

カエル水晶体 ρ - クリスタリンのDMクローニングと
蛋白質の発現

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2012-05-09 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 藤井, 豊 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/5380

カエル水晶体 ρ -クリスタリンの cDNA クローニングと蛋白質の発現

藤 井 豊

化学教室

(平成6年10月20日受理)

cDNA cloning and expression of frog lens ρ -crystallin

frog, ρ -crystallin, cDNA, cloning, expression, lens, aldo-keto reductase

Yutaka FUJII

The department of Chemistry

Abstract: cDNA (1203bp) of ρ -crystallin was cloned from a frog lens λ zap cDNA library. The cDNA contained initial codon and coded the full length (323 amino acid residues) of ρ -crystallin.

For the expression of recombinant protein, *Escherichia coli* was transformed by pMR1 plasmid which was prepared to be translated from initial codon of ρ -crystallin. The recombinant protein was purified as a homogenous protein with a molecular weight of 36.5kDa (identical to native ρ -crystallin) by four sequential chromatographies with Red Sepharose, Sephadex G-100, DEAE Toyopearl and Hydroxyapatite. The N-terminus of the recombinant protein was estimated to be TLTKETR which was identical to that of native ρ -crystallin (type II). The recombinant protein, as well as native ρ -crystallin, exhibited binding ability to NADPH without any enzymatic activity of aldo-keto reductase.

はじめに

アルド・ケト還元酵素はプロスタグランジンF合成酵素、アルドース還元酵素およびアルデヒド還元酵素など種々の酵素より構成されるファミリーである⁽¹⁾。このファミリーは幅広い基質特異性を示しプロスタグランジンD₂、アルドース、クロルデコンなどの抗生物質およびステロイド化合物などをNADPHを補酵素として対応するアルコールへと還元する。さらにプロスタグランジンH₂などのエンドパーオキシドも還元することができる大変ユニークな多機能酵素で、P₄₅₀に劣らず薬物代謝に重要な役割を果たしている。また、分子量がわずか3~4万の単量体酵素でありながら少なくともアルド・ケト化合物とエンドパーオキシド化合物に対してそれぞれ異なる触媒部位を持つ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾。一方、遺伝子的にアルド・ケト還元酵素の一員であ

りながらその酵素機能を失っている蛋白質の存在が知られている。それはカエル水晶体の構造蛋白質 ρ -クリスタリン⁵⁾で、全水晶体蛋白質の18%におよぶ驚異的な発現率を誇っている。仮に ρ -クリスタリンに酵素活性が保持されていたらそれは明らかに生理的必要性を逸脱してしまう。この大過剰の酵素活性が生体にとって脅威となったため、 ρ -クリスタリンはその分子進化の過程で酵素活性を放棄したものと考えられるが、そのオリジナル酵素が如何なるものであったのか未だに不明である。種々の動物の水晶体における主なアルド・ケト還元酵素はアルドース還元酵素とアルデヒド還元酵素である。特にアルドース還元酵素は糖に対する親和性が他のアルド・ケト還元酵素より高く糖尿病性合併症の起因酵素として知られている。今回カエル水晶体 cDNA ライブラリーから ρ -クリスタリンの cDNA をクローニングし、遺伝子操作による ρ -クリスタリンの酵素活性復元のための基礎研究とした。

実験材料と方法

実験材料：食用ガエル (*Rana catesbeiana*, 200–500 g, 雌雄) は北陸実験動物より購入した。Red Sepharose, Sephadex G-100 および cDNA 合成キットはファルマシアより購入した。Hydroxyapatite および P V D F 膜はバイオラドより、DEAE Toyopearl は東ソーより、アクリルアミド、ドデシル硫酸ナトリウム (S D S), N A D P H 及び p-nitrobenzaldehyde (pNBA) は和光純薬より、クーマーシープリリアントブルー (C B B) およびアミドブラックはナカライテスクより、T A クローニングキットおよび Vectstain-ABC キットはフナコシよりそれぞれ購入し、その他の試薬は特級品を使用した。

S D S-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S-P A G E) : SDS-PAGE は Lammuli の方法⁶⁾で行った、蛋白質は C B B で染色した。

蛋白質定量：蛋白質の定量は 280nm における吸光度または色素アミドブラック結合法⁷⁾により牛血清アルブミン (Fraction V) をスタンダードとして行った。

ウェスタンブロット：蛋白質を SDS-PAGE にかけた後、P V D F 膜にセミドライ方式で転写した。一次抗体としてウサギ抗- ρ -クリスタリン抗血清を用い、抗原蛋白質の検出は Vectstain-ABC キットを用いた。

活性測定：アルド・ケト還元酵素活性は終濃度 0.1M リン酸ナトリウム pH6.5, 0.1mM NADPH, 1mM pNBA のアッセイ溶液を用い酵素を加え 1 ml とし、37°C で反応を開始し、NADPH の減少速度を 340nm (ギルフォードフォトメーター) で測定した。酵素 1 ユニット (U) は 1 分間に 1 μ mol の NADPH を消費する酵素量とした。

ラジオイムノアッセイ：¹²⁵I-ラベルの ρ -クリスタリンをトレーサーとして藤井らの方法⁵⁾で行った。

ペプチドマッピング：蛋白質をジチオスレイトールで還元後、4-vinylpyridine で pyridylethyl (P E) 化した。P E 化蛋白質をリジルエンドペプチダーゼで消化後、逆層高圧

