S-抗原の生理機能について

大阪教育大学・健康科学 関 隆晴

はじめに

1973年、モルモット網膜の水溶性分画から実験的自己免疫疾患惹起物質として取り出されたS-抗原¹⁾は、その後ウシの網膜からも単離精製され²⁾、分子の性質が調べられた。一方、ウシの網膜中にあり視覚に関連した水溶性タンパク質として単離された48-KDaタンパク質³⁾は、S-抗原と同一のタンパク質であることが1985年に証明された⁴⁾。このタンパク質は、視細胞中のホスホディエステラーゼ(PDE)によるc-GMPの加水分解反応を抑える働きがあるとしてアレスチンともよばれている⁵⁾が、その機構についてはG-タンパク質と競合して直接PDEに作用することによるとするZuckermanの説と、リン酸化された光活性化ロドプシンに結合することにより最終的にPDE活性が抑えられるとするKühnの説がある。1987年にはc-DNAの塩基配列からこのタンパク質の一次構造が決定され^{6),7)}、その二次構造も推定された⁶⁾。S-抗原の諸性質の詳細については総説^{8),9)}を参照していただきたい。

筆者は1989年11月下旬から一年間、米国立保健研究所(NIH)国立眼研究所(NEI)の篠原利道先生の研究室でS-抗原について研究する機会を与えられ、S-抗原の生理機能についてこれまでの説とは異なる可能性を強く示唆する結果を得たのでここに報告する。

マウスS-抗原のパキューロウイルスと昆虫培養細胞系による発現

当初、Kühnの説を確認する実験について検討した際、この説には次のような問題点があることが指摘された。

①哺乳類の松果体にはS-抗原は存在するがロドプシンはない。②S-抗原は視細胞外節のみならず内節(特にシナプス領域)にも多量に存在する。そこでS-抗原の機能は白紙の状態から考えることとし、まずパキューロウイルスの系を用いてS-抗原を大量に発現させ、精製して結晶化を試みることにした。

Physiological function of S-antigen

Takaharu SEKI

Department of Health Science, Osaka Kyoiku University

パキューロウイルスとは鱗翅目の昆虫に感染するウイルスで、個体間感染の際にはポリヒドリンというタンパク質で包まれたオクルージョン(多角体)として食物とともに取り込まれ、消化管内で多角体が分解されて幼虫の細胞に感染するという経路をとる。このポリヒドリンの遺伝子はウイルスの感染にも増殖にも全く関与しないが、感染後期に大量に発現される。そこでポリヒドリンのプロモーター領域下流に異種タンパク質のc-DNAを組み込んだ組換えウイルスは、ガの卵巣由来の培養細胞(Sf9)に感染させて異種タンパク質を大量に発現させる優れた系として利用されている^{10),11)}。そこでこの仕事は、前任の津田正彦先生によって作られていたマウスのS-抗原c-DNAをもった組換えウイルスを用い、Sf9細胞でS-抗原を大量に発現させる条件設定から始まった。Sf9細胞は専用培地にウシ胎児血清を加え(20%)、27℃前後、CO₂なしの条件下で培養した。対数増殖期(約6×10⁵細胞数/ml)の細胞に約10倍量のウイルスを感染した後、3日目の培養細胞を低速遠心で集め、血清を除くためGrace's培地に懸濁し、再度遠心して集めた細胞を出発材料として用いた。通常一回の実験には300mlのウイルス感染細胞培養液4本を用い、約10mgの精製S-抗原が得られた。

マウスS-抗原の精製

まず遠心によって集めた細胞を各種プロテアーゼインヒビターを含むトリスバッファー中でホモジナイズし、超速遠心により水溶性分画を集めた。このとき、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)後ウェスタンブロッティングにより、分子量約5万と3.5万付近の2本のメインバンドが見られ、発現したS-抗原の一部はすでに細胞内で加水分解していることが示された。この水溶性分画を硫酸で段階的に分画したところ、35-45%飽和硫酸分画に分子量約5万のタンパクはほとんど回収され、分子量約3.5万のタンパクは大部分75%分画に回収された。次にこの35-45%分画をセファクリルS-200カラムにかけゲル濾過を行った。分子量約5万のタンパク質溶出分画をSDS-PAGE(銀染色)により確認して集め、溶媒置換の後、濃縮してクロマトフォーカシングを行ったところ、マウスS-抗原はpH4.5-4.2の範囲に溶出した。このようにして得られた試料のSDS-PAGEパターンは、銀染色により分子量5万付近のメインバンドと3.5万付近のマイナーバンドのみが認められたが、いずれのバンドもウェスタンブロッティングによりS-抗原由来であることが確認された。精製S-抗原試料

