〔シンポジウム：AFP 研究—その後の進展〕

リコンビナント分子を用いた AFP の機能部位の同定

小山芳一・Delavar Shahbazzadeh・酒井正春・西 信三

SUMMARY

We would like to focus on two topics which were recently made in our laboratory on structure/function relationship of alpha-fetoprotein (AFP) by recombinant DNA technology: identification of estrogen binding site of rat AFP, and evaluation of glycosylation of two possible *N*-glycosylation sites in rat AFP. In order to identify estrogen binding site of rat AFP, a series of rat-human chimeric AFPs was designed, since rat AFP binds to estrogen while human AFP does not. Out of 7 rat-human chimeric AFPs, only those which carry a rat segment 426-467 in human background sequence conserved the estrogen binding activity, indicating the segment 426-467, where 15 amino acid substitutions were observed, contained the residues responsible for estrogen binding. A variety of human mutant AFPs in which some human-specific amino acid residues were substituted with those of rat AFP was obtained by site-directed mutagenesis employing polymerase chain reaction. Among 17 human mutant AFPs carrying different combinations of substitutions, those carrying 436 A→V, 437 A→S, 438 T→I, 450 L→R, 451 L→S, 457 A→L, 461 I→Y conserved sufficient binding activities, strongly suggesting that these amino acid residues were responsible for the estrogen binding activity in rat AFP. The rat AFP resolves on polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) into two discrete bands, "Slow" and "Fast", and this electrophoretic pattern was shown by us to depend on the heterogeneity of *N*-glycosylation. For evaluation of glycosylation at two possible *N*-glycosylation sites in rat AFP, we designed three mutant rat AFPs, which had either substitution of 93 Asn→Gln, 229 Asn→Gln, or 93 Asn→Gln+229 Asn→Gln, as well as recombinant rat AFP without mutation. SDS-PAGE before and after glycopeptidase F treatment of the mutant AFPs indicated that the "Fast" had one carbohydrate moiety at 229 Asn and the "Slow" had two carbohydrate moieties at 93 Asn and 229 Asn. It was therefore indicated that 229 Asn was fully glycosylated while 93 Asn was partially.

Key words: α -fetoprotein, recombinant, estrogen, glycosylation.

はじめに

近年、分子生物学的手法によって変異タンパクが自由につくりだされるようになり、これを用いてタンパ

クの構造と機能の相互関係を明瞭に理解することができるようになった。アルファフェトプロテイン (AFP) の生物学的な役割を解明する第一歩として、われわれは特定の機能 (エストロゲン結合能) を保持し

Identification of functional site of AFP by recombinant molecule.

Yoshikazu Koyama, Delavar Shahbazzadeh, Masaharu Sakai, Shinzo Nishi ; 北海道大学医学部生化学第一講座

Correspondence address: Yoshikazu Koyama, Department of Biochemistry, Hokkaido University School of Medicine, Kita-ku, Sapporo 060, Japan.

第 45 回日本電気泳動学会総会・シンポジウム

たりコンビナント変異 AFP を作成することを計画した¹⁾。AFP のエストロゲン結合能はラットあるいはマウス AFP (RAFP, MAFP) にのみ認められ、ヒト AFP (HAFP) にはみられないので、われわれはまず、ラット/ヒトキメラ AFP を数種類作成し、そのエストロゲン結合能を検討した。エストロゲン結合能をもつキメラ AFP のなかで、HAFP をバックグラウンドにもち RAFP の置換部分が一番小さなキメラ AFP 分子が得られれば、RAFP のエストロゲン結合領域を特定できると考えられる。さらに、この領域のなかでエストロゲン結合に必要な十分なアミノ酸残基を同定すれば、このセットのアミノ酸残基がラットのそれで置換されたヒト AFP 分子はエストロゲン結合能をもつ変異ヒト AFP である、と考えられる。エストロゲン依存的に増殖する腫瘍が知られている²⁾が、エストロゲン結合能をもつ変異ヒト AFP が得られれば、抗癌作用をもつ AFP の臨床応用という点で非常に興味深い。われわれはキメラ AFP の結果を基に HAFP の一部のアミノ酸残基をラットのそれに置換した変異ヒト AFP を作成し、RAFP のエストロゲン結合に密接に関与するアミノ酸残基を同定すると同時にエストロゲン結合能をもつ変異ヒト AFP を作成することができた³⁾。

