

新発見の糊代を持ったタンパク質の基礎と応用 (タンパク質接着能を有する化粧品素材の開発)

東京工業大学 生命理工学部

広瀬 茂久

Trappins are a family of unique proteins that have recently been identified and shown to have an anchoring sequence at their N-termini through which they become covalently trapped at the site of action. A typical example of the trappin family members is the elastase inhibitor elafin which is composed of two domains: the N-terminal transglutaminase substrate domain or "cementoin" domain that serves as an anchoring sequence and the C-terminal inhibitor domain having a compact structure stabilized by four disulfide bonds and therefore called "four disulfide core" or "WAP motif". In this study, as summarized below, we characterized the cementoin moiety which has an important potential application in developing intelligent cosmetic materials and further carried out a series of basic research on trappins such as molecular evolution of trappins.

Two types of derivatives of the cementoin-like anchoring sequence of trappin-1 were produced and characterized. The cementoin-like sequence (cem) was first elongated by tandemly linking its cDNA and expressing it in *E. coli*. Using the genetically engineered cem-cem, the anchoring sequence rich in Gln, Lys, and Pro was shown to have a random coil structure and to serve as a good substrate for transglutaminase, a characteristic very useful for developing the biotechnology of protein cross-linking or protein gluing. As a second construct, we prepared a fusion protein of cem and green fluorescent protein (GFP). The useful properties of the component proteins are maintained in the fusion protein, namely we succeeded to prepare a fluorescent cementoin moiety that will be of special interest and importance in protein engineering.

Previous studies showed that trappin genes, especially of the pig, have undergone rapid evolution, producing trappins with a broad spectrum of action. To understand the evolution of such a rapidly evolving multigene family, we characterized the trappin genes and found that the intron sequences are homogenized by gene conversion. Similar mechanisms may also operate in the other genes whose intron sequences are conserved much higher than the exon sequences.

In summary, 1) using the newly discovered adhesive protein "cementoin" and its family members, we developed a powerful method for protein cross-linking. 2) The secondary structure of cementoin was determined using recombinant cementoin. 3) Fluorescent cementoin was prepared by fusing it with green fluorescent protein. 4) Evolution of cementoin family genes was clarified.

1 緒言

私たちは最近働き場所に共有結合でとどまるという風変わりなタンパク質を見つけトラッピン (Trappin) と命名した¹⁻⁹⁾。働き場所にトラップされるという意味と次に述べるようにトランスグルタミナーゼ (Transglutaminase) の基質になるという意味からそう名付けた。cDNA 及び遺伝子をクローニングして構造を決定したところ、このタンパク質の N 末端に糊代に相当する部分があるこ

とが分かった (図 1)。すなわち N 末端側に Lys と Gln に富む繰り返し配列があり、この部分を介してトランスグルタミナーゼによって他のタンパク質に架橋されることが明らかになった。糊代に相当する部分に私たちはその働きにちなんで、セメントインと命名した⁴⁾。セメントインないしはその誘導体を利用すると、タンパク質の接着技術が開発できるのみならず、皮膚の保護剤や枝毛防止剤として化粧品の分野でも有用な素材になると考えられるので、本研究ではセメントインを遺伝子工学的に生産し、その性質を明らかにするとともに、応用の可能性を探った。また基礎の観点から特に興味を持たれるセメントイン部分の由来を明らかにするべく、遺伝子レベルで、詳細な分子進化学的な解析を行った。



Properties, evolution, and cosmetological aspects of trappins that have recently been discovered as a new protein family and shown to have anchoring sequences

