
細胞膜裏打ち蛋白質群の構造的多様性による
情報伝達制御機構の統合生物学的解析

(研究課題番号 15571230)

平成15年度～平成17年度 科学研究費補助金
(基盤研究 (C)) 研究報告書



平成19年2月23日

東京女子医科大学医学部 生化学

布村 渉



細胞膜裏打ち蛋白質群の
構造的多様性による
情報伝達制御機構の
統合生物学的解析

課題番号：15571230

平成 15 年～17 年度
科学研究費補助金 基盤研究 (C)

研究報告書

東京女子医科大学医学部生化学

布村 渉

作成提出：平成 19 年 2 月 23 日

研究報告書の構成

第1章 研究の概要

第1節 研究の総括

1. 序論
2. 研究の目的
3. 研究計画の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義
4. 国内外の関連する研究の中での当該研究の位置付け
5. 本研究で明らかにしたこと（総括）

第2節 研究組織、発表業績

第2章 研究の成果

第1節 細胞生物学的解析

- 第1-1項 HeLa細胞を用いた4.1R-CD44結合解析
- 第1-2項 135kDa型4.1R (4.1R¹³⁵)を中心にした赤芽球での細胞膜骨格蛋白質群の発現
- 第1-3項 キメラ蛋白質を用いた4.1Rと4.1Gの細胞膜結合の分子特異性の解析

第2節 比較生化学的研究

- 第2-1項 ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) 4.1Rの比較生化学的研究
- 第2-2項 ショウジョウバエ *Coracle*の膜蛋白質結合解析

第3節 生物物理学的解析

- 第3-1項 4.1R-peptideとCaM結合の動的二次構造解析
- 第3-2項 4.1R FERM domainとGPC結合の三次構造解析

第4節 方法論の開発

- 第4-1項 4.1RのPKCリン酸化を利用した反転膜小胞の作製
- 第4-2項 4.1R 30kDa FERM domainに対する単クローン抗体の作製

第 1 章 研究の概要

第1節 研究の総括

1. 序論：

細胞膜を介する情報伝達系は、膜貫通蛋白質-膜裏打ち蛋白質細胞骨格系の構造的多様性の連鎖である。現在行われている研究の多くは情報伝達系に関わる分子の同定、翻訳後修飾に主力が注がれ、分子間相互作用、蛋白質の高次構造と機能（情報伝達の効果）を関連づけた研究は少ない。特に、膜裏打ち構造蛋白質群の情報伝達への寄与に関する報告は極めて少ない。

一方、著者らは、科学研究費（課題番号 11680701）の研究成果により、「細胞膜裏打ち蛋白質は、細胞の形態を維持するばかりではなく、情報伝達系を制御する」と「細胞内から細胞外へ向かう情報伝達系が存在する」と言う二つの仮説を持つに至った。この二つの仮説を生化学（反応速度論的解析、熱力学的変化）、構造生物学（分光法を用いた二次構造解析、X線結晶解析）、細胞生物学（免疫細胞化学）、分子生物学の手法を用い統合的に検証する事を本研究課題の目的とした。実際には、膜裏打ち構造蛋白質の要である protein 4.1(以下 4.1R: Ankyrin-CD44 結合を制御する)とその結合膜貫通蛋白質 CD44（ヒアルロン酸を結合する接着分子、Ankyrin はヒアルロン酸の結合を制御する、膜1回貫通型糖蛋白質）と Glycophorin C（以下 GPC と略記、赤血球膜1回貫通型糖蛋白質）及び制御系蛋白質（4.1に結合する Calmodulin、以下 CaM と略記）に焦点を当てた。

2. 研究の目的

蛋白質の構造と細胞膜裏打ち構造の解明を基本とし、以下の5項目明らかにしようとした。

(1) 4.1R の CD44 の結合部位を一次構造上で決定し、その結合様式を明らかにする。

- (2) 対象細胞 (HeLa 細胞) での CD44、4.1R 及び同族(ファミリー蛋白質、特に 4.1G、図 3)、Ankyrin の発現と分布を特異抗体及びヒアルロン酸結合蛋白質を用いて、プロット法、細胞免疫染色により明らかにする。
- (3) *in vitro* での 4.1 およびその同族蛋白質(主に 4.1G と ezrin)の CD44 結合性及び Ankyrin-CD44 結合への影響を明らかにする。並行して、CaM による 4.1R およびその同族蛋白質の CD44 結合性を明らかにする。
- (4) 対象細胞 (HeLa 細胞) に 4.1R、4.1R の CD44 結合部位を含むポリペプチドの強制発現、CaM または蛋白質リン酸化酵素を活性化させた時の、ヒアルロン酸の CD44 結合性を明らかにする。
- (5) 相同蛋白質として 4.1R¹³⁵ と 4.1G (図 3) の細胞内局在及び膜結合性を比較し、構造 (特に FERM domain の N 末端 209 アミノ酸 (head-piece: HP) 配列の一次構造) との相関性から分子構造の機能特性を解析する。
- (6) キメラ蛋白質(4.1R¹³⁵ と 4.1G の FERM domain と HP)を用いて一次構造と機能特性の関連性を明らかにする。
- (7) 異種動物の FERM domain の膜結合様式を解析し、一次構造と機能特性の関連性を明らかにする (図 4 参照)。
- (8) CaM を対照として蛋白質二次構造の計測の生物学的意義を考察する。

3. 本研究計画の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

本研究では、細胞膜裏打ち蛋白質群を細胞の形態を維持するばかりではなく、更に高次な生命活動としての情報伝達の制御系に於ける「機能ドメイン」として捉えた点、および、世界に先駆けて細胞内から細胞外へ向かう情報伝達系が存在する可能性に着眼した点に学術的独創性が有る。特に膜 1 回貫通型蛋白質とその結合蛋白質に焦点を置き、情報伝達系に関わる蛋白質分子の解析 (蛋白質の構造) と機能 (分子間相互作用) の相関について統合的理解を目標とする。

本研究の成果として、膜貫通蛋白質と細胞膜裏打ち構造の連鎖的構造変化によるダイナミックな情報伝達プロセスが明らかになり「機能ドメイン」としての膜裏打ち構造が解明されると期待される。さらに、細胞内でおこるイ

ベントが細胞外での接着等の機能を制御する情報伝達系を明らかにする事は、癌の転移機構解明への端緒を開くものと期待でき、この研究の意義は大きいと確信する。

本研究では、生命現象を蛋白質分子の構造と機能の相関性の視点から理解するに当たり、分散専門化する生命科学の諸分野を統合的、融合的に扱うことにより、より正確な情報を得ることを目的として計画した。

4. 国内外の関連する研究の中での当該研究の位置付け

4.1R はその同族蛋白質を含めて種々の動物（線虫、硬骨魚類等下等動物でも同定されている）のすべての細胞に発現しているが、申請者らの生物化学的解析の他は細胞学的機能の解析は少ない。また、CD44 と細胞膜裏打ち構造の分子間相互作用については、Ankyrin の結合についてカリフォルニア大学グループが現在も継続研究を行っているが、4.1-CD44-Ankyrin の三者間の相互作用及び CaM による制御系を発見報告したのは申請者であり、現在、斯くの如く、本研究課題は独創的であると思われる。

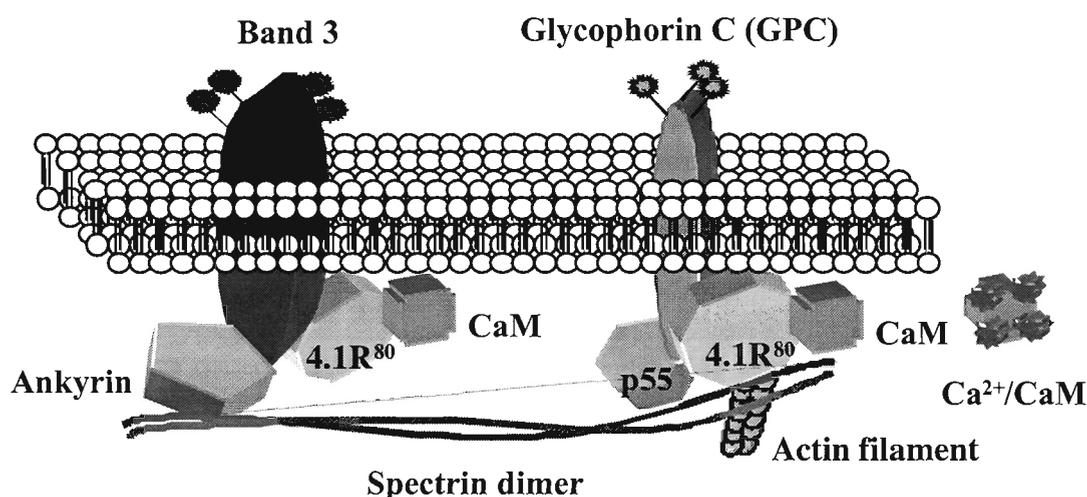


Fig.1. Organization of the erythrocyte plasma membrane. A protein network forming a “Cytoskeleton” underlies the cytoplasmic surface of the red blood Cell lipid bilayer. Spectrin (a and b), actin, adducin, 4.1R and p55 are the Main Constituents of the skeleton. Interactions between these proteins are defined as lateral interactions. This protein network is anchored to the lipid bilayer through two vertical interactions, one involving Ankyrin, and Band 3, the other one involving 4.1R, p55, and GPC.

赤血球膜の細胞膜裏打ち構造を図 1 に示した。細胞膜裏打ち構造の蛋白質群に焦点をあて、膜骨格蛋白質の分子レベルで情報伝達を理解するために、膜裏打ち構造の要であり、細胞内情報伝達にも重要な役割を果たしていると考えられる protein 4.1 蛋白質（赤血球型 80kDa を 4.1R⁸⁰、赤芽球型 135kDa を 4.1R¹³⁵ 及び全組織に発現する general type を 4.1G（図 3）の膜結合ドメインである N 末端 30kDa（所謂 FERM domain）及び 4.1R¹³⁵ の 30kDa（FERM domain）の N 末端 209 アミノ酸ポリペプチド（head-piece、HP と略記）に焦点を当て、膜貫通蛋白質（glycophorin C、以下 GPC、Band 3 或いは p55（PDZ 蛋白質）との結合解析を行い、情報伝達における膜骨格蛋白質の機能を考察した。

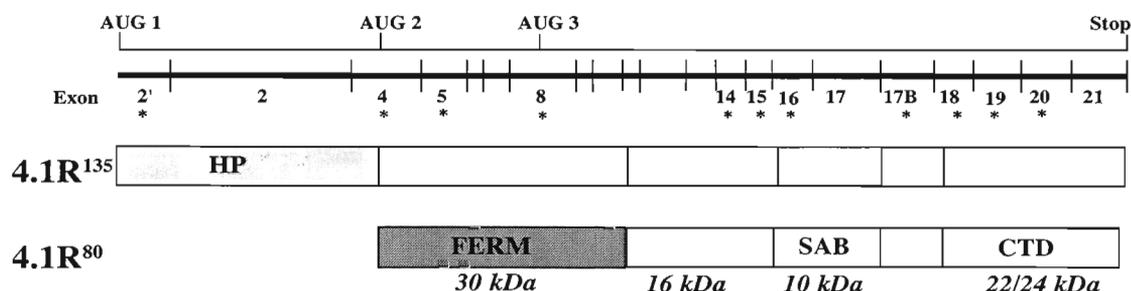


Fig.2. Primary structure of 4.1R isoforms. Translation of the prototypical red blood Cell 80 kDa 4.1R isoform (4.1R⁸⁰) is initiated at AUG-1, which is located in Exon 4. Translation of the 135 kDa 4.1R isoform (4.1R¹³⁵), an isoform expressed in early erythroblasts and other nucleated Cells, is initiated at AUG-1, which is located in Exon 1'. An updated list of the binding partners identified for each domain of 4.1R is displayed. 4.1R⁸⁰ is digested by α -chymotrypsin and generated 4 main domains, 30 kDa, 16kDa, 10 kDa and 11/14kDa domains. The 30 kDa domain named FERM domain after Four point one, Ezrin, Radixin and Moesin which have Conserved amino acid sequence (Chishti, A. H. *et al.* (1888) *Trends Biochem. Sci.* **13**, 181-181). * indicates alternative splicing Exon.

また、4.1 ファミリー蛋白質の 4.1G、4.1R の結合特性を比較することにより、4.1 ファミリー蛋白質の構造的多様性と機能分化について考察を試みた。

4.1R⁸⁰ は、膜結合部位である 30kDa domain を介して Calmodulin (CaM) と Ca²⁺非依存性に結合することが知られている（図 1 参照）。一方、ヒト赤血球膜では、Ca²⁺と CaM の複合体（Ca²⁺ 4 分子で飽和された CaM、以下では Ca²⁺/CaM と表記する）が 4.1R⁸⁰に結合すると 4.1R⁸⁰と spectrin / actin の結合が弱まり、結果として膜の安定性が低下することが知られている。4.1R⁸⁰ が

CaM と Ca^{2+} 非依存性に結合するにも関わらず、 Ca^{2+} が CaM を介した 4.1R⁸⁰ の膜結合を制御する機構を解明する為に、4.1R⁸⁰ の CaM 結合部位を決定した。

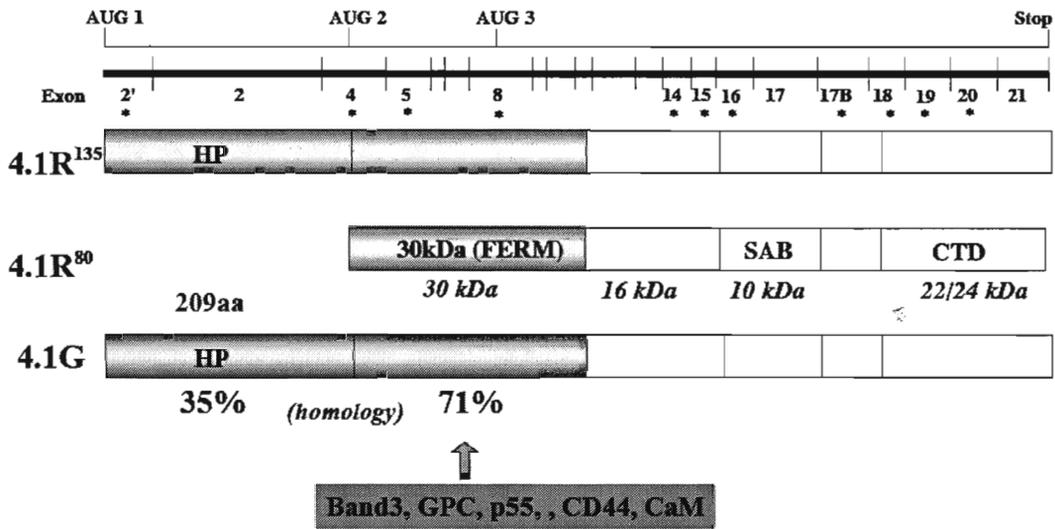


Fig. 3. Structures of 4.1R and 4.1G. 4.1R¹³⁵ and 4.1G are both expressed in erythroblasts. While the amino acid sequences of the 30kDa (*FERM*) domain of 4.1R¹³⁵ and 4.1G are highly conserved, in contrast, those of HP are unique.

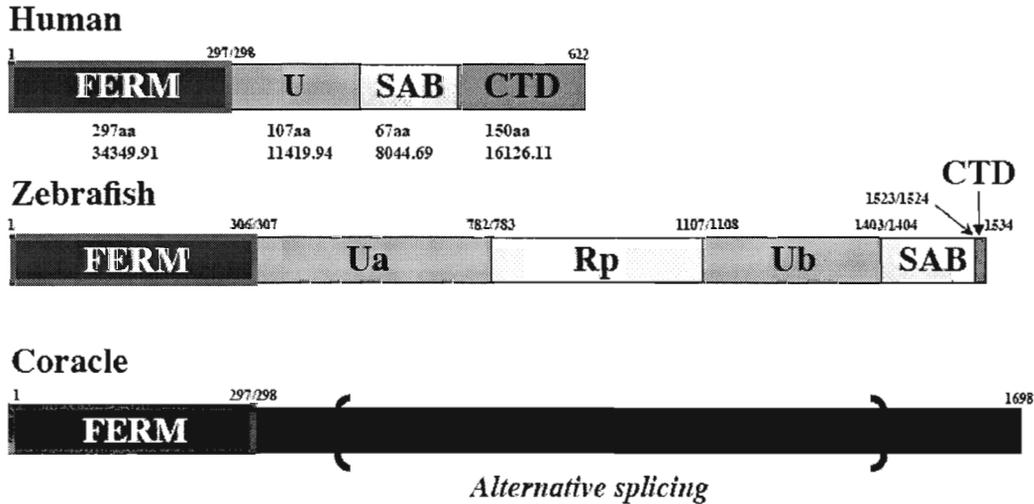


Fig.4 Primary structure of human and zebrafish 4.1R and coracle. These 4.1R family proteins have conserved FERM domain in its N-termini. The homology is high but not completely. We know well about the structure, binding profile of human 4.1R FERM domain. However, there is no report about the Zebrafish 4.1R and Coracle FERM domain. In the present study, we compared the binding profiles of these FERM domains to understand the relation of primary structure and biological significance of 4.1 proteins.

5. 本研究で明らかにしたこと（総括）

第1節 細胞生物学的解析

第1-1項 HeLa細胞を用いた4.1R-CD44結合解析

4.1RのCD44結合部位は立体構造上のC-lobe（Exon10コード領域、51アミノ酸残基）にあり、同部位に結合するp55とは競合しなかった。HeLa細胞では、赤血球型4.1R及びそのスーパーファミリー蛋白質であるEzrin（FERM domainでのホモロジーは約30%であるが、X線結晶構造解析の結果では相似性が極めて高いことが明らかになった（Han BG *et al.* Nat. Struc. Biol. 2000）、AnkyrinおよびCD44が発現していた。特異抗体を用いた細胞染色では、4.1R、及びCD44は細胞膜に局在したが、EzrinとAnkyrinは細胞質内に斑点状に局在していた。Ezrin FERM domainは、CD44細胞内ドメイン（CD44cyt）と平衡解離定数 $K_{(D)} = 5 \times 10^{-8} \text{M}$ で結合した。結合速度定数は、4.1R FERM domainとCD44との結合よりも大きかった。この事実をもとに、Ezrin FERM domainをHeLa細胞内に強制発現をすると、4.1Rは細胞質に、Ankyrinは、細胞膜に分布が変化した。抗CD44を用いた免疫沈降法により、CD44は細胞内で4.1Rと結合していることが証明された。

1) 4.1RのCD44結合部位

4.1RのCD44結合部位は立体構造上のC-lobe（Exon10コード領域、51アミノ酸残基）にあり、同部位に結合するp55とは競合しなかった。

2) 抗CD44抗体による免疫沈降法

Ezrin（FERM domainでのホモロジーは約30%であるが、X線結晶構造解析の結果では相似性が極めて高いことが明らかになった（論文））、AnkyrinおよびCD44が発現していた。特異抗体を用いた細胞染色では、4.1R、及び

CD44 は細胞膜に局在したが、Ezrin と Ankyrin は細胞質内に斑点状に局在していた。Ezrin FERM domain は、CD44 細胞内ドメイン (CD44cyt) と平衡解離定数 $K_{(D)} = 5 \times 10^{-8} \text{M}$ で結合した。結合速度定数は、4.1R FERM domain と CD44 との結合よりも大きかった。この事実をもとに、Ezrin FERM domain を HeLa 細胞内に強制発現をすると、4.1R は細胞質に、Ankyrin は、細胞膜に分布が変化した。抗 CD44 を用いた免疫沈降法により、CD44 は細胞内で 4.1R と結合していることが証明された。

第 1-2 項 135kDa 型 protein 4.1R (4.1R¹³⁵) を中心にした赤芽球での細胞膜骨格蛋白質群の発現

4.1R¹³⁵ の 30kDa FERM domain の N 末端 108 アミノ酸ポリペプチド (HP) は、30kDa FERM domain と膜蛋白質 (GPC と Band3) との結合を制御 (抑制と促進) した。つまり、GPC、Band 3 の細胞内ドメインとは各々、平衡解離定数 $\sim 10^{-6} \text{M}$ 及び解離定数 $\sim 10^{-8} \text{M}$ で結合した。この平衡解離定数は、30kDa FERM domain と各膜貫通蛋白質との平衡解離定数 $\sim 10^{-7} \text{M}$ とは異なっており、HP が 30kDa FERM domain と膜間との結合に関わっていることを示した。HP には、30kDa FERM domain よりも優位に CaM が結合した。CaM が Ca^{2+} 存在下で HP に結合すると 4.1R¹³⁵ と p55 及び GPC とは全く結合できなくなった。また、Band 3 との解離定数は $\sim 10^{-6} \text{M}$ に大きくなり結合の親和性が低下した。以上から、HP は 4.1R¹³⁵ の膜結合に大きく関わることを示した。本研究では、in living Cell (*in vivo*) の系として、ヒト赤芽球培養系を用い、4.1R¹³⁵ を中心に膜骨格蛋白質である GPC, GPA, Band3 及び p55 の経時的変化を細胞免疫染色法で観察した。その結果、4.1R¹³⁵ は、細胞質中に分布し、細胞膜には存在しなかった。一方、GPC、GPA、Band3 は培養後 5 日目には細胞膜に分布していた。p55 は、細胞膜に局在していた。

4.1R¹³⁵ が細胞膜に局在しないのは、細胞内 Ca^{2+} 濃度が高いためと考え、赤芽球を EGTA 存在下で 40 分間培養した結果、4.1R¹³⁵ は細胞膜に局在した。

HP30 は HP 領域がランダム構造であることから結晶化ができなかった。

第 1-3 項

キメラ蛋白質を用いた4.1Rと4.1Gの細胞膜結合の分子特異性の解析

4.1G は、赤芽球培養 7 日目に一過性に発現していた。4.1G の NH₂ 末端部 108 アミノ酸残基 (head-piece, HP) には Ca²⁺依存性の CaM 結合部位があり、CaM と解離定数 $\sim 10^{-8}\text{M}$ で結合した。GPC、Band3 の細胞内ドメイン及び p55 とは各々、平衡解離定数 $\sim 10^{-7}\text{M}$ で結合した。CaM が Ca²⁺存在下で HP に結合すると 4.1G と p55 及び Band3 とは全く結合できなくなった。また、GPC との平衡解離定数は $\sim 10^{-6}\text{M}$ になり親和性が低下した。

1) HeLa 細胞に発現している 4.1 蛋白質の解析

HeLa 細胞を用いた解析を行うに当たって、どのような 4.1 蛋白質アイソフォームが発現しているのかを特異抗体を用いて解析した。HeLa 細胞では、4.1G、4.1R、および 4.1N が発現していたが 4.1B は検出されなかった。

2) 赤芽球に発現している 4.1G の細胞内局在

4.1G は、赤芽球培養 7-10 日目に一過性に発現していた。抗体染色により 4.1G は赤芽球の細胞質に斑点状に染色された。また、C-末端部を認識する抗体は、免疫ブロット法にて、45kDa の位置に単一バンドを示した。

3) 4.1G と膜蛋白質の結合解析

NH₂ 末端部 108 アミノ酸残基 (head-piece, HP) には Ca²⁺依存性の CaM 結合部位があり、CaM と解離定数 $\sim 10^{-8}\text{M}$ で結合した。GPC、Band3 の細胞内ドメイン及び p55 とは各々、平衡解離定数 $\sim 10^{-7}\text{M}$ で結合した。CaM が Ca²⁺存在下で HP に結合すると 4.1G と p55 及び Band3 とは全く結合できなくなった。また、GPC との解離定数は $\sim 10^{-6}\text{M}$ になり結合の親和性が低下した。

4) キメラ蛋白質と膜蛋白質の結合解析

4.1G 及び 4.1R¹³⁵ の HP と 30kDa FERM domain をそれぞれ交互に組換えたキメラ蛋白質を作製し、その膜蛋白質及び CaM との結合特性を native 蛋白質と比較した。その結果、HP は 4.1G 及び 4.1R¹³⁵ で膜蛋白質との結合に対して特異的な制御機能が有ることが明らかになった。

第 2 節 比較生化学的解析

第 2-1 項 ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) 4.1R の比較生化学的研究

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) の 4.1R は、既にその全長 cDNA がクローニングされているが、各組織でどのようなアイソフォーム発現しているのか、また、どのように膜へ結合するのか、についてヒト (哺乳類) の 4.1R 及びショウジョウバエ (*Drosophila* sp.) の 4.1R 相同蛋白質 (Coracle) と一次、三次構造との観点から解析をした。赤血球から 3 種類の 4.1R アイソフォームをクローニングした。4.1R の N 末端 (FERM domain) および C 末端を認識する特異抗体は、赤血球膜の他、心房 (抗 CTD 抗体) 及び心室 (抗 FERM 抗体) を染色し、4.1R アイソフォームの細胞特異性が示唆された。また、赤血球膜貫通蛋白質である glycophorin C (GPC) 及び p55 に対する特異抗体を作製し、赤血球膜及び心筋細胞で局在を観察した。この結果は、ゼブラフィッシュ赤血球もヒト赤血球同様に GPC/p55/4.1R の三者複合体を形成している可能性が示唆された。一方、ゼブラフィッシュ 4.1R は、CaM と Ca²⁺ 非依存性に結合したが、Ca²⁺ で飽和した CaM (Ca²⁺/CaM) は、4.1R と GPC, p55 及び Band3 との平衡解離定数を変えなかった。

第 2-2 項 ショウジョウバエ Coracle の膜蛋白質結合解析

ショウジョウバエの細胞膜蛋白質である Coracle の N 末端 300 アミノ酸残基は FERM domain 相同性から 4.1R 相同蛋白質であり、その変異体は異常な細胞分化を誘導することが知られている。Coracle 分子のショウジョウバエの

結合蛋白質は同定されていないので、ヒト赤血球膜蛋白質をモデルとして結合解析を行った。Coracle は、ヒト赤血球反転膜 (IOV) にと共沈殿し、また、IAsys[®]で Band3, GPC と結合した。Coracle は、CaM と Ca²⁺ 非依存性に結合したが、Ca²⁺で飽和した CaM (Ca²⁺/CaM) は、4.1R と GPC, p55 及び Band3 との平衡解離定数を変えなかった。

第 3 節 生物物理学的解析

第 3-1 項 4.1R-peptide と CaM 結合の動的 2 次構造解析

蛋白質の 2 次構造解析にはフーリエ変換型中赤外分光法が有用であるが、水分子の影響を回避する為に重水を用いてきた。ブラカーオプティクス社は、軽水環境で水分子による吸収を回避して目的分子の吸光度を測定出来る装置 (ConfoCheck[™]) を開発した。

1) DSC、DSL 及び FT-IR を用いた CaM の動的二次構造解析

Calmodulin (CaM)は、4 分子の Ca²⁺を結合によりその立体構造を変化させて、標的蛋白質に結合または解離することで、標的蛋白質の機能を調節する情報伝達のセカンドメッセンジャー蛋白質である。CaM の構造は結晶化、NMR 法で解析されてきた。しかし、動的変化、温度依存性な構造解析を統合的に行った例はない。本研究では、温度依存性の動的二次構造変化を熱量 (DSC : Differential Scanning Calorimetry、示差型熱量計型)、動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering、DLS) 及びフーリエ変換型中赤外分光法 (FT-IR) で解析した。その結果、CaM は、Ca²⁺ 飽和状態では単量体であり、90°Cになっても二量体であった。また、FT-IR による測定結果でも二次構造に変化はなかった。一方、Ca²⁺ キレート状態では、CaM は 2 量体を形成しており、50°Cを越えると β -sheet 構造を介して急激に多量体形成した。

2) CaM-peptide 複合体の動的二次構造解析

前研究課題で、各種の Exon を 欠失させた 4.1R の膜結合ドメイン (N 末端 30kDa) の組換え蛋白質を用いて、反応速度論的結合解析により、4.1 の CaM の結合部位を同定した。つまり、CaM は Exon 8 (Ca²⁺ 感受性の結合) 及び Exon 11 (Ca²⁺ 非感受性の結合) の 2 箇所 (各 16 残基) に結合することを明らかにした。また、CaM が 4.1R に作用するためにはこの 2 箇所に同時に結合することが重要であることを明らかにした。更に 4.1R⁸⁰ と CaM の結合に於いて、Ca²⁺ 感受性の結合部位では S¹⁸⁵ (185 番目のセリン残基)、Ca²⁺ 非感受性の結合部位では、芳香族アミノ酸が重要な役割をしていることを明らかにした。

A¹⁸¹KKLSMYGVDLHKAKD

A¹⁶⁴KKLWVCVEHHTFFRL

本研究では、これらのペプチドが CaM と結合してどのような構造的な変化が起るかを FT-IR 法、DSC、DLS で検討した。DSC の結果は、これらのペプチドは CaM の C-lobe に結合すること、pep11 は CaM の 3 量体形成した。熱に対して、Ca²⁺存在下であっても b-sheet 構造を介して急激に多量体形成した。

第 3-2 項 4.1R FERM domain と GPC 結合の三次構造解析

4.1R 30kDa FERM domain と GPC 細胞内 domain の共結晶化により、結合部位に関わるアミノ酸を同定した。結晶構造解析の結果は、これまでに報告された生化学的解析結果を支持していた。(註:本研究は、Bong-Gyoon Han 博士 (Lawrence Berkeley National Laboratory, UCB、海外共同研究者) との共同研究で行われた結果であるが、本報告書作成時に未発表データであることから、Bong-Gyoon Han 博士の要請により詳細な結果の報告することは控えた)。

第 4 節 方法論の開発

第 4-1 項 4.1R の PKC リン酸化を利用した反転膜小胞の作製

ヒト赤血球の反転膜小胞を利用した蛋白質-膜結合の解析には、pH11 処理や沃化カリウム処理による過酷な条件により、残存蛋白質の除去をした。このため、目的とする膜貫通蛋白質のみならず膜脂質の変性がある条件化で結合解析を行って来た。一方、赤血球膜骨格の要である 4.1R を PKC でリン酸化されると、spectrin/actin、GPC から解離することが報告された (Manno *et al.* JBC、1005)。本研究では、4.1R を PKC でリン酸化した後に反転膜小胞を作製することで、強度の変性条件による残存蛋白質除去を回避し、得られた反転膜小胞の蛋白質を解析し、4.1R30kDa domain との結合解析を行った。その結果、本法を用いることにより IOV 作製の簡便化、及び結合分子数の増加に成功した。

第 4-2 項 4.1R 30kDa FERM domain に対する単クローン抗体の作製

4.1R は、種々の赤血球のみならず種々の細胞で発現していることが、mRNA レベル、蛋白質レベルで報告されている。単クローン抗体は、抗原検出のための強力な手段であるとともに、部位特異的な単クローン抗体は、結合を阻害することが出来ることから、新たな機能解析が期待できる。膜結合部位である 30kDa domain に対する単クローン抗体 (4 種類) を確立し、その結合特性、結合部位、膜との結合阻害を検討した。4 種類の抗体はいずれも 30kDa FERM domain の外表面を認識するが、#8 と #7 は、 β -sheet 構造、#5 は random 構造、#7 は α -helix 構造を認識しており、抗原の構造に共通性はなかった。立体構造上の 3 つのドメインを各々認識する抗体を得た。ただし、膜貫通蛋白質との結合部位とは異なっていた。抗体を用いて GPC の結合部位を 80 アミノ酸残基に絞った。各抗体の免疫ブロットへの応用を検討し、#5 抗体の汎用性を示した。

第 2 節 發表業績

研究組織：

研究代表者：布村 渉（東京女子医科大学医学部生化学・助手）

分担研究者：高桑雄一（東京女子医科大学医学部生化学・教授）

分担研究者：伊東栄子（東京女子医科大学看護学部生化学・助教授）

研究協力者：Bong-Gyoon Han (Lawrence Berkeley Natl. Lab., UCB, USA)

研究協力者：Philippe Gascard (Lawrence Berkeley Natl. Lab., UCB, USA)

研究協力者：服部美奈子（東京女子医科大学医学部産婦人科・助手¹⁾）*

研究協力者：澤田賢一（秋田大学医学部血液腎臓内科・教授）*

研究協力者：瀧保広美（秋田大学医学部血液腎臓内科・技官）*

研究協力者：坂口安史（日本シーベルヘグナー）*

研究協力者：笹倉大督（日本ブルカーオプティクス株式会社）*

研究協力者：志波公平（Sysmex Corporation）*

研究協力者：村田健二（Department of Animal Science, UC Davis, USA）*

研究協力者：Marilyn Parra（Lawrence Berkeley Natl. Lab., UCB, USA）*

（*の研究協力者は、本研究費補助金申請時に研究協力者として申請しなかったが、研究開始後に当事者に承諾を得て、研究の協力を頂いた方々である）

（¹⁾平成18年12月退職）

交付決定額：

平成15年度 直接経費 2,000千円

平成16年度 直接経費 600千円

平成17年度 直接経費 600千円

（総額 3,200千円）

研究発表業績^註：

(註：本補助金で得られた成果で平成15年から平成19年2月までに発表された業績について記載した)

(1) 誌上発表^註

(註：研究代表者関連発表のみを掲載)

Regulation of protein 4.1R interactions with membrane proteins by Ca²⁺ and calmodulin (*invited review*)

Nunomura W. and Takakuwa Y.

Frontiers in BioScience **11**:1522-1539 (2006)

Regulation of ankyrin interaction with CD44 by protein 4.1 in HeLa cells.

Hattori, M., Nunomura, W., Ito, E., Ohta, H., and Takakuwa, Y.

Membrane **31(2)**: 107-114 (2006)

Putative tumor suppressor protein 4.1B is differentially expressed in kidney and brain via alternative promoters and 5' alternative splicing.

Gascard, P., Parra, M.K., Zhao, Z., Calinisan, V. R., Nunomura, W., Rivkees, S.A., Mohandas, N., and Conboy, J G.

Biochim. Biophys. Acta **1680**: 71-82 (2004)

Mature parasite-infected erythrocyte surface antigen (MESA) of *Plasmodium falciparum* binds to the 30-kDa domain of protein 4.1 in malaria-infected red blood cells.

Waller, K.L., Nunomura, W., An, X.L., Mohandas, N., and Coppel, R. L.

Blood **102**: 1911-1914 (2003)

Protein 4.1 as a modulator of membrane skeletal organization and function of erythrocyte. (*invited review*)

Nunomura, W. and Takakuwa Y.

Recent Research Developments in Cell Research **1**:67-76 (2003)

(2) 学会発表

平成15年度 (2003年)

Protein 4.1G と膜蛋白質との結合について

日本膜学会第25年会講演要旨集 77頁 2003年5月

布村 渉、Mohandas, N.、高桑雄一

腎型 protein 4.1B (4.1B^{AUG2}) と膜蛋白質の結合解析

日本生化学会 2003 年 10 月

布村 渉、Gascard, P.D.、Mohandas, N.、高桑雄一

Ca²⁺ and calmodulin do not regulate 4.1B isoform 4.1B^{AUG2} binding to membrane proteins.

Nunomura, W., Parra, M., Orlowski, J., Narla, M., Takakuwa, Y., and Gascard, P.D.

43rd American Society for Cell Biology Annual Meeting (2003, 12, SanFrancisco, USA) *Mol. Biol. Cell* **14**, 55a (suppl.) (2003)

4.1R regulation of ankyrin interaction with CD44 : *In vivo* demonstration

Hattori M., Nunomura, W., Ito, E., Ohta H., and Takakuwa, Y.

43rd American Society for Cell Biology Annual Meeting. (2003, 12, SanFrancisco, USA) *Mol. Biol. Cell* **14**, Late Abstracts (suppl.) (2003)

平成 16 年度 (2004 年)

腎型 4.1B の膜蛋白質との結合解析

日本膜学会第 26 年会講演要旨集 51 頁

布村 渉、Gascard, P.D.、Mohandas, N.、高桑雄一

Functional analysis of head-piece region of protein 4.1R and 4.1G interactions with membrane proteins by chimera protein

2004 年 10 月 13 日生化学 76(8)1093

布村 渉、Gascard, P.D.、Parra, M.、Mohandas, N.、高桑雄一

平成 17 年度以降 (2005 年)

キメラ蛋白質による 4.1R と 4.1G の膜結合性の解析

日本膜学会第 27 年会

2005 年 5 月 13 日講演要旨集 69 頁

布村 渉、Gascard, P.D.、Parra, M.、Mohandas, N.、高桑雄一

Protein 4.1R の calmodulin 結合特性

第 5 回日本蛋白質科学会大会

2005 年 6 月 30 日プログラム 要旨集 80

布村 渉、高桑雄一

赤外分光法を用いたカルモジュリンの熱挙動に関する研究

第 5 回日本蛋白質科学会大会

2005年6月30日プログラム 要旨集 85
笹倉大督、古頭謙一、三浦剛、布村 渉、高桑雄一

Evaluation of the role of the headpiece region of cytoskeletal proteins 4.1R and 4.1G in regulation of their interaction with CD44 in HeLa cells
第78回日本生化学会大会 2005年10月13日
生化学 77(8) #854
布村 渉、Gascard, P.D.、 Mohandas, N.、高桑雄一

Characterization of mouse monoclonal antibodies to human protein 4.1R 30kDa domain
第78回日本生化学会大会 2005年10月13日
生化学 77(8) #855
布村 渉、畠山雅彦、高桑雄一

Interactions of zebrafish (*Danio rerio*) protein 4.1R with membrane proteins and calmodulin: comparative studies on its binding properties
第78回日本生化学会大会 2005年10月13日
生化学 77(8) #856
布村 渉、村田健二、高桑雄一

<ミニシンポジウム採択演題>

Interactions of zebrafish (*Danio rerio*) protein 4.1R with membrane proteins and calmodulin: comparative studies on its binding properties
第78回日本生化学会大会 2005年10月13日
生化学 77(8) #856
布村 渉、村田健二、高桑雄一

Calmodulin による新しい結合制御機構の解析：protein 4.1R と赤血球膜蛋白質の結合制御
第43回日本生物物理学会大会 2005年11月23日
生物物理(第43回年会予稿集)45(1)S58
布村 渉、高桑雄一

カルモジュリンの二次構造の赤外分光法による解析
第43回日本生物物理学会大会 2005年11月23日
生物物理(第43回年会予稿集)45(1)S53
布村 渉、高桑雄一

Functional analysis of zebrafish (*Danio rerio*) protein 4.1R binding to membrane proteins and calmodulin.
Nunomura, W., Murata, K., and Takakuwa, Y.

45th American Society for Cell Biology Annual Meeting (2005, 12, SanFrancisco, USA) *Mol. Biol. Cell* **16** (suppl. in CD ROM #2608) (2005)

The immunochemical analysis of Protein 4.1R in zebrafish (*Danio rerio*)
Murata, K., and Nunomura, W.
45th American Society for Cell Biology Annual Meeting (2005, 12, SanFrancisco, USA) *Mol. Biol. Cell* **16** (suppl. in CD ROM #2610) (2005)

Novel insights into binding properties of cytoskeletal proteins:4.1R and 4.1G with CD44 in HeLa cells.
Gascard, P.D. Nunomura, W., Parra, M., and Takakuwa, Y.
45th American Society for Cell Biology Annual Meeting (2005, 12, SanFrancisco, USA) *Mol. Biol. Cell* **16** (suppl. in CD ROM #2606) (2005)

Role of the head-piece region on cytoskeletal proteins 4.1R and 4.1G interactions with red cell membrane proteins.
Nunomura, W., Gascard, P.D., Parra, M., Narla, M., and Takakuwa, Y.
45th American Society for Cell Biology Annual Meeting (2005, 12, SanFrancisco, USA) *Mol. Biol. Cell* **16** (suppl. in CD ROM # 2607) (2005)

Functional characterization of cytoskeletal protein 4.1R interaction with Na⁺/H⁺ exchnager NHE1.
Nunomura, W., Denker, S.P., Watts, B.A., Calmisan, V., Grinstein, S., Orłowski, J., Brugnara, C., Mohandas, N., Good, D. W., and Gascard, P.D.
45th American Society for Cell Biology Annual Meeting (2005, 12, SanFrancisco, USA) *Mol. Biol. Cell* **16** (suppl. in CD ROM # 2609) (2005)

Protein 4.1R 由来ペプチドの結合した calmodulin の二次構造及び熱量解析
第 6 回日本蛋白質科学会大会
2006 年 4 月 24 日
プログラム 要旨集 75 頁
布村 渉、笹倉大督、高桑雄一

Zebrafish (*Danio rerio*) の 4.1R と膜蛋白質の結合解析
布村 渉、村田健二、高桑雄一
日本膜学会第 28 年会 (北海道大学学術交流会館)
2006 年 6 月 9 日

講演要旨集 73 頁
布村 渉、村田健二、高桑雄一

Thermodynamic analysis of calmodulin binding to peptides derived from protein 4.1R

Wataru Nunomura and Yuichi Takakuwa
20th IUBMB International Conference of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Conference.

(第 79 回日本生化学会大会 2006 年 6 月 13 日)

Abstract 4P-B-243, p638

Wataru Nunomura and Yuichi Takakuwa

Evaluation of second structure of calmodulin using infrared spectroscopic analysis.

Wataru Nunomura and Yuichi Takakuwa
20th IUBMB International Conference of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Conference.

(第 79 回日本生化学会大会 2006 年 6 月 13 日)

Abstract 4P-B-243, p638

Daisuke Sasakura, Wataru Nunomura and Yuichi Takakuwa

Fourier-transform infrared spectroscopic analysis of the calmodulin binding with peptide of protein 4.1R in physiological solution

Wataru Nunomura, Daisuke Sasakura and Yuichi Takakuwa

第 44 回日本生物物理学会大会

2005 年 11 月 12 日

生物物理(第 44 回年会予稿集) 46(1)S297

Importance of β -sheet structure for heat stability of Ca^{2+} saturated calmodulin: Fourier-transform infrared spectroscopic analysis in physiological solution.

Daisuke Sasakura, Wataru Nunomura and Yuichi Takakuwa

第 44 回日本生物物理学会大会

2005 年 11 月 12 日

生物物理(第 44 回年会予稿集) 46(1)S316

Isoform of protein 4.1R in blood cells of zebrafish (*Danio rerio*): analysis of membrane binding proteins

Nunomura, W., Murata, M. and Takakuwa, Y.

46th American Society for Cell Biology Annual Meeting (2006, 12, San Diego, USA) *Mol. Biol. Cell* **17** (suppl. in CD ROM #1764) (2006)

Immunochemical studies on the isoform of protein 4.1R during erythropoiesis

Nunomura, W., Hebiguchi, M., Kataho, H., Sawada, K., Narla, M. and Takakuwa, Y.

46th American Society for Cell Biology Annual Meeting (2006, 12, SanDiego, USA) *Mol. Biol. Cell* **17** (suppl. in CD ROM #1763) (2006)

Tissue-specific alternatively spliced Protein 4.1R Isoforms in the heart and blood of the Zebrafish, *Danio rerio*.

Murata, k., Chu, D. B., Shimada, E., Cherr, G. N. and Nunomura, W.

46th American Society for Cell Biology Annual Meeting (2006, 12, SanDiego, USA) *Mol. Biol. Cell* **17** (suppl. in CD ROM #1765) (2006)

第 2 章 研究の成果

第 1-1 項 HeLa 細胞を用いた 4.1R-CD44 結合解析

[目的]

我々は、これまでに表皮角化細胞に於いて細胞膜貫通蛋白質である CD44 に 4.1R が結合すること、4.1R は、CD44 と Ankyrin の結合を制御すること、4.1R と CD44 の結合は 4.1R 30kDa FERM domain. に結合する CaM が Ca^{2+} によって飽和されることによって制御されることを報告した (Nunomura et al. 1997)。さらに、CD44 はヒアルロン酸と結合するが、この結合は細胞内で Ankyrin と結合することが必要である (Bourguignon et al. 1986)。

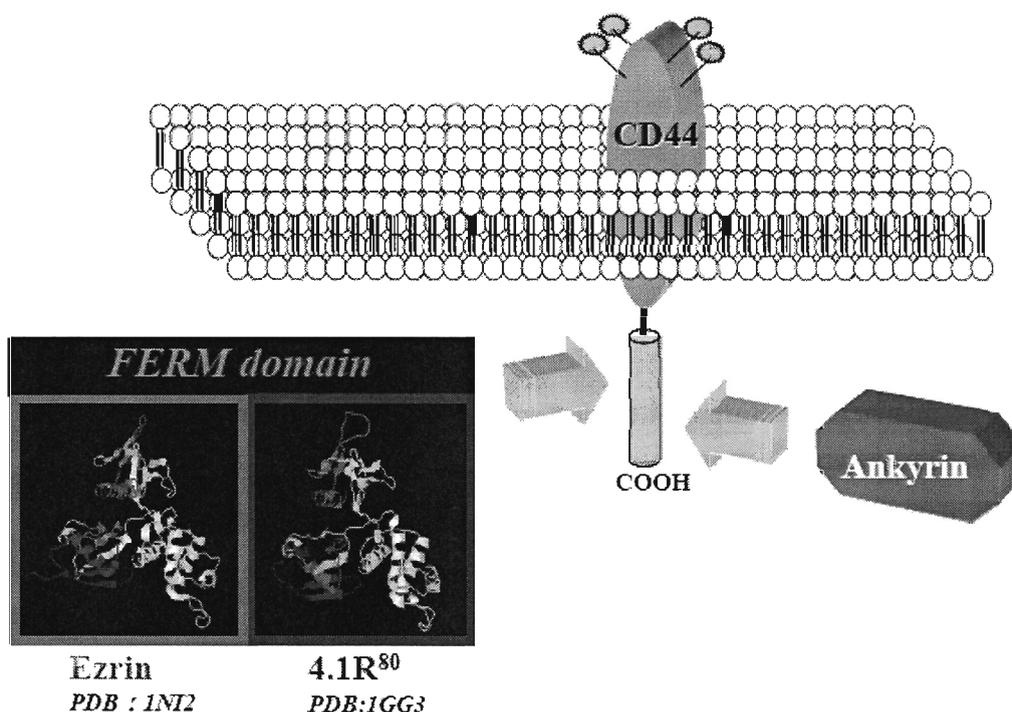


Fig.1 CD44 can bind both of Ezrin and 4.1R⁸⁰. We have reported that 4.1R⁸⁰ inhibits Ankyrin binding to CD44. However, there is no report about the relation of ezrin-CD44-Ankyrin. The 3D structure of FERM domain of ezrin and 4.1R was reported.

FERM domain のファミリー蛋白質である ezrin 或は radixin も CD44 結合蛋白質であることが報告されている (Tsukita S et al. 1997)。しかし、同族の蛋白質で有り乍らその作用の相同性、つまり Ankyrin の CD44 結合の制御機能などについては全く解明されていない。相同蛋白質が同一の標的蛋白質に結合する時、どのような制御機構（振り分け）が働くのか、また、なぜ相同（少し異なる）蛋白質が必要なのか、未だ不明な点が多い。これが解ければ、蛋白質構造に派生した多様性の生物学的意義が解けると期待される。

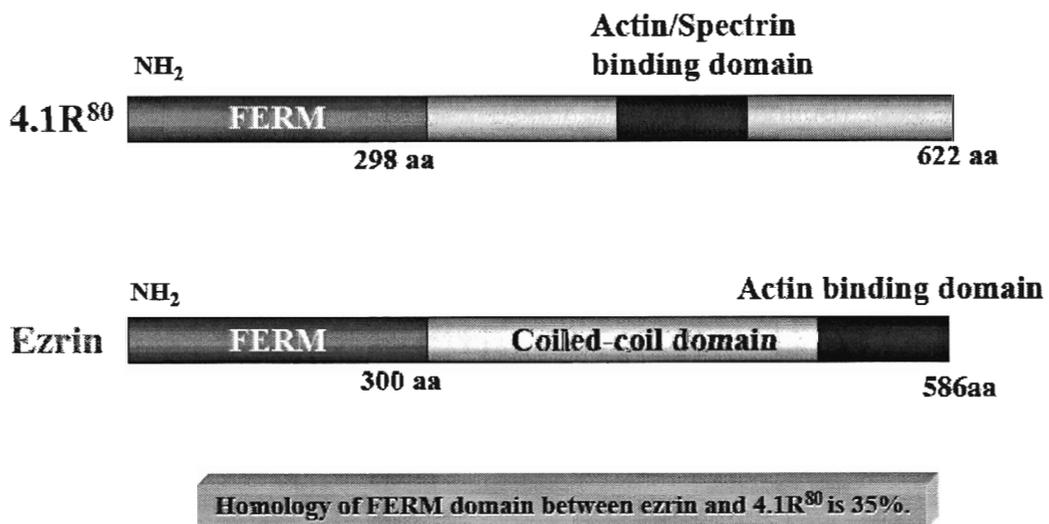


Fig.2 The primary structure of 4.1R and ezrin. As shown in Fig.1, the FERM domain. of 4.1R⁸⁰ and ezrin was high identical. The primary structure of these proteins was not high identical. 4.1R⁸⁰ binds spectrin and actin. Ezrin binds actin in its C-terminal domain..

本研究では、既に立体構造が解けている ezrin と 4.1R FERM domain.の CD44 結合性を比較し、Ankyrin の CD44 への結合性を検討した。また、HeLa cell を用

い生細胞内でこの相同蛋白質がどのような挙動をするかを明らかにすることにより、構造多様化の意義を考察することを目的とした。

[材料と方法]

1. 材料

pGEX-4T2 vector (Glutathione-S-transferase (GST) tag 融合蛋白質大腸菌発現用) は GE Healthcare BioSciences Life Sciences 社 (USA) から購入した。pEGFP-C3 vector (GFP 融合蛋白質真核細胞発現用) は Clontech 社 (USA) から購入した。

2. 細胞

HeLa 細胞は、東京女子医科大学医学部第一病理学教室澤田達夫教授より分与して頂いた。HeLa 細胞は、RPMI 培地に 10% FBS (牛胎児血清、GIBCO 社より購入) 添加し、37°C、5% CO₂、95% 湿度で培養した。

3. 組換え蛋白質の作製

組換え 4.1R 及び Ezrin の FERM domain、CD44 の細胞内ドメインは、pGEX-4T2 (Amersham Biosciences) に組込み、大腸菌 (*Escherichia coli*) BL21 株を形質転換した。これらの CDNA は、Dr. Gascard Philippe (海外共同研究者、Life Science Division, Lawrence Berkeley National Laboratory UC Berkeley, CA, USA) より供与

して頂いた。また、4.1R の Exon 10 欠損および部分ポリペプチド(図 3)は pGEX-4T2 に組換え、大腸菌 (*Escherichia coli*) BL21 株を形質転換した。

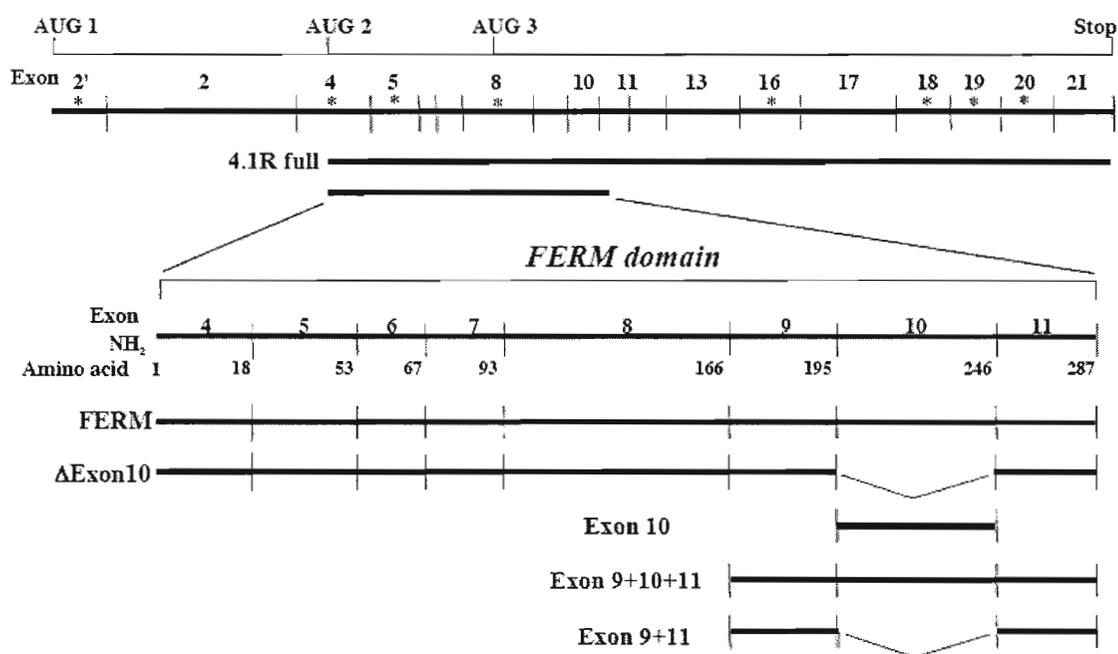


Fig.3 Constructs of 4.1R FERM domain and its fragments.

LB 培地にて大腸菌を 37°C 一定条件下で震盪培養し、 OD_{600} の値が 0.4~0.8 に達した時に、IPTG を最終濃度 (1mM) 添加し、さらに 37°C 一定条件下で 3 時間震盪培養した。pGEX-4T2 ベクターで形質転換した大腸菌は、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、8000rpm、4°C、8 分間) 沈澱後、1mMEDTA、1mM DFP、1mM 2ME を添加した B-PER™ (PIERCE、USA) に懸濁し溶菌した。溶菌液は氷上 10 分間の超音波処理後、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、18,000rpm、20 分間) の上清を得た。上清は、Glutathione-Sepharose (Amersham Biosciences) と懸濁し、GST 融合蛋白質を分離した。GST 融合蛋白質はトロンビン処理によ

り標的蛋白質と GST を切断した後、GST を Glutathione-Sepharose にて吸収し、Q-Sepharose (Amersham BioSciences) で更に精製した。蛋白質の純度は SDS-PAGE にて検定した。蛋白質量は UV 法を用いた (280nm と 260nm を測定し、蛋白質濃度 (mg/ml) = $1.45 A_{280} - 0.74 A_{260}$) 。

4. 赤血球の 4.1R と Ankyrin の精製

健康青年男子にインフォームドコンセントをした後、血液を採取した。白血球をフィルター除去後に、冷却した PBS により血漿成分を遠心除去した。低張溶液でヘモグロビンを遠心除去したのち、常法 (EDTA 低張溶液) に従って反転膜小胞を作製した。Tyler *et al.* (1980) 及び Bennett and Stenbuck (1980) の方法に従って、遠心沈殿を 2M KCl で処理した遠心上清を Q-Sepharose により精製し、Ankyrin を得た。純度は SDS-PAGE で検討した。蛋白質量は UV 法を用いた (280nm と 260nm を測定し、蛋白質濃度 (mg/ml) = $1.45 A_{280} - 0.74 A_{260}$) 。

5. 抗体

抗 4.1R 抗体は、上記の方法で精製した 4.1R⁸⁰ を家兎に免疫して得た。各々の抗体は、抗原をカップリングした Sepharose 6B (GE Healthcares Biosciences) カラムクロマトグラフィーにより、アフィニティー精製された。抗体の特異性は免疫ブロット法で確認した。マウス抗 c-myc 抗体及びマウス抗 ezrin 抗体は CLONTECH から購入した。抗 CD44 抗体 (clone: BU52; Isotype: IgG₁) は Santa Cruz から購入し、抗 Ankyrin

抗体は Santa Cruz から購入し、抗体の特異性は免疫ブロット法で確認した。抗 30kDa 抗体は、マウス単クローン抗体を用いた。単クローン抗体の作製及び抗原決定基（エピトープ）解析は、第4節第2項に記した。マウス抗アクチン単クローン抗体は、シグマから購入した。西洋ワサビ（HRP）コンジュゲートした2次抗体は、DAKO から購入した。蛍光色素（Cy3）をコンジュゲートした2次抗体は、Sigma から購入した。蛍光色素（FITC）をコンジュゲートした2次抗体は、DAKO から購入した。

6. 細胞内強制発現

cDNA（ezrin FERM domain）を pCMV ベクターに組み込み、塩基配列を確認後、大腸菌（*Escherichia coli*）DH5 α を形質転換した。大腸菌から無菌的にベクターを QuiaPrep[®]を用いて分離精製し、サブコンフルエントの HeLa 細胞に Amaxa 導入試薬を用いて形質転換した。

7. 免疫沈降法

RIPA 緩衝液で溶解した HeLa 細胞を Protein G-Sepharose（GE Healthcares Biosciences）で前処理した後、抗 CD44 抗体を 4°C で 24 時間混和し、Protein G-Sepharose（GE Healthcares Biosciences）を用いて免疫沈降を行った。ビーズは RIPA 緩衝液でよく洗浄した後、SDS サンプル緩衝液で処理し SDS-PAGE に供した。

8. 蛋白質-蛋白質間の結合解析。

蛋白質-蛋白質間および蛋白質ペプチド間の反応速度論的解析には、Affinity Sensor 社(ケンブリッジ、UK)の Resonant Mirror Detection (RMD)法による IAsys[®] 装置を用いた(図 5 参照)。蛋白質或いはペプチドは、10mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH7.4 緩衝液(0.1M NaCl を含む、以下 PBS と略記)に 100 mg/ml の濃度に溶解しアミノシランキュベット上に、BS³ (Pierce 社、USA) を介して固相化した。ペプチドの固相化には、一旦アミノシランキュベット上に BSA を BS³ を介して固相化したのち、NHS/EDC にて BSA のアミノ基を活性化する方法も共用した。反応には、10mM Tris HCl 緩衝液 pH7.5、0.1M NaCl (Buffer A) に対して 1mM EGTA 或いは 1mM EGTA と 2mM CaCl₂ を加えて用いた(図 2 参照)。キュベット内の反応温度は 25°C 一定に保ち、一定速度で攪拌した。反応に関わるパラメーター(結合速度定数、解離速度定数、最大結合量)は専用解析ソフトを用いて計算した。平衡解離定数 ($K_{(D)kin}$) は、結合速度定数 (k_d) と解離速度定数 (k_a) の比から以下の式で求めた。

$$K_{(D)kin} = k_d / k_a$$

(本文中では、平衡解離定数は $K_{(D)}$ で表示した)。

9.細胞染色

HeLa 細胞は、カバーグラス上にて RPMI1640 培地(10%FBS 含有)で培養した。細胞は、PBS で洗浄後 4%のフォルムアルデヒド/PBS で室温 30 分固定した。PBS 洗浄後に、50mg/ml BSA で非特異的反應をブロッキングした。細胞膜の可

溶化は、0.5% Triton X-100/PBS を室温 10 分で行った。抗 CD44 抗体（一次抗体）を室温 1 時間反応させた。PBS で洗浄後に、蛍光色素結合 2 次抗体を室温で

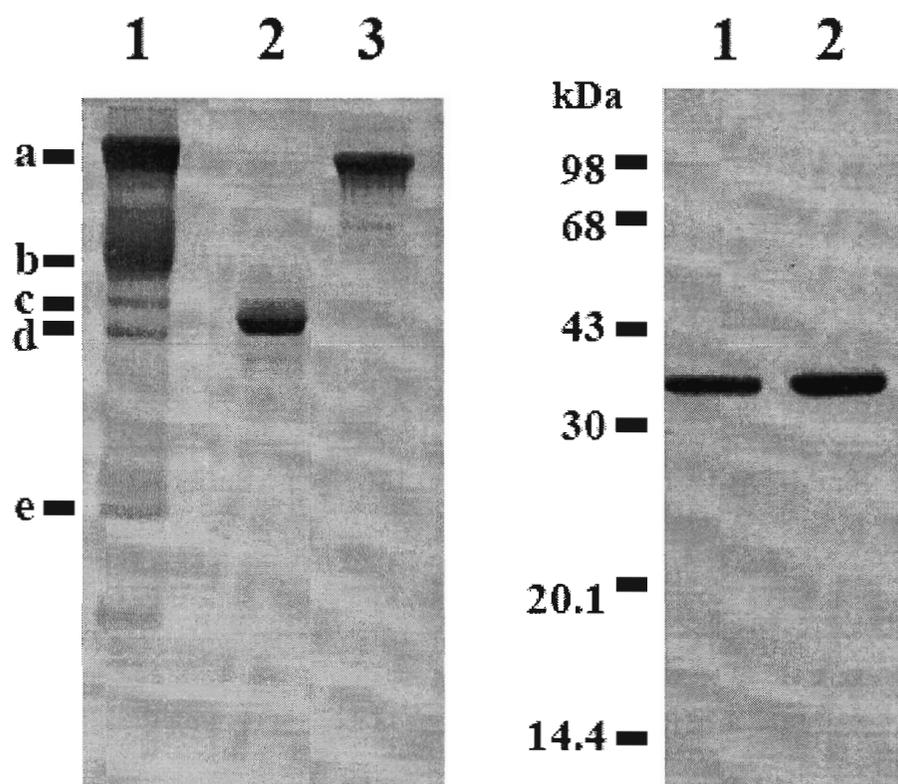


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of purified proteins. A. CBB staining of erythrocyte ghost proteins (*lane 1*), purified 4.1R (*lane 2*) and ankyrin (*lane 3*). Apparent molecular weight of spectrin (*a*), band 3(*b*), 4.1R(*c*), protein 4.2 (*d*) and actin (*e*) are 220, 110, 80, 72 and 43kDa, respectively. B. Purified recombinant FERM domains of 4.1R (*lane 1*) and ezrin (*lane 2*).

