



Title	甘味誘導タンパク質ミラクリン、クルクリンおよび耐熱性甘味タンパク質マビンリンの遺伝子工学的研究
Author(s)	葦澤, 悟
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬学)
Dissertation Number	甲第4075号
Issue Date	1997-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3122233
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51406
Type	doctoral thesis
File Information	000000307424.pdf



学位論文

甘味誘導タンパク質ミラクリン、クルクリンおよび
耐熱性甘味タンパク質マビンリンの遺伝子工学的研究

荏澤 悟

1997 年

目次

学位論文

甘味誘導タンパク質ミラクリン、クルクリンおよび耐熱性甘味タンパク質マビンリンの遺伝子工学的研究

1	1
1-1	1
1-2	1
1-2-1	1
1-2-2	2
1-2-3	8
1-2-4	9
1-2-5	9
1-2-6	10
1-2-7	10
1-2-8	12
1-2-9	12
1-3	13
1-3-1	14
1-3-2	17
1-3-3	20
1-3-4	20
1-3-5	25

葦澤 悟

1997 年

目次

略号表	4
第 I 章 序論	5
第 II 章 耐熱性甘味タンパク質マビンリンの構造と熱安定性	7
II-1. 序	7
II-2. 材料および方法	7
II-2-1. 材料	7
II-2-2. マビンリン同族体の精製	8
II-2-3. 逆相 HPLC	9
II-2-4. 甘味活性の測定	9
II-2-5. CD スペクトルの測定	9
II-2-6. アミノ酸組成分析	10
II-2-7. アミノ酸配列の決定	10
II-2-8. 遊離チオール基の検出	12
II-2-9. シスチン含有ペプチドの単離	12
II-3. 結果および考察	13
II-3-1. マビンリン I-1、III、IV の精製法の確立	13
II-3-2. マビンリン同族体の甘味活性とその熱安定性	17
II-3-3. マビンリン I-1、III、IV のアミノ酸配列の決定	20
II-3-4. マビンリン I-1、II、III、IV のアミノ酸配列の比較	25
II-3-5. マビンリン I-1、II のジスルフィド結合位置の決定	26
第 III 章 耐熱性甘味タンパク質マビンリン II の cDNA クローニングおよび 大腸菌における発現	31
III-1. 序	31
III-2. 材料および方法	31
III-2-1. 材料	31
III-2-2. cDNA ライブラリーの作製	32
III-2-3. プローブの作製	32

III-2-4. cDNA クローンの単離	33
III-2-5. 発現プラスミドの構築	33
III-2-6. 大腸菌での組換えマビンリン II の発現	34
III-2-7. 組換えマビンリン II の単離	35
III-3. 結果および考察	36
III-3-1. マビンリン II cDNA クローンの単離および解析	36
III-3-2. 組換えマビンリン II の大腸菌における発現	40
第IV章 甘味誘導タンパク質ミラクリンの cDNA クローニングおよび酵母、 タバコにおける発現	44
IV-1. 序	44
IV-2. 材料および方法	44
IV-2-1. 材料	44
IV-2-2. cDNA ライブラリーの作製	45
IV-2-3. プローブの作製	45
IV-2-4. cDNA クローンの単離	46
IV-2-5. ノーザンブロットハイブリダイゼーション	46
IV-2-6. 発現プラスミドの構築	47
IV-2-7. 酵母での組換えミラクリンの発現	48
IV-2-8. タバコでの組換えミラクリンの発現	49
IV-3. 結果および考察	51
IV-3-1. ミラクリン cDNA クローンの単離および解析	51
IV-3-2. ミラクリン mRNA の時期特異的および組織特異的発現の 解析	54
IV-3-3. 組換えミラクリンの酵母における発現	56
IV-3-4. 組換えミラクリンのタバコにおける発現	58
第V章 甘味誘導タンパク質クルクリンの大腸菌における発現	60
V-1. 序	60
V-2. 材料および方法	60
V-2-1. 材料	60
V-2-2. 発現プラスミドの構築	61

V-2-3. 大腸菌での組換えクルクリンの発現	62
V-3. 結果および考察	64
V-3-1. マルトース結合タンパク質-クルクリン融合タンパク質の大腸菌における発現	64
V-3-2. チオレドキシン-クルクリン融合タンパク質の大腸菌における発現	68
第VI章 総括	71
謝辞	72
参考文献	73

第1章 序論

生物には、外界からの刺激を受けて応答する能力が備わっている。刺激には光、音、圧力、化学物質などがあり、それぞれ視覚、聴覚、触覚、嗅覚・味覚が受容する。これらの感覚の中で味覚は、味物質が舌の味細胞上の味覚受容体を刺激することで引き起こされる。一般に、高分子物質は立体障害のため味覚受容体を刺激できないので、それ自身味が無い。これはほとんどのタンパク質にもあてはまる。ただ例外的に味覚受容体を刺激するごく限られたタンパク質の存在が知られている。この種のタンパク質には、それ自身が甘味を呈する甘味タンパク質（モネリン、ソーマチン、マビンリン、ブラゼイン）および酸っぱいものを甘く感じさせる甘味誘導タンパク質（ミラクリン、クルクリン）がある（表I-1）。これらのタンパク質は、この特異な作用から甘味の発現機構の解明に有力な手がかりを与えるものと期待されている。また、これらは、低濃度で甘味を呈するので、肥満の人や糖尿病患者に対し、副作用のない低カロリー甘味剤として利用することが考えられている。

モネリンは、西アフリカ原産のヤマノイモ科の植物 *Dioscoreophyllum cumminsii* Diels の実中存在するタンパク質で、重量比でショ糖の約3,000倍の強い甘味を有する⁽¹⁾。ソーマチンは、西アフリカ原産のクズウコン科の植物 *Thaumatococcus daniellii* Benth の実の種皮に存在するタンパク質で、重量比でショ糖の約1,600倍の甘味を有する⁽²⁾。マビンリンは、中国雲南省原産のフウチョウソウ科のつる性の低木 *Capparis masaikai* Levl. (バビンロウ) の種子に存在するタンパク質で、それ自身甘く、また、100℃に加熱しても甘味を失わない耐熱性を有する⁽³⁾。ブラゼインは、西アフリカ原産の植物 *Pentadiplandra brazzeana* Baillon の実中存在する甘味ペプチドで、80℃で4時間加熱しても甘味を失わない⁽⁴⁾。ミラクリンは、西アフリカ原産のアカテツ科の植物 *Richadella dulcifera* の実（ミラクルフルーツ）の果肉に存在する糖タンパク質で、それ自身は甘くないが、酸っぱいものを甘く感じさせる作用を有する⁽⁵⁾。たとえば、ミラクリンを口に含んだ後にレモンを味わうと甘いオレンジのように感じられる。クルクリンは、西マレーシア原産のキンバイザサ科の植物 *Curculigo latifolia* の実中存在するタンパク質で、それ自身甘く、またミラクリンと同様に酸っぱいものを甘く感じさせる作用を有する⁽⁶⁾。さらに、クルクリンは水を甘く感じさせる作用も有する。たとえば、クルクリンを口に含んだのちに砂糖の入っていない紅茶を飲むと甘く感じられる。

甘味タンパク質および甘味誘導タンパク質のうち、マビンリン、ミラクリン、クルクリンの精製および構造決定は、横浜国立大学の栗原らにより行われたものである。これまでの研究で、マビンリン同族体の中で最も多く含まれているマビンリンIIのアミノ酸配列⁽³⁾

およびミラクリン、クルクリンのアミノ酸配列^(6, 7)・ジスルフィド結合位置^(8, 9)・免疫学的手法による定量法^(10, 11)、さらにミラクリンの糖鎖構造⁽¹²⁾、クルクリン前駆体の構造⁽¹³⁾が明らかとなった。一方、ミラクリンやクルクリンの作用機構に関しては、これらのタンパク質が味受容膜に吸着したのち、酸により味受容膜コンフォメーションが変化すると、活性部位が甘味受容サイトに結合して甘味が発現すると推測してきた。しかしながら、いまだどの部位が活性中心であるのか全く不明である。今後、マビンリン、ミラクリン、クルクリンの構造と活性に関する研究を進めるためには、これらの遺伝子レベルでの研究が必要であると考えられる。

本研究では、まずマビンリン同族体の構造および性質を解析することにより、マビンリンの熱安定性と構造の関係を明らかにした⁽¹⁴⁻¹⁷⁾。つづいて、マビンリン II の cDNA クローニングを行い、マビンリン II 前駆体の構造を明らかにした⁽¹⁸⁾。また、大腸菌を用いて組換えマビンリン II の発現・生産系の確立を行った⁽¹⁹⁾。つぎに、ミラクリンの cDNA クローニングを行い、ミラクリン前駆体の構造を明らかにした⁽²⁰⁻²²⁾。また、ミラクリン mRNA の時期特異的および組織特異的発現の解析を行った^(20, 21)。さらに、酵母、タバコを用いて組換えミラクリンの発現・生産系の確立を試みた^(23, 24)。最後に、大腸菌を用いて組換えクルクリンの発現・生産系の確立を試みた⁽²⁵⁾。

表 I-1 甘味タンパク質、甘味誘導タンパク質

物質名	植物名 (存在場所)	生育地	作用
モネリン	<i>Dioscoreophyllum cumminsii</i> の実 (ヤマノイモ科)	西アフリカ	それ自身で甘味をもつ
ソーマチン	<i>Thaumatococcus daniellii</i> の実 (クズウコン科)	西アフリカ	それ自身で甘味をもつ
マビンリン	<i>Capparis masaikai</i> の種子 (フウチョウソウ科)	中国雲南省	それ自身で甘味をもつ
ブラゼイン	<i>Pentadiplandra brazzeana</i> の実	西アフリカ	それ自身で甘味をもつ
ミラクリン	<i>Richadella dulcifica</i> の実 (アカテツ科)	西アフリカ	酸味を甘味に変える
クルクリン	<i>Curculigo latifolia</i> の実 (キンバイザサ科)	西マレーシア	それ自身で甘味をもつ 酸味を甘味に変える 水を甘くする

第II章 耐熱性甘味タンパク質マビンリンの構造と熱安定性

II-1. 序

中国雲南省地方に自生する植物 *Capparis masaikai* (バビンロウ) は、テニスボール大の実をつける。実には数個の種子があり、これが甘味を有するので、現地ではのど飴の代わりに使われている。種子に含まれている甘味成分は昆明植物研究所の胡らによりタンパク質であることが報告され、マビンリンと命名された。横浜国立大学の栗原らは胡らと共同で、マビンリンには少なくとも5種類の同族体が存在すること、これらのうち最も多く含まれているマビンリンIIは100℃に加熱しても甘味を失わないことを明らかにした⁽³⁾。さらに、マビンリンIIのアミノ酸配列を決定し、マビンリンIIは33アミノ酸残基のA鎖と72アミノ酸残基のB鎖の2本のポリペプチド鎖から構成されていることを明らかにした⁽³⁾。

5種類のマビンリン同族体のうち、マビンリンII以外の甘味活性および熱安定性に関する知見はまだ得られていない。マビンリンの熱安定性の原因を明らかにするためには、マビンリンIIと他の同族体の熱安定性および構造を比較することが、きわめて有用な情報を与えると考えられる。

本章では、まずマビンリンII以外の同族体I-1、III、IVの精製法を確立した⁽¹⁴⁻¹⁶⁾。つづいて、マビンリン同族体I-1、II、III、IVの甘味活性とその熱安定性をヒト官能テスト法により測定した⁽¹⁴⁻¹⁶⁾。また、マビンリン同族体I-1、II、III、IVの加熱による立体構造の変化を円偏光二色性(CD)スペクトル法により調べた⁽¹⁴⁻¹⁶⁾。さらに、マビンリンI-1、III、IVの全アミノ酸配列をおよびマビンリンI-1、IIのジスルフィド結合位置決定した⁽¹⁴⁻¹⁷⁾。

II-2. 材料および方法

II-2-1. 材料

A) 材料

*C. masaikai*の果実は、中国雲南省地方に自生する植物体から収集し、実験に使用するまで4℃以下で保存したものをを用いた。

CM-Sepharose CL-6B; Pharmacia LKB Biotechnology

Bio gel P-30; Bio Rad

Prep C18; Waters

YM-5; Amicon

pyroglutamat-aminopeptidase, endoproteinase Glu-C; Boehringer Mannheim

trypsin, chymotrypsin; Sigma

lysyl endopeptidase; 和光純薬工業 (株)

carboxypeptidase W, thermolysin; 生化学工業 (株)

その他の試薬は、すべて特級、生化学用または遺伝子工学用を使用した。

B) 実験装置

高速液体クロマトグラフィー (HPLC); PC8011, 東ソー (株)

分光旋光計; Jasco J-720, 日本分光 (株)

アミノ酸配列自動分析計; 477A Protein/peptide Sequencer, Applied Biosystems

II-2-2. マビンリン同族体の精製

A) 抽出

C. masikai の種子 0.60 g を乳鉢で粉碎し、石油エーテル 20 ml で脱脂したのち、15,000 ×g、30 分間遠心し上澄みを除いた。さらに脱脂操作を 1 回繰り返す、自然乾燥させ、パウダー粉末 0.42 g を得た。つぎに、パウダー粉末に 0.5 M NaCl、20 ml を加え、マグネティックスターラーで 15 分間攪拌したのち、17,000 ×g、30 分間遠心し上澄みを集めた。この操作を 4 回繰り返した。

B) 塩析

集めた上澄みを 70% 飽和度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ で塩析したのち、18,000 ×g、60 分間遠心し沈殿を得た。沈殿を 50 mM glycine/NaOH (pH 9.0) に溶解した。

C) イオン交換クロマトグラフィー

0.25 M NaCl を含む 50 mM glycine/NaOH (pH 9.0) で平衡化した CM-Sepharose CL-6B カラムに試料を添加した。これに 0.25~1.0 M の NaCl 直線濃度勾配をかけてマビンリン同族体を溶離した。溶離液の各画分は、280 nm の紫外吸光で検出し、それらの甘味活性を測定し、活性を有するピーク部分を集めた。

D) ゲルろ過クロマトグラフィー

0.5 M NaCl を含む 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 6.8) で平衡化した Bio gel P-30 カラムに試料を添加した。280 nm の紫外吸光で検出し、それらの甘味活性を測定し、活性を有するピーク部分を集めた。

E) 逆相クロマトグラフィー

0.05% trifluoroacetic acid (TFA) を含む 20% CH_3CN で平衡化した Prep C18 カラムに試料を添加した。これに 20% ~ 40% の CH_3CN 直線濃度勾配をかけてマビンリンを溶離した。溶離液の各画分は、280 nm の紫外吸光で検出し、それらの甘味活性を測定し、活性を有するピーク部分を集めた。

F) 脱塩・凍結乾燥

集めた画分を限外ろ過膜 YM-5 を用いて脱塩したのち、溶液を凍結乾燥した。

II-2-3. 逆相 HPLC

精製マビンリン I-1、II、III、IV の純度検定および酵素消化により得られたペプチドの分離は、以下の条件で HPLC により行った。

カラム : Vydac 218TP54 (4.6 mm × 250mm)

移動相 : 0.05% TFA を含む CH_3CN の直線濃度勾配

流速 : 1 ml/min

検出 : 210 nm の紫外吸光測定

還元ピリジルエチル化マビンリン I-1、III、IV の分離は、以下の条件で HPLC により行った。

カラム : TSK gel TMS-250 (4.6 mm × 75mm)

移動相 : 0.05% TFA を含む CH_3CN の直線濃度勾配

流速 : 1 ml/min

検出 : 210 nm の紫外吸光測定

II-2-4. 甘味活性の測定

マビンリン同族体の甘味度の測定は、各濃度のマビンリン溶液を口に含み、0.05 ~ 0.4 M のショ糖溶液の甘さと比較することにより行った。また、マビンリン同族体の甘味活性の熱安定性は、0.8 mM のマビンリン溶液および 80℃ で 1 時間加熱した 0.8 mM のマビンリン溶液を、20℃ まで冷却したのち口に含み、0.05 ~ 0.4 M のショ糖溶液の甘さと比較することにより行った。

II-2-5. CD スペクトルの測定⁽²⁶⁻²⁸⁾

0.8 mM のマビンリン溶液および 80℃ で 1 時間加熱した 0.8 mM のマビンリン溶液を 0.2 mg/ml に希釈し、0.1 cm の経路長のセルを用い、分光旋光計により CD スペクトル

の測定を行った。測定は 20℃ で行い、スペクトルは 4 回積算した。

II-2-6. アミノ酸組成分析

A) 加水分解

乾固したペプチド試料の入ったダーラム管を反応バイアルに入れ、反応バイアル底部に 6 M HCl 200 μ l を加え窒素置換したのち、減圧にした。この反応バイアルを 110℃ に調節された恒温槽に入れ 22 時間加水分解した。

B) 誘導化

加水分解後ダーラム管を別の反応バイアルに移し、65 mTorr 以下で 2 時間乾燥させた。乾燥後、加水分解物中和試薬 (CH₃OH : H₂O : triethylamine (TEA) = 2 : 2 : 1 で混合したもの) 20 μ l を各々のダーラム管に加え 65 mTorr 以下で 2 時間乾燥させた。さらに、誘導化試薬 (CH₃OH : H₂O : TEA : phenylisothiocyanate = 7 : 1 : 1 : 1 で混合したもの) 20 μ l を各々のダーラム管に加え、25 分間反応させた後、65 mTorr 以下で 3 ~ 4 時間乾燥した。

C) 分析

誘導化した試料を溶離液 A 100 μ l に溶解し、その 25 μ l を HPLC により以下の条件で分析した。

カラム : TSK gel ODS-80TM (4.6 mm \times 150mm)

溶離液 : A; 100 mM CH₃COONH₄ (pH 6.4) : CH₃CN = 95 : 5

B; 60% CH₃CN

A \rightarrow B = 40 : 60 (20分、直線濃度勾配)

流速 : 1 ml/min

検出 : 254 nm の紫外吸光測定

温度 : 37℃

II-2-7. アミノ酸配列の決定

A) マビンリン I-1、III、IV の還元ピリジルエチル化⁽²⁹⁾

マビンリン I-1、III、IV を、それぞれ 6 M guanidine hydrochloride、10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を含む 0.5 M 2-amino-2-hydroxymethyl-1, 3-propanediol (Tris)/HCl (pH 8.6) に溶解し、これに 4-vinylpyridine および tri-*n*-butylphosphine を加え、窒素置換後、室温で 4 時間反応を行った。

B) ピログルタミル基の酸加水分解⁽³⁰⁾

還元ピリジルエチル化マビンリン I-1、III、IV の A 鎖を、それぞれ 1 M HCl/CH₃OH (1/11, v/v) 中で、35℃、24 時間インキュベートした。つづいて、反応液を凍結乾燥した。

C) 酵素消化

a) Pyroglutamate-aminopeptidase による還元ピリジルエチル化マビンリン I-1、III、IV の B 鎖およびペプチド L-1 のピログルタミル残基の除去

還元ピリジルエチル化マビンリン I-1、III、IV の B 鎖およびペプチド L-1 を、それぞれ 5 mM dithiothreitol (DTT)、10 mM EDTA を含む 0.1 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 8.0) に溶解し、これに pyroglutamate-aminopeptidase (酵素/基質 = 0.2 mU/nmol) を加え、37℃ で 24 時間消化を行った。

b) Trypsin 消化

還元ピリジルエチル化マビンリン I-1、III、IV の A 鎖を、それぞれ 10 mM CaCl₂ を含む 50 mM Tris/HCl (pH 8.0) に溶解し、これに trypsin (基質 : 酵素 = 25 : 1 (w/w)) を加え、37℃ で 24 時間消化を行った。

c) Chymotrypsin 消化

還元ピリジルエチル化マビンリン I-1、III、IV の A 鎖を、それぞれ 50 mM NH₄HCO₃ (pH 7.8) に溶解し、これに chymotrypsin (基質 : 酵素 = 200 : 1 (w/w)) を加え、25℃ で 1 時間消化を行った。

d) Lysyl endopeptidase 消化

還元ピリジルエチル化マビンリン I-1、III、IV の B 鎖を、それぞれ 2 mM EDTA、2 M urea を含む 50 mM Tris/HCl (pH 9.0) に溶解し、これに lysyl endopeptidase (基質 : 酵素 = 200 : 1 (mol/mol)) を加え、35℃ で 20 時間消化を行った。

e) Endoproteinase Glu-C 消化

還元ピリジルエチル化マビンリン I-1、III、IV の B 鎖を、それぞれ 50 mM NH₄HCO₃ (pH 7.8) に溶解し、これに endoproteinase Glu-C (基質 : 酵素 = 25 : 1 (w/w)) を加え、25℃ で 3.5 時間消化を行った。

f) Carboxypeptidase W による C 末端アミノ酸の決定

還元ピリジルエチル化マビンリン I-1、III、IV の A 鎖および B 鎖を、それぞれ 0.1 M pyridine/CH₃COOH (pH 4.0) に溶解し、これに carboxypeptidase W (基質 : 酵素 = 10

:1 (w/w)) を加え、25℃ で消化を行った。消化時間 0、10、30、60、120 分後の試料のアミノ酸組成分析を行い、それぞれの C 末端アミノ酸を検出した。

D) アミノ酸配列分析

各ペプチド 200 ~ 500 pmol を試料として、アミノ酸配列自動分析計を用いてアミノ酸配列分析を行った。

II-2-8. 遊離チオール基の検出

遊離チオール基の検出は Ellman の方法^(31,32)により行った。

II-2-9. シスチン含有ペプチドの単離

A) 酵素消化

a) Trypsin 消化

マビンリン I-1、II を、それぞれ 10 mM CaCl₂ を含む 0.2 M CH₃COONH₄ (pH 6.5) に溶解し、これに trypsin (基質 : 酵素 = 50 : 1 (w/w)) を加え、37℃ で 24 時間消化を行った。

b) Thermolysin 消化

T-6、T-21 を、それぞれ 10 mM CaCl₂ を含む 0.2 M CH₃COONH₄ (pH 6.5) に溶解し、これに thermolysin (基質 : 酵素 = 20 : 1 (mol/mol)) を加え、37℃ で 24 時間消化を行った。

B) シスチン含有ペプチドの同定

単離したペプチドを、それぞれ Moore の方法⁽³³⁾により過ギ酸酸化し、アミノ酸組成分析によりシステイン酸を検出することによって、シスチン含有ペプチドを同定した。

II-3. 結果および考察

II-3-1. マビンリン I-1, III, IV の精製法の確立

C. masakai の種子よりマビンリン同族体を抽出し、イオン交換クロマトグラフィーによりピーク 1 ~ 4 に分離した (図 II-1)。つづいて、ピーク 2 をゲルろ過クロマトグラフィーによりピーク A および B に分離した (図 II-2)。さらに、ピーク A をイオン交換クロマトグラフィーにより精製し、マビンリン I-1 を得た。また、ピーク 3 および 4 をそれぞれ逆相クロマトグラフィーにより精製し、マビンリン III および IV を得た。得られたマビンリン I-1, III, IV の純度を逆相 HPLC により検定したところ、精製マビンリン I-1, III, IV はそれぞれ単一のピークを示した (図 II-3)。これにより、精製マビンリン I-1, III, IV の純度が高いことを確認した。今回確立したマビンリン I-1, III, IV の精製法を図 II-4 に示した。

一方、Liu らの方法³⁾によりイオン交換クロマトグラフィーのピーク 1 の画分からマビンリン II を得た。得られたマビンリン II の純度を逆相 HPLC により検定したところ、精製マビンリン II は単一のピークを示した (図 II-3)。これにより、精製マビンリン II の純度が高いことを確認した。

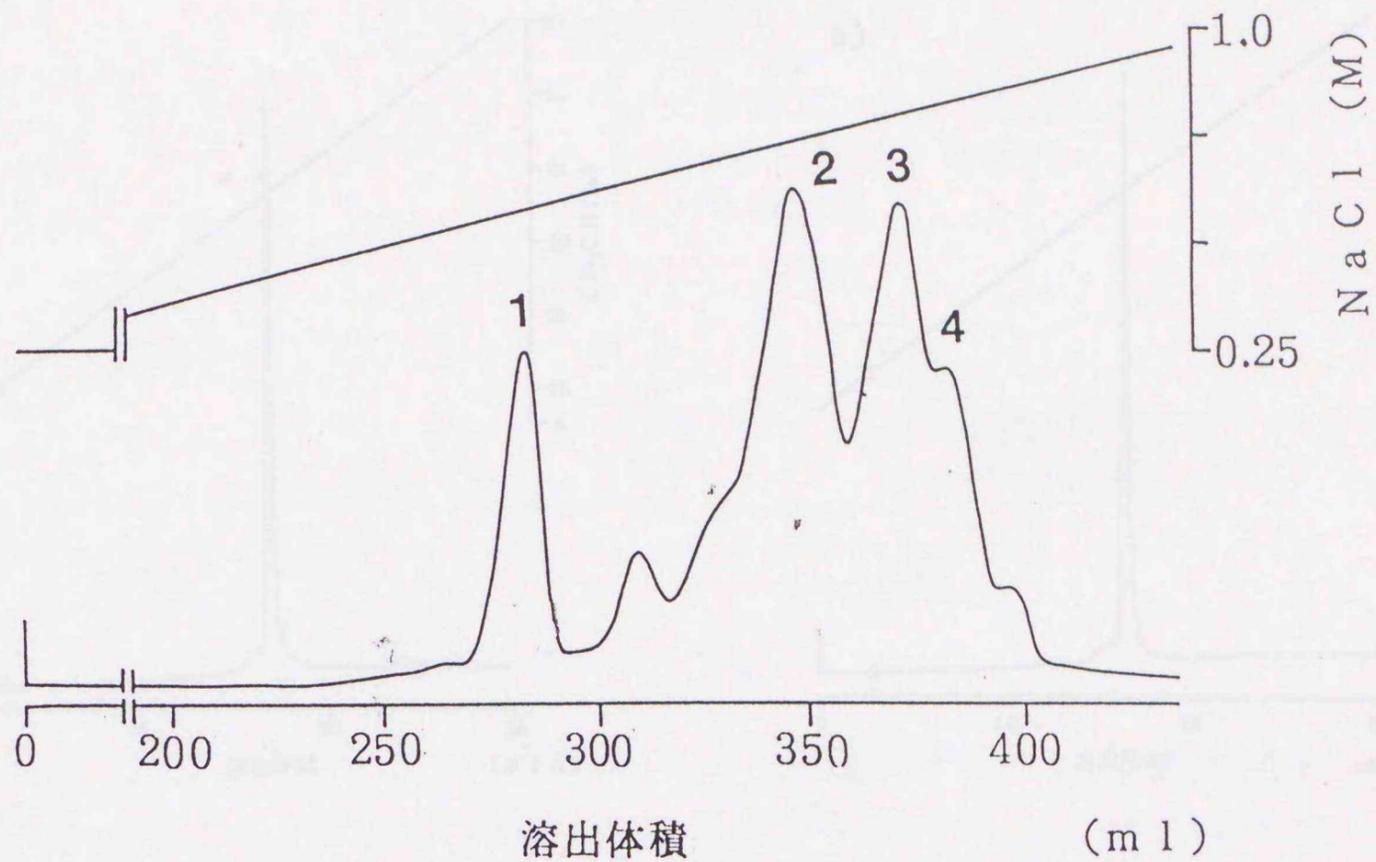


図 II-1 イオン交換クロマトグラフィーによるマビンリン同族体の分離

カラム; CM-Sepharose CL-6B (10 mm×330 mm)、溶離液; 50 mM glycine/NaOH (pH 9.0), 0.25 → 1.0 M NaCl (直線濃度勾配)、流速: 8.0 ml/h、検出: 280 nm の紫外吸光測定、温度: 4℃。

