Phage Protein に関する研究 (VII)

P22 phage coat protein 3 分画の分子構造 (その 1)

Studies on the Phage Protein (VII)

Molecular Structures of the 3 Fractions of P22 Phage Coat Protein (1)

堀 越 美智子* 上 条 清 明**
MICHIKO HORIKOSHI and KIYOAKI KAMIJO, M.D.

既に P22 phage の coat protein の抽出, 精製, 分画法, 免疫活性などについて報告したが (上条, 堀越, 1969; 堀越・上条, 1971 a, b, c, d, e)³⁻⁸⁾ それに関連してアミノ酸組成, 分子量, 末端アミノ酸および mercaptoethanol による S-S 結合の開裂について検討した. phage または virus に由来する蛋白成分の分子構造に関連する業績は比較的多く, 殊にアミノ酸組成については大腸菌 phage について Kellenberger (1968)⁹⁾, Poglazov & Mesyanshinov (1967)¹¹⁾, Poljak (1968)¹²⁾ などの報告があり, さらに Weber & Konigsberg (1967)¹⁷⁾ Weber (1967)¹⁸⁾, Wittmann-Liebhold (1966)¹⁹⁾ により f2, R17, MS2, fr, fd 各 phage の蛋白について末端アミノ酸および或程度のアミノ酸配列も報告されている. それによればこれらの phage の N-terminal は alanine, threonine, lysine などとされ C-terminal は threonine, serine, tyrosine などがあげられているが, 報告者によって差異があり定見が得られていないようである. また分子量は B, megatherium G phage で 89,990,000, T7 では 37,500,000, fd では 11,800,000, fr では 44,160,000 などの数値があげられている (Weast, 1968)¹⁶⁾.

phage の増殖の機序ならびに中和反応その他の免疫現象に関連して coat protein の分子構造は興味ある問題であり, われわれの実験成果をここに述べる.

実験材料と実験法

材料は前報と同様, *Salmonella typhimurium*

phage P22 およびその宿主 *S. typhimurium* LT2 株で, 3 分画の精製に至る過程はすべて第 1 報~第 6 報に述べた通りである (上条, 堀越, 1969; 堀越・上条, 1971 a, b, c, d, e)³⁻⁸⁾.

polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) は第 3 報と同様に永井 (1967)¹⁰⁾ によって行った.

mercaptoethanol 処理は Stanworth & Pardee (1967)¹⁵⁾ により, 試料 (全蛋白, Lot 58—1, 1.47 mg/ml, 3ml; Lot 58—2, 1.12mg/ml, 2ml; F1, Lot 56, 3.53mg/ml, 2ml; F2, Lot 57, Lot 60, 0.81mg/ml, 2ml; F3, Lot 59, 0.78mg/ml, 2ml) に mercapto-ethanol を 0.75M となるように加え室温に 1 時間おいて, ice bath で冷却した後, 0.75 Miodacetamide (予め脱気し, 0°C に保つ) を 1:1 に加え, 更に trimethylamine を加えて pH 8.0 としてから 100 倍量の生理食塩水に対し, 0°C で一夜透析後 5,000rpm 15 分遠心して沈渣を除いた上 PAGE で検査した. PAGE は永井 1967¹⁰⁾ の方法と Kellenberger 1968⁹⁾ により urea を終末濃度 6M となるよう gel に加える方法とを用いて行った.

分子量測定は Shapiro 1964¹⁴⁾ により, pepsin (ミクニ化学), lysozyme (Washington Biochem. Corp., New Jersey), BSA (第一化学) を standard とし, BSA (第一化学) に対する relative migration を測定し, 半対数グラフにプロットして推定値を算出した. PAGE には 6M urea gel と normal gel の両方を用い, 対数目盛には分子量をとった. また standard の分子量としては, pepsin: 35,500; lysozyme; 17,200; BSA: 65,400 を用いた¹⁶⁾.

