

図36. CD31強陽性細胞と陽性細胞の血管内皮細胞への分化能の比較

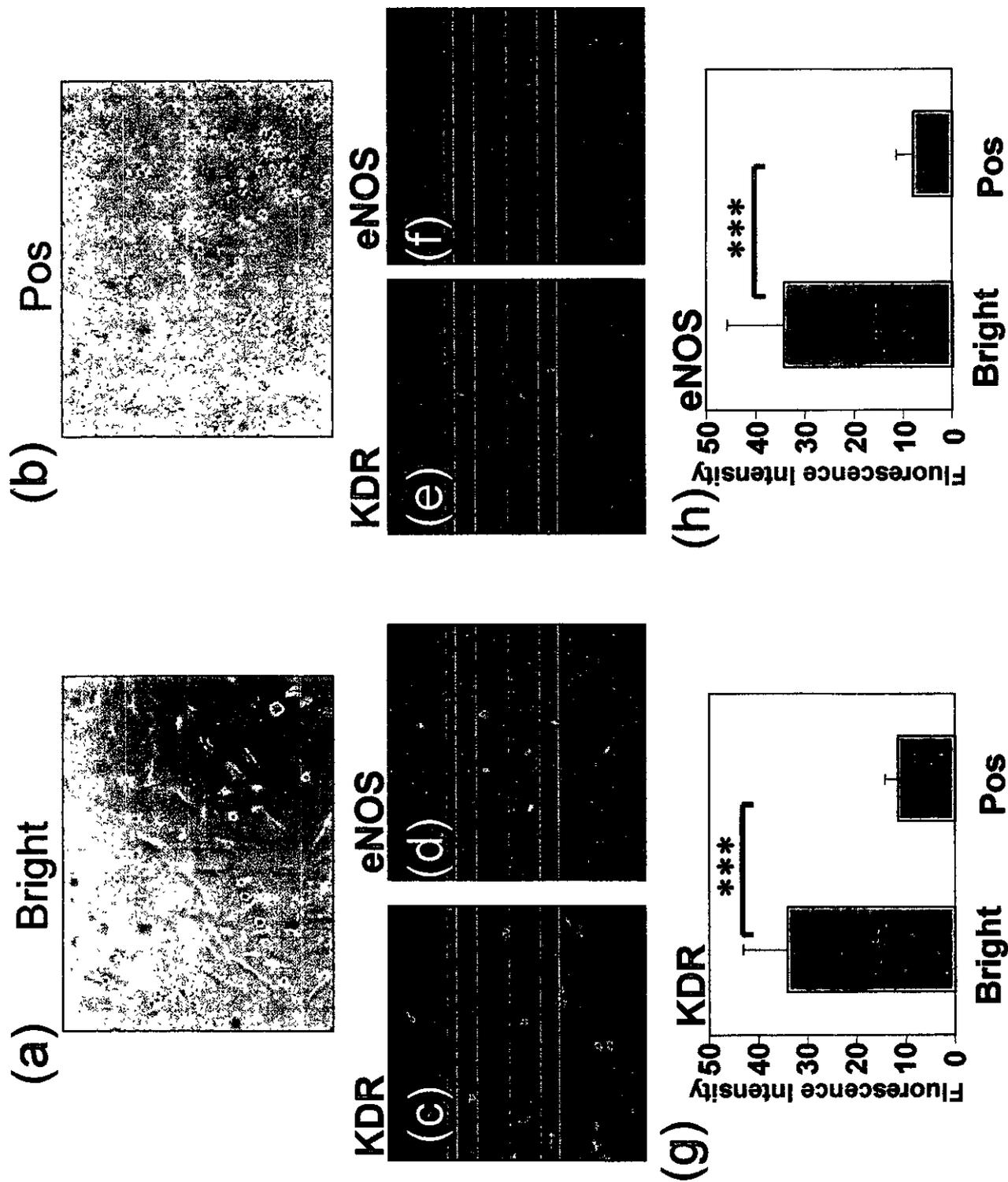


図37. 臍帯血及び末梢血のAC133及びCD34陽性細胞の含有率の比較

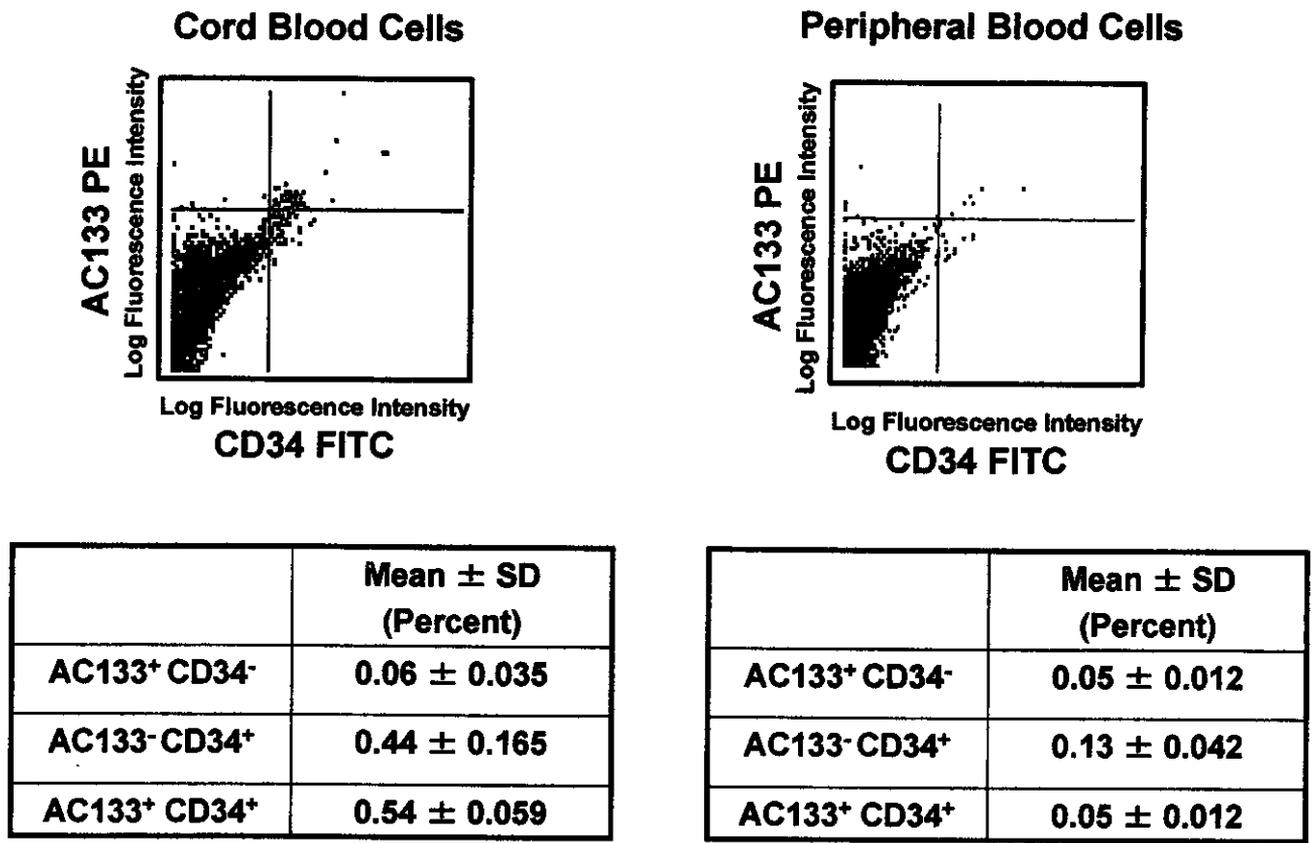


図38. 臍帯血及び末梢血のAC133及びCD34陽性細胞の増殖の比較

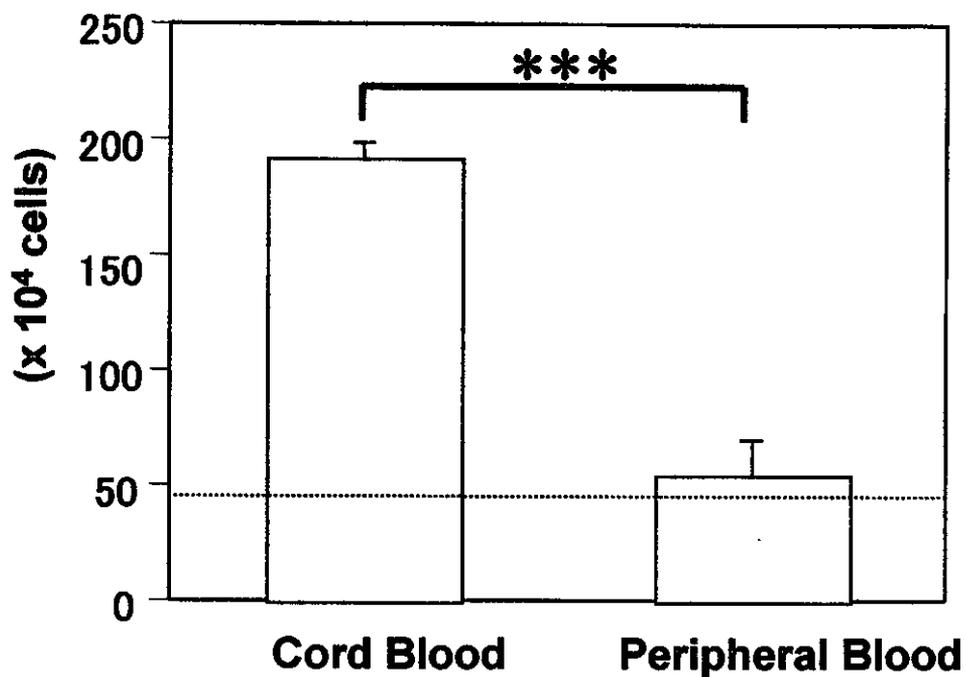


図39. 臍帯血AC133陽性細胞におけるCD31発現の経時的変化