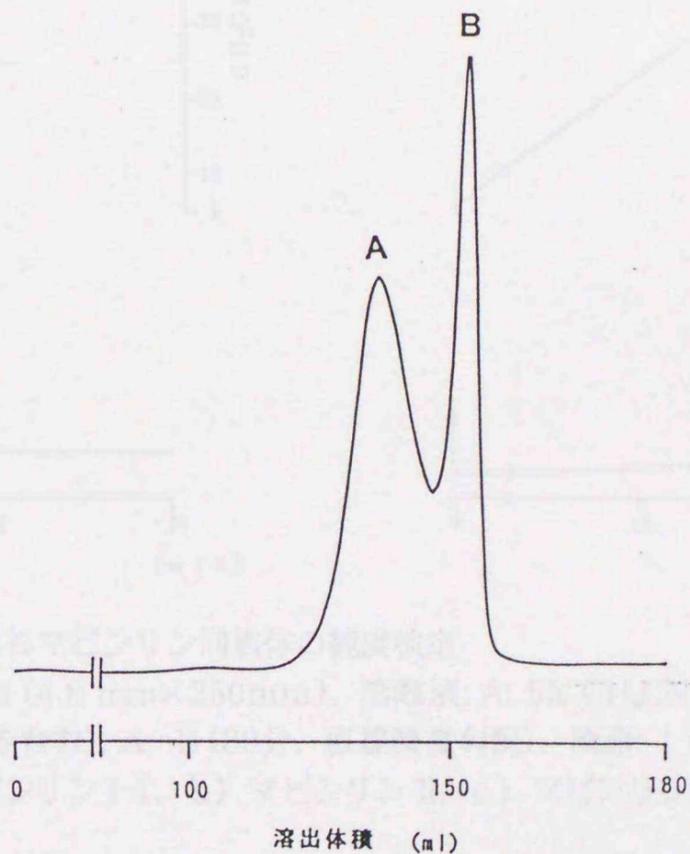


図 II-2 ゲルろ過クロマトグラフィーによるマビンリン同族体の分離

カラム: Bio gel P-30 (16 mm×900 mm)、溶離液: 0.5 M NaCl を含む 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 6.8)、流速: 4.5 ml/h、検出: 280 nm の紫外吸光測定、温度: 4℃。

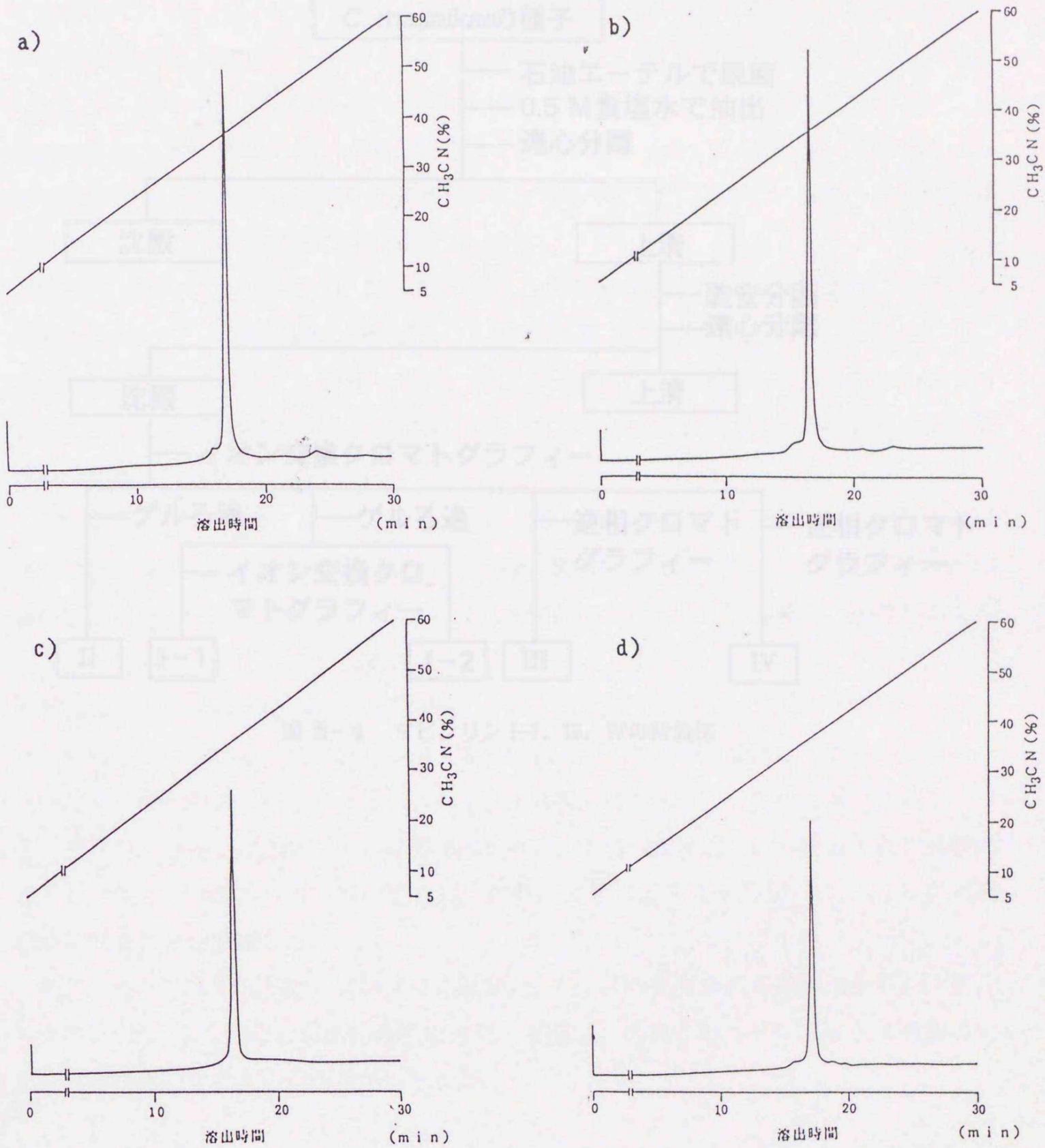


図 II-3 逆相 HPLC によるマピンリン同族体の純度検定

カラム: Vydac 218TP54 (4.6 mm×250mm)、溶離液: A; 5% CH₃CN (0.05% TFAを含む), B; 60% CH₃CN (0.05% TFAを含む), A→B (30分、直線濃度勾配)、流速: 1 ml/min、検出: 210 nm の紫外吸光測定。a) マピンリン I、b) マピンリン II、c) マピンリン III、d) マピンリン IV。

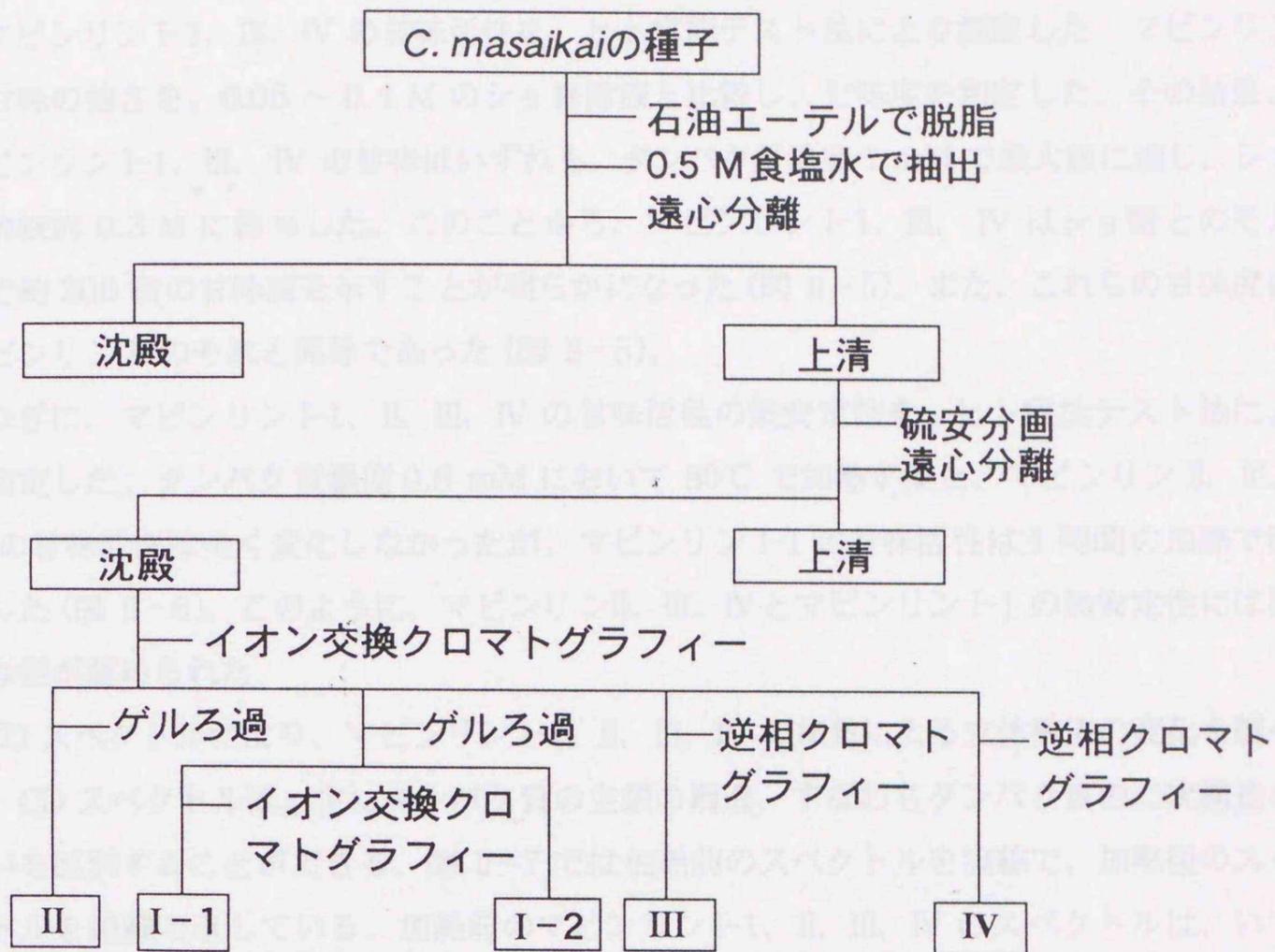


図 II-4 マピンリン I-1、III、IV の精製法

II-3-2. マビンリン同族体の甘味活性および熱安定性

マビンリンI-1、III、IVの甘味活性を、ヒト官能テスト法により測定した。マビンリンの甘味の強さを、0.05～0.4 Mのショ糖溶液と比較し、甘味度を判定した。その結果、マビンリンI-1、III、IVの甘味はいずれも、タンパク質濃度1 mMで最大値に達し、ショ糖溶液約0.3 Mに相当した。このことから、マビンリンI-1、III、IVはショ糖とのモル比で約300倍の甘味度を示すことが明らかになった(図II-5)。また、これらの甘味度はマビンリンIIのそれと同等であった(図II-5)。

つぎに、マビンリンI-1、II、III、IVの甘味活性の熱安定性を、ヒト官能テスト法により測定した。タンパク質濃度0.8 mMにおいて80℃で加熱すると、マビンリンII、III、IVの甘味活性は全く変化しなかったが、マビンリンI-1の甘味活性は1時間の加熱で消失した(図II-6)。このように、マビンリンII、III、IVとマビンリンI-1の熱安定性には顕著な差が認められた。

CDスペクトルにより、マビンリンI-1、II、III、IVの加熱による立体構造の変化を調べた。CDスペクトルは、主にタンパク質の主鎖の構造、すなわちタンパク質の二次構造の違いを区別することができる。図II-7では加熱前のスペクトルを実線で、加熱後のスペクトルを破線で示している。加熱前のマビンリンI-1、II、III、IVのスペクトルは、いずれも222 nmおよび208 nmに負の極値、193 nmに正の極値をもつ典型的な α -ヘリックス構造を示している。マビンリンII、III、IVは80℃で1時間加熱しても、そのスペクトルは全く変化せず、したがって α -ヘリックス構造は変化していないと考えられる。一方、マビンリンI-1は80℃で1時間加熱すると、198 nm付近に負の極値をもつ典型的なランダムコイルのスペクトルに変化し、加熱によりマビンリンI-1の α -ヘリックス構造が崩れることを示唆した。

以上、ヒト官能テストでの甘味活性の測定と、CDスペクトルの解析結果から、マビンリンI-1、II、III、IVの甘味活性の熱安定性の差異は、これらの α -ヘリックス構造の安定性の差に原因することが明らかになった。

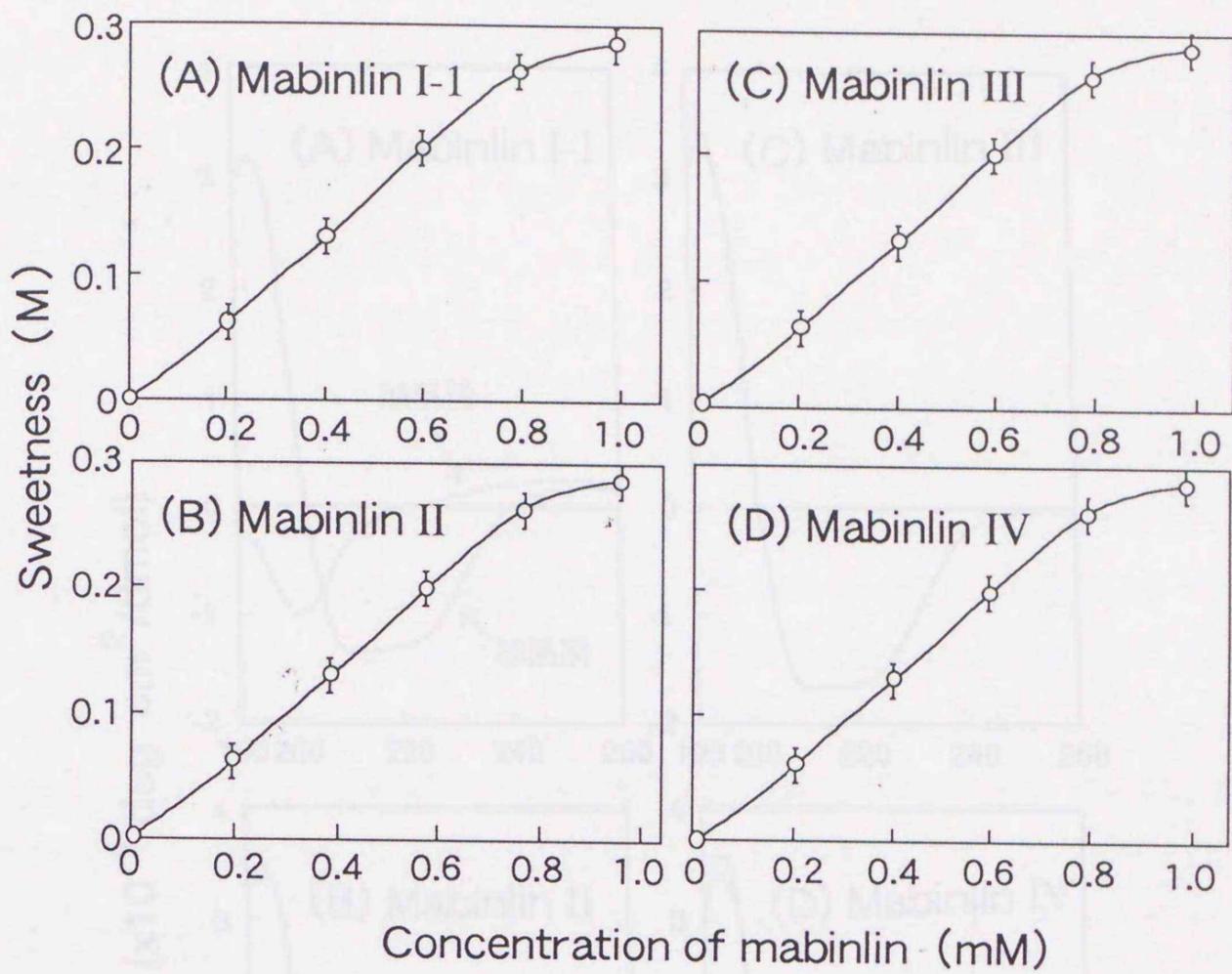


図 II-5 マビンリンI-1、II、III、IV の甘味活性

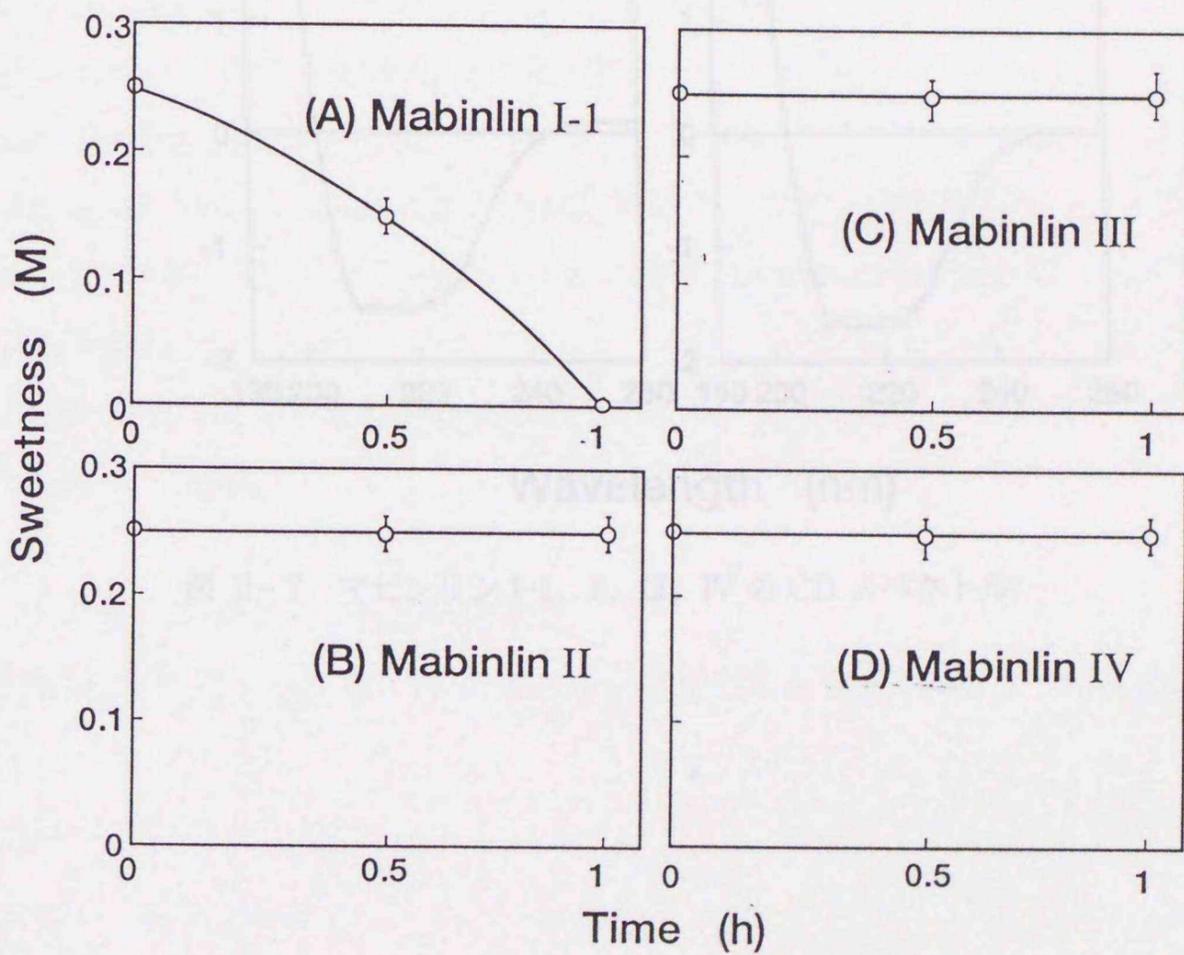


図 II-6 マビンリンI-1、II、III、IV の甘味活性の熱安定性

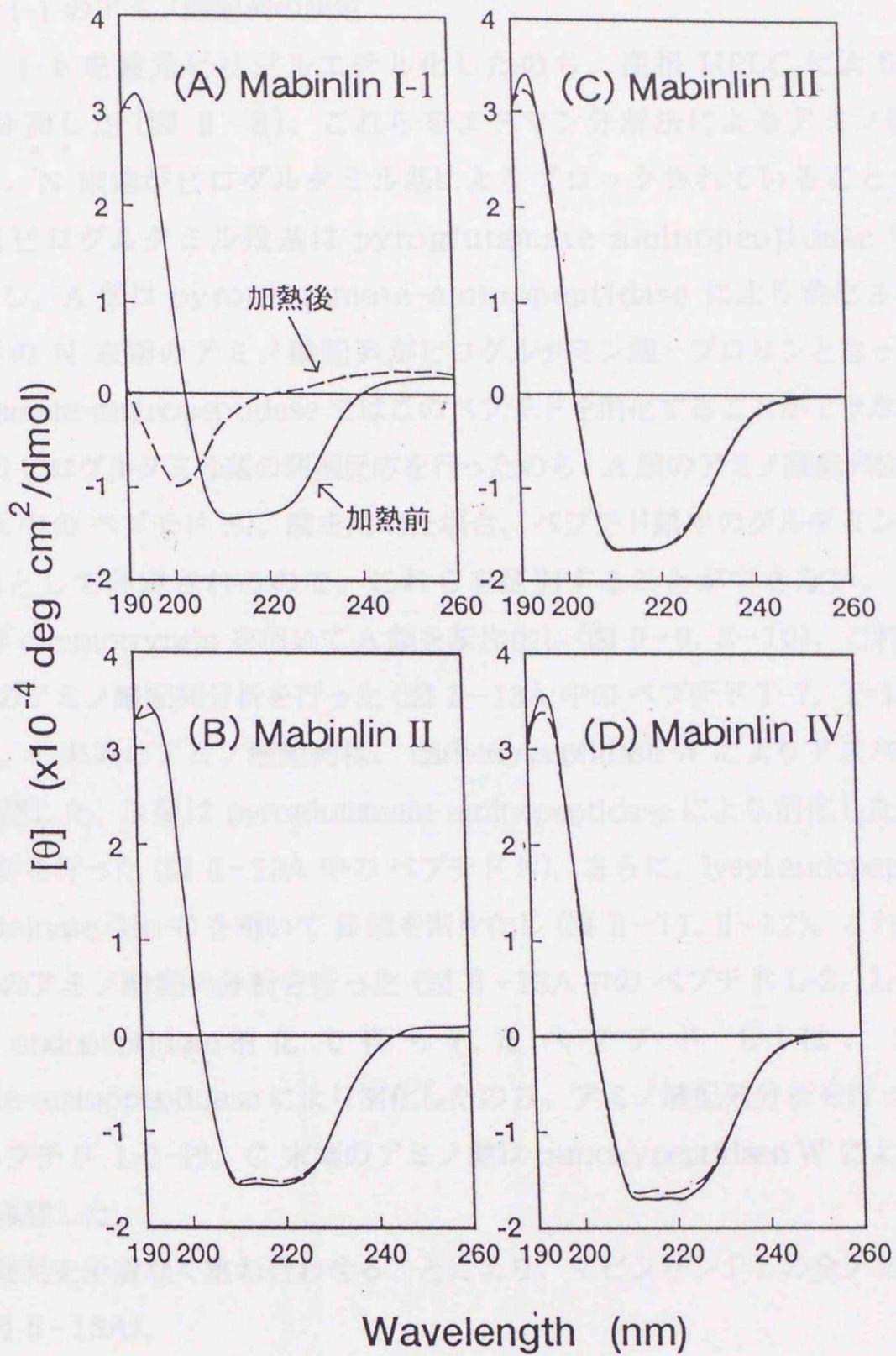


図 II-7 マビンリン I-1、II、III、IV の CD スペクトル

II-3-3. マビンリン I-1、III、IV のアミノ酸配列の決定

A) マビンリン I-1 のアミノ酸配列の決定

マビンリン I-1 を還元ピリジルエチル化したのち、逆相 HPLC により A 鎖および B 鎖に分画した (図 II-8)。これらをエドマン分解法によるアミノ酸配列分析したところ、N 末端がピログルタミル基によりブロックされていることがわかった。常法ではピログルタミル残基は pyroglutamate-aminopeptidase により除去する。しかし、A 鎖は pyroglutamate-aminopeptidase により消化されなかった。ペプチドの N 末端のアミノ酸配列がピログルタミン酸-プロリンとなっている場合、pyroglutamate-aminopeptidase ではこのペプチドを消化することができない⁽³⁴⁾。そこで、酸によりピログルタミル基の開環反応を行ったのち、A 鎖のアミノ酸配列分析を行った (図 II-13A 中の ペプチド N)。酸を用いた場合、ペプチド鎖中のグルタミンがすべてグルタミン酸として同定されるので、これらを区別することができない。そこで、trypsin および chymotrypsin を用いて A 鎖を断片化し (図 II-9, II-10)、これにより生じたペプチドのアミノ酸配列分析を行った (図 II-13A 中の ペプチド T-7, T-10, Ch-6 および Ch-7)。C 末端のアミノ酸配列は、carboxypeptidase W によりアスパラギン酸-バリンと確認した。B 鎖は pyroglutamate-aminopeptidase により消化したのち、アミノ酸配列分析を行った (図 II-13A 中の ペプチド N)。さらに、lysyl endopeptidase および endoproteinase Glu-C を用いて B 鎖を断片化し (図 II-11, II-12)、これにより生じたペプチドのアミノ酸配列分析を行った (図 II-13A 中の ペプチド L-2, L-3 および E-3)。lysyl endopeptidase 消化で得られたペプチド L-1 は、さらに pyroglutamate-aminopeptidase により消化したのち、アミノ酸配列分析を行った (図 II-13A 中の ペプチド L-1-P)。C 末端のアミノ酸は carboxypeptidase W により、トリプトファンと確認した。

