同様の実験を実施した。

#### センチュウ FABP-1~9 のグルタチオン化

タンパク質のチオール基の還元のため、脱脂後のタンパク溶液に DTT を 50 mM になるように加え、37℃で1時間インキュベートした。脱塩のため、必要に応じてゲル濾過し、YM-10 フィルターを用いて濃縮した。還元したタンパク質は diamide を 2 mM、GSH を 1 mM になるように加え、37℃で1時間インキュベートした。さらに、高い反応率を得るため、濃度、時間、混合方法について検討した。脱塩のため、ゲル濾過し、YM-10 フィルターを用いて濃縮した。

#### グルタチオン化の確認

過ギ酸を作製し、グルタチオン化処理後のタンパク溶液に等量加え、0℃で2時間反応させた。凍結乾燥により過ギ酸を除去した後、陰イオン交換樹脂カラムにより酸性アミノ酸分析を行った。また、Tris-Glycine (pH 8.8)を電極緩衝液とし、10%分離ゲルを使って Native PAGE を行った。

#### 酵素による消化

グルタチオン型 FABP 及び還元型 FABP について、蛋白質量の 1/10~1/50 量になるようにキモトリプシンを加えて 37℃でインキュベートし、経時的に反応系からサンプルを取った。サンプルは-80℃まで冷却することで、酵素反応を止めた。酵素消化の確認のため、Tris-Glycine (pH 8.8)を電極緩衝液とし、10%分離ゲルを使って Native PAGE を行った。

#### 結果と考察

大量培養したセンチュウの FABP1-9 は、結合活性測定と脂肪酸結合親和性測定により、ネイティブな状態で調製できることを確認することができた。さらに、FABP-9 を用いたグルタチオン化の反応モデルにより、グルタチオン化の条件を検討した結果、diamide 8mM、GSH 16mM の反応系で 37℃ 1 時間インキュベートすることにより、およそ半数の FABP をグルタチオン化できることがわかった。また、等濃度の diamide と GSH を予め混合した反応系では

グルタチオン化タンパクだけを得られることがわかった。これらモデル条件を利用して、センチュウ FABP の内、システイン残基を持つ FABP-3, 4, 5, 6, 8, 9 についてグルタチオン化を行い、Native PAGE によって確認した。グルタチオン化が確認できた FABP について、キモチリプシンによる被タンパク分解を確認したところ、グルタチオン型 FABP は還元型 FABP と比較して著しく感受性が増大することを確認できた。今回の結果は、ラットや両生類の場合と同様の傾向を示しており、センチュウにおいてもシステインへのグルタチオン化がタンパク分解のシグナルとなるか、構造の不安定化によりタンパク質分解酵素への感受性が高まると考えられる。今後は、さらに最適なグルタチオン化条件を探索し、また塩基性タンパク質についてもグルタチオン化を検討して被タンパク分解性について確認したい。

#### 参考文献

- Alpers,D.H.,Strauss,A.W.,Ockner,R.K.,Bass,N.M.and Gordon,J.I.(1984)Cloning of a cDNA encoding rat intestinal fatty acid binding protein.  
*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*,81,313-317
- Baba,K.Abe,K.T.,Tsunasawa,S.,and Odani,S.(1999)Characterization and primary structure of a fatty acid-binding protein and its isoforms from the liver of the amphibia,*Rana catesbeiana*.*J.Biochem.*,125,115-122
- Chan,L., Wei,C.-F., Li,W.-H., Yang,C.-Y., Ratner,P., Pownall,H., Gotto,A.M. Jr.and Smith,L.C.(1985)Human liver fatty acid binding protein cDNA and amino acid sequence. Functional and evolutionary implications.  
*J. Biol. Chem.*,260,2629-2632
- Cannon,J.R.and Eacho,P.I.(1991)Interaction of LY171883 and other peroxisome proliferators with fatty-acid-binding protein isolated from rat liver  
*.Biochem.J.*,280,387-391
- Cecilliani,F., Monaco,H.L., Ronchi,S., Faotto,L.and Spadon,P.(1994)The primary structure of a basic (pI 9.0) fatty acid-binding protein from liver of *Gallus domesticus*.*Comp. Biochem. Physiol.*,B109,261-271.
- Cistola,D.P.,Sacchettini,J.C.,Banaszak,L.J.,Walsh,M.T.and J.I.Gordon(1989) Fatty acid

- interactions with rat intestinal and liver fatty acid-binding proteins expressed in *Escherichia coli*. A comparative  $^{13}\text{C}$  NMR study. *J. Biol. Chem.*, **264**, 2700–2710
- Coleman, J.E. (1992) Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 897–946
- Denovan-Wright, E.M., Pierce, M., Sharma, M.K., and Wright, J.M. (2000) cDNA sequence and tissue-specific expression of a basic liver-type fatty acid binding protein in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Biochem. Biophys. Acta.*, **1492**, 227–232
- Di Pietro, S.M., Dell'Angelica, E.C., Veerkamp, J.H., Sterin-Speziale, N. and Santome, J.A. (1997) Amino acid sequence, binding properties and evolutionary relationships of the basic liver fatty-acid-binding protein from the catfish *Rhamdia sapo*. *Eur. J. Biochem.*, **249**, 510–517
- Fratelli, M., Demol, H., Puype, M., Casagrande, S., Eberini, I., Salmona, M., Bonetto, V., Mengozzi, M., Duffieux, F., Miclet, E., Bachi, A., Vandekerckhove, J., Gianazza, E. and Ghezzi, P. (2002) Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 3505–3510
- Glatz, J.F.C. and Veerkamp, J.H. (1983) A radiochemical procedure for the assay of fatty acid binding by proteins. *Anal. Biochem.*, **132**, 89–95
- Henry, G.L. and Melton, D.A. (1998) Mixer, a homeobox gene required for endoderm development. *Science*, **281**, 91–96
- Hunt, C.R., Ro, J.H.S., Dobson, D.E., Min, H.Y. and Spiegelman, B.M. (1986) Adipocyte P2 gene: Developmental expression and homology of 5'-flanking sequences among fat cell-specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 3786–3790
- Kaikaus, R.M., Bass, M.N. and Ocker, R.K. (1990) Functions of fatty acid binding proteins. *Experientia*, **46**, 617–630

- Ketterer, B., Tipping, E., Hackney, J.F. and Beale, D. (1976) A low molecular weight protein from rat liver that resembles triseriata. *Biochem.L.*, 203, 377-381.
- Kitamura, K., Suzuki, M., Suzuki, A. and Uyemura, K. (1980) The complete amino acid sequence of the P2 protein in bovine peripheral nerve myelin. *FABS Lett.*, 115, 27-30
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 227, 680-685
- Li, M. and Ishibashi, T. (1992) An in vitro reversible interconversion of rat liver fatty acid binding protein having different isoelectric points by virtue of fatty acid content. *Arch.Biochem.Biophys.*, 298, 254-258.
- Liang, J.N. and Pelletier, R. (1988) Destabilization of lens protein conformation by glutathione mixed disulfide. *Exp.Eye.Res.*, 47, 17-25
- Madsen, P., Rasmussen, H.H., Leffers, H., Honore, B. and Celis, J.E. (1992) Molecular cloning and expression of a novel keratinocyte protein (psoriasis-associated fatty acid-binding protein [PA-FABP]) that is highly up-regulated in psoriatic skin and that shares similarity to fatty acid-binding proteins. *J.Invest.Dermatol.*, 99, 299-305
- Morales, M.H., Ortiz, N.A., and Cordero-Lopez, N. (1995) EMBL DNA Data Bank Accession Number U28756
- Murai, A., Kusumoto, K. and Okumura, J. (2001) EMBL DNA Data Bank Accession Number AF380998 and AF380999
- Ockner, R.K. (1990) Historic overview of studies on fatty acid binding protein. *Mol.Cell.Biochem.*, 98, 3-9.
- Odani, S., Koide, T., Ono, T. and Aoyagi, Y. (1988) Analysis of strongly acidic amino acid