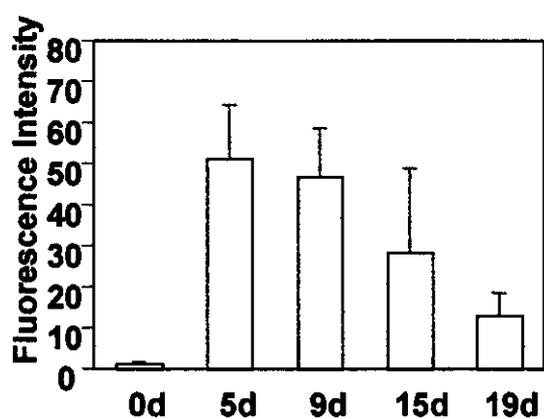
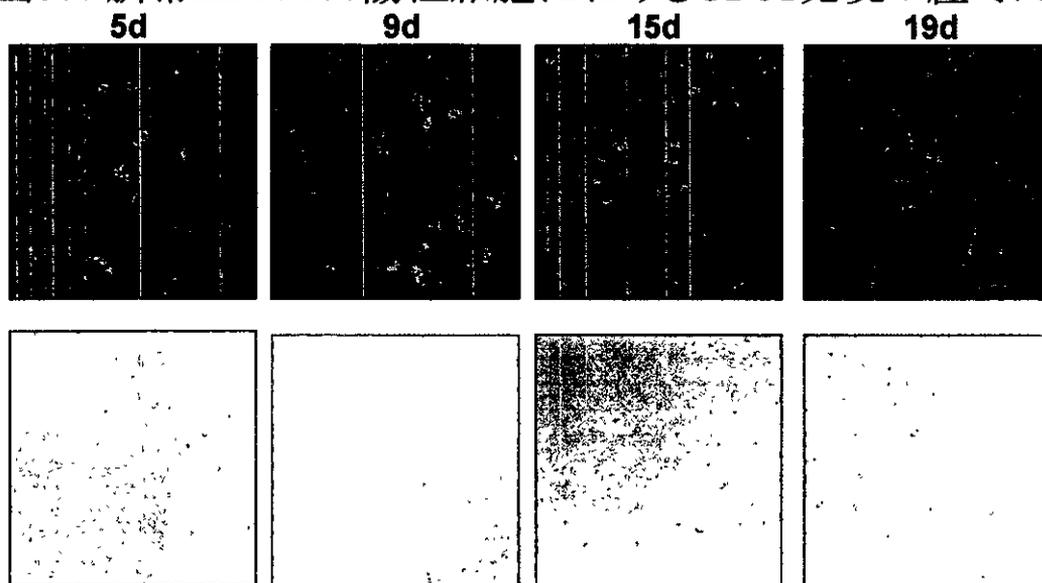


図40. 臍帯血AC133陽性細胞におけるKDR発現の経時的変化

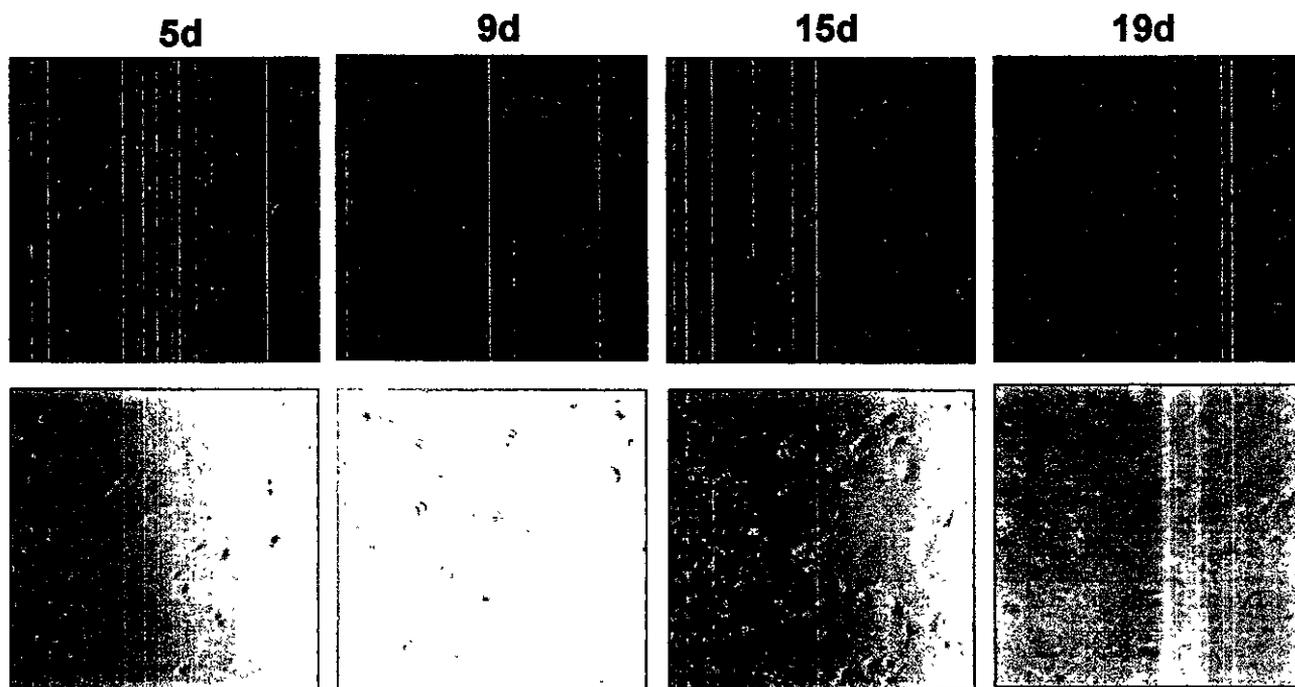


図41. 臍帯血AC133陽性細胞を6日間培養した時のCD31強陽性細胞の増加

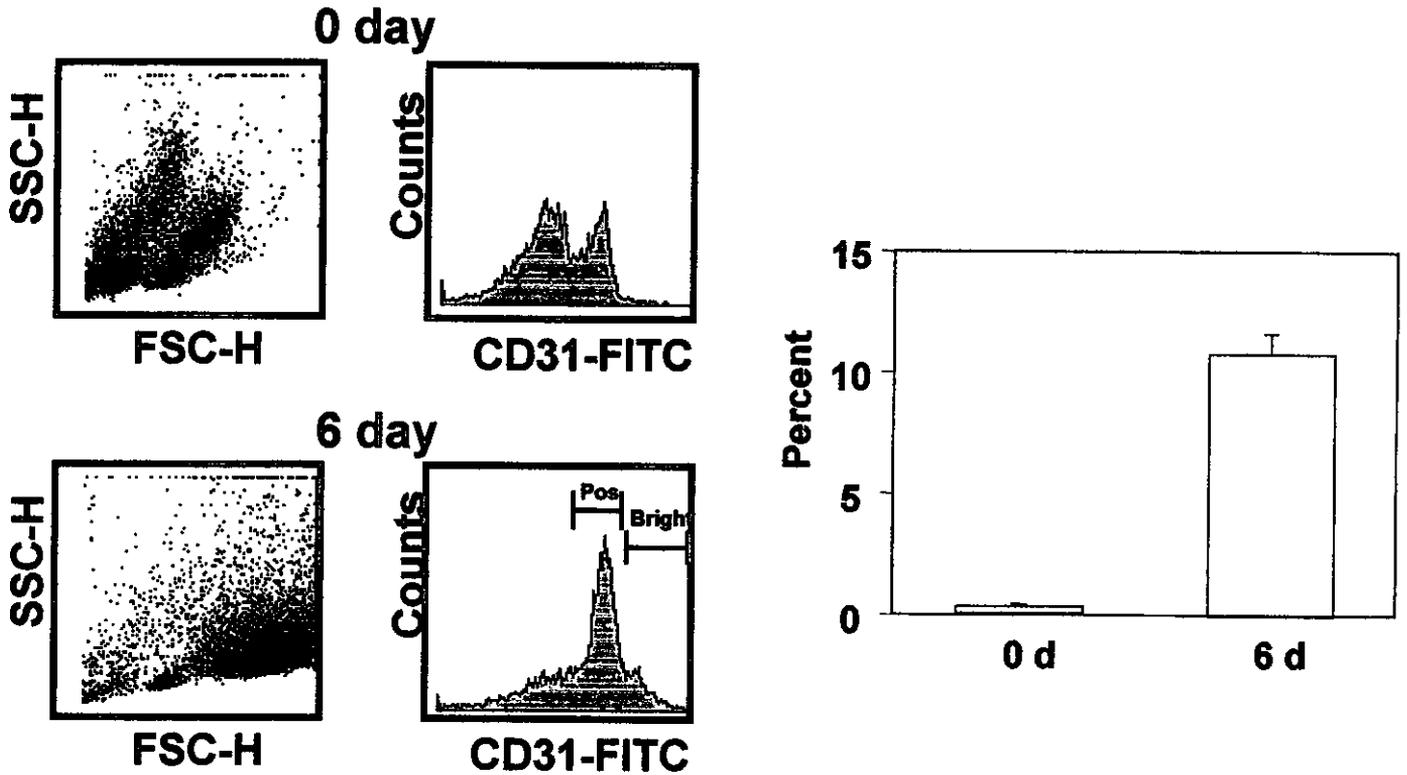
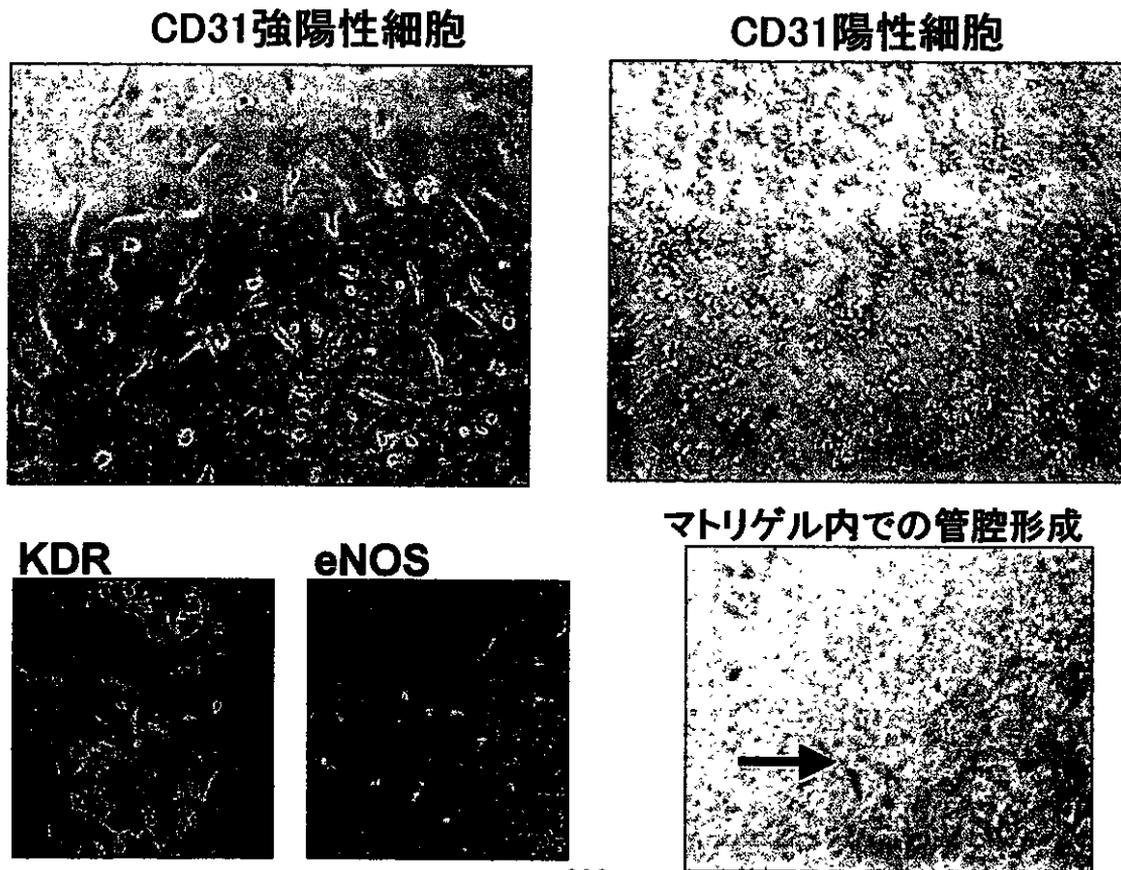