また、われわれは RAFP の電気泳動的不均一性についてもリコンビナント変異 AFP を作製してその要因の解明を試みた⁴⁾。RAFP は 2 種の分子種 (電気泳動上で “Fast” および “Slow”) からなるが、その分子構造は不明であった。われわれは先に天然型 RAFP とグリコシダーゼを用いた実験結果から、電気泳動上で二つに分離されるのは糖鎖の修飾の不均一性による、と報告した⁵⁾。すなわち、RAFP には 2 カ所の Asn-X-Thr/Ser (X≠Pro) があり、(93 Asn-Gln-Ser および 229 Asn-Ile-Thr) これら Asn 残基の糖鎖による修飾が不完全なために RAFP は電気泳動上で二つのバンドを与える、というものである。われわれはこれらの Asn 残基を Gln に置換して糖鎖の修飾をコントロールしたりコンビナント変異 AFP を作製しこの仮説を検証した⁶⁾。

これらの実験から得た知見を考察する。

試料および方法

1. 発現ベクターおよびリコンビナント AFP の酵母ならびに動物細胞での発現

エストロゲンに関する実験で用いたラット/ヒトキメラ AFP の発現には酵母 (AH 22) と発現プラスミド pAM 82¹⁾、点変異をいれたリコンビナント AFP の発

現には酵母 (2 B 12) と発現プラスミド pNW 033 の発現システムを用いた³⁾。リコンビナント AFP は前者の場合細胞内に蓄積し、後者では培地中に分泌される。一方、電気泳動的不均一性に関する実験ではマウス線維芽細胞株 Ψ2 と発現プラスミド pZIP-NeoSV (X) I の発現システムを用いた⁴⁾。この場合もリコンビナント AFP は培地中に分泌される。RAFP cDNA および HAFP cDNA、またはその断片をつないでそれぞれの発現プラスミドにクローニングし、これを用いて細胞の形質転換を行った。アミノ酸残基の変異を入れるときは PCR 法で変異 cDNA 断片を増幅し、発現プラスミドの相当する部分と置換挿入した。

2. リコンビナント AFP の精製

ラット/ヒトキメラ AFP cDNA を組み込んだ発現プラスミド pAM 82 でトランスフォームした酵母 (AH 22) を大量培養し、その細胞を Zymolyase 100 T で spheroplast 化したのち 0.1% Triton X-100 を含むバッファーで可溶化した¹⁾。これを DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー、MAbAFY-6-Sepharose イムノアフィニティーカラムにかけリコンビナントキメラ AFP を精製した。点変異リコンビナント AFP の発現系は培地中に分泌される系なので、トランスフォームした酵母培養液上清を回収した³⁾。この上清の 80% 飽和硫酸アンモニウム沈澱画分を Phenyl-Sepharose につけ水で溶出してリコンビナント AFP を粗精製したのち、MAbAFY-6-Sepharose イムノカラムで変異 AFP を精製した。線維芽細胞株の場合は、トランスフェクタント培養上清を直接、MAbAFY-6-Sepharose イムノカラムにかけ精製した⁴⁾。

3. エストロゲン結合能の測定

フィルターペーパーディスク (5 mmΦ) に MAbAFY-6 を固相化し、一定量のリコンビナント AFP と反応させた。ディスク洗浄後、希釈した [³H] estradiol と反応させ、ディスクに結合した放射活性を測定した¹⁾。

4. 糖鎖の酵素的脱離と電気泳動

リコンビナント変異 AFP を glycopeptidase F で処理し、8% SDS-PAGE を行った。タンパクの検出には Coomassie Brilliant Blue を、糖鎖の検出には glycan detection kit (Boehringer Mannheim) を用いた⁴⁾。