Shigehisa Hirose

Department of Biological Sciences,
Tokyo Institute of Technology

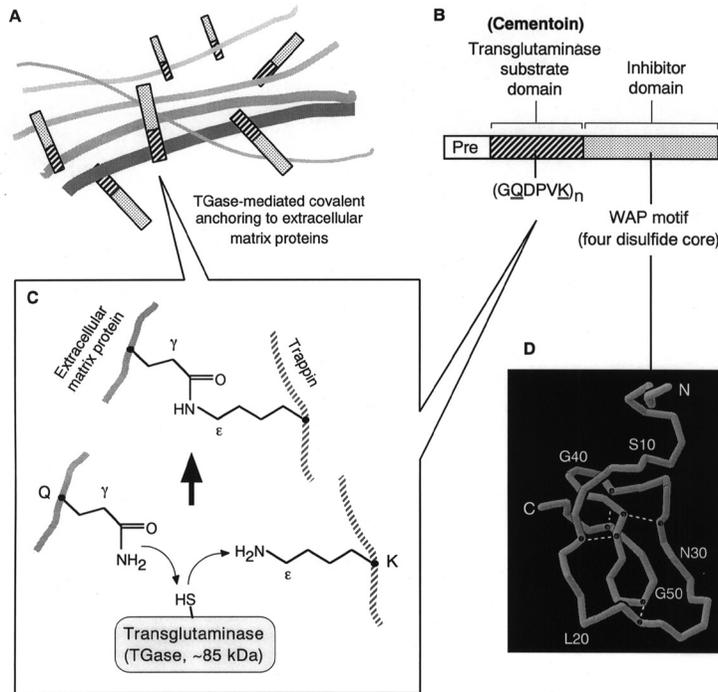


図1 Structural features of trappins. A) Covalent cross-linking of trappins to other proteins through the transglutaminase substrate domain. B) Domain structure of the trappin precursor. C) Mechanism of action of transglutaminase that catalyzes the formation of the isopeptide bond. Glutamine residue (Q) acts as an acyl donor and lysine (K) residue serves as an acceptor. The catalytic sulfhydryl group involved in the formation of an acylenzyme intermediate is also shown (for review, see Refs. 1 and 2). D) Three dimensional structure of the WAP motif of human trappin 2 (SKALP/elafin) determined by x-ray crystallography and NMR spectroscopy. Four disulfide bonds are indicated by broken lines.

2 実験

2.1 遺伝子工学的生産法と精製法

実験手順の概要を図2に示す。まず、Trappin ないしは Trappin のセメントイン部分をコードする cDNA を発現ベクター pMAL-p (New England Biolabs 社) に組み込み、大腸菌に導入し、マルトース結合タンパク質との融合タンパク質の形でペリプラズムに分泌されるようにした。このようにして作製した形質転換大腸菌を 4L の規模で 4~5 時間 振とう培養したのちに、IPTG で誘導をかけて、目的タンパク質を多量に作らせた。集菌後、Cold osmotic shock をかけて、ペリプラズム中のタンパク質を回収し、これをアミロース・レジ

を担体とするアフィニティーカラムにかけ精製した。約 20mg の目的産物がマルトース結合タンパク質との融合タンパク質の形で得られた。この精製標品にファクター Xa (プロテアーゼ) を作用させて、不要なマルトース結合タンパク質部分を切断除去し、ヒドロキシアパタイト・カラムに通すことにより簡便かつ効率よく目的物を得る方法を開発した。最終的な収量は約 5mg であった。

2.2 接着能の評価

上記のようにして得た Trappin ないしはセメントインに触媒量のトランスグルタミナーゼを作用させ、それらが架橋接着されて重合体になる様子を光散乱法及び SDS ポリアクリルアミドゲル電

電気泳動法によりモニターした。架橋接着反応の進行は、散乱光の増加ないしは電気泳動ゲル上の単体に相当するバンドが消失し多量体に相当する高分子量のところに新しくバンドが現れることにより検出できる。

2.3 その他

遺伝子工学的手法（プラスミドの調製, PCR, 塩基配列の決定), 抗体の作製, 免疫化学的組織染色, インサイチュハイブリダイゼーション等は通常の方法に従った。

3 結果と考察

3.1 セメントイン及びその同族分子の生産と性質

タンパク質の接着技術を確立する上で要となるセメントインを遺伝子工学的に大腸菌に作らせる系を構築し, セメントインの性質を明らかにした。同様に, 本研究を通して新たに発見した同族分子についても, 大腸菌を利用した発現系とアフィニティークロマトグラフィーによる精製系を確立した。このようにして得た産物は, 予想通り触媒量のトランスグルタミナーゼによって非常に効率よく架橋され, 優れたタンパク質接着能力を有することが確かめられた(図3)。

3.2 セメントインの2次構造

糊代として働くセメントイン領域は, 一次構造上は, LysとGlnに富む繰り返しの構造をとっていることが明らかになっているが, より高次の構造については不明である。そこで, 大腸菌で生産したセメントインを用いて二次構造の決定をおこなった。立体構造に関する情報は, セメントインの接着能を理解し, 応用に役立てるためには極めて重要である。

