微量生理活性タンパク質の構造—遺伝子工学によるアプローチ

豊田裕夫

Hiroo Toyoda, Beckman Research Institute of City of Hope
Department of Molecular Genetics

1. はじめに

生体にとって、重要な役割を果たしている高分子—特にタンパク質—の多くは、微量でしか存在しないため、その単離・精製には多くの困難を伴う。したがって、これらを医療薬剤として使用するにあたり、不可欠である構造—活性部位など—に関する詳細な情報を得ることが難しい。一方、この数年、発展の著しい遺伝子工学の手法は、微量生体高分子をコードする“遺伝子”を直接クローニングすることを可能にしてきた。この結果、これらの生体高分子が大量にかつ、純粋な状態で得られるようになった。最近では、遺伝子工学の手法により精製された物質を、臨床的に使うことも可能になってきている。また、種々の疾患—鎌状赤血球貧血症、自己免疫疾患など—の病因を、遺伝子レベルで解析する試みもなされている。

本稿では、遺伝子工学を用いて、どのように特定の遺伝子をクローニングしていくのか、さらには、この手法により得られた情報をどのように活用していくのか、筆者らが研究しているヒトの免疫応答遺伝子を例にとりながら紹介する。

2. 遺伝子のクローニング—ヒトの免疫応答遺伝子の場合

2-1. ヒトの免疫応答遺伝子の構造

生体は、免疫応答と総称される生体防御機構を通して「自己」と「非自己」を識別している。この識別に関与する分子の一つに「主要組織適合抗原 (MHC: Major Histocompatibility Complex)」がある^{1),2)}。この MHC を支配する遺伝子は、単一の遺伝子により支配されているものではなく、近接して存在する数個あるいはそれ以上の遺伝子座により支配されていることが明らかにされ“super-gene family”と称されて

いる。

ヒトにおいては、この抗原を支配する遺伝子群を「HLA-複合体」と呼び、第6染色体上に位置している (図1A)。この複合体は、その遺伝子産物の特性より3つのクラスに分けられ、それぞれクラスI、IIおよびIIIと呼ばれている。クラスI分子をコードする遺伝子座は、A、BおよびC領域から構成され、いわゆる古典的な移植抗原である。クラスII分子をコードする遺伝子座がD領域で、この領域はさらに3つの亜領域に細分化され、それぞれ、DR、DC および SB 亜領域*と呼ばれている。この領域に、抗原に対して、抗体産生の有無を規定する遺伝子群 (immune response genes) が存在する。したがって、免疫応答を直接支配する遺伝子の集まりといえる。生化学的研究^{1),2)}により、この領域よりコードされる抗原は、細胞膜に結合した2つの糖タンパク質よりなり、それぞれ、 α 鎖 (分子量 34,000)、 β 鎖 (分子量 29,000) と呼ばれている (図1B)。この“D領域”の遺伝子構造を明らかにすることは、生体内で起こる複雑な“免疫応答機構”を分子レベルで理解する上で必須であり、現在、最も精力的に研究が進められている一分野である。図2に示した遺伝子構造より明らかなように“D領域”は、数多くの遺伝子より構成されている³⁾。それぞれの亜

* 1984年に開かれた第9回国際ワークショップで、この亜領域の名称をDR、DQ (旧称DC)、およびDP (旧称SB)と呼ぶことが決定された。詳しくは文献³⁾を参照。

豊田裕夫 Beckman Research Institute of City of Hope
Department of Molecular Genetics (Duarte, CA 91010 U.S.A.) Assistant Research Scientist・医博
昭和49年東京薬科大学大学院薬学系修士課程修了, 53年金沢大学大学院医学系博士課程修了, 53~56年米国メイヨー医科大, ミネソタ大細胞生物部研究員, 56年City of Hope研究所分子遺伝部入所, 57年より現職。

Application of Genetic Engineering to Isolate Biologically Important Substances

図 1 (A) & (B) ヒトの HLA-複合体の構造

D領域の遺伝子構造の複雑性 (5つの α 鎖をコードする遺伝子, 7つの β 鎖をコードする遺伝子)は,おそらく各個人で異なると推定される。したがって,異なったハプロタイプをもつ場合, α 鎖, β 鎖をコードする遺伝子の数は異なると考えられる。

