

リソゾーム膜蛋白質のcDNAクローニングとラット肝 酸性フォスファターゼの酵母細胞での発現に関する 研究

藤田, 英明
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

<https://doi.org/10.11501/3073257>

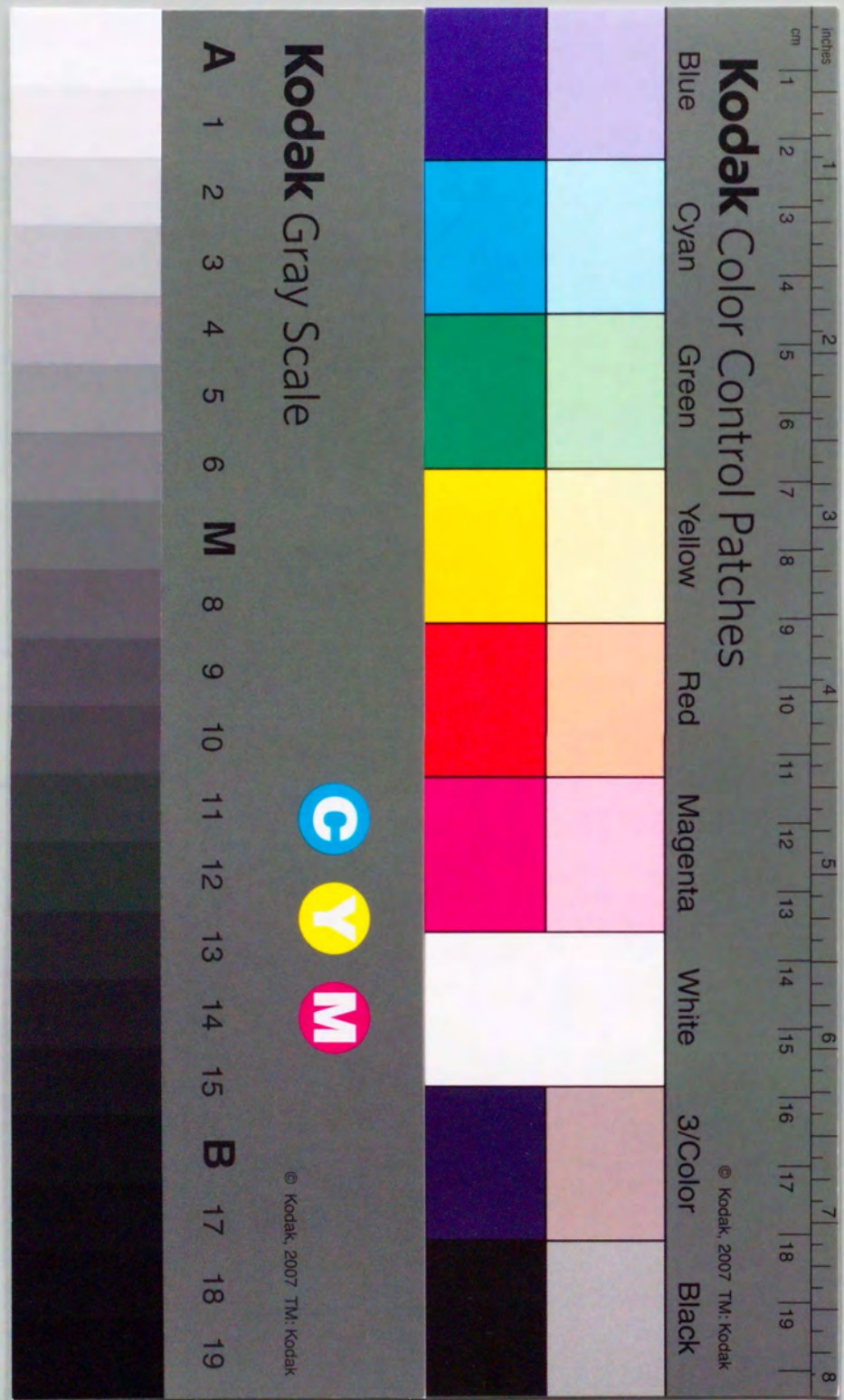
出版情報：九州大学, 1993, 博士（薬学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：



リソゾーム膜蛋白質の cDNA クローニングと
ラット肝酸性フォスファターゼの酵母細胞での
発現に関する研究

1993年

藤田英明



リソゾーム膜蛋白質の cDNA クローニングと
ラット肝酸性フォスファターゼの酵母細胞での
発現に関する研究

1993年

藤田英明

緒言	1
第一章 ラット肝リソゾーム膜に存在する酸性フォスファターゼ、分子量 85 K のシアロ糖蛋白質 (rLGP85) 及びヒト LGP85 の cDNA クローニング、およびこれらリソゾーム膜蛋白質の一次構造に関する比較検討	6
1-1 ラット肝リソゾーム膜に存在する酸性フォスファターゼの cDNA クローニング	
1-1-1 酸性フォスファターゼの特異的抗体によるラット肝 λ gt11 cDNA ライブラリーのスクリーニングおよび酸性フォスファターゼ cDNA の塩基配列決定	8
1-1-2 cDNA から推定される酸性フォスファターゼの一次構造およびリソゾーム膜上における存在様式	10
1-2 ラット肝リソゾーム膜に存在する分子量 85 K のシアロ糖蛋白質 (rLGP85) の cDNA クローニング	
1-2-1 オリゴヌクレオチドによるラット肝 λ gt11 cDNA ライブラリーのスクリーニングおよび分子量 85 K のシアロ糖蛋白質 (rLGP85) cDNA の塩基配列決定	16
1-2-2 cDNA から推定される分子量 85 K のシアロ糖蛋白質 (rLGP85) の一次構造およびリソゾーム膜上における存在様式	19
1-3 ヒト膀胱癌細胞 (QGP-1NL) cDNA ライブラリーからのヒト LGP85 の cDNA クローニング	
1-3-1 cDNA プローブによるヒト膀胱癌細胞 (QGP-1NL) cDNA ライブラリーのスクリーニングおよびヒト LGP85 cDNA の塩基配列決定	25
1-3-2 cDNA から推定されるヒト LGP85 の一次構造に関する検討	27
1-4 考察	
1-4-1 リソゾーム膜蛋白質の一次構造による分類	33
1-4-2 リソゾーム膜蛋白質の局在化シグナルの検討	35

第二章 酵母細胞における酸性フォスファターゼの発現およびその局在における細胞質ドメインの機能について.....	37
2-1 野生型酸性フォスファターゼおよび変異型酸性フォスファターゼのDNA作製および発現ベクター(pAM82)へのクローニング.....	38
2-2 酸性フォスファターゼの酵母細胞における発現およびその細胞内分布.....	
2-2-1 酸性フォスファターゼの酵母細胞における発現.....	44
2-2-2 酵母の液胞(vacuole)の分画.....	46
2-2-3 野生型および変異型酸性フォスファターゼの酵母細胞における液胞への局在.....	47
2-3 蛍光抗体法による酸性フォスファターゼの局在部位の検討...	51
2-4 考察.....	56
総括.....	61
謝辞.....	64
実験の部.....	65
References.....	71

Abbreviations

APase	: acid phosphatase
bp	: base pair
BSA	: bovine serum albumin
cDNA	: complementary deoxyribonucleic acid
CEA	: carcinoembryonic antigen
Da	: dalton
DAB	: 3,3'-diaminobenzidine
Fab'	: antigen binding fragment
FITC	: fluorescein isothiocyanate
GDP	: guanosine 5'-diphosphate
hLGP	: human lysosomal glycoprotein
HRP	: horse radish peroxidase
Ig	: immunoglobulin
Lamp	: lysosome associated membrane protein
LGP	: lysosomal glycoprotein
LIMP	: lysosomal integral membrane protein
M-6-P	: mannose-6-phosphate
ORF	: open reading frame
PAGE	: polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	: polymerase chain reaction
rLGP	: rat lysosomal glycoprotein
SDS	: sodium dodecyl sulfate
SRP	: signal recognition particle
TGN	: trans-Golgi network

緒言

真核細胞の細胞内部には、核・ミトコンドリア・ペルオキシソーム・小胞体(ER)・ゴルジ体・リソゾームという様な、脂質二重膜で囲まれた多数のオルガネラ(細胞内小器官)が存在している。各オルガネラには特有の蛋白質が存在しており、オルガネラの構造・機能発現はこれらの蛋白質によって司られている。Fig. 1 に示す様に、これらの蛋白質は細胞内のリボソーム上で合成された後、適切なオルガネラに運搬されることによってその機能を発揮する。したがって合成された各オルガネラ蛋白質や分泌蛋白質は、適切なオルガネラに移行するための何らかのシグナルをその分子中にもっており、また細胞はそのシグナルを特異的に識別・認識し、正確に仕分け・輸送するための厳密な細胞装置を備えていると考えられる。これら蛋白質の細胞内選別・輸送に関する研究は細胞生物学の柱の一つである「細胞内オルガネラの形成機構の解明」につながる重要な研究課題である。

蛋白質の細胞内選別・輸送のメカニズムを分子レベルで明らかにしようという試みは、まず蛋白質自身がつ局在化シグナルを明らかにすることから始まった。すなわち各オルガネラに固有な蛋白質の一次構造を比較・検討することにより局在化に必要な共通なアミノ酸配列を見だし、さらにその部分を実際に局在化シグナルとして機能することを遺伝子工学的・生化学的手法を用いて確認する、という手順でアプローチがなされてきた。このような研究方法は、最近の分子生物学的手法(cDNA クローニング、遺伝子発現、部位特異的遺伝子変異など)の進歩にともない多くの研究室で展開されており、その結果いくつかのオルガネラにおける局在化シグナルが同定されてきた。

例えば小胞体膜透過のために必要なシグナルペプチドはN末端に位置し、リジン・アルギニンなどの塩基性アミノ酸に続く10~30個の疎水性のアミノ酸のクラスターによって形成されている(1)。また小胞体内腔への残留シグナルは蛋白質のC末端に位置するリジン-アスパラギン酸-グルタミン酸-ロイシン(KDEL)という共通のアミノ酸配列が同定され、このシーケンスを付加された分泌蛋白質やリソゾーム酵素が小胞体内腔に留まることが報告され

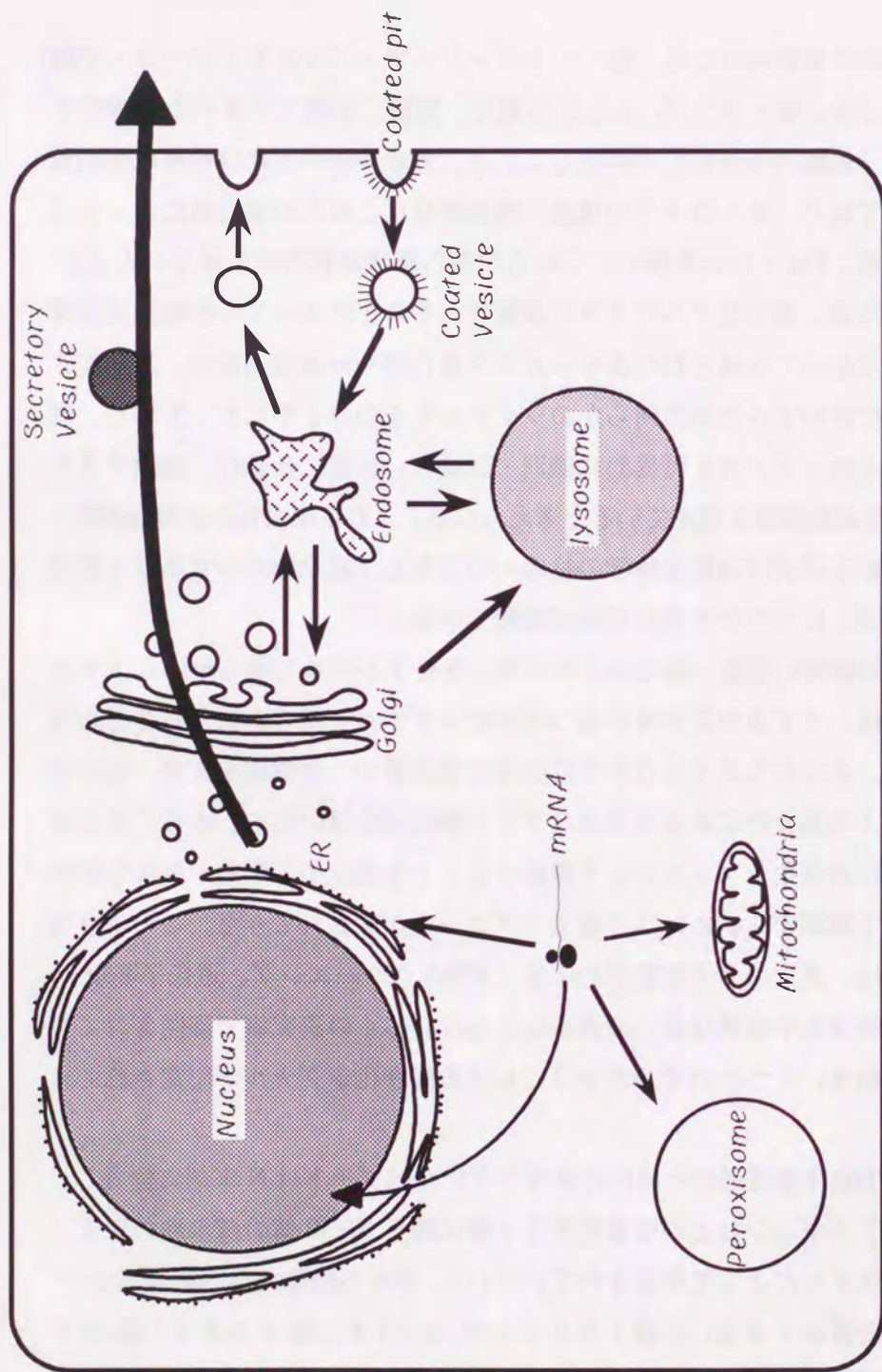


Fig. 1. The intracellular protein traffic.

ている(2, 3)。核移行シグナルの場合は蛋白質分子の外側に位置し塩基性アミノ酸に富みプロリンを含んでいることが多いという共通性がある(4, 5)。ミトコンドリア蛋白質はN末端に数十個のアミノ酸からなる延長ペプチドをもち、その配列中には塩基性アミノ酸が多く、塩基性アミノ酸が数個の非極性アミノ酸を挟んで繰り返し現われるという特徴を持っている(6, 7)。ペルオキシソーム蛋白質ではC末端にセリン-リジン-ロイシン(SKL) (またはこれに類する) 配列があり、これが局在化シグナルとして機能することが知られている(8, 9)。このように蛋白質側のシグナル配列は、その局在化するオルガネラに特異的である。

一方、これらのシグナル配列を特異的に認識し、蛋白質を正確に選別・輸送するための細胞質側の装置については、おもに *in vitro* の再構成系や semi intact 細胞を利用した生化学的、分子生物学的手法を用いて解析されてきた。また遺伝学的手法の導入可能な酵母の系を用いることにより、分泌系やミトコンドリアへの蛋白質輸送に関与する細胞側の因子の検出に大きな成果をあげている。

核、ミトコンドリア、ペルオキシソーム蛋白質のように遊離型リボソーム上で翻訳される蛋白質は翻訳後(post-translational) に細胞質から各オルガネラに輸送されるがその際、蛋白質を細胞質中からオルガネラへと導く細胞質因子と、オルガネラ膜を透過させるのに必要な膜透過装置が必要となる。これらの諸成分に関してはミトコンドリアへの輸送についてが最も解析が進んでおり、ミトコンドリア蛋白質の延長ペプチドを認識する細胞質因子(10, 11) や、複数個の膜透過装置が同定されている(12)。核蛋白質については近年の核局在化シグナルの発見により急速にその分子機構の解析が進んでおり、核局在化シグナルの受容体の同定や核膜孔の構造・通過機構の解明がなされている(13, 14)。

膜結合型リボソーム上で翻訳される蛋白質の場合、翻訳とほぼ同時(co-translational) に小胞体内腔に隔離されてそこから小胞(vesicle) を介してゴルジ複合体の層板間を移動し、トランスゴルジネットワーク(TGN)において、細胞外あるいは形質膜に向かうものとリソゾームへ向かうものとの選別を受ける(15)。この Central vacuolar system(16)における最初のステップである小

胞体膜への局在化や膜透過に関する分子については、シグナル認識粒子 (SRP:signal recognition particle) (17)、およびその受容体 (docking protein)(18) などさまざまな分子が同定されている。しかしながら小胞体以降におけるオルガネラ間の小胞輸送による蛋白分子の選別装置についてはKDEL受容体(19) や Mannose -6-phosphate receptor (M-6-P受容体; リソゾーム酵素受容体) (20) など一部の可溶性蛋白質に関するものが見つかるだけで、各オルガネラの主要構成成分であるオルガネラ膜蛋白質についてはそのシグナル・輸送装置ともに未だ明かとなっていないのが現状である。

現在、我々の研究室では蛋白質の細胞内選別・輸送機構に関する研究をリソゾームの蛋白質を中心に行っている。リソゾームは真核細胞に普遍的に存在し、その内部に存在する 60 数種におよぶ酸性加水分解酵素により、細胞内外の高分子物質の分解を司っている (21)。そのためリソゾームは細胞表面からエンドサイトーシスされたものを含むエンドソームや形質膜との融合や、細胞の自己消化のためのオートファジーの形成など活発な動きを見せており、非常に興味深いオルガネラである。リソゾームの蛋白質は分泌蛋白質・形質膜蛋白質と同様に膜結合型リボソーム上で合成され同じ輸送小胞で運ばれて、おそらくトランスゴルジネットワーク (TGN) あるいはエンドソームにおいてそれらの蛋白質と選別を受けていると考えられている (15)。リソゾーム内腔に存在する可溶性酵素に関しては、酵素が持つ高マンノース型糖鎖のマンノースの C-6 位にリン酸が付加された構造 (M-6-P) がシグナルとなり、このシグナルに結合する M-6-P 受容体によりリソゾームへ選別・輸送されることが明かとなっている (20)。しかしリソゾーム膜の主要構成成分であるリソゾーム膜蛋白質に関しては、試料が微量なことや純度の高いリソゾーム膜の調製および膜蛋白質の可溶化が困難であることなどが妨げとなりあまり進んでいなかったが、精製技術の進歩やモノクローナル抗体の開発などにより最近急激に進行し、マウス、ラット、ニワトリ、ヒトのリソゾーム膜蛋白質についてさまざまな検討が加えられ一部では cDNA クローニングも行われている (22-27)。

リソゾーム膜蛋白質の局在化機構を解明するために、これまで我々はリソゾーム膜に固有な数種類の膜蛋白質 (28) の精製と生合成・プロセッシングに

ついでの研究を行ってきた (29-35)。その結果、ラット肝リソゾーム膜から分子量 107 K (LGP107)、分子量 96 K (LGP96)、分子量 85 K (LGP85)、分子量 67 K (酸性フォスファターゼ: APase) の膜蛋白質が分離精製され、その生合成・プロセッシングについての研究を行ったところ、これらのリソゾーム膜蛋白質は糖鎖の大部分がシアル酸を多く含む複合型糖鎖であり、N 型糖鎖合成阻害剤であるツニカマイシン存在下でも正常にリソゾームに移行することが判明した。これらの結果よりリソゾーム膜蛋白質はリソゾーム酵素とは異なり、その局在化に糖鎖は必要とせず蛋白質部分に移行シグナルが存在するのではないかと考えられている。

そこで著者は、1) 数種類のリソゾーム膜蛋白質の cDNA クローニングを行いその一次構造を明らかにし、既に cDNA クローニングが報告されている他のリソゾーム膜蛋白質と合わせて一次構造の比較・検討を行いリソゾーム膜蛋白質のリソゾームへの局在化シグナルを推定すること、2) 得られた cDNA を酵母細胞内において発現させることにより、推定された局在化シグナルの機能の検証および酵母におけるリソゾーム様オルガネラである液胞への膜蛋白質の局在化機構を解明することを目的として本研究を行った。

第一章 ラット肝リソゾーム膜に存在する酸性フォスファターゼ (APase)、LGP85 及びヒト LGP85 の cDNA クローニング、およびこれらリソゾーム膜蛋白質の一次構造に関する比較検討

緒言でも述べたように、リソゾーム膜蛋白質は可溶性のリソゾーム酵素とは異なり、そのリソゾームへの局在化シグナルは蛋白質部分にあることが予想されている。従ってこの局在化シグナルを同定するためには、まず多数のリソゾーム膜蛋白質の一次構造を比較・検討し共通項を見つけ出すことが必要である。

我々の研究室ではこれまで、リソゾーム膜に固有な数種類の膜蛋白質 (Fig. 2) を精製しており、そのうち野口らによって既に LGP107, LGP96 の cDNA クローニングが報告されている (22,23)。そこで今回筆者は、ラット肝リソゾーム膜に存在する酸性フォスファターゼ (rAPase) および rLGP85 の cDNA クローニングを rAPase に関しては特異的抗体を用いて、rLGP85 に関してはその内部のアミノ酸シーケンスを基にして合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして行った。ラット肝 λ gt11 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、rAPase および rLGP85 の cDNA をそれぞれ得ることに成功した (36,37)。LGP85 についてはさらに、ヒト膀胱癌細胞 (QGP1-NL) cDNA ライブラリーから rLGP85 の cDNA をプローブとしてスクリーニングを行い、hLGP85 の cDNA を得ることに成功した (38)。そしてこれらの cDNA から推測される rAPase, rLGP85 および hLGP85 の一次構造について比較検討を行った。

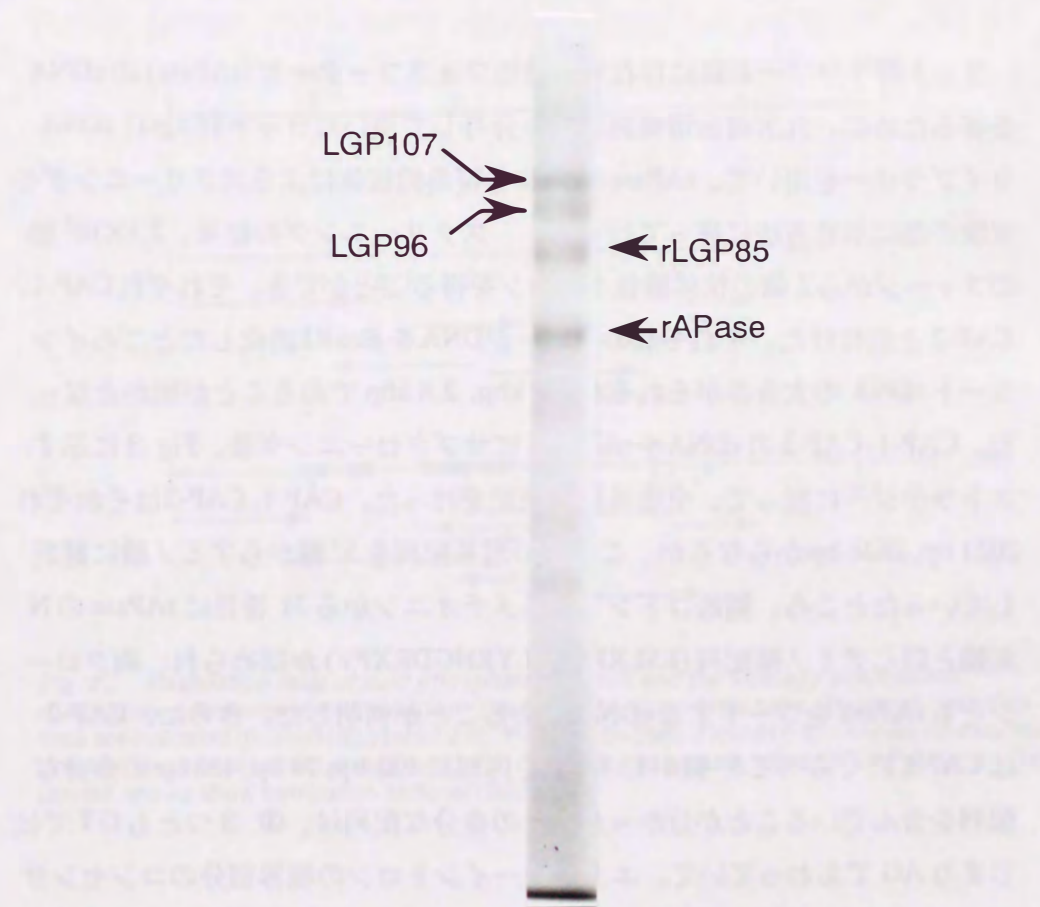


Fig. 2 . SDS-PAGE of purified rat liver lysosomal membranes. Gel was stained for protein with Coomassie blue and arrows indicate the positions of major lysosomal membrane glycoproteins.