カエル水晶体 ρ -クリスタリンの cDNA クローニングと蛋白質の発現

液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) で分析した。

cDNA クローニング：食用ガエル水晶体より mRNA を常法により調製し、cDNA を合成した。NotI/EcoRI アダプターを介して λ zap ファージミドベクターの EcoRI サイトにインサートして cDNA ライブラリーを作製した。 ρ -クリスタリンに特異的な二つのプライマー (5'-GAGAGATCTCTGAGGGATGTTGGA-3' と 5'-TCAGTACTCATCGTGG AAGGGTA-3') を使って PCR を行い、得られた 675bp の PCR 産物を TA クローニングキットでクローン化した。これをプローブとして ρ -クリスタリンの全長をコードする cDNA をカエル水晶体 cDNA ライブラリーよりクローニングした。得られたクローン (R7FF) の塩基配列はダイデオキシターミネーター法 (アプライドバイオシステムズ) で解析した。

蛋白質発現：R7FF から ρ -クリスタリンの開始コドン ATG の下流の cDNA を制限酵素 HinfI/EcoRI で切り出し、改変型プラスミッドベクター pM の β -gal 開始コドンの下流にインサートして発現ベクター pMR-1 を得た。これを大腸菌 (HB101細胞) にトランスフォームして組換え ρ -クリスタリンの発現を確認した。

発現蛋白質の精製

菌の培養：pMR-1 で形質転換した大腸菌を 5 ml のアンピシリン LB 培地で 37°C, 12 時間前培養後、1 l のマイヤーを用いて 330 ml のアンピシリン LB 培地培地中で 37°C, 20 時間振とう培養した。大腸菌を遠心により集め -80°C で保存した。

粗抽出：凍結した大腸菌をアイスバス中で 40 ml の 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.5 mg/ml のリゾチームに懸濁溶菌した。溶菌液をソニケーションにかけて DNA を切断した後、遠心分離し粗抽出液として回収した。

Red Sepharose クロマトグラフィー：この粗抽出液を 2 l の 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA, 0.01% NaN_3 に透析し同緩衝液で平衡化した Red Sepharose カラム (1.5 x 20 cm) にアプライした。発現蛋白質は 0 から 1.2 M の塩化カリウムの直線濃度勾配により溶出し Red Sepharose 画分とし、固形の硫酸を加えて 80% 飽和として、コールドルームで一夜放置した。

ゲル濾過：硫酸飽和により析出した発現蛋白質の沈殿を遠心分離により回収し、2 ml の 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.01% NaN_3 で溶解した後同緩衝液で平衡化した Sephadex G-100 カラム (1.5 x 180 cm) にアプライした。回収した発現蛋白質画分を Sephadex G-100 画分とした。

DEAE Toyopearl クロマトグラフィー：Sephadex G-100 画分を上記緩衝液で平衡化した DEAE Toyopearl カラム (1.0 x 20 cm) にアプライして、10 から 50 mM Tris-HCl の直線濃度勾配により溶出した。

Hydroxyapatite クロマトグラフィー：上記画分を 25 mM リン酸カリウム, pH 8.0, 0.01% NaN_3 で平衡化した Hydroxyapatite カラム (1.0 x 25 cm) にアプライした。発現蛋白質は 0 から 0.2 M 塩化カリウムの直線濃度勾配により溶出した。精製した発現蛋白質は 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.5, 30% グリセロールに透析して -80°C で保存した。

結 果

ρ -クリスタリン cDNA の塩基配列とアミノ酸配列の推定

カエル水晶体 λ zap 系 cDNA ライブラリーより、 ρ -クリスタリンをコードしている1203bp の cDNA をクローニングし、その塩基配列を決定した (図1)。得られた cDNA は開始コードを含み323アミノ酸残基よりなる ρ -クリスタリンをコードしていた。Tomarev らが報告した ρ -クリスタリンの部分塩基配列⁹⁾と比較して23ヶ所に相違が見られた。これはアミノ酸配列で見ると8ヶ所の相違になる (図2, 図3)。