30 分反応させた。PBS で洗浄後に Vectashield® (Vector Laboratories Inc. USA) で封入した。対照実験は、一次抗体を PBS のみに置き換えて同様に処理した。蛍光顕微鏡は、共焦点レーザー顕微鏡 (CSU 10 confocal scanning laser microscope、Yokogawa Electric Co., Japan) を用いて観察した。

[結果と考察]

1. 精製蛋白質の電気泳動的解析

赤血球膜から精製された 4.1R (80kDa) 及び Ankyrin (220kDa) は期待された分子量に位置に単一バンドとして泳動された。Ezrin 及び 4.1R の FERM domain の組換え蛋白質は共に GST 除去後に ~35kDa の位置に単一バンドとして泳動された (図 4)。

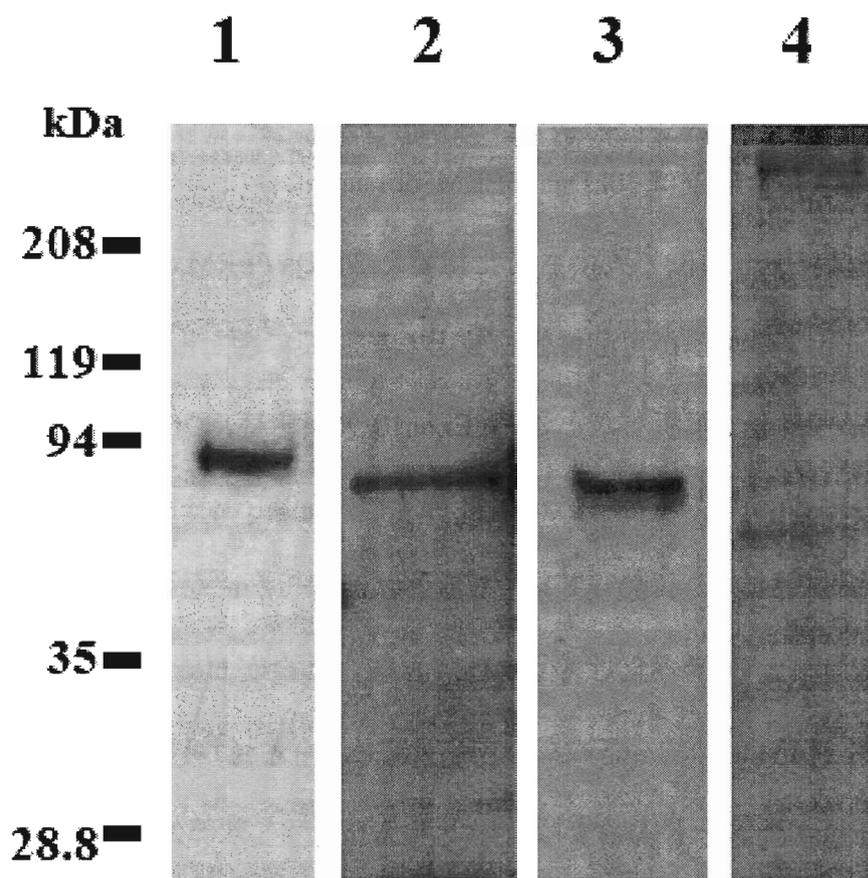


Fig. 5. Immunoblot analysis of proteins in HeLa cells. Immunoblot analysis of the extract of HeLa cells with antibodies to CD44 (*lane 1*), 4.1R⁸⁰ (*lane 2*), Ezrin (*lane 3*) and Ankyrin (*lane 4*).

2. HeLa 細胞に於ける膜蛋白質の発現

HeLa 細胞には、分子量 \sim 90kDa の CD44、4.1R⁸⁰、Ezrin 及び Ankyrin が発現していることが、特異抗体を用いた免疫ブロット法で明らかになった。また、各抗体は抗原に対して特異的であることが示された。尚、この解析では細胞分画を施行していないので細胞内局在に関する結果は得られない (図 5)。

3. 4.1R⁸⁰ の CD44 結合部位

4.1R の CD44 結合部位は 30kDa FERM domain に存在することを既に報告した。本研究では、Exon 単位で欠損させた組替え 30kDa FERM domain (Exon5, Exon 8, Exon10, Exon11 の欠損が可溶性蛋白質として精製できた) と CD44 固相化アミノシランキュベットで解析したところ、Exon10 欠損組替え 30kDa FERM domain は全く反応しなかった。また、Exon9-11 及び Exon9+Exon11 がコードする立体構造上の C-lobe、51 アミノ酸残基) にあることが明らかになった (表 1)。Exon10 がコードするポリペプチドだけでも CD44 と結合したが、結合速度定数 (k_a) は 30kDa FERM domain の約 25%になっていたことから、CD44 の結合には立体構造できにも Exon10 コード領域ではないと考えられる。同部位に結合する p55 とは競合しなかったことから、CD44 と p55 は 51 アミノ酸残基の別々の部位に結合すると考えられた。

Table I. FERM domain binding to CD44cyt

Analyte	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
4.1R full	$3.0 \pm 0.10 \times 10^4$	$9.0 \pm 0.06 \times 10^{-3}$	300
4.1R FERM domain	$3.0 \pm 0.16 \times 10^4$	$1.1 \pm 0.01 \times 10^{-2}$	367
4.1R FERM domain Δ Exon 10	No Binding	No Binding	No Binding
Exon 10	$7.2 \pm 0.16 \times 10^3$	$1.2 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	1667
Exon 9+10+11	$7.7 \pm 0.16 \times 10^3$	$6.4 \pm 0.20 \times 10^{-3}$	831
Exon 9+11	No Binding	No Binding	No Binding
ezrin FERM domain	$3.2 \pm 0.10 \times 10^5$	$1.7 \pm 0.08 \times 10^{-2}$	53

Each analyte (50nM to 2 μ M) was incubated with the CD44cyt immobilized on the aminosilane cuvette and from the binding curves obtained by the RMD method, k_a , k_d and K_D values were determined as described under *Materials and Methods*. All analytes did not bind to BSA immobilized cuvette. GST did not bind to CD44cyt.

4. FERM domain と CD44 の結合

表 1 に示したように、4.1R はその FERM domain と同様に平衡解離定数約 300nM で結合した。一方、Ezrin の FERM domain と CD44 の平衡解離定数は 53nM で有り、4.1R よりも低かった（親和性が高い）。この平衡解離定数の違いは、結合速度定数の違いによる、つまり Ezrin FERM domain の方が約 10 倍高いことに起因していた。この事実は、Ezrin と 4.1R が CD44 との結合を競合した時（分子数は同数と仮定する）Ezrin が優位に CD44 に結合することを示している。一方、Ezrin の細胞内分布は免疫細胞学的に、Ezrin 分子は HeLa 細胞質内に分布し

ており、細胞膜には観察されなかった。これらの事実から、Ezrin は 4.1R と競合させるのに適当な分子と考えられた。

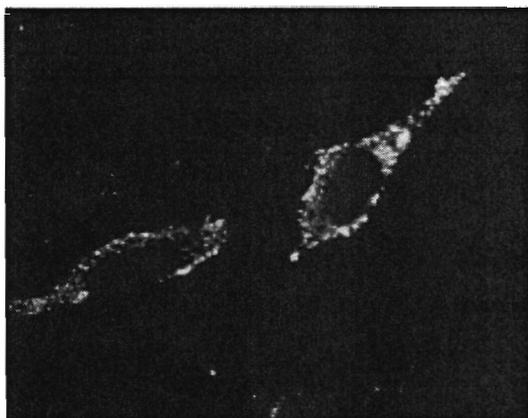


Fig. 6. Distribution of Ezrin in HeLa cells. Mouse anti Ezrin antibody was detected by FITC-conjugated anti mouse immunoglobulins. Ezrin distributed in the cytoplasm as dot.

5. Ankyrin-CD44 結合への FERM domain の影響

我々は、4.1R は CD44 に結合すると Ankyrin が結合でなくなることを報告した。しかし、相同な立体構造を持つ Ezrin が同様な機能を持つか否かは不明であった。図 7 に IAsys の結合図を示した。Panel A に示したように 4.1R をあらかじめ結合させた CD44 細胞内ドメイン固相化アミノシランキュベットを洗浄後に Ankyrin を添加しても結合しなかった。Panel B に示したように、Ezrin (FERM domain) を同様に CD44 細胞内ドメイン固相化アミノシランキュベット結合させた後であっても Ankyrin は結合した。この結果は、CD44 から 4.1R が解離し、Ezrin が結合する (交換する) ことによって、Ankyrin が CD44 に結合しすることが示唆された。以上の結果から、Ezrin FERM domain の HeLa 細胞内強制発現を試みた。対照としては、pCMV vector のみをトランスフェクトした。抗 CD44 抗

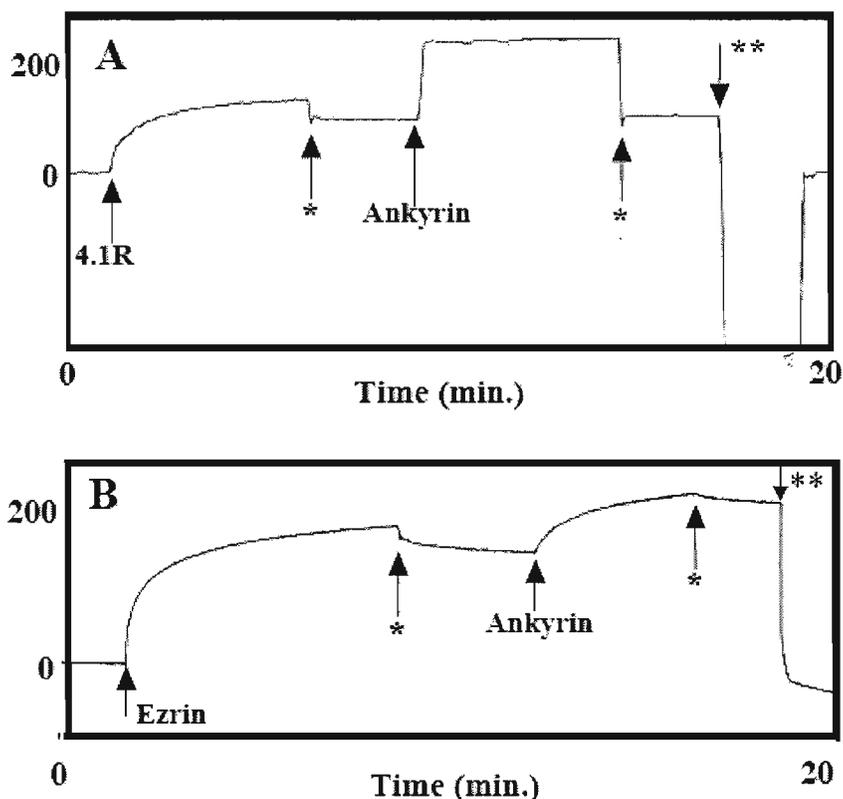
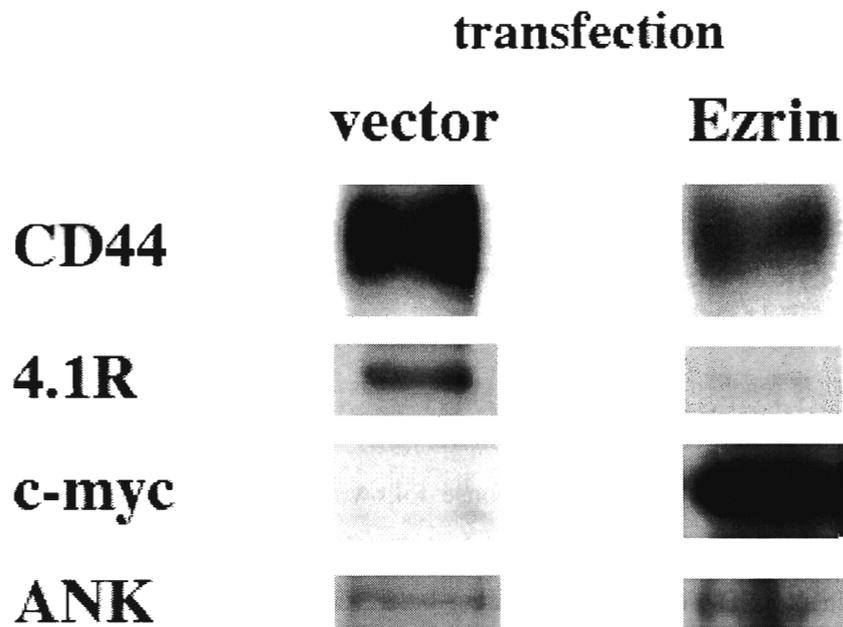


Fig. 7. Typical tracings from IAsys® to monitor protein interactions. Panel A, to examine the effects of 4.1R on ankyrin binding to CD44cyt, 100 μ l binding buffer containing 4.1R (1.8 μ M) were introduced into an aminosilane cuvette with immobilized CD44cyt. After binding response of 4.1R reached maximum, the cuvette was washed with binding buffer (*wash*) and 100 μ l binding buffer containing ankyrin (0.4 μ M) was introduced into the cuvette. The absence of sustained net change in response following washing with binding buffer would indicate absence of specific ankyrin binding. Panel B, to examine the effects of ezrin on ankyrin binding to CD44cyt, 100 μ l binding buffer containing the ezrin FERM domain (1.8 μ M) was introduced into an aminosilane cuvette with immobilized CD44cyt. With binding of ezrin FERM domain having reached maximum, the cuvette was washed with binding buffer (*) and 100 μ l binding buffer containing ankyrin (0.17 μ M) was introduced into the cuvette. Increase in response would indicate specific ankyrin binding occurred. The washing of the cuvette with 20 mM HCl removed bound proteins (**).

体 (CD44 の細胞外ドメインを認識する) で免疫沈降を行い、標的蛋白質の免疫ブロットを行った。CD44 は、実験群、対照群ともに免疫沈降された。4.1R は照

群で検出されたが、実験群では検出されなかった。つまり、Ezrin FERM domain を細胞内で強制発現すると 4.1R は CD44 と結合しなくなることを示している。図 8 では抗 c-myc 抗体で Ezrin FERM domain が CD44 と共沈殿していることが示された。つまり、Ezrin FERM domain が CD44 に結合すると 4.1R は CD44 に結合できなくなることを示した。しかし、既に CD44 に結合していた 4.1R 強制発現した Ezrin FERM domain が解離させたかどうかについては不明である。CD44 は、絶えず合成されていることが報告されていることを考慮すると、新規に



IP: anti-CD44

Fig. 8 Immunoprecipitation of CD44. Using anti CD44 extra-cellular domain., immunoprecipitation was performed from HeLa cells transfected with pCMV vector (*vector*) and Ezrin FERM domain. in pCMV vector (*Ezrin*). The precipitants were analyzed by immunoblot using antibodies to CD44 (*CD44*), 4.1R⁸⁰(*4.1R*), c-myc tag (*c-myc*) and Ankyrin (*ANK*).

合成された CD44 に分子数が過剰の Ezrin FERM domain が優位に CD44 に結合したと考えられる。仮説が正しければ、Ezrin FERM domain の強制発現によって Ankyrin は CD44 と結合し免疫沈降されると想定される。対照群では、CD44 の免疫沈降では Ankyrin は検出されなかった。しかし、Ezrin FERM domain 強制発現群でも有意な Ankyrin の結合を確認することは出来なかった。

6. FERM domain 強制発現による Ankyrin 及び 4.1R の細胞内局在の変化

HeLa 細胞内の CD44、Ankyrin 及び 4.1R の局在を観察した。CD44 は、細胞膜に局在していた (図 9 a, d)。Ankyrin は、赤血球膜とは異なり細胞質に分布し細胞膜には局在していなかった (図 9 b, c)。一方、4.1R は、HeLa 細胞全体に分布しており、細胞膜、細胞質、核に検出された (図 9, e)。CD44 とは細胞膜に共局在した (図 9, d, f)。

Ezrin FERM domain (内在性 Ezrin の検出を回避する為に c-myc tag を抗 c-myc 抗体で検出し) を HeLa 細胞内に強制発現をすると、Ezrin FERM domain は細胞膜に局在した。CD44 とは共局在した (図 10a, b, c)。この時、Ankyrin は、細胞膜に分布が変化した。しかし、CD44 の免疫沈降では Ankyrin を検出することはできなかった。また、4.1R は Ezrin FERM domain の強制発現により細胞質に局在が変化した。4.1R は Ezrin FERM domain の強制発現により、抗 CD44 を用いた免疫沈降法で 4.1R が結合していない結果と一致した。

本研究では、Ezrin FERM domain を用いたのは、Ezrin は FERM domain と C-terminal domain は内部結合しており、PIP₂が FERM domain に結合することにより解離することで活性型分子（CD44 と結合する）になることが報告されている。本研究では、Ezrin の翻訳後修飾を回避する為に FERM domain を用いた。PIP₂は Ezrin のみでなく 4.1R 30kDa FERM domain にも結合し、結合するアミノ酸残基が同定された。PIP₂は 4.1R 30kDa FERM domain に結合することにより、N-lobe に結合する Band3 の結合には抑制的に、また、 α -lobe に結合する Glycophorin C (GPC) の結合は促進するが、C-lobe に結合する p55 の結合には関与しないことが報告された。CD44 の結合部位が、C-lobe 領域に同定されたことにより、PIP₂は 4.1R と CD44 の結合に関与しないと思われる。

4.1R は Ca²⁺/CaM によって CD44 との結合が制御される。しかし、Ezrin には Ca²⁺/CaM の結合性はなく分子の機能的構造的違いがある。

[まとめ]

図 11 に結果を総括した。

FERM domain でのホモロジーは約 30%であるが、X 線結晶構造解析の結果では相似性が極めて高いことが明らかになった（図 11）。

特異抗体を用いた細胞染色では、4.1R、及び CD44 は細胞膜に局在したが、Ezrin と Ankyrin は細胞質内に斑点状に局在していた。Ezrin FERM domain は、CD44 細胞内ドメイン（CD44cyt）と平衡解離定数 $K_{(D)} = 5 \times 10^{-8} \text{M}$ で結合した。結合速度定数は、4.1R FERM domain と CD44 との結合よりも大きかった。

4.1R の CD44 結合部位は立体構造上の C-lobe (Exon10 コード領域、51 アミノ酸残基) にあり、同部位に結合する p55 とは競合しなかった。

HeLa 細胞では、赤血球型 4.1R 及びそのスーパーファミリー蛋白質である Ezrin (FERM domain. でのホモロジーは約 30% であるが、X 線結晶構造解析の結果では相似性が極めて高いことが明らかになった(Han et al. 2000)、Ankyrin および CD44 が発現していた。特異抗体を用いた細胞染色では、4.1R、及び CD44 は細胞膜に局在したが、Ezrin と Ankyrin は細胞質内に斑点状に局在していた。

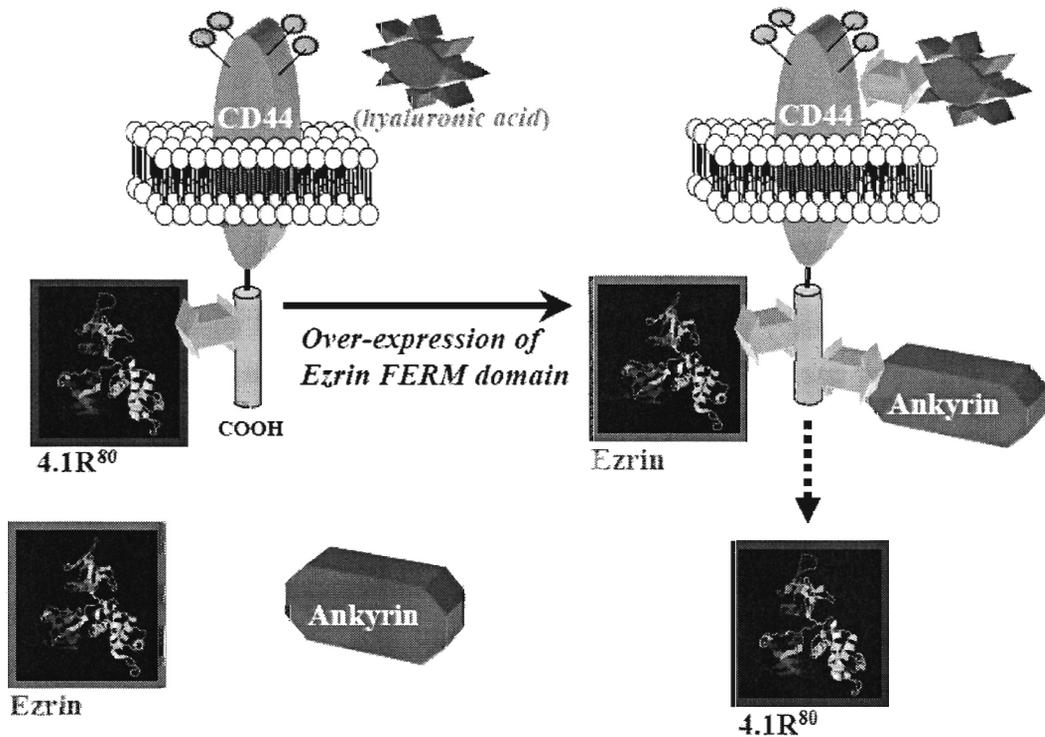


Fig.11. Proposed model of CD44 interactions with FERM proteins. In HeLa cells, 4.1R bound to CD44 and inhibit Ankyrin binding with CD44. As Ankyrin cannot access to CD44, Hyarulonic acid bind to CD44. When the FERM domain of ezrin having higher affinity to CD44 than 4.1R, Ezrin engaged the CD44 FERM binding site. Possibly, Ankyrin can bind to CD44 and then hyarulonic acid also binds to CD44.

Ezrin FERM domain は、CD44 細胞内ドメイン (CD44cyt) と平衡解離定数 $K_{(D)} = 5 \times 10^{-8} \text{M}$ で結合した。結合速度定数は、4.1R FERM domain と CD44 との結合よりも大きかった。この事実をもとに、Ezrin FERM domain を HeLa 細胞内に強制発現をすると、4.1R は細胞質に、Ankyrin は、細胞膜に分布が変化した。抗 CD44 を用いた免疫沈降法により、CD44 は細胞内で 4.1R と結合していることが証明された。

本研究では、CD44 とヒアルロン酸の結合が Ankyrin との結合により制御されることを制御系の上流にある 4.1R 及び細胞内 Ca^{2+} の上昇に伴う KDa の制御系を明らかにすることを目的として企画した。しかし、4.1R と Ezrin の CD44 結合との競合性は明らかになったが、Ankyrin の結合性まで証明が出来なかった。細胞免疫染色では、Ankyrin の細胞膜局在化は明らかにしたが、CD44 との結合まで証明が至らなかった。Ankyrin 分子の脆弱性による免疫沈降法の技術的未熟が原因と考えられる。また、HeLa 細胞は培養中に既にヒアルロン酸を自己分泌しており、CD44 分子のヒアルロン酸結合を証明することが出来なかった。現在、浮遊系細胞株である KG-1 及び Jurkat cell 及び K562 (CD44 negative control) を対象に、IASys[®] をもちいて検討中である。

4.1R の CD44 結合部位である 4.1R exon10 或は、exon 9+10+11 コード領域を pCMV vector 或は GFP 融合蛋白質として HeLa 細胞に発現させると細胞質内に斑点状に分布 (不溶性蛋白質の可能性はある) し、細胞内での 4.1R-CD44 の阻害実験には適さなかった (data not shown)。

[参考文献]

- W. Nunomura, Y. Takakuwa, R. Tokimitsu, S.W. Krauss, M. Kawashima, N. Mohandas
Regulation of CD44 –protein 4.1 interaction by Ca^{2+} and calmodulin
J. Biol. Chem. 272 (1997) 30322-30328.
- W. Nunomura, Y. Takakuwa, M. Parra, J.G. Conboy, N. Mohandas, Regulation of protein
4.1R, p55, and glycophorin C ternary complex in human erythrocyte membrane
J. Biol. Chem. 275 (2000) 24540-24546.
- J.M. Tyler, B.N. Reinhardt, D. Branton
Associations of erythrocyte membrane proteins. Binding of purified bands 2.1 and
4.1 to spectrin
J. Biol. Chem. 255 (1980) 7034-7039.
- V. Bennett, P.J. Stenbuck, Human erythrocyte ankyrin. Purification and properties
J. Biol. Chem. 255 (1980) 2540-2548.
- B.G. Han, W. Nunomura, Y. Takakuwa, N. Mohandas, and B.K. Jap
Protein 4.1R core domain structure and insights into regulation of cytoskeletal
organization
Nature Struct. Biol. 7 (2000) 871-875.
- L.Y. Bourguignon, G Walker, S. J. Suchard, and K. Balazovich
A lymphoma plasma membrane-associated protein with ankyrin-like properties
J Cell Biol. 102 (1986) 2115-2124.
- S. Tsukita and S. Yonemura
ERM (ezrin/radixin/moesin) family: from cytoskeleton to signal transduction.
Curr Opin Cell Biol. 1997 9(1): 70-5. Review.

[添付図表の説明]

Fig. 9. Distribution of CD44, 4.1R and ankyrin in HeLa cells. Cells were probed by indirect immunofluorescence using primary antibodies as indicated in “*Materials and Methods*”. CD44 (red, *a* and *d*) was exclusively detected on the plasma membrane. Ankyrin (green, *b*) was present only in the cell interior. No areas with yellow staining could be seen with double staining for CD44 and ankyrin (*c*). 4.1R (green, *e*) was detected in the cell interior and also on the peripheral cell membrane. Areas where red and green signals coincide are shown in yellow, indicating the co-localization of CD44 and 4.1R (*f*). Samples with non-immune IgG or without primary antibody showed no fluorescence.

Fig. 10. Changes in protein distribution in HeLa cells with ezrin FERM domain over-expression. Cells were probed by indirect immuno-fluorescence using the primary antibodies indicated. The ezrin FERM domain (red, *a*, *d* and *g*) and CD44 (green, *b*) were detected along the peripheral cell membrane. Ankyrin (green, *e*) was found along the plasma membrane and also in the cell interior. The ezrin FERM domain co-localized with CD44 (*c*) and ankyrin (*f*) along the plasma membrane, as indicated by yellow staining in the merged images. 4.1R distributed in the cytoplasm away from the membrane (*h* and *i*).

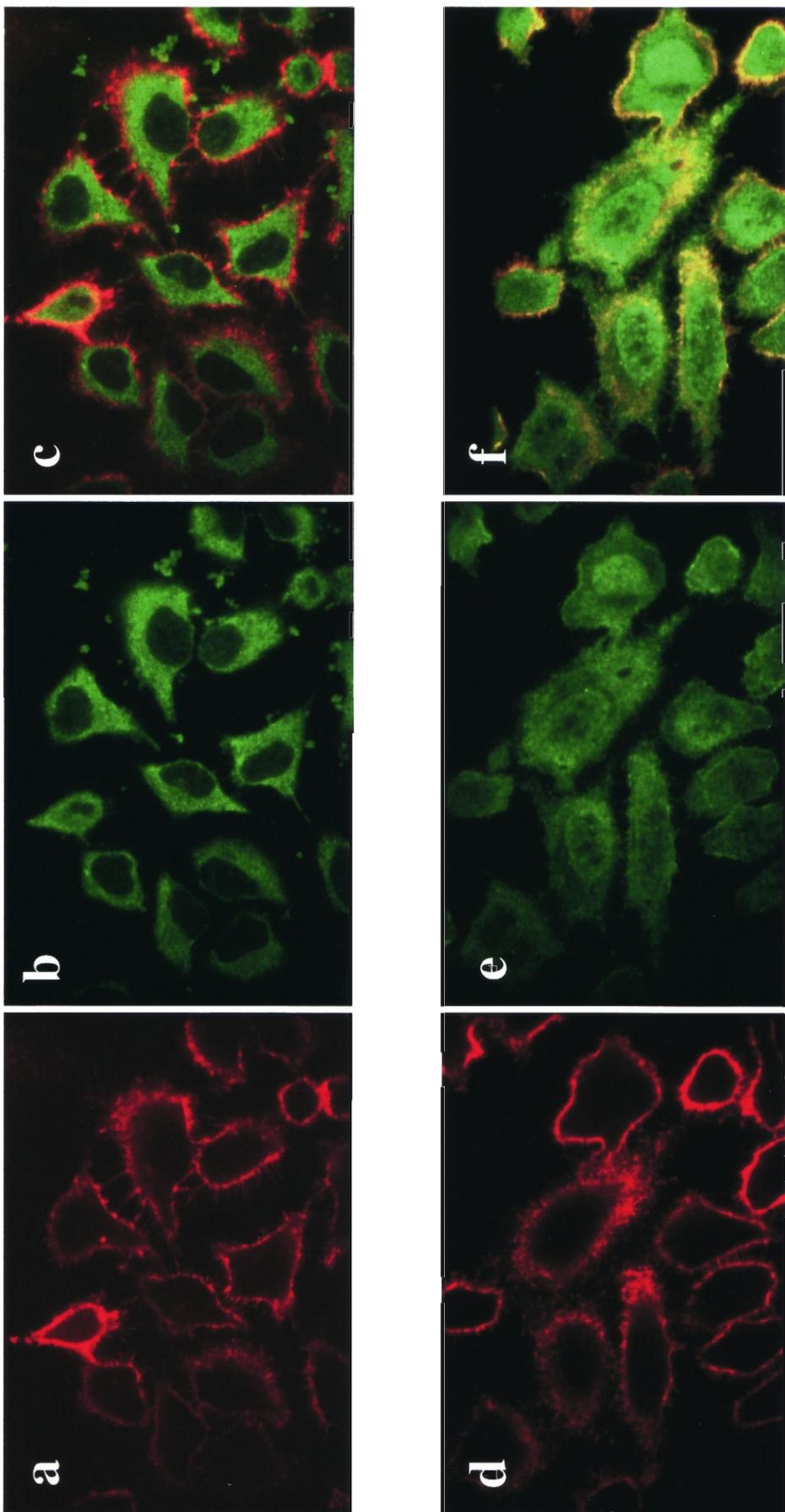


Fig.9. Localization of Ezrin, CD44 and FERM domain of Ezrin.

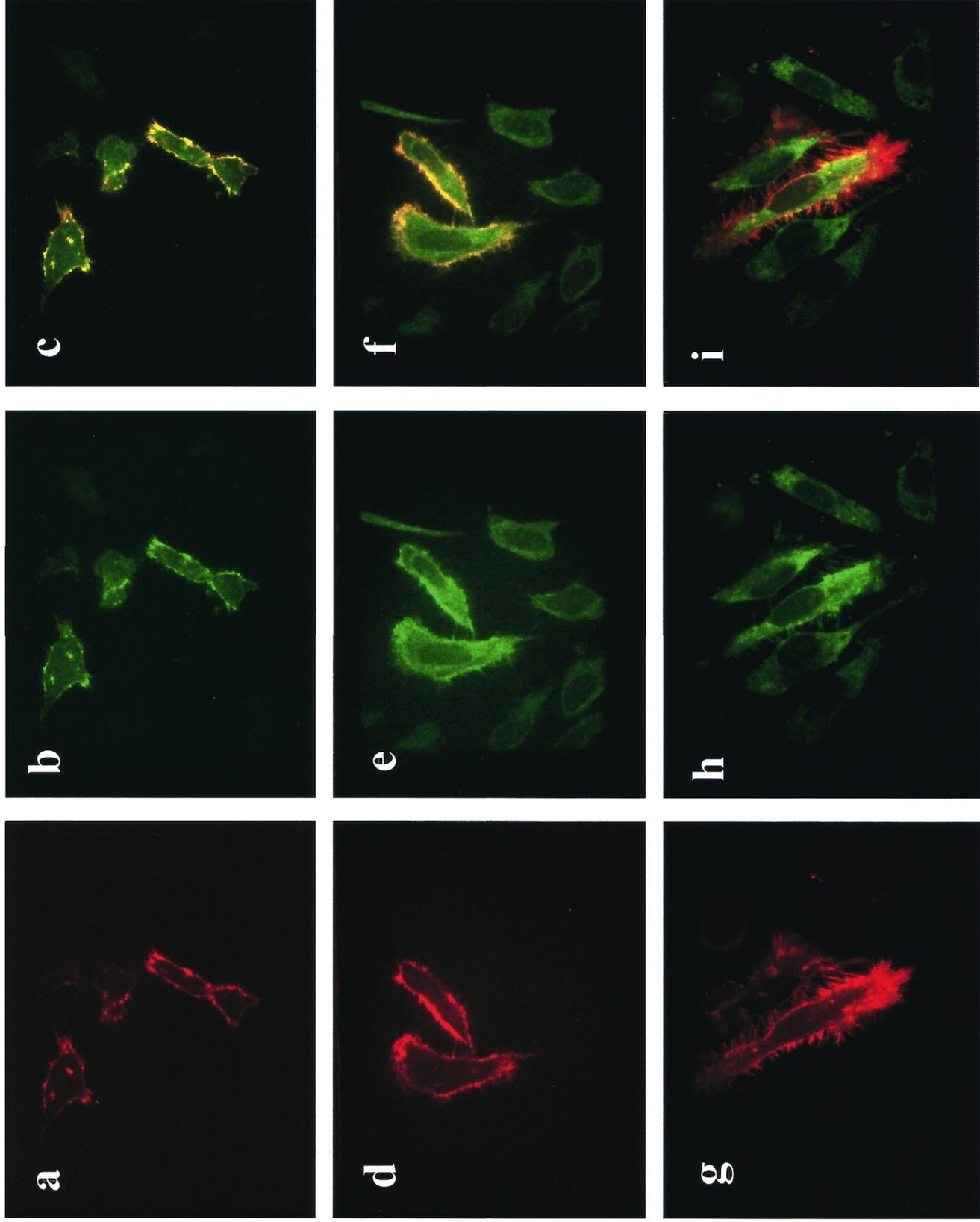
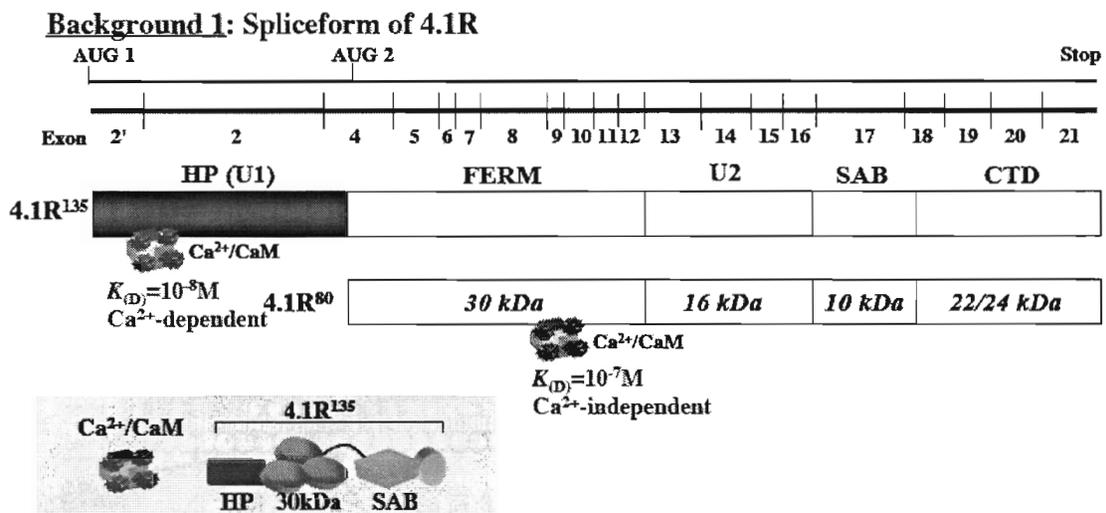


Fig.10. Localization of Ezrin, CD44 and FERM domain of Ezrin.

第 1-2 項 135kDa 型 protein 4.1R (4.1R¹³⁵) を中心にした赤芽球
での細胞膜骨格蛋白質群の発現

[目的]



Two major isoform of protein 4.1R, 135kDa type (4.1R¹³⁵) and 80kDa type (4.1R⁸⁰) are expressed in erythroblast. One difference between these molecules is 4.1R¹³⁵ having additional 209 amino acids, head-piece (RHP) at the NH₂ termini of 4.1R⁸⁰.

We have reported that the calmodulin (CaM) bound to the 30kDa (FERM) domain of 4.1R⁸⁰ in the Ca²⁺-independent manner. In contrast, CaM bound to HP region in the Ca²⁺-dependent manner. The $K_{(D)}$ was 10⁻⁸ M.

赤芽球及び上皮細胞に発現する 135kDa のアイソフォーム (4.1R¹³⁵) は、4.1R⁸⁰ の N 末端部に約 23kDa (head-piece、HP) のポリペプチドが付加されているが、その膜蛋白質との相互作用について、前課題で報告した(背景 1 参照)。4.1R¹³⁵ の 30kDa FERM domain の N 末端 209 アミノ酸ポリペプチド (HP) は、30kDa FERM domain と膜蛋白質 (GPC と Band3) との結合を制御 (抑制と促進) した。つまり、GPC、Band3 の細胞内ドメインとは各々、平衡解離定数 $\sim 10^{-6}M$ 及び解離定数 $\sim 10^{-8}M$ で結合した。この平衡解離定数は、30kDa FERM domain と各膜貫通蛋白質との平衡解

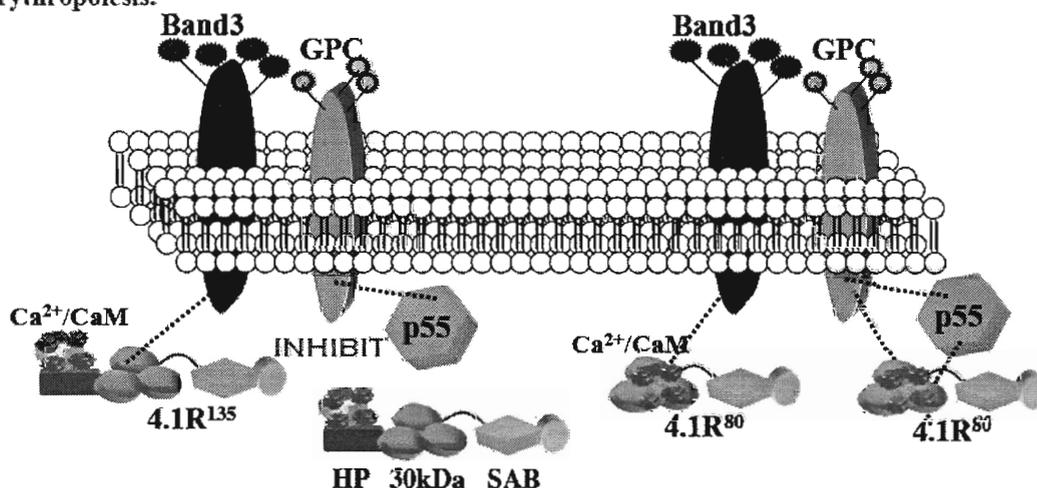
離定数 $\sim 10^{-7}M$ とは異なっており、HPが30kDa FERM domainと膜間との結合に関わっていることを

Background 2: Ca^{2+}/CaM regulation of 4.1R binding to membrane

In vitro binding assay showed that 4.1R¹³⁵ bound to cytoplasmic domains of Band3 and GPC in the $K_{(D)}$ of $\sim 10^{-8} M$ and $\sim 10^{-6} M$, and to p55 in $\sim 10^{-7} M$, respectively. The $K_{(D)}$ of RHP and 4.1R¹³⁵ to calmodulin (CaM) was $\sim 10^{-8} M$ in the presence of Ca^{2+} but not in the absence of Ca^{2+} . The Ca^{2+} saturated CaM (Ca^{2+}/CaM) and RHP completely inhibited the 4.1R¹³⁵ binding to GPC, and p55, and strongly reduced the binding to Band3.

AIM:

In the present study, we studied on the immunocytochemical localization of 4.1R isoform during the erythropoiesis.



示した。HPには、30kDa (FERM domain)よりも優位にCaMが結合した。CaMが Ca^{2+} 存在下でHPに結合すると4.1R¹³⁵とp55及びGPCとは全く結合できなくなった。また、Band3との解離定数は $\sim 10^{-6} M$ に大きくなり結合の親和性が低下した。以上から、HPは4.1R¹³⁵の膜結合に大きく関わることを示した。本研究では、*in living cell (in vivo)*の系として、ヒト赤芽球培養系を用い、4.1R¹³⁵を中心に膜骨格蛋白質であるGPC、GPA、Band3及びp55の経時的変化を細胞免疫染色法で観察した。その結果、4.1R¹³⁵は、細胞質中に分布し、細胞膜には存在しなかった。一方、GPC、GPA、Band3は培養後5日目には細胞膜に分布していた。p55は、細胞膜に局在してい

た。4.1R¹³⁵が細胞膜に局在しないのは、細胞内 Ca²⁺濃度が高いためと考え、EGTA存在下で40分間、赤芽球を培養した結果、4.1R¹³⁵は細胞膜に局在した。

[材料と方法]

1. 赤芽球の培養

赤芽球の培養及び免疫染色は、秋田大学医学部内科学澤田賢一教授との共同研究で行われた。秋田大学医学部内科学瀧保広美技官、蛇口美和大学院生の協力を得た。

提供健常男子に対して研究趣旨を説明し、本人承諾に上で血液試料を採取した。

ヒト抹消血から分離した血液幹細胞を培養してCD34陽性細胞を得た。さらにエリスロポエチン (EPO)の添加により赤芽球に分化誘導した。CD34陽性細胞を得た時をDay 0として脱核するまで経時的に細胞を採取した。細胞は固定後、非特異反応をBSAでブロッキング後、一次抗体として、家兎抗4.1G Exon16領域抗体を反応させた。FITC標識二次抗体を反応させ、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM 510 confocal microscope) で観察した。

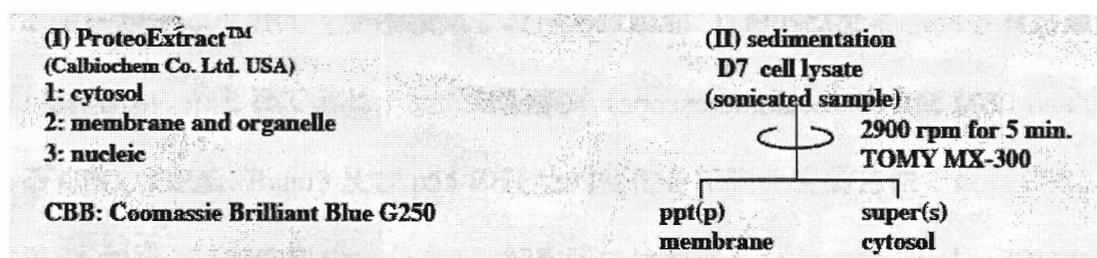
2. 抗体

抗 4.1RHP 抗体、抗 p55 抗体、本研究室で精製組換え蛋白質を精製し、家兔に免疫して得た。抗 4.1R⁸⁰ 抗体は、本研究室で家兔に免疫して得た。各々の抗体は、抗原をカップリングした Sepharose 6B (GE Healthcares Biosciences) カラムクロマトグラフィーにより、アフィニティー精製された。抗体の特異性は免疫プロット法で確認した。マウス抗 GPC 抗体、抗 GPA 抗体、抗 Band3 抗体は Sigma から購入し、抗体の特異性は免疫プロット法で確認した。抗 30kDa 抗体は、マウス単クローン抗体を用いた。単クローン抗体の作製及び抗原決定基 (エピトープ) 解析は、第 4 節第 2 項に記した。マウス抗アクチン単クローン抗体は、シグマから購入した。

蛍光色素 (Cy3 及び FITC) をコンジュゲートした 2 次抗体は、DAKO から購入した。

3.細胞分画法

細胞分画は、下記に示した 2 つの方法を用いた。つまり、培養 7 日目 (Day7) の細胞 10⁶ 個を用意した。細胞は、ProteoExtract[®]を用い、使用説明書に従って細胞分画 (膜画分、細胞質画分、核画分) を行った。また、もう一つに方法として、同様に調製した細胞を超音波処理及び遠心分離により、膜画分を得た (下記図参照)。



4. EGTA 存在下での赤芽球の培養

3mM EGTA 存在下で赤芽球を 45 分培養した。また、EPO の存在、非存在下との組合せでも同様に培養をした。細胞は上記と同様に処理した後、免疫染色を施し共焦点顕微鏡で観察した。

[結果と考察]

1. Day7 赤芽球の細胞膜画分の免疫プロット法による解析

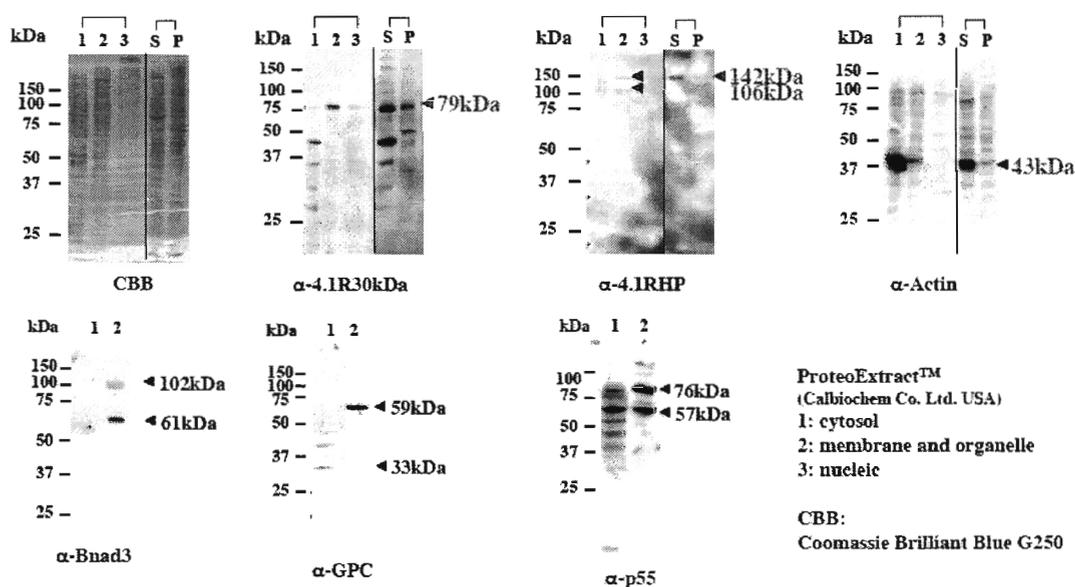


Fig. 1. Immunoblot of membrane proteins in erythroblast (Day7). Lanes 1~3 represent as cell fraction by ProteoExtract™, cytosol, membrane and organelle, and nucleus fraction, respectively. S and P represent supernatant and precipitate by centrifuge method.

Day7 赤芽球の細胞膜画分の免疫プロット法による解析を行った。図 1 では、各電気泳動図において、lane 番号 1~3 は、細胞質画分、膜画分、核画分を示す。また、S と P は、遠心分画法による遠心上清および沈殿を表す。抗 30kDa 抗体は、細胞膜画分に 80kDa (マーカー蛋白質を標準として算出された分子量は 79kDa) のバンド

の他、56kDa 付近等にバンドを検出した。細胞質分画では、46kDa 付近にバンドを検出したが、80kDa バンドは検出出来なかった。80kDa より小さな分子量は分画中の分解産物と思われる。遠心分離法では、細胞質分画に 135kDa の 4.1R を検出できた。抗 4.1RHP 抗体は、細胞膜画分に 142kDa 及び 106kDa の主たるバンドを検出した。この細胞膜画分は、細胞内小器官（オルガネラ）の膜成分も含んでいる。本結果から、4.1R¹³⁵ は細胞膜に局在するとは言えない。抗 Band3 抗体は、細胞膜画分に 102kDa と 61kDa の 2 本のバンドを検出した。102kDa は完全長の Band3 分子であると思われる。61kDa のバンドは分解産物である可能性が高い。一方、細胞内オルガネラの膜成分も画分に入っていることから、合成途中の分子或は、61kDa の垂分子が存在することも否定出来ない。用いた抗 Band3 抗体のエピトープに関する情報が無いため 61kDa Band3 がどの Fragment なのかは同定出来なかった。

抗 GPC 抗体は、細胞質分画に単量体の 33kDa および細胞膜画分に 59kDa のバンドを検出した。細胞膜画分には、単量体 GPC 分子を検出出来なかった。59kDa は 2 量体 GPC と考えられる。これまで、成熟赤血球膜では単量体 GPC が報告されて来た。内部対照として、アクチンを検出した。

2. 赤芽球に於ける 4.1R¹³⁵ 及び膜蛋白質発現の経時的変化

赤芽球は、培養後 12 日目に、細胞の大きさが小さくなり始め、14 日目 (Day14) で脱核し、その後成熟赤血球に分化した。赤芽球培養開始時 (Day0) で 4.1R¹³⁵ の細胞膜での局在が観察され (data not shown)、Day3、Day5 では細胞膜近傍に観察された。この時、GPC の細胞膜局在が観察された (図 6)。Day10 では、4.1R¹³⁵ は

細胞膜での染色が薄くなり、代わりに 4.1R⁸⁰ が細胞膜に局在が観察された。成熟赤血球において、4.1R¹³⁵ は全く観察されなかったが、4.1R⁸⁰ は細胞膜に強く染色された(図 4.)。GPC は、Day0 から成熟赤血球に至まで細胞膜局在が観察された(図 6)。Band3 抗原は GPA 同様に Day5 以降に発現を認めた。

p55 は、Day3 からすでに発現しており、細胞質及び細胞膜に分布していた。ただし、用いた抗体は 55kDa バンド以外にも 76kDa のバンドを認識していた(図 3)。現在、p55 のアイソフォーム (alternative splicing による) は報告されていない。一方、p55 には CASK などの相同蛋白質 (ファミリー蛋白質) があり、一次構造上の相同性を認める (Chishti, 1998)。更に特異性の高い抗体を用いた解析が必要と思われる。

免疫ブロット法では、抗 4.1R⁸⁰ 抗体は 4.1R¹³⁵ を検出しなかったことから、本研究で用いた抗 4.1R⁸⁰ 抗体は、4.1R⁸⁰ を優位に検出すると想定される (ただし、細胞染色でも 4.1R⁸⁰ に特異的であるとは言えない)。抗 4.1R⁸⁰ 抗体により、Day7 以降から陽性シグナルを細胞膜近傍に観察できた。4.1R⁸⁰ は、4.1R¹³⁵ に比してより細胞膜近傍に局在していた。特に、Day12 の脱核直前では明らかに細胞膜に局在しており、これは、4.1R¹³⁵ が細胞質に広範囲に分布していたことと異なる。

以上の結果を総括して、各膜骨格蛋白質の発現の経時的変化を図 5 に示した。ただし、発現量を客観的に定量した結果はでない。少なくとも、膜貫通蛋白質で GPC、GPA 及び Bandd3 の発現は Day3 から始まり Day7 には完全に細胞膜に組み込まれていることが明らかになった。培養の初期段階 (Day3-5) では、細胞膜上に斑点状に染色されたことから、合成された GPC 等の膜貫通蛋白質群は、蛋白質合成後に輸送され細胞膜上で分散するものと考えられる。細胞膜内での分布には脂質群、

Figure legend for Fig.2~4

Figures 2~4 show immunochemical localization of membrane proteins, 4.1R¹³⁵, 4.1R⁸⁰, p55, Band3, GPC and GPA in cultured human erythroblasts. Nucleus was stained with DAPI (*DAPI*) as blue. In Figs. 2 and 4, the phase contrast image of erythroblast is shown. *Merge* means images of two different antigens merged in a picture, for example 4.1R135 (*green*) and Band3 (*red*) in Fig.2. In Fig.3 (*the bottom lane*), we used rabbit antibody to 4.1R⁸⁰. This antibody is specific to 4.1R⁸⁰ based on the immuno-bl0t data showing in Fig.1

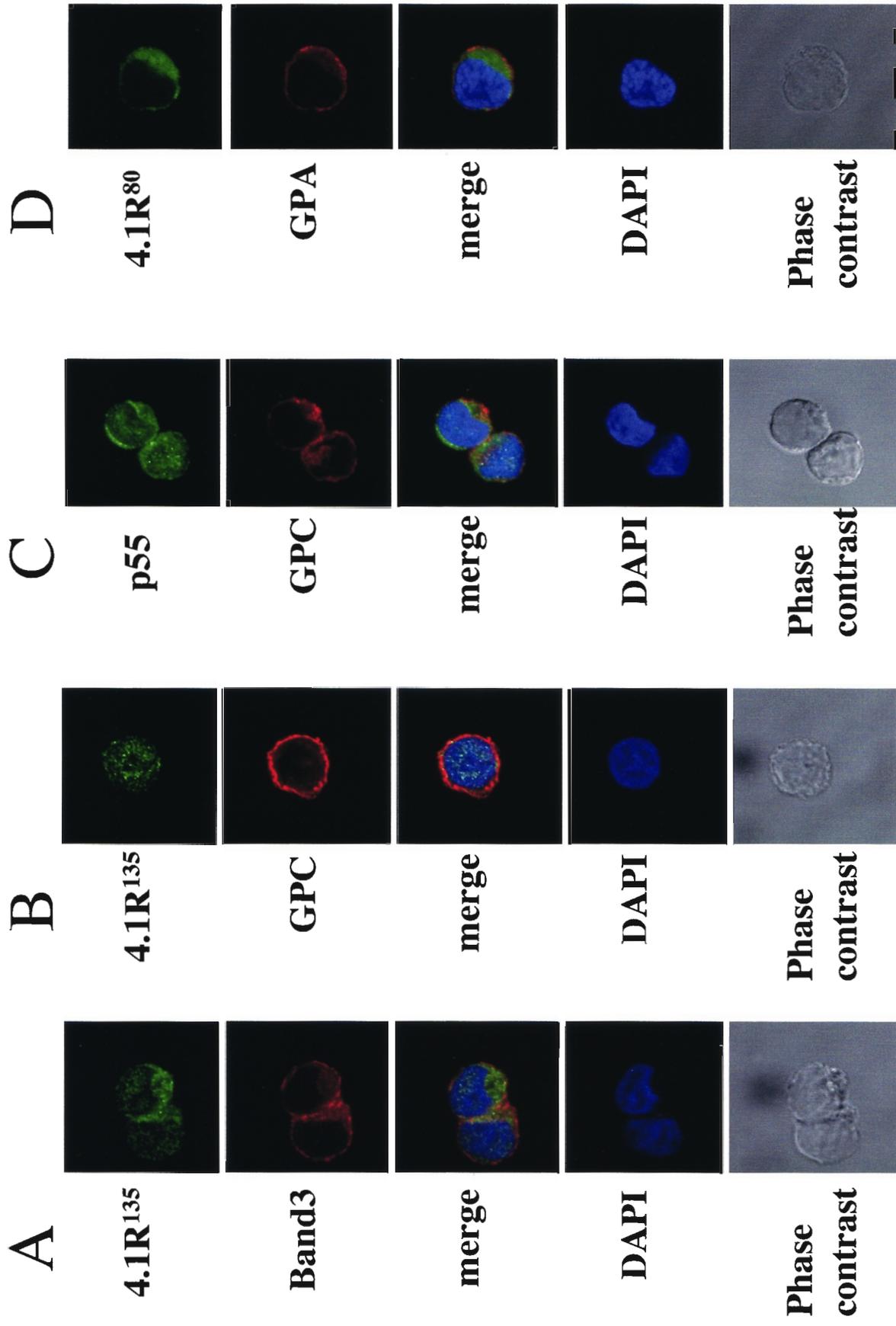


Fig. 2. Immunocytochemical localization of membrane proteins in erythroblast at Day7

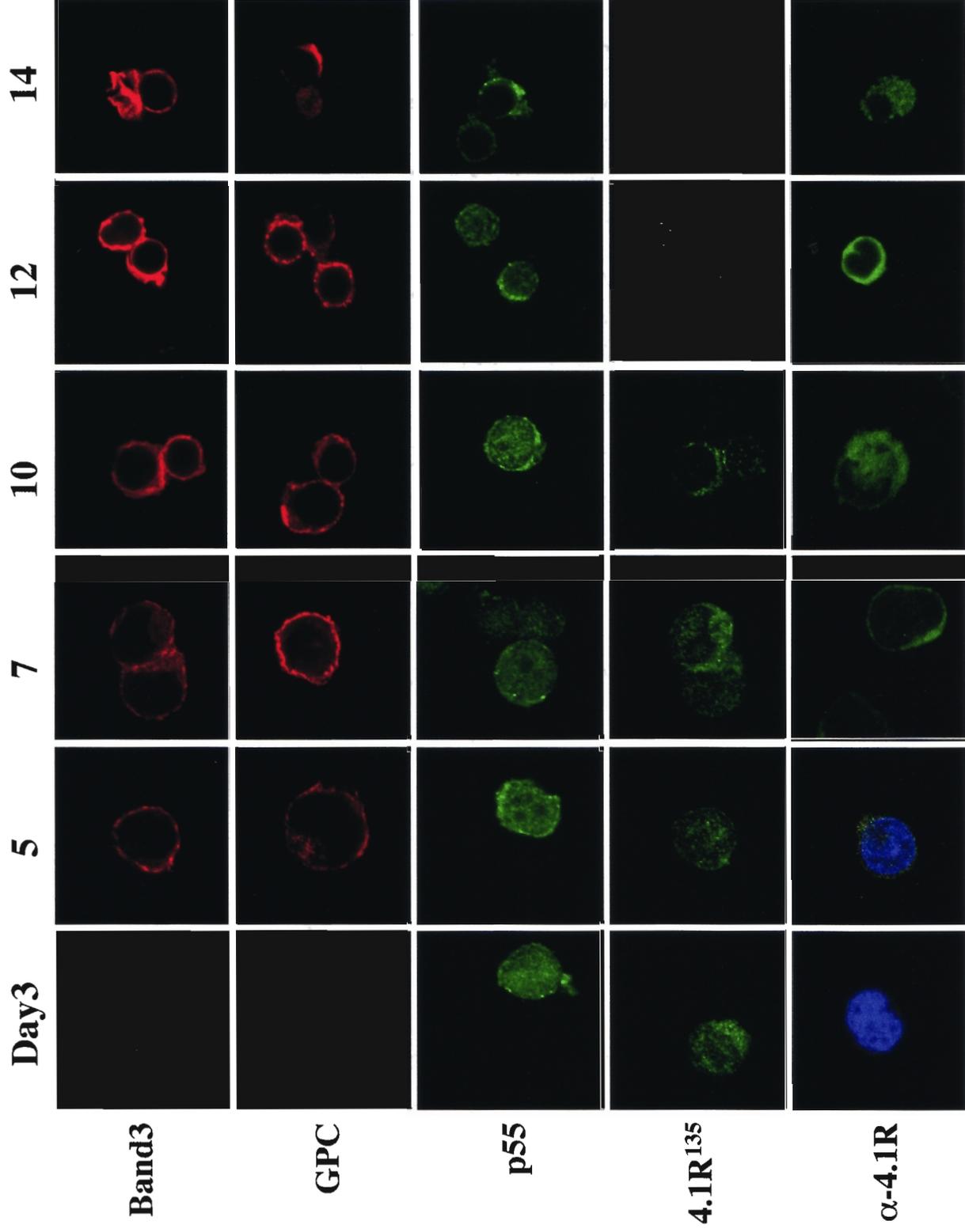


Fig.3. Distribution of membrane proteins in erythroblast

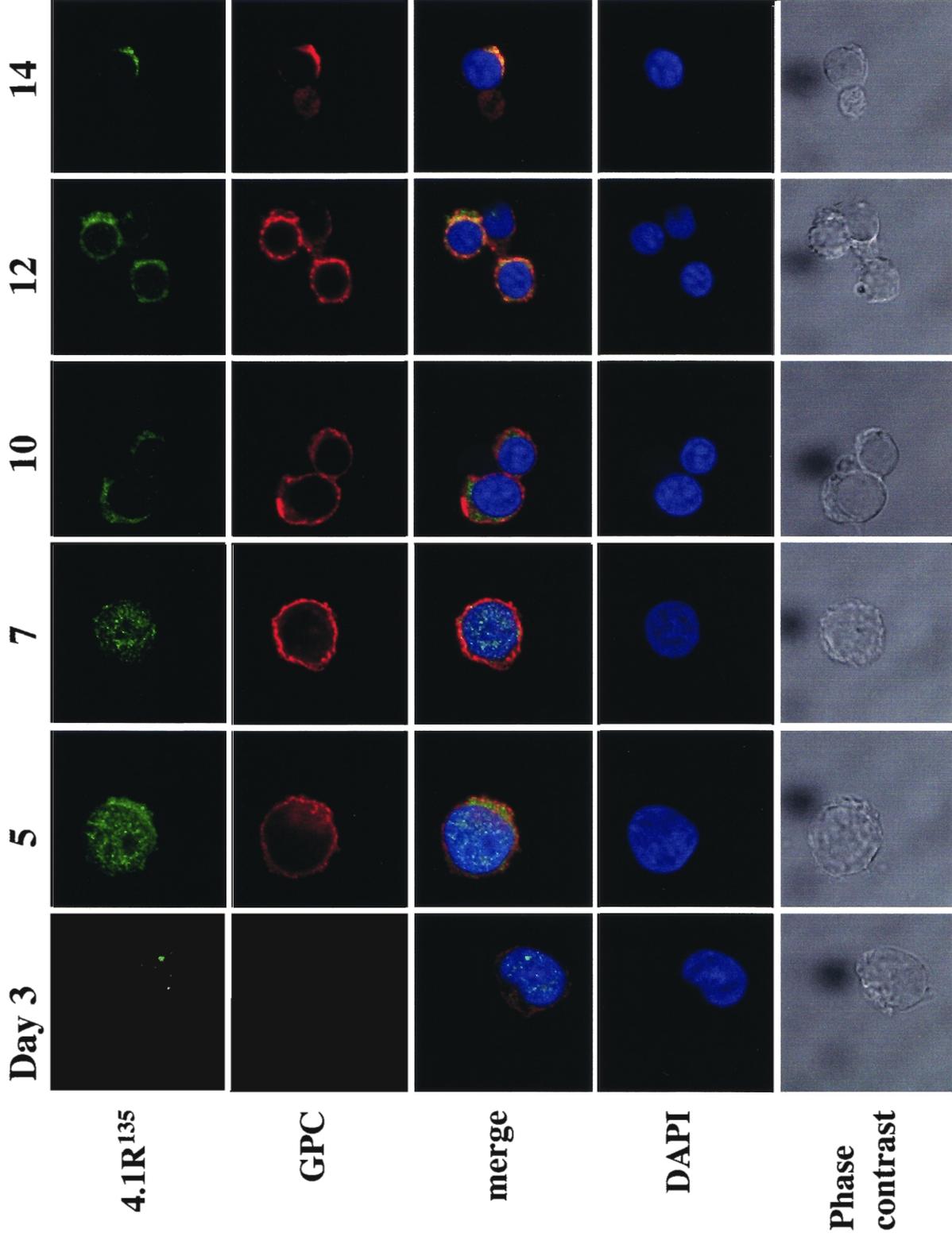


Fig. 4. Double staining of 4.1R¹³⁵ and GPC in erythroblasts

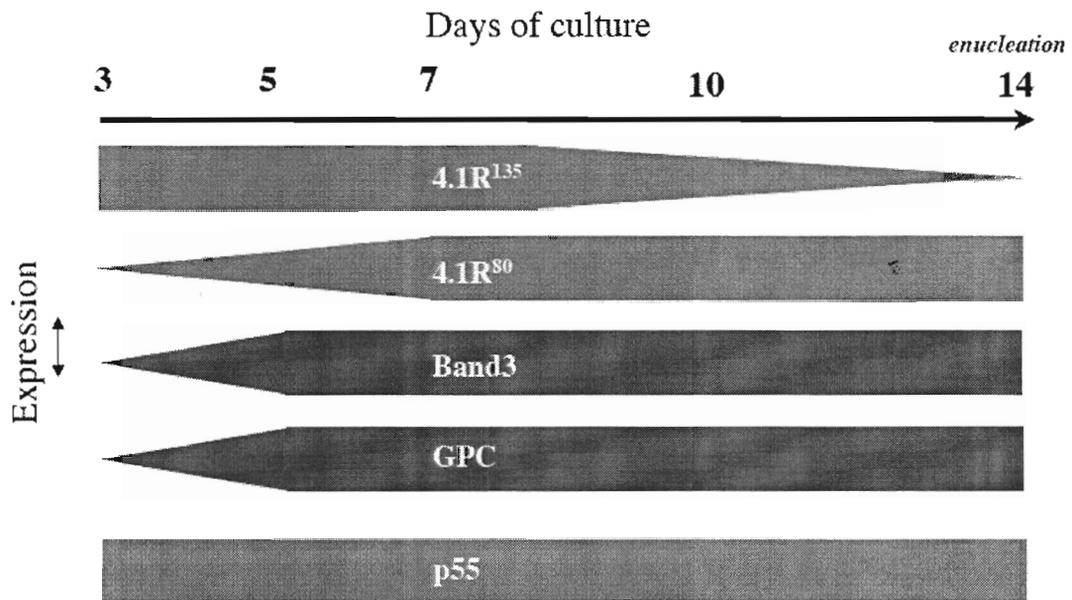


Fig. 5 Time course of apparent expression of membrane proteins based on the immunocytochemical staining.