- by the conventional amino acid analyzer: Application to analysis of protein-bound glutathione and cysteine. *Biochem.*, 171, 305-309
- Odani, S., Okazaki, Y., Kato, C., Uchiumi, T. and Takahashi, Y. (1994) On the molecular origin of charge heterogeneity of rat liver fatty acid-binding protein (Z-protein). *Arch. Biochem. Biophys.*, 309, 81-84
- Odani, S., Baba, K., Tsuchida, Y., Aoyagi, Y., Wakui, S. and Takahashi, Y. (2001) Hepatic fatty acid-binding proteins of a Teleost, *Lateolabrax japonicus*. The primary structures and location of a disulfide bond. *J. Biochem.*, 129, 69-76
- Offermann, M.K., McKay, M.J., Marsh, M.W. and Bond, J.S. (1984) Glutathione disulfide inactivates, destabilizes, and enhances proteolytic susceptibility of fructose-1,6-bis phosphate aldolase. *J. Biol. Chem.*, 259, 8886-8891
- Perozzi, G., Baril, D., Murgia, C., Kelly, D., Begbie, R. and King, T.P. (1993) Expression of differentiated functions in the developing porcine small intestine. *J. Nutr. Biochem.*, 4, 699-705
- Rolf, B., Oudenampsen-Kruger, E., Borchers, T., Faergeman, N.J., Kundsén, J., Lezius, A. and Spener, F. (1995) Analysis of the ligand binding properties of recombinant bovine liver-type fatty acid binding protein. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1259, 245-253
- Sacchettini, J.C., Said, B., Schulz, H. and Gordon, J.I. (1986) Rat heart fatty acid-binding protein is highly homologous to the murine adipocyte 422 protein and the P2 protein of peripheral nerve myelin. *J. Biol. Chem.*, 261, 8218-8223
- Sato, T., Baba, K., Takahashi, Y., Uchiumi, T. and Odani, S. (1996) Rat liver fatty acid binding protein: Identification of a molecular species having a mixed disulfide with cysteine and enhanced protease susceptibility. *J. Biochem.*, 120, 908-914
- Schagger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of protein the range from 1 to 100 kDa.

*Anal. Biochem.*,166,368-379

Sacchettini, J.C., Hauf, S.M., Van Camp, S.L., Cistola, D.P. and Gordon, J.I. (1990)

Developmental and structural studies of an intracellular lipid binding protein expressed in the intestinal epithelium. *J. Bio Chem.*,265,19199-19207

Schoentgen, F., Pignede, G., Bonanno, L.M. and Jolles, P. (1989) Fatty-acid-binding protein from bovine brain. Amino acid sequence and some properties.

*Eur. J. Biochem.*,185,35-40

Schroeder, F., Jefferson, J.R., Powell, D., Incerpi, S., Woodford, J.K., Colles, S.M.,

Myers-Payne, S., Emge, T., Hubbell, T., Moncecchi, D., Prows, D.R. and

Heyliger, C.E. (1993) Expression of rat L-FABP in mouse fibroblasts: role in fat absorption. *Mol. Cell Biochem.*,123,73-83

Spener, F. and Borchers, T. (1992) Structural and multifunctional proteins: from fatty acid-binding to cell growth inhibition. *Biochem. Soc. Trans.*,20,806-811.

杉山 俊博(1988)グルタチオンによる活性修飾 核酸・酵素・蛋白質,33,1423-1428

Sugiyama, Y., Yamada, T. and Kaplowitz, N. (1982) Identification of hepatic Z-protein in a murine elasmobranch, *Platyhinoides triseriata*. *Biochem. J.*,203,377-381

Sundelin, J., Anundi, H., Tragardh, L., Eriksson, U., Lind, P., Ronne, H., Peterson, P.A. and Rask, L. (1985 a) The primary structure of rat liver cellular retinol-binding protein. *J Biol Chem.*,260,6488-6493

Sundelin, J., Das, S.R., Eriksson, U., Rask, L. and Peterson, P.A. (1985 b) The primary structure of bovine cellular retinoic acid-binding protein, *J. Bio Chem.*,260,6494-6499

Takahashi, K., Odani, S., and Ono, T. (1982) Primary structure of rat liver Z-protein. A low-Mr cytosol protein that binds sterols, fatty acids other small molecules. *FEBS. Lett.*,140,63-66

- Takahashi,K.,Odani,S.and Ono,T.(1983)Isolation and characterization of the three fractions(DE- I ,DE- II and DE- III)of rat liver Z-protein and complete primary structure of DE- II .*Eur.J.Biochem.*,136,589-601.
- Thomas,J.A.,Poland,B.and Honztko,R.(1995)Protein sulfhydryls and their role in antioxidant function of protein S-thiolation.*Arch.Biochem.Biophys.*,319,1-9
- Veerkamp,J.H.,van Kuppevelt,T.H.,Maatman,R.G.and Prisen,C.F.(1993)Structure and functional aspects of cytosolic fatty acid binding protein.*Prostaglandins Leukot .Essent.Fatty Acids.*,49,887-906
- Veerkamp,J.H.and Maatman,R.G.(1995)Cytoplasmic fatty acid binding protein:their structure and genes.*Prog.Lipid Res.*,34,17-52.
- Watanabe,R.,Fujii,H.,Odani,S.,Sakakibara,J.,Yamamoto,A.,Ito,M.and Ono,T.(1994) Molecular cloning of a cDNA encoding a novel fatty acid-binding protein from rat skin.*Biochem.Biophys.Res.Comm.*,200,253-259
- Wilkinson,J.F.C.and Veerkamp,J.H. (1983) Studies on the fatty acid-binding proteins. The detection and quantification of the protein from rat liver by using a fluorescent fatty acid analog.*Biochem.J.*,238.419-424
- Wolfrum,C., Ellinghaus,P., Kannenberg,F., Seedorf,U., Assmann,G., Boerchers,T.and Spener,F. (1997) EMBL DNA Data Bank Accession Number Y14660

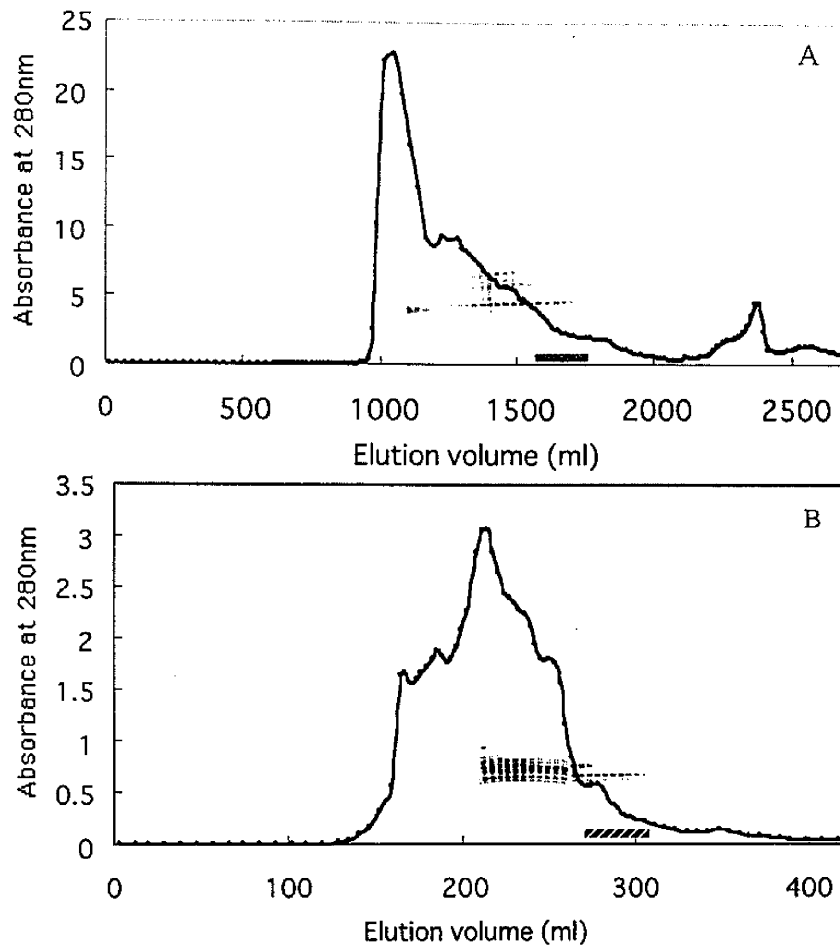


図1. *Rana catesbeiana* 肝細胞質画分のSephacryl S-200, Sephacryl S-100カラムによるゲル濾過  
 A : *Rana catesbeiana*肝細胞質可溶性画分を10mM Tris-HCl (pH8.0) 1mM EDTA bufferで平衡化した  
 Sephacryl S-200 カラム (4.5×100cm) でゲル濾過し低分子画分である下線部をプールした。  
 B : Sephacryl S-200の低分子画分を10mM Tris-HCl (pH8.0) 1mM EDTA bufferで平衡化したSephacryl S-  
 100カラム (3×100cm) で再度ゲル濾過し、低分子画分である下線部をプールした。