図1. ρ -クリスタリン cDNA の塩基配列とアミノ酸配列

```

-10      -1 1      10      20      30      40
C AGT AAC GCA ATA ATG ACT CTC ACC AAG GAA ACC CGT GTC ACC CTT AAC GAT GGC
Met T L T K E T R V T L N D G
50      60      70      80      90
AAC ATG ATG CCA ATC CTA GGA TTG GGC ACT TAT GCT GCT CCT GAT GTG CCT AAA AGT
N M M P I L G L G T Y A A P D V P K S
100     110     120     130     140     150
CTT GCA GAG GAA GCT GTG AAA ACT GCC ATT GAT GTT GGT TAC AGA CAC ATC GAC TGC
L A E E A V K T A I D V G Y R H I D C
160     170     180     190     200     210
GCC TTC ATC ACC GGC AAT GAG ATG CAT ATT GGA AAT GGC ATT CGC TCA AAG ATC TCT
A F I T G N E M H I G N G I R S K I S
220     230     240     250     260     270
GAT GGC ACA GTC AAG AGG GAA GAC ATC TTC TAC ACT GGA AAG CTC TGG TGT ACG TAC
D G T V K R E D I F Y T G K L W C T Y
280     290     300     310     320
TTT TCC CCT GAT ATG GTA CGC AAA GGT TTG GAG AGG TCT CTG AGG GAT GTT GGA ATG
F S F D M V R K G L E R S L R D V G M
330     340     350     360     370     380
GAT TAT CTG GAT CTC TTC CTT ATG CAC TGG CCT GTC TCC CTT AAG CCT AGT GGA GCA
D Y L D L F L M H W P V S L K P S G A
390     400     410     420     430     440
TCT GAT CCC TCC GAT AAG GAC AAG CCT TTC ATC TAT GAT AAT GTG GAC CTT TGT GCT
A D P S D K D K P F I Y D N V D P I S
450     460     470     480     490
ACA TGG GAG GCT CTA GAG GCA TGC AAA GAT GCA GGT TTG GTG AGA TCC CTC GGA GTA
T W E A L E A C K D A G L V R S L G V
500     510     520     530     540     550
TCA AAC TTT AAC CGC AGG CAG CTG GAA CGT ATC CTG AAC AAA CCA GGA CTG AAG TAC
S N F N R R Q L E R L L N K P G L K Y
560     570     580     590     600     610
AAG CCA GTT TGC AAC CAG GTG GAG TGT CAT GTA TAT TTA AAT CAA AAC AAA CTT CAC
K P V C N Q V E C H V Y L N Q N K L H
620     630     640     650     660
GCC TAC TGC AAA TCC AAG GAC ATT GTT TTG GTG GCT TAC AGC GTC TTG GGC TCA CAC
A Y C K S K D I V L V A Y S V L G S H
670     680     690     700     710     720
AGA GAC AGG AAC TGG GTG GAC CTT AGC TTG CCA GTC CTA CTT GAT GAT CCA ATT TTG
R D R N W V D L S L P V L L D D P I L
730     740     750     760     770     780
AAT AAA ATT GCT GCT AAG TAC AAT CGC TCC TCT GCA GAG GTC GCC ATG CGC TTC ATT
N K I A A K Y N R S S A E V A M R F I
790     800     810     820     830     840
CTC CAG AAG GGA ATT GTG GTC TTG GCC AAA AGC TTC ACC CCC GCT CGT ATC AAG CAA
L O K G I V V L A K S F T P A R I K O
850     860     870     880     890
AAC CTT GGG GTC TTT GAA TTT GAA CTG AAA CCT GAA GAT ATG AAA ACA CTT GAG AGC
N L G V F E F E L K P E D M K T L E S
900     910     920     930     940     950
CTA GAC AGA AAC CTA CAT TAT GGA CCT TTT AGA GAG GTG AAA CAG CAC CCA GAA TAC
L D R N L H Y G P F R E V K O H E Y
960     970     980     990     1000     1010     1020
CCC TTT CAT GAT GAG TAC TGA AGACCAACTGAGTCCCAACGACGTCCTCCAAGAATGCTTTCTGTAT
F F H D E Y TER
1030     1040     1050     1060     1070     1080     1090
TATATATGTAAGCTTTAGTAGACTGCACTCTGTGTACATACAGAAAAAATACATTATGTCATTGGCCAGAT
1100     1110     1120     1130     1140     1150     1160     1170
TTATAAAGCATTTGATTGGATGGGACATTATGTCTTATGCCATGTTGCCCTATGCATACCAACCAATAAAT
1180     1190
TAATGCTGAACATCAAAA