図 2 HLA-D 領域の遺伝子構造

領域よりコードされる遺伝子産物の解析から興味ある事実が解明された。すなわち DC 亜領域の α 鎖を除き, DR および SB 亜領域の α 鎖はほとんど多型性 (polymorphism)*1 を示さない。一方,すべての亜領域よりコードされる β 鎖は,多型性を示すということである。また, DNA 塩基配列の解析から,各亜領域よりコードされる β 鎖間の塩基配列は,高い相同性 (70~75%) を示すこともわかっている²⁾。

このように,“D領域”は,どのようにそれぞれの α 鎖, β 鎖の遺伝子発現が制御されているのか?といった,遺伝子構造の面からの興味ばかりでなく,臨床から非常に興味ある領域である。特に,多くの自己免疫疾患と,ある特定の DR ハプロタイプ (haplotype)*2 との間で,強い相関性が認められている。たとえば,インスリン依存性の糖尿病 (IDDM : Insulin

Dependent Diabetes Mellitus) の場合, DR 3, DR 4 と強く相関していることが知られている。

したがって,“D領域”の遺伝子構造を詳細に解析することにより,この領域と相関した,特定の疾患の素因を遺伝子レベルで解析することも可能である。

2-2. DR 亜領域の α 鎖, β 鎖のクローニング⁴⁾⁻⁸⁾

実際にどのような過程を経て,特定の遺伝子をクローニングするのか, DR 亜領域の α 鎖, β 鎖を例にとり説明する。

従来の遺伝子クローニングの手法においては,まず,目的とするタンパク質をコードする mRNA を,精製・濃縮するにあたり,免疫学的手法 (モノクローナル抗体など) を用いてきた。このため,目的とするタンパク質の細胞内存在量が少量の場合は,大きな困難を伴うことになる。

このような問題を解決する方法として,この数年来,脚光をあびてきているのが,化学的に合成した DNA をプローブとして, cDNA ライブラリー*3 の中

*1 多型性 (polymorphism) とは,あるタンパク質をコードする遺伝子が1つではなく,多数の対立遺伝子より成ることをいう。

*2 ハプロタイプ:血清学的特異性により各領域が細分化されている。たとえば, DR 亜領域の場合,16の異なる特異性があり, DC 亜領域の場合は3つ, SB 亜領域の場合は6つである。1つの特異性は父方より,もう1つは母方より受け継ぎ,両者が同じ場合は homozygous (ホモ接合型),異なる場合は heterozygous (ヘテロ接合型) とそれぞれ呼ばれている。したがって,各人,各々一種のハプロタイプしかもっていない。表記法としては,たとえば,HLA A1,2; B5,7; Cw1, w3; Dw2, w3; DR 3,4 などと表わされる。

*3 cDNA ライブラリー:細胞または臓器より mRNA を単離し,これに相補的な DNA (cDNA: complementary DNA) を作製し,ベクターと呼ばれるプラスミドに組み込み,形質転換法を用いて,大腸菌に挿入する。この方法で得られたクローニングの1つ1つが生体内に存在する,異なる mRNA 分子 (10,000~30,000 分子と推定される) を代表する。このような生体内のすべての mRNA 分子の情報を含む cDNA 分子の集まりを cDNA ライブラリーと呼ぶ。

表 1 HLA-DR α 鎖 N 末端のアミノ酸配列と使用した合成プローブ

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Ile	Lys	Glu	Glu	His	Val	Ile	Ile	Gln	Ala	Glu	Phe	Tyr	Leu	Asn	Pro	Asp
18	19	20	21	22	23	24	25	26								
Gln	Ser	Gly	Glu	Phe	Met	Phe	Asp	Phe								
									1	2	3	4	5	6		
アミノ酸配列									Ile	Lys	Glu	Glu	His	Val		
可能なコドン組み合わせ									5'	UU	AAA	GAA	GAA	CAU	GU	3'
									A	G	G	G	C			
									C							
プローブ HLA-DR α -I									TT	AAA	GAA	GAA	CAT	GT		
										G	G	G	C			
プローブ HLA-DR α -II									TA	AAA	GAA	GAA	CAT	GT		
										G	G	G	C			
プローブ HLA-DR α -III									TC	AAA	GAA	GAA	CAT	GT		
										G	G	G	C			

