— 原 著 —

トランスフェリン・レセプターの新しい精製方法と
その生化学的性質

田口 正男

日本医科大学生化学第2教室

An improved purification of human placental transferrin receptor and
biochemical properties of the receptor

Masao Taguchi

The Second Department of Biochemistry, Nippon Medical School

An improved method for the purification of human placental transferrin receptor (Tf-R) was developed. Fresh human placenta was homogenized in cold acetone and the acetone powder was prepared. After the acetone powder had been washed with HEPES buffer, the insoluble proteins containing Tf-R were separated by centrifugation and dissolved in Emulgen 109P-containing buffer. Tf-R was collected by affinity binding to Tf-Sepharose and extracted by consecutive treatment with 4 different kinds of buffers. Tf-R was eluted by buffer C (2 M KCl) and buffer D (0.5 M NaSCN). Tf-R was characterized as a 90-kDa monomer on gradient SDS-PAGE (4–20%) in the presence of 2-mercaptoethanol. Though there were several minor bands of 180- and above 205-kDa, all these bands were confirmed as Tf-R by Western blotting using an anti-Tf-R monoclonal antibody (OKT 9). The apparent molecular weights, measured by HPLC using a TSK-G 3,000 SW column, demonstrated that Tf-Rs eluted with buffer C were approximately 370-, 500- and above 500-kDa, but only a peak of above 500-kDa was found in Tf-R eluted with buffer D. Although the polymers of Tf-R with molecular weight of above 500-kDa were resistant to trypsin digestion, the Tf-R of 370-kDa was resistant to the enzyme only when it conjugated to the diferric Tf. The stability of the polymers of above 500-kDa to trypsin digestion suggested an advantage for the repeated use of Tf-R in the endocytosis of diferric Tf, which was performed by the translocation of Tf-R between cell surface and intracellular vesicles.

Key words: human transferrin receptor, purification and biochemical properties, polymer formation

緒 言

トランスフェリン(Tf)は、分子量 80-kDa の糖タンパク質であり、その主な生理機能は鉄の運搬である。鉄イオンの細胞内への取り込みは、Tf と鉄イオン 2 原子が結合した diferric Tf が細胞表面にある糖タンパク質であるトランスフェリン・レセプター (Tf-R) と特異的に結合し、結合体として細胞内へエンドサイトーシスされることが種々の細胞で証明されている¹⁻¹⁰⁾。Tf-R は、分子量 190-kDa の糖タンパク質で分子量 95-kDa の相同の 2 つの一量体より構成され、一

量体あたり 1 分子の diferric Tf と結合することができる¹¹⁻¹³⁾。Diferric Tf は receptor-mediated endocytosis により細胞内に取り込まれ endosome (endocytotic vesicle) を形成する¹⁻¹⁰⁾。Specific proton pump^{14,15)}により endosome 内の pH が低下すると Tf より鉄の解離が起こる。しかし、Tf-R と apo-Tf との解離は起こらず、細胞表面に再度露出し、細胞外液のもつ中性領域の pH にさらされてはじめて両者の解離は起こる^{1,5,9)}。細胞内で解離された鉄は heme 合成の原料となるか、または ferritin として貯蔵される^{9,16)}。また、細胞表面で apo-Tf を解離した Tf-R は、再び receptor-mediated endocytosis を繰り返す。同様に、細胞表面で解離された apo-Tf も、血液中で再び鉄イオンと結合し diferric Tf となり鉄運搬に再利用され

Correspondence to Masao Taguchi, Department of Biochemistry, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

る。

Tf-R の存在が最初に証明されたのは網赤血球であるが^{17,18)}、その後ヒト胎盤絨毛細胞をはじめとして種々の細胞で、その存在が確認された^{11,13,19-23)}。Seligman ら¹⁹⁾をはじめ多くの研究者により Tf-R の精製の試みがなされてきた。しかし、この精製方法はきわめて複雑であり、収量の面からも十分とは考えにくい。そのため、種々の改良がなされたが、いまだ満足いく方法には至らなかった^{12,24-26)}。そこで著者は、アセトン処理を利用し、さらに Tf-R の生化学的特徴である Tf への親和性を応用し、結合活性を有した Tf-R へ精製法を開発した。さらに得られた Tf-R の生化学的性質を検討したので報告する。

研究材料および方法

(1) 材料

1) ヒト胎盤

正期正常妊娠の分娩後 30 分以内の新鮮なヒト胎盤を用いた。

2) 試薬

CNBr-activated Sepharose 4B は、Pharmacia Fine Chemical 社、PMSF (phenyl-methyl-sulfonyl fluoride), Soybean Trypsin inhibitor, high molecular weight standard mixture, Anti-mouse Ig-G biotin conjugate, Avidine-labeled horseradish peroxidase, 3,3'-diaminobenzidine (tetrahydrochloride) は、Sigma Chemical 社、電気泳動用グラジエントゲル SDS-PAGE プレート 4/20 は、第一化学薬品、Emulgen 109 P は、花王、desferrioxamine は、CIBA-GEIGY 社、抗 Tf-R モノクロナール抗体 NU-tfR1 は、生化学工業、抗 Tf-R モノクロナール抗体 OKT 9 は、Orth Diagnostic System 社、Trypsin (Bovine Pancreas) は、P-L Bio-chemical 社、TSK-G 3,000 SW カラム (7.5 mmID×60 cm) は、東洋曹達工業、Gel Filtration Standard は、Bio-Rad 社よりそれぞれ購入した。その他の試薬は市販の特級品を用いた。