```

全長1203bp の塩基配列を示した。アンダーラインは天然型 ρ -クリスタリンで確認したアミノ酸配列を示した。

カエル水晶体 ρ -クリスタリンの cDNA クローニングと蛋白質の発現

図 2. 食用ガエルとヨーロッパ赤ガエル ρ -クリスタリンの cDNA の比較

```

-10      -1 1      10      20      30      40      50      60
cRHO: C AGT AAC GCA ATA ATG ACT CTC ACC AAG GAA ACC CGT GTC ACC CTT AAC GAT GGC AAC ATG ATG CCA ATC CTA GGA TTG GGC
tRHO: .....

70      80      90      100     110     120     130     140     150
ACT TAT GCT GCT CCT GAT GTG CCT AAA AGT CTT GCA GAG GAA GCT GTG AAA ACT GCC ATT GAT GTT GGT TAC AGA CAC ATC GAC TGC
.....

160     170     180     190     200     210     220     230     240
GCC TTC ATC ACC GGC AAT GAG ATG CAT ATT GGA AAT GGC ATT CGC TCA AAG ATC TCT GAT GGC ACA GTC AAG AGG GAA GAC ATC TTC
.....

250     260     270     280     290     300     310     320     330
TAC ACT GGA AAG CTC TGG TGT ACG TAC TTT TCC CCT GAT ATG GTA CGC AAA GGT TTG GAG AGG TCT CTG AGG GAT GTT GGA ATG GAT
.....

340     350     360     370     380     390     400     410
TAT CTG GAT CTC TTC CTT ATG CAC TGG CCT GTC TCC CTT AAG CCT AGT GGA GCA TCT GAT CCC TCC GAT AAG GAC AAG CCT TTC ATC
TAT CTG GAT CTG TTC CTT ATG CAC TGG CCT GTC TCC CTT AAG CCT AGT GGA GCA TCT GAT CCC TCC GAT AAG GAC AAG CCT TTC ATC

420     430     440     450     460     470     480     490     500
TAT GAT AAT GTG GAC CTT TGT GCT ACA TGG GAG GCT CTA GAG GCA TGC AAA GAT GCA GGT TTG GTG AGA TCC CTC GGA GTA TCA AAC
TAT GAT AAT GTG GAC CTT TGT GCT ACA TGG GAG GCT CTA GAG GCA TGC AAA GAT GCA GGT TTG GTG AGA TCC CTC GGA GTA TCA AAC

510     520     530     540     550     560     570     580     590
TTT AAC CGC AGG CAG CTG GAA CGT ATC CTG AAC AAA CCA GGA CTG AAG TAC AAG CCA GTT TGC AAC CAG GTG GAG TGT CAT GTA TAT
TTT AAC CGC AGG CAG CTG GAA CGT ATC CTG AAC AAA CCA GGA CTG AAG TAC AAG CCA GTT TGC AAC CAG GTG GAG TGT CAT GTA TAT

600     610     620     630     640     650     660     670
TTA AAT CAA AAC AAA CTT CAC GCC TAC TGC AAA TCC AAG GAC ATT GTT TTG GTG GCT TAC AGC GTC TTG GGC TCA CAC AGA GAC AGG
TTA AAT CAA AAC AAA CTT CAC GCC TAC TGC AAA TCC AAG GAC ATT GTT TTG GTG GCT TAC AGC GTC TTG GGC TCA CAC AGA GAC AGG

680     690     700     710     720     730     740     750     760
AAC TGG GTG GAC CTT AGC TTG CCA GTC CTA CTT GAT GAT CCA ATT TTG AAT AAA ATT GCT GCT AAG TAC AAT CGC TCC TCT GCA GAG
AAC TGG GTG GAC CTT AGC TTG CCA GTC CTA CTT GAT GAT CCA ATT TTG AAT AAA ATT GCT GCT AAG TAC AAT CGC TCC TCT GCA GAG

770     780     790     800     810     820     830     840     850
GTC GCC ATG CGC TTC ATT CTC CAG AAG GGA ATT GTG GTC TTG GCC AAA AGC TTC ACC CCC GCT CGT ATC AAG CAA AAC CTT GGG GTC
GTC GCC ATG CGC TTC ATT CTC CAG AAG GGA ATT GTG GTC TTG GCC AAA AGC TTC ACC CCC GCT CGT ATC AAG CAA AAC CTT GGG GTC

860     870     880     890     900     910     920     930
TTT GAA TTT GAA CTG AAA CCT GAA GAT ATG AAA ACA CTT GAG AGC CTA GAC AGA AAC CTA CAT TAT GGA CCT TTT AGA GAG GTG AAA
TTT GAA TTT GAA CTG AAA CCT GAA GAT ATG AAA ACA CTT GAG AGC CTA GAC AGA AAC CTA CAT TAT GGA CCT TTT AGA GAG GTG AAA

940     950     960     970     980     990     1000    1010    1020    1030    1040
CAG CAC CCA GAA TAC CCC TTT CAT GAT GAG TAC TGA AGACCAACTGAGTGCCCAACGCGAGTCCTCCAAAGAAGATGCTTCTGTATTATATATGTAAGCTTTAGTA
CAG CAC CCA GAA TAC CCC TTT CAT GAT GAG TAC TGA AGACCAACTGAGTGCCCAACGCGAGTCCTCCAAAGAAGATGCTTCTGTATTATATATGTAAGCTTTAGTA

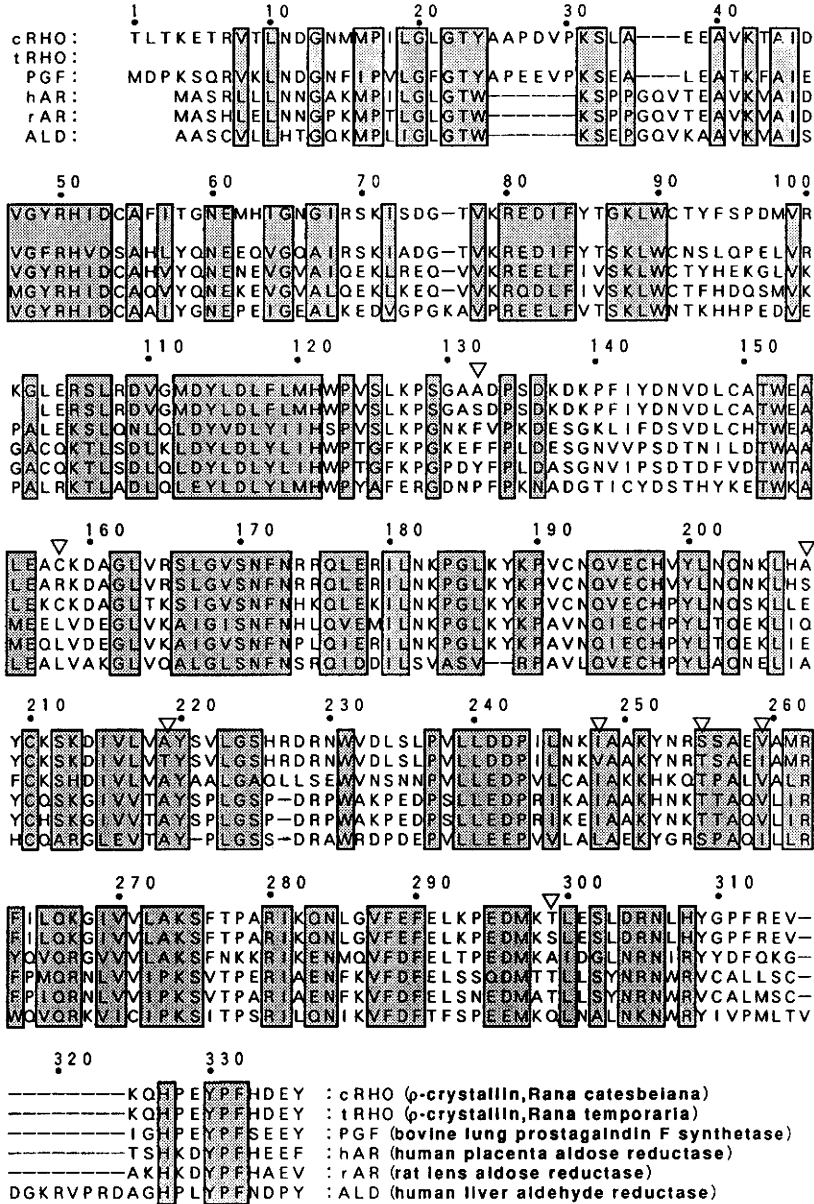
1050    1060    1070    1080    1090    1100    1110    1120    1130    1140    1150
GAGCTGCACCTCTGTTACATACAGAAAAAATAACATTTAGTCATTTGCCAGTATTTATAAAGCATTATTGATTGGATGGGAGCATTATGCTCTATGCCATGTTGCCATTATGCATAA
GAGCTGCACCTCTGTTACATACAGAAAAAATAACATTTAGTCATTTGCCAGTATTTATAAAGCATTATTGATTGGATGGGAGCATTATGCTCTATGCCATGTTGCCATTATGCATAA

1160    1170    1180    1190
CAACCAATAAATTTAATGCTGAACATCAAAA..... cRHO: Rana catesbeiana
CAACCAATAAATTTAATGCTGAACATCAAAA.....AAAA tRHO: Rana temporaria