以上の分析結果を矛盾なく重ね合わせることにより、マビンリン I-1 の全アミノ酸配列を決定した (図 II-13A)。

B) マビンリン III、IV のアミノ酸配列の決定

A) と同様にしてマビンリン III、IV の全アミノ酸配列を決定した (図 II-13B, C)。

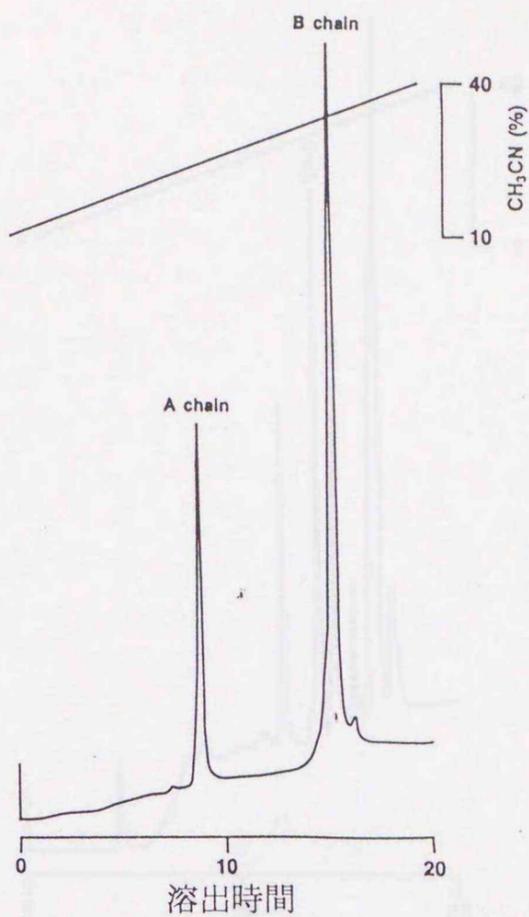


図 II-8 逆相 HPLC による還元ピリジルエチル化マビンリン I-1 A 鎖および B 鎖の分離
 カラム: TSK gel TMS-250 (4.6 mm×75mm)、溶離液: A; 10% CH₃CN (0.05% TFAを含む), B; 40% CH₃CN (0.05% TFAを含む), A→B (20分、直線濃度勾配)、流速: 1 ml/min、検出: 210 nm の紫外吸光測定。

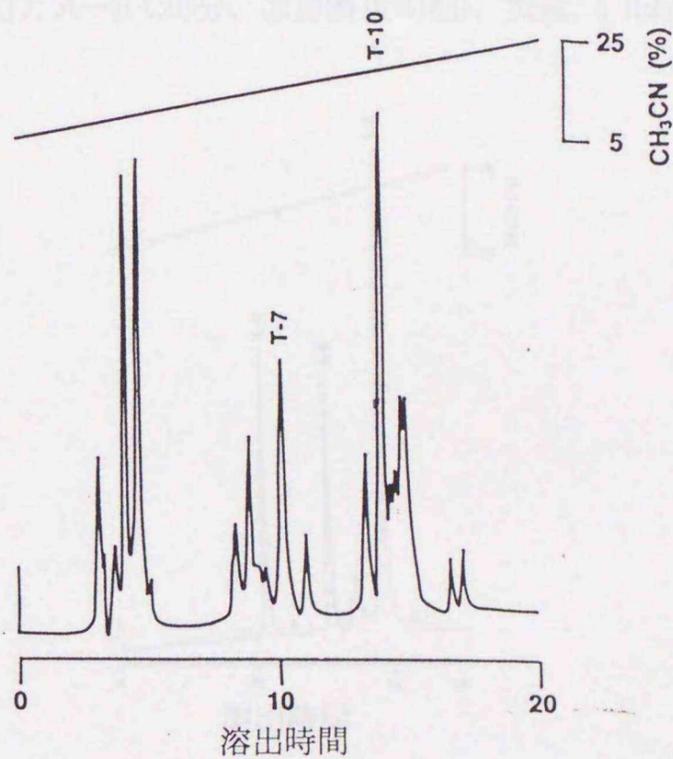


図 II-9 逆相 HPLC による還元ピリジルエチル化マビンリン I-1 A 鎖の trypsin 消化物の分離
 カラム: Vydac 218TP54 (4.6 mm×250mm)、溶離液: A; 5% CH₃CN (0.05% TFAを含む), B; 25% CH₃CN (0.05% TFAを含む), A→B (20分、直線濃度勾配)、流速: 1 ml/min、検出: 210 nm の紫外吸光測定。

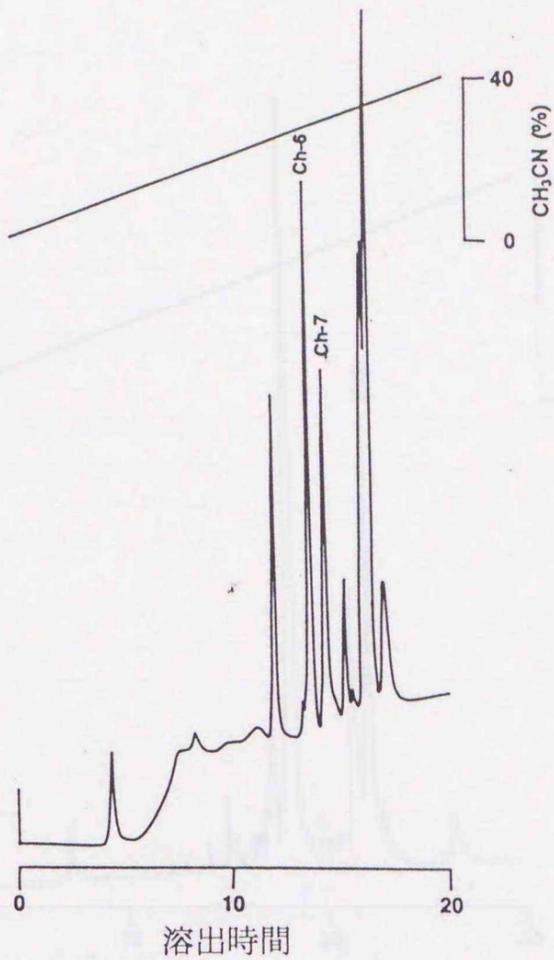


図 II-10 逆相 HPLC による還元ピリジルエチル化マピンリン I-1 A 鎖の chymotrypsin 消化物の分離

カラム: Vydac 218TP54 (4.6 mm×250mm)、溶離液: A; 0% CH₃CN (0.05% TFAを含む), B; 40% CH₃CN (0.05% TFAを含む), A→B (20分、直線濃度勾配)、流速: 1 ml/min、検出: 210 nm の紫外吸光測定。

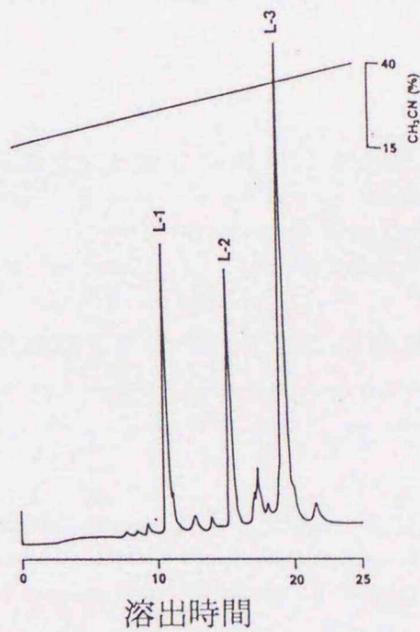


図 II-11 逆相 HPLC による還元ピリジルエチル化マピンリン I-1 B 鎖の lysyl endopeptidase 消化物の分離

カラム: Vydac 218TP54 (4.6 mm×250mm)、溶離液: A; 15% CH₃CN (0.05% TFAを含む), B; 40% CH₃CN (0.05% TFAを含む), A→B (25分、直線濃度勾配)、流速: 1 ml/min、検出: 210 nm の紫外吸光測定。

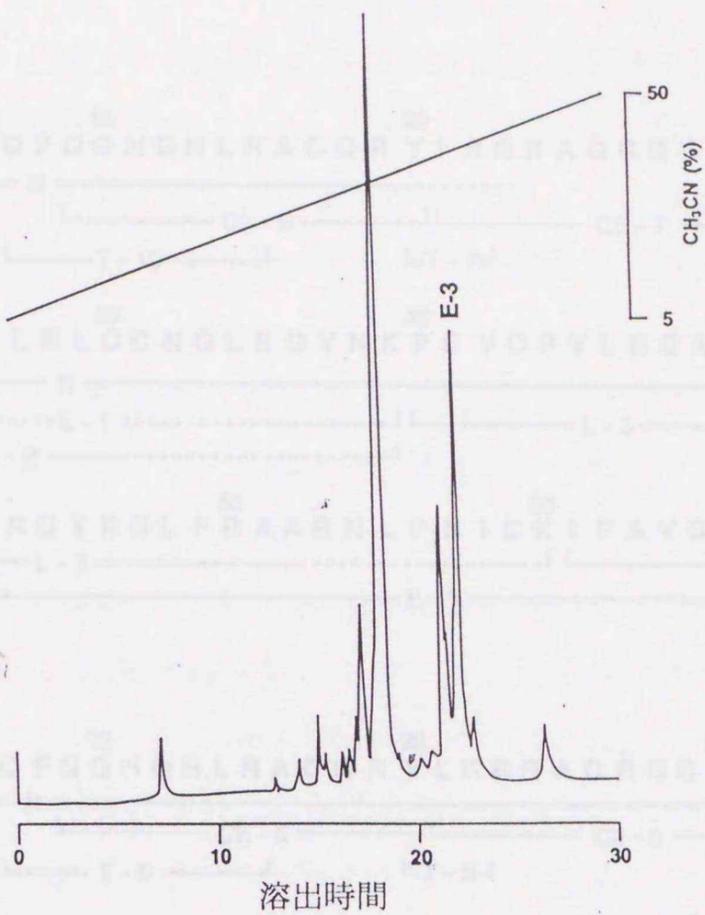
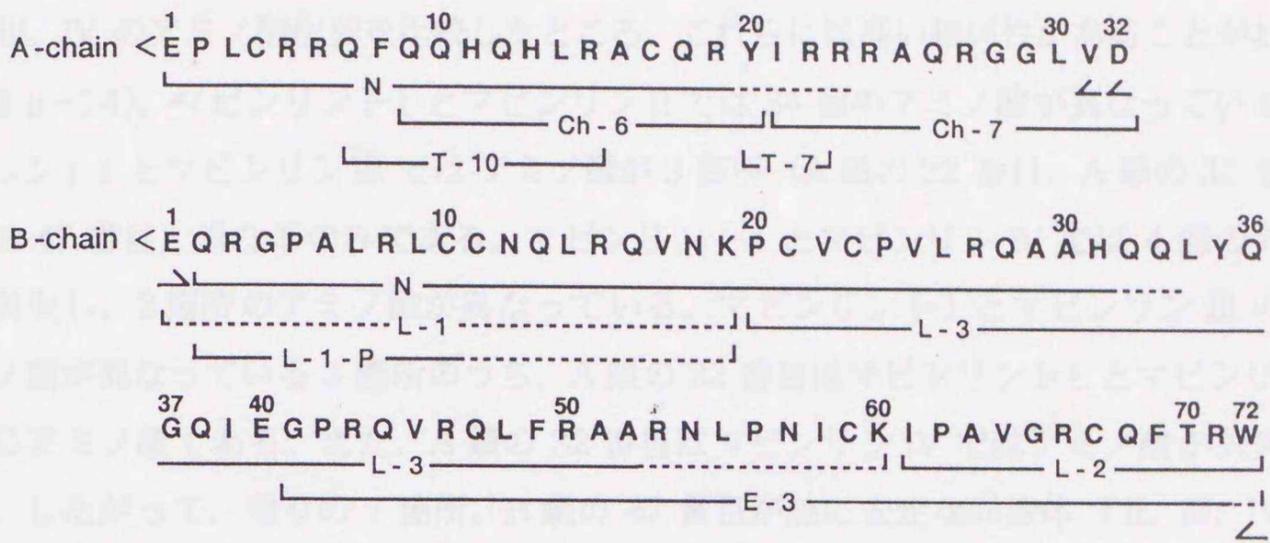


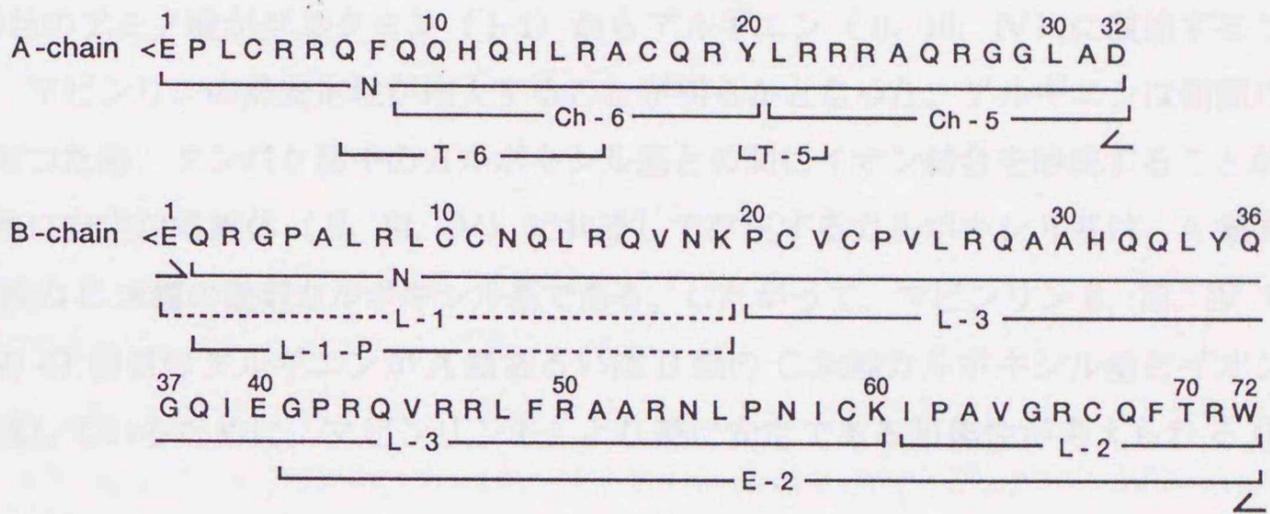
図 II - 12 逆相 HPLC による還元ピリジルエチル化マピンリン I-1 B 鎖の endoproteinase Glu-C 消化物の分離

カラム: Vydac 218TP54 (4.6 mm×250mm)、溶離液: A; 5% CH₃CN (0.05% TFAを含む), B; 50% CH₃CN (0.05% TFAを含む), A→B (30分、直線濃度勾配)、流速: 1 ml/min、検出: 210 nm の紫外吸光測定。

(A) Mabinlin I-1



(B) Mabinlin III



(C) Mabinlin IV

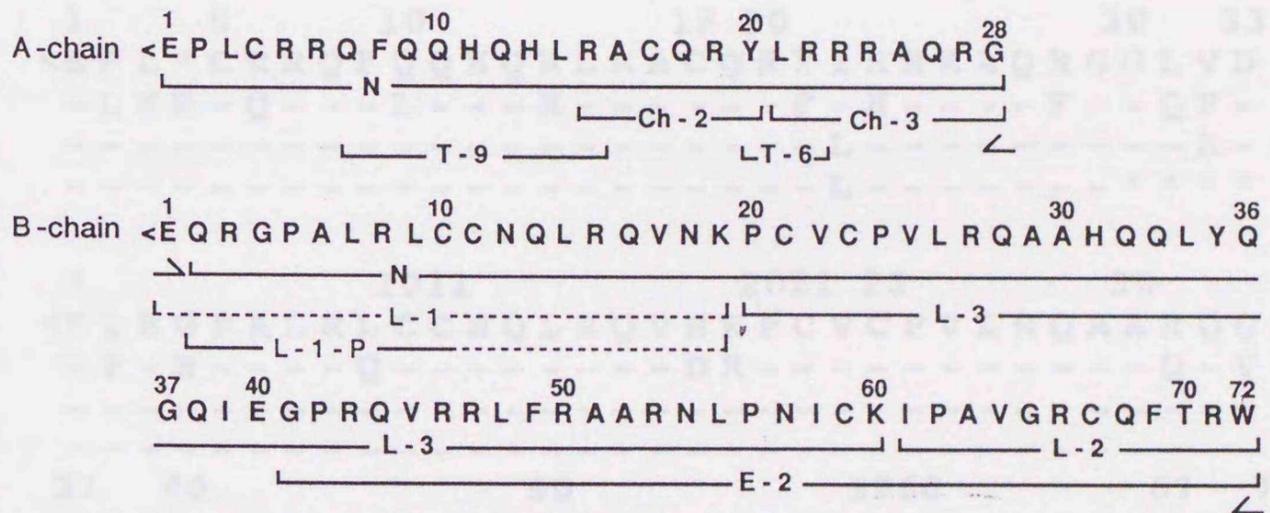


図 II-13 マビンリン I-1、III、IV のアミノ酸配列

N; A鎖およびB鎖のN末端アミノ酸配列分析、 Δ ; pyroglutamate-aminopeptidase 消化、 \angle ; carboxypeptidase W 消化、T, Ch, L, E; それぞれ Trypsin, Chymotrypsin, Lysyl endopeptidase, Endoproteinase Glu-C 消化により得られたペプチド。

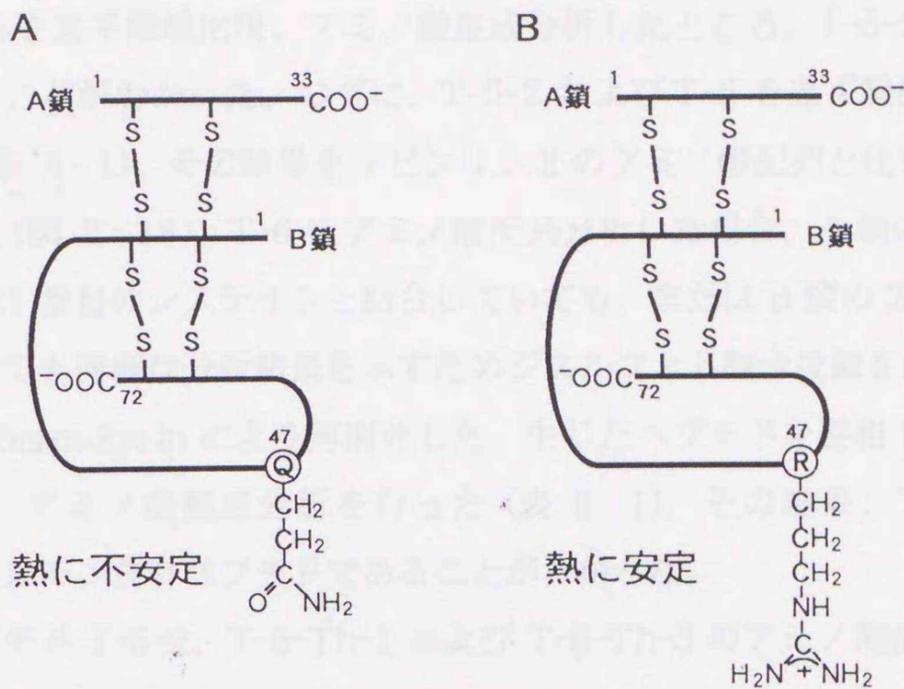


図 II-15 マビンリン同族体の構造
(A) マビンリン I-1、(B) マビンリン II、III、IV。

II-3-5. マビンリン I-1、II のジスルフィド結合位置の決定

マビンリン I-1 および II 中には、8 個のシステインが存在し、これらの一次構造上の位置はすべて一致していた。タンパク質中に複数のシステインが存在すると、通常は 2 個のシステイン間でジスルフィド結合を形成する。熱安定性の異なるマビンリン I-1 と II のジスルフィド結合位置を比較することは、マビンリンの熱安定性と構造の関係を明らかにする手がかりになると考えられる。

A) マビンリン II のジスルフィド結合位置の決定

通常、アミノ酸配列を決定する際には、ジスルフィド結合を切断してしまうため、その結合位置を確認することはできない。ジスルフィド結合の位置を決定するためには、ジスルフィド結合を切断しないで酵素による断片化を行い、シスチン含有ペプチドを単離する必要がある。

まず、マビンリン II の遊離チオール基の存在を Ellman の方法により調べた。その結果、マビンリン II には遊離チオール基が存在しないことがわかった。

つぎに、マビンリン II を trypsin を用いて消化し、生じたペプチドを逆相 HPLC で分離した (図 II-16)。これらのペプチドを過ギ酸酸化し、シスチンをシステイン酸としたのち、生じたシステイン酸をアミノ酸組成分析で検出した。その結果、T-5 および T-6 がシスチン含有ペプチドであることがわかった。

T-5 を逆相 HPLC によりさらに精製したところ、T-5-1 および T-5-2 に分離した (図 II-17)。これらを過ギ酸酸化後、アミノ酸組成分析したところ、T-5-2 がシスチン含有ペプチドであることがわかった。つぎに、T-5-2 および T-6 を過ギ酸酸化せずにアミノ酸組成分析し (表 II-1)、その結果をマビンリン II のアミノ酸配列と比較してペプチドの構造を推定した (図 II-18)。T-6 をアミノ酸配列分析した場合、A 鎖の 5 番目のシステインが B 鎖の 21 番目のシステインと結合していても、または B 鎖の 23 番目のシステインと結合していても同様な分析結果を示すためジスルフィド結合位置を決定できない。そこで、T-6 を thermolysin により再消化した。生じたペプチドを逆相 HPLC により分離し (図 II-19)、アミノ酸組成分析を行った (表 II-1)。その結果、T-6-Th-1 および T-6-Th-3 がシスチン含有ペプチドであることがわかった。

得られたペプチド T-5-2、T-6-Th-1 および T-6-Th-3 のアミノ酸配列分析を行った (表 II-2)。その結果、ジスルフィド結合位置は A 鎖の 5 番と B 鎖の 21 番、A 鎖の 18 番と B 鎖の 10 番、B 鎖の 11 番と B 鎖の 59 番および B 鎖の 23 番と B 鎖の 67 番であることが明らかとなった (図 II-18)。

B) マビンリン I-1 のジスルフィド結合位置の決定

A) と同様にしてマビンリン I-1 のジスルフィド結合位置を決定した。

C) マビンリン I-1、II のジスルフィド結合位置の比較

マビンリン I-1、II ともに A 鎖・B 鎖間に 2 個のジスルフィド結合、B 鎖内に 2 個のジスルフィド結合が存在することが明らかとなった (図 II-15)。さらに、両者のジスルフィド結合位置は完全に一致した。したがって、マビンリンに関しては、ジスルフィド結合が熱安定性の差異の主要な原因にはなっていないことが明らかとなった。

マビンリン I-1 も、80℃ においてその活性失活に 1 時間ほど要するので、通常のタンパク質より熱に安定である。おそらく 1 分子中に 4 個存在するジスルフィド結合が熱安定性に部分的貢献をしているものと思われる。

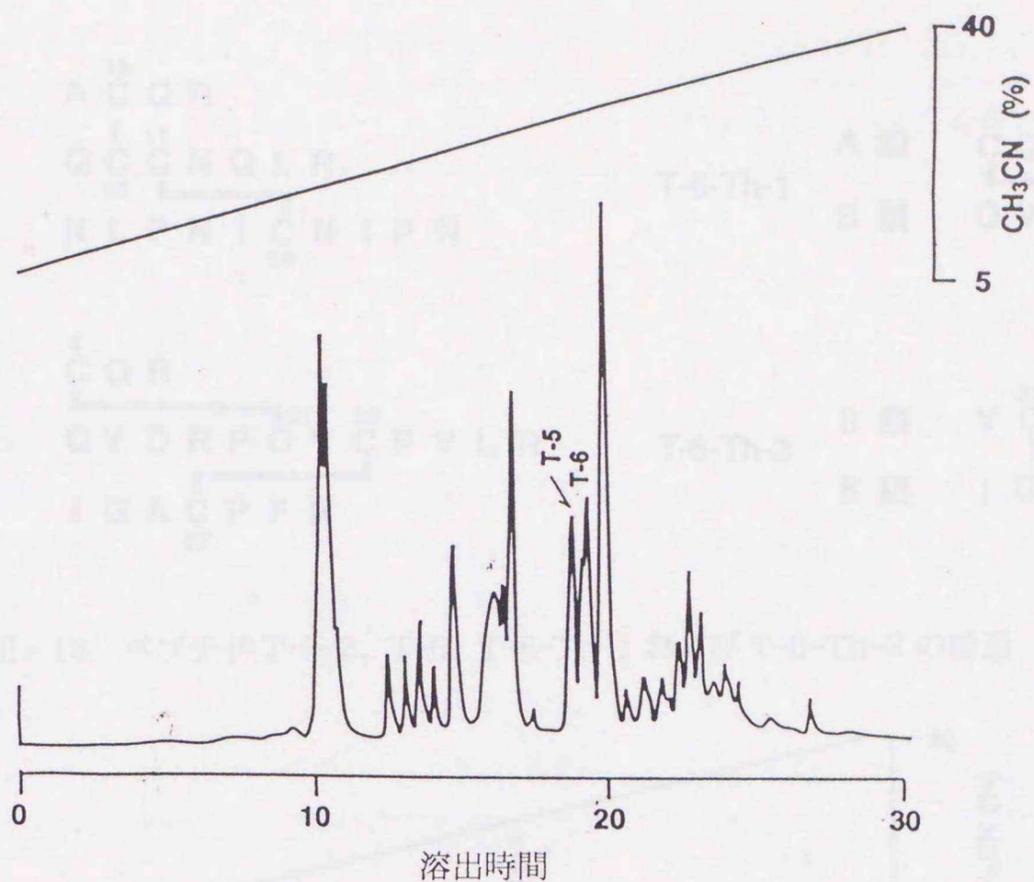


図 II-16 逆相 HPLC によるマビンリン II の trypsin 消化物の分離

カラム: Vydac 218TP54 (4.6 mm×250mm)、溶離液: A; 5% CH₃CN (0.05% TFAを含む), B; 40% CH₃CN (0.05% TFAを含む), A→B (30分、直線濃度勾配)、流速: 1 ml/min、検出: 210 nm の紫外吸光測定。

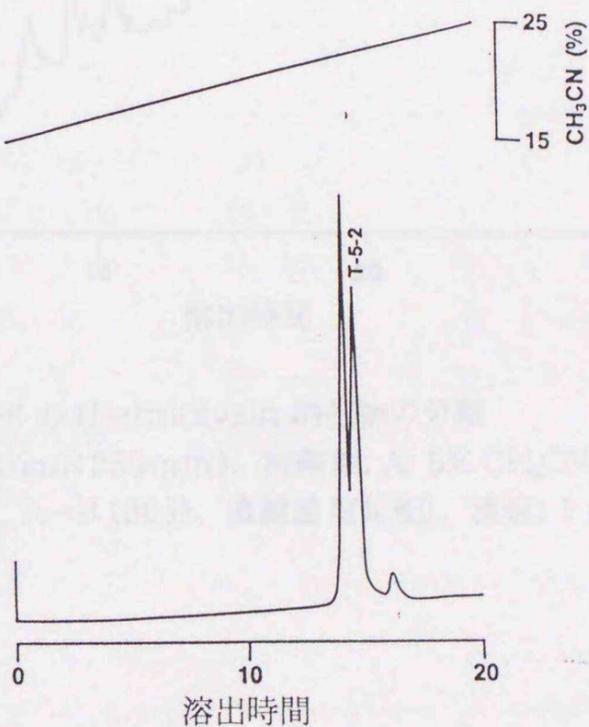


図 II-17 逆相 HPLC による T-5 のリクロマトグラフィー

カラム: Vydac 218TP54 (4.6 mm×250mm)、溶離液: A; 15% CH₃CN (0.05% TFAを含む), B; 25% CH₃CN (0.05% TFAを含む), A→B (20分、直線濃度勾配)、流速: 1 ml/min、検出: 210 nm の紫外吸光測定。