特に、マイクロドメインと称させる所謂ラフト構造が関わっていると思われる。

4.1R⁸⁰の発現は膜貫通蛋白質群よりも遅れることから、4.1R⁸⁰は膜貫通蛋白質群の分布を規定する（位置を固定する）役目があると思われる。4.1R⁸⁰と結合し膜安定性を司る spectrin の分布を観察することにより、上記仮説が明らかになると思われる。

p55 は、分子構造上そのC末端部にパルミチル化される Cys 残基があることから、細胞膜に局在すると思われる。事実、免疫染色は p55 の細胞膜局在を示している。

少なくとも GPC は p55 と結合することから、細胞膜上では GPC を標的としている可能性は否定できない。しかし、他の膜貫通蛋白質については別の機構を考えなくてはならない。一方、An ら (NYBC、私信) によれば、マウス赤芽球をフレンドウィルスで形質転換した後、RNA 干渉により 4.1R の発現を抑制すると、GPC は細胞

膜には存在せず、核内へ移行することを観察している。この結果は、4.1R の欠損により膜貫通蛋白質の小胞輸送機構に異常をきたしたと考えられる。この結果が正しいければ、4.1R⁸⁰は膜貫通蛋白質の発現以前あるいは同時に発現している必要がある。本研究では、寧ろ 4.1R⁸⁰の発現が膜貫通蛋白質よりも遅いと言う結果を得ている。ただし、免疫染色のみしか施行していないので、リアルタイム PCR 等を用いた定量的解析や免疫ブロット法による定量的な解析が必要と思われる。

これまでに主に *in vitro* の蛋白質-蛋白質結合解析から Ca²⁺/CaM が 4.1R⁸⁰ 及び 4.1R¹³⁵ の膜結合性について異なる挙動をすることを明らかにしてきた。つまり、Ca²⁺/CaM は 4.1R⁸⁰ と膜蛋白質との結合を弱める（平衡解離定数を約 10 倍上昇させる）が、4.1R¹³⁵ に対しては GPC と p55 については完全に結合を阻害することを報告した。本研究で得られた、4.1R⁸⁰ と 4.1R¹³⁵ の分布の違いは、Ca²⁺/CaM による膜結合への制御機構のためであるとの仮説をたてた。この仮説の背景には、EPO には細胞内 Ca²⁺ を上昇させることが報告されていることによる (Misiti and Spivak, 1979)。一方、赤芽球及び赤白血病細胞の一つである K562 細胞を用いて培養系に EGTA を加えると細胞内 Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]_i) が減少することが報告されている (Misiti and Spivak, 1979)。以上から、仮説を証明するために赤芽球 (Day7) を、Ca²⁺キレート状態で培養し 4.1R¹³⁵ の分布を観察した。

3. EGTA 存在下で培養した赤芽球での 4.1R¹³⁵ の分布

4.1R¹³⁵ 細胞質局在性が示唆された。この局在は、Ca²⁺/CaM の HP 結合によると考えられた。事実、エリスロポエチン存在下では細胞内 Ca²⁺ 濃度が上昇していること

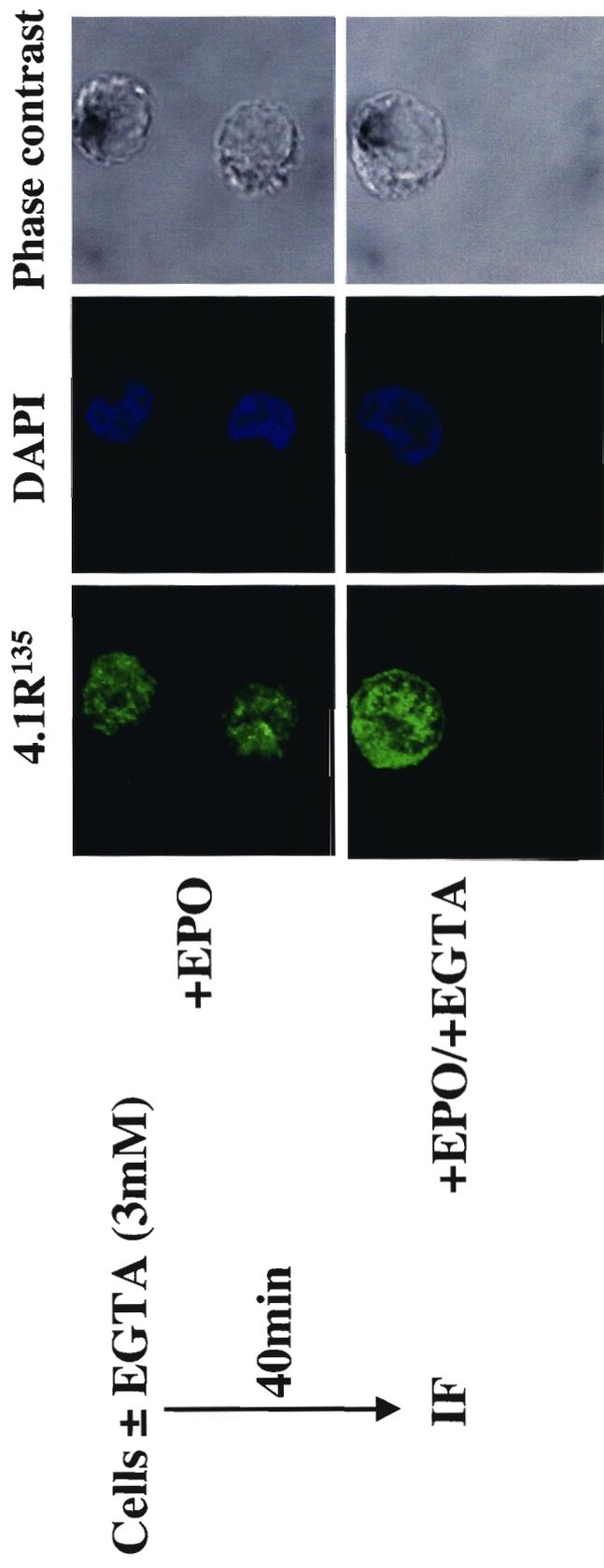


Fig. 5. Effect of EGTA on distribution of 4.1R¹³⁵. In the standard culture system, the 4.1R¹³⁵ was broadly distributed in the cells, cytoplasm and cytoplasmic membrane. The Ca²⁺/CaM interacting with the 4.1R¹³⁵ may cause this. To inhibit the effect of Ca²⁺/CaM, EGTA was added into the culture medium. The shape of cells was not significantly changed in the presence of 5mM EGTA. The 4.1R¹³⁵ was strongly stained at the peripheral membrane compared with standard culture (+EGTA).

が報告されている。文献的事実から、細胞外 Ca^{2+} を EGTA でキレートすることにより、4.1R¹³⁵ の細胞内分布が細胞膜に変化すると考えた（文献）。3mM EGTA を加えた培地（エリスロポエチン存在下）で Day7 の赤芽球を 20 時間培養すると細胞の形態は、シュリンクした。また、4.1R も観察出来なかった。CaM を細胞染色すると、染色性は低下していた。

4. HP の 4.1R¹³⁵ の FERM domain 膜結合への関与

これまで、*in vitro* での結合解析および本研究での *in living cell* での結果は、HP は 4.1R¹³⁵ の FERM domain 膜結合を調節することを明らかにしてきた。HP を FERM domain と混合したとき FERM domain の膜結合の変化を明らかにすることで HP と FERM の関連が明らかになると期待できる。

表 1 に示したように、HP と FERM domain を混合しても FERM domain と膜蛋白質 Band3 と p55 との結合に有為な変化は見られなかった。GPC との結合は HP 量に比例して平衡解離定数が大きくなった。HP 自体は、FERM domain と結合しないが、この結果は、HP が空間的に GPC 結合部位に配置されることを示唆している。詳しくは、次項で詳説する。

[まとめ]

4.1R¹³⁵ 及び 4.1R⁸⁰ 細胞局在を培養系の赤芽球を用いて観察し、4.1R¹³⁵ は細胞質内に分布し、4.1R⁸⁰ 細胞膜に局在していた。この分布の違いは、 Ca^{2+} /CaM による制御

であることが、EGTA による培養液の Ca^{2+} のキレートにより明らかになった。この結果は、*in vitro* 結合解析の結果を支持した。

膜貫通蛋白質群は培養開始から速やかに細胞膜に局在した。

Table 1. The 30kDa domain binding to membrane proteins in the absence and the presence of HP

Analyte	Ligand	k_a ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	$K_{(D)}$ (nM)
HP	Band3cyt	No Binding	No Binding	No Binding
30kDa	Band3cyt	$6.0 \pm 0.20 \times 10^4$	$1.2 \pm 0.10 \times 10^{-2}$	200
30kDa + HP (1:1)	Band3cyt	$1.3 \pm 0.10 \times 10^4$	$2.3 \pm 0.10 \times 10^{-3}$	177
30kDa + HP (1:10)	Band3cyt	$8.1 \pm 0.70 \times 10^4$	$5.5 \pm 0.12 \times 10^{-3}$	68
HP	GPCcyt	No Binding	No Binding	No Binding
30kDa	GPCcyt	$7.0 \pm 0.50 \times 10^4$	$1.2 \pm 0.10 \times 10^{-2}$	171
30kDa + HP (1:1)	GPCcyt	$2.1 \pm 0.20 \times 10^4$	$2.0 \pm 0.10 \times 10^{-2}$	952
30kDa + HP (1:10)	GPCcyt	$6.5 \pm 0.30 \times 10^3$	$3.4 \pm 0.12 \times 10^{-2}$	5230
HP	p55	No Binding	No Binding	No Binding
30kDa	p55	$1.0 \pm 0.20 \times 10^5$	$4.0 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	400
30kDa + HP (1:1)	p55	$1.4 \pm 0.10 \times 10^5$	$6.0 \pm 0.10 \times 10^{-2}$	429
30kDa + HP (1:10)	p55	$9.7 \pm 0.70 \times 10^4$	$3.7 \pm 0.12 \times 10^{-2}$	381

$K_{(D)}$ values for the interactions of 30kDa alone or mixture of 30kDa and HP to GPC, and p55 and Band3 are shown. Each analyte (50nM to 1 μM) was incubated with the identified ligand immobilized on the aminosilane cuvette as described under *Materials and methods*. From the binding curves obtained by the resonant mirror detection method, $K_{(D)}$ values were determined using the software package FAST-Fit™.

[文献]

Chishti, A. H. 1998. Function of p55 and its nonerythroid homologues.

Curr. Opin. Hematol. 5(2), 116-121.(Review).

Misiti, J. and Spivak, J. L. 1979. Erythropoiesis *in vitro*. Role of calcium.

J. Clin. Invest. 64, 1573-1579.

第 1-3 項 キメラ蛋白質を用いた 4.1R と 4.1G の 細胞膜結合の分子特異性の解析

[目的]

赤芽球では、4.1R のファミリー蛋白質 4.1G (G は Generally expression の略で mRNA レベルの解析ではほぼ全ての組織に発現している) の発現が予測されているが実際の観察報告はなく、また、その膜蛋白質との相互作用は不明であった。また、4.1R¹³⁵ と 4.1G は、共に膜結合をする 30kDa FERM ドメインの N 末端部に 209 アミノ酸残

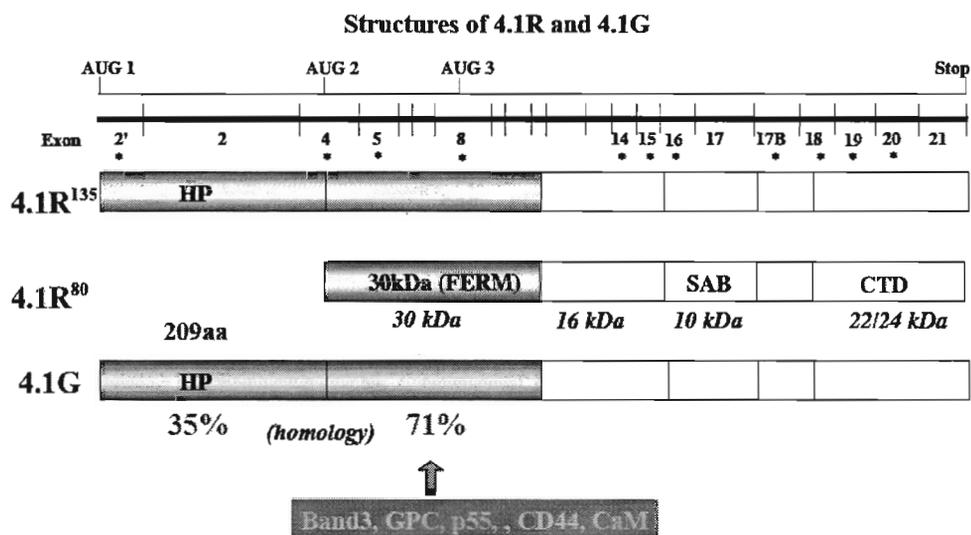


Fig.1 Structure of protein 4.1R and 4.1G. The homology in amino acid sequence of HP and 30kDa FERM domain between 4.1R and 4.1G was 35% and 71%, respectively. 4.1G has also membrane protein binding sequence in its FERM domain. HP of 4.1G and 4.1R consists 209 residues.

基 (head-piece, HP) のポリペプチドが付加されている。我々は、組換え 4.1G を用い、膜貫通蛋白質及び CaM との結合解析を行い (前課題)、4.1R¹³⁵ の膜結合性と比較した。その結果、1) 4.1G は HP に Ca²⁺依存性の CaM 結合部位がある (化学量

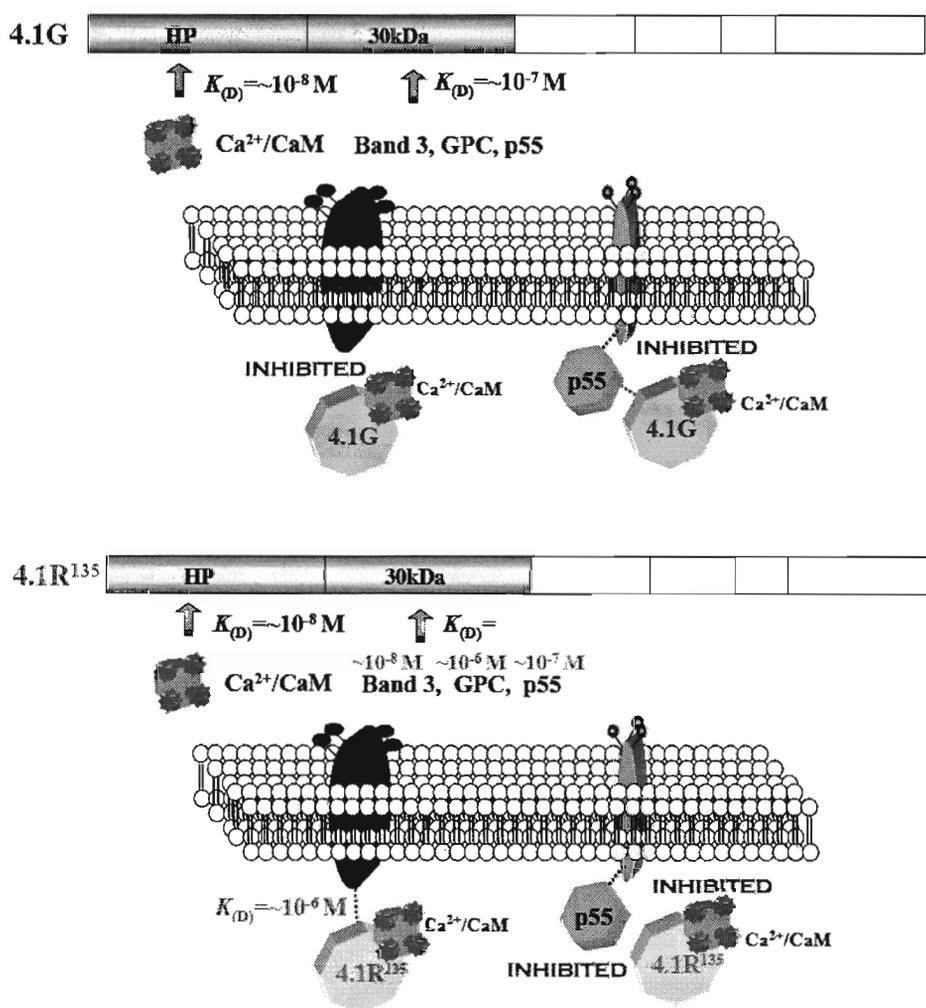


Fig.2. CaM regulate 4.1R and 4.1G binding to membrane proteins. Interactions of 4.1G (*upper*) and 4.1R¹³⁵ (*bottom*) with membrane proteins are inhibited by Ca²⁺/CaM. 4.1G bound to membrane proteins in K_(D) of submicro order. In contrast to 4.1G, the K(D)s for 4.1R135 binding to membrane proteins are variable as shown in figure.

論的結合比は 1:1 であることから FERM domain には CaM は結合しない。この結合性は 4.1R¹³⁵ と同様)、2) FERM domain は膜貫通蛋白質との結合は ~10⁻⁷M であった、

3) $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ は、4.1G と Band、CD44 および p55 との結合を阻害した (4.1R¹³⁵ では、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ は GPC、p55 及び CD44 との結合を阻害した)。本研究では、4.1G の細胞内局在と細胞膜蛋白質との分子間相互作用を解析し、さらにキメラ (κιμερα) 蛋白質を使い、4.1R¹³⁵ と比較することにより、4.1G と 4.1R¹³⁵ のどのような構造的違いがそれらの生物学的意義 (膜結合性) と関連しているかを明らかにしようとした。

[材料と方法]

1. 材料

pET31b(+) vector (His tag 融合蛋白質大腸菌発現用) は Invitrogen 社 (USA)、pGEX-4T2 vector (Glutathione-S-transferase (GST) tag 融合蛋白質大腸菌発現用) は GE Healthcare Sciences Life Sciences 社 (USA) から購入した。pEGFP-C3 vector (GFP 融合蛋白質真核細胞発現用) は Clontech 社 (USA) から購入した。

2. HeLa 細胞の培養

HeLa 細胞は、ATCC から購入した。HeLa 細胞は、RPMI 培地に 10% FBS (牛胎児血清、GIBCO 社より購入) 添加し、37°C、5% CO₂、95% 湿度で培養した。

3. 赤芽球の培養

赤芽球の培養及び免疫染色は、秋田大学医学部内科学澤田賢一教授との共同研究で行われた。秋田大学医学部内科学瀧保広美技官の協力を得た。

健康男子に対して研究趣旨を説明し、本人承諾に上で血液試料を採取した。

ヒト抹消血から分離した血液幹細胞を培養して CD34 陽性細胞を得た。さらにエリスロポエチン (EPO) の添加により赤芽球に分化誘導した。CD34 陽性細胞を得た時を Day 0 として脱核するまで経時的に細胞を採取した。細胞は固定後、非特異反応を BSA でブロッキング後、一次抗体として、家兎抗 4.1G Exon13 領域抗体を反応させた。FITC 標識二次抗体を反応させ、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM 510 confocal microscope) で観察した。

4. 組換え蛋白質の作製

組換え 4.1G の FERM domain、Band 3、GPC 及び p55 の細胞内ドメインの作製と CaM の精製は第 1 項に記載した。4.1G の HP 及び HP+30kDa domain (以下 GHP30) は GST fusion protein として大腸菌に発現させた。CDNA (4.1G) から、HP 及び HP30 領域を *EcoRI* 及び *Sall* 制限酵素切断部位を付加した特異プライマーによる PCR で増幅し、pGEX-4T2 ベクター (GE Healthcare Biosciences) に組換えた。4.1G は、tag 領域を欠失させた pET31 (Novagen) に組換えた塩基配列を確認後、大腸菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3) を形質転換した (4.1G には tag は付加されていない)。LB 培地にて大腸菌を 37°C 一定条件下で震盪培養し、OD600 の値が 0.4~0.8 に達した時に、IPTG を最終濃度 (1mM) 添加し、さらに 37°C 一定条件下で 3 時間震盪培養した。pGEX-4T2 ベクターで形質転換した

大腸菌は、遠心（RPR20-2 ローター、日立工機、8000rpm、4°C、8 分間）沈澱後、1mM EDTA、1mM DFP、1mM 2ME を添加した B-PER™（PIERCE、USA）に懸濁し溶菌した。溶菌液は氷上 10 分間の超音波処理後、遠心（RPR20-2 ローター、日立工機、18,000rpm、20 分間）の上清を得た。上清は、Glutathione-Sepharose（GE Healthcare Biosciences）と懸濁し、GST 融合蛋白質を分離した。GST 融合蛋白質はトロンビン処理により標的蛋白質と GST を切断した後、GST を Glutathione-Sepharose にて吸収し、Q-Sepharose（GE Healthcare Biosciences）で更に精製した。pET31b vector（4.1G）で形質転換した大腸菌は、遠心（RPR20-2 ローター、日立工機、8000rpm、4°C、8 分間）沈澱後、1mM DFP、を添加した PBS（第 1 項参照）に懸濁し、氷上 10 分間の超音波処理後、遠心（RPR20-2 ローター、日立工機、18,000rpm、20 分間）の上清を得た。上清は、35%硫酸沈澱後、Q-Sepharose、CaM-Sepharose により精製した。蛋白質の純度は SDS-PAGE にて検定した。蛋白質量は UV 法を用いた（280nm と 260nm を測定し、蛋白質濃度 (mg/ml) = 1.45 A₂₈₀ - 0.74 A₂₆₀）。

5. キメラ蛋白質の作製

Figure for constructs of chimera proteins に示したような 4.1GHP と 4.1R FERM 或は 4.1RHP と 4.1GFERM を、PCR を用いた "sewing method" により連結し、キメラ DNA を作製した。この DNA 断片を pGEX-4T2 vector 或は pEGFP-C3 へインサートした。夫々は、大腸菌を形質転換しクローニングを行った。DNA 配列

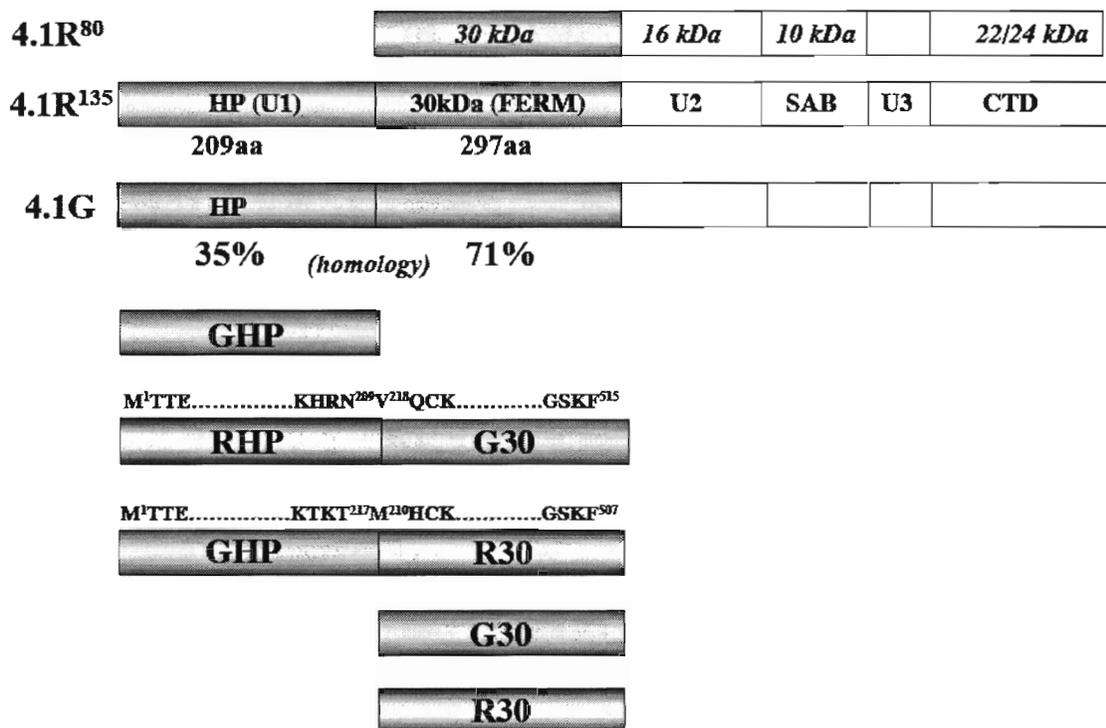


Figure for constructs of chimera proteins

を確認後、蛋白質発現用 BL21(DE3)に再度形質転換した。IPTG 添加による組換え蛋白質発現を確認した。組換え蛋白質の発現、精製、tag 蛋白質の分離は前項に記した。

HeLa 細胞への導入用 Vector は、QIA prep を用い無菌的に精製した。細胞への形質転換は、Lipofectamin を用いた。

6. 反転膜小胞 (*inside-out-vesicle: IOV*) との結合解析

健康成人男性に対して、十分な実験趣旨の説明をした上で本人了承を得た上で、血液をヘパリン存在下で腕静脈から採取し、赤血球を分離した。赤血球は、

5mM PBS 低張条件下で溶血し、ヘモグロビン等細胞内成分を除去し、所謂赤血球膜ゴースト分画を得た。赤血球膜ゴーストは、1mM EDTA 溶液 (pH8.5) に懸濁し、遠心沈澱分画 (反転膜分画) を得た。反転膜分画は、さらに、10mM NaOH pH11 で処理し膜結合の蛋白質を変性除去し、PBS で十分に洗浄の後、結合解析に供した。本文では、この pH11 で処理した反転膜を IOV とした。総蛋白質量は、便宜上、牛血清アルブミンを標準としたブラッドフォード法 (試薬は PIERCE 社、USA より購入) により測定した (目安の蛋白質量として用い、絶対量ではないことを認識の上で使用した)。種々の濃度の組換え 4.1R¹³⁵ (作製法は先に詳述) IOV と 37°C で 30 分間反応後、20% シュクロース溶液に懸濁液を重層し、ローター (RPR20-2) を用いて 18000rpm、30min、4°C で行い沈澱分画 (IOV-蛋白質結合分画) を SDS-PAGE 用処理液に懸濁した。一定量のサンプルを SDS-PAGE に掛け、蛋白質染色 (Coomassie Brilliant Blue G250) 後、デンスitomーター (インヴィトロエン) で 4.1R¹³⁵ 及び Band3 (内部標準) の吸光度をコンピューター解析した。結果は、4.1R¹³⁵ の Band3 に対する相対吸光度で評価した。Scatchard plot 解析は常法に従った。

7. 細胞内強制発現

キメラ蛋白質の cDNA を pEGFP ベクターに組み込み、塩基配列を確認後、大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5 α を形質転換した。大腸菌から無菌的にベクターを分離精製し、サブコンフルエントの HeLa 細胞に導入試薬を用いて形質転換した。顕微鏡は、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM 510 confocal microscope) で観察した

8. 蛋白質-蛋白質間の結合解析。

蛋白質-蛋白質間および蛋白質ペプチド間の反応速度論的解析には、Affinity Sensor 社(ケンブリッジ、UK)の Resonant Mirror Detection (RMD)法による IAsys 装置を用いた(図 5 参照)。蛋白質或いはペプチドは、10mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH7.4 緩衝液(0.1M NaCl を含む、以下 PBS と略記)に 100 mg/ml の濃度に溶解しアミノシランキュベット上に、BS³(Pierce 社、USA)を介して固相化した。ペプチドの固相化には、一旦アミノシランキュベット上に BSA を、BS³を介して固相化したのち、NHS/EDC にて BSA のアミノ基を活性化する方法も共用した。反応には、10mM Tris HCl 緩衝液 pH7.5、0.1M NaCl (Buffer A) に対して 1mM EGTA 或いは 1mM EGTA と 2mM CaCl₂を加えて用いた(図 2 参照)。キュベット内の反応温度は 25°C 一定に保ち、一定速度で攪拌した。反応に関わるパラメーター(結合速度定数、解離速度定数、最大結合量)は専用解析ソフトを用いて計算した(図 5B 参照)。平衡解離定数($K_{(D)kin}$)は、結合速度定数(k_a)と解離速度定数(k_d)の比から以下の式で求めた。

$$K_{(D)kin} = k_d / k_a$$

(本文中では、平衡解離定数は $K_{(D)}$ で表示した)。

9. CaM-Sepharose への 4.1R 結合性の解析

CaM-Sepharose CL 6B (Amersham Biosciences) のカラムを 50mM Tris-HCl, pH7.5 緩衝液、0.1M NaCl と 1mM CaCl₂ 含有で十分に平衡化し、同緩衝液で透析平衡化した蛋白質溶液を添加した。カラムに結合した蛋白質は 50mM Tris-HCl, pH7.5 緩衝液、0.1M NaCl と 5mM EGTA および 50mM Tris-HCl, pH7.5 緩衝液、0.6M NaCl と 5mM EGTA で順次溶出した。

[結果と考察]

1. HeLa 細胞に発現している 4.1 蛋白質の解析

HeLa 細胞で発現する 4.1 蛋白質を、夫々の分子を特異的に認識する特異抗体を用いた免疫ブロット法で観察した。抗 Exon13 ペプチド抗体は 80kDa と 135kDa にバンドを検出した。135kDa のバンドは相対的に 80kDa バンドよりも強く染色された。

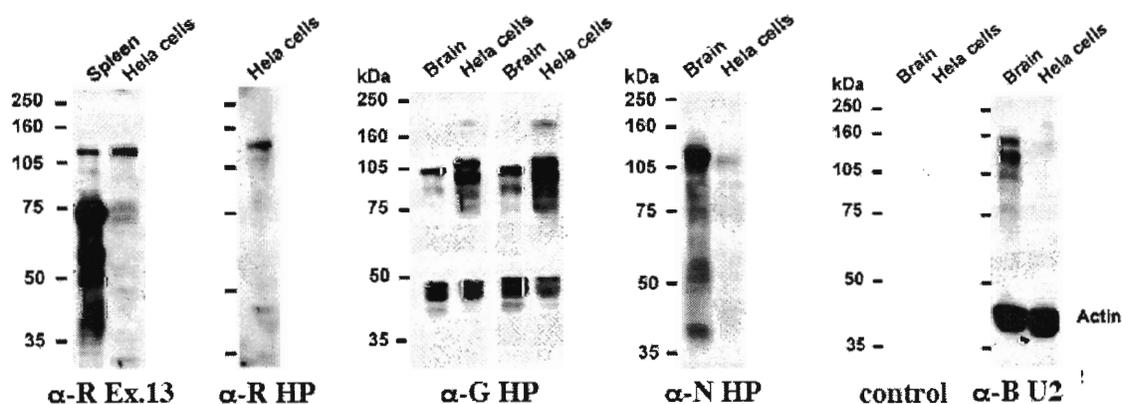


Fig. 3. Immunoblot analysis of 4.1 family proteins in HeLa cells. Immunoblot was performed with specific antibodies to human 4.1R Exon13 encoded region (α -R Ex.13), to HP of human 4.1R (α -R HP), to HP of human 4.1G (α -G HP), to HP of mouse 4.1N (α -N HP), to U2 region of mouse 4.1B (α -B U2). Control indicates that primary antibody was replacement with PBS. As positive control, extracts of mouse spleen (Spleen) and brain (Brain) were loaded onto the SDS-PAGE.

135kDa バンドは、抗 4.1RHP 抗体が検出するバンドと同じ位置であったことから、確認された。対照としてマウス脾組織の抽出液を用いた。抗 4.1GHP 抗体は、HeLa 細胞に 110kDa、95kDa の主たる 2 本のバンドを検出した。また、170kDa 付近にバンドを観察した。対照としてマウス脳抽出液を用いた。マウス脳では、105kDa の主たるバンドを認めた。マウス脳では、160kDa 及び HeLa 細胞で観察された 110kDa 及び 105kDa のバンドは観察されなかった。マウス脳及 HeLa 細胞に共通して観察された低分子（ \sim 50kDa）のバンドは分解産物と考えられる。抗 4.1N HP 抗体は、マウス脳と同じ 105kDa にバンドを認めた。抗 4.1B 抗体（U2 領域を認識する）は、全く反応しなかった。対照としてマウス脳では 110kDa に主たるバンドを認めた。43kDa 付近に反応したバンドはアクチンとの交差反応性によると考えられる。

2. HeLa 細胞に於ける 4.1 ファミリーの細胞内局在

図 4 に示すように、4.1R は、抗 4.1R Exon 13 ペプチド抗体は、細胞-細胞間の境界線上に局在していた（矢印）。4.1R¹³⁵（抗 4.1R HP 抗体に酔って認識される）も同様に細胞-細胞間の境界線上に局在していたがその染色性は相対的に弱く、また、細胞質にも散布していた。

図 5.1 に示すように、非特異的な染色は全くなかった。図 5.2 に示すように、抗 4.1G HP 抗体認識抗原は、細胞質に分布しており、細胞膜には殆ど検出されなかつ

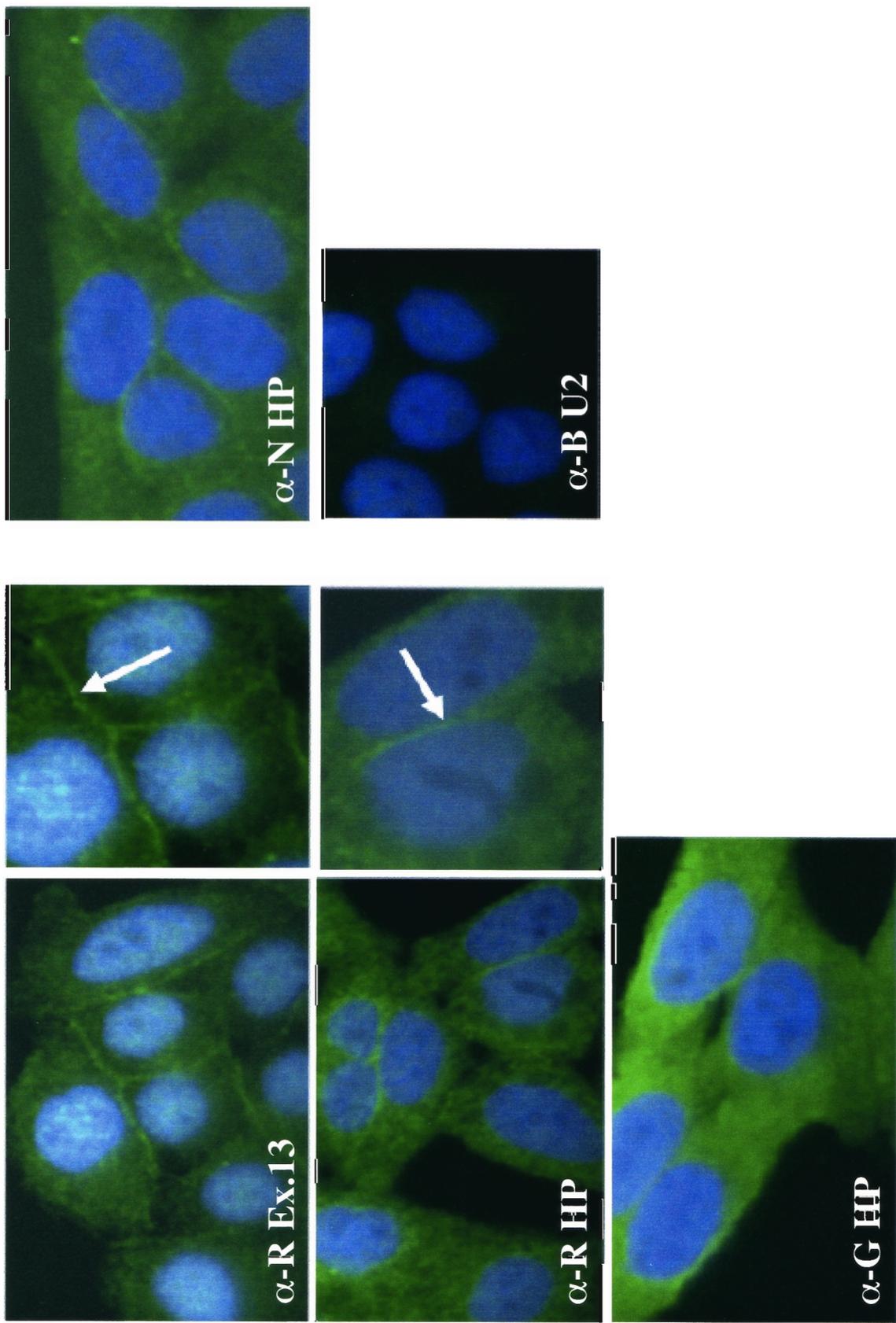


Fig. 4 Distribution of 4.1 proteins in HeLa cells.

preimmune non specific mouse IgG 10ug/ml



preimmune non specific rabbit IgG 10ug/ml

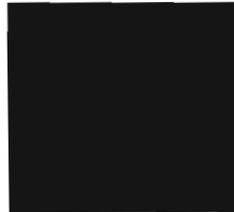


Fig. 5.1 Negative control for immunostaining of HeLa cells using pre-immune mouse (*upper*) and rabbit (*bottom*) IgG There is no staining in the HeLa cells.

た。一方、抗 4.1G HP 抗体認識抗原は、細胞-細胞間の境界面（細胞膜）に局在していた。4.1R の局在は再現性があった。

4.1G は、認識抗原によって局在が異なることは興味深い。抗 4.1G CTD 抗体は、C 末端 200 残基を認識している。また、抗 4.1G HP 抗体は HP を特異的に認識していることから、HeLa 細胞には少なくとも 2 種類の 4.1G 亜分子が有ると思われるこれらの亜分子は細胞内分布が異なることは興味深い。4.1G はその CTD 領域でアデノシン受容体と結合することが知られている。細胞膜境界に分布している事実は、このような膜貫通蛋白質との結合による可能性が高い。

図 6 に CD44 との共染色の結果を示した。4.1R と CD44 は細胞-細胞間の細胞境界面に染色されたが、4.1G（抗 4.1G HP 抗体）とは共局在は認められなかった。

図 7 に HeLa 細胞に於ける 4.1R と Ezrin の共染色像を示した。4.1R と Ezrin の分布は異なっていた。つまり、4.1R は細胞膜に、Ezrin は細胞質に分布していた。し

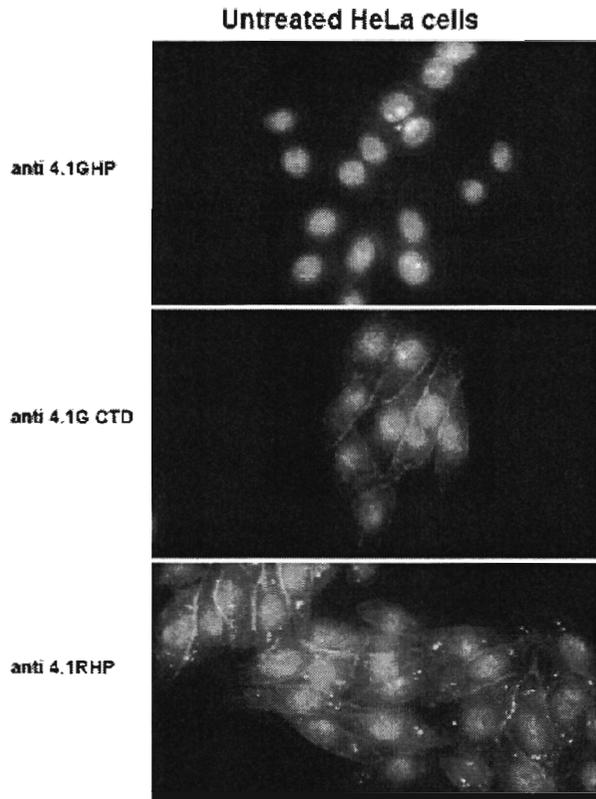


Fig. 5.2 Immuno-staining of 4.1G and 4.1R in HeLa cells. *Upper panel*; anti 4.1G, *Middle panel*; anti 4.1G CTD, *Bottom Panel*; anti 4.1R HP are shown. Interestingly, anti 4.1GHP antigen broadly distributed in cytoplasm but the anti 4.1G CTD antigen is localized at the cell-cell contact site in the HeLa cells. 4.1R135 is localized at the cell-cell contact sites.

かし、第 1-1 項で述べた様に Ezrin は斑点状に染色されなかった。Ezrin は細胞膜に分布しないことは明らかになったが、その分布形態については更に詳細な検討を要する。

第 1-2 項で述べたように、培養系細胞を用い、細胞外の Ca^{2+} を操作する (EDTA で Ca^{2+} をキレートする) ことにより、細胞内の 4.1R¹³⁵ の分布の変化を観察した。4.1G は、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ により細胞膜への結合が阻害されることを明らかにしたので、HeLa 細胞を用い、細胞外で培養液の Ca^{2+} を EGTA でキレートすること、新たに、W-7 を用いて CaM の 4.1G 結合を阻害すること、の 2 点の実験から、4.1G は膜へ局

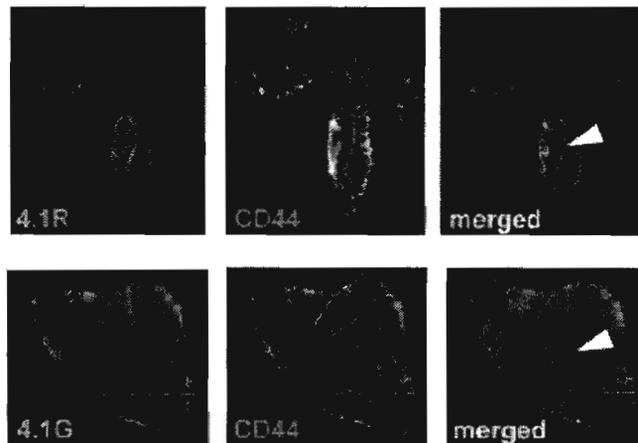


Fig.6 Co-localization of 4.1R, 4.1G and CD44 in HeLa cells. 4.1R was stained with anti 4.1R Exon 13 encoded region in HeLa cells (*upper lane*). 4.1G was detected by anti 4.1G HP. The 4.1R was co-localized with CD44 but not 4.1G.

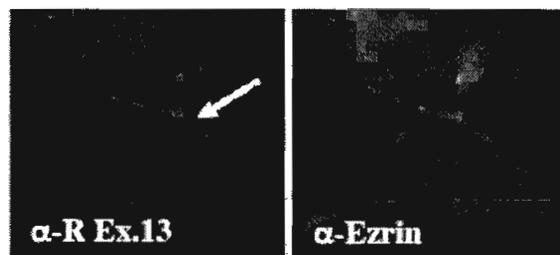


Fig. 7 Distribution of 4.1R and Ezrin in HeLa cells. 4.1R was stained with anti 4.1R Exon 13 encoded region in HeLa cells (*Left panel, Green*). Ezrin was distributed in the cytoplasm (*right panel, red*).

在が変化すると仮説の証明を試みた。

HeLa 細胞を EGTA 或いは W-7 を培養液に点かすると、30 分以降に球形化が観察された。細胞の形態変化は、W-7 の方が強かった。

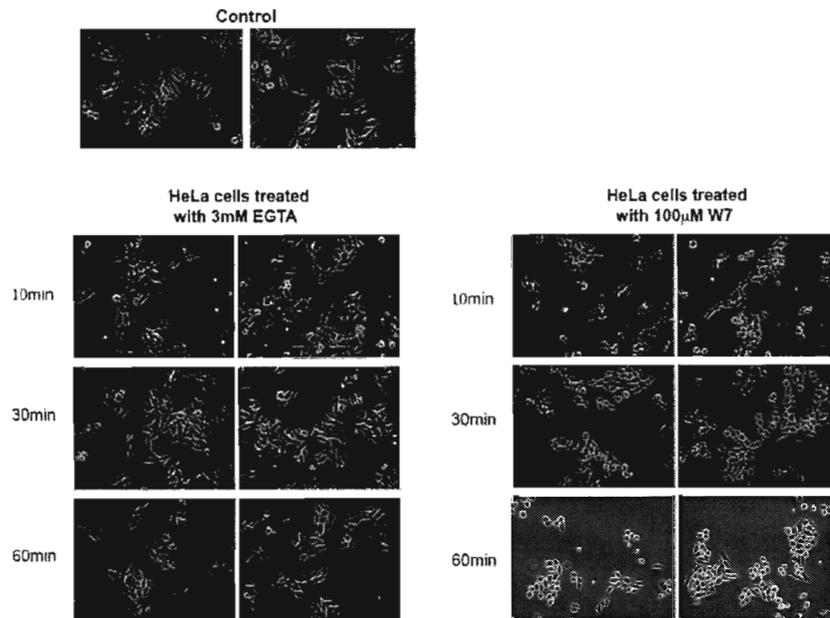


Fig.8 HeLa cells cultured in a medium containing 3mM EGTA or 100 μ M W-7 in different time. Control (*upper panels*) present cells cultured in normal RPMI medium with FCS.

次ぎに、同様に処理した HeLa 細胞の 4.1G を抗 4.1G CTD 抗体で染色した。抗 4.1G CTD 抗体を用いた免疫染色では、4.1G は、EGTA 処理において細胞-細胞間の細胞膜に局在していた。W-7 処理では、細胞の変形に伴い、4.1G 自身が検出されなくなった。一方、EGTA 処理した HeLa 細胞を抗 4.1G HP 抗体で染色すると、10 分の形態に変化がみられない時に、細胞膜に局在を観察した。しかし、その頻度は少ないので Ca^{2+} のキレート効果によって 4.1G が膜局在化したかどうかは断定できなかつた。

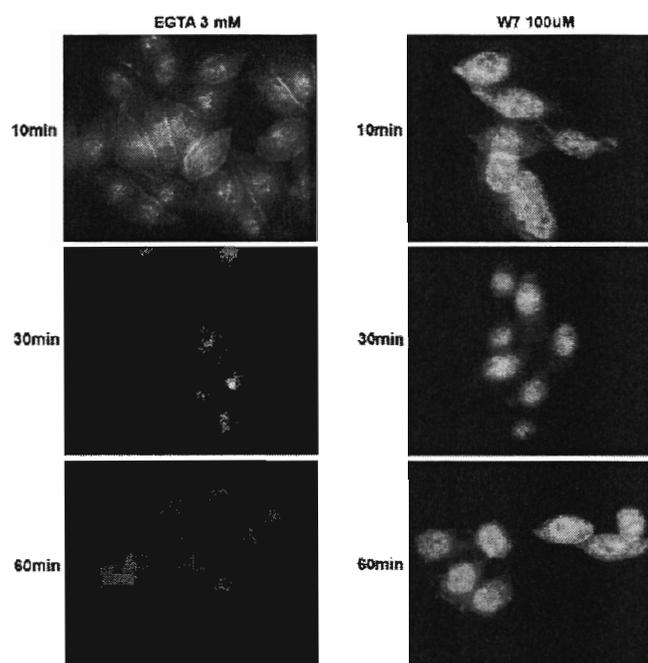


Fig.9 Distribution of 4.1G CTD in HeLa cells treated with EGTA or W-7 in different time.

Ca²⁺をキレートしても 4.1R¹³⁵ は細胞-細胞間の細胞膜局在に変化はなかった。Ca²⁺キレートによる 4.1R¹³⁵ の細胞内分布及びが HeLa 細胞と培養赤芽球でことなることは興味深い。しかし、本研究では、細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) までは測定しなかったため、この点は今後明らかにしたい。

表 1 に示したように 4.1G と 4.1R¹³⁵ は平衡解離定数 $\sim 10^{-7}$ M で CD44 に結合した。これらの結合は Ca²⁺/CaM によって完全に阻害された。きなかった。W-7 処理した HeLa 細胞を抗 4.1G HP 抗体で染色すると、細胞形態変化が著しく、染色性も減少していた。

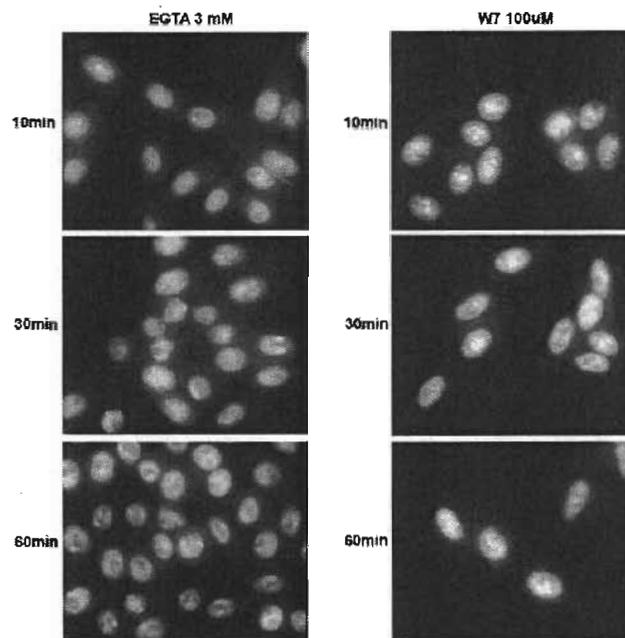


Fig. 10 Distribution of 4.1G HP in HeLa cells treated with EGTA or W-7 in different time.

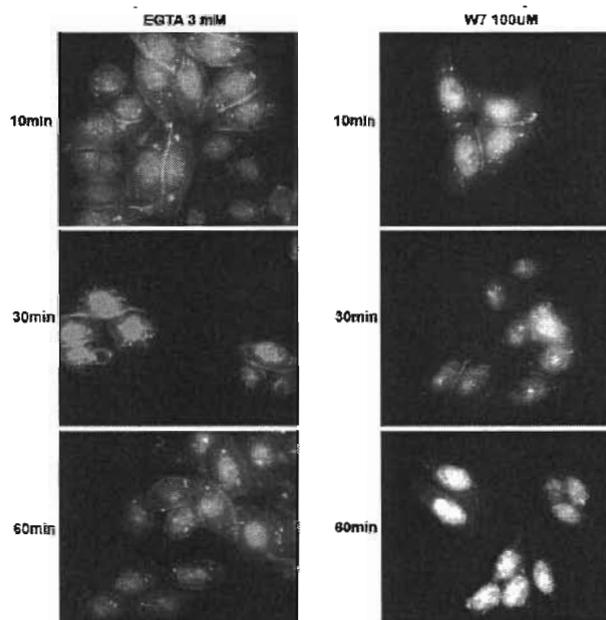


Fig. 11 Distribution of 4.1R¹³⁵ in HeLa cells treated with EGTA or W-7 in different time.