1-1 ラット肝リソゾーム膜に存在する酸性フォスファターゼ(rAPase)の
cDNA クローニング

1-1-1 rAPaseの特異的抗体によるラット肝 λ gt11 cDNA ライブラリーのスクリーニングおよび rAPase cDNA の塩基配列決定

ラット肝リソゾーム膜に存在する酸性フォスファターゼ(rAPase)のcDNAを得るために、九大遺伝情報施設より分与して頂いたラット肝 λ gt11 cDNA ライブラリーを用いて、rAPaseに対する特異的抗体によるスクリーニングを実験の部に示す方法に従って行った。スクリーニングの結果、 2.1×10^5 個のファージから2個の抗体陽性クローンを得ることができ、それぞれCAP-1、CAP-2と名付けた。それぞれのファージDNAを *Eco*RI 消化したところインサートcDNAの大きさがそれぞれ2.0 kbp、2.6 kbpであることが明らかとなった。CAP-1、CAP-2のcDNAをpUC118にサブクローニング後、Fig. 3に示す戦略に従って、全塩基配列決定を行った。CAP-1、CAP-2はそれぞれ2021 bp、2638 bpからなるが、これらの塩基配列を5'側からアミノ酸に翻訳していったところ、開始コドンであるメチオニンから31番目にrAPaseのN末端と同じアミノ酸配列(RSLRFVTLLYRHGDRXPV)が認められ、両クローンともrAPaseをコードするcDNAであることが判明した。さらに、CAP-2はCAP-1にくらべて5'側が13 bp 短く内部に102 bp、79 bp、436 bpの余分な配列を含んでいることが分かった。この余分な配列は、① 3つともGTではじまりAGでおわっていて、エクソン-イントロンの境界部分のコンセンサスな配列(39)と一致している、② open reading frame(ORF)中に終止コドンが出現しrAPaseが予想される分子量よりかなり小さくなってしまふ、③ ヒト酸性フォスファターゼのゲノム中(40)に存在する5、6、7番目のイントロンとサイズ・位置ともに一致する、などの理由からイントロンであることが示唆され、CAP-2のcDNAはスプライシングが完了していないmRNAから逆転写されてできたものであると考えられる。

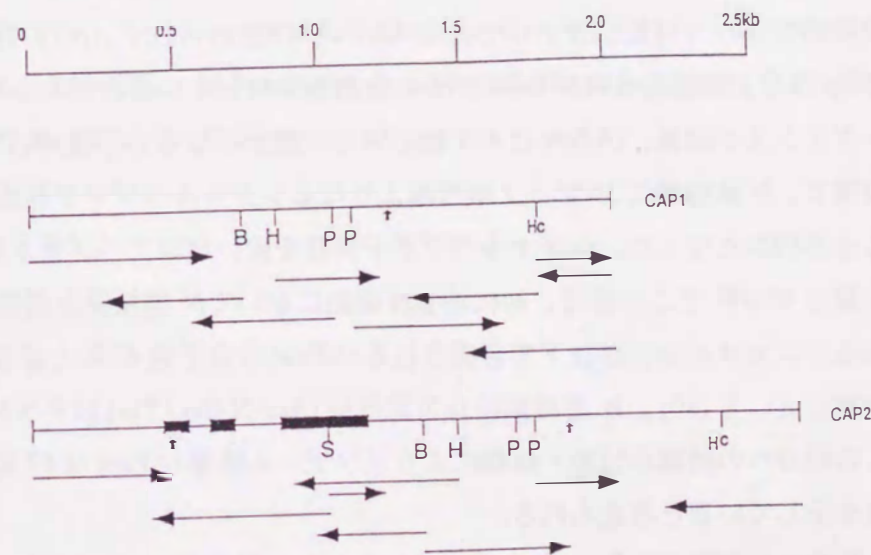


Fig. 3. Restriction map of acid phosphatase cDNA and the strategy adapted for nucleotide sequence determination. The top scale shows base pairs. Relevant restriction sites are indicated (B=*Bam* HI; H=*Hin* d III; P=*Pst* I; S=*Sac* I Hc=*Hin* c II). Arrows indicate the direction and extent of sequencing runs. The closed boxes indicate introns in CAP-2 clone. The upward arrows show termination codons(TGA).

1-1-2 cDNAから推定される rAPase の一次構造およびリソゾーム膜上における存在様式

Fig. 4 に CAP-1 の全塩基配列とそれから推定されるアミノ酸配列を示す。CAP-1 は全長 2021 bp で、1269 bp の ORF を含み、5' 側に 6 ヌクレオチド・3' 側に 743 ヌクレオチドの非翻訳領域を持っている。またこのクローンには典型的な poly A 付加シグナルである AATAAA は認められず、poly A 部分から 19 bp ほど上流にある AATGAA がその役割を果たしていると考えられる。シーケンスの結果、rAPase は 423 個のアミノ酸からなる分子量 48,332 の蛋白質で、N 末端側に 30 アミノ酸残基よりなるシグナルペプチド部分を持つことが明かとなった。シグナルペプチド部分を除いたコアペプチド部分の分子量は 45,096 でこの値は、初代培養肝細胞において N 型糖鎖合成阻害剤であるツニカマイシン存在下で合成される rAPase の分子量 45 K と非常によく一致している (30)。N 型糖鎖結合可能部位 (Asn-X-Ser/Thr) は 9 ケ所あり、この部分への糖鎖の付加・修飾によりリソゾーム膜型 rAPase は 67 K の分子量を示していると考えられる。

筆者らと同時期に Pohlmann ら (41) によりヒト酸性フォスファターゼの cDNA クローニングが報告されており、今回の結果と比較してみると核酸で 69%、アミノ酸で 89% と非常にホモロジーが高くどちらも 423 個の同数のアミノ酸からなることが明らかになった。またどちらも 30 アミノ酸残基よりなるシグナルペプチド・27 アミノ酸残基からなる膜貫通ドメイン・18 アミノ酸残基よりなる細胞質ドメインという同様の構造を持っていると考えられる。N 型糖鎖結合可能部位 (Asn-X-Ser/Thr) はヒトが 8 ケ所であるのに対して、ラットでは 197 番目のアスパラギン酸がアスパラギンに変わっているために一個増えて 9 ケ所だが、残り 8 ケ所はすべてヒト酸性フォスファターゼと同じ位置に存在していた。これらのことからリソゾームの酸性フォスファターゼの構造は種を越えて非常に良く保存されていると考えられる。

Fig. 5 に示す Kyte & Doolittle の方法 (42) による hydropathy plot の結果から C 末付近の 379~405 番目の部分に疎水性の高い領域がみられ、rAPase はこの部分でリソゾーム膜にアンカーしているものと考えられる。また N 型糖鎖

結合可能部位が全てこの疎水性の高い領域より N 末端側に位置していることから、rAPase はリソゾーム膜上において N 末側をリソゾーム内腔に向け、C 末側が細胞質に突き出た Type I の配向性をとっていることが予想された。最近、当研究室の中村 (43) によって rAPase のこの細胞質ドメイン 18 残基および rAPase の内腔側部分に対する特異的抗体が調製され、rAPase のリソゾーム膜上でのトポロジ-が検討がされた。その結果、細胞質ドメインに対する抗体は無傷のトライトゾームに対して結合するが内腔側に対する抗体は結合しないことが判明し、rAPase は Fig. 6 に示す通り Type I の配向性をとっていることが蛋白質レベルで裏付けられた。

1 CCG GTG ATG GCC GGC AGA CAG TCT GGT TGG AGC CAG GCG GCT CTT CTC
Met Ala Gly Arg Gln Ser Gly Trp Ser Gln Ala Ala Leu Leu

49 CAG TTC CTT CTT GGC ATG TGC CTA ATG GTG ATG CCA CCC ATA CAA GCC
15 Gln Phe Leu Leu Gly Met Cys Leu Met Val Met Pro Pro Ile Gln Ala

97 CCG AGT CTG CGC TTT GTT ACC TTG CTG TAT CGA CAC GGA GAT CGG TCA
31 Arg Ser Leu Arg Phe Val Thr Leu Leu Tyr Arg His Gly Asp Arg Ser

145 CCA GTG AAG GCA TAT CCT AAG GAC CCC TAT CAG GAA GAG AAA TGG CCC
47 Pro Val Lys Ala Tyr Pro Lys Asp Pro Tyr Gln Glu Glu Lys Trp Pro

193 CAG GGA TTT GGT CAG CTA ACC AAG GAA GGG ATG CTA CAG CAT TGG GAG
63 Gln Gly Phe Gly Gln Leu Thr Lys Glu Gly Met Leu Gln His Trp Glu

241 CTG GGC CAG GCC CTG CGG CAA CGC TAC CAT GGC TTT CTG AAC GCC TCT
79 Leu Gly Gln Ala Leu Arg Gln Arg Tyr His Gly Phe Leu Asn Ala Ser

289 TAC CAC AGG CAA GAG GTT TAC GTG CGA AGC ACA GAC TTT GAC CGT ACT
95 Tyr His Arg Gln Glu Val Tyr Val Arg Ser Thr Asp Phe Asp Arg Thr

337 CTC ATG AGT GCA GAG GCC AAC CTG GCC GGA CTC TTC CCT CCC ACT GAA
111 Leu Met Ser Ala Glu Ala Asn Leu Ala Gly Leu Phe Pro Pro Thr Glu

385 GTT CAG CAC TTC AAC CCG AAC ATT TCA TGG CAG CCT ATC CCT GTC CAC
127 Val Gln His Phe Asn Pro Asn Ile Ser Trp Gln Pro Ile Pro Val His

433 ACC GTG CCC ATT ACT GAA GAC AGG TTG CTG AAG TTT CCT TTG GGT CCA
143 Thr Val Pro Ile Thr Glu Asp Arg Leu Leu Lys Phe Pro Leu Gly Pro

481 TGT CCC CGT TAT GAG CAG TTG CAG AAC GAG ACT CGG CAG ACA CCA GAG
159 Cys Pro Arg Tyr Glu Gln Leu Gln Asn Glu Thr Arg Gln Thr Pro Glu

529 TAT CAG AAC ATG AGT ATT CAG AAT GCA CAA TTT CTG GAC ATG GTG GCC
175 Tyr Gln Asn Met Ser Ile Gln Asn Ala Gln Phe Leu Asp Met Val Ala

577 AAT GAG ACA GGG CTT ATG AAC TTG ACC CTA GAG ACC ATC TGG AAT GTG
191 Asn Glu Thr Gly Leu Met Asn Leu Thr Leu Glu Thr Ile Trp Asn Val

625 TAT GAC ACA CTC TTT TGT GAG CAA ACA CAT GGG CTG CTC CTG CCA CCC
207 Tyr Asp Thr Leu Phe Cys Glu Gln Thr His Gly Leu Leu Leu Pro Pro

673 TGG GCC TCT CCC CAA ACC GTG CAG GCT CTG AGC CAG CTA AAG GAC TTC
223 Trp Ala Ser Pro Gln Thr Val Gln Ala Leu Ser Gln Leu Lys Asp Phe

721 AGC TTC CTC TTC CTC TTC GGG ATC CAC GAT CAA GTA CAG AAG GCC CGG
239 Ser Phe Leu Phe Leu Phe Gly Ile His Asp Gln Val Gln Lys Ala Arg

769 CTT CAG GGG GGA GTT CTG CTG GCT CAA ATA TTG AAG AAT CTG ACC CTA
255 Leu Gln Gly Gly Val Leu Leu Ala Gln Ile Leu Lys Asn Leu Thr Leu

817 ATG GCA ACT ACC TCT CAA TTC CCT AAG CTT CTG GTT TAT TCT GCG CAT
271 Met Ala Thr Thr Ser Gln Phe Pro Lys Leu Leu Val Tyr Ser Ala His

865 GAC ACT ACC CTG GTT GCT CTG CAA ATG GCA CTG AAT GTC TAC AAT GGT
287 Asp Thr Thr Leu Val Ala Leu Gln Met Ala Leu Asn Val Tyr Asn Gly

913 AAA CAA GCC CCC TAT GCT TCC TGC CAC ATA TTT GAA CTG TAC CAG GAA
303 Lys Gln Ala Pro Tyr Ala Ser Cys His Ile Phe Glu Leu Tyr Gln Glu

961 GAT AAT GGG AAT TTC TCA GTC GAG ATG TAC TTT CGG AAT GAC AGT AAG
319 Asp Asn Gly Asn Phe Ser Val Glu Met Tyr Phe Arg Asn Asp Ser Lys

1009 AAG GCA CCC TGG CCA CTG ACC CTG CCT GGC TGT CCT CAC CGT TGC CCA
335 Lys Ala Pro Trp Pro Leu Thr Leu Pro Gly Cys Pro His Arg Cys Pro

1057 CTG CAG GAC TTC CTT CGC CTC ACA GAA CCT GTC ATA CCC AAG GAC TGG
351 Leu Gln Asp Phe Leu Arg Leu Thr Glu Pro Val Ile Pro Lys Asp Trp

1105 CAG AAG GAG TGC CAG CTA GCA AGC GAT ACT GCA GAC ACA GAG GTG ATT
367 Gln Lys Glu Cys Gln Leu Ala Ser Asp Thr Ala Asp Thr Glu Val Ile

1153 GTG GCA CTG GCT GTC TGT GGC TCC ATC CTC TTC CTT CTA ATA GTG TTG
383 Val Ala Leu Ala Val Cys Gly Ser Ile Leu Phe Leu Leu Ile Val Leu

1201 CTC CTC ACT GTC CTC TTC CGG ATG CAG GCC CAG CCT CCT GGC TAC CAC
399 Leu Leu Thr Val Leu Phe Arg Met Gln Ala Gln Pro Pro Gly Tyr His

1249 CAT GTT GCA GAC AGG GAA GAC CAT GCT TGA C ACCACTCAGTCCCCTTCCCTC
415 His Val Ala Asp Arg Glu Asp His Ala ---

1302 TGCCCTCCTAGGGGATGTGGGCTGAGTCCTGCTCCTGACTATTGCCGATCCCAGAGGGACAGG
1365 TTTAGCCTTCCTGATTACCTACGCCCAAATGAATGAGTGAGGCTGGGCTGGTCCGACGTCACC
1428 TGTGACTTACCATCCTCATGCTGATGTTTACCATGACTGTGTGGACACTGGCTTTCTCTA
1491 AATGGGATTTGGCTCTTCTATACTCCCTAAGGACTTGAGATACAGACAAGCATTGAGTTT
1554 CTCAAGACCTTGGGATTAACAAAAACAACAACAGAAAAAAACCCCAACCCTGAAGAA
1617 GCTGGTACTTGATCTGTCTAGCTCTTCCCCAAGCCTTGCTCTTTGTCTTCTAGCCCATCT
1680 TTGGCAAATGGCTGGAGACATTGTCCTTGGTACTTTTGCAGTTTCATATAAATGGCTCATTT
1743 TATATGGATCACCCAACAGCAAAGTTTCCCTCTGACTGAGGCCTGCCGTCAGTGTCAACCTCA
1806 GGCAGGTTGAAGGACACTGGTGTGCACCTGGATGACAGTGGGAGGACACAGGAGTGAACAC
1869 ATGGAATCATGACGTGACTCTCCCTCAGCTGGGCTGGACTCTTCAGGGACTTGAAGTAAATGC
1932 AGCTGGTGAACCTGTACACCTTACTGTGGCCGAAACAGAGCTGAAGTAACTCCGAGGAATG
1995 AAGGTTTTGACTGAGAAAAAAAAAAAAA

Fig. 4. Nucleotide sequence of cloned cDNA and deduced amino acid sequence of rat liver lysosomal acid phosphatase. The deduced amino acid sequence is shown below the nucleotide sequence. Both the nucleotides and the predicted amino acid residues are numbered on the left. Putative signal sequence is indicated by broken underline and an upward arrow indicates the cleavage site for signal peptidase. Underline indicates a stretch of hydrophobic amino acids, possible transmembrane domains. Putative polyadenylation signal is shown by dots. Potential N-glycosylation sites and the termination codon are represented by * and ---, respectively.

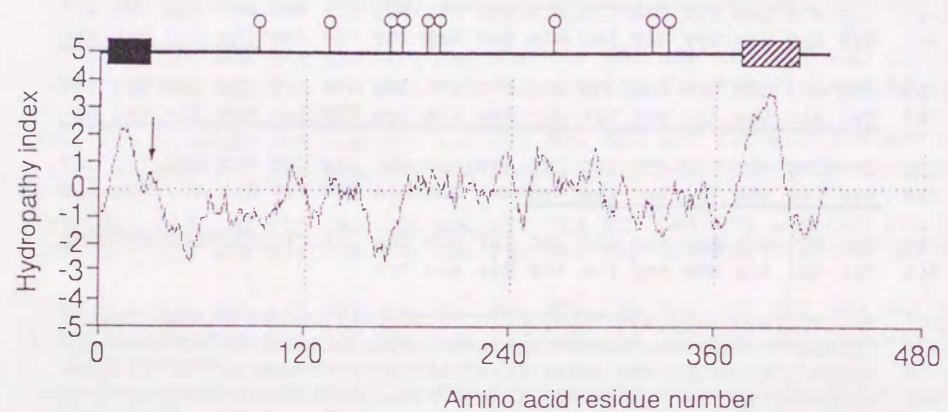


Fig. 5. Hydropathy plot of the rat liver lysosomal acid phosphatase. Hydrophobicity values obtained according to Kyte and Doolittle have been plotted with respect to positions in the amino acid sequence. The window used in the scanning was 11 amino acids. Line segments above and below the horizontal axis indicate hydrophobic and hydrophilic portions, respectively. A long arrow indicates the signal peptidase cleavage site. The membrane spanning region (hatched box) and potential N-linked glycosylation sites (○) are also indicated on the stick diagram above the hydropathy plot.

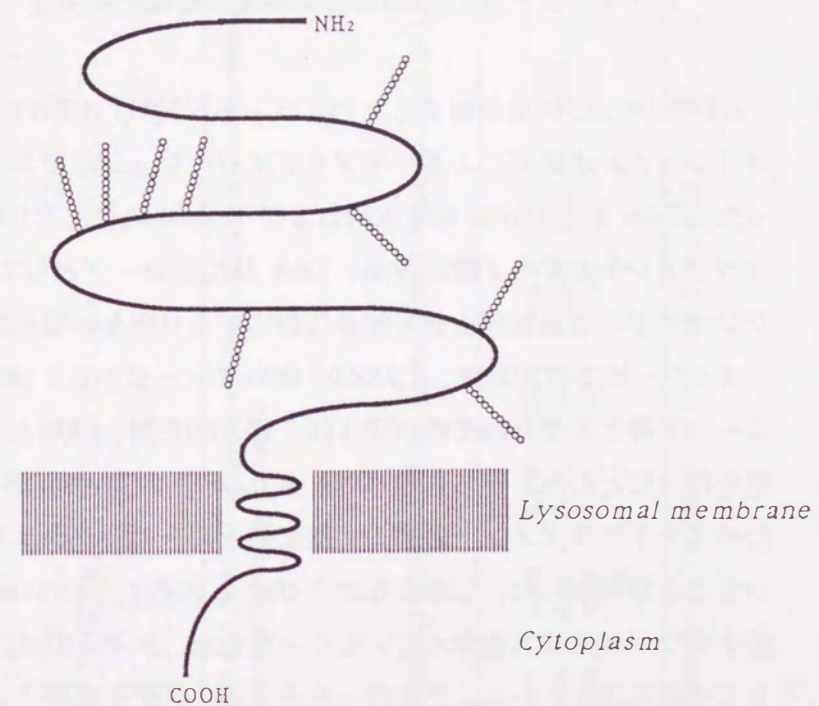


Fig. 6. Depiction of some aspects of the rat liver lysosomal acid phosphatase structure. NH₂- and COOH terminal ends are indicated and the membrane spanning segment is represented as the projected helix. Connected open circles represent approximate position of the N-glycosylation sites.

