

# 牛乳脂肪球膜PAS-4糖蛋白質の生化学的・分子生物学的研究

宇都宮大学農学部 教授 菅野 長右エ門

牛乳脂肪球膜 (MFGM) は、乳腺細胞の頂端細胞膜に起因し、乳脂肪球を被覆している構造リポタンパク質である。MFGMの約50%がタンパク質で、SDS-PAGE分析後に過ヨウ素酸-Schiff試薬 (PAS) で染色・検出される主要バンドは7本 (PAS-1~7) である。その内の本研究で目的とするPAS-4は、分子量75,000~88,000で、5%の糖を含むタンパク質である。

牛乳のPAS-4はヒト血小板のCD36と類似する抗原性を持つことが報告されている。血小板のCD36は、血小板細胞膜の主要な糖タンパク質の1つであり、コラーゲンのレセプター、血小板コラーゲンの接着の媒介、トロンボスポンジンのレセプター、マラリア感染赤血球との接着のレセプターなどの機能が報告されている。PAS-4とCD36は類似のタンパク質である可能性が示唆されているが、PAS-4の一次構造は解明されていない。乳腺に発現するPAS-4はCD36とは異なる機能を持つ可能性が考えられる。しかし、ウシ乳腺で発現されているPAS-4とCD36の関係はいまだに明らかにされていない。

本研究では、1)PAS-4の簡易な精製法を開発し、その生化学的特性を明らかにし、2)PAS-4のcDNAクローニングを行い、cDNAの塩基配列及びこれから推定されるアミノ酸配列からPAS-4の一次構造を明らかにし、3)PAS-4の乳腺における局在性を免疫組織学的に、また泌乳に伴う変動をノザンプロットにより検討する。また、この遺伝子 (あるいはCD36遺伝子) の各器官における発現を解析し、肝臓CD36のcDNAクローニングにより、CD36とPAS-4の構造上、機能上の差異を明らかにすることを目的とする。

## 1. PAS-4糖タンパク質の精製及びその生化学特性

### 実験方法

#### MFGMの調整

MFGMの調整はクリームを蒸留水で洗浄し、膜物質を超遠心法で回収するKanno and Kimの方法[1]に従った。バターミルクとバターセラムを合わせ、4℃、3,000xgで15分間遠心分離し、チャーンされずに上層に浮上したクリームを除去した残りの画分を膜物質として回収した。膜物質を超遠心分離 (100,000xg 4℃、60分) し、得られた沈殿物を蒸留脱イオン水に分散し、MFGMとして用いた。

#### PAS-4の精製

PAS-4の単離法としては、Greenwaltらの方法[2]がよく用いられているが、その方法は、異なるpH

(pH8.0、7.0、6.0)での3段階溶出によるイオン交換クロマトグラフィーに基づいており、長時間を要し、回収率も低い。モノクローナル抗体の作成や、クローニングのためのプローブの作成に不可欠なアミノ酸配列情報を得るためには、まとまった量のPAS-4が必要となる。そこで迅速かつ収率のよいPAS-4精製法の開発の検討から始めた。

MFGMからのPAS-4精製法の概略を Fig. 1-1 に示す。まず、MFGMをGreenwaltらの方法[2]により可溶化した。すなわち、1% Triton X-114を含む20mM Tris-HCl (pH7.4、0.15M NaCl、1mM EGTA、1% アプロチニン、0.5mM フェニルメタンсульフォニルフルオリド (PMSF) を含む) で最終タンパク質濃度が5 mg/mlになるように懸濁し、4℃で30分攪拌した。その後、100,000xg、4℃で60分間超遠心分離した。その上清を30℃まで加温し、1,000xg、室温で15分間遠心分離し、Triton X-114可溶性画分を得た。これを20mM Tris-HCl (pH7.4、0.15M NaClを含む) で10倍希釈し、氷中で4℃まで冷却後、30℃まで加温して再び1,000xg、15分、室温で遠心分離後、Triton X-114可溶性画分(以下TX-画分)を回収した。

TX-画分を10mM Tris-HCl (pH7.5、0.5% Triton X-100、2mM PMSFを含む) 平衡化緩衝液に対して透析し、DEAE-Sepharose CL-6Bカラム (1.5×15cm) に供し、イオン交換クロマトグラフィーを行った。平衡化緩衝液で非吸着タンパク質を洗浄し、吸着画分を0~0.5M NaCl直線濃度勾配により溶出した。

#### SDS-ポリアクリルアミド電気泳動

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) はLaemmliの方法[3]によって行った。アクリルアミドとメチレンビスアクリルアミドの濃度比は37:1 (w/w)、分離ゲルのアクリルアミド濃度は10%あるいは15%、濃縮ゲルのアクリルアミド濃度は5%とした。Coomassie brilliant blue R-250 (CB) でタンパク質染色、過ヨウ素酸-Schiff試薬 (PAS) で精染色した。

#### タンパク質定量

タンパク質の定量は、阻害物質が存在しない場合にはLowryらの方法[4]の改良法であるMarkwellらの方法[5]で行った。高濃度の尿素、硫安、Triton X-114などが存在する場合は、まずPetersonの方法[6]によりタンパク質を沈殿させ、次いでMarkwellらの方法に従ってタンパク質を定量した。ウシ血清アルブミンを標準タンパク質とした。

#### アミノ酸分析

アミノ酸分析はフェニルイソチオシアネート (PITC) を微アルカリ性でアミノ酸の $\alpha$ -アミノ基にカップリングさせ、生成するPTC-アミノ酸を逆相HPLCで分離、定量するBidlingmeyerらの方法[7]に準じて行った。HPLCはCapcell Pak C-18逆相カラム (4.6×150nm) を装着したSP-8800装置により、溶媒Aと溶媒B (水:アセトニトリル=40:60) を用い、0分 (A:B=100:0)→12分 (A:B=50:50)

→14分 (A : B = 0 : 100) → 18分 (A : B = 0 : 100) の濃度勾配で行った。PTC-アミノ酸は254nmで検出した。

#### 等電点電気泳動

5.0%アクリルアミド、0.25%メチレンビスアクリルアミド、5M尿素、2%Triton X-100、0.0005%リボフラビン、0.0625%TEMED、0.025%過硫酸アンモニウムおよび2%アンフォライン (pH3.5~10) よりなるゲル溶液[8]をMultiphor apparatusのUltrodexのflat bed (0.4×11×24cm) に注入し、蛍光灯下で重合させた。電気泳動は陽極に1Mリン酸、陰極に1M NaOHを用いて10℃、0.3w/cm<sup>2</sup>で1.5時間予備泳動後、サンプルを添加して (15~20μl (タンパク質10~15μg))、さらに同じ電圧で3時間泳動した。表面電極を用いてゲル上のpH勾配を測定後、ゲルを15%TCAに浸してタンパク質を固定し、メタノール：酢酸：水 (3 : 1 : 6) でアンフォラインを洗い出し、CB染色した。

#### シアリダーゼ消化

糖タンパク質 (500μg) を0.1M酢酸緩衝液 (pH5.0) 0.5mlに溶かし、40mUシアリダーゼ (*Cl. perfringens*) を加えて37℃で16時間消化後、100℃で3分間加熱して反応を停止した。これを蒸留水に対して透析し、凍結乾燥して、等電点電気泳動の試料とした。

#### 糖分析

凍結乾燥したPAS-4タンパク質約1mgを、2M NaBH<sub>4</sub>を含む0.1M NaOH (0.5ml) に溶解し、45℃で8時間インキュベートした[9]。反応後、4M酢酸で中和、透析、凍結乾燥し、糖分析用試料とした。

中性糖とアミノ酸は、Suzukiらの方法[10]に基づいて、4M HClと4M TFAを20mlずつ加えて100℃で3時間加水分解後、2-ピリジルアミノ化誘導体 (PA化糖) として分析した。同時に標準糖 (GalNac、GlcNac、Man、Gal、Glc、Fuc) も同じ条件で処理した。定量はTSK gel Sugar AX I カラム (4.6×150mm、5mm) を装着したHPLCにより、0.7M Borate-KOH (pH9.0、10%アセトニトリル) を用い、流速0.4ml/分、カラム温度70℃、検出は日立F-1050蛍光光度計を用いて励起波長310nm、測定波長380nmで行い、クロマトパックC-R5Aで記録した。

O-グリコシド結合糖鎖は、PAS-4 (1mg/0.5ml) に2M NaBH<sub>4</sub>を含む0.1M NaOH (1mg protein/0.5ml) を加えて45℃で8時間処理することにより解離し[11]、PA-化後、上記と同様に糖含量を測定した。

シアル酸の定量は、まず、フェノール-硫酸法により中性糖を測定し、糖含量が約80mg/ml濃度になるように試料を調整し、Haraらの方法[12]に従って蛍光誘導体としHPLCで分析した。カラムはCapcell Pak C18 (4.6×150mm、5ml) を用い、溶出液はMeOH : CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O = 2 : 0.5 : 10、流速は1ml/分、カラム温度は室温、検出は励起波長373nm、測定波長448nmとした。

## ウエスタンブロットリングおよびレクチン染色

TX-画分をSDS-PAGEで分析後、セミドライ-ブロットリング装置（ザルトプロットⅡ）を用い、2.5 mA/cm<sup>2</sup>で20分間ポリビニリデンフルオリドメンブレンフィルター（PVDF膜）へ転写した[13]。転写後、パーオキシダーゼ標識レクチン（HRP-レクチンキット-B）との結合、ジアミノベンジジン、過酸化水素との反応により染色した。

ビオチン標識したWFA（*Wistaria floribunda*）によるMFGMレクチン染色は、同様にウシMFGMをSDS-PAGE後、PVDF膜に転写し、これにビオチン標識したWFAレクチンを反応させ、ストレプトアビジン-パーオキシダーゼを結合、ジアミノベンジジン、過酸化水素との反応により発色させた。

## 結 果

### PAS-4の精製

#### Triton X-114による選択的可溶化

MFGMをSDS-PAGE後、CB染色し、スキヤニングにより各タンパク質のバンドの面積比を求めたところ、CBで染色されるMFGM全タンパク質中に占めるPAS-4の割合は3%であった（Fig.1-2Aのレーン2、Bのレーン4、Cのレーン6）。MFGMを1% Triton X-114を用いて可溶化した場合は、抽出タンパク質中に占めるPAS-4の割合は約26%まで上昇し（Fig.1-2Aの3、Bの5、Cの7）、約82%のPAS-4がMFGMからTX-画分に抽出された。

1% Triton X-114により可溶化させる可溶性画分のタンパク質濃度は、抽出時間に影響されなかった（Table1-1、Fig.1-3、レーン8~10）。1% Triton X-114を用いて4℃で1時間以上攪拌した場合、攪拌時間の延長に伴ってTX-画分中にタンパク質濃度は若干上昇するが、PAS-4のみではなく、他のタンパク質も一緒に抽出された。このことから、本実験では4℃で30分攪拌することにした。これまでに報告されている他の方法[1、14~16]と比べ、MFGMからPAS-4を選択的に可溶化する方法として非常に優れていることが示された。