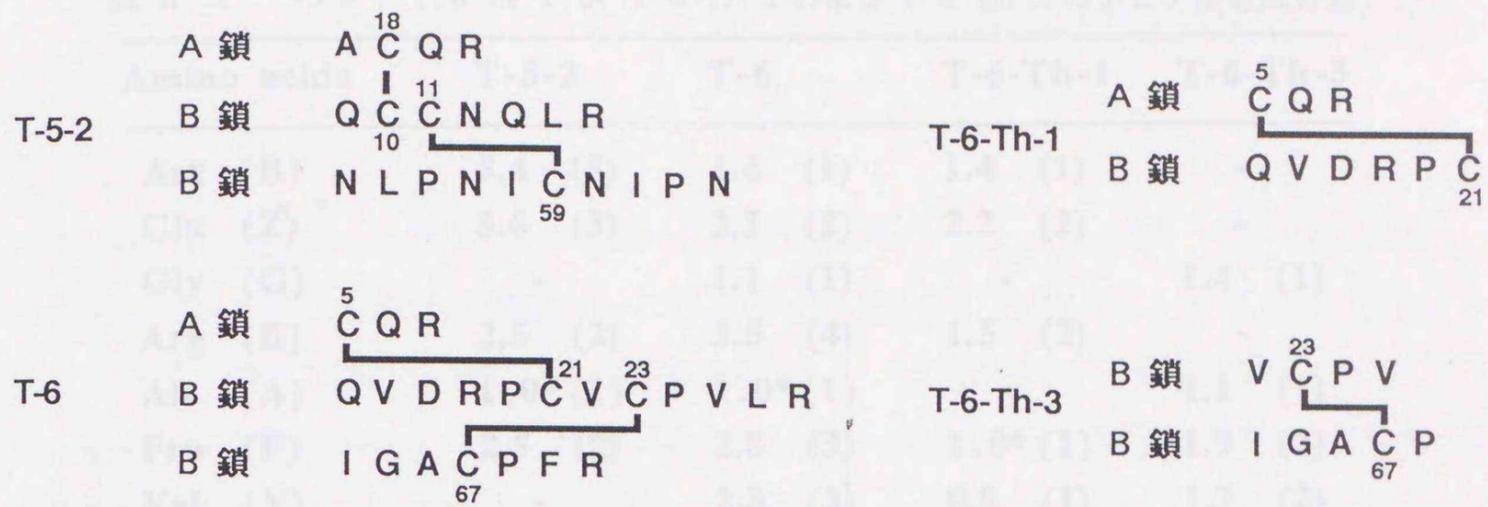


図 II-18 ペプチド T-5-2、T-6、T-6-Th-1 および T-6-Th-3 の構造

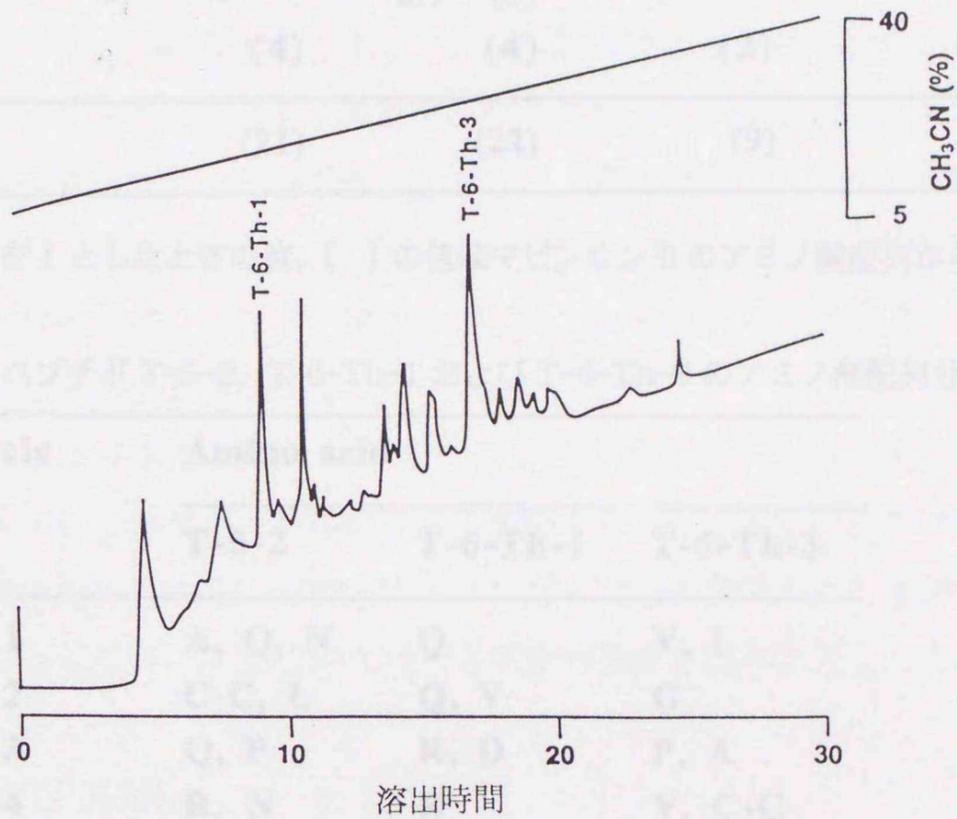


図 II-19 逆相 HPLC による T-6 の thermolysin 消化物の分離

カラム: Vydac 218TP54 (4.6 mm×250mm)、溶離液: A; 5% CH₃CN (0.05% TFAを含む), B; 40% CH₃CN (0.05% TFAを含む), A→B (30分、直線濃度勾配)、流速: 1 ml/min、検出: 210 nm の紫外吸光測定。

表 II-1 ペプチド T-5-2、T-6、T-6-Th-1 および T-6-Th-3 のアミノ酸組成分析

Amino acids	T-5-2	T-6	T-6-Th-1	T-6-Th-3
Asx (B)	5.4 (5)	1.4 (1)	1.4 (1)	-
Glx (Z)	3.6 (3)	2.3 (2)	2.2 (2)	-
Gly (G)	-	1.1 (1)	-	1.4 (1)
Arg (R)	2.5 (2)	3.5 (4)	1.5 (2)	-
Ala (A)	1.0* (1)	1.0* (1)	-	1.1 (1)
Pro (P)	2.5 (2)	2.8 (3)	1.0* (1)	1.9 (2)
Val (V)	-	2.3 (3)	0.9 (1)	1.7 (2)
Ile (I)	2.0 (2)	1.0 (1)	-	1.0* (1)
Leu (L)	1.9 (2)	1.3 (1)	-	-
Phe (F)	-	0.7 (1)	-	-
Cys (C)	(4)	(4)	(2)	(2)
Total	(21)	(22)	(9)	(9)

各アミノ酸は(*)を1としたときの値。()の値はマビンリンIIのアミノ酸配列からの計算値。

表 II-2 ペプチド T-5-2、T-6-Th-1 および T-6-Th-3 のアミノ酸配列分析

Cycle	Amino acid		
	T-5-2	T-6-Th-1	T-6-Th-3
1	A, Q, N	Q	V, I
2	C-C, L	Q, V	G
3	Q, P	R, D	P, A
4	R, N	R	V, C-C
5	Q, I	P	P
6	L, C-C	C-C	
7	R, N		
8	I		
9	P		
10	N		

第Ⅲ章 耐熱性甘味タンパク質マビンリンⅡの cDNA クローニングおよび大腸菌における発現

Ⅲ-1. 序

これまでに行われてきた甘味タンパク質の研究は、モネリンおよびソーマチンの例がある。モネリンでは、有機化学的手法により合成したモネリンを用いて、B鎖の7番目のアスパラギン酸が甘味活性部位である可能性が高いことが示されている⁽³⁵⁾。ソーマチンでは、遺伝子工学的的手法によりその発現・生産系の確立が試みられているが⁽³⁶⁻⁴³⁾、いずれも活性を有するソーマチンは得られていない。また、これまでに知られている甘味タンパク質（モネリン、ソーマチン、マビンリン、ブラゼイン）の間には、アミノ酸配列の相同性はない。

前章においてタンパク質化学的手法によりマビンリン同族体の構造を明らかにした。さらにマビンリンの甘味活性部位に関する研究を進めるためには、マビンリンを人工的に合成することができる系を確立する必要がある。タンパク質を合成するには、有機化学的に合成する方法および遺伝子工学的に合成する方法が考えられる。有機化学的手法では、100残基程度のような長いポリペプチド鎖を合成することは難しい。そこで、遺伝子工学的的手法によりマビンリンの生産系の確立を試みた。

本章では、まずマビンリンⅡ cDNA のクローニングを行った⁽¹⁸⁾。cDNA クローニングは、遺伝子工学的的手法によるタンパク質の生産に用いる DNA を得るためだけでなく、タンパク質化学的手法では得られない前駆体タンパク質の構造を解明することができる。つづいて、大腸菌を用いたマビンリンⅡ の発現・生産系の確立を試みた⁽¹⁹⁾。

Ⅲ-2. 材料および方法

Ⅲ-2-1. 材料

A) 材料

C. masakai の果実は、中国雲南省地方に自生する植物体から収集し、実験に使用するまで -80℃ 以下で保存したものをを用いた。

Oligotex-dT Super、各種酵素、pUC18; 宝酒造 (株)

cDNA synthesis kit; Boehringer-Mannheim

Complete rapid cloning system, Hybond N, *rediprime* DNA labelling system, peroxidase 標識抗ウサギ Ig G 血清、ECL 試薬; Amersham

DNA 合成; グライナー・ジャパン (株)

pET-15b; Novagen

抗マビンリン II 血清; Nakajo らの方法⁽⁴¹⁾により調製したもの

RX フィルム; 富士写真フィルム (株)

Chelating Sepharose, PD-10; Pharmacia LKB Biotechnology

その他の試薬は、すべて特級、生化学用または遺伝子工学用を使用した。

B) 実験装置

polymerase chain reaction (PCR) 装置; DNA Thermal Cycler PJ2000、Perkin Elmer

HPLC; PC8011、東ソー (株)

分光旋光計; Jasco J-720、日本分光 (株)

アミノ酸配列自動分析計; PPSQ-10 Protein Sequencer、Shimadzu

C) 培地組成

Luria-Bertani (LB) 培地; 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl

III-2-2. cDNA ライブラリーの作製

C. masaikai の種子から phenol-SDS 法⁽⁴⁴⁾により全 RNA を抽出した。この RNA から Oligotex-dT Super により poly (A)⁺ RNA を精製した⁽⁴⁵⁾。この poly (A)⁺ RNA を鋳型に cDNA synthesis kit により二本鎖 cDNA を合成した⁽⁴⁶⁾。得られた二本鎖 cDNA は Complete rapid cloning system によりファージベクター λ gt 10 に挿入したのち、バクテリオファージにパッケージングし、大腸菌中で増殖させた。

III-2-3. プローブの作製

C. masaikai の種子から抽出した全 RNA を鋳型として、reverse transcription (RT)-PCR 法により cDNA ライブラリーをスクリーニングするためのプローブを作成した。まず、以下に示す 2 種類のオリゴヌクレオチド I および II を合成した。オリゴヌクレオチド I には、制限酵素 *Nde*I サイト、成熟マビンリン II A 鎖 N 末端を、オリゴヌクレオチド II には、成熟マビンリン II B 鎖 C 末端、終止コドン、制限酵素 *Bam*HI サイトをコードした。これらのオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、RT-PCR を行った。PCR は、96°C、7 分間につづいて、96°C、1 分間、50°C、1 分間、72°C、1 分間を 30 回繰り返したのち、72°C、10 分間行った。つぎに、得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動に

より分離した。つづいて、これを切り出して精製したのち、T4 DNA polymerase を用いて平滑末端とした。さらに、これをプラスミドベクター pUC18 の *Sma*I サイトに挿入し、pMABPCR 1 を作成した。Sanger らの方法⁽⁴⁷⁾により pMABPCR 1 の塩基配列を分析した。

オリゴヌクレオチド I

5'-AG CATATG CARYTITGGMGITGYCA-3'

*Nde*I 成熟マビンリン II A 鎖 N 末端

オリゴヌクレオチド II

5'-C GGATCC CTA CCAIGCICKRAAIGGRC-3'

*Bam*HI 終止 成熟マビンリン II B 鎖 C 末端

(R = A or G, Y = C or T, K = G or T, M = A or C, I = inosine)

III-2-4. cDNA クローンの単離

組換えプラークをナイロンフィルター Hybond N に転写した。紫外線照射によりフィルターに DNA を固定したのち、緩衝液 (90 mM Na₃ citrate, 0.9 M NaCl, 0.2% Ficoll 400, 0.2% polyvinylpyrrolidone, 0.2% bovine serum albumin (BSA), 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), 100 μg/ml salmon sperm DNA (pH 7.6)) により 60°C で 20 分間プレハイブリダイズした。つぎに、このフィルターを、*rediprime* DNA labelling system を用いて³²P 標識したプローブを含む緩衝液により 60°C、20 時間ハイブリダイズした。このフィルターを 0.1% SDS を含む SSC 緩衝液 (0.15 M NaCl, 15 mM Na₃ citrate (pH 7.6)) で洗浄した。洗浄したフィルターは RX フィルムに -80°C で露光し、プローブとハイブリダイズするクローンを選択した。

陽性クローン MAB を単離し、ついで制限酵素 *Eco*RI で処理後、プラスミドベクター pUC 18 にクローニングした。これを用いて Sanger らの方法⁽⁴⁷⁾によりマビンリン II cDNA の塩基配列を決定した。

III-2-5. 発現プラスミドの構築

pMABPCR 1 を制限酵素 *Nde*I および *Bam*HI により消化し、マビンリン II A 鎖・リンカー・B 鎖をコードする DNA 断片を切り出した。これを pET-15b のもつヒスチジンタグ遺伝子の下流に挿入し、ヒスチジンタグ-マビンリン II A 鎖・リンカー・B 鎖融合タンパク質 (組換えマビンリン II) 発現プラスミド pMAB-2 を構築した。

Ⅲ-2-6. 大腸菌での組換えマビンリンⅡの発現

A) 発現プラスミドによる大腸菌の形質転換

組換えマビンリンⅡの発現実験には大腸菌 BL21 株を用いた。まず、大腸菌を LB 液体培地中で 37℃ で振とうし、600 nm の吸光度が 0.6 になるまで培養した。得られた培養液 20 ml を、3,000 × g、4℃ で 5 分間遠心し菌体を集めた。得られた菌体に低濃度緩衝液 (10 mM RbCl を含む 10 mM 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS) (pH 7.0)) 10 ml を加え、氷中で懸濁した。つづいて、3,000 × g、4℃ で 5 分間遠心し菌体を集め、得られた菌体に高濃度緩衝液 (50 mM CaCl₂, 10 mM RbCl を含む 0.1 M MOPS (pH 6.5)) 10 ml を加え、氷中で懸濁し、30 分間氷冷した。さらに、3,000 × g、4℃ で 5 分間遠心し菌体を集め、高濃度緩衝液 2 ml を加え、氷中で懸濁し、形質転換用 competent cell 溶液とした。この competent cell 溶液 100 μl に発現プラスミド溶液 1 μl を加え、30 分間氷冷したのち、42℃ で 1 分間熱処理をした。これに、LB 液体培地 1 ml を加え、37℃ で 60 分間培養したのち、3,000 × g、3 分間遠心し菌体を集めた。この菌体を 50 μg/ml の ampicillin を含む LB 寒天培地で 37℃ で培養し、形質転換菌 BL21/pMAB-2 を得た。

B) 組換えマビンリンⅡの発現

形質転換菌を 50 μg/ml の ampicillin を含む LB 液体培地 50 ml に植菌し、37℃ で一晩振とう培養を行った。得られた培養液を 50 μg/ml の ampicillin を含む LB 液体培地 1 l に加え、600 nm の吸光度が 0.6 になるまで 37℃ で振とう培養した。この培養液に 1 M isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を 1 ml (終濃度 1 mM) 加え、37℃ で 3 時間振とう培養を行った。得られた培養液を、3,000 × g、4℃ で 15 分間遠心し菌体を集めた。

C) 菌体の破碎

培養液 1 ml を分注し、12,000 × g、1 分間遠心し菌体を集めた。得られた菌体に SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 用 Laemmli's sample 緩衝液⁽⁴⁸⁾ 100 μl を加え、3 分間煮沸した。

D) SDS-PAGE および抗マビンリンⅡ血清を用いたイムノブロッティング

SDS-PAGE は Laemmli の方法⁽⁴⁸⁾により行った。ウエスタンブロッティングは

Towbin の方法⁽⁴⁹⁾により行った。菌体破碎液を SDS-PAGE により分離したのち、ニトロセルロース膜にウエスタンブロッティングした。この膜を TBS 緩衝液 (150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.6)) で 10 分間洗浄したのち、ブロッキング溶液 (5% スキムミルクを含む TBS 緩衝液) により 30 分間ブロッキングを行った。つぎに、抗マビンリン II 血清 (500 倍希釈) を含むブロッキング溶液を加え、室温で 1 時間振とうした。つづいて、0.05% Tween 20 を含む TBS 緩衝液で膜を洗浄したのち、peroxidase 標識抗ウサギ Ig G 血清 (1000 倍希釈) を含んだブロッキング溶液を加え、室温で 1 時間振とうした。さらに、膜を 0.05% Tween 20 を含む TBS 緩衝液で洗浄し、ECL 試薬を加え発色させたのち、RX フィルムに露光した。

III-2-7. 組換えマビンリン II の単離

A) 菌体の破碎

得られた菌体 1 g に対して 3 ml の 1 mM EDTA, 100 mM NaCl を含む 50 mM Tris/HCl (pH 8.0) を加え懸濁し、これに 4 μ l の 100 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、32 μ l の 50 mg/ml lysozyme を加え、4°C で 20 分間振とうした。つづいて、4 mg の deoxycholic acid を加え、37°C で 5 分間振とうした。さらに、2 μ l の 10 mg/ml deoxyribonuclease I を加え、37°C で 30 分間振とうしたのち、18,000 \times g, 4°C で 15 分間遠心し、上清および沈殿に分離した。

B) 組換えマビンリン II の精製

5 mM imidazole, 0.5 M NaCl を含む 20 mM Tris/HCl (pH 7.9) で平衡化した Chelating Sepharose カラムに菌体破碎液上清を添加した。60 mM imidazole, 0.5 M NaCl を含む 20 mM Tris/HCl (pH 7.9) で洗浄したのち、1 M imidazole, 0.5 M NaCl を含む 20 mM Tris/HCl (pH 7.9) により組換えマビンリン II を溶離した。溶離液の画分は、280 nm の紫外吸光で検出し、ピーク部分を集めた。

C) 脱塩・凍結乾燥

組換えマビンリン II を脱塩用カラム PD-10 を用いて脱塩したのち、溶液を凍結乾燥した。

D) 逆相 HPLC

組換えマビンリン II の純度検定を以下の条件で行った。

カラム : Vydac 218TP54 (4.6 mm×250mm)

移動相 : 0.05% TFA を含む CH₃CN の直線濃度勾配

流速 : 1 ml/min

検出 : 210 nm の紫外吸光測定

E) 組換えマビンリン II のアミノ酸配列分析

組換えマビンリン II のアミノ酸配列分析は、アミノ酸配列自動分析計により行った。

F) 組換えマビンリン II の甘味活性の測定

組換えマビンリン II を口に含み、甘味活性を調べた。

G) CDスペクトルの測定⁽²⁶⁻²⁸⁾

0.1 cm の経路長のセルを用い、分光旋光計により組換えマビンリン II (0.2 mg/ml) の CD スペクトルの測定を行った。測定は 20℃ で行い、スペクトルは 4 回積算した。

III-3. 結果および考察

III-3-1. マビンリン II cDNA クローンの単離および解析

まず、*C. masaikai* の種子から poly (A)⁺ RNA を精製し、これより二本鎖 cDNA を合成し、これをファージベクター λgt 10 に挿入して cDNA ライブラリーを作製した。

つぎに、RT-PCR 法により cDNA ライブラリーをスクリーニングするためのプローブを作製した。図 III-1 に示すように、マビンリン II のアミノ酸配列は *Arabidopsis thaliana* の種子貯蔵タンパク AT2S3⁽⁵⁰⁾ のそれと高い相同性がある⁽³⁾。AT2S3 は一本鎖の前駆体が合成されたのち、プロセッシングを受けて成熟体となる。マビンリン II A 鎖は AT2S3 の small subunit と、マビンリン II B 鎖は AT2S3 の large subunit と相同性が高いことから、マビンリン II 前駆体も AT2S3 前駆体と同様に一本鎖であると予想できる。そこで、RT-PCR に用いるプライマーは、成熟マビンリン II A 鎖 N 末端および成熟マビンリン II B 鎖 C 末端のアミノ酸配列をもとに設計した。これらを用いて RT-PCR を行い、PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により分離したところ、増幅された DNA は、約 380 bp の単一バンドを示した。つぎに、これをプラスミドベクター pUC18 に組み込み、pMABPCR 1 をクローニングした。pMABPCR 1 の塩基配列を分析した結果、成熟マビンリン II A 鎖・リンカー・成熟マビンリン II B 鎖をコードしていた (図 III-2)。成熟マビン

リン II 部分のアミノ酸配列は、天然マビンリン II のそれとすべて一致した。また、リンカー部分は 14 アミノ酸残基から構成され、10 残基の酸性アミノ酸を含んでいた。これは、成熟マビンリン II の等電点 (pI) が約 11 であるのと対照的な性質であり、大変興味深い。

つぎに、pMABPCR 1 より成熟マビンリン II A 鎖・リンカー・成熟マビンリン II B 鎖をコードする DNA 断片 (MABPCR1) を切り出し、これをプローブとして cDNA ライブラリーをスクリーニングした。約 3.0×10^5 個のプラークから、8 個の陽性クローンを得た。これらのうち、最も長い挿入断片のクローンを解析した結果、全長は 656 bp であり、465 bp からなるオープンリーディングフレームを含んでいた (図 III-3)。これより推定されるアミノ酸配列は、N 末端延長ペプチド 35 残基、成熟マビンリン II A 鎖 33 残基、リンカー 14 残基、成熟マビンリン II B 鎖 72 残基および C 末端延長ペプチド 1 残基であった (図 III-4)。N 末端延長ペプチド部分は、Perlman と Halverson⁽⁵¹⁾ および von Heijne⁽⁵²⁾ の法則より、シグナルペプチド 20 残基およびプロペプチド 15 残基からなるかと推測できる (図 III-4)。

エドマン分解法により決定されたマビンリン II のアミノ酸配列⁽³⁾は 148 番目および 153 番目の残基がアラニンであったが、今回決定した cDNA の塩基配列から推定されるアミノ酸配列ではスレオニンであった (図 III-3)。これは、マビンリンの微小不均一性 (microheterogeneity) によるものと考えられる。

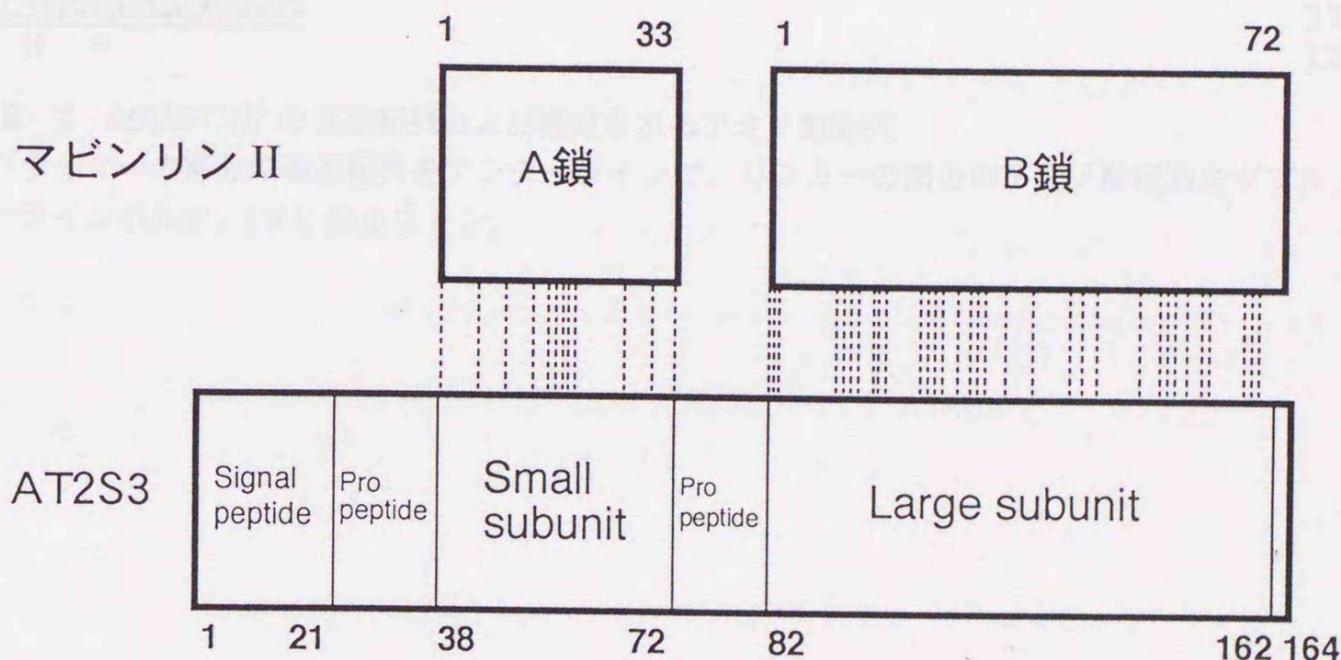


図 III-1 マビンリン II⁽³⁾ および *Arabidopsis thaliana* の種子貯蔵タンパク AT2S3⁽⁵⁰⁾ の一次構造の模式図

マビンリン II と AT2S3 の間でアミノ酸が一致している部分を点線で示した。

AGCATATGCAACTGTGGAGGTGTCAGAGGCAGTTCCTGCAGCACCAGCGACTCCGGGCTT 60
M Q L W R C Q R Q F L Q H Q R L R A C 19

GCCAGCGGTTTCATCCACCGACGAGCCCAGTTCGGCGGACAGCCCGATGAGCTTGAAGACG 120
Q R F I H R R A Q F G G Q P D E L E D E 39

AAGTCGAGGACGACAACGATGACGAAAACCAGCCAAGGCGACCGGCGCTCAGACAATGCT 180
V E D D N D D E N Q P R R P A L R Q C C 59

GCAACCAGCTGCGTCAAGTGGACAGACCTTGTGTTTGCCCTGTCCTCAGACAAGCTGCCC 240
N Q L R Q V D R P C V C P V L R Q A A Q 79

AGCAGGTGCTCCAACGACAAATAATCCAGGGTCCACAGCAGTTGAGGCGTCTCTTCGATG 300
Q V L Q R Q I I Q G P Q Q L R R L F D A 99

CCGCAAGAAATTTGCCCAACATCTGCAACATACCCAACATCGGAGCGTGCCCCTTCCGCG 360
A R N L P N I C N I P N I G A C P F R A 119

CCTGGTAGGGATCCG 375
W * 120

図 III-2 MABPCR1 の塩基配列および推定されるアミノ酸配列

プライマーの部分の塩基配列をアンダーラインで、リンカーの部分のアミノ酸配列をダブルアンダーライン示した。(*)；終止コドン。

CACACACTCACCCAAAACCCTAGCAATGGCGAAGCTCATCTTCCTCTTCGCGACCTTGGC 60
M A K L I F L F A T L A 12
シグナルペプチド

TCTCTTCGTTCTCCTAGCGAACGCCTCCATCCAGACCACCGTTATCGAGGTCGATGAAGA 120
L F V L L A N A S I Q T T V I E V D E E 32
↑ N 末端延長ペプチド

AGAAGACAACCAACTGTGGAGATGTCAGAGGCAGTTCCTGCAGCACCAGCGACTCCGGGC 180
E D N Q L W R C Q R Q F L Q H Q R L R A 52
↑ 成熟マビンリンII A 鎖