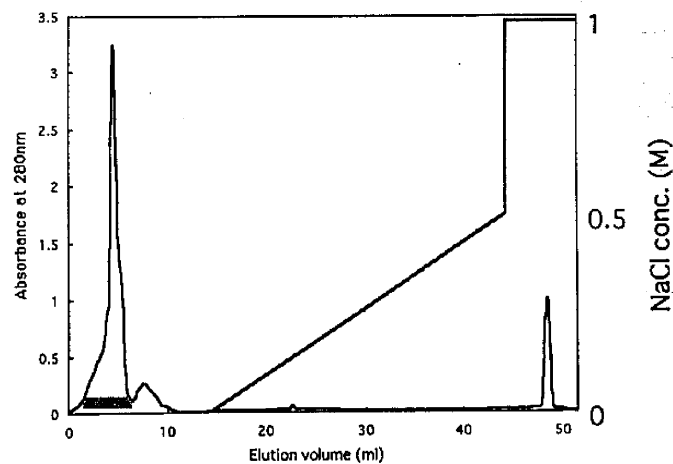


図2. *Rana catesbeiana*肝脂肪酸結合タンパクのRESOURCE Qカラム陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製  
 Sephacryl S-100によるゲル濾過の低分子画分を15mM Tris HCl, 1mM EDTA 緩衝液 pH8.0で平衡化したRESOURCE Qカラム  
 (1ml) にてイオン交換クロマトグラフィーを行った。非吸着画分である下線部を回収し精製標品とした。グラジエント：15mM  
 Tris HCl, 1mM EDTA 緩衝液 pH8.0で平衡化, 1M NaCl, 15mM Tris HCl, 1mM EDTA緩衝液 pH8.0で30分まで50%, その後100  
 %。流速：1ml/min



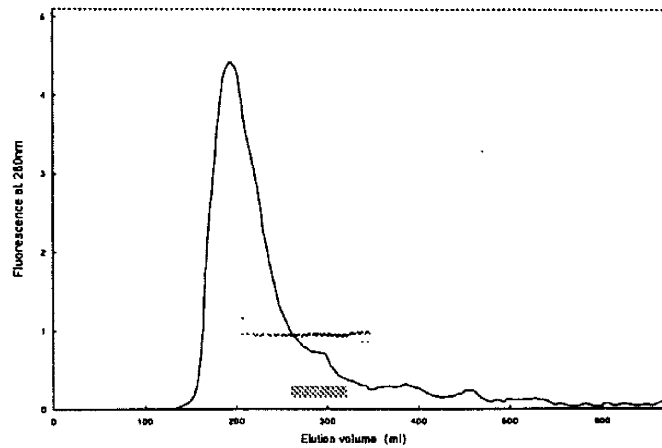


図3. *Anolis pulchellus* 肝細胞質画分のSephacryl S-100カラム によるゲル濾過

溶菌、遠心した上清画分を10mM Tris-HCl (pH8.0) 1mM EDTA 緩衝液で平衡化したSephacryl S-100カラム (3×100cm) でゲル濾過し、低分子画分である下線部をプールした。重ねた画像はフラクションごとのSDS-PAGE結果。

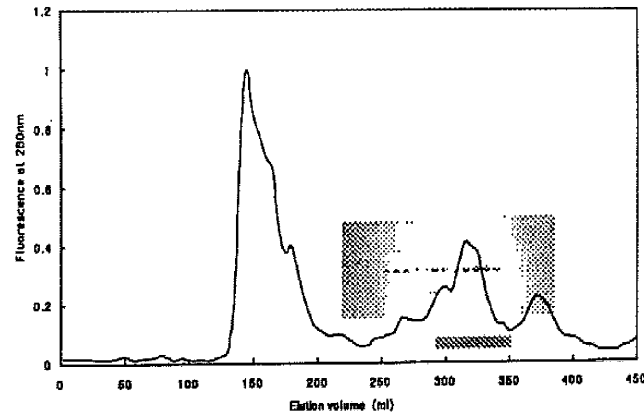


図4. *Brachydanio rerio* 肝細胞質画分のSephacryl S-100カラムによるゲル濾過

溶菌、遠心した上清画分を10mM Tris-HCl (pH8.0) 1mM EDTA bufferで平衡化したSephacryl S-100カラム (3×100cm) でゲル濾過し、低分子画分である下線部をプールした。重ねた画像はフラクションごとのSDS-PAGE結果。

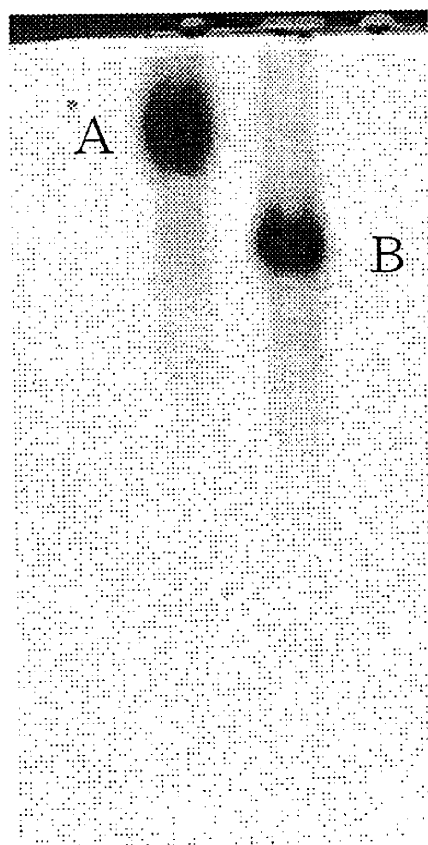


図5. *Rana catesbeiana* L-FABPのグルタチオン化によるNative-PAGE挙動の変化

グルタチオン化FABPのNative-PAGE泳動パターンを示した。ゲル組成は12%アクリルアミド, 0.3%Bis-アクリルアミド, 0.375M Tris-HCl (pH8.8)。Tris-glycine系泳動bufferを用いて泳動した。

A: *Rana* L-FABP-SH  
B: *Rana* L-FABP-SSG

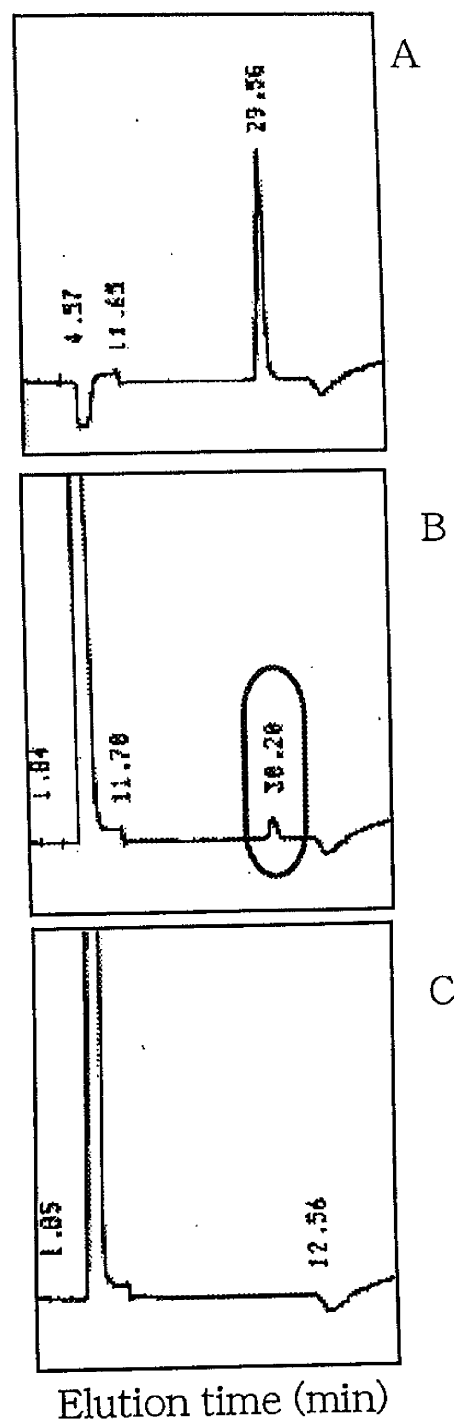


図6. *Anolis pulchellus* FABP-SSGのグルタチオンスルホン酸検出

A: グルタチオンスルホン酸の標準溶液 (5nmol)  
B: 0.56nmolのFABP-SSGを過ギ酸酸化し、アミノ酸分析計の陰イオン交換樹脂カラムで分析  
C: 0.63nmolのFABP-SHを過ギ酸酸化し、その後同様に分析