#### DEAE-Sepharoseイオン交換クロマトグラフィー

PAS-4を単離するために、TX-画分をDEAE-Sepharoseにおけるイオン交換クロマトグラフィーに供した。Fig.1-4にその溶出パターンを、Fig.1-5に得られた各画分のSDS-PAGEパターンを示す。PAS-4はpH7.5において素通り画分（Fig.1-4、画分1）に溶出され、SDS-PAGEでは単一のバンドとして検出された（Fig.1-5、レーン3、10）。画分2（Fig.1-4）には、大部分のPAS-4の他に微量の低分子量の成分が混在していたが、その収量は少なかった（Fig.1-5、4、9）。TX-画分に多く含まれていたCB-1、PAS-5、6、7では0.1~0.5M NaClで溶出された（Fig.1-4、画分3、4、Fig.1-5、レーン5~8）。

Table1-2はPAS-4の回収率を示している。MFGM226mgからTX-画分22.1mgが抽出され（そのうち

PAS-4は5.7mg)、DEAEの素通り画分1には3.9mg(48%)、画分2には1.1mg(13%)回収された。Greenwaltら[2]は異なるpH (pH8、7、6) によるCM-Sepharoseイオン交換クロマトグラフィーにより29%回収されることを報告している。現在一般に用いられているGreenwaltら[2]に方法より、さらに簡便で収率のよいPAS-4の単離精製法を開発することができた。

## PAS-4の生化学的特性

### 分子量

SDS-PAGEにより精製PAS-4の分子量は78,000と推定された (Fig.1-6)。これまでの報告によると、PAS-4の分子量は76,000~85,000[1、17~21]であり、精製PAS-4の分子量はこれらの範囲内にあった。

### 等電点

PAS-4は、等電点7.45、7.41、7.32に相当する3成分に分離され (Fig.1-7、A) これまでの報告の6.1~8.0[21]、7.8~8.5[2]と類似する結果となり、また、PAS-4がpH7.5におけるDEAE-Sepharoseイオン交換クロマトグラフィーで素通り画分に溶出されたこととも矛盾しない。

シアリダーゼ処理したPAS-4は、Fig.1-7のBに示すように、pI7.47に相当する1つの成分に収束し、PAS-4の等電点における不均一性は糖鎖の非還元末端に位置するシアル酸残基数の差によるものと推定された。

### アミノ酸組成

PAS-4のアミノ酸組成をTable1-3に示す。PAS-4は非極性残基をもつ疎水性アミノ酸であるAla、Ile、Met、Phe、ProおよびValが4.25mol%を占め、非常に疎水性が高いタンパク質であることが確認された。中性で非極性残基の側鎖をもつCys、Ser、ThrおよびTyrは17mol%であった。CysやMetなど含硫アミノ酸は少なく、Val、LeuおよびIleなどの側鎖分枝を持つアミノ酸が比較的多く含まれていた。

### 糖組成ならびにレクチンとの反応

PAS-4の糖含量は7.2%であり、Man、Gal、Fuc、GalNac、GlcNac、シアル酸からなっていた (Table1-4)。Haraら[12]は加水分解時間とシアル酸の遊離との関係について調べた結果、タンパク質によって酸加水分解時間を設定する必要があることを報告している。そこで、30分から8時間まで加水分解時間を変えて遊離するシアル酸を定量した結果、遊離されるシアル酸量は加水分解後2時間まで急激に増加したが、それ以上ではほとんど変化しなかったため、PAS-4の加水分解時間は2時間とした。

多量のManとGalNacの存在から、PAS-4にはN-グリコシド結合糖鎖およびO-グリコシド結合糖鎖が混在していることが示唆された。Table1-5に、温和なアルカリ条件下でPAS-4を処理し、糖組成の変

化を調べた結果を示す。アルカリ処理前のGlcNAcを1として比較した場合、アルカリ処理により、GlcNAcとManは変わらないのに対し、GalNAcとGalは約2/3、Fucは1/4が減少し、全体では約31%の糖が解離された。この結果からもPAS-4にはO-グリコシド結合糖鎖が存在していることが示された。

TX-画分をSDS-PAGE後、PVDF膜に転写して各種レクチンを用いて染色を行った (Fig.1-8)。PAS-4は、ハリエニシダレクチン (UEA-1) との反応を示さなかったが、ピーナッツレクチン (PNA)、ヒママメレクチン (RCA120) とは弱い反応性を示し、コンカナバリンA (Con A)、レンズマメレクチン (LCA)、インゲンマメレクチン (PHA-E4)、ドリコスマメ (DBA)、小麦麦芽レクチン (WGA) とは強く反応した。DBAは、PAS-3とは弱く反応し、PAS-7およびSGPとはわずかな反応しか見られず、その他の糖タンパク質とは全く反応しないことから、MFGMのうちではPAS-4と特異的に反応するレクチンであった。PAS-4と反応しなかったUEA-1はL-Fuc、特にL-Fuc  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4構造を強く認識することから、PAS-4はこの構造を含まないと推測される。

WFAを用いた場合には、PAS-4の他に、MFGMの大部分の糖タンパク質が強く反応した。WFAはGalNAcと親和性を示すレクチンであるが、N-グリカナーゼによってN-グリコシド結合糖鎖を遊離した後のPAS-4とも反応したことから、PAS-4はO-グリコシド結合糖鎖を有することが示された。

## 要 約

乳脂肪球膜 (MFGM) のSDS-PAGEパターンから、PAS-4が全MFGMタンパク質に占める含量は約3%と推定され、そのうちの82%が1% Triton X-114による相分離によって抽出された。このTriton X-114可溶性画分をpH7.5のDEAE-Sepharoseにおけるイオン交換クロマトグラフィーに供することにより、PAS-4は素通り画分に回収され、SDS-PAGEで単一バンドとして検出された。回収率は61%であった。この単離方法は、Triton X-114による可溶化とイオン交換クロマトグラフィーの2段階による精製方法であり、PAS-4を比較的簡易にかつ収率よく回収できる単離方法の開発に成功した。

PAS-4は42.5mol%の疎水性アミノ酸を含む疎水性の高い糖タンパク質であり、pI7.45、7.41、7.32の3成分からなる不均一性が確認されたが、シアリダーゼ処理によりいずれもpI7.47の1成分に収束した。PAS-4の糖含量は7.2%で、そのうちMan、GalNAcおよびGalが約70%を占めた。温和なアルカリ加水分解によるGalNAcとGalの減少、N-グリコシド結合糖鎖と親和性をもつCon AやRCAレクチンとの強い反応性、O-グリコシド結合糖鎖と親和性をもつPNAおよびDBAレクチンとの反応性およびN-グリカナーゼ処理により脱糖処理前後のWFAレクチンとの変化から、PAS-4にはN-およびO-グリコシド結合糖鎖が混在していることが明らかになった。



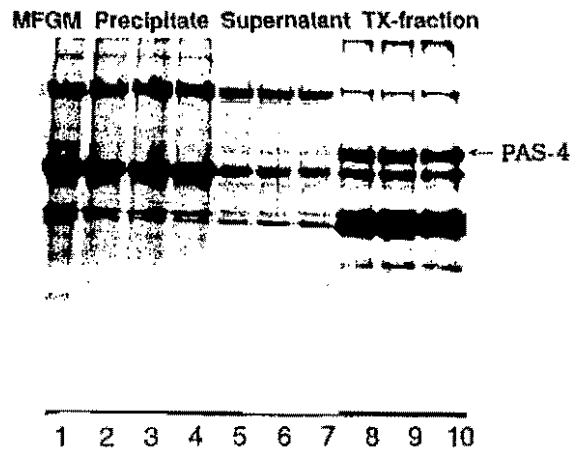


Fig. 1—3 SDS-PAGE patterns showing the effect of extraction time on the phase separation of PAS-4 from MFGM with Triton X-114. MFGM was mixed with 1 %T-114 and submitted to phase separation by mixing for following time : 0.5 hr (lanes 2, 5, 8), 1 hr (lanes 3, 6, 9), 2 hr (lanes 4, 7, 10).

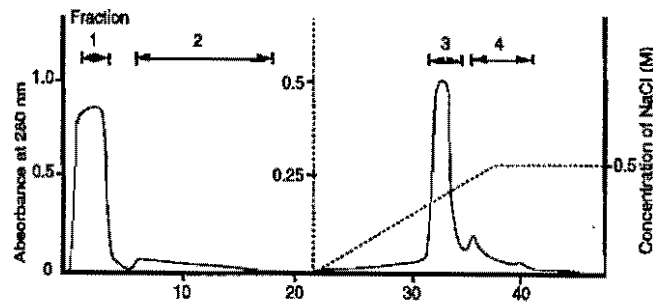


Fig. 1—4 Elution patterns of Triton X-1145 soluble fraction on DEAE-Sepharose chromatography.

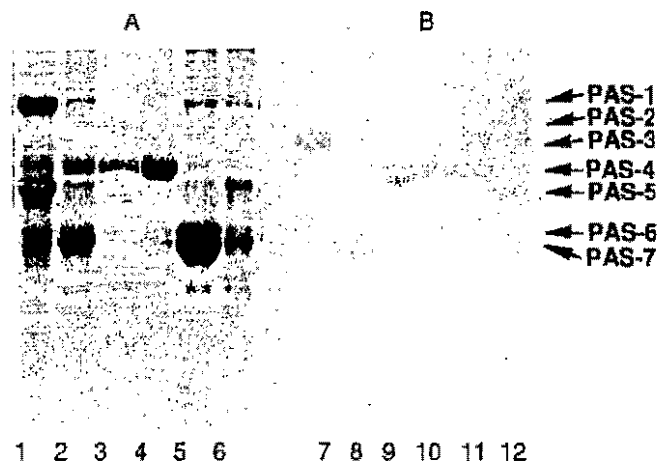


Fig. 1—5 SDS-PAGE patterns of fractions during the purification of bovine PAS-4. Lanes 1 and 12, MFGM ; lanes 2 and 11, Triton X-114 soluble fraction ; lanes 3 and 10, fraction 1 in Fig.1—4 ; lanes 4 and 9, fraction 2 in Fig.1—4 ; and lanes 5 and 8, fraction 3 and 4 in Fig.1—4. Gel A was stained with CB and B was with PAS.



