

# PAS-4糖蛋白質のcDNAクローニング(中間報告)

宇都宮大学農学部 教授 菅野 長右工門

精製したPAS-4糖タンパク質(前年度に報告)のN-末端配列およびペプチド部分配列に基づいてオリゴヌクレオチドプローブを合成し、遺伝子工学的な手法-RT-PCR-を用いてPAS-4 cDNAのクローニングを行い、その塩基配列および一次構造を解析した。

## 1. 実験方法

### 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-末端側の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Model 476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

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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C、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Model 476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(表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。

表1. RT-PCR用オリゴヌクレオチドプライマーのヌクレオチド配列及び位置。

No.	Primers	Sequence	Location
P4-5	sense	5'-GCGCTGTAATCGGAAGCTGTGGG-3'	nt 1 to 21
P4-3	antisense	5'-GAATGGATCGGTATAGCCCA-3'	nt 555 to 535

### mRNAの調製

Acid Guanidinium-Phenol-Chloform法(1)に基づき、TRIzol<sup>TM</sup> Reagent(T試薬)を用いて行った。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。調製した全RNAから、垣塚の方法(2)によりOligotex<sup>TM</sup>-oligo dTカラムを用いてmRNAを調製した。

## 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装置を用いて行った。アガロースゲル(0.6~1.5%)を0.5×TBEで調製し、100V定圧で泳動を行った。泳動終了後、エチジウムブロマイド(0.5µg/ml)で可視化した。

## RT-PCR

乳腺から調製した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2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を行った。反応液3µlを0.8%アガロースゲル電気泳動で分析した。

## 5'-RACE and 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(表2)を用い、94℃で30秒間熱変性、60℃で30秒間アニーリング、68℃で1分間増幅を30サイクル行った。PCRの反応液から5µl採取し、1%アガロースゲルで分析した。

表2. 5'-及び3'-RACE-PCR用オリゴヌクレオチドプライマーのヌクレオチド配列及び位置。

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

## アガロースゲルからPCR産物の精製

PCR産物はGeneClean 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(5µl)による溶出処理を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pCR™ IIを用いた。

## 形質変換

コンピタント細胞(200µl)を氷上で解かし、ライゲーション産物10µlを加え30分間放置した。42℃で30秒間加温し、直ちに氷上に移し、2分間氷冷した。1 ml SOCを加え、37℃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℃で一晩インキュベートすることによりColor-selectionを行った。

## ミニプレブによるDNAの精製

Color-selectionにより選択したコロニーからミニプレブによりその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。

## 2. 結果及び考察

### 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はできなかつたため、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-なる配列を得た。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(図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(表1)。

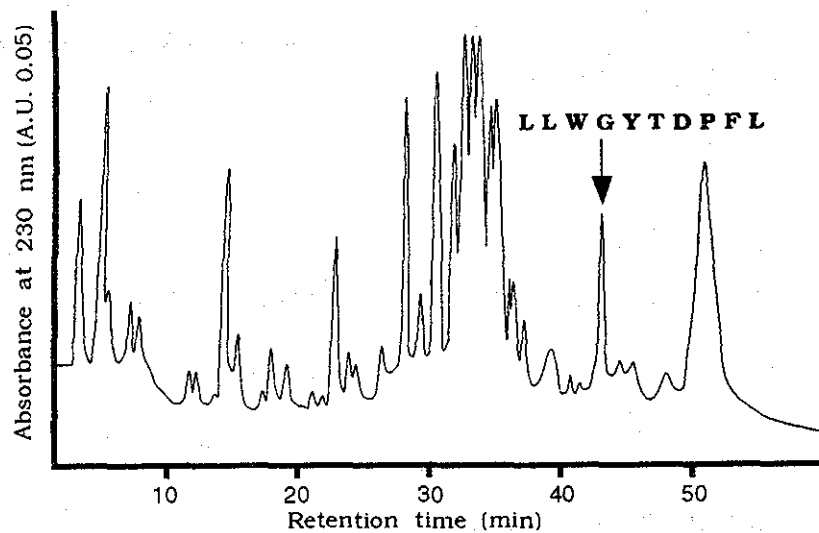


図1. PAS-4糖タンパク質のC8逆相カラムを用いたHPLCでのトリプシン分解物のペプチドマップ。

糖タンパク質は37°Cで6時間トリプシンで加水分解した。約43分に溶出されたペプチド(矢印)をプロテインシーケンサーで分析した。

### RT-PCRによるDNAの増幅ならびにその塩基配列

乳腺組織から調製した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、~560bpのPCR産物が増幅された(図2、レーン2)。これをpCR™ベクターにライゲーションした後、DH

