ウシ血清トランスフェリン分子の多様性

辻 荘 一

神戸大学農学部, 神戸市灘区 657

The Size Heterogeneity of Bovine Serum Transferrin

Soichi Tsuji

Laboratory of Animal Breeding, Faculty of Agriculture,
Kobe University, Kobe 657

はじめに

我が国の牛群では血清トランスフェリン(Tf)は澱粉ゲル電気泳動法により, 通常4種の対立遺伝子の組み合わせによる10種類の遺伝子型に区分される。それぞれのTfを澱粉ゲル上で観察すると, ホモ型では3から4本の, ヘテロ型では6から8本のバンドが認められる。通常1遺伝子からは1つの蛋白質が合成されるとされているので, このTf分子の多様性はその生合成の過程に何らかの特異性の存在することを示唆している。そのような多様性の生ずる原因としては, (1)1つの対立遺伝子はそれぞれ単一の遺伝子と思われているが実際には複数の極めて類似する遺伝子より構成されている場合, (2)mRNAの合成に当たって, スプライシングに多様性がある場合, (3)翻訳後の蛋白質が糖や有機酸あるいは脂質によって異なった修飾がなされる場合, (4)翻訳後の蛋白質(プレ蛋白質)が分泌型に変換されるにあたって異なったサイトで切断される場合などが考えられる。

このTf分子の多様性はウシに限定されるわけではなくヒト, ラットなどでも知られている。Parker & Bean (1962)はTf分子にはシアル酸が付着し, このシアル酸が酸性に帯電しているのを, シアル酸の付着数が異なることにより電気泳動における移動度の異なるTf分子が生ずるとした。Tf分子の構造がヒトやラットで詳しく解っており, その多様性の原因は以下のように考えられている。すなわち, Tf分子にはカルボキシル基側のドメインに2か所の糖鎖の結合するアスパラギン残基があって, それぞれの糖鎖の先端に2個のシアル酸が結合可能とされている。従って, 全体として4個のシアル酸が結合できるわけで, シアル酸の結合数の異なった(0から4個まで)Tf分子が5種類存在することになる(Dorland *et al.*, 1977, McGillivray *et al.*, 1982)。一般にシアル酸は分泌蛋白質の循環, すなわちその寿命に係わっているとされているが, Tf分子におけるシアル酸の役割は未だ解っていない。Parker & Bean (1962)のヒトTfにおける古典的研究に続いて, Stratil & Spooner (1971)はウシTfにおける分子の多様性もその一部がシアル酸の付着数の違いによるものであることを明らかにした。ところが, Tf分子からシアル酸を除去してもウシTf分子の多様性は完全には消滅せず, なお, 2種の分子が残ることが示された。その後, Richardson *et al.*, (1973), Hatton *et al.*

(1976), Maeda *et al.* (1980)らがこの2種のTf分子の差異を明らかにしようとしたが未だ成功しているとは言えない。著者らもこの問題に取り組み、個体発生と系統発生の両面から若干の知見を得たのでここに紹介する (Tsujii *et al.*, 1980, 1984a, 1984b)。

ウシTfには分子量の異なる2種の分子種が存在する

Stratil & Spooner (1971) が示したようにウシTfではホモ型で数本の、また、ヘテロ型でその倍程度のバンドが観察される。このTfをノイラミニダーゼによりシアル酸を除去すると、ホモ型では2本に、また、ヘテロ型では4本にバンドの数が減少する。さて、著者らはウシ血清よりTfを分離精製した。もちろん、この精製Tfは澱粉ゲル電気泳動で4本から6本あるいはそれ以上のバンド数を示す。この精製TfをSDS-polyacrylamide gel 電気泳動(SDS-PAGE) (Laemmli,

図1 精製TfのSDS-PAGE(Laemmli法による)電気泳動。A:AA型, D₁:D₁D₁型, D₂:D₂D₂型, E:EE型, AJ:AJヘテロ型を示す。ホモ, ヘテロ型を問わず, 何れも2本のバンドとなる。

