

博士論文

真核細胞の翻訳開始因子に関する研究

指導教官：三浦謹一郎 教授

自然科学研究科化学専攻

三 好 洋

1999年 12月

博士論文

真核細胞の翻訳開始因子に関する研究

指導教官：三浦謹一郎教授

自然科学研究科化学専攻

三好 洋

1999年12月

目次

	<u>序論</u>	1
	<u>本論</u>	9
第一章	<i>Xenopus laevis</i> eIF-4E大量発現系の構築	10
序		11
第一節	大腸菌及び酵母での発現系の検討	14
第一項	大腸菌での発現系の検討	14
第二項	酵母での発現系の検討	23
第二節	バキュロウイルス-昆虫細胞システムによる大量発現系の検討	35
第一項	eIF-4E発現組換えウイルスの調製及び発現条件の検討	35
第二項	eIF-4Eの精製及び確認	45
第三項	eIF-4Eの結晶化の検討	54
まとめ		60
第二章	翻訳調節におけるeIF-4Eと4E-BPとの相互作用の役割	61
序		62
第一節	eIF-4Eと4E-BP2との相互作用の定性的分析	67
第一項	eIF-4E及び4E-BP2の調製	67
第二項	アフィニティーカラムクロマトグラフィーによる分析	74
第三項	GPCによる分析	79
第二節	翻訳開始段階におけるeIF-4Eの速度論的解析	82
第一項	eIF-4Eと4E-BP2との相互作用の速度論的解析	82
第二項	eIF-4Eとキャップアナログとの速度論的解析	88
まとめ		94
	<u>結論</u>	96
試薬溶液		98
実験操作		103
引用文献		112
謝辞		118

略号表

A	alanine,adenine
Amp	ampicillin
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
bp	base pair
BPB	bromophenol blue
BSA	bovine serum albumin
C	cytocine
CBB	Coomassie Brilliant Blue
dNTP	deoxynucleotide 5'-triphosphate
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eIF	eukaryotic initiation factor
4E-BP	eukaryotic initiation factor-4E binding protein
EGF	epidermal growth factor
EtBr	ethidium bromide
G	guanine
GE	gel electrophoresis
GPC	gel permeation chromatography
GST	glutathione S-transferase
GTP	guanosine 5'-triphosphate
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulfonic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
hGH	human growth hormone
IGF-I	insulin-like growth factor I
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
K_{on}	association constant
K_{off}	dissociation constant
MAP	mitogen-activated-protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MBP	maltose binding protein
MCS	multi cloning site
Mnk	MAP kinase-interacting kinase
m^7 GTP	7-methylguanosin 5'-triphosphate
2-ME	2-mercaptoethanol
NBT	nitro blue tetrazolium chloride

ODS	octadecylsilicagel
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
Papb	Poly (A) tail binding protein
PDGF	platelet-derived growth factor
PHAS	phosphorylated heat- and acid-stable protein
PKC	protein kinase C
RNase	ribonuclease
SPR	surface plasmon resonance
S.D.	Shine-Dalgarno
SDS	sodium dodecyl sulfate
T	thymine
TBS	Tris-buffered saline
TEAA	triethylammoniumacetate
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
Tris	tris(hydroxymethyl) aminoethane
U	Uridine
X.C.	xylene cyanol FF
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

アミノ酸略号

A	Alanine	Ala
C	Cysteine	Cys
D	Aspartic acid	Asp
E	Glutamic acid	Glu
F	Phenylalanine	Phe
G	Glycine	Gly
H	Histidine	His
I	Isoleucine	Ile
K	Lysine	Lys
L	Leucine	Leu
M	Methionine	Met
N	Asparagine	Asn
P	Proline	Pro
Q	Glutamine	Gln
R	Arginine	Arg
S	Serine	Ser
T	Threonine	Thr
V	Valine	Val
W	Tryptophane	Trp
Y	Tyrosine	Tyr

この他、略号を表記したものは文章の最初に正式名称を付した。

序論

1. 遺伝情報の翻訳とmRNAのキャップ構造

地球上に生命が誕生して約35億年¹、生命がどの様にして始まったかについては諸説があるが、原始時代の地球では種々の反応によって簡単な有機物が合成されたと考えられる。そして現在、目に見えないような微生物から我々人間まで、多種多様な生命体が地球上には存在している。これらの生物は、単細胞で生命活動を行っているものもあれば、複雑な細胞組織の集合体として生活しているものまで多岐に渡っている。

この生命体の構造単位である細胞は大きく二つに分類される。細菌類に多く見られる核膜を持たない原核細胞と高等生物の組織細胞の様に核膜を持った真核細胞である。原核細胞と真核細胞には核膜の有無以外にも、その生命活動の中心である蛋白質の生合成においてかなりの違いがある。蛋白質の生合成は、細胞内のDNA上の遺伝情報が「セントラルドグマ」と呼ばれる流れ² (図0-1) にしたがってDNAにコピーされる複製、DNA上の遺伝情報がmRNAにコピーされる転写、mRNAの情報に従ってリボソーム上でタンパク質が合成される翻訳の3段階を経て最終的に蛋白質に翻訳されるものである。その中で特に翻訳の過程に注目すると、原核細胞と真核細胞とでは「セントラルドグマ」の中心に位置するmRNAに関しても極めて特徴的な違いが認められる。

mRNA 5'末端に存在するキャップ構造の有無は、原核細胞と真核細胞での翻訳過程における違いの最も大きなものであり、言い換えれば、真核細胞における生命現象を解析していくうえで最も重要な鍵の一つと言ってもよい。まず古市と三浦によって、キャップ構造が7位がメチル化されたグアノシンが5'-5'トリリン酸架橋で結合した構造³ (図0-2) である事が報告され、効率的な翻訳開始に必要な不可欠な構造⁴であり、更には細胞内のRNase(リボ核酸分解酵素)からmRNAを保護する働きも持っている事も明らかとなった^{5,6}。また、Muthukrishnanらや三浦らによってキャップ構造のアナログ(類似体)によりmRNAの翻訳が阻害される^{7,8}事が報告されており、古くより特異的に認識する蛋白質の存在も知られていた⁹。

2. 翻訳開始因子について

Sonenbergらはキャップ構造アナログアフィニティーカラムを用いてウサギの網状赤血球から初めてこの蛋白質の単離に成功し、キャップ結合蛋白質 (Cap Binding Protein, CBP) と名付けた¹⁰。後にこの蛋白質は、真核細胞翻訳開始因子4E (eukaryotic Initiation Factor 4E, eIF-4E) と呼ばれるようになり、他のいくつかの翻訳開始因子やリボソームと共に、真核細胞の翻訳開始過程において、極めて重要な役割をしている事が明らかになった。

また、eIF-4Eと特異的に結合するeIF-4E結合蛋白質 (eukaryotic Initiation Factor 4E Binding Protein, 4E-BP) が単離、同定され、更にインスリンや成長因子などの刺激により活性化するMAP-kinaseによってリン酸化されるPHAS-Iと4E-BPが同一の蛋白質である事も現在までに明らかにされている^{11,12}。

翻訳の制御 (開始及び抑制) はこのeIF-4Eと4E-BPとの複合体の形成及び解離が、直接係わっている。現在、翻訳開始の過程は下記のように考えられている。(図0-3) eIF-4Eと4E-BP複合体の中で4E-BPがMAP-kinaseによりリン酸化されて複合体から解離したeIF-4Eが、その分子内にeIF-4E及びRNAそしてeIF3の結合部位があり、さらにPabp(Poly A binding protein)への結合部位をも有しているeIF-4G¹³と、ATPase活性を持つeIF-4A¹⁴⁻¹⁶と共にeIF-4F複合体を構成する。このeIF-4F複合体がその順序こそ定かではないがキャップ構造を認識し、更にATPase活性依存のRNA helicaseであるeIF-4Bとの相互作用により、mRNAの5' UTR(Untranslated region)の二次構造を巻き戻す。つぎにeIF3や40S開始複合体との相互作用及びスキヤニングにより48S開始複合体が形成され、最終的に80S開始複合体を形成して、ペプチドの伸長が開始する¹⁷。つまり、eIF-4Eと4E-BPとの複合体の形成及び解離こそが引き続く翻訳の制御に直結しているからである。

上述のように、一連の翻訳開始の過程はeIF-4Eのキャップ構造への結合が引き金になっており、さらにeIF-4Eのリン酸化によっても蛋白質の生合成が調節されると事も数多く報告されている¹⁸⁻²⁷。この様に、eIF-4Eは翻訳開始の中心的役割を果たしており、蛋白質

の生合成を調節している重要な因子の一つである²⁸⁻³⁰。しかし、eIF-4Eは一連の翻訳開始因子の中でその存在量が最も少ないと言われており^{31,18}、したがって近年までその機能と構造についてはほとんど解明されていなかった。しかしながら、1997年にeIF-4EのX線結晶構造解析³²及びNMR³³での構造解析が報告されたものの、それはeIF-4Eのアミノ末端が削除された分子での解析や脂質とのミセルになった状態での構造であったりと細胞内での真の姿を100%反映したものとは断定できるものではなかった。

従って、eIF-4Eを中心としてその構造と機能を探る事は、真核生物の翻訳開始機構及び翻訳調節を明らかとする点からも、いまだ残されたきわめて興味深い課題である。

そこで本論文では、真核生物の翻訳開始及び翻訳調節機構の謎を解明することを目的として、次項について研究した結果について記す。

1. eIF-4Eの構造化学的及び速度論的検討が可能な量を得るための、大量発現系の構築及び精製方法の検討
2. 組換えeIF-4Eの物性、同定及びX線結晶構造解析のための結晶化の検討
3. eIF-4Eと4E-BP2との相互作用の分析
4. eIF-4Eと4E-BP2及びキャップアナログとの相互作用の速度論的解析

本研究は上述の視点に立って、学習院大学理学部生命分子科学研究所においてクローニングされたアフリカツメガエル *Xenopus laevis* のeIF-4E遺伝子 (図0-4、図0-5)³⁴ について、第一章で大量発現系の検討と精製及び同定、更に得られた組換えeIF-4Eの結晶化について記述し、結果より詳細に考察をした。ここで記述したバキュロウイルスー昆虫細胞システムでのeIF-4Eの大量発現は、本研究で初めて確立されたものである。次に第二章では、組換えeIF-4Eとキャップアナログ及び4E-BP2との相互作用をまず定性的に、さらにSPR (Surface Plasmon Resonance) を用いて速度論的に解析し、その結果より真核生物の翻訳開始及び翻訳調節機構を考察した。SPRを用いた翻訳開始因子の速度論的解析についても本論文が初めての報告であり、eIF-4Eとキャップアナログ及び4E-BPとの相互作用を同条件で比較検討した報告も本研究が初めてである。

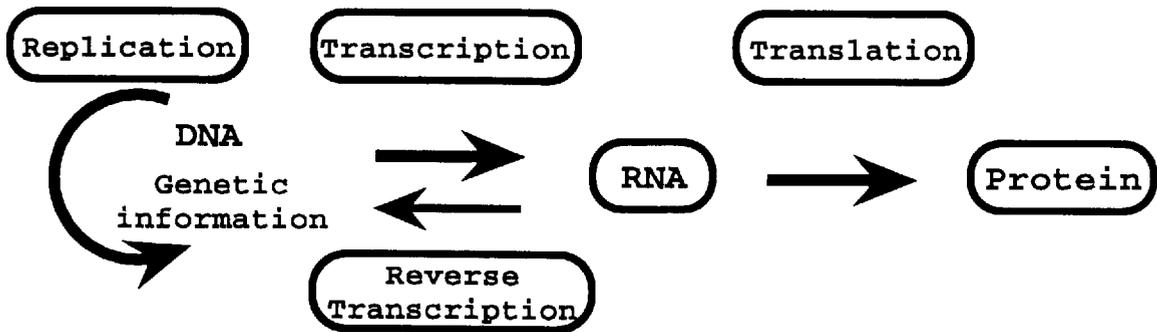


図0-1 セントラルドグマ

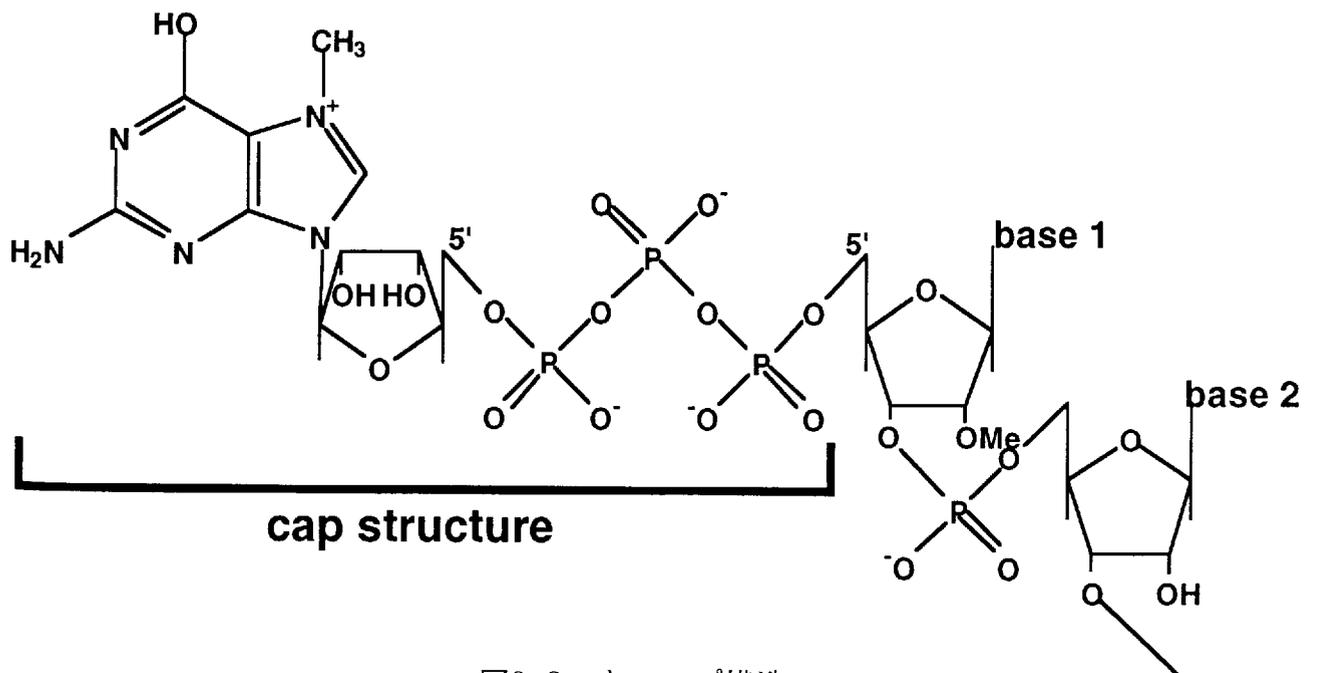


図0-2 キャップ構造

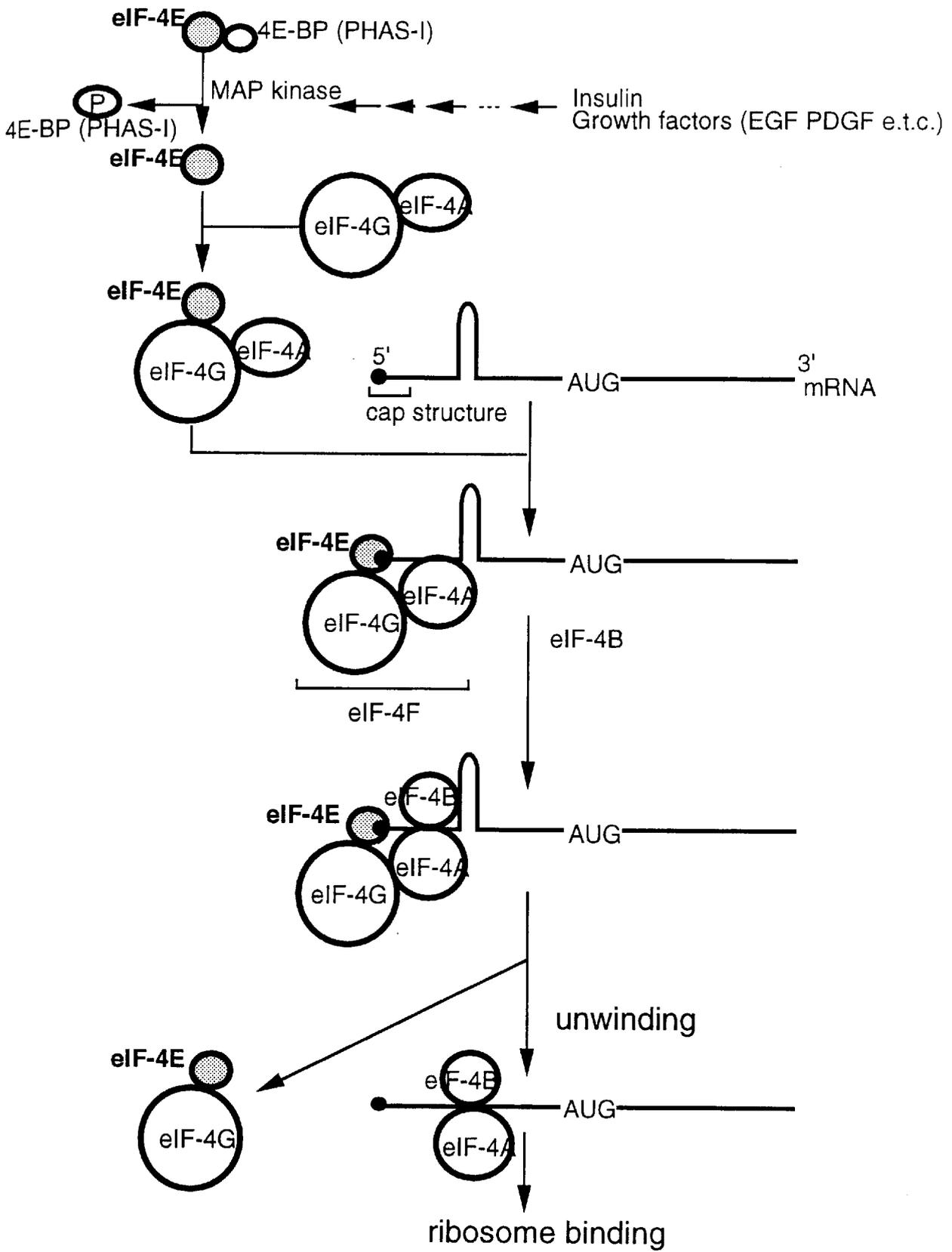


図0-3 真核細胞の翻訳開始反応

atggcgccgtggaaccggaaaacaccaatccccaatct
 M A A V E P E N T N P Q S
 acggaagaggaaaaagaaactggtcaggagattgtaagc
 T E E E K E T G Q E I V S
 cccgatcagtacattaagcatccactacagaacagatgg
 P D Q Y I K H P L Q N R W
 gccctttggttcttcaaaaacgataaaagcaaaacttgg
 A L W F F K N D K S K T W
 caggctaattctgcgcctcatttcaaaatttgatacagtt
 Q A N L R L I S K F D T V
 gaagatttttggggcgctttacaatcatatccagttgtct
 E D F W A L Y N H I Q L S
 agtaacttaatgtccggatgtgactattcactctttaag
 S N L M S G C D Y S L F K
 gatgggattgagcctatgtgggaagatgaaaagaacaag
 D G I E P M W E D E K N K
 cgtggaggtagatggctaatacactaaacaaacagcag
 R G G R W L I T L N K Q Q
 agaagaaatgatttagatcgtttttggctagagacgctc
 R R N D L D R F W L E T L
 atgtgccttattggagagtcctttgatgaacatagcgac
 M C L I G E S F D E H S D
 gatgtatgtggcgcagttgtaaattgtagagcaaaagg
 D V C G A V V N V R A K G
 gataaaatagcaatctggactactgaatttgaaaacaag
 D K I A I W T T E F E N K
 gatgctgttacacatataggagggtttacaaagaaaga
 D A V T H I G R V Y K E R
 ttaggacttcctgcaaaggtagtgattggttatcagtcc
 L G L P A K V V I G Y Q S
 catgcagacacagctaccaagagcggctccactactaaa
 H A D T A T K S G S T T K
 aatcgatttgttgttta
 N R F V V *

図0-4 eIF-4Eの遺伝子及びアミノ酸配列

本論

第一章

Xenopus laevis eIF-4E大量発現系の構築

序

真核細胞の翻訳開始の調節は多くの翻訳開始因子によって高度に制御されており、まだ完全に解明されていないが、現在は図1-1³⁵に示した経路で行われているとの考えが主流である。この中の一つである翻訳開始因子eIF-4Eは、mRNAの5'末端に存在するキャップ構造 (m⁷GpppN、NはA,G,CまたはU) を特異的に認識し結合するが、実際の翻訳過程においてはeIF-4A、eIF-4Gと共にeIF-4F複合体を形成し、mRNAのキャップ構造に結合して蛋白質合成の調節で極めて重要な役割を果たしており、したがってeIF-4Eは真核細胞の蛋白質合成におけるトリガー蛋白といっても過言ではない。

eIF-4EのmRNAのキャップ構造に対する親和性は、哺乳類の例においてinsulin、growth factor等の細胞膜上レセプターの刺激による細胞内リン酸化を介したシグナル伝達により、PKC(protein kinase C)又はMAPK(mitogen-activated-protein kinase)カスケードの末端に存在するMnk 1,Mnk 2 (MAP kinase-interacting kinase)によりリン酸化されると報告されているが^{25,36}、その詳細は明らかではない。また、eIF-4Eのリン酸化部位は209番目セリン(Ser209)であり^{26,37,38}リン酸化eIF-4Eのキャップ構造との会合定数は非リン酸化eIF-4Eに比べて4~5倍大きいとの報告³⁹もある。更に、eIF-4Eの活性(リン酸化)が過剰な状態になると細胞中での蛋白質合成が異常に増加する⁴⁰など、我々生物にとっては致命的な現象が起こることも報告されているが、その生化学的意義は未だに完全には解明されていない⁴¹。それゆえにeIF-4Eの構造と細胞内での生理的な機能との関係を解析することは非常に重要な課題である。

しかしながらeIF-4Eはその性質上、細胞内のごく微量(1分子/3-10 ribosomes)³¹にしか存在しないために、生理的な機能との関係を解析するためにはまず遺伝子工学的手法による大量発現の系を確立する必要がある。

そこで第一章では、学習院大学生命分子科学研究所においてクローニングされた*Xenopus laevis* eIF-4Eについて、1) 遺伝子工学的発現系として世界中で最も多く使用されている大腸菌の系、2) 真核生物であり、遺伝学的に詳しく研究されている酵母の系、

3) 真核生物由来の蛋白質をその生物学的特性を保持して発現する可能性の高いバキュロウイルスー昆虫細胞の系、以上3つの系による大量発現の検討を行ない、発現に成功した組換えeIF-4Eの精製と同定、さらにはX線構造解析のための結晶化を検討した。その結果及び考察した。

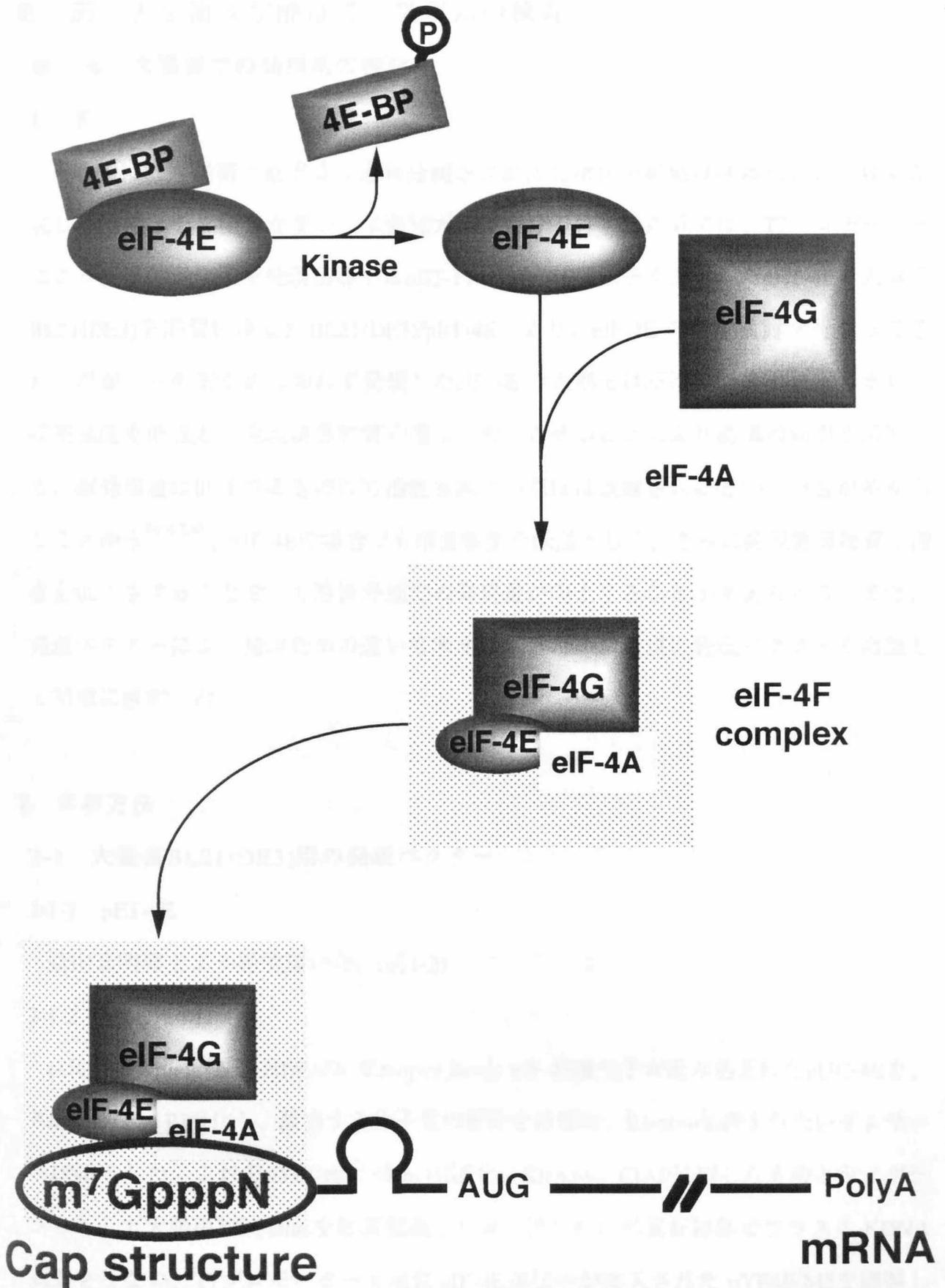


図1-1 真核細胞の翻訳開始調節

第一節 大腸菌及び酵母での発現系の検討

第一項 大腸菌での発現系の検討

1 序

一般的に、大腸菌で効率よく過剰発現された異種遺伝子産物は菌体内に封入体を形成し不溶性となる場合が多い。学習院大学生命分子科学研究所では、T7プロモーターにより、目的遺伝子を発現誘導するpET-11dにeIF-4E遺伝子を挿入したpET-4Eで大腸菌BL21(DE3)を形質転換したBL21(DE3)/pET-4Eにより、eIF-4Eの発現検討を行ってきた。だが、一般的な例に漏れず発現したeIF-4Eの大部分は不溶性であった。しかし、培養温度を低温とし発現誘導物質の濃度を低下させることにより誘導の効率を抑制して、総発現量は低下するものの可溶性分画での回収は改善されるという報告が多々あることから^{39,42,43}、eIF-4Eの場合でも培養温度を低温として、さらに発現誘導物質の濃度を低下させることで、可溶性分画での発現量が向上することが考えられる。また、発現ベクターによる発現効率の違いも考えられるため、新規に発現ベクターを調製して同様に検討した。

2 実験方法

2-1 大腸菌BL21(DE3)用の発現ベクター

2-1-1 pET-4E

脇山素明博士より提供頂いた。(図1-2)

2-1-2 pYE4E-M2

pUC18のKpn I、Bam HI部位に*Xenopus laevis* eIF-4E遺伝子が組み込まれたpUC-4Eを、Bam HI、Eco RI消化し、該当する分子量の断片を精製後、Klenow処理を行ないインサートDNAとした。これをpYEUra3のBam HI消化、Klenow、CIAP処理したものとライゲーションして大腸菌XL-I Blueを形質転換した後、得られた形質転換体でプラスミドDNA調製を行ない、T7プロモーター下流にeIF-4E遺伝子が挿入されたpYE4E-M2を調製した。(図1-3)

2-2 大腸菌BL21(DE3)によるeIF-4E発現の検討

2-2-1 BL21(DE3)/pET-4E：培養温度20℃での検討

プラスミドpET-4Eにより、蛋白質発現用の大腸菌BL21(DE3)を形質転換した。得られた形質転換体をLB/Amp液体培地3mlに植菌し、37℃、12時間培養後、その1mlを100mlのLB/Ampに植え継ぎ、20℃で $OD_{600}=0.5$ まで培養した。ここで終濃度 $20\mu\text{M}$ でIPTGを添加して蛋白質発現誘導を行ない、この時点から0、3.5、13、17、23時間経過後にサンプリングした。

2-2-2 BL21(DE3)/pYE4E-M2：培養温度20℃での検討

プラスミドpYE4E-M2により、蛋白質発現用の大腸菌BL21(DE3)を形質転換して以後2-2-1と同様に蛋白質発現誘導までを行ない、誘導時から0、7、16.5、20.5、26.5時間経過後にサンプリングした。

2-2-3 BL21(DE3)/pET-4E：培養温度15℃での検討

プラスミドpET-4Eにより、蛋白質発現用の大腸菌BL21(DE3)を形質転換した。得られた形質転換体をLB/Amp液体培地3mlに植菌し、37℃、12時間培養後、その1mlを100mlのLB/Ampに植え継ぎ、15℃で3時間培養した。ここで終濃度 $20\mu\text{M}$ となるようにIPTGを添加して蛋白質発現誘導を行ない、16時間培養後サンプリングした。

2-2-4 BL21(DE3)/pYE4E-M2：培養温度37℃での検討

プラスミドpYE4E-M2により、蛋白質発現用の大腸菌BL21(DE3)を形質転換して2-2-1と同様に37℃で蛋白質発現誘導までを行ない、誘導時からさらに14時間培養してサンプリングした。

上記より得られた各サンプルを遠心分離によって集菌し、超音波破碎後、可溶性分画と不溶性分画に分離し、SDS-PAGE、eIF-4E抗血清によるウエスタンブロットで分析した。実験操作の詳細を図1-4に記した。

3 実験結果

3-1 BL21(DE3)/pET-4E：培養温度20℃での検討

SDS-PAGEにより、不溶性分画にのみeIF-4Eが発現していることが確認できた。データは省略した。

3-2 BL21(DE3)/pYE4E-M2：培養温度20℃での検討

SDS-PAGEにより、可溶性及び不溶性分画共にeIF-4Eの発現は確認できなかった。データは省略した。

3-3 BL21(DE3)/pET-4E：培養温度15℃での検討

SDS-PAGE及びウエスタンブロットにより、不溶性分画にだけeIF-4Eが発現していることを確認した。(図1-5)

3-4 BL21(DE3)/pYE4E-M2：培養温度37℃での検討

SDS-PAGE及びウエスタンブロットにより、可溶性及び不溶性分画ともに、eIF-4Eが発現していることが確認できたが、可溶性分画の発現量に関してはウエスタンブロットで確認できる程度であった。(図1-5)

4 考察

20℃の培養温度では、BL21(DE3)/pET-4Eは不溶性分画での発現のみで、またBL21(DE3)/pYE4E-M2は不溶性、可溶性分画共に発現の確認はできなかった。このBL21(DE3)/pET-4Eの結果については終濃度20 μ MのIPTGにおいても誘導の効率が過剰であったためであろう。BL21(DE3)/pYE4E-M2については終濃度20 μ MのIPTGでは誘導の効率が低すぎたために、不溶性、可溶性分画共に発現しなかったと判断した。

そこで、BL21(DE3)/pET-4Eについては、さらに誘導の効率を抑えるために、IPTGは同濃度、培養温度15℃で、BL21(DE3)/pYE4E-M2についてはIPTGは同濃度、培養温度37℃で検討を行なった。

その結果、BL21(DE3)/pET-4Eでは15℃の培養温度でさえも発現は不溶性分画にだけで、さらには生育速度は著しく低下した。また、BL21(DE3)/pYE4E-M2では培養温度37℃で効率は芳しくはないもののようやく可溶性分画にeIF-4Eの発現を確認した。

このpET-4EとpYE4E-M2での発現効率の差は、SD配列から翻訳開始コドンまでの塩基数によるものであろう。pYE4E-M2では、pET-4EよりもSD配列から翻訳開始コドンまでの塩基数が多く、そのためにBL21(DE3)/pYE4E-M2では翻訳効率がBL21(DE3)/pET-4Eよりも抑制され、可溶性分画に発現することが可能になったと考えられる。(図1-6)

しかしながらその発現量は、可溶性分画にはウエスタンブロットで確認できる程度のものであったため、生理的な機能との関係を解析するためには、大腸菌での発現系は不十分であると判断した。