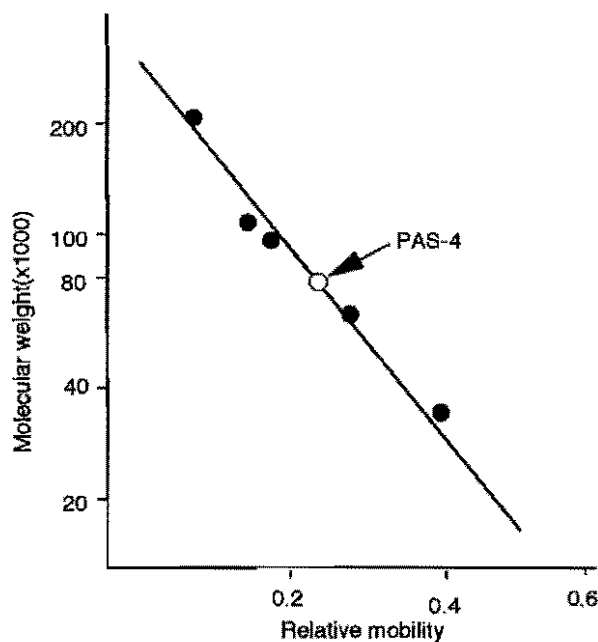


Fig. 1—6 Estimation of the molecular weight of PAS-4 by SDS-PAGE using 15% polyacrylamide gel. Molecular weight markers from the top to the bottom are myosin (205kDa),  $\beta$ -galactosidase (116kDa), phosphorylase b (97kDa), bovine serum albumin (66kDa), ovalbumin (45kDa), and carbonic anhydrase (29kDa).

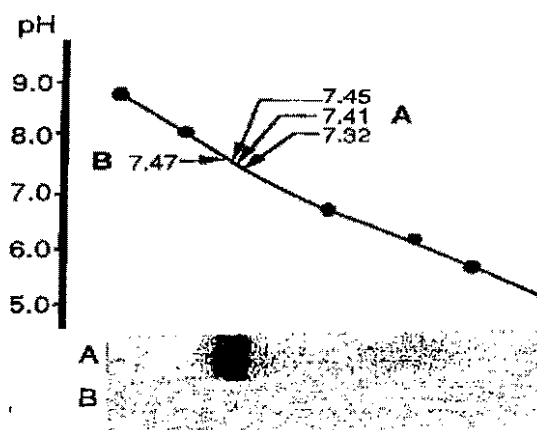


Fig. 1—7 Isoelectric focussing patterns of intact (A) and desialylated (B) PAS-4.

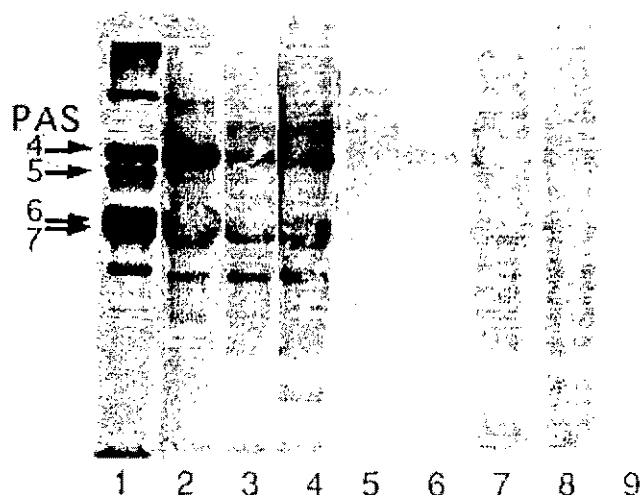


Fig. 1—8 Affinity of Triton X-114 soluble fraction to various lectins.  
Lane 1, CB ; lane 2, Con-A ; lane 4, PHA-E4 ; lane 5, PNA ; lane 6, DBA ; lane 7, WGA ; lane 8, RCA-120 ; lane 9, UEA-1.

Table. 1—1 Effect of extraction time on the yield of protein obtained by phase separation of MFGM with Triton X-114 (n=3, mean±SD)

Stirring time (Hr)	MFGM	Protein amounts(mg)		
		Precipitate*	Supernatant*	TX-fraction
0.5	20.4	14.5±0.5	2.6±0.6	2.0±0.4
1	20.6	13.7±0.3	2.7±0.8	2.1±0.9
2	20.5	13.6±0.7	2.6±0.4	2.1±0.8

\*Separated by centrifugation at 100,000 xg for 60 min at 4°C

Table. 1—2 Summary for purification of PAS-4 from bovine MFGM

Purification step	Total protein (mg)	Purity <sup>a</sup> (%)	PAS-4 <sup>b</sup> (mg)	Yields (%)
MFGM	226	3.0	6.8	100
TX-fraction	22.1	25.8	5.7	83.8
DEAE-Sepharose chromatography				
Fraction 1	3.9	100	3.9	47.4
Fraction 2	1.1	95.	1.0	12.7
Fraction 3	11.8	17.4	0.9	13.2
Fraction 4	3.1	5.6	0.2	2.9

a, Calculated from the scanned relative peak areas of PAS-4 in the bands stained with Coomassie brilliant blue R-250 after SDS-PAGE.  
b, Shows the amounts of PAS-4 calculated from 'a'.

Table. 1—3 Amino acid composition of PAS-4 from bovine MFGM (mol%) in comparison with the results of Greenwalt et al., (20)

Amino acid	PAS-4	Greenwalt et al.
Nonpolar		
Alanine	5.0	5.8
Glycine	6.3	6.7
Isoleucine	7.8	8.2
Leucine	8.4	9.5
Methionine	1.2	1.0
Phenylalanine	5.3	6.6
Proline	6.2	5.2
Valine	8.6	9.5
Polar (uncharged)		
Cysteine	1.3	1.8
Serine	7.3	7.3
Threonine	8.0	8.4
Tyrosine	3.4	3.8
Polar (charged)		
Aspartic acid	7.6	7.7
Glutamic acid	6.3	3.4
Arginine	3.3	2.7
Histidine	5.9	5.0
Lysine	8.2	7.6

Tryptophan was not measured.

Table. 1—4 Carbohydrate composition of PAS-4 from MFGM. The amounts shown are the mean  $\pm$  S. D. (n=3).

Carbohydrate	mg/mg of protein	m mole /g of protein
<i>N</i> -Acetylgalactosamine	11.7 $\pm$ 1.4	52.9
<i>N</i> -Acetylglucosamine	8.3 $\pm$ 0.2	37.5
Mannose	20.5 $\pm$ 0.3	113.8
Fucose	3.2 $\pm$ 0.1	19.5
Galactose	18.1 $\pm$ 0.4	100.5
<i>N</i> -Acetylneuraminic acid	10.1 $\pm$ 0.2	32.7
Total	71.9 $\pm$ 0.4	356.9

Table. 1—5 Carbohydrate composition of PAS-4 glycoprotein before and after mild alkaline hydrolysis.

Values are shown as the ratio to *N*-acetylglucosamine before alkaline hydrolysis (m mole/g of protein).

Carbohydrate	Before	After
<i>N</i> -Acetylgalactosamine	1.41	0.43
Mannose	3.03	3.03
Fucose	0.52	0.36
Galactose	2.18	0.72
<i>N</i> -Acetylglucosamine	1.00	1.00
Total	8.14	5.54

## 2. PAS-4糖タンパク質のcDNAクローニング

### N-末端アミノ酸配列の分析

精製したPAS-4のN-末端はブロックされていたので、デブロッキングキット（宝酒造）を用い、アシル化されているN-末端の1残基を切りはずした後、N-末端の2番目のアミノ酸配列からApplied BiosystemsのModel476プロテインシーケンサを用いて分析した。

### 内部アミノ酸配列の決定

タンパク質：酵素=50：1の濃度として5M尿素を含む50mM Tris-HCl buffer (pH7.8、200 $\mu$ l) に溶かし、37℃で6時間インキュベートし、反応液の上清をCapcell PAK C8逆相カラム (0.75 $\times$ 250mm) を用いたHPLCに供した。溶出は0.1%TFA中で、90%アセトニトリルを0から66.7%/hの直線濃度勾配で行った。流速1 ml/min、カラム温度45℃、230nmで検出した。溶出されたペプチドをピークごとに分取し、Applied BiosystemsのModel476プロテインシーケンサを用いてアミノ酸配列分析を行った。

### プライマーオリゴヌクレオチドの合成

RT-PCRを行うため、上記により決定したアミノ酸配列に基づいてオリゴヌクレオチドを合成した (Table2-1)。P4-5プライマーはPAS-4のN-末端配列から、P4-3はPAS-4の内部アミノ酸配列に基づいて設定した。

### mRNAの調整

Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform法[22]に基づき、TRIzol Reagent (T試薬) を用いて行なった。エタノール沈殿物として全RNAを回収し、RNA/DNA calculatorにてその濃度を測定した。調整した全RNAから、垣塚の方法[23]によりOligotex-oligo dTカラムを用いてmRNAを調整した。

### アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動はMupid-2装置を用いて行なった。アガロースゲル (0.6~1.5%) を0.5 $\times$ TBEで調整し、100V定圧で泳動を行なった。泳動終了後、エチジウムブロイマイド (0.5 $\mu$ g/ml) で可視化した。

### RT-PCR

ウシ乳腺から調整したmRNAを用い、ランダムプライマーあるいはOligo-dTプライマーでfirst strand cDNAを合成し、PCRのテンプレートとした。N-末端配列および部分アミノ酸配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプローブとし、熱変性を94℃で1分(最初の1サイクルのみ3分)、アニーリングは52℃で5分、増幅は72℃で3分(最後の1サイクルのみ10分)、30サイクルでPCRを行なった。

反応液 3  $\mu$ l を 0.8% アガロースゲル電気泳動で分析した。

#### 5'-RACE および 3'-RACE PCR

前述の first-strand cDNA から second-strand cDNA を合成し、ClonTech 社製、Marathon kit を用いて RACE-PCR を行った。プライマーには上記の PCR 産物の塩基配列を基に作成した 4 種のオリゴヌクレオチド (Table 2-2) を使い、94°C で 30 秒間熱変性、60°C で 30 秒間アニーリング、68°C で 1 分間増幅を 30 サイクル行った。PCR の反応液から 5  $\mu$ l 採取し、1% アガロースゲルで分析した。

#### アガロースゲルから PCR 産物の精製

PCR 産物は Gene Clean II kit を用いて精製した。ガラスミルクに結合している DNA の回収には TE (5  $\mu$ l) 溶出処理を 2 回繰り返した。

#### ライゲーション

ライゲーションは宝酒造の DNA ligation kit Ver. 2 を用いて行った。ベクターは、TA cloning Kit の PCRTM II を用いた。

#### 形質変換

コンピタント細胞 (200  $\mu$ l) を氷上で解かし、ライゲーション産物 10  $\mu$ l を加え 30 分間放置した。42°C で 30 秒間加温し、直ちに氷上に移し、2 分間冷やした。1 ml SOC を加え、37°C で 1 時間インキュベートした。これを LB/Agar broth プレートに撒いて、37°C で一晩インキュベートすることによりカラーセレクトーションを行った。

#### ミニプレップによる DNA の精製

カラーセレクトーションにより選択したコロニーからミニプレップによりその DNA を精製した。エタノール沈殿させた DNA を 75% エタノールで 1 回洗浄し、室温で 10 分間放置によりエタノールを除去したものに 10  $\mu$ l の TE を加えて溶解し、以後の分析に用いた。

#### シーケンス分析

T7 sequencing kit を用いて Dideoxy 法シーケンスを行ない、X 線フィルムに室温で一晩感光させた。

## 結 果

#### N-末端および部分アミノ酸配列の解析

精製した PAS-4 の N-末端配列を分析した結果、N-末端側アミノ酸がブロックされており、配列を解

析することができなかつたため、デブロッキング後にN-末端側の配列を分析し、X-Cys-Asn-Arg-Asn-Cys-Gly-配列を得た。さらに、トリプシン分解によりPAS-4の内部アミノ酸配列を調べた (Fig. 2-1)。約43分に溶出されたペプチドの配列はLeu-Leu-Trp-Gly-Tyr-Thr-Asp-Pro-Phe-Leuであった。この配列とN-末端側配列に基づいてオリゴヌクレオチドを合成した (Table 2-1)。

Table. 2-1 Nucleotide sequences and locations of oligonucleotide primers for RT-PCR.