(2) 方法

1) ヒト血清 Tf の分離精製

ヒト血清より吉野らの方法²⁷⁾により Tf を分離精製した。精製 Tf は sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) により、80-kDa の単一バンドであることを確認した。

2) ニトリロ三酢酸第二鉄 (Fe-NTA) の作製

栗井らの方法²⁸⁾にしたがってニトリロ三酢酸三ナト

リウム (NTA) より黒褐色の Fe-NTA を得た。

3) Diferric Tf-Sepharose の作製

CNBr-activated Sepharose 4B 8.6 g (30 ml) に diferric Tf を 10 mg/ml の濃度で製品指示書にしたがってカップリングさせた。最終段階で非特異的に吸着した Tf を除去するため酸性緩衝液で洗浄した。そのため Tf-Sepharose はアポ化されているので Fe-NTA を加え、diferric Tf-Sepharose とした。

4) Tf-R の精製

(i) アセトンパウダーの作成

Hudgin ら^{23,29)}の方法にしたがってアセトンパウダーを作製した。分娩後 30 分以内の新鮮なヒト胎盤組織から羊膜、臍帯を除去後、胎盤実質部 160 g を細切し、0.1 mol/l Tris 緩衝液 (0.1 mol/l Tris, pH 7.4, 0.01 mol/l EDTA, 0.2 mol/l NaCl, 50 μmol/l PMSF, 2 mg/l Trypsin inhibitor) にてすみやかに洗浄した。ついで -20℃ に冷却した 5 倍量 (v/w) のアセトンを加え、30 秒間、2 回ワーリングブレンダーにてホモジナイズし、懸濁液を濾過し、濾液を除去した。この操作を 2 回繰り返す。沈澱を室温に 30 分間放置するとパウダー状になった。

(ii) アセトンパウダーの可溶化

アセトンパウダーを約 20 倍量 (v/w) の 50 mmol/l HEPES 緩衝液 (50 mmol/l HEPES pH 7.4, 0.1 mol/l KCl, 50 μmol/l PMSF, 2 mg/l Trypsin inhibitor) に懸濁し、10,000×g 10 分間遠心分離し沈澱を集めた。この操作を 3 回繰り返す。アセトンパウダーを十分洗浄した。ついでアセトンパウダーを 20 g/l Emulgen 109 P を含む 50 mmol/l HEPES 緩衝液にて再懸濁し、90 秒間フルスピードでワーリングブレンダーにて可溶化した。さらに 4℃、1 時間静かに攪拌し可溶化を終了した。その後 10,000×g 30 分間遠心分離し上清を集め、この上清を 1 g/l Emulgen 109 P を含む 50 mmol/l HEPES で一晚透析した。

(iii) Tf-R の溶出

透析上清を diferric Tf-Sepharose と室温で 1 時間孵置した後に、カラム (2 cmID×25 cm) に重層し、1 g/l Emulgen 109 P を含む 50 mM HEPES にて十分に洗浄した。ついで以下の 4 種類の buffer 各 50 ml を順次カラムに負荷した。

i) buffer A : 0.1 mol/l sodium citrate pH 5.0, 1 g/l Emulgen 109 P, 50 mg/l desferrioxamine, 50 μmol/l PMSF, 2 mg/l Trypsin inhibitor

ii) buffer B : 50 mmol/l HEPES pH 7.4, 100

mmol/l KCl, 1 g/l Emulgen 109 P, 50 mg/l desferrioxamine, 50 μ mol/l PMSF, 2 mg/l Trypsin inhibitor

iii) buffer C : 50 mmol/l HEPES pH 7.4, 2 mol/l KCl, 1 g/l Emulgen 109 P, 50 μ mol/l PMSF, 2 mg/l Trypsin inhibitor

iv) buffer D : 50 mmol/l HEPES pH 7.4, 0.5 mol/l NaSCN, 1 g/l Emulgen 109 P, 50 μ mol/l PMSF, 2 mg/l Trypsin inhibitor

溶出終了後は apo-Tf-Sepharose となっているため Fe-NTA による鉄負荷を行い diferric Tf-Sepharose に変えて保存し、次回の実験に利用した。

5) High pressure liquid chromatography (HPLC)

TSK-G 3,000 SW カラムを用い、25~100 μ l の試料 (Tf-R, Tf: Tf-R Complex) を注入した。50mmol/l HEPES, 0.3 mol/l KCl, 0.1 mmol/l dithiothreitol, 1 g/l Emulgen 109 P を緩衝液と使用し、1 ml/min の流速で実施しカラムより流出するタンパク質を 280 nm における吸光度にて追跡した。また、Tf-R 調製用として、流出液を 1 ml ずつに分取した。分子量は、high molecular weight standard mixture を用いて作成した検量線より決定した。

6) Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Laemmli 法の変法³⁰⁾にしたがった。ゲルは、電気泳動用グラジエントゲル SDS-PAGE プレート 4/20 を使用した。還元条件での試料処理は、1% SDS, 5% 2-メルカプトエタノールを含む試料を 100℃ で 2 分間加熱処理した。ゲルの染色は、クマシーブルーにて行った。

7) Western blotting

SDS-PAGE を行い、ニトロセルロース膜に転写後、抗 Tf-R モノクロナール抗体を反応させた。その後、Anti-mouse Ig-G biotin conjugate, Avidine-labeled horseradish peroxidase を反応させ 3,3'-diaminobenzidine (tetrahydrochloride) との反応によって可視化した。

8) HPLC による精製 Tf-R 分画の Tf 結合能の評価

精製 Tf-R 分画の Tf との孵置の有無による HPLC 流出パターンの相違を比較検討した。

(i) buffer C より溶出した Tf-R 分画 (tetramer) の Tf 結合能の評価

buffer C より溶出した Tf-R 分画の Tf-R 分画単独

50 μ g およびこの Tf-R 分画 35 μ g と Tf 85 μ g との混合物を室温で 30 分間孵置後、それぞれ別々に HPLC 分析を行った。

(ii) Buffer D より溶出した Tf-R 分画の Tf 結合能の評価

Buffer D より溶出した Tf-R 分画単独 25 μ g およびこの Tf-R 25 μ g と Tf-100 μ g との混合物を室温で 30 分間孵置後、それぞれ別々に HPLC 分析を行った。

9) トリプシンによるタンパク分解^{26,34)}

Buffer C, D より溶出した Tf-R 単独およびそれぞれの Tf との複合体を Centricon 30 (Amicon) にて濃縮し、50 mmol/l HEPES pH 5.5 および 7.4 で希釈し、pH 5.5 および 7.4 の試料を作製した。pH 5.5 および 7.4 のそれぞれの試料にトリプシンをモル比が 1 : 2 になるように添加し、氷冷中で 30 分間孵置した後、トリプシンに対して 100 倍過剰の PMSF を加え反応を停止させ、SDS-PAGE 分析を行った。

結 果

1. Tf-R の精製

160 g のヒト胎盤より約 4 mg の精製 Tf-R を得た。上述のように Tf-R の精製は、ヒト胎盤よりアセトンパウダーの作製、可溶化、Tf-Sepharose affinity chromatography の 3 段階より成っている。

Fig. 1 に diferric Tf-Sepharose カラムの溶出パターンを示した。まず、三価鉄と強い親和性を有するキレート剤である desferrioxamine を含む buffer A にて Tf をアポ化すると鉄の放出が起こり、淡紅色のカラムが白色に変化した。この時、カラム流出液に大きなピークが出現したが、このピークには少量のタンパクしか含有していないため、カラムから遊出した三価のクエン酸鉄が主体をなすと思われた。ついで buffer B にて液性を中性に戻すと小さなピークが認められた。さらに buffer C にて KCl 濃度を 2.0 mol/l と上昇させると大きなピークが出現した。引き続き 0.5 mol/l NaSCN を含む buffer D にてもピークが認められた。

Fig. 2 は、buffer A, B に引き続き、buffer C の KCl 濃度を 0.1 mol/l から 3.0 mol/l までグラジエントを負荷した場合の溶出パターンを示した。1.0 mol/l 以上の濃度においても吸着タンパク質の溶出が認められた。従来の報告²⁵⁾に用いられた溶出液の KCl 濃度が 1.0 mol/l となっているが、この濃度ではタンパクの溶出が不完全であることが明らかとなった。よって著

Fig. 1 Elution of proteins bound to a diferric Tf-Sepharose column
Acetone powder extract was incubated with diferric Tf-Sepharose for 1 hr at room temperature and then poured into a column. After washing the column with 50 mmol/l HEPES buffer, proteins were eluted in four sequential buffers and a fraction of 2.5 ml was collected and the absorbance at 280 nm was measured

Fig. 2 Elution pattern of transferrin receptor from diferric Tf-Sepharose column with buffer C containing KCl gradient
After elution of proteins with buffer A and B, the column was applied with buffer C containing KCl gradient (0.1~3.0 mol/l)

者は、buffer C の KCl 濃度を 2.0 mol/l とした。

Fig. 3 は、アセトンパウダーの可溶化抽出液および affinity chromatography の buffer B, C, D より溶出したタンパクの SDS-PAGE を示した。アセトンパウダーの可溶化抽出液 (Ext) では、きわめて多数のバン

ドが認められた。

Buffer B 流出液 (B) に認められるバンド (分子量: 80-kDa) は、免疫電気泳動法により Tf であることを確認した。buffer C および D の流出液 ((C) および (D)) では、還元状態で 90-kDa, 非還元状態で 180-kDa が主

Fig. 3 Gradient SDS-PAGE (4~20%) analysis of four protein fractions obtained from diferric Tf-Sepharose column

Each sample was concentrated to 7 mg/ml using a Centricon 30 apparatus (Amicon) and incubated with 1% SDS (W/V) in the presence (reduced) or absence (nonreduced) of 5% 2-mercaptoethanol (W/V) at 100°C for 2 min. Lane Ext is acetone powder extract; Lane B, C and D are proteins eluted with buffer B, C and D respectively. Proteins concentration applied to each gel are as follow: Std (5 µg), Ext (15 µg), B (2 µg), C (15 µg), D (10 µg). Lane Std is a mixture of myosin (205-kDa), β -galactosidase (116-kDa), phosphorylase B (97.4-kDa), bovine serum albumin (66-kDa), ovalbumin (45-kDa) and carbonic anhydrase (29-kDa). Protein bands were visualized by staining with Coomassie Blue.