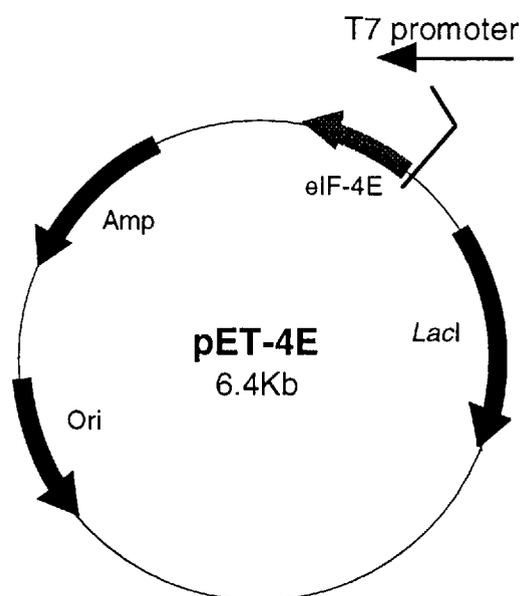


图1-2 pET-4E

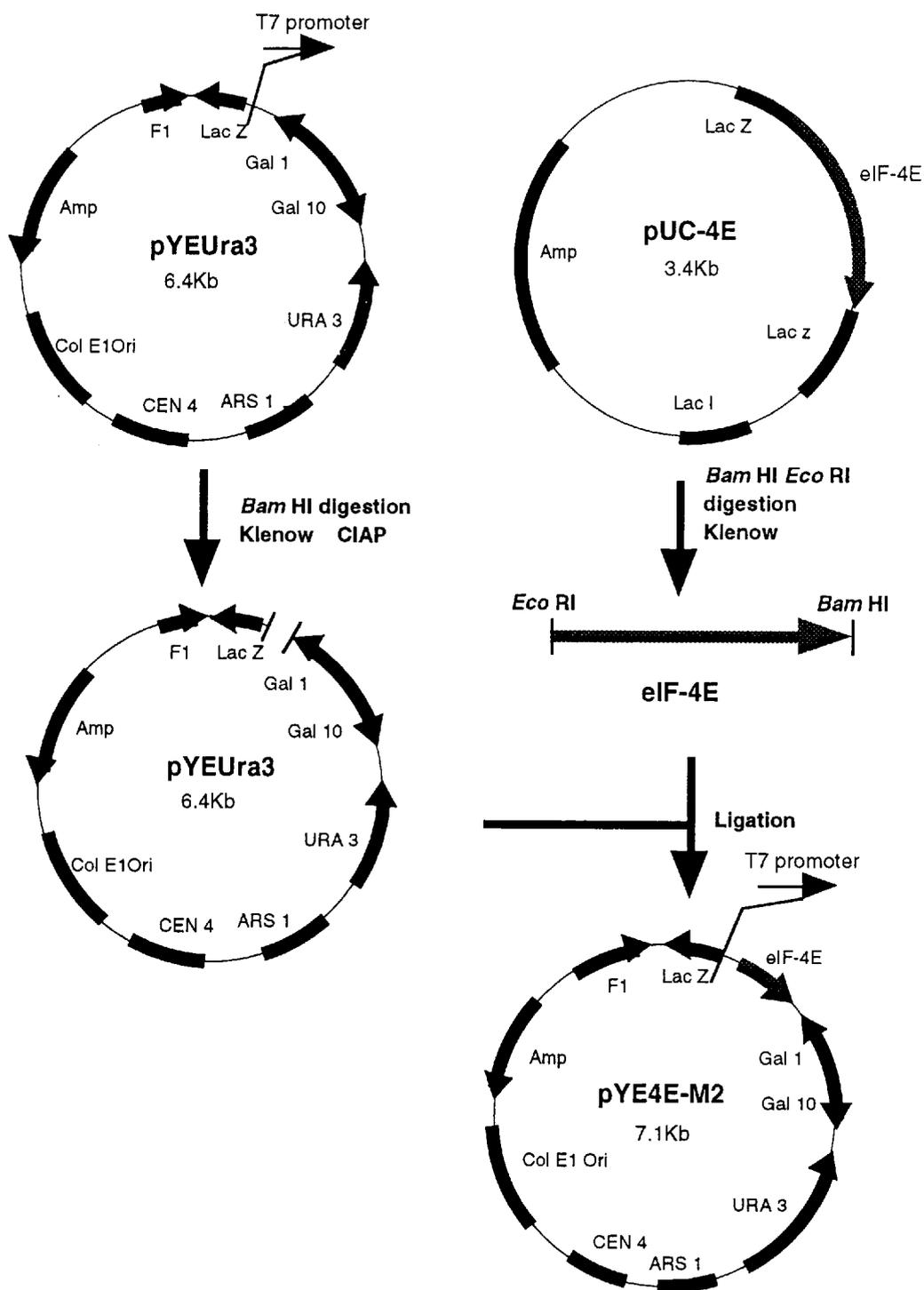


図1-3 pYE4E-M2の調製

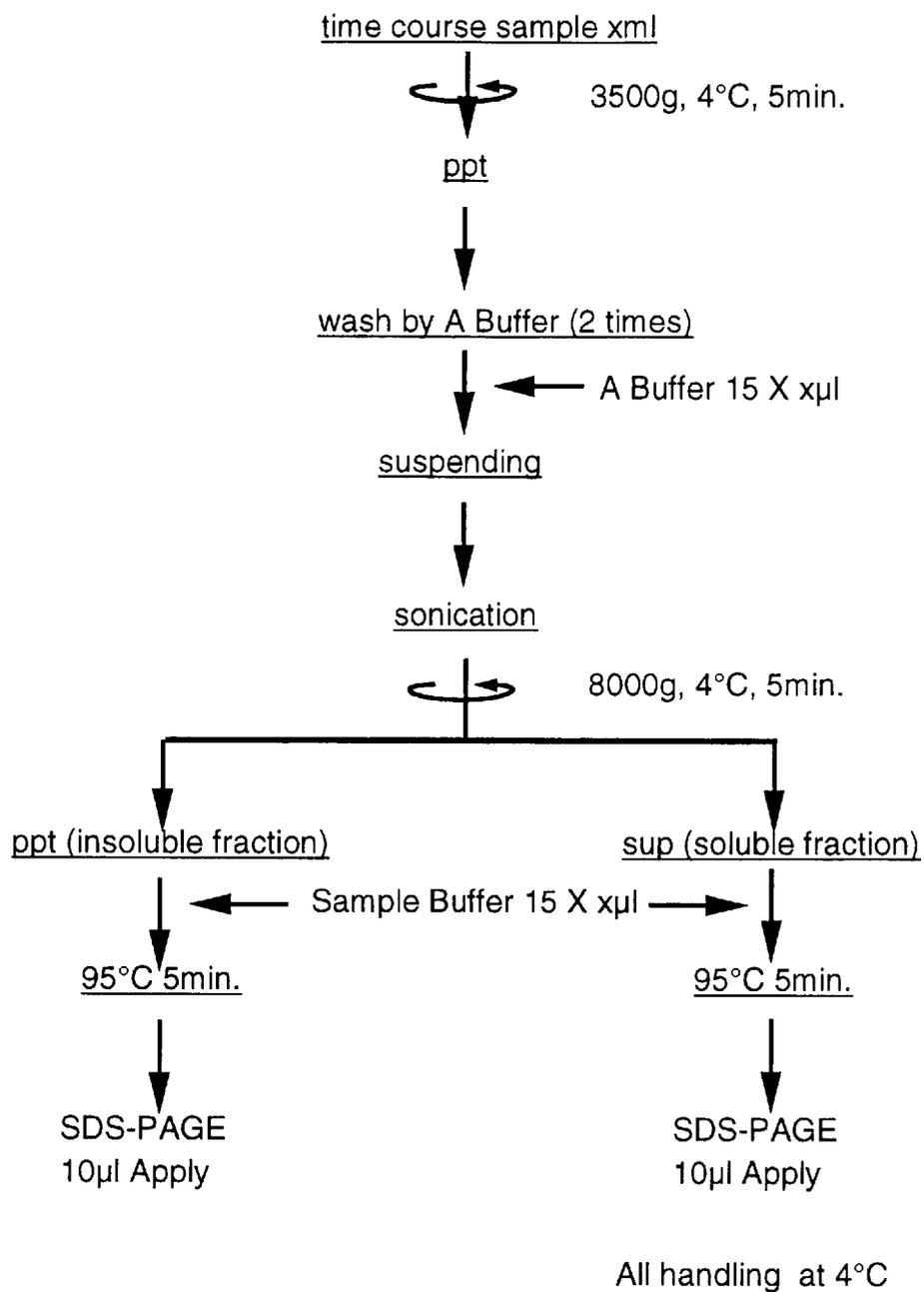


図1-4 大腸菌のサンプル調製

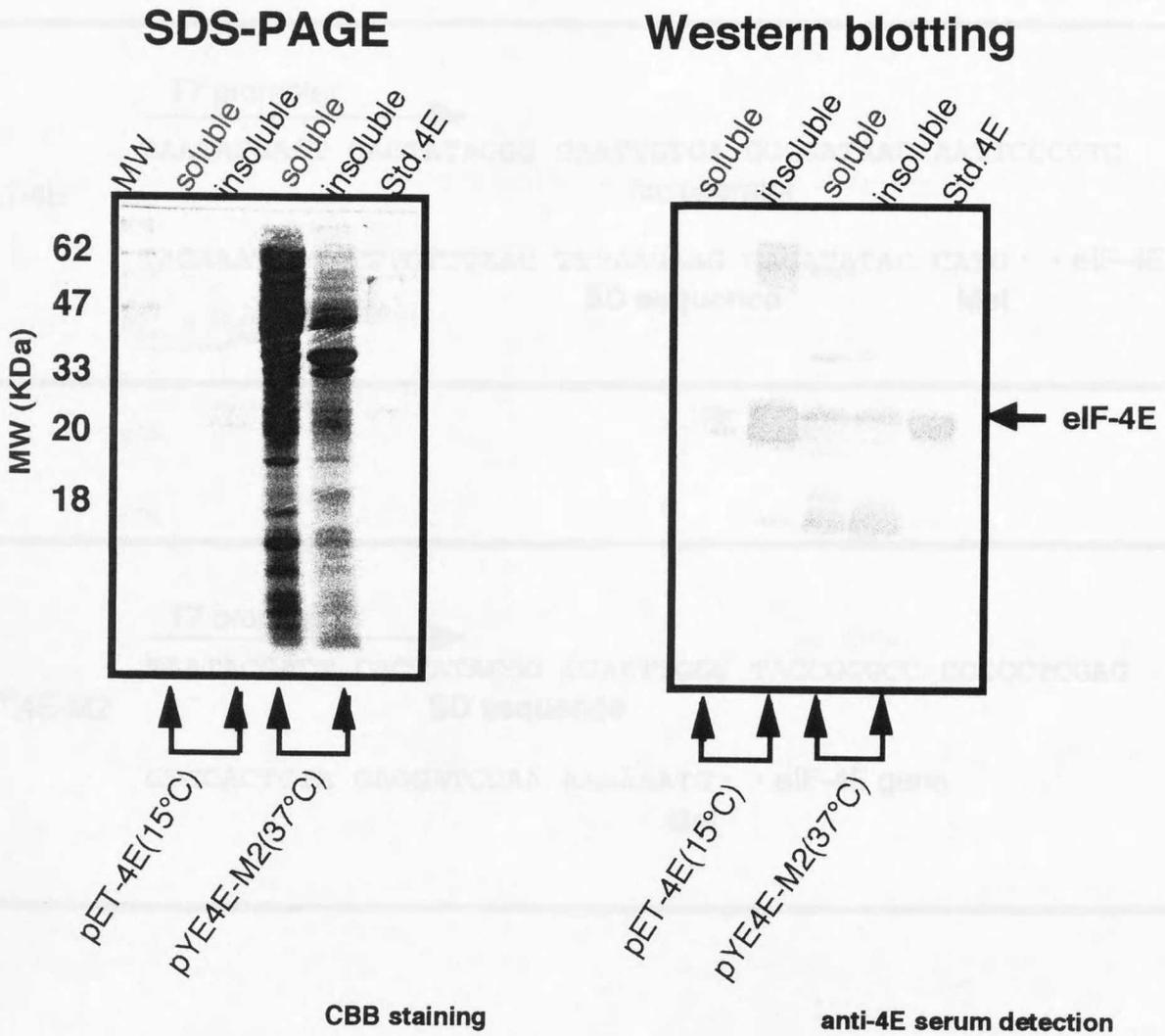


図1-5 eIF-4Eの発現結果

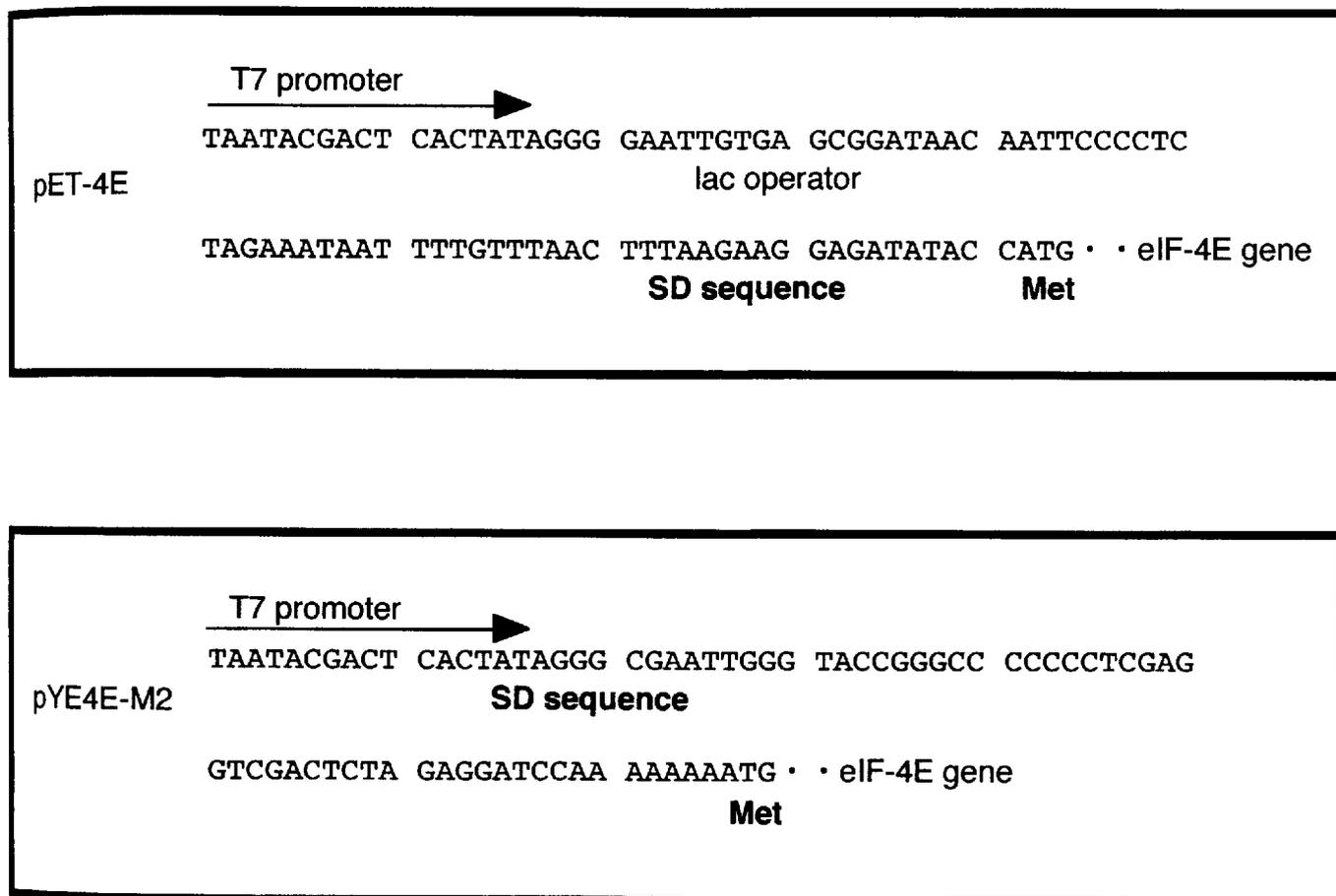


図1-6 pET-4E、pYE4E-M2の塩基配列比較

第二項 酵母での発現系の検討

1 序

第一項の大腸菌での検討において、可溶性分画に大量発現はできなかった。そこで、真核生物である出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)を利用したeIF-4Eの発現系を検討することにした。酵母の系を選択した理由として、遺伝子的知見が豊富であり大腸菌と同様に安価に培養できること、発現した外来遺伝子産物が可溶性である場合が多いこと⁴⁴、さらには発現産物のリン酸化等の修飾が期待できること等が挙げられる。また、将来的には高等真核生物のモデルとして利用することも可能であり、eIF-4Eを含めた細胞内シグナル伝達に関する研究にまで発展が可能と判断したためである。

本項では種々の酵母用のeIF-4E発現ベクターを構築し、それらで形質転換した出芽酵母によるeIF-4Eの発現の検討について記述した。

2 実験方法

2-1 *S.cerevisiae*(AB1380)用の発現ベクターの構築

2-1-1 pYE4E-M1の構築

pUC18のKpnI、BamHI部位に*Xenopus laevis* eIF-4Eの遺伝子が組み込まれたpUC-4Eを、BamHI、EcoRI消化し、該当する分子量の断片を精製後、Klenow処理してインサートDNAとした。これを、大腸菌と酵母のシャトルベクターであるpYEUra3のBamHI消化、Klenow、CIAP処理物とライゲーションして大腸菌XL-1 Blueを形質転換した後、得られた形質転換体でプラスミドDNA調製して、Gal1プロモーター下流にeIF-4E遺伝子が挿入されたpYE4E-M1を得た。(図1-7)

つぎに、*Xenopus laevis* eIF-4E遺伝子を酵母*S.cerevisiae*のコードン使用頻度(図1-8,1-9)にあわせて至適化するために、SOE (Splicing Overlap Extention) 法で変異を導入して、発現にとって重要とされているアミノ末端から2残基目と、使用頻度の低いコードンが唯一3つ連続している56、57、58残基目のコードンが至適化されるように構築した。

2-1-2 pYE4E-I1の構築

pTZ18Uの *EcoRI*、*BamHI* 部位に *Xenopus laevis* eIF-4E 遺伝子が組み込まれた pTZ18U-4E を鋳型としてプライマー 5SCBAM、MIYO で 5' 端の 1stPCR を、同様にプライマー MIYOI、4E31XB で 3' 端の 1stPCR を行なった。次に、2種の 1stPCR 産物を鋳型としてプライマー 5SCBAM、4E31XB で 2ndPCR を行ない、得られた産物を *BamHI* 消化して該当する分子量の断片を精製したものをインサートDNAとした。これを pYEUra3 の *BamHI* 消化、CIAP 処理物とライゲーションして大腸菌 XL-1 Blue を形質転換した。得られた形質転換体でプラスミドDNA調製して、Gal 1 プロモーター下流に eIF-4E 遺伝子が挿入された pYE4E-I1 を得た。なお、このベクターはコドン使用頻度の至適化のほかに、5' UTR に A が連なり翻訳開始領域が酵母にとってに至適になるように設計した。

(図1-10)

2-1-3 pYE4E-I2の構築

UDP-ガラクトースエピメラーゼとの融合蛋白質として eIF-4E を発現させるために pYE4E-I2 を下記のように調製した。

pTZ18Uの *EcoRI*、*BamHI* 部位に *Xenopus laevis* eIF-4E が組み込まれた pTZ18U-4E を鋳型としてプライマー 5SCECO、MIYOII で 5' 端の 1stPCR を、同様にプライマー MIYOI、3SCECO で 3' 端の 1stPCR を行なった。次に、2種の 1stPCR 産物を鋳型として、プライマー 5SCECO、3SCECO で 2ndPCR を行ない、得られた産物を *BamHI* 消化、該当する分子量の断片を精製したものをインサートDNAとした。これを pYEUra3 の *EcoRI* 消化、CIAP 処理物とライゲーションして大腸菌 XL-1 Blue を形質転換した。得られた形質転換体でプラスミドDNA調製して、Gal 10 プロモーター下流に eIF-4E 遺伝子が挿入された pYE4E-I2 を得た。なお、このベクターはコドン使用頻度の最適化の他に、Factor Xa によって切断可能な様に融合蛋白質として設計した。(図1-10)

2-2 発現ベクターによる *S.cerevisiae*(AB1380)の形質転換

2-1で調製したベクターにより *S.cerevisiae*(AB1380) を形質転換した。形質転換は電気穿孔法(図1-11)で行ない、ウラシル合成培地(20mg/ml Glucose) プレートで形質転換体を

選択した。

2-3 eIF-4E遺伝子挿入の確認

形質転換体のプラスミド中のeIF-4E遺伝子を確認をコロニーPCRで行なった。ここで電気泳動により該当する分子量のバンドが確認できたコロニーをeIF-4E遺伝子含有の形質転換体と判断して、2-4以降の発現検討に使用した。

2-4 eIF-4E遺伝子発現の検討

eIF-4E遺伝子含有の形質転換体をウラシル合成培地(20mg/ml Glucose)5mlに植菌し、30℃で12時間培養した。その培養液1mlを100mlのウラシル合成培地(20mg/ml Glucose)に植え継いで30℃でOD₆₀₀=0.5まで培養後、遠心分離により菌体を回収してウラシル合成培地(20mg/ml Galactose)で洗浄し、100mlのウラシル合成培地(20mg/ml Galactose)に懸濁して発現誘導を行なって、さらに30℃で培養した。植え継いだ時点から定期的にサンプリングし、*S.cerevisiae*/pYE4E-M1については、ガラスビーズ法で可溶性、不溶性分画に分離後、可溶性分画をSDS-PAGEにより検討した。(図1-12) またその他の形質転換体については、可溶性、不溶性分画に分離せず、そのままSDS-PAGE及びウエスタンプロットにより分析した。(図1-13)

3 実験結果

3-1 *S.cerevisiae*(AB1380)の形質転換

電気穿孔法によって、調製した発現用ベクターによる形質転換に成功し、ウラシル合成培地(20mg/ml Glucose)プレートで生育してきた*S.cerevisiae* (AB1380)の形質転換体を得ることができた。

3-2 eIF-4E遺伝子挿入の確認

形質転換体のプラスミド中のeIF-4E遺伝子確認のためにコロニーPCRを行なった結果、全種類プラスミドによる形質転換体においてeIF-4E遺伝子の挿入が確認できた。

3-3 eIF-4E遺伝子発現の検討

S.cerevisiae/pYE4E-M1について、若干量のeIF-4Eの発現がeIF-4E抗血清によるウエス

タンブロットにより確認されたが、その他の形質転換体に関しては、SDS-PAGE及びウエスタンブロットによってもeIF-4Eの発現は確認できなかった。データは省略した。

4 考察

S.cerevisiae/pYE4E-M1により、若干量のeIF-4Eの発現が確認できたものの、コドン使用頻度及び翻訳開始領域を改良した*S.cerevisiae*/pYE4E-I1ではeIF-4Eの発現しなかった。また、コドン使用頻度を改良してeIF-4EをUDP-ガラクトースエピメラーゼとの融合蛋白質とした、*S.cerevisiae*/pYE4E-I2についてもeIF-4Eの発現はしなかった。その理由について考察した。

4-1 培養中の形質転換体からの発現用ベクターの脱落

まず、ウラシル合成培地(20mg/ml Glucose)の培養中にベクターが脱落したために、eIF-4Eが発現しなかった可能性について考えると、酵母の成育状況は図1-14のような曲線を描いた。成育曲線の変化より②の領域でベクターの脱落した可能性が考えられた。ウラシル合成培地は栄養要求性の選択培地であるが、成育した酵母自身の抽出液によって選択培地の栄養要求性を回避出来る可能性が考えられた。そこで①と③の時点の同容量の培養液を、ウラシル合成培地(20mg/ml Glucose)プレートに塗布した結果、成育したコロニー数の差は予想された数と違いはなく、ベクターの脱落の可能性は否定された。よって、発現ベクターのURA3遺伝子は機能していると判断した。

4-2 発現蛋白質 (eIF-4E) の毒性

つぎに発現蛋白質であるeIF-4Eの酵母に対する毒性の影響を検討した。図1-14の成長曲線を見ると誘導後に酵母の生育が一時停止したが、対照実験であるeIF-4E遺伝子が挿入されていない*S.cerevisiae*/pYEUra3の場合でも、図1-14をみると他の形質転換体と成長曲線に変化がなかった。さらに、誘導後2、3時間の酵母内でのeIF-4Eの発現について、SDS-PAGE及びウエスタンブロットにより調査したが、発現は確認できなかった。上述のことからeIF-4Eの毒性の影響ではないと判断した。

4-3 プロモーターの機能について

最後にプロモーターが有効に機能しているかを *S.cerevisiae*/pYEUra3中の蛋白質を SDS-PAGEにより分析した。pYEUra3のGal10下流には、Gal10下流に挿入遺伝子が存在する場合、その挿入遺伝子産物と融合する蛋白質（UDP-ガラクトースエピメラーゼ）の遺伝子があり、Gal10下流に遺伝子が挿入されない場合でもそれ自身が誘導発現されるが、SDS-PAGEでの分析ではUDP-ガラクトースエピメラーゼは発現していなかった。（データは省略）よって、筆者はプロモーターが有効に機能していなかったと判断した。

また、*S.cerevisiae*/pYE4E-M1により、若干量のeIF-4Eの発現が確認できたことについては原因不明である。

完全な解明はできなかったが、酵母での発現系についてはここで検討を終了した。

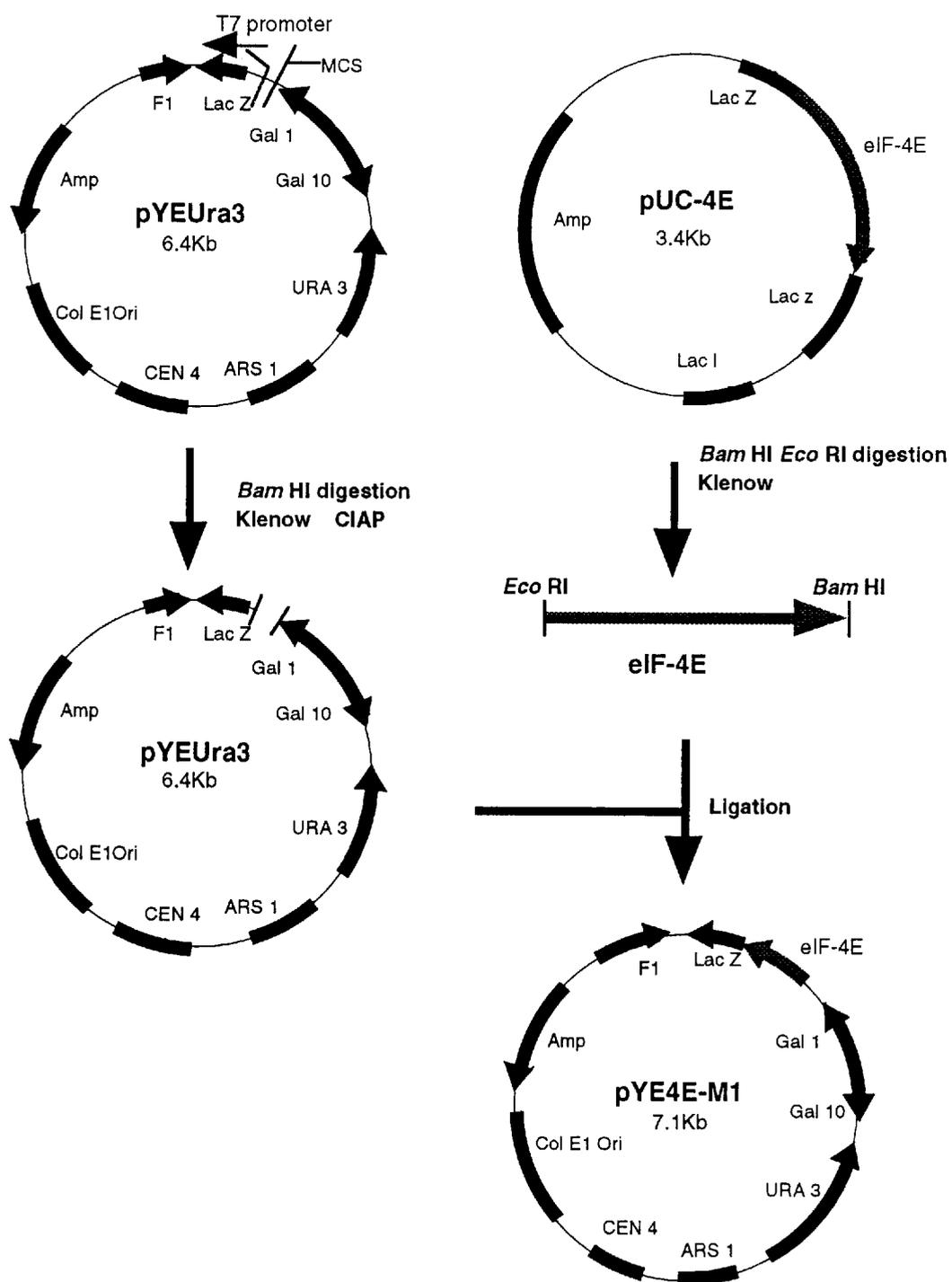


図1-7 pYE4E-M1の調製

		XEL	YSC			XEL	YSC			XEL	YSC
Arg	CGA	6.6	2.3	Ala	GCA	19.8	15.0	Tyr	UAC	16.1	16.0
	CGC	9.2	2.1		GCC	20.0	14.7		UAU	14.4	17.1
	CGG	6.1	1.3		GCG	4.2	5.5	Cys	UGC	12.9	3.7
	CGU	9.2	7.2		GCU	23.5	26.5		UGU	11.3	7.8
	AGA	14.5	23.2	Gly	GGA	22.7	9.4	Phe	UUC	16.5	19.3
	AGG	12.3	8.1		GGC	16.1	9.3		UUU	18.7	23.4
Leu	CUA	7.7	12.0		GGG	12.7	5.3	Ile	AUA	9.5	14.2
	CUC	12.7	4.3	GGU	15.3	31.9	AUC		18.8	18.0	
	CUG	25.8	9.0	Val	GUA	9.4	10.3		AUU	20.1	30.6
	CUU	15.5	10.1		GUC	12.4	13.9	Met	AUG	24.8	20.3
	UUA	8.1	24.5		GUG	21.3	9.9		Trp	UGG	9.9
	UUG	12.9	31.0	GUU	15.9	25.0	TER	UAA	1.4	1.0	
Ser	UCA	11.6	16.2	Lys	AAA	34.1		39.2	UAG	0.5	0.4
	UCC	14.9	14.9		AAG	35.6		34.5	UGA	0.8	0.5
	UCG	3.9	7.1	Asn	AAC	21.2	25.8	XEL : <i>X.laevis</i>	YSC : <i>S.cerevisiae</i>		
	UCU	17.5	24.6		AAU	20.1	32.9				
	AGC	16.7	7.9	Gln	CAA	15.7	29.2				
	AGU	12.4	12.1		CAG	26.9	11.4				
Thr	ACA	18.3	16.1	His	CAC	12.9	8.3				
	ACC	17.3	13.7		CAU	11.9	12.8				
	ACG	4.0	6.9	Glu	GAA	37.2	48.4				
	ACU	17.2	21.9		GAG	35.5	17.8				
Pro	CCA	18.1	20.8	Asp	GAC	25.2	21.8				
	CCC	13.6	5.9		GAU	29.7	37.7				
	CCG	4.0	4.5								
	CCU	15.3	12.9								

図1-8 コドン使用頻度⁴⁵

				15(5)					30(10)					45(15)
ATG	GCG	GCC	GTG	GAA	CCG	GAA	AAC	ACC	AAT	CCC	CAA	TCT	ACG	GAA
M	A	A	V	E	P	E	N	T	N	P	Q	S	T	E
				60(20)					75(25)					90(30)
GAG	GAA	AAA	GAA	ACT	GGT	CAG	GAG	ATT	GTA	AGC	CCC	GAT	CAG	TAC
E	E	K	E	T	G	Q	E	I	V	S	P	D	Q	Y
				105(35)					120(40)					135(45)
ATT	AAG	CAT	CCA	CTA	CAG	AAC	AGA	TGG	GCC	CTT	TGG	TTC	TTC	AAA
I	K	H	P	L	Q	N	R	W	A	L	W	F	F	K
				150(50)					165(55)					180(60)
AAC	GAT	AAA	AGC	AAA	ACT	TGG	CAG	GCT	AAT	CTG	CGC	CTC	ATT	TCA
N	D	K	S	K	T	W	Q	A	N	L	R	L	I	S
				195(65)					210(70)					225(75)
AAA	TTT	GAT	ACA	GTT	GAA	GAT	TTT	TGG	GCG	CTT	TAC	AAT	CAT	ATC
K	F	D	T	V	E	D	F	W	A	L	Y	N	H	I
				240(80)					255(85)					270(90)
CAG	TTG	TCT	AGT	AAC	TTA	ATG	TCC	GGA	TGT	GAC	TAT	TCA	CTC	TTT
Q	L	S	S	N	L	M	S	G	C	D	Y	S	L	F
				285(95)					300(100)					315(105)
AAG	GAT	GGG	ATT	GAG	CCT	ATG	TGG	GAA	GAT	GAA	AAG	AAC	AAG	CGT
K	D	G	I	E	P	M	W	E	D	E	K	N	K	R
				330(110)					345(115)					360(120)
GGA	GGT	AGA	TGG	CTA	ATC	ACA	CTA	AAC	AAA	CAG	CAG	AGA	AGA	AAT
G	G	R	W	L	I	T	L	N	K	Q	Q	R	R	N
				375(125)					390(130)					405(135)
GAT	TTA	GAT	CGT	TTT	TGG	CTA	GAG	ACG	CTC	ATG	TGC	CTT	ATT	GGA
D	L	D	R	F	W	L	E	T	L	M	C	L	I	G
				420(140)					435(145)					450(150)
GAG	TCC	TTT	GAT	GAA	CAT	AGC	GAC	GAT	GTA	TGT	GGC	GCA	GTT	GTA
E	S	F	D	E	H	S	D	D	V	C	G	A	V	V
				465(155)					480(160)					495(165)
AAT	GTT	AGA	GCA	AAA	GGG	GAT	AAA	ATA	GCA	ATC	TGG	ACT	ACT	GAA
N	V	R	A	K	G	D	K	I	A	I	W	T	T	E
				510(170)					525(175)					540(180)
TTT	GAA	AAC	AAG	GAT	GCT	GTT	ACA	CAT	ATA	GGG	AGG	GTT	TAC	AAA
F	E	N	K	D	A	V	T	H	I	G	R	V	Y	K
				555(185)					570(190)					585(195)
GAA	AGA	TTA	GGA	CTT	CCT	GCA	AAG	GTA	GTG	ATT	GGT	TAT	CAG	TCC
E	R	L	G	L	P	A	K	V	V	I	G	Y	Q	S
				600(200)					615(205)					630(210)
CAT	GCA	GAC	ACA	GCT	ACC	AAG	AGC	GGC	TCC	ACT	ACT	AAA	AAT	CGA
H	A	D	T	A	T	K	S	G	S	T	T	K	N	R
TTT	GTT	GTT	TAA											
F	V	V	*											

red letter : codon usage < 35%

図1-9 *X.laevis* eIF-4E遺伝子の*S.cerevisiae*におけるコドン使用頻度

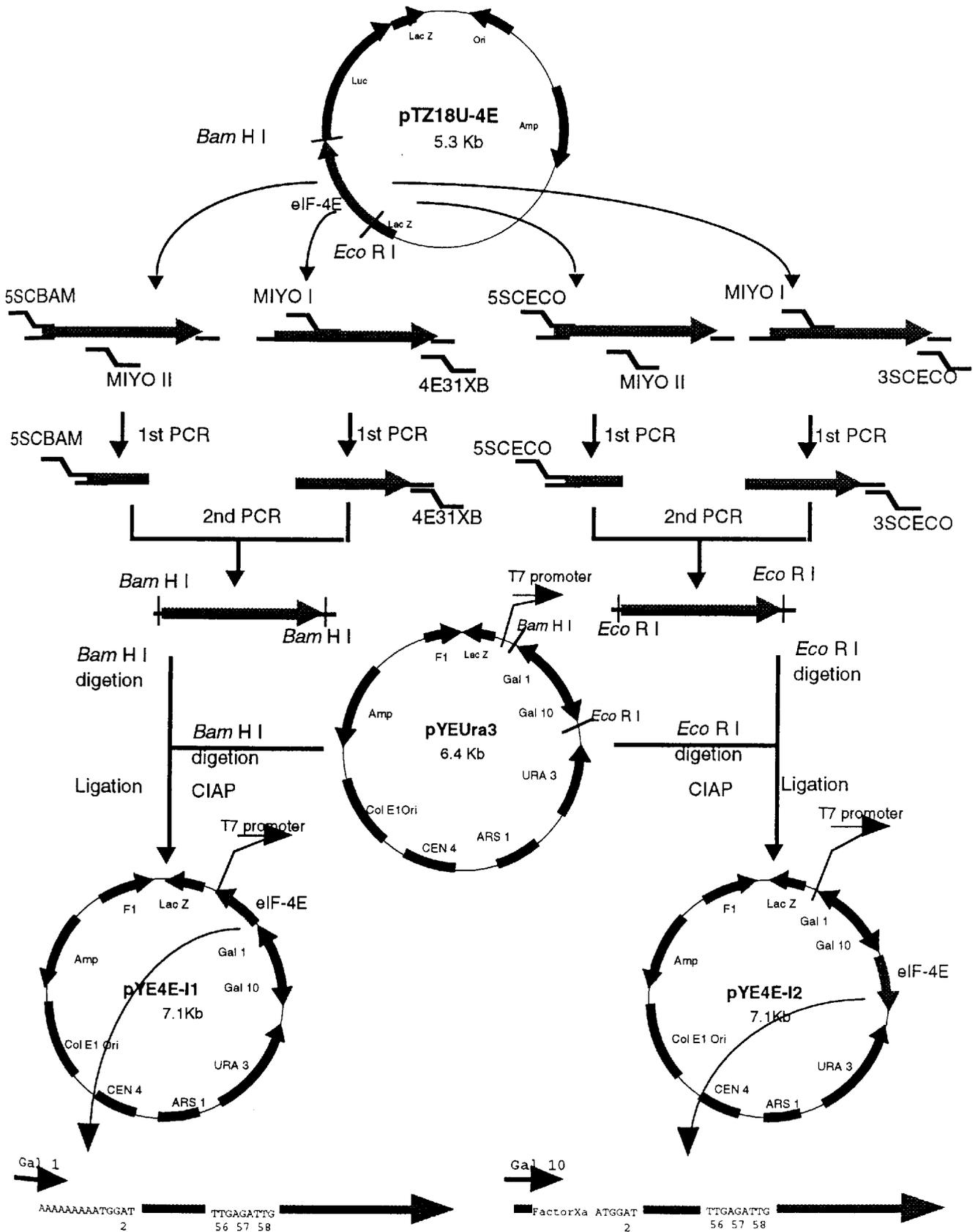
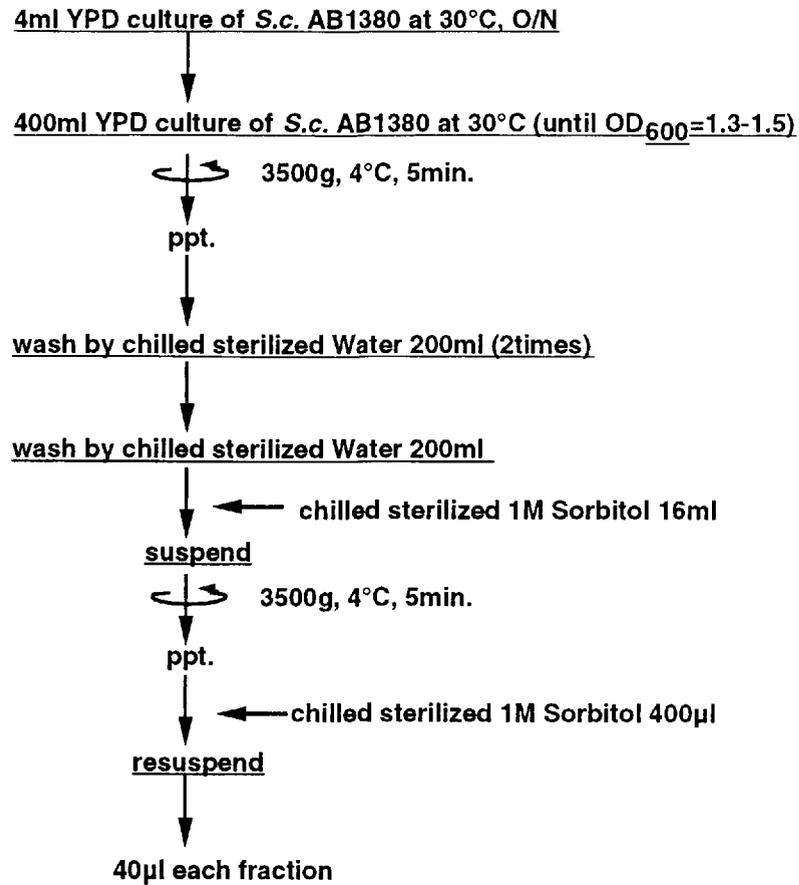


