
ニワトリ卵白中の新規蛋白質 EW135 および EW135 結合蛋白質の構造と機能

東海大学工学部・教授 松下 操

■ 緒 言

ニワトリ卵白中には多くの蛋白質が存在し、主に生体防御に働いている¹⁾。最近、私はニワトリ卵白より新規蛋白質 EW135 を発見し²⁾、構造と機能の解析から以下の特徴をこれまで明らかにしてきた。EW135 は Scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) ドメインを少なくとも 6 個持つ構造をしていることが cDNA クローニングから判明。また、EW135 はカルシウム依存的に蛋白質 (EW135 結合蛋白質) と結合している。更に、EW135 は黄色ブドウ球菌などの細菌に結合する。私が得たこれらの成果をもとに、EW135 に関して以下の 3 つを目的に研究を行った。(1) cDNA クローニングを更に行い、EW135 の全構造を解明 (2) 卵白中の EW135 結合蛋白質の単離・同定 (3) 黄色ブドウ球菌成分のプロテイン A への EW135 の結合性の検討。

■ 方 法

(1) EW135 の精製

ニワトリ卵白より、ポリエチレングリコール 4000 沈殿、Q Sepharose による分画を行い EW135 を精製した。

(2) EW135 の N 末端側アミノ酸配列の解析

EW135 を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後に PVDF 膜に転写した。蛋白染色後に EW135 のバンドを含む PVDF 膜の一部を切り、塩酸処理によりデブロッキング後にプロテインシーケンサーで N 末端側アミノ酸配列を解析した。

(3) EW135 の cDNA クローニング

本研究の前に行った cDNA クローニングの実験を要約すると以下の通りとなる。ニワトリ輸卵管 cDNA を鋳型にして行った PCR により 2.2 kbp の PCR 産物を得て、これをクローニングベクター (pGEM-T Easy Vector) へライゲーション後、大腸菌へトランスフェクションして形質転換を行った。クローニングの結果、2.2kbp の一部の塩基配列が決定され、6 個の SRCR ドメインが確認できた。そこで、本研究では、まず 2.2kbp の PCR 産物の残りの塩基配列をクローニングにより決定した。その後、これにより明らかになった塩基配列の一部をプライマーにして 3'RACE 法を行い、終止コドンを含む 3'側の塩基配列を決定した。この結果から、ニワトリのゲノムのデータベースに 3'側の翻訳領域と非翻訳領域を含む配列を持つエントリが存在することが判明した。そこで、このゲノムのエントリーの塩基配列をもとに 5'側にフォワードのプライマーを設計した。一方、cDNA クローニングの結果得られた塩基配列をもとにリバースのプライマーを設計した。これらのプライマーを用いて PCR、クローニングを行い、シグナル配列と推定される配列を含む 5'側の構造を決定した。以上の結果をもとに、EW135 の全塩基配列とアミノ酸配列を決定した。

(4) EW135 結合蛋白質の単離・同定

ニワトリ卵白からポリエチレングリコール 4000 の分画等により EW135 を含む画分を得た。これを Ca^{2+} を含むトリス塩酸緩衝液で平衡化したウサギ抗 EW135-Sepharose カラムにアプライし、カラムを洗浄後に EDTA を含むトリス塩酸緩衝液により溶出を行った。その後、グリシン塩酸緩衝液で溶出を行った。それぞれの溶出画分の蛋白質成分を SDS-PAGE により解析した。また、SDS-PAGE 後にウエスタンブロット法も行った。

(5) EW135 のプロテイン A への結合性の検討

EW135 を Ca^{2+} 存在下、プロテイン A-agarose カラムにアプライ後、EDTA を含む緩衝液で溶出を行い、溶出画分を SDS-PAGE で解析した。また、ELISA プレートにコートした EW135 に Ca^{2+} または EDTA 存在下、HRP 標識プロテイン A を反応させて、EW135 に結合するプロテイン A 量を測定した。

■ 結果

(1) ニワトリ輸卵管 cDNA を鋳型にして得られた 2.2kbp の PCR 産物のクローニングと、その後の 3' RACE 法および 5'側の解析から、EW135 をコードする cDNA の全塩基配列を決定した。それをもとに、EW135 はシグナルペプチドを含めて 987 アミノ酸残基から構成される蛋白質と推定された。精製した EW135 蛋白質は N 末端のアミノ酸が修飾されていたが、デブロッキングにより 10 アミノ酸残基の配列を決定したところ、この配列は cDNA クローニングの結果決定されたアミノ酸配列に含まれていることが確認され、シグナルペプチドを除いた蛋白質部分のアミノ酸残基数は 970 であった。また、EW135 はグループ B の SRCR ドメインが 9 個タンデムに並んだ構造上の特徴を持つことも判明した。