は目的に応じた適当な溶媒に置き換え、濃縮して冷凍庫または冷蔵庫で保存した。

なおウシの網膜を出発材料とした場合、クロマトフォーカシングによるS-抗原の溶出はpH5.2-4.5の範囲に認められ、また、完全に精製したS-抗原を得るためには少なくとももう一段階の精製操作が必要と思われる。

精製 S-抗原の結晶化における問題点

上記のようにして精製したS-抗原を用いて結晶化しようとしたとき、次の二つの問題点が明らかとなった。一つは分子のヘテロジェニティーが見られたことである。SDS-PAGEによる分子量約5万のバンドは少なくとも3本のバンドからなることが、銀染色、ウェスタンブロッティングいずれにおいても認められ、等電点電気泳動後、ウェスタンブロッティングを行うと、やはり3本のバンドがpI 5付近に認められた。ところで、マウス網膜のタンパク質を同様に等電点電気泳動及びウェスタンブロッティングで調べたところ2本のバンドが認められ、それらの等電点は精製S-抗原の3本のバンドのうちの2本と一致した。このことは網膜中でもS-抗原のヘテロジェニティーが見られることを示しており、同様の結果は、ウシ、サル、ラットの網膜でも見られた。

次にもう一点は、精製したS-抗原は非常に沈澱凝集しやすくなるということであった。約1 mg/mlの濃度の試料でも繊維状の沈澱を生じやすく、特に凍結融解した場合には著しい沈澱が見られた。そこで沈澱凝集の起こりにくい、溶媒条件を見つけるため、いろいろな溶媒条件下、冷蔵庫で保存したところ、ATP存在下では逆に著しく沈澱が促進された。このことは、S-抗原とATPの何らかの緊密な相互作用を示すとともに、S-抗原にはATPとの結合部位が少なくとも2ヶ所存在する可能性があることを示唆するものであった。

S-抗原はヌクレオチドカイネースか

以上のような結果が得られていた9月中旬のある日、同じ家に間借りし、同じ研究室で仕事をしていた白倉治郎先生（名古屋大学医学部）と夕食後のひとときS-抗原の生理機能について話し合っていた。その時、視細胞のシナプス領域に存在するS-抗原を問題にしていた彼の、シナプス領域にはc-AMPの系が関与しているという指摘に、ひょっとしてS-抗原がATPを用い、GMPからGTPへ、またAMPからATPへの再生に関与していたらこれまでのいろいろな結果が矛盾なく説明できるのではとの思いが頭をよぎった（図

図1. 視細胞外節におけるグアニンヌクレオチド代謝回転仮説。

1)。

そこで早速この実験を始めた。まずPEI-セルロースの薄層プレートを用い、0.75Mリン酸カリウム(pH3.5)で各種ヌクレオチドを展開したところ¹²⁾、GTP, ATP, GDP, ADP, GMP, AMPのスポットがきれいに分離した。そこでS-抗原、 γ -³²P-ATP, MgCl₂, ATP, に基質としてGMP, あるいはGDP, AMPを加えた反応系を、37℃, 5, 30, 90分インキュベートした後各1 μ lをPEI-セルロースで展開し、オートラジオグラフィーにより反応生成物を調べた。最初S-抗原試料として、沈澱を調べるため冷蔵庫で保存していた試料を用いたところ、期待した活性(ヌクレオチドカイネース活性)は見られなかった。しかし、ある試料においては基質のない反応系でATPase活性が見られ、しかもこのATPase活性はGMP, あるいはGDP, AMP存在下で抑制されていた。これらの結果は、S-抗原はATPのみならずGMP, GDP, AMPとも何らかの相互作用をしている可能性を示すものであった。そこで次に-80℃凍結保存していた試料を用いて実験を行った。解凍すると濁りが生じたが、そのまま、あるいは遠心上清を用いて上記の反応を行うと、期待していた、GMP→GDP→GTP, AMP→ADPという反応が見られた。この活性は数日間の冷蔵庫保存の間に徐々に低下し、ついにはなくなった。これらの結果は、S-抗原は非常に不安定ながらヌクレオチドカイネース活性をもっている可能性を強く示唆するものである。

この活性がS-抗原に由来するものであり、別のタンパク質によるものでないことを確認するために、まずS-抗原に対する抗体(抗血清)による阻害実験を

試みた。ところがこの抗血清中には強いヌクレオチドカイネース活性があることがわかりこの実験は中断した。そこで最後に、S-抗原を発現していないSF9培養細胞からS-抗原抽出操作を行い、S-抗原が得られるはずの分画にこのヌクレオチドカイネース活性があるか否かを調べた。その結果、ゲル濾過の段階で弱いながらGDP→GTP, AMP→ADPの活性はみられたが、GMP→GDPの活性は見られなかった。この結果は、少なくともGMP→GDPの活性はS-抗原にあることを強く示すものである。