図1-10 pYE4E-I1,I2の調製

1) Preparation of competent cells (400ml scale)



2) Electroporation

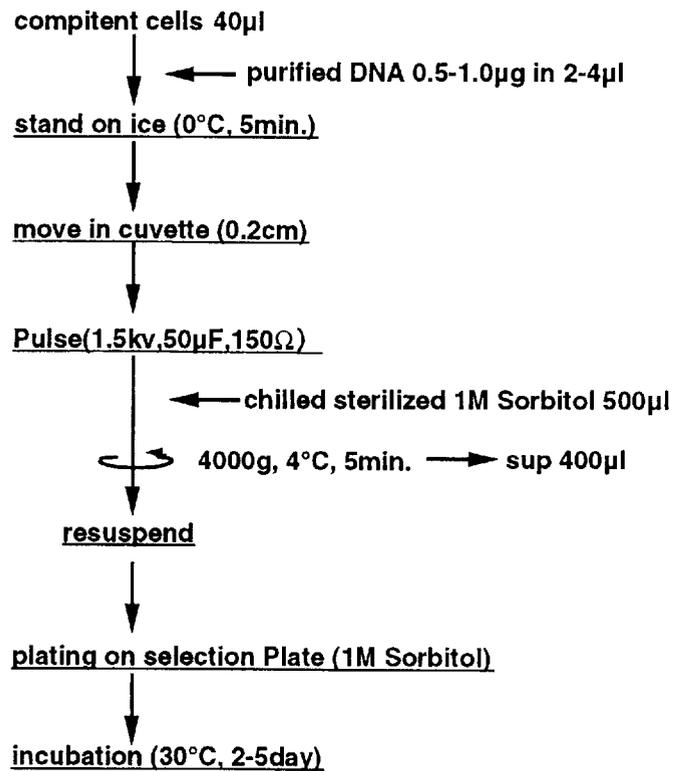


図1-11 酵母の形質転換

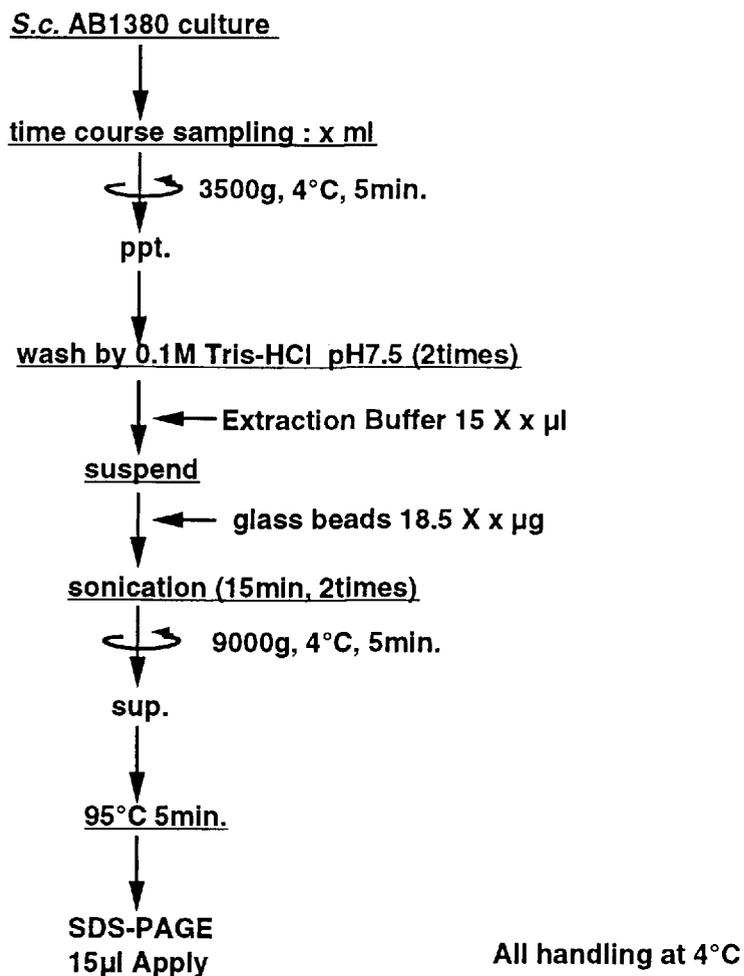


図1-12 サンプル調製 (ガラスビーズ法)

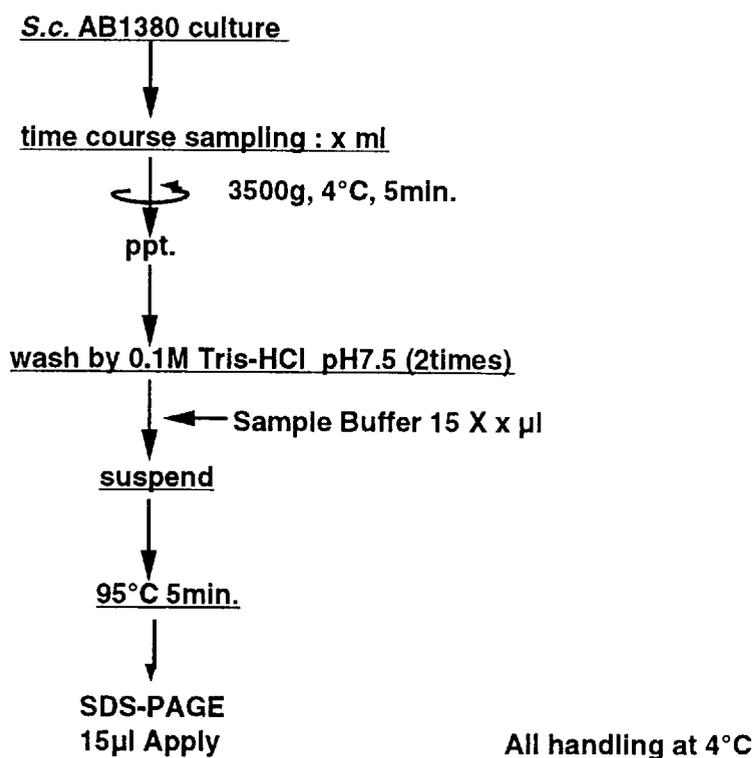


図1-13 サンプル調製 (簡易法)

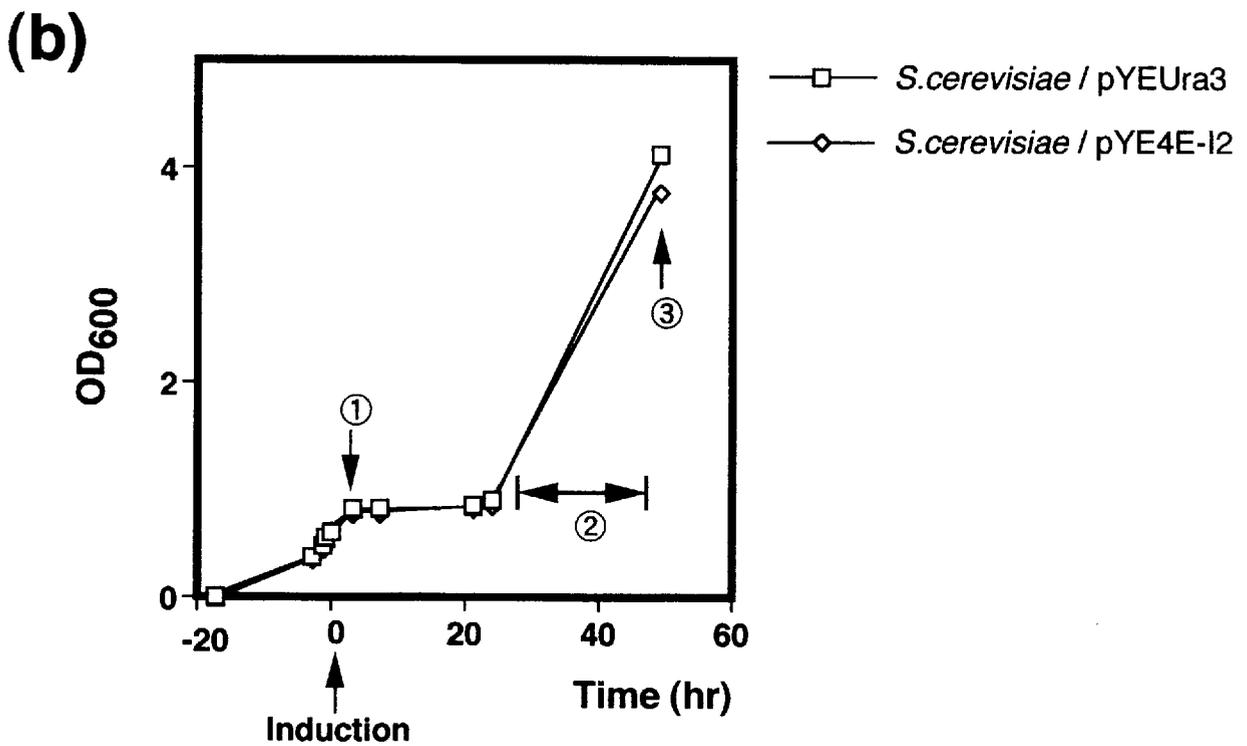
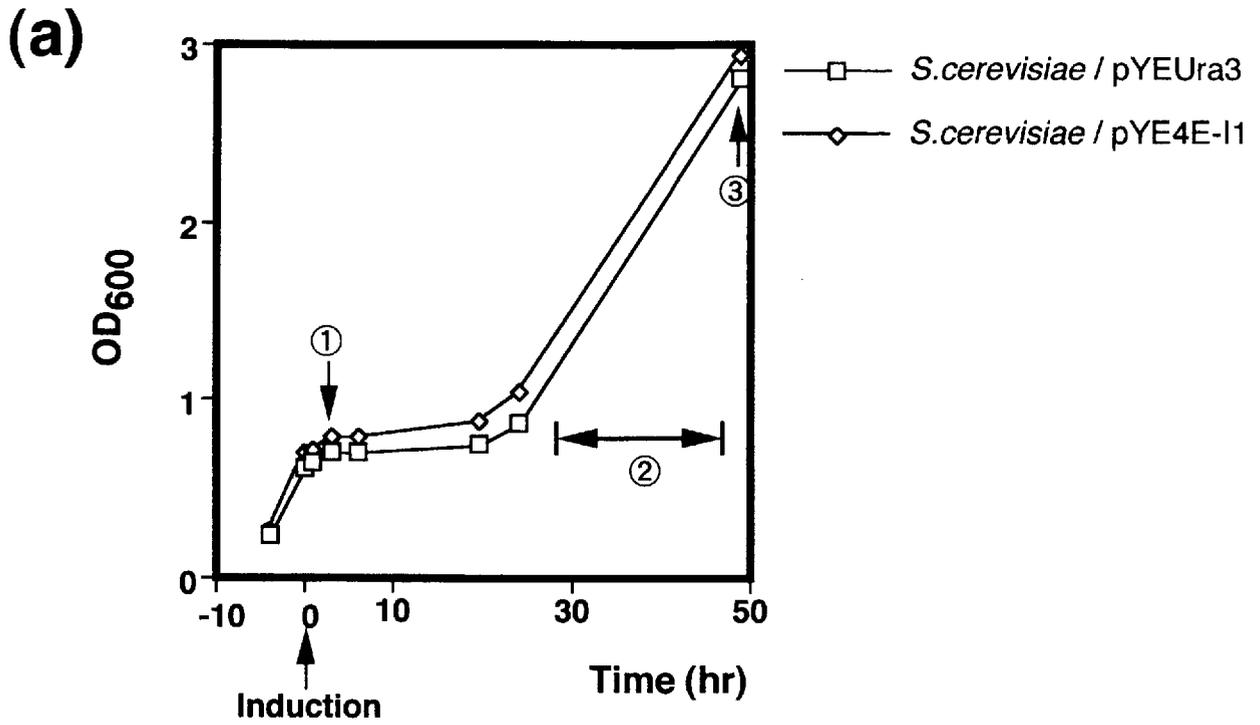


図1-14 形質転換酵母の成育

第二節 バキュロウイルス-昆虫細胞システムによる大量発現系の検討

第一項 eIF-4E発現組換えウイルスの調製及び発現条件の検討

1 序

バキュロウイルス-昆虫細胞による異種蛋白質の発現系は現在広く使用され始めている^{46,48}。この系は真核細胞である昆虫細胞を使用するため、産生された蛋白質はリン酸化、糖鎖の付加などの翻訳後の修飾を受ける⁴⁹可能性を有する。そのため、ほとんど全ての蛋白質を本来の生化学的活性を保持して発現できる可能性を秘めている。バキュロウイルスは、感染細胞の核内に多核体 (polyhedrin) と呼ばれる封入体を大量に作る核多角体病ウイルスで、このウイルスの強力な多角体プロモーター (polyhedrin promoter) を使用することは、異種蛋白質の大量発現系の構築に有用である。また、プロモーターを選択することで、遺伝子増幅効果、組換えウイルス感染後の目的蛋白質の発現時期を制御できる⁵⁰。

eIF-4Eは、第一節に記述した様到大腸菌、酵母の系において効率の良い発現系を構築できなかつた。したがって、真核細胞の発現系で異種蛋白質の大量発現に可能性の残された、夜盗蛾科 *Spodoptera frugiperda* の卵母細胞由来である Sf-9細胞を宿主として、バキュロウイルス核多角体病ウイルスの一種である AcNPV (*Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus) を選択して、このシステムでの発現系の構築を検討した。

2 実験方法

2-1 pBB-4E (Co-transfection用トランスファーベクター) の構築

pTZ18U の *Nco* I、*Bam*HI 部位に *Xenopus laevis* eIF-4E 遺伝子が組み込まれた pTZ18U-4E を鋳型とし、プライマー NCONEND、4E36 で PCR を行ない、得られた産物を *Nco* I、*Hind* III 消化して該当する分子量の断片を精製してインサート DNA とした。これを pBlueBAC III の *Nco* I、*Hind* III 消化して該当する分子量の断片を精製したものとライゲーションし、ライゲーション溶液で大腸菌 XL-1 Blue を形質転換した。得られた形質転換体でプラスミド DNA 調製して pBlueBAC III に eIF-4E 遺伝子が挿入された pBB-4E を得た。

(図1-15)

2-2 Co-transfection(遺伝子導入による組換えウイルスの調製)

2-2-1 Co-transfectionによるウイルスストックの調製

培地成分であるIPL-41またはGIM、トランスファーベクター及びバキュロウイルスDNA(Linear Bac-N-Blue DNA)の3種を混合し、さらにカチオニックリポソームを加えてカチオニックリポソーム/DNA溶液とした。(図1-16)

調製したカチオニックリポソーム/DNA溶液を、IPL-41で洗浄した細胞に加えて室温で穏やかに4時間振とう後、培地を加えて27℃で48時間培養した。その培養液の上清をウイルスストック(i)とした。また、新たに細胞に培地を加えて、さらに48時間培養した培養液の上清もウイルスストック(i)とした。(図1-16)

2-2-2 組換えウイルスの単離(プラークアッセイ)

細胞に培地及び2-2-1で得られたウイルスストック(i)を加え、室温で60～90分間緩やかに振とう後、上清の除去、培地による細胞の洗浄を行なった。ここで、洗浄した細胞にトップアガーを流し込んで固めて、さらに27℃で3～8日間培養した。得られたブループラークを切り出し、培地に懸濁して、ウイルスストック(ii)とした。(図1-17)

さらに上述のプラークアッセイを再度行なって、得られたウイルス液を組換えウイルスストックとした。

2-3 組換えウイルスの増幅

プラークアッセイで得られた組換えウイルスストックを細胞に感染させ、27℃で5日間培養してここで得られた上清を、さらに細胞に感染させて5日間培養した。得られた上清を増幅組換えウイルスストックとした。(図1-18)

2-4 β -ガラクトシダーゼアッセイ

pBB4Eには、マーカー遺伝子として β -ガラクトシダーゼが組み込んであることを利用して、ウイルスストック及び増幅中のウイルス液中の組換えウイルスの確認を、 β -ガラクトシダーゼの活性測定によって行なった。X-gal溶液(50 μ g/ml)2 μ lに、ウイルス液50 μ lを加えて37℃で2時間保温し、 β -ガラクトシダーゼの活性による青色の呈色

反応によって判断した。プラークアッセイ及びこの操作で β -ガラクトシダーゼの活性を示したウイルス液を、組換えウイルスが含まれるものと判断して以後のeIF-4Eの発現の検討に使用した。

2-5 eIF-4Eの発現検討

2-4において、組換えウイルスを増幅した際の培養液を、遠心分離により培地と細胞に分離し、SDS-PAGE及びeIF-4E抗血清を用いたウエスタンブロットによって分析した。データは省略した。

2-6 至適培養時間の検討

増幅組換えウイルスストックを細胞に感染させ、この時点から培養時間31、44、55、68、77時間の培養液をサンプリングし、遠心分離により培地、細胞に分離した。細胞は超音波破碎により可溶性画分と不溶性画分に分離して、それぞれ画分（培地、可溶性画分、不溶性画分）のSDS-PAGE及びeIF-4E抗血清を用いたウエスタンブロットを行なった。(図1-19)

3 実験結果

3-1 Co-transfection及び組換えウイルスの単離

β -ガラクトシダーゼアッセイにより、活性を有するウイルスストック(i)を選択し、組換えウイルスの単離及びeIF-4Eの発現を確認した。データは省略した。

3-2 培養時間の検討

SDS-PAGE及びeIF-4E抗血清によるウエスタンブロットによって、培地と不溶性画分にも少量のeIF-4E発現が確認できた。培地及び不溶性画分よりも、可溶性画分にeIF-4Eの大量発現が確認できた。可溶性での最大発現時間はウイルス感染後55時間で、その後発現eIF-4Eは時間と共に不溶性に移行した。(図1-19)

4 考察

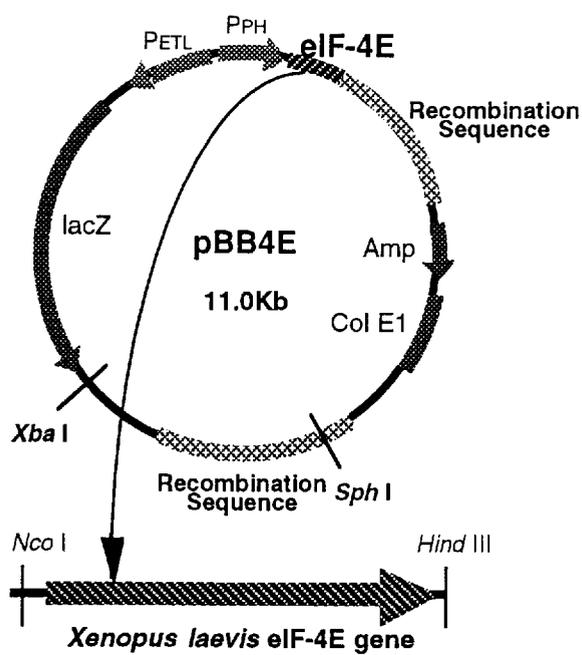
eIF-4Eを発現している β -ガラクトシダーゼ活性を持ったウイルスプラークを単離し、

組換えウイルスストックを得ることに最終的に成功した。しかし、検討の初期にはブループラークが得られなかった。組換えウイルスストックの調製に重要な因子は、まずCo-transfection及びプラークアッセイの細胞濃度であり、とりわけ細胞の維持継代の良否こそがウイルス調製及び単離に重要であると感じた。他に重要な因子としてはトランスファーベクターの純度、そしてIPL-41での洗浄による培地中の牛血清アルブミンの除去であると考えた。

Ac-NPVは、感染末期に多角体を形成するウイルスであり、eIF-4Eを多角体遺伝子に組み込んだ組換えウイルスでも、AcNPVの多角体プロモーターでeIF-4Eを発現させるため、Ac-NPVと同様に感染末期にeIF-4Eの発現量は最大となることと考えられる。その後はプロテアーゼによる分解、封入体の形成などで、可溶性画分に最終的に得られるeIF-4Eの量は減少することも考えられるため、eIF-4Eの発現量が最大となる感染末期の時間、その中でも可溶性画分でのeIF-4Eの量が最大となっている時間、この2つの条件を満たす培養時間を決定する必要がある。

図1-19より培養液の培地中に培養後55時間で、組換えウイルスによって細胞が崩壊したことを示すeIF-4Eの産生が確認できた。この事より、感染末期が感染後何時間後からなのかは定かではないが、培養後約55時間までが感染末期であると判断した。また、可溶性画分でのeIF-4Eの発現量は図1-19のウエスタンブロットの結果より、培養後55時間で最大量となり、その後封入体を形成して発現eIF-4Eが不溶性画分に移行し、可溶性画分での発現量は減少していく事も確認できた。

よって、本項以降の検討については組換えウイルス感染後55時間で可溶性画分からeIF-4Eを精製する事が最適であると判断した。



☒1-15 pBB4E

1) Preparation of Cationic Liposome / DNA soln

ependorf tubing (1.5ml)

IPL-41 or GIM 1ml

pBB4E (1.0 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$) 3 μl

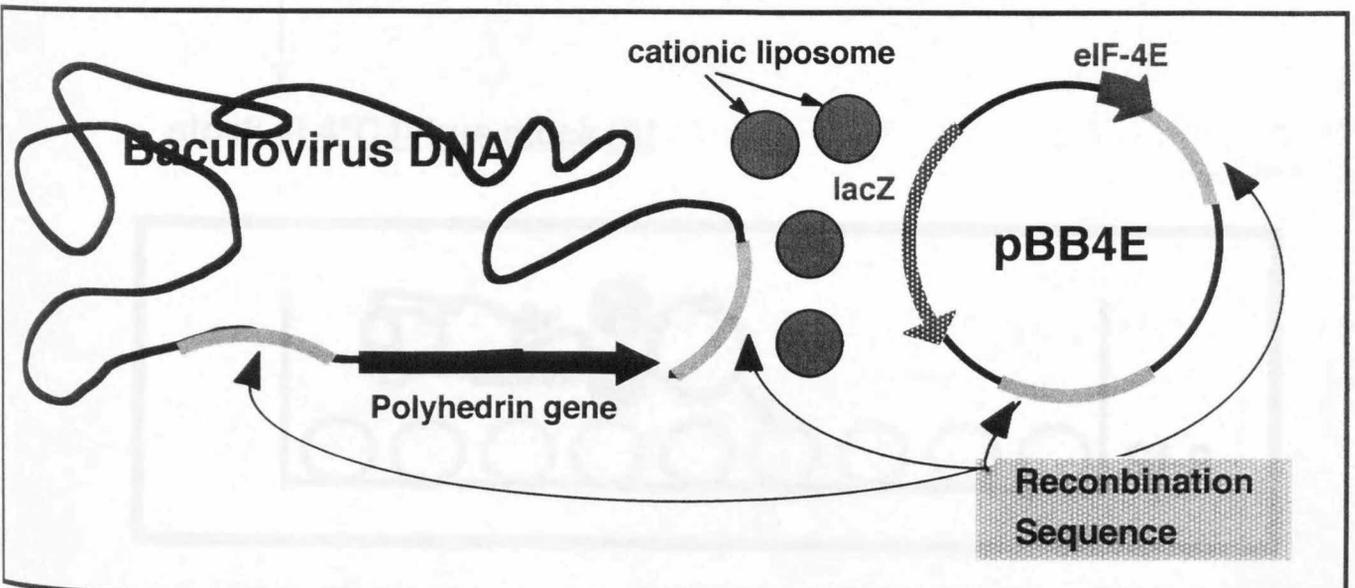
Linear Bac-N-Blue™ DNA (0.1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$) 10 μl

Stand on ice (2min)

Cationic Liposome soln. 20 μl

Vortexing

Stand at r.t. (15min)



☒1-16 Co-transfection : 1)

2) Co-transfection

Ca. 3.0×10^6 cells / 27cm^2

↓
washing the cells by IPL-41

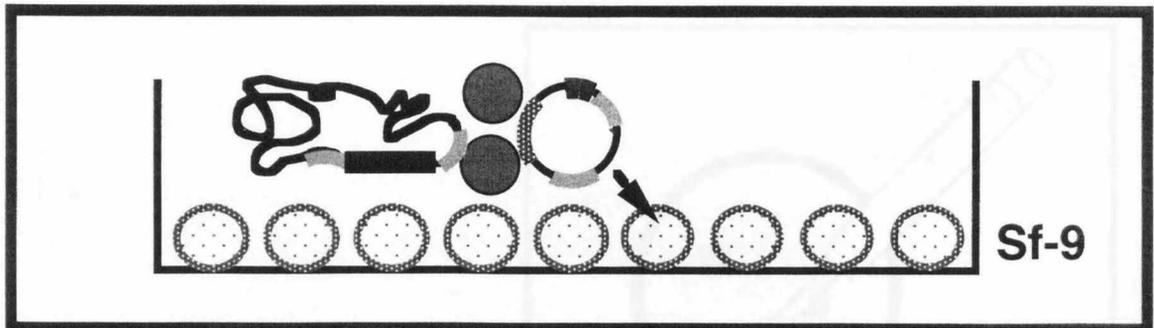
↓ ← Cationic Liposome / DNA soln
rocking at r.t. (4hr)

↓ ← IPL-41 (10% serum) 2ml

Incubation (27°C, 48hr) and further Incubation (27°C, 96hr)

↻
↓
sup.