No. Primers	Sequence	Location
P4-5 sense	5'-GGCTGTAATCGGAAGTGTGGG-3'	1 to 21
P4-3 antisense	5'-GAATGGATCGGTATAGCCCCA-3'	555 to 535

#### RT-PCRによるDNAの増幅ならびにその塩基配列

乳腺組織から調整したtotal RNAと、上記で設定したプライマーを用いてRT-PCRを行った結果、約560bpのPCR産物が増幅されていた (Fig. 2-2、レーン2)。これをPCRベクターにライゲーションした後、DH5に形質変換し、カラーセクションを行い、500kbp付近のPCR産物と類似する大きさのインサートを持つクローンを21個選び、そのDNA配列を分析した (Fig. 2-3)。

解析した PAS-4 cDNA のホモロジーを検索した結果、ヒト胎盤のCD36[24]と約85%のホモロジーを示した (Fig. 2-4)。これらの2つの糖タンパク質は同じか、もしくは非常に類似するタンパク質であると考えられたので、ここで得られた塩基配列を基に、続いて全長cDNAsをクローニングすることにした。

#### 5'-、3'-RACEによる全長cDNAのクローニング

Table 2-2に示すプライマーを用い、5'-および3'-RACE PCRを行った (MA-1とMA-2はアンチセンスプライマーとして、MA-3とMA-4はセンスプライマー)。ds DNAを鋳型に5'-および3'-RACE PCRを行った結果、MA-2とAP (アンカープライマー)-1 (Fig. 2-5、レーン5) およびMA-4とAP-1 (Fig. 2-5、レーン3) の組み合わせにより、5'-RACE PCRでは主に約0.7kbpの産物が、また、3'-RACE PCRでは約1.3kbpの産物と幾つかのマイナー産物が増幅された。PAS-4のORF全長cDNA配列をヒト胎盤CD36[24]とともにFig. 2-6に示す。ここには示していないが、PAS-4のcDNAは、開始コドンの上流側12残基目からShine-Dalgarno配列と同じ配列 (-agaa-) を持つこと、1414-6にTAA終止コドンがあり、3'-下流側にポリアデニレーション刺激配列 (-aataaa-)、ポリ(A)-テール配列が確認された。

Table. 2-2 Nucleotide sequences and locations of oligonucleotide primers for 5'-and 3'-RACE PCR.

No. Primers	Sequence	Location
MA-1 antisense	5'-GAATGGATCGGTATAGCCCCA-3'	555 to 535
MA-2 antisense	5'-CAATAGTTCCTTCAAAGTTC-3'	534-515
MA-3 sense	5'-GAATACTCAATTCATTTATC-3'	464-483
MA-4 sense	5'-ACTGAGGATGACAAGTTCACC-3'	385-405

また、5'-側の開始コドンの上流側および3'-側の終止コドンの下流側の配列はヒト胎盤のCD36と異なっており、PAS-4およびCD36の生合成は種特異的であることが示唆された。PAS-4はORFの塩基配

列レベルではCD36と約86%のホモロジーを持つことが認められた。

塩基配列から予測されるアミノ酸レベルでのPAS-4とヒト胎盤のCD36には、Fig. 2-7に示すように、83%のホモロジーが認められた。また、PAS-4は全長471アミノ酸残基からなっており、CD36と同じ長さであった。PAS-4には、CD36と同じ位置に10個のシステイン残基が認められ、これらは立体構造も類似していることが示唆された。

糖タンパク質であるPAS-4のN-グリコシド結合糖鎖部位(Asn-X-Ser/Thr)は、PAS-4には8箇所、CD36では10箇所が認められ、その結合サイトはほぼ同じであった。SDS-PAGE分析でPAS-4はCD36よりその分子量が約7,000小さいことが確認されたが、これらはN-グリカナーゼ処理あるいはエンドグリコシダーゼ処理Fにより同じ大きさの分子量として検出されることを前年度に明らかにした。従って、この2つの糖タンパク質の分子量の差は、PAS-4にN-グリコシド結合糖鎖部位が2つ少ないこと、あるいは各糖鎖の非還元末端に結合しているシアル産残基の差によることの可能性が考えられる。このことはすなわち、この2つのタンパク質には少なくとも部分的な種あるいは器官が特異的変異が起きていることを示唆する。

#### PAS-4の構造的特徴

PAS-4のアミノ酸配列のBigelowの方法[25]により求めた平均疎水性指数は1,226cal/残基と高く、内在性タンパク質であることが示唆された。PAS-4 cDNAのKyte-Doolittleの指数[26]から5ずつのアミノ酸残基を1つにして疎水制度をプロットした結果、N-末端側およびC-末端側付近に非常に疎水性度が高いセグメントが認められた(Fig. 2-8)。N-末端側は8番目のValから28番目のValまでの21残基にかけて疎水性アミノ酸が密集しており、また、C-末端側の448のLeuから460のIleまでの13残基が疎水性度が高く、これらの2つの領域が膜貫通の疎水性領域にあると考えられる。しかしながら、 $\alpha$ -ヘリックスや $\beta$ -シートにより折りたたまれて三次構造を形成する際に、これらの疎水性度あるいはシステイン残基などがどのように影響するかは不明である。

以上の結果に基づいてPAS-4はどのような形で細胞膜に存在しているかを推測した。Fig. 2-9に示すように、PAS-4のN-およびC-末端側の2つの貫通膜の疎水性領域があり、N-末端およびC-末端の短いシステイン残基を含む数残基の配列は細胞質側に配向すると考えられる。PAS-4に含まれている8つのN-グリコシド結合糖鎖部位は全てルーメン側に配向する。240-330残基間のプロリンに富む配列の内局在しているシステイン残基は、いずれがS-S結合の形成に関与しているかは不明であるが、ルーメン側に配向していると考えられる。

#### 要 約

RT-PCRプライマー設計のため、PAS-4のN-末端アミノ酸配列<(X)-Cys-Asn-Arg-Asn-Cys-Gly->ならびに内部の部分アミノ酸配列<Leu-Leu-Trp-Gly-Tyr-Thr-Asp-Pro-Phe-Leu->を決定し、それに基づ

きプライマーを合成した。ウシ乳腺total RNAを用いてPCRを行い、555bpのPCR産物からPAS-4の5'-frame側の塩基配列を決定した。また、Marathonキットを用いて5'-frameの上流側および3'-frameの下流側のクローニングを行い、全長1,882残基からなる塩基配列を決定した。PAS-4のタンパク質をコードする塩基配列のホモロジー検索を行った結果、ヒト胎盤CD36と約86%のホモロジーが認められた。PAS-4は471のアミノ酸残基からなり、CD36と同じ長さであった。アミノ酸レベルでPAS-4はCD36とは約83%のホモロジーが認められた。PAS-4は8つのN-グリコシド結合鎖部位を持ち、10個のシステイン残基を有していた。システイン残基はすべてCD36と同じ位置に保存されており、N-末端側の2つを除いて8つはC-末端側半分に偏在していた。PAS-4の疎水性度の解析から、8番目のValから28番目のValまでの21残基のN-末端側および448のLeuから460のIleまでの13残基のC-末端側の短い配列は細胞質側に、8つのN-グリコシド結合鎖部位をもつ大部分のアミノ酸領域をルーメン側に配向し、さらに、ルーメン側の29番目から447番目のアミノ酸配列から疎水性度が高い領域が4箇所が膜と結合している構造を提案した。