限られた期限のため、研究はここで終わった。今後はS-抗原の酵素活性を安定に保つ溶媒条件を確立し、酵素としてのS-抗原の性質が解明されることが期待される。

おわりに

これまでS-抗原の生理機能としてはPDEによるc-GMP加水分解反応を抑える働きが主として考えられてきた。その機構については先に述べた二つの説があるが、Zuckermanの説は実験的根拠に乏しいといえる。一方Kühnの説については、S-抗原がリン酸化したオプシンと結合するという実験的根拠はあるものの（この現象については我々も確認した）、すでに述べたように、視物質のないところにもS-抗原は存在するという問題がある。また、深田ら¹³⁾はリン酸化光活性化ロドプシンによるトランスデューシンのGDP, GTP交換反応が、S-抗原によって抑えられないことを示し、Kühnの説に疑問を呈している。これらのことから、S-抗原が今まで考えられていたものとは全く異なる生理活性、例えばヌクレオチドカイネース活性をもっていたとしても不思議はない。

もしも、この活性が実際に視細胞外節で機能しているとなると、一個のロドプシンが光を吸収することにより、数枚のディスク間に存在するc-GMPが加水分解されると計算されている杆体外節において、局所的に速やかにGTPを再生するためにS-抗原が多量に存在する（ロドプシンの約1/10）との説明も可能になる。

また、ヌクレオチドカイネースとしては幾つかの分子が知られているが、単量体の分子量はいずれも2万前後であり¹⁴⁾、S-抗原よりはかなり小さい。そして視細胞は他の細胞と比較したとき、アデニンヌクレオチドに匹敵する量のグアニンヌクレオチドを含み、しかもグアニレートカイネース活性が高いという特徴をもっている¹⁵⁾。そこで視細胞では通常のヌクレオチドカイネースではなくS-抗原が利用されて

いるとすれば、S-抗原と光受容細胞の密接な関連が示唆される。S-抗原の存在が知られている細胞（松果体¹⁶⁾、レンズ¹⁷⁾、ハエの視細胞^{18)~20)}）がいずれも光受容に関係の深い細胞であることから楽しい想像をかきたてられるものである。

最高の研究環境で研究の楽しさを味わう機会を与えていただいた篠原利道先生、並びに貴重な助言をいただいた臼倉治郎先生はじめ、親切に指導していただいた篠原研のスタッフ全員に心からお礼を申し上げたい。

文 献

- 1) Wacker, W. B. (1973) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **45**, 582-592.
- 2) Wacker, W. B. et al., (1977) *J. Immunol.* **119**, 1949-1958.
- 3) Kühn, H. (1978) *Biochemistry* **17**, 4389-4395.
- 4) Pfister, C. et al., (1985) *Science* **228**, 891-893.
- 5) Zuckerman, R. et al., (1985) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **26**, 45.
- 6) Shinohara, T. et al., (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6975-6979.
- 7) Yamaki, K. et al., (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142**, 904-910.
- 8) Shinohara, T. et al., (1988) *Progress in Retinal Research* (Osborn, N. N., Chader, J. G., eds.) **8**, 51-66, Pergamon Press, New York.
- 9) 篠原利道, 津田正彦, 山木邦比古 (1989) 蛋白質・核酸・酵素, **34**, 537-545.
- 10) Summers, M. D., Smith, G. E. (1987) A manual of methods for baculovirus vector and insect cell culture procedures., *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin* No. 1555.
- 11) 宮本 力, 古市泰宏 (1990) 蛋白質・核酸・酵素, **35**, 2598-2612.
- 12) 清水 隆, 古沢清孝, 大箸信一 (1989) 生体の科学, **40**, 388-391.
- 13) Fukada, Y., et al., (1990) *FEBS*, **261**, 419-422.
- 14) 木村成道 (1988) 実験医学, **6**, 1151-1156.
- 15) Berger, S. J. et al., (1980) *J. Biol. Chem.*, **255**, 3128-3133.
- 16) Johse, M. J. et al., (1990) *Science* **248**, 1547-1550.
- 17) Shinohara, T. et al., (1991) *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*, **32**, 1007.
- 18) Smith, D. P. et al., (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1003-1007.
- 19) Hyde, D. R. et al., (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1008-1012.
- 20) Yamada, T. et al., (1990) *Science* **248**, 483-486.