↓
stock at 4°C [virus stock (i)]



☒1-16 Co-transfection : 2)

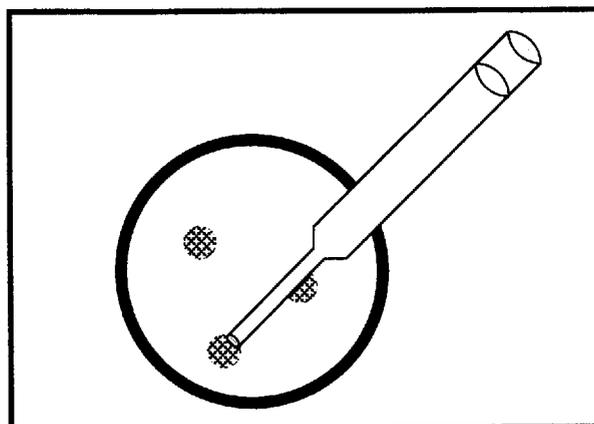
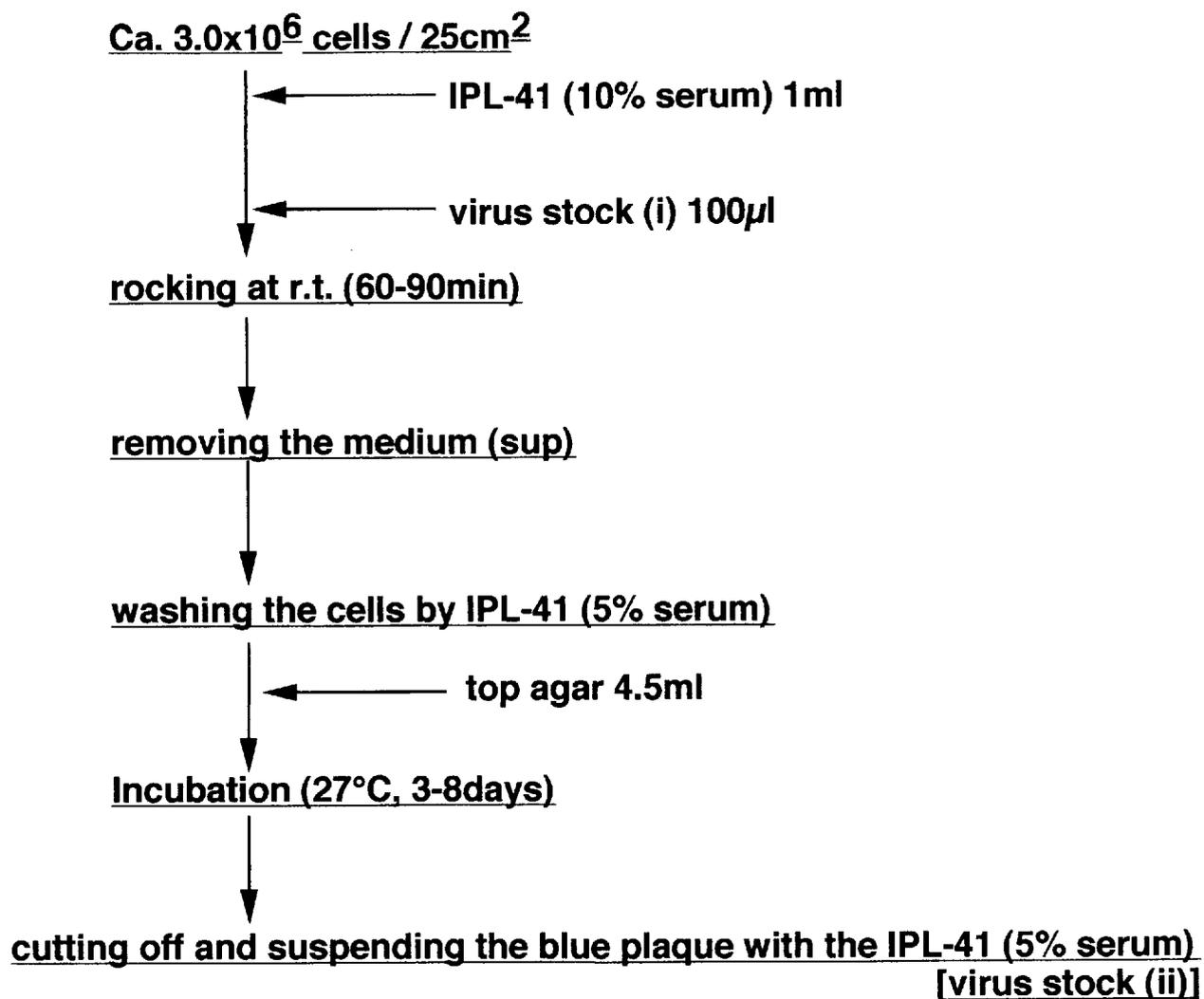


図1-17 プラークアッセイ

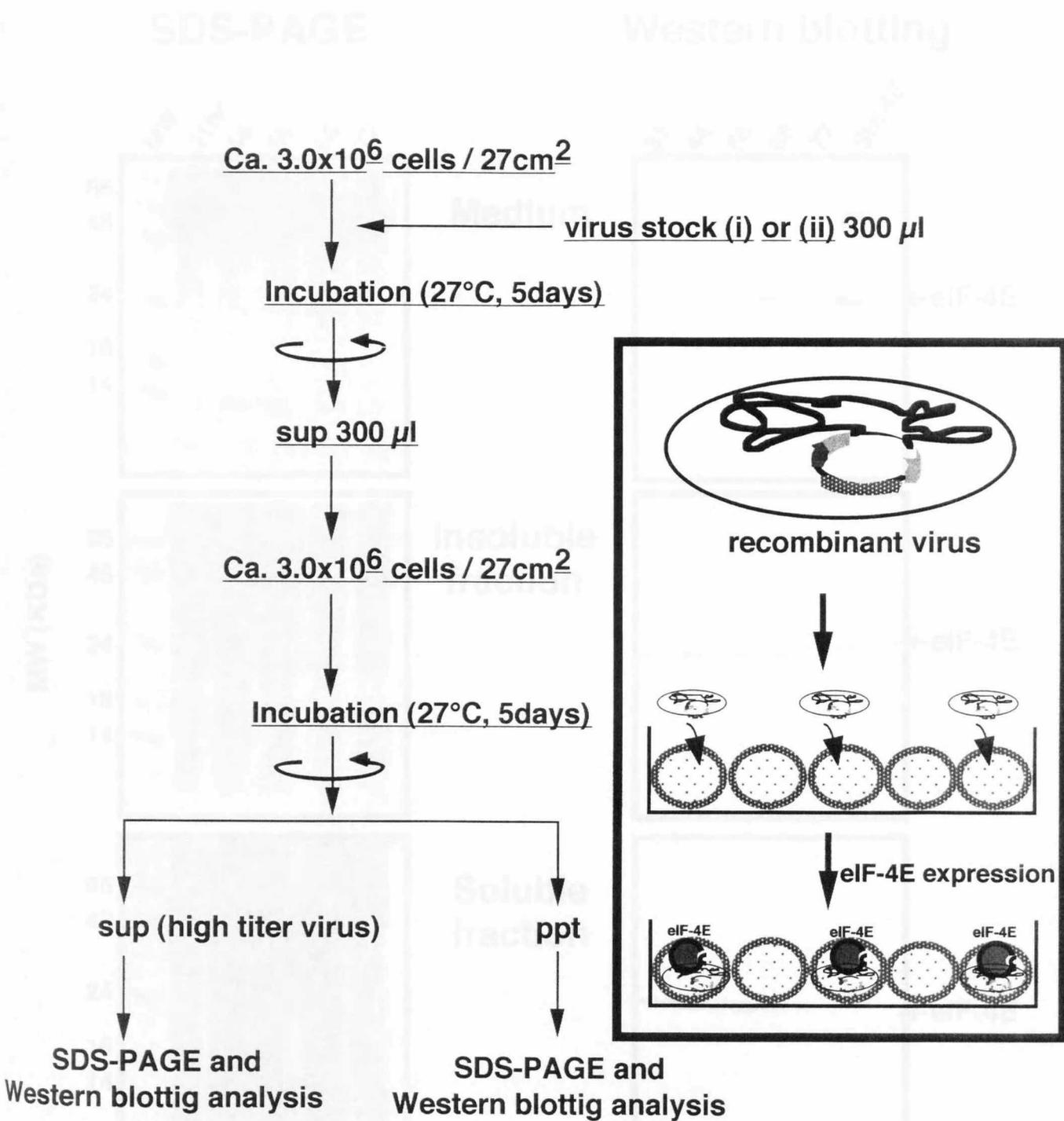


図1-18 組換えウイルスの増幅、eIF-4Eの発現

SDS-PAGE

Western blotting

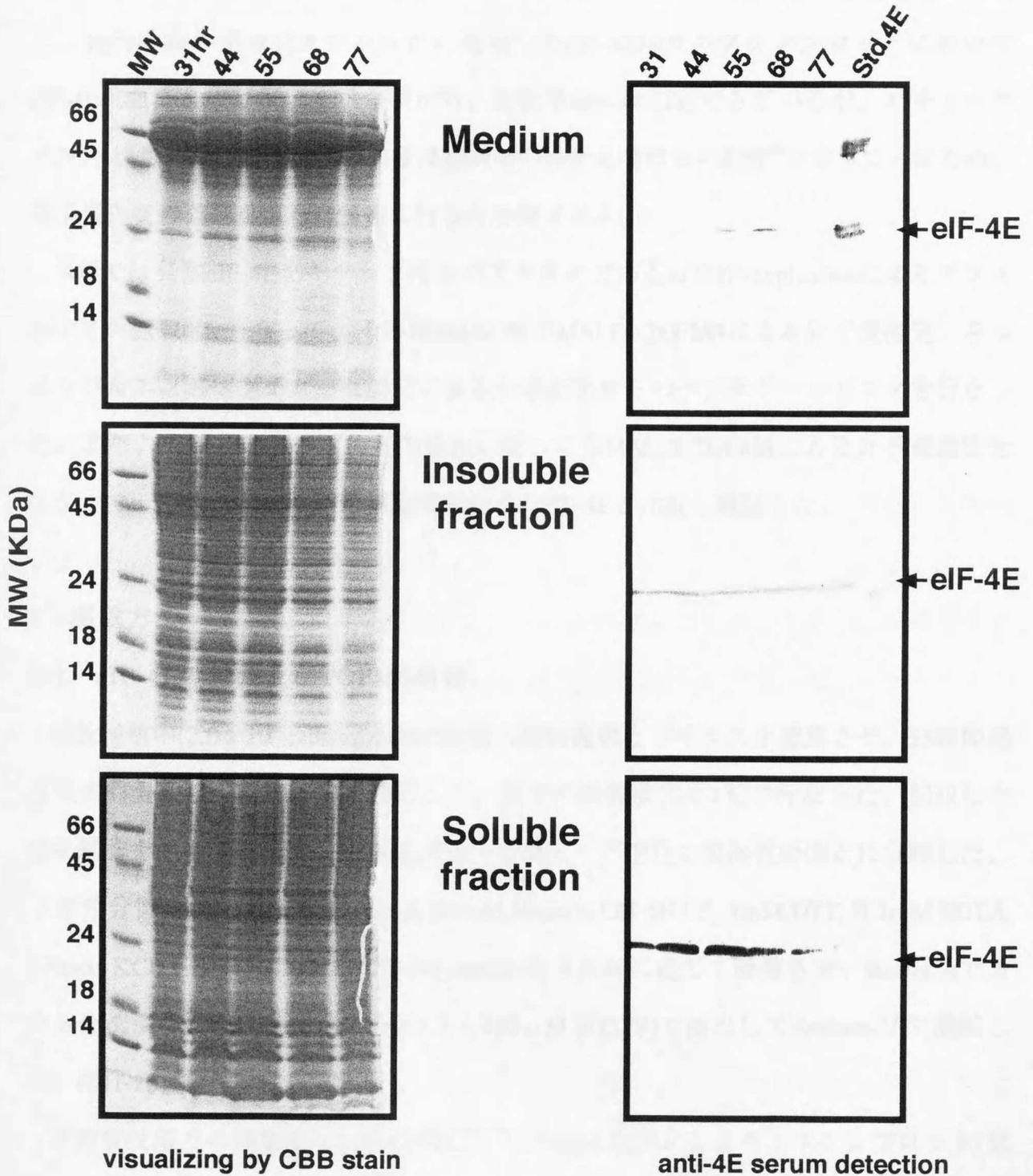


図1-19 eIF-4Eの発現結果

第二項 eIF-4Eの精製及び確認

1 序

前項までにバキュロウイルス-昆虫細胞システムによって、eIF-4Eの大量発現に成功し、発現時間の至適化を行なった。発現したeIF-4EはウエスタンブロットにおいてeIF-4E抗血清と交差反応を示す事から、生物学的には同定できているが、バキュロウイルス-昆虫細胞による発現蛋白質は翻訳後の修飾を受ける可能性⁴⁹を有しているため、発現蛋白質の確認をさらに慎重に行なう必要がある。

本項では発現eIF-4Eをキャップ構造のアナログであるm⁷GTP-Sepharoseによるアフィニティー精製⁵⁰を行なって、その精製eIF-4EのMALDI-TOFMSによる分子量測定、さらにリジルエンドペプチダーゼ消化による分解産物からのペプチドマッピングを行なった。また、アミノ末端ペプチドの修飾についてもMALDI-TOFMSによる分子量測定を行なって、*Xenopus laevis*卵母細胞卵母細胞のeIF-4Eと比較し確認した。

2 実験方法

2-1 eIF-4Eの精製及びTOFMS測定

対数増殖中(2.0×10^6 cells/ml)のSf-9細胞に増幅組換えウイルスを感染させ、55時間経過後遠心分離して感染細胞を回収した。以下の精製操作は4℃で行なった。回収した感染細胞を超音波破碎後、10,000gで遠心分離して不溶性と可溶性分画とに分離した。可溶性分画をあらかじめBuffer A (20mM Hepes/KOH pH7.5, 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 100mM KCl)で平衡化したm⁷GTP-Sepharose 4Bカラムに通じて吸着させ、Buffer Aでカラムを洗浄した後、buffer B (buffer A + 100 μ M m⁷GTP)で溶出してAmicon-10で濃縮した。(図1-20)

各精製段階での精製度はSDS-PAGE及びeIF-4E抗血清によるウエスタンブロット(図1-20)によって確認し、さらに最終的に精製したeIF-4Eの分子量を、*Xenopus laevis*卵母細胞より精製したeIF-4Eと共に、リゾチームを標準物質としたMALDI-TOFMSによって測定した。(図1-21)

2-2 ペプチドマッピングとアミノ末端分析

精製eIF-4Eをリジルエンドペプチダーゼによって消化し、その分解産物であるペプチドをHPLCで分離(図1-22)した。その各ペプチドのアミノ酸配列をプロテインシーケンサーにより決定してペプチドマッピング(図1-23)を行ない、遺伝子配列より予想されるeIF-4Eのアミノ酸配列との比較確認を行なった。また、プロテインシーケンサーでのアミノ酸配列が解析できなかつた図1-23のピークIについて、MALDI-TOFMSにより分子量を測定を行なった。(図1-24)

3 実験結果アフリカツメガエル卵母細胞

3-1 eIF-4Eの精製及びMALDI-TOFMSによる同定

m⁷GTP-Sepharoseカラムでのアフィニティー精製により、図1-20に示した様にeIF-4E抗血清と交差反応を示す単一バンドとして、発現eIF-4Eを精製できた。培養液1000ml当りの精製eIF-4Eの量は4mgであった。

MALDI-TOFMS測定で、アフリカツメガエル卵母細胞より抽出したeIF-4Eは分子量24581.0で、本論文で発現させた組換えeIF-4Eは分子量24583.7であった。

3-2 ペプチドマッピングとeIF-4Eのアミノ末端修飾

リジルエンドペプチダーゼ消化によるペプチドマッピングにより、大部分のペプチドのアミノ酸配列を決定した。図1-22でのピークIII及びVIは二つのペプチドが重複していることが、プロテインシーケンサーで確認でき、図1-23中にIII-1、III-2及びVI-1、VI-2として示した。決定したペプチドのアミノ酸配列は遺伝子配列より予想されたものと一致した。

プロテインシーケンサーでのアミノ酸配列が解析できなかつた図1-23のピークIのペプチドの分子量は、MALDI-TOFMS測定により1914.77であった。また、アフリカツメガエル卵母細胞のeIF-4Eから同様の操作を行なって得たペプチドの分子量は1914.81であり、分子量は一致した。

4 考察

m^7 GTP-Sepharose 4Bでのアフィニティー精製により、eIF-4E抗血清と交差反応を示す単一バンドとして発現eIF-4Eを精製できた。(図1-20) 精製の純度を向上させるために、 m^7 GTP-Sepharoseカラムに発現eIF-4Eを吸着させて洗浄する際に、洗浄中のKCl濃度を100mMから300mM程度まで上昇させると、 m^7 GTP-Sepharoseへの非特異的な吸着蛋白質の量をさらに減少させる事ができた。(データは省略)

リゾチームを標準物質としたMALDI-TOFMS分析では、卵母細胞のeIF-4Eは分子量24581.0で組換えeIF-4Eは24583.7であった。アミノ酸配列より予想された24634.3とは若干の違いはあったが、卵母細胞のeIF-4Eと組換えeIF-4Eの分子量はほぼ同一であったことから、このバキュロウイルス-昆虫細胞システムにより精製した組換えeIF-4Eは、卵母細胞のeIF-4Eと同一の分子であると判断した。(図1-21)

リジルエンドペプチダーゼ消化でのペプチドマッピングによって、大部分の生成ペプチドのアミノ酸配列を決定することができたが、プロテインシークエンサーでアミノ酸1残基目から分析することができなかったペプチドIは、アミノ末端に何らかの修飾が施されていると予想された。そこで、卵母細胞のeIF-4Eから同様の操作を行なって得たペプチドと共にMALDI-TOFMS分析を行なった結果、アミノ末端のメチオニンが脱落し、2残基目のアラニンにアセチル化が施された場合のペプチドの分子量と一致した。(図1-24)

そこで、ペプチドIをアシルアミノ除去酵素(アミノ末端がアシル化されたペプチドからアシルアミノ酸残基を除去する酵素)で消化して、アミノ酸配列をプロテインシークエンサーで分析した結果、AVEPENTNPQSTEEEEKであったため(データは省略)、MALDI-TOFMS分析での結果と考え合わせてeIF-4Eのアミノ末端の配列をacetyl-AAVEPENTNPQSTEEEEKと判断した。

真核細胞における蛋白質のアミノ末端の修飾には、ピログルタミル化、アセチル化、ホルミル化などの様々な修飾⁴⁹が知られており、eIF-4Eの場合にはアミノ末端がアセチル化されている事が本論文により明らかとなった。また、組換えeIF-4Eもまったく同

様であった。このアセチル化は当然の事ながら原核生物である大腸菌での大量発現では起りえず、このバキュロウイルス-昆虫細胞システムの優位性を示すものと言えよう。

上述のようにアミノ末端の修飾も含めて、バキュロウイルス-昆虫細胞システムによるeIF-4Eは、卵母細胞のeIF-4Eと完全に同一の分子であると同定した。

Infected Sf9 culture (after 55hrs)

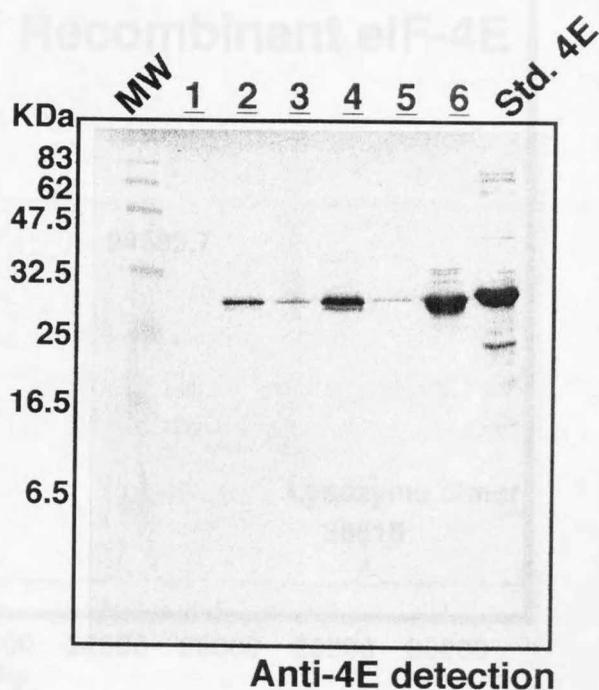
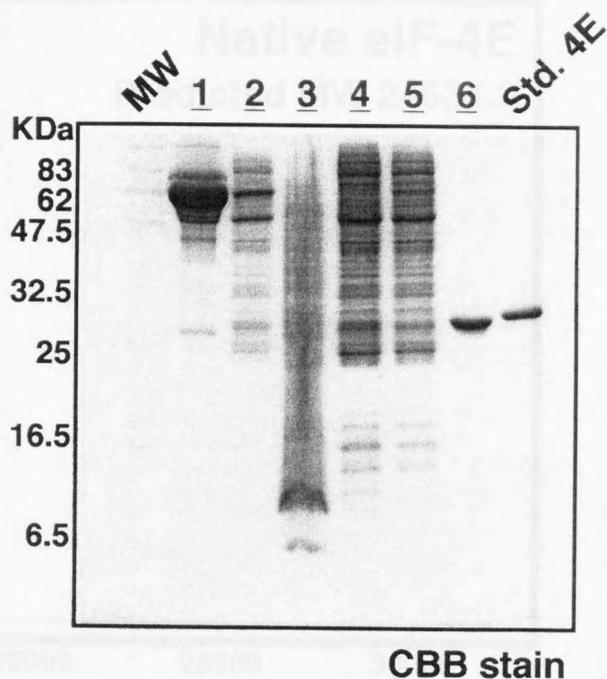
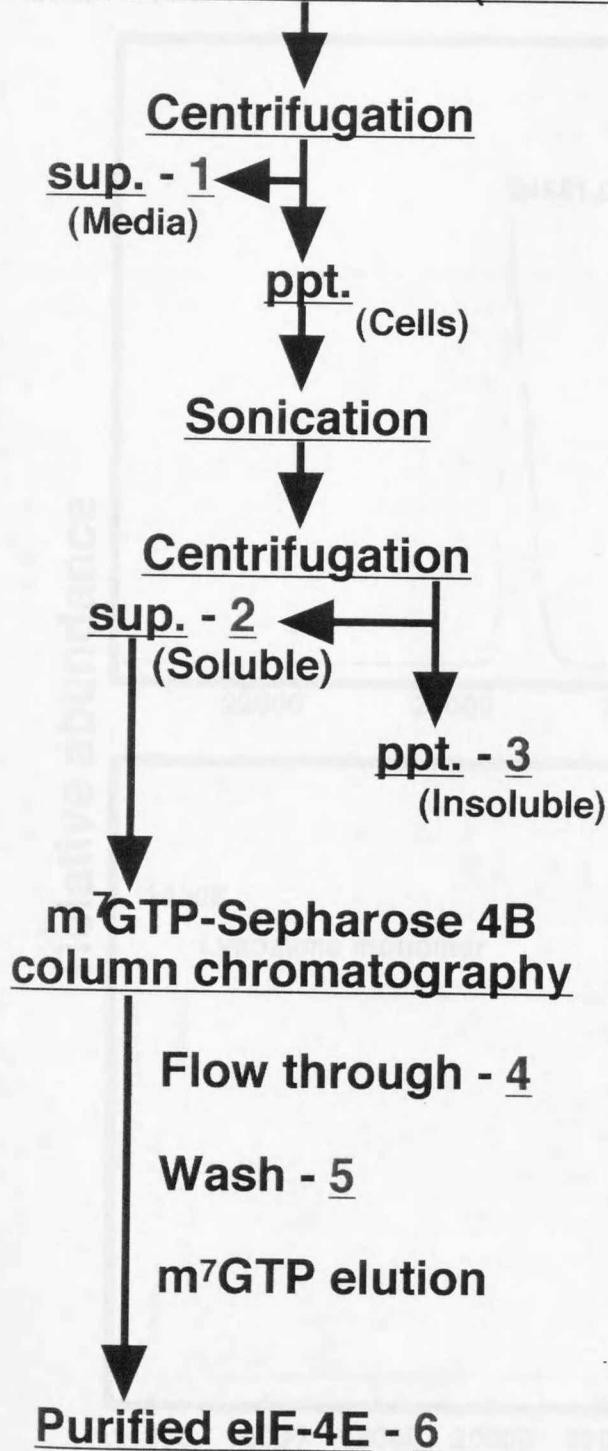


図1-20 発現eIF-4Eの精製

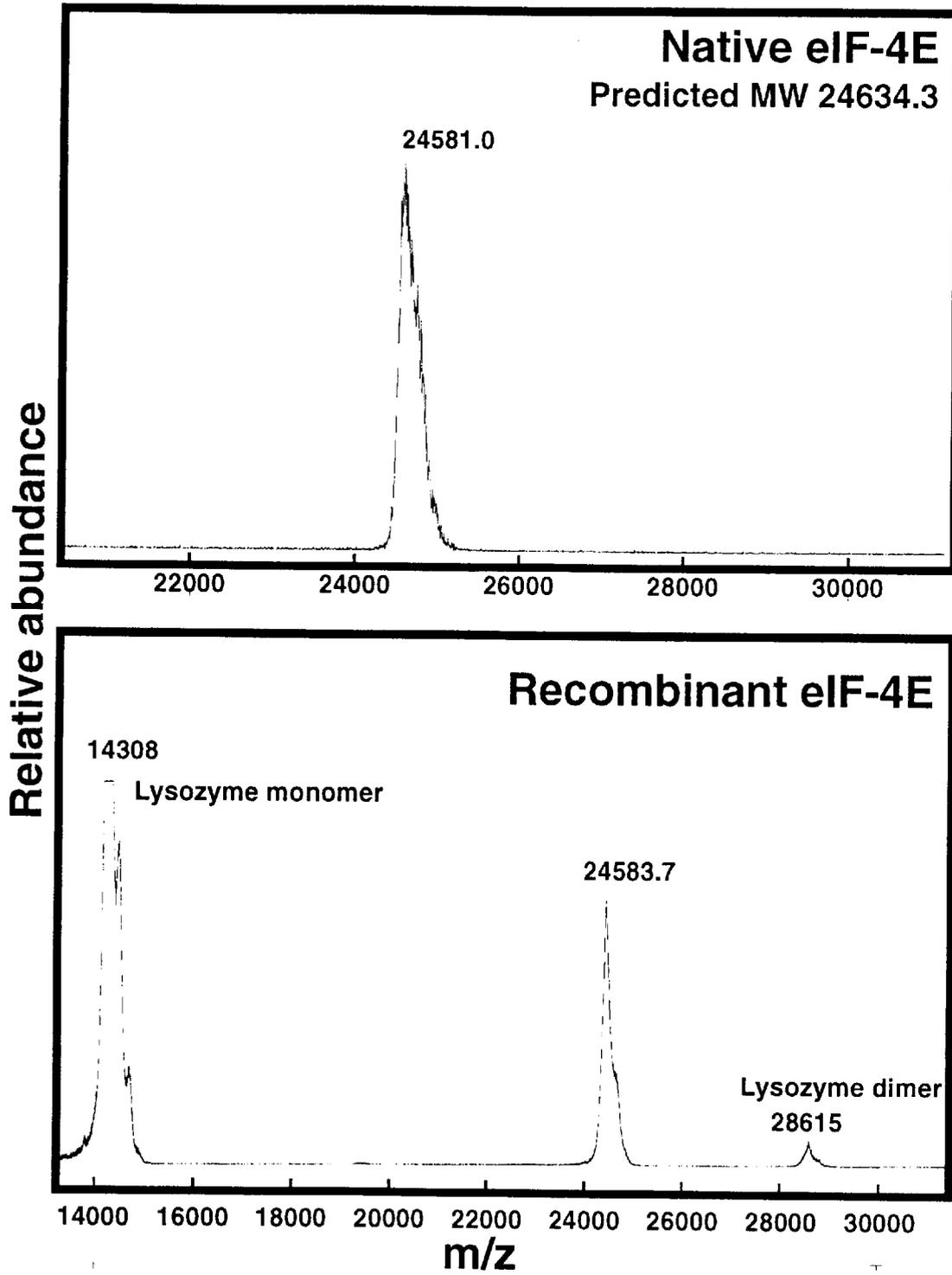
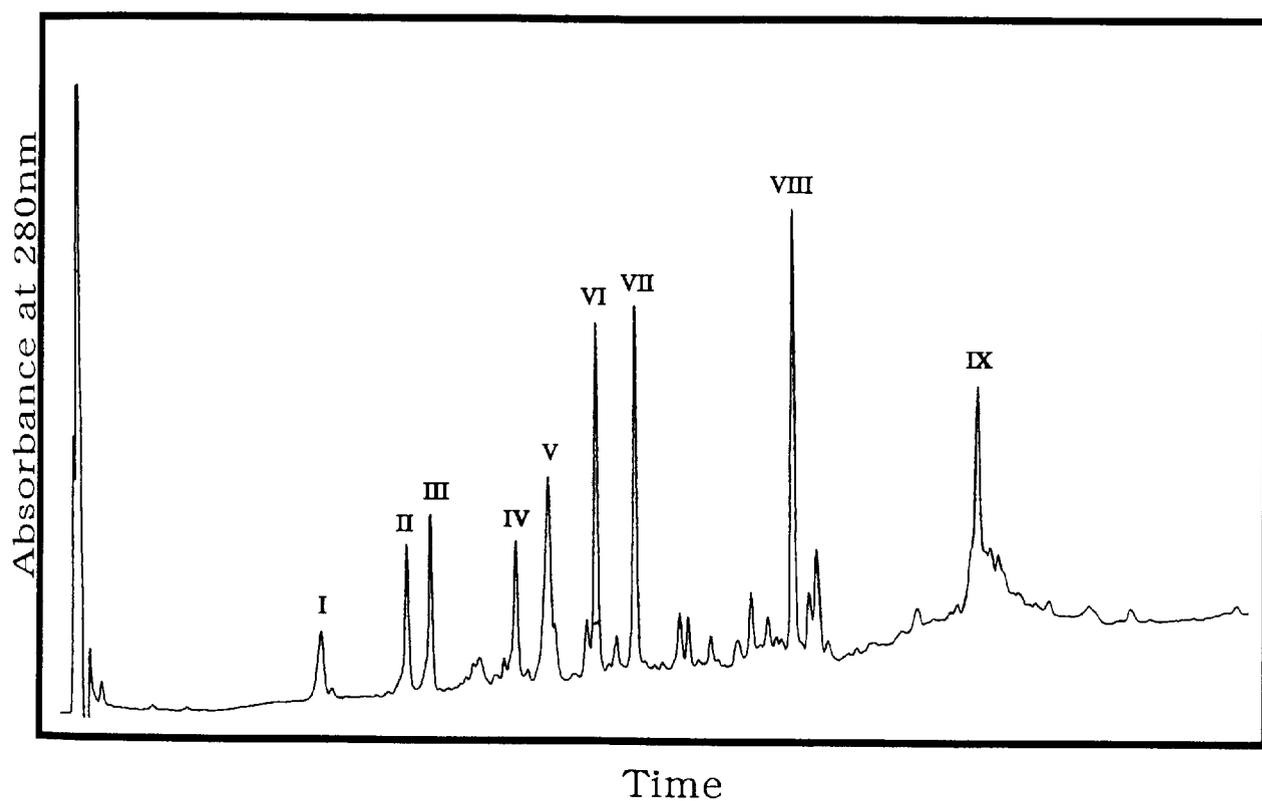


図1-21 精製eIF-4EのMALDI-TOFMS分析



Column : Shiseido Capcel Pak C18

Mobile phase : 10-80% CH₃CN linear gradient in 0.1% TFA

Injection amount : 2.7 nmol of lysyl-endopeptidase digestion sample

図1-22 精製eIF-4Eのリジルエンドペプチダーゼ分解物の逆相HPLC分析

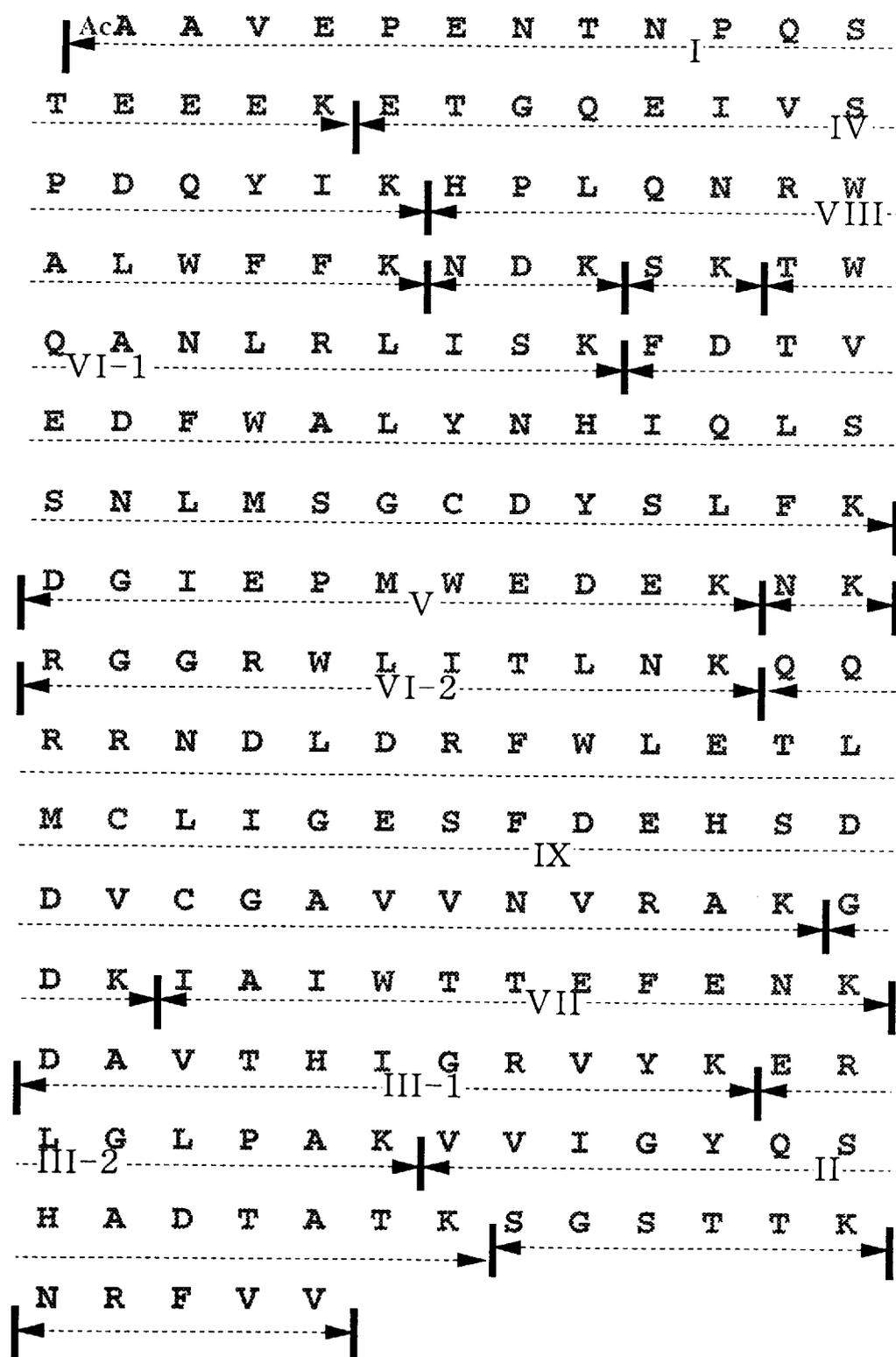


図1-23 リジルエンドペプチダーゼによるペプチドマップ

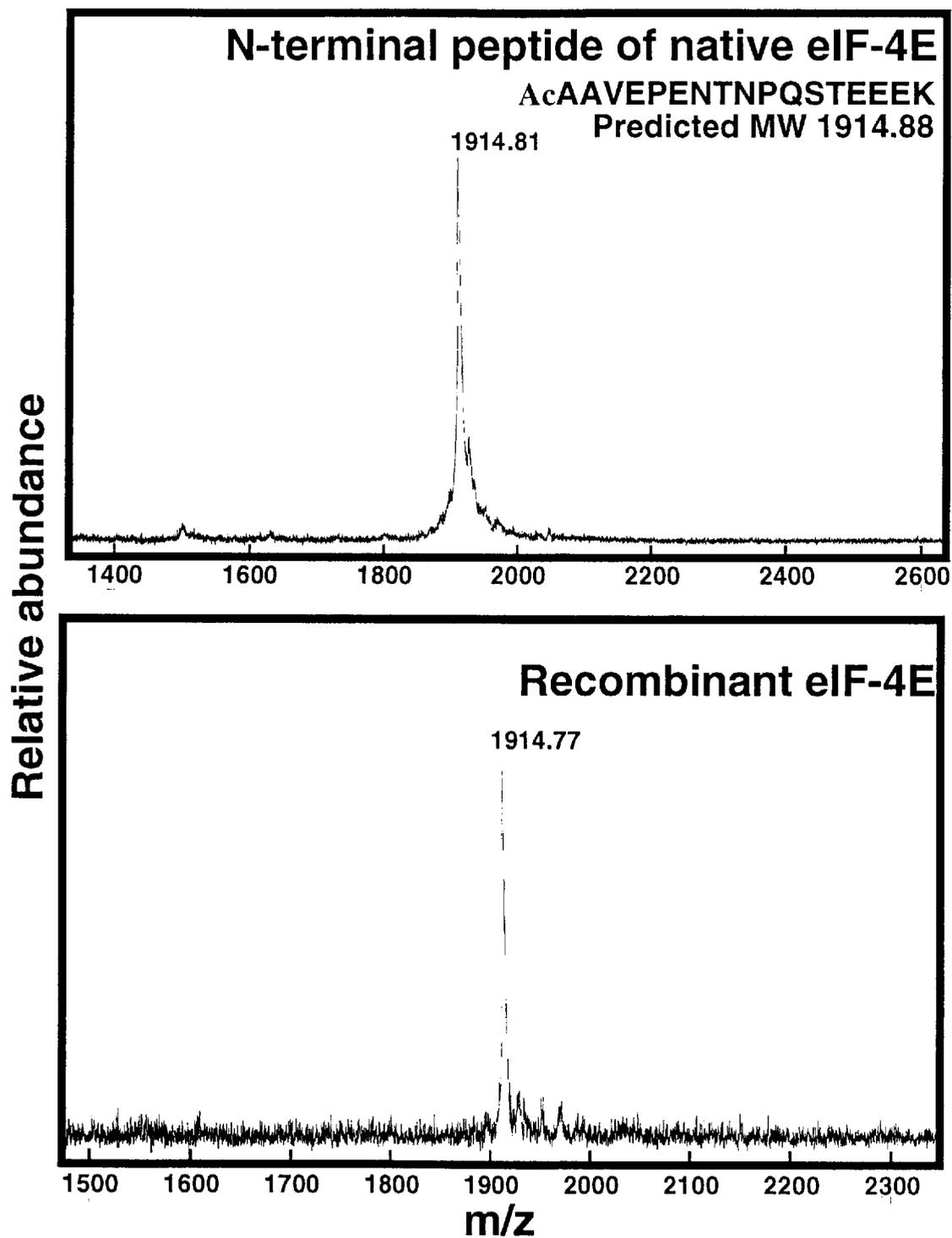


図1-24 N末端ペプチドIのMALDI-TOF MS分析

第三項 eIF-4Eの結晶化の検討

1 序

前項までにバキュロウイルス-昆虫細胞システムによって、eIF-4Eの大量発現に成功し、精製eIF-4Eの同定を行なって卵母細胞のeIF-4Eと同一分子であることを確認した。eIF-4EのX線結晶構造解析はアミノ末端が削除された分子での解析³²こそ報告されているものの、未だ完全分子での解析はなされていない。そこで、eIF-4Eの構造と細胞内での生理的な機能との関係を解析するために、完全分子でのX線結晶構造解析を行なう事にした。