5αに形質変換し、カラーセレクションを行い、0.5kbp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(図3)。

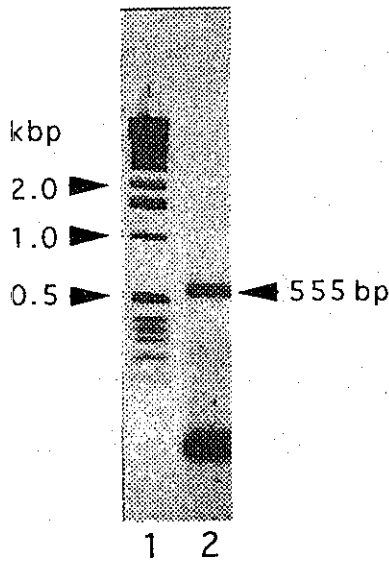


図2. P4-5(前方向)及びP4-3(後方向)のプライマーの組み合わせからのRT-PCR産物(レーン2)の電気泳動パターン。

```

GGCTGTAATCGGAACGTGGGCTCATTGCTGGTGCTGTCATTGGTGCAATC 51
G C N R N C G L L A G A V I G A V
CTGGCTGTGTTGGAGGGATTCTAATGCCAGTTGGAGACATGCTTATTGAG 102
L A V F G G I L M P V G D M L I E
AAGACAATTA AAAAGGAAGTTGTCCTTGAAGAAGGCACAATTGCTTTTAAA 153
K T I K K E V V L E E G T I A F K
AATTGGGTAAAAACAGGCACAGATGTTTACAGACAGTTTGGATATTTGAT 204
N W V K T G T D V Y R O F W I F D
GTGCAGAAATCCAGATGAAGTGACAGTTAACAGCAGCAAAATTAAGTTAAG 255
V Q N P D E V T V N S S K I K V K
CAAAGAGGTCTTACACATACAGAGTTGTTATCTAGCCAAGGAAAATATA 306
Q R G P Y T Y R V R Y L A K E N I
ACCCAGGACCTGAGACCAACACGGTCTCTTTCCTGCAGCCCAATGGGGCC 357
T Q D P E T N T V S F L Q P N G A
ATCTTTGAACCCITGCTATCAGTTGGAACTGAGGATGACAAGTTCACCATT 408
I F E P L L S V G T E D D K F T I
CTCAACCTGGCTGAGCAGCTGCACCACAGCTGTATCCAAATACATTTATG 459
L N L A V A A A P Q L Y P N T F M
CAAGGAATACTCAATTCATTTATCAAAAAGTCCAAATCTTCTATGTTTCAA 510
Q G I L N S F I K K S K S S M F Q
AACAGAACTTTGAAAGAACFATTGTTGGGGCTATACCGATCCATTC 555
N R T L K E L L W G Y T D P F
    
```