TTGCCAGCGGTTTCATCCACCGACGAGCCAGTTCGGCGGACAGCCCGATGAGCTTGAAGA 240
C Q R F I H R R A Q F G G Q P D E L E D 72
↑ リンカー

CGAAGTCGAGGACGACAACGATGACGAAAACCAGCCAAGGCGACCGGCGCTCAGACAATG 300
E V E D D N D D E N Q P R R P A L R Q C 92
↑ 成熟マビンリンII B 鎖

CTGCAACCAGCTGCGTCAAGTGGACAGACCTTGTGTTTGGCCTGTCCTCAGACAAGCTGC 360
C N Q L R Q V D R P C V C P V L R Q A A 112

CCAGCAGGTGCTCCAACGACAAATAATCCAGGGTCCACAGCAGTTGAGGCGTCTCTTCGA 420
Q Q V L Q R Q I I Q G P Q Q L R R L F D 132

TGCCGCAAGAAATTTGCCCAACATCTGCAACATACCCAACATCGGAACTTGCCCATTTCAG 480
A A R N L P N I C N I P N I G T C P F R 152

AACATGGCCCTAGGCGAACCAACCAGTGGCTGACGGAGAGGTGTGTTGTAGAATCCCATG 540
T W P * 155
↑ C 末端延長ペプチド

TTGTAGTGTGTTAATAATATAGTTAGCATCGAGGCTAATGTCGAACTAGCACTACTCCTA 600
ATAAGAGGTTTCCAAGTTCTCTTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 656

図 III-3 マビンリン II cDNA の塩基配列および推定されるアミノ酸配列
翻訳後プロセッシングを受ける部位を矢印で示した。(*)；終止コドン。

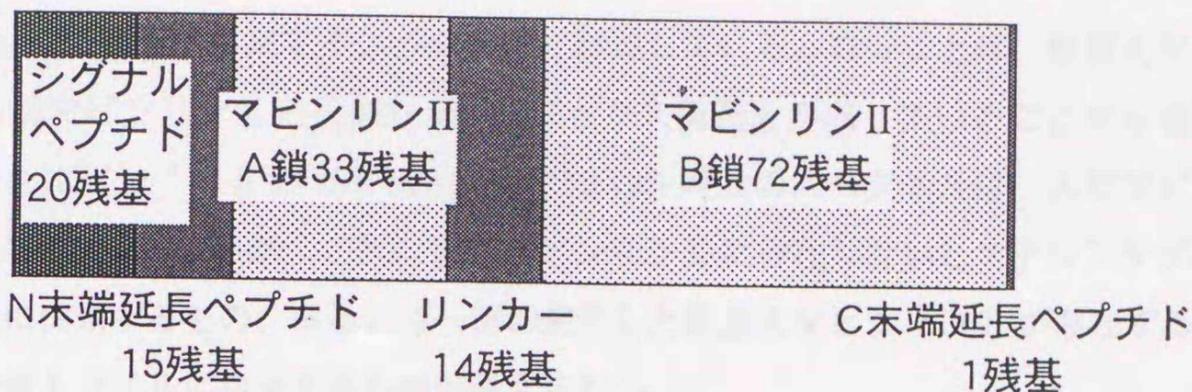


図 III-4 マビンリン II 前駆体の構造

III-3-2. 組換えマビンリン II の大腸菌における発現

cDNA クローニングに用いたプローブ *MABPCR1* は、一本鎖の成熟マビンリン II A 鎖・リンカー・成熟マビンリン II B 鎖をコードしている。これを用いて大腸菌による一本鎖成熟マビンリン II A 鎖・リンカー・成熟マビンリン II B 鎖の発現生産系の確立を試みた。外来タンパク質の発現系として、T7 フェージプロモーターを有する pET-15b を用いた。

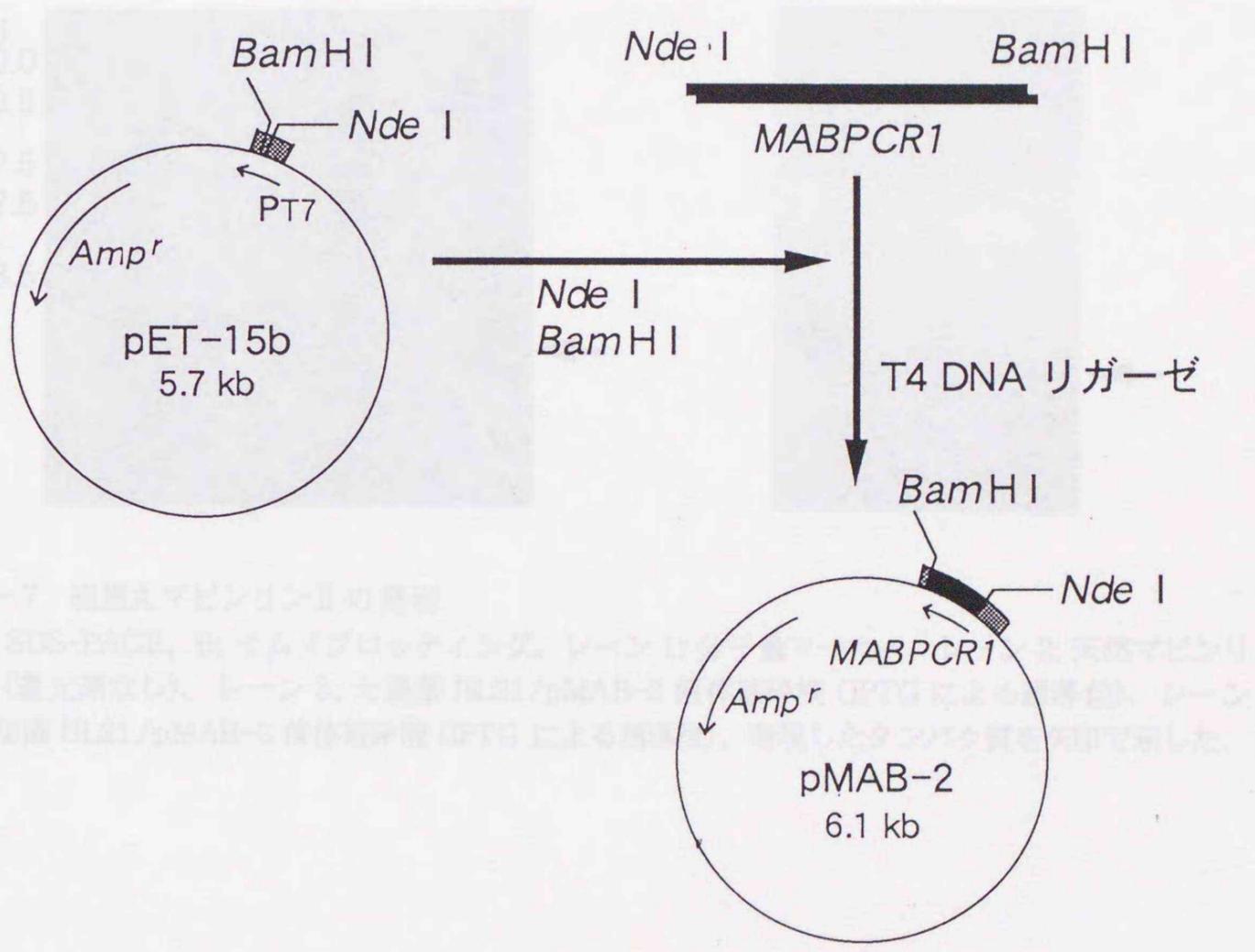
まず、pMABPCR 1 より *MABPCR1* を切り出し、pET-15b のもつヒスチジンタグ遺伝子の下流に挿入した。これにより、ヒスチジンタグ-成熟マビンリン II A 鎖・リンカー・成熟マビンリン II B 鎖融合タンパク質（組換えマビンリン II）発現プラスミド pMAB-2 を構築した（図 III-5）。図 III-6 に、pMAB-2 により合成が推定されるタンパク質の構造を示した。これによると、ヒスチジンタグ 20 残基、メチオニン 1 残基、成熟マビンリン II A 鎖 33 残基、リンカー 14 残基および成熟マビンリン II B 鎖 72 残基と推定される。

つぎに、pMAB-2 を用いて大腸菌 BL21 株を形質転換し、形質転換菌 BL21/pMAB-2 を得た。これを用いて組換えマビンリン II の発現を試みたところ、IPTG によるタンパク質発現誘導後の菌体破砕液に、抗マビンリン II 血清と交差反応を示す分子量約 15,000 のタンパク質の発現を確認した（図 III-7）。

つぎに、Chelating Sepharose カラムを用いて、組換えマビンリン II を単離した。組換えマビンリン II は培養液 1 l あたり 0.5 mg 得られた。得られた組換えマビンリン II の純度を逆相 HPLC により検定したところ、精製組換えマビンリン II は単一のピークを示した（図 III-8）。これにより、精製組換えマビンリン II の純度が高いことを確認した。さらに、組換えマビンリン II のアミノ酸配列分析を行ったところ、N 末端から 30 残基目までのアミノ酸配列は、予想される組換えマビンリン II のそれと一致した。また、組換えマビンリン II の甘味活性を測定したところ、活性を認めた。

つぎに、組換えマビンリンⅡのCDスペクトルを測定した。図Ⅲ-9に示すように、組換えマビンリンⅡの220 nmから240 nm周辺のスペクトルは、天然マビンリンⅡの α -ヘリックス構造に由来するスペクトルに近似している。このことは、組換えマビンリンⅡが天然マビンリンⅡと近似な α -ヘリックス構造を形成していることを示唆している。組換えマビンリンⅡの190 nmから210 nm周辺のスペクトルは、天然マビンリンⅡのそれと異なっているが、これは天然マビンリンⅡに存在しないヒスチジンタグおよびリンカーに由来するもの、あるいは一部の変性した組換えマビンリンⅡが存在することによるランダムコイルに由来するものと考えられる。

今回確立した系では、甘味活性を有する組換えマビンリンⅡを得ることに成功した。組換えマビンリンⅡは天然マビンリンⅡに存在しないヒスチジンタグおよびリンカーを有する。このことから、これらの部分はマビンリンⅡの甘味活性発現に直接影響を与えないことがわかった。



図Ⅲ-5 組換えマビンリンⅡ発現プラスミド pMAB-2 の構築

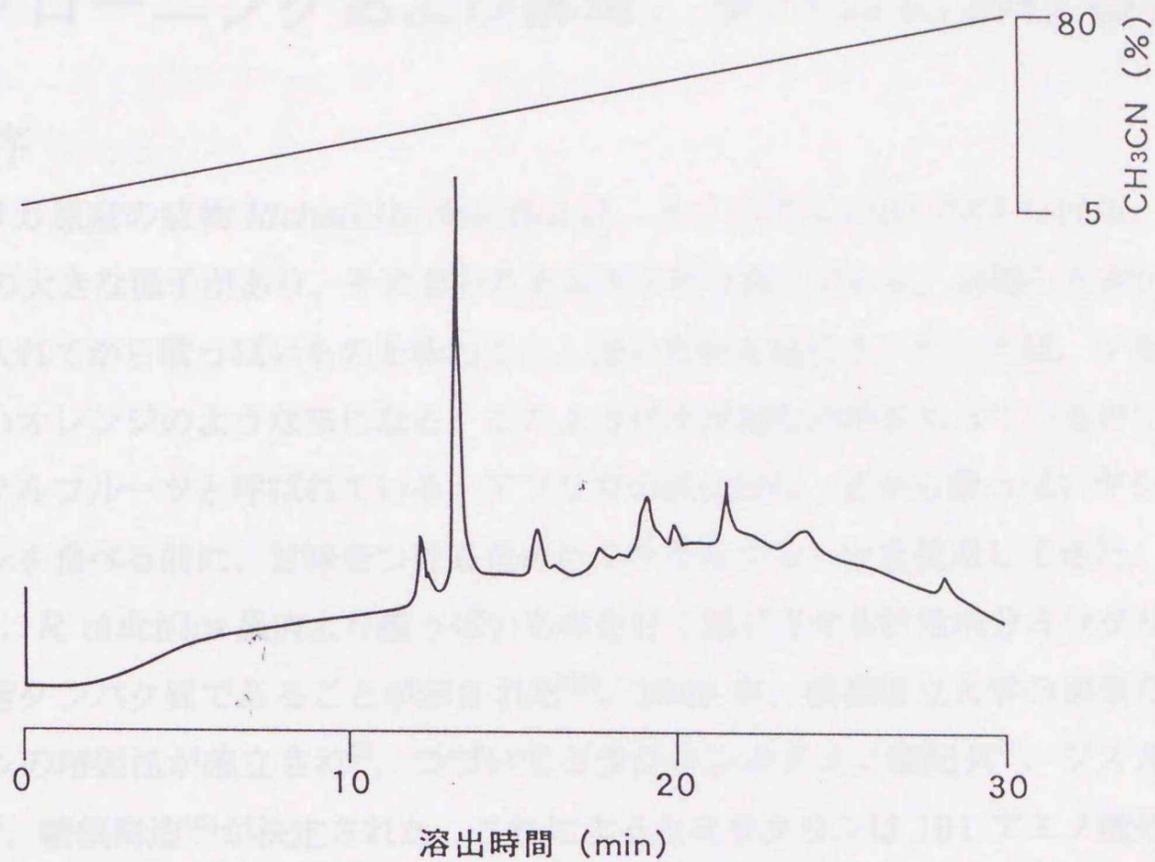


図 III-8 逆相 HPLC による組換えマビンリン II の純度検定

カラム: Vydac 218TP54 (4.6 mm×250mm)、溶離液: A; 5% CH₃CN (0.05% TFAを含む), B; 80% CH₃CN (0.05% TFAを含む), A→B (30分、直線濃度勾配)、流速: 1 ml/min、検出: 210 nm の紫外吸光測定。

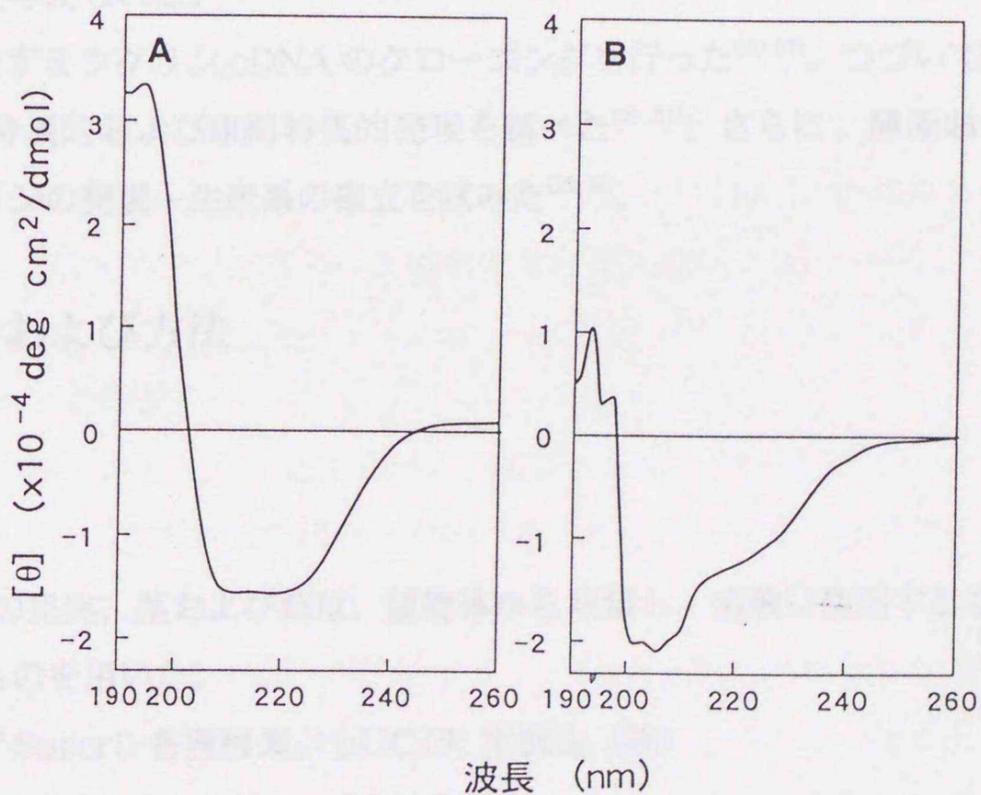


図 III-9 組換えマビンリン II の CD スペクトル
A; 天然マビンリン II、B; 組換えマビンリン II。

第IV章 甘味誘導タンパク質ミラクリンの cDNA クローニングおよび酵母、タバコにおける発現

IV-1. 序

西アフリカ原産の植物 *Richadella dulcifica* は、オリーブ大の赤い実をつける。実の中には1個の大きな種子があり、そのまわりを果肉が取り囲んでいる。成熟した赤い実の果肉を口に入れてから酸っぱいものを味わうと、強い甘味を感じる。たとえば、レモンを味わうと甘いオレンジのような味になる。このように不思議な作用をもっているため、この実はミラクルフルーツと呼ばれている。アフリカの原住民は、昔から酸っぱいヤシ酒や発酵したパンを食べる前に、甘味をつけるためにミラクルフルーツを使用してきた。

1968年、*R. dulcifica* 果肉より酸っぱいものを甘く感じさせる活性成分ミラクリンが抽出され、糖タンパク質であることが示された⁽⁶³⁾。1988年、横浜国立大学の栗原らによりミラクリンの精製法が確立され⁽⁶⁾、つづいてミラクリンのアミノ酸配列⁽⁷⁾、ジスルフィド結合位置⁽⁸⁾、糖鎖構造⁽¹²⁾が決定された。これによるとミラクリンは191アミノ酸残基のポリペプチド鎖が、分子間ジスルフィド結合により二量体を形成し、糖鎖が2箇所のアスパラギン残基に結合していることがわかった。一方、ミラクリンの活性部位に関する研究はこれまでに例がなく、いまだどの部位が活性中心であるのか全く不明である。今後、ミラクリンの構造と活性に関する研究を進めるためには、ミラクリンの遺伝子レベルでの研究が必要であると考えられる。

本章では、まずミラクリン cDNA のクローニングを行った⁽²⁰⁻²²⁾。つづいて、ミラクリン mRNA の時期特異的および組織特異的発現を調べた^(20, 21)。さらに、酵母およびタバコを用いてミラクリンの発現・生産系の確立を試みた^(23, 24)。

IV-2. 材料および方法

IV-2-1. 材料

A) 材料

R. dulcifica の果実、茎および葉は、植物体から収集し、実験に使用するまで -80℃ 以下で保存したものを用いた。

Oligotex-dT Super、各種酵素、pUC19; 宝酒造 (株)

cDNA synthesis kit; Boehringer-Mannheim

Complete rapid cloning system, Hybond N, rediprime DNA labelling system,

peroxidase 標識抗ウサギ Ig G 血清、ECL 試薬; Amersham

DNA 合成; グライナージャパン (株)

pYPR3831、pYE RNAP-Rh; 東京大学農学部応用生命工学科の高木正道教授より恵与

pBI121; 東洋紡績 (株)

抗ミラクリン血清; Nakajo らの方法⁽¹⁰⁾により調製したもの

RX フィルム; 富士写真フィルム (株)

その他の試薬は、すべて特級、生化学用または遺伝子工学用を使用した。

B) 実験装置

PCR 装置; DNA Thermal Cycler PJ2000、Perkin Elmer

C) 培地組成

LB 培地; 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl

YPD 培地; 2% polypeptone, 1% yeast extract, 2% glucose

SD 培地; 0.17% yeast nitrogen base, 2% glucose, 0.5% (NH₄)₂SO₄

Murashige-Skoog (MS) 培地; MS solts, MS vitamins, 3% sucrose

IV-2-2. cDNA ライブラリーの作製

R. dulcifica の果肉から phenol-SDS 法⁽⁴⁴⁾により全 RNA を抽出した。この RNA から Oligotex-dT Super により poly (A)⁺ RNA を精製した⁽⁴⁵⁾。この poly (A)⁺ RNA を鋳型に cDNA synthesis kit により二本鎖 cDNA を合成した⁽⁴⁶⁾。得られた二本鎖 cDNA は Complete rapid cloning system によりファージベクター λgt 10 に挿入したのち、バクテリオファージにパッケージングし、大腸菌中で増殖させた。

IV-2-3. プローブの作製

R. dulcifica の果肉から抽出した全 RNA を鋳型として、RT-PCR 法により cDNA ライブラリーをスクリーニングするためのプローブを作成した。まず、以下に示す 2 種類のオリゴヌクレオチド I および II を合成した。オリゴヌクレオチド I には、制限酵素 *EcoR* I サイト、成熟ミラクリン 69 番目～75 番目を、オリゴヌクレオチド II には、成熟ミラクリン 182 番目～188 番目、制限酵素 *EcoR* I サイトをコードした。これらのオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、RT-PCR を行った。PCR は、96℃、7 分間につづいて、96℃、1 分間、55℃、1 分間、72℃、1 分間を 30 回繰り返したのち、72℃、10 分

間行った。つぎに、得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により分離した。つづいて、これを切り出して精製したのち、T4 DNA polymerase を用いて平滑末端とした。さらに、これをプラスミドベクター pUC19 の *Sma*I サイトに挿入し、pMIRPCR 1 を作成した。Sanger らの方法⁽⁴⁷⁾により pMIRPCR 1 の塩基配列を分析した。

オリゴヌクレオチド I

5'-AA GAATTC GARAAAYCCIAARGARGAYGT-3'
*Eco*R I 成熟ミラクリン 69 番目～75 番目

オリゴヌクレオチド II

5'-AA GAATTC GTYTTTRTTRAAYTCRAAIGC-3'
*Eco*R I 成熟ミラクリン 182 番目～188 番目

(R = A or G, Y = C or T, I = inosine)

IV-2-4. cDNA クローンの単離

組換えプラークをナイロンフィルター Hybond N に転写した。紫外線照射によりフィルターに DNA を固定したのち、緩衝液 (90 mM Na₃ citrate, 0.9 M NaCl, 0.2% Ficoll 400, 0.2% polyvinylpyrrolidone, 0.2% BSA, 0.5% SDS, 100 μg/ml salmon sperm DNA (pH 7.6)) で 60℃ で 20 分間プレハイブリダイズした。つぎに、このフィルターを、*rediprime* DNA labelling system を用いて³²P 標識したプローブを含む緩衝液で 60℃、20 時間ハイブリダイズした。このフィルターを 0.1% SDS を含む SSC 緩衝液 (0.15 M NaCl, 15 mM Na₃ citrate (pH 7.6)) で洗浄した。洗浄したフィルターは RX フィルムに -80℃ で露光し、プローブとハイブリダイズするクローンを選択した。

陽性クローン *MIR* を単離し、ついで制限酵素 *Eco*R I で処理後、プラスミドベクター pUC 19 にクローニングした。これを用いて Sanger らの方法⁽⁴⁷⁾によりミラクリン cDNA の塩基配列を決定した。

IV-2-5. ノーザンプロットハイブリダイゼーション⁽⁵⁴⁾

R. dulcifica の受粉後各週における果実および各組織 (果肉、種子、茎、葉) から phenol - SDS 法⁽⁴⁴⁾により全 RNA を抽出した。それぞれ 20 μg の全 RNA を変性させたのち、ホルムアルデヒドを含むアガロースゲルを用いて電気泳動した。泳動終了後、全 RNA をナイロンフィルター Hybond N に転写した。紫外線照射によりフィルターに

RNAを固定したのち、緩衝液 (0.1 M NaH₂PO₄, 1.5 M NaCl, 10 mM EDTA, 0.1% formamide, 0.2% Ficoll 400, 0.2% polyvinylpyrrolidone, 0.2% BSA, 1% SDS, 500 μg/ml salmon sperm DNA (pH 7.4)) により 42°C で 2 時間プレハイブリダイズした。つぎに、このフィルターを、rediprime DNA labelling system を用いて³²P 標識した MIR を含む緩衝液により 42°C、16 時間ハイブリダイズした。このフィルターを 0.1% SDS を含む SSPE 緩衝液 (0.15 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄ (pH 7.4)) で洗浄した。洗浄したフィルターは RX フィルムに -80°C で露光した。

IV-2-6. 発現プラスミドの構築

A) PCR 法による制限酵素サイトの導入

酵母用発現プラスミド pYPR3831、pYE RNAP-Rh およびタバコ用発現プラスミド pBI121 にミラクリン遺伝子を挿入するために、PCR 法により各種制限酵素サイトをミラクリン遺伝子に導入した。まず、以下に示す 3 種類のオリゴヌクレオチド I、II および III を合成した。オリゴヌクレオチド I には、制限酵素 *Xba*I および *Eco*R I サイト、ミラクリン前駆体 N 末端を、オリゴヌクレオチド II には、制限酵素 *Bam*HI および *Eco*R I サイト、メチオニン、成熟ミラクリン N 末端を、オリゴヌクレオチド III には、成熟ミラクリン C 末端、終止コドン、制限酵素 *Sac*I および *Eco*R I サイトをコードした。MIR を鋳型として、オリゴヌクレオチド I および III (ミラクリン前駆体をコードする遺伝子を増幅)、オリゴヌクレオチド II および III (成熟ミラクリンのみをコードする遺伝子を増幅) の組み合わせにより PCR を行った。PCR は、96°C、7 分間につづいて、96°C、1 分間、53°C、1 分間、72°C、1 分間を 30 回繰り返したのち、72°C、10 分間行った。つぎに、得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により分離し、これらを切り出して精製したのち、T4 DNA polymerase を用いて平滑末端とした。さらに、これらをプラスミドベクター pUC19 の *Sma*I サイトに挿入し、それぞれ pMIR-p、pMIR-m を作成した。Sanger らの方法⁽⁴⁷⁾により pMIR-p、pMIR-m の塩基配列を分析した。

オリゴヌクレオチド I

5' -A TATAGAATTC A ATGAAGGAATTAACAATGCT-3'

*Xba*I, *Eco*R I ミラクリン前駆体 N 末端

オリゴヌクレオチド II

5'-A GGATCC GAATTC ATG GATTCGGCACCCAATCCG-3'
BamHI EcoRI M 成熟ミラクリン N 末端

(M = メチオニン)

オリゴヌクレオチド III

5'-G GAATTC GAGCTC CAA TTA GAAGTATACGGTTTT-3'
EcoRI SacI 終止 成熟ミラクリン C 末端

B) 酵母用組換えミラクリン発現プラスミドの構築

pMIR-p を制限酵素 *EcoR* I および *Sal* I により消化し、ミラクリン前駆体をコードする DNA 断片を切り出した。これを pYPR3831 に挿入し、発現プラスミド pYMI-1 を構築した。つぎに、pMIR-m を制限酵素 *EcoR* I により消化し、成熟ミラクリンのみをコードする DNA 断片を切り出した。これを pYE RNAP-Rh に挿入し、発現プラスミド pYMI-4 を構築した。さらに、pMIR-m を制限酵素 *Bam*HI により消化し、成熟ミラクリンのみをコードする DNA 断片を切り出した。これを pYE RNAP-Rh のもつ分泌シグナル遺伝子の下流に挿入し、発現プラスミド pYMI-5 を構築した。

