

## 活性化補体フラグメントを標的とした抗アレルギー・ 抗炎症治療に関する基礎的研究

高野 克彦\*

Fundamental investigation of anti-allergic and anti-inflammatory therapy  
focused on activated complement fragments

Katsuhiko Takano \*

*Received October 30, 2008*

### Abstract

Recombinant production of novel rat neutrophil chemotactic factor, C3 $\beta$ c, a C-terminal fragment of  $\beta$ -chain of 3rd component, has been attempted. In addition to C3a, C337 (expediential name in this paper), two types of C3 $\beta$ c expression vectors were constructed to express these proteins as GST or 6  $\times$  His tag fusion proteins. One is C3 $\beta$ c, which has putative C-terminal that is identical with C-terminal of  $\beta$ -chain of C3. The other one is C3 $\beta$ c Arg (expediential name), and has additional C-terminal Arg residue with C3 $\beta$ c. C337 means protein that is composed of contiguous sequence of C3 $\beta$ c, linker peptide, C3a. C3 $\beta$ c cleaved from GST fusion protein, in addition to C3 $\beta$ c Arg, has lost on RP-HPLC at final step of purification. 6  $\times$  His-C3 $\beta$ c has been almost purified from small amount of culture fluid, though lower purity was obtained from large amount of culture fluid. 6  $\times$  His-C3 $\beta$ c Arg has been checked, in contrast, expression of both fusion proteins of C3a and C337 could not be detected.

### 緒 言

C3 $\beta$ cは1993年、富山医科薬科大学薬学部生化学研究室（当時）の籠田氏と中川秀夫教授により、ラットにおける新規の好中球走化性因子として精製された<sup>1)</sup>。ラット・カラゲニン空気嚢炎症慢性期の炎症組織（肉芽組織）を2日間、メディウム中で培養すると、特に刺激物質を添加するわけでもないが、回収した時点では、メディウム中に、強力な好中球走化性活性が認められる。このメディウムから、7種類の好中球走化性因子の存在が示唆され、うち4種類は、cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINCs) と呼ばれる一連のラット・ケモカイ

---

\* 薬 学 部  
Faculty of Pharmaceutical Sciences

ンである<sup>2)</sup>。後にCINC-1と改名されたCINCは当初、ラット・インターロイキン-8 (IL-8) という表記がされることもあった<sup>3)</sup>。しかし、ホモロジー、その他の点からは、ヒトGROのカウンターパート (ホモログ) であると考えられており、かつ現在ではラットには、IL-8は存在しないと考えられている。残る3種のうち、1種類はフィブロネクチンに由来するⅢ型繰り返し構造由来の10 kDaフラグメントであること<sup>4)</sup>、もう1種類はCINCsとは別のサブファミリーに属するケモカインであるMIP-1 $\alpha$ と推測される結果<sup>5,6)</sup>が後に得られた。

一方で肉芽組織内に大量に貯留していた滲出液からは、不思議とCINCsは精製されず、2種類の好中球走化性因子が精製された。1つは既知の因子でありC3a、もう一方は、後述の通り、本研究の対象であるC3 $\beta$ cであった<sup>1)</sup>。

補体成分C3は、1本鎖ポリペプチド鎖前駆体として合成され、このうちArg4残基からなるリンカーペプチドが除去され大小2フラグメントに解裂する。N末端側が小フラグメントで $\beta$ 鎖、C末端側が大フラグメントで $\alpha$ 鎖と呼ばれるもので、両者はジスルフィド結合1本により結合している。 $\alpha$ 鎖のN末端側約80残基がC3 convertaseにより解裂したものが、アナフィラトキシンC3aである。

これに対し、ラット・カラゲニン空気嚢炎症の炎症局所滲出液より精製された新規の好中球走化性因子は、SDS-PAGE上分子量約11 kDaで、N末端アミノ酸配列25残基目までが、C3の $\beta$ 鎖C末端側544番目のPro以降の配列と一致したため、C3 $\beta$ cと命名された<sup>1)</sup> (Figs.1,2)。その後、C3 $\beta$ cの精製手法の確立を受け、大量精製しその生物活性の検討を行った<sup>7)</sup>。しかしながらnativeなタンパクを大量精製し、生物活性を検討するには限界があったことから、何年かの後、組換え体タンパクの作製に着手した。しかし、発現したタンパクの可溶性に問題があり、結果として組換え体タンパクを得られず、以後の実験を断念した。上記のような事情から、C3 $\beta$ cの生物活性の探索が急がれるにもかかわらず、今日までに既に15年ほどの年月が経過してしまっただけで、以下のような検討課題が考えられた。すなわち、1) 可溶性の高い発現系における組換え体の作製、2) nativeなタンパクの大量精製では検討しきれなかった生物活性の検討、3) C末端のArg残基の有無による生物活性の相違、4) C3 $\beta$ c分子構造の解明、5) C3 $\beta$ c生成機構の解明、6) C3 $\beta$ c受容体の同定、7) ヒトにおけるC3 $\beta$ cはどうか、という7点である。