アミノ酸の分析は自動分析機により, 6NHCl, 110°C 20h 加水分解試料について行い, N-末端アミノ酸の決定は DNP 法 (Sanger, 1945¹³⁾; 岩井・

* 順天堂大学医学部助手, ** 同教授 (組織培養)
Tissue Culture Laboratory, Juntendo University
School of Medicine
[Aug. 3, 1971 受付]

Table 1 N-terminal determination

Sample+NaHCO ₃ +H ₂ O (1 g : 0.1 g : 1 ml)
Add 5% FDNB in C ₂ H ₅ OH 2ml; shaking at room temp. for 2-3 h Add H ₂ O, 2ml
Precipitate is removed by 3,000 rpm 5 min
Supernatant is extracted with 5ml of C ₂ H ₅ OC ₂ H ₅ , 3-5 times (excess FDNB is removed)
Water phase (Ether is pipetted off)
Add a few drops of conc. HCl; precipitate appears
Ether extraction, 3-5 times to remove DNP
Wash the precipitates with H ₂ O, Acetone and Ether
Dried in vacuo (CaCl ₂ desiccator)
Add 6N HCl 3ml, sealed in vacuo Hydrolysis, 105°C, 4-5 h
Add 9ml of H ₂ O
Ether extraction, with 4-5ml, 5 times, shaking
Ether phase
Dried in vacuo Add 0.5ml of Ethyl Acetate
Chromatography
1. Toluene : Pyridine : 2-Chlorethanol : NH ₄ OH (10:3:6:6) (upper phase is used)
2. 1M NaH ₂ PO ₄ +0.5M Na ₂ HPO ₄ , add water to 1,000ml
(run for 20h with 1 and 16h with 2)

藤岡, 1968²³; Bailey, 1967¹³) により表 1 に従って実施した. 用いた試料は, P22P; Lot 59—1, 0.65mg/ml, 4ml; F1: Lot 55, Lot 56 mixture, 1.3mg/ml, 1~2ml; F2: Lot 60, 濃度未測定; F3: Lot 56-F3, 0.21mg/ml, 4ml である.

N-terminal amino acid の DNP 化合物は酢酸エチルに溶けた状態で得られるがこれを東洋濾紙 No. 51 (40×40) にスポットし 2 次元の chromatography を行った. 展開溶媒はトルエン系には toluene 10ml, pyridine 3ml, 2-chlorethanol 6ml を分液ロートで混ぜ, これに 0.8N NH₄OH 6ml を静かに加えてその上層を用い, 燐酸塩系には 1M NaH₂PO₄ と 0.5M Na₂HPO₄ を水に溶解し全量を 1*l*としたものを用いた. 展開槽にはあらかじめ 0.8N NH₄OH を入れ約 4 時間室温に放置し, これを捨ててトルエン系溶媒を入れた. 展開時間は一次 (トルエン系) 20 時間, 二次 (燐酸塩系) 16 時間とした.

アミノ酸の判定には, あらかじめ標準 DNP アミノ酸 (和光純薬) の展開 map を作っておいて, これと試料と比較して行った. なおこの実験はすべて遮光し, 室温で行った.

実験成績

アミノ酸組成とモル比を表 2 に示す. 構成アミノ酸の種類は前報までに述べたもの^{4,5)}と同じであったが, モル比は F1, F3 の間に多少の差異があるが, 今迄に報告したように物理化学性状および免疫活性では分画間に明らかな差異があるのに対応して, F1 と F3 の構成アミノ酸量はかなり異っているようである. F2 は試料の蛋白濃度が不充分で histidine, lysine, phenylalanine, proline, tyrosine, valine は検出されず, その他のアミノ酸のモル比も数値の信頼度が低く, この数値をそのまま計算には用い得ない.

mercaptoethanol (ME) 処理による PAGE 所見の変化は図 1 および写真に示した通りである. 図中左の 2 列は ME 処理を行わない試料を普通の gel と urea-gel (6M) で泳動させた所見の比較であり, urea-gel の方が各 component の分離は良いが, 分画後の F2 は分画前の F2 にくらべ移動速度が小さくなっている. また ME 処理を行うと F1 は移動速度がほとんど変わらないが, F2, F3 の移動速度は表 3 の数値にくらべかなりおそくなる. 図中の表は BSA の移動速度を 10.0 とした