成績および考察

1. RAFP のエストロゲン結合部位

この実験に用いたリコンビナント RAFP と HAFP

はそれぞれ 587 および 597 アミノ酸残基から成り、その一時構造を Fig. 1 に示す。RAFP と HAFP cDNA の共通な制限酵素部位を用いて Fig. 2 に示すようなラット/ヒトキメラ AFP cDNA を作成、酵母発現ベクター pAM 82 にクローニングした¹⁾。これら発現プラスミドでトランスフォームした酵母 AH 22 を培養後、spheroplast 化、TritonX-100 で融解し、組替えタンパクをイオン交換体、イムノカラムで精製した。これらのキメラ AFP のエストロゲン結合アッセイを行ったところ、アミノ酸配列 418-516 をラットの配列で置換されている AFP のみが高いエストロゲン結合活性をもっていた (Table 1)。したがって、ラット AFP のエストロゲン結合部位はこの配列 418-516 内で、さらにはラット/ヒト共通のアミノ酸残基を除いた領域 423-506 に局在することが示された。つぎにこの領域にある 31 残基の RAFP 特異的アミノ酸残基のうち、エストロゲン結合に直接関与するのはその一部と考えられた。これらのアミノ酸残基を同定するため、PCR 法によりさらにいくつかのキメラ分子を作製し検討した。その結果、エストロゲン結合に必要な領域は、ラットに特異的な 15 残基のアミノ酸を含む 426-467 の領域であることを見いだした (Fig. 3)。

この 42 アミノ酸残基から成る領域にはラットとヒトで計 15 アミノ酸残基が置換されており、したがって、エストロゲン結合に密接に関与するアミノ酸残基はこれらラット特異的 15 アミノ酸残基のなかにあると考えられた。これを検証するために、HAFP においてこれらのアミノ酸残基に相当するヒトのアミノ酸残基を

ラットの配列につぎつぎに置換させたヒト変異体 AFP を作製し、エストロゲン結合活性を測定することを試みた。変異体 AFP を作成するために用いた HAFP あるいは RAFP cDNA は、Fig. 4 に示すように発現プラスミド pNW 033 にクローニングした。点変異をもつ AFP の作製は、PCR 法を用いた site directed mutagenesis で行った。PCR を行うために Fig. 5 に掲げたような 18 種類のプライマーを合成した。黒点をもったヌクレオチドを変異させ、結果的に対応するアミノ酸残基が置換されるように設計されている。この実験に用いた発現プラスミド pNW 033 は Fig. 4 に示すようにシグナルペプチドをもっているの でリコンビナントタンパクは細胞外に分泌される。事実、リコンビナント AFP は培養液上清に回収された。この精製のために、リコンビナントタンパクを含む培養上清を 80% 硫酸アンモニウムで塩析し、その沈澱画分を Phenyl-Sepharose にかき、吸着画分を水で溶出

Table 1. Estradiol binding by AFPs.

AFP	Bound estradiol, dpm (% of input)
Hepatoma RAFP	5271 (45. 8)
Hepatoma HAFP	28 (0. 2)
YRAFP	4271 (37. 1)
YHAFP	27 (0. 2)
RHHAFP	38 (0. 3)
HRRAFP	2991 (26. 0)
RHRAFP	35 (0. 3)
HRHAFP	4495 (39. 1)

Fig. 1. Primary structures of AFPs encoded by pAMHA 3 (H, human) and by pAMRA 1 (R, rat), which were composed of 597 and 587 amino acid residues, respectively.

The former protein had 7 amino acid residues at the N-terminus in addition to those of mature HAFP. The 98 amino acids encoded by *Pvu* II-*Xho* II fragment of AFP cDNAs are underlined. The corresponding sequence of mouse AFP is also shown (M). Identical residues are indicated (●).

Fig. 2. Construction of expression plasmids.

AFP cDNA were ligated at the *Xho* I site of pAM 82. It consists of a DNA fragment of *Escherichia coli* plasmid pBR 322 that consists a replication origin and ampicillin-resistance gene (Amp^r), a DNA fragment of yeast that contains an acid phosphatase promoter (P), an autonomous replication origin (A), a replication origin of 2- μ m DNA (O) and the LEU 2 gene (L) for insertion into a *leu*⁻ auxotrophic host yeast cell such as AH 22. pAMRA 1 and pAMHA 3 had been constructed to express RAFP and HAFP, respectively. pAMRHHA, pAMHRRA, pAMRHRA, and pAMHRHA had chimeric AFP cDNA that were prepared by ligating cDNAs of RAFP and HAFP at the *Pvu* II and *Xho* II restriction sites indicated.

した。この溶出画分を、AFP に対するモノクローナル抗体を結合した MabAFY-6-Sepharose イムノアフィニティーカラムにかけ、酸性バッファーで AFP を溶出した。この Phenyl-Sepharose による精製の第一ステップは大量の培養上清を短時間で処理することができ、酵母培養液中からリコンビナントタンパクを効率よく抽出するのに適した方法と考えられた。また、精製された各変異 AFP は SDS-PAGE 上で期待される泳動パターンをもっていた。

Fig. 3. Construction of expression plasmids that promote secretion of recombinant protein into culture medium.