1) については、以前組換え体を作製した際に、組換え体タンパクが得られなかった最大の要因と考えており、一方、3) についてはC3aと同じアナフィラトキシンであるC5aにおいてよく知られた事実である。C5aのC末端はArgであるが、このArg残基は非常に外れやすく、C末端のArg残基を欠いたC5aを通常C5a<sub>desArg</sub>と呼ぶ。このC末端のArg残基の有無により、生物活性が1,000倍も低下することが知られている。ただ、ラットC5aはやや特殊で、C5a<sub>desArg</sub>も含め数十倍はヒトのそれより活性が高いという報告もある<sup>8)</sup>。

C3 $\beta$ cは上述の通り、ラットC3の544番目のProをN末端とするSDS-PAGE上約11 kDaのフラグメントである、という事実が明らかになっているだけで、C末端アミノ酸が同定されているわけではない。こうした背景から、C3 $\beta$ cのC末端には、リンカーペプチドのうちArg1残基が残存しており、もしこのArg残基が外れることがあれば、C5aとC5a<sub>desArg</sub>の関係のように、大きな生物活性の低下が認められるのではないかと、この推測が成り立つ。ここで一つ疑問として浮かび上がるのが、C3 $\beta$ cが本当にアナフィラトキシン活性を有するのだとすれば、C3aと

C3 $\beta$ c とでは、一次構造上のホモロジーはほとんど認められないことから、分子構造上 C5a や C3a に共通する点、すなわち C 末端アミノ酸は Arg 残基であるのかどうか、という点である。

こうした課題を検討する目的で、炎症滲出液からの native な C3 $\beta$ c の大量精製は難しいことから、組換え体タンパクを作製することにより実験を行うこととした。

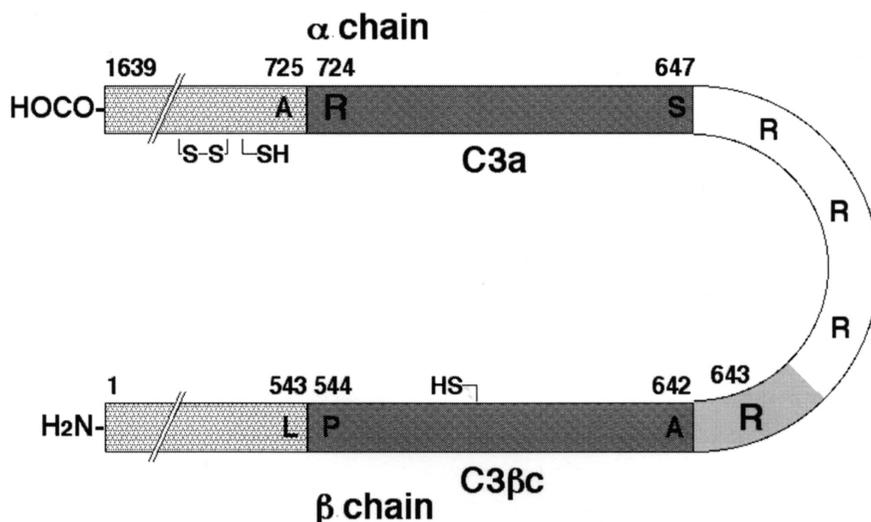


Fig.1 Illustration of the structure of rat complement of C3.

## 実験材料と方法

### 1. 実験材料及び試薬

#### 1-1. 宿主菌及びベクター

大腸菌は *E. coli* XL-1 Blue, *E. coli* BL21 pLys を使用した。また、ベクターは pBluescript II SK(-) (以下, pBluescript), pGEX-4T-2, pET-28a を使用した。いずれも生命情報科学教室 小倉教授より頂戴した。

#### 1-2. PCR プライマー

シグマジェノシスより購入した、以下の 5 種の合成ヌクレオチド, B3F (5'-CTT GGA TCC CCA AGA GAT AAC CGA C -3' (25-mer)), B4R (5'-CGC TCG AGT CAG GCA GCT GGC TTG G -3' (25-mer)), B5R (5'-TGC TCG AGT CAG CGG GCA GCT GGC T -3' (25-mer)), A6F (5'-GTG GAT CCG TGC AGT TGA TGG AAA G -3' (25-mer)), A7R (5'-GGC TCG AGT CAC CTG GCC AGG CCC A -3' (25-mer)) (50  $\mu$ M in TE) をそれぞれ滅菌超純水により 20  $\mu$ M に希釈して使用した。