Table 2 Amino acid analysis

	F1 (0.33mg)		F2 (0.125mg)		F3 (0.50mg)	
	micro mol	mol. ratio	micro mol	mol. ratio	micro mol	mol. ratio
Alanine	0.385	15	0.042	3	0.317	14
Arginine	0.121	5	0.230	14	0.087	4
Aspartic Acid	0.490	20	0.040	2	0.276	12
Glycine	0.301	12	0.079	5	0.286	12
Glutamic Acid	0.331	13	0.042	3	0.262	11
Histidine	0.167	7	—	—	0.113	5
Isoleucine	0.140	6	0.017	1	0.103	4
Leucine	0.249	10	0.021	1	0.171	7
Lysine	0.025	1	—	—	0.023	1
Methionine	0.070	3	0.034	2	0.025	1
NH ₃	0.447	18	0.154	9	0.419	18
Phenylalanine	0.102	4	—	—	0.072	3
Proline	0.127	5	—	—	0.128	6
Serine	0.247	10	0.031	2	0.166	7
Threonine	0.210	8	0.030	2	0.123	5
Tyrosine	0.083	3	—	—	0.053	2
Valine	0.257	10	—	—	0.158	9

Fig. 1 M.E. Cleavage

場合の各分画の relative migration を示す数値であり, total protein としたものは分画前の P22 proteinの意味である。

図2はN末端アミノ酸の決定を示したものであり, 各スポットは標準 DNP アミノ酸の位置を示し, △印は被検試料のスポットの中心を示したものである, 試料1~4はP22 proteinをDNP化し, 5時間加水分解したもの, 試料5は同じくP22 proteinをDNP化し, 4時間加水分解したもの

After treatment with mercaptoethanol, only single component is seen in PAGE. The component referred as ME-P22P and bovine serum albumin as BSA. On left side, the PAGE of the original P22 protein was shown.

のであり, 試料6はF1, 試料7, 8はF2, 試料9はF3で, いずれも加水分解時間は5時間である. 試料10はF3で加水分解時間は4時間である. 試料1, 2, 4は同定不能であるが, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10はいずれもvalineの位置に一致している. 従ってN-末端アミノ酸はvalineである.

表3には urea-gel および normal gel によるPAGEの結果を示し, 図3には urea-gel による

Table 3 Polyacrylamide gel electrophoresis (Disc electrophoresis)

Protein	Gel	Urea-gel		Normal-gel	
			Average		Average
Lysozyme		17.8	18.2	22.0	18.3
		18.5		15.6	
Pepsin		14.0	14.0	10.5	10.3
		14.0		10.1	
F1	Lot 94	6.0	5.9	7.9	7.7
	Lot 102	5.7		8.0	
	Lot 114	6.0		7.2	
F2	Lot 92	13.1	13.3	15.2	14.2
	Lot 103	13.9		13.1	
	Lot 115	12.9		14.3	
F3	Lot 97	14.8	14.5	16.0	16.5
	Lot 100	14.0		17.2	
	Lot 116	14.8		16.3	

(Relative values; Migration of BSA=10.00mm)

Fig. 2 N-terminal amino acid

数値をグラフで示した。縦軸は対数目盛で分子量をとった。横軸は BSA の migration を 10 とした relative migration である。

表 3 によれば urea-gel では F1, pepsine, BSA は移動が小さく, F2, F3, lysozyme, は移動が大きい。また実際に gel を染めて見た場合 urea-gel の方が各成分の disc は鮮鋭にみえる。更にこの数値をグラフにすると urea-gel の数値は直線上にならぶが normal-gel の数値は直線にならない。

Fig. 3 Relative migration and molecular weight

次に urea-gel の数値をプロットした図 3 について F1, F2, F3 の relative migration から分子量を求めると, 各分画の平均 migration に対して