Table I. Effect of $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ on 4.1 family binding to CD44

Analyte	CaM	k_a ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	$K_{(D)}$ (nM)
4.1R ¹³⁵ full	-	$4.2 \pm 0.1 \times 10^4$	$1.5 \pm 0.2 \times 10^{-2}$	357
4.1R HP30	-	$2.6 \pm 0.1 \times 10^5$	$3.0 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	110
4.1R HP30	EGTA	$4.1 \pm 0.1 \times 10^4$	$1.5 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	366
4.1R HP30	Ca^{2+}	No binding	No binding	No binding
4.1G full	-	$3.8 \pm 0.1 \times 10^4$	$6.6 \pm 0.1 \times 10^{-3}$	174
4.1G HP30	-	$7.1 \pm 0.1 \times 10^4$	$1.4 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	197
4.1G HP30	EGTA	$7.7 \pm 0.1 \times 10^4$	$2.1 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	273
4.1G HP30	Ca^{2+}	No binding	No binding	No binding
4.1N		$4.4 \pm 0.1 \times 10^3$	$1.1 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	2500

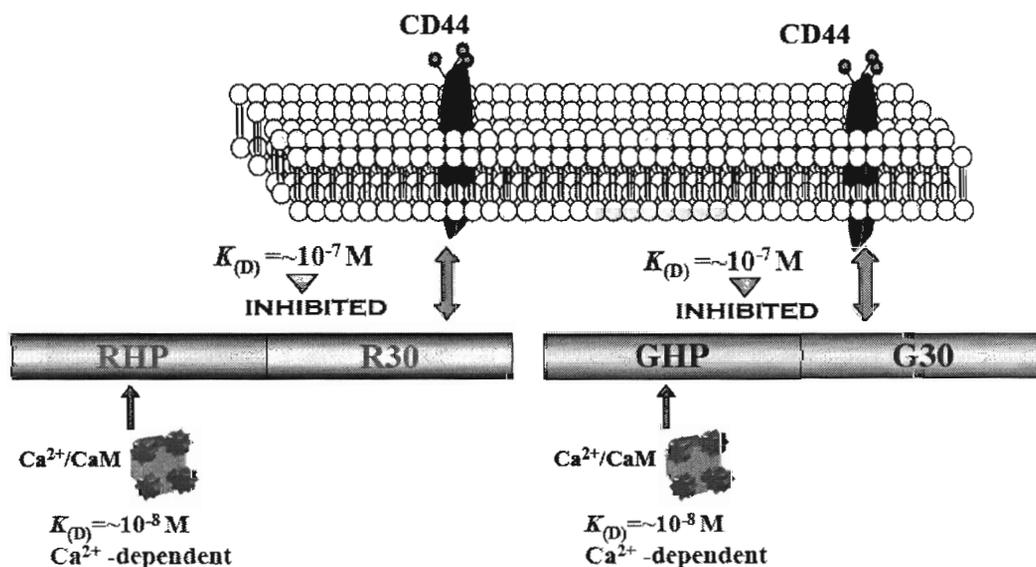


Fig.12 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ binding to HP of 4.1R and 4.1G inhibited its interacting with CD44.

3. 赤芽球に於ける 4.1G の細胞膜局在

4.1G は、赤芽球培養 7~10 日目に一過性に発現していた。抗体染色により 4.1G は赤芽球の細胞質に斑点状に染色された。また、C-末端部を認識する抗体は、免疫ブロット法にて、45kDa の位置に単一バンドを示した。このバンドは、抗 4.1G30 抗体では染色されなかったことから、赤芽球に発現している 4.1G は、N 末端を欠落したアイソフォームが存在するのかもしれない。前報では、4.1G 及び 4.1G・HP30 を上皮細胞の COS7 で強制発現した時に、実際に細胞膜に集積することを確認した。前課題報告で示したように、GFP との 4.1G 及び 4.1G・HP30 は、細胞膜に集積局在

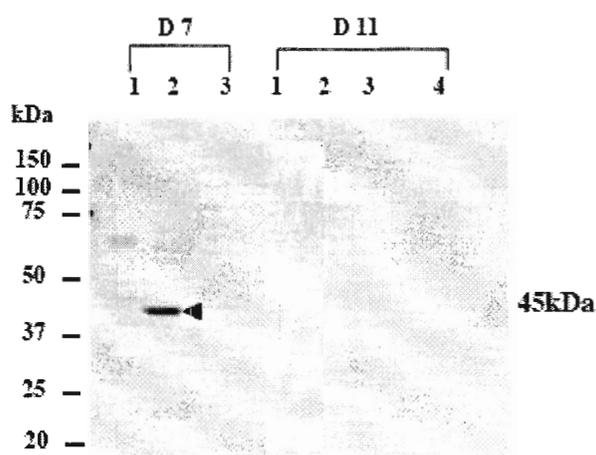


Fig.13 Immunoblot analysis of 4.1G in erythroblasts (Day7; D7 and Day11; D11). Lanes 1~4 represent as cytosol, membrane and organelle, nucleus and matrix fractions.

することから、細胞膜に局在することが確認された（但し、COS7 細胞内での実際の 4.1G が標的とする膜蛋白質は同定されていない。この実験では、Exon 16 欠失蛋

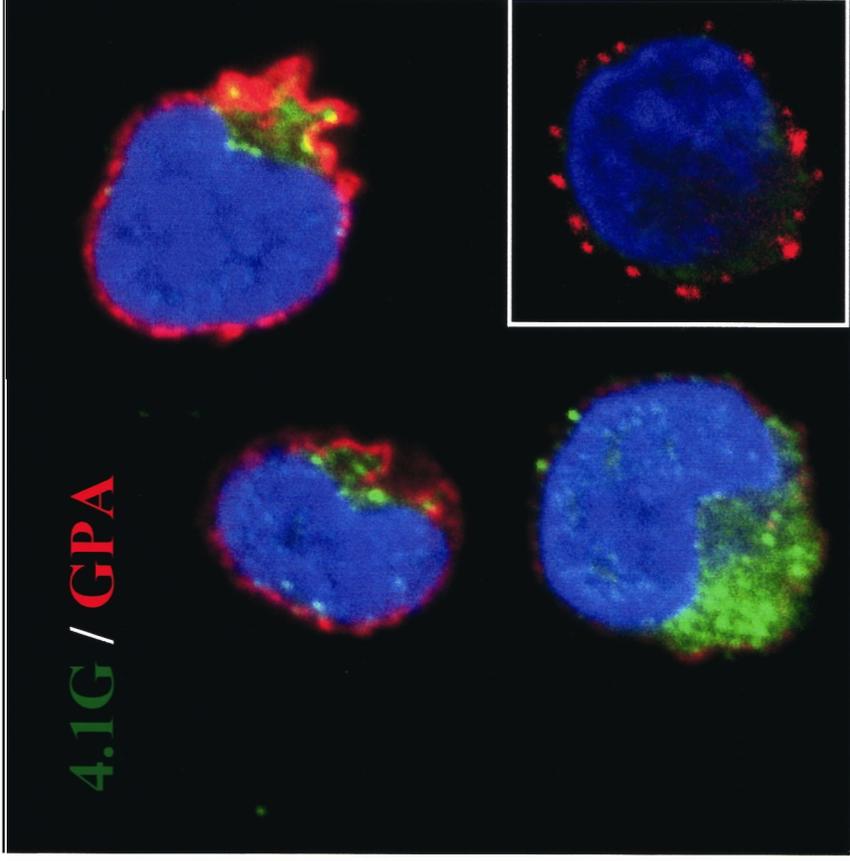


Fig. 13b Localization of 4.1G in erythroblast. Triple staining by 4.1G (*green*), GPA (*red*) and nucleus (*blue*) was performed.

白質を用いているので少なくとも Spectrin/actin filament への結合ではないと思われる。また、GHP と CTD はある種の受容体と結合するとの報告も有る）。

4. IOV と 4.1G の結合解析

4.1G と IOV の結合解析を行った。その結果、4.1G FERM ドメインは、4.1R FERM ドメインと同様に IOV と結合した。GST は IOV に結合しなかった。上記の結果を踏まえ、4.1G と膜蛋白質（GPC、Band3 及び p55）との IAsys[®]による速度論的解析を行った。4.1G は、GPC, Band3, CD44, p55 と何れも $\sim 100\text{nM}$ の平衡解離定数で結合した。この平衡解離定数は、FERM domain は、単独での結合の場合と同じだったことから、4.1G は、4.1R¹³⁵とは異なり、HP 領域が FERM domain と膜骨格蛋白質とに影響しなことが明らかになった。4.1G HP 領域には Ca^{2+} 依存性に結合する CaM 結合部位があり、その配列を同定した。4.1G HP 由来の CaM 結合ペプチドを固相化したアミノシランキュベットを用いた IAsys[®]での解析により、このペプチドに CaM は Ca^{2+} 依存性に結合した（図 14）。この配列は 4.1R¹³⁵ HP の CaM 結合部位と非常に良く似ていた。配列の相同性から、CaM 結合に関わるアミノ酸残基が想定された（図 14）。4.1G HP 由来の CaM 結合ペプチドは、オブアルブミンに結合するとオブアルブミンは不溶性になった。

4.1G HP は 4.1G full と同様に Ca^{2+} 依存性に CaM-Sepharose CL 6B に結合した（図 15）。この結合は 0.5M NaCl でも解離しなかったが、5mM EGTA で溶出された。4.1G HP と CaM の結合は Ca^{2+} による CaM の構造変化に依存することが明らかになった。

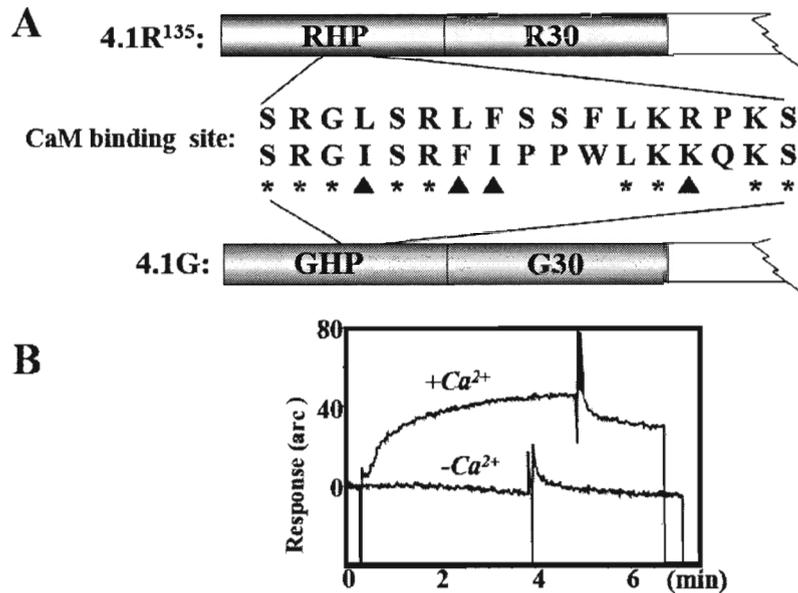


Fig.14. CaM binding sequence of 4.1GHP. Based on the 4.1R HP CaM binding sequence, a sequence of CaM binding to 4.1G was predicted. Triangle indicate the identical residue between 4.1R and 4.1G (A). The CaM binding profile of to predicted 4.1G CaM binding peptide of 4.1G immobilized on the a cuvette (B).

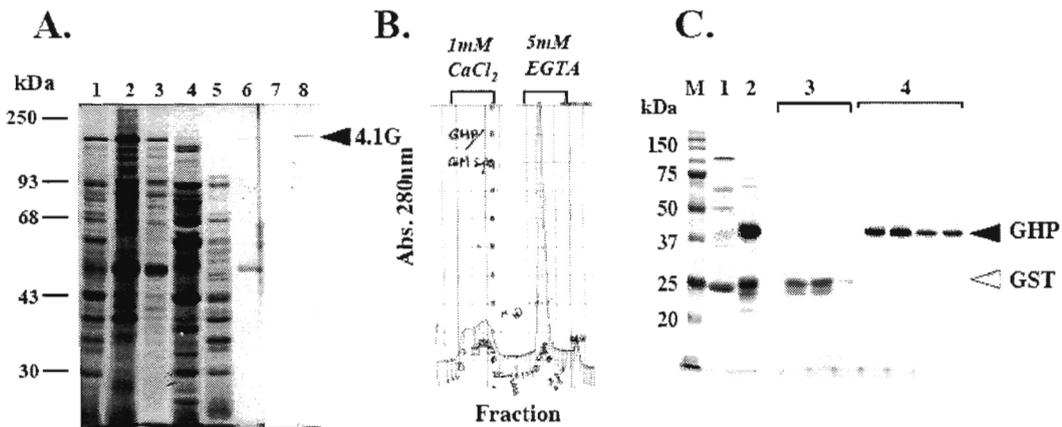


Fig.15. 4.1G binding to CaM in the presence of Ca²⁺. (A) Purification of 4.1G. 4.1G was purified by salting out and Q-Sepharose (Lanes 1~6) and CaM-Sepharose (Lane 7; Ca²⁺-presence and Lane 8; EGTA). (B) 4.1G HP bound to CaM-Sepharose. (C) Analysis of proteins from CaM-Sepharose. Mixture of GST and GHP loaded onto the column in the presence of Ca²⁺. Bound proteins were eluted by 5mM EGTA.

4.1G HP のアミノ酸組成 (209 残基) から計算された分子量は、24374.99Da であり、GHP の SDS-PAGE 上の分子量は 37kDa (図 15)であったことから GHP の大部分は構造をとらないランダム構造であることが明らかとなった。同様に RHP は、23365.15Da であったが、SDS-PAGE 上の分子量は 45kDa (Nunomura, et al. 2002)であった。これらの事実は、HP 領域はいずれもランダム構造であることが明らかとなったが、RHP の方がより構造の自由度 (ランダムな構造をとる度合い) が高いと思われる。

5. キメラ蛋白質の精製

4.1GHP は 4.1R HP と一次構造ばかりの違いから、FERM domain への膜結合性が

Glutathione-Sepharose



Thrombin cleavage



SP-Sepharose



50mM Tris/HCl, pH7.5
0.2M NaCl,
1mM EDTA,
1mM 2ME

0.4ml/min

2ml/tube

Gradient:

0.2-0.8M NaCl, 100ml

異なることが明らかになった。FERM domain は図 1 に示したように 71% のホモロジーがあり、膜蛋白質との結合は両者の間で有意な差異を認めなかった。仮説「4.1 R と 4.1G の機能的分担は HP により規定される」を実証する為に、4.1R HP と 4.1G HP を夫々の FERM domain とのキメラ (κιμερα) 蛋白質を作製し、本来の蛋白質の違いから膜結合に関わる HP の機能を考察することを目的とした。

遺伝子工学的手法により作製されたキメラ蛋白質 (4.1G HP と 4.1R 30kDa FERM domain のキメラ蛋白質 GHP-R30) の精製過程 (右のフローチャート) 及び電気泳動解析結果を示した (図 17)。グルタチオンカラムで精製した GST 融合蛋白質をト

ロンビン処理により切り離した。その GHP-R30 は、pH7.5 で平衡化された SP-Sephrose カラムに添加した。右のフローチャートに示したように、カラムに吸着した蛋白質は、NaCl の濃度勾配で溶出した。図 17 に示したように、GHP-R30 は 0.66M NaCl に現れた鋭利なピークとして溶出された。これは、各分画を電気泳動法及び抗 4.1R 30kDa 抗体及び抗 GHP 抗体による免疫ブロット法により確認した。

図 17 の結果に示した矢頭に分画には分解産物が免疫ブロット上でも確認されなかった。この分画には少なくともキメラ蛋白質としては、完全長であると判断した。

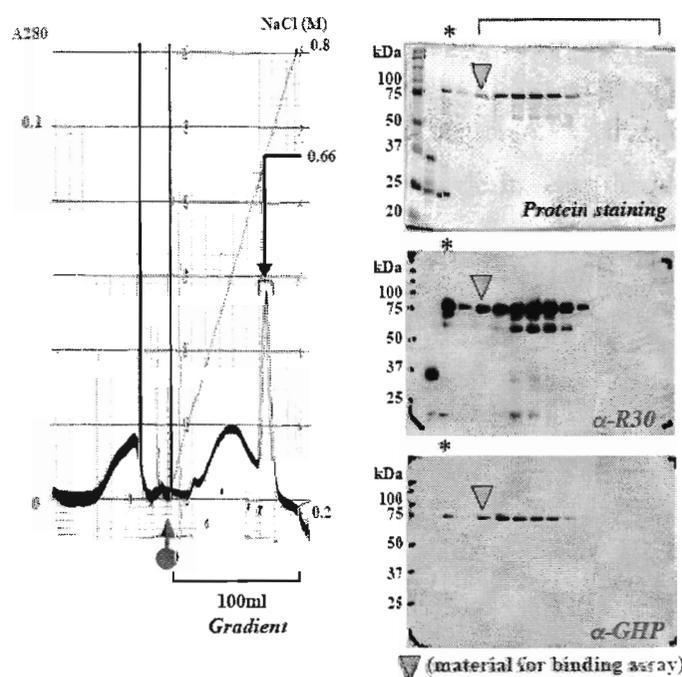


Fig.17 Elution profile of GHP-R30 protein from SP-Sephrose (left) and immuno-blot analysis of each fraction from SP-Sephrose (right). GHP-R30 chimera protein was eluted with 0.66M NaCl in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 in the presence of 1mM EDTA and 1mM 2ME. The arrow indicates the start point of NaCl gradient (0.2M to 0.8M in 100m). The fractions of around the 0.66M NaCl appeared as a sharp peak analyzed with SDS-PAGE and immuno-blot using antibodies to 4.1R 30kDa domain (α -R30) and to 4.1G HP (α -GHP). Upper panel shows protein staining of SDS-PAGE gel with Coomassie Brilliant Blue G-250 (*Protein staining*). Arrow-head indicate that the sample for using binding assay. The fraction did not contain any degradation.

キメラ蛋白質 RHP-G30 は、CaM-Sepharose CL-6B に Ca^{2+} 非依存性に結合した。
(図 14)。

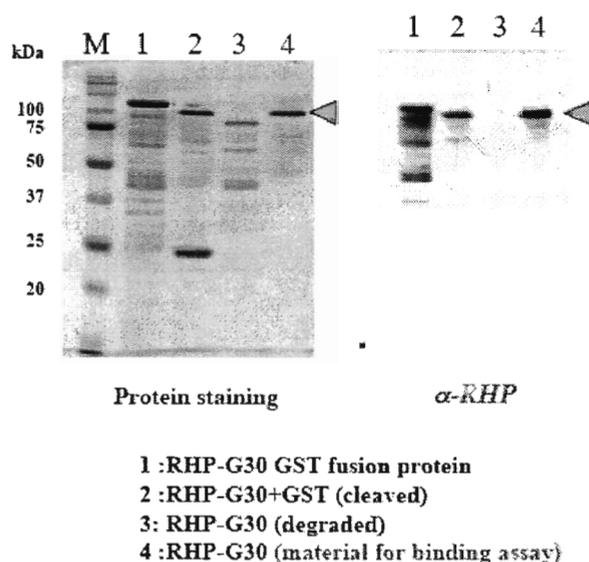


Fig.14 Elution profile of RHP-G30 protein from SP-Sepharose (left) and immuno-blot analysis of each fraction from SP-Sepharose (right). GHP-R30 chimera protein was eluted with 0.66M NaCl in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 in the presence of 1mM EDTA and 1mM 2ME. (data of elution profile not shown). The arrow indicates the start point of NaCl gradient (0.2M to 0.8M in 100m). The fractions of around the 0.66M NaCl appeared as a sharp peak analyzed with SDS-PAGE and immuno-blot using antibody to 4.1R HP (α -RHP). Upper panel shows protein staining of SDS-PAGE gel with Coomassie Brilliant Blue G-250 (*Protein staining*). Arrow-head indicate that the sample for using binding assay. The fraction did not contain any degradation.

6. キメラ蛋白質と膜蛋白質の結合解析

これは GHP-G30 が 4.1G full と同様に CaM-Sepharose CL-6B に Ca^{2+} 依存性に結合した結果とは異っていた。IASys[®]を用いた測定結果では、キメラ蛋白質 RHP-G30

は、CaM を固相化したアミノシランキュベットに対して、 $\sim 100\text{nM}$ (サブマイクロオーダー) の平衡解離定数で結合し、G30 単独、R30 単独と CaM の結合平衡解離定数と同じだったことから、キメラ蛋白質 RHP-G30 では RHP には CaM は結合せず G30 に結合することが明らかになった。

キメラ蛋白質 RHP-G30 は、G30 同様に pH11-IOV と共沈殿し、また、膜貫通蛋白質 (GPC, Band3, CD44) 或は p55 を固相化したアミノシランキュベットに結合し、その平衡解離定数は $\sim 100\text{nM}$ (サブマイクロオーダー) であった。

$\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ は、キメラ蛋白質 RHP-G30 と膜貫通蛋白質 (GPC, Band3, CD44) 或は p55 の中で CD44 以外の結合を約 10 倍弱くした。この結果は、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ の R30 と膜蛋白質との制御機能と同じであった。CD44 との結合には影響しなかった。キメラ蛋白質の RHP は G30 と静電的に反発する等の作用により、RHP は G30 の膜結合に全く関与しなくなったと考えられる。

7. キメラ蛋白質と IOV との結合

図 19 に示したように、キメラ蛋白質は反転膜小胞に結合した。HP だけでは、反転膜小胞に結合しないことから HP 部分を取り替えても FERM domain は膜に結合することが示唆された。RHP-G30 を P-IOV と共に混和すると RHP 部分が分解し、30kDa 部分 (G30) のみが残った。GHP-R30 の方が RHP-G30 よりも SDS-PAGE で大きな分子量の位置に泳動された。GHP-R30 は、反転膜小胞に結合すると見かけ上分子量が元の蛋白質よりも大きくなった。これらの結果を元に、キメラ蛋白質と CaM 及び膜蛋白質との結合解析を行った。

表2には、キメラ蛋白質と CaM の結合解析結果をまとめた。キメラ蛋白質は、native 蛋白質とは異なり Ca^{2+} 非依存性に CaM と結合し、その平衡解離定数は約 $\sim 10^{-7}\text{M}$ であった。

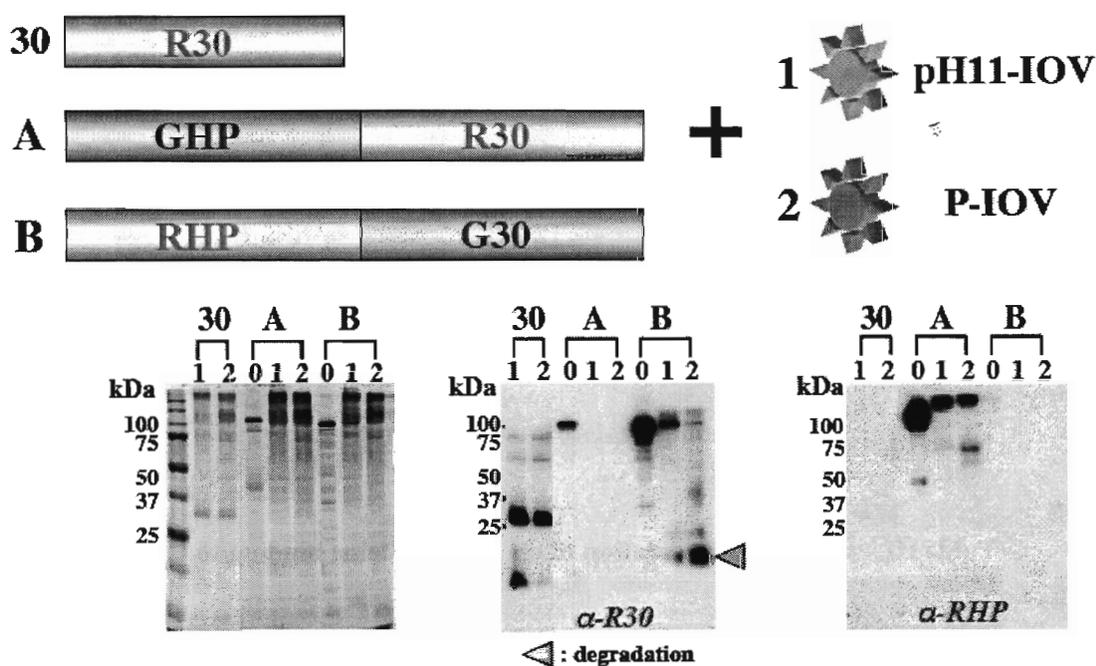


Fig.19 Chimera proteins binding to IOVs. Human 4.1R 30kDa FERM domain (*R30*) and chimera proteins, GHP-R30 and RHP-G30 were incubated with pH11 treated IOV (*pH11-IOV*) and PKC activated by PMA treated IOV (*P-IOV*). Proteins precipitated with IOVs by centrifuge. The precipitates were analyzed by SDS-PAGE and immuno-blot using antibodies to R30 (α -*R30*) and to HP (α -*RHP*). *30*, *A* and *B* represents R30, RHP-G30 and GHP-R30. The numbers *0*, *1* and *2* represent in put, supernatant and precipitate form centrifuge.

キメラ蛋白質によって、本来の HP の CaM 結合性が消失しい、FERM domain との結合と同様に、完全な阻害はなく平衡解離定数の増大（親和性の低下）が観察された。

Table II *Chimera proteins bound to CaM*

Analyte	Ligand	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	$K_{(D)}$ (nM)
GHP-R30	EGTA/CaM	$4.5 \pm 0.3 \times 10^5$	$4.6 \pm 0.4 \times 10^{-2}$	111
GHP-R30	Ca ²⁺ /CaM	$4.1 \pm 0.3 \times 10^5$	$6.3 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	154
RHP-R30	EGTA/CaM	$2.6 \pm 0.2 \times 10^3$	$1.6 \pm 0.3 \times 10^{-2}$	11428
RHP-R30	Ca ²⁺ /CaM	$2.0 \pm 0.1 \times 10^5$	$1.9 \pm 0.1 \times 10^{-3}$	73
RHP-G30	EGTA/CaM	$4.1 \pm 0.1 \times 10^4$	$1.8 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	439
RHP-G30	Ca ²⁺ /CaM	$1.0 \pm 0.1 \times 10^5$	$2.3 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	230
GHP-G30	EGTA/CaM	$3.0 \pm 0.3 \times 10^3$	$8.8 \pm 0.2 \times 10^{-3}$	2667
GHP-G30	Ca ²⁺ /CaM	$1.8 \pm 0.1 \times 10^5$	$8.0 \pm 0.4 \times 10^{-3}$	43

Binding buffer: 50mM Tris/HCl, pH7.5, 0.1M NaCl, 1mM EGTA (EGTA/CaM) or 1.1mM CaCl₂ and 1mM EGTA (Ca²⁺/CaM)

Table III. Ca²⁺/CaM regulation of chimera proteins binding to CD44

Analyte	Ligand	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	$K_{(D)}$ (nM)
GHP-R30	EGTA	$7.7 \pm 0.1 \times 10^5$	$2.1 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	27
GHP-R30	Ca ²⁺	$3.7 \pm 0.1 \times 10^5$	$1.5 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	43
GHP-R30	EGTA/CaM	$4.1 \pm 0.1 \times 10^5$	$1.5 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	37
GHP-R30	Ca ²⁺ /CaM	$7.5 \pm 0.1 \times 10^4$	$2.8 \pm 0.2 \times 10^{-2}$	373
RHP-G30	EGTA	$6.1 \pm 0.1 \times 10^4$	$1.2 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	198
RHP-G30	Ca ²⁺	$8.7 \pm 0.1 \times 10^4$	$9.5 \pm 0.1 \times 10^{-3}$	107
RHP-G30	EGTA/CaM	$6.5 \pm 0.1 \times 10^4$	$1.1 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	169
RHP-G30	Ca ²⁺ /CaM	$2.9 \pm 0.1 \times 10^4$	$1.7 \pm 0.2 \times 10^{-2}$	582

Binding buffer: 50mM Tris/HCl, pH7.5, 0.1M NaCl, 1mM EGTA (EGTA/CaM) or 1.1mM CaCl₂ and 1mM EGTA (Ca²⁺/CaM)

2種類のキメラ蛋白質は、膜蛋白質に対して共に native 蛋白質とは異なる結合様式を示した。GHP-R30はCD44に対して native form (GHP-G30及びRHP-R30)よりも約10倍強く結合し ($\sim 10^{-8}M$)、また、Ca²⁺/CaMによって、平衡解離定数

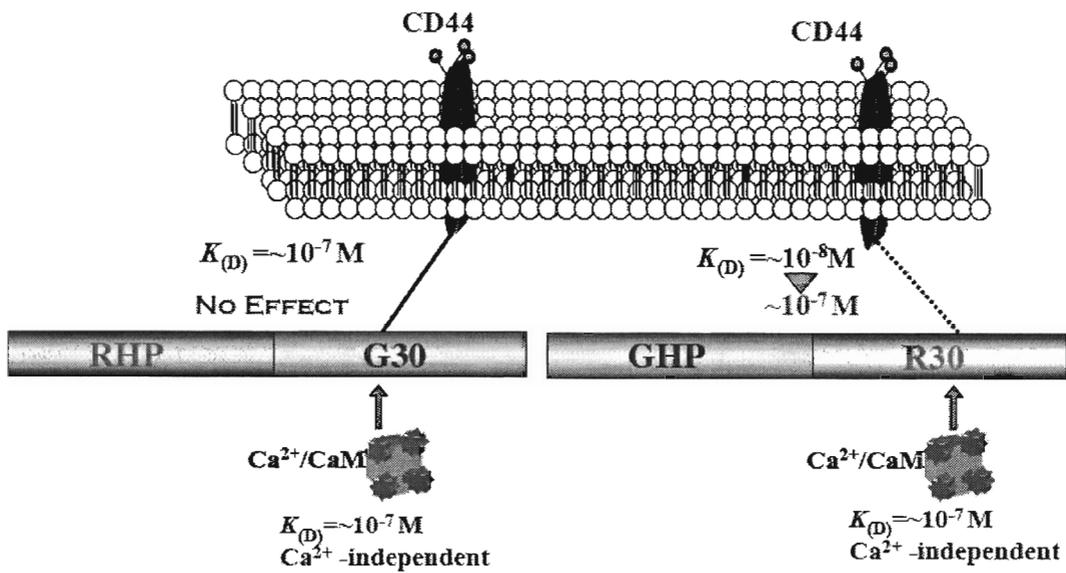


Fig. 20. Ca^{2+}/CaM regulation of chimera proteins binding to CD44.

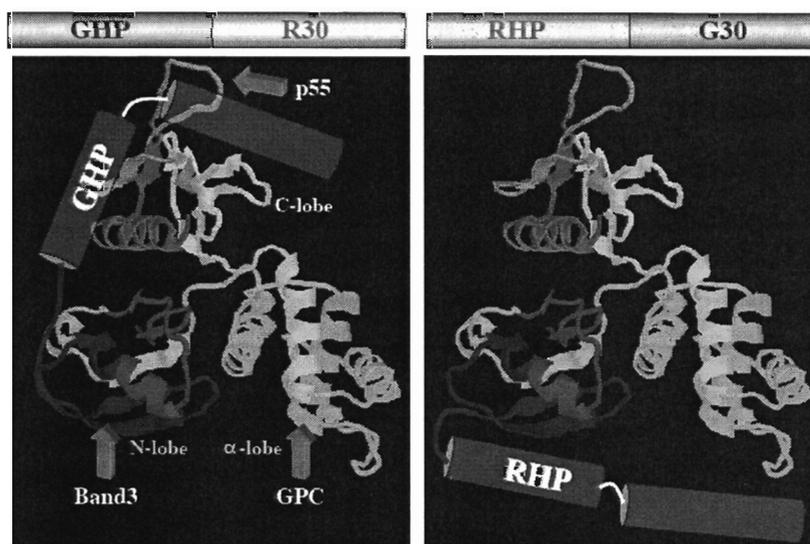


Fig.21. Proposed model of topology of HP on the FERM domain in chimera protein. This is virtual model based on the binding assay. 3D structure of FERM domain (human 4.1R) is visualized based on PDB1GG3. In GHP-R30, GHP may locate near the C-lobe. In RHP-G30, RHP may locate far from FERM domain.

は約 10 倍上昇した。一方、RHP-G30 は、CD44 に平衡解離定数 $\sim 10^{-7}$ M で結合したが、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ は平衡解離定数を変えなかった。FERM domain の結合 site は C-lobe 領域にあることを明らかにした。キメラ蛋白質の解析結果は、FERM domain に HP が寄り添っている（結合ではなく、空間的配置として HP は FERM domain の近傍に在る）と考えられる。この空間的配置が 4.1G と 4.1R の膜結合性の特異性を規定していると考えられる。この仮説を確かめる為に、FERM domain の他の結合を解析した。つまり、赤血球膜蛋白質である Band3、GPC 及び p55 を対象として、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ の影響をしらべた。

表 4 及び図 22 に示すように、GHP-R30 は R30 と同様に GPC と Band3 とは平衡解離定数 $\sim 10^{-7}$ M で結合し、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ はその結合に影響しなかった。GHP-R30 は R30 と異なり p55 とは平衡解離定数 $\sim 10^{-8}$ M で結合し、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ の結合によって、平衡解離定数は約 10 倍上昇した。この結果は、GHP-R30 と CD44 との結合と同様であり、C-lobe に結合する p55 に対して影響すると考えられる（図 25）。

Table IV. Chimera protein binding with membrane proteins (1)

Analyte	Ligand		$k_a (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$k_d (\text{s}^{-1})$	$K_D (\text{nM})$
GHP-R30	GPCcyt	EGTA	$1.1 \pm 0.1 \times 10^5$	$2.1 \pm 0.2 \times 10^{-2}$	191
		Ca^{2+}	$1.5 \pm 0.1 \times 10^5$	$1.9 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	154
		EGTA/CaM	$1.3 \pm 0.1 \times 10^5$	$2.1 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	162
		$\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$	$7.6 \pm 0.1 \times 10^4$	$1.9 \pm 0.4 \times 10^{-2}$	250
GHP-R30	p55	EGTA	$3.0 \pm 0.1 \times 10^5$	$1.9 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	63
		Ca^{2+}	$7.8 \pm 0.1 \times 10^5$	$3.7 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	47
		EGTA/CaM	$6.0 \pm 0.1 \times 10^5$	$3.0 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	50
		$\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$	$1.9 \pm 0.1 \times 10^5$	$6.0 \pm 0.4 \times 10^{-2}$	316
GHP-R30	Band3cyt	EGTA	$9.1 \pm 0.1 \times 10^4$	$1.3 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	143
		Ca^{2+}	$7.0 \pm 0.1 \times 10^4$	$2.6 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	371
		EGTA/CaM	$6.6 \pm 0.1 \times 10^4$	$1.9 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	288
		$\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$	$4.0 \pm 0.1 \times 10^4$	$1.8 \pm 0.4 \times 10^{-2}$	450

Binding buffer: 50mM Tris/HCl, pH7.5, 0.1M NaCl, 1mM EGTA (EGTA) or 1.1mM CaCl_2 and 1mM EGTA (Ca^{2+})

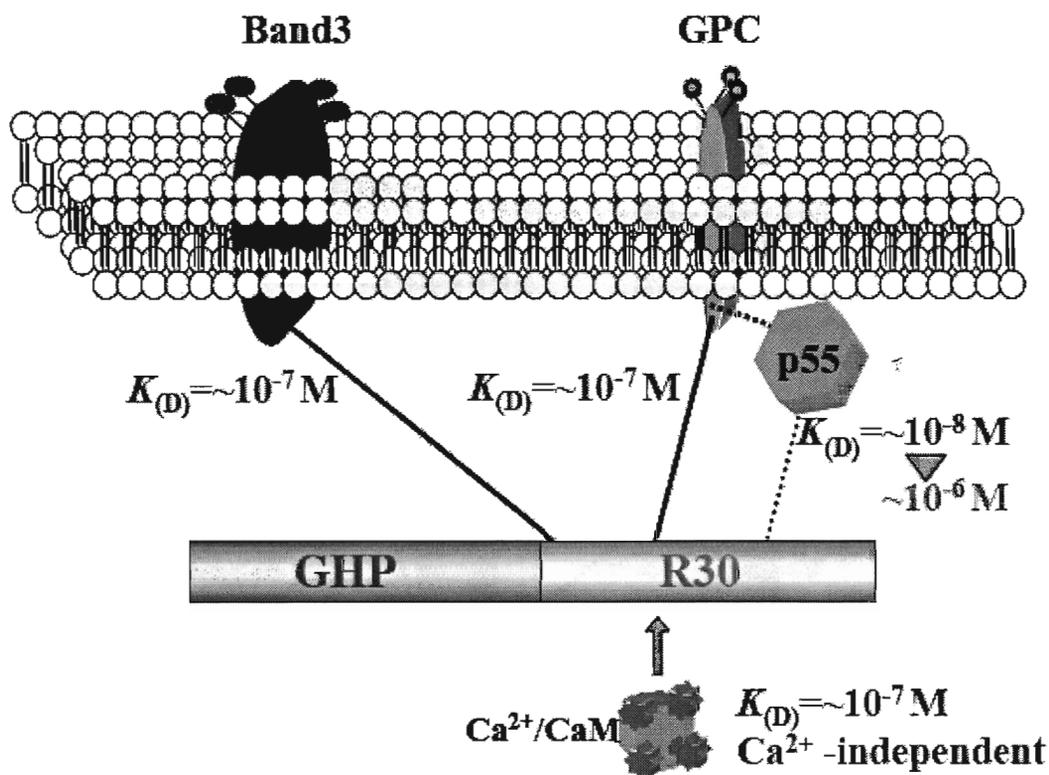


Fig.22. Chimera protein (GHP-R30) binding to membrane proteins and its regulation by $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$.

Table V. Chimera protein binding with membrane proteins (2)

Analyte	Ligand		$k_a (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$k_d (\text{s}^{-1})$	$K_{(D)} (\text{nM})$
RHP-G30	GPCcyt	EGTA	$4.6 \pm 0.4 \times 10^4$	$1.3 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	284
		Ca^{2+}	$1.7 \pm 0.1 \times 10^4$	$7.3 \pm 0.1 \times 10^{-3}$	433
		EGTA/ CaM	$6.4 \pm 0.4 \times 10^4$	$1.2 \pm 0.2 \times 10^{-2}$	187
		$\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$	$1.4 \pm 0.1 \times 10^4$	$1.9 \pm 0.4 \times 10^{-2}$	1357
RHP-G30	p55	EGTA	$8.0 \pm 0.6 \times 10^4$	$2.2 \pm 0.2 \times 10^{-2}$	275
		Ca^{2+}	$3.0 \pm 0.2 \times 10^4$	$1.2 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	400
		EGTA/ CaM	$6.8 \pm 0.4 \times 10^4$	$1.2 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	176
		$\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$	$3.0 \pm 0.2 \times 10^4$	$3.2 \pm 0.4 \times 10^{-2}$	1067
RHP-G30	Band3cyt	EGTA	$8.0 \pm 0.6 \times 10^4$	$2.2 \pm 0.2 \times 10^{-2}$	275
		Ca^{2+}	$5.9 \pm 0.5 \times 10^4$	$1.0 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	169
		EGTA/ CaM	$6.4 \pm 0.4 \times 10^4$	$1.2 \pm 0.2 \times 10^{-2}$	187
		$\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$	$2.0 \pm 0.2 \times 10^4$	$4.3 \pm 0.4 \times 10^{-2}$	2150

Binding buffer: 50mM Tris/HCl, pH7.5, 0.1M NaCl, 1mM EGTA (EGTA) or 1.1mM CaCl_2 and 1mM EGTA (Ca^{2+})

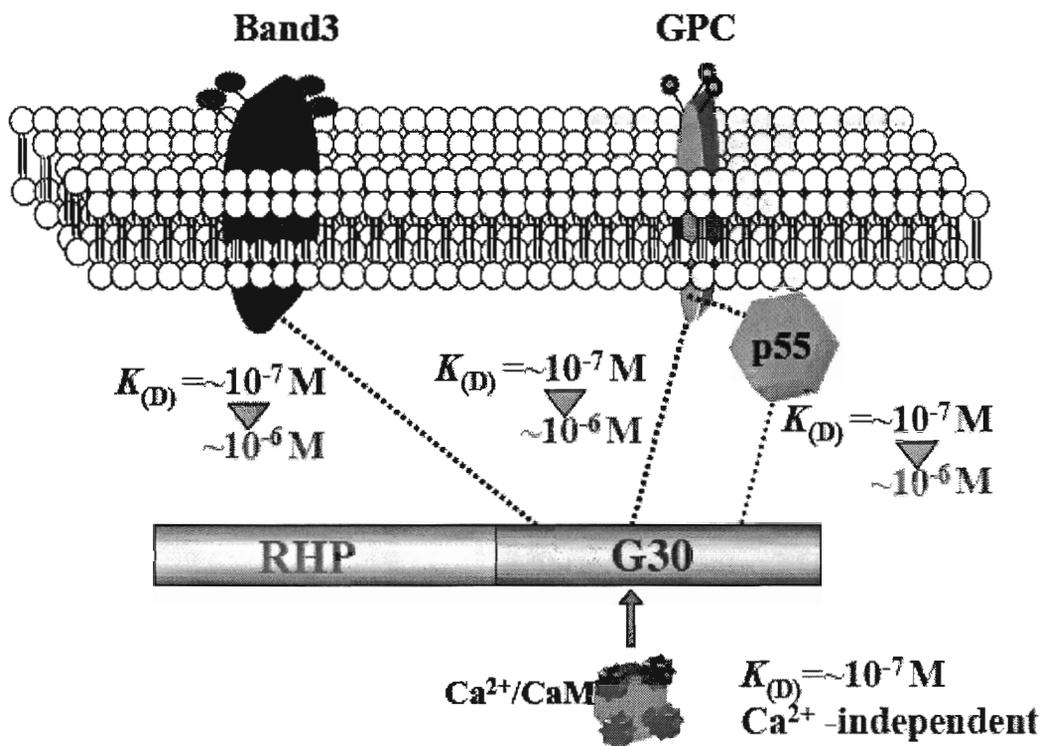


Fig. 23 Chimera protein (RHP-G30) binding to membrane proteins and its regulation by $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$.

RHP-G30 は、膜蛋白質と平衡解離定数 $\sim 10^{-7}\text{M}$ で結合し、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ はその平衡解離定数を約10倍上昇させた(親和性が約10分の1に弱くなった)この $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ による制御反応はG30単独の膜結合と同じであることから、キメラ蛋白質のHPは全くFERM domainに関与していない、或は、HPはFERM domainは離れた一にあると考えられる(表5と図23)。

図24には、キメラ蛋白質のHeLa細胞内局在を示した。キメラ蛋白質(GHP-R30)は細胞膜近傍に局在していた。IAsys[®]での結合解析で得られた結果を支持した。

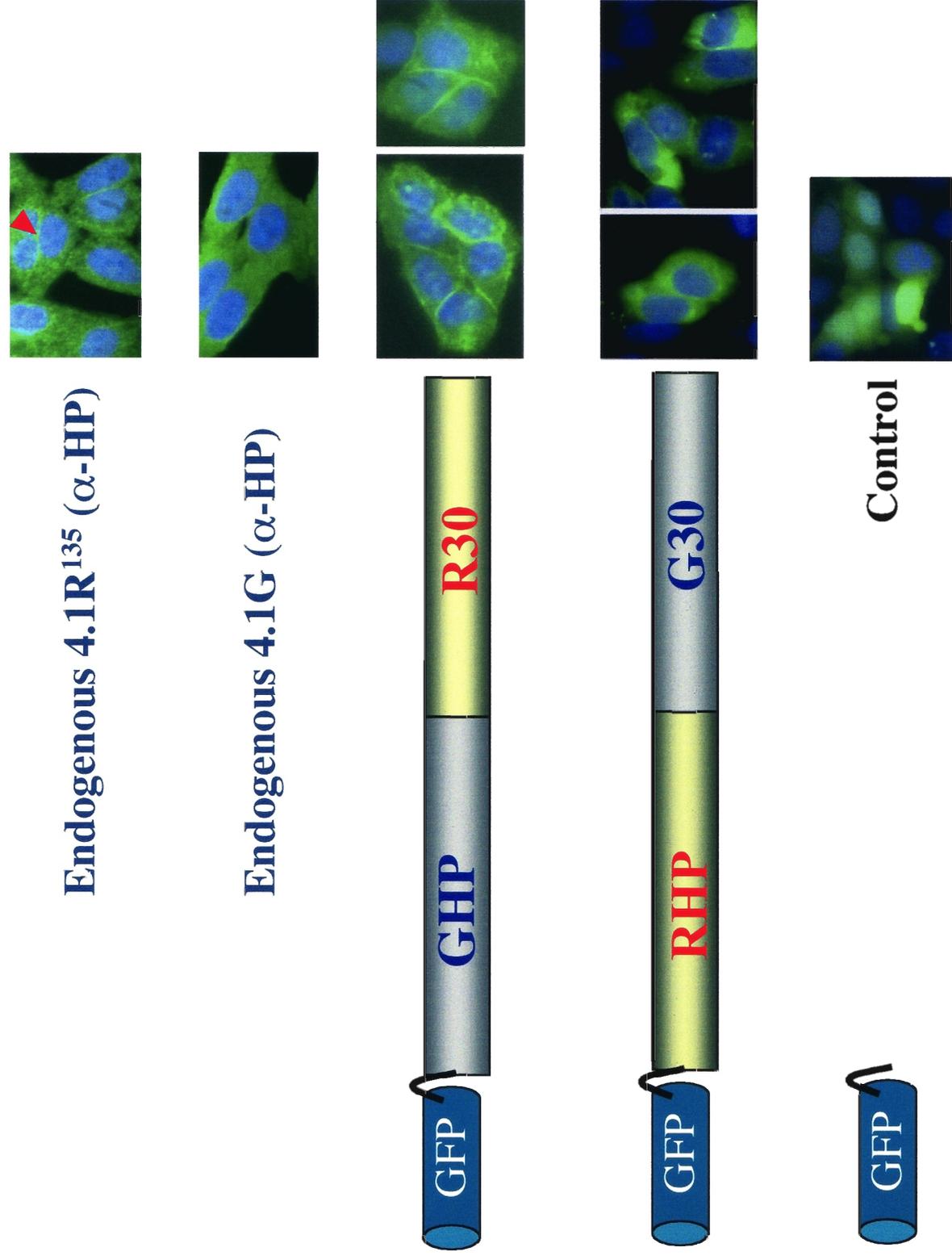


Fig. 24. Localization of chimera proteins in HeLa cells. The transfected proteins were fused with GFP.

キメラ蛋白質 (RHP-G30)は、細胞質に染色された。

[まとめ]

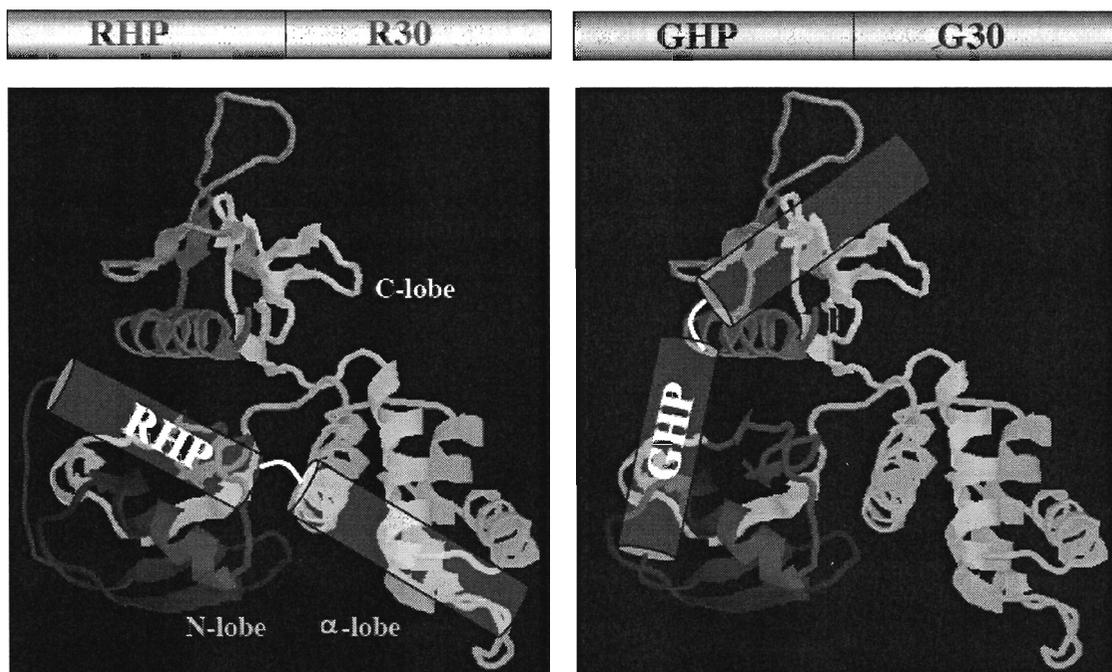


Fig.25. Proposed topology of HP and FERM domain of 4.1R and 4.1G. FERM domain is visualized based on the PDB 1GG3 (visualized by RasMol®).

図 25 に予想される 4.1R 30kDa FERM domain と HP のトポロジーを示した。4.1G 及び 4.1R¹³⁵ の HP は共にランダム構造であることが示唆された。4.1R¹³⁵ の HP は FERM domain の N-lobe と α -lobe の近傍に位置しているが、4.1G では、3 つの lobe の膜結合部位には全く関係しない距離にあると想定された。この構造的な違いから、HP に結合した $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ による FERM domain の結合制御活性も異なると考えられる。本研究では、RHP-R30 の結晶化を試みたが、HP が構造をとらないため、結晶を得ることが出来なかった。RHP-R30 には Ca^{2+} 依存性の CaM

結合部位が在るため、CaM と RHP-R30 の共結晶化も試みたが結晶を得ることは出来なかった。現在、本研究で得られた結果を元に計算による構造予想を試みている。

4.1R¹³⁵ 及び 4.1G の FERM domain が実際、生体内でどの蛋白質と結合しているのかは分かっていない。しかし、4.1R 30kDa FERM domain は他の膜蛋白質や CaM のみならず、PS 或は PIP₂ も結合することから、細胞膜脂質へ直接結合しうる。本研究は、今後解明されるであろう、4.1R¹³⁵ 及び 4.1G の結合蛋白質との結合解析に情報を提供出来ると期待する。

[参考文献]

Han, B. G., Nunomura, W., Takakuwa, Y., Mohandas, N. and Jap, B.K.

Protein 4.1R core domain structure and insights into regulation of cytoskeletal organization

Nature Struct. Biol. 7 (2000) 871-875.

Nunomura, W., Takakuwa, Y., Tokimitsu, R., Krauss, S.W., Kawashima, M., Mohandas, N.

1997. Regulation of CD44 –protein 4.1 interaction by Ca²⁺ and calmodulin

J. Biol. Chem. 272, 30322-30328.

2

Nunomura, W., Takakuwa, Y., Parra, M., Conboy, J. G., Mohandas, N.,

2000a. Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent calmodulin binding sites in erythrocyte protein 4.1. Implications for regulation of protein 4.1

interactions with transmembrane proteins. J. Biol. Chem. 275, 6360-6367.

Nunomura, W., Takakuwa, Y., Parra, M., Conboy, J. G., Mohandas, N.,

2000b. Regulation of protein 4.1R, p55, and glycophorin C ternary complex in human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 275, 24540-24546.

Nunomura, W., An, X., Gascard, P., Parra, M., Narla, M., Takakuwa, Y., 2002. Regulation of 135 kDa protein 4.1R interactions with membrane proteins by its head-piece region. *Mol. Biol. Cell* 13, 500a (suppl.)

第 2 節 比較生物化學的研究

第 3-1 項 ゼブラフィッシュ 4.1R 膜結合性の解析

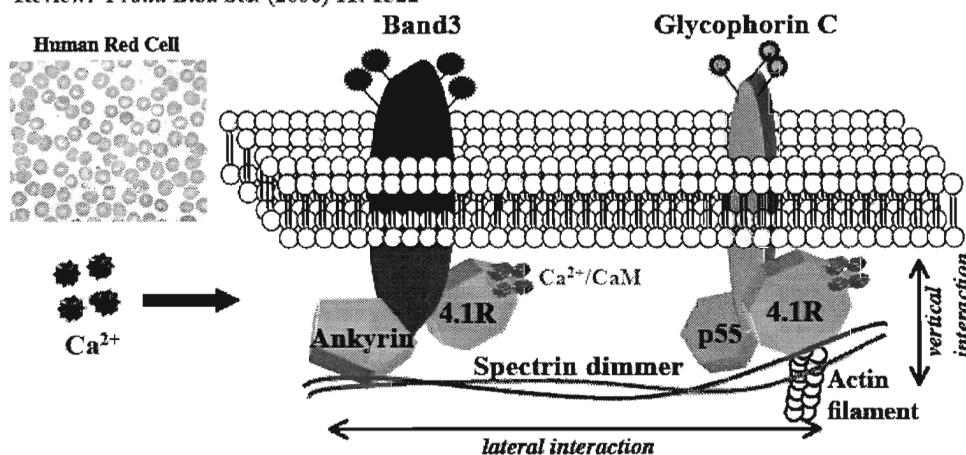
[目的]

我々は、背景 1 に示すようにヒト赤血球膜骨格蛋白質の分子間相互作用を 4.1R と CaM の結合に焦点をあて解析して来た。

Background.1 Over view of human erythrocyte membrane structure

A protein network forming a “cytoskeleton” underlies the cytoplasmic surface of the erythrocyte lipid bilayer. Spectrin (α and β), actin, adducin, 4.1R (80kDa erythrocyte type) and p55 are the main constituents of the skeleton. Interactions between these proteins are defined as lateral interactions. This protein network is anchored to the lipid bilayer through two vertical interactions, one involving ankyrin and Band3, the other one involving 4.1R, p55, and Glycophorin C. Calmodulin (CaM) binds to 4.1R independent to cytosolic Ca^{2+} concentration. Ca^{2+} saturated CaM (Ca^{2+}/CaM) regulates the 4.1R binding to the membrane proteins.

Review: *Front. Biol. Sci.* (2006) 11: 1522



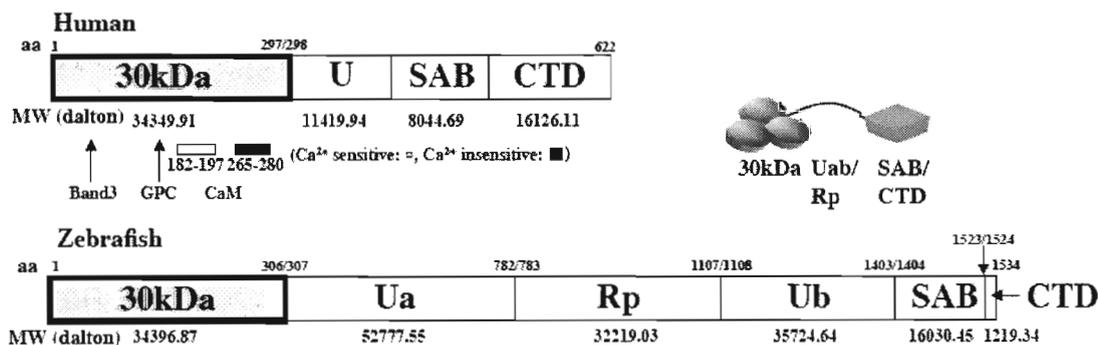
本項では、4.1R の膜結合性を比較生化学的見地から解析し、蛋白質構造との相関性を膜骨格蛋白質の進化学を視野に入れて、4.1R の生物学的意義（機能）にアプローチすることを目的とした。膜骨格蛋白質の比較生化学的研究は世界的にも希少である。これは、膜骨格蛋白質は酵素などのように活性があるわけでもない、その生物学的機能を計る指標がない為と思われる。本研究では、蛋白質-蛋白質の分子間相互作用の定量的評価により、蛋白質の特異的分子認識

を蛋白質の機能と捉え、解析を行った。

哺乳動物以外ではゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) のmutantのマスクリーニングの解析から4.1Rの遺伝子構造が報告され、そのcDNAからアミノ酸配列が予測された (Shafizadeh *et al. Development* 2002)。Shafizadeh *et al.*らは、分子途中で異常な停止コドンをもつ4.1R mutantの赤血球は形態変化、チューブリンの分布異常を報告した。

一方、ゼブラフィッシュ 4.1R の cDNA 構造解析は、N 末端 30kDa FERM domain はヒト 4.1R 30kDa FERM domain の相同性が明らかになった。しかし、これまでに同定されたヒト 4.1R 30kDa FERM domain の Band3 結合部位と CaM の結合部位にアミノ酸の置換が明らかになった (背景2)。

Background.2 Primary structures of 4.1R in human and zebrafish (*Danio rerio*)



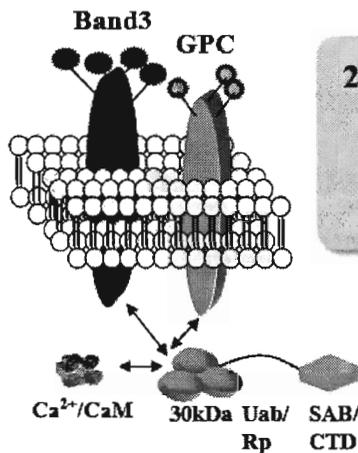
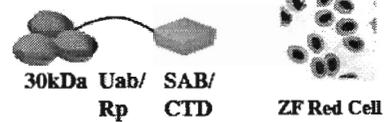
Limited chymotryptic digestion of erythroid 4.1R⁸⁰ generates four structural domains (30kDa membrane binding; U, unique 16kDa; SAB, spectrin and actin binding 10kDa, and CTD; C-terminal 24 kDa). The 30kDa domain, so-called FERM (*four-one, ezrin, radixin, moesin*) domain, mediates 4.1R⁸⁰ binding to plasma membrane via transmembrane proteins glycophorin C (GPC) and Band3. We have characterized two calmodulin (CaM) binding sites in the 30kDa domain and have established that the Ca²⁺-dependent regulation of 4.1R binding to membrane proteins occurs through these CaM binding sites.

Shafizadeh *et al.* (2002) have recently cloned 4.1R in zebrafish (ZF4.1R) and determined cDNA sequence of ZF4.1R. ZF4.1R is a much larger protein than human 4.1R, ZF4.1R consisting of 1534 amino acids (with a predicted molecular weight of ~170kDa). The ZF4.1R has large unique domains (Ua and Ub) containing repeat sequence (Rp). The amino acid sequence of ZF4.1R 30kDa domain (ZFR30) shows 59% homology with its human counterpart.

また、cDNA から得られた様な 1534 残基の 4.1R は実際に赤血球に発現しているのか、或はアイソフォームが発現しているのか情報が無い。

We asked the two following questions:

1) Which 4.1R isoforms are actually expressed in ZF erythrocytes ?



2) Given the structure of these ZF4.1R isoforms, what are their binding properties in respect to interactions with membrane proteins and regulation by the Ca²⁺/CaM ?

Fig.1 What we want to know in this study.