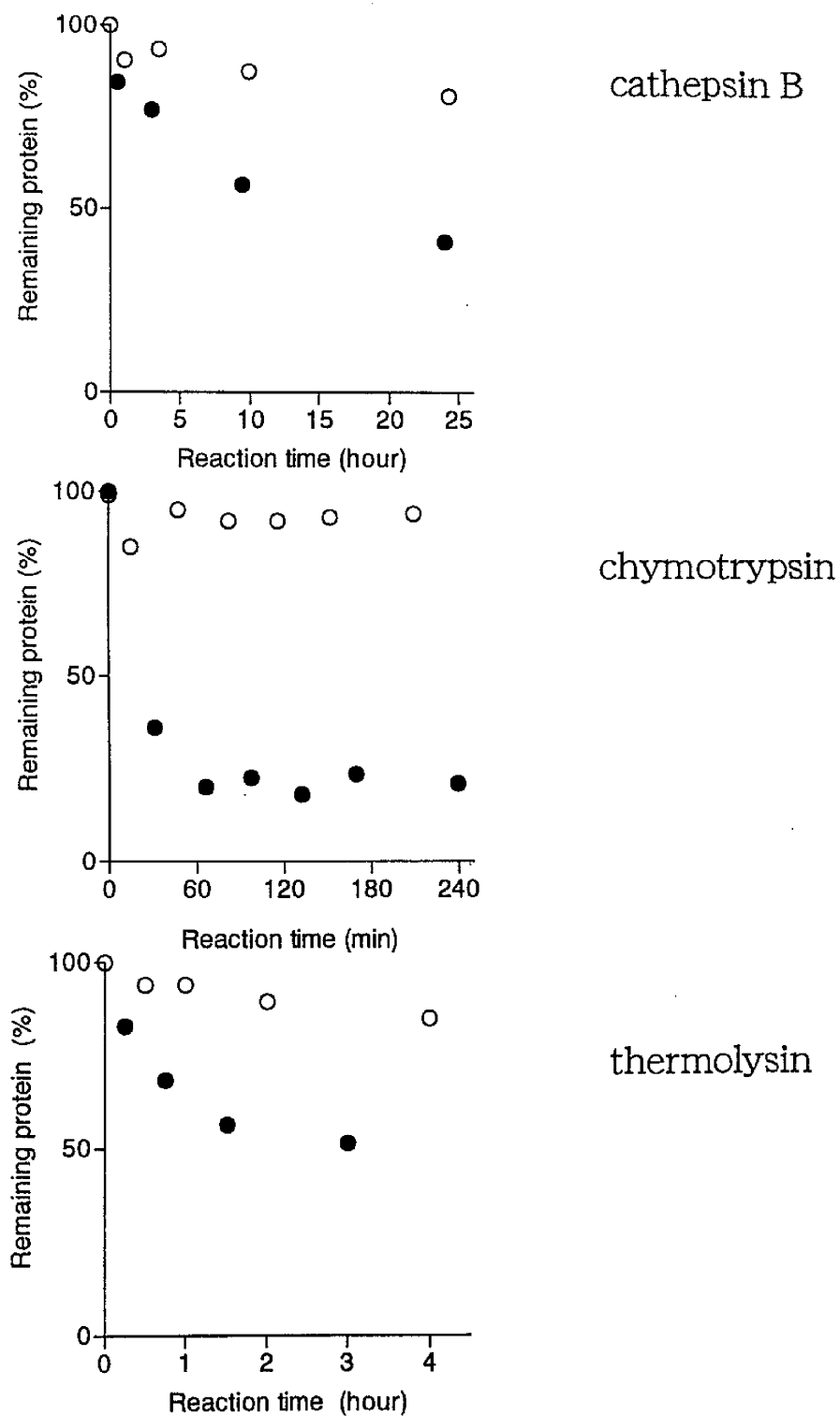


図7. *Rana catesbeiana* FABP-SH, -SSGのプロテアーゼ感受性の比較

*Rana* L-FABP-SSG (●) と *Rana* L-FABP-SH (○) に酵素を反応させ、反応液から一定量を取り、 $C_{18}$ カラムにより逆相HPLCにて分析し、0時間のピークを100%として残存タンパク質をプロットした。

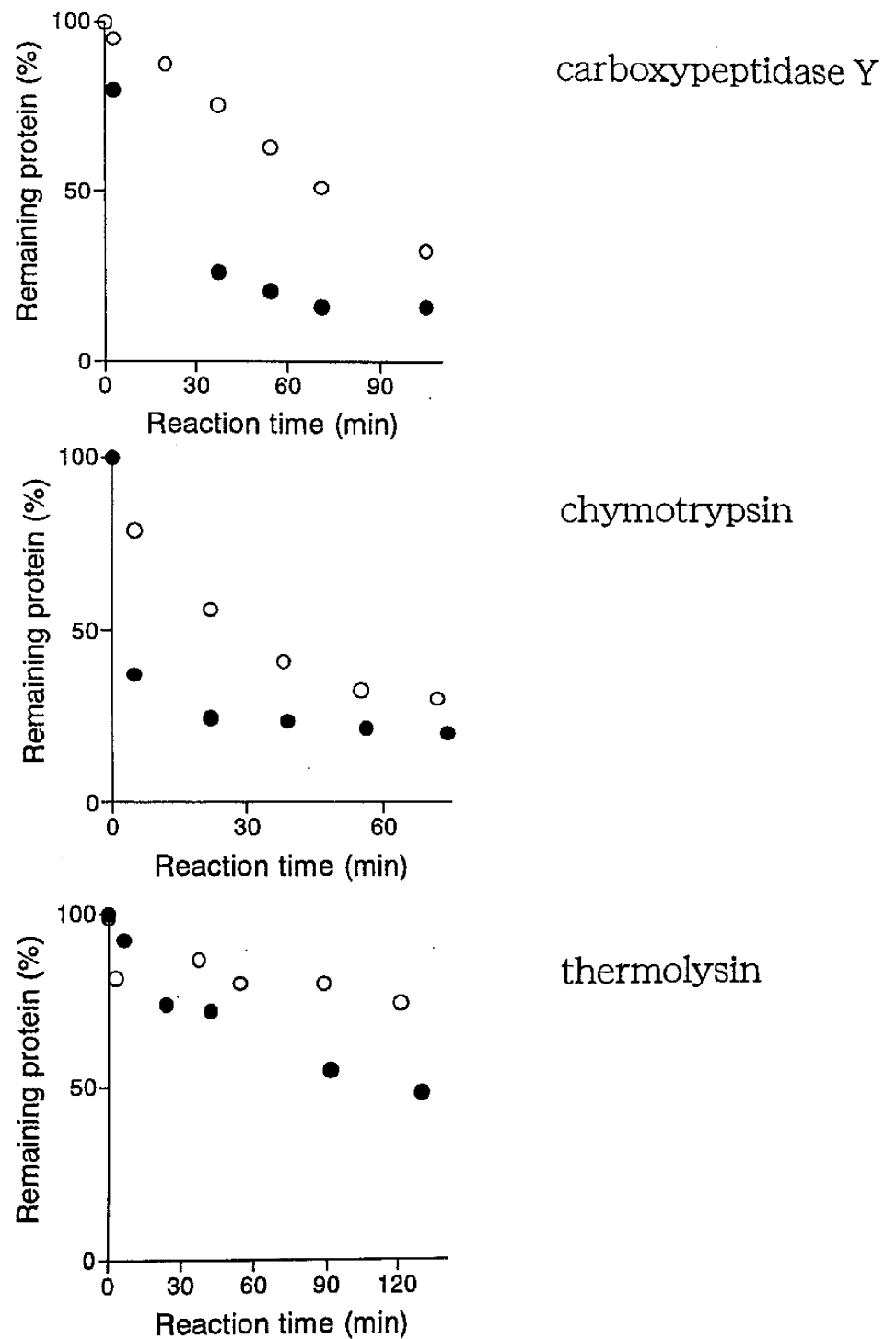


図8. *Anolis pulchellus* FABP-SH, -SSGのプロテアーゼ感受性の比較

*Anolis* L-FABP-SSG (●) と *Anolis* L-FABP-SH (○) に酵素を反応させ、反応液から一定量を取り、 $C_8$ カラムにより逆相HPLCにて分析し、0時間のピークを100%として残存タンパク質をプロットした。