C) タバコ用組換えミラクリン発現プラスミドの構築

pMIR-p を制限酵素 *Xba*I および *Sac* I により消化し、ミラクリン前駆体をコードする DNA 断片を切り出した。これを pBI121 に挿入し、発現プラスミド pBMI を構築した。

IV-2-7. 酵母での組換えミラクリンの発現

A) 発現プラスミドによる酵母の形質転換⁽⁵⁵⁾

組換えミラクリンの発現実験には酵母 EHI3-15 株を用いた。まず、酵母を YPD 液体培地中で 30℃ で振とうし、600 nm の吸光度が 1.0 ~ 2.0 になるまで培養した。得られた培養液 10 ml を、3,000 ×g、4 分間遠心し菌体を集めた。得られた菌体に緩衝液 (0.1 M CH₃COOLi, 1 mM EDTA を含む 10 mM Tris/HCl (pH 8.0)) 5 ml を加え懸濁し、再度遠心して菌体を集めた。得られた菌体に緩衝液 300 μl を加え懸濁し、30℃ で 60 分間振とうした。この菌体懸濁液 100 μl に、salmon sperm DNA 40 μg、発現プラスミド 1 μg を加え、30℃ で 30 分間保温したのち、これに 35% polyethyleneglycol 4000, 0.1 M CH₃COOLi, 1 mM EDTA を含む 10 mM Tris/HCl (pH 7.6) 700 μl を加え、30

℃で50分間保温した。つづいて、42℃で5分間熱処理をし、集菌後、これをSD寒天培地で30℃で培養し、形質転換菌を得た。

B) 組換えミラクリンの発現

形質転換菌をSD液体培地に植菌し、30℃で培養を行った。pYMI-1を用いた場合は、さらにgalactoseによりタンパク質の発現を誘導した。得られた培養液を、3,000 × g、4℃で15分間遠心し、培養液上清および菌体を得た。

C) 菌体の破碎

得られた菌体(培養液1.5 ml)を0.5 mlの0.2 M NaOH, 1% 2-mercaptoethanolに懸濁し、氷中で10分間混和した。これに、 CCl_3COOH を終濃度10%になるように加え、氷中に10分間置いたのち、10,000 × g、5分間遠心し沈殿を得た。これをacetoneで2回洗浄したのち、SDS-PAGE用Laemmli's sample 緩衝液⁽⁴⁸⁾を加え、5分間煮沸した。

D) SDS-PAGE および抗ミラクリン血清を用いたイムノブロッティング

Ⅲ-2-6-Dと同様に行った。抗ミラクリン血清は1000倍希釈で用いた。

E) 酵母からの全RNAの抽出

酵母からSchmittらの方法⁽⁵⁶⁾により全RNAを抽出した。

F) 組換えミラクリンの甘味誘導活性の測定

得られた菌体10 gに対して200 mlの1 M sorbitol, 10 mM 2-mercaptoethanol, 10 mM EDTAを加え懸濁し、2.5 mgのzymolyase 100Tを加え、30℃で1時間振とうした。つづいて、1,400 × g、3分間遠心し、スフェロプラストを集めたのち、これに0.1% triton X-100を含む20 mM Tris/HCl (pH 8.0)を加えてホモジナイズした。つづいて、1,000 × g、5分間遠心し破碎断片を除いたのち、17,000 × g、30分間遠心し上清を得た。これを70%飽和度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ で塩析したのち、18,000 × g、60分間遠心し沈殿を得た。この沈殿を10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 6.8)に溶解し粗精製タンパク質溶液とした。これを口に含み、3分間味わったのち、0.1 M citric acidを口に含み甘味誘導活性を測定した。

IV-2-8. タバコでの組換えミラクリンの発現

A) アグロバクテリウムへの発現プラスミド pBMI の導入

アグロバクテリウムを LB 液体培地中で 28°C で振とうし、600 nm の吸光度が 0.5 ~ 1.0 になるまで培養した。得られた培養液 50 ml を、3,000 ×g、4°C で 5 分間遠心し菌体を集めた。得られた菌体に 1 ml の 20 mM CaCl₂ を加え懸濁した。この菌体懸濁液 100 μl に 1 μg の pBMI を加え、液体窒素によりこれを凍結した。つづいて、37°C で 5 分間保温したのち、これに、LB 液体培地 1 ml を加え、28°C で 2 時間培養した。さらに、5,000 ×g、5 分間遠心し菌体を集め、これを 25 μg/ml の kanamycin を含む LB 寒天培地で 28°C で培養し、pBMI が導入された菌を得た。

B) タバコへのアグロバクテリウムの感染およびトランスジェニックタバコの選択

pBMI が導入されたアグロバクテリウムを 25 μg/ml の kanamycin を含む LB 液体培地 50 ml に植菌し、28°C で一晩振とう培養を行った。タバコの成熟葉を 1 cm 角に無菌ナイフで切り、アグロバクテリウム培養液に浸し、0.5 μg/ml 6-benzylaminopurine, 0.05 μg/ml 1-naphthaleneacetic acid, 100 μg/ml kanamycin, 500 μg/ml carbeniciline を含む MS 寒天培地の上に葉の表側を下にして置いた。2 ~ 3 週間後、生じたカルスを前述の培地に植え継ぎ、さらにカルスより茎葉が分化するまで培養した。つづいて、生じた茎葉を 100 μg/ml kanamycin, 500 μg/ml carbeniciline を含む MS 寒天培地に植え継ぎ、発根させた。約 1 カ月後、成長した植物体を土に移し育成した。

C) SDS-PAGE および抗ミラクリン血清を用いたイムノブロッティング

植物体を破碎し、SDS-PAGE 用 Laemmli's sample 緩衝液⁽⁴⁸⁾を加え、5 分間煮沸した。つづいて、遠心分離により破碎断片を除き上清を得た。SDS-PAGE および抗ミラクリン血清を用いたイムノブロッティングは、IV-2-7-D と同様に行った。

D) トランスジェニックタバコ遺伝子 DNA の抽出

葉 0.25 g を液体窒素中で破碎し、パウダー粉末とした。これに、750 μl の 50 mM EDTA, 0.5 M NaCl, 1 mM 2-mercaptoethanol を含む 0.1 M Tris/HCl (pH 8.0) を加え攪拌したのち、50 μl の 20% SDS を加えさらに攪拌した。つづいて、65°C で 10 分間保温したのち、5 ml の 5 M CH₃COOK を加え攪拌した。つぎに、20 分間氷冷したのち、25,000 ×g、4°C で 20 分間遠心し、得られた上清に 500 μl の isopropanol を加え -20°C で 30 分間保温した。さらに、25,000 ×g、4°C で 15 分間遠心し、得られた沈殿に 100 μl の 1 mM EDTA を含む 10 mM Tris/HCl (pH 8.0) を加え、遺伝子 DNA 溶液と

した。

E) ミラクリン遺伝子の検出

トランスジェニックタバコ遺伝子 DNA を鋳型に、IV-2-6-A と同様な方法で PCR を行い、得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により分析した。

IV-3. 結果および考察

IV-3-1. ミラクリン cDNA クローンの単離および解析

まず、*R. dulcifica* の果肉から poly (A)⁺ RNA を精製し、これより二本鎖 cDNA を合成し、これをファージベクター λ gt 10 に挿入して cDNA ライブラリーを作製した。

つぎに、RT-PCR 法により cDNA ライブラリーをスクリーニングするためのプローブを作製した。プライマーは、ミラクリンのアミノ酸配列⁽⁷⁾ 69 番目～75 番目 および 182 番目～188 番目 (図 IV-1) をもとに設計した。これを用いて RT-PCR を行い、PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により分離したところ、増幅された DNA は、約 550 bp の単一バンドを示した。つぎに、これをプラスミドベクター pUC19 に組み込み、pMIRPCR 1 をクローニングした。pMIRPCR 1 の塩基配列を分析し、ミラクリンのアミノ酸配列 69 番目～188 番目をコードしていることを確認した。

つぎに、pMIRPCR 1 よりミラクリンの 69 番目～188 番目をコードする DNA 断片を切り出し、これをプローブとして cDNA ライブラリーをスクリーニングした。約 3.0×10^5 個のプラークから、13 個の陽性クローンを得た。これらのうち、最も長い挿入断片のクローン (MIR) を解析した結果、全長は 801 bp であり、660 bp からなるオープンリーディングフレームを含んでいた (図 IV-2)。これより推定されるアミノ酸配列は、N 末端延長ペプチド 29 残基、成熟ミラクリン 191 残基であった (図 IV-3)。ミラクリン前駆体の疎水性度⁽⁵⁷⁾ を解析した結果 (図 IV-4)、N 末端延長ペプチド部分は多くの疎水性アミノ酸から構成されているので、シグナルペプチドであると推定できる (図 IV-3)。

エドマン分解法により決定されたミラクリンのアミノ酸配列⁽⁷⁾ は 129 番目の残基がセリンであったが、今回決定した cDNA の塩基配列から推定されるアミノ酸配列ではトリプトファンであった (図 IV-2)。これは、ミラクリンの微小不均一性 (microheterogeneity) あるいはアミノ酸配列決定の際のアーティファクトによるものと考えられる。

D S A P N P V L D I D G E K L R T G T N 20
 Y Y I V P V L R D H G G G L T V S A T T 40
 P N G T F V C P P R V V Q T R K E V D H 60
 D R P L A F F P E N P K E D V V R V S T 80
 D L N I N F S A F M P C R W T S S T V S 100
 R L D K Y D E S T G Q Y F V T I G G V K 120
 G N P G P E T I S S W F K I E E F C G S 140
 G F Y K L V F C P T V C G S C K V K C G 160
 D V G I Y I D Q K G R R R L A L S D K P 180
 F A F E F N K T V Y F 191

図 IV-1 ミラクリンのアミノ酸配列⁽⁷⁾

プライマーの設計に用いたアミノ酸配列をアンダーラインで示した。糖鎖付加部位をダブルアンダーラインで示した。

ACAACAATGAAGGAATTAACAATGCTCTCTCTCTCGTTCTTCTTCGTCTCTGCATTGTTG 60
 M K E L T M L S L S F F F V S A L L 18
 シグナルペプチド

GCAGCAGCGGCCAACCCACTGCTTAGTGCAGCGGATTCGGCACCCAATCCGGTTCTTGAC 120
 A A A A N P L L S A A D S A P N P V L D 38
 ↑成熟ミラクリン

ATAGACGGAGAGAACTCCGGACGGGGACCAATTATTACATTGTGCCGGTGCTCCGCGAC 180
 I D G E K L R T G T N Y Y I V P V L R D 58

CATGGCGGGCGGCCTTACAGTATCCGCCACCACCCCAACGGCACCTTCGTTTGTCCACCC 240
 H G G G L T V S A T T P N G T F V C P P 78

AGAGTTGTCCAAACACGAAAGGAGGTCGACCACGATCGCCCCCTCGCTTTTCTTTCCAGAG 300
 R V V Q T R K E V D H D R P L A F F P E 98

AACCCAAAGGAAGACGTTGTTTCGAGTCTCCACCGATCTCAACATCAATTTCTCGGCGTTC 360
 N P K E D V V R V S T D L N I N F S A F 118

ATGCCCTGTCGTTGGACCAGTTCACCGTGTGGCGGCTCGACAAATACGATGAATCCACG 420
 M P C R W T S S T V W R L D K Y D E S T 138

GGCAGTACTTCGTGACCATCGGCGGTGTCAAAGGAAACCCAGGTCCCGAAACCATTAGT 480
 G Q Y F V T I G G V K G N P G P E T I S 158

AGCTGGTTTAAAGATTGAGGAGTTTTGTGGTAGTGGTTTTTACAAGCTTGTTTTCTGTCCC 540
 S W F K I E E F C G S G F Y K L V F C P 178

ACCGTTTGTGGTTCCTGCAAAGTAAAATGCGGAGATGTGGGCATTTACATTGATCAGAAG 600
 T V C G S C K V K C G D V G I Y I D Q K 198

GGAAGAAGGCGTTTGGCTCTCAGCGATAAACCATTCGCATTCGAGTTCAACAAAACCGTA 660
 G R R R L A L S D K P F A F E F N K T V 218

TACTTCTAATTGGGTTTGGGGGTGGTTTTTCCAATCACATCTCATGTATGATCAGCTCCA 720
 Y F * 220

TTATCGATCTGCATAATTATAATTAATAAGGAAGCTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 780

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 801

図 IV-2 ミラクリン cDNA の塩基配列および推定されるアミノ酸配列
 翻訳後プロセッシングを受ける部位を矢印で示した。(*)；終止コドン。



図 IV-3 ミラクリン前駆体の構造

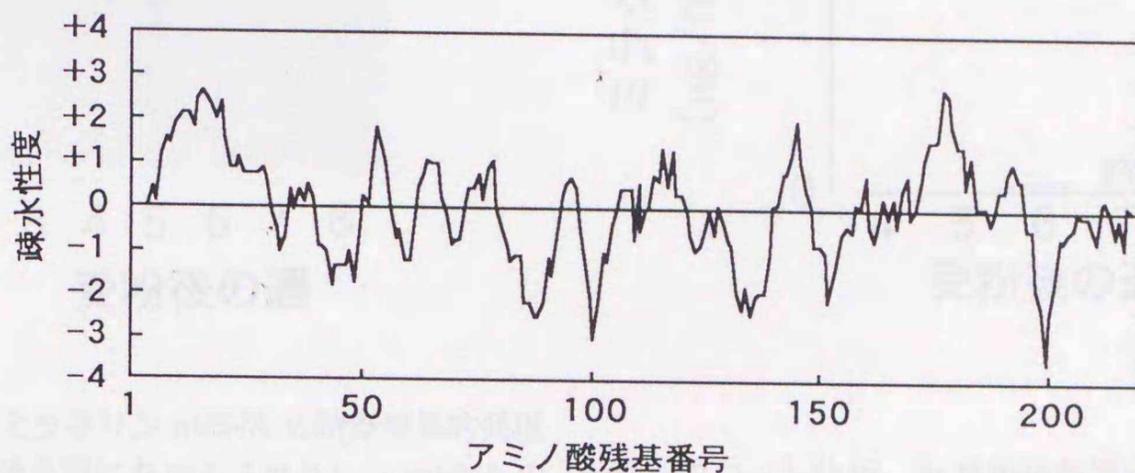


図 IV-4 ミラクリン前駆体の疎水性度

IV-3-2. ミラクリン mRNA の時期特異的および組織特異的発現の解析

ミラクリン mRNA の時期特異的発現を調べるために、MIR をプローブとして、ノーザンブロット分析を行った。その結果、ミラクリン mRNA はすでに 3 週目の実において発現しており、その後 8 週目まではほぼ同程度に発現していた (図 IV-5)。抗ミラクリン血清を用いた実験⁽¹⁰⁾によると、成熟ミラクリンは受粉後 8 週目になってから多量に生合成されていた。しかし、今回ミラクリン mRNA は受粉後少なくとも 8 週目以降には発現していることが明らかとなった。したがって、ミラクリンの mRNA は早期に発現し、3 週目になるとさらにミラクリンの生合成を厳密に制御する機構が働き、成熟ミラクリンが生合成をするものと考えられる。

つぎに、ミラクリン mRNA の組織特異的発現を調べた。その結果、ミラクリン mRNA は果肉のみに発現しており、他の組織 (種子、茎および葉) では発現していないことがわかった (図 IV-6)。

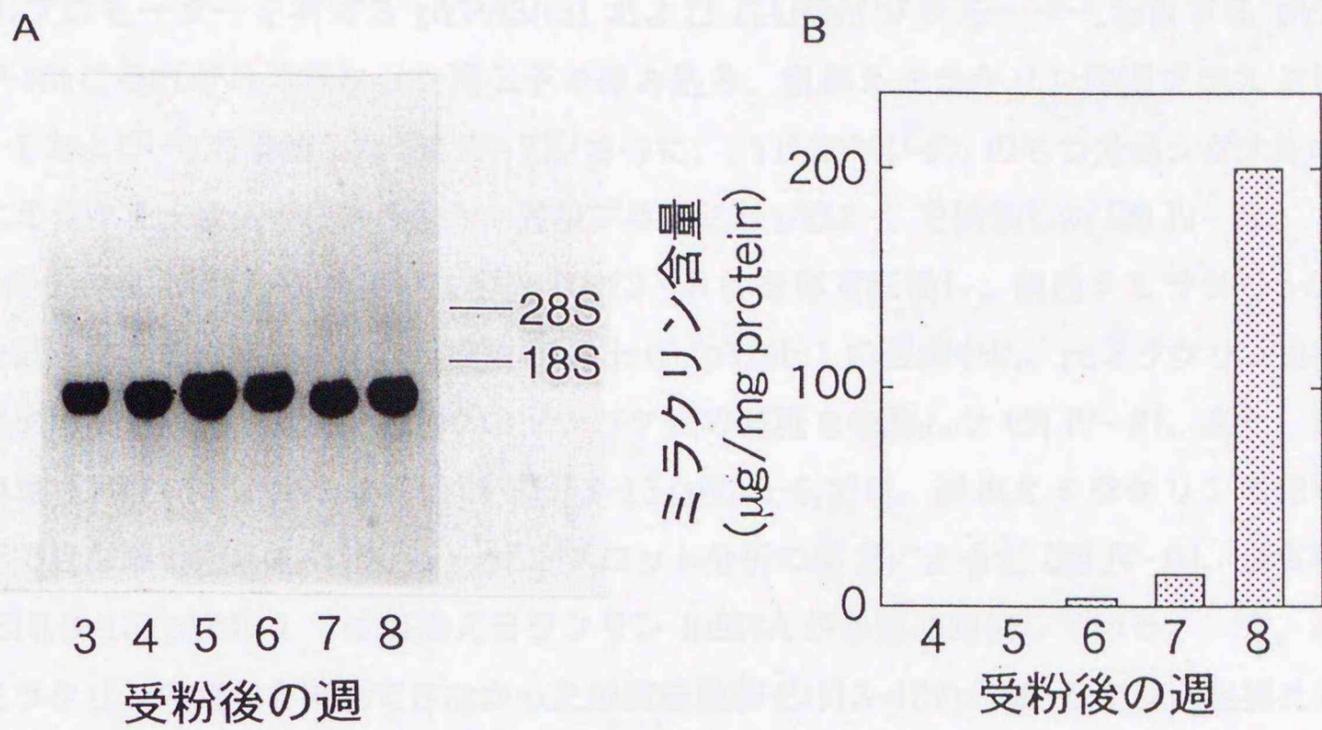


図 IV-5 ミラクリン mRNA の時期特異的発現

A; 受粉後各週におけるミラクリン mRNA のノーザンプロット分析、B; 受粉後各週における成熟ミラクリンの生合成量⁽¹⁰⁾。

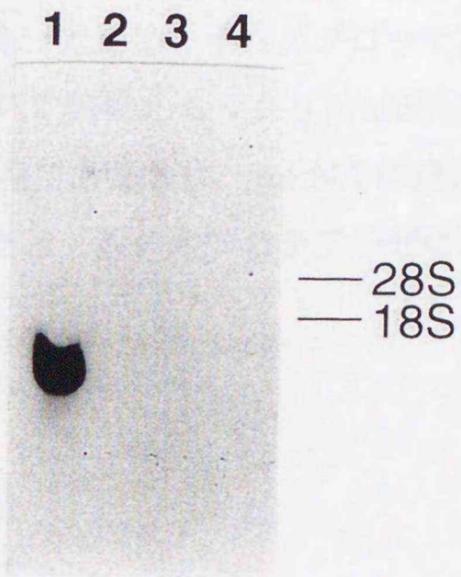


図 IV-6 ミラクリン mRNA の組織特異的発現 (ノーザンプロット分析)

レーン 1; 果肉、レーン 2; 種子、レーン 3; 茎、レーン 4; 葉。

IV-3-3. 組換えミラクリンの酵母における発現

GAL プロモーターを有する pYPR3831 および *GAPDH* プロモーターを有する pYERNAp-Rh にそれぞれミラクリン遺伝子を組み込み、組換えミラクリン発現プラスミド pYMI-1 および -4 を構築した (図 IV-7)。さらに、pYERNAp-Rh のもつ分泌シグナルの下流にミラクリン遺伝子を組み込み、発現プラスミド pYMI-5 を構築した (図 IV-7)。

pYMI-1、-4 および -5 を用いて酵母 EH13-15 株を形質転換し、組換えミラクリンの発現を試みた。その結果、形質転換菌 EH13-15/pYMI-1 の菌体中に、抗ミラクリン血清と交差反応を示す分子量約 27,000 のタンパク質の発現を確認した (図 IV-8)。また、形質転換菌 EH13-15/pYMI-4 および EH13-15/pYMI-5 では、組換えミラクリンの発現を確認できなかった。さらに、ノーザンブロット分析の結果によると (図 IV-9)、形質転換菌 EH13-15/pYMI-1 では組換えミラクリン mRNA が多量に発現している。一方、組換えミラクリンの発現を確認できなかった形質転換菌 EH13-15/pYMI-5 では、組換えミラクリン mRNA が微量に発現していたが、形質転換菌 EH13-15/pYMI-4 では全く発現していなかった (図 IV-9)。

つぎに、組換えミラクリンが得られた形質転換菌 EH13-15/pYMI-1 の全タンパク質を抽出し、粗精製したのち、これの甘味誘導活性を測定した。その結果、粗精製物に甘味誘導活性は認められなかった。

今回構築した *GAL* プロモーターを有する組換えミラクリン発現プラスミド pYMI-1 を用いることにより、酵母において組換えミラクリンを発現することに成功した。しかし、タンパク質の発現量が微量であったため、イムノブロッティングにおいてのみ検出することができた。この場合、菌体内に組換えミラクリン mRNA が安定に存在していることから、タンパク質の発現量が微量であるのは、mRNA の構造あるいはコドンの使用頻度に起因する翻訳効率の低さ、または、菌体内プロテアーゼによるタンパク質の分解が原因である可能性が考えられる。

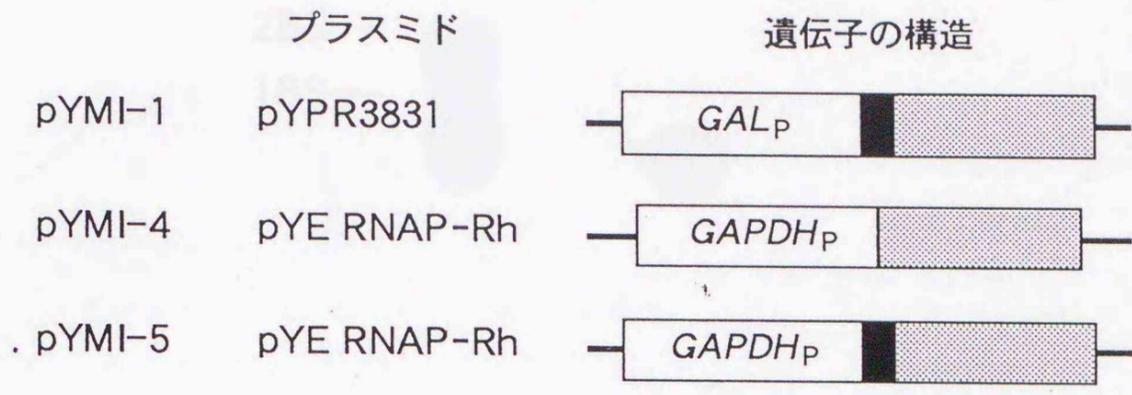


図 IV-7 組換えミラクリン発現プラスミドの構築
; 成熟ミラクリン、; ミラクリンシグナルペプチド、; 分泌シグナル。

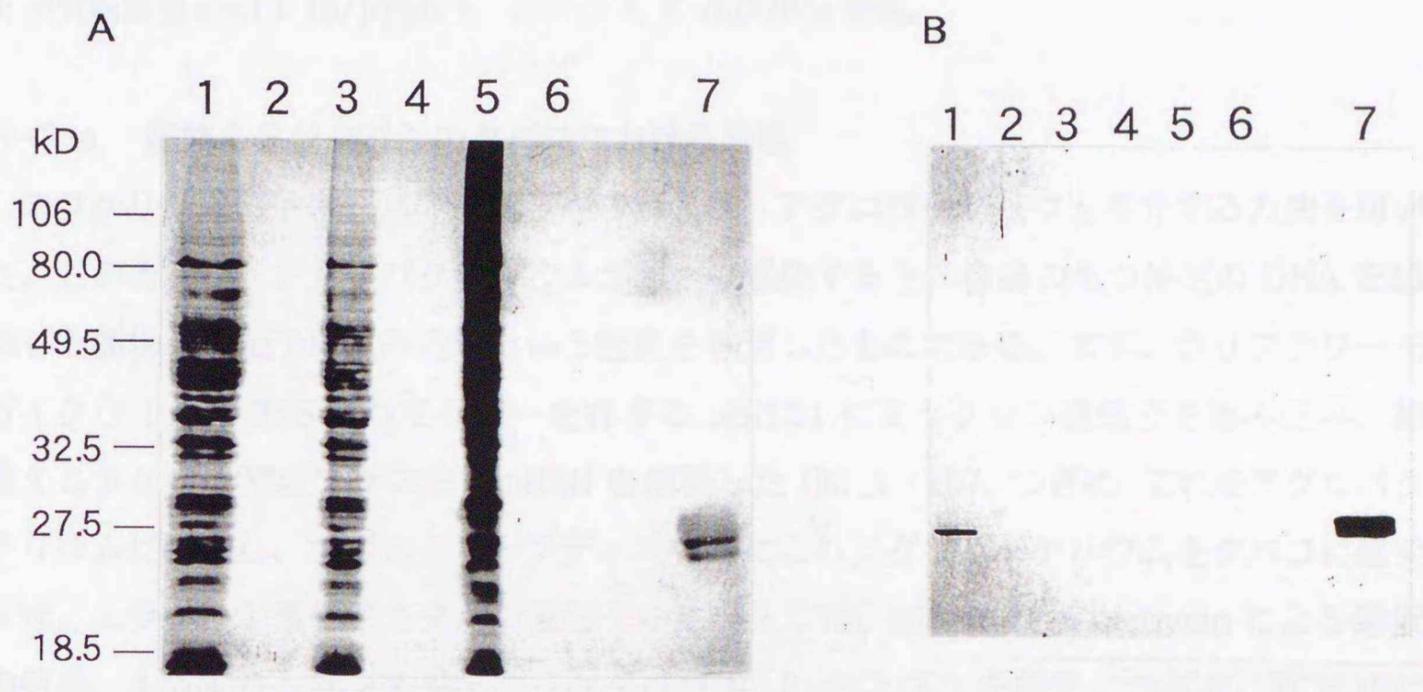


図 IV-8 組換えミラクリンの発現
 A; SDS-PAGE、B; イムノブロットィング。レーン 1; 形質転換菌 EH13-15/pYMI-1 菌体、レーン 2; 形質転換菌 EH13-15/pYMI-1 培養液、レーン 3; 形質転換菌 EH13-15/pYMI-4 菌体、レーン 4; 形質転換菌 EH13-15/pYMI-4 培養液、レーン 5; 形質転換菌 EH13-15/pYMI-5 菌体、レーン 6; 形質転換菌 EH13-15/pYMI-5 培養液、レーン 7; 天然ミラクリン。



