

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成8年度博士課程 入学
氏名 伊藤 三恵
指導教官 田之倉 優

論文題目

サイトカイン LECT2 のリフォールディングと NMR を用いた高次構造解析

[目的]

LECT2 は好中球走化性因子であり、ヒト好中球の機能を制御するタンパク質として造血器系腫瘍細胞株から単離精製され、遺伝子もクローニングされた。LECT2 はアミノ酸 133 残基、分子量約 16 k の塩基性タンパク質で、肝臓に特異的に発現している。本研究は、LECT2 の立体構造に基づいて、その作用機構を解明することを目的としている。NMR を用いて LECT2 の高次構造解析を行うには安定同位体標識(^{15}N , $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$)することが不可欠である。そこで、本研究では、(His) $_6$ -LECT2 の大腸菌を宿主とする大量発現系を構築し、発現タンパク質の巻き戻し法を確立し、円二色性(CD)スペクトル及び核磁気共鳴(NMR)スペクトルの解析を行った。様々なタンパク質の様々な巻き戻し方法が NMR サンプル調製に用いられているが、巻き戻しの困難なタンパク質も数多く存在する。本研究では、高い障害となるサンプル調製に際し、系統的に巻き戻し法を検討することにより、Cys 残基を 6 個持つ(His) $_6$ -LECT2 の最も効率の良い Ni-NTA agarose 上での巻き戻し法を開発した。これにより得られたデータは他のタンパク質の調製にも応用可能な重要な知見である。

[実験]

(His) $_6$ -LECT2 の大量発現系の検討

LECT2 の N 末端に(His) $_6$ -tag を付加した遺伝子を T7 プロモーターを持つ pET-21(a)ベクターに挿入して発現プラスミドを作成した。誘導により発現した

(His)₆-LECT2 はインクルージョンボディを形成し、大部分が不溶性画分となった。可溶性タンパク質として生産させるために様々な培養条件の検討を行い、チオレドキシシンや GroES/L との共発現、チオレドキシシン融合タンパク発現系を試みた。しかし、可溶性画分への生産量の増加に効果は見られなかったため、大量に発現している不溶性画分からの可溶化、巻き戻しを行った。

巻き戻し法の検討

不溶性タンパク質に 8 M 尿素を添加して可溶化し、透析法、希釈法、ゲル濾過カラム法、及び Ni-NTA-agarose カラムに結合させたまま尿素濃度をゆっくり下げる Ni-NTA-agarose カラム法を行った。

再生(His)₆-LECT2 の分析・巻き戻しの確認

再生(His)₆-LECT2 の CD 及び NMR スペクトルを、CHO 細胞で発現精製した LECT2 のものと比較した。CD 測定は JASCO J-720、多核多次元 NMR 測定は、VARIAN Unity INOVA 500 NMR で行った。

NMR 測定

溶媒条件の検討は ¹⁵N 標識 (His)₆-LECT2 を用いて行った。¹⁵N, ¹H-HSQC スペクトルで最も分離の良い溶媒条件は 50 mM Na₂SO₄ と 5% glycerol を含む 90% H₂O/10% D₂O (pH 6.0) だった。さらに、¹³C/¹⁵N 標識(His)₆-LECT2 を同様の方法で調製し、連鎖帰属に用いる 3 核 3 次元 NMR スペクトル (HNCA, HNCO, HN(CO)CA, CBCA(CO)NH, C(CO)NH, H(CCO)NH) を測定した。測定温度は全て 25°C とした。

主鎖の連鎖帰属

スペクトルの処理には NMRPipe, NMRDraw を用いた。スペクトルを印刷して解析するためには PROI を使い、コンピュータディスプレイ上での解析には Sparky 3 を使用した。各 NMR スペクトルからアミドプロトン、アミド窒素、C_α 炭素、C_β 炭素、カルボニル炭素の相関を得て、連鎖帰属を行った。

[結果と考察]

巻き戻し法の確立

検討の結果、Ni-NTA agarose カラム法での巻き戻しに成功した。透析法と希釈法では(His)₆-LECT2 を効率良く巻き戻すことはできなかったが、Ni-NTA agarose 上に固定することで、巻き戻し過程のタンパク質間相互作用が減り、効率良く巻き戻せるようになったものと考えられる。間違った S-S 結合をかけ直すために、酸化型グルタチオン/還元型グルタチオン混合溶液中で、穏やかに Ni-NTA agarose カラム上に固定した(His)₆-LECT2 を攪拌した。さらに、溶出後に充分空気酸化をすることが、モノマーの存在比の増加に効果的であった。その結果、最小培地 1 リットルあたり約 1mg の最終生成物を得ることができた。この方法で得た再生(His)₆-LECT2 の CD 及び NMR スペクトルを、CHO 細胞か