はそれぞれ, 125,000, 39,000, 32,000 となる。

考 察

P22 phage protein の subunit として F1, F2, F3 が得られその免疫学的性状を明らかにしてきたが, 各分画の分子構造と免疫活性あるいは形態学上の localization は最も興味ある問題である。分子構造解明の第一歩としてアミノ酸組成, 同モル比, N 末端アミノ酸, mercapto-ethanol による reductive cleavage, 分子量測定 (推定) を試みたのであるが, 各分画分子の一次構造に関しては今回の自動分析機による数値は 6NHCl, 110°C 加水分解試料について測定したものであり, cystine, cysteine, tryptophane などのアミノ酸は加水分解時または加水分解後に失われる可能性が強く, 別途に定量する必要があるので決定的な論議はできないが, F1, F3 のモル比からみて少くとも aspartic acid, leucine, serine, threonine などのアミノ酸量は両分画間にかなりの差異があり, 従つて F1, F3 分子の一次構造はかなり異なるものと考えなければならない。F2 については今回のアミノ酸分析では histidine, lysine, phenylalanine, proline, tyrosine, valine が検出されていないが, その他のアミノ酸の検出数値も低く, 試料負荷量も少量であり, さらに N 末端アミノ酸として検出されている valine をも欠如している点などからして, 当然再分析を要するものと考ええる。

次に分子量に関しては電気泳動速度と分子量との関連性にもとづく Shapiro et al. 1964 の方法¹⁴⁾により推定値として F1: 125,000, F2: 39,000, F3: 32,000 が得られ, 一方アミノ酸分析のモル比から計算すると F1 の分子量は $15,250 \times n_1$, F3 の分子量は $12,825 \times n_2$ となり F2 の分子量は前記と同様の理由から不明である。Shapiro 法による推定値と比較すると $n_1=8$, $n_2=2$ と推定される。

N 末端アミノ酸は試料 1, 2, 4 (いずれも DNP 化 P22 protein, 5 時間加水分解) では同定不能であつたが, 試料 1, 2, 4 と同条件の試料 3 および F1, F2, F3 試料 (DNP 化後 5 または 4 時間加水分解) のすべてが valine に一致する spot

を示し, 各分画とも分子の一次構造および分子量には差異のあることが推定されるのにもかかわらず N 末端アミノ酸は valine であろうと考えられる。

二次構造あるいは三次構造に関連する問題として mercapto-ethanol 処理試料の PAGE 移動速度の測定結果は当初 F2, F3 分画が F1 を基本分子として構成されとの誤認に陥つたものであるが, その後一次構造その他に関する実験成績から F1, F2, F3 は異なる分子構造をもつものと考えに至り, 再検討の結果 F1 は S-S 結合の開裂による PAGE 移動速度の変化は殆どなく, 分子構造の変化は余りないと思われるのに反し, F2, F3 では移動速度の減少が著しく, S-S 結合開裂の結果, 分子の広がりがかかなり大きく変化している模様である。従つて F1, F2, F3 の各分画は二次構造あるいは三次構造における folding その他の様式がかかなり異つていてものと推定される。

更に C-terminal の決定につき, アミノ酸配列, 分子間 S-S 結合などを調べる計画であり, その成果により, この蛋白の分子構造や免疫学的性状との関連は一層明確にし得るものと考えている。

総 括

P22 phage の coat protein について実験を進めてきたが, 今回は P22 protein の 3 分画についてアミノ酸組成, N 末端アミノ酸, mercaptoethanol による reductive cleavage, 分子量測定などを試み, 次の結論を得た。

1. アミノ酸分析の結果からみて F1, F3 は一次構造においてかなり異つていてものと推定される。
2. PAGE の数値から F1, F2, および F3 の分子量はそれぞれ, 125,000, 39,000, 32,000 と推定された。
3. アミノ酸モル比から計算すると F1 の分子量は $15,250 \times n_1$, F3 の分子量は $12,825 \times n_2$ ($n_1=8$, $n_2=2$) となる。
4. N 末端アミノ酸は各分画とも valine である。

5. mercapto-ethanol処理前後のPAGE移動速度の変化から, F1, F2, F3 分子の二次構造, 三次構造におけるS-S結合を介してのfoldingその他の様式にはかなりの差異があると推定される.