図 IV-9 組換えミラクリン mRNA の発現 (ノーザンプロット分析)

レーン 1; 形質転換菌 EH13-15/pYMI-1、レーン 2; 形質転換菌 EH13-15/pYMI-4、レーン 3; 形質転換菌 EH13-15/pYMI-5、レーン 4; *R. dulcifica* 果肉。

IV-3-4. 組換えミラクリンのタバコにおける発現

ミラクリン遺伝子のタバコ遺伝子への導入は、アグロバクテリウムを介する方法を用いた。この方法は、アグロバクテリウムが植物に感染すると、自身のもつ特定の DNA を感染した植物の遺伝子に組み込むという性質を利用したものである。まず、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターを有する pBI121 にミラクリン遺伝子を組み込み、組換えミラクリン発現プラスミド pBMI を構築した (図 IV-10)。つぎに、これをアグロバクテリウムに導入し、つづいてリーフディスク法によりアグロバクテリウムをタバコに感染させ、ミラクリン遺伝子をタバコ遺伝子中に導入した。抗生物質 kanamycin による選択の結果、3 個体のトランスジェニックタバコ 1、2 および 3 を得た。つぎに、PCR 法により、得られたトランスジェニックタバコの遺伝子にミラクリン遺伝子が存在しているかどうかを調べた。その結果、いずれのトランスジェニックタバコにもミラクリン遺伝子が導入されていること確認した。つぎに、トランスジェニックタバコの葉を破碎し、イムノブロッティングにより組換えミラクリンが発現しているかどうかを調べた。その結果、すべてのトランスジェニックタバコ破碎液上清に、抗ミラクリン血清と交差反応を示すタンパク質の発現を確認した (図 IV-11)。発現した組換えミラクリンは、分子量約 27,500 付近に 2 本のバンドとして確認できる。これらは、発現した組換えミラクリンの翻訳後プロセッシングの有無、あるいは糖鎖の付加の有無による違いである可能性が考えられる。

今回構築した系により、タバコにおいて組換えミラクリンを発現することに成功した。しかし、タンパク質の発現量が微量であったため、イムノブロッティングにおいてのみ検出することができた。

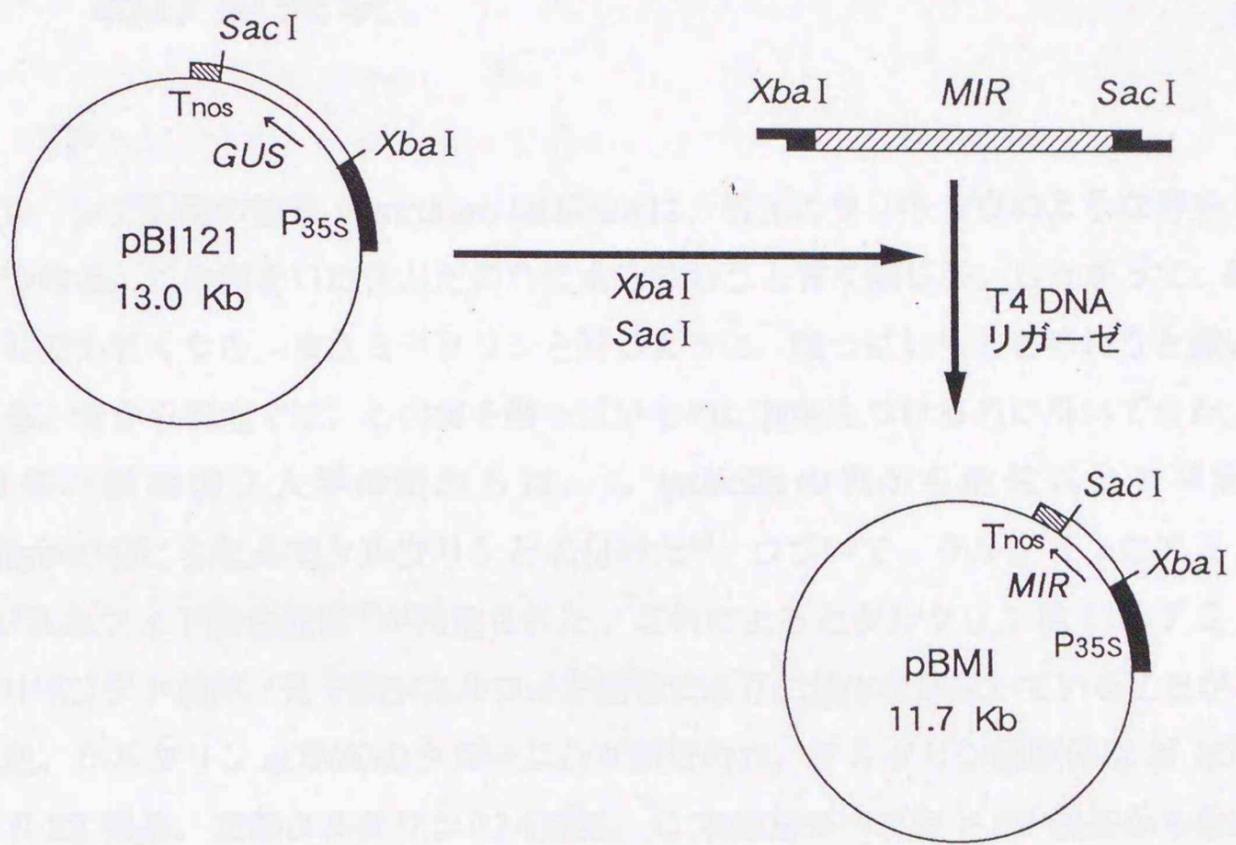


図 IV-10 組換えミラクリン発現プラスミドの構築

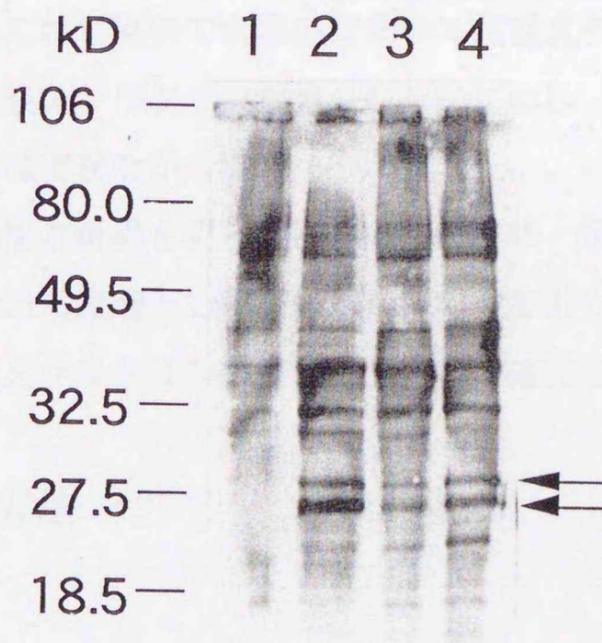


図 IV-11 組換えミラクリンの発現 (イムノプロットイング)

レーン 1; コントロール、レーン 2; トランスジェニックタバコ 1、レーン 3; トランスジェニックタバコ 2、レーン 4; トランスジェニックタバコ 3。発現したタンパク質を矢印で示した。

第V章 甘味誘導タンパク質クルクリンの大腸菌における発現

V-1. 序

西マレーシア原産の植物 *Curculigo latifolia* は、根元にラッキョウのような形をした白い実をつける。この実を口に含んだのちに水を味わうと甘く感じる。したがって、紅茶は砂糖なしでも甘くなる。またミラクリンと同じように、酸っぱいものを味わうと強い甘味を感じる。昔から現地では、この実を酸っぱいものに甘味をつけるのに用いてきた。

1990年、横浜国立大学の栗原らは、*C. latifolia* の実から活性成分を単離し、*Curculigo* の名にちなんでクルクリンと名付けた⁽⁶⁾。つづいて、クルクリンのアミノ酸配列⁽⁶⁾、ジスルフィド結合位置⁽⁹⁾が決定された。これによるとクルクリンは114アミノ酸残基のポリペプチド鎖が、分子間ジスルフィド結合により二量体を形成していることがわかった。また、クルクリン cDNA のクローニングが行われ、クルクリン前駆体はN末端延長ペプチド22残基、成熟クルクリン114残基、C末端延長ペプチド22残基からなることが明らかになった⁽¹³⁾。さらに、大腸菌におけるクルクリンの発現・生産系が検討された。それによると、クルクリン cDNA をプラスミドベクター pUC18 のβ-ガラクトシダーゼ領域にクローニングし、これを用いて大腸菌において組換えクルクリンを発現させた。その結果、封入体として組換えクルクリンが得られた。しかし、これより組換えクルクリンの活性を再生させることはできなかった。

クルクリンの構造と活性の関係を明らかにするためには、アミノ酸置換による活性部位の検索が有効であり、その前段階としてクルクリンの生産系の確立が必要である。本章では、大腸菌を用いて組換えクルクリンの発現・生産系の確立を試みた⁽²⁵⁾。

V-2. 材料および方法

V-2-1. 材料

A) 材料

pCUR09; Abe らにより構築されたもの⁽¹³⁾

各種酵素、pUC18; 宝酒造 (株)

DNA 合成; グライナージャパン (株)

pMAL-p2, Amilose resin; New England Biolabs

pET-32a; Novagen

抗クルクリン血清; Nakajo らの方法⁽¹¹⁾により調製したもの
peroxidase 標識抗ウサギ Ig G 血清、ECL 試薬; Amersham
RX フィルム; 富士写真フィルム (株)
PD-10; Pharmacia LKB Biotechnology
その他の試薬は、すべて特級、生化学用または遺伝子工学用を使用した。

B) 実験装置

PCR 装置; DNA Thermal Cycler PJ2000、Perkin Elmer
アミノ酸配列自動分析計; PPSQ-10 Protein Sequencer、Shimadzu

C) 培地組成

LB 培地; 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl

V-2-2. 発現プラスミドの構築

A) PCR 法による成熟クルクリンのみをコードする遺伝子の増幅

pCUR09 は、プラスミドベクター pUC18 にクルクリン cDNA 全域をクローニングしたプラスミドである。これを鋳型として、PCR 法により成熟クルクリンのみをコードする遺伝子を増幅した。まず、以下に示す 2 種類のオリゴヌクレオチド I および II を合成した。オリゴヌクレオチド I には、制限酵素 *EcoRI* サイト、Factor Xa protease による切断部位、成熟クルクリン N 末端を、オリゴヌクレオチド II には、成熟クルクリン C 末端、終止コドン、制限酵素 *SalI* および *EcoRI* サイトをコードした。これらのオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、PCR を行った。PCR は、96°C、7 分間につづいて、96°C、1 分間、55°C、1 分間、72°C、1 分間を 30 回繰り返したのち、72°C、10 分間行った。つぎに、得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により分離した。つづいて、これを切り出して精製したのち、T4 DNA polymerase を用いて平滑末端とした。さらに、これをプラスミドベクター pUC18 の *SmaI* サイトに挿入し、pCUR-m を作成した。Sanger らの方法⁽⁴⁷⁾により pCUR-m の塩基配列を分析した。

オリゴヌクレオチド I

5' -G GAATTC ATCGAGGGAAGG GACAATGTCCTGCTCTCCG-3'

EcoRI Factor Xa 成熟クルクリン N 末端

オリゴヌクレオチド II

5'-G GAATTC GTCGAC TTA ACCATTAACACGGCGGCAC-3'

*EcoR*I *Sal*I 終止 成熟クルクリン C 末端

B) マルトース結合タンパク質-クルクリン融合タンパク質発現プラスミドの構築

pCUR-m を制限酵素 *Sal*I および *EcoR*I により消化し、成熟クルクリンをコードする DNA 断片を切り出した。これを pMAL-p2 のもつマルトース結合タンパク質遺伝子の下流に挿入し、マルトース結合タンパク質-クルクリン融合タンパク質発現プラスミド pMCU-m を構築した。

C) チオレドキシン-クルクリン融合タンパク質発現プラスミドの構築

pCUR-m を制限酵素 *Sal*I および *EcoR*I により消化し、成熟クルクリンをコードする DNA 断片を切り出した。これを pET-32a のもつチオレドキシン遺伝子の下流に挿入し、チオレドキシン-クルクリン融合タンパク質発現プラスミド pTCU-m を構築した。

V-2-3. 大腸菌での組換えクルクリンの発現

A) 発現プラスミドによる大腸菌の形質転換

マルトース結合タンパク質-クルクリン融合タンパク質の発現実験には大腸菌 BL21 株を、チオレドキシン-クルクリン融合タンパク質の発現実験には大腸菌 AD494 株を用いた。まず、それぞれの大腸菌を LB 液体培地中で 37°C で振とうし、600 nm の吸光度が 0.6 になるまで培養した。得られた培養液 20 ml を、3,000 × g、4°C で 5 分間遠心し菌体を集めた。得られた菌体に低濃度緩衝液 (10 mM RbCl を含む 10 mM MOPS (pH 7.0)) 10 ml を加え、氷中で懸濁した。つづいて、3,000 × g、4°C で 5 分間遠心し菌体を集め、得られた菌体に高濃度緩衝液 (50 mM CaCl₂, 10 mM RbCl を含む 0.1 M MOPS (pH 6.5)) 10 ml を加え、氷中で懸濁し、30 分間水冷した。さらに、3,000 × g、4°C で 5 分間遠心し菌体を集め、高濃度緩衝液 2 ml を加え、氷中で懸濁し、形質転換用 competent cell 溶液とした。この competent cell 溶液 100 μl に発現プラスミド溶液 1 μl を加え、30 分間水冷したのち、42°C で 1 分間熱処理をした。これに、LB 液体培地 1 ml を加え、37°C で 60 分間培養したのち、3,000 × g、3 分間遠心し菌体を集めた。この菌体を 50 mg/ml の ampicillin を含む LB 寒天培地で 37°C で培養し、形質転換菌 BL21/pMCU-m および AD494/pTCU-m をそれぞれ得た。

B) マルトース結合タンパク質-クルクリン融合タンパク質およびチオレドキシン-クルクリン融合タンパク質の発現

形質転換菌を 50 mg/ml の ampicillin を含む LB 液体培地 50 ml に植菌し、37°C で一晩振とう培養を行った。得られた培養液を 50 mg/ml の ampicillin を含む LB 液体培地 1 l に加え、37°C で振とう培養した。この際、形質転換菌 BL21/pMCU-m の場合は、600 nm の吸光度が 0.6 になるまで、形質転換菌 AD494/pTCU-m の場合は、600 nm の吸光度が 1.2 になるまで培養した。これらの培養液に 1 M IPTG を 1 ml (終濃度 1 mM) 加え、37°C で 3 時間振とう培養を行った。また、形質転換菌 AD494/pTCU-m は、これにつづいて 4°C で 2 時間振とう培養を行った。得られた培養液を、3,000 ×g、4°C で 15 分間遠心し菌体を集めた。

C) 菌体の破碎

得られた菌体 1 g に対して 3 ml の 1 mM EDTA, 100 mM NaCl を含む 50 mM Tris/HCl (pH 8.0) を加え懸濁し、これに 4 μl の 100 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、32 μl の 50 mg/ml lysozyme を加え、4°C で 20 分間振とうした。つづいて、4 mg の deoxycholic acid を加え、37°C で 5 分間振とうした。さらに、2 μl の 10 mg/ml deoxyribonuclease I を加え、37°C で 30 分間振とうしたのち、18,000 ×g、4°C で 15 分間遠心し、上清および沈殿に分離した。

D) SDS-PAGE および抗クルクリン血清を用いたイムノブロッティング

菌体破碎液の上清および沈殿を Laemmli's sample 緩衝液⁽⁴⁸⁾中で 3 分間煮沸した。SDS-PAGE および抗クルクリン血清を用いたイムノブロッティングは、III-2-6-D と同様に行った。抗クルクリン血清は 1000 倍希釈で用いた。

E) マルトース結合タンパク質-クルクリン融合タンパク質の精製

緩衝液 (0.2 M NaCl を含む 50 mM Tris/HCl (pH 7.4)) で平衡化した Amilose resin カラムにタンパク質の発現を誘導した形質転換菌 BL21/pMCU-m 破碎液上清を添加した。非吸着成分を緩衝液で洗浄したのち、10 mM maltose を含む緩衝液により吸着成分を溶離した。溶離液の画分は、280 nm の紫外吸光で検出し、ピーク部分を集めた。

F) マルトース結合タンパク質-クルクリン融合タンパク質の Factor Xa protease 消化

10 ml のマルトース結合タンパク質-クルクリン融合タンパク質画分 (280 nm の吸光度

が1.2) に、0.4 ml の 50 mM CaCl₂、9.8 ml の H₂O、30 μg の Factor Xa protease を加え、16°C で 24 時間消化を行った。

G) 組換えクルクリンのアミノ酸配列分析

マルトース結合タンパク質-クルクリン融合タンパク質の Factor Xa protease 消化物を SDS-PAGE により分離したのち、PVDF 膜にウエスタンブロッティングした。PVDF 膜に転写されたクルクリン部分を切り出し、アミノ酸配列自動分析計を用いてアミノ酸配列分析を行った。

H) 脱塩

マルトース結合タンパク質-クルクリン融合タンパク質の Factor Xa protease 消化物を脱塩用カラム PD-10 を用いて脱塩した。

I) 組換えクルクリンの甘味活性および甘味誘導活性の測定

脱塩したマルトース結合タンパク質-クルクリン融合タンパク質の Factor Xa protease 消化物を口に含み、組換えクルクリンの甘味活性を測定した。また、脱塩したマルトース結合タンパク質-クルクリン融合タンパク質の Factor Xa protease 消化物を 3 分間味わったのち、0.1 M citric acid および H₂O を口に含み甘味誘導活性を測定した。

V-3. 結果および考察

V-3-1. マルトース結合タンパク質-クルクリン融合タンパク質の大腸菌における発現

Abe らにより単離されたクルクリン cDNA⁽¹³⁾ (図 V-1) を用いて、大腸菌によるクルクリンの発現・生産系の確立を試みた。ここでは、発現させた組換えクルクリンが可溶性の状態で見られるように、外来タンパク質の発現系として、マルトース結合タンパク質との融合タンパク質の系 (pMAL-p2) を用いた。

まず、クルクリン cDNA (pCUR09) を鋳型として、PCR 法により成熟クルクリンのみをコードする遺伝子を増幅した。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により分離したところ、増幅された DNA は、約 380 bp の単一バンドを示した。つぎに、これをプラスミドベクター pUC18 に組み込み、pCUR-m を作成した。pCUR-m の塩基配列を分析し、クルクリン部分は変化していないことを確認した。つづいて、pCUR-m よりクルクリンをコードする DNA 断片を切り出し、pMAL-p2 のもつマルトース結合タンパク質遺伝子

の下流に挿入した。これにより、マルトース結合タンパク質-クルクリン融合タンパク質発現プラスミド pMCU-m を構築した (図 V-2)。

つぎに、pMCU-m を用いて大腸菌 BL21 株を形質転換し、形質転換菌 BL21/pMCU-m を得た。これを用いてマルトース結合タンパク質-クルクリン融合タンパク質の発現を試みたところ、菌体破碎液の上清に、抗クルクリン血清と交差反応を示す分子量約 60,000 のタンパク質の発現を確認した (図 V-3)。つづいて、Amilose resin カラムを用いて、マルトース結合タンパク質-クルクリン融合タンパク質を単離した。得られたマルトース結合タンパク質-クルクリン融合タンパク質を Factor Xa protease により消化し、融合部分を切断したのち (図 V-4)、クルクリン部分のアミノ酸配列分析を行った。その結果、クルクリン部分の N 末端から 20 残基目までのアミノ酸配列は、天然クルクリンのそれとすべて一致した。さらに、Factor Xa protease 消化物を脱塩したのち、この甘味活性および甘味誘導活性を測定したところ、活性は認められなかった。

今回確立したマルトース結合タンパク質との融合タンパク質の系を用いることにより、はじめて可溶性タンパク質としてクルクリンを得ることに成功した。しかし、これにより得られた組換えクルクリンに、活性は認められなかった。これは、組換えクルクリンの立体構造が、天然クルクリンのそれと異なっていたためと考えられる。

CGCAAAGACAATGGCGGCCAAGTTTCTTCTCACCATTCTTGTCACCTTTGCGGCCGTCGC 60
M A A K F L L T I L V T F A A V A 17
N 末端延長ペプチド

TAGCCTTGGCATGGCCGACAATGTCCTGCTCTCCGGGCAAACCTCTGCATGCCGACCACTC 120
S L G M A D N V L L S G Q T L H A D H S 37
↑ 成熟クルクリン

TCTCCAGGCGGGCGCCTATACCTTAACCATAACAAAACAAGTGCAACCTGGTGAAATACCA 180
L Q A G A Y T L T I Q N K C N L V K Y Q 57

GAACGGGAGGCAGATCTGGGCTAGCAACACTGACAGGCGGGGCTCCGGCTGCCGCCTCAC 240
N G R Q I W A S N T D R R' G S G C R L T 77

ATTGCTGAGTGACGGGAACCTCGTTATCTACGACCACAACAACGACGTGTGGGGGAG 300
L L S D G N L V I Y D H N N N D V W G S 97

CGCCTGCTGGGGGGACAACGGCAAGTATGCTCTTGTTCTTCAGAAGGATGGCAGATTTGT 360
A C W G D N G K Y A L V L Q K D G R F V 117

CATCTATGGCCCGGTTTTGTGGTCCCTTGGCCCTAATGGGTGCCGCCGTGTTAATGGTGG 420
I Y G P V L W S L G P N G C R R V N G G 137
↑

AATCACAGTTGCTAAGGATTCTACTGAACCACAACATGAGGATATTAAGATGGTGATTAA 480
I T V A K D S T E P Q H E D I K M V I N 157
C 末端延長ペプチド

TAATTAATCAAGTGAGAGGATTGTTATGAGAATAATGAGTGGAATGGAAGACCAATCTCA 540
N * 158

TGTCGGTGTGGCCTATCTCCACCTGTTTGCAGTGCCTTTGTTAAAATAACACATTGGGGGA 600
ATAATAAAGTGAACTATATAGATTGGTTCAGCAAATTTTCTGTTTCAGTTTTCCTCTCAC 660
ATGTCAATGTCGATTTTTTGGCCGCGGATCATACTGTGCTTGGTATTCTAATCGATAGAA 720
TTATGGCTCAAATGGAGGCAGGGATTATGAGAGTTTATTTCGCATCTCCGGGTCTTCCAAC 780
TTACGAATTATAACAAGATTCAAGGATGCATCTGAGAGCCAACCTAACGTCTTACATCAA 840
AGGAGCTAGCCGAAGTTTATTCCAGAGCTAGAGGAAGTTCGCTGCCATGGTTGATAGTA 900
CAAGTAGAACGACGCATGTATTGCTTCCAGGAATCACTTCCAGCTTCTCGACACCTCCAG 960
TGGCCTTTTCACCACCGAAAGCACCACCAATTTTCAGCACCATTGGTAGGTATATTTACAT 1020
TAACAATACCACAGTCACTGCCATGGGGTCCAATCCACTTGAAAATAACTTCAGGTCTAC 1080
GAGTGAAAATAGAAGTCTTAAACTTGCGGTACAGAGTTATTTATTTCAATTGCTTCTTT 1140
CAGAGTCTGGAATTTTCATTACGTAAA 1166

図 V-1 クルクリン cDNA の塩基配列および推定されるアミノ酸配列⁽¹³⁾
翻訳後プロセッシングを受ける部位を矢印で示した。(*)；終止コドン。

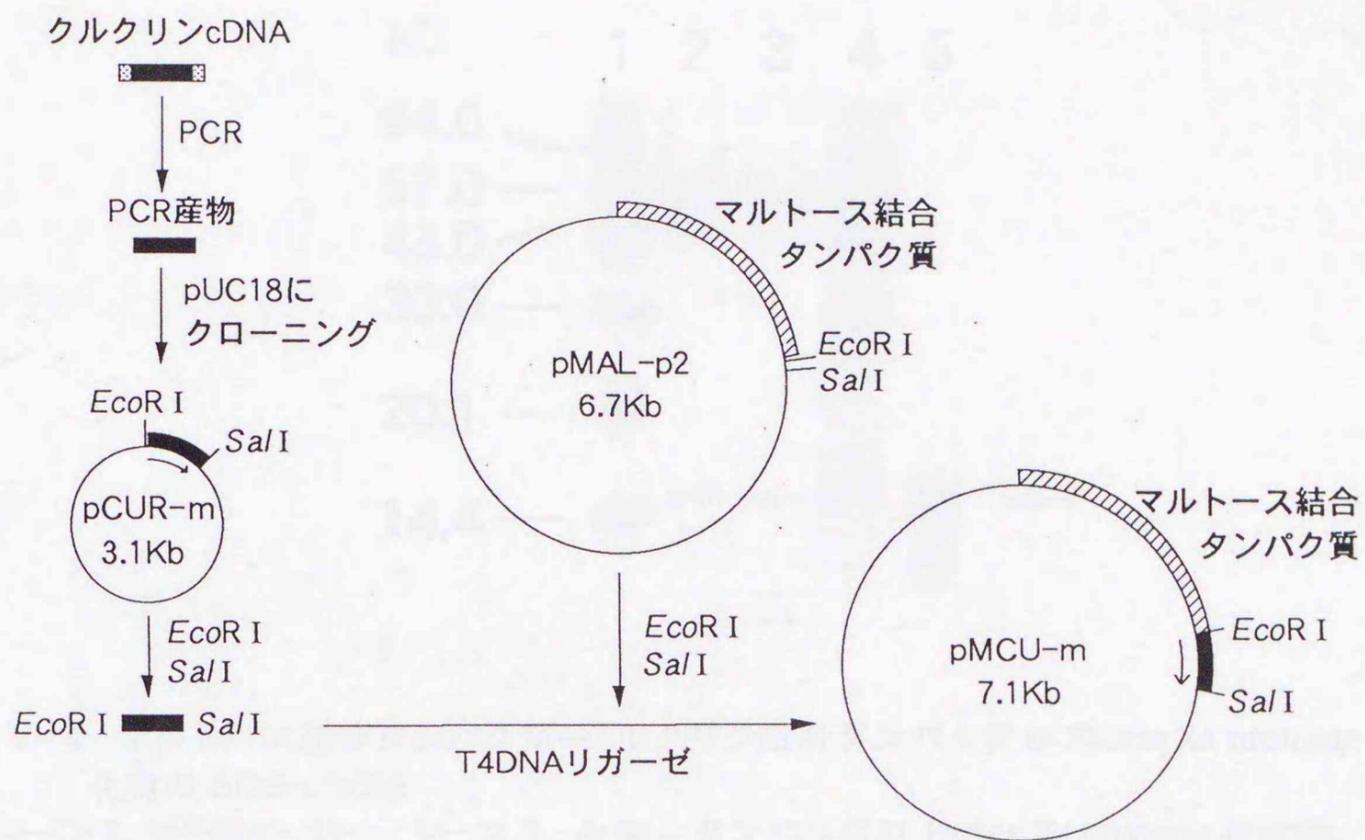


図 V-2 マルトース結合タンパク質-クルクリン融合タンパク質発現プラスミドの構築

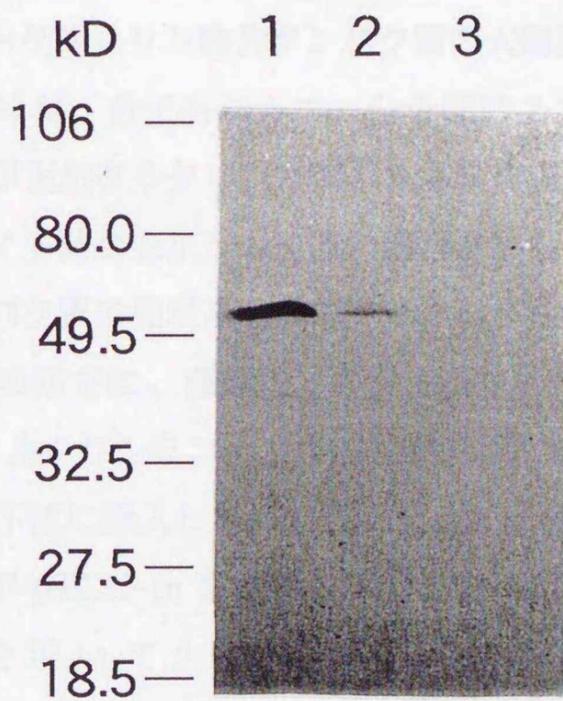


図 V-3 マルトース結合タンパク質-クルクリン融合タンパク質の発現 (イムノブロッティング)