なバンドとして認められた。(C),(D)の還元状態で認められる 180-kDa のバンドは、還元剤を使用したのにも拘らず、タンパク量が大量のため還元されずに残ったバンドと考えられた。すなわち、流出液(C),(D)とも、少量負荷した場合には還元状態で、90-kDa のバンドのみが認められた。そのほか流出液(C),(D)では、70-kDa の位置および高分子領域にも小さなバンドが認められた。

Fig. 4 は、抗 Tf-R モノクローナル抗体 OKT 9 を用いた Western blotting の結果である。buffer C および D にて流出したすべてのタンパク質 (Fig. 3 (C, D)) は、OKT 9 と反応した。すなわち、(C),(D)の還元状態で認められる 90-kDa のバンドは、Tf-R の一量体、非還元状態で認められる 180-kDa のバンドは

Fig. 4 Western blotting of the gradient SDS-PAGE. The proteins separated by SDS-PAGE (Fig. 3) were transferred to a nitrocellulose membrane and reacted with anti-Tf-R monoclonal antibody OKT 9 (5 µg) for 2 h at room temperature. After incubating with anti-mouse Ig-G biotin conjugate and avidine-labelled horseradish peroxidase, the membrane was finally reacted with 3,3'-diaminobenzidine (tetrahydrochlorine) to visualize proteins.

Tf-R の二量体であることを免疫学的に確認した。70-kDa の小さなバンドは、Turkewitz ら^{26,34)}が報告している Tf-R の extracellular fragment と想像された。また、アセトンパウダーの可溶性抽出液は、理論上 OKT 9 と反応するバンドがあるはずだが検出されなかった。それは Tf-R の相対濃度が低いためと考えられた。Buffer B からの流出液 (B) は無反応であったが、この現象は (B) の含有するタンパク質が Tf であることを示すものである。一方、抗 Tf-R モノクローナル抗体 NU-tfR1 を用いて Western blotting を実施しても、OKT 9 と全く同様な結果が得られた。

2. HPLC による精製 Tf-R の分子量的検討

TSK-G 3,000 SW カラムを用い、精製 Tf-R の分子量的検討を加えた。buffer C より溶出した Tf-R の TSK-G 3,000 SW gel filtration HPLC の流出パターン、およびそれぞれのピークの部分の SDS-PAGE (還元状態) を Fig. 5 に示した。最も典型的なパターンが最上段で、HPLC における分子量は 370-kDa であった。二量体の重合体として存在すると想像されたが、SDS-PAGE の結果よりその構成単位は 90-kDa の一量体であることを確認した。また時に認められるのが

Fig. 5 Gel filtration (HPLC) patterns of Tf-R obtained from buffer C
Gel filtration (HPLC) on a TSK-G 3,000 SW column was performed in 50 mmol/l HEPES pH 7.4 containing 0.3 mol/l KCl, 0.1 mmol/l dithiothreitol and 1 g/l Emulgen 109 P at a flow rate of 1 ml/min and 1 ml fractions were collected. Three elution patterns were obtained and fraction of each major peak was concentrated to 1 mg/ml using a Centricon apparatus. These samples were analysed by gradient SDS-PAGE in reduced condition as described in the experiment of Fig. 3. Arrows indicate molecular weight standards: thyroglobulin (670-kDa), gamma globulin (158-kDa), ovalbumin (44-kDa), myoglobin (17-kDa), vitamin B₁₂ (1.35-kDa).

最下段のパターンで HPLC の void volume の位置に出現し、二量体の複合体と思われたが、これも SDS-PAGE よりその構成単位は 90-kDa の一量体であった。中段に認められるパターンは、両者の移行像を示していた。このように Tf-R が四量体として存在しても、さらに二量体の複合体として存在しても SDS-

PAGE では還元状態で 90-kDa、非還元状態で 180-kDa になることがこれより明らかになった。同一タンパク質であるにもかかわらず、HPLC による分子量測定値と SDS-PAGE による分子量測定値に相異が存在することにより、SDS-PAGE による分子量測定値は、その構成単位のみを示していると考えられた。これらの結果により精製 Tf-R は、生理的な状態では、180-kDa の複合体が容易に集合し巨大分子を形成した Tf-R (self-associated Tf-R) の状態として存在していると示唆された。

Fig. 6 に、buffer D より溶出した Tf-R の HPLC パターンおよびそのピーク部分の SDS-PAGE を示した。Buffer C の場合とは異なり buffer D より溶出する Tf-R はすべて void volume の位置に出現し四量体は認められなかった。この場合も SDS-PAGE の結果より、その構成単位はすべて 90-kDa の一量体であった。