図2 精製Tfより糖鎖の除去。糖鎖の除去前の精製Tf(N)に比べ糖鎖の除去後のTf(D)はサイズは小さくなるが、依然として大小2分子が存在する。

1970)で分析すると、図1に示すようにホモ型、ヘテロ型を問わず、いずれの型のTfでもバンドの数が2本にまで減少した。SDS-PAGEでは蛋白質は分子量の大小によって区分される。したがって、Tf分子には分子量の異なる大小の2分子が存在し、大分子の分子量は78,000ダルトン、小は72,000ダルトンと推定された。SDS-PAGEでは蛋白質に付着した糖鎖が電気泳動上の移動度に影響することが知られている。そこで、精製Tf分子から糖鎖を除去してその移動度を比較してみた。図2はその結果を示したものである。この図から明らかなようにTf分子から糖鎖を除去するとTf分子の大きさは小さくなるが、大小2分子は依然として存在し、糖除去によっても2分子種は消失しなかった。このことから、Tf分子における分子量の違いは蛋白質の構造上の違いによることが推定さ

れた。このことから、ウシTfにおける分子多様性の原因の一つはシアル酸の付着数の違いであり、もう一方は分子量を異にする2種類のTf分子種の存在によることが示された (Tsuji *et al.*, 1984b)。シアル酸の付着数には、その付着出来る糖鎖の数から0から4個までの5種類であると推定される。他方、分子量を異にする2種の分子種があるので、ホモ型で 5×2 、10種の分子種が、ヘテロ型ではその倍の20種にのぼる分子種が存在することになる。もっとも、通常シアル酸の付着数は2個か3個の場合が多いと云われているので、ホモ型で4種の、ヘテロ型で8種のバンド(分子種)が認められることになり、実際の澱粉ゲル電気泳動の結果と良く一致する。

ウシTfの大小2分子種は出生後に出現する

ところで、ウシ胎児では先に述べた澱粉ゲル上のバンドの数が成牛のそれに比べて少ないことが知られている (Stratil & Spooner, 1971)。著者はこの大小2分子種がウシ胎児では存在しないのではないかと考えた。そこで、抗ウシTf抗体を用いてTfと抗体との複合体を形成させ、この複合体をSDS-PAGEにより分析する方法を用いて分子量を異にするTfの2分子種の存在の有無を検

図3 ウシ胎児血清中のTf。2ヶ月から9ヶ月までのいずれの胎児でも血清中のTfは成牛Tfと異なって1分子のみである。

図4 胎児と成牛における精製TfのBrCN断片の比較、胎児TfのBrCN断片は成牛Tfのそれとよく似ているが、成牛の高分子種の断片(図8参照)により近い。

討した。図3はその様子を示したものである。図3のI領域はTfを、II領域は免疫グロブリンIgGの長鎖を、III領域はIgGの短鎖を示したものである。両端のAは成牛のTfで明らかに大小2種の分子種が存在している。ところが、在胎月齢2ヶ月から9ヶ月までのいずれの胎児の血清も大小2種のTfを明らかに含んでいるとはいえず、在胎9ヶ月の胎児の血清にのみ小分子種が痕跡程度に認められた。ウシの妊娠期間は284日前後であり、分娩24時間以内の新生子牛血清にはすでに大小2分子

種が認められたので、Tf 分子のうちの小分子は分娩直前の時期に作り出されると推定された。ウシ胎児では成牛に比べて澱粉ゲル上で認められるTf のバンドの数が少ないが、それはウシ胎児の血清中に小分子のTf が存在しないことによると考えられた。また、ウシ胎児のTf は成牛Tf の大分子種に相当することが示された。すなわち、胎児の血清からTf を精製し、これをBrCNによりメチオニンの位置で切断して成牛Tf のBrCN切断断片と比較した。図4に示すように胎児のTf は成牛Tf と非常に良く似た切断パターンを示すが、どちらかといえば成牛Tf の大分子種により近い構造であることがわかった(図8参照)。