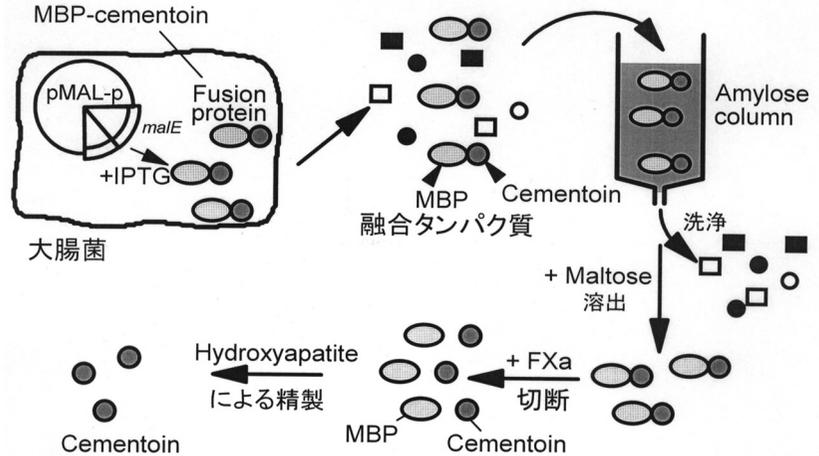


図2 糊代の役割をたすセメントインの遺伝子工学的生産と精製法の概要。

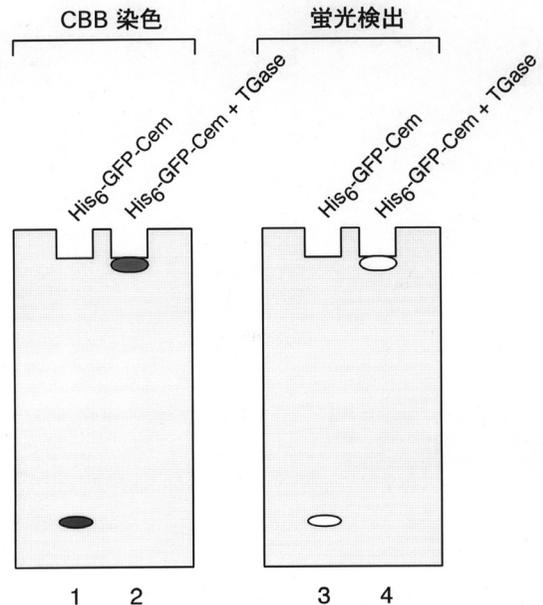


図3 蛍光性セメントイン (His6-GFP-Cem) の調製と評価。大腸菌用の発現ベクターにクラゲの蛍光タンパク質 (GFP) とセメントイン (Cem) の cDNA を組み込み, 産物をインクルージョン・ボディとして回収し, 尿素で可溶化後, Niキレートカラムにかけて精製した。精製標品を大の中性緩衝液で希釈後4°Cに5日間放置し, 蛍光性とした。低温で徐々に酸化させることにより蛍光を発するクロモフォアが形成されたものと推定される。トランスグルタミナーゼ (TGase) の添加により His6-GFP-Cem は速やかに架橋接着され, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってはっきりと識できるほど高分子化した (レーン2と4)。GFPは, 一旦蛍光性になるとクロモフォアは極めて安定で SDS のような界面活性剤の存在下でも蛍光を失わないという利点を有する。

セメントインを大腸菌でマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として発現させ、セメントイン部分のみを切り離し精製した後に、円偏光二色性(CD スペクトル)を測定することによって、二次構造である α ヘリックス、 β 構造の含量を求めたところ、予想外に、特徴的な二次構造は持たず、ランダムコイル構造をとっていることが判明した。最初は α ヘリックス構造が主ではないかと予想していたが、よく考えてみると、ランダムコイルの方がより効率よくタンパク質を架橋するのに適した構造といえそうである。

3.3 局在部位の同定

精製標品に対する抗体も作製し、ウエスタン分析や免疫組織化学やラジオイムノアッセイの開発に応用した。その結果、セメントイン及びセメントイン様接着分子は生体中では細胞外マトリックスタンパク質に架橋されて存在すること、気管や腸の上皮細胞に多く発現しており、血中にも存在することが明らかになった^{4, 6)}。組織分布に関しては、RNase プロテクションアッセイによっても気管や腸に多いことを確かめた。さらにヒトのある種の病態(Psoriasis, 乾癬)では、セメントインが異常に発現し、皮膚等の結合組織の病気になることが判明した⁵⁾。以上の結果は、本研究対象である接着因子が基礎及び応用の両面において、極めて重要な因子であることをよく物語っている。