3. HPLC による精製 Tf-R の Tf 結合能の評価

精製 Tf-R と Tf を室温で 30 分間孵置し、Tf: Tf-R complex を形成させ、Tf-R の複合体形成に伴う分子量の増加を gel filtration HPLC にて検討した。

Fig. 7 に四量体の Tf-R 単独と、この Tf-R を diferic Tf と孵置後、HPLC 分析した結果を示した。実線で四量体の Tf-R 単独、点線で Tf と孵置後の流出パターンを図示した。Tf との孵置により Tf-R 単独時に認められたピークは完全に消失し、高分子領域に新たなピークおよび Tf の retention time に相当するピークを認めた。すなわち、精製 Tf-R 分画は、Tf と反応し Tf: Tf-R complex を形成したのと考えられた。また Tf-R 単独時に認められたピークが完全に消失していることより結合活性をほぼ完全に維持しているものと考えられた。

ついで HPLC にて void volume の位置に認められた self-associated Tf-R の結合活性を検討した。実線で Tf-R 単独、点線で Tf と孵置後の流出パターンを Fig. 8 に示した。ただし、TSK-G 3,000 SW (排除限界分子量 500-kDa) では void volume の位置に self-associated Tf-R 自身のピークが出現するため、Tf との結合により分子量が増加しても buffer C より流出した Tf-R に認められたような retention time の短縮 (Fig. 7) としては観察されえない。そのため Tf-R 単独時のタンパク量と Tf と孵置した Tf-R の終濃度を同一にし、その他の測定条件を変化させずに void volume の位置に認められるピーク高を比較した。self-

Fig. 6 Gel filtration (HPLC) pattern of Tf-R obtained from buffer D
Experiment was carried out by the same condition as in Fig. 5.

Fig. 7 Gel filtration (HPLC) pattern of Tf-R and Tf: Tf-R complex eluted with buffer C
Gel filtration (HPLC) was performed under the same condition as in Fig. 5. Solid line represents the pattern of Tf-R ($50\mu\text{g}$). Broken line represents the pattern of a mixture of Tf-R ($40\mu\text{g}$) and Tf ($80\mu\text{g}$), incubated 1 h at 37°C prior to the analysis.

Fig. 8 Gel filtration (HPLC) pattern of Tf-R and Tf: Tf-R complex eluted with buffer D
Experiment was carried out under the same condition as described in Fig. 5. Solid line represents the pattern of Tf-R ($25\mu\text{g}$). Broken line represented the pattern of a mixture of Tf-R ($25\mu\text{g}$) and Tf ($100\mu\text{g}$), incubated for 1 hr at 37°C prior to the analysis.

associated Tf-R と Tf を孵置することにより、Tf-R 単独の場合のピークと比較して、ピーク高の顕著な増加が認められた。これより TSK-G 3,000 SW の void

Fig. 9 Gradient SDS-PAGE (4~20%) of trypsin digested Tf-R eluted with buffer C and Tf: Tf-R complex
After incubating Tf-R (50 μ g) and Tf 100 μ g) in HEPES buffer pH 7.4, the complex was concentrated to 10 mg/ml and was diluted 1 : 10 in HEPES buffer pH 7.4 or 5.5. A trypsin : Tf-R (1 : 2 molar ratio) was employed and proteolysis was carried out for 30 min on ice. The reaction was terminated by adding PMSF. Lane 1 (molecular weight standard) : Lane 2 (Tf-R) : Lane 3 (Tf: Tf-R complex).

Fig. 10 Gradient SDS-PAGE (4~20%) of trypsin digested Tf-R eluted with buffer D and its Tf: Tf-R complex
The experiment was carried out under the same condition as described in Fig. 10. Lane 1 (molecular weight standard) : Lane 2 (Tf-R) : Lane 3 (Tf: Tf-R complex).

volume の位置に認められる Tf-R も Tf との結合活性を有し Tf: Tf-R complex を形成したものと考えられた。

4. トリプシン消化による精製 Tf-R 分画の安定性の検討

Turkewitz ら³⁵⁾は、70-kDa の Tf-R (extra-cellular

fragment) および Tf との complex の消化酵素に対する安定性を検討し, complex の形成ならびに self-association により安定性が增大すると報告している。そこで, Tf-R (四量体; buffer C より溶出), self-associated Tf-R (buffer D より溶出) およびそれぞれの Tf-R: Tf complex をトリプシン消化し, トリプシン消化の前後における SDS-PAGE 像の相違を比較することによりその安定性を検討した。Fig. 9 は, 四量体の安定性を検討したもので, pH 7.4, 5.5 とともに Tf-R 単独では分解されてしまうが, complex を形成することによりトリプシンに対する抵抗性の増大が認められた。また, self-associated Tf-R は, pH 7.4, 5.5 とともにトリプシン消化を受けず安定であり, なおかつ complex も pH 7.4, 5.5 とともにトリプシン消化を受けず安定であった (Fig. 10)。以上の結果から Tf-R は, complex の形成および self-association により安定化がはかれると考えられた。