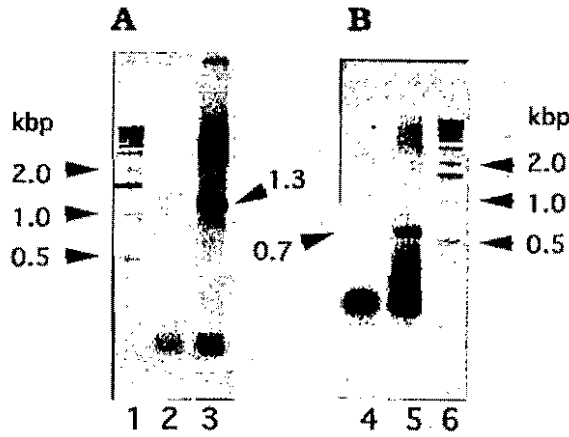


Fig. 2—5 3' (A)-and 5' (B)-RACE PCR products of PAS-4 cDNA from bovine mammary gland. Lanes 1 and 6, ladder ; 2, primer MA3/AP1 ; 3, primer MA4/AP1 ; 4, primer MA1/AP1 ; 5, primer MA2/AP1

```

PAS-4 085TCGAAATCGAAACTGTGGGCTAATGCTGCTGTCATGTTGGTCCAGTCTGGCTATG 80
CD36  GGCTGTGACCGAATCTGTGGCTCATGCTGGGCTCTCATTTGGTCTGTCCTGGCTGTG
TTTGGAGCGATTCCTAATGCCAGTGGAGACATGCTTATTTGAGAGAGCAATTAAGAAGAA 120
*****
TTTGGAGGTATTCCTAATGCCAGTGGAGACCTGCTATCCAGAAATCAATTAAGAAGCAA
GTGTTCTCTGAAGTAGGCACAAATGCTTTTAAAAATTTGGTTAAACAGGCACAGATTTI 160
*****
GTGTTCTCTGGAAGTAGGCACAAATGCTTTTAAAAATTTGGTTAAACAGGCACAGAAATTT
TACAGACAGTATTGAAATTTGATGTCAGAAATCCAGATGAAATGAACTTAAACAGCAGC 240
*****
TACAGACAGTATTGAAATTTGATGTCAGAAATCCAGAGAAATGAACTTAAACAGCAGC
AAAATTAAGTAAAGCAAAAGAGGCTCTTACACATACAGACTTCTGTTATGACCAAGGAA 300
*****
AAGCTTAAAGTAAAGCAAAAGAGGCTCTTACAGACTTAAAGAGTAAAGTAAAGTAAAGAA
AATTAACCCAGGACCTGAAAGCAACACGCTTTTCTCTCCAGCCCAATGAGCCCATC 360
*****
AATTAACCCAGGACCTGAAAGCAACACGCTTTTCTCTCCAGCCCAATGAGCCCATC
AATTAACCCAGGACCTGAAAGCAACACAGCTTTTCTCTCCAGCCCAATGAGCCCATC 420
*****
TTTGAACCTGTCATCAGTGGAACTAGGAGTGAATAGTTGACCTTCTCAACCTTCAACCTGCT
TTTGAACCTGTCATCAGTGGAACTAGGAGTGAATAGTTGACCTTCTCAACCTTCAACCTGCT 480
*****
GTAGAGCTGTCAGCAGAGCTCTATGCAAAATCAATTTATGCAAGGAACTACTGATTTCAIT
*****
GTAGAGCTGTCAGCAGAGCTCTATGCAAAATCAATTTATGCAAGGAACTACTGATTTCAIT
ATCAAAAGTCCAAATTTCTATGTTTTCAAAGCAAGCTTTGAAGAACTATTGTTGGGG 540
*****
ATTAACAGTCCAAATTTCTATGTTTTCAAAGCAAGCTTTGAAGAACTATTGTTGGGG
TATAGGATCCATCTTAAATTTGGTTCATGCTTACTACTACTACAAATTTGTTGTT 600
*****
TATAGGATCCATCTTAAATTTGGTTCATGCTTACTACTACTACAAATTTGTTGTT
TATGCTTACAATAATGCTGGATGAAATTTTCAAGGTTTTCATGAAAGGACAGACATA 660
*****
TATGCTTACAATAATGCTGGATGAAATTTTCAAGGTTTTCATGAAAGGTTTTCATGAA
AGCAAAATTTGCTATTTATGACATACAAAGGCAAGAAATTTCTCTCAATTTGCTCAAGT 720
*****
AGCAAAATTTGCTATTTATGACATACAAAGGCAAGAAATTTCTCTCAATTTGCTCAAGT
AGCAAAATTTGCTATTTATGACATACAAAGGCAAGAAATTTCTCTCAATTTGCTCAAGT 780
*****
TATGTTACCTGATTTATGACATACAAAGGCAAGAAATTTCTCTCAATTTGCTCAAGT
CACTCCGACATGATTTATGACATACAAAGGCAAGAAATTTCTCTCAATTTGCTCAAGT 840
*****
AGGCTATTTCAAAATTTCTCTCAATTTGCTCAATTTGCTCAAGT
GAAATTAATTTGAAAGGAAATTTCTCTCAATTTGCTCAATTTGCTCAAGT 900
*****
GAAATTAATTTGAAAGGAAATTTCTCTCAATTTGCTCAATTTGCTCAAGT
TCTGCAATTTCAAAATTTCTCTCAATTTGCTCAATTTGCTCAAGT 960
*****
TCTGCAATTTCAAAATTTCTCTCAATTTGCTCAATTTGCTCAAGT
TCTGCAATTTCAAAATTTCTCTCAATTTGCTCAATTTGCTCAAGT 1020
*****
TCTGCAATTTCAAAATTTCTCTCAATTTGCTCAATTTGCTCAAGT
TCTGCAATTTCAAAATTTCTCTCAATTTGCTCAATTTGCTCAAGT 1080
*****
TCTGCAATTTCAAAATTTCTCTCAATTTGCTCAATTTGCTCAAGT
TCTGCAATTTCAAAATTTCTCTCAATTTGCTCAATTTGCTCAAGT 1140
*****
TCTGCAATTTCAAAATTTCTCTCAATTTGCTCAATTTGCTCAAGT
TCTGCAATTTCAAAATTTCTCTCAATTTGCTCAATTTGCTCAAGT 1200
*****
TCTGCAATTTCAAAATTTCTCTCAATTTGCTCAATTTGCTCAAGT
TCTGCAATTTCAAAATTTCTCTCAATTTGCTCAATTTGCTCAAGT 1260
*****
TCTGCAATTTCAAAATTTCTCTCAATTTGCTCAATTTGCTCAAGT
TCTGCAATTTCAAAATTTCTCTCAATTTGCTCAATTTGCTCAAGT 1320
*****
TCTGCAATTTCAAAATTTCTCTCAATTTGCTCAATTTGCTCAAGT
TCTGCAATTTCAAAATTTCTCTCAATTTGCTCAATTTGCTCAAGT 1380
*****
TCTGCAATTTCAAAATTTCTCTCAATTTGCTCAATTTGCTCAAGT
TCTGCAATTTCAAAATTTCTCTCAATTTGCTCAATTTGCTCAAGT 1413

```

Fig. 2—6 Nucleotide sequence of PAS-4 ORF and its homology to human CD36 cDNA counterpart. The asterisks indicate the identical nucleotides between PAS-4 and CD36 (Oquendo et al. (24))

```

PAS-4  ☆ ☆
        GCNRRNCGLIAGAVIGAVLAVFVGGILMPVGDMLIEKTIKKEVVLEEGTIAFKNWVKTGTDV  60
CD36    GCDRNCGLIAGAVIGAVLAVFVGGILMPVGDLLIQRTIKKQVLEEGTIAFKNWVKTGTEV
        YRQFWIEFDVQNPDEVTVNSKIKVKQRGPYTYRVRYLAKENITQDPETNTVSLQPNGAI  120
        YRQFWIEFDVQNFQEVHMNSNIQVKQRGPYTYRVRFLAKENVTQDAEDNTVSLQPNGAI
        FEPLLSVGTEDDKFTILNLAVAAAPQLYPNTFMQGIILNSFIKKS KSSMFQNR TLKELLWG  180
        FEPLLSVGTEDADNFTVLNLAVAAASHIYQNQFVQMLNLSL I KKS KSSMFQVR TLRELLWG
        YTOPFLNLVYPYPIITTTIGVFYFNNTADGIYKVFNGKDDLSKVAIIDTYKGRKNLSYWSS  240
        YRDPFLSLVYPYVTTTVGLFYPYNTADGVYKVFNGKDNISKVAIIDTYKGRKNLSYWES
        ☆
        YCDLLINGTDAASFPPLEKTRVLQFFSSDICRSIYAVFGARINLKGIPYRFLVPSFAFA  300
        HCDLLINGTDAASFPPVFKSQVLQFFSSDICRSIYAVFESDVNLKGLPVRFLVPSKAAFA
        ☆ ☆
        SPFENPDNHCFCTEKII SKNCTLYGVLDIGKCKEGRPVYISLPHFLHGSPELAEPIEGLS  360
        SPVENPDNYFCTEKII SKNCTSYGVLDISKCKEGRPVYISLPHFLYASPDVSEPIDGLN
        PNEEHRSTYLDVEPITGFTLRF AKRLQVNLVLPKSKIEALKNLKHN IVPILWLNETGT  420
        PNEEHRSTYLDLEPITGFTLQFAKRLQVNLVLPKSKIQVLKLNLRN IVPILWLNETGT
        ☆ ☆
        IGDEKAEMFRNQVTGKINLLGLVEIVLLSVGVVVFIAFMISYCACRSKTIK  471
        IGDEKANMFRSQVTGKINLLGLIEMILLVGVVVFVAFMISYCACRSKTIK

```

Fig. 2—7 Homology of amino acid sequences between PAS-4 and CD36.  
 ▽ ; Potential asparagine-linked glycosylation site, ☆ ; Cysteine residue.

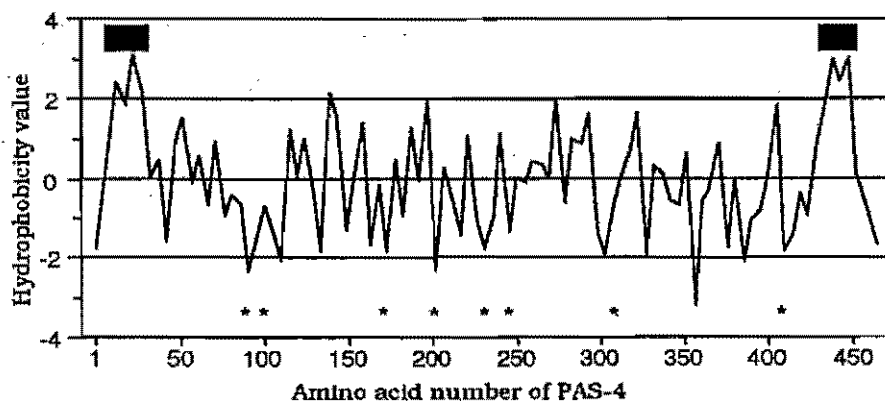


Fig. 2—8 Hydropathy plot of bovine PAS-4.  
 The hydropathy of 5 consecutive amino acids was calculated using the algorithm of Kyte and Doolittle. Black boxes indicate the position of potential trans-membrane segments. \* ; potential asparagine-linked glycosylation sites.

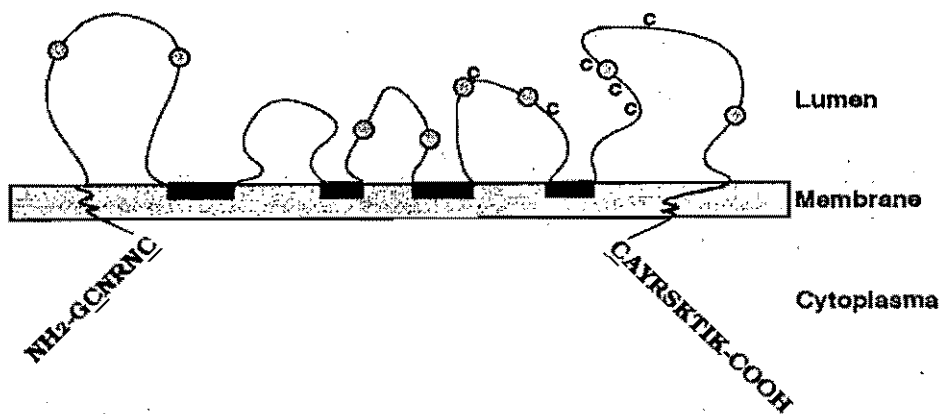


Fig. 2—9 Cartoon depicting the main features of PAS-4 glycoprotein.  
 C, cystein residue. Circles represent oligosaccharide chains. The black boxes show strong hydrophobic region.