上図に示したように、本研究では 1) 赤血球の発現している 4.1R 分子のアイソフォームを明らかにする、2) 4.1R は膜貫通蛋白質とどのように結合するのか(結合様式の解明)、3) Ca²⁺/CaM は 4.1R と膜貫通蛋白質の結合を制御するかを明らかにすることを目的とした。

[材料と方法]

1.ゼブラフィッシュ

ゼブラフィッシュは、28.5°C、明期 14 時間、暗期 10 時間一定で飼育した。赤

血球は、MS222 麻酔後尾静脈切断により 40mM EDTA 存在下で採血した。

2. cDNA の取得

ゼブラフィッシュの 4.1R cDNA は、Zon 教授 (Dana-Farber 研究所 Boston) から供与して頂いた。Glycophorin C (GPC) の cDNA は、ATCC から購入した (#BG72957)。Band3 cDNA は、Paw 博士 (Dana-Farber 研究所 Boston) から供与して頂いた。

3. 組換え蛋白質の作製

組換え 4.1G の 30kDa domain、Band 3、GPC 及び p55 の細胞内ドメインの作製と CaM の精製は第 1 項に記載した。4.1G の HP 及び HP+30kDa domain (以下 GHP30) は GST fusion protein として大腸菌に発現させた。CDNA (4.1G) から、HP 及び HP30 領域を *EcoRI* 及び *Sall* 制限酵素切断部位を付加した特異プライマーによる PCR で増幅し、pGEX-4T2 ベクター (Amersham Bioscienece) に組換えた。4.1G は、tag 領域を欠失させた pET31 (Novagen) に組換えた塩基配列を確認後、大腸菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3) を形質転換した (4.1G には tag は付加されていない)。LB 培地にて大腸菌を 37°C 一定条件下で震盪培養し、OD600 の値が 0.4~0.8 に達した時に、IPTG を最終濃度 (1mM) 添加し、さらに 37°C 一定条件下で 3 時間震盪培養した。pGEX-4T2 ベクターで形質転換した大腸菌は、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、8000rpm、4°C、8 分間) 沈澱後、

1mM EDTA、1mM DFP、1mM 2ME を添加した B-PER™ (PIERCE、USA) に懸濁し溶菌した。溶菌液は氷上 10 分間の超音波処理後、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、18,000rpm、20 分間) の上清を得た。上清は、Glutathione-Sepharose (Amersham BioSciences) と懸濁し、GST 融合蛋白質を分離した。GST 融合蛋白質はトロンビン処理により標的蛋白質と GST を切断した後、GST を Glutathione-Sepharose にて吸収し、Q-Sepharose (Amersham BioSciences) で更に精製した。pET31b vector (4.1G) で形質転換した大腸菌は、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、8000Rpm、4°C、8 分間) 沈澱後、1mM DFP、を添加した PBS (第 1 項参照) に懸濁し、氷上 10 分間の超音波処理後、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、18,000Rpm、20 分間) の上清を得た。上清は、35% 硫酸沈澱後、Q-Sepharose、CaM-Sepharose により精製した。蛋白質の純度は SDS-PAGE にて検定した。蛋白質量は UV 法を用いた (280nm と 260nm を測定し、蛋白質濃度 (mg/ml) = $1.45 A_{280} - 0.74 A_{260}$) 。

4. 抗体

ゼブラフィッシュの 4.1R に対する抗体は、FERM domain ペプチド [(NH₂)-EHLNLLERDYFGLV] 及び C 末端部ペプチド [(NH₂)-MGLMDENGKTILLRTQEEIFA] のペプチドを化学合成し、KLH にカップリングして家兎に免疫した。GPC は、N 末端 (細胞外ドメイン) [(NH₂)-RDSTRGPYFEA] のペプチドを化学合成し、KLH にカップリングして家兎に免疫した。

5. RT-PCR

Total RNA を成熟魚赤血球から分離し、TITANIUM™ One-Step RT-PCR kit (Clontech, Palo Alto, CA)を用いて RT-PCR を行った。プライマーは、data base No. NM_175084 により、N 末端コード領域及び C 末端コード領域に設定した、

6. 反転膜小胞 (*inside-out-vesicle: IOV*) との結合解析

健康成人男性に対して、十分な実験趣旨の説明をした上で本人了承を得た上で、血液をヘパリン存在下で腕静脈から採取し、赤血球を分離した。赤血球は、5mM PBS 低張条件下で溶血し、ヘモグロビン等細胞内成分を除去し、所謂赤血球膜ゴースト分画を得た。赤血球膜ゴーストは、1mM EDTA 溶液 (pH8.5) に懸濁し、遠心沈澱分画 (反転膜分画) を得た。反転膜分画は、さらに、10mM NaOH pH11 で処理し膜結合の蛋白質を変性除去し、PBS で十分に洗浄の後、結合解析に供した。本文では、この pH11 で処理した反転膜を IOV とした。総蛋白質量は、便宜上、牛血清アルブミンを標準としたブラッドフォード法 (試薬は PIERCE 社、USA より購入) により測定した (目安の蛋白質量として用い、絶対量ではないことを認識の上で使用した)。種々の濃度の組換え 4.1R¹³⁵ (作製法は先に詳述) IOV と 37°C で 30 分間反応後、20% シュクロース溶液に懸濁液を重層し、ローター (RPR20-2) を用いて 18000Rpm、30min、4°C で行い沈澱分画 (IOV-蛋白質結合分画) を SDS-PAGE 用処理液に懸濁した。一定量のサンプルを SDS-PAGE

に掛け、蛋白質染色 (Coomassie Brilliant Blue G250) 後、デンストメーター (Invitrogen) で 4.1R¹³⁵ 及び Band3 (内部標準) の吸光度をコンピューター解析した。結果は、4.1R¹³⁵ の Band3 に対する相対吸光度で評価した。Scatchard plot 解析は常法に従った。

8. CaM-SephaRose への 4.1R 結合性の解析

CaM-Sepharose CL 6B (Amersham Biosciences) のカラムを 50mM Tris-HCl, pH7.5 緩衝液、0.1M NaCl と 1mM CaCl₂ 含有で十分に平衡化し、同緩衝液で透析平衡化した蛋白質溶液を添加した。カラムに結合した蛋白質は 50mM Tris-HCl, pH7.5 緩衝液、0.1M NaCl と 5mM EGTA および 50mM Tris-HCl, pH7.5 緩衝液、0.6M NaCl と 5mM EGTA で順次溶出した。

9. 蛋白質-蛋白質間の結合解析。

蛋白質-蛋白質間および蛋白質ペプチド間の反応速度論的解析には、Affinity Sensor 社 (ケンブリッジ、UK) の Resonant Mirror Detection (RMD) 法による IAsys 装置を用いた (図 5 参照)。蛋白質或いはペプチドは、10mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH7.4 緩衝液 (0.1M NaCl を含む、以下 PBS と略記) に 100 mg/ml の濃度に溶解しアミノシランキュベット上に、BS³ (Pierce 社、USA) を介して固相化した。ペプチドの固相化には、一旦アミノシランキュベット上に BSA を、BS³ を介して固相化したのち、NHS/EDC にて BSA のアミノ基を活性化する方法も共用し

た。反応には、10mM Tris HCl 緩衝液 pH7.5、0.1M NaCl (Buffer A) に対して 1mM EGTA 或いは 1mM EGTA と 2mM CaCl₂ を加えて用いた (図 2 参照)。キュベット内の反応温度は 25°C 一定に保ち、一定速度で攪拌した。反応に関わるパラメーター (結合速度定数、解離速度定数、最大結合量) は専用解析ソフトを用いて計算した (図 5B 参照)。平衡解離定数 ($K_{(D)kin}$) は、結合速度定数 (k_a) と解離速度定数 (k_d) の比から以下の式で求めた。

$$K_{(D)kin} = k_d / k_a$$

(本文中では、平衡解離定数は $K_{(D)}$ で表示した)。

10. CaM-SephaRose への 4.1R 結合性の解析

CaM-Sepharose CL 6B (Amersham Biosciences) のカラムを 50mM Tris-HCl, pH7.5 緩衝液、0.1M NaCl と 1mM CaCl₂ 含有で十分に平衡化し、同緩衝液で透析平衡化した蛋白質溶液を添加した。カラムに結合した蛋白質は 50mM Tris-HCl, pH7.5 緩衝液、0.1M NaCl と 5mM EGTA および 50mM Tris-HCl, pH7.5 緩衝液、0.6M NaCl と 5mM EGTA で順次溶出した。

11. 細胞免疫染色

ゼブラフィッシュ赤血球を特異抗体で免疫染色した。2次抗体 (FITC 或は Cy3 コンジュゲート IgG、DAKO 社製) を用いた。共焦点レーザー顕微鏡は、Leica DM-5000 microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) を用いた。

[結果と考察]

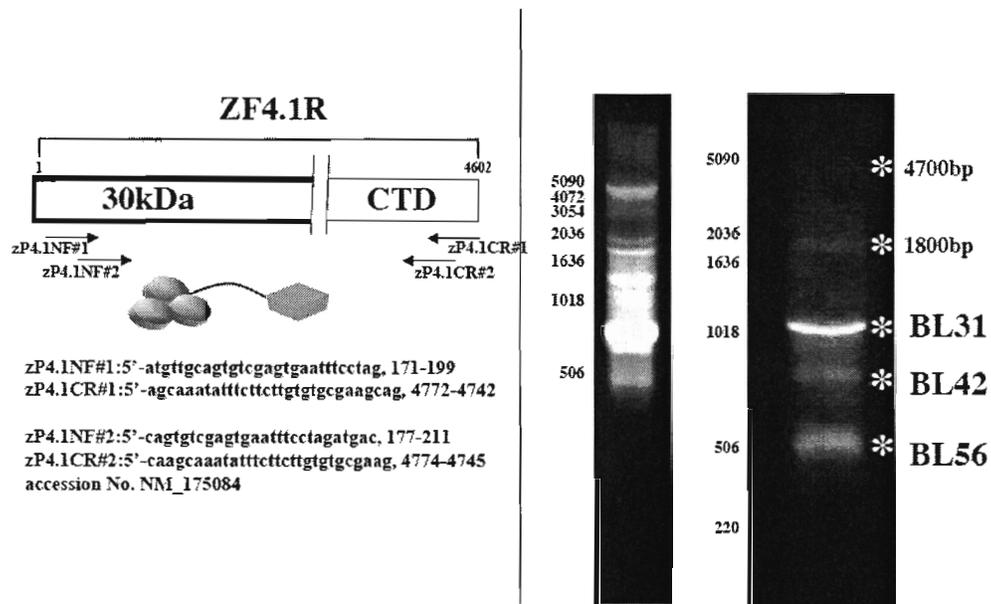


Fig. 1 RT-PCR of 4.1R in ZF blood cells. In order to identify 4.1R isoforms expressed specifically in ZF erythrocytes, ZF4.1R cDNAs were generated from total RNA by RT-PCR. During the first round of PCR amplification, several products were obtained, their size ranging from ~400bp to ~4200bp. After a second round of nested PCR, 5 bands were amplified, three major bands migrating at ~500bp, ~800bp and ~1000bp, and two minor species migrating at ~1800bp and ~4700bp.

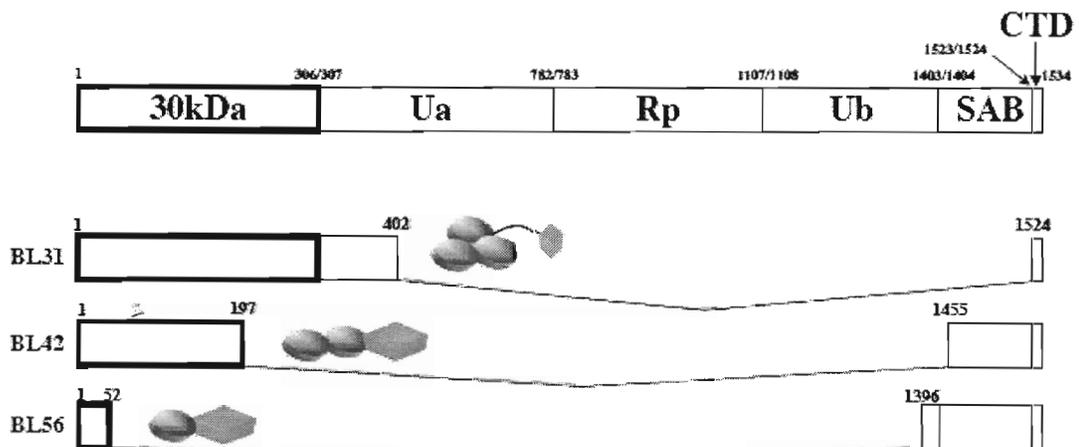


Fig.2 Gene structure of 4.1R in ZF blood cells. Three spliceforms of 4.1R in ZF blood cells deduced from the RT-PCR. Clone BL31, comprised of 412 residues, contained full length 30kDa domain, the first 96 residues of the Ua and the last 10 residues of the CTD. Clone BL42, comprised of 248 amino acids, expressed 197 N-terminal and 80 C-terminal residues. Clone BL56, comprised of 181 residues, expressed the 52 N-terminal residues of ZFR30 and the last 129 C-terminal residues. The calculated theoretical molecular weights based on the amino acid sequences of these isoforms were 49kDa, 32kDa, and 22kDa, respectively.

図1に示したように、特異的な2組のプライマーを使ったRT-PCR及びnested PCRによりゼブラフィッシュ赤血球から、主たる3本のバンド(BL56、BL42、BL31)と1800bp及び4700bpのバンド2本を得た。

図1で得たBL56、BL42、BL31のDNAの配列をシーケンスして、オープンリーディングフレームを既知の配列情報から決定し、全アミノ酸配列を決定した(図2)。その結果、BL31はFERM domainの全長とCTDの全長を含んでいた。さらにUa領域N末端の95残基をコードしていた。BL42は、FERM domainのN末端197残基とSAB domainの1455番目からのアミノ酸をコードしていた。BL56は、FERM domainの52残基とSAB及びCTD domainをコードしていた。

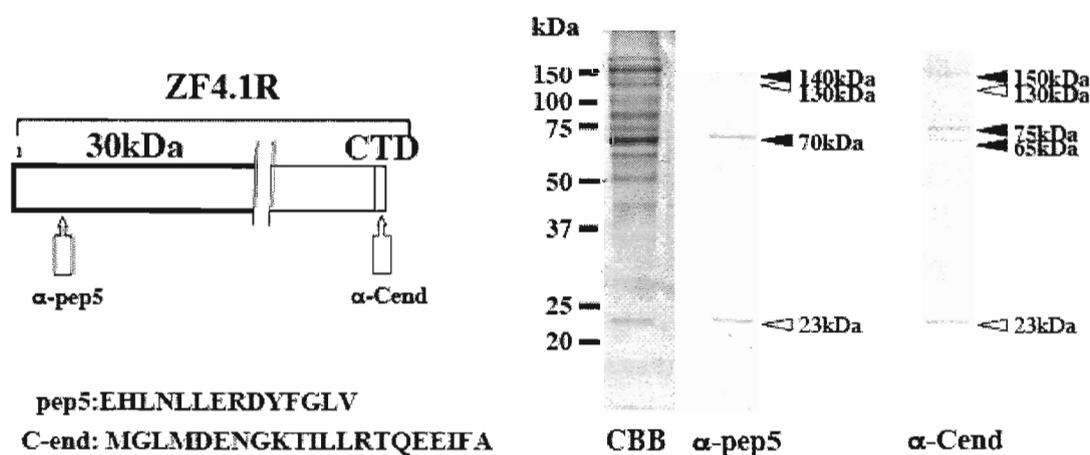


Fig.3 Immunoblot of 4.1R in ZF blood cells. Rabbit antibodies to pep5 and C-end detected 6 and 7 bands, in ZF blood cells, respectively. Both antibody detected same molecular weight bands, 130kDa and 23kDa, indicating open arrow head. Note that the sample is containing red and white blood cells.

図3には、ゼブラフィッシュ4.1Rを検出するために作製した抗体の抗原として用いたペプチドの配列を示した。本研究では、Exon5相当領域がコードするペプチドに対する抗pep5抗体(FERM domain)及びC末端部を認識する抗C-end抗体を用意した。ゼブラフィッシュ赤血球をSDS-PAGE電気泳動後に、免疫ブロー

ット法で解析した。抗 pep5 抗体は、23kDa、70kDa、130kDa、140kDa のバンドを検出した。抗 C-end 抗体は、23kDa、65kDa、75kDa、130kDa、150kDa のバンドを検出した。遺伝子解析の結果から得られた3つのクローンがコードする4.1R蛋白質は、この二つの抗体が同時に認識されるはずである。両抗体が同時に認識する（同じ移動度）を指標とすると、白抜き矢印で示した 23kDa と 130kDa の2本のバンドが同定された。蛋白分子が球状と仮定した場合、アミノ酸配列から計算された分子量と SDS-PAGE 上の分子量は大凡一致することから、23kDa のバンドは BL56 分子と考えられた。BL31 と BL42 がコードする蛋白分子のアミノ酸配列から予想される分子量は、それぞれ 49kDa と 32kDa であり、これらと一致するバンドは同定されなかった。二つの可能性が考えられる。

- 1) 遺伝子或は mRNA レベルまで発現しているが、蛋白質は分解される。
 - 2) 実際の蛋白分子は線維上であり、SDS-PAGE では見かけ上大きく見える。
- 2) に関しては、繊維状蛋白質では理論分子量の2〜3倍の分子量を SDS-PAGE で観察することがある。本報告で記した 4.1R135 及び 4.1G の領域がその例である。

本研究では、Ua、Ub、Rp 領域を検出する抗体を使っていないので、現在、これらの領域を認識する抗体を作製して、観察を計画している。

抗 pep5 抗体及び抗 C-end 抗体を用いて赤血球を細胞免疫染色を試みた。図4に示すように両方の抗体は、いずれも赤血球膜及び赤血球細胞質にシグナルが観察された。

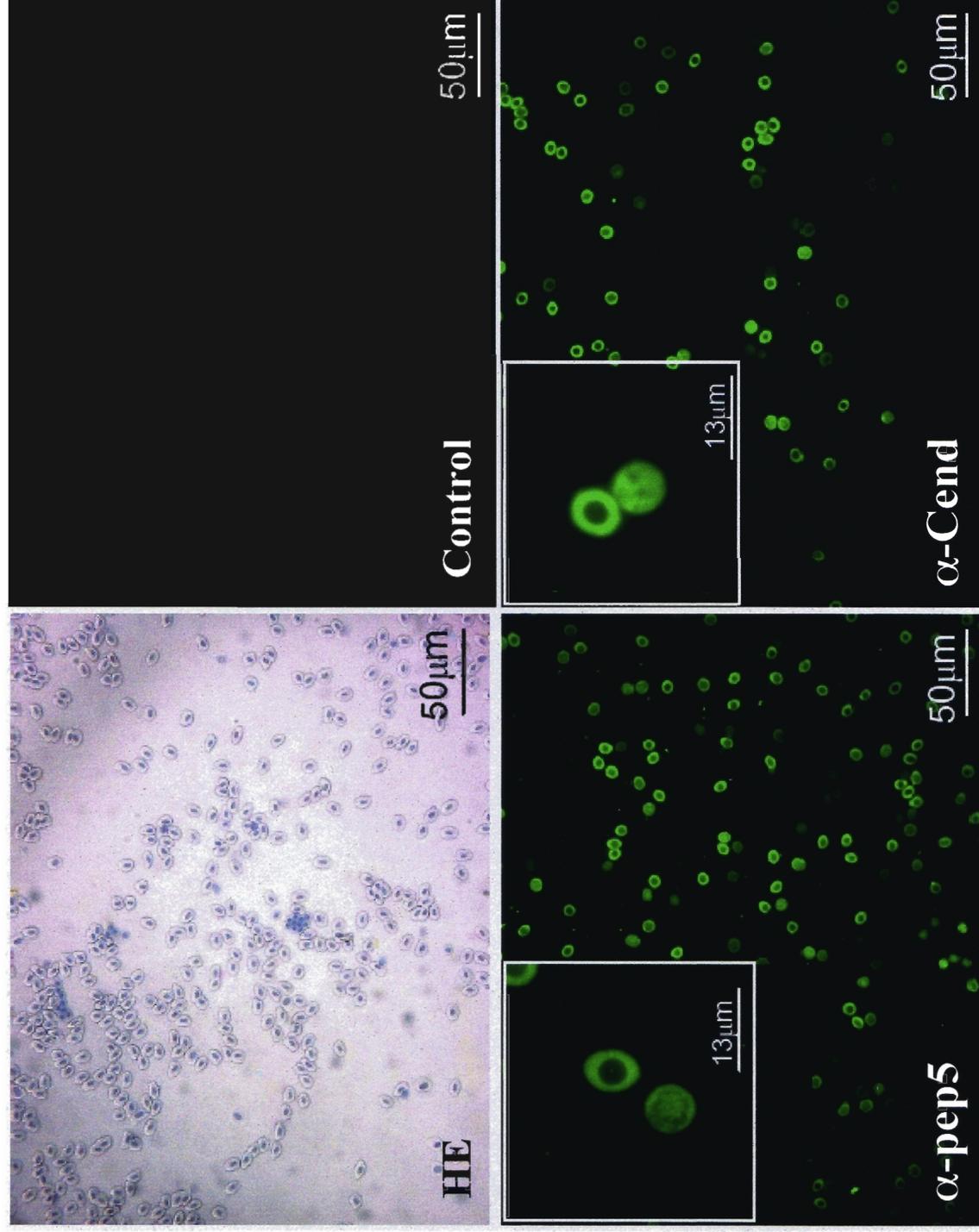


Fig.4 Immunohistochemistry of 4.1R in ZF blood cells. The antibodies to pep5 and C-end (ZF4.1R) stained membrane and cytosol in red blood cells. In control (non immunized rabbit IgG), no signal was detected.

[挿入図の説明]

Fig.4 Localization of 4.1R at the periphery of zebrafish erythrocytes. (A) HE staining of ZF erythrocytes; (B) staining of ZF erythrocytes without primary antibody (negative control); (C) staining of ZF erythrocytes with *a-pep5* antibody; and (D), staining of ZF erythrocytes with *a-Cend* antibody. Both antibodies detected 4.1R on the peripheral membrane of erythrocytes. Some cells showed nuclear staining. Scale bar: 50 nm.

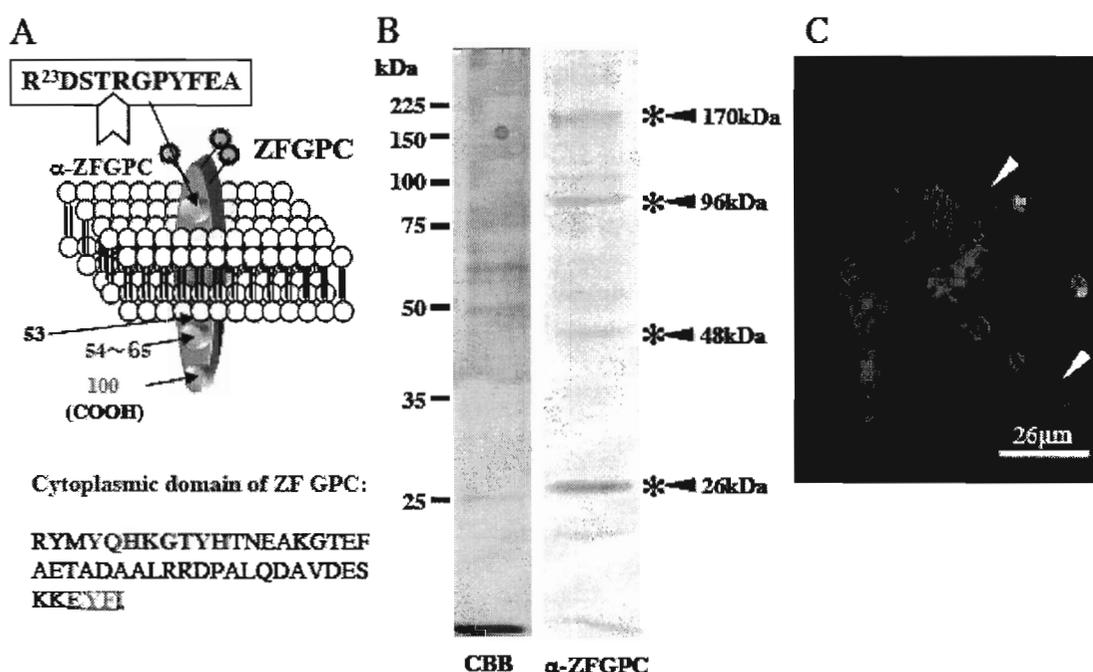


Fig. 5 Expression of GPC in ZF red blood cells. The antibody to ZFGPC detected the 4 bands. The major band appeared at the position of 26kDa on immuno-blot membrane (α -ZFGPC). GPC was detected immunochemically in the membrane of red cells.

For Fig.5 (A) Elution profile of ZFR30 bound to CaM Sepharose CL-6B in the presence of 1mM of CaCl_2 (lane 1; unbound), eluted with 5mM EGTA (lane 2; 5mM EGTA) and eluted with 0.6M NaCl in the absence of Ca^{2+} (lane 3; 0.6M NaCl). A mixture of GST and ZFR30 (resulting from thrombin cleavage of GST-ZFR30 fusion protein) was loaded into CaM-Sepharose CL 6B (1.0 x 15cm). SDS-PAGE analysis of ZFR30 binding to CaM Sepharose CL-6B, (B) gel stained with CBB. lane 1: mix of ZFR30 and GST (Mixture), lane 2: purified GST (GST), lane 3: elution fractions from CaM Sepharose CL-6B, (C) Immunoblot analysis of fractions shown in (B) using the *a-pep5* primary antibody confirming elution of ZFR30 at 0.6M NaCl, (D) SDS-PAGE analysis of ZFR30 binding to CaM Sepharose CL-6B in the absence of Ca^{2+} . Gel stained with CBB showing that ZFR30 is retained on the column in absence of Ca^{2+} (lane 4), its elution requiring 0.6M NaCl (lane 5)

ゼブラフィッシュの GPC は、その遺伝子が data base に登録されているが (BG729257)、実際に赤血球膜での発現は確認されていない。GPC の細胞内 domain (47 アミノ酸残基) には非常によく保存されているが、細胞外 domain には殆ど保存されていない。つまり、細胞外 domain は種特異性がある。本研究では、この細胞外 domain に対する特異抗体 (抗 GPC 細胞外 domain 抗体) を用いて、赤血球膜での GPC (抗原) 発現を解析した (図 5A)。

図 5B には、ゼブラフィッシュの GPC についての免疫ブロット解析を行った結果を示した。抗 GPC 細胞外 domain 抗体は、26kDa (予想される単量体 GPC) の他、48kDa、96kDa 及び 170kDa のバンドを検出した。GPC は、赤血球膜で 2 量体を形成する報告もあるが、ポリマーの報告はない。

図 5C には、ゼブラフィッシュの GPC についての組織免疫染色を行った結果を示した。心室組織を対象とした。抗 GPC 細胞外 domain 抗体は、赤血球膜及び細胞質を染色した。このことから、抗 GPC 細胞外 domain 抗体の認識抗原は赤血球特異であること、cDNA 配列から予見されたアミノ酸配列の相同性 (ただし、細胞内 domain) からヒト GPC と相同と判断した。

GPC はその細胞内 domain は種間及び分子間で極めて良く保存されている。しかし、その細胞外 domain は種間及び分子間で変異に富んでおり、種及び細胞特異性を表現していることは興味深い。我々は、GPC は細胞内で 4.1R と p55 で三者複合体を形成していることを明らかにしてきた。4.1R にも p55 にもそれぞれ相同性の高いファミリー蛋白質が報告されている。現在、赤血球以外で相同な三者複合体は TSLC1 (GPC 相同細胞内 domain) -DAL1 (4.1B の部分ポリペプ

チド) -dlg (p55 ファミリー蛋白質) がある。この複合体は、肺癌の増殖抑制を担っている。この三者複合体がなぜ、細胞増殖抑制に関与するのかは不明である。翻って、赤血球における GPC-4.1R-p55 の生物学的意義も解明されていない。現在、ゼブラフィッシュの p55 の抗体を作製し、その発生に伴う発現の変化を観察している。

Method: ゼブラフィッシュ赤血球でも少なくとも GPC と 4.1R は発現しており、4.1R には、FERM domain を持っていることが明らかになった。次に、ゼブラフィッシュの 4.1R FERM domain の CaM 結合性を解析した。右図に示したように、ゼブラフィッシュ 4.1R FERM domain (図中では ZFR30 と表記してある) と GST の混合液を CaM カラムに通した。GST は陰性対照として用いた。

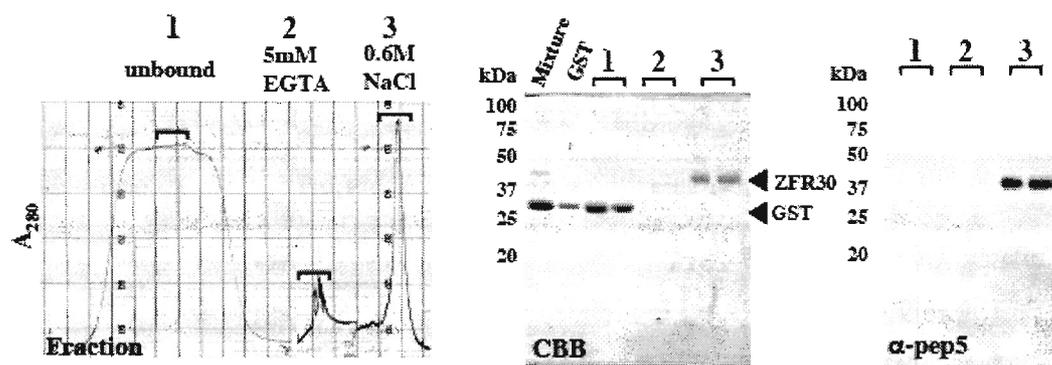


Fig.6 ZFR30 bound to CaM. ZFR30 bound to CaM-Sepharosecolumn in the presence and the absence of Ca^{2+} . ZFR30 was eluted by 0.6M NaCl.

その結果、図6に示したようにゼブラフィッシュ 4.1R FERM domain は、 Ca^{2+} 非依存性に CaM カラムに結合し、その結合は Ca^{2+} のキレート (EGTA) では解離されず、0.6M NaCl で溶出された。この結果はゼブラフィッシュ 4.1R FERM domain は CaM に対する結合性はヒト 4.1R 30kDa FERM domain と同じであった。

一方、BL42 コード蛋白質を同様に CaM-Sepharose へ添加した。

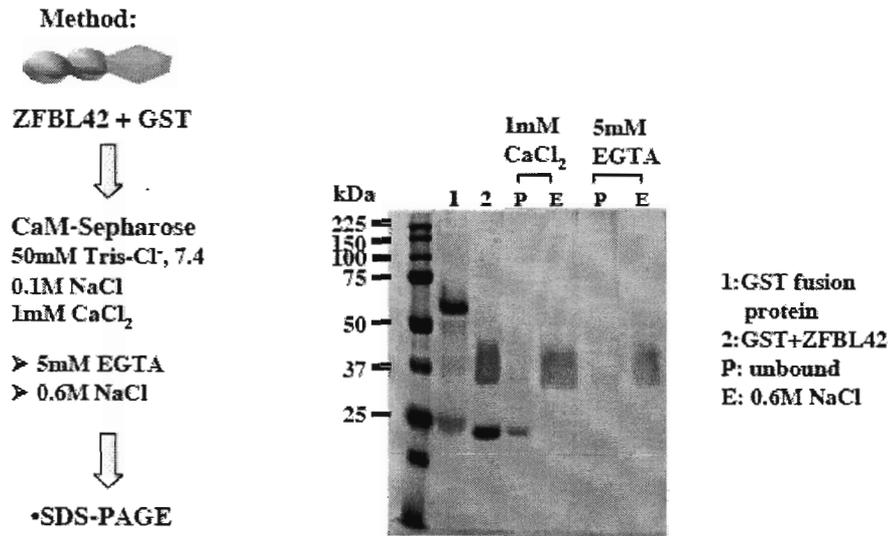


Fig.7 ZFBL42 bound to CaM. ZFBL42 bound to CaM-Sepharose column in the presence and the absence of Ca²⁺. ZFBL42 was eluted by 0.6M NaCl. Note that the band of ZFBL42 on SDS-PAGE was broad, not sharp.

図7に示す様に、BL42も同様に CaM-Sepharose に対して Ca²⁺非依存性に結合し、0.6M NaClにより解離（溶出）された。

Table I. 4.1R binding to CaM

Analyte	Ligand	Condition	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	$K_{(D)}$ (nM)
ZFR30	CaM	EGTA	$1.2 \pm 0.20 \times 10^5$	$1.8 \pm 0.10 \times 10^{-2}$	150
		Ca ²⁺	$2.2 \pm 0.10 \times 10^5$	$2.9 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	132
ZFR/BL42	CaM	EGTA	$6.4 \pm 0.20 \times 10^4$	$2.8 \pm 0.10 \times 10^{-2}$	339
		Ca ²⁺	$9.9 \pm 0.10 \times 10^4$	$3.8 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	399
HR30	CaM	EGTA	$6.5 \pm 0.20 \times 10^4$	$2.0 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	308
		Ca ²⁺	$3.1 \pm 0.20 \times 10^4$	$1.1 \pm 0.10 \times 10^{-2}$	354

$K_{(D)}$ values for the interaction between CaM and ZFR30, ZFR/BL42 and HR30kDa, in the presence and absence of Ca²⁺ are shown. Analytes (50 nM to 1 μ M) were incubated with CaM immobilized on aminosilane cuvettes in the presence of either 1 mM EGTA (EGTA) or 1.1 mM CaCl₂ and 1.0 mM EGTA (0.1mM free Ca²⁺) in Buffer A as described under "Experimental Procedures". From the binding curves obtained by the resonant mirror detection method, a $K_{(D)}$ was determined using the software package FAST-FITM. $K_{(D)}$ was calculated from three independent experiments represents (mean \pm S.D: 3-5).

ZFR30 bound to CaM with a $K_{(D)}$ of 150nM both in presence and absence of Ca²⁺ (Table 1). The $K_{(D)}$ values for ZFR30 and HR30 binding to CaM in presence and absence of Ca²⁺ were similar, ~150nM and ~300nM, respectively. Kinetic analysis also revealed that the BL42 isoform bound to CaM with a $K_{(D)}$ value similar to ZFR30, 400nM both in presence and absence of Ca²⁺. The B_{max} values for ZFR30 and BL42 binding to Ca²⁺/CaM were 135.0 and 112.8 (arc seconds), respectively (data not shown).

表 1 にゼブラフィッシュ 4.1R FERM domain とヒト 4.1R 30kDa FERM domain 及び BL42 コードポリペプチドと CaM 固相化キュベットとの平衡解離定数を測定した結果を示した。その結果、これらの蛋白質との CaM の平衡解離定数には Ca^{2+} の存在に関わらず、有意な差を認めなかった。

Table II. $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ does not regulate ZFR30 binding to ZFBand3cyt and GPCcyt

Ligand	Analyte	Condition	k_d ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_a (s^{-1})	$K_{(D)}$ (nM)
ZFBand3cyt	ZFR30	EGTA	$2.3 \pm 0.20 \times 10^6$	$2.0 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	15
		Ca^{2+}	$2.7 \pm 0.20 \times 10^6$	$1.4 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	52
	+CaM	EGTA	$2.1 \pm 0.10 \times 10^6$	$5.8 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	28
		Ca^{2+}	$7.8 \pm 0.20 \times 10^6$	$1.8 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	23
ZFGPCcyt	ZFR30	EGTA	$2.9 \pm 0.20 \times 10^6$	$1.6 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	552
		Ca^{2+}	$2.5 \pm 0.10 \times 10^6$	$1.2 \pm 0.10 \times 10^{-2}$	480
	+CaM	EGTA	$3.7 \pm 0.21 \times 10^6$	$1.4 \pm 0.11 \times 10^{-2}$	385
		Ca^{2+}	$5.8 \pm 0.20 \times 10^6$	$1.7 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	293

$K_{(D)}$ values for the interactions between cytoplasmic domains of ZFBand3 (ZFBand3cyt) or GPC (ZFGPCcyt) and ZFR30, in the presence and absence of Ca^{2+} , are shown. ZFR30 (50 nM to 1 μM) was incubated with CaM immobilized on aminosilane cuvettes in the presence of either 1 mM EGTA (EGTA) or 1.1 mM CaCl_2 and 1.0 mM EGTA (0.1 mM free Ca^{2+}) in Buffer A as described under "Experimental Procedures". The CaM/ZFR30 complex was incubated with ZFBand3cyt or ZFGPCcyt immobilized on aminosilane cuvettes. From the binding curves obtained by the resonant mirror detection method, a $K_{(D)}$ was determined using the software package FAST-FIT™. $K_{(D)}$ was calculated from three independent experiments represents (mean \pm S.D.: 3-5).

ゼブラフィッシュ 4.1R FERM domain は、ヒト 4.1R 30kDa FERM domain 同様に CaM に結合することが明らかになったので、 Ca^{2+} で飽和された CaM ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) による膜貫通蛋白質との制御機構を、IASys を用いて解析した。この解析では、ゼブラフィッシュの GPC (ZFGPC) 及び Band3 の細胞内 domain を固相化したアミノシランキュベットを用いた。ゼブラフィッシュ Band3 (ZFBand3) が赤血球膜に発現していることは既に Paw らによって報告されている [Paw, B. H., et al. *Nat. Genet.* 2003]。その結果、ゼブラフィッシュ 4.1R FERM domain は、Band3 に対して平衡解離定数 $\sim 10^{-8} \text{M}$ で結合し、ヒト 4.1R 30kDa FERM domain がヒト Band3 に対する結合よりも約 10 倍強かった。また、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ は、

ゼブラフィッシュ 4.1R FERM domain とゼブラフィッシュ Band3 の平衡解離定数を有意に変えなかった。ゼブラフィッシュ 4.1R FERM domain は、ゼブラフィッシュ GPC に対して平衡解離定数 $\sim 10^{-7}M$ で結合し、ヒト 4.1R 30kDa FERM domain がヒト GPC に対する結合とほぼ同じであった。また、 Ca^{2+}/CaM は、ゼブラフィッシュ 4.1R FERM domain とゼブラフィッシュ GPC の平衡解離定数を有意に変えなかった。

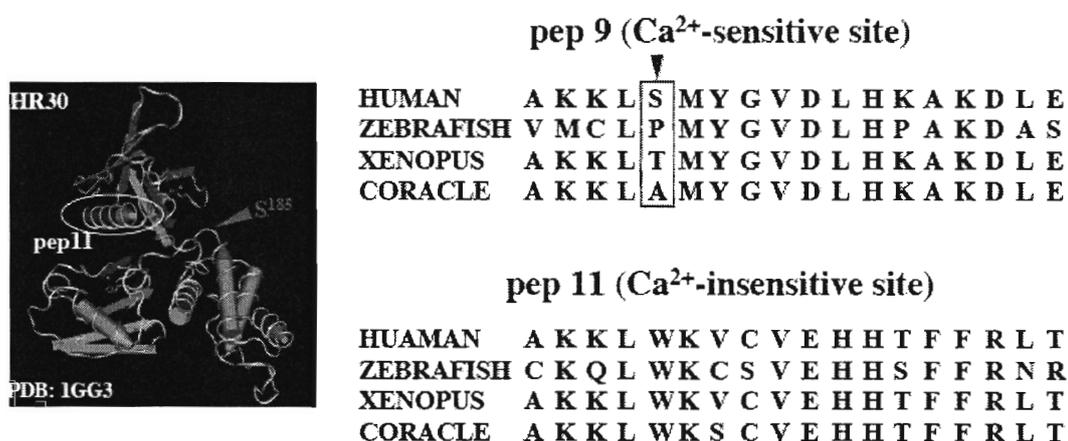


Fig.8 Comparison of CaM binding sequences of 4.1R proteins. Importantly, a key Ser¹⁸⁵ residue in the pep9 sequence of HR30 responsible for the Ca^{2+}/CaM -dependent regulation of HR30 binding to transmembrane proteins (Nunomura et al. 2000 *JBC*, 6360), is replaced by a proline (ZF), threonine (*Xenopus*. sp.) and alanine (coracle). This feature may well account for the ability of ZF and *Xenopus* 4.1R and coracle to bind to CaM in a Ca^{2+} -independent manner and for the fact that the interactions of these 4.1 proteins with GPC and Band3 are not regulated by the Ca^{2+}/CaM complex.

図 8 に CaM 結合部位のアミノ酸配列を示した。先に報告したように、CaM の制御機能には pep9 の S¹⁸⁵ が重要であることを示した。ゼブラフィッシュではこの S¹⁸⁵ が環状アミノ酸 Pro (プロリン) に置換していた。Pro 残基では蛋白質一次構造上、折れ曲がる箇所であり、構造上の変化も考慮しなければならない。また、次の第 3-2 項で述べるショウジョウバエ Coracle 遺伝子産物 coracle では、Ala に置換している。一方、pep11 領域では種間を超えてアミノ酸配列はよく保

存されていた。

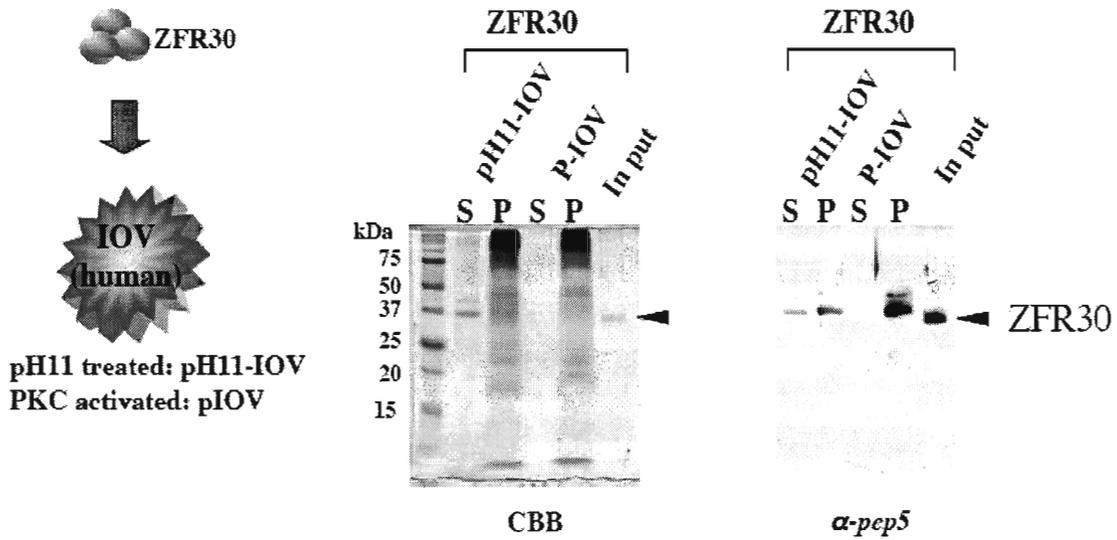


Fig.9 ZFR30 co-precipitated with human red cell IOV. Since we cannot make an IOV of ZF erythrocytes, inside-out vesicles (IOV) prepared from human erythrocytes were used to assess ZFR30 binding to transmembrane proteins because of the difficulty to obtain IOV from ZF erythrocytes. ZF4.1R binding features, highlighted by the RMD binding assays presented above, were confirmed in vivo by ZFR30 pull down assays with human IOV. BL42 also co-precipitated with human IOV (data not shown).

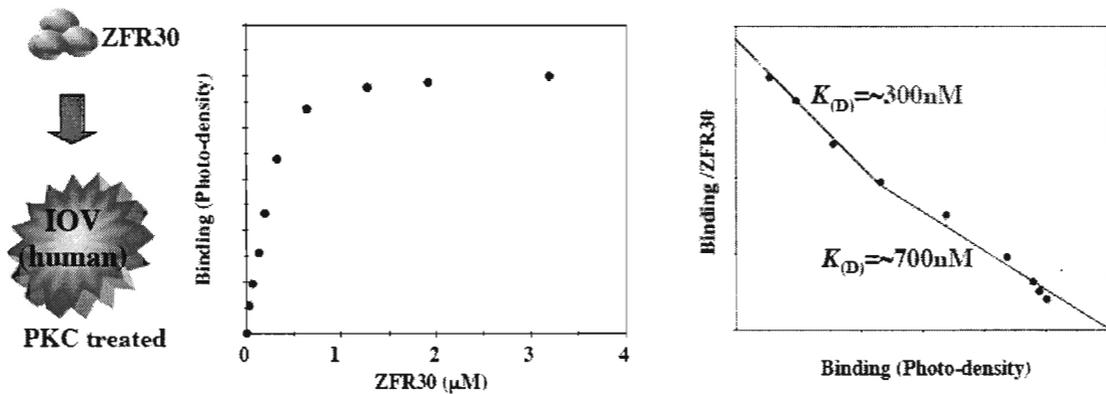


Fig.10 Scatchard analysis of ZFR30 binding with human IOV. ZFR30 binding to IOV prepared from PMA-treated erythrocytes (p-IOV) was higher than that to pH11-IOV, suggesting that PKC-dependent phosphorylation of transmembrane proteins was promoting their interaction with ZFR30. ZFR30 bound to IOV with an apparent dissociation constant of $\sim 10\text{nM}$, a value similar to that observed for human red blood cell 4.1R⁸⁰ and HR30 ($K_{(D)} \approx 300\text{nM}$) (data not shown). Scatchard plot analysis revealed the existence of two classes of binding sites of characterized by $K_{(D)}$ values of $\sim 300\text{nM}$ and $\sim 700\text{nM}$, respectively. The ratio of maximal binding was approximately 1:1.3 (high affinity:low affinity binding sites).

次に、ゼブラフィッシュ 4.1R FERM domain がヒトの膜貫通蛋白質とどのような結合をするかを解析した。この解析に後述する反転膜小胞 (IOV) を用いて、共沈殿を解析した。その結果、ゼブラフィッシュ 4.1R FERM domain はヒト IOV と共沈殿した (図 9)。

ゼブラフィッシュ 4.1R FERM domain はヒト IOV との結合を Scatchard Plot 法で解析した (図 10)。その結果、平衡解離定数 300nM と 700nM の二相性の解析結果を得た。反転膜小胞では、膜脂質も存在するので、蛋白質部分を取り出して分子間相互作用を、IAsys[®]を用いて解析した。

Table III. Comparison of binding properties of human and zebrafish 4.1R to membrane proteins.

Ligand	Analyte	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	$K_{(D)}$ (nM)
ZFBand3cyt	ZFR30	$2.3 \pm 0.10 \times 10^6$	$2.0 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	15
	ZFBL42	$1.4 \pm 0.20 \times 10^5$	$3.1 \pm 0.10 \times 10^{-2}$	230
	HR30	$2.5 \pm 0.20 \times 10^4$	$4.1 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	1640
HBand3cyt	ZFR30	$3.2 \pm 0.20 \times 10^4$	$3.4 \pm 0.23 \times 10^{-2}$	1063
	ZFBL42	$1.2 \pm 0.09 \times 10^4$	$4.1 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	2032
	HR30	$6.8 \pm 0.20 \times 10^4$	$1.6 \pm 0.14 \times 10^{-2}$	235
ZFGPCcyt	ZFR30	$2.9 \pm 0.20 \times 10^4$	$1.6 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	552
	ZFBL42	$6.0 \pm 0.10 \times 10^3$	$2.8 \pm 0.10 \times 10^{-2}$	4667
	HR30	$1.8 \pm 0.19 \times 10^4$	$6.5 \pm 0.26 \times 10^{-3}$	361
HGPCcyt	ZFR30	$2.9 \pm 0.20 \times 10^4$	$1.7 \pm 0.11 \times 10^{-2}$	586
	ZFBL42	$2.2 \pm 0.20 \times 10^5$	$2.0 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	1043
	HR30	$3.0 \pm 0.17 \times 10^6$	$3.5 \pm 0.05 \times 10^{-2}$	117

$K_{(D)}$ values for the interactions between cytoplasmic domain of zebrafish (ZF) and human (H) transmembrane proteins Band3 (ZF Band3cyt, HBand3cyt) and GPC (ZFGPCcyt, HGPCcyt) and ZFR30, ZFR/BL42 and HR30 are shown. Analytes (50 nM to 1 μ M) were incubated with ZFBand3cyt, HBand3cyt, ZFGPCcyt or HGPCcyt immobilized on aminosilane cuvettes as described under "Experimental Procedures". From the binding curves obtained by the resonant mirror detection method, a $K_{(D)}$ was determined using the software package FAST-FITM. $K_{(D)}$ was calculated from three independent experiments represents (mean \pm S.D.: 3-5).

ZFBL42 also bound to ZFBand3cyt and ZFGPCcyt. But the $K_{(D)}$ values of the binding were higher than ZFR30. ZFR30 binding to the human transmembrane proteins. But the $K_{(D)}$ values of binding were higher than those of binding to ZF transmembrane proteins.

ゼブラフィッシュ 4.1R FERM domain は、ゼブラフィッシュ Band3 と平衡解離定数 15nM で結合したが、ヒト Band3 との平衡解離定数 1063nM であった。この違いは結合速度定数の違いに起因していた。逆にヒト 4.1R FERM domain は、ヒト

Band3 と平衡解離定数 215nM で結合したが、ゼブラフィッシュ Band3 との平衡解離定数 1640nM であった。この違いは結合速度定数の違いに起因していた。

ゼブラフィッシュ 4.1R FERM domain は、ゼブラフィッシュ GPC と平衡解離定数 552nM で結合したが、ヒト GPC との平衡解離定数 586nM であった。この違いは結合速度定数の違いに起因していた。逆にヒト 4.1R FERM domain は、ヒト Band3 と平衡解離定数 117nM で結合したが、ゼブラフィッシュ GPC との平

Table IV. Comparison of 4.1R binding to human Band3cyt

Ligand	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
ZFR30	$3.2 \pm 0.20 \times 10^4$	$3.4 \pm 0.20 \times 10^{-3}$	1063
HR30	$6.8 \pm 0.20 \times 10^4$	$1.6 \pm 0.20 \times 10^{-3}$	235
H4.1G	$2.4 \pm 0.23 \times 10^4$	$1.2 \pm 0.10 \times 10^{-3}$	500

ZFR30	L	N	L	L	E	R	D	Y	F	G	L
HR30	L	N	L	L	E	E	D	Y	F	G	L
4.1G	L	N	L	L	E	K	D	Y	F	G	L

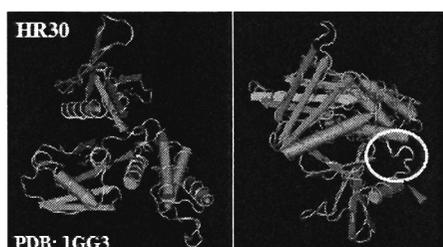


Table IV Comparison of 4.1R binding to human Band3cyt

Motifs responsible for human Band3/4.1R interaction have been mapped to the L³⁷EEDY motif in HR30 and the L³⁵³RRRY and I³⁹⁶RRRY motifs in Band3-cyt. The LEEDY motif in HR30 is replaced by a LERDY motif in ZFR30. We have observed that 4.1G interacts with also Band3 through its LEKDY motif in 30kDa domain. Although the 4.1R binding motifs in human Band3cyt are not conserved in ZFBand3cyt, but two similar motifs, I³⁶⁰KRRY and L¹⁷²QRKRSQ are present in ZFBand3cyt are there in it. Importantly, the location of the I³⁶⁰KRRY motif in ZF Band3cyt is very similar to that of the L³⁵³RRRY motif in human Band3cyt. We therefore hypothesize that have thought for long time 4.1R/Band3 interaction through the E-X-D motif in 4.1 proteins and RRR/KRR /RKR clusters in Band3cyt is a hallmark of erythrocyte membrane organization is important for the interaction. The results of our binding assays also illustrate the specificity of protein-protein interaction within a species, the K_D value of heterologous proteins being lower than that of proteins originating from the same species.

衡解離定数 361nM であった。

有意な差異を認めることは出来なかった。

BL42 コードポリペプチ

ドは、ゼブラフィッシュ

Band3 と平衡解離定数

230nM で結合し、ゼブラフ

イッシュ GPC とは平衡解

離定数 4667nM で結合した。

表 4 と付随図には、ゼブラフィッシュ 4.1R FERM domain (ZFR30)、ヒト 4.1R FERM domain (HR30) 及び 4.1G とヒト Band3 との結合解析結果、Band3 結合部位のアミノ酸配列及びヒト FERM domain (HR30) の結晶構造解析モデル (1GG3) を示した。Band3 結合モチーフとして LEE³⁹DY 配列が同定された。上記の 3 種類の蛋白質では、モチーフの E³⁹ (Glu) が塩基性アミノ酸 (K 或は R) に置換されている。しかし、実際には Band3 と結合することから、この E³⁹ (Glu) は結合に関与していないと思われる。立体構造では、この E³⁹ (Glu) はランダム構造上にあるが、側鎖は他の Glu (E³⁸) 残基とはことなる方向を向いていることから支持される。

ゼブラフィッシュ 4.1R FERM domain (ZFR30) がゼブラフィッシュ Band3 にヒトの場合よりも強く結合した。Paw らは、4.1R と Band3 の結合は細胞分裂および Band3 の HCO₃⁻ 活性に影響することを示した。この強い親和性は、細胞分裂に関係あるのかもしれない。

[まとめ]

図 12 にゼブラフィッシュ赤血球膜における 4.1R のアイソフォームの結合モデルを示した。BL31 と BL42 の二通りが考えられる。どのアイソフォームが赤血球膜で優位かは明らかにできなかった。どちらのアイソフォームも Ca²⁺非依存性に CaM と結合するが、Ca²⁺飽和 CaM は、4.1R の結合 (平衡解離定数) をかえなかった。これは、Ser 残基が Pro 残基に置換されていたためであった。

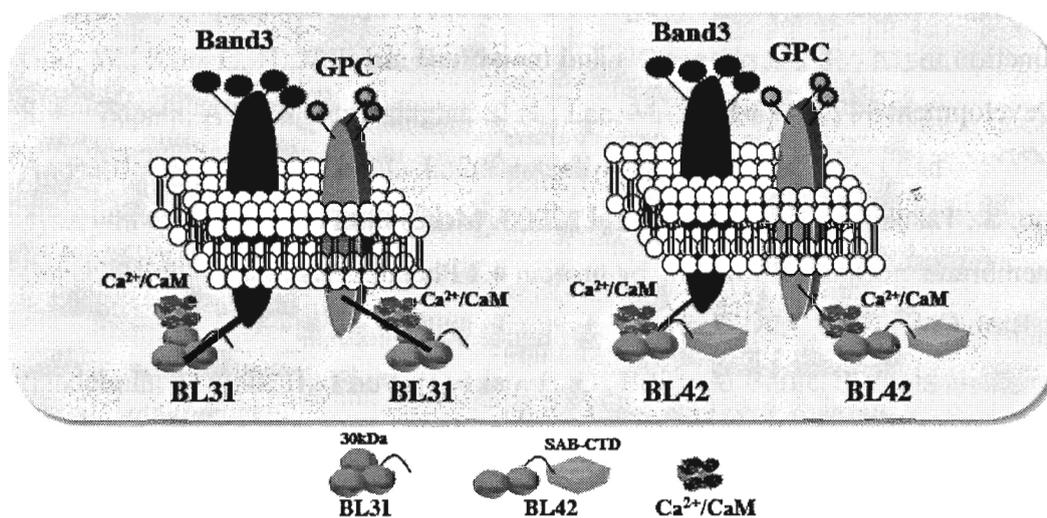


Fig.12 A proposed model for ZF erythrocyte membrane organization. We propose different models for each of the three isoforms, BL31 and BL42, depending on the integrity of the 30kDa and SAB domains. BL31 strongly binds to Band3. BL42 expresses a SAB domain and binds weakly to Band3 compared with BL31. The BL31 has both a CaM binding site but the Ca²⁺/CaM complex does not affect significantly 4.1R binding to Band3 and GPC.

[参考文献]

- Han, B. G, Nunomura, W., Takakuwa, Y., Mohandas, N., Jap, B. K., 2000. Protein 4.1R core domain structure and insights into regulation of cytoskeletal organization. *Nat. Struct. Biol.* 7, 871-875.
- Hoover, K. B., Bryant, P. J., 2000. The genetics of the protein 4.1 family: organizers of the membrane and cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 229-234.
- Jöns, T., Drenckhahn, D., 1992. Identification of the binding interface involved in linkage of cytoskeletal protein 4.1 to the erythrocyte anion exchanger. *EMBO J.* 11, 2863-2867.

- Liao, E. C., Paw, B. H., Peters, L. L., Zapata, A., Pratt, S. J., Do, C. P., Lieschke, G., Zon, L. I. 2000. Hereditary spherocytosis in zebrafish *riesling* illustrates evolution of erythroid beta-spectrin structure, and function in red cell morphogenesis and membrane stability. *Development* 127, 5123-5132.
- Manno, S., Takakuwa, Y., Mohandas, N., 2005. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 280, 7581-7587.
- Marfatia, S. M., Leu, R. A., Branton, D., Chishti, A. H., 1995. Identification of the protein 4.1 binding interface on glycophorin C and p55, a homologue of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *J. Biol. Chem.* 270, 715-719.
- Nunomura, W., Takakuwa, Y., Tokimitsu, R., Krauss, S., Kawashima, M., Mohandas, N., 1997. Regulation of CD44-protein 4.1 interaction by Ca^{2+} and calmodulin. Implications for modulation of CD44-ankyrin interaction. *J. Biol. Chem.* 272, 30322-30328.
- Nunomura, W., Takakuwa, Y., Parra, M., Conboy, J. G., Mohandas, N., 2000a. Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent calmodulin binding sites in erythrocyte protein 4.1. Implications for regulation of protein 4.1 interactions with transmembrane proteins. *J. Biol. Chem.* 275, 6360-6367.
- Nunomura, W., Takakuwa, Y., Parra, M., Conboy, J. G., Mohandas, N., 2000b. Regulation of protein 4.1R, p55, and glycophorin C ternary complex in human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 275, 24540-24546.
- Nunomura, W., Takakuwa, Y., 2006. Regulation of protein 4.1R interactions with membrane proteins by Ca^{2+} and calmodulin. *Front. BioScience.*

11, 1522-1539.

Paw, B. H., Davidson, A. J., Zhou, Y., Li, R., Pratt, S. J., Lee, C., Trede, N. S., Brownlie, A., Donovan, A., Liao, E. C., Ziai, J. M., Drejer, A. H., Guo, W., Kim, C. H., Gwynn, B., Peters, L. L., Chernova, M. N., Alper, S. L., Zapata, A., Wickramasinghe, S. N., Lee, M. J, Lux, S. E., Fritz, A., Postlethwait, J. H., Zon, L. I., 2003. Cell-specific mitotic defect and dyserythropoiesis associated with erythroid band 3 deficiency. *Nat. Genet.* 34, 59-64.