```

食用ガエル (*Rana catesbeiana*) ρ -クリスタリン (cRHO, 上段) と Tomarev ら⁽⁷⁾のヨーロッパ赤ガエル (*Rana temporaria*) ρ -クリスタリン (tRHO, 下段) の塩基配列を比較した。相違している塩基は反転文字で示した。

図3. アルド・ケト還元酵素ファミリーと ρ -クリスタリン



食用ガエル ρ -クリスタリン (cRHO)、ヨーロッパ赤ガエル ρ -クリスタリン (tRHO)、牛肺プロスタグランジンF合成酵素 (PGF)、ヒト胎盤アルドース還元酵素 (hAR)、ラット水晶体アルドース還元酵素 (rAR) およびヒト肝臓アルデヒド還元酵素 (ALD) のアミノ酸配列を比較した。保守的領域は灰色で囲んである。cRHOとtRHOのアミノ酸配列で相違が見られたところは逆白抜き三角で示した。hARの必須アミノ酸残基の一つチロシン-48 (図では58番目)⁽⁸⁾はPGF、rARおよびALDで保守されているがcRHOではスレオニン残基になっている。

カエル水晶体 ρ -クリスタリンの cDNA クローニングと蛋白質の発現

組換え ρ -クリスタリンの発現

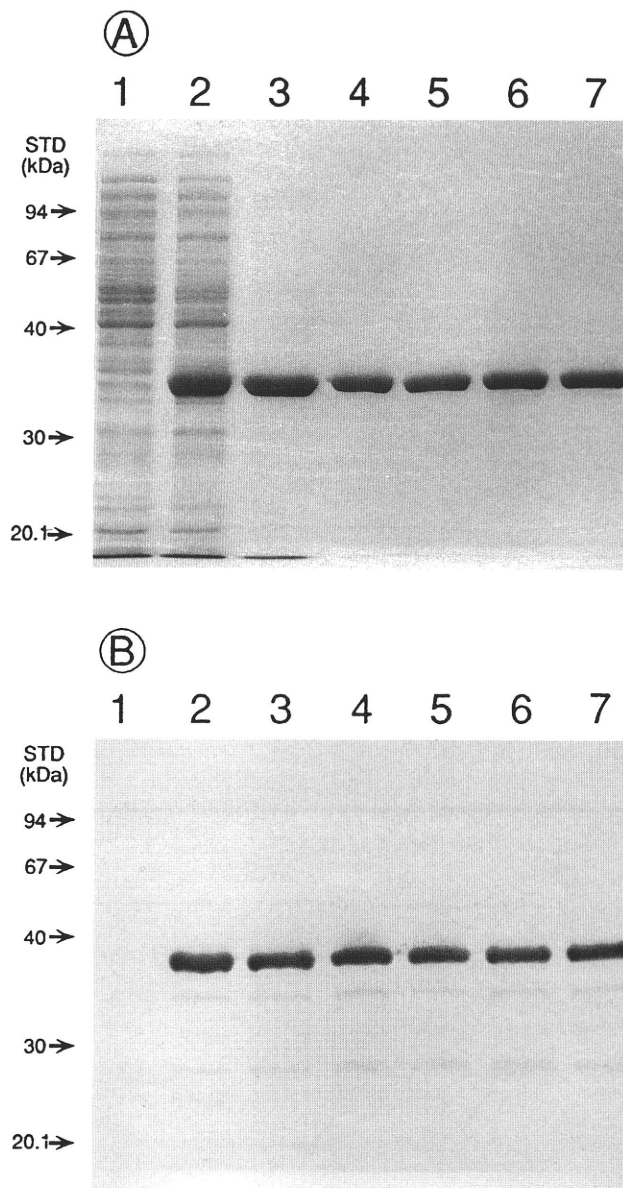
この ρ -クリスタリン cDNA をインサートに持ち ρ -クリスタリンの開始コドンより翻訳されるように調製したプラスミド PMR-1 を大腸菌にトランスフォームし、組換え蛋白質を発現させた (図 4 A)。発現量は非常に高く全可溶性蛋白質の 25% に達した (表 1)。この組換え蛋白質は抗- ρ -クリスタリン抗体により認識された (図 4 B)。この組換え蛋白質は Red Sepharose、Sephadex G-100、DEAE Toyopearl 及び Hydroxyapatite を用いたクロマトグラフィー (図 5) により ρ -クリスタリンと同じ 36.5 kDa の蛋白質として単一に精製された (図 4 A)。

表 1. 組換え ρ -クリスタリンの精製

Steps	Volume	Protein	ρ -Crystallin		p-Nitrobenzaldehyde reducing activity
	<i>ml</i>	<i>mg</i>	<i>mg eq</i>	<i>yield</i>	<i>milliunit</i>
1. Crude extracts	40	228	62.3	100	11,400
2. Red Sepharose	180	104	55.6	89.2	1,080
3. Sephadex G-100	26	53.6	51.2	82.2	308
4. DEAE Toyopearl	56	41.7	41.5	66.7	N.D.
5. Hydroxyapatite	120	37.5	37.5	60.2	N.D.