考 察

Tf-R に関する研究の歴史は古く, 1963 年, Jandl and Katz³¹⁾ が immature red cell を用いて Tf-R の存在を示唆したのがそのはじまりである。以来, 多数の研究が報告されているが, Tf-R の精製についての歴史は浅く, 1979 年の Seligman ら¹⁹⁾ の報告が最初である。しかし, 収量が悪く, 操作がきわめて複雑であるうえに活性が低いなどの欠点が指摘され, 1986 年, Anderson ら²⁵⁾ により簡略化した精製方法が報告された。彼らの精製方法の特徴は, Tf-R および Tf の持つ生化学的特徴を精製に応用した点である。すなわち, Tf-R と Tf の親和性は, diferric-Tf, monoferric-Tf, apo-Tf の順に低下すること, および Tf-R と complex を形成している diferric-Tf を弱酸性下でアポ化しても, Tf-R と apo-Tf は解離せず, 液性が中性になって初めて両者の解離が生じるという特徴を利用して Tf-Sepharose カラムから Tf-R を溶出させた点である。そして, この精製方法をさらに改良したのが Turkewitz ら²⁶⁾ であり, 内因性 Tf による affinity chromatography の競合現象の除去 (iron chelation), および Tf-Sepharose カラムの溶出条件をさらに改善した。前記した 3 者に共通していえるのは, 胎盤の洗浄, 可溶化, 硫酸沈渣, 透析, affinity chromatography という段階を経ていることである。しかし, 胎盤はきわめて血液を豊富に含む組織であるため, 多量の胎盤を短時間に洗浄し血液成分を完全に除去するのは困難

である。そのため内因性の Tf が残り affinity chromatography の収量を下げる原因に成ると考えられる。また, 多量の胎盤を完全に可溶化することはきわめて難しく, そのため多量の胎盤を使用したにも拘らず, 結果的には少量の胎盤しか可溶化されていないと考えられた。このような欠点を改善するため, 著者は長期保存が可能であるアセトンパウダーを利用した。すなわち, 胎盤ホモジェネートのアセトンパウダーから出発することにより, 胎盤の洗浄が不十分で血液が残存する試料であっても, アセトンパウダーを溶媒で洗浄することによって胎盤成分から血漿成分 (血漿 Tf を含む) を分離可能とした。また, 160 g の胎盤は約 30 g のアセトンパウダーを作るため, 可溶化の効率が上げられると考えられた。同時にアセトンパウダーを利用すれば, 硫酸沈渣を省略しても Tf-R の精製が可能であることが示された。さらに著者の精製方法の特徴は, Tf-Sepharose カラムの再利用が可能である点である。従来の報告では Tf-Sepharose カラムは, 再利用は不可能とされてきたが, 鉄負荷に Fe-NTA を利用することにより再利用が可能と成った。また, rat kidney, reticulocyte, myeloma cell, erythroleukemic cell を検体として Tf-R の精製の報告^{21,32,33)} があるが, 解剖学的にも Tf-R が豊富に存在し, しかも入手しやすい胎盤が精製材料として最も適していると思われた。

従来 Tf-R の分子量に関する考察は, SDS-PAGE に依存してきた。1982 年, Schneider ら¹³⁾ は, 抗 Tf-R モノクローナル抗体 OKT 9 を用いた immunoprecipitation により, Tf-R は 90-kDa の一量体の disulfide-linked homodimer であると報告している。彼らも SDS-PAGE を利用しており, gel filtration により Tf-R の分子量に関する考察を加えている報告はきわめて少ない。1988 年, Turkewitz らは Tf-R の精製に成功し, 精製 Tf-R の分子量は gel filtration により四量体 ($M_r = 420\text{-kDa}$), 二量体 ($M_r = 190\text{-kDa}$) であると報告しているが, 他方 SDS-PAGE ではすべて 90-kDa の一量体 (還元状態), 180-kDa の二量体 (非還元状態) であると報告している²⁶⁾。このように同一物質でありながらも gel filtration と SDS-PAGE では分子量に違いがあることを示している。これは著者の実験結果 (Fig. 5, 6) を支持するものであり, SDS-PAGE での分子量が必ずしも生理的な状態での分子量を反映しているとは限らないと示唆された。そのため彼らは, 同年, Tf-R の self-association の概念を導入した³⁴⁾。Tf-R をトリプシン処理して生ずる 70-kDa の frag-

ment は、pH 依存性の self-association を受けることを HPLC および電子顕微鏡的所見により証明した。self-association のメカニズムについては全く不明であるが著者の実験系においては、可溶化された Tf-R と Tf がカラム内で receptor 結合することによって、あるいは diferric Tf-sepharose がアボ化された段階で同様の self-association が生じ、これがカラムより溶出したものと考えられた。著者は、Tf-R の self-association により、endosome 内に多数の Tf: Tf-R complex を包含できれば receptor-mediated endocytosis が効率良く行われ、生体にとって合目的と考えている。しかし、一つの clathrin-coated vesicle の中に一分子の Tf-R のみを含み、可溶化されてはじめて self-association が起こるという報告³⁵⁾もあり、アセトンパウダーの可溶化溶液の段階で self-association が起こる可能性もある。ただし、この報告においては、細胞膜に存在するすべての clathrin-coated vesicle について検討しているわけではないばかりか、Tf-R に特異的な clathrin-coated vesicle であるという証明もない。そのため他の receptor の clathrin-coated vesicle も含まれている可能性もあり、実際に clathrin-coated vesicle 中に含まれる Tf-R 数より少なく計算している可能性がある。いずれにせよ、今後の研究課題として残された問題である。