Shafizadeh, E., Paw, B. H., Foott, H., Liao, E. C., Bruce A. Barut, B. A., Cope, J. J., Zon, L.I., Lin, S., 2002. Characterization of zebrafish merlot/chablis as non-mammalian vertebrate models for severe congenital anemia due to protein 4.1 deficiency. *Development* 129, 4359-4370.

第 2-2 項 ショウジョウバエ 4.1R 相同蛋白質 Coracle の膜結合性の解析

[目的]

pep 9 (Ca²⁺-sensitive site)

	HUAMN	A	K	K	L	S	M	Y	G	V	D	L	H	K	A	K	D	L	E
	ZEBRAFISH	V	M	C	L	P	M	Y	G	V	D	L	H	F	A	K	D	L	E
	XENOPUS	A	K	K	L	T	M	Y	G	V	D	L	H	K	A	K	D	L	E
	CORACLE	A	K	K	L	A	M	Y	G	V	D	L	H	K	A	K	D	L	E

pep 11 (Ca²⁺-insensitive site)

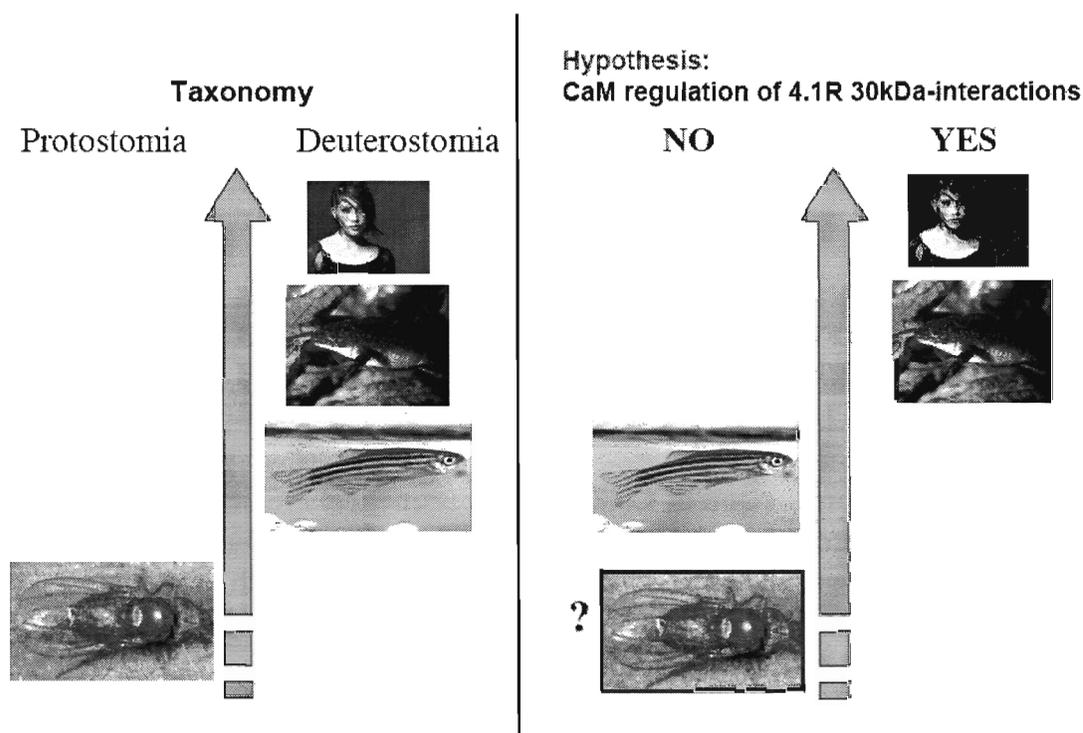
	HUAMN	A	K	K	L	W	K	V	C	V	E	H	H	T	F	F	R	L	T
	ZEBRAFISH	C	K	Q	L	W	K	C	S	V	E	H	H	T	F	F	R	N	R
	XENOPUS	A	K	K	L	W	K	V	C	V	E	H	H	T	F	F	R	L	T
	CORACLE	A	K	K	L	W	K	S	C	V	E	H	H	T	F	F	R	L	T

Background: Comparison of CaM binding sequence. Predicted CaM binding sequence of different species based on human 4.1R CaM binding sequence, pep9 and pep11 is shown. A key residue of S¹⁸⁵ is replacement with the other residues in coracle being human 4.1R homologue.

我々は、「背景」に示すようにヒト赤血球膜骨格蛋白質の分子間相互作用を 4.1R と CaM の結合に焦点をあて解析して来た。また、前項目 (2-1) で示した様に、ゼブラフィッシュ 4.1R は、CaM と Ca²⁺非依存性に結合するが、と Ca²⁺/CaM (Ca²⁺飽和 CaM) は、4.1R と膜貫通蛋白質との結合を変えなかった。これは、Ca²⁺/CaM の作用部位である Ser¹⁸⁵がゼブラフィッシュでは Pro に置換されている為であることが原因であるとの結論に至った (Nunomura et al. 2000)。

「背景」に 4.1R とその相同蛋白質の CaM 結合部位 (pep9 と pep11) のアミノ

酸配列を示した。ここに掲げた 4 種類のペプチドの配列は相互に極めて良く保存されているが、Ca²⁺/CaM の作用部位である Ser¹⁸⁵ 残基がその他のアミノ酸に置換されている。ヒトとゼブラフィッシュの結果は、動物の進化過程において 4.1R は Ca²⁺/CaM の作用部位を獲得して行ったと考えられる。その生物学的意義を解明すべく、より下等なショウジョウバエ (*Drosophila* sp.) に発現する coracle 遺伝子産物 Coracle に焦点をあて、Ca²⁺/CaM の作用について検討した。



Hypothesis: CaM regulation of 4.1R FERM domain binding is changing during the animal evolution. This hypothesis is based on the sequence of CaM binding site of pep9 (Ca²⁺-sensitive CaM binding site). The taxonomy classified two groups, Protostomia including fly and Deuterostomia including fish, frog and mammals based on shape of body.

「仮説」に示したように、動物界は分類学上前口動物と後口動物に分類される。CaM が FERM domain にどの様に作用するか、つまり、pep9 の Ser 残基の置換で分類すると「仮説」右のようになる。ただし、カエルはこの残基は Thr であ

る。仮説として Ser の OH 基が重要だと考えられる。

図 1 に Coracle とヒト 4.1R の一次構造の比較を示した。Coracle は、全長 1698 アミノ酸残基からなる長大な蛋白質であるが、本研究では N 末端 298 アミノ酸残基 (FERM domain) のみに焦点をあてた。Coracle FERM domain にいくつかの mutant が報告されており、それらの異常は形態形成異常の原因になっている (Ward et al. 2001)。

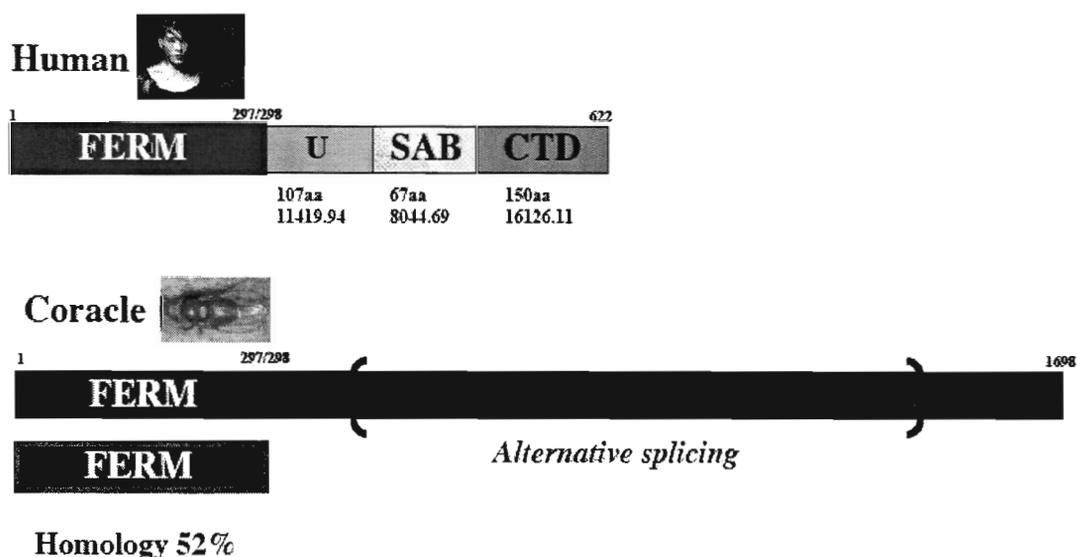


Fig.1 Structure of 4.1R of human and coracle. The coracle has a 30kDa FERM domain homologue in its N-terminal. The homology is 52%. In this study, we focus in the 30kDa FERM domain.

Coracle の C-terminal domain (CTD)は glutamate acid receptor との結合が報告されているが、FERM domain についてはその結合相手は報告されていない (Ward et al. 2001)。

本項では、4.1R の膜結合性を比較生化学的見地から解析し、蛋白質構造との相関性を膜骨格蛋白質の進化学を視野に入れて、4.1R の生物学的意義 (機能) にアプローチすることを目的とした。膜骨格蛋白質の比較生化学的研究は世界

的にも希少である。これは、膜骨格蛋白質は酵素などのように活性があるわけでもない、その生物学的機能を計る指標がない為と思われる。本研究では、蛋白質-蛋白質の分子間相互作用の定量的評価により、蛋白質の特異的分子認識を蛋白質の機能と捉えて解析を行った。

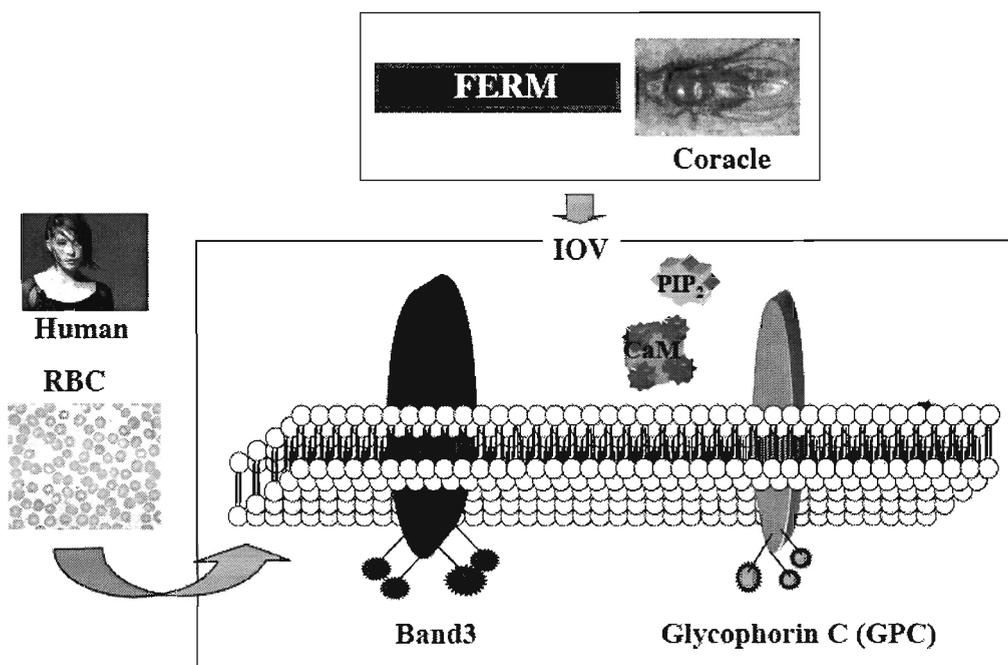


Fig.2 Strategy of this study. We compare the binding profile of Coracle FERM domain with human membrane proteins.

本研究では、1) Coracle FERM domain とヒト赤血球膜貫通蛋白質とどのように結合するのか（結合様式の解明）、2) Ca^{2+}/CaM は Coracle FERM domain と膜貫通蛋白質との結合を制御するかを明らかにすることを目的とした（図2）。

[材料と方法]

1. cDNA の取得

Coracle cDNA は、R.G. Fehon 教授 (Chicago 大学) から供与して頂いた。ヒト Glycophorin C (GPC)及び Band3 の cDNA は、Ms. Parra (Lawrence Berkeley Natl. Laboratory, UCB, USA) から供与して頂いた。

2. 組換え蛋白質の作製

組換え 4.1R の 30kDa FERM domain、ヒト Band3、GPC 及び p55 の細胞内ドメインは GST fusion protein として大腸菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3)に発現させた。LB 培地にて大腸菌を 37°C 一定条件下で震盪培養し、OD600 の値が 0.4~0.8 に達した時に、IPTG を最終濃度 (1mM) 添加し、さらに 37°C一定条件下で 3 時間震盪培養した。pGEX-4T2 ベクターで形質転換した大腸菌は、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、8000rpm、4°C、8 分間)沈澱後、1mM EDTA、1mM DFP、1mM 2ME を添加した B-PER™ (PIERCE、USA) に懸濁し溶菌した。溶菌液は氷上 10 分間の超音波処理後、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、18,000rpm、20 分間)の上清を得た。上清は、Glutathione-Sepharose (Amersham BioSciences) と懸濁し、GST 融合蛋白質を分離した。GST 融合蛋白質はトロンビン処理により標的蛋白質と GST を切断した後、GST を Glutathione-Sepharose にて吸収し、Q-Sepharose (Amersham BioSciences) で更に精製した。pET31b vector (4.1G)で形質転換した大腸菌は、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、8000rpm、4°C、8 分間)沈澱後、1mM DFP、を添加した PBS (第 1 項参照)に懸濁し、氷上 10 分間の超音波処理後、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、18,000rpm、20 分間)の上清を得た。上清は、35%硫酸沈澱後、Q-Sepharose、CaM-Sepharose

により精製した。蛋白質の純度は SDS-PAGE にて検定した。蛋白質量は UV 法を用いた (280nm と 260nm を測定し、蛋白質濃度 (mg/ml) = $1.45 A_{280} - 0.74 A_{260}$)。

3, 抗体の作製

Coracle FERM domain に対する抗体は、精製した組換え蛋白質を家兎に免疫した。抗ヒト 4.1R FERM domain 単クローン抗体の作製は、第 4 節第 2 項に記した。

5. 反転膜小胞 (*inside-out-vesicle: IOV*) との結合解析

健常成人男性に対して、十分な実験趣旨の説明をした上で本人了承を得た上で、血液をヘパリン存在下で腕静脈から採取し、赤血球を分離した。赤赤血球は、5mM PBS 低張条件下で溶血し、ヘモグロビン等細胞内成分を除去し、所謂赤血球膜ゴースト分画を得た。赤血球膜ゴーストは、1mM EDTA 溶液 (pH8.5) に懸濁し、遠心沈澱分画 (反転膜分画) を得た。反転膜分画は、さらに、10mM NaOH pH11 で処理し膜結合の蛋白質を変性除去し、PBS で十分に洗浄の後、結合解析に供した。本文では、この pH11 で処理した反転膜を IOV とした。総蛋白質量は、便宜上、牛血清アルブミンを標準としたブラッドフォード法 (試薬は PIERCE 社、USA より購入) により測定した (目安の蛋白質量として用い、絶対量ではないことを認識の上で使用した)。種々の濃度の組換え 4.1R¹³⁵ (作製法は先に詳述) IOV と 37°C で 30 分間反応後、20% シュクロース溶液に懸濁液を重層し、ローター (RPR20-2) を用いて 18000rpm、30min、4°C で行い沈澱分画

(IOV-蛋白質結合分画) を SDS-PAGE 用処理液に懸濁した。一定量のサンプルを SDS-PAGE に掛け、蛋白質染色 (Coomassie Brilliant Blue G250) 後、デンストメーター (Invitrogen) で 4.1R¹³⁵ 及び Band3 (内部標準) の吸光度をコンピューター解析した。結果は、4.1R¹³⁵ の Band3 に対する相対吸光度で評価した。Scatchard plot 解析は常法に従った。

6. CaM-Sepharose への 4.1R 結合性の解析

CaM-Sepharose CL 6B (Amersham Biosciences) のカラムを 50mM Tris-HCl, pH7.5 緩衝液、0.1M NaCl と 1mM CaCl₂ 含有で十分に平衡化し、同緩衝液で透析平衡化した蛋白質溶液を添加した。カラムに結合した蛋白質は 50mM Tris-HCl, pH7.5 緩衝液、0.1M NaCl と 5mM EGTA および 50mM Tris-HCl, pH7.5 緩衝液、0.6M NaCl と 5mM EGTA で順次溶出した。

7. 蛋白質-蛋白質間の結合解析。

蛋白質-蛋白質間および蛋白質ペプチド間の反応速度論的解析には、Affinity Sensor 社(ケンブリッジ、UK)の Resonant Mirror Detection (RMD)法による IAsys 装置を用いた(図5参照)。蛋白質或いはペプチドは、10mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH7.4 緩衝液(0.1M NaCl を含む、以下 PBS と略記)に 100 mg/ml の濃度に溶解しアミノシランキュベット上に、BS³ (Pierce 社、USA) を介して固相化した。ペプチドの固相化には、一旦アミノシランキュベット上に BSA を、BS³ を介し

て固相化したのち、NHS/EDCにてBSAのアミノ基を活性化する方法も共用した。反応には、10mM Tris HCl 緩衝液 pH7.5、0.1M NaCl (Buffer A) に対して1mM EGTA 或いは1mM EGTA と2mM CaCl₂を加えて用いた(図2参照)。キュベット内の反応温度は25°C一定に保ち、一定速度で攪拌した。反応に関わるパラメーター(結合速度定数、解離速度定数、最大結合量)は専用解析ソフトを用いて計算した(図5B参照)。平衡解離定数($K_{(D)kin}$)は、結合速度定数(k_a)と解離速度定数(k_d)の比から以下の式で求めた。

$$K_{(D)kin} = k_d / k_a$$

(本文中では、平衡解離定数は $K_{(D)}$ で表示した)。

8. CaM-SephaRose への Coracle 結合性の解析

CaM-Sepharose CL 6B (Amersham Biosciences) のカラムを50mM Tris-HCl, pH7.5 緩衝液、0.1M NaCl と1mM CaCl₂ 含有で十分に平衡化し、同緩衝液で透析平衡化した蛋白質溶液を添加した。カラムに結合した蛋白質は50mM Tris-HCl, pH7.5 緩衝液、0.1M NaCl と5mM EGTA および50mM Tris-HCl, pH7.5 緩衝液、0.6M NaCl と5mM EGTA で順次溶出した。

[結果と考察]

図3に示したように、Coracle FERM domain はヒト反転膜小胞 (P-IOV) と濃度依存性の結合(共沈殿)をした。

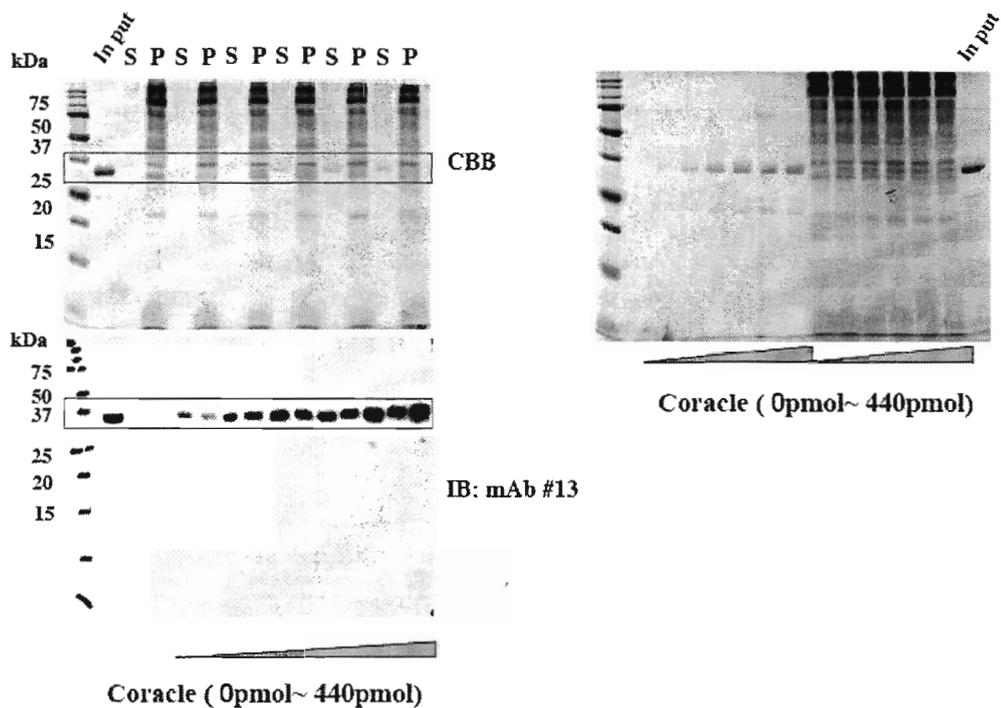


Fig. 3 Coracle FERM domain bound to human IOVs. Coracle FERM domain (*Coracle*) bound to human IOVs. The bound protein was detected by mouse anti-human 4.1R monoclonal antibody (mAb#13).

第 4 節で述べるように、抗ヒト 4.1R FERM domain 単クローン抗体は Coracle と交差反応することから、mAb#13 (FERM domain の C-lobe 認識抗体) を用いた。調製した human IOV では、Coracle FERM domain の~35kDa の位置は蛋白質を全く検出しなかったため、特異的に Coracle を検出していると判断した。

図 4 に示したように Coracle FERM domain は、Ca²⁺非依存性に CaM カラムに結合し、その結合は Ca²⁺のキレート (EGTA) では解離されず、0.6M NaCl で溶出された。この結果は Coracle FERM domain は CaM に対する結合性はヒト及びゼブラフィッシュ 4.1R 30kDa FERM domain と同じであった。

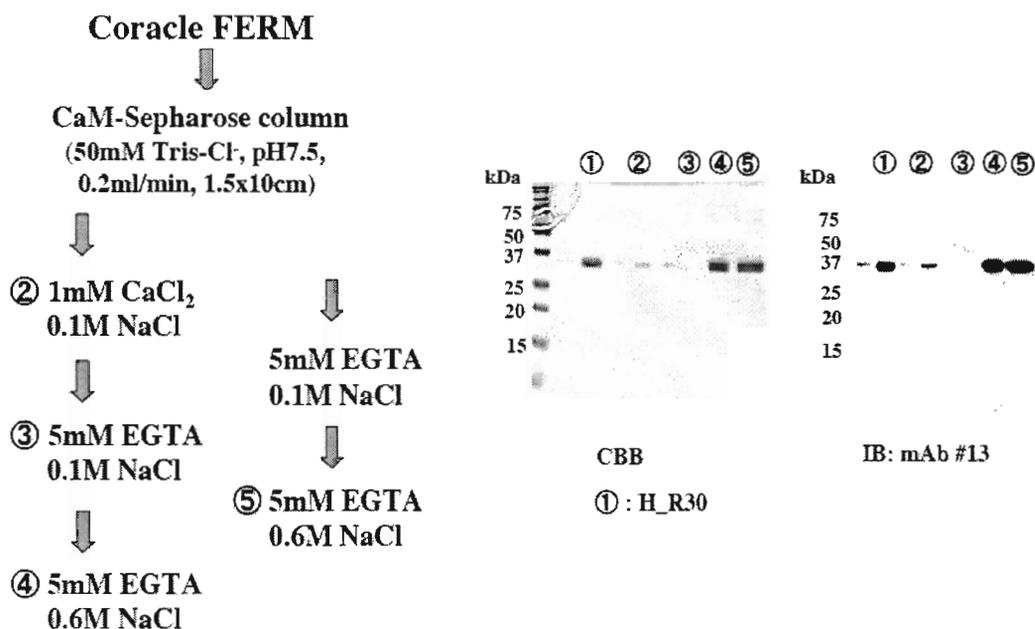


Fig. 4 Coracle FERM domain bound to CaM-Sepharose in Ca²⁺ independent manner.

Table I. 4.1R binding to CaM

Analyte	Ligand	Condition	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	$K_{(D)}$ (nM)
H_4.1R ⁸⁶	CaM	EGTA	$7.8 \pm 0.20 \times 10^4$	$1.6 \pm 0.10 \times 10^{-2}$	205
		Ca ²⁺	$2.3 \pm 0.20 \times 10^5$	$2.3 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	100
H_4.1R30	CaM	EGTA	$6.5 \pm 0.20 \times 10^4$	$2.0 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	115
		Ca ²⁺	$3.1 \pm 0.20 \times 10^4$	$1.1 \pm 0.10 \times 10^{-2}$	215
ZF_4.1R30	CaM	EGTA	$1.2 \pm 0.20 \times 10^5$	$1.8 \pm 0.10 \times 10^{-2}$	150
		Ca ²⁺	$2.2 \pm 0.10 \times 10^5$	$2.9 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	132
Cor30	CaM	EGTA	$5.3 \pm 0.20 \times 10^4$	$1.7 \pm 0.10 \times 10^{-2}$	280
		Ca ²⁺	$1.4 \pm 0.10 \times 10^5$	$4.1 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	284

$K_{(D)}$ values for the interactions of H_4.1R⁸⁶, H/4.1R30, ZF_4.1R30 to CaM immobilized aminosilan cuvette in the presence (Ca²⁺) and absence of Ca²⁺ (EGTA) are shown. Each analyte (50nM to 1 μM) was incubated with the identified ligand immobilized on the aminosilan cuvette as described under Experimental Procedures. From the binding curves obtained by the resonant mirror detection method, $K_{(D)}$ values were determined using the software package FAST-Fit™.

表 1 にヒト、ゼブラフィッシュ 4.1R FERM domain と Coracle FERM domain (Cor30) と CaM 固相化キュベットとの平衡解離定数を測定した結果を示した。

その結果、これらの蛋白質との CaM の平衡解離定数には Ca^{2+} の存在に関わらず、平衡解離定数~100nM のオーダーで結合した。

Table II. $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ not down-regulate Cor30-human membrane proteins interaction

Ligand	Condition	k_a ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	$K_{(D)}$ (nM)
H_Band3cyt	EGTA	$3.3 \pm 0.20 \times 10^4$	$2.1 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	634
	Ca^{2+}	$4.3 \pm 0.20 \times 10^4$	$2.6 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	607
	+CaM EGTA	$3.0 \pm 0.10 \times 10^4$	$1.8 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	600
	+CaM Ca^{2+}	$4.9 \pm 0.20 \times 10^4$	$2.7 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	570
H_GPCcyt	EGTA	$3.2 \pm 0.20 \times 10^4$	$1.5 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	468
	Ca^{2+}	$2.7 \pm 0.10 \times 10^4$	$1.8 \pm 0.10 \times 10^{-2}$	656
	+CaM EGTA	$3.8 \pm 0.21 \times 10^4$	$2.6 \pm 0.11 \times 10^{-2}$	526
	+CaM Ca^{2+}	$5.3 \pm 0.20 \times 10^4$	$2.7 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	511

$K_{(D)}$ for the interaction between cytoplasmic domain of H_Band 3 (*Band3*_{cyt}) and that of GPC (*GPC*_{cyt}) with Coracle 30kDa domain in the presence and absence of Ca^{2+} are shown. Coracle 30kDa domain (50 nM to 1 μM) was preincubated with CaM (5 μM) and either 0.1 mM EGTA (EGTA) or 1.1 mM CaCl_2 and 1.0 mM EGTA (Ca^{2+}) for 30 min at 25 °C in buffer A. The complex of CaM and Coracle 30kDa domain was incubated with the cytoplasmic domain of Band 3 immobilized on the aminosilane cuvette.

Coracle FERM domain は、ヒト 4.1R 30kDa FERM domain 同様に CaM に結合することが明らかになったので、 Ca^{2+} で飽和された CaM ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) による膜貫通蛋白質との制御機構を IAsys® を用いて解析した。この解析では、ヒト GPC (H__GPC) 及び Band3 (H__Band3) の細胞内 domain を固相化したアミノシランキュベットを用いた。その結果、Coracle FERM domain は、Band3 に対して平衡解離定数 ~100nM オーダーで結合し、ヒト 4.1R 30kDa FERM domain がヒト Band3 に対する結合とほぼ同じだった (Nunomura et al. 2000, 2006)。また、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ は、Coracle FERM domain とヒト Band3 の平衡解離定数を変えなかった。

Table III. Various 30kDa domains interaction with Band3cyt

Ligand	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	$K_{(D)}$ (nM)
ZF_4.1R	$3.2 \pm 0.20 \times 10^4$	$3.4 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	1063
H_4.1R	$6.8 \pm 0.20 \times 10^4$	$1.6 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	235
H_4.1G	$2.4 \pm 0.23 \times 10^4$	$1.2 \pm 0.10 \times 10^{-2}$	500
Coracle	$3.3 \pm 0.20 \times 10^4$	$2.1 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	634

	HUAMN	L N L	L E E D Y	F G L	pI
4.1R	ZEBRAFISH	L N L	L E R D Y	F G L	2.95
	XENOPUS	L N I	V E E D Y	F G L	4.11
	CORACLE	L N L	L E K D Y	F G L	4.11
4.1G		L N L	L E K D Y	F G L	

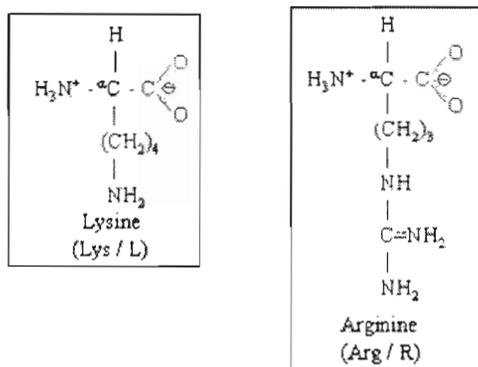


Fig. 5 Comparison of Band3 binding sequence.
The structure of Lysine and Arginine is shown.

Band3 結合モチーフとして LEE³⁹DY 配列が同定された (Jöns, T. and Drenckhahn, D. 1992)。上記の 3 種類の蛋白質では、モチーフの E³⁹ (Glu) が塩基性アミノ酸 (K 或は R) に置換されている。しかし、実際には Band3 と結合することから、この E³⁹ (Glu) は結合に関与していないと思われる。立体構造では、この E³⁹ (Glu) はランダム構造上にあるが、側鎖は他の Glu (E³⁸) 残基とはことなる方向を向

いていることから支持される (Han et al. 2000)。

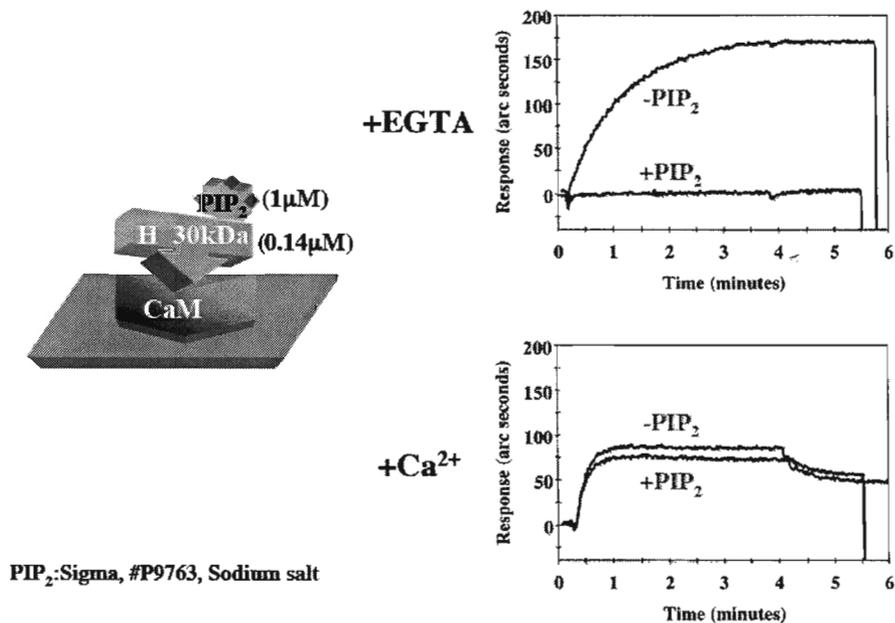


Fig. 6A Effect of PIP₂ on human 30kDa binding to CaM.

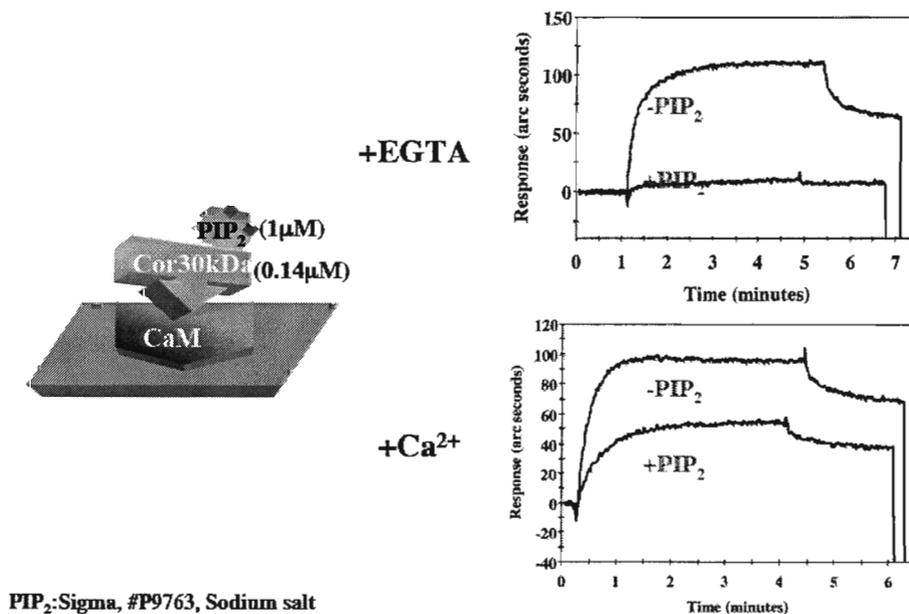


Fig. 6B Effect of PIP₂ on coracle FERM binding to CaM.

ヒト 4.1R FERM domain は PIP₂ 結合性が示されている。ヒト 4.1R FERM domain は、PIP₂ 結合により、GPC との結合が増長され、逆に Band3 の結合が抑制され

ることが報告されている（平衡解離定数の変化ではなく、最大結合量を測定結果であることに注意）。Coracle とヒト 4.1R FERM domain のアミノ酸配列の相同性から、PIP₂ 結合性が想定される。

一方、FERM domain に PIP₂ 結合した場合、CaM とはどのような結合をするのか解明されていない。PIP₂ と CaM はともに制御系因子として機能する。PIP₂ を切断する PLA₂ は Ca²⁺依存性に活性化する。Ca²⁺を介した 2 系統の制御機構を解明する上で重要と思われる。

PIP₂ (塩酸塩、水溶性) は、Coracle とヒト 4.1R FERM domain の CaM 結合は、Ca²⁺非存在下で完全に抑制したが、Ca²⁺存在下で抑制しなかった。

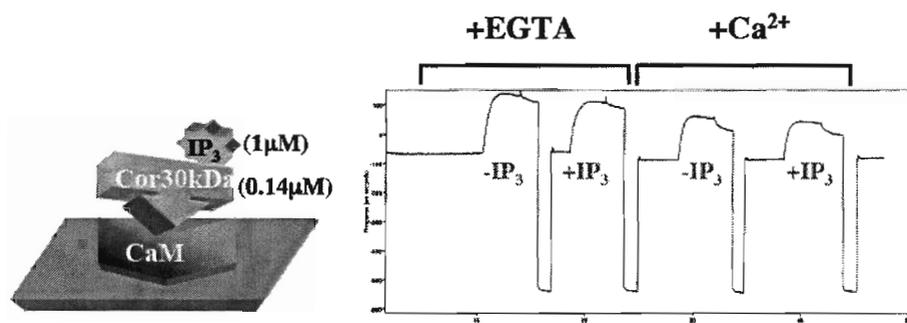


Fig. 6C Effect of PIP₂ on Coracle FERM domain binding to CaM.

IP₃ は、水溶液中ではミセル状であり、また、Coracle とヒト 4.1R FERM domain の CaM 結合は、Ca²⁺非存在下で完全に抑制したが、Ca²⁺存在下で抑制しなかった。対照実験として、IP₃ (水溶性) を同様にしよりましたが、全く変化はなかった。

pep 11 (Ca²⁺-insensitive site)

HUAMN	A	K	K	L	W	K	V	C	V	E	H	H	T	F	F	R	L	T
ZEBRAFISH	C	K	Q	L	W	K	C	S	V	E	H	H	T	F	F	R	N	R
XENOPUS	A	K	K	L	W	K	V	C	V	E	H	H	T	F	F	R	L	T
CORACLE	A	K	K	L	W	K	S	C	V	E	H	H	T	F	F	R	L	T

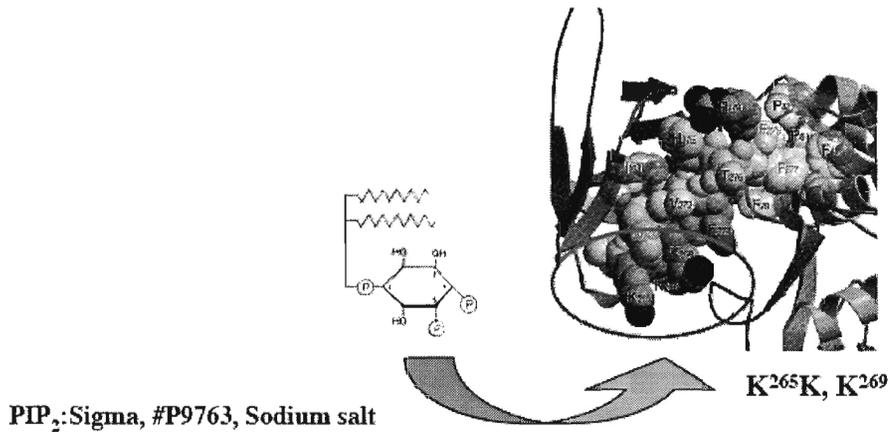


Fig. 6D PIP₂ binding sites on the FERM domain

ゼブラフィッシュの 4.1R 30kDa FERM domain は、PIP₂（塩酸塩、水溶性）により、CaM との結合は、Ca²⁺非存在下でも完全に抑制されなかった。図 6D には、以上の結果を総括した。以上の結果から、K²⁶⁶ は、PIP₂ の重要な結合部位であることが分かった。

[まとめ]

図 7 に示したように、4.1R の CaM 結合部位だけに焦点をあてると、ヒトに至動物の進化過程で、Ser 残基を獲得したのは哺乳動物であり、赤血球の脱核関連

があると予想される。鳥類、両生類など多くの解析データが必要であることは言うまでもない。逆に、ゼブラフィッシュや Coracle が CaM を結合するにもかかわらず、FERM domain と膜貫通蛋白質との結合に影響（制御）しないのか、という問題も、尚、残っている。

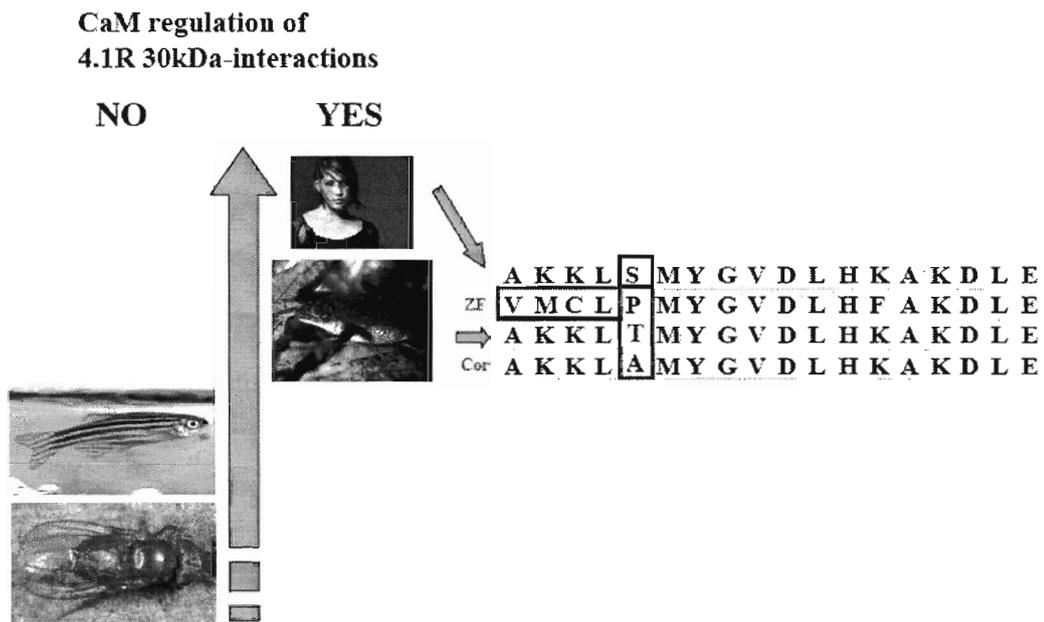


Fig. 7 Proposed novel evolutionary tree based on CaM regulation of 4.1R binding to membrane proteins.

[文献]

Han, B. G, Nunomura, W., Takakuwa, Y., Mohandas, N., Jap, B. K., 2000.

Protein 4.1R core domain structure and insights into regulation of cytoskeletal organization. Nat. Struct. Biol. 7, 871-875.

Hoover, K. B. and Bryant, P. J. 2000. The genetics of the protein 4.1

family: organizers of the membrane and cytoskeleton. Curr. Opin. Cell Biol. 12, 229-234.

Jöns, T. and Drenckhahn, D. 1992. Identification of the binding interface

involved in linkage of cytoskeletal protein 4.1 to the erythrocyte anion exchanger. *EMBO J.* 11, 2863-2867.

Manno, S., Takakuwa, Y., Mohandas, N., 2005. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 280, 7581-7587.

Nunomura, W., Takakuwa, Y., Parra, M., Conboy, J. G., Mohandas, N., 2000a. Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent calmodulin binding sites in erythrocyte protein 4.1. Implications for regulation of protein 4.1 interactions with transmembrane proteins. *J. Biol. Chem.* 275, 6360-6367.

Nunomura, W., Takakuwa, Y., Parra, M., Conboy, J. G., Mohandas, N., 2000b. Regulation of protein 4.1R, p55, and glycophorin C ternary complex in human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 275, 24540-24546.

Nunomura, W., Takakuwa, Y., 2006. Regulation of protein 4.1R interactions with membrane proteins by Ca^{2+} and calmodulin. *Front. BioScience.* 11, 1522-1539.

Shafizadeh, E., Paw, B. H., Foott, H., Liao, E. C., Bruce A. Barut, B. A., Cope, J. J., Zon. L.I., Lin, S., 2002. Characterization of zebrafish merlot/chablis as non-mammalian vertebrate models for severe congenital anemia due to protein 4.1 deficiency. *Development* 129, 4359-4370.

Ward, R. E., 4th, Schweizer, L., Lamb, R. S., and Fehon, R. G.
The protein 4.1, ezrin, radixin, moesin (FERM) domain of *Drosophila* Coracle, a cytoplasmic component of the septate junction, provides functions essential for embryonic development and imaginal cell proliferation.
Genetics. 2001 159(1): 219-228.

第 3 節 生物物理学的解析

第 3-1 項 4.1R の Calmodulin 結合ペプチドと Calmodulin の生物物理学的結合解析

[目的]

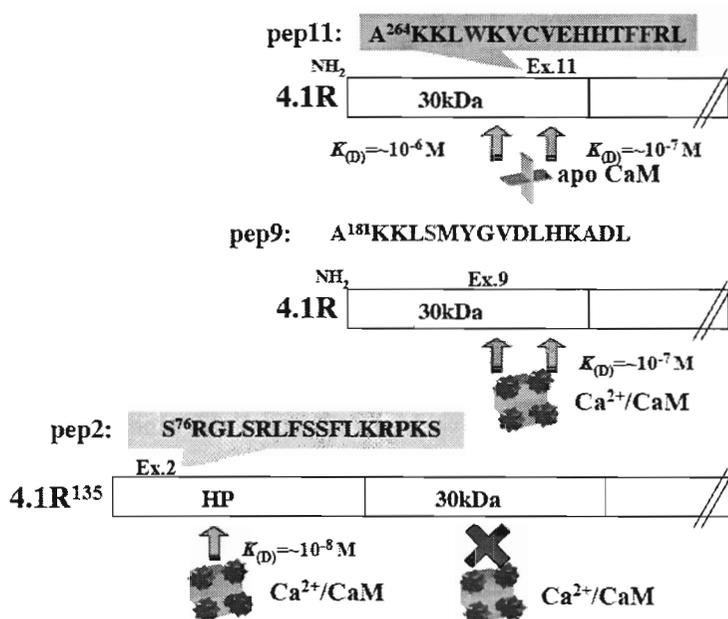


Fig.1. CaM binding sites of 4.1R. The CaM binding sites were located in NH₂-terminal 30kDa domain of the 4.1R (so-called FERM (four-one, ezrin, radixin, moesin domain), we have determined the sequence of the two CaM binding sites, pep11 and pep9 as shown in this figure. The aromatic amino acids, W and F in pep11 were important residues for CaM binding and S in pep9 was key residue for the regulation by Ca²⁺ and CaM. *JBC* (2000) 275:6360 On the other hand, the large molecule isoform of 4.1R (4.1R¹³⁵) expressed in non-erythroid cells has typical Ca²⁺-dependent CaM binding site (pep2) in its additional 209 amino acids at upstream of 4.1R. *Eur. J. Biochem.* (1998) 258:567

4.1R⁸⁰は、膜結合部位である 30kDa domain を介して Calmodulin (CaM) と Ca²⁺ 非依存性に結合することが知られている (図 1)。一方、ヒト赤血球膜では、Ca²⁺ と CaM の複合体 (Ca²⁺ 4 分子で飽和された CaM を以下では Ca²⁺/CaM と表

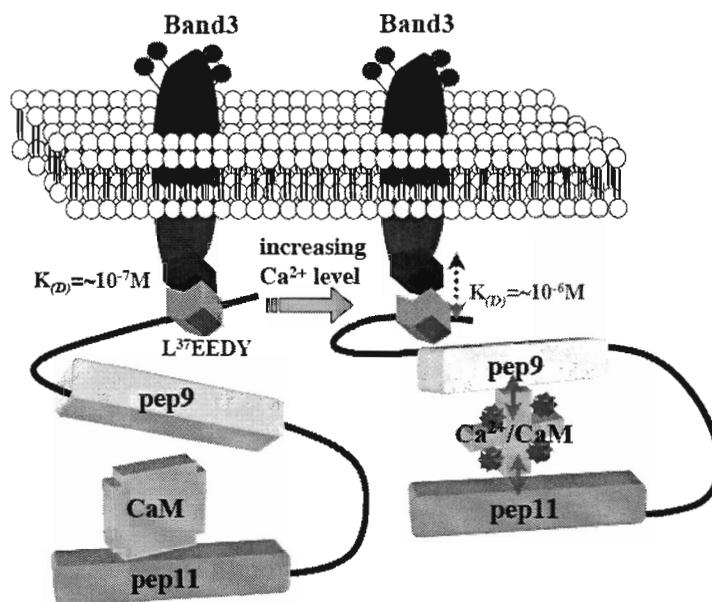


Fig.2. Modulation of 4.1R binding to cytoplasmic domain of Band3 by $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. 4.1R, an erythrocytes membrane skeletal protein, is a unique CaM-binding protein in that it has distinct Ca^{2+} -sensitive (pep9) and Ca^{2+} -insensitive high affinity CaM binding sites (pep11). CaM bound to 4.1R at a stoichiometry of 1:1 both in the presence and absence of Ca^{2+} , implying that one CaM molecule binds to two distinct sites in the same molecule of 4.1R. The binding affinity of 4.1R with Band3 was reduced by Ca^{2+} and CaM complex ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$). *JBC* 275: 6360 (2000)

記する) が $4.1R^{80}$ に結合すると $4.1R^{80}$ と spectrin / actin の結合が弱まり、結果として膜の安定性が低下することが報告されている。これまでに、 $4.1R^{80}$ が CaM と Ca^{2+} 非依存性に結合するにも関わらず、 Ca^{2+} が CaM を介した $4.1R^{80}$ の膜結合を制御する機構を解明する為に、 $4.1R^{80}$ の CaM 結合部位を決定した。つまり、4.1R には、 Ca^{2+} 非依存性に結合する部位 (17 残基, pep11) と Ca^{2+} により結合が強くなる (平衡解離定数が低下する) 部位 (17 残基, pep9) を同定した。Pep9 では、その中の 185 番目のセリン残基 (Ser¹⁸⁵ 或は S¹⁸⁵ と表記) が鍵であることを同定した。CaM が 4.1R の結合を制御する為には、CaM が上記の 2 箇所の結

合部位に同時に結合することがひつようであることが明らかになっている (Nunomura et al. 2000)。4.1R の CaM 結合及び制御機構は、1) Ca^{2+} 濃度に関係なく結合する、2) 1 分子の CaM は 4.1R の異なる部位に箇所て結合することで活性になる、の点で他の CaM 結合蛋白質と異なる点でユニークである。

また、4.1R にはそのアイソフォームである 4.1R¹³⁵ (赤芽球で発現しているが、成熟赤血球には殆どない)がある。4.1R¹³⁵ の N 末端 209 アミノ酸領域 (head-piece、HP と略記) には、 Ca^{2+} 依存性の CaM 結合部位 (pep2) があり、この制御機能については前項で解説した。つまり、pep9、pep11 の対照として pep2 を用いることが可能であり、4.1R と CaM の相互作用を考察する上でも有用と考えた。

一方、CaM は Ca^{2+} により飽和された状態、つまり、4 分子の Ca^{2+} を結合している状態では、熱に対して極めて高い安定性を獲得し、沸騰水処理後でもその結合活性が回復することが報告されているが、どのような分子構造が関与しているのか、未だ不明である。また、図に示すように CaM の立体構造は殆どが α -helix 構造であるが 4 残基からなる β -sheet 構造が 4 個、 Ca^{2+} 結合部位 (EF-hand 構造) 近くにある。これまで、このマイナー構造には殆ど注目されてこなかった。

Ca^{2+} /CaM と FERM domain とどのような分子間相互作用、あるいは蛋白質分子としての構造変化が起因して、FERM domain と GPC 等の膜貫通蛋白質との結合が制御されるのか未だ不明である。本件研究では、動的な構造変化を蛋白質の 2 次構造に焦点をあて、特に変性温度と構造の相関性から CaM とペプチドの相互作用を解析した。本研究では、示差型熱量計 (DSC)、動的光散乱法 (DLS)、フーリエ変換型中赤外分光 (FT-IR)法を組み合わせ、蛋白質高次構造の動的変

化の多面的解析を行った。

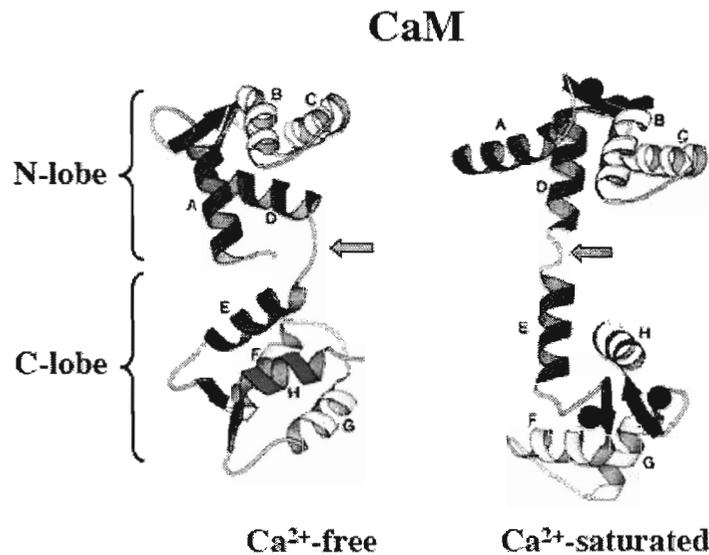


Fig.3. 3D structure of CaM : Reviewed by Zhang, M. & Yuan, T. (*Biochem Cell Biol.* (1998) 76:313-323). CaM contains two structurally similar domains, N-lobe and C-lobe connected by a flexible central linker. The binding of Ca²⁺ induces concerted helical pair movements and changes the two helices in each Ca²⁺ binding motif to a nearly perpendicular orientation. These concerted helix pair movements are accompanied by dramatic changes on the molecular surface of the protein. Rather than exhibiting a flat, hydrophilic molecular surface as seen in Ca²⁺ - free CaM, the Ca²⁺ - saturated form of the protein contains a Met-rich, cavity-containing hydrophobic surface in each domain. These hydrophobic surfaces are largely responsible for the binding of CaM to its targets. The unique flexibility and high polarizability of the Met residues located at the entrance of each hydrophobic pocket together with other hydrophobic amino acid residues create adjustable, sticky interaction surface areas that can accommodate CaM's targets, which have various sizes and shapes. Therefore, CaM is able to bind to a large array of targets without obvious sequence homology. Upon binding to its target peptides, the unwinding of the central linker allows the two domains of the protein to engulf the hydrophobic face of target peptides of differing lengths. The binding of Ca²⁺ reduces the backbone flexibility of CaM. Formation of complexes with its target peptides further decreases the backbone motion of CaM.

[材料と方法]

1. CaM の精製

CaMは、正常牛脳からトリクロロ酢酸沈澱、等電点沈澱、Phenyl Sepharose CL6B (Amersham Biosciences) を用いたカラムクロマトグラフィーにより精製した (Gopalakrishna, R., and Anderson, W. B. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**, 830-836)。

2. ペプチド合成

ペプチドは、Fmoc 法により Perseptive 社のペプチド合成機 9500 により合成した (図 4 参照)。ペプチドは、逆相カラムクロマトグラフィー (C18) で精製し、アミノ酸シーケンサー (島津) で配列を確認し、純度は (MALDI-TOF-MS, REFLEX IITM, Bruker Instruments, Switzerland) で検定した。

3. Resonant Mirror Detection (RMD)法による反応速度論的解析。

蛋白質-蛋白質間および蛋白質ペプチド間の反応速度論的解析には、Resonant Mirror Detection (RMD) 法による IAsys[®] 装置 (Affinity Sensor 社、ケンブリッジ、UK) を用いた (原理は図 5A 参照)。蛋白質或いはペプチドは、10mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄、pH7.4 緩衝液 (0.1M NaCl を含む、以下 PBS と略記) に

100 mg/ml の濃度に溶解しアミノシランキュベット上に、BS³ (Pierce 社、USA 合衆国)を介して固相化した。反応には、10mM Tris HCl 緩衝液 pH7.5、0.1M NaCl (Buffer A) に対して 1mM EGTA 或いは 1mM EGTA と 2mM CaCl₂を加えて用いた。キュベット内の反応温度は 25°C一定に保ち、一定速度で攪拌した。反応に関わるパラメーター (結合速度定数、解離速度定数、最大結合量) は専用解析ソフトを用いて計算した (図 5B 参照)。平衡解離定数 ($K_{(D)kin}$) は、結合速度定数 (k_a) と解離速度定数 (k_d) の比から以下の式で求めた。

$$K_{(D)kin} = k_d / k_a$$

($K_{(D)kin}$) の値は、同じ測定で得られた結果から最大結合量の値を用いて Scatchard plot 解析を行い、両者を比較し合致性を検討した。本文での結果は、($K_{(D)kin}$) の結果のみを $K_{(D)}$ として表示した。

結合比は、以下の式に従って求めた。

結合比 4.1R : CaM =

$B_{max} (4.1R^{80}) / 80,000 : CaM \text{ 固相化量} / 18,000$

(4.1R と CaM の分子量は 80,000 と 18,000 とした。 B_{max} は、解析ソフトを用いた計算から得られる最大結合量)。

4. CaM と 4.1 由来ペプチドの熱量測定

ペプチド 2 (pep2) 、 9 (pep9) 、 11 (pep11) と CaM の結合で発生する熱量変化を、マイクロキャル社の示差型熱量測定器 (VP-DSC) で測定した。反応には、10mM Tris-HCl 緩衝液 pH7.5、0.1M NaCl (Buffer A) に対して 1mM EGTA 或いは 1mM EGTA と 2mM CaCl₂ (Buffer B) を加えて用いた。CaM 濃度 23mM に対してペプチド濃度 (471 mM) を滴定した。熱力学的パラメーター、 ΔH : エンタルピー変化量 ; ΔS : エントロピー変化量 ; ΔG : 自由エネルギー変化量 ; N ; 結合比は、付属のソフトウェアを用いて解析した。

5. FT-IR による二次構造の測定

FT-IR の測定には、ブルカーオプティクス社の ConfoCheckII®を用いた。CaM の濃度は 1mg/ml に調製し、緩衝液は前述のように Ca²⁺存在 (Buffer A) 、非存在 (Buffer B) を用意した。

6. DLS により蛋白質分子径の測定

動的光散乱法 (DLS) の測定は、ゼータサイザーナノ (ゼシスメックス社) を用いた。CaM 試料は、0.2 μ m のフィルター濾過後に計測に用いた。温度依存性の粒径変化は、30°C から 90°C までを自動的に測定した。CaM の濃度は 1mg/ml に調製し、緩衝液は前述のように Ca²⁺存在 (Buffer A) 、非存在 (Buffer B) を用意した。

[結果と考察]

1. 精製 CaM の純度

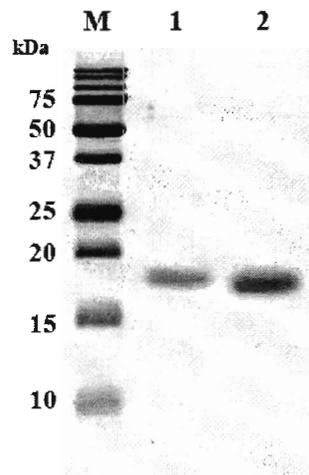


Fig.4. SDS-PAGE of purified CaM. Lane 1; Ca²⁺ free CaM, Lane 2; Ca²⁺ saturated CaM. SDS-PAGE using 15% gel stained with Coomassie Brilliant Blue G-250.