1-2 ラット肝リソゾーム膜に存在する分子量 85 Kのシアロ糖蛋白質
(rLGP85) の cDNA クローニング

1-2-1 オリゴヌクレオチドによるラット肝 λ gt11 cDNA ライブラリーのスクリーニングおよび rLGP85 cDNA の塩基配列決定

rLGP85 の cDNA を単離するためにラット肝 λ gt11 cDNA ライブラリーからオリゴヌクレオチドによるハイブリダイゼーション法でスクリーニングを行った。Table I に rLGP85 の N 末端および Trypsin 消化により得られたペプチドフラグメントのアミノ酸配列を、Table II にプローブとして用いたオリゴヌクレオチドの塩基配列とその部分に対応する cDNA の塩基配列を示す。

スクリーニングの結果、 1.25×10^5 個のファージから 2 個のポジティブなクローンを得たのでそれぞれ cGP-1 (1.7 kb), cGP-2 (1.8 kb) と名付け塩基配列決定を行ったところ、どちらの cDNA も rLGP85 の Trypsin 消化により得られたペプチドフラグメントのアミノ酸配列と同一のシーケンスをコードしていることが判明した。しかしながら cGP-1, cGP-2 とともに rLGP85 の N 末端に相当するシーケンスを含んでいなかったため、cGP-2 の cDNA をプローブにしてさらにスクリーニングを行ったところ、cGP-1, cGP-2 よりも長い cDNA をもつクローン cGP-3 (1.9 kb), cGP-4 (2.1 kb) を得ることが出来た。各々の塩基配列決定の結果、最長の cDNA をもつクローン cGP-4 が rLGP85 の N 末端に相当するシーケンスを含んでいることが明らかになった。cGP-4 の cDNA は Fig. 7 に示すストラテジーに従って塩基配列決定を行った。

Table I. N-terminal amino acid sequences of rLGP85 and their derived peptides.

Peptides	Sequences	Amino acid residues
Fragment 8	IVEWNGK	228-234
Fragment 14	AYIFER	116-121
Fragment 26	SFENVEGLPAFR	283-294
Fragment 33	GMR <u>PNKEEHE</u> SFVDINPLT	355-373
Fragment 44	VFDSWEKPPLEVIYIQFYFF	49-67
rLGP85	ARCCFYTA	2-9

The peptides were isolated by HPLC after trypsin digestion of rLGP85. The numbering of amino acid residues corresponds to that in Fig. 8. Amino acid residues underlined was chosen for the oligonucleotide probe (Table II).

Table II. Oligonucleotide probe used for isolating LGP85 and the part of the cDNA sequence of LGP85.

Amino acid sequence cDNA sequence of LGP85 Oligonucleotide probes	5'	3'	Pro	Asn	Lys	Glu	Glu	His	Glu	3'
			CCA	AAC	AAG	GAA	GAA	CAT	GAG	5'
			GGG	TTC	TTC	CTT	CTT	GTA	CTC	
				A	T	C	C	G	T	

The synthesized oligonucleotide probes are corresponded to the underlined amino acid sequence of fragment 33.

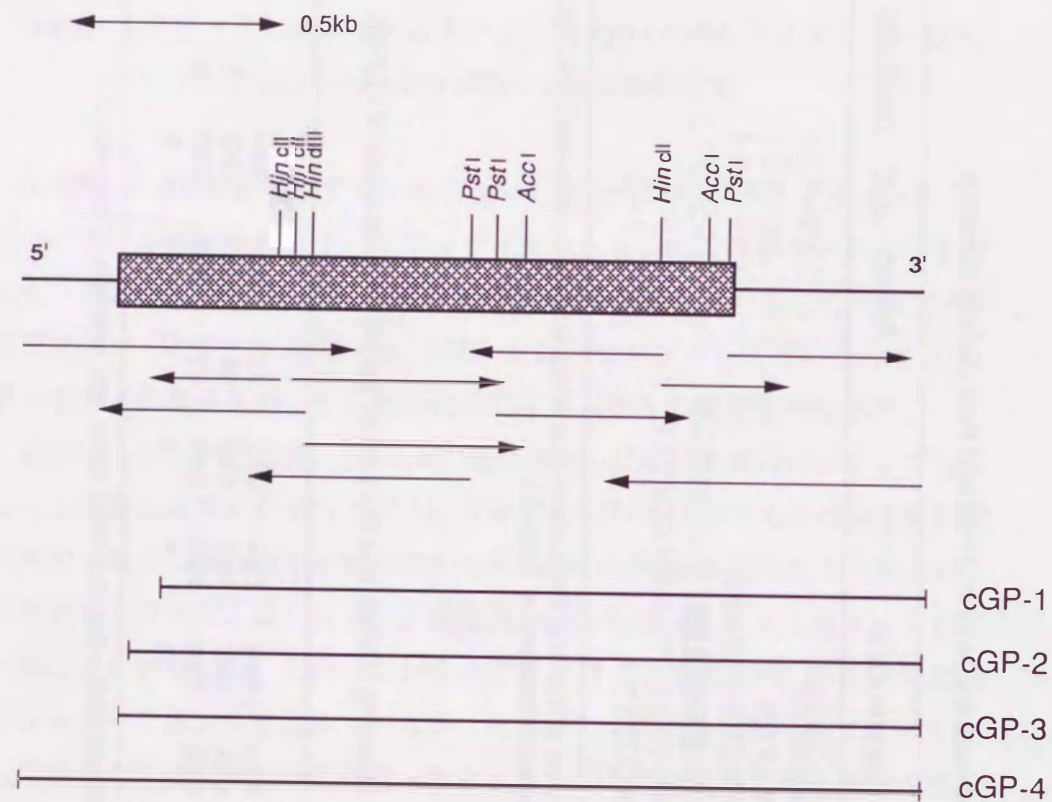


Fig. 7. Restriction map of rat LGP85 cDNA and strategy adapted for nucleotide sequence determination. Arrows indicate the direction and the extent of sequencing runs. The shadow box indicates the amino acid coding region and the lines indicate the 5'- and 3'-non-coding regions.

1-2-2 cDNA から推定される rLGP85 の一次構造およびリソゾーム膜上における存在様式

Fig. 8 に cGP-4 の全塩基配列とそれから推定される rLGP85 の全アミノ酸配列を示す。cGP-4 は全長 2065 bp で、1437 bp の ORF を含み、5' 側に 221 ヌクレオチド・3' 側に 407 ヌクレオチドの非翻訳領域を持っている。また 5' 末端から 1091 番目に典型的な poly (A) 付加シグナルである AATAAA が存在しており、そこから 142 ヌクレオチド下流に poly (A) が付加されている。

塩基配列をアミノ酸に翻訳した結果、rLGP85 は 478 個のアミノ酸からなりその蛋白質部分の分子量は 54,090 で、この値は江崎らが初代培養肝細胞を用いた実験で得られた糖鎖部分を除いた rLGP85 の分子量 55 K に非常に近い値である(33)。また N 型糖鎖結合可能部位 (Asn-X-Ser/Thr) は 11 ケ所あり、この部分への糖鎖の付加・修飾により rLGP85 は 85 K の分子量を示していると考えられる。

得られた一次構造をもとに、Kyte & Doolittle らの方法(42)に従って rLGP85 の hydrophathy plot を行ったところ (Fig. 9)、rLGP85 は N 末端と C 末端付近の 2 ケ所に疎水性の高い領域が存在していることが判明した。このうち N 末端の疎水性の高い部分は rLGP85 の小胞体膜透過のためのシグナルペプチドとして機能しているものと考えられる。しかしながらリソゾーム膜から精製した rLGP85 の N 末端のアミノ酸配列を決定したところ、このシグナルペプチドは開始コドンであるメチオニンが除去されているだけで切断を受けておらず(37,44)、rLGP85 は N 末端と C 末端付近の 2 ケ所でリソゾーム膜にアンカーしていると考えられる。

rLGP85 の一次構造をもとに GENETYX-CD を用いて SWISS-plot database のホモロジー検索を行ったところ、ヒト形質膜蛋白質である CD36 とアミノ酸レベルで 33.9% のホモロジーがあることが判明した(45)。CD36 は rLGP85 同様、非切断型のシグナルペプチドを有しており N 末端と C 末付近の二ヶ所に疎水性の高い領域が存在している。また 10 ケ所あるシステイン残基のうち 7 ケ所が rLGP85 と同じ位置にあることなどから、この二つの蛋白質は良く似た構造で膜上に存在していることが予想される。また筆者らと同時期

に Vega ら (46) はラット肝リソゾーム膜蛋白質のひとつである LIMP II の cDNA クローニングを報告しているが、これは rLGP85 と同一の蛋白質であった。

当研究室の岡崎らによると、rLGP85 は無傷のトライトゾームをノイラミニダーゼ処理しても分子量は不変であるが、低張破壊したトライトゾーム膜ではノイラミニダーゼ処理による分子量の低下がみられることから rLGP85 はその糖鎖部分がリソゾーム内腔側に存在していることが示唆されている (47)。また最近、当研究室の池田により、rLGP85 の C 末端の 20 アミノ酸残基および rLGP85 内腔側部分に対する特異的な抗体が調製され、これらの抗体を用いて rLGP85 のリソゾーム膜上での存在様式が検討された。それぞれの抗体の無傷および低張破壊後のトライトゾームに対する結合性、および各々の抗体による免疫電顕の染色パターンの比較によると rLGP85 は少なくとも C 末端側 20 残基は細胞質側に突出しており、また N 末側の大部分がリソゾーム内腔側に存在していることが蛋白質レベルでも証明されている (48)。Fig. 10 にこれらの結果から予想される rLGP85 のリソゾーム膜上での存在様式を示す。これまで報告されているリソゾーム膜蛋白質はすべて rAPase のような Type I の配向性を示し (Fig. 6)、比較的短い細胞質ドメインを有していることが知られていたが rLGP85 はそれらのリソゾーム膜蛋白質とは異なるトポロジーでリソゾーム膜上に存在していることが判明した。

```

1          CCCAGCACCCGCGATCGCGCGGGCTCTGTGCTCCGAGGGCCGTGCTCGCTGGTG
56 CCTACTCCAGGGCTGTGTACACCGCGCGCGCGGCTGAGCCCGCACCAGGAGGGCGGGAGCCGACGGCCCTGGAGCTT
139 TGGGCGACTGCTACCGCGCCTTG3CGGAGGCTCTTCTTGTCTGCGCGTCTGTGCGGGCCCTGGAACCGCTCACAGT

222 ATG GCC CGA TGC TGC TTC TAC ACG GGG GGG ACA CTG TCT CTG CTG CTG CTG ACC AGT GTC
Met Ala Arg Cys Cys Phe Tyr Thr Ala Gly Thr Leu Ser Leu Leu Leu Leu Val Thr Ser Val
285 ACG CTG CTA GTG GCT CGA GTC TTT CAG AAG GCA GTG GAC CAG ACG ATC GAG AAG AAT ATG GTA
22 Thr Leu Leu Val Ala Arg Val Phe Gln Lys Ala Val Asp Gln Thr Ile Glu Lys Asn Met Val

348 TTA CAA AAT GGT ACC AAG GTC TTT GAT TCC TGG GAG AAG CCC CCT CTA CCT GTG TAC ATC CAG
43 Leu Gln Asn Gly Thr Lys Val Phe Asp Ser Trp Glu Lys Pro Pro Leu Lys Val Tyr Ile Gln
411 TTT TAT TTC TTC AAT GTC ACC AAT CCA GAG GAG ATC CTC CAA GGA GAA ATC CCC CTG CTA GAA
64 Phe Tyr Phe Phe Asn Val Thr Asn Pro Glu Glu Ile Leu Gln Gly Glu Ile Pro Leu Leu Glu
474 GAA GTG GGG CCG TAC ACC TAC AGG GAG CTC AGG AAC AAG GCA AAC GTT CAG TTT GGA GAA AAT
85 Glu Val Gly Pro Tyr Thr Tyr Arg Glu Leu Arg Asn Lys Ala Asn Val Gln Phe Gly Glu Asn
537 GGA ACA ACC ATA TCT GCC GTC ACC AAT AAG GCA TAT ATT TTT GAA CGA AAC CAG TCT GTT GGA
106 Gly Thr Thr Ile Ser Ala Val Thr Asn Lys Ala Tyr Ile Phe Glu Arg Asn Gln Ser Val Gly
600 GAC CCT ACC GTT GAC TTG ATT AGA ACA ATA AAT ATT CCT CTG TTG ACT GTT GTG GAA ATG GCC
127 Asp Pro Thr Val Asp Leu Ile Arg Thr Ile Asn Ile Pro Leu Leu Thr Val Val Glu Met Ala
663 CAG CAG CCC TTC CTC AGG GAG ATC ATC GAG GCC ATG CTG AAA GCT TAT CAG CAG ACG CTG TTT
148 Gln Gln Pro Phe Leu Arg Glu Ile Ile Glu Ala Met Leu Lys Ala Tyr Gln Gln Thr Leu Phe
726 GTC ACT CAC ACT GTA CAT GAA CTG CTC TGG GCG TAC AAA GAT GAG GTC TTG TCG CTC GTC CAT
169 Val Thr His Thr Val His Glu Leu Leu Trp Gly Tyr Lys Asp Glu Val Leu Ser Leu Val His
789 ATT TTC AGA CCT GAC GTC TCC CCT AAC TTT GGC CTG TTC TAT GAG AGA AAT GGA ACT AAT GAT
190 Ile Phe Arg Pro Asp Val Ser Pro Asn Phe Gly Leu Phe Tyr Glu Arg Asn Gly Thr Asn Asp
852 GGG GAG TAT GTT TTT CTG ACT GGA GAG GAC AAT TAC CTG AAC TTT ACA AAA ATT GTG GAG TGG
211 Gly Glu Tyr Val Phe Leu Thr Gly Glu Asp Asn Tyr Leu Asn Phe Thr Lys Ile Val Glu Trp
915 AAT GGA AAA ACG TCG CTG GAC TGG TGG ACG ACG GAC ACG TGC AAT ATG ATC AAC GGG ACA GAC
232 Asn Gly Lys Thr Ser Leu Asp Trp Trp Thr Thr Asp Thr Cys Asn Met Ile Asn Gly Thr Asp
978 GGA GAT TCT TTT CAC CCA TTA ATA AGC AAG GAT GAG ACC CTG TAC ATC TTC CCA TCT GAC TTC
253 Gly Asp Ser Phe His Pro Leu Ile Ser Lys Asp Glu Thr Leu Tyr Ile Phe Pro Ser Asp Phe
1041 TGC AGG TCC GTC TAT ATA ACT TTC AGT AGC TTT GAG AAC GTA GAA GGA CTG CCT GCT TTT CGG
274 Cys Arg Ser Val Ile Tyr Thr Phe Ser Ser Phe Glu Asn Val Glu Gly Leu Pro Ala Phe Arg
1104 TAT AAG GTG CCT GCA GAA ATA CTA GCC AAT TCC TCC GAA AAC GGT GGC TTC TGT ATA CCC GAG
295 Tyr Lys Val Pro Ala Glu Ile leu Ala Asn Ser Ser Glu Asn Ala Gly Phe Cys Ile Pro Glu
1167 GGA AAC TGC ATG GAC GCG GGA GTG CTG AAC GTC AGC ATT TGC AAG AAT GGT GCG CCC ATT ATC
316 Gly Asn Cys Met Asp Ala Gly Val Leu Asn Val Ser Ile Cys Lys Asn Gly Ala Pro Ile Ile
1230 ATG TCT TTC CCA CAC TTT TAC CAA GCC GAC GAG AAG TTC GTT TCG GCC ATA AAA GGC ATG CGT
337 Met Ser Phe Pro His Phe Tyr Gln Ala Asp Glu Lys Phe Val Ser Ala Ile Lys Gly Met Arg
1293 CCA AAC AAG GAA GAA CAT GAG TCA TTT GTG GAC ATT AAT CCT TTG ACA GGA ATT ATT TTA AGA
358 Pro Asn Lys Glu Glu His Glu Ser Phe Val Asp Ile Asn Pro Leu Thr Gly Ile Ile Leu Arg

```

```

1356 GGG GCC AAG AGA TTC CAA ATC AAC ACG TAC GTT AAG AAG CTG GAT GAC TTT GTG GAA ACG GGA
379 Gly Ala Lys Arg Phe Gln Ile Asn Thr Tyr Val Lys Lys Leu Asp Asp Phe Val Glu Thr Gly

1419 AAC ATT AGG ACT ATG GTT TTC CCA GTG ATG TAT CTC AAT GAG AGT GTT CTC ATT GAC AAA GAG
400 Asn Ile Arg Thr Met Val Phe Pro Val Met Tyr Leu Asn Glu Ser Val Leu Ile Asp Lys Glu
                                     #
1482 ACT GCA AGT CAA CTG AAG TCT GTG ATT AAC ACA ACT TTG ATT GTC ACC AAC ATA CCC TAC ATC
421 Thr Ala Ser Gln Leu Lys Ser Val Ile Asn Thr Thr Leu Ile Val Thr Asn Ile Pro Tyr Ile
                                     #
1545 ATC ATG GCA CTG GGC GTG TTC TTT GGC TTG ATT TTC ACG TGG CTG GCG TGT CGA GGA CAG GGG
442 Ile Met Ala Leu Gly Val Phe Phe Gly Leu Ile Phe Thr Trp Leu Ala Cys Arg Gly Gln Gly

1608 TCT ACG GAT GAG GGA ACT GCA GAT GAA AGG GCA CCC CTC ATA CGG ACC TAA TGGGACTTACCTGTT
463 Ser Thr Asp Glu Gly Thr Ala Asp Glu Arg Ala Pro Leu Ile Arg Thr ---

1674 GCCTGAGCTTGGTGAGAGAA TGTGAGA ACTGACCTGACCTGGACCAGGACAGGGAAAAGCCTGCATCCTCACGGGCTCCTGGC
1757 CTGTCAAGAAGGAGTGAAGCCCGAGCACTGGCACGCGAGAAAGACCCCTCTGGACAGAGGGGACCGAGCAGGTGACATGGCTG
1840 GCAATTACGCTTTATAAAATCATGTCTCTGAAACTGTGCAATGTGTCTTAGGGAGTATTTAATATAATTGTGTAGAAACCTTT
1923 TGTGATTGGGCTCTGGGAGCTGTGGGTTTGTAAACCCCTGTTGTAGATACAGTGTCTGAGTCACCTGTTAATGTAACTTGG
2006 CCTGACCCGATTTCAGTATGCCTCACTCTCAAACCTTGTGTTTAAAAATATGAAAAAAAAA

```

Fig. 8. Nucleotide sequence of cloned cDNA and deduced amino acid sequence of rat liver lysosomal LGP85. The deduced amino acid sequence is shown below the nucleotide sequence. Both the nucleotides and the predicted amino acids are numbered on the left. Amino acid sequences of rat liver lysosomal LGP85 determined by Edman degradation are boxed. Underlines indicate a stretch of hydrophobic amino acid, possible transmembrane domains, at the NH₂-terminus and near the COOH terminus. Asparagine residues (#) represent potential N-linked glycosylation sites. An underline in the 3'-non coding region indicates the polyadenylation signal. The stop codon limiting the open reading frame is indicated by (---). The arrowhead indicates the posttranslational cleavage sites.

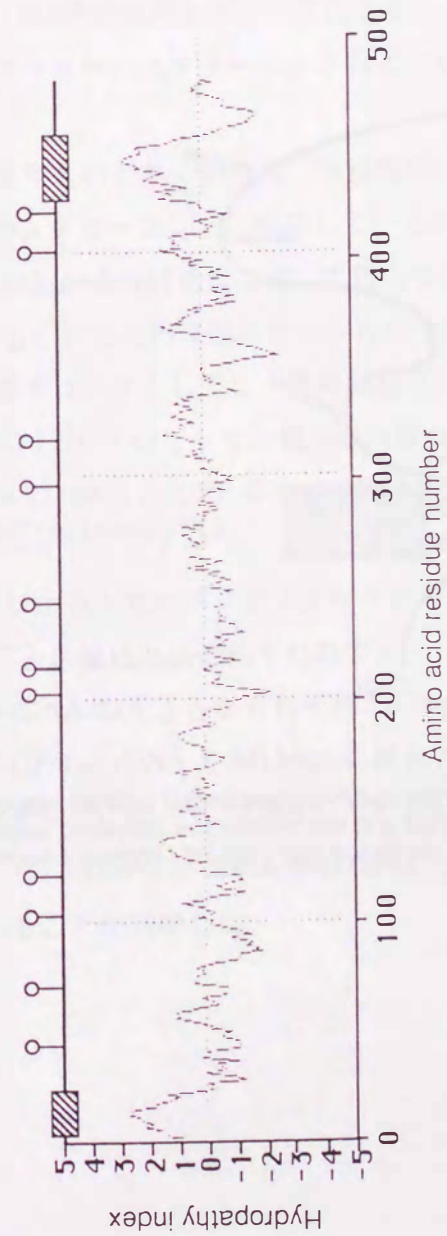


Fig. 9. Hydropathy plot of the rLGP85. Hydropobicity values obtained according to Kyte and Doolittle have been plotted with respect to positions in the amino acid sequence. The window used in the scanning was 11 amino acids. Line segments above and below the horizontal axis indicate hydrophobic and hydrophilic portions, respectively. The membrane spanning regions (hatched boxes) and potential N-linked glycosylation sites (φ) are shown above the hydropathy plot.