蛋白質のX線結晶構造解析には解析装置を含めて専門の施設、知識が必要であり、現在は専門の研究機関との共同研究によって研究を進める事が不可欠となっている。したがって、筆者は構造解析への最初の障害である結晶化の条件検討を行ない、生成した結晶からのX線結晶構造解析に関しては大阪薬科大学第二物理化学教室との共同研究で行なった。本項では結晶化の検討について記述した。

2 実験方法

現在までに多数の蛋白質の結晶化が成功しておりそれらの条件から、統計的に頻度の高い緩衝液、沈殿剤及び塩の三者の組み合わせで構成された、スパースマトリックス法³²によるリザーバー溶液96種類を用いて、ハンギングドロップ及びシッティングドロップ蒸気拡散法(図1-25)により、eIF-4E濃度7mg/ml、温度4℃及び20℃でeIF-4Eの結晶化を検討した。図1-25に示したセットアップ後、結晶生成の様子を実体顕微鏡で2週間置きに観察した。

次に結晶が得られた条件から、緩衝液には0.1M HEPES-KOH pH7.00, 7.25, 7.50, 7.75, 8.00と0.1M Na Cacodylate pH6.00, 6.13, 6.25, 6.38, 6.50, 6.63, 6.75, 6.88と0.1M Na Citrate pH6.00, 6.25, 6.50, 6.75, 7.00を、沈殿剤にはPEG4000 30% , 20% とPEG6000 30% , 20%を、塩には0.2M NaOAcと0.2M Li₂SO₄を使用して、すべての緩衝液、沈殿剤及び塩の組み合わせで、ハンギングドロップ蒸気拡散法によりeIF-4E濃度7mg/ml、20

℃で検討した。

3 実験結果

スパースマトリックス法によるリザーバー溶液96種類の検討で結晶が生成した条件を表1-1にまとめた。これらの条件で生成した結晶はほとんど針状結晶であったが、リザーバー溶液番号137では柱状結晶も観察できた。得られた結晶の写真を抜粋して図1-26に示した。

緩衝液を0.1M HEPES-KOH、0.1M Na Cacodylate、0.1M Na Citrateに、沈殿剤をPEG4000、PEG6000に、塩を0.2M NaOAc、0.2M Li₂SO₄に絞った組み合わせでの検討では針状結晶しか生成しなかった。データは省略した。

4 考察

表1-1より結晶化条件には、緩衝液のpHが中性、沈殿剤はPEG、塩は0.2M NaOAcと0.2M Li₂SO₄が適していると判断し、条件を絞り込んだ検討を行なったが結晶化の状態は改善されず、X線結晶構造解析に使用できる最適な品質の結晶を得る事はできなかった。スパースマトリックス法による溶液番号137では、構造解析のデータ採取が可能な柱状結晶も調製できた(図1-26)が、結晶化の再現性は悪く、精密な構造解析にはさらなる高品質の結晶を得るための条件の確立が必要である。蛋白質の結晶化を行なう際の主要因³²を下記に記した。

1. 沈殿剤の濃度
2. 蛋白質の濃度
3. 温度
4. pH
5. 還元剤などの存在
6. リガンドの存在
7. 蛋白質の純度
8. 緩衝液の種類
9. 緩衝液の濃度
10. 沈殿剤の種類

これらの要因の中に必ず結晶の品質をさらに向上させる因子があると考えられるが、ここで筆者自身による検討は終了し、これ以後のX線結晶構造解析の検討については、

大阪薬科大学第二物理化学教室に依頼した。

現在はX線結晶構造解析に耐えうる結晶化条件が確立し、分解能1.7 Åの回折現象を観察して理化学研究所播磨研究所放射光施設Spring-8でのデータの採取が終了し、構造解析中である。

また、1997年に報告された脂質によるミセル状態でNMRにより解析された *Yeast* eIF-4Eの構造³³を図1-27に示した。アミノ末端の部分は揺らいで非常に不安定な構造であり、とてもこれが細胞内における真のeIF-4Eの姿とは考えにくい。確かに図0-5に示したように、eIF-4Eのアミノ末端の配列はあまり保存されておらず、この部分を重要視していない報告³²もあるが、*Xenopus laevis*の場合にはアミノ末端の配列に折り返しもあり、何らかの機能を持っていると筆者は考えており、この全長でのeIF-4Eの構造解析を慎重に進めていきたい。

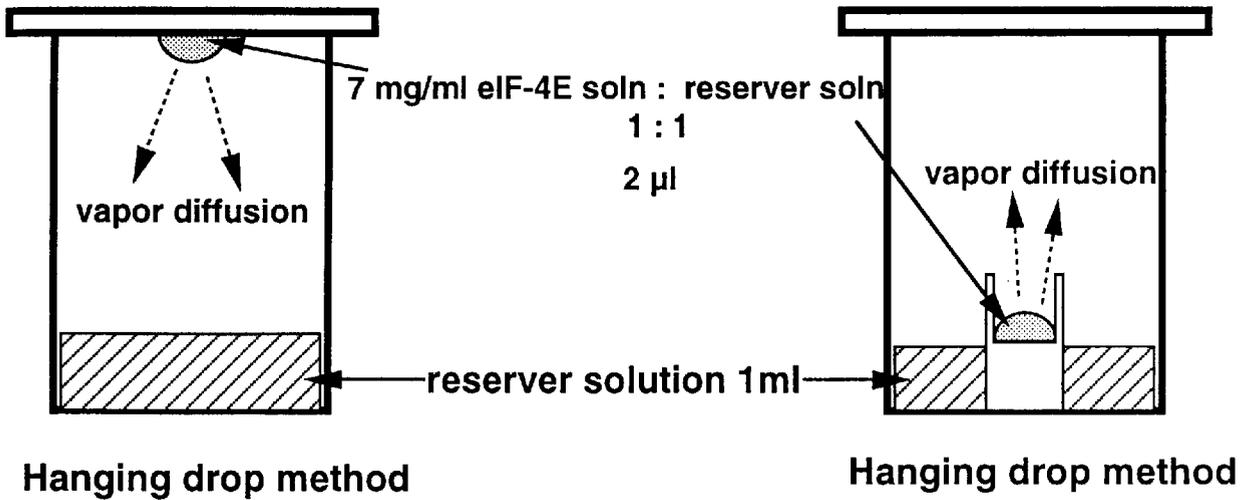


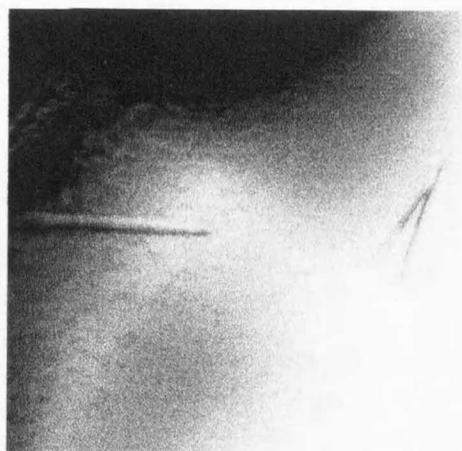
図1-25 ハンギングドロップ及びシッティングドロップ蒸気拡散法⁵²

表1-1 結晶化したリザーバー溶液の組成

Soln. No.	Precipitant	Buffer	Salt
17	30% PEG4000	0.1M Tris	0.2M Li_2SO_4
22	30% PEG4000	0.1M Tris	0.2M NaOAc
28	30% PEG6000	0.1M Cacodylate	0.2M NaOAc
39	30% PEG400, 2.0M $(NH_4)_2SO_4$	0.1M HEPES	
41	20% PEG4000, 10% Isopropanol	0.1M HEPES	
42	20% PEG6000		0.05M K_2HPO_4
107	10% PEG1000, 10% PEG6000		
122	12% PEG20000	0.1M MES pH6.5	
130	10% PEG6000, 5% MPD	0.1M HEPES pH7.5	
137	10% PEG6000, 8% Ethylene Glycol	0.1M HEPES pH7.5	
148	10% PEG20000	0.1M Bicine pH9.0	2% Dioxane



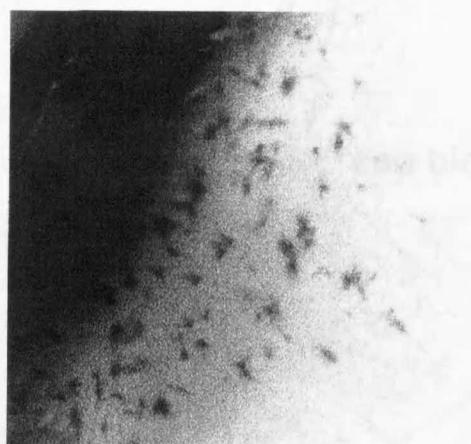
針状と柱状の間の結晶



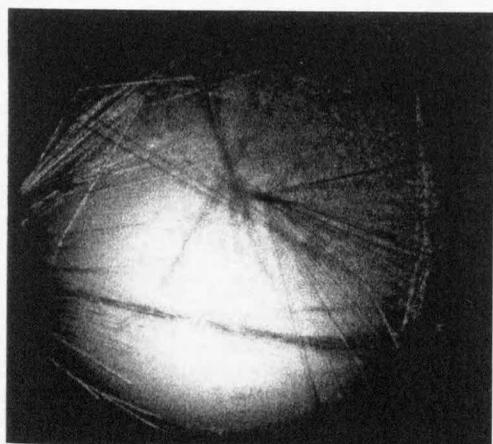
針状及び柱状結晶
この柱状結晶は厚さ0.1mmで
放射光施設ではデータ採取可能である。



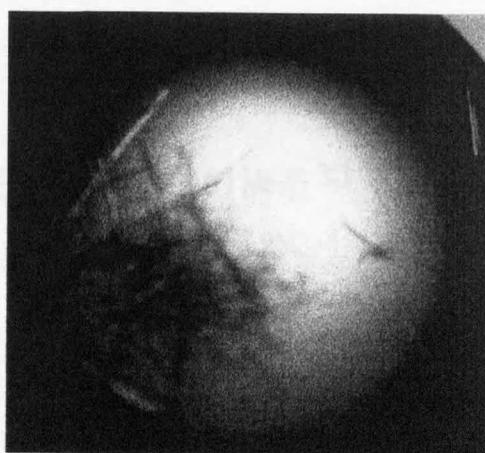
針状結晶



雲母状結晶



針状結晶(凝集沈殿と共存)



針状結晶(凝集沈殿と共存)

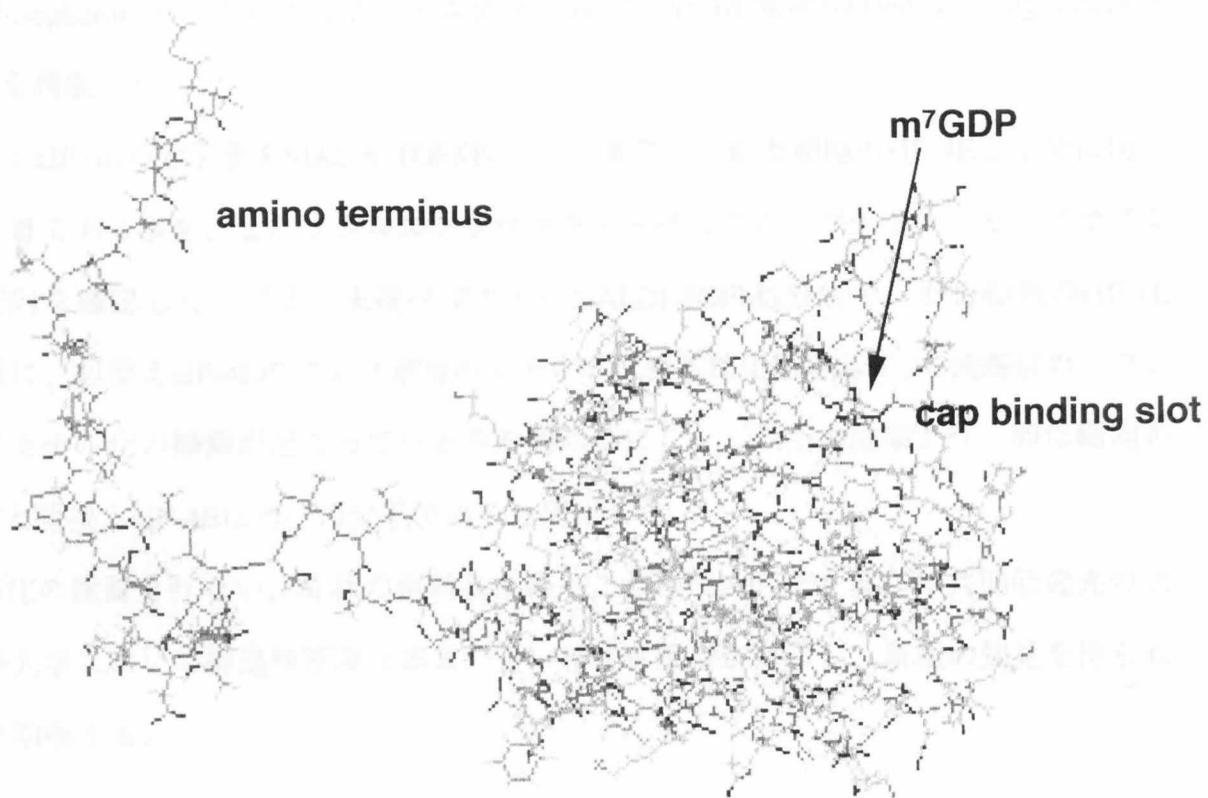


図1-27 eIF-4Eのミセル状態での構造³³

まとめ

Xenopus laevis eIF-4E遺伝子の大量発現系を、大腸菌、酵母及びバキュロウイルス-昆虫細胞システムにより検討した。

大腸菌及び酵母では大量発現系を構築することはできなかったが、バキュロウイルス-昆虫細胞システムによって大量発現系を構築し、キャップ構造アナログである m^7 GTP-Sepharoseカラムによるアフィニティー精製でSf-9培養液1000ml当り4mgの組換えeIF-4Eを精製した。

組換えeIF-4Eの分子量をMALDI-TOFMSにより測定し、卵母細胞のeIF-4Eと完全に同一の分子量である事を、またリジルエンドペプチダーゼによるペプチドマッピングでアミノ酸配列を確認した。アミノ末端ペプチドのMALDI-TOFMS分析で、卵母細胞のeIF-4Eと同様に、組換えeIF-4Eのアミノ末端のメチオニン残基は切断されて、2残基目のアラニンにアセチル化の修飾が起こっている事を明らかにした。以上の結果より、卵母細胞のeIF-4Eと組換えeIF-4Eは同一の分子であると同定した。

結晶化の検討を行ない、柱状の粗結晶を得ることに成功した。現在は共同研究先の大坂薬科大学において構造解析中である。近い将来に解析が終了し、新規の知見を得られること期待する。

第二章

翻訳調節におけるeIF-4Eと4E-BPとの相互作用の役割

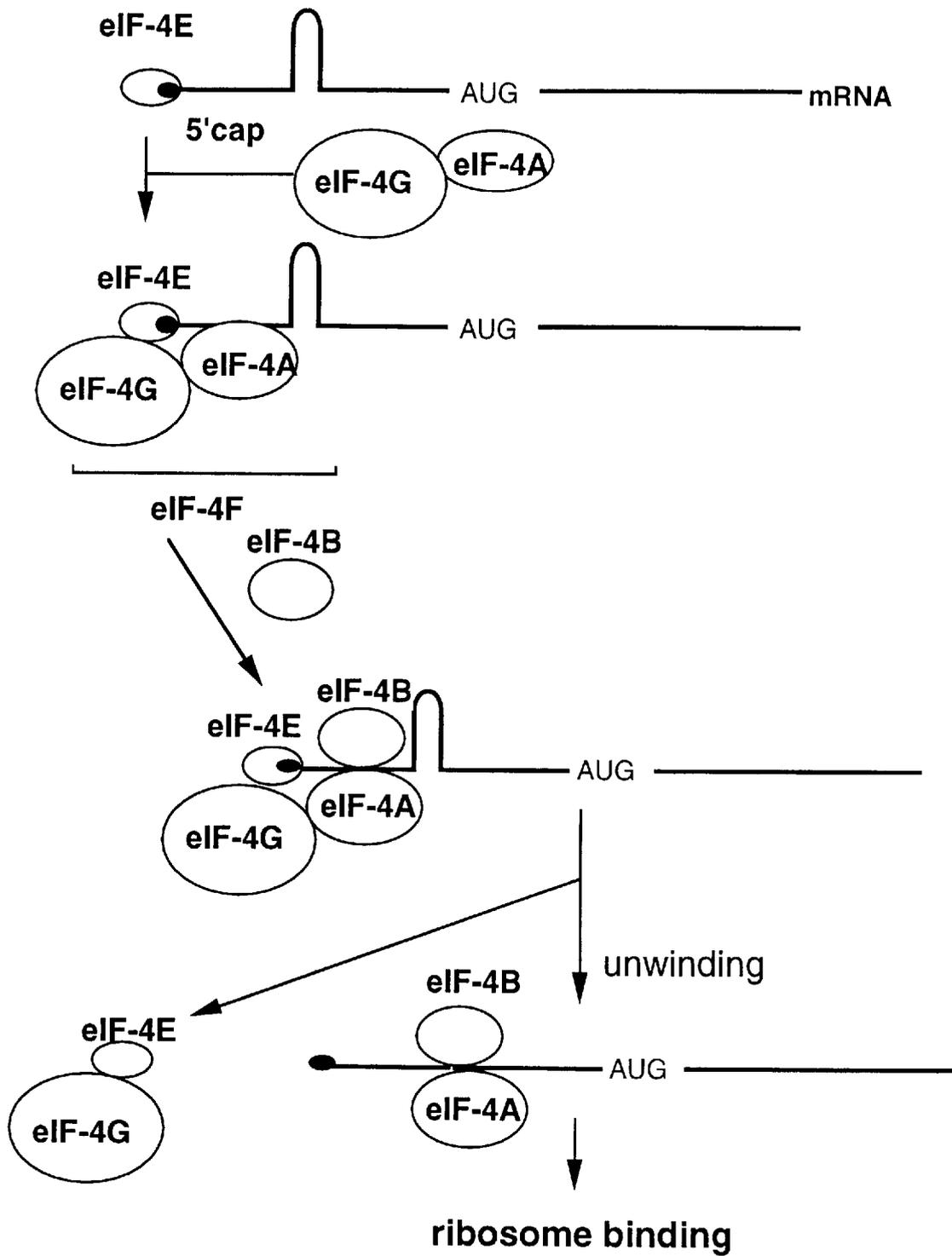
序

現在、真核細胞の翻訳開始には二つの model が提唱されている。一つは stepwise assembly model (図2-1)^{53,54} と呼ばれており、eIF-4E が mRNA のキャップ構造を認識した後、eIF-4G 及び eIF-4A が eIF-4E-キャップ構造複合体に結合して eIF-4F (開始因子複合体)⁵⁵ を形成し、eIF-4B の GTP 加水分解により eIF-4A が mRNA の 5' UTR (untranslated region) の高次構造を解いて、リボゾームの mRNA 5' 末端へのエントリーを容易にする model である。もう一つは、eIF-4E、eIF-4G 及び eIF-4A から構成される eIF-4F を形成した後、キャップ構造を認識する performed assembly model (図2-2)^{56,57} と呼ばれている。翻訳開始の機構がいずれの model に従うかを解明することは、生命現象の謎を解き明かすことにもつながり、極めて重要な課題である。

また、eIF-4E は哺乳類の 4E-BP1、4E-BP2、4E-BP3 や酵母の p20 のような 4E-BP (4E 結合蛋白質) によって eIF-4G への結合を抑制⁵⁸ されており、この制御はインスリンや成長因子などの刺激によって活性化された MAP-kinase によるリン酸化により行われている¹¹。この 4E 結合蛋白質は、eIF-4E の構造³³ (図2-3) から eIF-4E とキャップ構造との結合には直接影響は及ぼしていないと考えられているが、eIF-4E と eIF-4G の相互作用を抑制することにより eIF-4F 複合体形成を制御している。

これらの翻訳開始機構を検討するためには、この中心となる eIF-4E の大量発現系の確立は必要不可欠であるが、筆者は第一章までに eIF-4E の大量発現系の構築に成功した。よって eIF-4E を使用した、他の翻訳開始因子との相互作用を検討することが可能である。eIF-4G については現在までに大量発現系が世界的にも確立されておらず、直接的な eIF-4E との速度論的な解析は現時点では不可能である。しかし 4E-BP に関しては、*Xenopus laevis* の 4E-BP2 遺伝子をペンシルバニア大学の P. S. Klein 博士より提供を受けることができたため、この 4E-BP2 を大量発現させて精製し、eIF-4E との速度論的な解析を行なうことは可能であると考えた。また、キャップアナログについては市販品を使用することや、有機合成されたものを入手することができる。

そこで第二章では、eIF-4Eとその結合因子である4E-BP2やキャップアナログとの親和性について、第一節で定性的に検討した。また、第二節では翻訳開始における環境を考慮して、詳細にSPR (Surface Plasmon Resonance)を用いて速度論的な解析を行ない、翻訳開始及び翻訳調節機構の機構について考察した。



☒2-1 stepwise assembly model^{53,54}

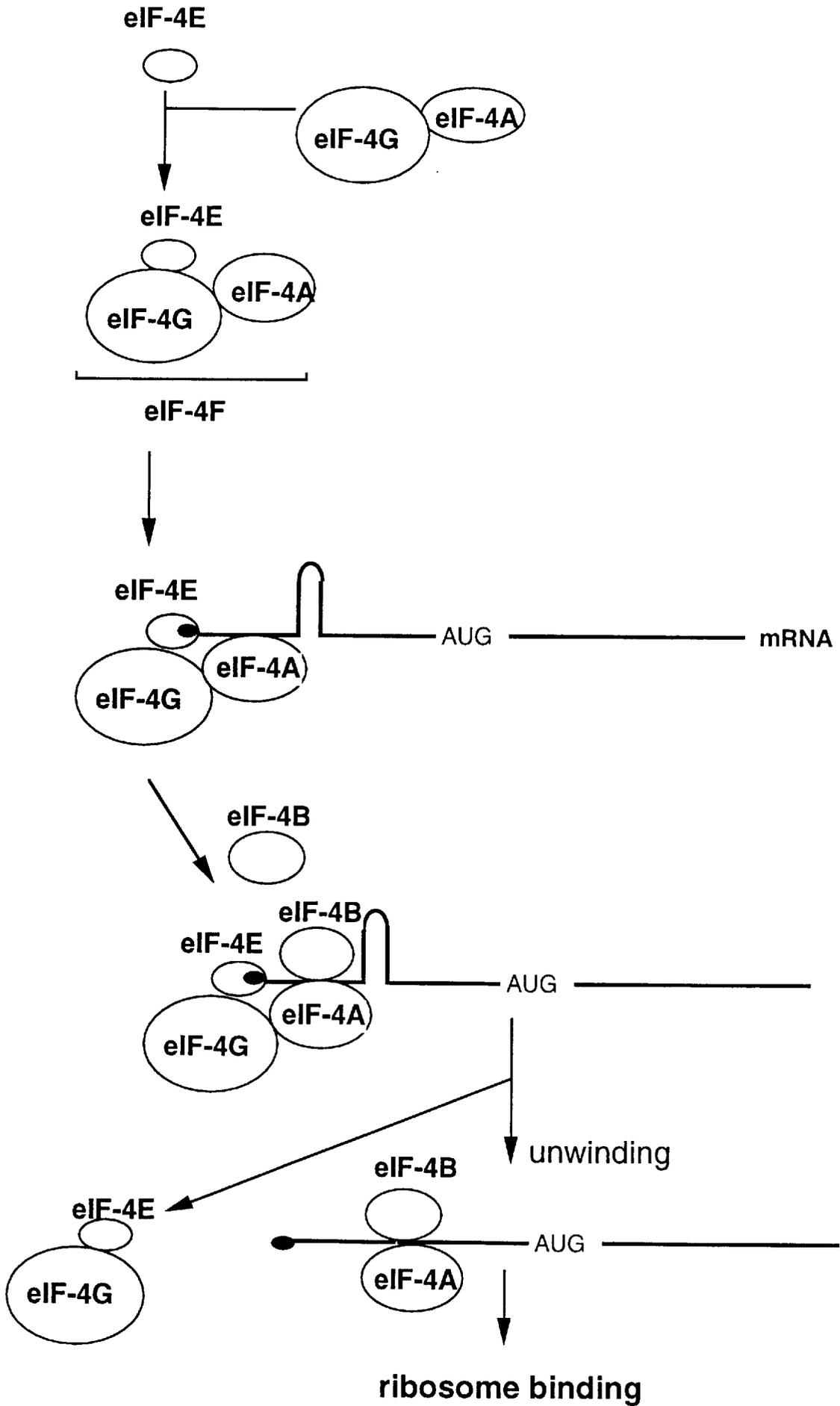
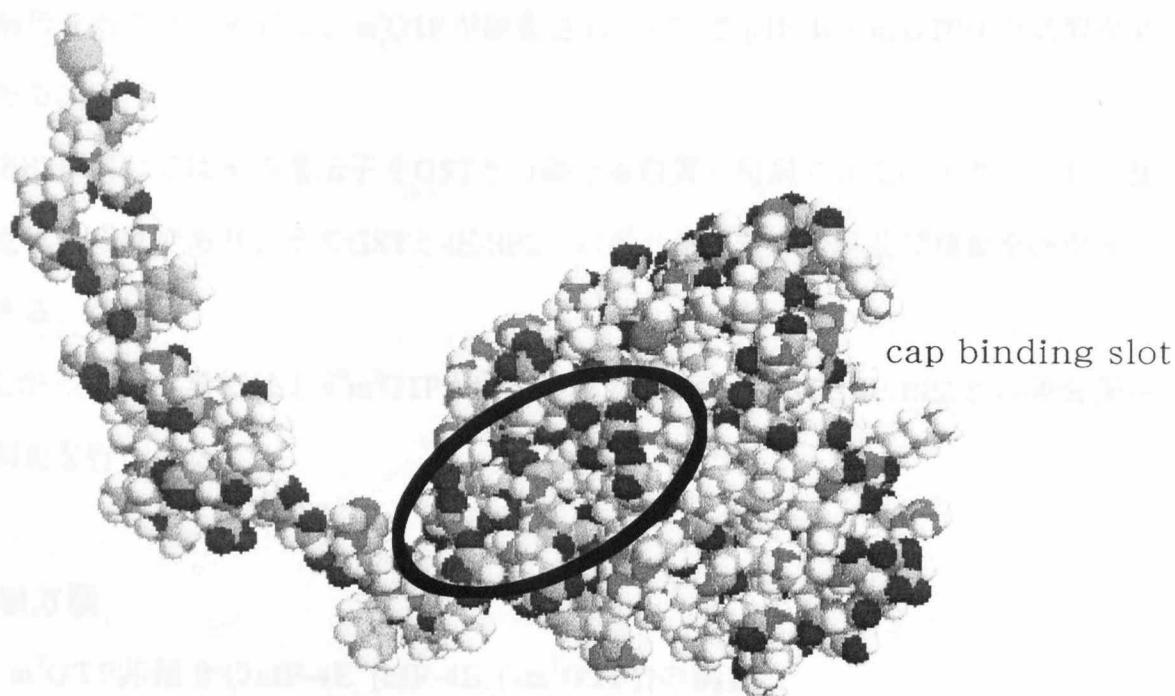


图2-2 performed assembly model^{56,57}



4E-BP & eIF-4G binding region

図2-3 eIF-4Eへの各因子の結合部位³³

第一節 eIF-4Eと4E-BP2との相互作用の定性的分析

第一項 eIF-4Eと4E-BP2の調製

1 序

第一章で、eIF-4Eについては大量発現系の構築及び精製方法を確立したが、精製したeIF-4Eは m^7 GTP-Sepharoseからの溶出時に m^7 GTPを使用しているため、 m^7 GTPとの複合体となっている。よって、この第二章での翻訳開始及び翻訳調節機構の機構についての解析を行なうためには、 m^7 GTPが除去されたeIF-4E [eIF-4E ($-m^7$ GTP)] の精製が必要である。

4E-BP2に関してはその遺伝子をGSTとの融合蛋白質で発現できるベクターとして提供を受けただけであり、そのGSTと4E-BP2との融合蛋白質の発現及び精製を行なう必要がある。

したがって、本項ではまず m^7 GTPが除去されたeIF-4EとGSTと4E-BP2との融合蛋白質の調製を行なった。

2 実験方法

2-1 m^7 GTP非結合のeIF-4E [eIF-4E ($-m^7$ GTP)]の調製

第一章で m^7 GTPとの複合体で精製したeIF-4Eを、あらかじめBuffer A (20mM HEPES/KOH pH7.5, 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 100mM KCl)で平衡化した m^7 GTP-Sepharoseカラムに通じて吸着させ、Buffer Aでカラムを洗浄した後、buffer E (20 mM HEPES/KOH pH 7.5, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 1 M KCl)で溶出した。溶出液をBuffer Aに対して透析を行なった後、Amicon-10によって濃縮を行ない、調製したeIF-4E ($-m^7$ GTP)の純度確認をSDS-PAGEで行なった。実験操作の概略は図2-4に示した。

2-2 GSTと4E-BP2との融合蛋白質(GST-BP2)の調製

ペンシルバニア大学の P. S. Klein博士より提供頂いた、pGEX-3X (Pharmacia)発現ベクター由来で、4E-BP2のアミノ末端にGST (Glutathione S-Transferase) が融合した蛋白質として発現できるpGEX-BP2を発現ベクターとして使用した。図2-5に4E-BP2のアミ

ノ酸配列をHuman 4E-BP1及び4E-BP2と共に示した。

E. coli BL21をpGEX-BP2で形質転換し、得られた形質転換体をLB/Amp液体培地、37℃、12時間培養した。新たに用意したLB/Amp液体培地に対して12時間培養液を1/100量加えて、 $OD_{600}=0.5$ まで培養した時点で終濃度 $100\mu\text{M}$ でIPTGを添加して融合蛋白質の誘導を行ない、さらに2.5時間経過後遠心分離により集菌した。下記の操作は4℃で行なった。

超音波破碎後、遠心分離の上清を、あらかじめTBS (20 mM Tris/HCl pH 7.5、150 mM NaCl)で平衡化したGlutathione-Sepharoseカラムに通じ、GSTと4E-BP2との融合蛋白質(GST-BP2)を吸着させた後、buffer C (TBS + 0.1 mM Glutathione)で洗浄し、buffer D (TBS + 10 mM Glutathione)で溶出した。溶出したGST-BP2をBuffer Aに対して透析を行なった後、Amicon-10で濃縮し、純度の確認をSDS-PAGEで行なった。実験操作の概略は図2-6に示した。

3 実験結果

図2-7に示したSDS-PAGEにより、 $m^7\text{GTP}$ との複合体で精製したeIF-4Eと同分子量にeIF-4E ($-m^7\text{GTP}$)を確認した。GST-BP2も予想される分子量に精製されていることを確認した。

4 考察

$m^7\text{GTP}$ との複合体で精製したeIF-4Eを $m^7\text{GTP}$ -Sepharoseに吸着させ、1M KClで溶出させることにより、 $m^7\text{GTP}$ 非結合のeIF-4Eを精製した。このeIF-4E ($-m^7\text{GTP}$)を $m^7\text{GTP}$ -Sepharoseに再度通じたところ、完全に吸着したことから高濃度の塩(1M KCl)溶出による変性がないことも確認でき(データは省略)、その精製度も速度論的解析を行なうのに十分なものであった。

GST-BP2は*E. coli* BL21/pGEX-BP2で大量発現させ、Glutathione-Sepharoseアフィニティークロマトグラフィーで精製し、eIF-4E ($-m^7\text{GTP}$)と同様に速度論的解析を行なうのに十

分な精製度であることを確認した。

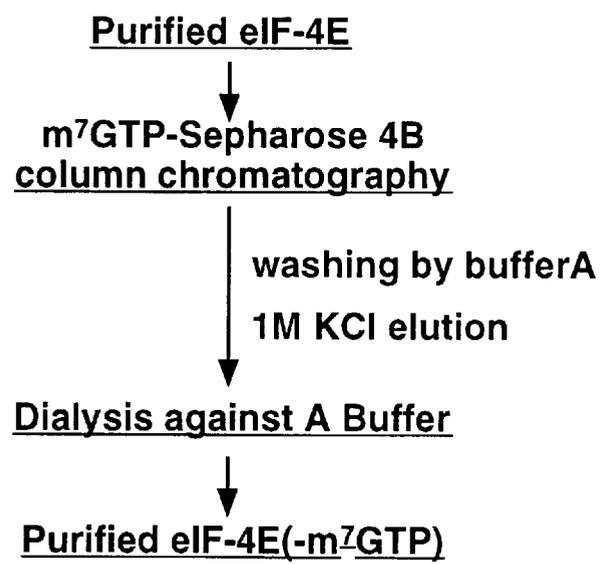


図2-4 eIF-4E(-m⁷GTP)の調製

Xenopus 4E-BP2 GGT
 Human 4E-BP2 **MSSSAGSGHQPSQSRAIP-TRTVAI SDAAQLPH-DYCTTPGGT**
 Human 4E-BP1 **MSGGSSCSQTP--SRÄIPATR RVVLGDGVQLPPGDYSTTPGGT**

Xenopus 4E-BP2 **LFSTTPGGTRIIYDRKFLLLDRRTSPLAQTPPRRLPDIPGVTSP**
 Human 4E-BP2 **LFSTTPGGTRIIYDRKFLLLDRRNSPMAQTPPCHLPNIPGVTSP**
 Human 4E-BP1 **LFSTTPGGTRIIYDRKFLMECRNSPVAKTTPRDLPTIPGVTSP**

Xenopus 4E-BP2 **NTVVEEPKVETNNL---NNHETKTATGDDSQFEMDI**
 Human 4E-BP2 **GT[•]LI[•]ED[•]SK[•]VE[•]V[•]NN[•]L[•]NN[•]L[•]NN[•]H[•]DR[•]K[•]HA[•]VG[•]DD[•]A[•]Q[•]F[•]EM[•]DI**
 Human 4E-BP1 **SS--DEPPMEASQSHLRNSPEDKRAGGEESQFEMDI**

The underlined sequence is a conserved region including tyrosine and leucine, which are essential for eIF4E binding, among three species of 4E-BP. *Xenopus laevis* 4E-BP2 was expressed as a GST fusion protein truncated at the N-terminal region.