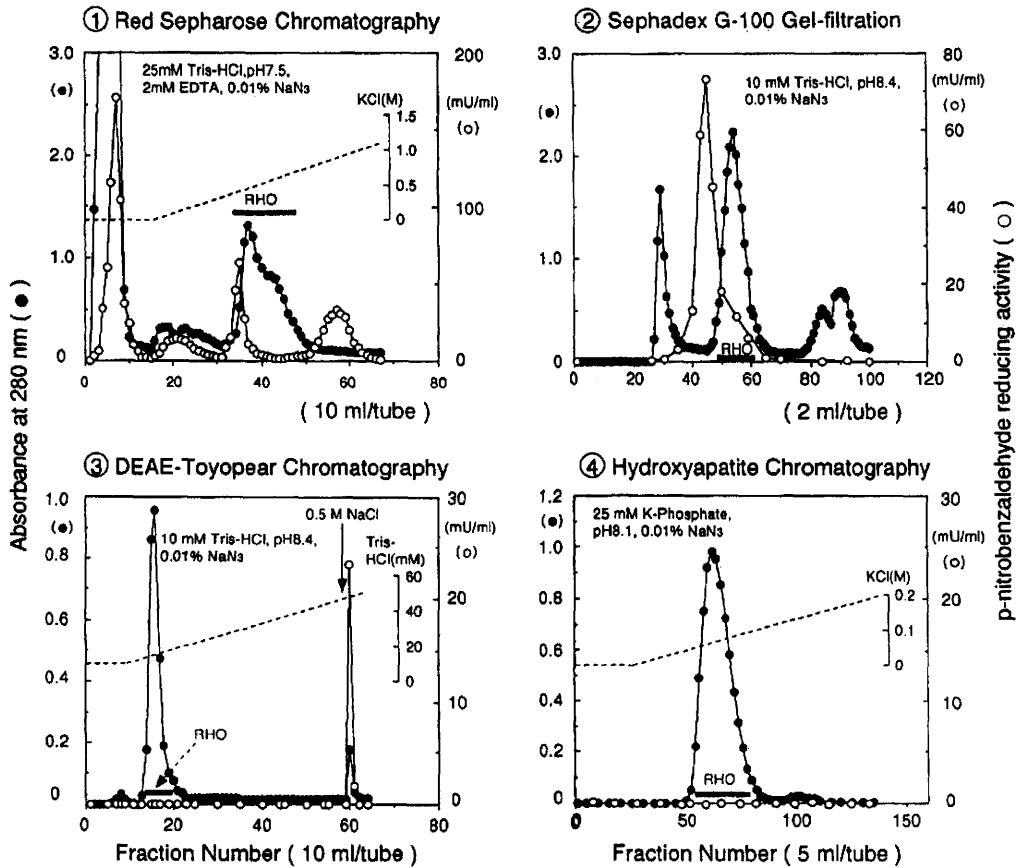
N.D. not detected

図 4. ρ -クリスタリンの SDS-PAGE



A : C B Bによる蛋白質染色, B : ウェスタンブロット, 1 : コントロールHB101細胞の粗抽出フラクション (A : 2.85 μ g, B : 0.285 μ g), 2 : pMR1-HB101細胞の粗抽出フラクション (A : 2.70 μ g, B : 0.270 μ g), 3 : Red Sepharose フラクション (A : 1.45 μ g, B : 0.145 μ g), 4 : Sephadex G-100フラクション (A : 0.65 μ g, B : 0.065 μ g), 5 : DEAE Toyopearl フラクション (A : 0.70 μ g, B : 0.070 μ g), 6 : Hydroxyapatite フラクション (A : 0.73 μ g, B : 0.073 μ g), 7 : 天然型 ρ -クリスタリン (A : 0.79 μ g, B : 0.079 μ g),

図 5. 各精製過程のクロマトグラフィー

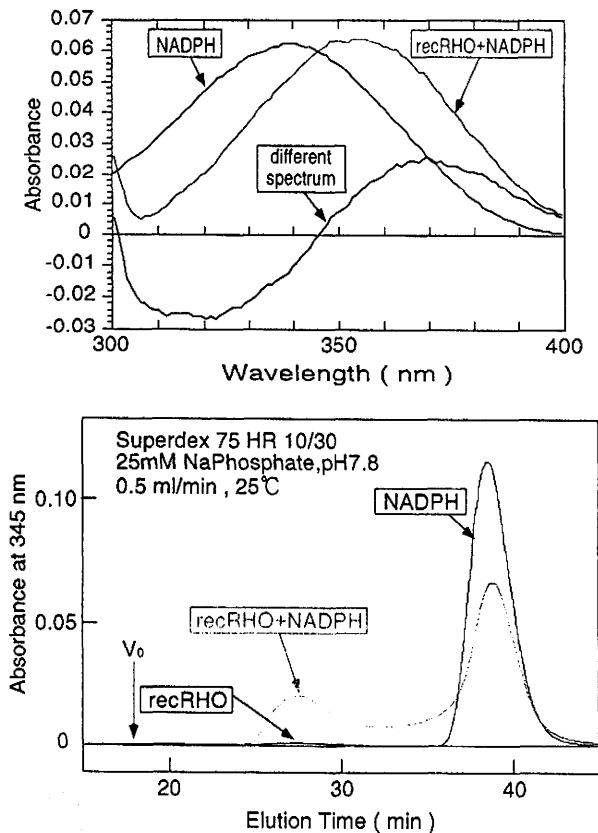


組換え ρ -クリスタリンの溶出位置は SDS-PAGE でチェックし太線で示しプールした。プールしたサンプルはラジオイムノアッセイ (表 1) および SDS-PAGE (図 4) による蛋白染色とウェスタンブロットに供した。