レーン 1, 2; 大腸菌 BL21/pMCU-m 菌体破碎液上清、レーン 3; 大腸菌 BL21/pMCU-m 菌体破碎液沈殿。



図 V-4 マルトース結合タンパク質-クルクリン融合タンパク質の Factor Xa protease 消化物の SDS-PAGE

レーン 1; 分子量マーカー、レーン 2-4; 融合タンパク質の Factor Xa protease 消化物、レーン 5; 天然クルクリン。Factor Xa protease 消化により得られたクルクリン部分を矢印で示した。

V-3-2. チオレドキシソ-クルクリン融合タンパク質の大腸菌における発現

天然クルクリン(二量体)は、分子内に1つ、分子間に2つのジスルフィド結合が存在する。組換えクルクリンが天然クルクリンと同じ立体構造を形成し、活性を発現するためには、これらのジスルフィド結合を正しい位置に結合させることが重要であると考えられる。ここでは、外来タンパク質の発現系として、チオレドキシソとの融合タンパク質の系(pET-32a)を用いた。この系では、菌体内でのジスルフィド結合形成が可能になる。

まず、pCUR-mよりクルクリンをコードする DNA 断片を切り出し、pET-32a のもつチオレドキシソ遺伝子の下流に挿入した。これにより、チオレドキシソ-クルクリン融合タンパク質発現プラスミド pTCU-m を構築した(図 V-5)。

つぎに、pTCU-mを用いて大腸菌 AD494を形質転換し、形質転換菌 AD494/pTCU-mを得た。これを用いてチオレドキシソ-クルクリン融合タンパク質を試みたところ、菌体破碎液の上清および沈殿に、約 1:1 の割合で、分子量約 35,000 のタンパク質の発現を確認した(図 V-6)。また、このタンパク質は抗クルクリン血清と交差反応を示すことから(図 V-6)、目的タンパク質であることを確認した。さらに、還元剤の入っていない菌体破碎液上清では、融合タンパク質の二量体(分子量約 70,000)のバンドが認められた(図 V-6)。

今回確立したチオレドキシンとの融合タンパク質の系では、可溶性タンパク質としてクルクリンを得ることができた。さらに、融合タンパク質の二量体が存在していることから、クルクリン部分の分子間ジスルフィド結合が形成されていると考えられる。このことから、組換えクルクリンが天然クルクリンと同様な立体構造を形成し、活性を有するクルクリンが得られることを期待している。

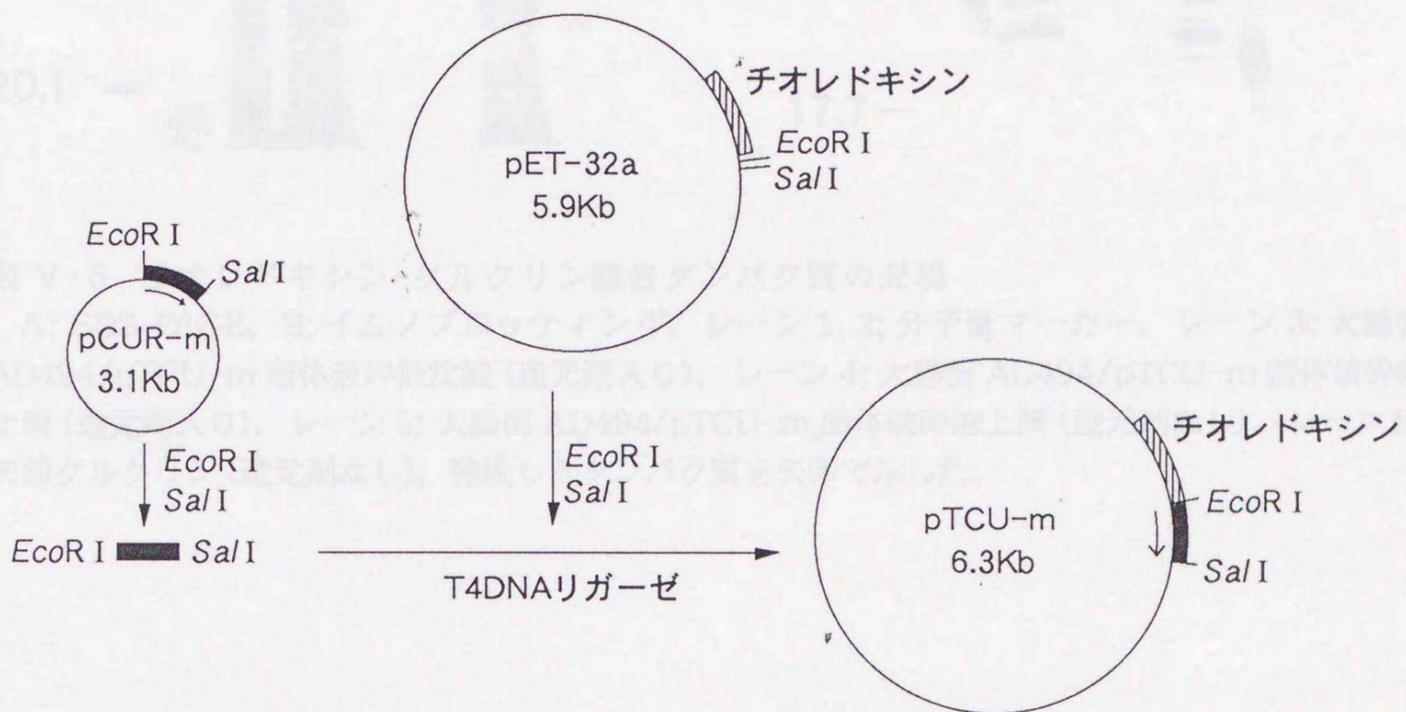


図 V-5 チオレドキシン-クルクリン融合タンパク質発現プラスミドの構築

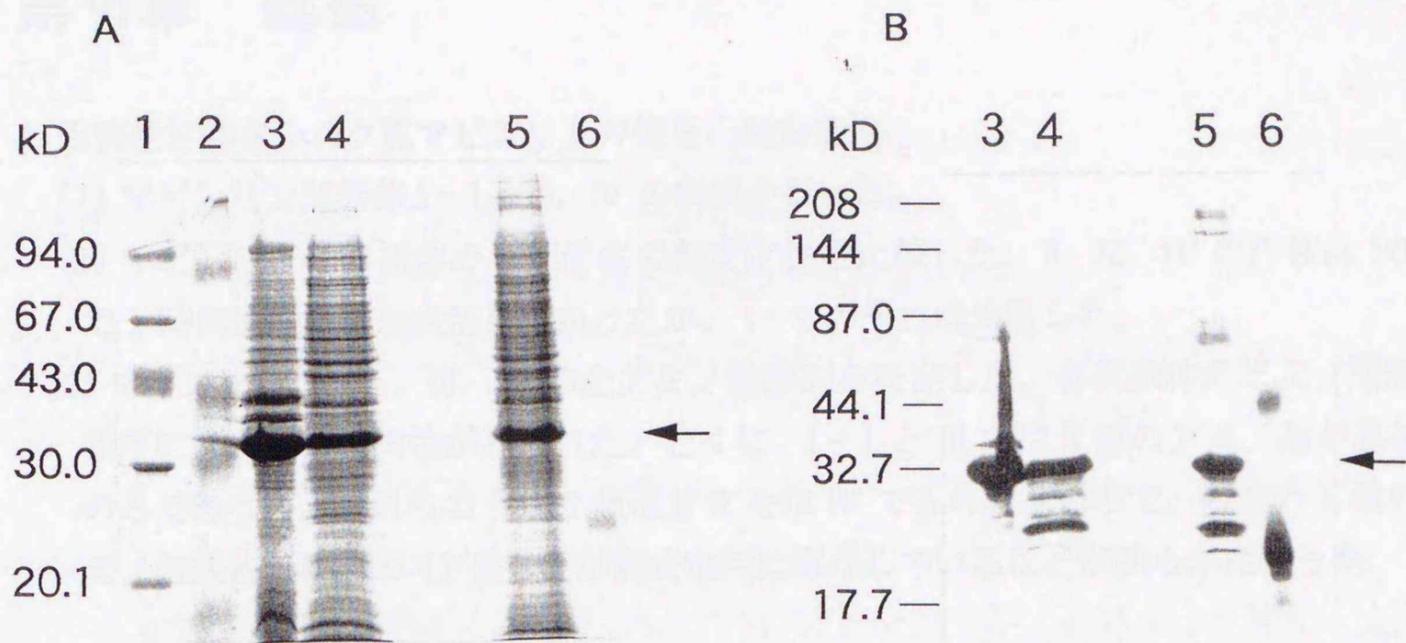


図 V-6 チオレドキシシン-クルクリン融合タンパク質の発現

A; SDS-PAGE、B; イムノプロットティング。レーン 1, 2; 分子量マーカー、レーン 3; 大腸菌 AD494/pTCU-m 菌体破碎液沈殿 (還元剤入り)、レーン 4; 大腸菌 AD494/pTCU-m 菌体破碎液上清 (還元剤入り)、レーン 5; 大腸菌 AD494/pTCU-m 菌体破碎液上清 (還元剤なし)、レーン 6; 天然クルクリン (還元剤なし)。発現したタンパク質を矢印で示した。

第VI章 総括

1. 耐熱性甘味タンパク質マビンリンの構造と熱安定性
 - (1) マビンリン同族体 I-1、III、IV の精製を行った。
 - (2) マビンリンの同族体の甘味活性の熱安定性を比較した。II、III、IV の活性は 80℃ で 1 時間加熱しても失活しなかったが、I-1 のそれは失活した。
 - (3) マビンリン I-1、III、IV の全アミノ酸配列を決定した。各同族体のアミノ酸配列順序には、高い相同性がみられた。とくに、I-1 と III では 3 個のアミノ酸が異なるのみであった。これらのうち 2 個は II または IV でみられないので、残りの 1 個のアミノ酸残基 (B 鎖の 47 番目) が熱安定性に寄与していることが明らかになった。
2. 耐熱性甘味タンパク質マビンリン II の cDNA クローニングおよび大腸菌における発現
 - (1) マビンリン II cDNA のクローニングを行い、マビンリン II 前駆体は N 末端延長ペプチド 35 残基、成熟マビンリン II A 鎖 33 残基、リンカー 14 残基、成熟マビンリン II B 鎖 72 残基および C 末端延長ペプチド 1 残基からなることを明らかにした。
 - (2) 大腸菌において、甘味活性を有する組換えマビンリン II の生産に成功した。
3. 甘味誘導タンパク質ミラクリンの cDNA クローニングおよび酵母、タバコにおける発現
 - (1) ミラクリン cDNA のクローニングを行い、ミラクリン前駆体は N 末端延長ペプチド 29 残基、成熟ミラクリン 191 残基からなることを明らかにした。
 - (2) ミラクリン mRNA の時期および組織特異的発現を調べた。ミラクリン mRNA はすでに 3 週目の実において発現しており、その後 8 週目までほぼ同程度に発現していること、ミラクリン mRNA は果肉のみに発現していることを明らかにした。
 - (3) 酵母・タバコにおいて、組換えミラクリンの生産に成功した。
4. 甘味誘導タンパク質クルクリンの大腸菌における発現
 - (1) 大腸菌において、はじめて可溶性タンパク質として組換えクルクリンの生産に成功した。

今回、甘味タンパク質 (マビンリン) および甘味誘導タンパク質 (ミラクリン、クルクリン) の発現・生産系を確立を試みた。その結果、マビンリンでは甘味活性を有するタンパク質が得られ、また、ミラクリンではタンパク質の発現には成功したが、発現量が微量であった。さらに、クルクリンでは立体構造の問題が残るものの、大量に可溶性タンパク質を得ることに成功した。

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始暖かい御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学薬学部薬剤学講座の栗原堅三教授に心より感謝の意を表します。

本研究は、横浜国立大学教育学部化学教室栗原研究室で行われたものであり、このような機会を与えていただき、ひとかたならぬ御指導くださいました栗原良枝教授に心より感謝いたします。

遺伝子工学に関する詳細な実験の御指導、御助言をいただきました昭和大学薬学部生物化学教室の中谷一泰教授および増田豊博士に厚く御礼申し上げます。

アミノ酸配列自動分析計を貸して下さり、多くの御助言をいただきました横浜市立大学医学部第一生化学講座の西野武士助教授および西野朋子博士に厚く御礼申し上げます。

分光旋光計を貸して下さり、多くの御助言をいただきました横浜国立大学工学部物質工学科の上杉晴一教授および片平正人助教授に厚く御礼申し上げます。

C. masakai の果実の採取をしてくださった中国科学院昆明植物研究所の胡忠教授および刘小焯氏に厚く御礼申し上げます。

R. dulcifica の栽培をしてくださった麻生武夫氏に厚く御礼申し上げます。

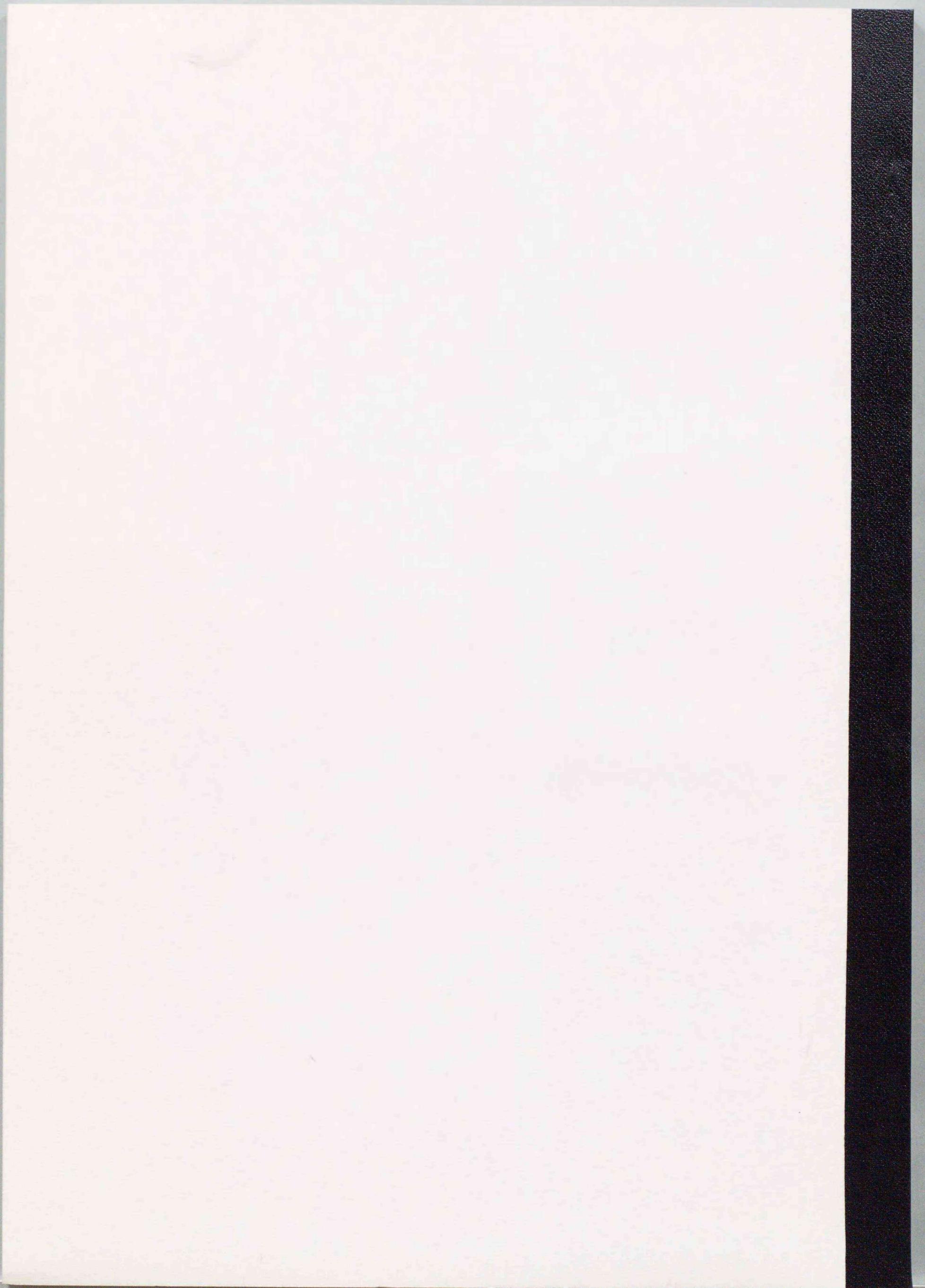
植物での遺伝子工学に関する詳細な実験の御指導、御助言をいただきました理化学研究所国際フロンティア研究システムホルモン機能研究チームの神谷勇治チームリーダーおよび今井亮三博士に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- (1) Morris, J. A. and Cagan, R. H. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, 261, 114-122.
- (2) van der Wel, H. and Loeve, K. (1972) *Eur. J. Biochem.*, 31, 221-225.
- (3) Liu, X., Maeda, S., Hu, Z., Aiuchi, T., Nakaya, K. and Kurihara, Y. (1993) *Eur. J. Biochem.*, 211, 281-287.
- (4) Ming, D. and Hellekant, G. (1994) *FEBS Lett.*, 355, 106-108.
- (5) Theerasilp, S. and Kurihara, Y. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263, 11536-11539.
- (6) Yamashita, H., Theerasilp, S., Aiuchi, T., Nakaya, K., Nakamura, Y. and Kurihara, Y. (1990) *J. Biol. Chem.*, 265, 15770-15775.
- (7) Theerasilp, S., Hitotsuya, H., Nakajo, S., Nakaya, K., Nakamura, Y. and Kurihara, Y. (1989) *J. Biol. Chem.*, 264, 6655-6659.
- (8) Igeta, H., Tamura, Y., Nakaya, K., Nakamura, Y. and Kurihara, Y. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, 1079, 303-307.
- (9) 丘小曼、山下治之、相内敏弘、中谷一泰、西野武士、栗原良枝 (1991) 味と匂のシンポジウム論文集 25, 281-284.
- (10) Nakajo, S., Theerasilp, S., Nakaya, K., Nakamura, Y. and Kurihara, Y. (1988) *Chem. Senses*, 13, 663-669.
- (11) Nakajo, S., Akabane, T., Nakaya, K., Nakamura, Y. and Kurihara, Y. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, 1118, 293-297.
- (12) Takahashi, N., Hitotsuya, H., Hanzawa, H., Arata, Y. and Kurihara, Y. (1990) *J. Biol. Chem.*, 265, 7793-7798.
- (13) Abe, K., Yamashita, H., Arai, S. and Kurihara, Y. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, 1130, 232-234.
- (14) Kurihara, Y. and Nirasawa, S. (1994) *Trends in Food Sci. and Technol.*, 5, 37-42.
- (15) Nirasawa, S., Liu, X., Hu, Z., Nishino, T., Katahira, M., Uesugi, S. and Kurihara, Y. (1994) In, Kurihara, K., Suzuki, N., Ogawa, H. (eds) *Olfaction and Taste XI*, Springer-Verlag, Tokyo, p 277.
- (16) Nirasawa, S., Nishino, T., Katahira, M., Uesugi, S., Hu, Z. and Kurihara, Y. (1994) *Eur. J. Biochem.*, 223, 989-995.
- (17) Nirasawa, S., Liu, X., Nishino, T. and Kurihara, Y. (1993) *Biochim. Biophys.*

- Acta, 1202, 277-280.
- (18) Nirasawa, S., Masuda, Y., Nakaya, K. and Kurihara, Y. (1996) *Gene*, 181, 225-227.
- (19) Nirasawa, S., Inagaki, Y., Masuda, Y., Nakaya, K. and Kurihara, Y., in preparation.
- (20) 増田豊、葦澤悟、佐藤京子、中谷一泰、栗原良枝 (1994) *日本味と匂学会誌*, 1 (3), 33-35.
- (21) Masuda, Y., Nirasawa, S., Nakaya, K. and Kurihara, Y. (1995) *Gene*, 161, 175-177.
- (22) 葦澤悟、栗原良枝 (1996) *高分子*, 45, 380-384.
- (23) 葦澤悟、増田豊、中谷一泰、栗原良枝 (1995) *日本味と匂学会誌*, 2 (3), 271-273.
- (24) Nirasawa, S., Imai, R., Masuda, Y., Nakaya, K., Kamiya, Y. and Kurihara, Y., in preparation.
- (25) 葦澤悟、稲垣泰男、増田豊、中谷一泰、栗原良枝 (1996) *日本味と匂学会誌*, 3 (3), 387-390.
- (26) Chang, C. T., Wu, C. S. C. and Yang, J. T. (1978) *Anal. Biochem.*, 91, 13-31.
- (27) Chen, Y. H., Yang, J. T. and Chau, K. H. (1974) *Biochemistry*, 13, 3350-3359.
- (28) Johnson, W. C. (1990) *Proteins*, 7, 205-214.
- (29) Friedman, M., Krull, L. H. and Cavins, J. F. (1970) *J. Biol. Chem.*, 245, 3868-3871.
- (30) Kawasaki, I. and Itano, H. A. (1972) *Anal. Biochem.*, 48, 546-556.
- (31) Ellman, G. L. (1959) *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 70-77.
- (32) Glazer, A. N., Delange, R. J. and Sigman, D. S. (1975) *Chemical modification of proteins*, North-Holland/American, Elsevier.
- (33) Moore, S. (1963) *J. Biol. Chem.*, 238, 235-237.
- (34) Fujiwara, K., Kobayashi, R. and Tsuru, D. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, 570, 140-148.
- (35) Kohmura, M., Nio, N. and Ariyoshi, Y. (1992) *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 1937-1942.
- (36) Holland, J. P. and Holland, M. J. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 2596-2605.
- (37) Edens, L., Heslinga, L., Klok, R., Ledebor, A. M., Maat, J., Toonen, M. Y., Visser, C. and Verrips, C. T. (1982) *Gene*, 18, 1-12.

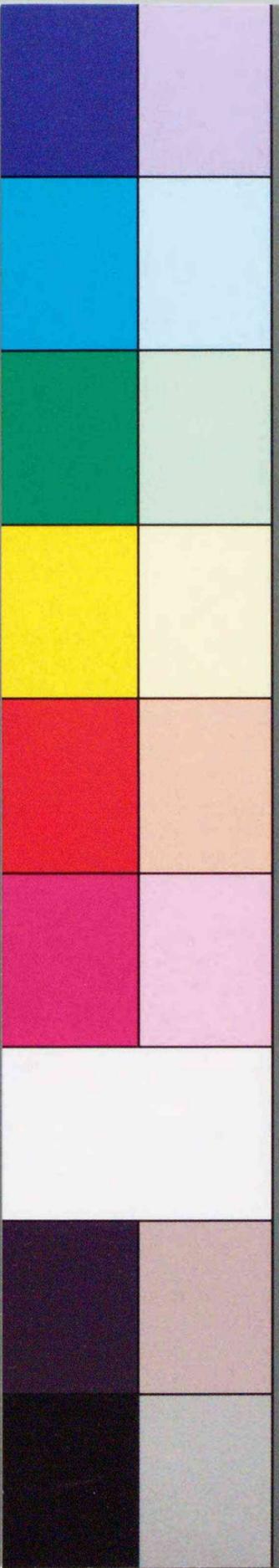
- (38) Holland, J. P., Labieniec, L., Swimmer, C. and Holland, M. J. (1983) *J. Biol. Chem.*, 258, 5291-5299.
- (39) Edens, L., Bom, I., Ledeboer, A. M., Maat, J. Toonen, M. Y., Visser, C. and Verrips, C. T. (1984) *Cell*, 37, 629-633.
- (40) Ledeboer, A. M., Verrips, C. T. and Dekker, B. M. M. (1984) *Gene*, 30, 23-32.
- (41) Edens, L., Russell, S. W., Visser, C. and Verrips, C. T. (1984) European Patent, 096 910.
- (42) Edens, L. and van der Wel, H. (1985) *Trends Biotechnol.*, 3, 1-4.
- (43) Takayasu, D., Grunstein, M. Hollenberg, S., Koduri, R., Lai, J., Lee, J. H. and Wilcox, G. (1985) European Patent, 0139 591.
- (44) Brawerman, G., Mandeck, J. and Lee, S. Y. (1972) *Biochemistry*, 11, 637-641.
- (45) Kuribayashi, K., Hikata, M., Hiraoka, O., Miyamoto, C. and Furuichi, Y. (1988) *Nucleic Acids Res.*, 19, 61-64.
- (46) Gubler, U. and Hoffman, B. J. (1983) *Gene*, 25, 263-269.
- (47) Sanger, F. and Coulson, A. R. (1975) *J. Mol. Biol.*, 94, 441-448.
- (48) Laemmli, U. K. (1970) *Nature*, 227, 680-685.
- (49) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76, 4350-4354.
- (50) Krebbers, E., Herdies, L., de Clercq, A., Seurinck, J., Leemans, J., van Damme, J., Segura, M., Gheysen, G., van Montagu, M. and Vandekerckhove, J. (1988) *Plant Physiol*, 87, 859-866.
- (51) Perlman, D. and Halverson, H. O. (1983) *J. Mol. Biol.*, 167, 391-409.
- (52) von Heijne, G. (1986) *Nucleic Acids Res.*, 14, 4683-4690.
- (53) Kurihara, K. and Beidler, L. M. (1968) *Science*, 161, 1241-1242.
- (54) Lehrach, H., Hammond, D., Wozney, J. and Boedtker, H. (1977) *Biochemistry*, 16, 4743-4751.
- (55) Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983) *J. Bacteriol*, 153, 163-168.
- (56) Schmitt, M. E., Brown, T. A. and Trumpower, B. L. (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18, 3091-3092.
- (57) Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982) *J. Mol. Biol.*, 157, 105-132.



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

Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale

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



© Kodak, 2007 TM: Kodak