図2-5 4E-BPのアミノ酸配列

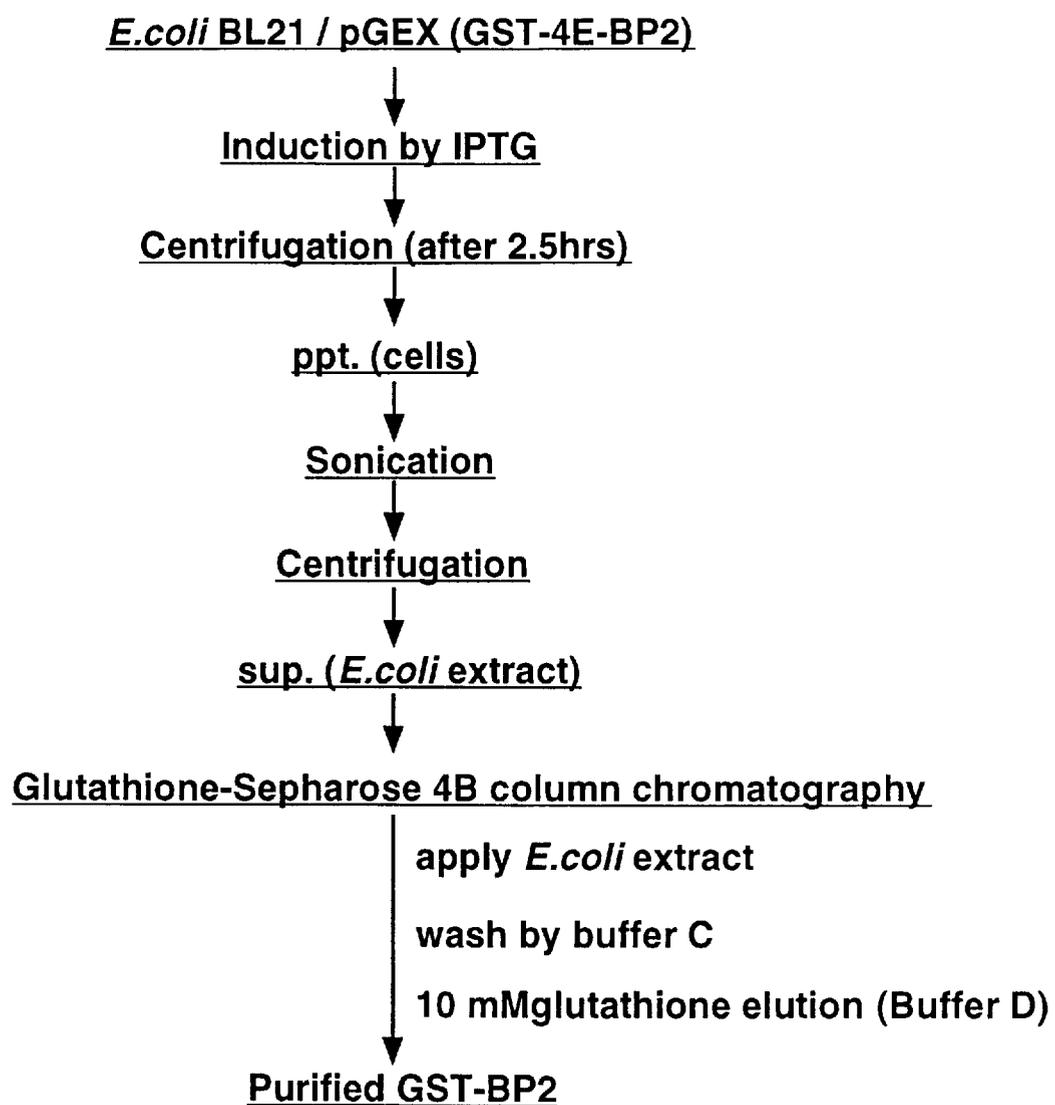
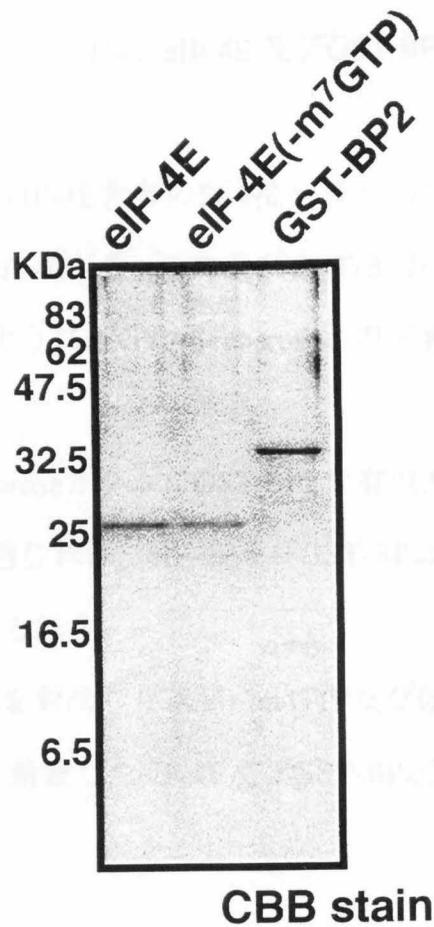


図2-6 GST-BP2の調製



SDS-PAGE of purified samples, using 15% polyacrylamide.

Lanes: eIF-4E; the purified recombinant eIF-4E (m^7 GTP bound form).

eIF-4E(m^7 GTP): the re-chromatographed eIF-4E eluted with buffer B (m^7 GTP-free form)

GST-BP2: the purified recombinant GST-BP2.

図2-7 eIF-4E(m^7 GTP)及びGST-BP2の確認

第二項 アフィニティーカラムクロマトグラフィーによる分析

1 序

第一項で、eIF-4E (-m⁷GTP)及びGST-BP2をそれぞれ単離精製した。しかし、大量発現させたeIF-4E及びGST-BP2のお互いの結合能（生化学的な活性）は確認していない。そこで速度論的な解析を行なう前に、eIF-4E及びGST-BP2の生化学的な活性を定性的に確認することにした。

m⁷GTP-SepharoseカラムにeIF-4E含有のSf-9抽出液を通じた後に、GST-BP2含有の大腸菌抽出液を通じれば、eIF-4E上のm⁷GTP及びGST-BP2の結合位置が立体的に独立していれば、図2-3に示したようにm⁷GTP-Sepharoseとの三者複合体を形成すると考えられる。

同様に、Glutathione-SepharoseカラムにGST-BP2含有の大腸菌抽出液を通じた後に、eIF-4E含有のSf-9抽出液を通じれば、eIF-4E及びGST-BP2がGlutathione-Sepharoseとの三者複合体を形成すると考えられる。

よって、この三者複合体を形成した状態にm⁷GTP及びGlutathioneを通じ、eIF-4E及びGST-BP2が溶出されれば、精製したeIF-4E及びGST-BP2がお互いに結合能を保持していると判断できる。

2 実験方法

2-1 eIF-4E含有のSf-9抽出液の調製

対数増殖中(2.0×10^6 cells/ml)のSf-9細胞に増幅組換えウイルスを感染させ、55hr経過後遠心分離後に感染細胞を回収した。回収した感染細胞を超音波破碎後、遠心分離で不溶性と不溶性分画に分離した。その可溶性分画をeIF-4E含有のSf-9抽出液とした。

2-2 GST-BP2含有の大腸菌抽出液の調製

E. coli BL21をpGEX-BP2で形質転換し、得られた形質転換体をLB/Amp液体培地、37℃、12時間培養した。新たに用意したLB/Amp液体培地に対して12時間培養液を1/100量加えて、OD₆₀₀=0.5まで培養した時点で終濃度100μMとなるようにIPTGを添加して

融合蛋白質の誘導を行ない、さらに2.5時間経過後に集菌した。超音波破碎後、遠心分離の上清をGST-BP2含有の大腸菌抽出液とした。

2-3 m⁷GTP-Sepharoseカラムクロマトグラフィーによる分析

2-1で調製したeIF-4E含有のSf-9抽出液をあらかじめBuffer A (20mM HEPES/KOH pH7.5, 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 100mM KCl)で平衡化したm⁷GTP-Sepharoseカラムに通じた後、buffer Aでカラムを洗浄した。さらにGST-BP2含有の大腸菌抽出液を通じて再度buffer Aでカラムを洗浄後、buffer B (buffer A + 100 μM m⁷GTP)で溶出してAmicon-10で濃縮した。各段階でのサンプルをSDS-PAGE及びウエスタンブロットで分析した。実験操作の概略及び結果は図2-8に示した。

2-4 Glutathione-Sepharoseカラムクロマトグラフィーによる分析

2-2で調製したGST-BP2含有の大腸菌抽出液をあらかじめTBS (20 mM Tris/HCl pH 7.5 and 150 mM NaCl)で平衡化したGlutathione-Sepharoseカラムに通じた後、buffer C (TBS + 0.1 mM Glutathione)で洗浄した。さらにeIF-4E含有のSf-9抽出液を通じて再度buffer Aでカラムを洗浄後、buffer D (TBS + 10 mM Glutathione)で溶出してAmicon-10で濃縮した。各段階でのサンプルをSDS-PAGE及びウエスタンブロットで分析した。実験操作の概略及び結果は図2-9に示した。

3 実験結果

3-1 m⁷GTP-Sepharoseカラムクロマトグラフィーによる分析

図2-8より、最終的なbuffer B (buffer A + 100 μM m⁷GTP)による溶出分画 (レーン5)に、eIF-4EとGST-BP2が含まれていることが確認できた。

3-2 Glutathione-Sepharoseカラムクロマトグラフィーによる分析

図2-9より、最終的なbuffer D (TBS + 10 mM Glutathione)による溶出分画 (レーン5)にeIF-4EとGST-BPが含まれていることが確認できた。

4 考察

m^7 GTP-Sepharoseカラムクロマトグラフィーによる結果は、Sf-9抽出液中のeIF-4Eが m^7 GTP-Sepharoseに吸着し、さらに大腸菌抽出液中のGST-BP2がeIF-4Eを介して m^7 GTP-Sepharoseに吸着したことを示しており、組換えeIF-4EがGST-BP2と結合する活性を持っていることを示すものである。

同様に、Glutathione-Sepharoseカラムクロマトグラフィーの結果も、大腸菌抽出液中のGST-BP2がGlutathione-Sepharoseに吸着し、Sf-9抽出液中のeIF-4EがGST-BP2を介してGlutathione-Sepharoseに吸着したことを示した。これらの結果は、組換えeIF-4EとGST-BP2がお互いに生化学的な活性を持っていることを示している。また、GST-BP2分子中のGST部位がeIF-4Eとの結合に影響を及ぼさないことも確認できた。

さらに、この結果はeIF-4EがGST-BP2と結合するばかりでなく、キャップアナログと三者複合体を形成できることを示している。つまり生体内において4E-BPが、遊離したeIF-4E分子とeIF-4G分子との結合を抑制することだけではなく、mRNA上のキャップ構造と複合体を形成したeIF-4EとeIF-4G分子との結合を抑制することによっても、翻訳開始の制御が可能であることを示している。言い換えれば、これは生体内で、キャップ構造と結合したeIF-4Eに4E-BPが結合して、翻訳を抑制している状態が存在している可能性を秘めていることを示している。

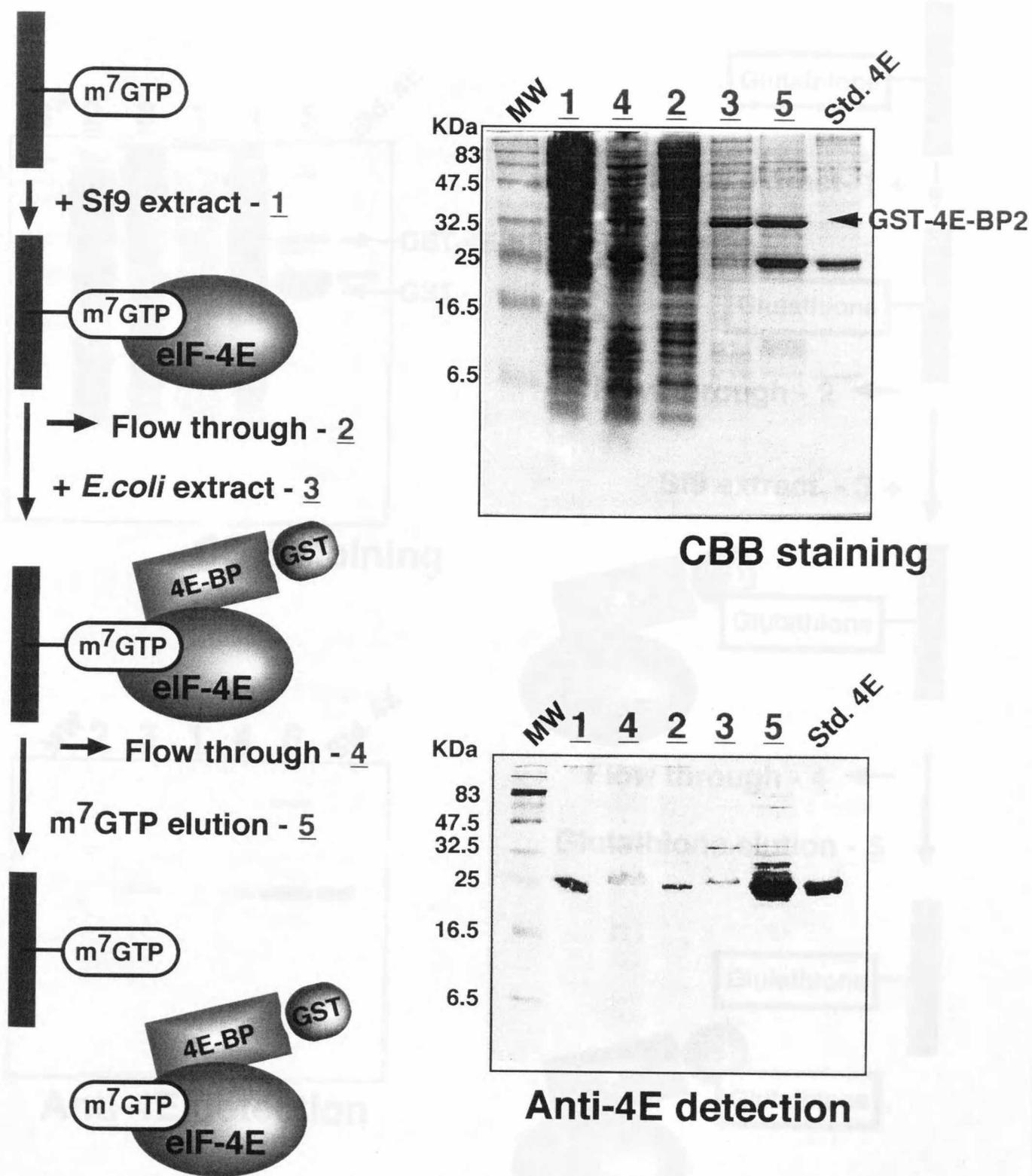


図2-8 m⁷GTP-Sepharoseカラムクロマトグラフィーによる解析

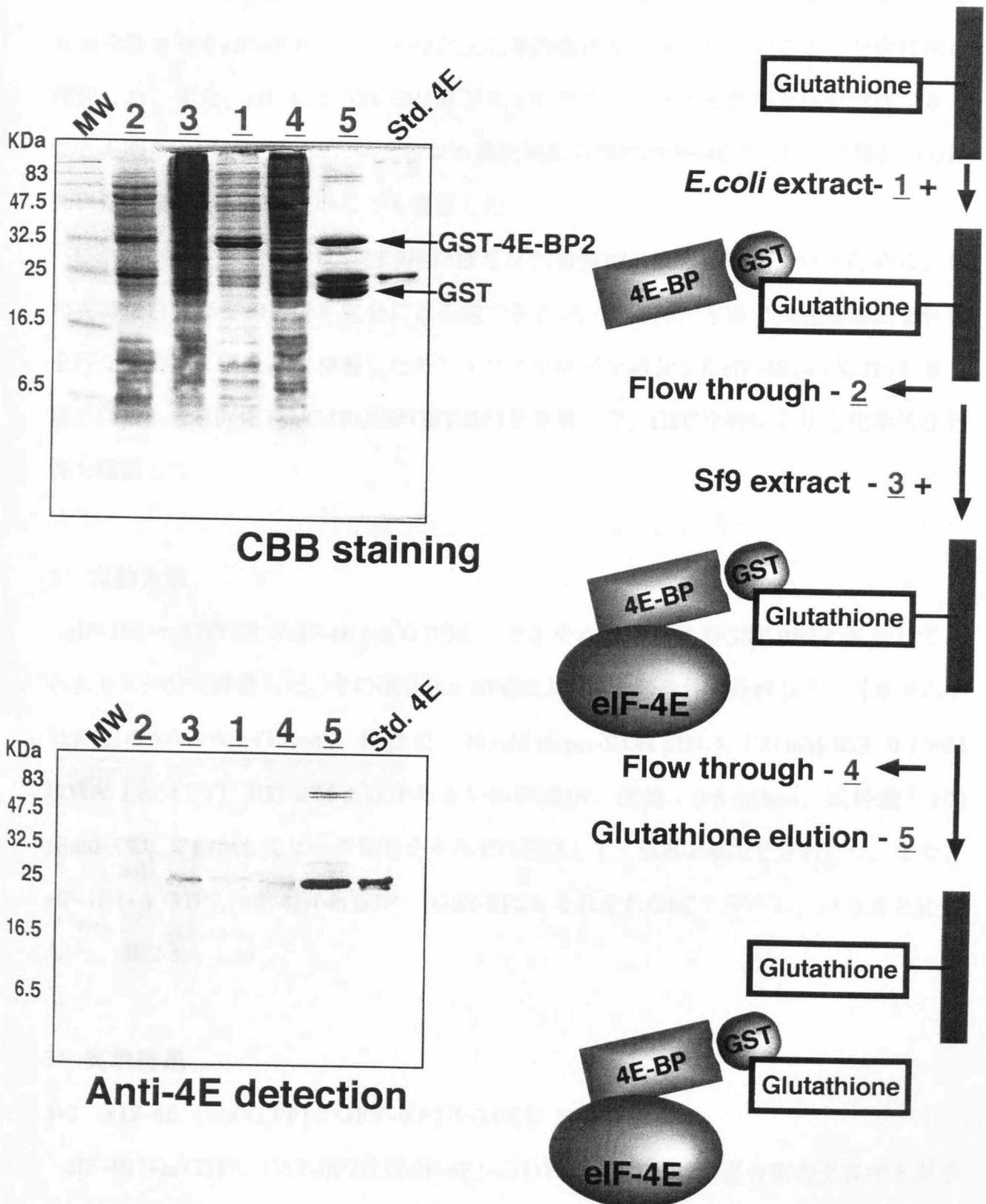


図2-9 Glutathione-Sepharoseカラムクロマトグラフィーによる解析

第三項 GPCによる分析

1 序

第一項でeIF-4E (-m⁷GTP)及びGST-BP2をそれぞれ単離精製し、第二項では本論文で大量発現させたeIF-4E及びGST-BP2が生化学的な活性を保持していることを定性的に確認した。また、eIF-4EがGST-BP2及びキャップアナログと三者複合体を形成できることも明らかにし、4E-BPの結合による翻訳開始の抑制がeIF-4Eのキャップ構造への結合には直接影響していないことも確認した。

しかしながら第二項では、Sf-9抽出液及び大腸菌抽出液を使用しているために、他の夾雑蛋白質などの影響を完全には否定できない。そこで、本項では速度論的な解析を行なう前に、第一章で精製したキャップアナログを結合したeIF-4E (+m⁷GTP)と第一項で精製したeIF-4E (-m⁷GTP)及びGST-BP2を使用して、GPC分析により生化学的な活性を確認した。

2 実験方法

eIF-4E (+m⁷GTP)及びeIF-4E (-m⁷GTP)を、それぞれ等モル量のGST-BP2と混合して、氷水中に30分間静置した。その混合液をGPCによって次の条件で分析した。(カラム：TSKgel G3000SW_{XL} (Tosoh)、移動相：20 mM Hepes-KOH pH7.5, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 μM m⁷GTPあるいは無添加、流速：0.5 ml/min、試料量：100 pmol) OD₂₈₀で検出したピーク分画をそれぞれ回収して、SDS-PAGEで分析した。また、eIF-4E (+m⁷GTP)、eIF-4E (-m⁷GTP)、GST-BP2もそれぞれGPCで分析し、混合液と比較した。(図2-10、a,b)

3 実験結果

3-1 eIF-4E (+m⁷GTP)とGST-BP2のGPCによる分析

eIF-4E (+m⁷GTP)、GST-BP2及びeIF-4E (+m⁷GTP)とGST-BP2の混合物のクロマトグラムを図2-10のaに示した。また、それぞれのクロマトグラムから得られたピークの

SDS-PAGEを示した。混合液のクロマトグラムiiiでは、eIF-4E (+m⁷GTP)のピーク2やGST-BP2のピーク1よりも高分子量に、新しいピーク3が出現していた。このピーク3のSDS-PAGEにより、このピーク3がeIF-4E (+m⁷GTP)とGST-BP2の複合体形成によるものであることが判明した。

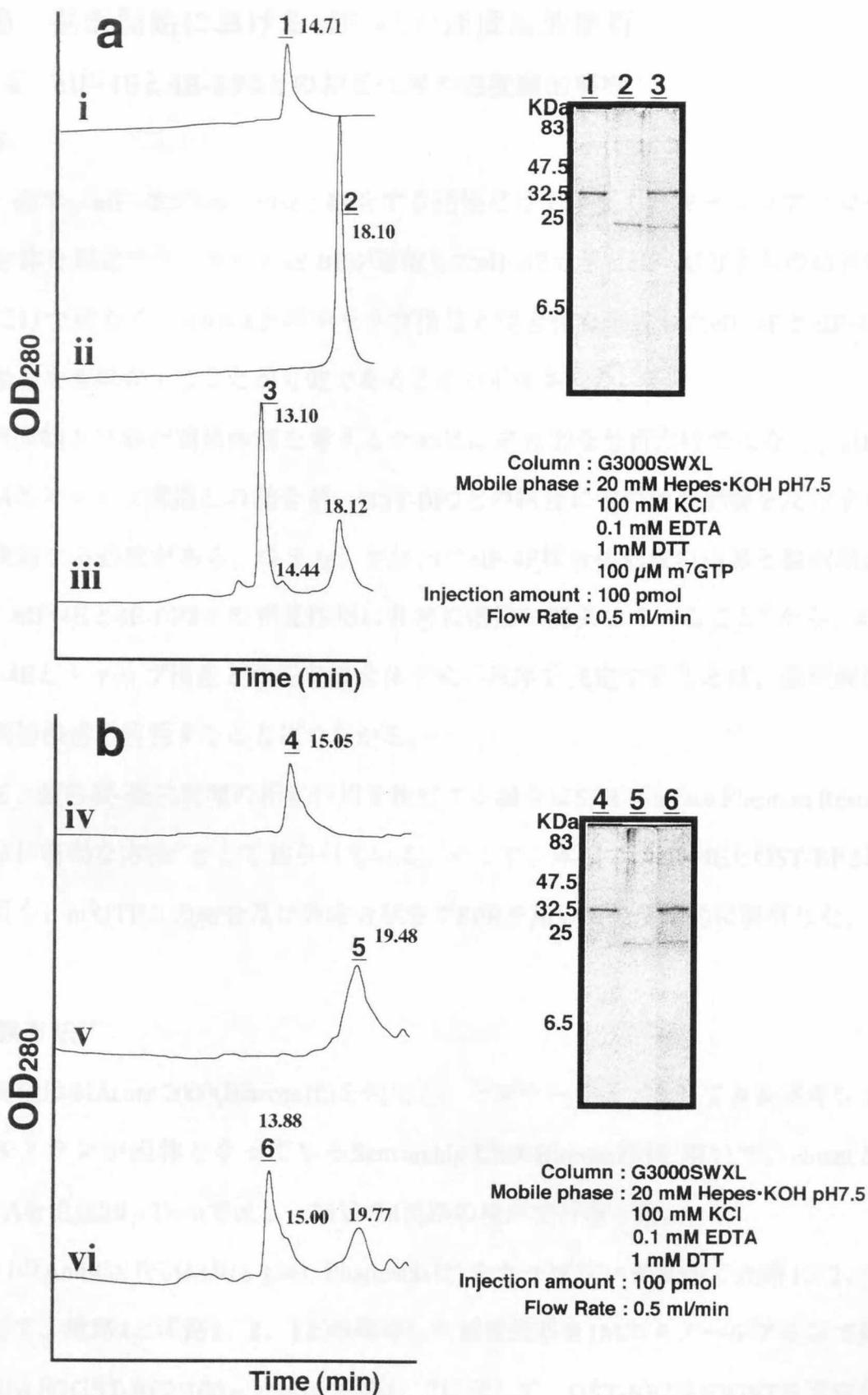
3-2 eIF-4E (-m⁷GTP)とGST-BP2のGPCによる分析

3-1と同様にそれぞれのクロマトグラム及びSDS-PAGEを図2-10のBに示した。混合物のクロマトグラムviでは、eIF-4E (-m⁷GTP)のピーク5やGST-BP2のピーク4よりも高分子量に、3-1と同様に新しいピーク6が出現し、SDS-PAGEでこのピーク6がeIF-4E (-m⁷GTP)とGST-BP2の複合体によるものであることが判明した。

4 考察

eIF-4E (+m⁷GTP)及びeIF-4E (-m⁷GTP)共に、他の因子の存在なしで、4E-BP2と結合できることが確認できた。第二項で記述したように、eIF-4EがGST-BP2と結合する活性を持っていることばかりでなく、キャップアナログとの三者複合体を形成できることを定性的に確認できた。

GPC分析においても生体内で、4E-BPが遊離したeIF-4E分子とeIF-4G分子との結合を抑制するだけでなく、mRNA上のキャップ構造と複合体を形成したeIF-4EとeIF-4G分子との結合を妨害することによっても、翻訳開始の抑制が可能であることが確認できた。



(a) GPC chromatograms to reveal the interaction between m7GTP-bound eIF-4E and GST-BP2

(b) GPC chromatograms to reveal the interaction between m7GTP-free eIF-4E and GST-BP2

i : purified GST-BP2

ii : m7GTP-bound eIF-4E

iii : mixture of purified GST-BP2 and m7GTP bound eIF-4E

iv : purified GST-BP2

v : m7GTP-free eIF-4E

vi : mixture of purified GST-BP2 and m7GTP-free eIF-4E

The retention times are indicated, and the result of SDS-PAGE of each peak is shown as insets.

図2-10 eIF-4EとGST-BP2のGPC分析

第二節 翻訳開始におけるeIF-4Eの速度論的解析

第一項 eIF-4Eと4E-BP2との相互作用の速度論的解析

1 序

第一節で、eIF-4EがGST-BP2と結合する活性だけではなく、キャップアナログと三者複合体を形成でき、さらに4E-BPが遊離したeIF-4E分子とeIF-4G分子との結合を抑制するだけではなく、mRNA上のキャップ構造と複合体を形成したeIF-4EとeIF-4G分子との結合をも抑制することが可能であることが示唆された。

翻訳開始及び翻訳調節機構を考えるためには定性的な分析だけではなく、eIF-4EのmRNAのキャップ構造との結合が、GST-BP2との結合にどのような影響を及ぼすかを詳細に検討する必要がある。つまり、生体内でeIF-4F複合体形成の阻害と翻訳開始の抑制は、eIF-4Eと4E-BP2との相互作用に非常に密接に関係していること⁶²から、4E-BP2とeIF-4Eとキャップ構造との三者複合体形成の順序を決定することは、翻訳開始及び翻訳調節機構を解明することにつながる。

現在、蛋白質-蛋白質間の相互作用を検討する場合にSPR (Surface Plasmon Resonance) は非常に有効な方法⁵⁹として知られている。そこで、本項ではeIF-4EとGST-BP2との相互作用を、m⁷GTPとの結合及び非結合状態でSPRを用いて速度論的に解析した。

2 実験方法⁶⁰

PR測定はBIAcore 2000(Biacore社)を使用し、センサーチップとしてカルボキシメチルデキストランが担体となっているSensorchip CM5(Biacore社)を用いて、eluentとしてbuffer Aを流速20 μ l/minで流し、25°Cで4流路の検出で行なった。

70 μ lのAnti-GST抗体(50 μ g/ml, Pharmacia社)をカップリング反応で流路1、2、3に固定化して、流路4と流路1、2、3上の残存した活性残基を1Mエタノールアミンで処理した。40 μ lのGST-BP2(100 μ g/ml)を流路1、2に流して、GST-BP2中のGSTを固定化したAnti-GST抗体で捕捉した。対照実験として、40 μ lのGST(100 μ g/ml)を流路3に流してAnti-GST抗体で捕捉した。その状態で、80 μ lのeIF-4Eを4流路すべてに流して、Surface

Plasmon Resonanceによる相互作用を検出した。測定方法の概略を図2-11に示した。

測定終了ごとに、10 mM glycine-HCl pH 2.2を4流路すべてに流して固定化したAnti-GST抗体の再生を行なった。

eIF-4EはeIF-4E(+m⁷GTP)、eIF-4E(-m⁷GTP)、eIF-4E(-m⁷GTP)にm⁷GTPを添加したサンプル：eIF-4E(-m⁷GTP)+m⁷GTP、eIF-4E(-m⁷GTP)にGTPを添加したサンプル：eIF-4E(-m⁷GTP)+GTPについて、それぞれの濃度を変化させて測定した。

対照実験であるGSTのセンサグラムを、対応するGST-BP2のセンサグラムより減算して、特異的な相互作用のセンサグラムを得た。センサグラムのカーブフィッティング及び速度論的な定数は、BIA Evaluationプログラムで算出した。

3 実験結果

GST-BP2とeIF-4E(+m⁷GTP)とのセンサグラムを図2-12aに、GST-BP2とeIF-4E(-m⁷GTP)とのセンサグラムを図2-12bに、eIF-4E(-m⁷GTP)+m⁷GTPとのセンサグラムを図2-12cに、eIF-4E(-m⁷GTP)+GTPとのセンサグラムを図2-12dに示した。

また、それぞれのセンサグラムからもとめた速度論的な定数を表2-1に示した。

4 考察

GST-BP2とeIF-4E(+m⁷GTP)の相互作用(図2-12a)と、GST-BP2とeIF-4E(-m⁷GTP)の相互作用(図2-12b)との間には大きな差異が観察された。最も大きな違いは図中にeIF-4E ONで示された会合状態におけるで、計算された k_{on} 値は $7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (+m⁷GTP)と $4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (-m⁷GTP)であった。一方、 k_{off} 値はほとんど差異がなかった。(表2-1)算出されたGST-BP2とeIF-4E(+m⁷GTP)との K_D 値は $3 \times 10^{-9} \text{ M}$ で、GST-BP2とeIF-4E(-m⁷GTP)との相互作用の K_D 値は $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ であり、m⁷GTPのeIF-4Eへの結合はGST-BP2とeIF-4Eとの親和性を増すことがわかった。

このGST-BP2とeIF-4Eとの親和性の差異が、eIF-4E(-m⁷GTP)の1M KClによる変性に依存したものでないことは、eIF-4E(-m⁷GTP)にm⁷GTP加えた場合にGST-BP2とeIF-4E

との親和性が回復（図2-12c）し、eIF-4E (-m⁷GTP)にGTP加えた場合には親和性が回復しなかった（図2-12d）ことから確認できる。

図2-3に示したように、eIF-4E上でキャップ構造と4E-BPの結合部位はまったく反対側に独立に位置している。したがって、このGST-BP2とeIF-4Eとの親和性の増加は、m⁷GTPのeIF-4Eへの結合によるアロステリックな構造変化によるものと考えている。

また、このm⁷GTPのeIF-4Eへの結合によるGST-BP2とeIF-4Eとの親和性の増加は、生体内での翻訳開始の制御に関係していると思われる。もしもeIF-4Eが単独でmRNA上のキャップ構造に結合した場合には、eIF-4Gの浪費を防ぐためにeIF-4Gよりも先に4E-BPが結合する必要があると思われる。eIF-4GがeIF-4EやPapb(Poly (A) tail binding protein)との結合を介してmRNAの環状化するとの報告⁶¹もあることから、リボソームのリサイクルなどとも関係があるのかも知れない。

eIF-4E(+m⁷GTP or -m⁷GTP) / 4E-BP2

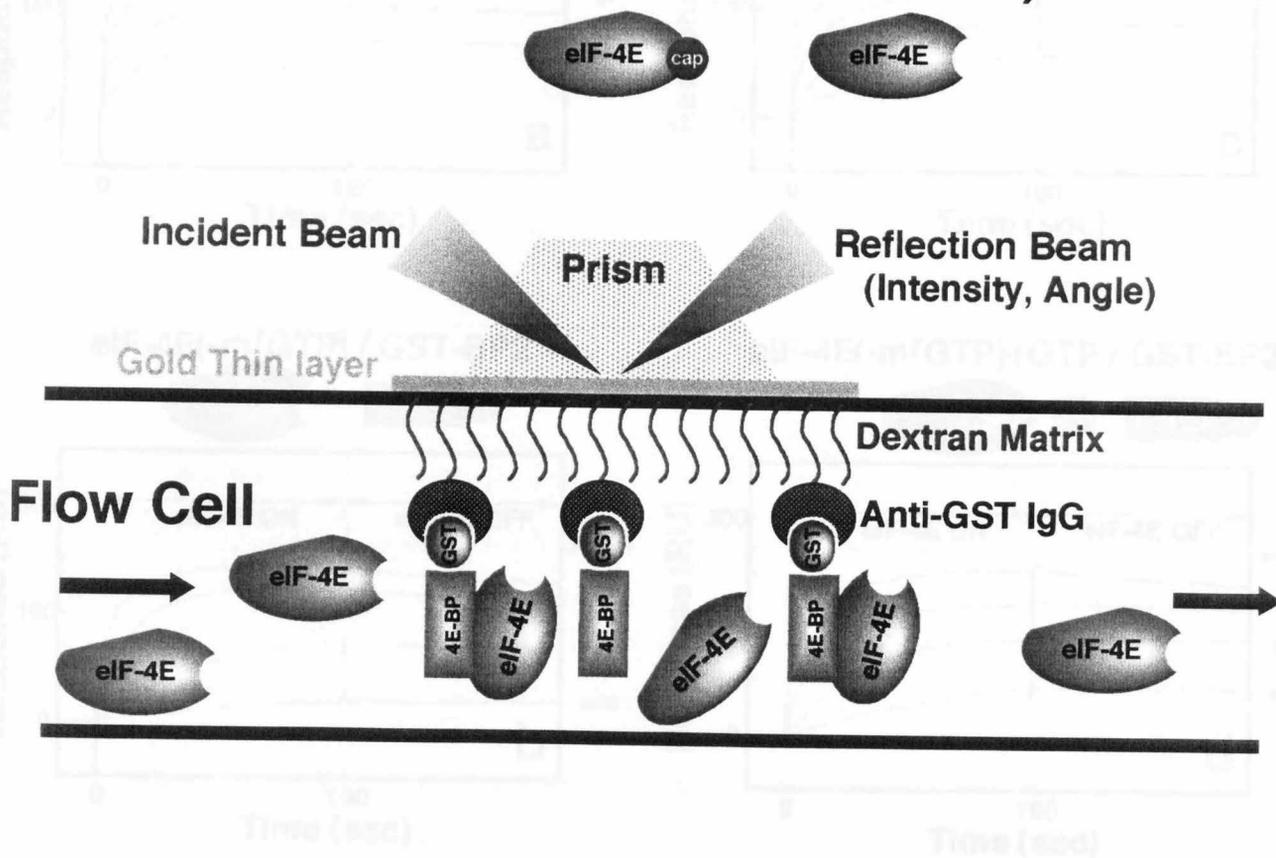
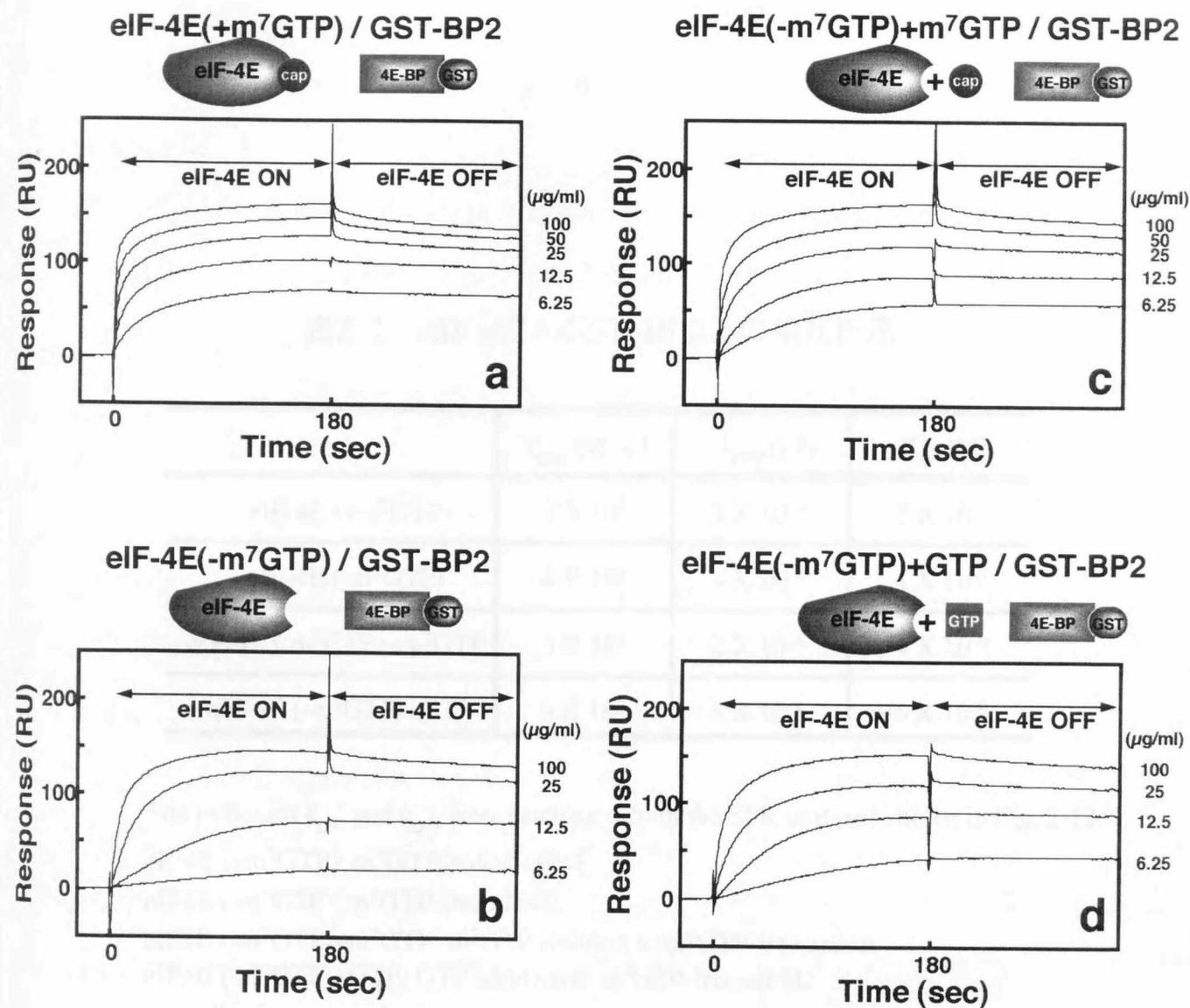


図2-11 SPR(Surface Plasmon Resonance)による測定方法概略



- (a) interaction between m⁷GTP-bound eIF-4E and GST-BP2
 (b) interaction between m⁷GTP-free eIF-4E and GST-BP2
 (c) interaction between m⁷GTP-added m⁷GTP-free eIF-4E and GST-BP2
 (d) interaction between GTP-added m⁷GTP-free eIF-4E and GST-BP2.