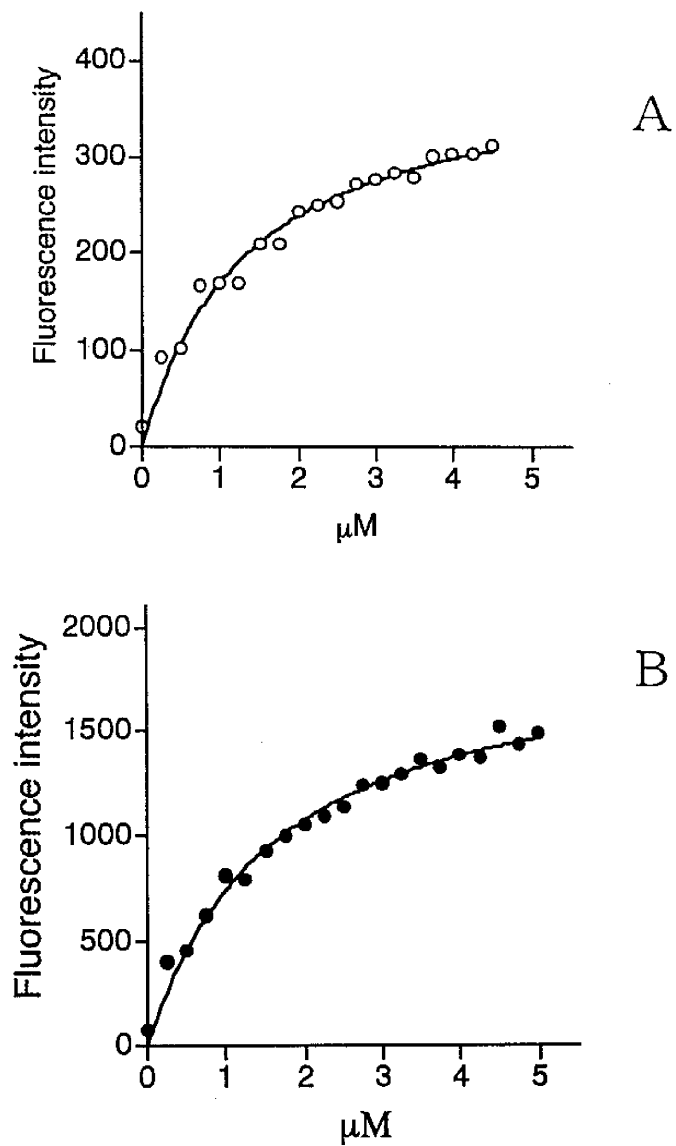


図9. *Rana catesbeiana* FABP-SH, FABP-SSGの結合活性の測定

A : チオール基をDTTによって還元した*Rana* L-FABPによる*cis*-parinaric acidの結合を蛍光強度によって測定した。

B : *Rana* L-FABPのチオール基にGSHを結合させた場合。

\* 励起波長310nm、蛍光波長415nmで測定

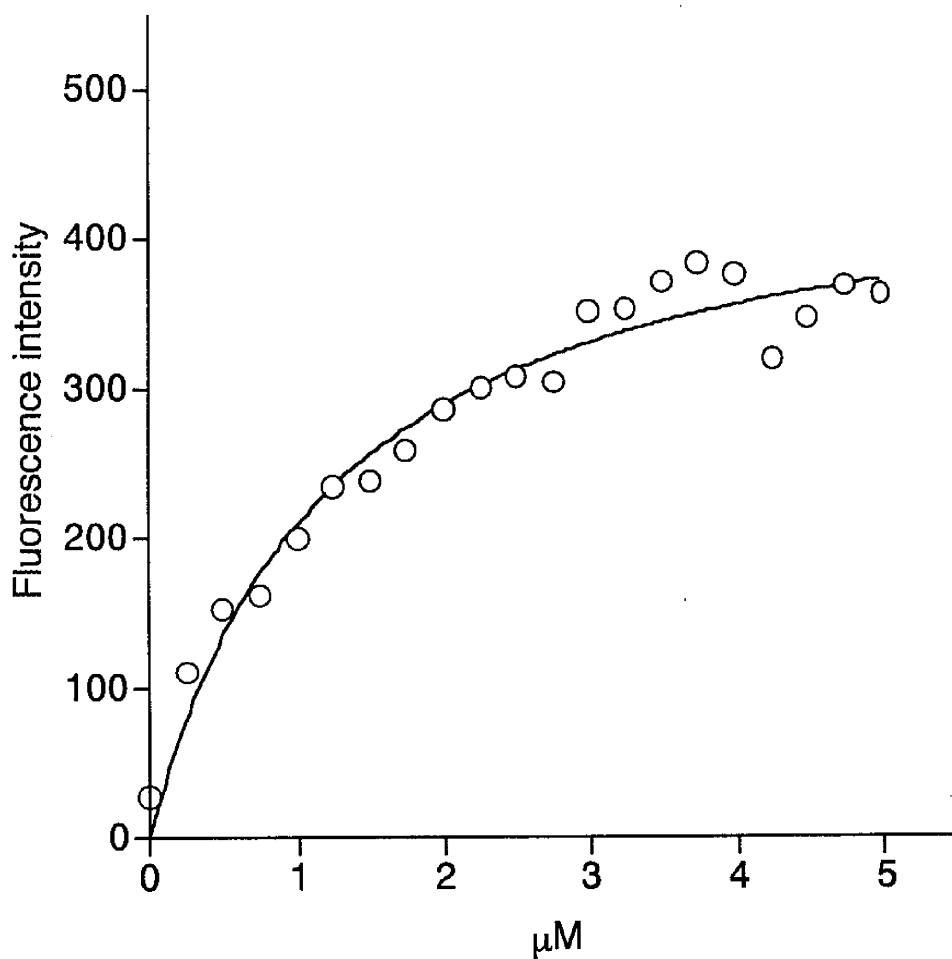


図10. *Rana catesbeiana* L-FABPの結合活性の測定

ゲル濾過、イオン交換した精製 *Rana* L-FABP をLipidexカラムで内因性の脂肪酸を除去したものに、*cis*-parinaric acidを加えて行ったときの蛍光強度を測定した。310nmで励起し、415nmの蛍光波長を測定した。