大小2分子種はウシ亜科の動物にのみ存在する

澱粉ゲル電気泳動で検出されるTf バンドの数を動物間で比較してみると、最も多いバンド数を示す動物はウシである。また、ヒトやラットのTf ではシアル酸の除去によってこの多様性が消失し、1本のバンドとなる。別の研究によってヒトやラットのTf には一種のTf 蛋白質分子しか存在しないことが示されており、ここで述べてきたウシTf 分子の多様性とは明らかに異なっている。そこで免疫学的に反応性を示すウシと近縁の種属の血清Tf について分子量の異なるTf の存在を検索した。調査した動物は、ラクダ亜目のラクダ、ウシ亜目のシカ(シカ科)、キリン(キリン科)、ブラックバック、ヤギ、ヒツジ、バーバリーシープ、ニホンカモシカ、ウシ、スイギュウ、アノア(以上ウシ科)である。図5はそれらの動物の血清と抗ウシTf 抗体との反応性を調べたものである。ここに示した

図5 抗ウシTf抗血清と反芻動物の血清Tfとの反応。ABは抗ウシTf抗血清を、GO(ヤギ), JS(ニホンカモシカ), CT(ウシ), DR(シカ), WB(スイギュウ), BB(ブラックバック), GF(キリン)の血清である。これらの動物はいずれも抗ウシTf抗血清と反応性を示す。

ように抗ウシTf抗体はラクダ亜目とウシ亜目の動物の血清Tfと反応するが、ヤギ、バーバリーシープ、スイギュウ、アノアの血清Tfとのみヒューズし、他の動物のTfとはスパーを形成した。したがって、ウシとこれらのヤギ、バーバリーシープ、スイギュウ、アノアといった動物とがより近縁であることが示された。さて、これらの動物の血清と抗ウシTf抗体との反応物をSDS-PAGEにより分析した結果が、図6と図7である。図4と同様に、I領域はTfを、II領域は免疫グロブリンIgGの

図6 反芻動物のTf分子の多様性。領域IはTfを、領域IIはIgGの長鎖を、領域IIIはIgGの短鎖を、それぞれ示す。TfではCTのウシのみが2本のバンドを示し、他の動物のTfはすべて1本であった。CMはラクダである。

図7 反芻動物のTf分子の多様性。領域IはTfを、領域IIはIgGの長鎖を、領域IIIはIgGの短鎖を、それぞれ示す。ウシにより近縁な反芻動物を比較した。G(ヤギ)、S(ヒツジ)、A(アノア)、W(スイギュウ)、C(ウシ)、BC(バリウシ)、BT(バンテン)、Z(ゼブー)である。ウシ科ウシ亜科の動物のみ2本のバンドが認められる。

長鎖を、III領域はIgGの短鎖を示したものである。I領域を見ると図6では中央のCT(ウシ)のみが大小2種のTfの存在を示し、ヤギ、ラクダ、シカ、ニホンカモシカ、キリンでは一種類のTfのみが検出された。また、図7ではウシとより近縁な動物を示してあるが、ヤギ、ヒツジといったウシ科の動物でもTfは一分子種のみが検出された。これに対して、インド牛ゼブーやバリ牛はもちろんのこと、スイギュウ、フィリピンの高性水牛アノア、インドネシアのバンテンでもウシと同様、明らかに大小2分子のTfが検出された。このことから、Tfの分子量を異にする分子種の存在はウシ科ウシ亜科の動物に限定されることが明らかとなった。また、ヤギとスイギュウの血清からTfをウシTfと同様の方法で精製し、BrCNを用いて切断し、ウシTfの大小両分子種のそれと比較した。その結果、ヤギやスイギュウのTfはウシ胎児の血清Tfと同様成牛Tfの大分子種に相当するものと考えられた。これらの結果をもとに個体発生と系統発生的な検討を加えると、次のような結論が得られる。すなわち、Tf分子はヒトやラットに代表されるように最初是一分子種のみが血清中に存在していたが、ウシ科の中でウシ亜科(ウシ、スイギュウ、アノア、バンテン、ヤク、バイソン)がヤギ亜科(ヤギ、ヒツジ、バーバリーシープ、ニホンカモシカ)あるいはブラックバック亜科(ブラックバック)といった動物と分化する時点で、何らかの必然性に駆られて小分子のTfが形成されるようになったと考えられる。また、個体発生は系統発生を繰り返すという有名な仮説があるが、ウシ胎児のTfでは、まさに、この仮説に合致して、胎児期の高分子種一種から出生直前に大小2分子種が形