(本論文の要旨は第17回日本ウィルス学会総会, 札幌, 1969, 8.27および第24回日本細菌学会関東支部総会, 東京, 1969, 11.13に於て発表した)

文 献

- 1) Bailey, J.L.: *Techniques in Protein Chemistry*, Elsvier, Amsterdam, 1967, pp. 163-188
- 2) 岩井浩一・藤岡英子: 蛋白質実験法 (1), 共立出版東京, 1968, pp. 5-26
- 3) 上条清明・堀越美智子: 日本細菌学雑誌, 24, 5, 240-245, 1969
- 4) 堀越美智子・上条清明: 順天堂医学, 17, 2, 286, 1971
- 5) 堀越美智子・上条清明: 同上, 17, 3, 427, 1971
- 6) 堀越美智子・上条清明: 同上, 17, 4, 549, 1972
- 7) 堀越美智子・上条清明: 同上, 17, 4, 556, 1972
- 8) 堀越美智子・上条清明: 同上, 18, 1, 64, 1972
- 9) Kellenberger, E.: *Viol.*, 34, 549-561, 1968
- 10) 永田 裕: 蛋白・核酸・酵素, 別刷, 共立出版, 東京, 1967, pp. 3-13
- 11) Poglazov, B.F. and Mesyanshinov, V.V.: *Viol.*, 31, 449-452, 1967
- 12) Poljak, R.J.: *Viol.*, 35, 185-193, 1968
- 13) Sanger, F.: *Biochem. J.*, 39, 507, 1945
- 14) Shapiro, A.L., Vinuela, E. and Maizel, J. V.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 28, 815-820, 1964
- 15) Stanworth, D.R. and Pardoe, G.I.: *Handbook of exp. Immunol.* (Weir, D.M. ed.) Blackwell Scientific Pub., Oxford, 1967, pp. 168-179
- 16) Weast, R.C. et al.: *Handbook of Biochem., Chem.* Rubber Co., Cleavland, 1968, pp. C-29, C-154
- 17) Weber and Konigsberg: *J. Biol. Chem.*, 242, 3563 1967 (Weast et al., 1968より引用)
- 18) Weber: *Biochem.*, 6, 3144, 1967 (Weast et al. 1968より引用)
- 19) Wittmann-Liebold: *Z. Naturforsch.*, 21 b, 1249 (Weast et al., 1968より引用)

Studies on the Phage Protein. (VII)

Molecular Structure of the 3 Fractions of P22 Phage Coat Protein. (1)

Michiko HORIKOSHI and Kiyooki KAMIJO

Tissue Culture Laboratory, Juntendo University
School of Medicine

Amino acid analysis, N-terminal determination, reductive cleavage of the S-S bond with mercaptoethanol and the estimation of the molecular weight were carried out with the 3 fractions of P22 phage coat protein. Results obtained were summarized as follows:

- 1) It was suggested that F1, F2 and F3 differed even in their primary molecular structure.
- 2) The molecular weight of F1, F2 and F3 were 125,000, 39,000 and 32,000, respectively, so far estimated by the method of Shapiro et al.
- 3) From the amino acid molar ratio, the molecular weights were caculated as 122,000. for F1 and 25,650 for F3.
- 4) N-terminal amino acid was valine samely in F1, F2 and F3, irrespective of their difference in immunresponse and presumed molecular structure.
- 5) After cleavage of the S-S bond by treatment with mercaptoethanol, F1 showed almost same migration as the original F1 molecule, whereas F2 and F3 showed slower migration than originals. This facts show the difference in secondary or tertiary molecular configuration of the three fractions, especially with refference to the intermolecular S-S bonds.