私たちが最初に見つけた Trappin (Trappin-1) は、上述のように血中にも多量に存在するが、それがどこから来るのか不明であった。そこで、この問題を解く手がかりを得るために、インサイチュ ハイブリダイゼーションにより Trappin-1 の局在部位を決定した。ブタの小腸切片を用いて、Trappin-1 mRNA の局在を調べたところ、陰窩底部の内分泌細胞(enteroendocrine cells) がきれいに染色された⁷⁾。エンテロエンドクリン細胞は、種々の腸管ペプチドを合成・分泌しており、ここで Trappin-1 が合成されている事実は、腸の陰窩が血中の Trappin-1 源であることを強く示唆す

る。

3.4 蛍光性セメントイン分子の作製

セメントインは期待どおり非常に優れたタンパク質の接着剤になることがわかったが、さらにセメントイン分子を標識することが出来れば利用価値は格段に上がる。そこで、最近よく利用されているクラゲ由来の蛍光性タンパク質 GFP (Green Fluorescent Protein) との融合タンパク質として発現させることを試みた。GFP の N 末端と C 末端にセメントインを結合させた融合タンパク質をデザインし、それぞれの N 末端に精製のためのヒスチジン・タグを付けて大腸菌で発現させた。いずれも不溶性のインクルージョンボディとして回収されたが、N 末端にセメントインを結合させたものでは、Renaturation 後も GFP の蛍光は戻らなかったため、C 末端にくっつけた His6-GFP-セメントインについて詳細に検討することにした。

His6-GFP-セメントインをインクルージョンボディとして回収し、6M 尿素で可溶化後、金属キレートカラムで精製した。精製標品を希釈法によって Renaturation し、低温に放置することにより蛍光を発するようにした。希釈時に、0.1%のポリエチレングリコール (MW6000) を共存させると Renaturation の効率が良くなることも見出した。

蛍光性とすることに成功した His6-GFP-セメントインにトランスグルタミナーゼを作用させると、His6-GFP-セメントインは容易に重合し高分子化した。すなわち His6-GFP-セメントインは、当初のもくろみどおり、蛍光性のタンパク質接着剤として機能することが確かめられた(図3)。最近では改良型 GFP として色調の異なるものも開発されており、私たちのセメントインと組み合わせれば魅力的な化粧品素材の一つになるものと期待されよう。

3.5 セメントイン遺伝子ファミリーの由来方と進化

セメントイン領域すなわち糊代を持った興味深

い一群のタンパク質が存在することを見つけ、それらの性質と応用の可能性について検討してきた。これらのタンパク質は皮膚等の上皮組織を守るという極めて重要な役割を担っていることから皮膚科学との関連においてもより詳細な生化学的・分子生物学的な研究を進めなければならないが、もう一つ明らかにしなければならない根本的問題がある。すなわち進化の過程でどのようにしてこのように風変わりな構造を持つタンパク質が登場したかという根源的問題にも答えなければならない。この問題解決の糸口を見つけるために、DNA データベースの検索をおこない、遺伝子構造の類似性等を比較検討したところ、セメントイン領域は REST 遺伝子の一部から派生し (図 4)、その後繰り返しの複雑な重複や除去等を経て、今日の姿になったことが明らかになった (図 4)¹¹⁾。上述の Trappin 分子の遺伝子は、従って、

REST 遺伝子と Trappin の活性部位をコードしている WAP モチーフの先祖遺伝子がエクソン・シャッフリングすることによって出来たものと推定される。

トラッピン・ファミリーの進化系統樹を図 5 に示す。トラッピン・ファミリーのメンバーの数が動物種によって大きく異なるのも特徴であるが、ブタにおいてその傾向が特に強いので、ブタの近縁種 (イボイノシシ、ベッカリー、カバ) で詳細な解析を試みつつある (図 6)¹¹⁾。この過程で、イボイノシシのトラッピン遺伝子を解析した際に、以下に述べるように、予想外の大発見をした。

Trappin 遺伝子は 3 個のエクソンと 2 個のイントロンから成る (図 6 A)。エクソン 1 は 5' 非翻訳領域と分泌シグナル (pre-sequence) をコードし、エクソン 2 はセメントイン領域とそれに続く WAP モチーフをコードし、エクソン 3 は 5' 非