成されるようになって考えられた。ヘモグロビンでは胎児型とアダルト型の存在が知られ、母体と胎児間の酵素の授受に適応した形で胎児型ヘモグロビンが機能しているが、ウシTfにおける小分子種の存在も何らかの機能的意味を持つものと考えられ、今後の研究課題である。

ウシTfの分子構造

この大小2分子のTfは免疫学的にも鉄との結合性においても、全く差異が認められないが、上記のごとく約6,000ダルトンの大きさの違いがある。そこで、この大小2分子種の一次構造を明らかにし、両者の比較を行えば大小2分子種の成因を明らかにすることが出来るものと期待される。Tf大小2分子種の分離精製し、BrCNで切断した。図8はその切断断片の電気泳動図である。大小2分

図8 精製TfのBrCNによる切断。W(分離前のTf)、S(小分子種)、L(大分子種)。大分子と小分子とはCN3とCN5の個所に違いがあり、大分子はCN3が濃く、CN5は薄い、小分子種はCN3が無く、CN5が非常に濃く染まっている。このことから、大分子種にはCN3とCN5のバンドがそれぞれ1本ずつ、小分子種にはCN5のバンドが2本あると推定される。

図9 サイズを異にするTf分子のモデル。大分子と小分子はCドメイン側に違いがあると推定される。小文字のSは糖鎖、大文字のL、Sは大小の分子種を示す。

子種の違いはBrCN断片CN1からCN5間に見られ、CN6からCN13までの小さな断片では両者に全く差異はない。特に、大小の違いはCN3とCN5の断片にあって、小分子にはCN3の断片がなく、大分子ではCN5の断片が小分子のそれと比較して薄い。McGillivrayら(1982)は最近ヒトTfの全一次構造を明らかにしたが、それによればTf分子は分子内のアミノ基側の領域とカルボキシル基側の領域のアミノ酸配列に相同性が高く、分子内重複構造を取っていることが示された。また、ニワ

トリのオボトランスフェリンやミルク中のラクトフェリンも Tf と同様に分子内重複構造を取っていることが知られている (Metz-Boutique *et al.*, 1981, Williams *et al.*, 1982)。この様に Tf とその関連蛋白質は遺伝子重複による分子内重複構造をとっているものとされている。ウシ Tf がヒト Tf と同様に分子内重複構造を取っていると仮定すれば、CN3 と CN5 はともに糖鎖が付着し、大分子での CN3 と CN5 断片のそれぞれ 1 個の代りに、小分子では CN5 が 2 個あると推定されるので、図 9 のようなモデルを仮定することが出来る。次に、ゲル濾過法をつかって、BrCN 断片の分離を行った。その結果、CN3, CN5, CN9, CN12 の各断片が分離された。それらの断片のアミノ酸配列の一部をエドマン法 (Cheng *et al.*, 1978) によって決定した。CN3 は N 末端より Gly-Leu-Asn-Tyr-Arg-Lys-Leu-- の配列を持ち、CN5 は CN3 と全く同じ配列 Gly-Leu-Asn-Tyr-Arg-Lys-Leu-- と Gly-Arg-Leu-Tyr-Asn-Lys-Leu-- の N 末端を持つ 2 種のペプチドが混ざっていることが明らかとなった。また、CN9 は Asp-Cys-Leu-Lys-Ala-Leu-Leu-Asn-Asn-- の配列を持ち、CN12 には Asp-Pro-Glu-Arg-Thr-Val-Agr-Phe-Cys-Thr-- と Asp-Pro-Ala-Gly-Thr-Val-Ala-Phe-Val-Thr-- の配列を持つ 2 種のポリペプチドが含まれていることが解った。このアミノ酸配列をヒト Tf のそれと対比させると、CN3 と CN5 に共通する配列はヒト Tf のカルボキシル基側ドメインの 465 番目から 471 番目までの配列と完全に一致した。このことから、CN3 と CN5 に共通する配列は図 9 の C ドメインの右端に位置するものと考えられた。また、CN9 のアミノ酸配列はヒト Tf の N 末端側の 47 から 55 番目までの配列と一致した。さらに、大小両分子ともそのアミノ酸配列は Asp-Pro-- であって、CN12 の配列と一致するので、CN12 が N 末端側のペプチドであると考えられた。この CN12 のアミノ酸配列は Maeda ら (1980) の決めた N 末端側から 10 番目までの配列と一致している。