ら発現精製した LECT2 のものと比較したところ、CD スペクトル (Fig.1)はいずれも 230 nm にピークを持つ β 構造に特徴的なパターンを示した。さらに、NMR スペクトル (^1H - ^1H NOESY) (Fig.2)においてもシグナルが一致したことから、大腸菌由来の(His)₆-LECT2 は CHO 細胞由来の LECT2 と同じ立体構造を持つと結論づけた。

NMR スペクトルの帰属

以上の系を用いて、 ^{15}N および $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ で標識した(His)₆-LECT2 を調製し、3核3次元 NMR の測定と解析を行った。天然型立体構造を持つタンパク質に特徴的な分離の良いスペクトルが得られ、50 mM Na₂SO₄ 存在下で測定したスペクトルに帰属した (Fig.3)。その結果、観測可能と期待される 130 スピン系(140 アミノ酸-(N 末端+Pro 残基 9 個))のうち 110 について帰属をすることができた (Fig.4)。

帰属した化学シフトの値を元に、CSI (chemical shift index)を用いて二次構造の分布を明らかにした。その結果、(His)₆-LECT2 は β シートに富むタンパク質であり、 α ヘリックスを含まないことが明らかとなった。

[まとめ]

- (1) (His)₆-LECT2 の巻き戻しに成功した。Ni-NTA agarose 樹脂に固定することで、液相での巻き戻し法に比べて、高濃度での取り扱いが可能となった。
- (2) CD 測定の結果、CHO 細胞由来の LECT2 と大腸菌で発現、再生した (His)₆-LECT2 の CD スペクトルが一致した。
- (3) NMR(^1H - ^1H NOESY)測定の結果、観測された交差ピークの分布が CHO 細胞由来の LECT2 と再生(His)₆-LECT2 との間で一致した。(2),(3)より、巻き戻しが成功したものとする。
- (4) 主鎖の化学シフトから、予測した二次構造は、 β シートに富むことを示唆しており、CD 測定の結果と一致した。

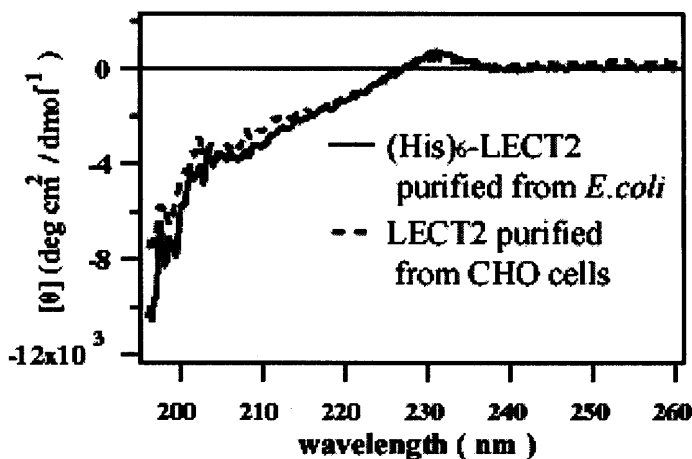


Fig.1 CD spectra of LECT2 (16.7 μM) from CHO cells and (His)₆-LECT2 (21.3 μM) from *E. coli*.