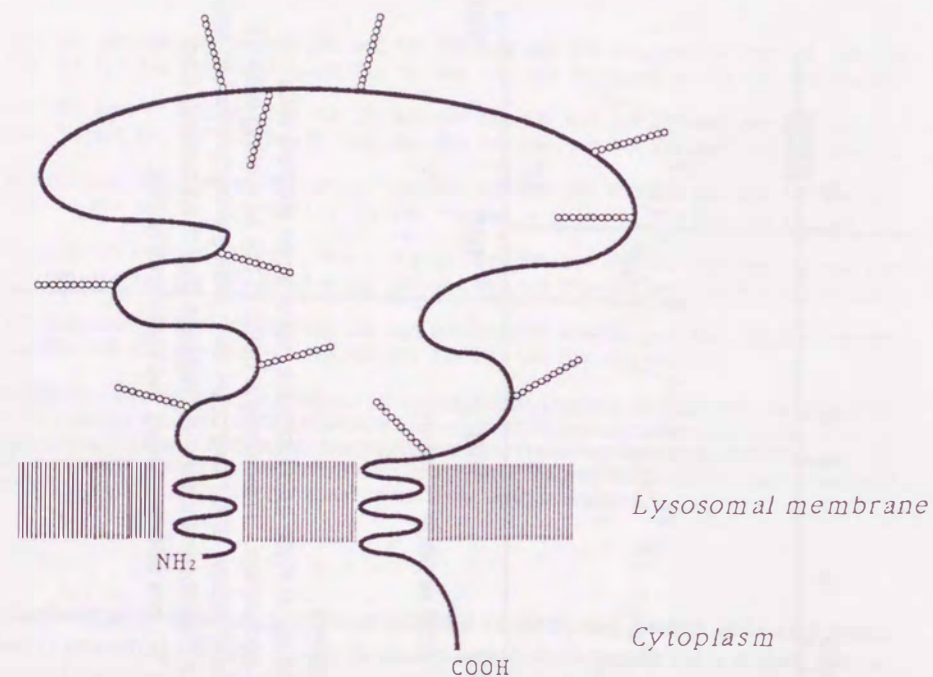


Fig. 10. Depiction of some aspects of the rat liver lysosomal LGP85 structure. NH₂- and COOH terminal ends are indicated and the membrane spanning segments are represented as the projected helix. Connected open circles represent approximate position of the N-glycosylation sites.

1-3 ヒト膀胱癌細胞(QGP-1NL)cDNAライブラリーからのヒトLGP85のcDNAクローニング

1-3-1 rLGP85 cDNA プローブによるヒト膀胱癌細胞(QGP-1NL)cDNAライブラリーのスクリーニングおよびhLGP85 cDNAの塩基配列決定

これまでわれわれの研究室では数種類のラット肝リソゾーム膜蛋白質に関してcDNAクローニングに成功しているが、それらはすべてヒトでの相同蛋白質の存在が他の研究室において報告されている(27,41)。そこでLGP85に関してもヒトでの相同蛋白質の存在が予想されるので、ラットのLGP85のcDNAをプローブとしてヒト膀胱癌細胞(QGP-1NL)(49,50)のcDNAライブラリーからLGP85のヒトでの相同蛋白質のcDNAクローニングを試みた。

cGP-4のcDNAのORF中のHin cII fragment(847bp)をプローブとして、ブランクハイブリダイゼーションによるスクリーニングの結果、 4.2×10^5 個のファージから2個のポジティブなクローンを得たので、それぞれhLGP-1, hLGP-2と名付けた。それぞれのファージDNAをEcoRI消化したところインサートcDNAの大きさがそれぞれ2.3 kbp, 2.0 kbpであることが明らかとなった。hLGP-1のcDNAをM13mp18, 19にサブクローニング後、Fig. 11に示すストラテジーに従って、DNAシーケンサーによる全塩基配列決定を行ったところ、hLGP-1のcDNAがrLGP85と非常に相同性の高い蛋白質をコードしていることが判明した。

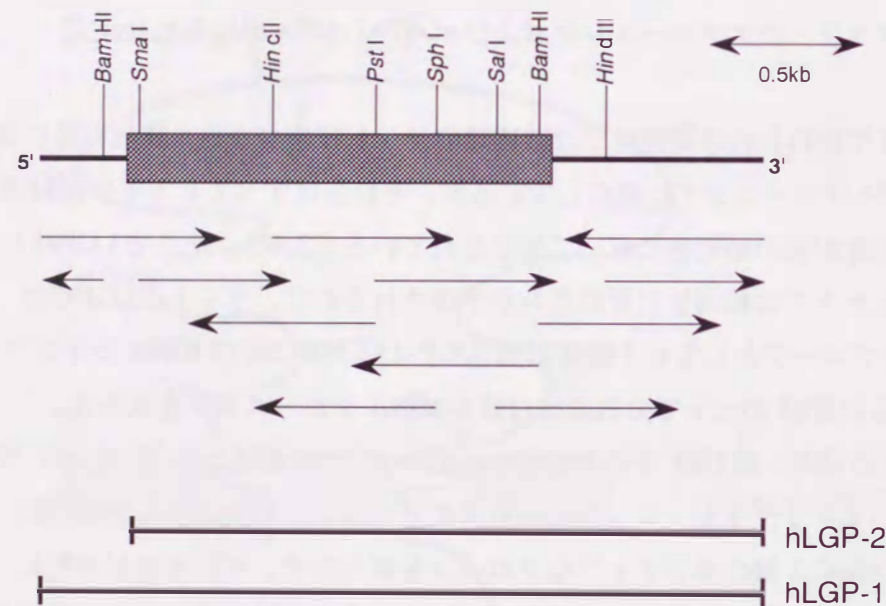


Fig. 11. Restriction map of human LGP85 cDNA and strategy adapted for nucleotide sequence determination. Arrows indicate the direction and the extent of sequencing runs. The shadow box indicates the amino acid coding region and the lines indicate the 5'- and 3'- non-coding regions.

1-3-2 cDNA から推定される hLGP85 の一次構造に関する検討

Fig. 12 に hLGP-1 の全塩基配列とそれから推定される hLGP85 の全アミノ酸配列を示す。hLGP-1 は全長 2329 bp で、1437 bp の ORF を含み、5' 側に 251 ヌクレオチド・3' 側に 641 ヌクレオチドの非翻訳領域を持っている。また 5' 末端から 2279 番目に典型的な poly (A) 付加シグナルである AATAAA が存在しているが、このクローンには poly (A) が付加されていなかった。

塩基配列をアミノ酸に翻訳した結果、hLGP85 は rLGP85 と同数の 478 個のアミノ酸からなり蛋白質部分の分子量は 54,289 であった。また N 型糖鎖結合可能部位は 10 ケ所で rLGP85 より 1 ケ所少なかったが、これは rLGP85 での 122 番目のアスパラギンが hLGP85 ではアスパラギン酸に変化しているためである。hLGP85 と rLGP85 のホモロジーは核酸レベルで 79 % でアミノ酸レベルで 86 % と非常に高く、LGP85 が種を越えて非常によく保存された蛋白質であることが予想される。

ヒト LGP85 に関しては蛋白質レベルでの解析はほとんど行っていないが、ラット LGP85 に対する特異的抗体を用いてヒトの肝臓、膀胱癌細胞 (QGP1-NL)、胎盤の膜画分のイムノプロテイングを行ったところ、Fig. 13 に示すようにいずれの画分にもほぼ分子量 85 K のバンドが確認された。これはラット LGP85 に対する抗体がヒト LGP85 に対して交差反応しているためであり、LGP85 がラット/ヒトの間でアミノ酸レベルで 86% という高い相同性を示していることを裏付けている。

次にヒト膀胱癌細胞 (QGP1-NL) における hLGP85 の細胞内局在部位を検討するために、この抗 rLGP85 抗体および horseradish peroxidase (HRP) 標識した二次抗体を用いて、細胞の免疫染色を行い光学顕微鏡による観察を行った。Fig. 14 において、細胞核はヘマトキシリン染色により青紫色に染まっているのに対して、Fig. 14-1 に見られるように抗 rLGP85 抗体および HRP 標識した二次抗体由来の茶褐色のジアミノベンチジン (DAB) 反応物は、細胞質中の顆粒状のリソゾームと考えられる構造物に多く認められた。一方コントロールとして用いた非免疫ウサギ抗体では茶褐色の DAB 反応物は認められなかった (Fig. 14-2)。また ポジティブコントロールとして、QGP1-NL 細胞に発

現している事が知られている癌胎児性抗原 (CEA : carcinoembryonic antigen) に対する抗体を用いて同様に細胞の免疫染色を行った場合、DAB反応物は形質膜上に多く認められている (Fig. 14-3)。以上の結果よりヒト LGP85 はヒトの細胞においても、分子量 85 K の膜蛋白質として合成され、やはりリソゾームに局在していることが示唆された。またラット LGP85 と非常に良く似た一次構造を持つために、その局在化機構やリソゾーム膜上での存在様式もラットの場合と同様であると考えられるが、これらの詳細な検討はまだなされていない。

```

1 CACGGCTGCCCGGCG
16 AAGGAAACCGAAACCGAGTCCGGGCCCCGTCCCTCCGCGGCCCATCCGCCCGGTGCACC
75 CGGGGCCGCGCTCGCCAGGCCGCGGAGCCAGAGCTGCGCGCACGAACCGTGCAGCGGGAG
134 GGCGTGGGCGTTGCGCCGAAGGGTCCCCGAGTCTTCGACGCCTCTGCGGCGGCTCCTCCC
193 TCCTTGCAAGTTGGATCCCTGGCGGGTGCAGGCCCGGCCCGTGGAGCGGCGCACAGA

252 ATG GGC CGA TGC TGC TTC TAC ACG GCG GGG ACG TTG TCC CTG CTC
1 Met Gly Arg Cys Cys Phe Tyr Thr Ala Gly Thr Leu Ser Leu Leu

297 CTG CTG GTG ACC AGC GTC ACG CTG CTG GTG GCC CGG GTC TTC CAG
16 Leu Leu Val Thr Ser Val Thr Leu Leu Val Ala Arg Val Phe Gln

342 AAG GCT GTA GAC CAG AGT ATC GAG AAG AAA ATT GTG TTA AGG AAT
31 Lys Ala Val Asp Gln Ser Ile Glu Lys Lys Ile Val Leu Arg Asn
#

387 GGT ACT GAG GCA TTT GAC TCC TGG GAG AAG CCC CCT CTG CCT GTG
46 Gly Thr Glu Ala Phe Asp Ser Trp Glu Lys Pro Pro Leu Pro Val

432 TAT ACT CAG TTC TAT TTC TTC AAT GTC ACC AAT CCA GAG GAG ATC
61 Tyr Thr Gln Phe Tyr Phe Phe Asn Val Thr Asn Pro Glu Glu Ile
#

477 CTC AGA GGG GAG ACC CCT CGG GTG GAA GAA GTG GGG CCA TAC ACC
76 Leu Arg Gly Glu Thr Pro Arg Val Glu Glu Val Gly Pro Tyr Thr

522 TAC AGG GAA CTC AGA AAC AAA GCA AAT ATT CAA TTT GGA GAT AAT
91 Tyr Arg Glu Leu Arg Asn Lys Ala Asn Ile Gln Phe Gly Asp Asn
#

567 GGA ACA ACA ATA TCT GCT GTT AGC AAC AAG GCC TAT GTT TTT GAA
106 Gly Thr Thr Ile Ser Ala Val Ser Asn Lys Ala Tyr Val Phe Glu

612 CGA GAC CAA TCT GTT GGA GAC CCT AAA ATT GAC TTA ATT AGA ACA
121 Arg Asp Gln Ser Val Gly Asp Pro Lys Ile Asp Leu Ile Arg Thr

657 TTA AAT AAT CCT GTA TTG ACT GTC ATA GAG TGG TCC CAG GTG CAC
136 Leu Asn Ile Pro Val Leu Thr Val Ile Glu Trp Ser Gln Val His

702 TTC CTC AGG GAG ATC ATC GAG GCC ATG TTG AAA GCC TAT CAG CAG
151 Phe Leu Arg Glu Ile Ile Glu Ala Atg Leu Lys Ala Tyr Gln Gln

747 AAG CTC TTT GTG ACT CAC ACA GTT GAC GAA TTG CTC TGG GGC TAC
166 Lys Leu Phe Val Thr His Thr Val Asp Glu Leu Leu Trp Gly Tyr

792 AAA GAT GAA ATC TTG TCC CTT ATC CAT GTT TTC AGG CCC GAT ATC
181 Lys Asp Glu Ile Leu Ser Leu Ile His Val Phe Arg Pro Asp Ile

837 TCT CCC TAT TTT GGC CTA TTC TAT GAG AAA AAT GGG ACT AAT GAT
196 Ser Pro Tyr Phe Gly Leu Phe Tyr Glu Lys Asn Gly Thr Asn Asp
#

882 GGA GAC TAT GTT TTT CTA ACT GGA GAA GAC AGT TAC CTT AAC TTT
211 Gly Asp Tyr Val Phe Leu Thr Gly Glu Asp Ser Tyr Leu Asn Phe
#

927 ACA AAA ATT GTG GAA TGG AAT GGG AAA ACG TCA CTT GAC TGG TGG
226 Thr Lys Ile Val Glu Trp Asn Gly Lys Thr Ser Leu Asp Trp Trp

972 ATA ACA GAC AAG TGC AAT ATG ATT AAT GGA ACA GAT GGA GAT TCT
241 Ile Thr Asp Lys Cys Asn Met Ile Asn Gly Thr Asp Gly Asp Ser
#

1017 TTT CAC CCA CTA ATA ACC AAA GAT GAG GTC CTT TAT GTC TTC CCA
256 Phe His Pro Leu Ile Thr Lys Asp Glu Val Leu Tyr Val Phe Pro

1062 TCT GAC TTT TGC AGG TCA GTG TAT ATT ACT TTC AGT GAC TAT GAG
271 Ser Asp Phe Cys Arg Ser Val Tyr Ile Thr Phe Ser Asp Tyr Glu

```

```

1107 AGT GTA CAG GGA CTG CCT GCC TTT CGG TAT AAA GTT CCT GCA GAA
286 Ser Val Gln Gly Leu Pro Ala Phe Arg Tyr Lys Val Pro Ala Glu

1152 ATA TTA GCC AAT ACG TCA GAC AAT GCC GGC TTC TGT ATA CCT GAG
301 Ile Leu Ala Asn Thr Ser Asp Asn Ala Gly Phe Cys Ile Pro Glu
#
1197 GGA AAC TGC CTG GGC TCA GGA GTT CTG AAT GTC AGC ATC TGC AAG
316 Gly Asn Cys Leu Gly Ser Gly Val Leu Asn Val Ser Ile Cys Lys
#
1242 AAT GGT GCA CCC ATC ATT ATG TCT TTC CCA CAC TTT TAC CAA GCA
331 Asn Gly Ala Pro Ile Ile Met Ser Phe Pro His Phe Tyr Gln Ala

1287 GAT GAG AGG TTT GTT TCT GCC ATA GAA GGC ATG CAC CCA AAT CAG
346 Asp Glu Arg Phe Val Ser Ala Ile Glu Gly Met His Pro Asn Gln

1332 GAA GAC CAT GAG ACA TTT GTG GAC ATT AAT CCT TTG ACT GGA ATA
361 Glu Asp His Glu Thr Phe Val Asp Ile Asn Pro Leu Thr Gly Ile

1377 ATC CTA AAA GCA GCC AAG AGG TTC CAA ATC AAC ATT TAT GTC AAA
376 Ile Leu Lys Ala Ala Lys Arg Phe Gln Ile Asn Ile Tyr Val Lys

1422 AAA TTA GAT GAC TTT GTT GAA ACG GGA GAC ATT AGA ACC ATG GTT
391 Lys Leu Asp Asp Phe Val Glu Thr Gly Asp Ile Arg Thr Met Val

1467 TTC CCA GTG ATG TAC CTC AAT GAG AGT GTT CAC ATT GAT AAA GAG
406 Phe Pro Val Met Tyr Leu Asn Glu Ser Val His Ile Asp Lys Glu
#
1512 ACG GCG AGT CGA CTG AAG TCT ATG ATT AAC ACT ACT TTG ATC ATC
421 Thr Ala Ser Arg Leu Lys Ser Met Ile Asn Thr Thr Leu Ile Ile
#
1557 ACC AAC ATA CCC TAC ATC ATC ATG GCG CTG GGT GTG TTC TTT GGT
436 Thr Asn Ile Pro Tyr Ile Ile Met Ala Leu Gly Val Phe Phe Gly

1602 TTG GTT TTT ACC TGG CTT GCA TGC AAA GGA CAG GGA TCC ATG GAT
451 Leu Val Phe Thr Trp Leu Ala Cys Lys Gly Gln Gly Ser Met Asp

1647 GAG GGA ACA GCG GAT GAA AGA GCA CCC CTC ATT CGA ACC TAA ACA
466 Glu Gly Thr Ala Asp Glu Arg Ala Pro Leu Ile Arg Thr ***

1692 TTGCCTTTGCTTGGTGAAGAACTGTGTGAGCTGTCCTGACCTGGACGATGACGTGGGG
1751 AAACCCCTCCACCTCCTTGCAGGCTTGTTCCTGTGAAAAGAAGGAAAAAGACACGGCGC
1810 TGGCAAGTGATAGGAACATTCTGGCCAGAGGTTAAAAGAGCAGGCTGACATGGCTGGCCA
1869 TTAAGCTTTATAAAATCATGTGGGCTCTGAAATTGTTCTTTTATGTGTCTAGCAAGTAT
1928 TTAATAAACCCCTTGTATAGTAATTTTGTGTGTGGGTGCTGGTAGCTCCAGAATTTT
1987 GTGACCACTATTGTGGGTAAAATGTCTCTGCATCACTTGTAAATGCTACTGGTCTAACT
2046 TCATTCAGTATGCTTCATTCACCGAACTTTGTGCTCAAAAATGCGTATATACCATTTTAT
2105 GTTGTATTCCCTCCATTTCACTTGCAAAACAGAAAGTAAATAAGAGTTCGGGACCCAGGGT
2164 AAAATGGTAGCTTCATCCAATATATCATTCAAATGCATCTGATTTCTAAACCATATTAC
2223 ATTTTATGCTGATCTTCAGTTCATAATCTTCCAGGAAAACCTCAGTCTTCCAACCTGCAA
2282 TAAAATACTGGGGTAGGAATCAAATGGGAAAGGGGGGGGGGGGGGGGGGG

```

Fig. 12. Nucleotide sequence of cloned cDNA and deduced amino acid sequence of human LGP85. The deduced amino acid sequence is shown below the nucleotide sequence. Both the nucleotides and the predicted amino acid residues are numbered on the left. Shadow boxes indicate a stretch of hydrophobic amino acids, possible transmembrane domains, at the NH₂-terminus and at near the -COOH terminus. Asparagine residues (#) represent potential *N*-linked glycosylation sites. The stop codon limiting the open reading frame is indicated by stars. An underline in the 3'-non coding region indicates the polyadenylation signal. The arrowhead means the posttranslational cleavage site.

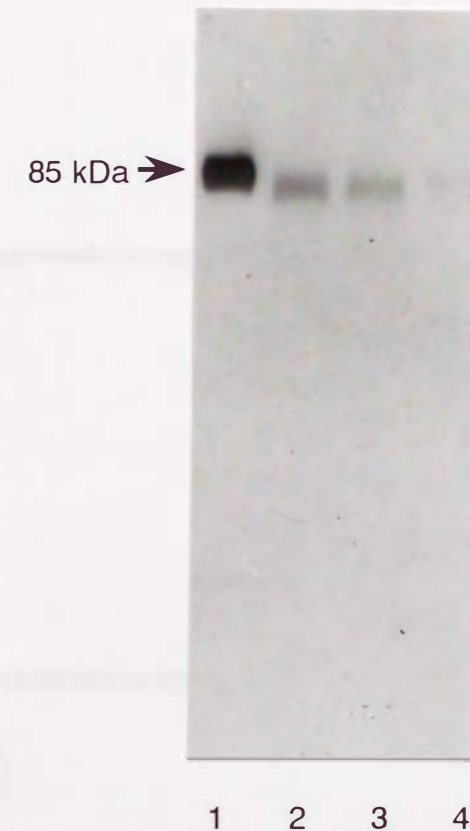


Fig. 13. Immunoblotting of LGP85 from membrane fractions prepared from rat liver, human liver, QGP-1NL, and human placenta. Each membrane fraction was subjected to SDS/PAGE followed by immunoblot analysis, using specific anti-rLGP85-IgG. Lane 1, rat liver lysosomal membranes; Lane 2, membrane fractions from human liver; Lane 3, membrane fractions from QGP-1NL; Lane 4, membrane fractions from human placenta.

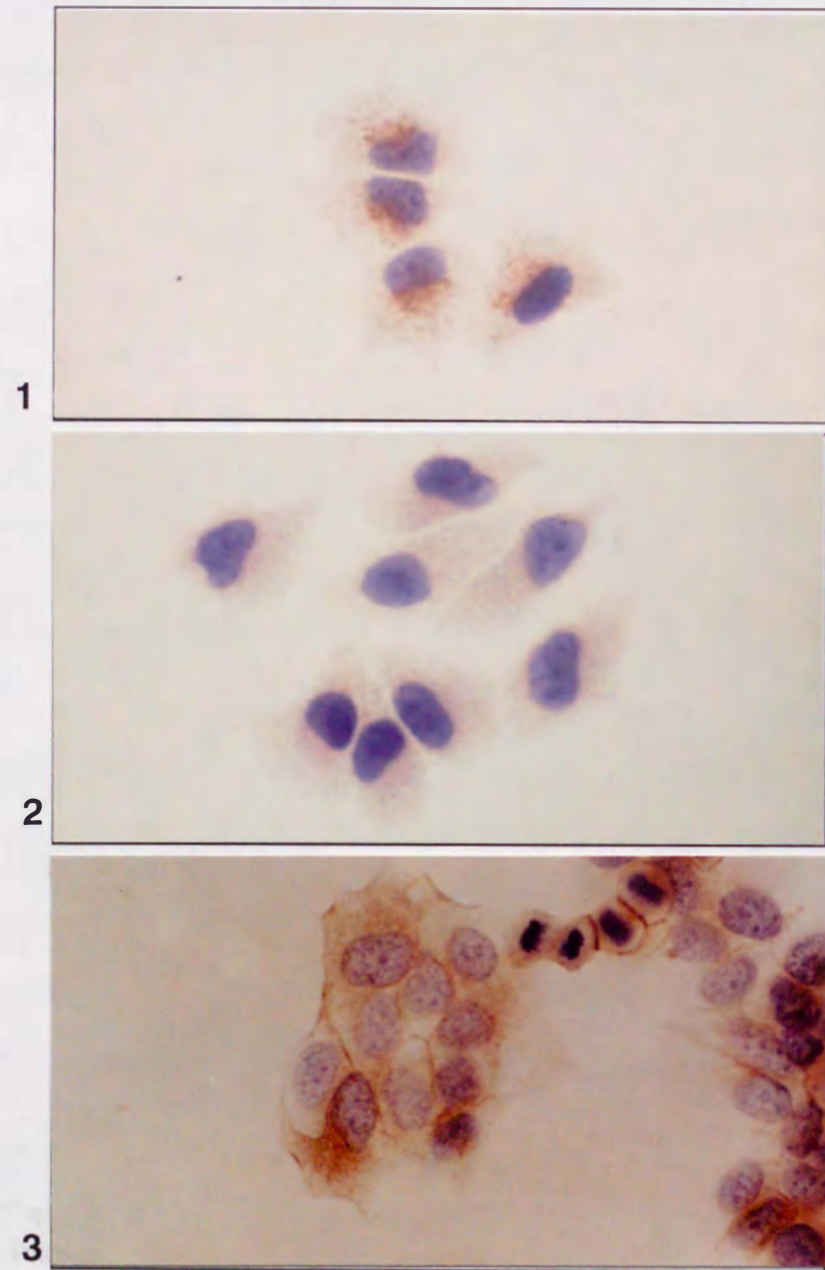


Fig. 14. Immunological staining of QGP-1NL cells by anti-rLGP85 IgG(1), non-immune IgG(2), or anti-CEA IgG(3).