部分的ではあるが、以上の結果をまとめるとウシ Tf 大小 2 分子種の違いは N 末端側ではなく C ドメイン側にあるものと考えられ、現在のところ、図 9 のモデルが一応妥当と言えよう。最初に Tf 分子の多様性が生ずる原因として 4 つの仮説を挙げたが、N 末端側が同一であること、蛋白質の修飾によるものではなく蛋白質の構造上の違いによるものであるところから (3) と (4) の可能性はない。また、(1) の仮説も否定は出来ないが、小分子の形成されない変異が未だ発見されていないところから、その可能性は少ない。従って、著者は (2) の可能性、すなわち、DNA から mRNA が作られる際に異なったスプライシングを受けることによるのではないかと考えている。このことを確かめるには 2 種の mRNA の存在の有無と cDNA の塩基配列を明らかにするのが早道であろう。

文 献

- Cheng, J. Y., D. Brauer & B. Wittman-Liebold, 1978 FEBS Lett., 93 : 205-214.
 Dorland, L., J. Haverkamp, B. L. Schut, & J. F. G. Vliegenthart, 1977 FEBS Lett., 77 : 15-19.
 Hatton, M. W. C., E. Regoeczi, K. L. Wong & G. J. Kraay, 1976 Biochem. Genet., 15 : 621-640.
 Laemmli, U. K., 1970 Nature, 227 : 680-685.

- Maeda, K., H. A. McKenzie & D. C. Shaw, 1980 *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.*, **11**:63-75.
- McGillivray, R. T. A., E. Mendez, S. K. Sinha, M. R. Sutton, J. Lineback-Zins & K. Brew, 1982 *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **79**:2504-2508.
- Metz-Boutique, M. H., J. Mazurier, J. Jolles, G. Spik, J. Monenil & P. Jolles, 1981 *Biochim. Biophys. Acta*, **670**:243-254.
- Parker, W. C. & A. G. Bean, 1962 *J. Exptl. Med.*, **115**:83-105.
- Richardson, N. E., N. Butress, A. Feinstein, A. Stratil & R. L. Spooner, 1973 *Biochem. J.*, **135**:87-92.
- Stratil, A. & R. L. Spooner, 1970 *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.*, **1**:173-174.
- Stratil, A. & R. L. Spooner, 1971 *Biochem. Genet.*, **5**:347-365.
- Tsuji, S., T. Fukushjma, M. Shiomi & T. Abe, 1981 *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.*, **12**:299-305.
- Tsuji, S., H. Kato, Y. Matsuoka, T. Fukushima, I. Nanjoh, T. Amano & T. Namikawa, 1984a *Biochem. Genet.*, **22**:1127-1143.
- Tsuji, S., H. Kato, Y. Matsuoka & T. Fukushima, 1984b *Biochem. Genet.*, **22**:1145-1159.
- Williams, J., T. G. Elleman, I. B. Kingston, A. G. Wilkins & K. A. Kuhn, 1982 *Eur. J. Biochem.*, **122**:297-303.