Recombinant wild type and mutant AFP cDNAs were ligated at the *Bam*H I and *Sac* I sites of vector pNW 033. In addition to the DNA fragments also found in pAM 82, it contains the TRP1 gene as a selection marker for transformation of a *Trp*⁻ auxotrophic yeast strain, 20 B 12 KR 16. The plasmid employs a promoter of phosphoglycerate kinase (PGK Promoter) and a sequence for signal peptide of 97 K killer toxin (97 K Signal), which promotes the efficient secretion of the product into culture medium. The restriction sites of *Bgl* II and *Sac* I at the ends of human and rat AFP cDNAs were created by PCR.

精製した変異体 AFP のそれぞれについてエストロゲン結合アッセイをおこなった (Table 1)。その結果、N 末端側 5 残基、C 末端側 1 残基をヒト型に保存し、残り 9 残基をラットの配列に置換した変異体 AFP (HM-I) がこの実験のポジティブコントロールであるキメラ分子 (HM-A) とほぼ等しいエストロゲン結合活性をもっており、この 436-461 がエストロゲン結合に必要な最小領域と示唆された。さらに、結合活性を保持したままこの領域で置換されうるアミノ酸残基を探したところ、440 Ser と 448 Glu をヒト型に戻しても (HM-J) エストロゲン結合活性に重大な影響を与えな

Fig. 4. Oligonucleotides used for site-directed mutagenesis.

A partial cDNA sequences of HAFP (1362-1512), and RAFP (1327-1477) are decorated for comparison. The above numbers show different amino acid residues in human and rat AFPs. PM stands for primer, and the letter C inside bracket for complimentary sequence. The mutation introduced into the nucleotide is indicated by asterisk above it. Restriction enzyme site created on the primer is as follows: *Pvu* II (••••), *Cpo* I (----), and *Sph* I (—).

Fig. 5. Analyses of authentic and recombinant AFPs by SDS-PAGE.

Authentic hepatoma RAFP (lane 1, 6) and recombinant AFPs produced by transfectant cells, G 22 B 6 (lane 2, 7) PsGL1D (lane 3, 8), PsGL 2 A (lane 4, 9) and PsGL 12 D (lane 5, 10) were electrophoresed on 8% gels before (lane 1-5) and after deglycosylation by the digestion with glycopeptidase F (lane 6-10). A: The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue. Size markers (lane M) were phosphorylase b (92,500), bovine serum albumin (66,200) and ovalbumin (45,000). B: Western blotting. AFPs were blotted to a nitrocellulose membrane, reacted with 125 I-labeled monoclonal antibody AFY 6 and visualized by autoradiography. C: Analysis of glycoconjugation with a glycan detection kit. Glycans on samples were labeled with digoxigenin, electrophoresed, blotted to a nitrocellulose membrane and immunodetected.

かったと結論した。このようにしてえられた HM-J はさきのキメラ分子に匹敵するエストロゲン結合活性を保持しているが、HM-M のように N-末端側の 436 Val・437 Ser を置換するとかかなり結合活性が損なわれた。これは HM-C, HM-D, HM-E のように順次、

N-末端側の 436 Val, 437 Ser を置換して結合活性がさがるとよく一致した。一方、438 Ile, 451 Ser, 457 Leu, 461 Tyr をそれぞれ置換した変異体 (HM-F, -L, -G, -H など) はことごとく結合活性が損なわれたのでこれら 4 か所のアミノ酸残基はエストロ

ゲン結合に必須なアミノ酸残基と考えられた。これら4カ所のアミノ酸残基のみをラット型に置換してあるHM-Nは低いながらも有意な結合活性を示した。一方、RAFPの配列のうち、上記の領域で436-438のアミノ酸残基をヒト型に置換した変異体RM-P、および450-461のアミノ酸残基をヒト型にしたRM-Rは、ことごとく結合活性が損なわれたことから、ヒト変異体の実験結果が強く支持された。