QGP1-NL cells were fixed and incubated with each antibody and HRP-labeled secondary antibody. And then, the fixed cells were processed for DAB cytochemistry. The reaction products of DAB were observed in lysosomes(1) and in plasma membranes(3).

1-4 考察

1-4-1 リソゾーム膜蛋白質の一次構造による分類

今回筆者はラット肝リソゾーム膜蛋白質である rAPase、rLGP85、および rLGP85 のヒトでの相同蛋白質である hLGP85 の cDNA クローニングを行い、それらの一次構造を明らかにすることに成功した。また我々の研究室では野口らによってラット肝リソゾーム膜蛋白質である LGP107、LGP96 の cDNA クローニングが報告されており(22,23)、さらに最近他の研究室においてもいくつかのリソゾーム膜蛋白質の cDNA クローニングが報告されてきている(24~27)。これらリソゾーム膜蛋白質は、Table III に示すように大きく分けて五つのグループに分類することができる。それぞれのグループの蛋白質は異なる種間では非常に良く保存されているが、それぞれのグループ間では Lamp 1 / Lamp 2 間に若干相同性が見られる(ラット: 32.1%、ヒト: 36.7%) 以外はとくに相同性は認められない。Lamp 1、Lamp 2 に関しては最近 genomic DNA のクローニングが報告されており(51,52) その遺伝的相関性がさらに明らかになってきている。このように個々のリソゾーム膜蛋白質間において相同性が見られないことは、各々の蛋白質が独自の機能を持っていることを示唆しているが、リソゾーム膜蛋白質の機能に関しては酸性フォスファターゼ以外は未だ明らかにされていない。リソゾーム膜蛋白質の機能としては、1) リソゾーム内腔の酸性化、2) リソゾーム内腔での加水分解酵素等の作用により生じる各種アミノ酸、脂肪酸、糖質、およびコレステロールやコバラミン(vitamin B₁₂) などの栄養素の細胞質内への輸送などが予想されているが、これらの機能にかかわるリソゾーム膜蛋白質はまだ同定されていない(20)。これらリソゾーム膜蛋白質の機能解明は今後のリソゾーム膜蛋白質に関する研究における重要課題の一つである。

Table III. Properties of the lysosomal membrane glycoproteins.

Properties	acid phosphatase	Lamp-1	Lamp-2	Lamp-3	LGP85
Homology rat/human rat/mouse rat/chicken	89.0%	60.0% 82.5% 40.0%	65.3% 65.3%		86.0%
Apparent molecular weight(kDa)	67	90-120	95-120	30-55	85
Number of amino acid residues	423	382-396	380-389	238	478
Number of N-glycans	8-9	17-20	16-17	3	10-11
Number of membrane spanning domains	1	1	1	3	2
Signal sequence	cleavable	cleavable	cleavable	uncleavable	uncleavable
Orientation	Type I	Type I	Type I	poly topic	poly topic
GY-motif	Yes	Yes	Yes	Yes	No

1-4-2 リソゾーム膜蛋白質の局在化シグナルの検討

前項で述べたように、個々のリソゾーム膜蛋白質間には顕著な相同性は認められなかったがリソゾーム膜上におけるトポロジーに関しては、LGP85を除いてすべてType I の配向性を示すという共通性が見られた。すなわち N 末側の大部分をリソゾーム内腔に向け C 末付近で一回リソゾーム膜を貫通し、細胞質側に十数残基からなる細胞質ドメインを有するというトポロジーで存在している。このうちリソゾーム内腔側ドメインはおそらく個々のリソゾーム膜蛋白質の機能発現に関与していると考えられ、各々に特徴的なシークエンスを持っていると考えられる。一方、緒言でも述べたようにリソゾーム膜蛋白質の局在化シグナルが蛋白質部分にあると予想するならば、これは C 末端側の細胞質ドメインにあると考えるのが妥当であろう。何故なら他の部分はリソゾームの内腔側に存在するか、リン脂質二重層の中に埋もれていたりして、キャリアー蛋白質など細胞の持つ選別装置と相互作用することができないはずである。そこでこの細胞質ドメインのアミノ酸配列を比較したものが Fig. 15 である。これを見ると LGP85 以外はすべてリソゾーム膜からほぼ同じ距離 (6-8 アミノ酸残基) のところにグリシン-チロシンという特徴的な配列 (GY-motif) が存在していることがわかる。したがってこの GY-motif がリソゾーム膜蛋白質の局在化シグナルである可能性が示唆された。

LGP85 の場合、他のリソゾーム膜蛋白質と異なり N 末端と C 末端付近の 2 ケ所に膜結合ドメインが存在しているが、やはり C 末端 20 残基の短い細胞質ドメインが存在している。しかしながらこのドメイン中には GY-motif は存在しておらず、また他のリソゾーム膜蛋白質の細胞質ドメインとのホモロジーも認められなかった。したがって LGP85 には他のリソゾーム膜蛋白質とは異なる局在化シグナルが存在している可能性がある。すなわちリソゾーム膜蛋白質の局在化機構には少なくとも 2 種類以上のシグナルが存在していることが示唆された。GY-motif でない新しいシグナルの同定には、さらに多数のリソゾーム膜蛋白質の cDNA のクローニングが必要であろう。

2-1 野生型 rAPase および変異型 rAPase の DNA 作製および発現ベクター (pAM82) へのクローニング

酵母発現ベクターである pAM82 (56) は Fig. 16 に示すように、酵母 2 μ m DNA の複製起点を持ち、細胞あたりのコピー数も多く比較的安定に保持される。また組換え体選択マーカーである *Leu 2* 遺伝子はそのプロモーター部分をほとんど失っているために、ロイシンを含まない培地中では高いコピー数が保たれるという性質を持つ。*PHO5* プロモーターはリン酸濃度によって発現の制御が可能であり、これまでにこのベクターを用いて B 型肝炎ウイルスコア抗原 (56)、カリフラワーモザイクウイルスの逆転写酵素 (57)、ヒト α アミラーゼ (58)、ニワトリリゾチーム (59) などの酵母細胞における発現が報告されている。rAPase の細胞質ドメインの機能を酵母細胞の系において調べるために、Fig. 17 に示すように PCR 法 (60) および Kunkel 法 (61) を用いて、野生型 rAPase および数種類の変異型 rAPase の DNA を作製し、発現ベクターである pAM82 に挿入した。まずはじめに 5' 側に *EcoRI*、3' 側に *XbaI* のタグをつけたプライマーを用いて PCR を行い、rAPase の 5' および 3' 側の非翻訳領域を除いた DNA を作製した。この際に膜結合領域と細胞質ドメインを欠失させた変異体 (dC45) も同様に PCR 法により作製した。ABI-DNA シークエンサーによる塩基配列確認後、M13 中間ベクターである ϕ KP1010 を用いて、Kunkel 法により rAPase の N 末端のシグナルシーケンスを酵母の分泌蛋白質であるインベルターゼのシグナルシーケンスに変換した。これは蛋白質の central vacuole system への最初のステップである小胞体膜透過およびシグナルペプチドの切断の効率を良くするために行った。さらに細胞質ドメインの欠失体 (dC18) や GY-motif 中のチロシン残基をアラニン残基に変換したアミノ酸置換体 (Y412A) の作製もこの中間ベクター上で Kunkel 法により行った。いずれの場合も Kunkel 法による変異導入後は塩基配列の確認を行っている。このようにして作製した野生型 rAPase および変異型 rAPase の DNA を、酵母における発現ベクターである pAM82 に挿入した。Fig. 18 にこの実験に用いた野生型 rAPase および変異型 rAPase の模式図を示す。作製したプラスミドは実験の部に示す方法 (62) に従って large scale で調製し、プロ

トプラスト法 (63) により酵母細胞 (AH22) を形質転換し、ロイシンを含まない培地上で組換え体の選択を行った。得られた組換え体は FJ-1 (wild type), FJ-2 (dC45), FJ-3 (dC18), FJ-4 (Y412A) と名付け、以下の実験に用いた。

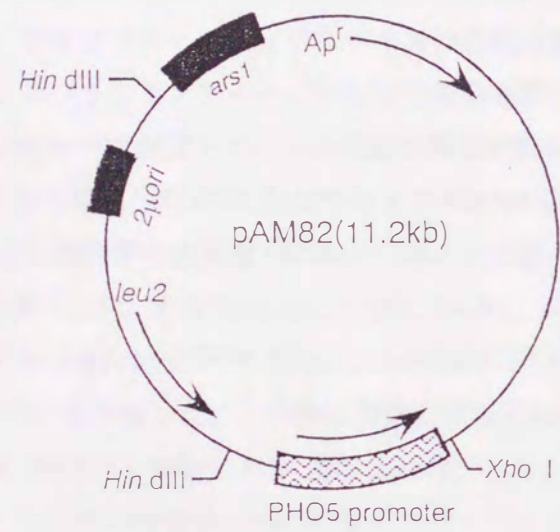
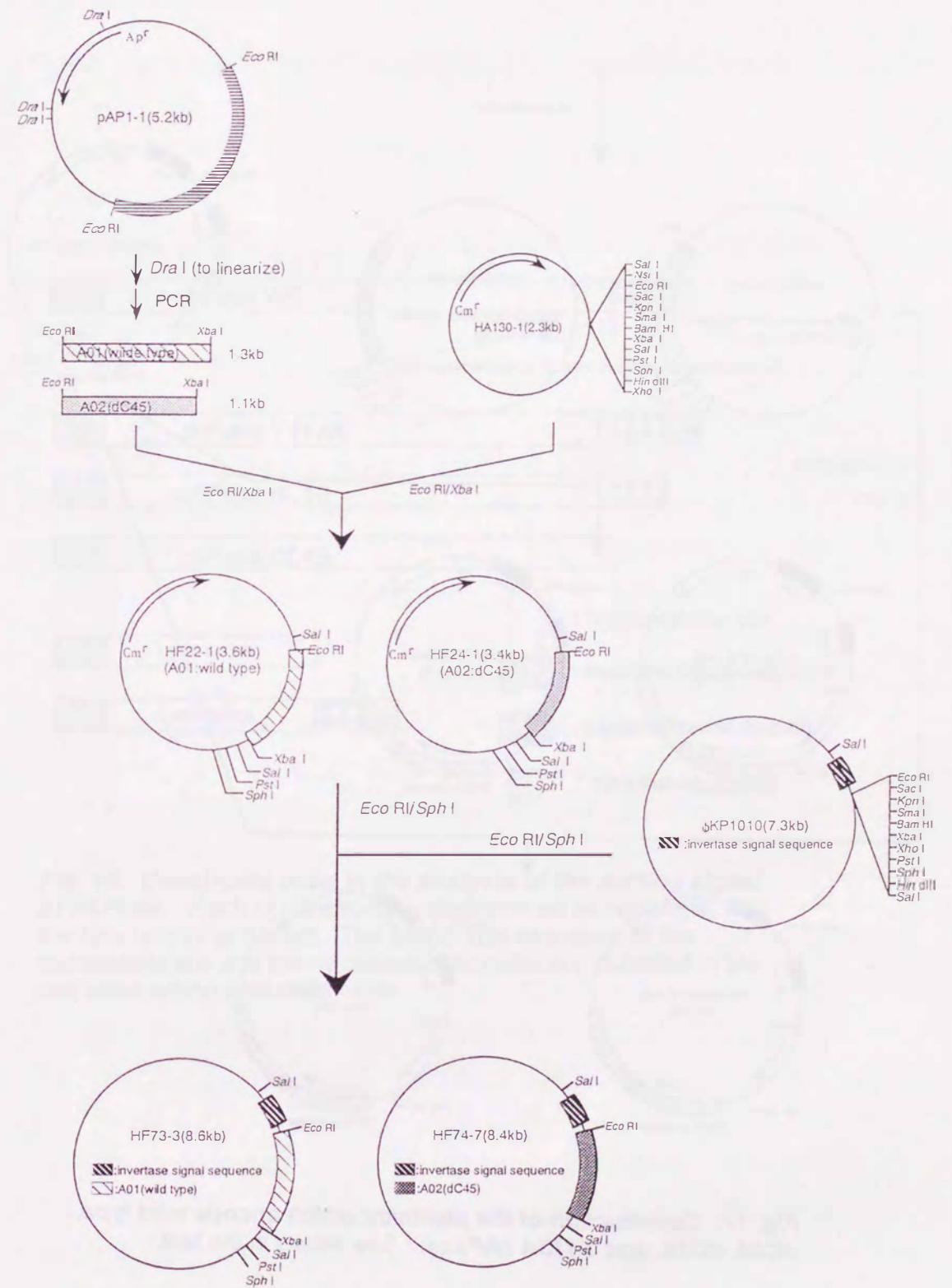


Fig. 16. The structural map of pAM82



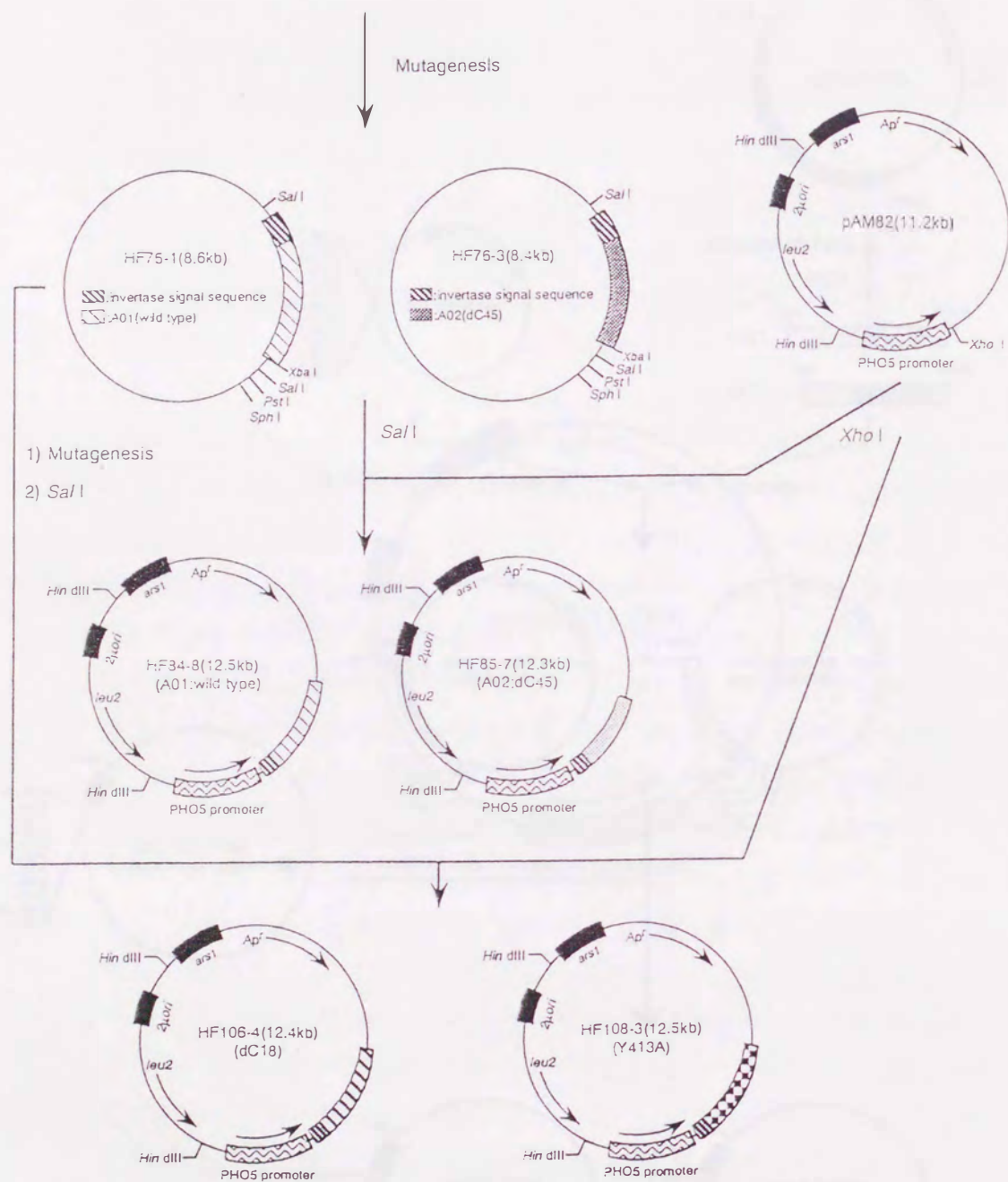


Fig. 17. Construction of the plasmids which encode wild type, dC45, dC18, and Y413A rAPase. See details in the text.

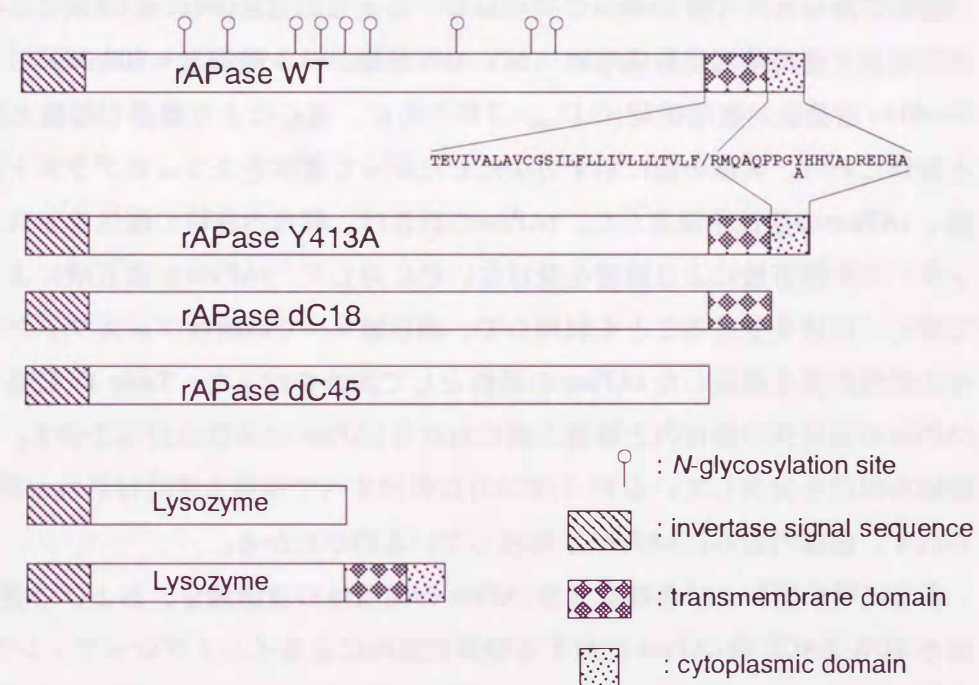


Fig. 18. Constructs used in the analysis of the sorting signal of rAPase. Each of constructs is diagrammed as rectangle, with the NH₂ termini at the left. The amino acid sequence of the transmembrane and the cytoplasmic domains are indicated in the one letter amino acid code.