### 3. 乳腺発育に伴うPAS-4の発現ならびにPAS-4の器官特異性

#### 実験方法

##### 乳腺及び肝臓の免疫組織染色

組織染色全ての手法は組織学研究法[27]に基づいて行った。泌乳中のホルスタイン牛から採取した乳腺ならびに肝臓組織をZamboni固定液で固定、エチルアルコールで脱水の後、パラフィン包埋した。パラフィン切片を脱パラフィン、再水和し、一晚乾燥後、一部はヘマトキシリン-エオシン染色(HE染色)し、一部は抗体染色に供した。抗体染色には、1次抗体としてKAS-4モノクローナル抗体、2次抗体としてはビオチン標識抗マウスIgGを用い、ストレプトアビジン標識パーオキシダーゼを結合させH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>存在下でアミノベンジジンとの反応により染色した。

##### RT-PCR

乳腺細胞におけるPAS-4の発現量を調べるため、ラットの乳腺細胞からRNAを精製し、RT-PCRを行った。未経産、妊娠末期、泌乳初期の3つのグループのラットを用いた。total RNAの精製およびFirst strandの合成および反応溶液の組成は前年度の報告と同様に行った。各プライマーはラットの脂肪細胞膜から同定されたcDNAの配列[28]を用いて設定した(Table3-1)。PCRは94℃で1分(最初のサイクルだけ3分)、50℃で2分、72℃で3分(最後のサイクルだけ10分)ずつ15、25、35、40サイクルを行った。

Table. 3-1 Nucleotide sequences and locations of oligonucleotide primers used for rat PAS-4 RT-PCR.

No.	Primers	Sequence	Location
R-1	sense	5'-GGAAGTTGTCCITGAAGAA-3'	187 to 205
R-2	sense	5'-GAGGTCCTTACACATACAGAG-3'	330 to 349
R-3	antisense	5'-TTATGTGTAAGGATAAAAACACACC-3'	685 to 662
R-4	antisense	5'-CACAGCATAGATGGACCTGC-3'	900 to 881

Oligonucleotides were synthesized based on rat CD36 sequence reported by Abumard et al. (28)

##### ノーザンブロット

異なる組織で発現しているPAS-4のmRNAを解析するため、各組織からtotal RNAを調整し(前年度と同様の方法)、ノーザンブロット[29]を行った。アガロース1.5gに10×MOPS15mlと滅菌水110mlを加えて溶解し、60℃まで冷却後、25mlのホルムアルデヒドを加えゲルを作成した。total RNA (20μg)

あるいはmRNA (1  $\mu$ g) を滅菌水3.5  $\mu$ lに溶解し、ホルムアミド5  $\mu$ l、10 $\times$ MOPS1.5  $\mu$ l、ホルムアルデヒド2  $\mu$ lを加え、65 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベートした後、氷冷した。3  $\mu$ lの5 $\times$ ダイグリセロールを加え、1 $\times$ MOPS下で3時間電気泳動を行なった。泳動後、0.05M NaOHを用いてRNAをゲルからニトロセルロース膜にアルカリ転写を行い、2 $\times$ SSPEで中和しハイブリダイゼーションを行った。なお、ポジティブコントロールとしてHEL細胞のtotal RNAを用いた。

#### ウシ肝臓のCD36のcDNAクローニング

ウシ肝臓から同様にtotal RNAを精製し、RT-PCRクローニングを行った。用いたプライマーは前年度報告したPAS-4 cDNAの塩基配列に基づいて合成した (Table3-2)。PCRの反応溶液の組成およびそのPCRは乳腺細胞の条件と同様にした。PCR産物を精製し、前年度と同様の方法によりシーケンスを決定した。

Table. 3-2 Nucleotide sequences and locations of oligonucleotide primers used for bovine liver CD36 RT-PCR.

No. Primers	Sequence	Location
L-1 sense	5'-GGGTGCAATCGAAACTGTG-3'	1 to 19
L-2 antisense	5'-CCTTGCATAAATGTATTTG-3'	464 to 446
L-3 antisense	5'-GTAGTAATAGGATATGGAAC-3'	584 to 565
L-4 sense	5'-CAAATCTTCTATGTTTC-3'	492 to 508
L-5 antisense	5'-GAACATTTCCGCCTTCTC-3'	1289 to 1272
L-5 antisense	5'-ATTACTCTCTTTGATCTG-3'	1423 to 1395

Oligonucleotides were synthesized based on the PAS-4 cDNA

## 結 果

#### KAS-4モノクローナル抗体による乳腺及び肝臓の免疫組織染色

ウシの乳腺および肝臓の組織切片を用いてHE染色を行った結果 Fig. 3-1; A、Cを示す。黒く染色されている部分がヘマトキシリンにより染色された細胞核で、赤く染まっている部分がエオシンにより染色された細胞質である。乳腺腺胞腔の周りに密集した乳腺上皮細胞の層が観察される。乳腺腺胞腔内に染色される分泌物も確認された。それに対して肝臓では、密集している肝細胞の周りに毛細血管などが観察された。Fig. 3-1B、DはKAS-4抗体を用いた免疫染色であるが、乳腺の場合 (B)、乳腺腺胞腔に接する細胞のところ、すなわち頂端細胞膜がKAS-4抗体により強く染色され、これ以外に染色される部位は確認されなかった。PAS-4は乳腺上皮細胞に局在している報告も多数あり [2、20、30]、これらの免疫染色の結果と類似している。また、ヒト乳腺におけるPAS-4の発現は、乳腺上皮細胞に

多量に発現されることはClezardinらによって最近報告されている[31]。肝臓では、細胞の中の核の周辺およびリソソームと推測される部位がKAS-4抗体で強く染色された (Fig. 3-1, D)。また、細胞と細胞の隣接する境界も染色されていた。Maenoら[32]は、血小板CD36の単クローン抗体 (MO30) を用いた肝臓の免疫染色で、細胞との境界が強く染色されることを報告している。これはKAS-4抗体を用いた肝臓の染色パターンと類似していた。

このように乳腺と肝臓における染色パターンは明らかに異なっており、器官におけるPAS-4 (あるいはCD36) の機能も異なることが示唆された。乳腺細胞でのPAS-4は、肝臓あるいは血小板などの組織におけるCD36の接着因子としての機能でなく、むしろ分泌機構に関与している可能性が考えられる。

#### 乳腺の発達に伴うPAS-4の発現

2匹ずつの未経産、妊娠末期 (18日目から20日目)、泌乳初期 (分娩後1週間以内) ラットの乳腺からtotal RNAを調整しRT-PCRを行った。乳腺におけるPAS-4の発現量は、妊娠および泌乳期に著しく増加した (Fig. 3-2, レーン3, 8)。乳腺におけるmPAS-4の発現の推移は、各PCRサイクルごとに増幅量をみる半定量的測定に結果 (Fig. 3-3) と一致した。レーン1-4の未経産ラットの場合、40サイクルを行ってもほとんど増幅されるDNAは認められなかった。これに対して、妊娠末期 (レーン5-8)、泌乳期 (レーン8-12) では30サイクル以上ではほとんど一定になった。泌乳初期の発現量は妊娠末期のそれに比べて多かった (Fig. 3-3, レーン5-12)。以上のことは、PAS-4の発現は泌乳期に最大になり、乳腺が退化することによりその発現も減少するとの報告[33]を一致する結果であり、PAS-4は泌乳に何らかの機能を果たしていると考えられる。

#### 各組織におけるPAS-4の発現

ウシの乳腺、肝臓、脾臓、心臓、肺、腎臓の各組織から調整したtotal RNAを用いてノーザンブロットを行った。その結果、各器官においてPAS-4は、約2.9kbpのmRNAとして発現されていたが、シグナルの強さから見られるように、その発現量は異なっていた (Fig. 3-4)。特に、乳腺細胞での発現量が一番多かった。これは、コントロールとして用いた、CD36を発現する細胞として知られているHEL細胞に匹敵する量であった (乳腺組織のPAS-4を1として比較した場合、細胞0.97、肝臓0.38、心臓0.17、腎臓0.41、肺0.19および脾臓0.11)。このように、各器官におけるPAS-4 (あるいはCD36) の発現は器官特異的に行われているのかもしれない。

#### ウシ肝臓におけるCD36のcDNAクローニング

5'-frameのクローニングで、プライマーL1とL3を用いたRT-PCRにより約580bpのDNAが増幅された (Fig. 3-5, レーン4)。しかし、L1とL2の組み合わせで増幅されるDNAは検出されなかった (Fig. 3-5, レーン5)。プライマーL1とL3を用いて得られたPCR産物の塩基配列を解読し、PAS-4 cDNAと

のホモロジー検索を行った。Fig. 3-6にはウシ肝臓のCD36 cDNAの塩基配列をウシ肝臓のそれと比較して示している。両者の間に約89%の高いホモロジーが認められ、塩基の欠損および挿入は見られなかった。しかし、プライマーの部分に器官特異的と考えられる塩基置換が正在进行していることが認められ、このためプライマー-L1とL2セットではRT-PCRで増幅されなかったものと考えられる。

3'-frame側のクローニングでも、プライマー-L4とL5を用いたRT-PCRにより約740bpのがDNA増幅された (Fig. 3-5、レーン3) が、L4とL6の組み合わせで増幅されるDNAは検出されず、プライマー-L6の部位に組織特異的な塩基置換が強く行われている可能性が示唆された (Fig. 3-5、レーン2)。5'-frame と合わせてPAS-4 cDNAウシ乳腺とのホモロジー検索では全体的に約94%の高いホモロジーがあることが認められた (Fig. 3-6)。

塩基配列から予測されたアミノ酸レベルでは、ウシ乳腺のPAS-4と約90%のホモロジーを示した (Fig. 3-7)。塩基置換により生じたミスセンス突然変異により、乳腺PAS-4のよりN-グリコシド結合部位が8つのうち2つ少ないことが確認された。すなわち、101番目のアミノ酸がAsnからIle、171番目のAsnからLysに変わっている。同じ種において90%以上の高いホモロジーを示す部分が存在することは、これまでの研究成果で示されているように、PAS-4およびCD36は非常に類似するタンパク質として、器官特異的な変異あるいはその組織に対する特異的な変異が生じており、それぞれ異なる機能もっていることが考えられる。

乳腺細胞においては、乳腺特有な機能を果たすために、PAS-4遺伝子が発現され、その遺伝子もCD36遺伝子と異なるものであることが示された。また、各種動物におけるPAS-4およびCD36は非常に類似するタンパク質であるが器官特異的、種特異的に塩基置換がおこり、それによってその機能も異なる可能性が示唆された。今後、同一種におけるPAS-4とCD36のゲノムを解析することにより、これを明らかにする必要があるだろう。

本研究で、ウシとラットの臓器を用いてPAS-4の発現を解析した。抗体による染色パターンの違いや同じ種にも関わらず発現しているPAS-4およびCD36 cDNAの塩基配列の差などから、この2つの糖タンパク質は非常に類似していることが明らかになった。接着タンパク質として知られてきたCD36と異なって、頂端細胞膜に局在するPAS-4は乳の分泌機構に何らかの役割を果たしている可能性が期待される。

## 要 約

ウシおよびラットの乳腺と肝臓組織のPAS-4抗体での免疫染色によって、ウシ乳腺細胞では乳腺細胞の乳腺腺胞腔側が強く染色された。これに対して、ウシ肝臓では、細胞核の周囲あるいは細胞質のなかが強く染色された。ラット乳腺では、その染色の感度は低い、乳腺上皮細胞が染色された。

RT-PCRで得られたラットの乳腺におけるPAS-4の発現量は、非泌乳期の乳腺で極くわずかであったが、妊娠末期あるいは泌乳期に急激に増加した。胎児と肝臓における多量のPCR産物はCD36であると