図42. 臍帯血AC133陽性細胞由来CD31強陽性細胞及び陽性細胞のファイブロネクチン上での血管内皮細胞への分化



細胞治療薬の新規体内動態解析技術の開発研究

分担研究者 川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部長

要 旨

組織・細胞加工医薬品等から分泌される目的タンパク質の生体内発現量や体内動態に関する新規評価法の開発を目的とする研究を行なった。はじめに、フルオレッセイン誘導体 FIAsH (4',5'-bis(1,3,2-dithioarsolan-2-yl) fluorescein) に特異的に結合するタグペプチドを GFP 誘導体 ECFP に結合させた融合タンパク質を作り、血清中での FIAsH 結合の至適条件を検討した。次に FIAsH 結合性タグペプチドを導入した各種 TNF- α 改変体の発現ベクターを作成し、HeLa 細胞に発現させ、その特性を評価した。その中で、C-末端に α ヘリックス型タグを導入した TNF- α は良好に発現、分泌され、TNF- α と同様の細胞障害活性を示すことが明らかとなった。また FIAsH による蛍光標識も確認され、この方法は内因性タンパク質の蛍光標識法として利用可能であることが明らかとなった。蛍光標識の程度は結合液中の SH 還元剤によって影響され、また細胞からの FIAsH 反応性物質の遊離が示唆されることから、目的タンパク質の体内動態解析への応用にあたっては、結合条件の詳細な検討、および目的タンパク質の部分精製が必要であることが予想された。

A. 研究目的

細胞治療においては、細胞本来の機能、あるいは遺伝子組換えによって目的とする機能を付与した細胞を利用することが多いが、この場合通常細胞の機能は細胞によって合成される機能性タンパク質によって担われる。したがって、これら細胞・細胞加工医薬品として用いる細胞を評価する場合、細胞を生体内に適用した場合の機能性タンパク質の発現を含めた体内動態を評価することは極めて重要といえる。しかしこの場合、バイオテクノロジー医薬品の体内動態の評価に用いられるような放射線同位体標識タンパク質の利用は困難である。そこで、通常液体クロマトグラフィーを中心とした測定、あるいは免疫化学的

法を利用した測定法が用いられる。しかしながら、十分な感度が得られない場合、あるいは適切な抗体が得られない場合も少なくない。

そこで、本研究では細胞・細胞加工医薬品の体内動態の解析に応用可能なタンパク質の体内動態解析法の開発を目的とした研究を行なった。方法としては、細胞内で発現する内因性タンパク質の新しい蛍光標識物質として発表された FIAsH (4',5'-bis(1,3,2-dithioarsolan-2-yl) fluorescein) (*Science*, **281**, 269-272 (1998)) の利用の可能性を検討した。この物質はフルオレッセイン誘導体であり、-CCXXCC- (C はシステイン、X はシステイン以外の任意のアミノ酸) というアミノ酸配列を含む α -ヘリックスに特異的に配位し、強い蛍光

を発するという特性を有する。したがって、このアミノ酸配列を含むタグペプチドを目的タンパク質に導入し発現させれば、目的タンパク質の簡便な蛍光標識法としての応用が可能と考えられる。同様の目的で用いられる蛍光標識物質としては、緑色蛍光タンパク質 Green Fluorescence Protein (GFP)が既にあるが、FIAsH 特異的タグペプチドは GFP に比較してはるかに小さいため (GFP は 238 個のアミノ酸からなるのに対し、20 個弱のアミノ酸で足りるとされている)、目的タンパク質の機能および生体内動態への影響を小さく抑えることができると期待される。

本研究でははじめに FIAsH 標識の定量が容易である GFP 誘導体 ECFP をモデル目的タンパク質として選び、血中のタグペプチド結合 ECFP への FIAsH 標識条件を検討するとともに、血中でも定量的な標識が可能なることを明らかにした。次にモデル化合物として TNF- α を選び、タグペプチドを導入させたタンパク質を発現させて、機能への影響を検討し、さらに FIAsH とタグとの結合性の改善をめざし、各種タグ導入法の検討を行った。

B. 研究方法

1. 試薬: FIAsH は FIAsH-EDT₂ (EDT:1,2-ethanedithiol) として Aurora Bioscience Corporation (San Diego, CA, USA)から購入した。pCMV-TNF および pShuttle は水口博士(国立医薬品食品衛生研究所)から供与された。 α -ヘリックス型およびヘアピン型タグ付き TNF- α 作成のための合成ヌクレオチドは北海道システムサイエンスから得た。制限酵素 Dpn I, Not I, Age I, BsrGI は New England BioLabs Inc.から得た。

2. タグ付き ECFP を用いた血液中的での FIAsH 結合条件の検討

2-1 タグ付き ECFP の作成: FIAsH とタグペプチド AEAAAREACCRECCARA との結合を簡便に調べるために、緑色蛍光タンパク質 (GFP) の改

変型である ECFP の C-末端に上記タグペプチドを融合したタンパク質を作製した。タグ付きタンパク質遺伝子は以下のプライマー:

```
5'-GCCGAATTCTTAGGCCCTGGCGCACTCCCT-  
GCAGCAGGCCTCCCTGGCGGCGGCCTCGGC-  
CTTGTACAGCTCGTCCATGCCG-3'
```

を用いて PCR 法で作製した。作製した遺伝子を、HindIII および Eco R1 の制限酵素部位で pcDNA3 ベクター (Invitrogen) に挿入した (ECFP-TG pcDNA3)。タグ付きタンパク質は大腸菌中で発現させ、ポリヒスチジンタグを用いて精製し、さらにミリポア Ultrafree-4 フィルターで脱塩し、100mM HEPES に再懸濁して用いた。

2-2 タグ付タンパク質への FIAsH の結合の測定: 通常、タグ付タンパク質を PBS (pH7.3) で 2 倍希釈したラット血清および PBS に 0.5 μ M の濃度で溶解した後、1,2-ethanedithiol (EDT) を加えた。この溶液を 15 分以上静置した後、2-mercaptoethanol を添加し、さらに FIAsH-EDT₂ を加え、440nm の励起光による 540nm の蛍光を測定した。

3. FIAsH 結合性タグを付加した TNF- α の検討

3-1 FIAsH 結合性タグを付加した TNF- α 発現プラスミドの作製: 制限酵素による切断は約 1 μ g プラスミド溶液, 3 μ l 0.1%BSA, 3 μ l NEBuffer, 2~20unit 制限酵素 を含む全量 30 μ l の溶液をエッペンドルフチューブに入れ、37°C で 2 時間インキュベートすることによって行った。作製した DNA フラグメントは 0.7%アガロースゲルで電気泳動し、目的のバンドを切り出し回収することによって精製した。1 μ l 0.1%BSA, 1 μ l T₄DNA Ligase Buffer, 1 μ l ベクター, 3 \times 1 インサート, 0.8 μ l T₄DNA Ligase を加えた全量 10 μ l の超純水溶液中で 17°C で 2 時間以上インキュベートすることにより Ligation を行った。

3-2 形質転換: Competent Cell high E.coli DH5 α (東洋紡績) 20 μ l と 3-1 で作られたプラスミド 5 μ l を滅菌チューブに取り、水中に 30 分放置した。42°C の水浴中で 30 秒間ヒートショックを行った

後、2分間水中で冷却し、SOC medium(2% Bacto trypton, 0.5% Bacto yeast extract, 10mM NaCl, 2.5mM KCl) を 180 μ l 加え、37°C で 1 時間振盪培養した。次いでカナマイシンの入った LB/K プレートに播種し、37°C インキュベーターで一晩培養した。培養後プレートから数個のコロニーを選択し、2~3ml の LB/K 液体培地で 37°C, 8 時間以上振盪培養した。

3-3 発現用プラスミドの調製： 3-2 の大腸菌培養液からアルカリミニプレップ法により得た。調製した発現用プラスミドは 0.7%アガロースゲルで電気泳動し、そのサイズによって確認するとともに、シーケンスし、塩基配列を確認した。解析はパソコンソフト ABI PRISM 310 Collection で行った。

3-4 融合タンパク質の発現： HeLa 細胞をペニシリン 100 units/ml、ストレプトマイシン 100 μ g/ml、グルコース 1g/l を含んだ 10%FCS-DMEM を培地として 60mm dish で 37°C、5%CO₂ / 95% air インキュベーター中で培養した。継代には 0.25% Trypsin-1mM EDTA を用いた。用意したプラスミドを HeLa 細胞へトランスフェクトした。トランスフェクトは QIAGEN Effectene Transfection Reagent を用いて行った。

3-5 ウェスタンブロット： Trichloro acetic acid 沈殿法により培養液を濃縮したものをサンプルとした。15%アクリルアミドゲルを用いて、20mA で約 1 時間泳動を行った。プロットは常法に従って行った。検出は Amersham ECL Western blotting detection reagent を用いて行った。