2-2 rAPaseの酵母細胞における発現およびその細胞内分布

2-2-1 rAPaseの酵母細胞における発現

前項で得られた各種 rAPase の発現体を、井上らの方法(64)に従いロイシン選択組換え酵母培養用合成培地 (MY-AHT培地、リン酸濃度=300 μ M) で 38~40 hr 培養後対数増殖期 (O.D.₆₀₀ = 2.0~3.0) に、遠心により集菌し培養上清と菌体にわけ、実験の部に示す方法にしたがって菌体をスフェロプラスト化後、rAPase の活性を測定した。rAPase の活性は、酵母内在性の酸性フォスファターゼが酒石酸により阻害を受けないのに対して、rAPase が酒石酸によって著しく阻害を受けることを利用して、酒石酸 +/- での酸性フォスファターゼの活性の差を発現した rAPase の活性として測定を行った。Table IV に各種 rAPase の発現体の菌体内と培養上清における rAPase の活性の分布を示す。膜結合部位を欠失している FJ-2 (Δ C45) 以外はすべて培養上清には活性が見られず、菌体内のみに rAPase が存在しているのがわかる。

さらに野生型および各種変異型 rAPase の発現体の液胞画分、および培養上清を SDS-PAGE 後 rAPase に対する特異的抗体によるイムノブロッティングを行った。その結果、FJ-1 (wild type) と FJ-4 (Y413A) は 58 kDa、FJ-3 (Δ C18) は 56 kDa のバンドが液胞画分のみに検出された。また FJ-2 (Δ C45) に関しては、液胞・培養上清の両方に 53 kDa と 53~60 kDa のバンドが検出された (Fig. 20)。この結果は活性測定による rAPase の分布の結果と一致している。しかしラット肝リソゾームに存在する rAPase の分子量は、膜結合型が 67 kDa、可溶性型が 64 kDa でいずれも酵母細胞で発現させた rAPase と分子量が異なっていた。これは酵母細胞とラット肝細胞とでは rAPase の糖鎖のプロセッシングが違うためであると考えられる。

Peters ら(65)が動物細胞の系において行ったヒト酸性フォスファターゼ cDNA の発現でも、C 末端から 44 残基を欠失させるとヒト酸性フォスファターゼが細胞外へ分泌されるという同様の結果が報告されている。すなわちヒト酸性フォスファターゼはその内腔ドメインに活性部位を持つが、細胞内への retention およびリソゾームへの局在化シグナルは内腔ドメインには無く、

C 末端から 44 残基の膜結合ドメインから細胞質ドメインにかけての部分に存在していると考えられる。

今回筆者が行った rAPase の酵母細胞における発現においても Peters らの結果と同様、rAPase は内腔ドメインに活性部位を持つが、細胞内への retention および液胞への局在化シグナルは内腔ドメインには無く、C 末端から 45 残基の膜結合ドメインから細胞質ドメインにかけての部分に存在していることが示唆された。

2-2-2 酵母細胞の液胞 (vacuole) の分画

つぎに細胞内部での rAPase の局在部位を明らかにするために、細胞分画による検討を行った。rAPase は動物細胞においてはリソゾームに局在しており、リソゾームの標識酵素として用いられている。したがって酵母細胞において発現させた場合、酵母のリソゾーム様オルガネラである液胞 (vacuole) に局在化していることが予想される。そこでまず酵母の液胞の分画を実験の部に示すように、Emr らの方法 (66) を基にしたフィコールの不連続密度勾配法により行い、各種 rAPase の液胞への局在化の度合いを比較検討することにした (Fig. 20)。Table V に示すようにこの分画法により得られた液胞画分は、液胞の標識酵素である α -マンノシダーゼやカルボキシペプチダーゼ Y の比活性がホモジネートに対して約 46 倍に上昇している。また小胞体やゴルジ体の標識酵素である チトクローム C 還元酵素や GDP アーゼの比活性は 4.1~5.5 倍程度しか上がっておらず、これらのオルガネラの混入は比較的少ないと考えられる。

2-2-3 各種 rAPase の酵母細胞における液胞への局在

前項の分画方法を用いて各種 rAPase の発現体について細胞分画を行い、ホモジネートと液胞画分の rAPase の酵素活性を測定した結果を Table VI に示す。FJ-1 (wild type) については液胞画分の rAPase の比活性がホモジネートに対して約 66 倍に上昇しており、野生型 rAPase が酵母細胞におけるリソゾーム様コンパートメントである液胞に局在化していることが示唆される。一方、FJ-2 (dC45) においては膜結合領域を欠失させた可溶性型 rAPase の液胞画分での比活性は 12 倍程度までしか上昇しておらず、一部液胞に局在が見られるもののその局在化の効率は野生型 rAPase に比べ明らかに低かった。Table IV に示されているように、FJ-2 (dC45) では rAPase は 76% 以上が分泌されており、細胞内の変異型 rAPase (dC45) は分泌経路上 (おそらく分泌顆粒内) に存在している可能性が高い。

しかしながらリソゾーム局在化シグナルと考えられている細胞質ドメインを欠失させた FJ-3 (dC18) や、GY-motif 中のチロシンをアラニンに変換させた FJ-4 (Y413A) においても、変異型 rAPase の液胞画分での比活性は 38~46 倍とほぼ液胞の標識酵素と同程度の比活性の上昇を示しており、これらの変異型 rAPase も液胞に局在化していることが判明した。

以上のことからリソゾーム膜蛋白質である rAPase は動物細胞の場合と同様、酵母細胞においてもリソゾーム様コンパートメントである液胞に局在化するが、膜結合ドメインおよび細胞質ドメインを欠失させた可溶性型 rAPase は液胞に局在せず細胞外に分泌されてしまうことが明らかとなった。しかしながら、膜結合型 rAPase はその細胞質ドメインの有無や GY-motif にかかわらず液胞に局在しており、酵母細胞では動物細胞の場合とは異なった局在化機構が考えられる。

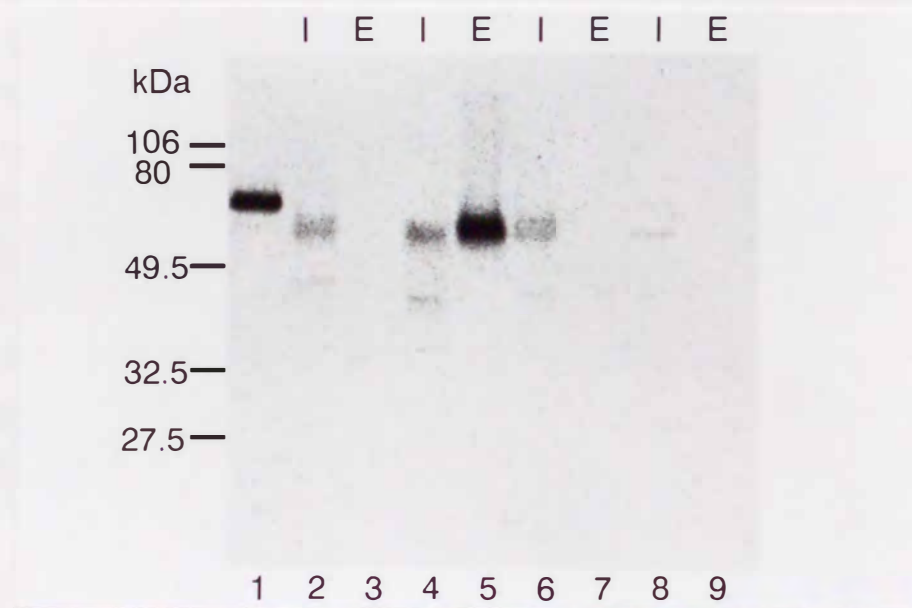


Fig. 19. Immunoblot analysis of rAPase proteins expressed in *S. cerevisiae*. Cultures were separated into two fractions, intracellular (I) and extracellular (E), and each fractions were subjected to SDS/PAGE followed by immunoblot analysis, using specific anti-rAPase-IgG. Lane 1, rat liver lysosomal membrane; Lanes 2 and 3, cells expressed wild type rAPase (FJ-1); Lanes 4 and 5, cells expressed dC45(FJ-2); Lanes 6 and 7, cells expressed dC18(FJ-3); Lanes 8 and 9, cells expressed Y413A(FJ-4).

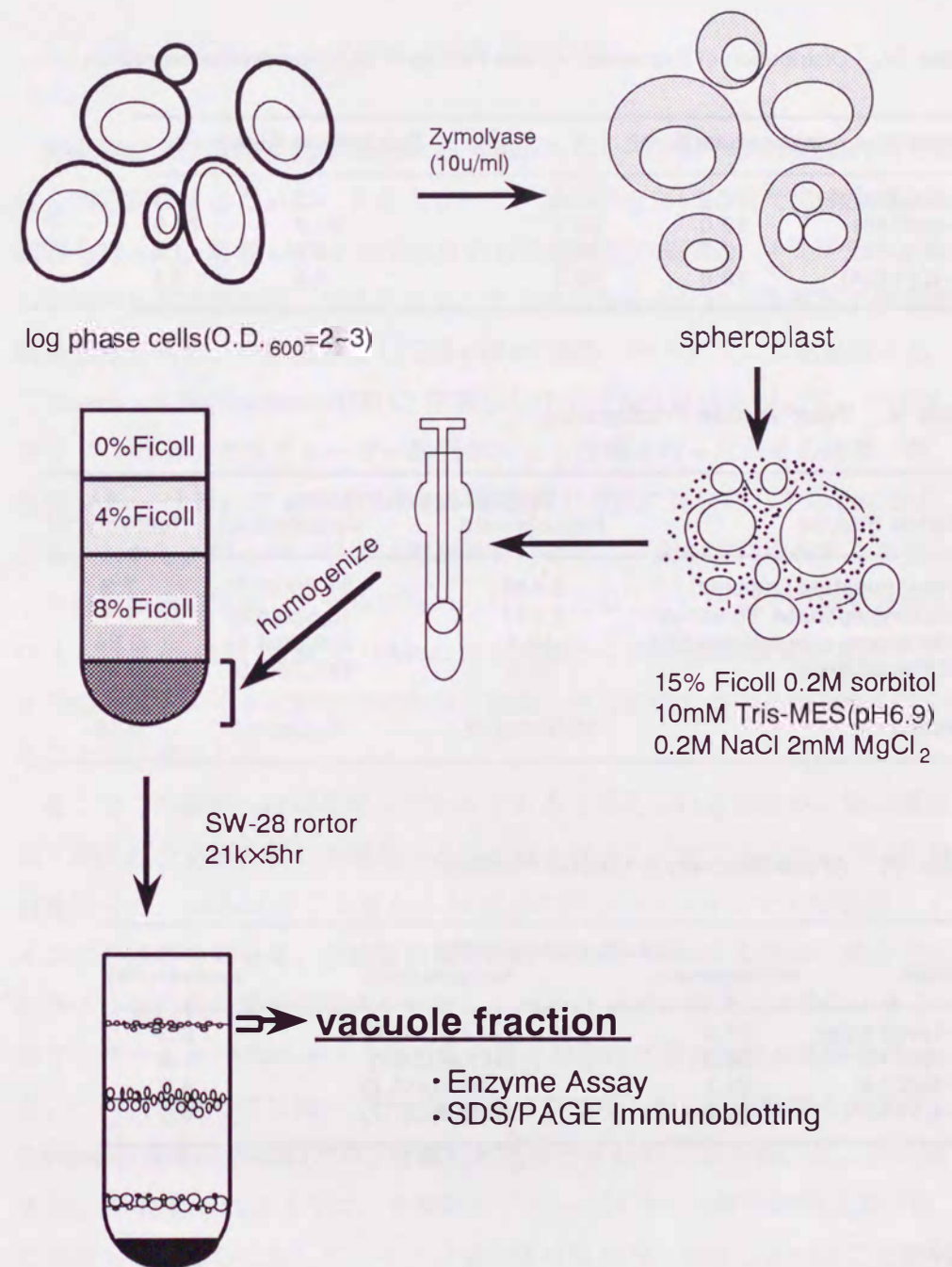


Fig. 20. Scheme of vacuole fractionation. The details of the methods are described in the Materials and Methods.

Table IV. Distribution of Expressed APase Activity in *Saccharomyces cerevisiae*.

Strain	Intracellular(U/ml)		Extracellular(U/ml)	
		%		%
FJ-1(wild type)	19.2	99.0	0.2	1.0
FJ-2(dC45)	19.0	23.1	63.3	76.9
FJ-3(dC18)	12.9	98.5	0.2	1.5
FJ-4(Y413A)	18.8	96.9	0.6	3.1

Table V. Yeast Vacuole Fractionation.

Marker Enzyme	Specific Activity(mU/mg)		Recovery(%)
	Homogenate	Vacuole(fold)	
α -mannosidase(vacuole)	0.446	21.2(x46.1)	7.3
carboxypeptidase Y(vacuole)	0.299	13.5(x45.0)	7.1
cytochrome <i>c</i> reductase(ER)	49.4	200.0(x4.1)	0.64
GDPase(Golgi)	35.2	191.7(x5.5)	0.87
protein	10.53mg/ml	45.5 μ g/ml	0.16

Table VI. APase Recovery in Vacuole Fraction.

Strain	Specific Activity(U/mg)		recovery(%)
	Homogenate	Vacuole(fold)	
FJ-1(wild type)	37.3	2443.6(x65.6)	8.3
FJ-2(dC45)	36.2	441.4(x12.2)	1.9
FJ-3(dC18)	24.1	1100.5(x45.7)	5.9
FJ-4(Y413A)	33.8	1272.8(x37.7)	6.1

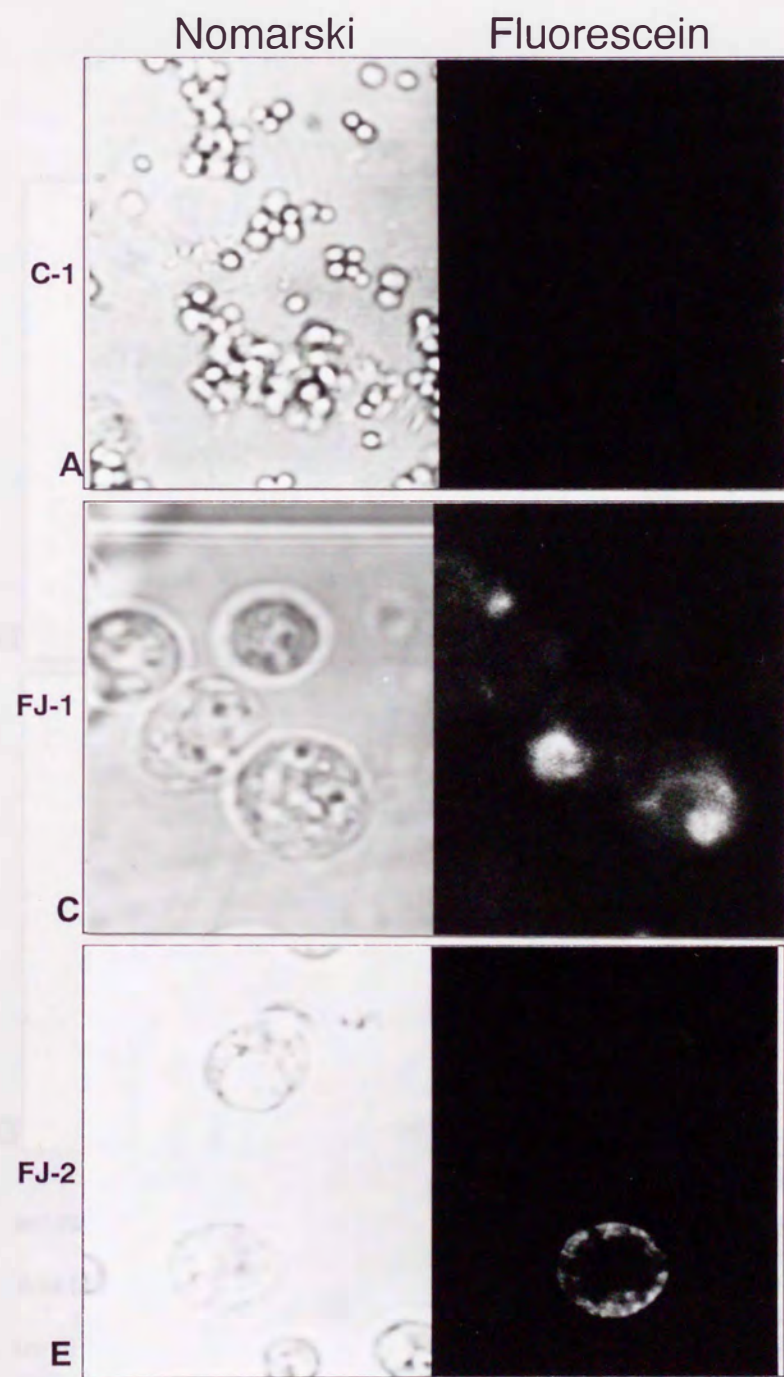
2-3 蛍光抗体法による rAPase の局在部位の検討

野生型および各種変異型 rAPase の発現体において、rAPase の細胞内局在部位を明らかにするために、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光抗体法による観察を行った。各種 rAPase の発現体の対数増殖期の細胞を、4%パラホルムアルデヒドで固定化、ザイモリエースで細胞壁を消化後 2% SDS で細胞の膜透過性を高め、一次抗体として抗 rAPase 抗体 (ヤギ) を、二次抗体として fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識した抗ヤギ IgG 抗体を用いて、バイオラッド-アルガス共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。その結果、野生型 rAPase は Fig. 21 に示すように、細胞内の液胞に局在化しているのがわかる。しかし、FJ-2(dC45) では細胞表層付近および細胞内に点在するおそらく分泌顆粒内に蛍光シグナルが認められた。このことは前項での細胞分画法による結果と一致しており、rAPase の C 末端から 45 残基の膜結合ドメインから細胞質ドメインにかけての部分に液胞への局在化シグナルが存在していることが示唆される。

そこでこの液胞への局在化シグナルであると考えられる部分が、他の蛋白質 (例えば分泌蛋白質) を液胞へと局在化させることができるかについて検討を行った。rAPase の C 末端から 45 残基の膜結合ドメインから細胞質ドメインにかけての部分を、分泌蛋白質であるリゾチームの C 末端部に結合させたキメラ蛋白質の酵母発現体を作製し、rAPase 同様に蛍光抗体法によるこのリゾチームと rAPase キメラ蛋白質の酵母細胞内の局在部位の観察を行った。一次抗体としては抗リゾチーム抗体 (ウサギ) を、二次抗体としては fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識した抗ウサギ IgG 抗体を用いた。その結果 Fig. 22 に見られるように、正常型リゾチームはやはり酵母細胞表層付近に存在しているのに対して、キメラ蛋白質は液胞内に局在していることが判明した。すなわち rAPase の C 末端から 45 残基には分泌蛋白質を液胞へと局在化させる機能があることが示唆された。

しかしながら動物細胞においてリソゾームへの局在化シグナルであると考えられている細胞質ドメインを欠失させた FJ-3 (dC18) や、GY-motif 中のチ

ロシン残基をアラニン残基に変換した FJ-4 (Y413A) については FJ-1(wild type) 同様の蛍光染色パターンが確認され(Fig. 23)、これらの変異型 rAPase もやはり液胞に局在化しているのが明らかになった。以上の結果は細胞分画法による結果と一致しており、やはり酵母細胞においては膜結合型 rAPase はその細胞質ドメインの有無や GY-motif にかかわらず液胞に局在しており、動物細胞の場合とは異なった局在化シグナルと局在化機構の存在が考えられる。



B Fig. 21. Indirect immunofluorescence detection of rAPase in Yeast. AH22 cells harboring the vector with no insert (C-1) or plasmid expressing wild type (FJ-1) or dC45 (FJ-2) were fixed, converted to spheroplasts, and stained with rAPase antibody as described in the Materials and Methods. The cells were viewed by Nomarski optics (A, C, and E) and by epifluorescence using a filter set specific for fluorescein fluorescence (B, D, and F).

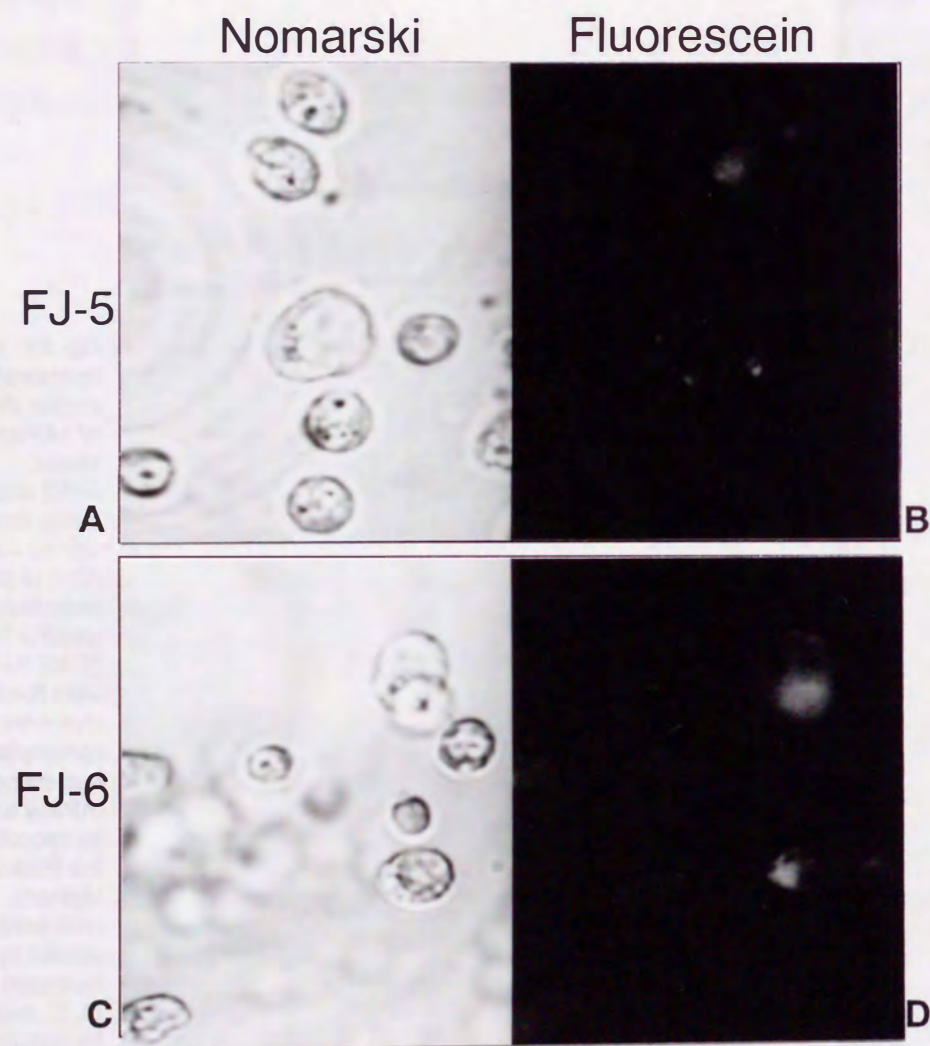


Fig. 22. Indirect immunofluorescence detection of Lysozyme and Lysozyme/rAPase chimera protein in Yeast.

AH22 cells containing plasmids encoding hen Lysozyme(FJ-5) and hen Lysozyme/rAPase chimera(FJ-6) were fixed, converted to spheroplasts, and stained with rAPase antibody as described in the Materials and Methods. The cells were viewed by Nomarski optics (A and C) and by epifluorescence using a filter set specific for fluorescein fluorescence(B and D).