推測された。これはPAS-4とCD36のcDNAは非常に類似しており、PAS-4あるいはCD36のcDNAを基づいてプライマーを合成してもRT-PCRによりDNAは増幅されていることを示している。

ノーザンブロット分析により2.9kbpの大きさのPAS-4遺伝子が乳腺組織の他に腎臓、肝臓、HEL細胞において多量発現されていた。脾臓、肺および心臓にもその発現量は少ないがPAS-4が発現されていた。

ウシの肝臓のCD36のクローニングによって1,287残基からなるウシ肝臓CD36の部分的なcDNAの塩基配列を解読した。ウシ乳腺PAS-4 cDNAと約94%の高いホモロジーがあり、塩基の挿入あるいは欠失部分は認められなかった。塩基配列から予測したアミノ酸配列では、PAS-4と約90%のホモロジーを示した。塩基置換によるミスセンス突然変異が起こりN-グリコシド結合糖鎖部位が2つ少なかったが、それ以外の大きな変異は認められなかった。

これらの結果、PAS-4とCD36は非常に類似する糖タンパク質でありながら器官特異的な変異が起きていることが明らかになった。これらの糖タンパク質の各器官における機能も異なると推察される。



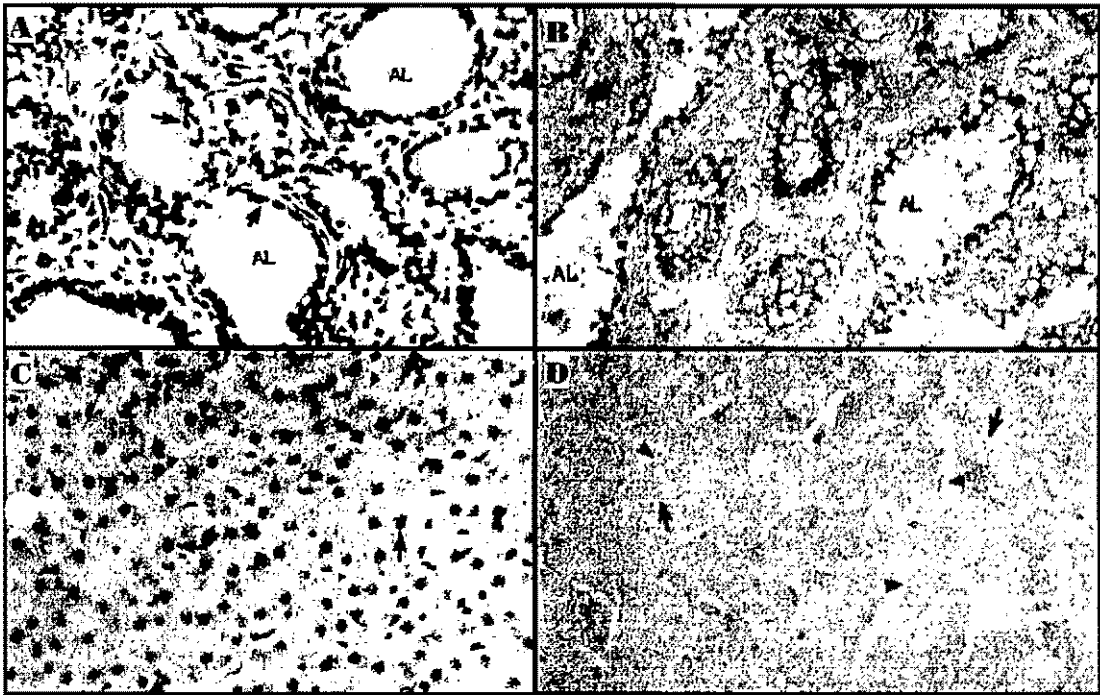


Fig. 3—1 Optical microscopy of bovine mammary gland (A, B) and liver (C, D). A and C were stained with hematoxylin-eosin, and B and C were immuno-stained with KAS-4 mcAb. Arrows in A and C indicate nuclei. Thin arrows in B indicate epithelial cells. Thick arrows in D indicate capillary endothelial and arrow heads indicate nuclei. AL ; alveolar lumen.

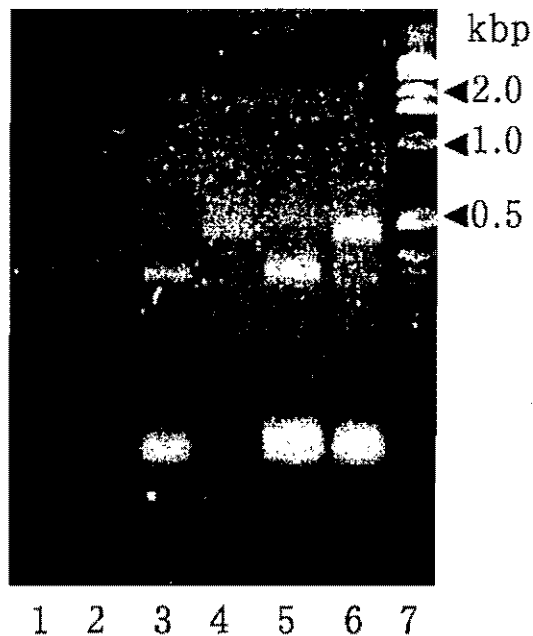


Fig. 3—2 RT-PCR analysis of expression of PAS-4 rat mammary gland. Lanes 1, 3, 5 are products of primer set of R2/R3. Lanes 2, 4, 6 are of R1/R3. Lanes 1, 2 are from virgin rat ; 3, 4 are at terminal stage of pregnancy ; 6 are at lactating stage. Lane 7, ladder.

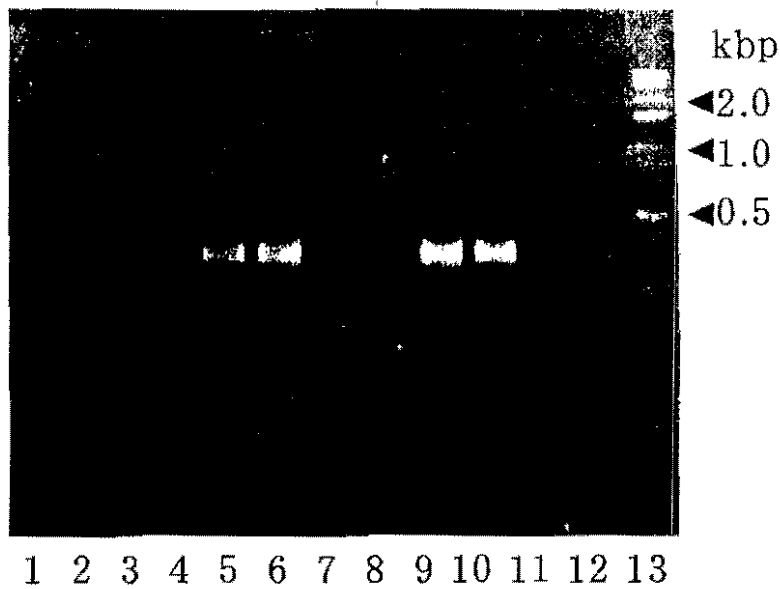


Fig. 3—3 RT-PCR products with primer set R2/R3 after 15, 25, 30 and 40 cycles of amplification for PAS-4 in rat mammary gland at different stage. Lanes 1, 5, 9 are of 40 cycles ; lanes 2, 6, 10 are of 30 cycles ; lanes 2, 6, 10 are of 25 cycles. Lanes 1-4 are from virgin rats ; lanes 5-8 are at terminal stage of pregnancy ; lane 9-12 are at lactating stage. Lane 13, ladder.

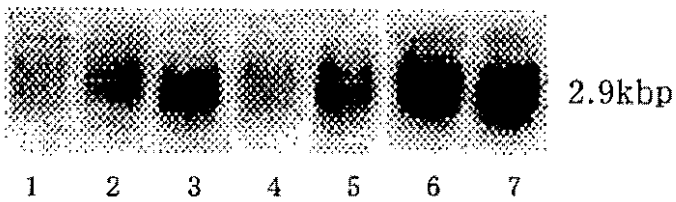


Fig. 3—4 Northern blot analysis for various bovine tissues and HEL cells. Lanes 1 to 7 corresponds to spleen, lung, kidney, heart, liver, HEL cells and lactating mammary gland, respectively.

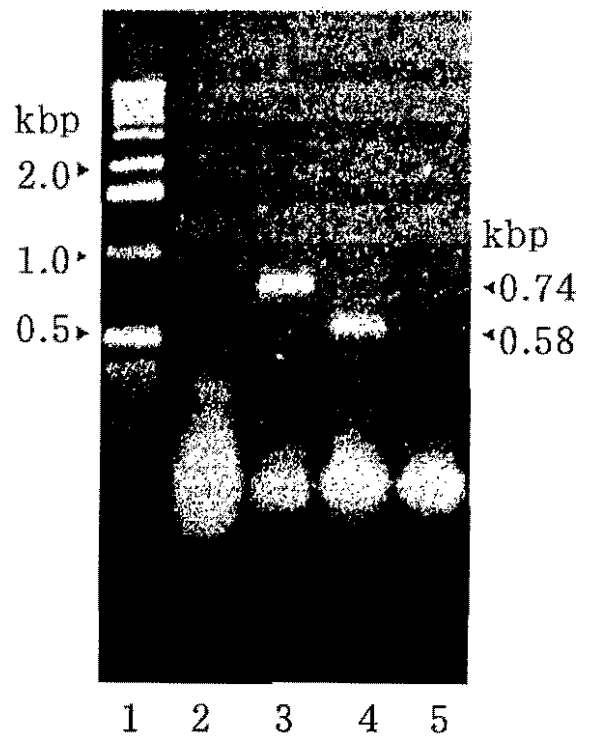


Fig. 3—5 RT-PCR analysis of the expression of CD36 in bovine liver. Lane 1, ladder ; 2, primer set L4/L6; 3, primer set L4/L5 ; 4, primer set L1/L3 ; 5, primer set L1/L2.



```

GAAATAAATCTGAAAGGAATCCCTGTGTATAGATTTATTCTTCCATCCTTTGCTTTTGA 900
*****
GAAATAAATCTGAAAGGAATCCCTGTGTATAGATTTGTTCTTCCATCCTTTGCTTTTGA

TCTCCATTTCAAAAATCCAGACAACCCTGTTTCTGCACAGAAAAATCATCTCAAAAAAT 960
*****
TCTCCATTTGAAAAATCCAGACAACCCTGTTTCTGCACAGAAAAATCATCTCAAAAAAT

TGTACCTTATATGGTGTGCTAGACATTGGCAAATGCAAAGAAGGAAAACCTGTGTACATT 1020
*****
TGTACCTTATATGGTGTGCTAGACATTGGCAAATGCAAAGAAGGAAAACCTGTGTACATT

TCACTTCCTCATTTTCTACATGGAAGTCTGAACTTGCAGAACCTATTGAAAGCTTAAGT 1080
*****
TCACTTCCTCATTTTCTACATGGAAGTCTGAACTTGCAGAACCTATTGAAAGCTTAAGT

CCAAATGAAGAAGAACATAGCACGTACTTAGATGTTGAACCTATAACTGGATTACTTTA 1140
*****
CCAAATGAAGAAGAACATAACACGTACTTAGATGTTGAACCTATAACTGGATTACTTTA

CGGTTTGCAAAACGGCTGCAGGTCAACACTGGTCAAGCCAGGCAAAAAAATGGAAGCA 1200
*****
CGGTTTGCAAAACGGCTGCAGGTTAACACTGGTCAAGCCAGGCAAAAAAATGGAAGCA

TTGAAGAATCTGAAGCACAACATATATTGTCCTATTCTTTGGCTTAATGAGACTGGTACC 1260
*****
TTGAAGAATCTGAAGCACAACATATATTGTCCTATTCTTTGGCTTAATGAGACTGGTACC

ATTGGTGATGAGAAGGCGGAAATGTT 1289
*****
ATTGGTGATGAGAAGGCAAACATGTT