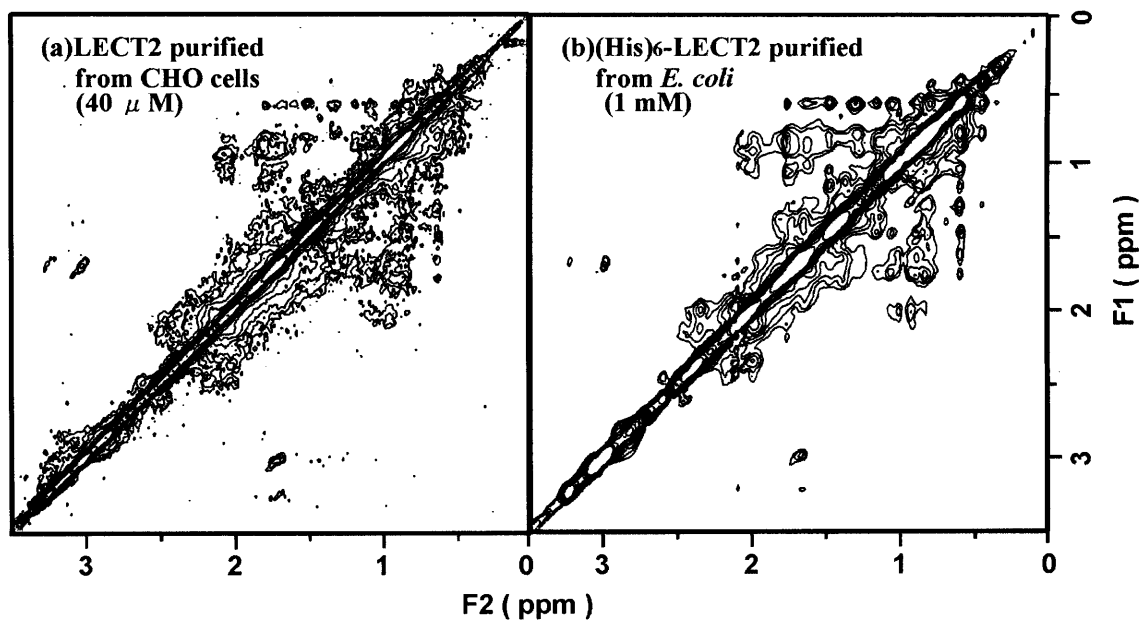


Fig.2 Methyl-methyl region of ^1H - ^1H NOESY spectra of (a) LECT2 ($40\ \mu\text{M}$) from CHO cells and (b) $(\text{His})_6$ -LECT2 ($1\ \text{mM}$) from *E. coli*.

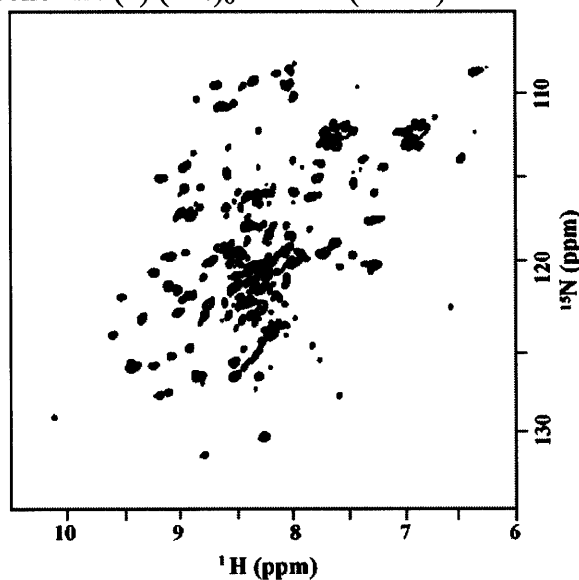


Fig.3 ^{15}N , ^1H -HSQC spectrum of $(\text{His})_6$ -LECT2 in 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%\text{D}_2\text{O}$ (pD 6.0) containing 50 mM Na_2SO_4 and 5% glycerol.

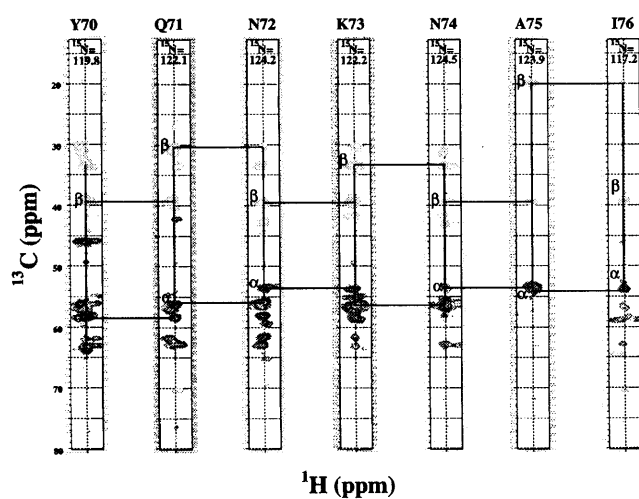


Fig.4 Sequential walk of $(\text{His})_6$ -LECT2. The residues from Tyr70 to Ile76 were connected by the sequential walk on the HNCACB spectrum.