3-6 細胞障害活性測定：測定には TNF- α に強く感受性を示すマウス L929 細胞を用いた。培養のための medium に 10%FCS-MEME を用い、他は 7 の HeLa 細胞の培養と同じ方法で培養した。TNF- α を発現させた細胞の培養 medium を 4 段階に希釈し 50 μ l ずつ分注した。これにアクチノマイシン D を 1 μ g/ml となるように加えた。60mm dish でサブコンフルエントに培養したマウス L929 細胞を Trypsin-EDTA で処理して剥がし、

12ml に浮遊させた細胞培養液を 100 μ l ずつ分注し、37°C、5%CO₂/95%Air のインキュベーター中で 12~20 時間培養した。顕微鏡で細胞の状態を確認した後、アラマーブルーを 10w/v% となるように添加し、37°C、5%CO₂/95%Air のインキュベーター中で 3~4 時間培養した後、530nm 励起による 590nm 蛍光を測定した。

3-7 蛍光スペクトルの測定： HeLa 細胞の培養液をチューブに採り、13,000x g で遠心、上清のみ回収した。FIAsH による標識は通常は 2-メルカプトエタノール 1 mM、FIAsH-EDT₂ 1 μ M、EDT(1,2-ethanedithiol)10 μ M となるように添加し、反応を行った。場合によっては培養液を以下のような処理をした後、標識した。即ち、緩衝液として 100mM Tris-HCl pH7.4 (at 4°C) を用い分画分子量 12,000~14,000 の半透膜で dialysis を約 24 時間行い、その後分画分子量 5000 の限外濾過メンブレンで濃縮し、0.5M Tris-HCl pH7.2 で 200 μ l とした後、測定した。

4. 心筋ナトリウムカルシウム交換体の実験

4-1.心筋ナトリウムカルシウム交換体発現用プラスミド pKCRH-NCX1、および 1 で使用した ECFP-TG pcDNA3 から Griffin らの方法 (*Science*, **281**, 269-272 (1998)) に準じて、C-末端に FIAsH 反応性ペプチド AEAAAREACCRECCARA 遺伝子を導入し、発現用ベクターを作製した。

4-2. 細胞培養： CCL39 細胞は 8% FCS, penicillin 50mg/ml および streptomycin 50mg/ml を含む Dulbecco's Modified Eagle's medium 中で培養した。細胞への発現用ベクターのトランスフェクションは QIAGEN Effectene Transfection Reagent を用いて行った。

4-3. ウェスタンブロットによるナトリウムカルシウム交換体の検出：細胞を氷冷した PBSCM (0.1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂ を含んだリン酸緩衝液 pH7.2) で洗浄した。次に細胞を 0.5mM biotin maleimide を含む PBSCM 中で 30 分、室温でインキュベートした。2%の 2-mercaptoethanol を含む

PBSCM で洗浄後、細胞を培養ディッシュからはがし、懸濁させ遠心管に集めた。遠心管の中で細胞を可溶化緩衝液（10mM Hepes/Tris(pH7.4), 150mM NaCl, 1% Triton X100, 1mM phenylmethylsulfonylfluoride, 1mM benzamide) 0.8ml で処理した。遠心後、上清を streptavidine-agarose ビーズとインキュベートした。ビーズを可溶化緩衝液で洗浄し、続いてタンパク質を Laemmli's 緩衝液中で沸騰させてタンパク質を遊離させた。このタンパク質を 7.5%ゲルで SDS-PAGE を行い、常法に従いウェスタンブロット染色した。

4.4 Na⁺依存性 ⁴⁵Ca²⁺取り込みの測定：細胞に Na⁺を負荷するためにコンフルエント細胞を 0.5ml の 1mM ouabain と 10 μ M monensin を含んだ BSS 溶液中（10mM Hepes/Tris (pH7.4), 140mM NaCl, 5mM KCl, 2mM MgCl₂, 0.1mM CaCl₂, 10mM glucose, 0.1% BSA) で 20 分間 37°C でインキュベートした。次に Ca²⁺を除いた溶液で細胞を一度洗浄した。⁴⁵Ca²⁺の取り込みは、0.5mM ⁴⁵Ca²⁺, 1mM ouabain, 10 μ M verapamil を含んだ Na⁺-free BSS 溶液から正常 BSS に溶液を代えることで開始した。20 秒インキュベートした後、10mM Hepes/Tris (pH7.4), 120mM NaCl, 10mM LaCl₃ を含む溶液で 4 回洗浄することにより、⁴⁵Ca²⁺の取り込みを止めた。細胞を 0.1M NaOH で溶解して放射活性を測定した。Na⁺依存性 Ca²⁺取り込み活性は、Na⁺-free BSS 中での取り込み量から正常 BSS 中での取り込み量を引くことによって求めた。

C. 研究結果

1. 血中の F l A s H 結合性タグ付 ECFP の FIAsH による蛍光標識の検討

1-1 標識の解析法

タグペプチド付 ECFP は 440nm 付近の励起光をあてると 480nm 前後の蛍光を示す。一方 FIAsH はタグペプチドに配位すると 510nm 付近に最大励起波長、540nm 付近に最大蛍光波長を示す蛍光発色団となる物質であるが、440nm の励起光で励起すると ECFP からの蛍光エネルギーが FIAsH に

遷移して (Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): 蛍光共鳴エネルギー遷移) 540nm 周辺の蛍光を示すようになる。したがって、540nm の蛍光を測定することにより、FIAsH の配位の程度を簡便に測定することができる。この測定系を用いて以下の検討を行った。

1-2 血液中のタグ付 ECFP への FIAsH 結合の最適化

FIAsH をタグペプチドに配位させるにあたっては、配位されるタグペプチドの 4 つのシステイン残基の SH 基を還元状態におく必要がある。しかし一方、FIAsH 処理溶液に過剰 (mM レベル) の EDT が存在すると FIAsH のタグペプチドへの結合が阻害されることが予想される。そこで EDT 処理の最適濃度を検討し、タグ付き ECFP のシステイン残基の還元には 10 μ M の EDT が適当であることを明らかにした。

FIAsH でタグペプチドのチオールを十分に標識するために 2-mercaptoethanol のような一価のチオール化合物が必要であるとされているが、2-mercaptoethanol の添加至適濃度を検討し、1.0 mM の添加が適当であることを明らかにした。

次にタグ付 ECFP の FIAsH との反応時間を検討した。FIAsH の処理濃度を 1.5 μ M として検討したところ、インキュベーション時間は 30 分で一定となることから、インキュベーション時間を 30 分とした。

さらに FIAsH のインキュベーション濃度の最適化を行った。検討した濃度領域は 0.25~1.5 μ M である。PBS 溶液中で反応を行なった場合、1.0 μ M でほぼ最大値を示し、それ以上濃度を増やしても結合量の増加はみられなかったが、血清中では 1.25 μ M まで漸増する傾向がみられ、PBS 溶液より濃度を高めに設定する必要性を示唆した。この違いは血清中に共存するタンパク質の影響によるものと思われるが、標識時の FIAsH の処理濃度は 1.5 μ M と設定した。

1-3 FIAsh による蛍光標識のタグ付き ECFP 濃度に対する直線性の検討

1.0mM 2-mercaptoethanol 30 分前処理、1.5 μ M FIAsh 30 分インキュベーションという条件で、結合溶液に添加するタグ付タンパク質濃度を 0.025~0.5 μ M に変化させて、結合量を測定した。その結果 PBS 中では、全濃度領域に渡って直線的な結合量の増加が観察されたものの、血清においては、低濃度になるにつれて測定値が大きくなる傾向が見られ、血清中に測定系に干渉する何らかの物質があることが示唆された (図 1)。

2. FIAsh 結合性タグを利用した内因性 TNF- α の蛍光標識法の検討

2-1 TNF- α への FIAsh 結合性タグペプチドの導入の分子設計

TNF- α (tumor necrosis factor : 腫瘍壊死因子)は、三量体としてレセプターに結合し、細胞壊死作用を現す。そのため、生物活性に影響を及ぼすことなくタグを導入する部位としては、三量体となる場合に必要とされる部位およびレセプターとの結合部位は避けなければならない。また N-末端には分泌シグナルがある。したがって、タグペプチドの導入部位は C-末端および EF-loop 領域が適していると考えられた。

C-末端への導入は TNF- α 配列の 3'末端近くに BsrDI 部位および KpnI 部位があるので、この間に以下の 2 種の FIAsh 結合性配列を挿入した。

α ヘリックス型 : AEAAAREACCRECCARA

ヘアピン型 : AEAAAREACCPGCCARA

α ヘリックス型は FIAsh 結合性配列として始めて報告されたものであり (*Science*, **281**, 269-272 (1998))、ヘアピン型は最近になって、より親和性が高い配列として報告されたものである (*J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6063-6076 (2002))。

EF-loop への FIAsh 結合性タグの挿入においては、EF-loop 中の 108 と 109 番目のアミノ酸の間に、以下の配列を挿入した

α ヘリックス型 :

TGAEAAAAREACCRECCARACT

ヘアピン型 : TGAEAAAAREACCPGCCARACT

2-2 FIAsh 結合性タグ導入 TNF- α 発現用プラスミドの作製および発現

発現プラスミドの作製にあたっては、各段階ごとに 0.7%アガロースゲルで電気泳動を行いプラスミドやフラグメントのサイズを確認するとともに、合成オリゴヌクレオチドをリンカーとして組み込んだ際にはシーケンスを行ってその結果からも塩基配列を確認した。次に市販キットを用いて、大量の pTNF-tag 発現プラスミドを得た。

C-末端へ α 型タグあるいはヘアピン型を導入した TNF- α (TNF-C-tag1 あるいは TNF-C-tag2) 発現用プラスミドを HeLa 細胞へトランスフェクトしたところ、24 時間後にすでに一部の細胞は浮遊死細胞となっていたが、無血清培地に交換後さらに 24 時間培養したところ、多くの細胞は浮遊死細胞となった。EF-loop へ α ヘリックス型タグあるいはヘアピン型タグを導入した TNF- α (TNF-EF-tag1 あるいは TNF-tag2) 発現用プラスミドを HeLa 細胞へトランスフェクトした後、24 時間後では dish いっぱいに細胞が接着していたが、無血清培地に交換後さらに 24 時間培養したところ、一部浮遊死細胞が観察されるとともに、接着細胞においても細胞の萎縮が観察された。一方シャトルベクターをトランスフェクトした細胞では死細胞は観察されず、萎縮した細胞も観察されなかった。