以上、436 A→V, 437 A→S, 438 T→I, 450 L→R, 451 L→S, 457 A→L, 461 I→Yの最少7残基がエストロゲン結合活性に必要十分の置換であった。したがって、これらのアミノ酸残基がラットAFPのエストロゲン結合部位を構成していると結論した。同時に、ヒトAFPにおいて、これら残基をラットの配列に置換させることでヒトAFPにエストロゲン結合活性を付与できることが証明された。

2. RAFPの電気泳動的不均一性

変異を入れていないリコンビナントRAFPとつぎの3種類のリコンビナント変異RAFPを作成した：93 Asn→Gln (93のAsnのみをGlnに置換したもの)、229 Asn→Gln (229のAsnのみをGlnに置換したもの)、93 Asn→Gln+229 Asn→Gln (93と229の二つのAsnをGlnに置換したもの)。これらのglycopeptidase F処理前後のSDS-PAGEの結果をFig. 5に示す。ワイルドタイプのRAFPは“Slow”と“Fast”の分子種から成り、これらはそれぞれ糖鎖を2残基、1残基もっていて、これをglycopeptidase F処理すると糖鎖をもたない“Fastest”の分子量的に均一な一つの分子種となる⁵⁾。リコンビナント変異RAFP- (93 Asn→Gln) は均一な“Fast”のみから成り、glycopeptidase F処理後“Fastest”に変換された。このことから、RAFPの229 Asnは均一に、ほぼ完全に糖鎖が結合していることが示唆された。一方、リコンビナント変異RAFP- (229 Asn→Gln) は“Fast”と“Fastest”の2分子種から成り、これらはglycopeptidase F処理後“Fastest”に変換された。したがって、RAFPの93 Asnは糖鎖の結合が部分的のみ起こっていることが示された。また、糖鎖の修飾の可能性を全く排除したりコンビナント変異RAFP- (93 Asn→Gln+229 Asn→Gln) は“Fastest”のみから成り、上記実験を裏付けた。以上の実験から、RAFPの電気泳動的不均一性 (“Fast”および“Slow”の2種の分子種から成ること) について、2カ所のAsn-X-Thr/Ser (93 Asn-Gln-Ser および 229 Asn-Ile-Thr) のうち、229 Asnでは糖鎖は完全に修飾されるのに対して93 Asn

では部分的にしか修飾されることが明らかになった。

最後に

ラットAFPのエストロゲン結合に関与するアミノ酸残基を同定したり、エストロゲン結合活性をもっていないヒトAFPをエストロゲン結合型に変換することができた。また、ラットAFPの電気泳動的不均一性は93 Asnでの部分的なグリコシレーションに起因することが証明された。このように分子生物学的手法によって作成した変異タンパクを用い、タンパクの構造と機能の相互関係を明瞭に理解することができるようになった。

今回明らかにされたアミノ酸残基をさらに置換することでAFPのエストロゲンに対する親和性を変えることも不可能でない。そうすれば、エストロゲン結合活性をもったヒトAFPは、先に述べたようにエストロゲン依存性腫瘍の増殖を抑えることで、肝癌などの腫瘍マーカーのみならず、有用な抗癌剤として臨床応用される可能性もでてくると考えられる。また、糖タンパクの糖鎖はその分子の寿命と深く関わっているという説がある。タンパクに自在に糖鎖が付加、除去できるとなれば、この点でも大変興味深い。

文 献

- 1) Nishi S, Matsue H, Yoshida H, Yamamoto R, Sakai M. Localization of the estrogen-binding site of alpha-fetoprotein in the chimeric human-rat proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 3102-5.
- 2) Jacobson HI, Bennet JA, Mizejewski GJ. Inhibition of estrogen-dependent breast cancer growth by a reaction product of alpha-fetoprotein and estradiol. *Cancer Res* 1990; 50: 415-20.
- 3) Shahbazzadeh D, Koyama Y, Sakai M, Nishi S. Estrogen binding site of alpha-fetoprotein: introduction of estrogen binding activity to human alpha-fetoprotein by amino acid substitution. (投稿準備中).
- 4) Koyama Y, Nishi S. Expression of rat alpha-fetoprotein cDNA and its mutants in cultured mouse fibroblasts and identification of glycosylation sites related to electrophoretic variants. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1208: 332-7.
- 5) Ehara A, Nishi S. Structural basis of electrophoretic variants of rat alpha-fetoprotein. *Electrophoresis* 1991; 12: 315-6.