The plots show how the SPR signal responded to the addition of eIF4E (at time 0) to a sensorchip bearing GST-BP2.

Arrows above the traces indicate the phases of binding (after eIF4E addition) and of release (after exposure of the chip to eIF4E-free buffer).

The estimated on- and off-rates are summarized in Table 2-1.

図2-12 eIF-4EとGST-BP2との相互作用のSPR測定

表2-1 eIF-4EとGST-BP2との相互作用

	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (M)
eIF-4E (+m ⁷ GTP)	7×10^4	2×10^{-4}	3×10^{-9}
eIF-4E (-m ⁷ GTP)	4×10^3	4×10^{-4}	1×10^{-7}
eIF-4E (-m ⁷ GTP)+m ⁷ GTP	5×10^4	2×10^{-4}	4×10^{-9}
eIF-4E (-m ⁷ GTP)+GTP	9×10^3	5×10^{-4}	6×10^{-8}

The indicated k_{on} and k_{off} were calculated from the SPR analyses shown in Fig. 2-12.

eIF4E (+m⁷GTP); m⁷GTP-bound eIF4E

eIF4E (-m⁷GTP); m⁷GTP-free eIF4E

eIF4E (-m⁷GTP)+m⁷GTP; m⁷GTP addition to m⁷GTP-free eIF4E

eIF4E (-m⁷GTP)+GTP; GTP addition to m⁷GTP-free eIF4E

第二項 eIF-4Eとキャップアナログとの速度論的解析

1 序

第一項でeIF-4Eと4E-BP2との相互作用が、eIF-4Eがキャップアナログと結合することによって親和性が増大することを明らかにした。そこで、eIF-4Eとキャップアナログとの相互作用に対して、4E-BP2のeIF-4Eへの結合がどのような影響を及ぼすかを、SPRを測定し解析することを考えた。また、このeIF-4EとキャップアナログとのSPRを測定で翻訳開始機構がstepwise assembly model^{53,54}とperformed assembly model^{56,57}のどちらで制御されているかも検討できる可能性がある。

SPRの測定試料は分子量がより大きいものが適しているため⁶⁴、本項ではキャップアナログとしてm⁷GTPの代わりに、東京工業大学石川正英博士より提供をうけたm⁷GpppAを使用した。

2 実験方法

2-1 4E-BP2結合のeIF-4EとキャップアナログとのSPR測定⁶⁰

SPR測定はBIAcore 2000(Biacore社)を使用し、第一項と同条件で行なった。

70 μ lのAnti-GST抗体(50 μ g/ml, Pharmacia社)をカップリング反応で流路1、2、3に固定して、流路4と流路1、2、3上の残存した活性残基を1Mエタノールアミンで処理した。40 μ lのGST-BP2(100 μ g/ml)を流路1、2に流して、GST-BP2中のGSTを固定化したAnti-GST抗体で捕捉した。対照実験として、40 μ lのGST(100 μ g/ml)を流路3に流してAnti-GST抗体で捕捉した。次に80 μ lのeIF-4E (-m⁷GTP)を4流路すべてに流して、流路1、2上のGST-BP2中の4E-BP2部位を介して捕捉した。その状態で、80 μ lのm⁷GpppAを4流路すべてに流して、SPRによる相互作用の検出を行なった。測定方法の概略を図2-13に示した。

測定終了ごとに、10 mM glycine-HCl pH 2.2を4流路すべてに流して固定化したAnti-GST抗体を再生した。m⁷GpppAは濃度を変化させて測定した。

対照実験であるGSTのセンサグラムを、対応するGST-BP2のセンサグラムより減算

して、特異的な相互作用のセンサグラムを得た。センサグラムのカーブフィッティング、速度論的な定数はBIA Evaluationプログラムで算出した。

2-2 4E-BP2非結合のeIF-4EとキャップアナログとのSPR測定

SPR測定に先立って、eIF-4E抗血清から特異的なAnti-eIF-4E抗体の精製を、eIF-4Eをカップリング反応で固定化したHiTrap™ NHS-activated(Pharmacia社)を用いてアフィニティークロマトグラフィーで精製した。

SPR分析はBIAcore 2000(Biacore社)を使用し、第一項と同条件で行なった。

175 μ lのAnti-eIF-4E抗体(20 μ g/ml)をカップリング反応で流路1、2に、また175 μ lのAnti-羊IgG抗体(20 μ g/ml, コスモバイオ社)をカップリング反応で流路3に固定して、流路4と流路1、2、3上の残存した活性残基を1Mエタノールアミンで処理した。

次に80 μ lのeIF-4E (-m⁷GTP)を4流路すべてに流して、流路1、2上の固定化したAnti-eIF-4E抗体で捕捉した。その状態で80 μ lのm⁷GpppAを4流路すべてに流して、SPRによる相互作用の検出を行なった。測定方法の概略を図2-14に示した。

測定終了ごとに、10 mM glycine-HCl pH 2.2を4流路すべてに流して固定化したAnti-eIF-4E抗体を再生した。m⁷GpppAは濃度を変化させて測定した。

対照実験であるAnti-羊IgG抗体のセンサグラムを、対応するAnti-eIF-4E抗体のセンサグラムより減算して、特異的な相互作用のセンサグラムを得た。センサグラムのカーブフィッティング、動力学的な定数はBIA Evaluationプログラムで算出した。

3 実験結果

4E-BP2結合のeIF-4E (-m⁷GTP)とm⁷GpppAとのセンサグラムを図2-15aに、4E-BP2非結合のeIF-4E (-m⁷GTP)とm⁷GpppAとのセンサグラムを図2-15bに示した。また、それぞれのセンサグラムからもとめた速度論的な定数を表2-2に示した。

4 考察

測定したeIF-4Eとm⁷GpppAとの相互作用は、4E-BP2のeIF-4Eへの結合に関係なく非常

に弱いものであった。算出された K_D 値は $3 \times 10^{-2} \text{M}$ (4E-BP2結合)、 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ (4E-BP2非結合)と非常に大きな値であった。この値は分光学的にeIF-4Eとキャップアナログとの結合定数をもとめた森野らの結果⁴⁵とほぼ同じであり、4E-BP2結合と非結合で差はあるものの生化学的に意味のある数値ではないと考える。

これらの結果は生体内でのeIF-4EとmRNAのキャップ構造との結合には、他の翻訳開始因子が必要不可欠であることを示している。その翻訳開始因子は、RNA結合部位を持っており、酵母においてeIF-4Eとキャップ構造との相互作用を強めるとの報告例^{62,63}のあるeIF-4Gに間違いない。生体内においては、eIF-4EとeIF-4Gが協調してキャップ構造を持ったmRNAのそれぞれの認識部位と結合して、翻訳開始の引き金になっていると考える。

よって筆者は本項の結果より、翻訳開始はperformed assembly modelにしたがっているものと判断した。

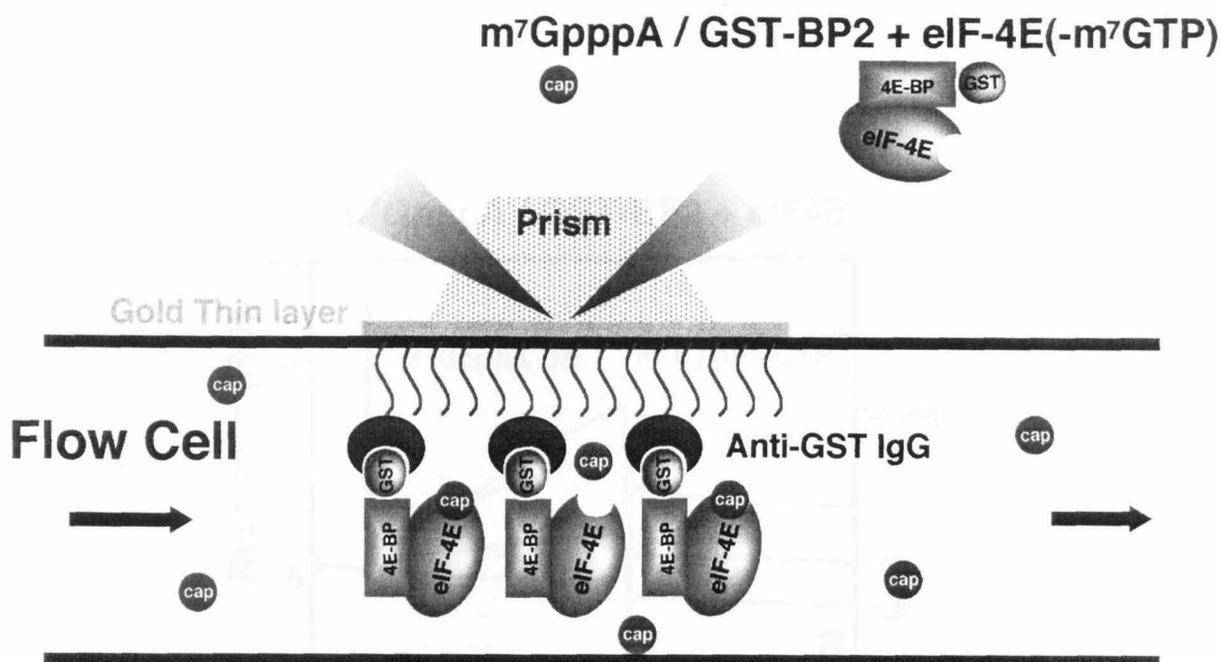


図2-13 4E-BP2結合のeIF-4EとキャップアナログとのSPR測定方法概略

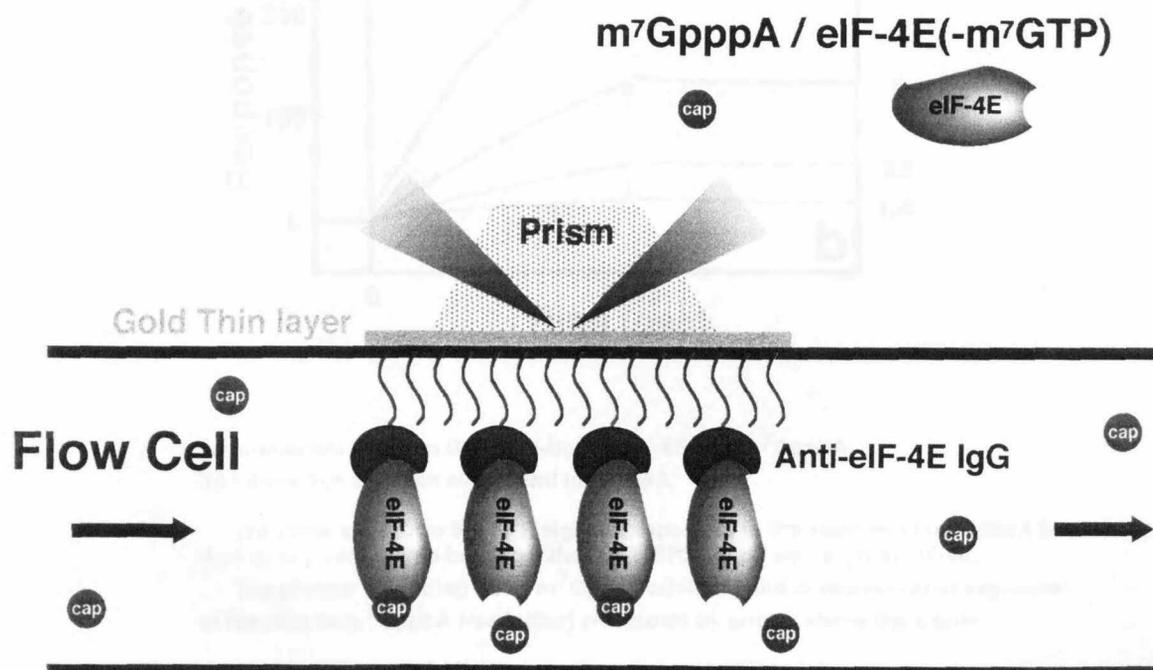
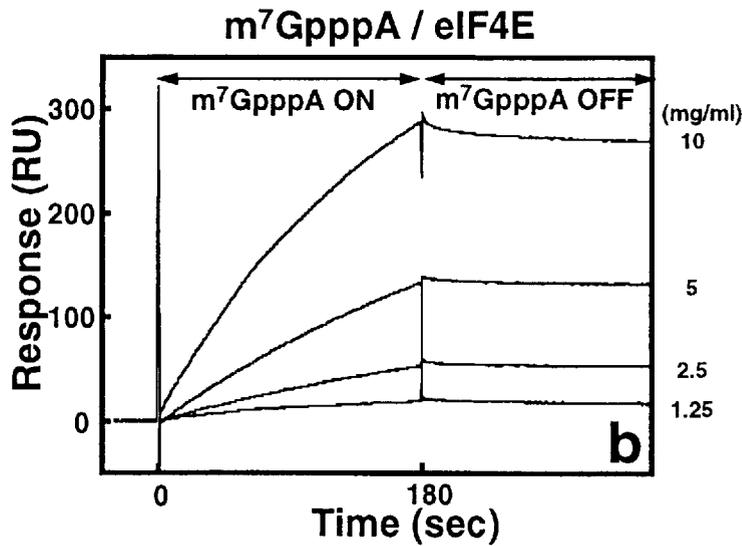
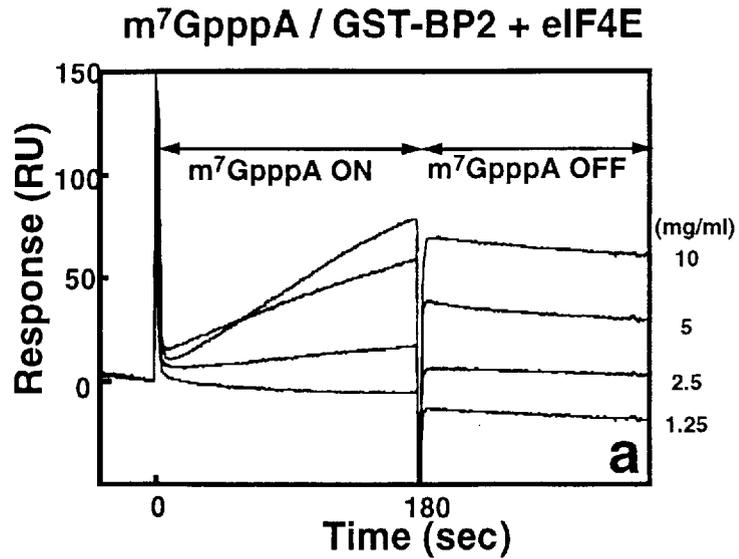


図2-14 4E-BP2非結合のeIF-4EとキャップアナログとのSPR測定方法概略



- (a) interaction between GST-BP2-bound eIF-4E and m⁷GpppA
 (b) interaction between eIF-4E and m⁷GpppA

The plots show how the SPR signals responded to the addition of m⁷GpppA (at time 0) to a sensorchip bearing either GST-BP2-bound eIF-4E (a) or eIF-4E.

The phases of binding (after m⁷GpppA addition) and of release (after exposure of the chip to m⁷GpppA-free buffer) are shown by arrows above the traces.

The estimated on- and off-rates are summarized in Table 2-2.

図2-15 eIF-4Eとキャップアナログとの相互作用のSPR測定

表2-2 m⁷GpppAと eIF-4Eとの相互作用

	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	K_D (M)
4E-BP2+ eIF-4E	0.13	4 X 10 ⁻³	3 X 10 ⁻²
eIF-4E	5.5	6 X 10 ⁻⁴	1 X 10 ⁻⁴

The indicated k_{on} and k_{off} were calculated from the SPR analyses shown in Fig. 2-15.
 4E-BP2+ eIF-4E; complex of m⁷GTP-free eIF-4E and GST-BP
 eIF4E ; m⁷GTP-free eIF-4E

まとめ

細胞抽出液を使用した2種類のアフィニティーカラムクロマトグラフィーによって、本論文で調製したeIF-4E及びGST-BP2が生化学的な活性を有していること、そしてeIF-4EがGST-BP2と結合するばかりでなく、キャップアナログと三者複合体を形成できることを定性的に明らかにした。

精製したキャップアナログ結合及び非結合2種類のeIF-4Eと精製したGST-BP2によるGPC分析で、eIF-4Eが他の因子の存在なしで、4E-BP2と結合できることが確認した。また、eIF-4Eがキャップアナログと三者複合体を形成できることを確認した。

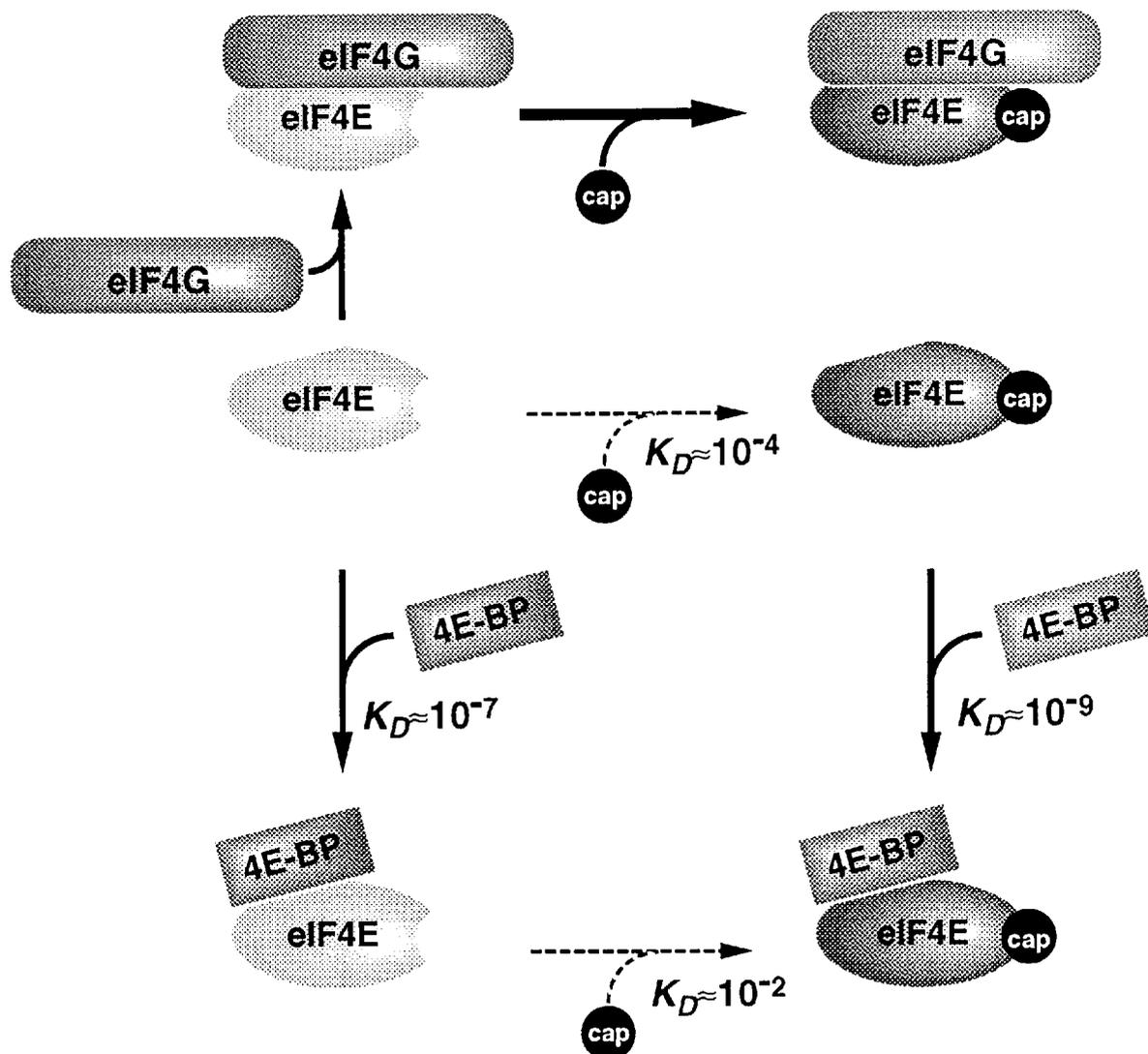
生体内において4E-BPは単独のeIF-4E分子とeIF-4G分子との結合を抑制するだけでなく、mRNA上のキャップ構造と複合体を形成したeIF-4EとeIF-4G分子との結合をも抑制することによっても、翻訳開始の制御が可能であることが示唆された。

GST-BP2とeIF-4Eとの相互作用のSPR測定で、 m^7 GTPのeIF-4Eへの結合の有無で会合状態における大きな差異が観察され、 K_D 値はそれぞれ m^7 GTP結合のeIF-4Eは 3×10^9 M、 m^7 GTP非結合のeIF-4Eは 1×10^7 Mであった。 m^7 GTPのeIF-4Eへの結合はGST-BP2とeIF-4Eとの親和性を増加させた。この親和性の増加は、 m^7 GTPのeIF-4Eへの結合によるアロステリックな構造の変化によるものと思われる。

eIF-4Eと m^7 GpppAとの相互作用のSPR測定で、この相互作用は4E-BP2のeIF-4Eへの結合に関係なく非常に微弱であり、生化学的に意味のある数値ではなかった。

これら結果より、生体内でのeIF-4EとmRNAのキャップ構造との結合には、他の翻訳開始因子が必要不可欠であり、それはRNA結合部位を持っているeIF-4Gに違いない。生体内においては、eIF-4EとeIF-4Gが協調してキャップ構造を持ったmRNAのそれぞれの認識部位と結合して、翻訳開始の引き金になっていると考える。

本項の結果より、筆者はperformed assembly modelを支持する。最後に本項で得られたデータによる翻訳開始の制御モデルを図2-16に示した。



In translational initiation, eIF4E binds to either 4E-BP or eIF4G. The 4E-BP-bound eIF4E can not recognize the cap structure. EIF4E can not recognize the cap structure alone, but can recognize the cap structure by participation with the eIF4G *In vivo*.

図2-16 翻訳開始の制御モデル

結論

本論で筆者は *Xenopus laevis* eIF-4E 遺伝子の大量発現系をバキュロウイルス-昆虫細胞システムによって構築し、キャップ構造アナログである m⁷GTP-Sepharose によるアフィニティー精製で Sf-9 培養液 1000ml 当り 4mg の組換え eIF-4E を精製することに成功した。

組換え eIF-4E が、天然の eIF-4E と完全に同一の分子であることを MALDI-TOFMS 分析及びペプチドマッピングで同定した。その際に、eIF-4E にはアミノ末端のメチオニンが解離し、2 残基目のアラニンにアセチル化の修飾が起こっている事を明らかにした。

結晶化の検討を行ない、柱状の粗結晶を得ることに成功した。

アフィニティーカラムクロマトグラフィー及び GPC 分析で eIF-4E が GST-BP2 と結合するばかりでなく、キャップアナログと三者複合体を形成できることを定性的に明らかにし、さらに生体内において 4E-BP が遊離した eIF-4E 分子と eIF-4G 分子との結合を抑制するだけでなく、mRNA 上のキャップ構造と複合体を形成した eIF-4E と eIF-4G 分子との結合をも抑制することが可能であることを明らかにした。

GST-BP2 と eIF-4E との相互作用の SPR 測定によって、m⁷GTP の eIF-4E への結合は GST-BP2 と eIF-4E との親和性を増すこと、また eIF-4E と m⁷GpppA との相互作用の SPR 測定ではこの相互作用が 4E-BP2 の eIF-4E への結合に関係なく非常に弱いことを見出した。

本論文より、生体内での eIF-4E と mRNA のキャップ構造との結合には、他の翻訳開始因子が必要不可欠であり、それは RNA 結合部位を持っている eIF-4G と推測した。eIF-4E と eIF-4G が協調してキャップ構造を持った mRNA のそれぞれの認識部位と結合して、翻訳が開始がすると筆者は考え、performed assembly model を支持する。

試薬、溶液

試薬は、和光純薬等試薬メーカーの製品を用途に応じた品質の特級、生化学用等のも
のを使用した。酵素類は宝酒造、東洋紡等から購入した。試薬及び溶液（培地）の組成
等は下記に示したが、基本的にはMolecular Cloning (Sambrook, J., Fritsch, E. F., and
Maniatis, T.編、Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.)やCURRENT
PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Virginia Benson Chanda編、John Wiley & Sons,
Inc.)等の実験書にしたがった。器具、試薬及び溶液（培地、緩衝液）などは必要に応じ
て滅菌して使用した。

○LB (Luria-Bertani) 液体培地

1g/100ml	Bacto-tryptone
0.5g/100ml	Bacto-yeast extract
1g/100ml	NaCl

○LB/Amp液体培地：LB液体培地+100 μ g/ml Amp

○LB/Ampプレート：LB液体培地にBacto-agarを1.5%加え、オートクレーブ、冷却後、
終濃度100 μ g/mlでAmpを加えて固めた。

○LB/Amp、IPTG、X-Galプレート：LB液体培地にBacto-agarを1.5%加え、オートクレー
ブ、冷却後、終濃度200、40 μ g/mlでAmp、X-Gal (40mg/ml in DMF) を加えて固めた。
形質転換細胞と23.8mg/mlのIPTG 20 μ lをプレートに同時に塗布した。

○LB/Amp、Tc、IPTG、X-Galプレート：LB液体培地にBacto-agarを1.5%加え、オートク
レーブ、冷却後、終濃度200、25、40 μ g/mlでそれぞれAmp、Tc、X-Gal (40mg/ml in
DMF) を加えて固めた。形質転換細胞と23.8mg/mlのIPTG 20 μ lをプレートに同時に
塗布した。

○YPD液体培地

2g/100ml	Bacto-peptone
1g/100ml	Bacto-yeast extract
2g/100ml	Glucose (フィルター滅菌)

○YPDプレート：YPD液体培地にBacto-agarを1.5%加え、オートクレーブ、冷却して固めた。

○ウラシル合成液体培地 (Glucose)

1M	Sorbitol
6.7mg/ml	Yeast nitrogen base w/o amino acid
20mg/ml	Glucose (フィルター滅菌)
10 μ g/ml	Adenine Sulfate (フィルター滅菌)
40 μ g/ml	Arginine-HCl (フィルター滅菌)
20 μ g/ml	Histidine (フィルター滅菌)
60 μ g/ml	Isoleucine-HCl (フィルター滅菌)
60 μ g/ml	Leucine-HCl (フィルター滅菌)
50 μ g/ml	Lysine-HCl (フィルター滅菌)
20 μ g/ml	Methionine (フィルター滅菌)
50 μ g/ml	Phenylalanine (フィルター滅菌)
200 μ g/ml	Threonine (フィルター滅菌)
40 μ g/ml	Tryptophan (フィルター滅菌)
50 μ g/ml	Tyrosine (フィルター滅菌)

○ウラシル合成培地 (Glucose) プレート：0.67g/100mlのYeast nitrogen base w/o amino acidにBacto-agarを1.5%加えてオートクレーブ後、所定濃度になる様にGlucose及びアミノ酸溶液を加えて冷却して固めた。

○ウラシル合成液体培地 (Galactose)：ウラシル合成液体培地 (グルコース) 中の20mg/ml Glucoseの代わりに20mg/ml Galactoseを使用した。

○合成DNAは下記に配列のものをサイメディアより購入した。

5SCBAM：5'-GCGGGATCCAAAAAAATGGCTGCCGTGGAACCGGAAAAC-3'

4E31XB：5'-CCTTTGGATCCTCGAGATTGCTTGACGCAGTCTCCT-3'

4E36：5'-TTTAAGCTTCTGCAGTAAGAATACTTTGATGGCGTC-3'

5SCECO: 5'-CGGGAATTCAATTGAAGGTAGAATGGCTGCCGTGGAACCGGAAAAC-3'

3SCECO: 5'-GGGAATTCCTCGAGATTGCTTGACGCAGTCTCCT-3'

MIYOI: 5'-ACTTGGCAGGCTAATTTGAGATTGATTTCAAATTTGAT-3'

MIYOII: 5'-ATCAAATTTTGAAATCAATCTCAAATTAGCCTGCCAAGT-3'

NcoNEND: 5'-TTTGGTACCATGGCGGCCGTGGAACCGGA-3'

○TE Buffer

10mM Tris-HCl pH8.0

1mM EDTA

○Sample Buffer

2% SDS

100mM Dithiothreitol

0.01% Bromophenol blue

○5×MBN (Mung Bean Nuclease) Buffer

150mM NaOAc pH5.0

250mM NaCl

25% Glycerol

○10×TEN Buffer

100mM Tris-HCl pH7.6

10mM EDTA pH8.0

1M NaCl

○pYE Ura3: 東洋紡から購入した。

○*E. Coli* Competent Cells HB101: 宝酒造から購入した。

○*E. Coli* Competent Cells BL21: 宝酒造から購入した。

○*Saccharomyces cerevisiae* AB1380: 東洋紡から提供して頂いた。

○IPL-41: LIFE TECHNOLOGIESから購入した。

○GIM: LIFE TECHNOLOGIESから購入した。

- pBacVector-2000 DNA Kit：宝酒造から購入した。
- X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D(-)-galactopyranoside)：宝酒造から購入した。
- GIM Liquid Medium：LIFE TECHNOLOGIESから購入した。
- m⁷GTP Sepharose 4B：Pharmaciaから購入した。
- Glutathione Sepharose 4B：Pharmaciaから購入した。
- 7-methylguanosine 5'-triphosphate：SIGMAから購入した。
- m⁷GpppA：東京工業大学石川正英博士による合成物を恵与していただいた。
- Anti-eIF-4E Serum (rabbit)：サワディーテクノロジーから購入した。
- AP-conjugated Anti-rabbit IgG：フナコシから購入した。

実験操作

実験操作については必要に応じて本文中に示してあるが、基本操作に関しては一括して表示した。

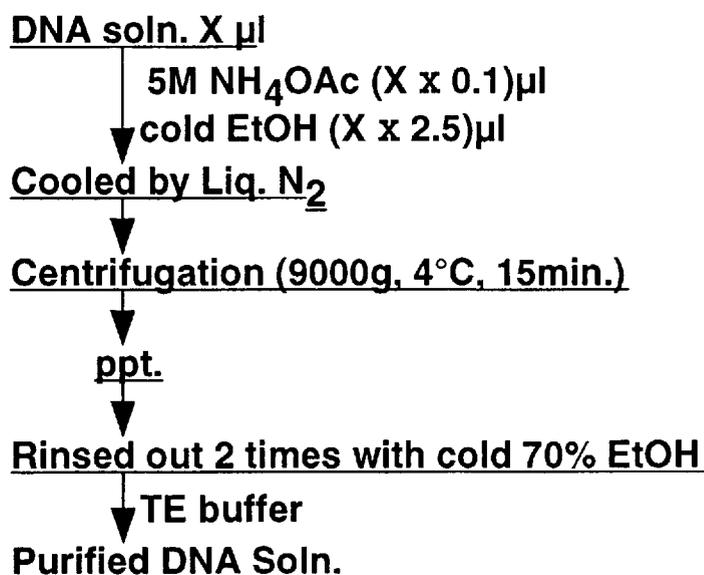
•PCR

10 x Reaction Buffer	10 μ l
dNTP mix (20mM)	1 μ l
+ Primer	1 μ l (Ca.50pmol)
- Primer	1 μ l (Ca.50pmol)
Target DNA	5 μ l
Sterilized Water	81 μ l
Tth DNA polymerase	1 μ l
<hr/>	
Total reac. soln.	100 μ l

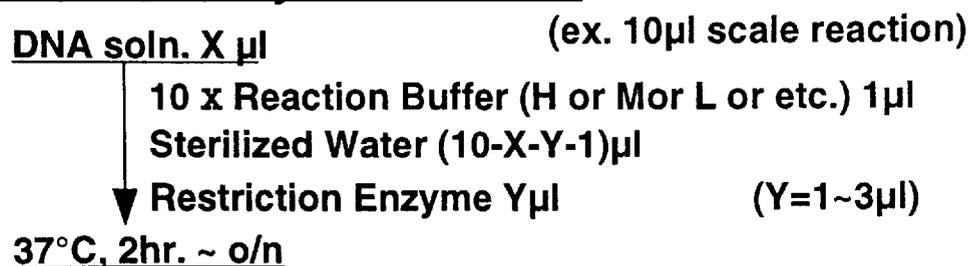
Reaction condition

94°C	1.5min.] 30cycles
40°C	2.5min.	
72°C	1.5min.	