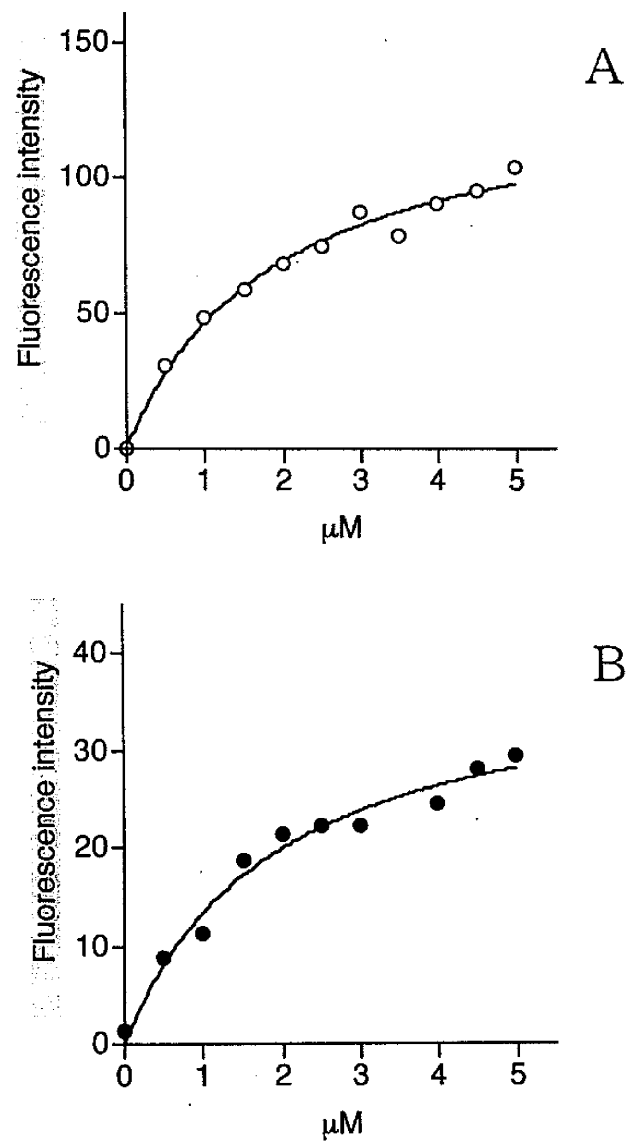


図11. *Anolis pulchellus* FABP-SH, FABP-SSGの結合活性の測定

A : *Anolis* L-FABPのチオール基をDTTによって還元させたものに  
*cis*-parinaric acidを加えて行った時の蛍光強度を測定した。

B : *Anolis* L-FABPのチオール基にGSHが結合したものに  
*cis*-parinaric acidを加えて行った時の蛍光強度を測定した。

\* 310nmで励起し、蛍光波長415nmで測定

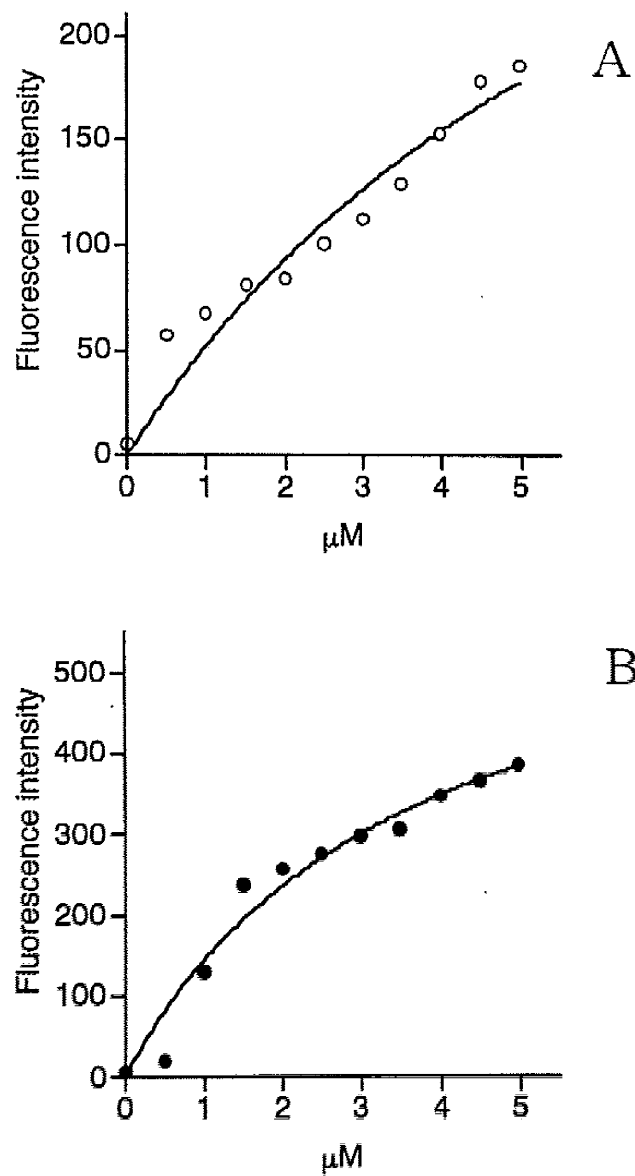


図12. *Brachydanio rerio* FABP-SH, FABP-SS-の結合活性の測定

- A : Zebrafish L-FABPのチオール基をDTTによって還元させたものに *cis*-parinaric acidを加えて行った時の蛍光強度を測定した。
- B : Zebrafish L-FABPにdiamideによって-SS-結合を形成させたものに *cis*-parinaric acidを加えて行った時の蛍光強度を測定した。
- 励起光310nm ; 蛍光波長415nm



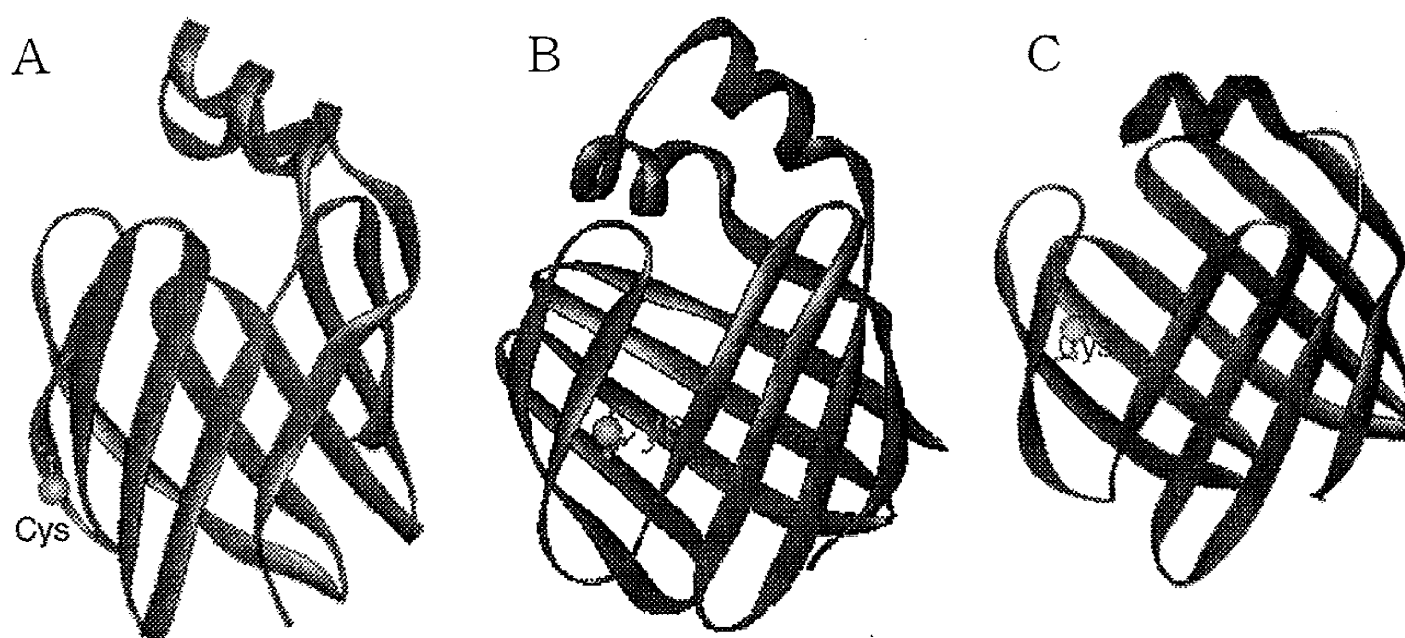


図13. ラット、*Rana catesbeiana*、*Anolis pulchellus* L-FABPの 立体構造の比較

ラット (A) とウシガエル (B) 、タテガミトカゲ (C) L-FABPの立体構造をWebLabViewer (Molecular Simulation) で表示した。  
それぞれCys-69、Cys-81、Cys-92のアミノ酸側鎖をBall-and-Stickモデルで示す。