```

Fig. 3—6 Alignment of the nucleotide sequences of CD36 from bovine liver in comparison with those of PAS-4 from bovine mammary gland. The asterisk (\*) indicates the identical sequences of PAS-4 to those of CD36. Nucleotides are numbered at the right of each line. Underlined nucleotides indicate primers L-1 to 5.

```

PAS-4 GCNRRNCGLIAGAVIGAVLAVFGGILMPVGDMLIEKTIKKEVLEBGTIAFNWVKTGTDV 60
*****
CD36 GCNRRNCGLVGAVIGAVVALFGGILMPVGDMLIVKTIKKEVLEBGTIAFNWVKGAGAV

YRQFWIFDVQNPDEVTVNSSKIKVKQRGPYTYRVRYLAKENITQDPETNTVVSFLQPNGAI 120
*****
YRQFWIFDVQNPPEVAVNSSKIKVKQRGPYTYRVRYLAKNIIISQDSKHTVVSFQRPKGAI

FEPLLSVGTEDDKFTILNLAVAAAPQLYPNTFMQGI LNSFIKKS SSMFQNTLTKELLWG 180
*****
FEP SLSVGTTRDDTFTV LNLAVAAATPPLYPSTFVQIILNVFIK KLSFMFORPTLTKELLWG

YTDFFLNLVPIYITTTIGVFYYPYNTADGIYKVFNGKDDISKVAIIDTYKGRKNLSYWSS 240
*****
YTDFFLNLVPIYITTTIGVFYYPYNTADGIYKVFNGKDDISKVAIIDTYKGRKNLSYWSS

YCDLINGTDAASFPPFVEKTRVLQFFSSDICRSIYAVFGAEINLKGIPVYRFLPSFAFA 300
*****
YCDLINGTDAASFPLVEKTRVLQFFSSDICRSIYAVFGAEINLKGIPVYRFLPSFAFA

SPPQNPDNHCFCTEKLIISKNTLYGVLDIGKCKEGKPVYISLPHFLHGSPELARP IESLS 360
*****
SPFENPDNHCFCTEKIISKNTLYGVLDIGKCKEGKPVYISLPHFLHGSPELARP IEGLS

PNEEHSTYLDVEPITGFTLRFKRLQVNTGQARQKKIEALKNLKRN YIVPILWNETGT 420
*****
PNEEHNTYLDVEPITGFTLRFKRLQVNTGQARQKKIEALKNLKRN YIVPILWNETGT

IGDEKAEMF 429
*****
IGDEKANMF

```

Fig. 3—7 Alignment of the deduced amino acid CD36 cDNA from bovine liver in comparison with those of PAS-4 from bovine mammary gland. Open boxes were indicate asparagine-linked glycosylation site different from CD36.

## 引用文献

1. Kanno, C. and D. H. Kim, 1990, *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2845-2854.
2. Greenwalt, D. E., K. W. K. Watt, O. Y. So and N. Jiwani, 1990, *Biochemistry*, 29, 7054-7059.
3. Laemmli, U., 1970, *Nature*, 227, 680-685.
4. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, 195, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
5. Markwell, M. A. K., S. M. Hass, L. L. Bieberand and N. E. Tolbert, 1978, *Anal. Biochem.*, 87, 206-210.
6. Peterson, G. L., 1977, *Biochem.*, 83, 346-356.
7. Bidkingmeyer B. A., S. A. Cohen and T. L. Tarvin, 1984, *J. Chromato.*, 336, 93-104.
8. Howell, K. E. and G. E. Palade, 1982, *J. Cell Biol.*, 92, 822-832.
9. Iyer, R. N. and D. M. Carson, 1971, *Arch. Biochem. Biophys.*, 142, 101-105.
10. Suzuki, S., A. Kondo, I. Kato, S. Hase and T. Ikenaka, 1991, *Agric. Biol. Chem.*, 55, 283-284.
11. Kim D. H., C. Kanno and Y. Mizokami, 1992, *Biochim. Biophys. Acta*, 1122, 203-211.
12. Hara, S., Y. Takemori, M. Yamaguchi, M. Nakamura and Y. Ohkura, 1987, *Anal. Biochem.*, 164, 138-145.
13. 平野 久、1998、蛋白質、核酸、酵素、33, 2388-2396.
14. Imam, A., D. J. R. Laurence and A. M. Neville, 1981, *Biochem. J.*, 193, 47-54.
15. Mather, I. H., C. B. Tamplin and M. G. Irving, 1980, *Eur. J. Biochem.*, 110, 327-336.
16. Howell, K. E. and G. E. Palade, 1982, *J. Cell Biol.*, 92, 822-832.
17. Shimizu, M., C. Kanno and K. Yamauchi, 1976, *Agric. Biol. Chem.*, 40, 1711-1716.
18. Kitchen B. J., 1974, *Biochem. Biophys. Acta*, 356, 257-269.
19. Kobylka D. and K. L. Carraway, 1972, *Biochem. Biophys. Acta*, 288, 282-295.
20. Greenwalt, D. E., V. G. Johnson and I. H. Mather, 1985, *Biochem. J.*, 228, 223-240.
21. Catimel, B., S. Parmentier, L. L. K. Leung and J. L. McGregor, 1991, *Biochem. J.*, 279, 419-425.
22. Chomczynski, P and N. Sacchi, 1987, *Anal. Biochem.*, 162, 156-159.
23. 垣塚 彰、1989、実験医学、ニューテクノロジー、7, 2065-2068.
24. Oquendo, P., E. Hundt, J. Lawler and B. Seed, 1989, *Cell*, 58, 95-101.
25. Bigelow, C. C., 1967, *J. Theoret. Biol.*, 16, 187-211.
26. Kyte, J. and R. Doolittle, 1982, *J. Mol. Biol.*, 157, 105-132.
27. 佐野 豊、組織学研究法、南山堂、55-246.
28. Abumrad, N. A., M. R. El-Maghrabi, E. Z. Amri, E. Lopez and P. A. Grimaldi, 1993, *J. Biol. Chem.*, 268, 17665-17668.
29. 藤本明子、1992、細胞工学実験プロトコール、143-154.
30. Greenwalt, D. E. and I. H. Mather, 1985, *J. Cell Biology.*, 100, 397-408.
31. Clezardin, P., L. Frappart, M. Clerget, C. Pechoux and P. D. Delmas, 1993, *Cancer Res.*, 53, 1421-1430.

32. Maeno, Y., H. Fujioka, M. J. Hollingdale, C. F. Ockenhouse, S. Nakazawa and M. Aikawa, 1994, *Exp. Parasit.*, 79, 383-390.
33. Spitsberg, V. L., E. Matitashvili and R. C. Gorewit, 1995, *Eur. J. Biochem.*, 230, 872-878.
34. Wyler, B., L. Daviet, H. Borkiewicz, J.-C. Bordet and J. L. McGregor, 1993, *Thrombosis and Hemostasis*, 70, 500-505.

## 全体要約

これまでのPAS-4精製法は煩雑で収率も悪い。そこでまず迅速かつ収率のよい精製法の開発の検討から始めた。乳脂肪球膜 (MFGM) に含まれるPAS-4のうちの82%が1% Triton X-114による相分離によって抽出された。pH7.5のDEAE-Sepharoseイオン交換クロマトグラフィーにより、PAS-4は素通りに画分回収され、SDS-PAGEで単一バンドとして検出された (回収率は61%)。PAS-4は疎水性の高い糖タンパク質であり、pI7.45、7.41、7.32の3成分からなる不均一性が確認されたが、シアリダーゼ処理によりいずれもpI7.47の1成分に収束した。糖含量は7.2%で、そのうちMan、GalNAcおよびGalが約70%を占めた。温和なアルカリ加水分解および各種レクチンとの反応性から、PAS-4にはN-およびO-グリコシド結合糖鎖が混在していることが明らかになった。

RT-PCRプライマー設計のため、PAS-4のN-末端ならびに内部の部分アミノ酸配列を決定し、それに基づきプライマーを合成した。ウシ乳腺total RNAを用いてPCRを行い、555bpのPCR産物からPAS-4の5'-frame側の塩基配列を決定し、さらに5'-、3'-RACEにより全長1,882残基からなる塩基配列を決定した。PAS-4のORFの塩基配列はヒト体盤CD36と約86%のホモロジーが認められた。アミノ酸残基数 (471) もCD36と同じであり、アミノ酸レベルでは約83%のホモロジーが認められ、システイン残基はすべてCD36と同じ位置に保存されていた。N-およびC-末端側の短い疎水性領域は細胞質側に、8つのN-グリコシド結合糖鎖部位をもつ大部分のアミノ酸領域をルーメン側に配向し、さらに、ルーメン側の29番目から447番目のアミノ酸配列から疎水制度が高い領域が4箇所が膜と結合している構造を提案した。

KAS-4抗体での免疫染色によって、乳腺細胞の乳腺腺胞腔側が強く染色されたのに対して、肝臓では細胞核の周囲あるいは細胞質の中が強く染色され、この蛋白の局在性に相違がみられた。ラットの乳腺におけるPAS-4の発現量は、非泌乳期の乳腺で極くわずかであったが、妊娠末期あるいは泌乳期に急激に増加した。PAS-4 (あるいはCD36) 遺伝子は、ノーザンブロット分析により、乳腺細胞の他に肝臓、腎臓において多量発現され、脾臓、肺および心臓にも発現されていることが確認された。ウシ肝臓CD36の部分的なcDNAの塩基配列は乳腺PAS-4 cDNAと約94%の高いホモロジーがあり、塩基の挿入あるいは欠失部分は認められなかった。アミノ酸配列では約90%のホモロジーを示した。これらの結果、PAS-4とCD36は非常に類似する糖タンパク質でありながら器官特異的な変異が起きていることが明らかになった。これらの糖タンパク質の各器官における機能も異なると推察される。