上記培養液の上清について、抗 TNF- α 抗体を用いたウェスタンブロット法によって、TNF- α 関連タンパク質の発現、分泌を確認した。その結果、TNF-C-tag1 および TNF-C-tag2 では TNF- α の分子量 (SDS-PAGE では 21kD 付近) よりやや大きい位置 (23kD 付近) に明瞭なスポットが観察された (図 2)。一方 EF-loop へのタグ挿入タイプの場合 (α ヘリックス型を TNF-EF-tag1、ヘアピン型を TNF-EF-tag2)、培養上清の原液では検出限界以下で分泌は確認されなかった。しかし分画

分子量 5000 の限外濾過フィルターを用いて約 10 倍に濃縮したサンプルを用いてウェスタンブロット法を用いて検出を試みたところ、TNF- α より分子量の大きいところに薄いながらバンドが検出された。

2-3 FIAsh 結合性タグペプチドを導入した TNF- α の特性

続いて、各種タグペプチド導入 TNF- α 発現細胞の培養上清について細胞障害活性を測定した。その結果、TNF-C-tag1 あるいは TNF-C-tag2 を発現させた HeLa 細胞の培養上清は、明瞭な細胞障害活性を示した。これらタグ付き TNF- α は TNF- α と等しく抗 TNF- α 抗体と結合すると仮定して、タグ付き TNF- α は TNF- α に比較すると約 1/3 の細胞障害活性を示すと概算された (図 3)。一方 TNF-EF-tag1、TNF-EF-tag2 を発現させた HeLa 細胞の培養上清の細胞障害性を検討してみたが、限外濾過を用いて濃縮した試料についても細胞障害作用は観察されなかった。

そこで、次にこれらタグペプチド導入 TNF- α について FIAsh との反応性を調べた。まず TNF-C-tag1 と TNF-C-tag2 に関してであるが、前者は FIAsh と反応させることにより、504nm 励起による蛍光強度の増加が確認できた。しかし TNF-C-tag2 については、現在までの所、蛍光強度の増加は検出されていない。一方 TNF-EF-tag1 あるいは TNF-EF-tag2 は、FIAsh との反応によって、弱いながら蛍光の増加が観察された。

2-4 TNF-C-tag1 の蛍光標識条件の検討

以上のように、FIAsh 反応性タグを導入した TNF- α の中で、C-末端に α ヘリックス型タグを付加したものが、生物活性 {細胞障害活性} および FIAsh との反応性という点で最も優れたものであった。しかしながら、その蛍光強度は、細胞内のタンパク質の体内動態の研究に応用するには、未だ不十分なものだった。そこで、TNF-C-tag1 の FIAsh 標識条件について、さらに検討を加え

た。

まず tag と FIAsh との反応溶液に加えていた SH還元剤 EDT(10 μ M) に代えて 1mM 2-mercaptoethanol (BME) および 1mM tris(2-carboxy-ethyl) phosphine (TCEP) を用いたところ、蛍光強度が大きく増加した。しかしこの場合、Shuttle ベクターを処置した control 細胞の上清も大きな蛍光強度を示すことが明らかとなった。そこで TNF-C-tag1 にさらにヒスチジンタグを付加した TNF- α を発現させ、培養上清から TALON Resin (Clonetech) を使用して精製、流出液の imidazole を除いた後に FIAsh と同様の反応を行ったところ、60 倍以上の蛍光強度を示すと同時に、TNF-C-tag1 非存在時に比べて、約 5 倍の蛍光強度の増加として検出できることが明らかとなった (図 4)。

3. ナトリウムカルシウム交換体へのタグペプチド付加の影響

3-1 タグペプチド付加 NCX1 のナトリウムカルシウム交換活性

タグペプチド付加 NCX1 の発現をウェスタンブロット法で確認した細胞についてナトリウムカルシウム交換活性を測定して、NCX1 の活性とを比較したところ、タグペプチドを付加した NCX1 発現細胞においても、NCX1 を発現させた細胞とほぼ同様の活性が観察された。

3-2 タグペプチドを付加した NCX1 の蛍光染色像

タグペプチドを付加した NCX1 を発現させた CCL39 細胞について、NCX1 抗体で免疫組織化学的に染色した場合の染色と、FIAsh による染色を比較した。NCX1 抗体で染色した細胞では、細胞膜領域が比較的選択的に染色されており、タグペプチド付加 NCX1 が形質膜に発現していることを示していると思われる。しかし FIAsh 染色では細胞質領域までもが染色されたような蛍光染色像が得られた。

D. 考 察

本研究は2つの2連のシステイン間に2つのアミノ酸があるような一次構造(-CCXXCC-, Xはシステイン以外の任意のアミノ酸)を含む α -ヘリックスに特異的に配位して、強い蛍光を生じるフルオレッセイン誘導体 FIAsh を利用して、目的タンパク質の蛍光標識に応用し、その生体内の動態解析法の開発を目指すものである。

この方法が成立するには、

- (1) 上記構造を含むタグペプチドを付加した目的タンパク質の FIAsh 標識が定量的であること
- (2) 目的タンパク質へのタグペプチドの付加が、目的タンパク質の機能に影響をおよぼさないこと
- (3) 目的タンパク質へのタグペプチドの付加が、目的タンパク質そのものの動態に影響をおよぼさないこと

という条件をクリアーすることが好ましい。

まず(1)についての検討を行い、以下のような血清中のタンパク質の定量的な標識条件を確立した。

- (1)血清を PBS(pH7.3)で2倍希釈 (ただし目的タンパク質濃度 0.025~0.50mM)
- (2)1,2 Ethanedithiol 10 μ M 添加、15min 以上室温処置
- (3)2-Mercaptoethanol 1.0mM 添加
- (4)FIAsh 1.5mM 添加、30min 以上室温処置

ただし、同時に血清中に測定に干渉する何らかの物質が存在することを示唆する結果も得た。

続いて分泌タンパク質 TNF- α をモデルにして、機能に影響することなく FIAsh 結合性タグを導入する方法を検討した。まず、挿入の位置であるが、TNF- α の EF-loop へタグを挿入した場合、(1)タンパク質としての発現量、あるいは分泌量が少ない、および(2)分泌されたタンパク質の生物活性が低い(あるいはない)、という可能性が考え

られた。このことから、EF-loop は TNF- α の機能発現に直接かかわる領域ではないものの、その修飾により、細胞障害活性等の機能が妨げられる可能性が考えられた。一方、もう一箇所、タグの導入で影響をうけにくいことが予想される C-末端の場合であるが、発現プラスミドを導入した HeLa 細胞において発現、分泌は容易に確認することができた。さらに生物活性(細胞障害活性)においても、TNF- α と同様の細胞障害活性を示すことが明らかとなった。

次に FIAsh 親和性タグの種類を検討として、最近 Adams らによる α -ヘリックス型タグよりむしろヘアピン型タグが FIAsh とより安定的な結合を示すという報告(*J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6063-6076 (2002))を参考に、 α -ヘリックス型タグとともにヘアピン型タグを導入した TNF- α を発現させ、その特性を調べた。その結果、C-末端へ導入した TNF- α において、ヘアピン型タグの場合も α -ヘリックス型タグの場合とほぼ同じレベルで発現、分泌され、さらに細胞障害活性においても同等であることが確認された。しかしながら、FIAsh との結合を蛍光の増加として確認したところ、 α -ヘリックス型タグ導入 TNF- α では蛍光の増加が検出されたにもかかわらず、ヘアピン型タグ導入 TNF- α では確認できず、ヘアピン型タグの有用性は見出せなかった。この結果と Adams らの結果との相違の原因については今のところ説明できない。しかし、Adams らは、タグペプチド部分のみを用いて結合性を検討しており、TNF- α に結合させた本実験とは反応条件が異なっていることが、その原因であろう。

このように、FIAsh 結合性タグの導入法としては C-末側に α -ヘリックス型タグを導入した場合、最もよい結果が得られている。しかし、初年度に見出した FIAsh との反応条件をもとに反応させても、蛍光強度の増加は2倍弱であり、また蛍光強度そのものも低いものであった。

そこで FIAsh との反応条件の詳細な検討を行い、改善に成功した。即ち、SH還元剤を変更し、

SH の酸化還元状態を変化させたところ、蛍光が 60 倍にも増加することが明らかとなった。この条件では、HeLa 細胞の培養上清でも FIAsh との反応によって高い蛍光が生じるが、培養上清を部分精製することにより、バックグラウンドを改善することができた。これらの結果から、(1) FIAsh とタグとの結合(あるいは結合の結果生じる蛍光)は、SH 基の酸化還元条件によって大きく影響をうけるが、適切に調整することにより、大きな蛍光変化として検出可能である、(2) HeLa 細胞からは FIAsh 反応性の物質が遊離されている、(3) したがって、FIAsh 結合性タグを用いた蛍光標識法においては少なくとも試料の部分精製が必要、ということが示唆された。

本研究では、FIAsh を用いた蛍光標識法について、分泌タンパク質の TNF- α とともに、膜タンパク質であるナトリウムカルシウム交換体の蛍光標識の可能性も検討した。その結果、交換活性に関与していないと思われる C-末端にタグを導入すれば、活性に影響することなく蛍光標識が可能であることを示唆する結果が得られた。しかし一方、目的タンパク質以外のものも蛍光染色されている可能性も同時に示唆する結果が得られた。

以上本研究によって、FIAsh を利用した内因性タンパク質の蛍光標識法がほぼ完成した。今後、(1)対照とするタンパク質そのものについて SH の酸化還元状態を適切に調節することによる標識の最適化、(2)FIAsh との反応によって生じると考えられる蛍光物質の除去、の 2 点の解決を図りながら、本法の目的タンパク質の体内動態解析法へ応用する予定である。

E. 研究成果

1. 論文発表

1) Toru KAWANISHI, Takehito KIUCHI, Hiroki ASOH, Rie SHIBAYAMA, Hiroshi KAWAI, Hisayuki OHATA, Kazutaka, MOMOSE, and

Takao HAYAKAWA : Effect of Tributyltin Chloride on Release of Calcium Ion from Intracellular Calcium Stores in Rat Hepatocytes, *Biochem. Pharmacol.* **62**, 863-872 (2001)

2) T. HISAMITSU, H. OHATA, T. KAWANISHI, T. IWAMOTO, M. SHIGEKAWA, H. AMANO, S. YAMADA, and K. MOMOSE : A mechanism of Ca^{2+} release from Ca^{2+} stores coupling to the Na^+/Ca^{2+} exchanger in cultured smooth muscle cells, *Life Sci.*, **69**, 2775-2787 (2001)