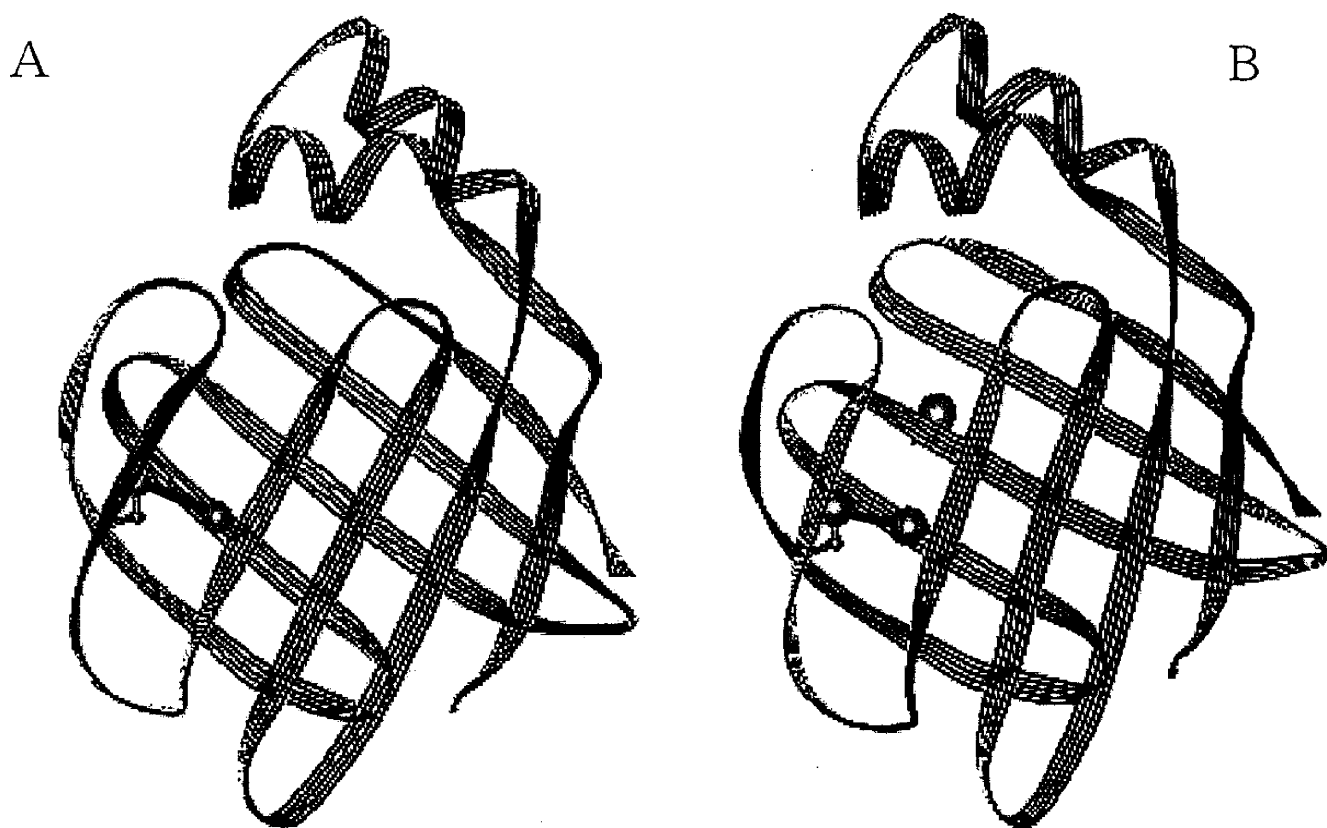


図14. *Brachydanio rerio* L-FABPと*Lateolabrax japonicus* L-FABPの立体構造の比較

ゼブラフィッシュ(A)とスズキ (B) のL-FABPの立体構造をSwiss Modelにより予測しWebLabViewer (Molecular Simulation) で表示した。  
それぞれのチオール基をBall-and-Stickモデルで示し、ジスルフィド結合を示した。

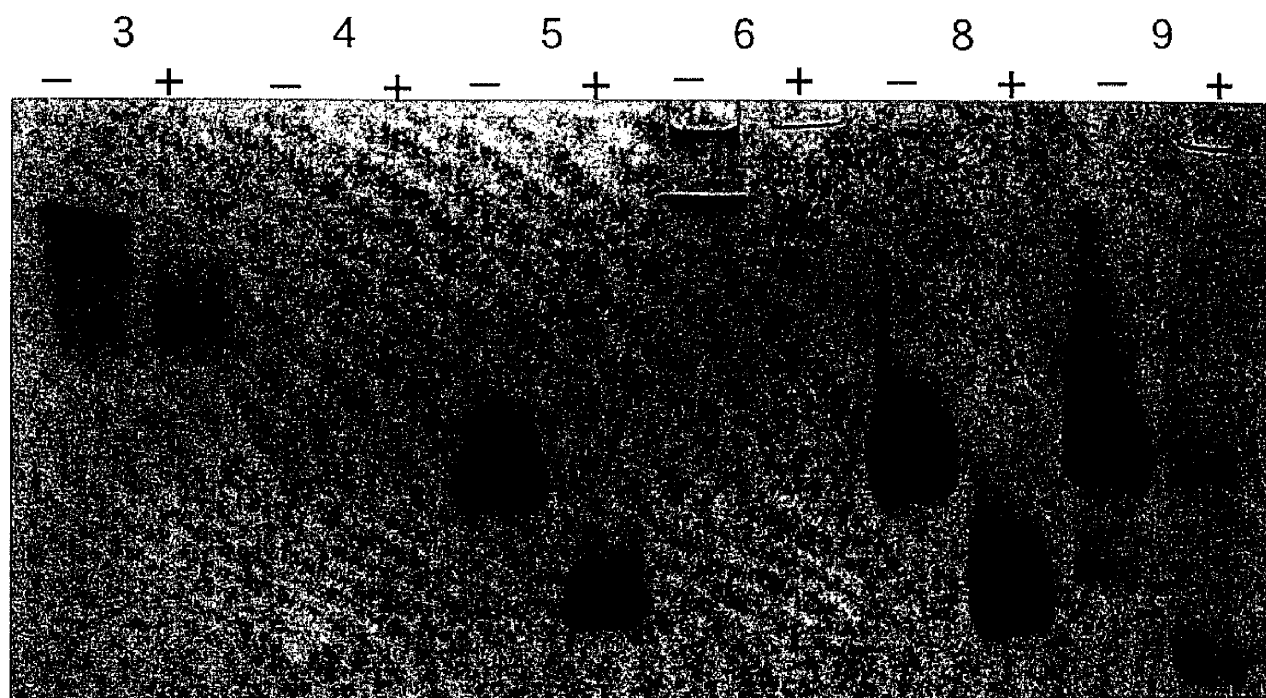
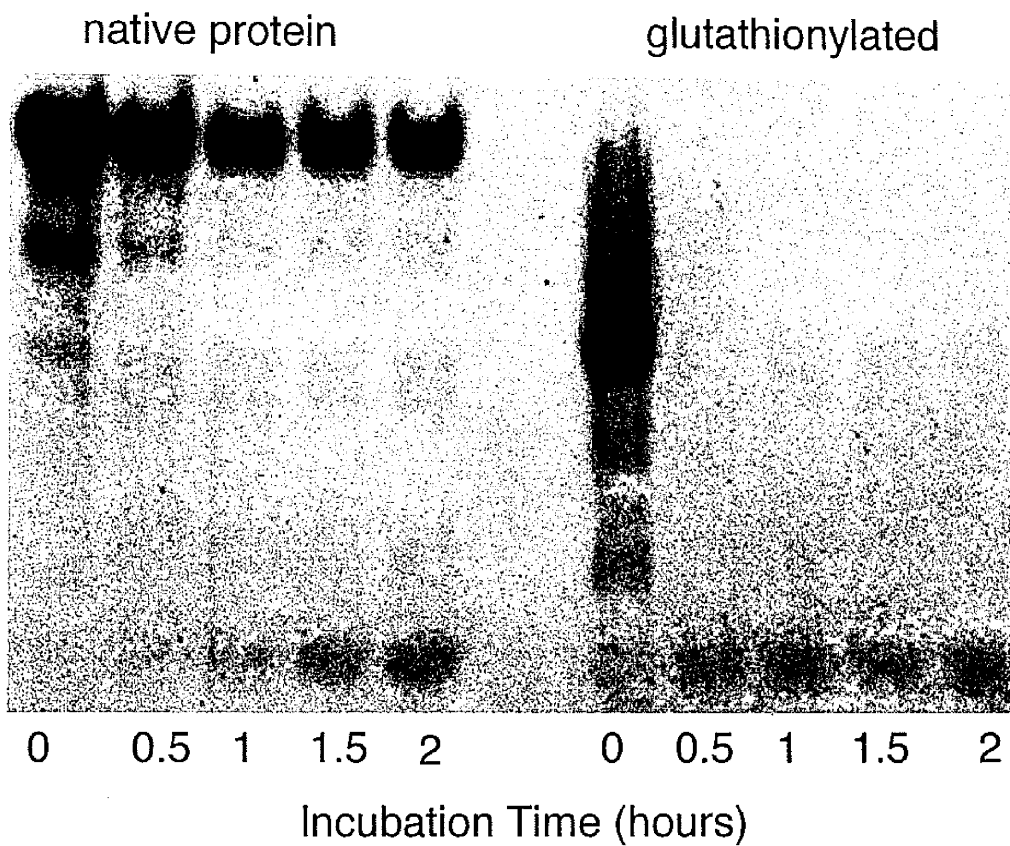