から目的とする遺伝子をクローニングする方法である。この方法は、途中 mRNA を濃縮することなく、スクリーニングできるのが大きな利点である。

しかし、この方法を用いる場合は、目的とするタンパク質の部分的アミノ酸配列がわからなければ、プローブを合成することができない。生体内に微量しか存在しないタンパク質のアミノ酸配列の同定は最近開発された“微量アミノ酸配列決定法”⁷⁾を用いることによって可能になった。現在、約 10 μ g 以上の精製タンパク質があれば、その N 末端部分のアミノ酸配列を決定することが可能である。

タンパク質を構成する 20 種のアミノ酸は、それぞれ、3 つの塩基 (コドン) の組み合わせにより規定されている。たとえば、トリプトファン、メチオニンを規定する塩基の組み合わせは、1 種類しかなく、それぞれ UGG, AUG である。一方、他のアミノ酸の場合には、縮重 (degeneracy) が認められ、たとえばロイシンの場合には、6 種類の組み合わせがある。ところが生体は、1 種類の組み合わせしか用いていない。どの組み合わせを、生体が使用しているかは、得られたクローニングの DNA 塩基配列を決定して初めて明らかとなる。したがって、合成したプローブは、プローブ部位のアミノ酸配列を規定する、すべての塩基配列の組み合わせを含んでいる混成プローブ (mix-probe 法)^{*1} である。

DR 亜領域の α 鎖の N 末端部分アミノ酸配列を決

めるために使用したプローブの種類を表 1 に示す。48 種類の混成プローブを用いてクローニングを行なった。48 種の組み合わせのうち、ただ 1 つの組み合わせのみが、目的とするクローニングと完全に相補的な塩基配列から構成され、このプローブ以外は、目的とするクローニングの塩基配列と、少なくとも 1 か所以上塩基配列が異なる。塩基対が完全に相補的な場合と非相補的な塩基対が 1 か所以上ある場合 (ミスマッチを含む場合) の熱安定性には差があるため、両者がある特定の条件下^{*2}で識別することができる。上述した方法により、スクリーニングした結果、プローブ HLA-DR α -III と強くハイブリダイズし、他の 2 つのプローブとは、弱くハイブリダイズするクローニングを得た。さらに詳しく解析した結果、プローブ部位の塩基配列は

—TCAAAGAAGAACATGT—

であることを確認した。一方、DR 亜領域の β 鎖遺伝子はすでに述べたように、多型性でありしかも互いに塩基配列の相同性が高いため、混成プローブではクローニングが困難であり、単一プローブで、かつ 40 塩基前後の長い合成プローブを用いてクローニングを行なった。長いプローブの利点は、プローブと目的とするクローニング DNA 間で、非相補的な塩基配列があっても塩基対形成が可能なことである。40 塩基前後では 2~3 塩基、50 塩基前後では数塩基の非相補があっても、塩基対を形成する。この方法を用いて種々のヒトの成長因子がクローニング^{9),10)}されている。

*1 混成プローブ (mix-probe) を作製する際に問題となるのは ① プローブの長さ ② プローブ部位の選び方である。①に関しては、短かすぎると、プローブの特異性が低くなり、長すぎると、組み合わせの数が多くなる。実際には、17~19 塩基を用いてスクリーニングを行なっている。②に関しては、できるだけ縮重度の少ない部位を選ぶことが重要である。

*2 $T_d = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$ という経験式⁹⁾を用いて、ハイブリダイゼーションの温度を設定している。 T_d は、合成プローブ・DNA 塩基対においてハイブリダイズしたプローブの 50% 量が解離する温度である。

DR 亜領域に関して、ホモ接合型を示す。Bリンパ芽球細胞より DNA を単離し、制限酵素 (Bam HI) で切断後、D 領域に特異的な合成プローブを用いて、ハイブリダイゼーションを行なった。