図3. 図2のRT-PCR産物のヌクレオチド配列と演繹アミノ酸配列。

プライマーは二重下線で、予測されるN-結合糖鎖結合位置は下線で示してある。またドットの四角は3'-5'-RACE-PCR(表2)のプライマーの位置を示す。

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[3]と約85%のホモロジーを示した(図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cDNAをクローニングすることにした。

```

PAS-4 GGGTGAATCGAAACTGTGGGCTCATTGCTGGTCTGTCATTGGTGCGAGTCTGGCTGTG 60
      * * * * *
CD36  GGCTGTGACCGGAACTGTGGGCTCATCGCTGGGCTGTCATTGGTGCTGCTCGGCTGTG 120
      TTTGGAGGGATTCATAATGCCAGTTGGAGACATGCTTATTGAGAAGACAATTAAGGAA
      * * * * *
      TTTGGAGGTAATCTAATGCCAGTTGGAGACCTGCTTATCCAGAAGACAATTAAGCAA 180
      GTTGTCTTGAAGAAGGCACAATTGCTTTTAAAAATGGGTTAAAAACAGGCACAGATGTT
      * * * * *
      GTTGTCCGCGAAGAAGGTACAATTGCTTTTAAAAATGGGTTAAAAACAGGCACAGAAGTT 240
      TACAGACAGTTTGGATATTGATGTGCAGAATCCAGATGAAGTGACAGTTAACAGCAGC
      * * * * *
      TACAGACAGTTTGGATCTTTGATGTGCAAAAATCCACAGGAAGTGAATGAACAGCAGC 300
      AAAATTAAGTTAAGCAAAGAGGTCCTTACACATACAGAGTTCGTTATCTAGCCAAGGAA
      * * * * *
      AACATTCAAGTTAAGCAAAGAGGTCCTTATACGTACAGAGTTCGTTTTCTAGCCAAGGAA 360
      AATATAACCCAGGACCCTGAGACCAACACGGTCTCTTTCTGCAGCCCAATGGGGCCATC
      * * * * *
      AATGTAACCCAGGACGCTGAGGACAACACAGTCTCTTTCTGCAGCCCAATGGTGCCATC 420
      TTTGAACCCCTGCTATCAGTTGGAAGTGAAGATGACAAGTTCACCATTCTCAACCTGGCT
      * * * * *
      TTGGAACCTTCACTATCAGTTGGAACAGAGGCTGACAACCTCACAGTTCCTCAATCTGGCT 480
      GTAGCAGCTGCACCACAGCTCTATCCAAATACATTTATGCAAGGAATACCAATTCATTT
      * * * * *
      GTGGCAGCTGCATCCCATATCTATCAAAAATCAATTTGTTCAAATGATCCTCAATTCATT 540
      ATCAAAAAGTCCAAATCTTCTATGTTTCAAAACAGAAGTTGAAAGAAGTATTGTGGGGC
      * * * * *
      ATTAACAAGTCAAAATCTTCTATGTTCCAAGTCAGAAGTTTGAGAGAAGTATTGAGGGC 555
      TATACGGATCCATTC
      * * * * *
      TATAGGGATCCATTT

```

図4. PAS-4及びヒト胎盤CD36(Oquendo et al. (3))のヌクレオチド配列。

5'-、3'-RACEによる全長cDNAのクローニング

表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(図5、レーン5)およびMA-4とAP-1(図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の産物が増幅された。PAS-4のORF全長cDNA配列をヒト胎盤CD36(3)とともに図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polyadenylation刺激配列(-aataaa-)、poly(A)-tail配列が確認された。

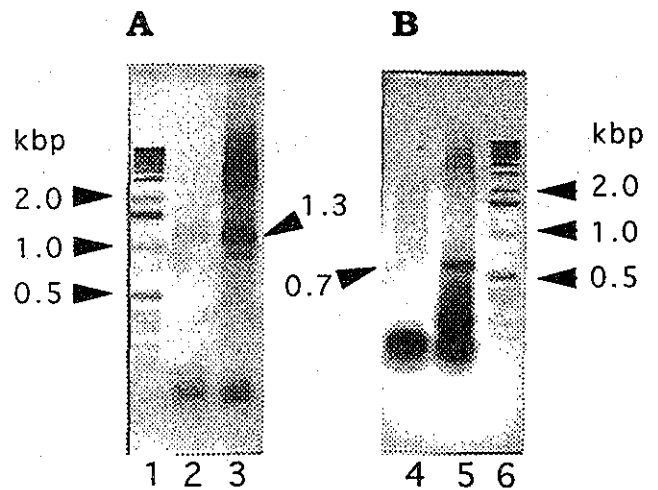


図5. ウシ乳腺のPAS-4のcDNAの3'(A)及び5'(B)-RACE-PCR産物。

レーン1及び6、ラダー；2、MA3/AP1プライマー；3、MA4/AP1プライマー；4、MA1/AP1プライマー；5、MA2/AP1プライマー。レーン3(～1.3kbp)及び5(～0.6kbp)の産物はシークエンス分析に使用した。