Receptor-mediated endocytosis は、Tf に特有な ligand 取り込み機構ではなく、insulin, asialoglycoprotein, low density lipoprotein などでも報告⁵⁾されている。Endosome 内の pH が specific proton pumps により酸性に転換すると、レセプターとリガンド間の結合は解離され、そのためこのような endosome を CURL (compartment of uncoupling of receptor and ligand) と呼ばれている。しかし、Tf の場合にはこのような解離は起こらず Tf: Tf-R complex を形成したままである。このようにして細胞内に取り込まれたレセプターとリガンドがライソソームなどの細胞内消化酵素により分解されてしまう場合と分解されずに細胞表面に recycle される場合が起こり得る。Tf の場合は後者に属するが、この両者の違いを支配する因子は全く不明であるが、著者の実験結果から Tf: Tf-R 複合体および self-associated Tf-R のトリプシンに対する抵抗性より何らかの関与が示唆された。Receptor-mediated endocytosis のどの段階で、またどのような部位で self-association を起こすかは不明であるが、endosome 内では Tf: Tf-R complex が self-

association の状態となる可能性もある。そこで Tf-R および complex の安定性をトリプシン消化によって検討したところ Tf-R は、complex の形成および self-association によって安定性の増大が認められるという結論を得た。すなわち、Tf-R は self-association によって安定化するため細胞内消化酵素の分解を受ける割合が少なく recycle すると考えられた。

結 論

1) ヒト胎盤からアセトンパウダーを作製し、Emulgen 109 P 抽出後、Tf-Sephadex に対する親和性を利用してトランスフェリン・レセプター (Tf-R) を精製した。

2) 精製 Tf-R 分画は、SDS-PAGE で 90-kDa (還元条件)、180-kDa (非還元条件) であった。

3) Gel filtration では、四量体 (Mr 370-kDa)、さらにその複合体として存在した。

4) 抗 Tf-R モノクローナル抗体 OKT 9, NU-tfR1 を用い Western blotting を行くとクマシーブルーで染色されるすべてのバンドが反応性を示した。

5) 精製 Tf-R 分画の Tf との結合性活性を、Gel filtration より確認した。

6) 精製 Tf-R 分画の安定性を Trypsin 消化により検討すると Tf: Tf-R complex の形成、および Self-association により安定性の増大が認められた。

稿を終るに臨み、直接ご指導いただきました生化学第2教室吉野芳夫主任教授、平井幸彦博士、ならびに教室員各位に深く感謝いたします。また、Emulgen 109 P, OKT 9 をご提供いただきました花王 (株)、Orth Diagnostic System 社の両社に深く感謝いたします。

なお、本論文の要旨は第 62 回日本生化学会大会 (1989 年 10 月) において発表した。

文 献

- 1) Karin, M. and Mintz, B.: Receptor-mediated endocytosis of transferrin in developmentally totipotent mouse teratocarcinoma stem cells. *J. Biol. Chem.*, 256, 3245~3252, 1981.
- 2) van Renswoude, J., Bridges, K.R., Harford, J.B. and Klausner, R.D.: Receptor-mediated endocytosis of transferrin and the uptake of Fe in K562 cells; Identification of a nonlysosomal acidic compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 6186~6190, 1982.
- 3) Lamb, J.E., Ray, F., Ward, J.H., Kushner, J.P. and Kaplan, J.: Internalization and subcellular localization of transferrin and transferrin receptors in HeLa cells. *J. Biol. Chem.*, 258, 8751~8758, 1983.
- 4) Ciechanover, A., Schwartz, A.L., Dautry-Varsat, A. and Lodish, H.F.: Kinetics of internalization and recycling