組換え ρ -クリスタリンの性質

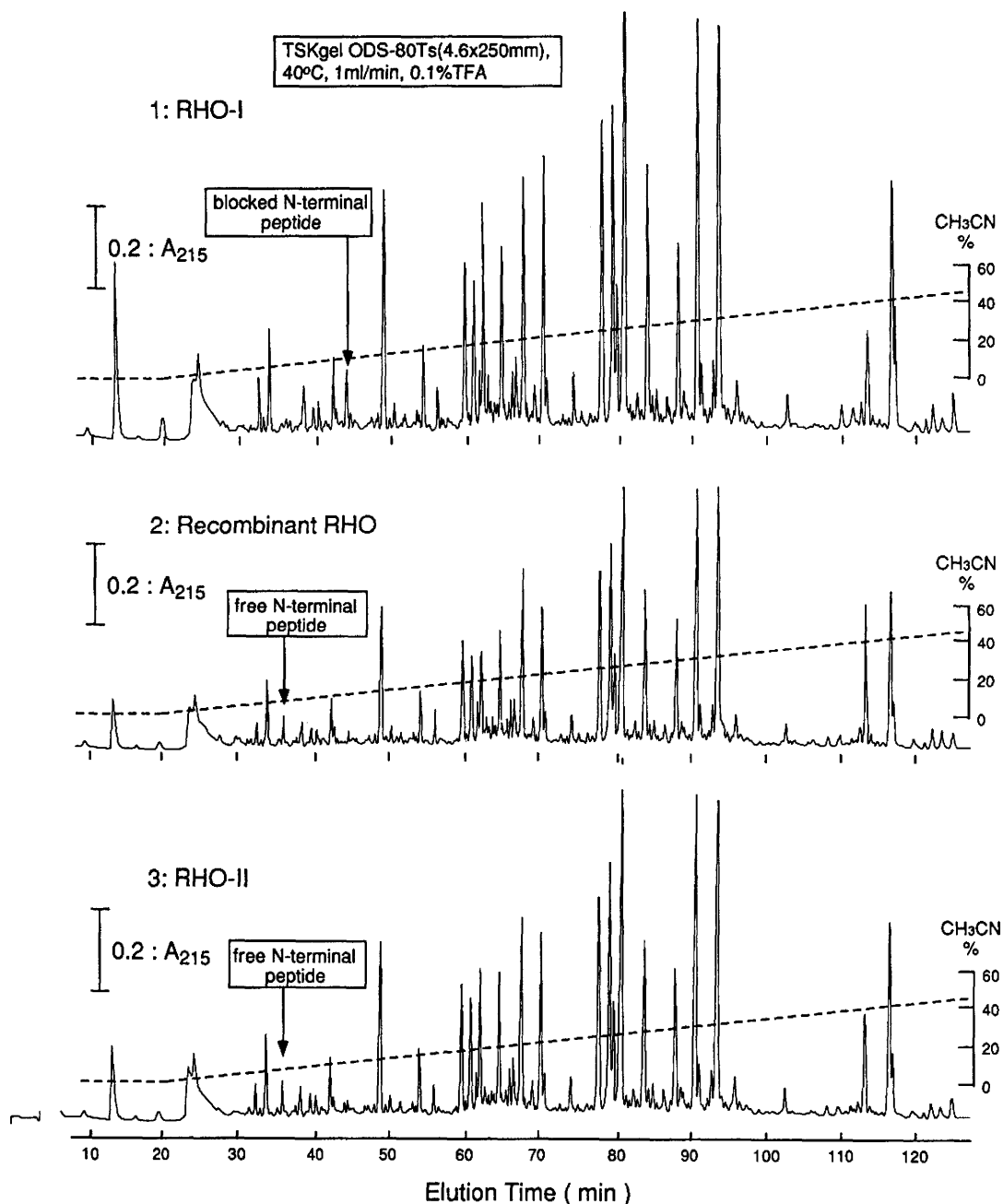
pNBA を基質として、アルド・ケト還元酵素活性をモニターして精製していくと、最終的に酵素活性の全くない組換え ρ -クリスタリンが得られた (表1, 図5)。一方, 補酵素NADPH に対する親和性はある複合体を形成した (図6)。これらの性質は天然型 ρ -クリスタリンの性質と全く同じである。組換え ρ -クリスタリンのN末端アミノ酸配列は TLTKETR と決定され, 天然型 ρ -クリスタリンのII型と同じ構造であった。リジルエンドペプチダーゼによるペプチドマップによる比較では組換え ρ -クリスタリンと天然型 ρ -クリスタリンのII型のマップは完全に一致し, 天然型 ρ -クリスタリンのI型とはそのN末端ペプチドのみの相違であった (図7)。天然型 ρ -クリスタリンのI型のN末端はアシル基によりブロックされていることが知られているので, 基本的に組換え ρ -クリスタリンと天然型 ρ -クリスタリンのI型のペプチドマップに相違はないことが確認された。

図6. 組換え ρ -クリスタリンのNADPH複合体形成によるスペクトル変化と複合体の分離



組換え ρ -クリスタリン・NADPH複合体のスペクトルと差スペクトルを上段に示した。また複合体を Superdex75によりフリーのNADPHと分離した。複合体の結合比は約1:1であり, 組換え ρ -クリスタリンは一つのNADPH結合部位を持つと考えられる。