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、図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の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。

```

    ☆ ☆
PAS-4 GCNRNCGLIAGAVIGAVLAVFGGILMPVGDMLIEKTIKKEVLEEGTIAFKNWVKTGTDV 60
    * * * * *
CD36  GCDNRNCGLIAGAVIGAVLAVFGGILMPVGDLLIQKTIKKQVLEEGTIAFKNWVKTGTEV
    * * * * *
    YRQFWIFDVQNPDEVTVNSSKIKVKQRGPYTYRVRYLAKENITQDPETNTVSLQPNGAI 120
    * * * * *
    YRQFWIFDVQNPQEVMMNSSNIQVKQRGPYTYRVRFLAKENVTQDAEDNTVSLQPNGAI
    * * * * *
    FEPLLSVGTEDDKFTILNLAVAAAPQLYPNTFMQGILNSFIKSKSSMFQNRRTLKELLWG 180
    * * * * *
    FEPSSLVGTEDDNFTVLNLAVAAASHIYQNQFVQMILNSLINKSKSSMFQVRTLRELLWG
    * * * * *
    YTDFFLNLVPPYPITTTIGVFYYPYNNNTADGIYKVFNGKDDISKVAIIDTYKGRKNLSYSS 240
    * * * * *
    YRDPFLSLVPPYPTTTVGLFYPYNNNTADGVYKVFNGKDNISKVAIIDTYKGRKNLSYSS
    * * * * *
    YCDLINGTDAASFPPLEKTRVLQFFSSDICRSIYAVFGAEINLKGIPVYRFVLPSPFAFA 300
    * * * * *
    HCDMINGTDAASFPPFVEKSOVLQFFSSDICRSIYAVFESDVNLKGIPVYRFVLPSPKAF
    * * * * *
    SPFENPDNHCFCTEKIIISKNCTLYGVLDIGKCKEGKPVYISLPHFLHGSPELAPEIEGLS 360
    * * * * *
    SPVENPDNYCFCTEKIIISKNCTSYGVLDISKCKEGRPVYISLPHFLYASPDVSEPIDGLN
    * * * * *
    PNEEEHSTYLDVEPITGFTLRFKRLQVNLVLPKSKIEALKNLKHNIVPIVLWLNETGT 420
    * * * * *
    PNEEEHRTYLDIEPITGFTLQFAKRLQVNLVLPKSEKIQVLKLNKRNIVPIVLWLNETGT
    * * * * *
    IGDEKAEMFRNQVTGKINLLGLVEIVLLSVGVVVFIAFMISYCACRSKTIK 471
    * * * * *
    IGDEKANMFRSQVTGKINLLGLIEMILLSVGVVVFVAFMISYCACRSKTIK
  
```

図7. PAS-4及びCD36間のアミノ酸配列のホモロジー。

▽、予測されるアスパラギン結合糖鎖の位置；☆、システイン残基を示す。

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 or 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7k小さいことが確認されたが、これらはN-glycanase処理あるいはEndoglycosidase F処理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酸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(4)により求めた平均疎水性指数は1,226cal/residues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(5)から5つずつのアミ

ノ酸残基を1つにして疎水性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(図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。