3) Haruko MASUMIYA, Junya KASE, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA, Setsuya MIYATA, Yoichi SATO, Ryu NAKAMURA, Hikaru TANAKA and Koki SHIGENOBU, Effect of T-type and L-type Ca^{2+} channel blockade on early phase Ca^{2+} transients in rat atrial and ventricular cardiomyocytes, *Bioimages*, **9**, 87-93 (2001)

4) Hikaru TANAKA, Haruko MASUMIYA, Toshiyuki SEKINE, Junya KASE, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA, Setsuya MIYATA, Yoichi SATO, Ryu NAKAMURA, and Koki SHIGENOBU Involvement of Ca waves in excitation-contraction coupling of rat atrial cardiomyocytes, *Life Sci.*, **70**, 715-726 (2001)

5) Hikaru Tanaka, Eichi Ishii, R. Fujisaki, Y. Miyamoto, Yoshio Tanaka, T. Aikawa, Toru Kawanishi, and Koki Shigenobu, Effect of manganese on guinea pig ventricle. Initial depression and late augmentation of contractile force, *Biol. Pharm. Bulletin*, **25**, 323-326 (2002)

6) Tetsu Kobayashi, Shingo Niimi, Toru Kawanishi, Masamichi Fukuoka, and Takao Hayakawa, Changes in peroxisomes proliferator-activated receptor α -regulated gene expression and inhibin/activin-follistatin system gene expression in rat testis after an administration of di-n-butyl phthalate, *Toxicol. Lett.*, **138**, 215-225 (2003)

7) S. Niimi, T. Oshizawa, T. Yamaguchi, M.

Harashima, T. Seki, T. Ariga, T. Kawanishi, T. Hayakawa, Specific expression of annexin III in rat-small-hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **300**, 770-774 (2003)

- 8) H. Tanaka, K. Nishimaru, R. Makuta, W. Hirayama, T. Kawamura, T. Matsuda, Y. Tanaka, T. Kawanishi, and K. Shigenobu, Possible Involvement of prostaglandins F₂α and D₂ In acetylcholine-induced positive Inotropy In Isolated mouse left atria, *Pharmacology* (In press)

2. 学会発表

- 1) 川西 徹、柴山理恵、河合 洋、鈴木琢雄、小林 哲、早川堯夫、田中 光、重信弘毅、大幡久之、百瀬和享 カルシウムイオンの動きを追いかける 公開シンポジウム「生命機能を調節する分子をさぐるバイオイメージング」平成14年10月30日
- 2) 川西徹、河合洋、鈴木琢雄、柴山理恵、早川堯夫 心筋細胞・肝細胞等のマルチカラーイメージングと分子機能解析 —細胞死メカニズムの画像化— 公開シンポジウム「バイオイメージングとナノテクノロジー」平成15年2月21日

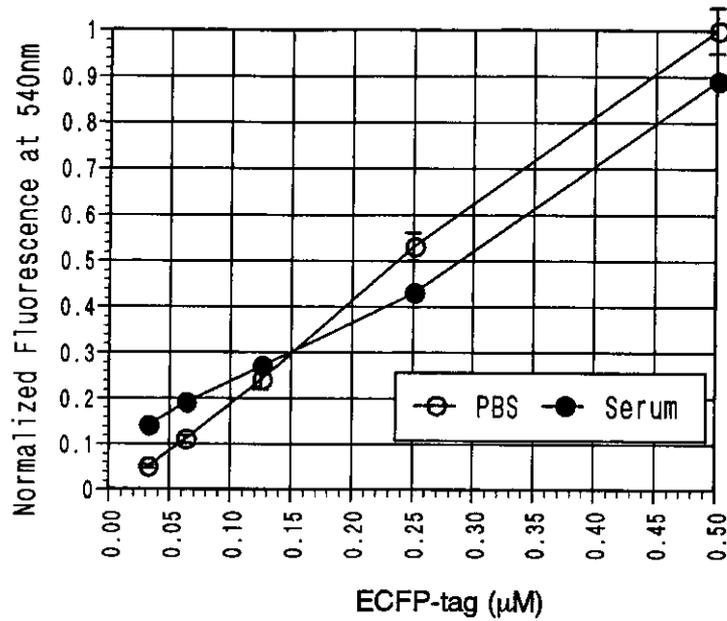


図1 タグペプチドへのFlAsHの結合量におけるタグペプチド量に対する直線性の検討

研究方法、研究結果を参照。実験は4～5回行い（血清はそれぞれ異なった動物から得た）、結果は平均±標準偏差で示した。

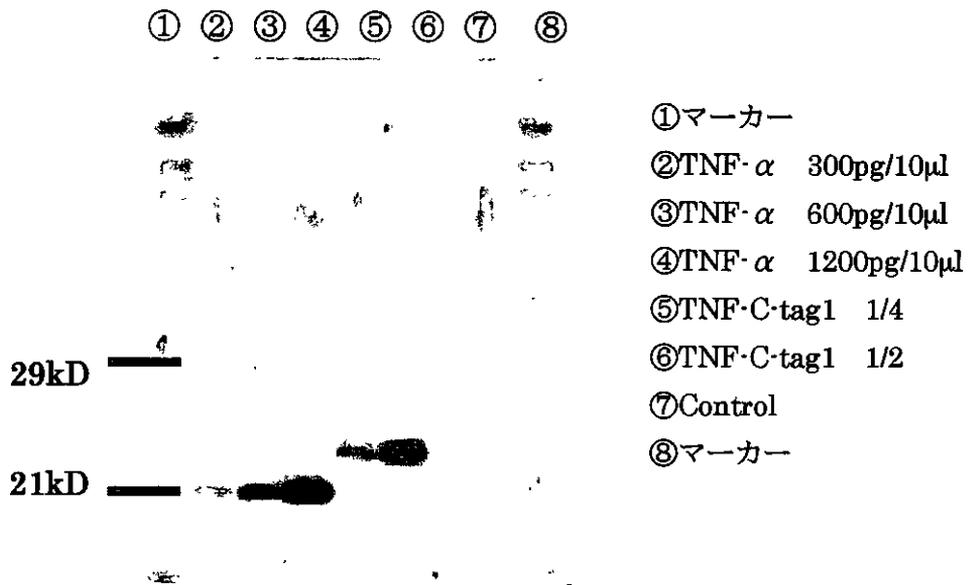


図2 C-末端に α -ヘリックス型タグを付加したTNF- α の発現および分泌

TNF- α 抗体を用いた培養上清のウェスタンブロット結果である。ControlはShuttleベクターを処置したHeLa細胞の培養上清。TNF-C-tag1の濃度は培養上清の希釈倍率であらわしている

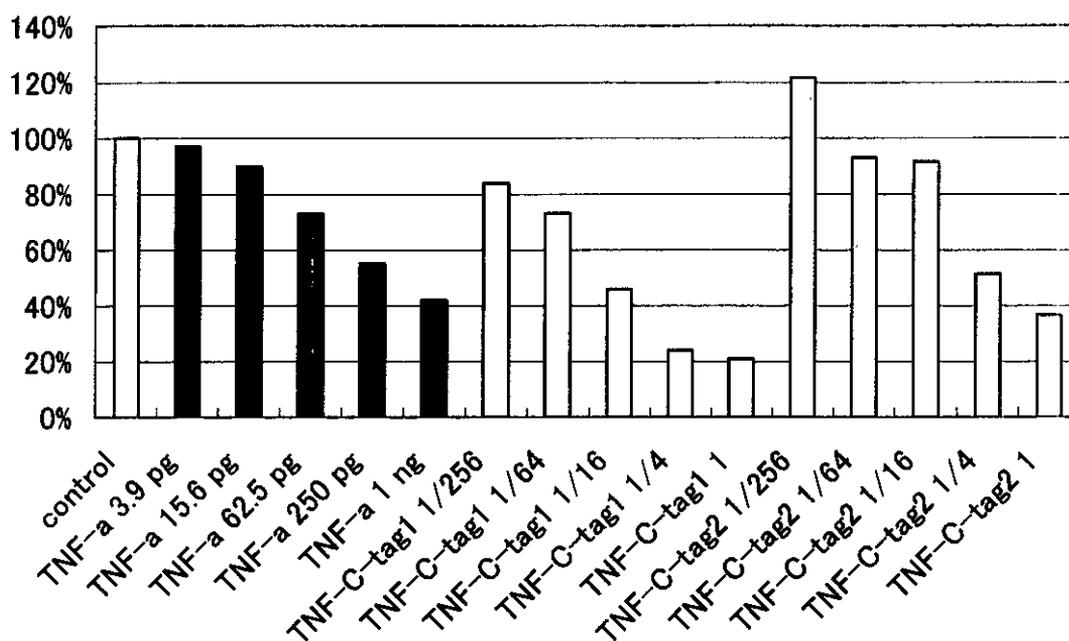


図3 C-末端にヘアピン型あるいはαヘリックス型タグを付加した TNF-αの細胞障害活性

Control は Shuttle ベクターを処置した HeLa 細胞の培養上清を表す。結果は Control を 100%として、その百分率で表す。TNF-αは試料 50μl 中に添加した量を表す。その他は培養上清の希釈倍率を表す。