(2) ニワトリ卵白より得られた EW135 を含む画分を Ca^{2+} の存在下、抗 EW135-Sepharose カラムに結合後に EDTA を含む緩衝液とグリシン塩酸緩衝液で順に溶出を行い、それぞれの画分を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析したところ、蛋白染色によりいずれの溶出画分でも EW135 の位置にバンドが検出された。また、ウエスタンブロット法により、この蛋白質が抗 EW135 抗体と反応することが確認された。

(3) EW135 は Ca^{2+} 存在下、プロテイン A-agarose カラムに結合して、EDTA で溶出した。そこで、ELISA を用いて EW135 とプロテイン A の直接的な結合を検討したところ、EW135 は Ca^{2+} 依存的にプロテイン A に結合することが分かった。

■ 考察

本研究において、cDNA クローニングの結果 EW135 の一次構造が解明されたが、これがグループ B の SRCR ドメインが 9 個のタンデムリピートを持つユニークな構造をしていることが判明した。グループ B の SRCR ドメインは、一般的に 100 ~ 110 アミノ酸から構成され 6 ~ 8 個のシステイン残基を持つが、EW135 の各 SRCR ドメインには 8 個のシステイン残基が含まれている³⁾。各 SRCR ドメイン内でこれらのシステイン残基が 4 組のジスルフィド結合をとる構造が推定される。ニワトリ血清中にはグループ B の SRCR ドメインを持つ蛋白質として 18-B が存在している⁴⁾。18-B は EW135 と同様に SRCR ドメインのみから構成されており、ドメインの数は 4 である。

本研究では、EW135 結合蛋白質の検索も行った。その為に、EW135 を含む画分を Ca^{2+} 存在下、抗 EW135-Sepharose カラムへ添加して EW135 を抗 EW135 に結合させた後に EDTA を含む緩衝液で溶出を行った。これにより、EW135 結合蛋白質が EW135 より解離して溶出されると予想した。結果は予想外にも EW135 が EDTA により溶出された。SDS-PAGE からは、EW135 以外の蛋白質は EDTA 溶出画分には確認されなかった。この実験で、EDTA による溶出の後にグリシン塩酸緩衝液でも EW135 が溶出された。これらのことから、EW135 結合蛋白質は EW135 そのものであり、EW135 分子同士が Ca^{2+} 存在下複合体を形成している可能性が推定される。この点については、今後更なる検討が必要と考える。

本研究ではまた、EW135 のプロテイン-A への結合性が明らかになった。この結合には Ca^{2+} が必要であった。EW135 は Ca^{2+} 存在下に黄色ブドウ球菌に結合することから、黄色ブドウ球菌上のプロテイン-A が EW135 の結合する成分の一つであると推定される。プロテイン-A は黄色ブドウ球菌の病原因子であることから、EW135 がプロテイン-A に結合することは、これが黄色ブドウ球菌に対して抗菌的に働く可能性を示している。

■ 要約

ニワトリ卵白の新規蛋白質 EW135 の一次構造を cDNA クローニングにより解明した。その結果、EW135 はグループ B の Scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) ドメインのみをタンデムに 9 個持つ構造をしていることが明らかとなった。EW135 分子同士がカルシウムイオン依存的に結合している可能性が推定された。また、EW135 は黄色ブドウ球菌の成分であるプロテイン A にカルシウムイオン依存的に結合することが判明した。

■ 文 献

1. Kovacs-Nolan, J., Phillips, M. and Mine, Y. (2005) Advances in the value of eggs and egg components for human health. *J. Agric. Food. Chem.* 53, 8421-8431.
2. Yoo, W., Araki, T., Saito, J., Kurata, Y., Tokita, K., Kato, K. and Matsushita, M. (2013) Isolation and characterization of a novel chicken egg white protein with scavenger receptor cysteine-rich domains. *J. Poult. Sci.* 50, 159-163.
3. Sarrias, M.R., Gronlund, J., Padilla, O., Madsen, J., Holmskov, U. and Lozano, F. (2004) The scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domain: An ancient and highly conserved protein module of the innate immune system. *Critical. Rev. in Immunology.* 24, 1-38.
4. Iwasaki, K., Morimatsu, M., Inanami, O., Uchida, E., Syuto, B., Kuwabara, M. and Niiyama, M. (2001) Isolation, characterization, and cDNA cloning of chicken turpentine-induced protein, a new member of the scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) family of proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 9400-9405.