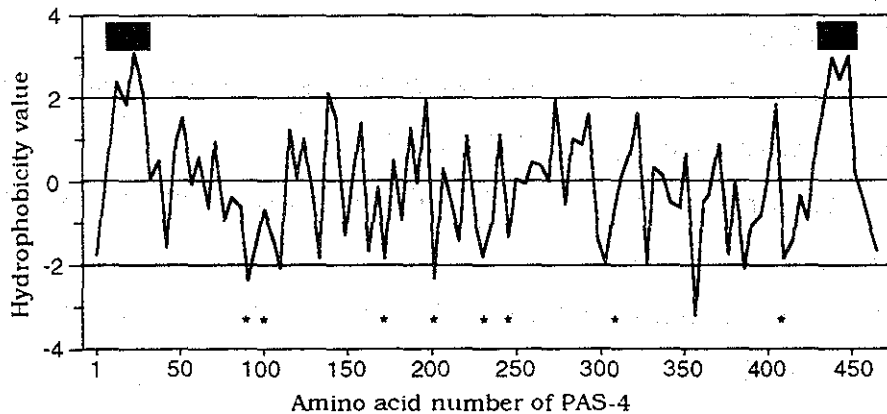


図8. PAS-4糖タンパク質のハイドロパシー。

ハイドロパシーは5アミノ酸残基ごとにKyte and Doolittleアルゴリズムにより算出した。■は膜通過領域を、\*は予測されるアスパラギン結合糖鎖の位置を示す。

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。図9に示すように、PAS-4のN-およびC-末端側に2つの膜貫通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結合の形成には関与しているかは不明であるが、ルー

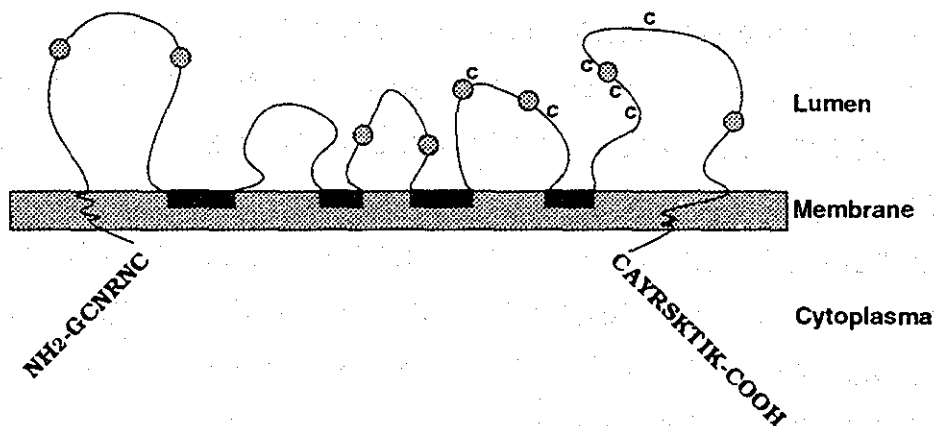


図9. PAS-4糖タンパク質の構造の特性を示す模式図。

C、システイン；○、糖鎖位置、■疎水性領域を示す。



メン側に配向していると考えられる。

### 3. 引用文献

1. Chomczynski, P. and N. Sacchi, 1987, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-PhOH-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156-159.
2. 垣塚 彰, 1989, oligo(dT)-Latex粒子を用いたポリ(A)<sup>+</sup>RNAの精製方法. *実験医学, ニューテクノロジー*, 7, 2065-2068.
3. Oquendo, P., E. Hundt, J. Lawler and B. Seed, 1989, CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. *Cell*, 58, 95-101.
4. Bigelow, C. C., 1967, On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure. *J. Theoret. Biol.*, 16, 187-211.
5. Kyte, J. and R. F. Doolittle, 1982, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 157, 105-132.

### 4. 要 約

PAS-4のN-末端アミノ酸配列<(X)-Cys-Asn-Arg-Asn-Cys-Gly->ならびにトリプシン処理によりPAS-4内部の部分アミノ酸配列<Leu-Leu-Trp-Gly-Tyr-Thr-Asp-Pro-Phe-Leu->を決定した。ウシ乳腺から調製したtotal RNAを用いてcDNAを合成し、N-末端およびPAS-4の内部アミノ酸からRT-PCRプライマーを合成した。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-グリコシド結合糖鎖部位を持ち、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-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-末端側付近に非常に疎水性が高いセグメントが存在していることが明らかにされた。PAS-4のN-および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性度が高い領域4箇所が膜と結合している構造を提案した。