図7. PE化組換え ρ -クリスタリンと天然型 ρ -クリスタリンのペプチドマップ



PE化組換え ρ -クリスタリン (recombinant RHO) および天然型 ρ -クリスタリン (RHO-I, RHO-II) をリジレンドペプチダーゼで消化し0.05%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度勾配によりペプチドマップを解析した。

考 察

今回、クローニングした ρ -クリスタリン cDNA から発現された組換え ρ -クリスタリンは N 末端アミノ酸配列およびペプチドマップによる構造解析から天然型 ρ -クリスタリン (I と II 型) と同じ一次構造を持つことが確認された。従って、クローニングされた cDNA は正しく ρ -クリスタリンの mRNA を反映していると考えられる。組換え ρ -クリスタリンは天然型 ρ -クリスタリンと同じく補酵素 NADPH に対する親和性を保持しながらもアルド・ケト還元酵素活性を欠落していることが確認された。このことは、 ρ -クリスタリンは翻訳後修飾等による失活ではないことを強く示唆し、その一次構造に酵素活性の欠落の原因があることを示すものである。アルド・ケト還元酵素ファミリー (図 3) はいろいろのアルド・ケト化合物を還元できる。中でもアルドース還元酵素はグルコースやガラクトースを還元してポリオールの生合成を触媒し糖尿病性白内障などの合併症を引き起こす。 ρ -クリスタリンがなぜ糖尿病性合併症の危険をおかしてまでカエル水晶体構造蛋白質クリスタリンとして大量に発現されることになったのかは未だ不明であるが、少なくとも酵素活性に必須なアミノ酸残基の置換を介してその危険を回避した可能性が高い。事実、アルドース還元酵素の必須アミノ酸残基であるチロシン-48⁰⁰は ρ -クリスタリンではスレオニン-55 に置換している。チロシンのフェノール性水酸基が電子伝達に重要な役割を担っていることを考えるとスレオニン残基のアルコール性水酸基では不可能なのかもしれない。今後、 ρ -クリスタリンの遺伝子操作を行ってこのスレオニン残基をチロシン残基に復帰し酵素活性の復活の可能性を検討すべきである。

Tomarev らが報告した ρ -クリスタリンの部分塩基配列とは 23 塩基対の相違が認められた。彼らはヨーロッパ赤ガエル (*Rana temporaria*) の水晶体を研究した。一方ここでは食用ガエル (*Rana catesbeiana*) を研究対象としている。従って、この相違は種の違いによるもので、仮に全長を比較したときにはさらに相違が見つかる予想される。少なくとも 23 塩基対の相違は予想以上に多いものであり、両者の ρ -クリスタリンに機能的に大きな相違があるのかもしれない。

要約：カエル水晶体 λ zap 系 cDNA ライブラリーより、 ρ -クリスタリンをコードしている全長 1203bp の cDNA をクローニングした。得られた cDNA は開始コドンを含み 323 アミノ酸残基よりなる ρ -クリスタリンをコードしていた。 ρ -クリスタリンの開始コドンより翻訳されるように調製した pMR 1 プラスミドを用いて大腸菌から組換え蛋白質を発現させた。発現蛋白質は Red Sepharose, Sephadex G-100, DEAE Toyopearl 及び Hydroxyapatite を用いたクロマトグラフィーにより天然型 ρ -クリスタリンと同じ 36, 5kDa の蛋白質として単一に精製された。発現蛋白質の N 末端アミノ酸配列は TLTKETR と同定され ρ -クリスタリン (II 型) と同一であった。 ρ -クリスタリンと同様、発現蛋白質は補酵素 NADPH との結合能を示したが p-nitrobenzaldehyde などアルド・ケト還元酵素の典型的な基質を還元しなかった。

カエル水晶体 ρ -クリスタリンの cDNA クローニングと蛋白質の発現

参考文献

1. D. A. Caper, G. Wistow, C. Nishimura, C. Graham, K. Watanabe, Y. Fujii, H. Hayashi, and O. Hayaishi (1989) Exp. Eye Res. 49, 377—388
2. K. Watanabe, Y. Fujii, H. Ohkubo, S. Kuramitsu, H. Kagamiyama, and O. Hayaishi (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 181, 272—278
3. K. Watanabe, Y. Fujii, K. Nakayama, H. Ohkubo, S. Kuramitsu, H. Kagamiyama, S. Nakanishi, and O. Hayaishi (1989) Prog. Clin. Biol. Res. 290, 365—379
4. H. Hayashi, Y. Fujii, K. Watanabe, and O. Hayaishi (1989) J. Biol. Chem. 264, 1036—1040
5. Y. Fujii, K. Watanabe, H. Hayashi, Y. Urade, S. Kuramitsu, H. Kagamiyama, and O. Hayaishi (1990) J. Biol. Chem. 265, 9914—9923
6. Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680+688
7. Schaffner, W., and Weissmann, C. (1973) Anal. Biochem. 56, 502—514
8. Y. Fujii, F. X. Zhao, S. C. J. Fu, N. Nakai, and C. Y. Lai (1991) Protein Expression and Purification 2, 420—425
9. Tomarev, S. I., Zinovieva, R. D., Dolgilevich, S. M., Luchin, S. V., Krayev, A. S., Skryabin, K. G. and Gause, G. G. jr (1984) FEBS Letter 171, 297—302
10. Tarle, I., Borhani, D. W., Wilson, D. K., Quioco, F. A. and Petrash, J. M. (1993) J. Biol. Chem. 268, 25687—25693