図 15 *Caenorhabditis elegans* FABP ホモログのグルタチオン化反応

FABP-3, 4, 5, 6, 8, 9 について 12mM diamide, 12mM GSH でグルタチオン化(+)し, native PAGE により反応を追跡した (詳細はテキスト参照)。



- キモトリプシンをタンパク重量の1/10
- 37℃でインキュベート。0～2時間まで30分毎
- 還元型FABP-5溶液を同様に処理
- Tris Glycine(pH 8.3) Native PAGE

図 16 *Caenorhabditis elegans* FABP-5 のグルタチオン化によるプロテアーゼ感受性の増大 (実験の詳細はテキスト参照)

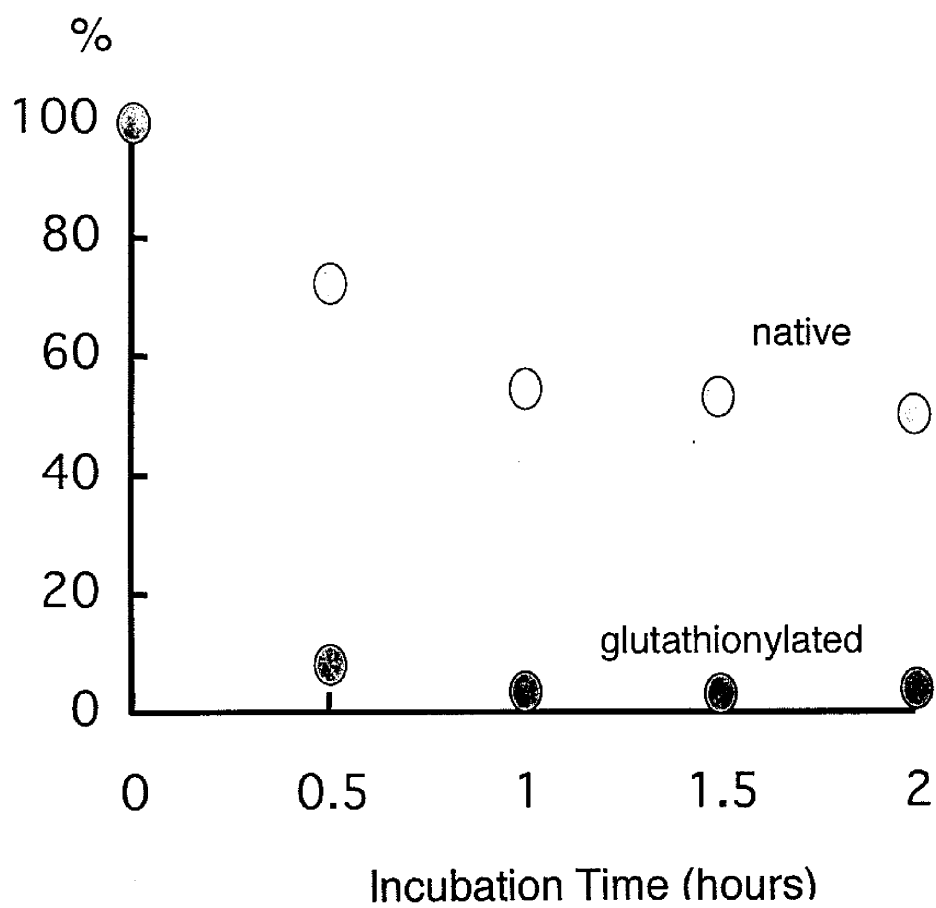


図17 *Caenorhabditis elegans* FABP-5 におけるグルタチオン化とプロテアーゼ感受性の相関。図16の結果をデンストメトリーにより定量化し消化時間に対してプロットした（詳細はテキスト参照）。

Mr= 13,722

amino acid	analysis	residue #	integer	Theory	1-lett.	mole%
Asp	6.35	14.59	15	14	D	11.7
Thr	3.79	8.70	9	9	T	7.0
Ser	4.65	10.70	11	11	S	8.6
Glu	7.30	16.77	17	16	E	13.5
Pro	1.54	3.53	4	4	P	2.8
Gly	4.52	10.39	10	10	G	8.4
Ala	2.40	5.52	6	5	A	4.4
Cys	0.44	1.01	1	1	C	0.8
Val	4.88	11.21	11	12	V	9.0
Met	0.50	1.14	1	1	M	0.9
Ile	4.21	9.67	10	12	I	7.8
Leu	2.80	6.44	6	5	L	5.2
Tyr	0.85	1.95	2	2	Y	1.6
Phe	2.61	6.01	6	6	F	4.8
Lys	5.88	13.52	14	13	K	10.9
His	0.40	0.91	1	1	H	0.7
Trp		0.00	0	1	W	0.0
Arg	0.98	2.26	2	2	R	1.8
Total	54.09	124.32	126	125		99.9

sample weight	5.97 $\mu\text{g}$	(	8.36 / 350 $\mu\text{l}$ )
molar amount	0.435 nmol	(	0.61 / 350 $\mu\text{l}$ )

hydrolyzed:  $\frac{30}{350}$  ul sample conc. = 279  $\mu\text{g/ml}$   
 = 20.3 nmol/ml

表1. *Rana catesbeiana* L-FABPのアミノ酸分析結果

精製標品のアミノ酸組成を日立835型アミノ酸分析計を用いて分析した。トリプトファンは加水分解時に分解。  
分子量を13721.5として計算した。



Mr= 14,004

amino acid	analysis	residue #	integers	theory	1-lett.	mole%
Asp	10.34	8.7	9	8	D	6.9
Thr	16.93	14.2	14	15	T	11.3
Ser	7.69	6.5	7	7	S	5.1
Glu	19.86	16.7	17	16	E	13.2
Pro	3.76	3.2	3	3	P	2.5
Gly	13.33	11.2	11	10	G	8.9
Ala	7.70	6.5	7	6	A	5.1
Cys	1.35	1.1	1	2	C	0.9
Val	10.75	9.0	9	9	V	7.2
Met	3.68	3.1	3	4	M	2.4
Ile	12.86	10.8	11	11	I	8.6
Leu	9.42	7.9	8	7	L	6.3
Tyr	2.14	1.8	2	2	Y	1.4
Phe	6.03	5.1	5	5	F	4.0
Lys	18.54	15.6	16	15	K	12.3
His	1.04	0.9	1	1	H	0.7
Trp		0.0	0	1	W	0.0
Arg	4.88	4.1	4	4	R	3.2
Total	150.30	126.4	128	126		100.0

sample weight	16.7 $\mu$ g	(	23.4 / 350 $\mu$ l)
molar amount	1.2 nmol	(	1.67 / 350 $\mu$ l)

lyolyzed: 50 ul  
 dilution: 350 ul sample conc. = 467  $\mu\text{g/ml}$   
 = 33 nmol/ml

表3. *Brachydanio rerio* L-FABPのアミノ酸組成分析

精製標本のアミノ酸組成を日立835型アミノ酸分析計を用いて

分析した。トリプトファンは加水分解時に破壊されるため0とする。

分子量14004.2として計算した。