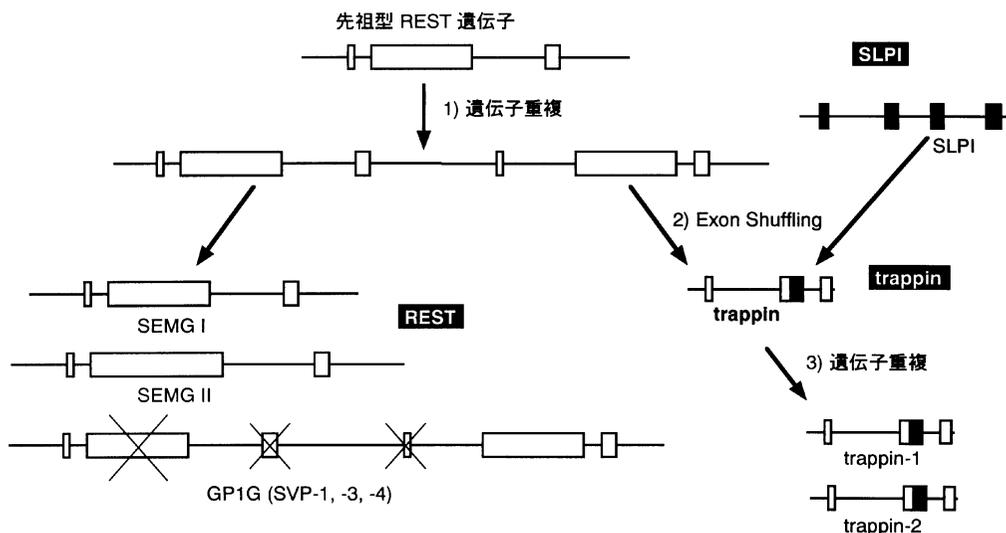


図 4 トラッピン (Trappin) 遺伝子の由来。トラッピン遺伝子は、REST 遺伝子と SLPI 遺伝子を起源とすることが明らかになった。REST は Rapidly Evolving Seminal vesicle Transcribed の略で、精嚢で多くに作られている一群のタンパク質の総称であるが、セメントインのようにトランスグルタミナーゼの良い基質となり、架橋接着される。REST 遺伝子産物は、Seminal Vesicle secretory Protein ないしは Seminal Vesicle clotting Protein (SVP) あるいは Semenogelin (SEMG) と呼ばれる。SLPI は、Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor の略で、Antileukoproteinase (ALP) とも呼ばれる。SLPI に特徴的なことは、プロテアーゼインヒビター・ドメイン (WAP モチーフ) を 2 個持つことである。第 2 の WAP モチーフをコードするエクソン (exon 3) が REST 遺伝子の後半と一緒に、トラッピン遺伝子が出来たと考えられる。

翻訳領域をコードする。すべてのトラップイン遺伝子において、エクソン2の変異率が周りのイントロンに比べて極めて高く、これまでの分子生物学の常識では説明できない事実として注目を浴びている。一般的には機能的制約のないイントロンの方が変異しやすいと考えられ、実際にほとんどの遺伝子ではそうなっているので、トラップイン遺伝

子の場合イントロンの保存率が98%と異常に高い（エクソンは70%程度）のはなぜかがここ数年大問題となっていたわけである⁹⁾。私たちはイボイノシシのトラップイン遺伝子を解析中に、この問いに対する解答を得た。すなわち、ジーン・コンバージョンによってイントロンの配列が一定になるように置換されていることをジーン・コンバー