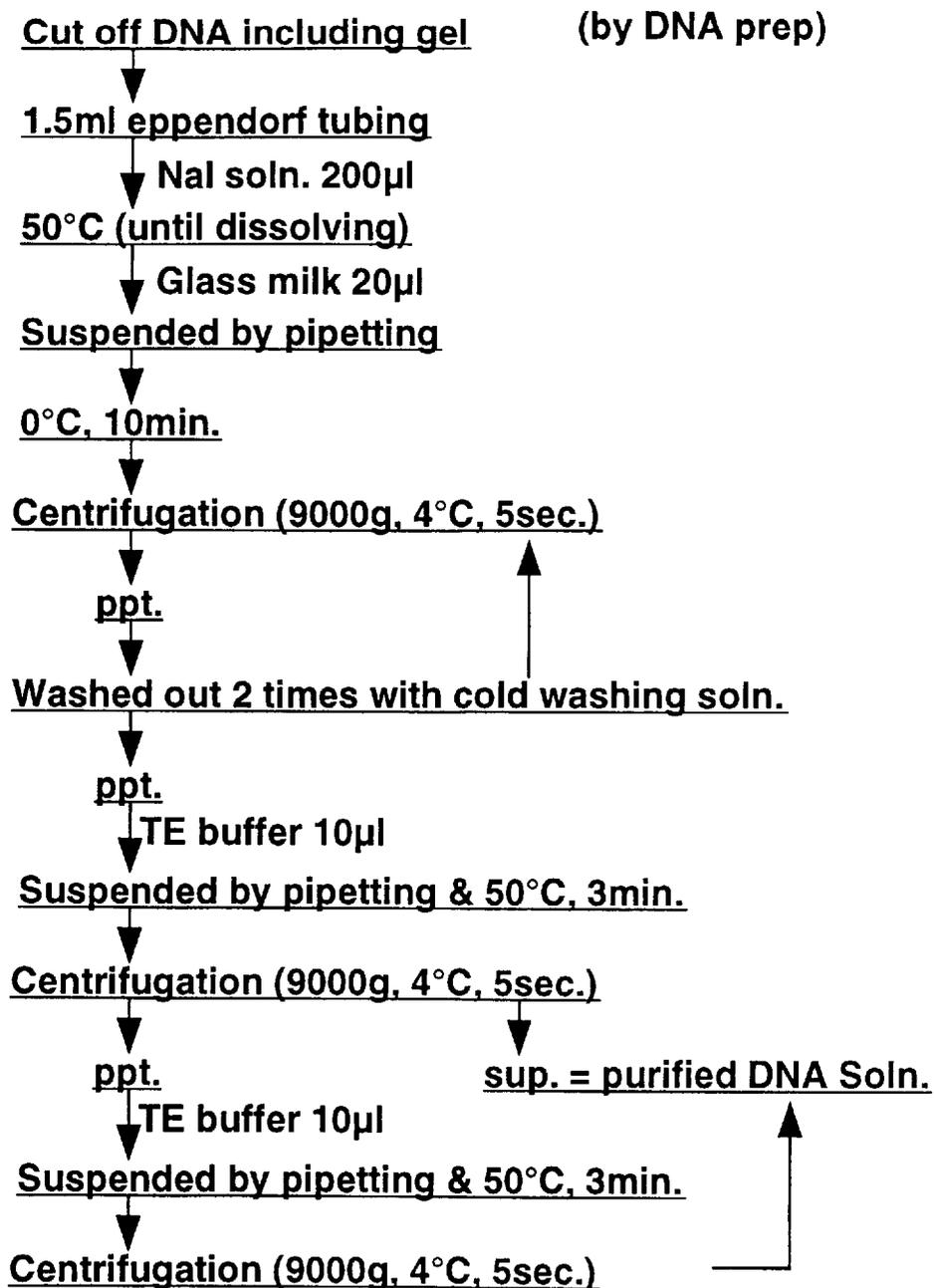
•DNA purification by EtOH



•Restriction Enzyme Reaction

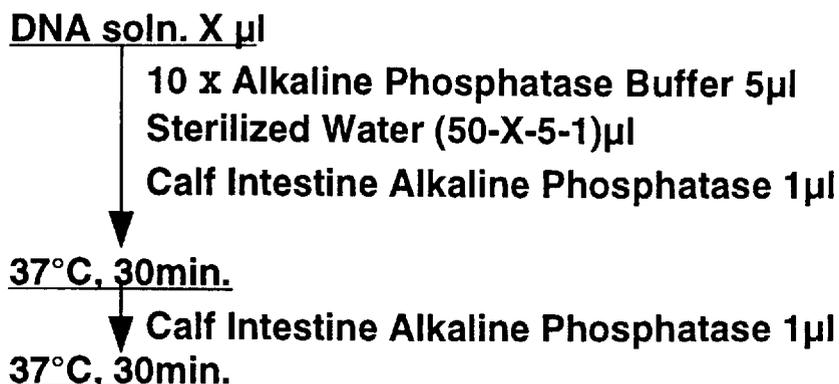


•DNA purification from agarose gel

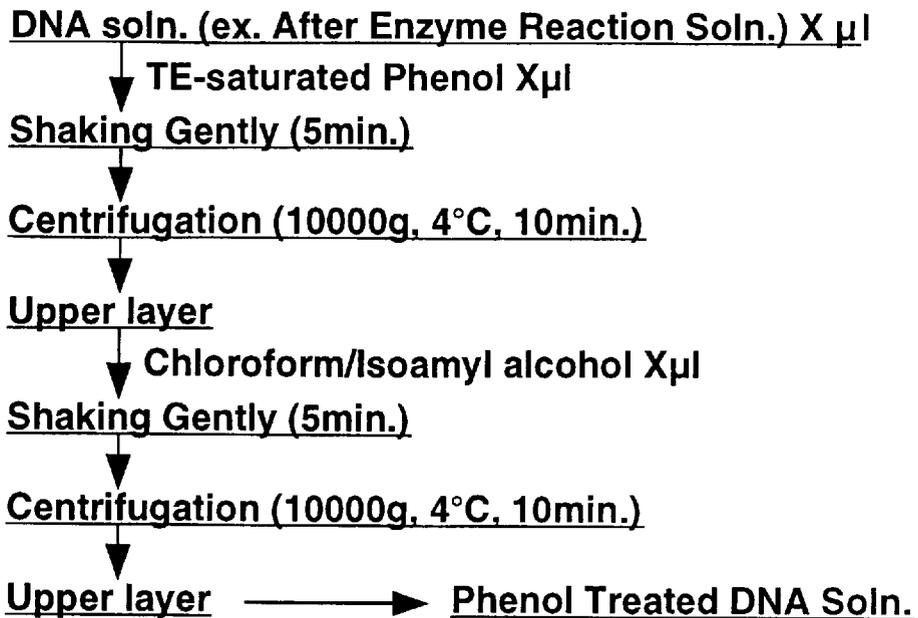


•CIAP Reaction

(ex. 50µl scale reaction)

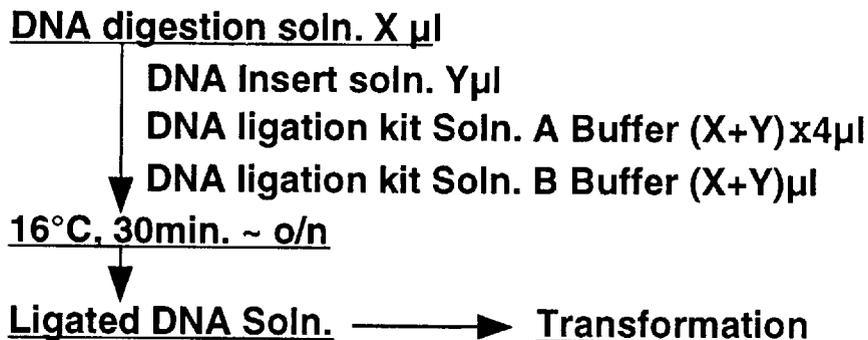


•DNA purification with Phenol/ Chloroform

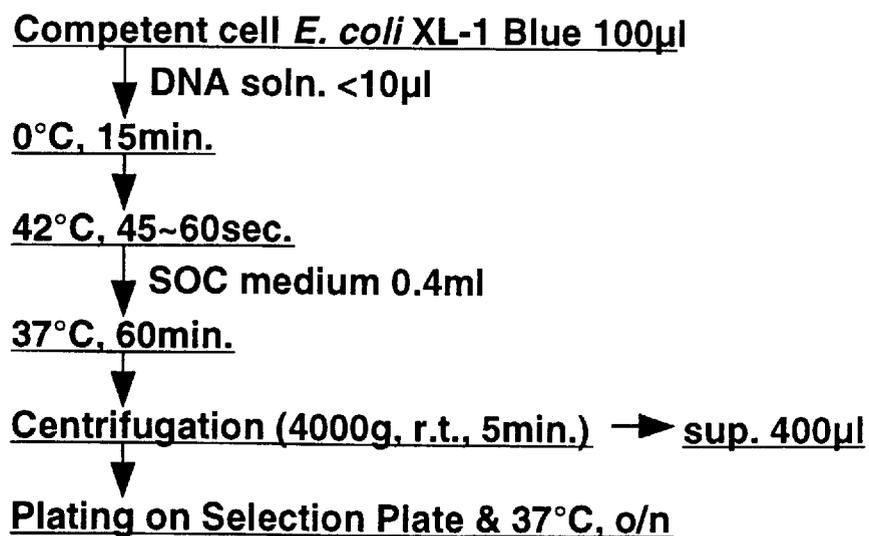


•Ligation

(by Takara Ligation kit using)



•Transformation



•Klenow Reaction(ex. 20 μ l scale reaction)DNA soln. X μ l10 x Klenow Buffer 2 μ l1mM dNTP 2 μ lSterilized Water (20-X-2-2-2) μ l▼ Klenow Fragment 2 μ l16°C, 1hr.**•Mung Bean Nuclease Reaction**(ex. 50 μ l scale reaction)DNA soln. X μ l5 x Mung Bean Nuclease Buffer 10 μ lSterilized Water (50-X-10-1) μ l▼ Mung Bean Nuclease 1 μ l25°C, 20min.**•DNA Kination**(ex. 50 μ l scale reaction)DNA soln. X μ l10 x Kination Buffer 5 μ lSterilized Water (50-X-5-1-1) μ l100mM ATP 1 μ l▼ T4 Polynucleotide Kinase 1 μ l37°C, 1hr.**•DNA purification by Polyethylene Glycol**DNA soln. X μ l▼ 20% PEG6000 / 2.5 M NaCl (X x 0.6) μ l0°C, 1hr.

▼

Centrifugation (10000g, 4°C, 10min.)

▼

ppt.

▼

Rinsed out 1 time with cold 70% EtOH

▼

Dry up by Vacuuming

▼

TE buffer

Purified DNA Soln.

•Mini-scale Preparation of Plasmid DNA

Transformed Cell o/n Culture 3ml (Rapid Method)

↓
Centrifugation (9000g, 3min.)

↓
ppt.

↓ TEN Buffer 120μl

↓
Suspending

↓ TE-saturated Phenol 120μl

↓
Swing in a frash

↓
Centrifugation (9000g, 10min.)

↓
sup.

↓ 5M NH₄OAc 80μl

↓ 2-Propanol 200μl

↓
Shaking Gently (2min.)

↓
Centrifugation (9000g, 0°C, 15min.)

↓
ppt.

↓ 70% EtOH 500μl

↓
Centrifugation (9000g, 0°C, 5min.)

↓
ppt. & Dry up by Vacuuming

↓ TE Xμl

↓ 0.46mg/ml RNase A 1μl

↓
37C, 30min.

↓ 20% PEG6000 / 2.5M NaCl (X x 0.6)μl

↓
0°C, 1hr.

↓
Centrifugation (9000g, 4°C, 10min.)

↓
ppt.

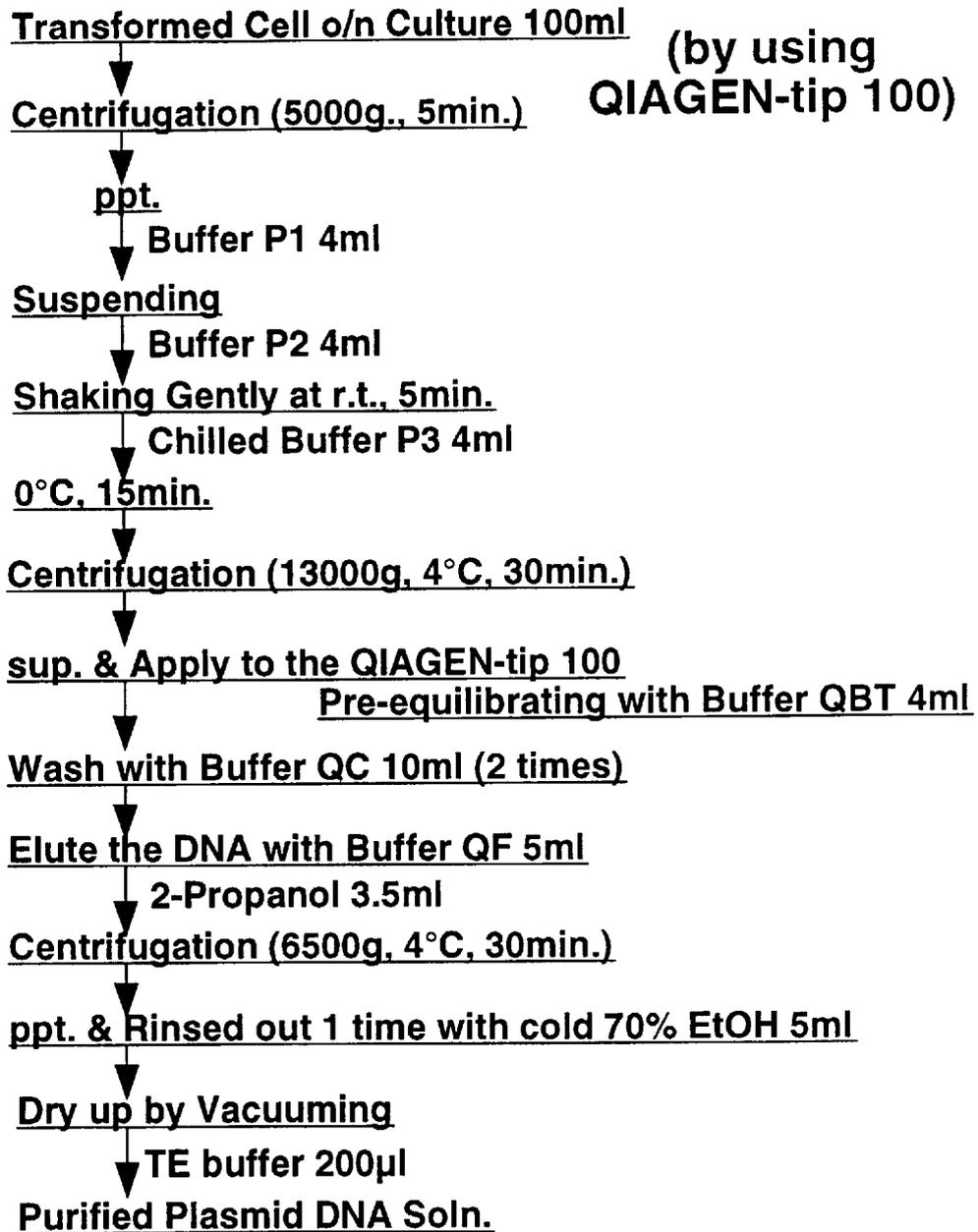
↓
Rinsed out 1 time with cold 70% EtOH

↓
Dry up by Vacuuming

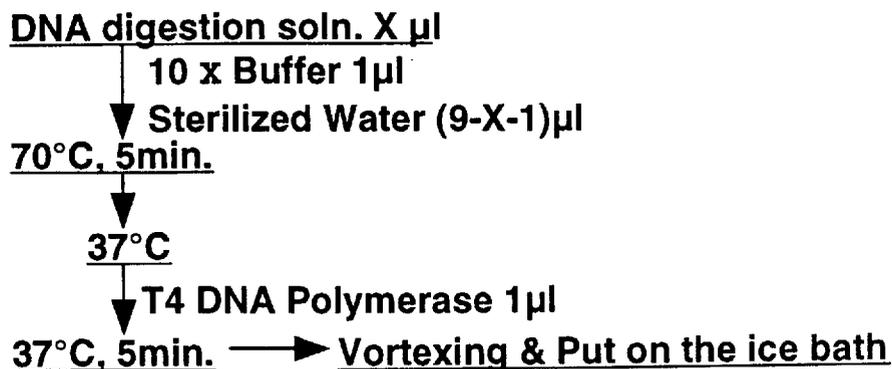
↓ TE buffer

↓
Plasmid DNA Soln.

•Midi-scale Preparation of Plasmid DNA



•Blunting (by using Takara DNA Blunting kit)



•Agarose Gel Electrophoresis

- For DNA Purification •For LMW DNA
SeaKem GTG Agarose Gel SeaKem 1.5% Agarose Gel
in 0.5 x TAE in 0.5 x TAE
- For Analysis •For HMW DNA
SeaKem LE Agarose Gel SeaKem 0.7% Agarose Gel
in 0.5 x TAE in 0.5 x TAE
- For Very LMW DNA •10 x Dye
NuSieve 4.0% Agarose Gel 2.5mg/ml BPB
in 0.5 x TAE 2.5mg/ml Xylene Cyanol
- Electrophoresis Buffer (0.5 x TAE)
48.4g/l Tris }
11.42ml/l Acetic Acid } 10 x TAE
0.5M EDTA pH8.0 20ml

•SDS-PAGE

(ex. T=15%, 4sheets)

•Separation Gel

Distilled Water	7.2ml
30% Acrylamide mix. (29:1)	15.0ml
1.5M Tris-HCl pH8.8	7.5ml
10% SDS	0.3ml
Ammonium Peroxodisulfate	Trace
TEMED	12µl

•Concentration Gel

Distilled Water	5.65ml
30% Acrylamide mix. (29:1)	1.7ml
0.5M Tris-HCl pH6.8	2.5ml
10% SDS	0.1ml
Ammonium Peroxodisulfate	Trace
TEMED	10µl

•PAGE Buffer (1 x)

25mM Tris-HCl pH8.4
192mM Glycine
0.1% SDS

•Sample Buffer (1 x)

60mM Tris-HCl pH6.8
100mM Dithiothreitol
2.0% SDS
0.01% BPB

•Electrophoresis Condition

35mV Constant / 1sheet

•Western Blotting

•Transfer Buffer

48mM Tris Base
39mM Glycine
0.037% SDS
20% MeOH

•Pretreatment of PVDF

Soak in MeOH, 1min.



Soak in Distilled Water, 3min., 2times



Soak in Transfer Bufer, 3min., 2times

•Electro-Transfer Condition

90mA Constant, 1.0hr. / 100x100mm 1 PVDF Sheet

•Anti-Serum Detection

Wash Electro-Transferred PVDF with TBS, r.t., 5min.



Coat the PVDF with Blocking Buffer 20ml, 4°C, o/n



Reaction with Anti-eIF-4E Serum soln. 20ml, r.t., 2hr.



Wash 2times with TTBS, r.t., 5min.



Reaction with AP-anti rabbit IgG (goat) soln. 20ml, r.t., 1hr.



Wash 2times with TTBS, r.t., 5min.



Wash 1time with TBS, r.t., 5min.



AP Detection



Wash with TE

•Blocking Buffer

5% BSA in TTBS
Filtration by 0.8µm filter

•TBS

25mM Tris-HCl pH7.4
140mM NaCl
5mM KCl

•TTBS

0.05% Tween-20 in TBS

•Anti-eIF-4E Serum soln.

1/2000 Anti-eIF-4E Serum diluted
by 2% BSA in TTBS

•AP-anti rabbit IgG (goat) soln.

1/5000 AP-anti-rabbit IgG diluted
with 2% BSA in TTBS

•AP Detection

Alkaline Phosphatase Buffer 15ml



50µg/ml NBT in 70% DMF 100µl
50µg/ml BCIP in DMF 50µl



Mixing under Dark Condition (NBT/BCIP Detection Soln.)



AP Reacted Membrane in NBT/BCIP Detection Soln.



37°C, 30min.

引用文献

1. Alberts, B. M. (1986) *Am. Zool.*, **26**, 781.
2. Crick, F. H. C. (1958) *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **12**, 548-555
3. Furuichi, Y. and Miura, K. (1985) *Nature*, **253**, 374-375.
4. 三浦謹一郎, 篠崎和子 (1985) *蛋白質 核酸 酵素*, **30**, 711.
5. Furuichi, Y., LaFinadra, A., and Shatkin, A. J. (1977) *Nature*, **266**, 235-236.
6. Green, M., Melton, D., and Maniatis, T. (1983) *Cell*, **32**, 681.
7. Muthukrishnan, S., Morgan, M., Banerjee, A. K., and Shatkin, A. J. (1976) *Biochemistry*, **15**, 5761.
8. Miura, K., Kodama, Y., Shimotohna, K., Fukui, T., Ikehara, M., Nakagawa, I., and Hata, T. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, **564**, 264.
9. Edery, I., Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1987) in *Translational Regulation of Gene Expression* (ed. Ilan, I.) pp.335, Plenum Press, New York.
10. Sonenberg, N., Mogan, M. A., Merrick, W. C., and Shatkin, A. J. (1978) *Proc. Natl. Acad. Soc. USA*, **75**, 4843-4847.
11. Pause, A., Belsham, J. G., Gingeras, A., Donzé, O., Lin, T., Lawrence Jr, C. J., and Sonenberg, N. (1994) *Nature*, **371**, 762-767.
12. Lin, T., Kong, X., Haystead, A. J. T., Pause, A., Belsham, J. G., Sonenberg, N., and Lawrence Jr, C. J. (1994) *Science*, **266**, 653-656.
13. Yan, R., Rychlik, W., Etchison, D., and Rhoads, R. E. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 23226.
14. Grifo, J. A., Abramson, R. D., Satler, C. A., and Merrick W. C. (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 8648.
15. Ray, B. K., Lawson, T. G., Kramer, J. C., Cladaras, M. H., Grifo, J. A., Abramson, R. D., Merrick W. C., and Thach, R. E. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 7651.
16. Abramson, R. D., Dever, T. E., Lawson, T. G., Ray, B. K., Teach R. E., and Merrick, W. C. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 3826.
17. Merrick W. C. (1992) *Microbiological Reviews*, **56**, 291.

18. Duncan, R., Milburn, S. C., and Hershey, J. W. B. (1987) *J. Biol. Chem.*, 262, 380.
19. Panniers, R., Stewart, E. B., Merrick, W. C., and Henshaw, E. C. (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 9648.
20. Rychlik, W., Rush, J. S., Rhoads, R. E., and Waechter, C. J. (1990) *J. Biol. Chem.*, 265, 19467.
21. Lazaris-Karatzas, A., Montine, K. S., and Sonenberg, N. (1990) *Nature*, 345, 544.
22. Lamphear, B. J. and Panniers, R. (1991) *J. Biol. Chem.*, 266, 2789.
23. Morley, S. J., Dever, T. E., Etchison, D., and Traugh, J. A. (1991) *J. Biol. Chem.*, 266, 4669.
24. Lazaris-Karatzas, A., Smith, M. R., Frederickson, R. M., Jaramillo, M. L., Liu, Y., Kung, H., and Sonenberg, N. (1992) *Genes & Dev.*, 6, 1631.
25. Minich, W. B., Balasta, M. L., Goss, D. J., and Rhoads, R. E. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91, 7668-7672.
26. Joshi, B., Cai A., Keiper, B. D., Minich, W. B., Mendoz, R., Beach, C. M., Stepinski, J., Stolarski, R., Darzynkiewicz, E., and Rhoads, R. E. (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 14597-14603.
27. Makkinje, A., Xiong, H., Li, M., and Damuni, Z. (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 14824.
28. Robert E. T. (1992) *Cell*, 68, 177.
29. Rhoads, R. E. (1993) *J. Biol. Chem.*, 268, 3017.
30. Sonenberg, N. (1994) *Biochimie*, 76, 839.
31. Hiremath, L. S., Webb, N. R., and Rhoads, R. E. (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 7843-7849.
32. Marcotrigiano, J., Gingras, A. C., Sonenberg, N., and Burley, S. K. (1997) *Cell*, 89, 951-961.
33. Matsuo, H., Li, H., McGuire, A. M., Fletcher, C. M., Gingras, A. C., Sonenberg, N., and Wagner, G. (1997) *Nat. Struct. Biol.*, 4, 717-724.
34. Wakiyama, M., Saigoh, M., Shiokawa, K., and Miura, K. (1995) *FEBS Lett.*, 360, 191-193.

35. Robert K. Murray, Daryl K. Granner, Peter A. Mayes, Victor W. Rodwell著 上代淑人監訳,
ハーパー・生化学原書24版, 468-470, 丸善株式会社
36. Waskiewicz, A. J., Flynn, A., Proud, G. C., and Cooper, J. A. (1997) *EMBO J.*, 16,
1909-1920.
37. Flynn, A., and Proud, C. G. (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 21684-21688.
38. Whalen, S. G., Gingars, A. C., Amankwa, L., Marder, S., Branton, P. E., Aebersold, R.,
and Sonenberg, N. (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 11831-11837.
39. Morino, S., Yasui, M., Doi, M., Ishida, T., Ueda, H. and Uesugi, S. (1994) *J. Biochem.*,
116, 687-693.
40. Morley, S. J., Rau, M., Kay, J. E. and Pain, V. M. (1993) *Eur. J. Biochem.*, 218, 39-48.
41. Tuazon, P. T., Morley, S. J., and Rhoads, R. E. (1990) *J. Biol. Chem.*, 265, 10617-10621.
42. 横田、新井編, 実験医学別冊 遺伝子導入と発現・解析法, 177-190, 羊土社
43. Sawyer, J. R., Schlom, J. and Kashmiri, S. V. S., (1994) *Protein Engineering.*, 7, 401-1406.
44. 横田、新井編, 実験医学別冊 遺伝子導入と発現・解析法, 166-176, 羊土社
45. Wada, K., Wada, Y., Ishibashi, F., Gojobori, T. and Ikemura, T. (1992) *Nucleic Acids Res.*,
20, 2111-2118.
46. Smith, G. E., Summers, M. D., and Fraser, M. J. (1983) *Mol. Cell. Biol.*, 3, 2156-2165.
47. O'Reilly, D. R., Miller, L. K., and Luckow, V. A. (1992) "Baculovirus Expression Vectors: a
Laboratory Manual", W. H. Freeman and Co., New York.
48. King, L. A., and Possee R. D. (1992) "Baculovirus Expression System: A Laboratory
Guide", Chapman & Hall, New York.
49. Hellers, M., Gunne, H., and Sreiner, H. (1991) *Eur. J. Biochem.*, 199, 435-439.
50. Jarvis, D. L., Fleming, J. G. W., Kovacs, G. R., Summers, M. D., and Guarino, L. A.
(1990) *Bio/Technology*, 8, 950-955.
51. Rychlik, W., Gardner, P. R., Vanaman, T. C., and Rhoads, R. E. (1986) *J. Biol. Chem.*,
261, 71-75.

52. 平山令明著, 生命科学のための結晶解析入門, 33-56, 丸善
53. Lampher, J. B., Kirchweger, R., Skern, T., and Rhoads, R. E. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 21975-21983.
54. Joshi, B., Yan, R., and Rhoad, R. E. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 2048-2055.
55. Lawson, T. G., Cladaras, M. H., Ray, B. K., Lee, K. A., Abramson, R. D., Merrick, W. C., and Thach, R. E. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 7266-7276.
56. Sonenberg, N. (1993) *GENE EXPRESSION*, **3**, 317-323.
57. Lee, K. A., Edery, I., and Sonenberg, N. (1985) *J. Virol.*, **54**, 515-524.
58. Fletcher, C. M., McGuire, A. M., Gingras, A. C., Li, H., Matsuo, H., Sonenberg, N., and Wagner, G. (1998) *Biochemistry*, **37**, 9-15
59. 竹縄忠臣、渡辺俊樹編, タンパク質の分子間相互作用実験法, 211-230, 羊土社
60. Takada, T., Matozaki, T., Takeda, H., Fukunaga, K., Noguchi, T., Fujioka, Y., Okazaki, I., Tsuda, M., Yamao, T., Ochi, F., and Kasuga, M. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 9234-9242.
61. Wells, E. S., Hillner, E. P., Vale, D. R., and Sachs, A. B. (1998) *Molecular Cell*, **2**, 135-140.
62. Haghghat, A., and Sonenberg, N. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 21677-21680.
63. Lampher, B. J., Kirchweger, R., Skern, T., and Rhoads, R. E. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 21975-21983.

謝辞

本研究を行なうに際して、興味深い研究課題及び自由な研究環境を与えて頂き、常に冷静に御指導及び御指摘を賜りました学習院大学生命分子科学研究所所長、理学部教授三浦謹一郎博士に心より深く感謝いたします。卒業研究生として三浦先生とお会いして十五年が経ちました。さまざまなお無礼をお許しいただき、さらに価値ある研究課題を頂きましたが、筆者の能力の低さからか先生には物足りないまとめ方になってしまったと思っております。これからも少しでも先生の納得できる研究を行なっていきたいと思っております。有難うございました。

大阪薬科大学第二物理化学教室教授石田寿昌博士には、共同研究者として多くの議論をさせていただき、SPRの測定から結晶構造解析まで非常に多くのご配慮をいただきました。有難うございました。最初に石田教授にお会いしたときは、ちょうどeIF-4Eの構造が他のグループから解かれたときでした。落ち込んでいた筆者は石田教授の言葉に励まされたことを覚えております。何とか全長でのeIF-4Eの構造が解けることを願っております。今後ともご指導のほどよろしくお願いいたします。

日本医科大学第一生化学教室教授西野武士博士には本研究を行なうにあたり、研究室の施設の提供からお世話になり、論文のまとめ方及び研究に対する姿勢までご指導いただきました。特にGPCによる分析は、西野教授との議論からアイデアをいただきました。本論文は日本医科大学第一生化学教室での研究がなければ、成立していないと断言できます。有難うございました。西野教授の研究に対する熱意、執念にも非常に多くの感銘を受けました。今後の筆者の研究人生に少しでも見習って活かせればと思います。今後ともご指導のほどよろしくお願いいたします。

学習院大学生命分子科学研究所助手脇山素明博士には、様々な試料から本研究に必要な知識まで提供いただきました。学習院大学におけるeIF-4Eの研究に関して、脇山博士の先駆者としての貢献がなければ、本研究は成立しなかったと思っております。有難うございました。

学習院大学生命分子科学研究所助教授小島修一博士には、学習院大学における実験に関してご配慮いただきました。有難うございました。

日本医科大学第一生化学教室助手堀弘幸博士には本研究を行なうにあたり、バキュロウイルスの系の提供、また様々な研究上の議論からアイデアをいただきました。堀博士のおかげで第一生化学教室に出入りさせていただく機会を得て、本論文は初めて成立しました。有難うございました。筆者には身に余るご配慮を学部生の時より頂戴していると思っております。今後ともご指導のほどよろしく願いいたします。

学習院大学生命分子科学研究所助手竹本千重博士をはじめ、学習院大学生命分子科学研究所の皆様には、本研究を行なうにあたり大変お世話になりました。有難うございました。

日本医科大学第一生化学教室講師阿部靖子博士をはじめ、日本医科大学第一生化学教室の皆様には、本研究を行なうにあたりお世話になりました。特に助手岡本研博士、研究技術員美濃純子氏及び前田裕子氏には、昆虫細胞の培養でお世話になりました。有難うございました。今後ともよろしく願いいたします。

大阪薬科大学第二物理化学教室助手友尾幸司博士をはじめ、大阪薬科大学第二物理化学教室の皆様には、本研究を行なうにあたり大変お世話になりました。有難うございました。

学習院大学生命分子科学研究所の伊東孝祐、井出寛子氏には共同研究者として一緒に研究を行なわせていただきました。伊東氏には発現系の検討で、井出氏には物性の検討で主に協力していただきました。

学習院大学生命分子科学研究所の酒井伸也、鈴木晶氏には共同研究者として協力していただきました。感謝しております。

大阪薬科大学第二物理化学教室の野添良昭、荻野哲也、陽谷武氏には共同研究者として協力していただきました。特に野添氏には構造解析で、陽谷氏にはSPRの測定で主に協力していただきました。有難うございました。

東京大学講師鈴木勉博士には、マススペクトルの測定でお世話になりました。有難う

ございました。

ビアコア社の岡崎一生博士には、SPRの測定で大変お世話になりました。SPRの結果で論文が書けたと思っております。難うございました

東京大学教授渡辺公綱博士、横浜国立大学教授阿久津秀雄博士には、学習院大学生命分子科学研究所で本研究を行なうと決意するにあたって適切な助言をいただきました。有難うございました。

その他、すべてのお名前を挙げる事はできませんが、東京理科大学内田研究室、東京大学三浦研究室、小野田セメント株式会社、財団法人相模中央化学研究所、信越化学工業株式会社、東京工業大学渡辺・西川研究室、横浜国立大学阿久津・藤原研究室、学習院大学生命分子科学研究所、日本医科大学第一生化学教室の皆様には有形、無形の御協力を戴き、更に御迷惑をかけてきたと思います。有難うございました。

最後に、私のすべてを支えてくれている妻和子に本論文を捧げます。有難う。今後は良き夫でありたいと思っております。

一九九九年十二月