番号は、DR のハプロタイプを示す。矢印はマーカーを示す (DNA の Hae III ダイジェストを用いた)。

図 3 D 領域の DNA タイピング

3. 遺伝子工学の医学領域への応用—特に DNA タイピングについて

“D 領域”は、すでに述べたように、血清学的手法を用いて、数多くのハプロタイプに分類されている。一方、図 2 に示すように α 鎖、 β 鎖遺伝子のクローニングが進むにつれ、“D 領域”は少なくとも全部で 12 の遺伝子から構成されていることがわかってきた。では、血清学的に異なるハプロタイプはその遺伝子構成も異なるのであろうか、という疑問に対して答えるために考えだされたのが“DNA タイピング”である。特定の塩基配列を認識する酵素 (制限酵素) で、異なるハプロタイプを示す遺伝子 DNA を切断し、ゲル電気泳動後、クローニングした“D 領域”を構成する遺伝子 DNA をプローブとして、ハイブリダイゼーションを行なう。もし、異なるハプロタイプでは、その遺伝子の塩基配列も異なるとすれば、プローブのハイブリダイズする位置が異なるはずである。図 3 に示したように、異なるハプロタイプでは、ハイブリダイズする位置の異なる DNA 断片が検出されることがわかった¹¹⁾。現在“D 領域”の各亜領域 (DR, DC, SB) に特異的な合成プローブ¹¹⁾を、クローニングした β 鎖遺伝子の塩基配列をもとにして合成し、“DNA タイピング”に利用している。

この手法は、“D 領域”と相関する種々の疾患を遺伝子レベルで解析する上で有効な方法と考えられる。さらに、合成 DNA プローブを用いて、ヒトの代表的遺伝病の一つである鎌状赤血球貧血症¹²⁾の遺伝子レベルの解析も進んでいる。

4. お わ り に

遺伝子工学—特に合成プローブを用いて、“微量生体活性物質の遺伝子をどのように単離するのか?”

また、“得られた遺伝子を用いて、どのようなことができるのか? ”, その一部を紹介した。紙面の都合で、その他多くの応用例を紹介できなかったが、興味ある読者は総説¹³⁾を参照されたい。この小文が、遺伝子工学の有効性を理解する上で、少しでも役立てば幸いである。

文 献

- 1) J. Dausset: *Science*, **213**, 1469 (1981)
- 2) J.F. Kaufman, C. Auffray, A.J. Korman, D.A. Shackelford, J. Strominger: *Cell*, **36**, 1 (1984)
- 3) J. Bodmer, W. Bodmer: *Immunol. Today*, **5**, 252 (1984)
- 4) Y. Kajimura, H. Toyoda, M. Sato, S. Miyakoshi, S.A. Kaplan, Y. Ike, S.M. Goyert, J. Silver, P. Hawke, J.E. Shively, S.V. Suggs, R.B. Wallace, K. Itakura: *DNA*, **2**, 175 (1983)
- 5) 豊田裕夫, 梶村芳雄, 板倉啓彦: 免疫 '82, 代謝, **19**, 241 (1982)
- 6) H. Toyoda, J. Krull, S. Miyakoshi, (in preparation)
- 7) J.E. Shively, D. Hawke, B.N. Jones: *Anal. Biochem.*, **120**, 312 (1982)
- 8) R.B. Wallace, N.J. Johnson, T. Hirose, T. Miyake, E.H. Kawashima, K. Itakura: *Nucleic Acids Res.*, **9**, 879 (1981)
- 9) A. Ullrich, C.H. Berman, T.J. Dull, A. Gray, J.M. Lee: *EMBO J.*, **3**, 361 (1984)
- 10) R. Dergnack, A. Roberts, M.E. Winkler, E.Y. Chem, D.V. Goeddel: *Cell*, **38**, 287 (1984)
- 11) H. Toyoda, J. Krull, S. Miyakoshi, K. Itakura, L. Fisher: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Submitted
- 12) B.J. Conner, A.A. Reyes, C. Morin, K. Itakura, R.L. Teplitz, R.B. Wallace: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 278 (1983)
- 13) K. Itakura, J. Rossi, R.B. Wallace: *Ann. Rev. Biochem.*, **53**, 323 (1984)