- of transferrin and the transferrin receptor in a human hepatoma cell line. *J. Biol. Chem.*, 258, 9681~9689, 1983.
- 5) Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A. and Lodish, H.F.: pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2258~2262, 1983.
 - 6) Harding, C., Heuser, J. and Stahl, P.: Receptor-mediated endocytosis of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.*, 97, 329~339, 1983.
 - 7) Hopkins, C.R. and Trowbridge, I.S.: Internalization and processing of transferrin and the transferrin receptor in human carcinoma A431 cells. *J. Cell Biol.*, 97, 508~521, 1983.
 - 8) Klausner, R.D., Ashwell, G., van Renswoude, J., Harford, J.B. and Bridges, K.R.: Binding of apotransferrin to K562 cells; Explanation of the transferrin cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2263~2266, 1983.
 - 9) Klausner, R.D., van Renswoude, J., Ashwell, G., Kempf, C., Schechter, A.N., Dean, A. and Bridges, K.R.: Receptor-mediated endocytosis of transferrin in K562 cells. *J. Biol. Chem.*, 258, 4715~4724, 1983.
 - 10) Ajioka, R.S. and Kaplan, J.: Intracellular pools of transferrin receptors result from constitutive internalization of unoccupied receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 6445~6449, 1986.
 - 11) Sutherland, R., Delia, D., Schneider, C., Newman, R., Kemshead, J. and Greaves, M.: Ubiquitous cell-surface glycoprotein on tumor cells is proliferation-associated receptor for transferrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 4515~4519, 1981.
 - 12) Enns, C.A. and Sussman, H.H.: Physical characterization of the transferrin receptor in human placenta. *J. Biol. Chem.*, 256, 9820~9823, 1981.
 - 13) Schneider, C., Sutherland, R., Newman, R. and Graves, M.: Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9. *J. Biol. Chem.*, 257, 8516~8522, 1982.
 - 14) Tycko, B. and Maxfield, F.R.: Rapid acidification of endocytic vesicles containing $\alpha 2$ -macroglobulin. *Cell*, 28, 643~651, 1982.
 - 15) Marsh, M., Bolzau, E. and Helenius, A.: Penetration of Semliki Forest Virus from acidic prelysosomal vacuoles. *Cell*, 32, 931~940, 1983.
 - 16) Nunez, M.-T. and Glass, J.: The transferrin cycle and iron uptake in rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.*, 258, 9676~9680, 1983.
 - 17) Fielding, J. and Speyer, B.E.: Iron transport intermediates in human reticulocytes and the membrane binding site of iron-transferrin. *Biochem. Biophys. Acta*, 363, 387~396, 1974.
 - 18) Sullivan, A.L. and Weintraub, L.R.: Identification of 125 I-labeled rat reticulocyte membrane proteins with affinity for transferrin. *Blood*, 52, 436~446, 1978.
 - 19) Seligman, P.A., Schlicher, R.B. and Allen, R.H.: Isolation and characterization of the transferrin receptor from human placenta. *J. Biol. Chem.*, 254, 9943~9946, 1979.
 - 20) Wada, H.G., Hass, P.E. and Sussman, H.H.: Transferrin receptor in human placental brush border membrane. *J. Biol. Chem.*, 254, 12629~12635, 1979.
 - 21) Fernandez-Pol, J.A. and Klos, D.J.: Isolation and characterization of normal rat kidney cell membrane proteins with affinity for transferrin. *Biochem.* 19, 3904~3912, 1980.
 - 22) Stein, B.S. and Sussman, H.H.: Peptide mapping of the human transferrin receptor in normal and transformed cells. *J. Biol. Chem.*, 258, 2668~2673, 1983.
 - 23) Tsunoo, H. and Sussman, H.H.: Placental transferrin receptor. *J. Biol. Chem.*, 258, 4118~4122, 1983.
 - 24) Enns, C.A., Shindelman, J.E., Tonic, S.E. and Sussman, H. H.: Radioimmunochemical measurement of the transferrin receptor in human trophoblast and reticulocyte membranes with a specific anti-receptor antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 4222~4225, 1981.
 - 25) Anderson, G.J., Mackerras, A., Powell, L.W. and Halliday, J.W.: Improved purification of the human placental transferrin receptor and a novel immunoradiometric assay for receptor protein. *Biochim. Biophys. Acta*, 884, 225~233, 1986.
 - 26) Turkewitz, A.P., Amatruda, J.F., Borhani, D., Harrison, S.C. and Schwartz, A.L.: A high yield purification of the human transferrin receptor and properties of its major extracellular fragment. *J. Biol. Chem.*, 263, 8318~8325, 1988.
 - 27) 吉野芳夫, 折茂英生, 久安早苗, 神成節子, 平井幸彦: トランスフェリンと血鉄鉄. 続生化学実験講座, 第8巻, p. 461~468, 日本生化学会編, 1987.
 - 28) Awai, M., Narasaki, M., Yamanoi, Y. and Seno, S.: Induction of diabetes in animals by parenteral administration of ferric nitrilotriacetate. *Am. J. Path.*, 95, 663~674, 1979.
 - 29) Hudgin, R.L., Pricer, W.E., Jr., Ashwell, G., Stockert, R.J. and Morell, A.G.: The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for asialoglycoproteins. *J. Biol. Chem.*, 249, 5536~5543, 1974.
 - 30) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680~682, 1970.
 - 31) Jandl, J.H. and Katz, J.H.: The plasma-to-cell cycle of transferrin. *J. Clin. Invest.*, 42, 314~326, 1963.
 - 32) Ecarot-Charrier, B., Grey, V.L., Wilczynska, A. and Schulman, H.M.: Reticulocyte membrane transferrin receptors. *Can. J. Biochem.*, 58, 418~426, 1980.
 - 33) van Driel, I.R., Stearne, P.A., Grego, B., Simpson, R.J. and Goding, J.W.: The receptor for transferrin on murine myeloma cells; One-step purification based on its physiology, and partial amino acid sequence. *J. Immunol.*, 133, 3220~3224, 1984.
 - 34) Turkewitz, A.P., Schwartz, A.L. and Harrison, S.C.: A pH-dependent reversible conformational transition of the human transferrin receptor leads to self-association. *J. Biol. Chem.*, 263, 16309~16315, 1988.
 - 35) Turkewitz, A.P. and Harrison, S.C.: Concentration of transferrin receptor in human placental coated vesicles. *J. Cell Biol.*, 108, 2127~2135, 1989.

(受付: 1990年11月20日)