精製 CaM は分子量 17kDa の位置に単一バンドとして泳動された。Ca²⁺飽和 CaM は、Ca²⁺-free CaM よりも相対的に電気泳動上の移動度が大きかった。この結果より、以下の測定に供与出来ると判断した。

2. DSC による CaM 及び CaM 複合体の熱量変化の測定

図 5 には実際の測定結果を示した。図 5 から分かるように、熱に対しては Ca²⁺ free の CaM と Ca²⁺飽和 CaM (Ca²⁺/CaM) では熱変性中点 (T_m) を表すピークは大きく異なっていた。また、Ca²⁺/CaM では、120°C以上の測定ができなかった。図 6 では、緩衝液由来の熱量変化を差し引いて、標準化した結果を図 7 に示した。

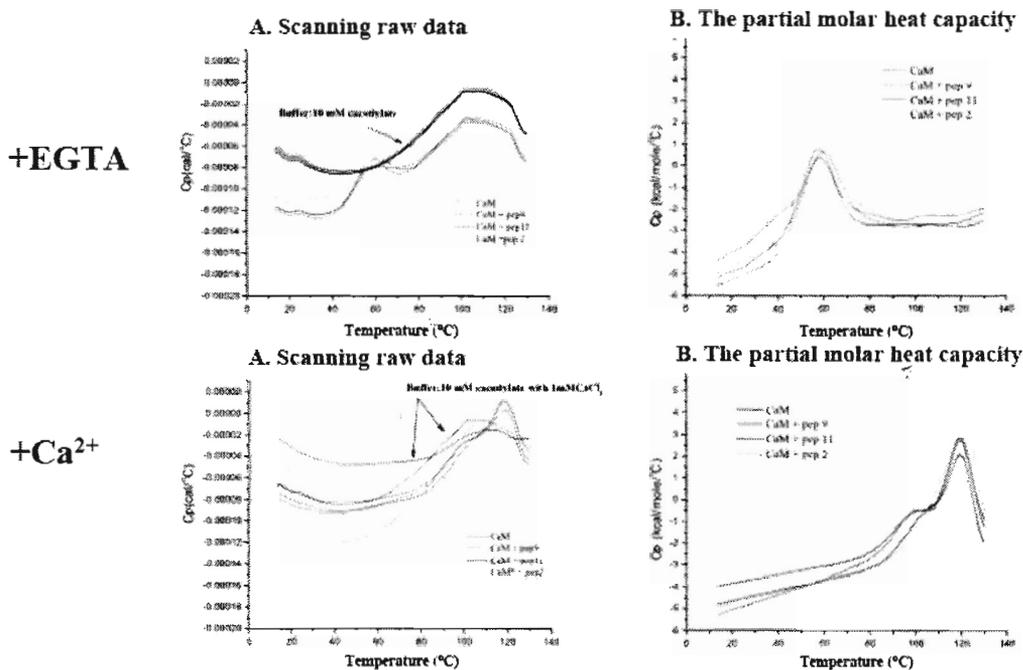


Fig. 5. Temperature dependent of partial molar heat capacity of CaM and complex of CaM-peptides from 4.1R. Ca^{2+} -free (+EGTA) and Ca^{2+} saturated CaM (+ Ca^{2+}).

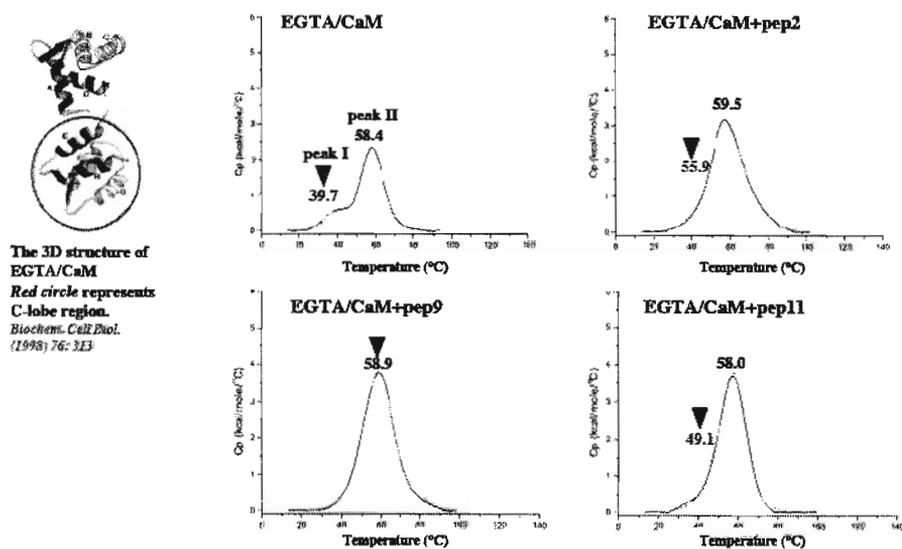


Fig. 6. Temperature dependent of partial molar heat capacity of CaM and complex of Ca^{2+} -free CaM-peptides from 4.1R. EGTA/CaM represent Ca^{2+} -free CaM.

図6に示したように、 Ca^{2+} -free CaM には、 39.7°C (peak I) と 58.4°C (peak II) の2つの熱変性中点があった。この結果は、既報の結果と一致しており peak I

は、Ca²⁺/CaM 構造の C 末端半分 (C-lobe) 由来であると判断できた。4.1R 由来のペプチドを CaM と 1:1 (モル比) で加えると、peak II の温度はどれも 58.4°C 付近で 1°C 以上の変化はなかったが、peak I については、pep2 では 16.2°C、pep9 では 19.0°C、pep11 では 18.1°C 上昇していた。Pep2 は Ca²⁺依存性の結合をすることから、この pep2 は CaM の熱変性中点を変えないと予測していたが、実際には変化が観察された。MLCK (ミオシン軽鎖キナーゼ) の CaM 結合ペプチドは、Ca²⁺依存性 CaM に結合するにも関わらず、CaM の熱変性中点を変えたことが報告された。結果には示さないが、我々も MLCK ペプチドを合成し、Ca²⁺-free CaM と共に DSC で測定したところ、同様な結果を得ることが出来、再現性を確認した。Ca²⁺依存性の結合をするペプチドが DSC で Ca²⁺-free CaM の熱変性中点を変化 (高温側へシフトさせる) 理由は不明である。

pep9 は、Ca²⁺感受性部位として同定されたペプチドであった。この事実は、pep9 が Ca²⁺依存性の結合をするのではなく、Ca²⁺をキレートした状態であっても結合しているがその平衡解離定数は Ca²⁺存在下での 10 倍以上高い事実に由来している。本研究で得られた、pep9 による CaM の peak I の熱変性中点のシフトは、pep11 よりも約 1 個°C 高いことは pep9 の CaM 結合部位が CaM の C-lobe 領域にあり、pep11 も同じ領域にその結合部位があるが、それぞれの部位及び結合様式が異なることを示している。しかし、具体的な様式の違いは指摘できなかった。

図 7 には、Ca²⁺/CaM の DSC 測定結果を示した。Ca²⁺/CaM の熱変性中点は 101.1°C と 119.2°C であった。

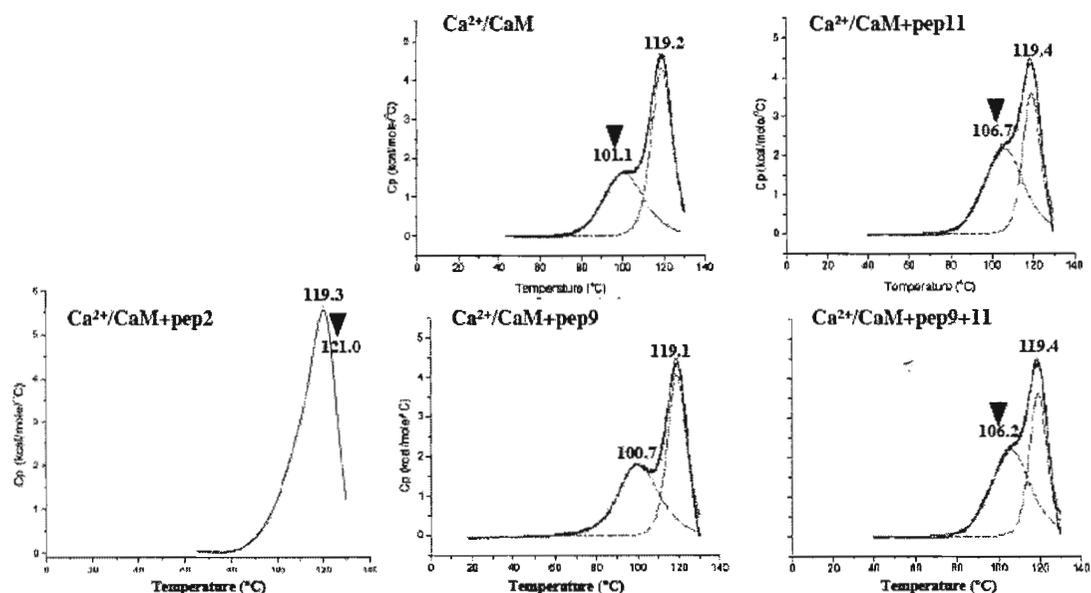


Fig. 7. Temperature dependent of partial molar heat capacity of CaM and complex of Ca^{2+} -free CaM-peptides from 4.1R. $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ represent Ca^{2+} -saturated CaM.

どのケースに於いても peak II には変化はなかった。Pep9 の peak I は 0.4°C しかシフト（低温側）しなかったのに対して、pep11 の peak I は、 5.6°C 高温側にシフトした。pep9 と pep11 を CaM と等モル比で混合すると (pep9+pep11) そのシフトは、 5.1°C であり、pep9 による低温側へのシフト (0.4°C) の結果 ($5.6^\circ\text{C} - 0.4^\circ\text{C} = 5.2^\circ\text{C}$) とよく一致していた。 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ に pep2 を混ぜると peak I は、 121.0°C にシフト (18.9°C) した。 Ca^{2+} -依存性に結合する pep2 は、pep9 及び pep11 と大きく異なっていた。何れも、peak I での変化であり、これらの結果はどのペプチドも CaM の C-lobe に結合することを示している。Peak I の熱変性中点のシフトの違いは、各ペプチドと CaM の結合様式の違いを反映していると思われるが、その様式までは解明できなかった。

Table I. Thermo-dynamical parameters of CaM and peptide complex in DSC

SAMPLE		First Transition			Second Transition	
		ΔH_{total} (kcal/mol)	T_{m1} (°C)	$\Delta H1$ (kcal/mol)	T_{m2} (°C)	$\Delta H2$ (kcal/mol)
CaM	EGTA	46	39.7 ± 0.024	9.4 ± 0.032	58.4 ± 0.046	36.4 ± 0.031
CaM+PEP 9		83	-	-	58.9 ± 0.0053	82.6 ± 0.0454
CaM+PEP 11		65	49.1 ± 0.77	14.9 ± 0.002	58.0 ± 0.055	49.9 ± 0.002
CaM+PEP 2		76	55.9 ± 0.022	9.1 ± 0.196	59.5 ± 0.017	67.1 ± 0.192
CaM	1mM CaCl ₂	105	101.1	44.4	119.3	60.1
CaM+PEP 2		117	112.0	66.1	121.0	50.9
CaM		100.77	101.1 ± 0.049	42.14 ± 0.185	119.2 ± 0.0080	58.63 ± 0.163
CaM+PEP 9		96.08	100.7 ± 0.067	46.69 ± 0.294	119.1 ± 0.0013	49.93 ± 0.243
CaM+PEP 11		95.48	106.7 ± 0.11	54.76 ± 0.529	119.4 ± 0.0016	40.72 ± 0.449
CaM+PEP 9+11MIX		111.25	106.2 ± 0.11	70.21 ± 0.642	119.4 ± 0.0015	41.04 ± 0.517
		ΔH_{total} (kJ/mol)		(kJ/mol)		(kJ/mol)
CaM	EGTA	191		39		152
CaM+PEP 9		346		-		346
CaM+PEP 11		271		62		209
CaM+PEP 2		319		38		281
CaM	1mM CaCl ₂	437		186		252
CaM+PEP 2		490		277		213
CaM		422		176		245
CaM+PEP 9		402		195		207
CaM+PEP 11		400		229		170
CaM+PEP 9+11MIX		466		294		172

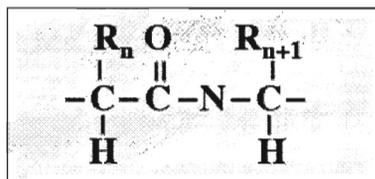
表 1 に、CaM 及び CaM とペプチド複合体の DSC から得られたパラメーターをまとめた。Peak II については、定常レベルに達していないので計算上の予測点で計算した。

3. FT-IR による CaM の温度依存性二次構造変化の解析

FT-IR では、二次構造特にペプチド結合アミドバンド I (Amide I) に由来する波数特異的な吸光度変化を観察することから、CD (円偏光二色性) スペクトル法よりも直接変化を測定出来る利点がある。しかし、これまでは大多数を占める水分子のために、蛋白質分子の吸光度変化を測定することができなかった。このため、重水環境中で測定が行われてきた。今般、ブルカーオプティクス社

は、軽水環境で蛋白質分子の FT-IR 測定可能な Confocheck II®を開発した。

●FT-IR detects the change of Amide I band (C=O) of peptide bond.



●FT-IR measures specific absorbance at 1652 cm⁻¹ for α-Helix and at 1630cm⁻¹ for β-Sheet.

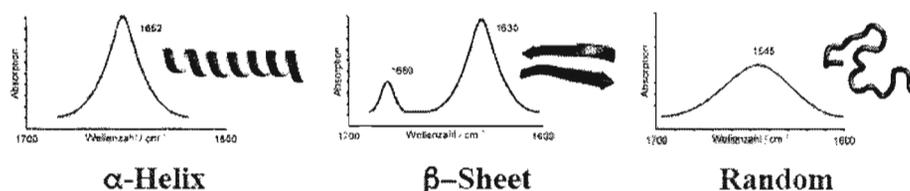


Fig. 8. FT-IR measures the changes of Amide I band of peptide bond. Specific absorbance are at 1652cm⁻¹ for α-helix, β-sheet at 1630cm⁻¹ and random for 1645cm⁻¹.

Confocheck II を利用して、CaM 及び CaM とペプチド複合体の二次構造の温度依存性変化を測定した。図 9 に CaM 単独での FT-IR 測定結果を示した。

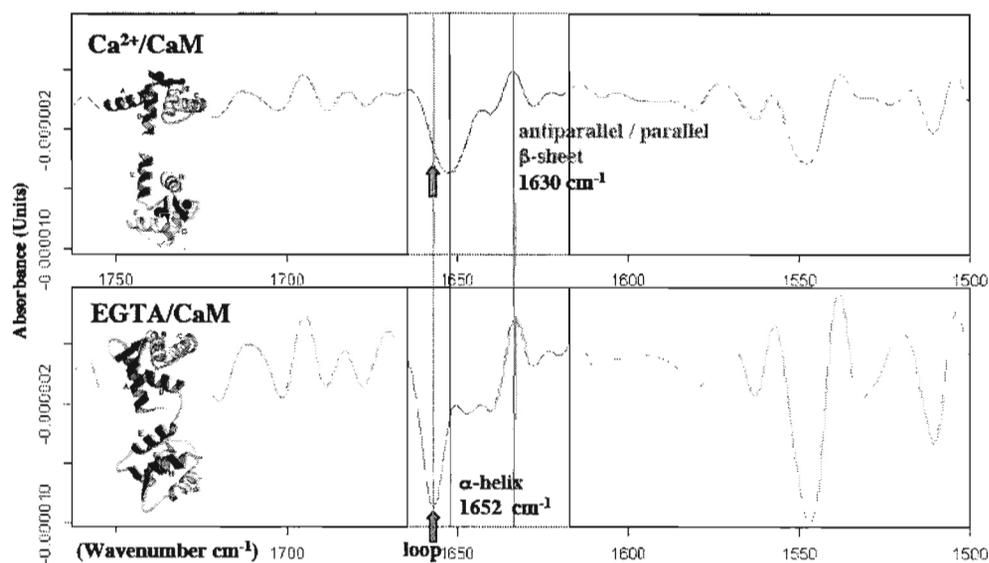


Fig. 9. FT-IR measures the changes of CaM in the presence and the absence of Ca²⁺. Loop structure of CaM increased in the absence of Ca²⁺. α-helix structure at 1652cm⁻¹ increased in the presence of Ca²⁺. Slight change was seen at 1630cm⁻¹ for β-sheet structure.

FT-IR の結果から、Ca²⁺-free CaM で観測された loop 構造は Ca²⁺/CaM に於いて減少していた。1652cm⁻¹ で観測されるα-helix 構造は、Ca²⁺/CaM で増加していた。1630cm⁻¹ で観測されるβ-sheet 構造は、Ca²⁺/CaM で減少していた。この結果を元に各ペプチドをモル比 1:1 で混合して測定した。

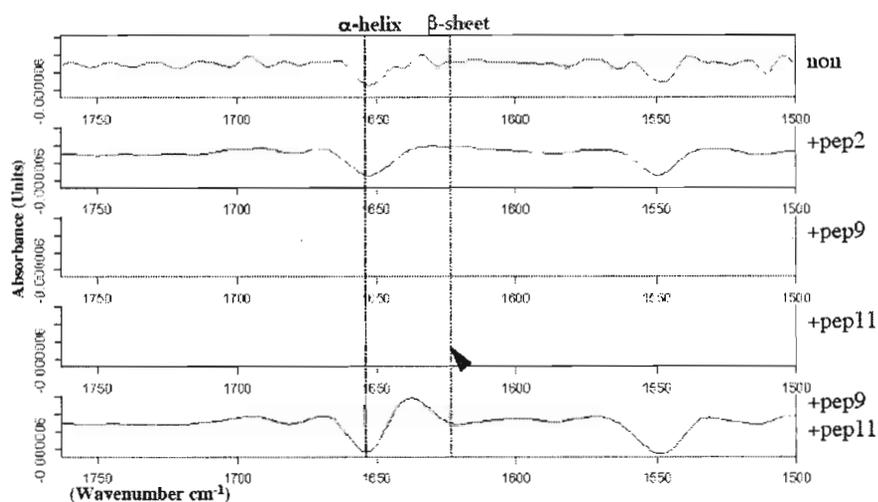


Fig. 10. FT-IR measures the changes of CaM-peptide complex in the presence of Ca²⁺. The second derivative spectrum is shown. Loop structure of CaM increased in the absence of Ca²⁺. α-helix structure at 1652cm⁻¹ did not change mixing with peptides in the presence of Ca²⁺. A dramatic change was seen at 1630cm⁻¹ for β-sheet structure mixing with pep11 but not with the other peptides.

図 10 に示したように、pep11 と CaM の複合体では、1630cm⁻¹ に大きな変化が観察された。この変化は、pep11 特異的であり、pep 9 及び pep2 では観察されなかった。また、pep9 と pep11 を混和した場合でも pep11 単独での変化が同様に観察された。この結果は、pep11 による変化は pep9 に依存しないことが明らかになった。

図 11 に各ペプチドと Ca²⁺/CaM の複合体について温度依存性の変化を観察した結果及びその二次微分結果 (図 12) を示した。図 11 に示したように、pep11

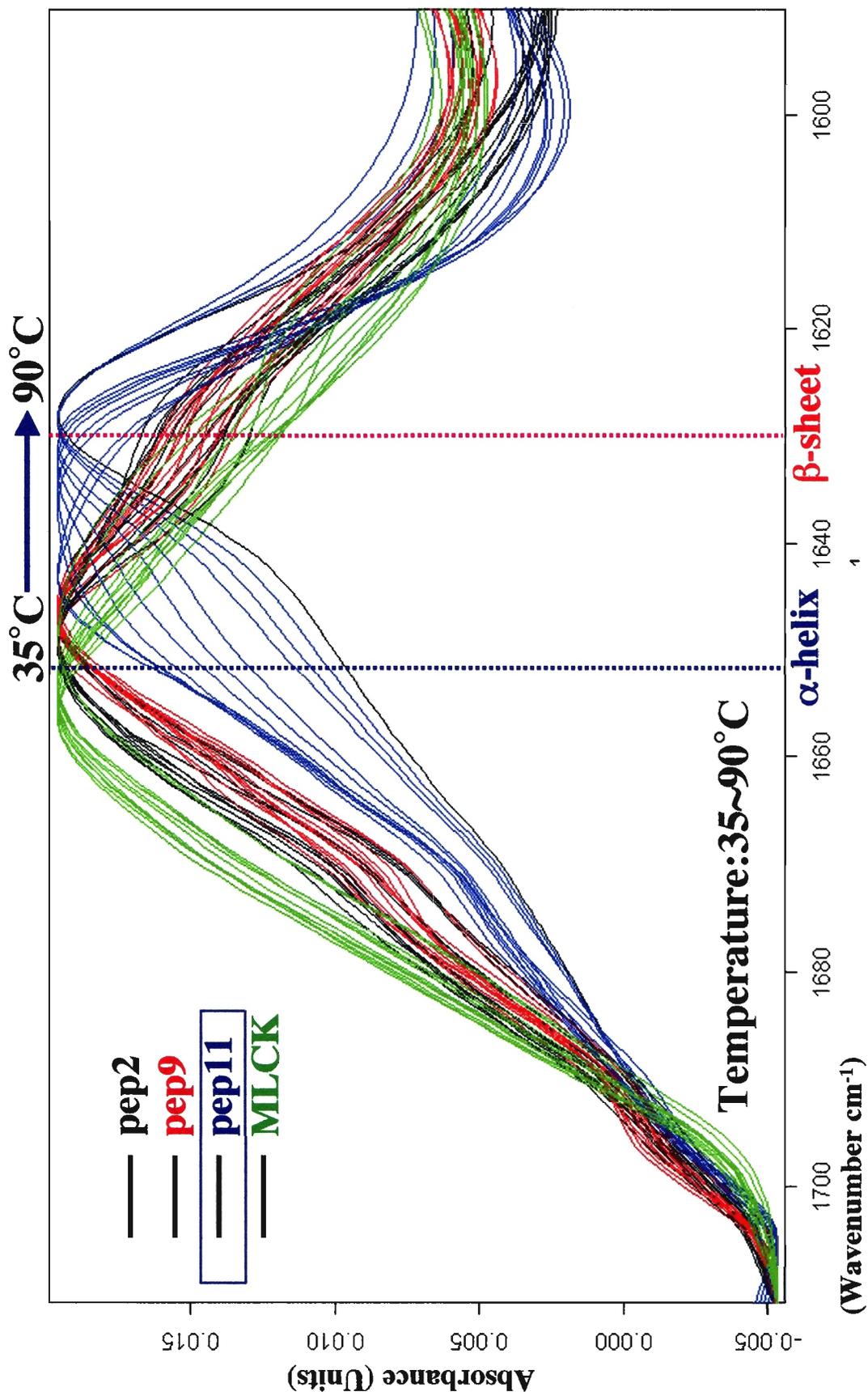


Fig. 12A. Temperature dependent changes of spectrum of $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ with peptides.

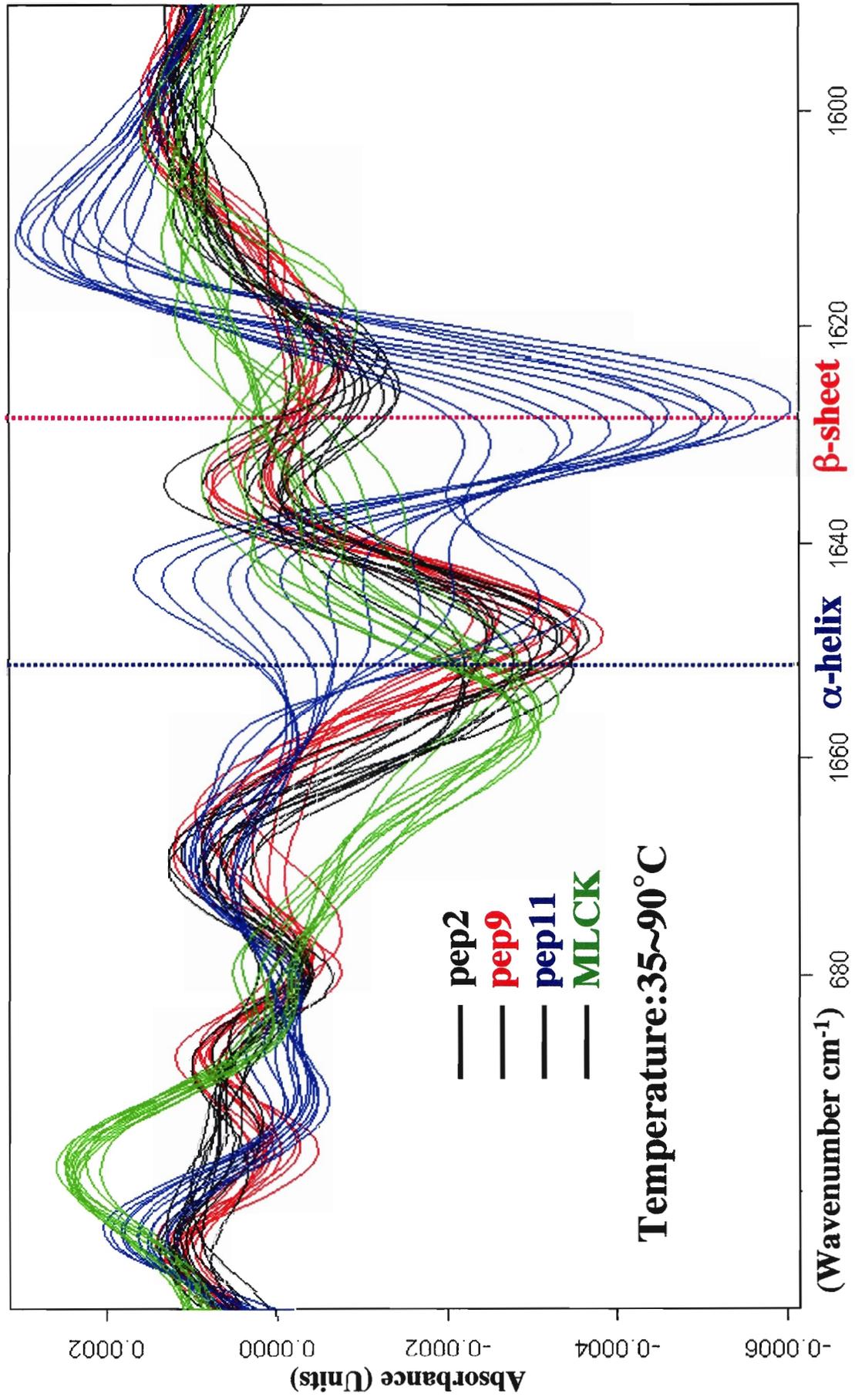


Fig. 12B. Temperature dependent changes of second derivative spectrum of $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ with peptides.

と $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ の複合体は、温度依存性に α -helix 構造を反映する 1652cm^{-1} が 1630cm^{-1} (β -sheet 構造) に変化していた。この温度依存性の変化は pep11 に特異的な変化であり、pep2、pep9 及び MLCK ペプチドでは観察されなかった。測定結果の二次微分で得られた band の面積を積算した結果を図 13 及び 14 に示した。

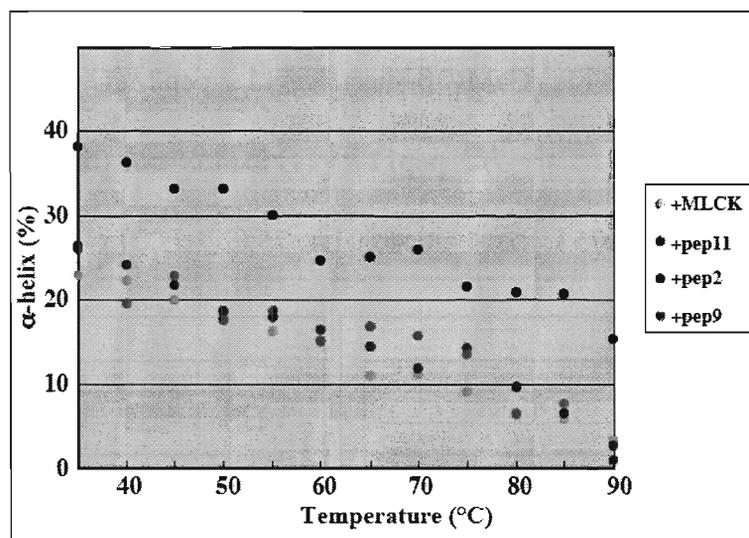


Fig. 13A. Temperature dependent changes of second derivative spectrum at α -helix area. α -helix structure area at 1652cm^{-1} is estimated by using software PLS Calibration model of Proteins established by Bruker Optics.

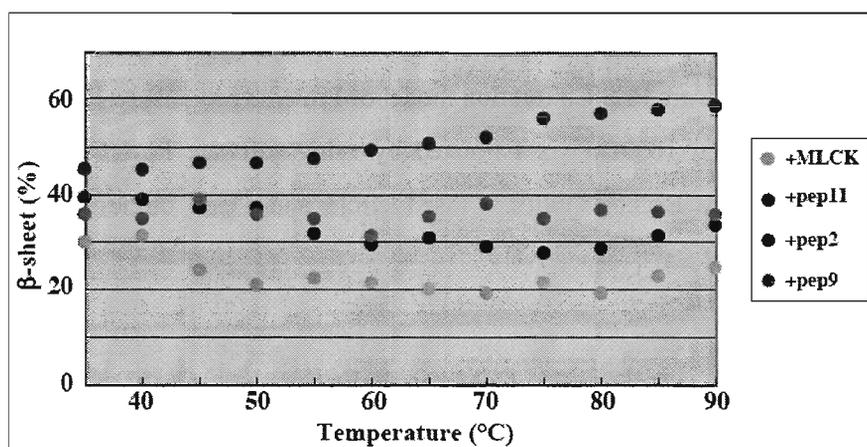


Fig. 13B. Temperature dependent changes of second derivative spectrum at β -sheet area. β -sheet structure area at 1630cm^{-1} is estimated by using software PLS Calibration model of Proteins established by Bruker Optics.

図13A に示したように、 α -helix構造は、温度依存性にその含有量が減少した。55°Cから70°Cでは、 α -helix構造の含有量は、温度依存性の変化はなかった。pep2とCa²⁺/CaMの複合体の α -helix含有量が高いのは、pep2自体に α -helix構造が含まれている為であると思われる。

図13B に示したように、CaMの β -sheet構造は、pep2及びpep9は温度依存性の変化は観察されなかった。一方、pep11と複合体になったCa²⁺/CaMでは、 β -sheet構造の含量が55°Cから75°Cにかけて増加し、75°C以上では殆ど変化しなかった。

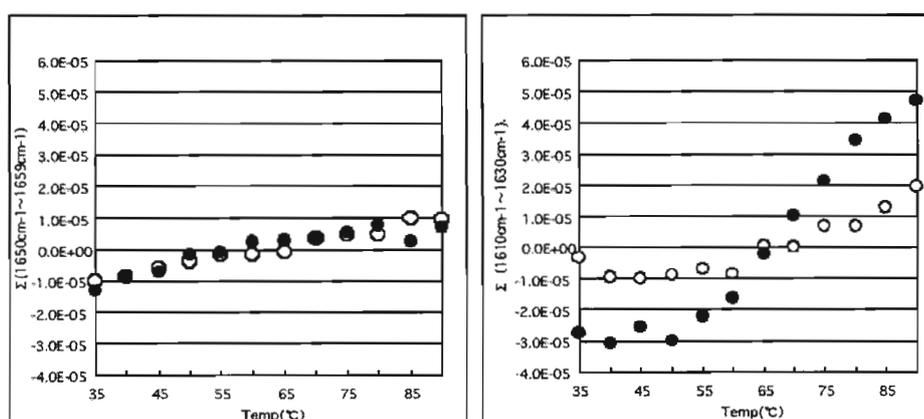
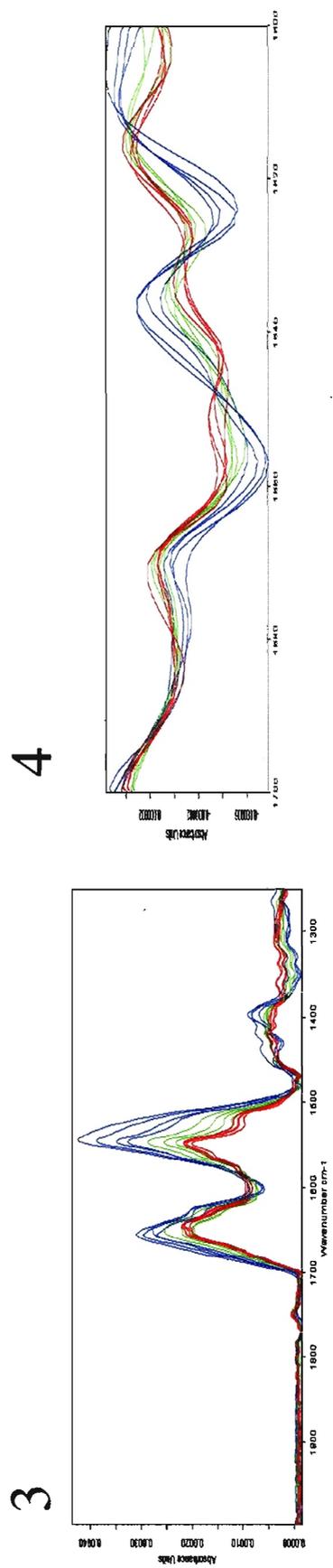
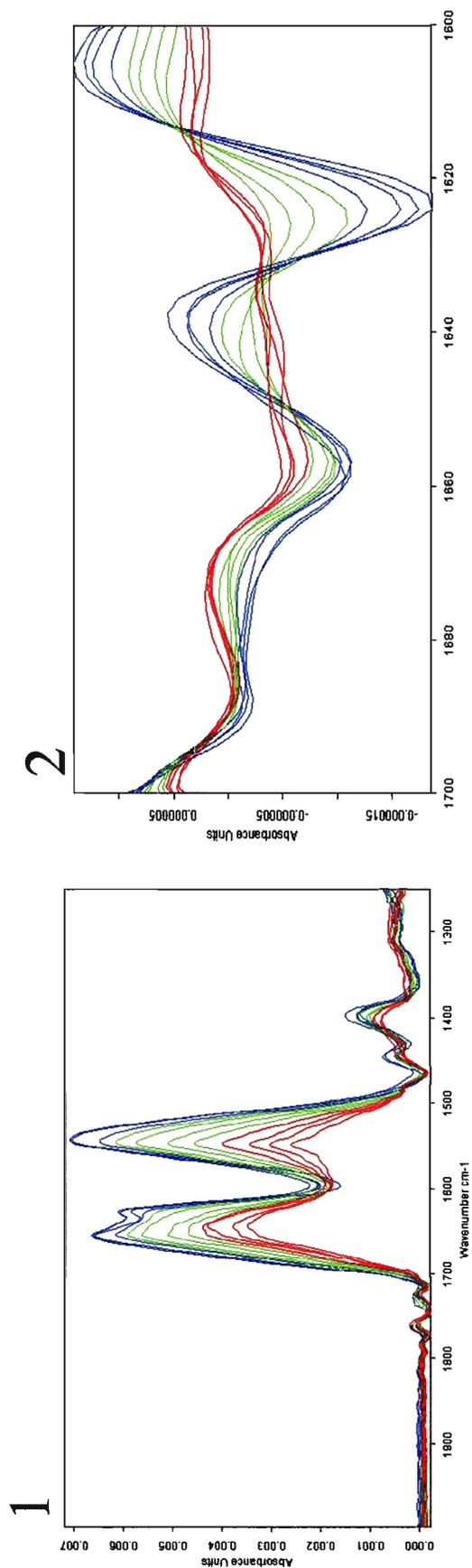


Fig. 14B. Temperature dependent changes of second derivative spectrum at α -helix area (left panel) and β -sheet area (right panel) CaM. α -helix structure area at 1652cm^{-1} is estimated by using software PLS Calibration model of Proteins established by Bruker Optics. β -sheet structure area at 1630cm^{-1} is estimated by using software PLS Calibration model of Proteins established by Bruker Optics. Closed circle and Open circle represent as in the presence and absence of Ca²⁺, respectively.

図14B (左) に示したように、CaMの α -helix構造は、Ca²⁺の濃度に関わらず温度依存性の含有量に変化しなかった。図14B (右) に示したように、 β -sheet構造は、Ca²⁺存在下では温度依存性の変化は観察されなかったが、Ca²⁺非存在下では



**Fig14A. The the thermally induced change of EGTA/CaM (1) and Ca²⁺/CaM (3) by ATR.
 2nd derivative spectra of EGTA/CaM (2)Ca²⁺/CaM (4).
 Red;35°C-50°C, Green;55°C-70°C, Blue;75°C-90°C**

温度依存性に β -sheet構造の含量が55°Cから75°Cの間で増加した。

4. DLSによるCaMの温度依存性二次構造変化の解析

Ca²⁺非存在下でのCaMの温度依存性な β -sheet構造の増加は、CaM単分子内でおこることなのか、あるいは分子間の凝集による結果なのかを明らかにするために、温度依存性の分子径の変化から分子量を算定した。この解析には、シスメックス社が開発したゼータサイザーナノ[®]を用いた。

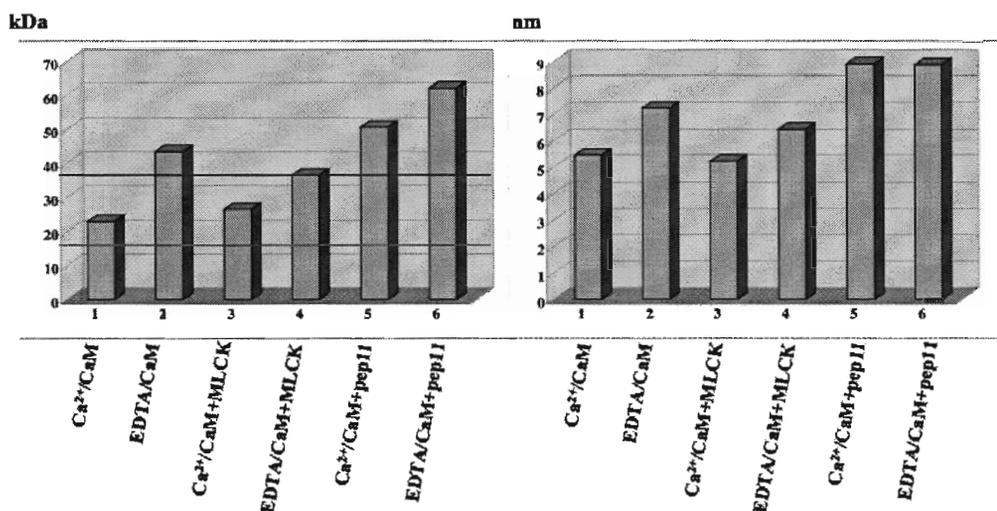


Fig. 15. Measurement of molecular weight (left panel) and diameter (right panel) of CaM and its complex of peptides by Zetasizer[®] based on dynamic light scattering light. Concentration of CaM was 1mg/ml in the presence and absence of Ca²⁺.

DLSによる分子径測定から算出したCaMの分子量は、Ca²⁺存在下では約22kDa (5nm)であったが、Ca²⁺非存在下では約44kDa (7nm)であった。この結果から、Ca²⁺非存在下では2量体を形成している可能性が示唆された。MLCKペプチ

ドをCaMに加えても粒子径に変化はなかった。Pep11ペプチドをCaMに加えるとCa²⁺存在下ではCaMは2量体を形成しており、また、Ca²⁺非存在下では3量体を形成している可能性が示唆された。

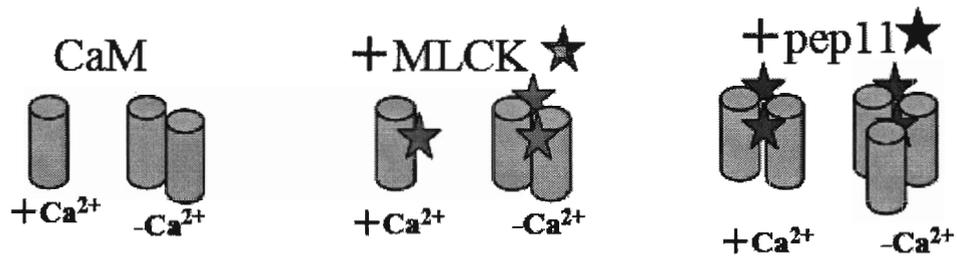


Fig. 16. Proposed model of CaM and its complex of peptides by data from Zetasizer[®] based on dynamic light scattering light.

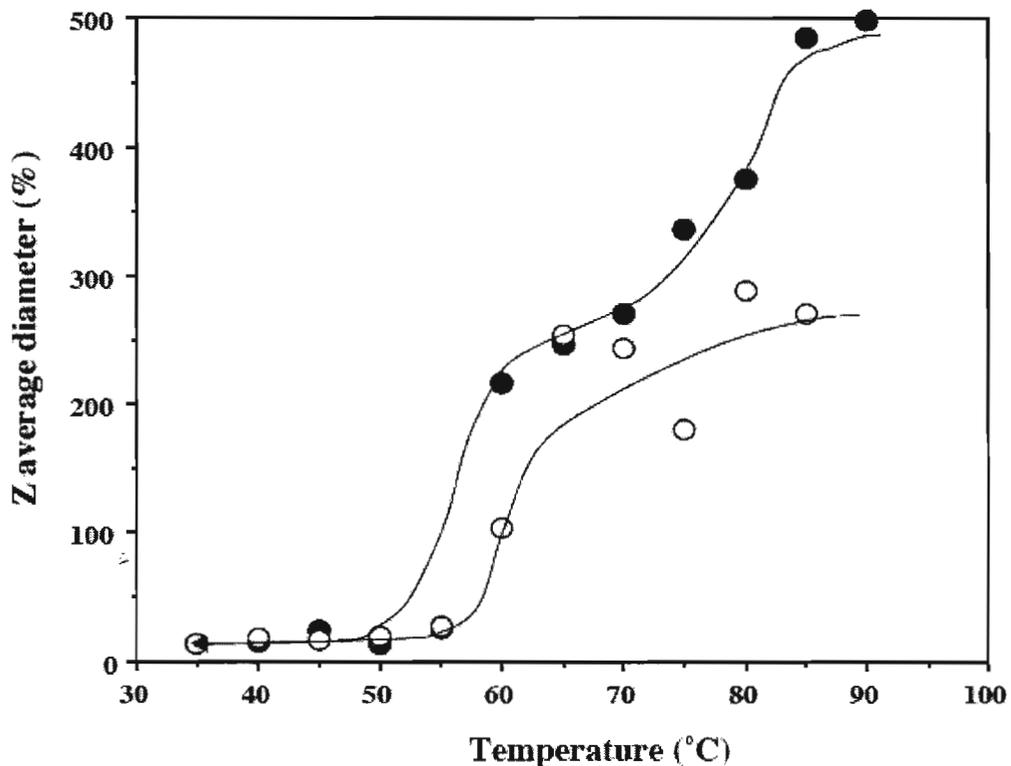


Fig. 17. Temperature inducing aggregation of CaM in the presence (*open circle*) and the absence (*closed circle*) of Ca²⁺.

温度依存性によるCaMの分子径の変化を動的光散乱法で測定した結果を図15に示した。黒丸で示したCa²⁺-free CaMは、50°Cを超えたところで急速に可溶性の凝集が始まり、60°Cから70°Cまで一旦変化が緩和になり、75°C以上で更に凝集することが明らかになった。しかし、Ca²⁺/CaMでは60°Cから65°Cに凝集がおこるが、その後、さらに温度を上昇させても分子径に変化はないことが明らかになった。これらの結果から、1) CaMのβ-sheet構造の温度依存的増加は、単分子内での構造変化ではなく分子間の凝集による可能性が高いこと、2) Ca²⁺はCaMの単分子化に重要であり、且つ、温度依存安定性を司ることが示唆された。

[まとめ]

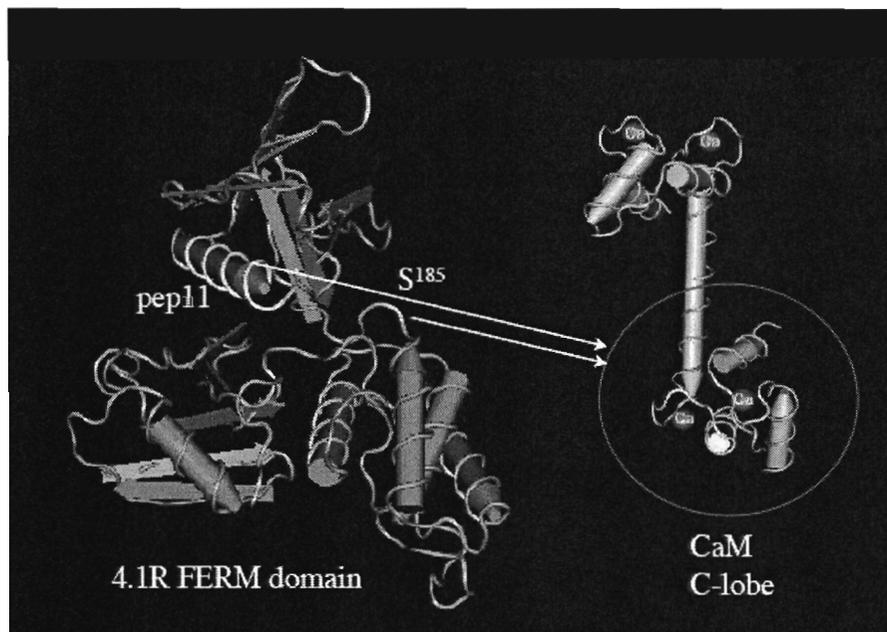


Fig. 18 Predicted 4.1R binding site on 3D structures of 4.1R FERM domain and CaM.

本研究では、DSC、FT-IR及びDLSを用いて、CaM及びCaM-ペプチド複合体について観測し、CaMの熱安定性及び、ペプチドの結合部位についての予測を行った。

その結果、30kDa FERM domain由来のペプチドはともにCaMのC-lobeに結合するが、その結合様式はことなること、pep11の結合はCaMの β -sheet様構造を増加させたことが明らかになった。このことは、pep11の結合により Ca^{2+} で飽和された状態（ Ca^{2+} は4分子結合する）のCaMから Ca^{2+} は4分子を遊離させ、見かけ上、 Ca^{2+} -free CaMと同じ状態になることも考えられる。しかし、DCSの測定結果はpep11の結合により、CaMのC-lobeの熱安定性を増加させていることから、否定された。

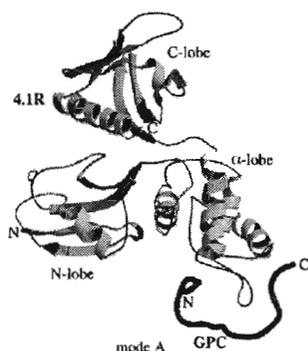
Pep11による β -sheet様構造を増加は、CaMの多量体形成（3量体形成）と関係があると推測される。2量体CaMと3量体に於ける β -sheet様構造が関わっていることは推測できるが、其れ以上のことは明らかに出来なかった。

[問題点]

蛋白質構造解析に於いて、DSC、FT-IR及びDLSは極めて有効な手段である。しかし、現在の技術でも相当量の蛋白質試料を用意しなければならない。本研究では、CaMを対照としたがこれは試料の調製が用意であり、また、高濃度にしても可溶性だからである。しかし、実際に一般に種々の蛋白質に応用出来る訳ではない。例えば、4.1R 30kDa domainは、1mg/mlで沈殿する。今後、さらに高感度な機器の開発が望まれる。

第 3-2 項 共結晶構造解析による 4.1R 30kDa FERM domain の GPC 結合部位の同定

4.1R 30kDa FERM domain と GPC 細胞内 domain の共結晶化により、結合部位に関わるアミノ酸を同定した。結晶構造解析の結果は、これまでに報告された生



化学的解析結果を支持していた。つまり、4.1R 30kDa FERM domain の中で Exon8 がコードする領域に GPC の結合部位があること、GPC の 4.1R 30kDa FERM domain 結合部位で、RHKモチーフが関与していることが明らかになった。（注：本研究は、Bong-Gyoon Han 博士（海外共同研究者）との共同研究で行われた。本報告書作成時に未発表であることから、Bong-Gyoon Han 博士の要請により詳細な結果の報告は控えた）。

[参考文献]

Nunomura, W., Takakuwa, Y., Parra, M., Conboy, J. G., Mohandas, N., 2000a. Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent calmodulin binding sites in erythrocyte protein 4.1. Implications for regulation of protein 4.1 interactions with transmembrane proteins. *J. Biol. Chem.* 275, 6360-6367.

Nunomura, W., Takakuwa, Y., Parra, M., Conboy, J. G., Mohandas, N., 2000b. Regulation of protein 4.1R, p55, and glycoprotein C ternary complex in human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 275, 24540-24546.

第4節 方法論の開発

第 4-1 項 4.1R の PKC リン酸化を利用した反転膜小胞の作製

[目的]

ヒト赤血球の反転膜小胞を利用した蛋白質-膜結合の解析には、pH11 処理や沃化カリウム処理による過酷な条件により、残存蛋白質の除去をした。このため、目的とする膜貫通蛋白質のみならず膜脂質の変性がある条件化で結合解析を行って来た。一方、赤血球膜骨格の要である 4.1R を PKC でリン酸化されると、spectrin/actin、GPC から解離することが報告された (Manno et al. 2005)。本研究では、4.1R を PKC でリン酸化した後に反転膜小胞を作製することで、強度の変性条件による残存蛋白質除去を回避し、得られた反転膜小胞の蛋白質を解析し、4.1R 30kDa FERM domain との結合解析を行った。

[材料と方法]

1. 組換え蛋白質の作製

ヒト 4.1R の cDNA から、30kDa FERM domain (アミノ酸番号 1-298、exon 4-12 コード領域) を *EcoRI* 及び *Sall* 制限酵素切断部位を付加した特異プライマーによる PCR で増幅し、pGEX-KG ベクター (Amersham Biosciences) に組換えた。また、Band3 細胞質内 domain は、赤芽球由来 cDNA から、特異的プライマーにより増幅し、塩基配列を確認後、大腸菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) を形質転換した。

LB 培地にて大腸菌を 37°C 一定条件下で震盪培養し、波長 600nm での吸光度（以下では OD600 或は A600 等で表示）の値が 0.4-0.8 に達した時に、IPTG を最終濃度（1mM）添加し、さらに 37°C 一定条件下で 3 時間震盪培養した。大腸菌は、遠心（RPR20-2 ローター、日立工機、8000rpm、4°C、8 分間）沈澱後、1mM EDTA、1mM DFP、1mM 2ME を添加した B-PER™（PIERCE、USA）に懸濁し溶菌した。溶菌液は氷上 10 分間の超音波処理後、遠心（RPR20-2 ローター、日立工機、18,000rpm、20 分間）の上清を得た。上清は、Glutathione-Sepharose（Amersham Biosciences）と懸濁し、GST 融合蛋白質を分離した。GST 融合蛋白質は PreScission proteinase® 処理により標的蛋白質（30kDa domain）と GST を切断した後、GST を Glutathione-Sepharose にて吸収し、30kDa domain を Q-Sepharose（GE Healthcare Biosciences）で更に精製した。精製した蛋白質の純度は SDS-PAGE にて検定した。蛋白質量は UV 法を用いた（280nm と 260nm を測定し、蛋白質濃度（mg/ml） $= 1.45 A_{280} - 0.74 A_{260}$ ）。

2. 反転膜小胞の作製

a. PKC リン酸化反転膜小胞 (P-IOV) の作製。

PKC リン酸化反転膜小胞 (P-IOV) の作製は、Manno ら（2005）に従った。健常日本人男子に対して、実験の説明及び承諾を得た上で採血をした。血液から白血球をフィルター除去し、氷冷した PBS を血液量の 2 倍量で混和した。遠心分離（5000rpm, Tomy MX-300）で赤血球分画から血清を除去した。赤血球分

Preparation of *inside-out-vesicle*

human blood

|
wash with iced 10mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7.4, 0.15M NaCl (cPBS)
MAX 300 (TOMY Co.Ltd.) 5K rpm, for 5 min @ 4°C, 3 times to remove serum

|
Suspend in cPBS, 50% Ht.

|
| Add calyculin A, final Conc. 20nM, @37°C for 30min

|
| Add phorbol 1myristate 13-acetate, final conc. 2μM @37°C for 60min

|
Suspend in 5mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7.4 and wash 3 times by same buffer

|
Incubate in 0.1mM EDTA, pH 8.5 @37°C for 30min

|
P-IOV

Suspend in 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1M NaCl, 1mM EDTA, 1mM 2-mercaptoethanol (*binding buffer*)

Fig.1. Preparation of inside-out-vesicle (IOV).

量 (a ml) を等量の PBS に研抱くさせ、0.1mM のカリキュリン A (Sigma) を a μl 加え、37°C、20 分加温した。赤血球懸濁液に、フォロボールミリステート (TPA) を加え、37°C、60 分加温した。赤血球を遠心分離後、5 倍量の低張溶液 (5mM リン酸緩衝液 pH7.4) を加え、溶血させた。遠心分離後 (16500rpm, 15min 4°C、Hitachi PRP-20 rotor) し、ゴースト膜を得た。ゴースト膜を 5 倍量の 5mM EDTA, pH8.5 溶液に懸濁し、遠心分離後 (16500rpm, 15min 4°C、Hitachi PRP-20 rotor) 同緩衝液に再懸濁し、37°C、30 分加温した。遠心分離後 (18000rpm, 30min 4°C、Hitachi PRP-20 rotor) 、50mM Tris-HCl, pH7.5, 0.15M NaCl (結合部位緩衝液) に懸濁した。操作流れ図を図 1 に示した。

b. pH11 処理反転膜小胞 (pH11-IOV) の作製

pH11 処理反転膜小胞(pH11-IOV)の作製は、Danilov ら (1990) に従った。健康日本人男子に対して、実験の説明及び承諾を得た上で採血をした。血液から白血球をフィルター除去し、氷冷した PBS を血液量の 2 倍量で混和した。遠心分離 (5000rpm, Tomy MX-300) で赤血球分画から血清を除去した。赤血球を遠心分離後、5 倍量の低張溶液 (5mM リン酸緩衝液 pH7.4) を加え、溶血させた。遠心分離後 (16500rpm, 15min 4°C、Hitachi PRP-20 rotor) し、ゴースト膜を得た。ゴースト膜を 5 倍量の 5mM EDTA, pH8.5 溶液に懸濁し、遠心分離後 (16500rpm, 15min 4°C、Hitachi PRP-20 rotor) 同緩衝液に再懸濁し、37°C、30 分加温した。遠心分離後 (18000rpm, 30min 4°C、Hitachi PRP-20 rotor) 、更に同緩衝液で 3 回洗浄 (懸濁と遠心分離) 繰り返した。膜 (沈殿) 画分は、pH11 NaOH 溶液に 37°C、30 分加温した。遠心分離後 (18000rpm, 30min 4°C、Hitachi PRP-20 rotor) 、更に同緩衝液で 3 回洗浄 (懸濁と遠心分離) 繰り返した。膜画分は 50mM Tris-HCl, pH7.5, 0.15M NaCl (結合部位緩衝液) に懸濁した。膜画分の総蛋白質量は、BSA を標準としたブラッドフォード法により測定した。

3. 共沈降実験

反転膜小胞と組換え 30kDa FERM domain は等量混合し、室温 30 分反応させた。このとき、全容量は 100 μ l にした。結合解析緩衝液で調製した 3% シュクロース (150 μ l) を遠心チューブ (Beckman) に入れ、反転膜小胞と組換え 30kDa FERM domain の混合懸濁液を静かに重層した。

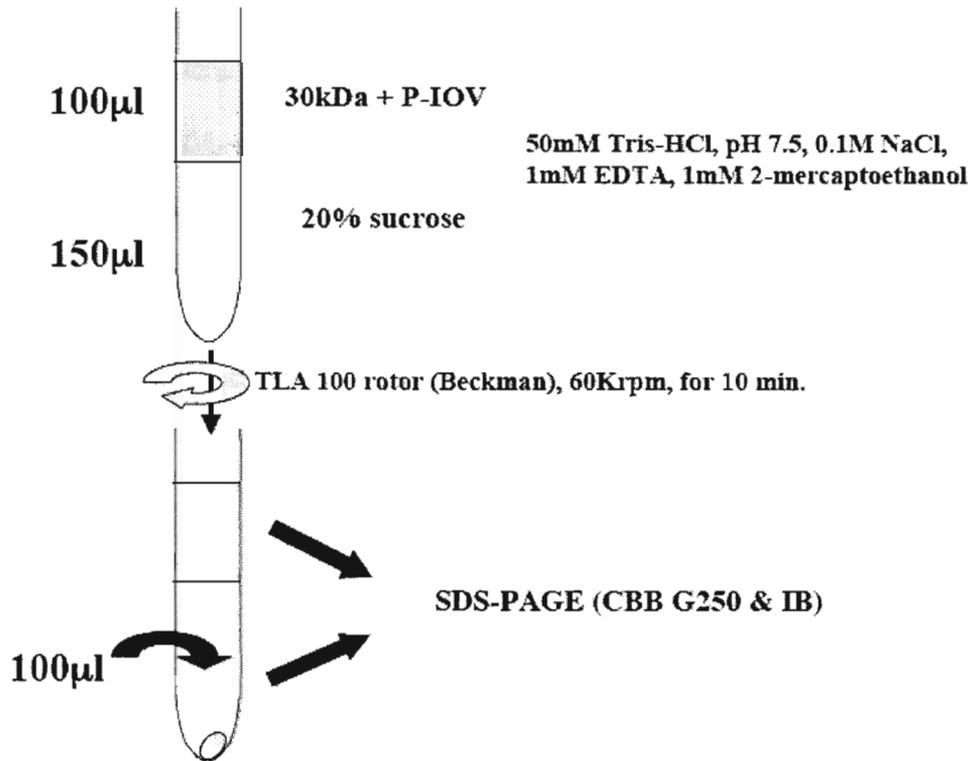


Fig.2 Binding assay of 30kDa domain of 4.1R and P-IOV.