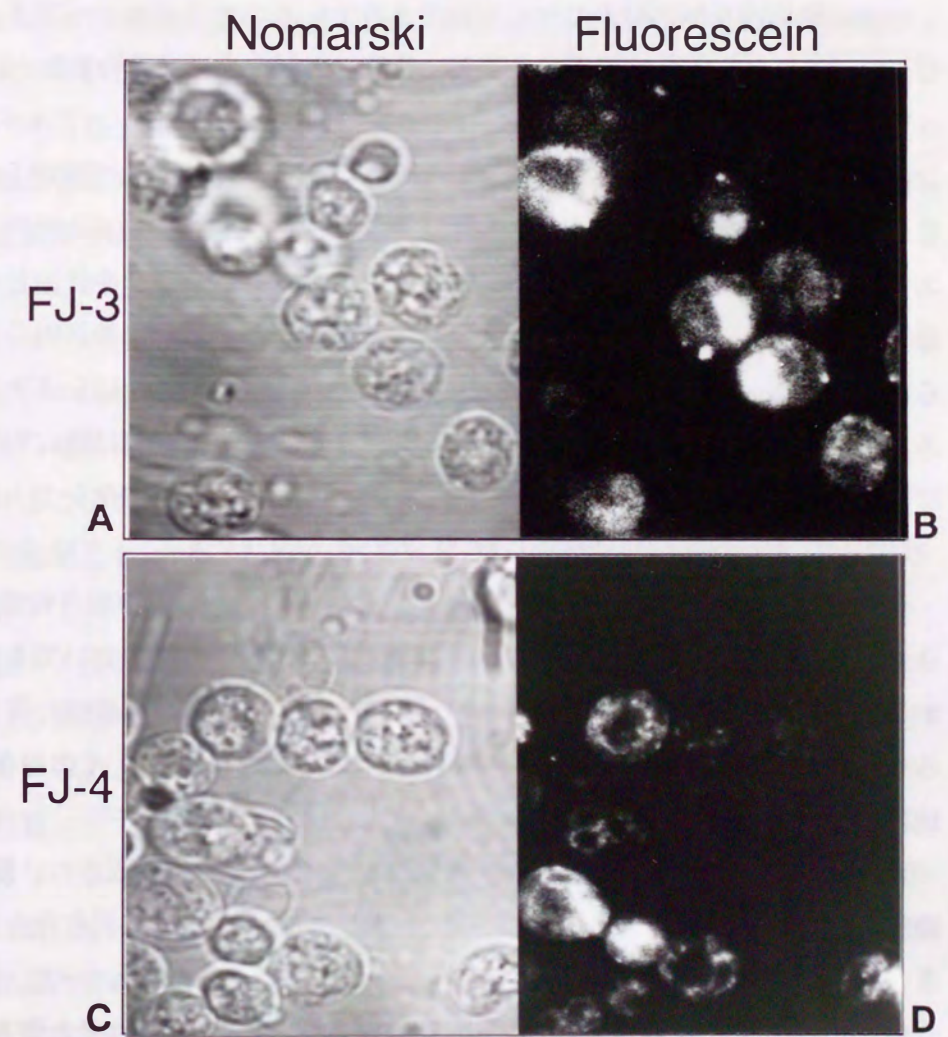


Fig. 23. Indirect immunofluorescence detection of truncated rAPase and mutated rAPase in Yeast.

AH22 cells containing plasmids encoding dC18 (FJ-3) and Y413A (FJ-4) were fixed, converted to spheroplasts, and stained with rAPase antibody as described in the Materials and Methods. The cells were viewed by Nomarski optics (A and C) and by epifluorescence using a filter set specific for fluorescein fluorescence (B and D).

2-4 考察

酵母細胞の液胞への蛋白質の局在化シグナルに関する研究は、これまでいくつかの酵母内在性の酵素に関して報告されている。カルボキシペプチダーゼ Y は可溶性の加水分解酵素であるが、液胞への局在化には動物細胞とは違って糖鎖部分を必要とせず、そのプロ配列部分にあるグルタミン-アルギニン-プロリン-ロイシン (QRPL) という配列が局在化シグナルとして機能していることが知られている (67)。また液胞膜結合型蛋白質であるアルカリ性フォスファターゼの場合は、その膜結合領域および細胞質ドメインを付加した酵母分泌蛋白質 (インベルターゼ) が液胞に局在化するようになる (68) ことから、動物細胞の場合と同様に膜結合領域および細胞質ドメインにシグナルがあることが示唆されている。しかし両者のこのシグナル部分には特に相同性は認められない。このように酵母細胞の液胞への蛋白質の局在化シグナルについてはいまだ明確な知見が得られていないのが現状である。

そこで今回筆者は、1) 酵母細胞における液胞への膜蛋白質の局在化機構、2) 動物細胞におけるリソゾームへの局在化シグナルが酵母においても機能するか、という 2 点を明らかにするためにラット肝リソゾーム膜蛋白質である rAPase の野生型および変異型蛋白質を酵母細胞で発現させ、その局在部位について細胞分画法や免疫蛍光法を用いて検討を行った。

野生型 rAPase は酵母細胞において 58 kDa の蛋白質として合成され、酵母細胞におけるリソゾーム様オルガネラと考えられている液胞に局在化していることが、細胞分画法および免疫蛍光法により明らかになった。一方、膜結合領域から細胞質ドメインにかけての C 末端側 45 残基を欠失させた変異型 rAPase (dC45) は、その大部分が細胞外に分泌されており、細胞内でも液胞とは異なるコンパートメント (細胞表層に点在するおそらく分泌顆粒内) に存在していることが明かとなった。したがって、rAPase の液胞への局在化シグナルはその内腔ドメインには存在しておらず、動物細胞における場合と同様に C 末端側 45 残基内に存在していることが示唆された。さらに分泌蛋白質であるリゾチームに、この C 末端側 45 残基を結合させたキメラ蛋白質を発現させたところ液胞への局在が認められ、やはりこの部分に蛋白質を液胞

に局在化させる機能があることが判明した。しかし動物細胞においてリソゾームへの局在化シグナルであると考えられている細胞質ドメインを欠失させた変異型 rAPase (dC18) や、GY-motif のチロシン残基をアラニンに変えた変異型 rAPase (Y413A) も酵母細胞においては、野生型 rAPase と同様に液胞に局在化していることが明かとなった (Fig. 24)。以上の結果より、酵母細胞の液胞への局在化機構は動物細胞とは異なり、細胞質ドメインや GY-motif などに依存しない機構で局在化しているものと考えられる。しかしながらこれらの変異型 rAPase の液胞までの移行経路がゴルジ装置以後、直接液胞に向かっているのかあるいは一旦形質膜を經由して液胞に向かっているのかについてはまだ明らかにしておらず (Fig. 25)、今後詳細な検討が必要である。

最近 Stevens (69) らは、酵母の液胞膜蛋白質であるジペプチジルアミノペプチダーゼ B (DPAP B) が、その細胞質ドメインの有無に関係なく液胞へ局在化することを報告しており、この結果は今回筆者が rAPase を用いて行った実験結果とも一致している。彼らはさらに、ゴルジ膜蛋白質であるジペプチジルアミノペプチダーゼ A (DPAP A) が、そのゴルジ残留シグナルである細胞質ドメインを欠失させると液胞へ局在化してしまうことから、酵母細胞における液胞への膜蛋白質の輸送経路は、default な経路であるという見解を示している。また Cooper (70) らも酵母のゴルジ膜蛋白質である Kex 1p のゴルジ残留シグナルである細胞質ドメインを欠失させると、この蛋白質は液胞へミスソーティングされてしまうことを明らかにしている。このように酵母細胞においては、特定のオルガネラへ向かうためのシグナルを持たない非標識の膜蛋白質が液胞に輸送されてしまうという液胞 = default compartment、という説が提唱されてきている。これは動物細胞における default な経路が形質膜であるとする考えと著しく異なる点である (71)。

このように今回の筆者の結果も含めて最近、酵母細胞の液胞と動物細胞のリソゾームではそれぞれ独自の蛋白質の選別・輸送機構が存在していることが示唆されてきている。緒言でも述べたように、酵母は遺伝学的手法が可能なため小胞体やミトコンドリアでの蛋白質の膜透過装置や小胞体・ゴルジ装置間の蛋白質の選別・輸送に必要な遺伝子産物の解明にこれまで大きな成果を上げてきた。また最近、液胞への蛋白質輸送の変異株を用いた研究も進ん

しており、いくつかの液胞への局在化に必要なコンポーネントが同定されてきている。しかしこれら酵母細胞での液胞への蛋白質輸送装置が、動物細胞にも同様に存在・機能しているかについては、両者の蛋白質の選別・輸送機構が異なることを考慮に入れた上で注意深く解析しなければならない。

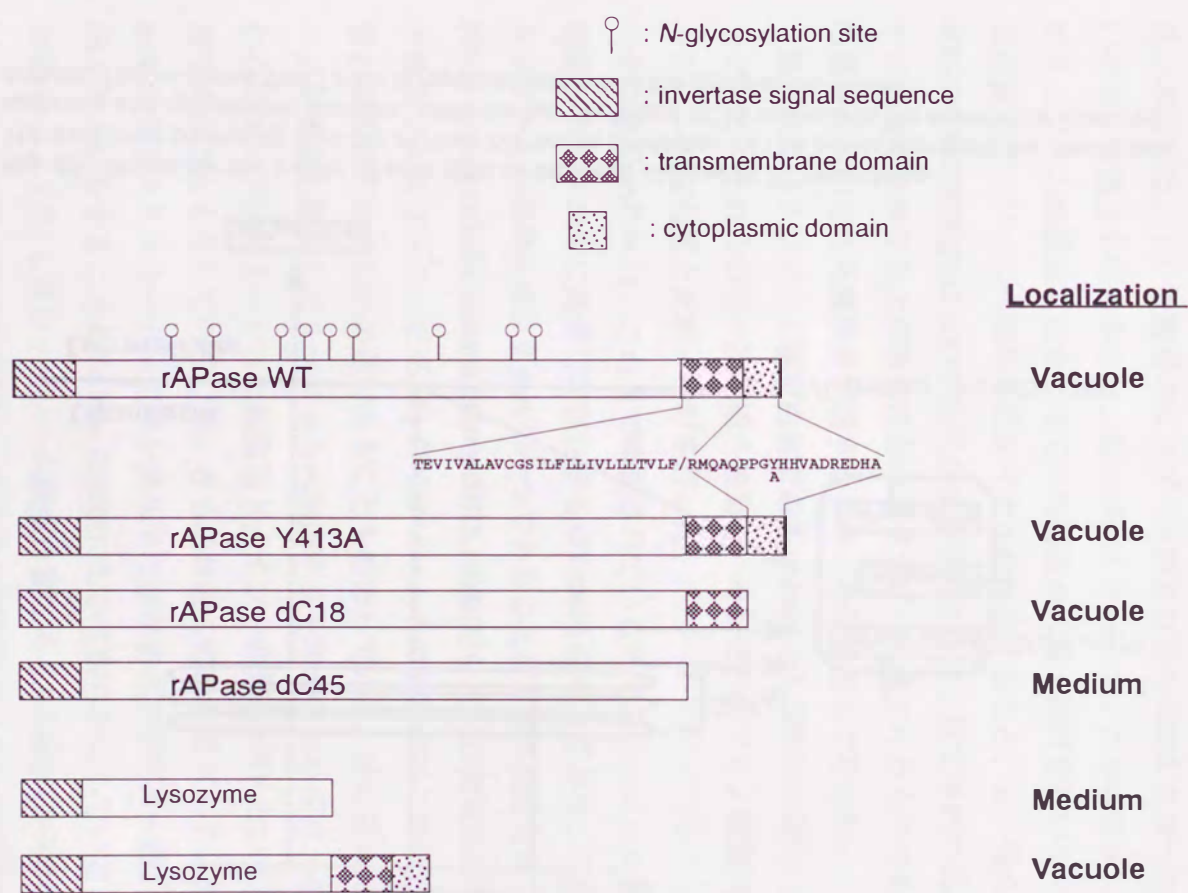


Fig. 24. Localization of wild type or mutated rAPase expressed in *S. cerevisiae*.

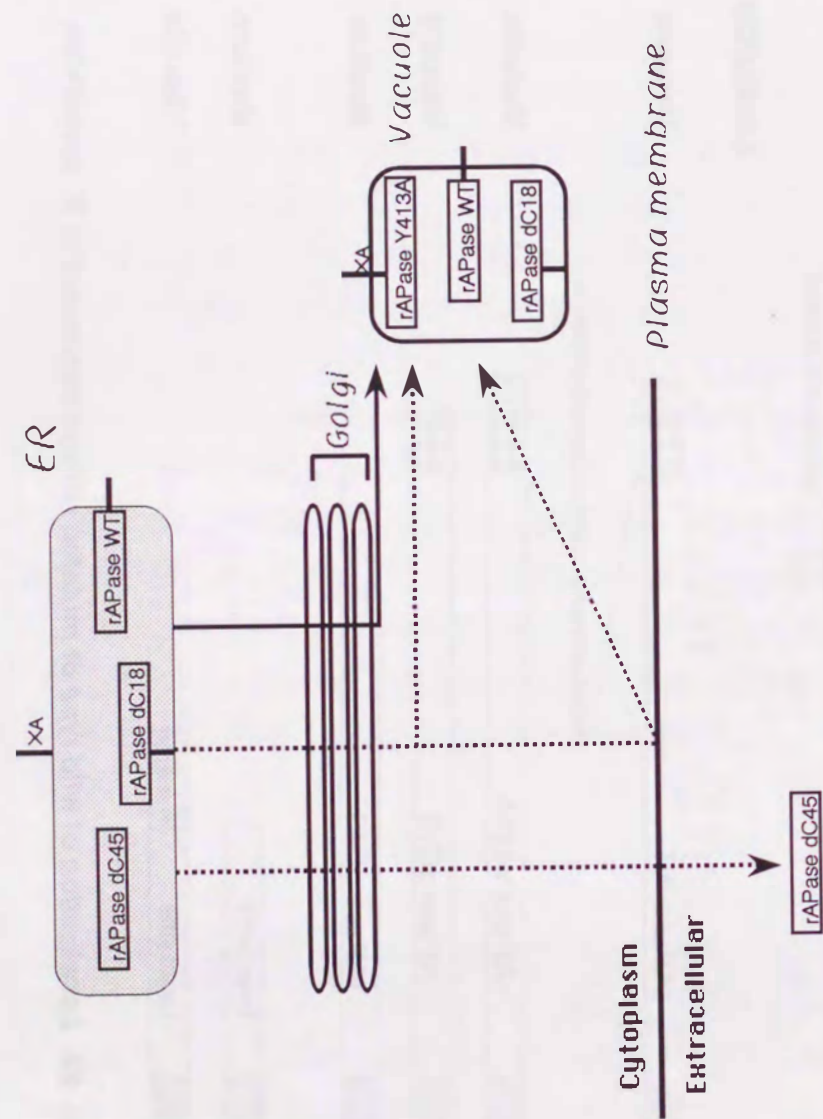


Fig. 25. Model for the traffic of wild type or mutated rAPase in *S. cerevisiae*. The thick bars protruding from the rAPase WT boxes or rAPase Y413A boxes represent the membrane spanning and cytoplasmic domains, while the bar of rAPase dC18 represents the membrane spanning domain. The xA shows that Tyr⁴¹³ is replaced with Ala in the cytoplasmic domain.

リソゾームの形成機構を考える上で、リソゾームの主要構成成分であるリソゾーム膜蛋白質の局在化機構を解明することは、非常に重要なテーマである。本研究は、1) 数種類のリソゾーム膜蛋白質の cDNA クローニングを行いその一次構造を明らかにし、既に cDNA クローニングが報告されている他のリソゾーム膜蛋白質と合わせて一次構造の比較・検討を行いリソゾーム膜蛋白質のリソゾームへの局在化シグナルを推定すること、2) 得られた cDNA を酵母細胞内において発現させることにより、推定された局在化シグナルの機能の検証および酵母におけるリソゾーム様オルガネラである液胞への膜蛋白質の局在化機構を解明すること、を目的として行った。

第一章ではリソゾーム膜蛋白質である rAPase と LGP85 の cDNA クローニングを行いそれらの全一次構造を推定し、それぞれのアミノ酸配列を他のリソゾーム膜蛋白質と比較・検討を行った。

その結果 rAPase は、これまで報告されている全てのリソゾーム膜蛋白質の細胞質ドメイン中に共通して存在する GY-motif を有しており、この motif がリソゾームへの局在化シグナルの一つであることを予測させるものであった。Peters ら (65) は baby hamster kidney (BHK) の細胞を用いた発現系においてヒト酸性フォスファターゼ (LAP) のリソゾームへの局在化にこの GY-motif を含む細胞質ドメインが必要であることを報告している。特に彼らは LAP は一旦形質膜を經由してリソゾームへ到達すると考えており (72)、その形質膜からのエンドサイトーシスに細胞質ドメイン中の PGYRHV という配列が重要であることも示している (73)。さらに最近この細胞質ドメインが、形質膜由来のクラスリンコートドベシクル中に存在するアダプター蛋白質 (HA-2) と結合することも *In Vitro* の実験において明らかにしている (74)。また Fukuda ら (75) も同じリソゾーム膜蛋白質である h-Lamp1 が LAP 同様、リソゾームへの局在化にこの GY-motif を含む細胞質ドメインが必要であることを、COS 細胞を用いた発現系において明らかにしている。このようにこれまで報告されているリソゾーム膜蛋白質のリソゾームへの局在化シグナルは、細胞質ドメイン中に存在している GY-motif であることが強く示唆され

ている。また最近われわれの研究室においても、野口ら(76)によりラットLGP107がその細胞質ドメインをシグナルとしてリソゾームへ局在していることが、COS細胞における発現系をもちいた実験により明らかにされている。

しかしながらLGP85については、ヒト・ラットの二つの種において細胞質ドメイン中にこのGY-motifを有していないことを今回の研究で明らかにしており、リソゾームへの局在化シグナルは少なくとも二種類以上存在することが明かとなった。Vegaら(46)はCOS細胞を用いた発現系においてrLGP85も他のリソゾーム膜蛋白質同様、細胞質ドメイン中に局在化シグナルが存在することを示しているが、具体的にどの配列が重要であるかはまだ明らかにしていない。Letourneurら(77)はT細胞の細胞表面抗原受容体(T cell antigen receptor: TCR)のサブユニットのひとつであるTCR- γ が、細胞質ドメイン中のロイシン-ロイシンという配列に依存してリソゾームへ局在化することを報告している(Di-Leucine motif)。LGP85の細胞質ドメイン中にはこのDi-Leucine motifに類似するロイシン-イソロイシンという配列が存在している。このDi-Leucine motifが新しいリソゾームへの局在化シグナルであるかどうか、またこのようなリソゾーム膜蛋白質の局在化シグナルを認識・識別し選別している細胞側の装置を明らかにすることは、今後の重要研究課題である。

第二章では酵母細胞における発現系を用いて、rAPaseの細胞質ドメインのリソゾームへの局在化機能の検証および、酵母細胞におけるリソゾーム様オルガネラである液胞への膜蛋白質の局在化機構の解明を行った。

rAPaseは酵母においてもラット肝細胞同様に、液胞(リソゾーム)に局在化することが判明した。しかしその局在化には細胞質ドメインやGY-motifの有無に関係なく、酵母細胞における液胞への膜蛋白質の局在化機構は、動物細胞のリソゾームへの膜蛋白質の局在化機構とは異なることが明かとなった。酵母細胞での液胞への膜蛋白質の局在化にはシグナルは必要なく、液胞は酵母細胞におけるdefault compartmentであることを支持する結果となった。

同様の結果がStevensら(69)により酵母の液胞膜蛋白質であるジペプチジルアミノペプチダーゼB(DPAP B)やゴルジ膜蛋白質であるジペプチジルアミノペプチダーゼA(DPAP A)を用いた実験や、Cooper(70)らによるゴルジ

膜蛋白質であるKex 1pを用いた実験により報告されている。すなわち1)液胞膜蛋白質はその細胞質ドメインの有無や膜結合領域の種類によらずすべて液胞に局在化していること、2)ゴルジ膜蛋白質はその局在化シグナルである細胞質ドメインを欠失させると液胞にミスソーティングされてしまうこと、などから液胞=default compartmentという説が提唱されてきている。これは動物細胞におけるdefaultな経路が形質膜であるのと著しく異なる点である(71)。

植物細胞において液胞は単に物質分解の場としてだけではなく、水分・栄養分の貯蔵やその固体の成長に伴う体積維持のために必要な空間としての役割を果たしており、動物細胞におけるリソゾームとはその機能・目的などが異なるオルガネラである。菌類である酵母細胞の液胞は、動物細胞のリソゾームよりも植物細胞の液胞に近い機能を果たすオルガネラであるために、その蛋白質の局在化機構が異なっているのかもしれない。あるいは動物細胞にも存在しているが、まだ見つかっていない選別・輸送機構で液胞を形成しているのかも知れない。

現在、酵母細胞における液胞への蛋白質の選別・輸送に関する研究は、液胞への蛋白質輸送の温度感受性変異株を用いた実験を中心に進められている。今後これら酵母細胞において解明されてきた選別・輸送装置が動物細胞においても存在・機能しているかどうかを検討することにより、詳細なリソゾームへの蛋白質輸送機構の解明につながるかもしれない。

本研究は、九州大学薬学部姫野勝教授の御指導のもとに行われたものであり、先生の御懇篤な御指導と御助言に厚く感謝致します。また本研究の遂行にあたり終始貴重な御助言を賜りました加藤敬太郎九州大学名誉教授に深く感謝致します。本論文の作製にあたって御指導・御校閲頂きました九州大学薬学部小栗一太教授、三木健良助教授ならびに西村行生助教授に深甚の感謝の意を表します。

本研究に深い御理解を頂き、多くの御助言・御鞭撻を賜りました九州がんセンター臨床研究部化学療法研究室、河野彬室長に厚く御礼申し上げます。また本研究の遂行にあたり多大な御指導・御助言を頂きました九州大学薬学部、田中嘉孝助手ならびに石川豊子助手に深く感謝致します。

cDNA クローニングにあたり直接指導して下さった野口陽一郎博士（現；熊本大学医学部助手）、ならびに酵母細胞での cDNA 発現に御協力頂きました九州大学薬学部、橋本良夫助手に厚く御礼申し上げます。ラット肝 cDNA ライブラリーを供与して頂きました三住佳生助教授（福岡大学医学部）ならびにヒト膀胱癌細胞 cDNA ライブラリーを供与して頂きました高田豊博士（九州がんセンター臨床研究部化学療法研究室）に謹んで感謝致します。また抗リゾチーム抗体を分与して頂きました九州大学薬学部、井本泰治教授、伊東祐二助手、金丸周司君に心から御礼申し上げます。さらに本研究の遂行にあたり、多大な御協力を頂きました九州がんセンター臨床研究部化学療法研究室、九州大学薬学部微生物薬品化学教室の皆様にも深く感謝致します。