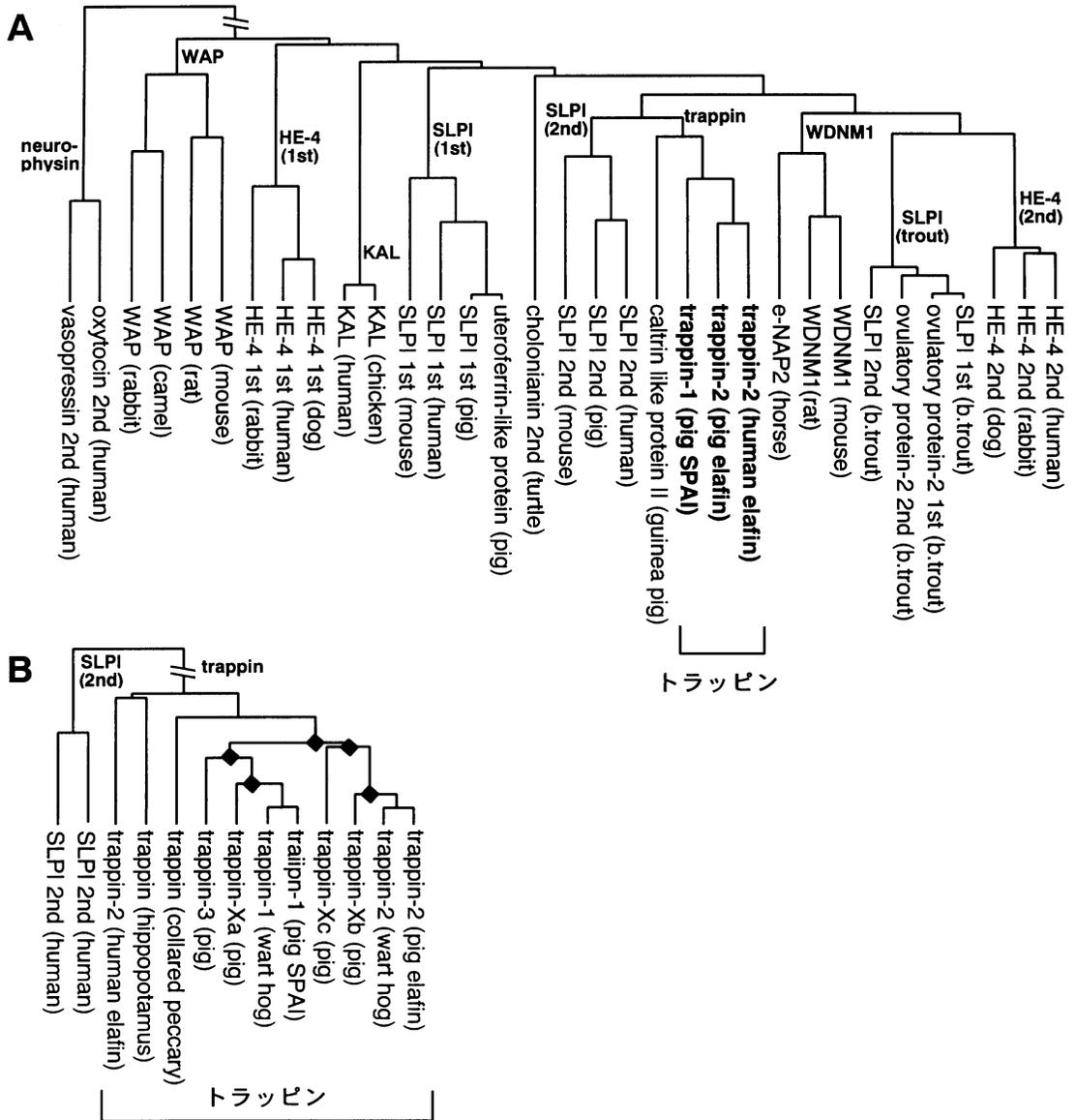


図5 トラップイン・ファミリーとその関連遺伝子の分子進化系統樹。

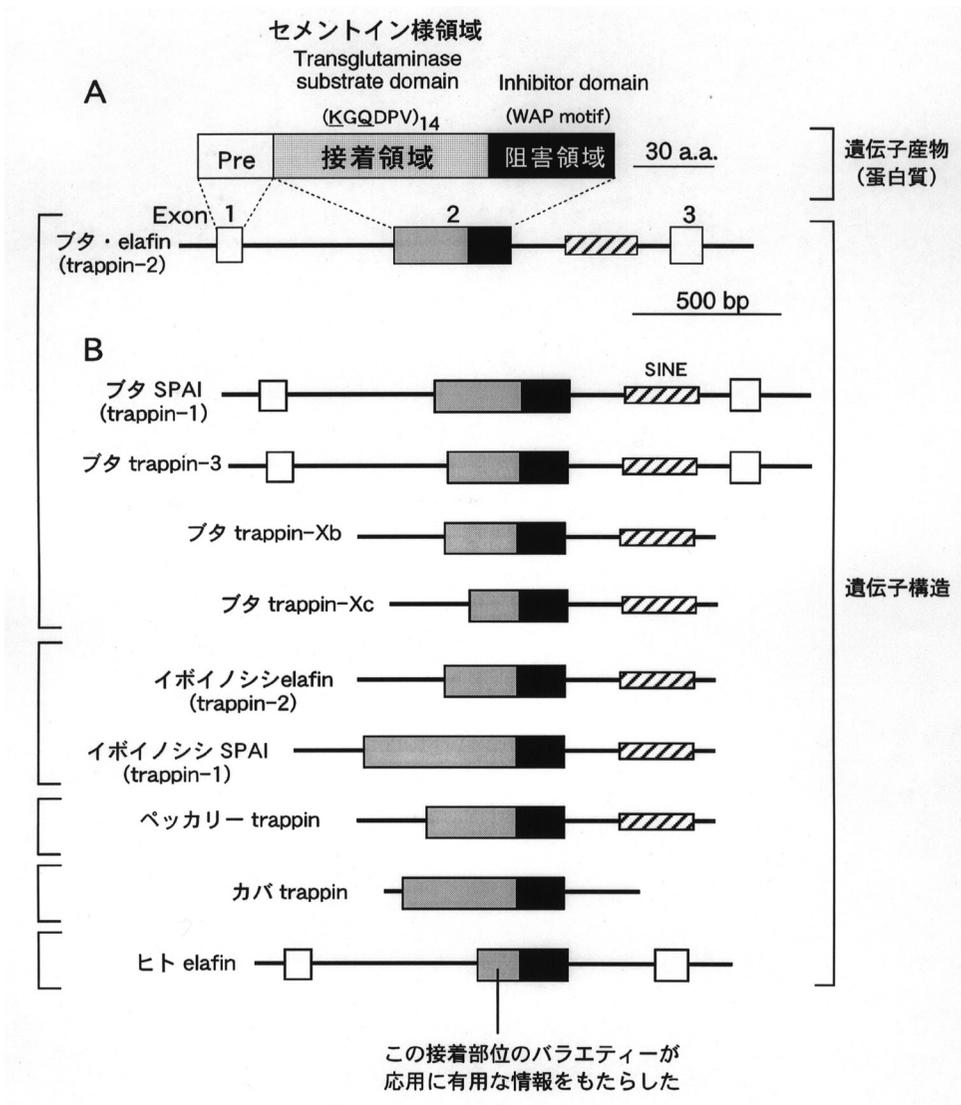


図6 偶蹄目におけるトラップイン遺伝子の種類と構造。これまでの解析で、ブタで5種類、イボイノシシで2種類、ベッカリー、カバ、ヒトでそれぞれ1種類、合計10種類のトラップイン分子の構造が明らかになった。接着部分のバラエティーの豊富さは応用の観点から注目される。A、トラップインの代表ブタ・エラフィン (Trappin-2) とその遺伝子構造。B、その他のトラップイン遺伝子ファミリーの構造

ジョンの中間体を捕まえることにより明らかにした(図7)¹²⁾。このジーン・コンバージョンの生物学的意義は現在のところ不明であるが、イントロンが保存されるメカニズムが明らかになったことで、今後この分野の大きな進展が期待できよう。基礎的には画期的な成果である。

4 総括

糊代に相当するセメントイン領域を有する一群の内在性のタンパク質を発見し、トラップイン (Trappin) と総称することを提唱した。働き場所にトラップされて機能を発揮しているからであ

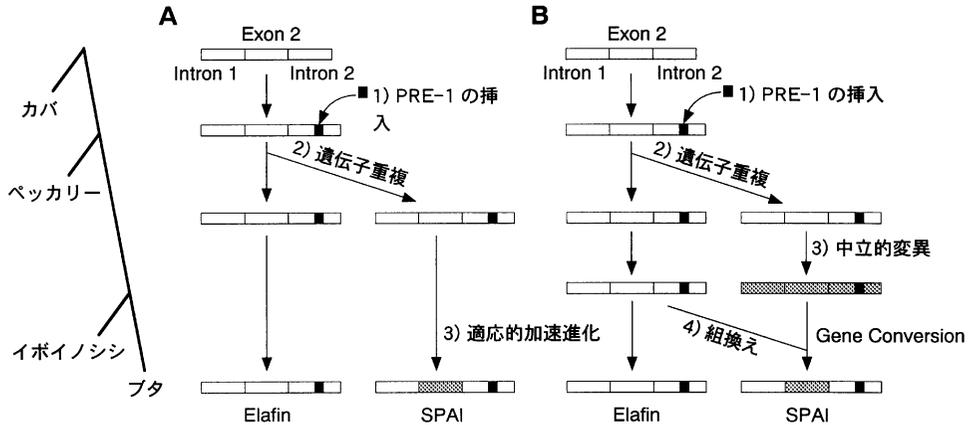


図7 トラップイン遺伝子のイントロンの保存機構。左の系統樹は、偶蹄目においてトラップイン遺伝子がどのように分子進化をし、出来てきたかを示す；トラップイン遺伝子の数、塩基配列の類似性、及びPRE-1の有無に基づいて推定したものである。PRE-1はPig Repetitive Elementの略で、散在性反復配列（Short Interspersed Repetitive Element, SINE）の一種である。SINEの有無は分子進化の時標として重宝されている。カバのトラップイン遺伝子にはPRE-1（SINE）は無く、PRE-1の挿入はカバとイボイノシ上科の分岐後に起こったと推定される。AとBには、見かけ上エクソン2の配列のみが変化し、イントロンの配列が保存されるメカニズムが2つ示されている。Aは何らかの機構でエクソン2に変異が集中的に起こるとするもので、現在信じられている進化の中立説では説明しにくい。Bは、変異はイントロンにもエクソンにもまんべんなく起こるが、途中で相同組換えによるジーン・コンバージョン（Gene Conversion）によってイントロンの配列が置換されるために見かけ上イントロンが変化しないように見える。Bの可能性を強く示唆する結果がイボイノシの解析から得られた。