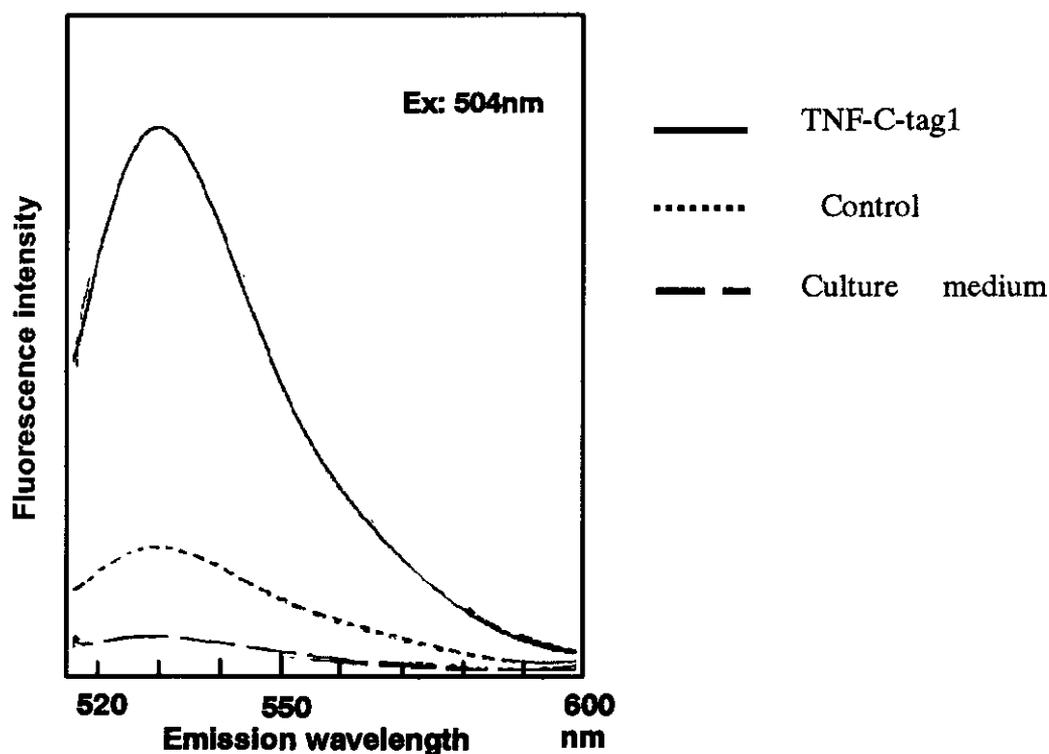


図4 標識条件の検討後の C-末端にタグを付加した TNF-α (TNF-C-tag1) の F1AsH による蛍光標識
TNF-C-tag1 はヒスチジンタグを利用して精製したものである。

細胞タンパク質プロファイル評価技術の開発

分担研究者： 川崎ナナ （国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第一室長）
協力研究者： 掛樋一晃 （近畿大学薬学部教授）
協力研究者： 日向昌司 （国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部主任研究官）
協力研究者： 伊藤さつき （国立医薬品食品衛生研究所重点支援研究員）

要 旨

細胞発現タンパク質のプロファイリングと、目的タンパク質の定量、及び特性解析を基本とした細胞治療用医薬品の特性解析・品質評価法の開発を行った。ゲル電気泳動法による発現タンパク質のプロファイリングと目的タンパク質の分離、マイクロ液体クロマトグラフィー質量分析法(LC/MS)とキャピラリーLC/MS (CapLC/MS)による目的タンパク質の構造解析、並びに表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いた目的タンパク質の定量法を検討した。はじめに、モデル糖タンパク質としてトロンボモジュリン、及びフォリスタチンを用いて、マイクロ LC/MS、及び CapLC/MS は、目的タンパク質の一次構造確認、及び糖鎖を含む翻訳後修飾の解析に有用であることを確認した。つぎに、モデルタンパク質、組織プラスミノゲンアクチベータ (t-PA)を SDS-PAGE で泳動し、ゲル内消化によって得られた糖鎖、及びペプチド断片について CapLC/MS による糖鎖プロファイリング及びペプチドマッピングを行い、泳動前と同じ糖鎖プロファイル、及びペプチド/糖ペプチドマップが得られることを確認した。そこで、細胞・組織への応用としてウシ脳をモデルとして、可溶性膜タンパク質画分の SDS-PAGE による分離、及び CapLC/MS によるゲル内タンパク質の特性解析を行い、両分析法が脳特異的タンパク質のプロファイリングと同定、及び特定タンパク質の構造解析に応用可能であることを確認した。さらに、SPR は、培養上清中の目的タンパク質の定量法として有用であることを確認した。以上のことから、ゲル電気泳動法と CapLC/MS、及び SPR は、細胞治療用医薬品の特性解析・品質評価法として有用であることが示唆された。

A. 研究目的

対象疾患ごとに必要な治療用細胞を大量生産・再構築することによって、それらの細胞が有する機能を利用する再生医療が実現されようとしている。この治療法の一つに、細胞が産生するタンパク質、あるいはタンパク質群の機能を利用することによって、失われた機能の再生を図るというアプローチがある。この種の細胞治療用医薬品において、細胞が発現するタンパク質群の恒常性、及び有効成分（目的タン

パク質）の特性を一定に保つことは、品質を確保する上で重要である。

細胞発現タンパク質群の恒常性評価には、分離能に優れた2次元ゲル電気泳動法 (2D-GE)を用いたプロファイル解析が有用であると考えられる。この2D-GEは、目的タンパク質を単離する手段としても優れた方法である。従って、2D-GEでタンパク質プロファイルを作成すると同時に、その中から目的タンパク質を回収し、その特性を詳細に解析すること

ができれば、細胞治療用医薬品の評価法として効率的な方法となり得ることが期待される。

目的タンパク質の構造解析法として、近年、質量分析法 (MS) が幅広く利用されている。我々も、LC/MS を用いたペプチド/糖ペプチドマッピング、及び独自に開発した糖鎖プロファイリング法を組み合わせたタンパク質の一次構造確認、糖鎖結合部位の同定、糖鎖構造解析、及び糖鎖以外の翻訳後修飾の解析法を開発し報告している (Kawasaki, N., et al., *Anal. Biochem.*, 2000)。この方法の微量化を進めることができれば、2D-GE で単離された微量の目的タンパク質の構造解析が可能になると思われる。

一方、目的タンパク質の定量法としては、ラジオイムノアッセイ、及びエンザイムイムノアッセイなどが繁用されている。しかし、これらの方法には迅速性や操作性などに問題があることが知られている。表面プラズモン共鳴 (SPR) イムノアッセイは、特別な前処理を必要とせず、培養上清をそのまま解析に供することが可能な定量法として注目されている定量法である。SPR イムノアッセイでは、抗体を固定化したセンサーチップに目的タンパク質を含む培養上清等を一定量添加し、目的タンパク質がセンサーチップ上に結合することによって生じる SPR 屈折角の変化量 (レゾナンスユニット) を測定することによって、目的タンパク質を定量することができる (図 1)。レゾナンスユニットと時間を軸としたセンサーグラムが 10 分間以内に得られることから迅速性に優れた方法である (図 2)。

本研究の目的は、細胞発現タンパク質のプロファイリングと、目的タンパク質の特性解析、及び定量分析を基本とした細胞治療用医薬品の特性解析・品質評価法の開発である。本研究では、2D-GE による細胞発現タンパク質のプロファイリングと目的タンパク質の単離、及び LC/MS を用いた単離タンパク質の構造解析法の開発、並びに SPR を用いた目的タンパク質の定量法の開発を目指す。

はじめに、2D-GE で分離された目的タンパク質を想定した微量タンパク質の特性解析法の検討を行った。モデルタンパク質として糖鎖の不均一性により、

様々なグリコフォームが存在するトロンボモジュリン、及びフォリスタチンを用いて、マイクロ LC/MS、及びさらに微量分析が可能な CapLC/MS によるペプチド/糖ペプチドマッピング、及び糖鎖プロファイリング法を検討し、2D-GE で回収可能な量 (1 μ g 程度) のタンパク質の一次構造確認、糖鎖結合位置、糖鎖構造の解析、及び糖鎖以外の翻訳後修飾の解析ができることを確認した。

つぎに、その CapLC/MS を用いた構造解析法が、実際に、電気泳動ゲル内タンパク質の特性解析に応用できるかどうかを検討した。まず、モデル糖タンパク質として t-PA を用い、電気泳動後、ゲル内消化によるペプチドの断片化と糖鎖の切り出しを行い、CapLC/MS を用いて構造解析を行った。次に、電気泳動法と CapLC/MS の細胞・組織への応用性を検討するため、ウシ脳をモデル組織として用い、可溶性膜タンパク質のプロファイリングと詳細構造未知のゲル内タンパク質の構造解析を行った。

また、目的タンパク質の定量法として、組換えフォリスタチン産生細胞をモデル細胞として、SPR イムノアッセイによる培養上清中のフォリスタチン濃度測定を検討した。

B. 研究方法

1) 試薬

CHO 細胞で生産し、精製した遺伝子組換え型ヒトトロンボモジュリンは、旭化成工業株式会社より供与された。遺伝子組換え型ヒトフォリスタチンは CHO 細胞で生産し精製した。ヒト黒色腫細胞由来 t-PA は和光純薬より購入した。ウシ脳アセトンパウダーはシグマ社より購入した。Phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PIPLC) は Molecular Probes 社製を使用した。抗ヒトフォリスタチン抗体は、R&D systems 社より購入した。トリプシンは、シグマ社製を使用した。N-グリコシダーゼ F (PNGase F) は Roche Diagnostic GmbH 社製を用いた。ギ酸及びヘプタフルオロ酪酸 (Heptafluorobutyric acid, HFBA) は、それぞれ和光純薬製、及び PIERCE 社製を用いた。

ゲル染色液は Simply Blue SafeStain (Invitrogen 社製) を使用した。HBS-EP buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% (v/v), Tween 20), N-hydroxy-succinimide(NHS), N-ethyl-N³-(3-diethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC), ethanolamine hydrochloride (pH 8.5), 及び CM5 センサーチップは, BIAcore AB 社から購入した。

2) トロンボモジュリンのペプチドの調製

①還元カルボキシメチル化

脱塩, 凍結乾燥したトロンボモジュリン (360 μg) に, 8 M グアニジン塩酸塩, 5 mM EDTA を含む 0.5 M Tris-HCl, pH 8.6 を 360 μl 加え溶解した。さらに, 2-メルカプトエタノール 2.6 μl を加え, 室温で 2 時間放置した。モノヨード酢酸ナトリウム 7.56 mg を試料溶解溶液 60 μl に溶かし, 試料溶液に加え, 遮光下, 室温にて 2 時間放置した。PD-10 カラムを用いて脱試薬し, 得られた試料溶液を凍結乾燥した。

②トリプシン消化

還元カルボキシメチル化したトロンボモジュリン 120 μg (トロンボモジュリン換算量) を 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 120 μl に溶かし, トリプシンを 2.4 μg 加え, 37 °C で 1 時間消化した。LC/MS を用いたペプチド及び糖ペプチドマッピングには, 還元カルボキシメチル化したトロンボモジュリンのトリプシン消化物 2 μg (トロンボモジュリン換算量) を用いた。

③K16 のヘキソースの結合位置の確認

トロンボモジュリン K16 (ピーク 10) を分取し (60 μg, トロンボモジュリン換算量), 凍結乾燥後, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 60 μl に溶解し, 1 μg のキモトリプシンを加え, 37 °C, 40 時間消化した。消化物の分子量を, LC/MS で分析した。