遠心分離（Beckman, TLA100, 70000rpm, 10min, 4°C）して得た沈殿（膜分画）と上清を分離した（図2）。

4. SDS-PAGE および免疫ブロット法

共沈降実験で得られた各画分は SDS-PAGE 及び免疫ブロット法で解析した。免疫ブロット法には、ニトロセルロース膜（BioRad）を用いたセミドライ方式によるブロット（12V 定電圧、50分）を行なった。ブロット膜は、5%スキムミルクと2次抗体と同一動物種の血清（2%）で非特異反応のブロッキング（室温、

60分)行った。一次抗体は、自家製の家兎抗ヒト 4.1R 30kDa domain (IgG 画分)、家兎抗ヒト GPC 細胞内 domain (IgG 画分)、家兎抗ヒト p55 (IgG 画分) を用いた。マウス抗 calmodulin 抗体は Upstate から入手した。また、2次抗体は、ペルオキシダーゼ標識抗家兎 IgG 抗体 (DAKO) を用いた。検出は、ECL(GE Healthcare Bioscience)を用い、X線フィルム (KODAK) を感光した。SDS-PAGE の蛋白染色は、GelCode Blue[®] (Pierce) を用いた。デンストメトリーは、KODAK EDAS を用いた。

[結果と考察]

1. P-IOV の調製と蛋白質の解析。

P-IOV を免疫ブロットで解析すると、4.1R 及び p55 の染色性は減少していたが、GPC はゴースト膜と同様に検出された (図 3)。蛋白質染色では、4.1R のバンドの染色性の低下がみられた (図 3 矢印)。蛋白染色では、Band3 および spectrin のバンドに染色の違いがなかった。ただし、これらの蛋白質の免疫ブロット解析は行っていない。また、P-IOV では、CaM は完全に消失していた (図 4)。しかし、免疫染色レベルで 4.1R の残存を認めたが、少なくともゴーストに比較すると減少していた。蛋白染色において、Band3 及び Band3 に結合する Band4.2 もゴースト膜及び P-IOV で変化していないことは、ゴースト膜と P-IOV は等量が泳動されたことを示している。また、PKC の基質にならないことを示している。本研究で、ゴースト膜にあった CaM が P-IOV では完全に消失

SDS-PAGE of P-IOV (1)

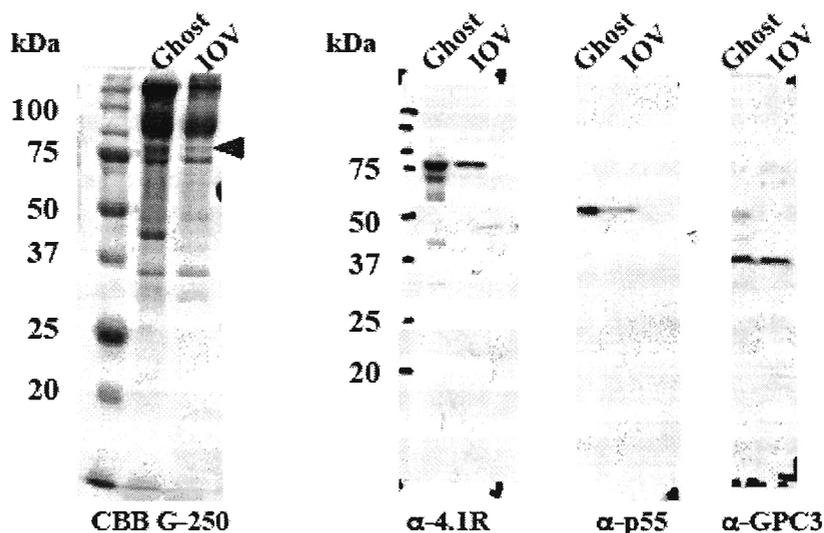
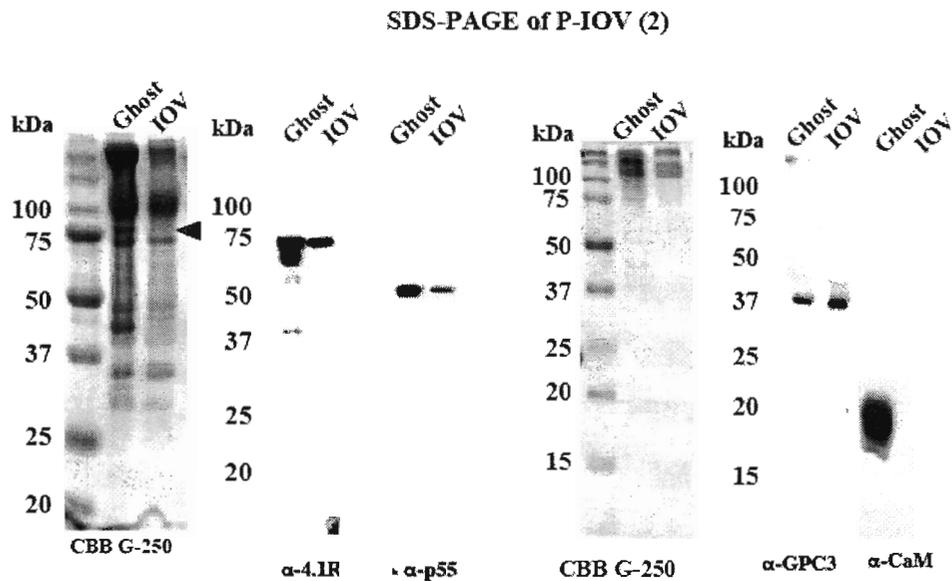


Fig.3 SDS-PAGE of P-IOV(1)

Figure legend for Figure 3. **Immuno-blot analysis of Ghost and IOV prepared by PKC treated with red cell ghost.** Using specific antibodies to 4.1R (α -4.1R), p55 (α -p55) and GPC (α -GPC3, this antibody is specific to the 4.1R binding sequence of GPC), immuno blot image is shown.

していることが示された。赤血球膜の CaM の結合蛋白質としては、4.1R の他、Adducin、spectrin が知られている。ただし、spectrin と CaM の結合には異論がある。Adducin は、PKC の基質であることも明らかになっており、MARKS 相同配列は CaM 結合部位であり、PKC の基質部位でもある。Adducin は PKC リン酸化により膜骨格から離脱することから、CaM は、結合蛋白質と共に反転膜小胞を作製時に離脱したと考えられる。もう一つに可能性は、4.1R や Adducin がリン

酸化により CaM が標的蛋白質から解離し、ゴースト作製時に分離されたとも考えられる。



IOV/(ROV+IOV) was not determined.

Fig.4. SDS-PAGE of P-IOV(2)

Figure legend for Figure 4. **Immuno-blot analysis of Ghost and IOV prepared by PKC treated with red cell ghost.** Using specific antibodies to 4.1R (α -4.1R), p55 (α -p55) and GPC (α -GPC3, this antibody is specific to the 4.1R binding sequence of GPC), immuno blot image is shown.

2. 4.1R 30kDa FERM domain の IOV との結合解析。

P-IOV (総蛋白質量 $185 \mu\text{g}$) と pH11-IOV (総蛋白質量 $200 \mu\text{g}$) を用い、4.1R 30kDa domain の結合を解析した。図 5 に示したように、4.1R 30kDa domain の濃度依存性に P-IOV と pH11-IOV に結合した。蛋白染色及び免疫ブロット法で、

反転膜小胞への結合を確認した。図6には、4.1R 30kDa FERM domain の濃度依存性結合を示した。免疫ブロットで得られたバンドをデンストメーターで解析した。P-IOV と pH11-IOV 共に平衡解離定数はともに $10^{-7}M$ であったが、最大結合量は P-IOV の方が pH11-IOV よりも大きかった。

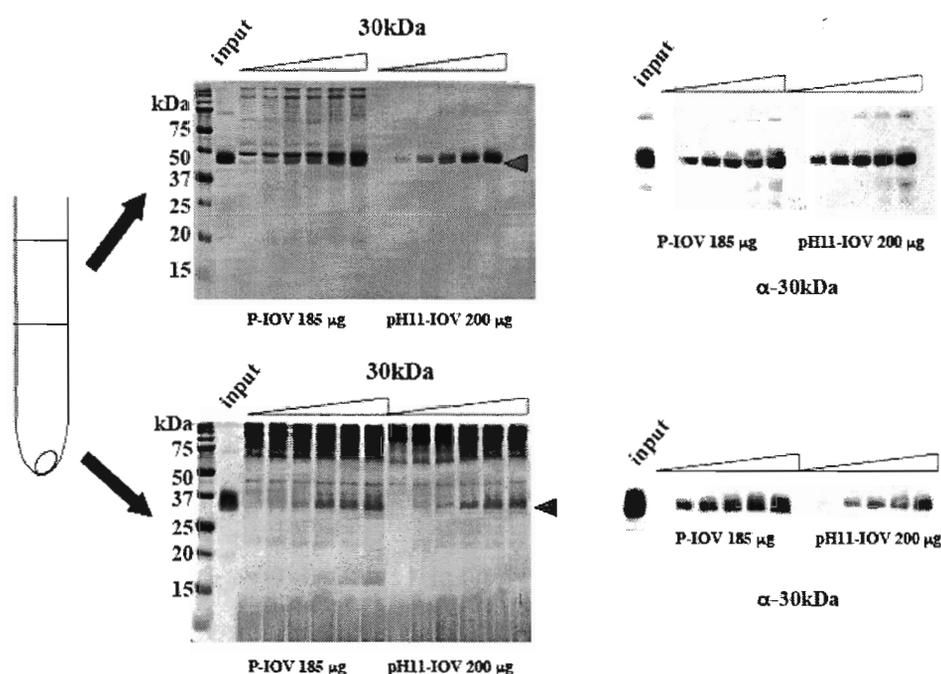


Fig.5. 30kDa binding to P-IOV(1)

Figure legend for Figure 5. **4.1R 30kDa FERM domain (30kDa) binding with P-IOV.**

Comparison of P-IOV and pH11 treated IOV describing by Danilove. The not-bound (*Upper panels*) and bound 30kDa (*Lower panels*) were analyzed by using specific antibodies to 4.1R 30kDa FERM domain (α -30kDa). Electrogram showed the dose dependent of 30kDa binding with IOV.

4.1R 30kDa FERM domain と大過剰の CaM ($5 \mu M$) 存在下で P-IOV との結合を解析した。これまでに、CaM は 4.1R 30kDa FERM domain と膜貫通蛋白質との結合を弱めることを示した (Nunomura et al. 2000)。

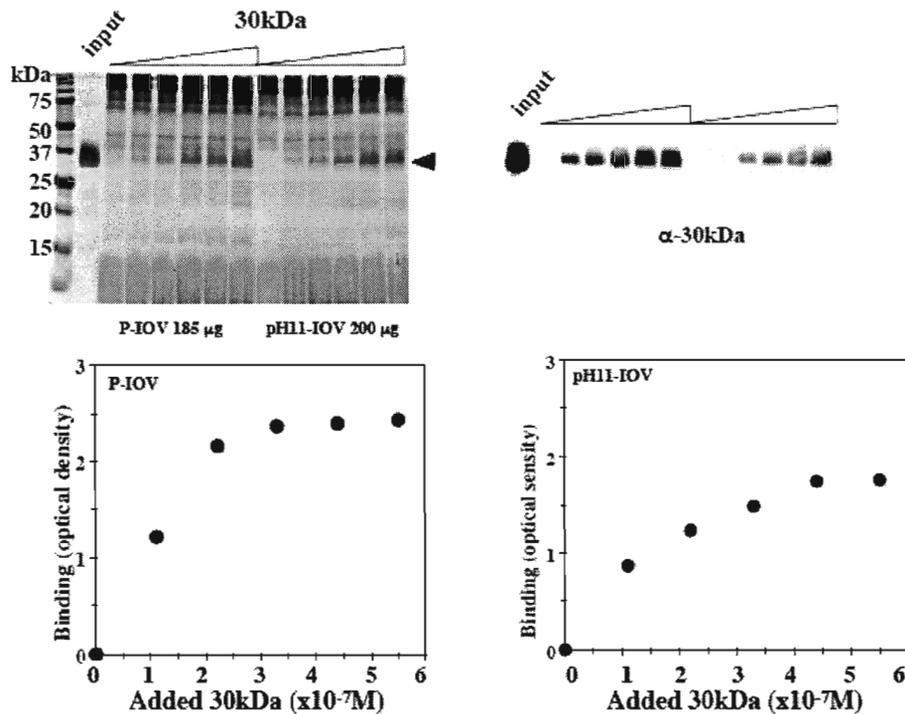


Fig.6. 30kDa binding to P-IOV(2)

Figure legend for Figure 6. **4.1R 30kDa FERM domain (30kDa) binding with P-IOV.**

Comparison of 30kDa binding with P-IOV and pH11 treated IOV. The electrogram of 30kDa binding (*Upper panels*) and dose dependent binding plot data (*Lower panels*) analyzed by using specific antibodies to 4.1R 30kDa FERM domain (α -30kDa) are shown. Electrogram showed the dose dependent of 30kDa FERM domain binding with IOV.

[まとめ]

P-IOV は、作製の過程が勘弁であり、その有効性が高いと思われる。膜貫通蛋白質である Band3 及び GPC はよく保存されていた。ほぼ同じ量の IOV に対しての 4.1R 30kDa FERM domain の結合は、平衡解離定数は変わらないが結合量は、P-IOV の方が大きい事実は、膜貫通蛋白質の変性が少ないことを示している

思われと、これらの反転膜小胞と 4.1R 30kDa FERM domain の結合を行った場合の粒径の変化を明らかにすることにより、本法の有用性を解析したい。

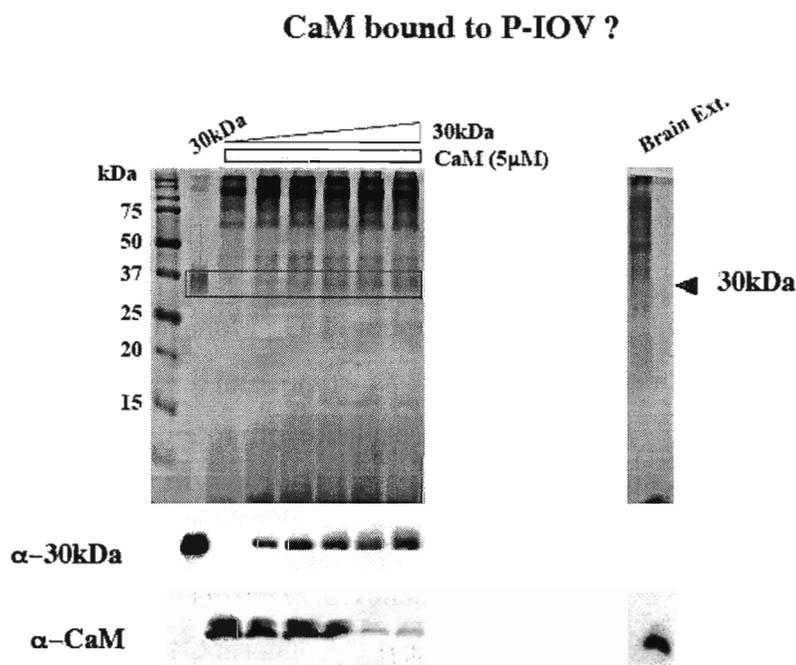


Fig.7. 30kDa binding to P-IOV(3)

Figure legend for Figure 7. **Ca²⁺/CaM effect on 4.1R 30kDa FERM domain (30kDa) binding with P-IOV.** Different dose of 30kDa domain and 5 μM of CaM in the presence of Ca²⁺ was mixed with P-IOV. The bound proteins were analyzed by using antibodies to 30kDa domain (α-30kDa) and CaM (α-30kDa).

[参考文献]

Danilov YN, Fennell R, Ling E, et al. Selective modulation of Band 4.1 binding to erythrocyte membranes by protein kinase C. 1990. *J. Biol. Chem.* 265:2556-2562.

Manno, S., Takakuwa, Y., Mohandas, N., 2005. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 280, 7581-7587.

Nunomura, W., Takakuwa, Y., Parra, M., Conboy, J. G., Mohandas, N., 2000a. Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent calmodulin binding sites in erythrocyte protein 4.1. Implications for regulation of protein 4.1 interactions with transmembrane proteins. *J. Biol. Chem.* 275, 6360-6367.

Nunomura, W., Takakuwa, Y., Parra, M., Conboy, J. G., Mohandas, N., 2000b. Regulation of protein 4.1R, p55, and glycophorin C ternary complex in human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 275, 24540-24546.

第 4-2 項 4.1R FERM domain に対する単クローン抗体の作製

[目的]

4.1R は、種々の赤血球のみならず種々の細胞で発現していることが、mRNA レベル、蛋白質レベルで報告されている。単クローン抗体は、抗原検出のための強力な手段であるとともに、部位特異的な単クローン抗体は、結合を阻害することが出来ることから、新たな機能解析が期待できる。膜結合部位である 30kDa domain に対する単クローン抗体を確立し、その結合特性、結合部位、膜との結合阻害を検討した。

[材料と方法]

1. 組換え蛋白質の作製

ヒト 4.1R の cDNA から、30kDa domain (アミノ酸番号 1-298、Exon 4-12 コード領域) を *EcoRI* 及び *SalI* 制限酵素切断部位を付加した特異プライマーによる PCR で増幅し、pGEX-KG ベクター (Amersham Biosciences) に組換えた。また、Band3 細胞質内 domain は、赤芽球由来 cDNA から、特異的プライマーにより増幅し、塩基配列を確認後、大腸菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) を形質転換した。LB 培地にて大腸菌を 37°C 一定条件下で震盪培養し、波長 600nm での吸光度 (以下では OD600 或いは A600 等で表示) の値が 0.4-0.8 に達した時に、IPTG を最

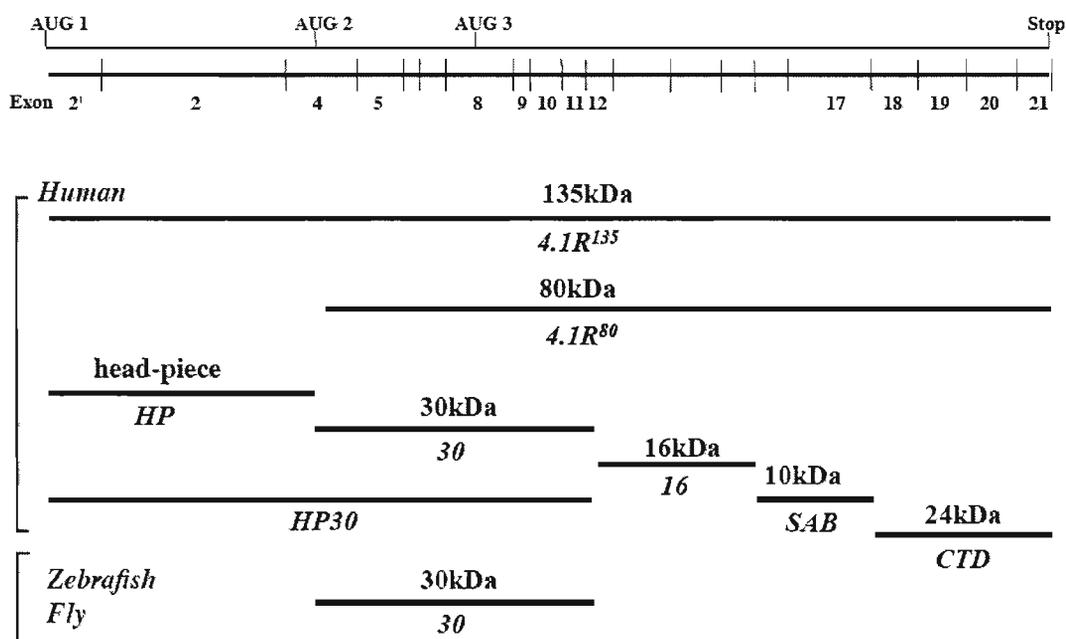
終濃度 (1mM) 添加し、さらに 37°C 一定条件下で 3 時間震盪培養した。大腸菌は、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、8000rpm、4°C、8 分間) 沈澱後、1mM EDTA、1mM DFP、1mM 2ME を添加した B-PER™ (PIERCE、USA) に懸濁し溶菌した。溶菌液は氷上 10 分間の超音波処理後、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、18,000rpm、20 分間) の上清を得た。上清は、Glutathione-Sepharose (Amersham Biosciences) と懸濁し、GST 融合蛋白質を分離した。GST 融合蛋白質は PreScission proteinase™ 処理により標的蛋白質 (30kDa domain) と GST を切断した後、GST を Glutathione-Sepharose にて吸収し、30kDa domain を Q-Sepharose (Amersham Biosciences) で更に精製した。精製した蛋白質の純度は SDS-PAGE にて検定した。蛋白質量は UV 法を用いた (280nm と 260nm を測定し、蛋白質濃度 (mg/ml) = $1.45 A_{280} - 0.74 A_{260}$) 。

各種の Exon を 欠失させた 4.1 の膜結合ドメイン (N 末端 30kDa) の組換え体を作製した (Construct 3)。変異導入は、塩基配列を確認した。

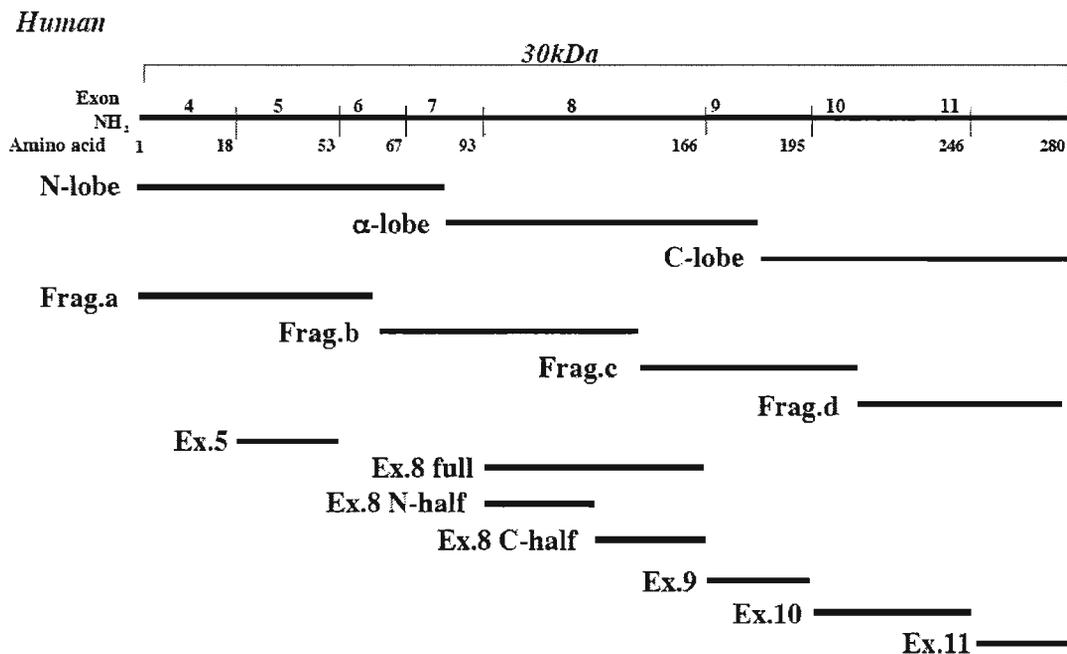
2. ペプチド合成。

ペプチドは、Fmoc 法により Perseptive 社のペプチド合成機 9500 により合成した (図 4 参照)。ペプチドは、逆相カラムクロマトグラフィー (C18) で精製し、アミノ酸シーケンサー (島津) で配列を確認し、純度は (MALDI-TOF-MS、島津) で検定した。精製ペプチドは、アミノ基活性化 Ovalbumin (Pierce より購

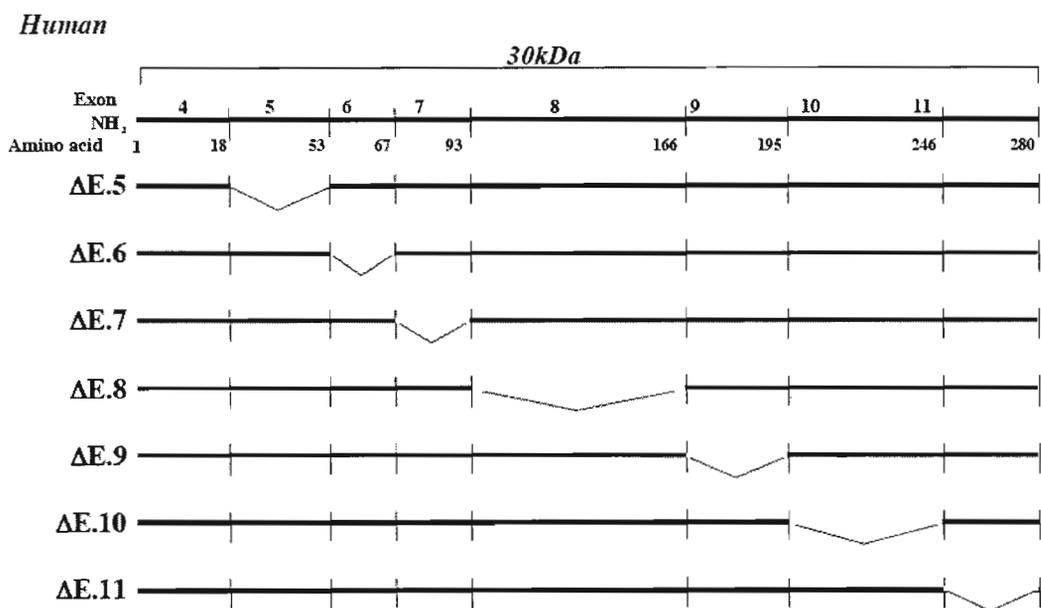
Constaructs (1)



Constaructs (2)



Constructs (3)



入) に結合させて使用した。結合比は、ペプチド 1mg に対し Ovalbumin は 2mg の割合で調製した。

3. Resonant Mirror Detection (RMD)法による反応速度論的解析。

蛋白質-蛋白質間および蛋白質ペプチド間の反応速度論的解析には、Affinity Sensor 社(ケンブリッジ、UK)の Resonant Mirror Detection (RMD)法による IAsys® 装置を用いた(原理は図 5A 参照)。蛋白質或いはペプチドは、10mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH7.4 緩衝液(0.1M NaCl を含む、以下 PBS と略記)に 100 mg/ml の濃度に溶解しアミノシランキュベット上に、BS³(Pierce 社、USA)を

介して固相化した。ペプチドの固相化には、一旦、アミノシランキュベット上にウシ血清アルブミン (BSA) を、BS³を介して固相化したのち、NHS/EDCにてBSAのアミノ基を活性化する方法 (Nunomura et al. 1997) も共用した。反応には、10mM Tris-HCl 緩衝液 pH7.5、0.1M NaCl (Buffer A) に対して 1mM EGTA 或いは 1mM EGTA と 2mM CaCl₂を加えて用いた。キュベット内の反応温度は 25°C一定に保ち、一定速度で攪拌した。反応に関わるパラメーター (結合速度定数、解離速度定数、最大結合量) は専用解析ソフトを用いて計算した (図 5B 参照)。平衡解離定数 ($K_{(D)kin}$) は、結合速度定数 (k_a) と解離速度定数 (k_d) の比から以下の式で求めた。

$$K_{(D)kin} = k_d / k_a$$

($K_{(D)kin}$)の値は、同じ測定で得られた結果から最大結合量の値を用いて Scatchard plot 解析を行い、両者を比較し合致性を検討した。本文での結果は、($K_{(D)kin}$)の結果のみを $K_{(D)}$ として表示した。

4. 免疫及び腹水化

精製した 4.1R 30kDa FERM domain を 2mg/ml に調製し、TiterMax[®] (アジュバント) と等量混合して BALB/c mouse に免疫した。30 日後に尾静脈から採血し、血中抗体価を酵素免疫測定法 (ELISA) 及び免疫ブロット法で確認した後、脾を摘出し、常法従ってポリエチレングリコールを用いて P3U1 と核融合を行った。

ハイブリドーマは RPMI1640 培地 (10% FCS を含む) で培養した。4.1R 30kDa domain を固相化 (BSA でブロッキング) した ELISA 法を用い、陽性クローンを選択した。このとき、2 次抗体として抗マウス IgG 特異抗体を用いることにより、IgG 産生型クローンを選択した。クローニングは、限界希釈法を用いた。

クローンの選択は、4.1R およびその断片蛋白質、4.1 ファミリーの免疫ブロットにより、特異性の高いクローンを選択した。

最終的に選択した 4 クローンのハイブリドーマを、ヌードマウス (BALB/c) 腹腔内に投与し腹水を得た。4 クローンの選択過程は結果に記す。

5. IgG の精製

遠心分離した腹水に等量の PBS を加えた後、等量の飽和硫酸溶液を徐々に加えた (半飽和)。添加後更に室温で 30 分攪拌した後、遠心分離にて沈殿を得た。この沈殿を腹水と同じ量の PBS で溶解した後、同様に飽和沈殿を行った。同様な操作を更に二回繰り返した後、10mM Tris-HCl, pH 8.0, 50mM NaCl (Buffer A) で溶解し、同緩衝液で十分透析をした。不溶成分を遠心除去後、Buffer A で平衡化した Q-Sepharose (GE Health Science) の 1 x 20cm カラムに 0.7ml/min の流速で通した。素通り画分の吸光度 A280 が 0.05 以下になった時点で、Buffer A に更に 50mM の NaCl (最終濃度 0.1M NaCl) で抗体活性のある IgG 分画を回収した。精製抗体は、SDS-PAGE で純度を確認した。蛋白質濃度は、A280 を測定して決定した ($E^{1\%}=15$)。

6. 4.1R ノックアウトマウス血球の解析

4.1R ノックアウトマウス血球の解析は安秀麗博士 (New York Blood Center) に解析を依頼した。精製抗体は、本教室から供与した。

[結果と考察]

1. 抗体の結合部位の同定

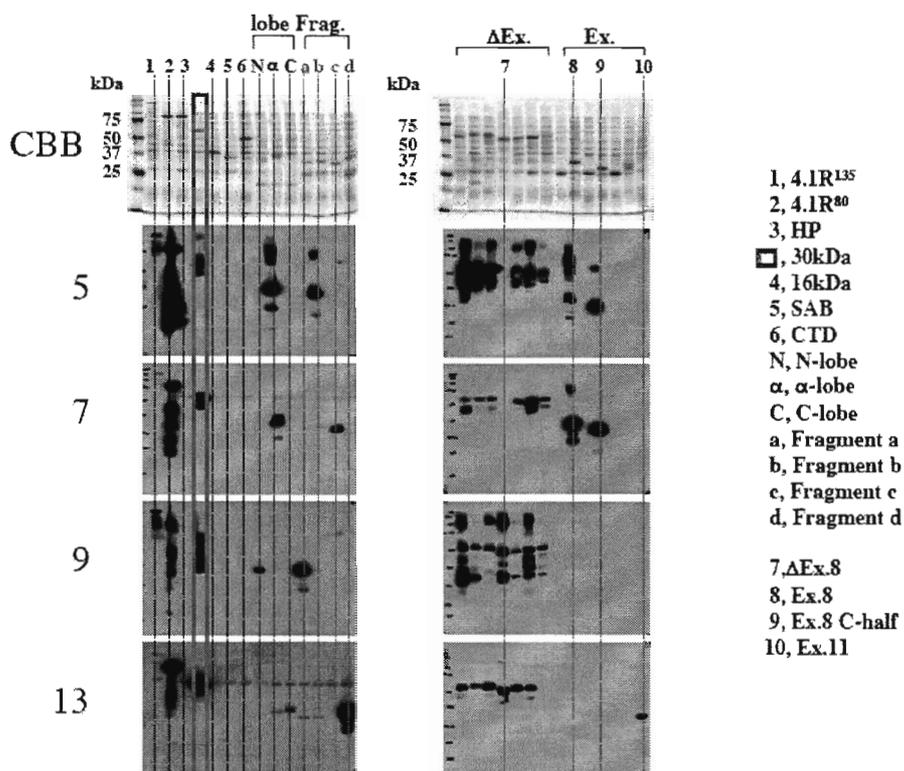


Fig.2A Binding site of mAbs to R30

4.1R の 30kDa FERM domain に反応するクローンを**個得た。図 2A に示したように、4.1R 30kDa FERM domain の部分ポリペプチドを GST 融合蛋白質とし

て発現し、SDS-PAGE 電気泳動後にブロットした。これら全てのクローンの産生する抗体を免疫ブロット法で解析し、反応性の違いから4つのグループに分類された。つまり、3D構造上のN-lobeに反応した、 α -lobeに反応した、C-lobeに反応したに分類し、更に、 α -lobeに反応した中には Fragment b に反応したクローンと Fragment c に反応するクローンに分類され、4種類を得た。夫々の中から任意に一つのクローンを選んだ (#5、#7、#9、#13) (下表に総括)。

4.1

mAb	class	4.1				
		WG	R	G	B	N
5	IgG2a κ	■	■			
7	IgG2b κ	■	■			
9	IgG2b κ					■
13	IgG1 κ	■	■			■

■ positive
WG: white ghost

(単クローン抗体のサブクラス及び4.1蛋白質ファミリーの交差反応性)

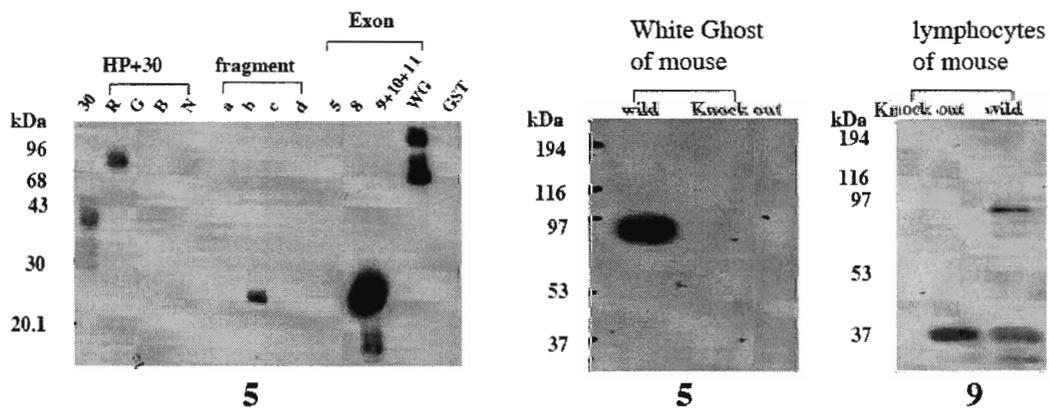


Fig.2B. Cross-reaction of mAbs

図 2B に、#5 抗体の特異性を示した。つまり、#5 抗体は、4.1 ファミリー蛋白質 (G、N、B) の HP 及び FERM domain には反応せず、4.1R のみに反応した。図 2 に示した 30kDa FERM domain の部分ポリペプチドに対しては、Fragment C 及び Exon 8 のコードする領域に対して反応した。また、white ghost (WG) にも反応したが、80kDa 及び 150kDa の 2 本のバンドを検出した。これらは、4.1R⁸⁰ と 4.1R¹³⁵ と思われる。また、4.1R 欠損マウスの赤血球膜には反応しなかった (#5 抗体)。4.1R 欠損マウスのリンパ球には反応しなかった (#9 抗体)。いずれも正常マウス由来の赤血球あるいはリンパ球の 4.1R⁸⁰ を検出した。

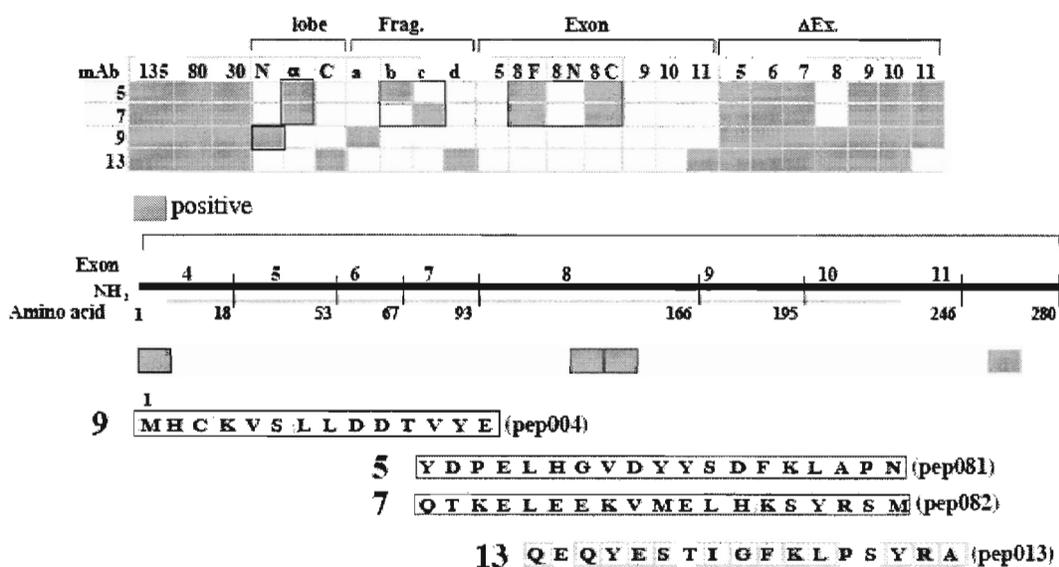


Fig.2C Epitope of 4.1R 30kDa domain recognized by mAbs

次に、4.1R の 30kDa FERM domain をコードする Exon 単位で欠損させたポリペプチドとの反応性から、#5 と #7 は Exon 8 領域、#9 は Exon4 領域、#13 は Exon11 領域のポリペプチドを認識することが明らかになった。各 Exon をコードするポリペプチド及び Exon 8 は N 末端半分と C 末端半分を用意し #5 及び

#7はそれぞれ、Exon 8のC末端半分領域に結合することが明らかになった。各 lobe、4つの Fragments、及び各 Exon の欠損 30kDa FERM domain 及び各 Exon がコードするポリペプチドの反応性から、4種類のクローン（#5、#7、#9、#13）が認識するペプチドを推測した（図5）。#5、#7、#9、#13の認識する抗原ペプチドを図5に示した。これらのペプチドを化学合成した（pep 004、pep 081、pep 082、pep013）。それぞれのN末端部には人工的にシステイン残基を付加し、リシン残基のεアミノ基にコンジュゲーションした。これらのコンジュゲーションを別個にアミノシランキュベットに固相化して各抗体との反応性を反応速度論的に観察した（表1）。4.1R 30kDa FERM domain (30kDa)を陽性対照とした。

Table I. *mAb binding to 30kDa domain of 4.1R*

Analyte	Ligand	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	$K_{(D)}$ (nM)
5	30kDa	$1.8 \pm 0.10 \times 10^5$	$1.0 \pm 0.20 \times 10^{-1}$	56
	pep004	No binding	No binding	No binding
	pep081	$5.3 \pm 0.10 \times 10^4$	$1.1 \pm 0.10 \times 10^{-2}$	207
	pep082	No binding	No binding	No binding
	pep013	No binding	No binding	No binding
7	30kDa	$9.3 \pm 0.20 \times 10^4$	$6.5 \pm 0.10 \times 10^{-3}$	69
	pep004	No binding	No binding	No binding
	pep081	No binding	No binding	No binding
	pep082	$9.3 \pm 0.10 \times 10^4$	$9.8 \pm 0.10 \times 10^{-3}$	105
	pep013	No binding	No binding	No binding
9	30kDa	$6.1 \pm 0.20 \times 10^4$	$9.7 \pm 0.10 \times 10^{-3}$	159
	pep004	$3.5 \pm 0.10 \times 10^5$	$6.0 \pm 0.10 \times 10^{-3}$	17
	pep081	No binding	No binding	No binding
	pep082	No binding	No binding	No binding
	pep013	No binding	No binding	No binding
13	30kDa	$6.1 \pm 0.20 \times 10^4$	$9.7 \pm 0.10 \times 10^{-3}$	24
	pep004	No binding	No binding	No binding
	pep081	No binding	No binding	No binding
	pep082	No binding	No binding	No binding
	pep013	$1.7 \pm 0.10 \times 10^5$	$1.7 \pm 0.10 \times 10^{-2}$	100

Each analyte (5nM to 100 nM) was incubated with the identified ligand immobilized on the aminosilane cuvette. From the binding curves obtained by the resonant mirror detection method, $K_{(D)}$ values were determined using the software package FAST-FIT™.

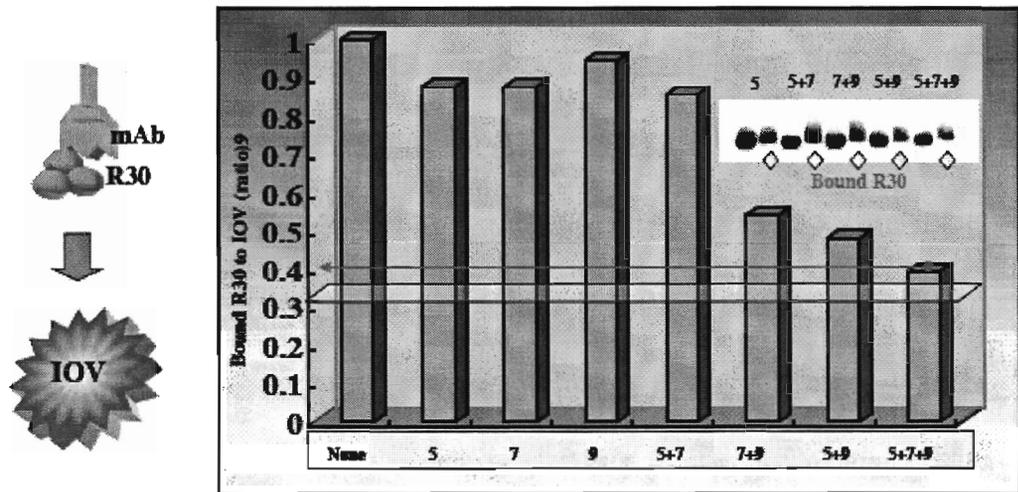
#5、#7、#13抗体は、30kDaと平衡解離定数は、~10nM orderであった。これらの結合速度定数 (k_a) は~ 10^4 s/Mであり、解離速度定数 (k_d) は、~ 10^{-3} 1/s

であったことから、これらの抗体は抗原である 30kDa と結合は相対的に遅いが、同時に解離も遅いことが明らかになった。このことは、抗原抗体複合体の形成に時間がかかるが、一旦形成された複合体は解離し難いことを示している。#9 抗体と 30kDa と結合は他の 3 種類の抗体よりも平衡解離定数が大きかった。これは、解離速度定数が 10^{-2} 1/s と他の抗体よりも大きいことに起因すると考えられた。#5 と #13 抗体とそれぞれの抗原ペプチドとの結合では、30kDa と比較して解離速度定数の増大に伴う平衡解離定数の上昇が観察された。#9 抗体は、抗原ペプチドとの結合の方が 30kDa よりも強く観察された。X 線結晶構造解析の結果では、#9 抗体の認識ペプチド領域は二つの β -sheet 構造が互いに逆方向になる X 字型であることが示された。アミノシランキュベットへの固相化により、この抗原部位が蛋白質内部に織り込んでいることが考えられる。

2. 反転膜小胞を用いた抗体による 30kDa の結合阻害

前項で用意した P-IOV (詳細は第 4-1 項参照)を用いて、これらの抗体と 30kDa の結合への影響を検討した。実験では、抗体は抗原に対して等量混合した後に P-IOV と混合した。前項の結果をもとに P-IOV の総蛋白質量に対して過剰になるように調製した。

P-IOV には膜貫通蛋白質は残っているが、p55 はないので、C-lobe 領域に結合する #13 については検討しなかった。また、4 種類の抗体を混合すると理論値でも 600kDa になり、標的蛋白質である 30kDa の 20 倍相当になるため、#5、#7、#9 について検討した。#9 は N-lobe を認識するが Band3 結合部位を認識す



R30 mixed with 10 times excess mAb(s). The mixture incubated with IOV and then bound R30 were analyzed by SDS-PAGE. Optical density was measured by CCD camera. The binding ratio to control (none) was calculated.

Fig.4. Inhibition of R30 binding to IOV by mAbs

る抗体ではないこと、#5、#7は Exon8 コード領域であることからこれらの抗体による阻害により GPC 結合部位の同定を期待した。#5、#7、#9 単独と 30kDa との複合体は 30kDa 単独と同様に P-IOV に結合した。#5 と #7 の混合でも 30kDa の結合に全く影響はなかったことから、GPC の結合部位は、Exon8 コード領域の中でも N 末端の半分領域に存在することが示唆された。このことは、N 末端を認識する #9 抗体と #5 或は #7 との混合により、30kDa の結合は 40%~50% 減少した。P-IOV には 4.1R の主たる結合部位は Band3 と GPC であり、4.1R とこれらの膜貫通蛋白質との平衡解離定数が同等とすると 50% の結合阻害は、GPC との結合を阻害していることを示唆している。

3. 種間交差性

Table II. *mAb binding to 30kDa domains of 4.1R from 3 species*

Analyte (mAb)	Ligand (30kDa domain)	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
5	Human	$1.8 \pm 0.10 \times 10^5$	$1.0 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	56
	Zebrafish	$5.3 \pm 0.10 \times 10^4$	$1.1 \pm 0.10 \times 10^{-2}$	207
	Fly	$1.6 \pm 0.10 \times 10^6$	$5.8 \pm 0.10 \times 10^{-3}$	3.6
7	Human	$9.3 \pm 0.20 \times 10^4$	$6.5 \pm 0.10 \times 10^{-3}$	69
	Zebrafish	$6.5 \pm 0.20 \times 10^5$	$9.6 \pm 0.20 \times 10^{-3}$	148
	Fly	$2.0 \pm 0.20 \times 10^5$	$1.4 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	70
9	Human	$6.1 \pm 0.20 \times 10^4$	$9.7 \pm 0.10 \times 10^{-3}$	159
	Zebrafish	$1.7 \pm 0.20 \times 10^3$	$4.2 \pm 0.20 \times 10^{-3}$	2348
	Fly	No Binding	No Binding	No Binding
13	Human	$2.8 \pm 0.20 \times 10^5$	$6.7 \pm 0.10 \times 10^{-3}$	24
	Zebrafish	No Binding	No Binding	No Binding
	Fly	$5.0 \pm 0.20 \times 10^4$	$5.0 \pm 0.20 \times 10^{-3}$	100

Each analyte (5nM to 100 nM) was incubated with the identified ligand immobilized on the aminosilane cuvette. From the binding curves obtained by the resonant mirror detection method, K_D values were determined using the software package FAST-Fit™.

4種類の抗体の種間交差性を IAsys を用いて検討した。ヒトとゼブラフィッシュの 4.1R 30kDa FERM domain 及びシヨウジョウバエ (*coracle* 遺伝子産物である Coracle の N 末端 FERM domain 相同領域) をそれぞれ固相化したアミノシランキュベットを用意し、抗体との平衡解離定数を測定した。#5 と #7 は、3種類の 30kDa FERM domain と結合した。#9 は、ゼブラフィッシュの 30kDa FERM domain と反応したが、Coracle と結合しなかった。また、#13 は、ゼブラフィッシュの 30kDa FERM domain と反応しなかったが、Coracle と結合した。興味深い点は、#5 は、ヒト抗原よりも Coracle に対する平衡解離定数が小さい（親和性が高いと同義）ことである。ゼブラフィッシュ及び Coracle の各エピトープのアミノ酸配列を図 7 に示した。#5 の認識エピトープを比較すると（図 7）、極性のあるアミノ酸では 5 番目の L が E に、9 番目の D が R に置換されている。また、ヒトの配列の 3 番の P は、Coracle では 7 番に P がある。こうした置換が抗体と

の親和性を変えている可能性がある。一方、#7抗体の認識するエピトープは、3種の動物で比較的良く保存されており、特に13番目までの配列は、全く性質のことなるアミノ酸は3番目のKのみであった。このことは、#7抗原は、QからHまでの13個の配列であると考えられる(図7)。#9抗体に認識するエピトープの配列19残基では、ヒトとゼブラフィッシュとの間では、8残基(*部分)のみであった。両者の平衡解離定数には約15倍の差があり、これは結合速度定数の差に起因していた。つまり、結合が起り難いことを示している。#13抗体が結合したヒト4.1RおよびCoracleでは、同定された17残基の内、13残基が相同であった。ヒトの13番目から15番目の3残基(P-S-Y)がCoracleでは(A-N-H)に置換されており、平衡解離定数の差、特に結合速度定数による違いはこの3残基に起因すると思われる。#5抗体は、ゼブラフィッシュ及びCoracleの免疫ブロットに使用可能であった。

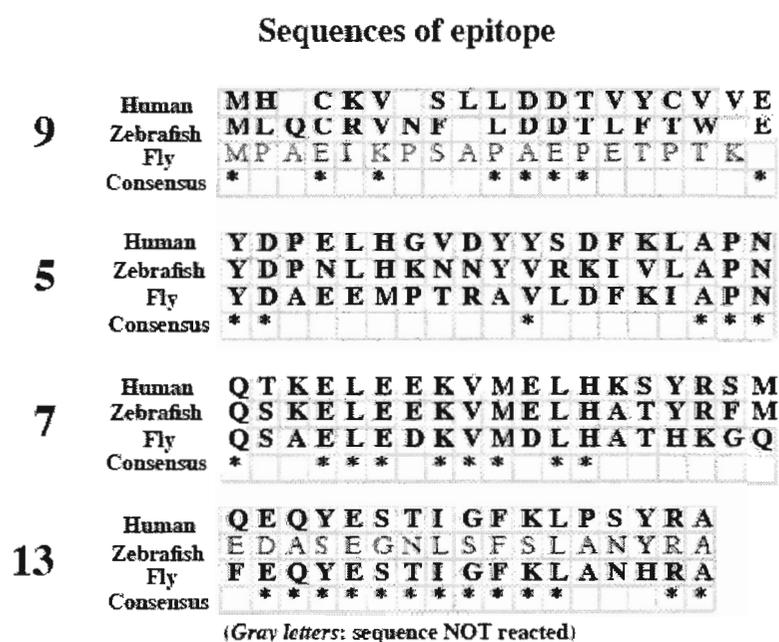
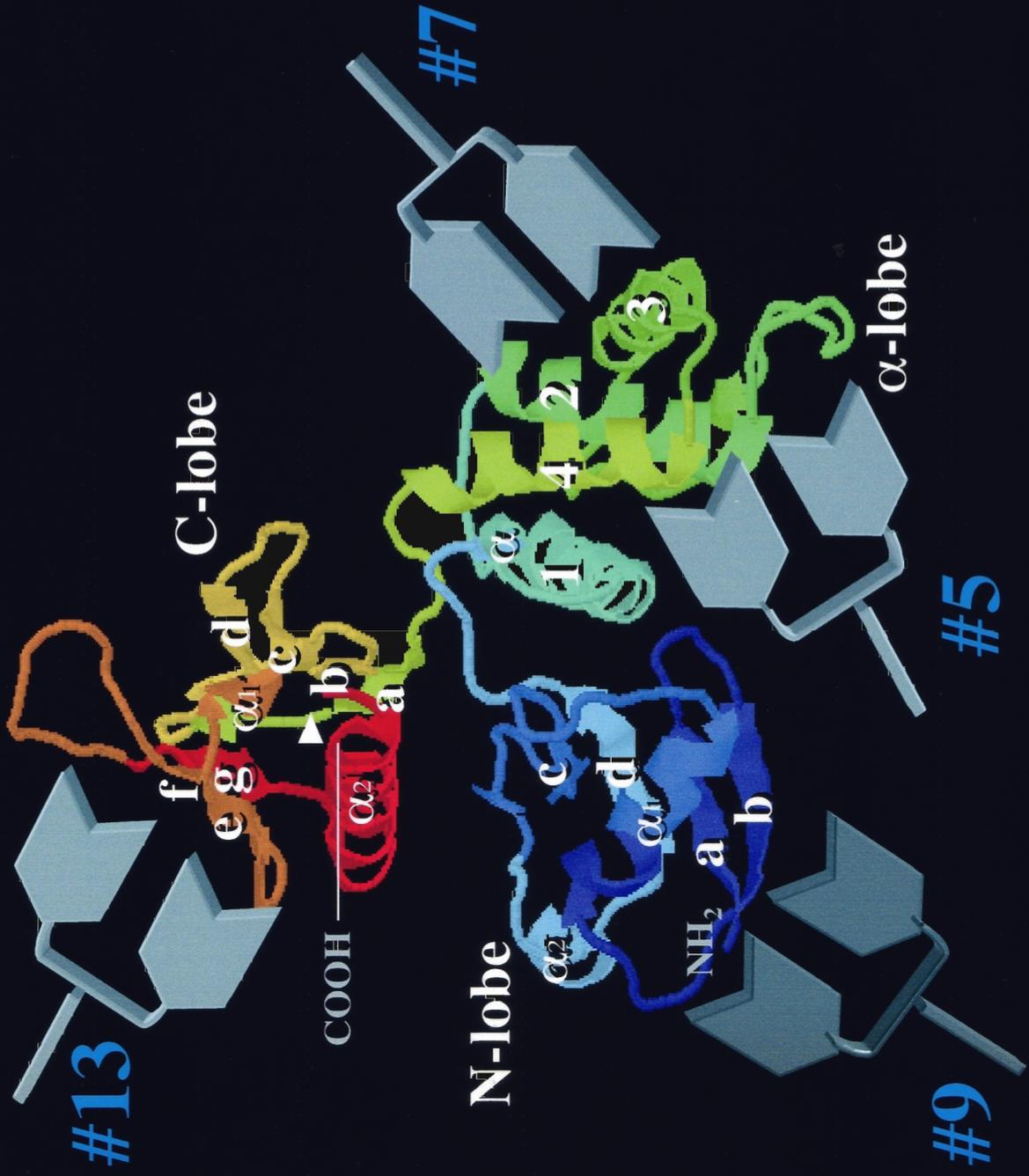


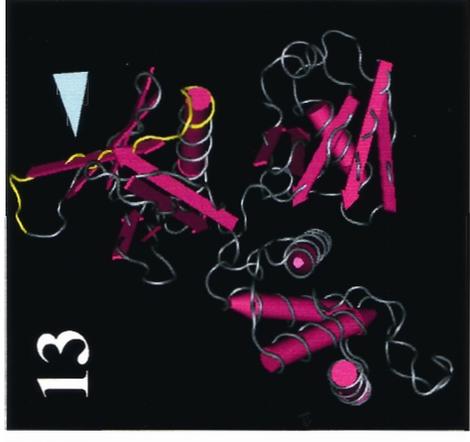
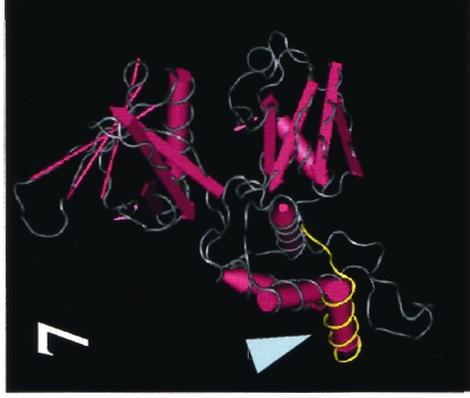
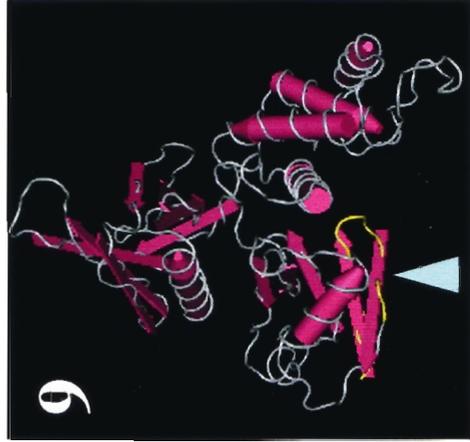
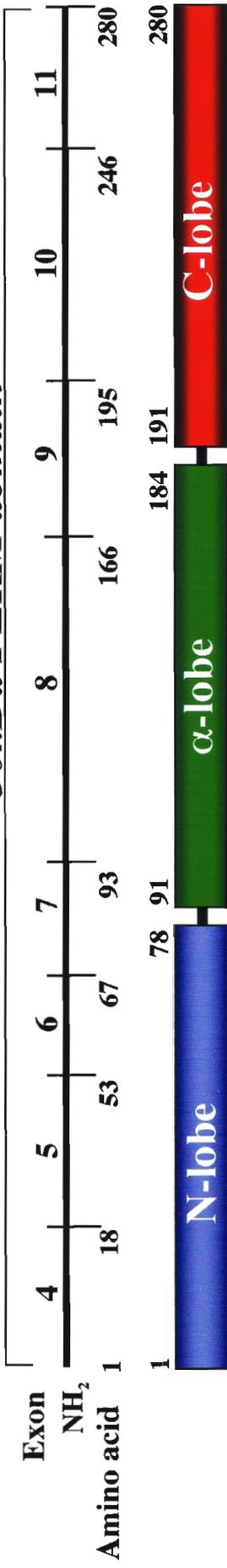
Fig.3. Epitope of 4.1R 30kDa domain recognized by mAbs

Summary-1



Summary-2

30kDa FERM domain



Arrow head indicates the epitope.

4. 応用

#5 抗体は、ヒト赤血球膜のみならずヒト赤芽球、K562、KG1、Jurkat 細胞膜の免疫ブロットに使用可能であった。つまり、80kDa の 4.1R 及び 135kDa の 4.1 を予想された位置（バンド）で検出した。#7 抗体は、しばしば K562、KG1、Jurkat 細胞膜で、80kDa 4.1R よりは少し分子量の小さい抗原を認識した。#9 と #13 抗体は、K562、KG1、Jurkat 細胞膜に 4.1R を検出しないことがあった。一方、共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞免疫染色では非特異的反応が多く、適していなかった。

5. まとめ

Summary 1 及び 2 に単クローン抗体が認識するエピトープマップを示した。立体構造は、PDB 1GG3 から描画した。4 種類の抗体はいずれも 30kDa FERM domain の外表面を認識するが、#9 と #7 は、 β -sheet 構造、#5 は random 構造、#7 は α -helix 構造を認識しており、抗原の構造に共通性はなかった。

立体構造上の 3 つのドメインを各々認識する抗体を得た。ただし、膜貫通蛋白質との結合部位とは異なっていた。

抗体を用いて GPC の結合部位を 80 アミノ酸残基に絞った。

各抗体の免疫ブロットへの応用を検討し、#5 抗体の汎用性を示した。

[参考文献]

- Han, B. G. , Nunomura, W., Takakuwa, Y., Mohandas, N., Jap, B. K., 2000.
Protein 4.1R core domain structure and insights into regulation of
cytoskeletal organization. *Nat. Struct. Biol.* 7, 871-875.
- Hoover, K. B. and Bryant, P. J. 2000. The genetics of the protein 4.1
family: organizers of the membrane and cytoskeleton.
Curr. Opin. Cell Biol. 12, 229-234.
- Jöns, T. and Drenckhahn, D. 1992. Identification of the binding interface
involved in linkage of cytoskeletal protein 4.1 to the erythrocyte anion
exchanger. *EMBO J.* 11, 2863-2867.
- Manno, S., Takakuwa, Y., Mohandas, N., 2005. Modulation of erythrocyte
membrane mechanical function by protein 4.1 Phosphorylation. *J.*
Biol. Chem. 280, 7581-7587.
- Nunomura, W., Takakuwa, Y., Parra, M., Conboy, J. G., Mohandas, N. 2000a.
Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent calmodulin binding sites in erythrocyte
protein 4.1. Implications for regulation of protein 4.1 interactions with
transmembrane proteins.
J. Biol. Chem. 275, 6360-6367.
- Nunomura, W., Takakuwa, Y., Parra, M., Conboy, J. G., Mohandas, N. 2000b.
Regulation of protein 4.1R, p55, and glycophorin C ternary complex in human
erythrocyte membrane.
J. Biol. Chem. 275, 24540-24546.
- Nunomura, W., Takakuwa, Y., 2006. Regulation of protein 4.1R interactions
with membrane proteins by Ca²⁺ and calmodulin. *Front. BioScience.*
11, 1522-1539.

Shafizadeh, E., Paw, B. H., Foott, H., Liao, E. C., Bruce A. Barut, B. A., Cope, J. J., Zon. L.I., Lin, S., 2002. Characterization of zebrafish *merlot/chablis* as non-mammalian vertebrate models for severe congenital anemia due to protein 4.1 deficiency. *Development* 129, 4359-4370.

Ward, R. E., 4th, Schweizer, L., Lamb, R. S., and Fehon, R. G.

The protein 4.1, ezrin, radixin, moesin (FERM) domain of *Drosophila* Coracle, a cytoplasmic component of the septate junction, provides functions essential for embryonic development and imaginal cell proliferation.

Genetics. 2001 159(1): 219-228.