る。さらにプロテアーゼ等をトラップして不活性化するという意味も込められている。この興味深いタンパク質トラップインは皮膚を守ることに也大いに貢献しており、化粧品学の観点からも興味深い研究対象である。本研究では、基礎及び応用の両面から解析を進め、以下の成果を得た。

- 1) 内在性の架橋接着因子であるセメントインとその同族分子を利用して効率の良いタンパク質の接着法を開発した。
- 2) セメントインを遺伝子工学的に量産し、その2次構造を推定した。
- 3) 蛍光性のセメントインを調製し、セメントインの付加価値を高めた。
- 4) セメントイン遺伝子の由来方と進化を分子レベルで明らかにした。私たちが世に送り出したトラップインが皮膚科学・化粧品学の分野で有名になり、愛用されることを願ってやまない。

謝辞

本研究は以下の方々の献身的な努力に負うところ大である：Magdy A. Ghoneim (NEDO 研究員；現、カイロ大学助教授)、古川 真 (博士課程大学院生；現、有人宇宙システム株式会社)、古谷 裕 (修士課程大学院生；現、総合研究大学院生)、加藤 明 (博士課程大学院生；現、理化学研究所特 研究員)、鈴木陽子 (東京工業大学生命理工学部教務職員)。

文献

- 1) 広瀬茂久, Ghoneim MA: 糊代をもったタンパク質：タンパク質の局在化機構に新たな視点：タンパク質の接着技術への応用にも期待。化学と生物 34, 632-633, 1996.
- 2) Schalkwijk J, Wiedow O, Hirose S: The trappin gene family: proteins defined by an N-terminal transglutaminase substrate domain and a C-terminal four-disulfide core motif. J Invest

- Dermatol, in press (1998).
- 3) Saheki T, Ito F, Hagiwara H, Saito Y, et al: Primary structure of the human elafin precursor preproelafin deduced from the nucleotide sequence of its gene and the presence of unique repetitive sequences in the prosegment. *Biochem Biophys Res Commun* 185, 240-245, 1992.
 - 4) Nara K, Ito S, Ito T, et al: Elastase inhibitor elafin is a new type of proteinase inhibitor which has a transglutaminase-mediated anchoring sequence termed "cementoin". *J Biochem*, 115, 563-567, 1994.
 - 5) Nonomura K, Yamanishi K, Yasuno H, et al: Up-regulation of elafin/SKALP gene expression in psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol*, 103, 88-91, 1994.
 - 6) Kuroki J, Hosoya T, Itakura M, et al: Cloning, characterization, and tissue distribution of porcine SPAI, a protein with a transglutaminase substrate domain and the WAP motif. *J Biol Chem*, 270, 22428-22433, 1995.
 - 7) Furukawa M, Suzuki Y, Ghoneim MA, et al: Cryptic origin of SPAI, a plasma protein with a transglutaminase substrate domain and the WAP motif, revealed by in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Biol Chem*, 271, 29517-29520, 1996.
 - 8) Hirose S, Furukawa M, Tamechika I, et al: Discovery of a new type of proteinase inhibitor family whose members have an anchoring sequence. In: Bond J, Suzuki K (eds): *Intracellular Protein Catabolism*. Plenum, New York, 1996, 43-49.
 - 9) Tamechika I, Itakura M, Saruta Y, et al: Accelerated evolution in the inhibitor domains of porcine elafin family members. *J Biol Chem*, 271, 7012-7018, 1996.
 - 10) Ghoneim MA, Hirose S: Fluorescent protein glues: preparation, properties, and application for protein cross-linking of cementoin moieties of trappins fused to green fluorescent protein. (in preparation)
 - 11) Furutani Y, Kato A, Yasue H, Hirose S: Evolution in Suidae of the trappin multigene family with unusually conserved intron sequences. (in preparation)
 - 12) Kato A, Furutani Y, Yasue H, Hirose S: Mechanisms of evolution of the trappin gene family and unusual conservation of their intron sequences. (in preparation)