3) トロンボモジュリンの糖鎖の調製

脱塩, 凍結乾燥したトロンボモジュリン (100 μg) を, 5 unit の PNGaseF を含む 0.1 % Triton X-100 及び 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) 中で 37 °C で 2 日間消化させた。消化後, タンパク質をエタノール沈殿により除去した。遊離糖鎖を含む上清を乾固させ, 水 100 μl に溶解した後, 0.5 M 水素化ホウ素ナトリウム水溶液 100 μl を加え, 室温で 2 時間放置した。反応溶液中の過剰の水素化ホウ素ナトリウムを希釈酢酸を用いて分解させ, pH 7.0 に調整した後, ENVI-Carb (Supelco 社製) で脱塩した。

4) フォリスタチンのペプチドの調製

①還元カルボキシメチル化

脱塩, 凍結乾燥したフォリスタチン (100 μg) に, 8 M グアニジン塩酸塩, 5 mM EDTA を含む 0.5 M Tris-HCl, pH 8.6 (試料溶解溶液) を 243 μl 加え溶解した。さらに, 2-メルカプトエタノール 1.8 μl を加え, 室温で 2 時間放置した。モノヨード酢酸ナトリウム 5.1 mg を試料溶解溶液 40 μl に溶かし, 試料溶液に加え, 遮光下, 室温にて 2 時間放置した。PD-10 カラムを用いて, 脱試薬し, 得られた試料溶液を凍結乾燥した。

②エンドプロテアーゼ Asp-N 消化

還元カルボキシメチル化したフォリスタチン 100 μg (フォリスタチン換算量) を 25 mM 重炭酸アンモニウム, pH 8.0, 200 μl に溶かし, エンドプロテアーゼ Asp-N を 2 μg 加え, 37 °C で 20 時間消化した。LC/MS を用いたペプチド及び糖ペプチドマッピングには還元カルボキシメチル化したフォリスタチンのエンドプロテアーゼ Asp-N 消化物 3 μg (フォリスタチン換算量) を用いた。

5) t-PA の SDS-PAGE

8%ゲル (80×80×1.5 mm) を用いて, 25 mM トリス塩酸塩, 0.19 M グリシン, 0.1 % SDS を含む泳動用緩衝中, 30 mA で泳動させた。分離された t-PA は, Simply Blue SafeStain を用いて検出した。

6) t-PA のゲル内アルキル化

SDS-PAGE 後, t-PA を含むゲル片を切り出し, 30%アセトニトリルを含む 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液を用いて脱色後, アセトニトリルを加え脱水した。アセトニトリルを除去後, 減圧濃縮遠心エバポレーター (Speed Vac) を用いて, ゲル片を乾燥させた。乾燥ゲル片に 10 mM DTT を含む 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液 150 μ l を加え, 56°C で 1 時間反応させた後, 室温に戻した。還元化溶液を除いた後, 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液を用いてゲル片を洗浄した。洗浄用溶液を除いた後, 55 mM モノヨード酢酸ナトリウムを含む 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液 150 μ l を加え, 室温で遮光下 45 分間反応させた。反応後, アルキル化溶液を除いた後, 洗浄用溶液を用いてゲル片を洗浄し, 50%アセトニトリルを含む 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液 (脱水用溶液) を用いてゲル片を脱水し, Speed Vac を用いてゲル片を乾燥させた。

7) t-PA の糖鎖の調製 (ゲル内消化)

ゲル内アルキル化を行った乾燥ゲル片に PNGase F (3 unit) を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH7.2), 120 μ l を加え, 37°C で 16 時間反応させた。反応後, ゲル片を含む反応液を超音波照射 (30 分間) し, 遊離糖鎖を抽出・回収した。さらに, 水 200 μ l を加え, 超音波照射による抽出・回収を 3 回繰り返した。抽出液をすべて合わせ, Speed Vac を用いて乾固させた後, 0.25 M 水素化ホウ素ナトリウム水溶液 200 μ l を加え, 室温で 2 時間反応させた。反応後, 希釈した酢酸を用いて過剰の試薬を分解させ, Envi-Carb を用いて脱塩した。

8) t-PA のペプチド/糖ペプチドの調製 (ゲル内消化)

ゲル内アルキル化を行った乾燥ゲル片にトリプシン溶液 (10 μ g/ml, 50 mM 重炭酸アンモニウム) を加え, 氷上で 30 分間放置し, ゲル片にトリプシン溶液を染み込ませた。余分なトリプシン溶液を取り除き, 37°C で一晩反応させた。50%アセトニトリル及び 5%トリフルオロ酢酸水溶液 (抽出溶液)

300 μ l を加え, 室温で 30 分間振とうし, ペプチドを含む抽出液を回収した。再度抽出操作を行った後, 抽出液をすべて回収し, Speed Vac を用いて濃縮した。

9) ウシ脳膜画分の調製

ウシ脳アセトンパウダー 0.5 g にクロロホルム/メタノール混液 (2/1, v/v), 30 ml を加え, ポリトロンを用いて 1000 rpm で 20 秒間均質化後, クロロホルム/メタノール混液をさらに 10 ml 加え, 室温で 1 時間放置した。遠心分離後 (3000rpm, 室温, 10 分), 上清を除去し, 沈殿をメタノール 30 ml で 2 回洗浄した。洗浄した沈殿に 0.15 M 塩化ナトリウム, 1 mM EDTA 及び 1 mM PMSF を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液, pH 7.4 (均質化用緩衝液) 30 ml を加え, ポリトロンを用いて 1500 rpm で 30 秒間均質化を行った。ウシ脳アセトンパウダー 4 g 相当分を一つにまとめ遠心分離した (10,000 \times g, 37°C, 20 分)。再度沈殿に均質化用緩衝液を加え (ウシ脳アセトンパウダー 4 g に対し 120 ml), ポリトロンを用いて 1500 rpm で 30 秒間均質化後, 10% Triton X-114 を含む均質化用緩衝液 30 ml を加え, 4°C で一晩攪拌し, 膜画分の可溶化を行った。可溶化溶液を遠心分離後 (10,000 \times g, 4°C, 20 分), 上清を 37°C で 10 分間放置後, 遠心分離し (3000 rpm, 30°C, 5 分), Triton X-114 相と水相に分離した。得られた Triton X-114 相に均質化用緩衝液を等量加え洗浄し, 再び 37°C で 10 分間放置後, 遠心分離した (3000 rpm, 30°C, 5 分)。得られた Triton X-114 相に冷アセトンを 4 倍量加え, -15°C で一晩放置後, 遠心分離し (3,000 rpm, 4°C, 30 分), 膜画分を得た。

10) 可溶性膜タンパク質画分の調製

得られた膜画分を 1% Triton X-100 を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 pH7.4 に溶かし, ウシ脳アセトンパウダー 1 g 相当量に対し, PIPLC, 0.5 unit を加え, 37°C で 4 時間消化した。反応溶液の 1/4 倍容の 10% Triton X-114 を加え (最終 Triton X-114 濃度, 2%), 0°C に冷却後, よく攪拌した。反応溶

液を 37°C に保温後、遠心分離し(3000 rpm, 30°C, 5 分), Triton X-114/水相分離を行った。Triton X-114 相を除いた後、水相に 10% Triton X-114-トリス塩酸緩衝液 pH 7.4 を 1/4 倍容加えて洗浄した。水相に冷アセトンを 4 倍容加え、-15°C で一晩放置後、遠心分離し (3000 rpm, 4°C, 60 分), 可溶性膜タンパク質画分を得た。可溶性膜タンパク質画分は、さらに SDS-PAGE を用いて分離した。

11) 可溶性膜タンパク質の SDS-PAGE

8%ゲル (80x 80x 1.5 mm) を用いて、25 mM トリス塩酸塩, 0.19 M グリシン, 0.1 % SDS を含む泳動用緩衝液中 30 mA で泳動させた。分離されたタンパク質は、Simply Blue SafeStain を用いて検出した。

12) 可溶性膜タンパク質のペプチド調製

SDS-PAGE で分離された可溶性膜タンパク質を含むゲル片を切り出し、t-PA と同様にゲル内アルキル化を行った後、ゲル内 PNGase F 消化により糖鎖を遊離・抽出した。糖鎖を切り出したゲル片に、脱水用溶液を加え、10 分間振とうし、脱水用溶液を除去後、遠心型真空乾燥機を用いて、ゲル片を乾燥させた。乾燥ゲル片に、トリプシン溶液を加え、t-PA と同様に、ゲル内トリプシン消化を行い、抽出溶液を用いてペプチドを含む抽出液を回収・濃縮した。

13) 可溶性膜タンパク質の糖鎖調製

ゲル内 PNGase F 消化により遊離・抽出した糖鎖を、t-PA と同様に還元・精製した。

14) ペプチド/糖ペプチドマッピング

①マイクロ LC/MS

LC :

装置 : MAGIC 2002 システム (Michrom BioResources 社製)

カラム : Magic C18 (1.0×150 mm, 5 μ)

流速 : 50 μ l/min

検出波長 : 206 nm

溶離液 A: 0.05 % TFA を含む 2 % アセトニトリ

ル

溶離液 B: 0.05 % TFA を含む 80 % アセトニトリル

グラジエントプログラム :

トロンボモジュリンの場合

B 液 : 5~45% (0~40 分)

フォリスタチンの場合 :

B 液 : 5~35% (0~40 分)

エレクトロスプレーイオン化質量分析法 (ESI-MS) :

装置 : ESI トリプルステージ四重極化 MS/MS システム, TSQ7000 (Finnigan)

測定 : ポジティブ及びネガティブイオンモード

シースガス : 70 psi

オグジュラリーガス : 10 unit

キャピラリー温度 : 225 °C

マルチプライヤー : 1200 V

ESI 電圧 : 4500 V

スキャン範囲 : 400-2,400 (low mass range),
1,000-4,000 (high mass range)

スキャン回数 : 4 秒 (low mass range),
6 秒 (high mass range)

② CapLC/MS

LC :

装置 : MAGIC 2002 システム (Michrom BioResource 社製)

カラム : Magic C18 (Michrom BioResource 社製,
0.2×50 mm, 5 μ)

溶離液 A: 0.1%ギ酸及び 0.005%HFBA を含む 2%
アセトニトリル水溶液

溶離液 B : 0.1%ギ酸及び 0.005%HFBA を含む
80%アセトニトリル水溶液

グラジエントプログラム :

B 液 : 5~70% (0~60 分)

70~5% (60~61 分)

5% (61~70 分)

流速 : ポンプ 50 μ l/分, スプリッター 1200/400

UV 検出波長 : 206 nm