また日頃から暖かい励ましや御心遣いを頂き、終始御協力頂いた九州大学薬学部生理化学教室の皆様にも、深く感謝するとともに厚く御礼申し上げます。

最後に研究への道を励ましてくれた両親に深い感謝の意を表します。

I. 試薬および実験材料

(1) 菌株

strain	genotype	reference
<i>E. coli</i>		
Y1088	Δ <i>lacU169, supE, supF, hsdR⁻, hsdM⁺, metB, trpR, tonA21, proC::Tn 5(pMC9)</i>	78
Y1090	Δ <i>lacU169, proA⁺, \Delta lon, araD139, strA, supF, [trpC22::Tn10], pMC9</i>	78
LE392	<i>F', hsdR514(r_k, m_k), supE44, supF58, \Delta lacY1 or (lacIZY)6, galK2, galT22, metB1, trpR55, \lambda</i>	79
JM83	<i>ara, \Delta (lac-proAB), rpsL (=strA), \phi 80', lacZ\Delta M15</i>	80
JM103	Δ (<i>lac-pro</i>), <i>thi, strA, supE, endA, sbcB, hsdR⁻, F', traD36, proA⁺, proB⁺, lacI^q, lacZ\Delta M15</i>	81
JM110	<i>dam, dcm, supE44, hsdR17, thi, leu, rpsL, lacY, galK, galT, ara, tonA, thr, tsx, (lac-proAB)/F'[traD36, proAB⁺, lacI^q, lacZ\Delta M15]</i>	81
BW313	<i>HfrKL16PO/45[lys(61-62)], dut1, ung1, thi1, relA1</i>	82
RR1	<i>supE44, hsdS20(r-B, m-B), ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xy1-5, mt1-1</i>	79
Yeast		
AH22	<i>a leu 2, his 4, can 1, cir⁺</i>	63

(2) ベクター

Plasmid	Characteristics & comments	
λ gt11	λ <i>lac5, srl \lambda 3⁺, cl857, srl \lambda 4⁺, nin5, srl \lambda 5⁺, Sam100</i>	83
pUC118	Ap ^r cloning vector	84
M13mp18	cloning vector	81
M13mp19	cloning vector	81
ϕ KP1010	Hashimoto, Y., unpublished results; construction of this plasmid will be described elsewhere.	
pAM82	expression vector(yeast), PHO5 promoter, Leu 2, 2 μ ori, ars1, Ap ^r , Xho I(cloning site)	56

(3) 試薬

Bactotryptone、Bacto Yeast Extract、Bacto Agar、Nitrogen Base w/o amino acids は Difco 社から購入した。

濾過滅菌用フィルター(MILLEX-HV 0.45 μ m)はミリポア社から購入した。

大腸菌組換え体選択培地に加えたアンピシリン、IPTG、X-gal、は和光純薬工業(株)より購入した。

ホルムアルデヒド(37% solution ;Formalin)、RNase A、DNase I、GDP、チトクロームc、はSigma 社から、制限酵素は宝酒造(株)、日本ジーン(株)、東洋紡績(株)より、T4 DNA polymerase、T4 DNA ligase、T4 DNA kinase、は東洋紡績(株)からそれぞれ購入した。

[¹²⁵I]-プロテインA、[α -³²P]-dCTP は Amersham社 から購入した。

ニトロセルロース膜はS&S 社から、FITC-labeled anti-goat IgG Fab' fragment (rabbit)はCappel 社より、エンドグリコシダーゼH、サイモリエース100T、は生化学工業から購入した。

Bz-Tyr-pNA はペプチド研究社、4-Methylumbelliferyl- α -D-Mannopyranoside は NBS BIOLOGICALS、 β -NADPHはオリエンタル酵母工業(株)から各々購入した。

パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、ソルビトール、トリプトファン、ヒスチジンは半井化学薬品より購入した。

他の試薬はすべて特級を使用した。

(4) 培地

大腸菌培養用培地

L-broth: 1.0%(w/v) Bactotryptone
0.5%(w/v) Yeast Extract
1.0%(w/v) NaCl
NaOH により pH7.0 に調製

H-medium 1.0%(w/v) polypeptone
0.8%(w/v) NaCl
NaOH により pH7.0 に調製

2 \times YT medium 1.6%(w/v) polypeptone
1.0%(w/v) Yeast Extract
0.5%(w/v) NaCl
NaOH により pH7.0 に調製

酵母培養用培地

YPD medium 2.0%(w/v) polypeptone
(酵母完全培地) 1.0%(w/v) Yeast Extract
2.0%(w/v) glucose
NaOH により pH5.0 に調製

10 \times NB medium 6.7% Nitrogen Base
(組換え体選択培地) 20% glucose
200mg/ml Histidine
フィルター濾過(0.45 μ m)で滅菌

MY-AHT/P-, Suc+ 井上らの方法(64)に従い調製した。
(低リン酸発現用培地) 但しリン酸濃度は300 μ Mとした。

II. 実験方法

(1) 抗体を用いた λ gt11 cDNAライブラリーのスクリーニング
大田らの方法(85)を若干変更し、抗rAPase抗体を用いてスクリーニングを行った。

(2) 合成オリゴヌクレオチドをプローブとして行った λ gt11 cDNAライブラリーのスクリーニング
宝酒造(株)のMEGALABELTMkitを用いて合成オリゴヌクレオチドの5'末端を[γ -³²P]-dCTPで標識したものをプローブとして、Maniatisらの方法(79)に従って行った。

(3) cDNA プローブを用いて行った λ gt11 cDNAライブラリーのスクリーニング
Amersham社のMultiprime DNA labeling systemを用いて[α -³²P]-dCTPで標識したものをプローブとして、Maniatisらの方法(79)に従って行った。

(4) DNAの調製

大腸菌プラスミドDNAはManiatisらのAlkaline lysis法(79)を用いて行った。酵母形質転換に用いたプラスミドDNAは、三木らの改良によるKupersztoch-PortonyらのTriton X-100 cleared lysate法(62)によって調製した。ファージDNAの調製はManiatisらの方法(79)に従った。

(5) DNAの塩基配列決定

RI標識($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$)法による塩基配列決定はHattoriらの方法(86)に従ってアルカリ変性したプラスミドDNAをテンプレートとして用いた。塩基配列決定にはUSB社のSEQUENASETMキットを使用し、方法は添付文書に従った。蛍光標識したプライマーを用いた塩基配列決定には、M13mp18,19ベクターにクローニングした一本鎖DNAをテンプレートとして用いた。反応はSeiko Instruments Inc.のDSP-240 CHEMICAL ROBOTで行い、ゲル電気泳動はABI社の373A DNA Sequencerで行った。

(6) In vitro mutagenesis

In vitro mutagenesisはKunkel法(82)に基づいて行った。

(7) 酵母形質転換

酵母形質転換はプロトプラスト法(63)により行った。

(8) 蛋白質の定量および各種酵素活性の測定

蛋白質の定量はBio-Rad Protein Assay kitを用いて測定を行った。測定方法は添付文書に従い、標準物質としてBSAを用いた。

酸性フォスファターゼはp-nitrophenyl phosphateを基質としてShibko and Tappelの方法(87)を用いた。活性1 unitは基質1 nmolが1分間に加水分解される量として表した。ただしrAPaseの活性は10 mM 酒石酸存在下でと非存在下での差を用いた。

α -マンノシダーゼは4-Methylumbelliferyl- α -D-Mannopyranosideを基質とし、Anrakuらの方法(88)に従い測定を行った。

カルボキシペプチダーゼYはBz-Tyr-pNAを基質としてStevensらの方法(89)に従って行った。

NADPH-チトクロームC還元酵素はKubotaらの方法(90)に従って測定を行った。

GDPaseはGDPを基質としてAbeijonらの方法(91)により反応を行い、遊離

してくる無機リンの定量をFiske and SubbaRowの方法(92)で定量した。

(9) SDS ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)

Laemmliらの方法(93)に従って10% スラブゲルで行った。

(10) イムノブロッティング

試薬: スキムミルク溶液 [2% skim milk, 20 mM Tris-HCl (pH7.5), 0.15 M NaCl, 0.1% Triton X-100]

washing buffer [20 mM Tris-HCl (pH7.5), 0.6 M NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.2% SDS]

(SDS-PAGE)後、Towbinらの方法(94)に従って、蛋白質をニトロセルロース膜に電氣的に転写した。転写終了後、ニトロセルロース膜をブロックエース(雪印乳業)で約1時間振盪しブロッキングを行った。ブロッキング終了後、抗rAPase抗体で約5時間振盪し(一次反応)、その後washing bufferで洗浄後、 ^{125}I -プロテインAを含むスキムミルク溶液中で約2時間振盪した(二次反応)。二次反応終了後ニトロセルロース膜をwashing bufferで洗浄後、風乾してイメージングプレートでフルオログラフィーを行いBAS2000で解析を行った。

(11) 酵母細胞の細胞分画法

Emrらの方法(66)を若干変更して行った。

試薬: SSB [25mM Tris-HCl (pH7.5), 1.2M sorbitol, 50mM β -Mercapto ethanol]

サイモリエース100T (10mg/ml), 1.2M ソルビトール

15% Ficoll [15% Ficoll, 10mM Tris-MES (pH6.9), 0.1mM MgCl_2 , 0.2M sorbitol]

8% Ficoll [8% Ficoll, 10mM Tris-MES (pH6.9), 0.1mM MgCl_2 , 0.2M sorbitol]

4% Ficoll [4% Ficoll, 10mM Tris-MES (pH6.9), 0.1mM MgCl_2 , 0.2M sorbitol]

0% Ficoll [10mM Tris-MES (pH6.9), 0.1mM MgCl_2 , 0.2M sorbitol]

対数増殖期 ($\text{O.D.}_{600}=2.0\sim 3.0$)の酵母細胞300 mlを遠心で集菌後、0.1 M Na_2CO_3 , 0.1 M β -Mercaptoethanolで懸濁し30°Cで20分間ゆるやかに振盪する。遠心で菌体を集めSSBで懸濁し、サイモリエース100Tを加え (final 100 $\mu\text{g/ml}$)、30°Cで60分間ゆるやかに振盪する。スフェロプラスト化終了後、遠心で菌体を集め1.2M ソルビトールで洗浄後、もう一度遠心で菌体を集め15% Ficollで懸濁する。懸濁液をDounce homogenizerでホモジナイズ後(3~5 strokes)、ホモジネートを遠心チューブに移し、その上に8% Ficoll、4% Ficoll、0% Ficollを静かに層積し不連続密度勾配を作る。日

立SW28 ローターで21K_x 4 時間遠心後4 % Ficoll と0 % Ficoll の境界部分を液胞画分とする。(Fig. 20 参照)

(12) 酵母細胞の蛍光抗体法による観察

Pringleらの方法(95)に従って、FITC-labeled anti-goat Fab'(rabbit)を用いて行った。

試薬: 37%ホルムアルデヒド、4%パラホルムアルデヒド、1.2Mソルビトール、FITC-labeled anti-goat Fab'(rabbit)、5mg/ml BSA in PBS、TEB [0.2M Tris-HCl(pH8.0), 20mM EDTA, 1%β-Mercaptoethanol] SPM [1.2M sorbitol, 50mM potassium phosphate(pH7.3), 1mM MgCl₂] ギモリエース100T(10mg/ml)、1.2Mソルビトール/4% SDS、0.1%ポリリジン、mounting medium [100mg/ml DABCO in 50% glycerol]

1. 固定化: 対数増殖期(O.D.₆₀₀=2.0~3.0)の酵母細胞5mlに37%ホルムアルデヒドを0.6ml加え、30°Cで1時間ゆるやかに振盪する。遠心で菌体を集め4%パラホルムアルデヒド5mlで懸濁し30°Cで16時間ゆるやかに振盪する。
2. スフェロプラスト化: 固定終了後、遠心で菌体を集めTEBで懸濁し30°Cで10分間ゆるやかに振盪する。遠心で菌体を集めSPMで懸濁し、ギモリエース100Tを加え(final 100μg/ml)、30°Cで60分間ゆるやかに振盪する。
3. permeabilize: スフェロプラスト化終了後、遠心で菌体を集め1.2Mソルビトールで洗浄後、もう一度遠心で菌体を集め1.2Mソルビトールで懸濁する。つぎに当量の1.2Mソルビトール/4% SDSを加え、室温で2分間放置する。遠心で菌体を集め1.2Mソルビトールで2回洗浄後、1.2Mソルビトールで懸濁する(fixed cells)。
4. スライドへの吸着および蛍光抗体による観察: スライドガラスを0.1%ポリリジンでコート後、fixed cellsを室温で1時間吸着させる。5mg/ml BSA in PBSで1時間ブロッキング後、抗rAPase goat抗体を用いて室温で6時間放置する。その後5mg/ml BSA in PBSで9回洗浄し、FITC-labeled anti-goat Fab'(rabbit)を用いて室温で3時間放置する。5mg/ml BSA in PBSで9回洗浄し、mounting mediumで細胞を覆った後、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。

REFERENCES

1. Walter, P., Gilmore, R., & Blobel, G. (1984) *Cell* **38**, 5
2. Munro, S., & Pelham, H. R. B. (1987) *Cell* **48**, 899
3. Pelham, H. R. B. (1988) *EMBO J.* **7**, 913
4. Landford, R. E. & Butel, J. S. (1984) *Cell* **37**, 801
5. Kardon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F. & Smith, A. E. (1984) *Nature* **311**, 33
6. Hurt, E. C., Pesold-Hurt, B. & Schatz, G. (1984) *EMBO J.* **3**, 3149
7. Hase, T., Muller, U., Rienzman, H. & Schatz, G. (1984) *EMBO J.* **3**, 3157
8. Gould, S. J., Keller, G., Wilkinson, J. & Subramani, S. (1989) *J. Cell Biol.* **108**, 1657
9. Miyazawa, S., Osumi, T., Hashimoto, T., Ohno, K., Miura, S. & Fujiki, Y. (1989) *Mol. Cell Biol.* **9**, 83
10. Ono, H., & Tuboi, S. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* **280**, 299
11. Murakami, K., & Mori, M. (1990) *EMBO J.* **9**, 3201
12. Ono, H., & Tuboi, S. (1990) *J. Biochem.* **107**, 840
13. Adams, S. A., Lobl, T. A., Mitchell, M. A. & Gerace, L. (1989) *Nature* **337**, 276
14. Imamoto, N., Matsuoka, Y., Semba, T., Okada, Y., Uchida, T., & Yoneda, Y. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 16504
15. Palade, G. E. (1975) *Science* **189**, 347
16. Klausner, R. D. (1989) *Cell* **57**, 703
17. Kurzchalia, T. V., Wiedman, M., Girshovich, A. S., Bochkareva, E. S., Bielka, H., & Rapoport, T. A. (1986) *Nature* **320**, 634
18. Tajima, S., Lauffer, L., Rath, V. L. & Walter, P. (1986) *J. Cell Biol.* **103**, 1167
19. Lewis, M. J. & Pelham, H. R. B. (1990) *Nature* **348**, 162
20. Kornfeld, S. & Mellman, I. (1989) *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 483
21. Baiton, D. F. (1981) *J. Cell Biol.* **91**, 66s
22. Himeno, M., Noguchi, Y., Sasaki, H., Tanaka, Y., Kono, A., Sakaki, Y., & Kato, K. (1989) *FEBS Lett.* **244**, 351
23. Noguchi, Y., Himeno, M., Sasaki, H., Tanaka, Y., Kono, A., Sakaki, Y., & Kato, K. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 1113
24. Howe, C. L., Granger, B. L., Hull, M., Green, S. A., Gabel, C. A., Helenius, A., & Mellman, I. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 7577
25. Fambrough, D. M., Takeyasu, K., Lippincott-Schwartz, J. & Siegel, N. R. (1988) *J. Cell Biol.* **106**, 61

26. Cha, Y., Holland, S. M. & August, J. T. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 5008
27. Fukuda, M., Viital, J., Matteson, J. & Carlsson, S. R. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 18920
28. 大住幸秀 学位論文 (1984)
29. Himeno, M., Koutoku, H., Ishikawa, T., & Kato, K. (1989) *J. Biochem.* **105**, 449
30. Tanaka, Y., Harada, R., Himeno, M., & Kato, K. (1990) *J. Biochem.* **108**, 278
31. Tanaka, Y., Himeno, M., & Kato, K. (1990) *J. Biochem.* **108**, 287
32. Okazaki, I., Himeno, M., Ezaki, J., Ishikawa, T., & Kato, K. (1992) *J. Biochem.* **111**, 763
33. 江崎淳二 学位論文 (1991)
34. 新留徹広 修士論文 (1986)
35. 加来聖司 修士論文 (1989)
36. Himeno, M., Fujita, H., Noguchi, Y., Kono, A., & Kato, K. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162**, 1044
37. Fujita, H., Ezaki, J., Noguchi, Y., Kono, A., Himeno, M., & Kato, K. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 444
38. Fujita, H., Takata, Y., Kono, A., Tanaka, Y., Takahashi, T., Himeno, M., & Kato, K. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 604
39. Breathnach, R., & Chambon, P. (1981) *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 349
40. Geier, C., von Figura, K., & Pohlmann, R. (1989) *Eur. J. Biochem.* **183**, 611
41. Pohlmann, R., Krentler, C., Schmidt, B., Schrode, W., Lorkowski, G., Culley, J., Mersmann, G., Geier, C., Waheed, A., Gottschalk, S., Grzeschik, K. H., Hasilik, A., & von Figura, K. (1988) *EMBO J.* **7**, 2343
42. Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982) *J. Mol. Biol.* **157**, 105
43. 中村勝次 修士論文 (1991)
44. Shermann, F., Stewart, J. W., & Tunasawa, S. (1985) *BioEssays* **3**, 27
45. Oquendo, P., Hundt, E., Lawler, J., & Seed, B. (1989) *Cell* **58**, 95
46. Vega, M. A., Segui-Real, B., Alcalde, J., Cales, C., Rodriguez, F., Vandekerckhove, J., & Sandoval, I. V. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 16818
47. 岡崎一生 学位論文 (1986)
48. 池田一彦 修士論文 (1982)
49. Funakoshi, A., Tateishi, K., Tsuru, M., Jimi, A., Wakasugi, H., Ikeda, Y., & Kono, A. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**, 741

50. Iguchi, H., Hayashi, I., & Kono, A. (1990) *Cancer Res.* **50**, 3691
51. Mattei, M. G., Matteson, J., Chen, J. W., Williams, M. A., & Fukuda, M. (1991) *J. Biol. Chem.* **265**, 7548
52. Sawada, R., Jardine, K. A., & Fukuda, M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 9014
53. Novick, P., Field, C., & Scheckman, R. (1980) *Cell* **21**, 205
54. Robinson, J. S., Klionsky, D. J., Banta, L. M., & Emr, S. D. (1988) *Mol. Cell Biol.* **8**, 4936
55. Wilson, D. W., Wilcox, C. A., Flynn, G. C., Chen, E., Kuang, W. -J., Hemzel, W. J., Block, M. R., Ullrich, A., & Rothman, J. E. (1989) *Nature* **339**, 355
56. Miyanohara, A., Toh-e, A., Nozaki, C., Hamada, F., Ohtomo, N., & Matsubara, K. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 1
57. Takatsuji, H., Ikeda, J., et al. (1986) *Nature* **319**, 240
58. Nakamura, Y., Miyanohara, A., Matsubara, K., et al. (1986) *Gene* **50**, 239
59. Makoto, I., Yamada, H., Yasukochi, T., Kuroki, R., Miki, T., Horiuchi, T., & Imoto, T. (1992) *Biochemistry* **31**, 5545
60. Saiki, R., Gelfand, D. H., Stoffel, S. J., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988) *Science* **239**, 487
61. Kunkel, T. A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 488
62. Kupersztoch-Portny, Y. M., Lovett, M. A., & Helinski, P. R. (1974) *Biochemistry* **13**, 5484
63. Hinnen, A., Hicks, J. B., & Fink, G. R. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1929
64. 井上誠 修士論文 (1989)
65. Peters, C., Braun, M., Weber, B., Wendland, M., Schmidt, B., Pohlmann, R., Waheed, A., & von Figura, K. (1990) *EMBO J.* **9**, 3497
66. Bankaitis, V. A., Johnson, L. M., & Emr, S. D. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9075
67. Valls, L. A., Winther, J. R., & Stevens, T. H. (1990) *J. Cell. Biol.* **111**, 361
68. Klionsky, D. J., & Emr, S. D. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 5349
69. Roberts, C. J., Nothwehr, S. F., & Stevens, T. H. (1992) *J. Cell. Biol.* **119**, 69
70. Cooper, A., & Bussey, H. (1992) *J. Cell. Biol.* **119**, 1459
71. Pfeffer, S., & Rothman, J. E. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 829
72. Braun, M., Waheed, A., & von Figura, K. (1989) *EMBO J.* **8**, 3633
73. Lehmann, L. E., Eberle, W., Krull, S., Prill, V., Schmidt, B., Sander, C., von Figura, K., & Peters, C. (1992) *EMBO J.* **11**, 4391

74. Sosa, M. A., Schmidt, B., von Figura, K. & Rehfeld, A. H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 12537
75. Williams, M. A., & Fukuda, M. (1990) *J. Cell. Biol.* **111**, 955
76. 野口陽一郎 博士論文 (1992)
77. Letourneur, F., & Klausner, R. D. (1992) *Cell* **69**, 1143
78. Young, R. A., & Davis, R. W. (1983) *Science* **222**, 778
79. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989) "*Molecular Cloning*" Cold Spring Harbor Laboratory Press
80. Vieira, J., & Messing, J. (1982) *Gene* **19**, 259
81. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., & Messing, J. (1985) *Gene* **33**, 103
82. Kunkel, T. A., Roberts, J. D., & Zakour, R. A. (1987) "*Method in Enzymology*" **154**, 367
83. Young, R. A., & Davis, R. W. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 1194
84. Norrander, J., Kempe, T., & Messing, J. (1983) *Gene* **26**, 101
85. 大田成男 (1986) 細胞工学 **5**, 264
86. Hattori, M., & Sakaki, Y. (1986) *Anal. Biochem.* **152**, 232
87. Shibko, S., & Tappel, A. L. (1965) *Biochem. J.* **95**, 731
88. Yoshihisa, T., Ohsumi, Y., & Anraku, Y. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 5158
89. Valls, L. A., Winther, J. R., & Stevens, T. H. (1990) *J. Cell. Biol.* **111**, 361
90. Kubota, S., Yoshida, Y., Kumaoka, H., & Furumichi, A. (1977) *J. Biochem.* **81**, 197
91. Abeijon, C., Orlean, P., Robbins, P. W., & Hirschberg, C. B. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6935
92. Fiske, C. H., & Subbarow, Y. (1955) *Method in Enzymology* **3**, 843
93. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680
94. Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350
95. Pringle, J. R., Adams, A. E. M., Drubin, A. D. G., & Haarer, B. K. (1991) *Method in Enzymology* **194**, 565