## 1-3. 鋳型DNA

福岡大学医学部 三角博士より頂戴したラットC3 cDNA pCRC201を元に、当研究室で50 ng/mlとなるよう調製し、使用した。

```

1698/66                               1728/76
gat gtg aag gac tcc tgt gta ggc acg cyg gtg gtg aaa ggt gac cca aga gat aac cga
D V K D S C V G T L V V K G D P R D N R

1758/86                               1788/96
cag ccc gcg cct ggg cat caa acg aca cta agg atc gag ggg aac cag ggg gcc cga gtg
Q P A P G H O T T L R I E G N Q G A R V

1818/106                             1848/116
ggg cta gtg gct gtg gac aag ggg gtg ttt gtg ctg aac aag aag aac aaa ctc aca cag
G L V A V D K G V F V L N K K N K L T Q

1878/126                             1908/136
agc aag atc tgg gat gta gta gag aag gca gac att ggc tgc acc cca ggc agt ggg aag
S K I W D V V E K A D I G C T P G S G K

1938/146                             1968/156
aac tat gcg ggt gtc ttc atg gat gct ggc ctg acc ttc aag aca aac caa ggc ctg cag
N Y A G V F M D A G L T F K T N Q G L Q

1998/166                             2028/176
act gat cag aga gaa gat cct gag tgc gcc aag cca gct gcc cgc cgc cgt cgc tca gtg
T D Q R E D P E C A K P A ⋮ R R R R ⋮ V
2058/186                             2088/196
cag ttg atg gaa agg agg atg gac aaa gct ggt cag tac acc gac aag ggt ctg cgg aag
Q L M E R R M D K A G Q Y T D K G L R K

2118/206                             2148/216
tgt tgt gag gat ggc atg cgt gat atc cct atg ccg tac agc tgc cag cgc cgg gct cgc
C C E D G M R D I P M P Y S C Q R R A R

2178/226                             2208/236
ctc atc acc cag ggc gag agc tgc ctg aag gcc ttc atg gac tgc tgc aac tat atc acc
L I T Q G E S C L K A F M D C C N Y I T

2238/246                             2268/256
aag ctt cgt gag cag cac aga aga gac cat gtg ctg ggc ctg gcc agg agt gat gtg gat
K L R E Q H R R D H V L G L A ⋮ S D V D

2298/266                             2328/276
gaa gac ata atc cca gaa gaa gat att atc tct aga agc cac ttc cca gag agc tgg ttg
E D I I P E E D I I S R S H F P E S W L

```

Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of rat C3 (partial)

Underlined amino acids were identified as N-terminal of rat C3 $\beta$ c. Ala<sup>179</sup> (shadow) is C-terminal of  $\beta$  chain of C3. Ser<sup>184</sup> and Arg<sup>261</sup> (shadow) are N- and C-terminal of C3a, respectively.

#### 1-4. その他

その他の試薬は、特にことわりのない限りは、特級のものを使用した。

### 2. GST融合タンパク発現ベクターの構築

ラットC3 cDNA pCRC201を鋳型DNAとして、C3 $\beta$ cまたはC3a, およびC3 $\beta$ cからC3aにかけてのコード領域のDNA断片をPCRにより増幅した。PCRチューブに *Pyrobest* DNA Polymerase (終濃度1.25 U/tube), これに付属の10×*Pyrobest* buffer 20 $\mu$ l (1×), dNTP mix (0.2 mM), 鋳型DNA溶液 (50 ng/tube), 目的の領域用のプライマー2種 (終濃度各0.5 mM), さらに全量が50 $\mu$ lとなるよう滅菌蒸留水を加え, 混合した。これらチューブをサーマルサイクラー (PC707; ASTEC) にセットし, 94 $^{\circ}$ C 30秒, 42 $^{\circ}$ C 30秒, 72 $^{\circ}$ C 30秒, で3サイクル反応を行ったのち, 94 $^{\circ}$ C 30秒, 58 $^{\circ}$ C 30秒, 72 $^{\circ}$ C 30秒で30サイクル反応を行った。その後, 4 $^{\circ}$ Cで保持した。

PCR産物を1.5%低融点アガロースゲル (Agarose L) 上で電気泳動後, ゲルから目的のDNA断片を抽出した。回収したPCR産物をpBluescriptの*EcoR* V領域にligationした。これをさらに, *E. coli* XL-1 Blueにtransformした。目的のDNA断片の挿入が示唆されたプラスミドDNAについて, BigDye Terminator cycle sequencing kitならびにABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ) を用いて, 塩基配列を確認した。

各cDNA断片を挿入したベクターを*Bam*H I, *Xho* Iで処理し, 目的のcDNA断片を回収, 精製後, 同じく*Bam*H I, *Xho* Iで処理したpGEX 4T-2とligationした。これをさらに, *E. coli* XL-1 Blueにtransformした。目的のDNA断片の挿入が確認されたものを融合タンパクの発現に用いた。

### 3. GST融合タンパクの発現と精製, 回収

SB/Amp培養液5 mlに, GST-C3 $\beta$ c融合タンパクまたはGST-C3 $\beta$ c Arg融合タンパク発現ベクターを有する大腸菌を殖菌し, 37 $^{\circ}$ Cで一晩振とう培養した。この大腸菌培養液1 mlを, あらかじめ保温しておいたSB/Amp培養液12.5 mlに加え, 37 $^{\circ}$ Cで1時間振とう培養した。1 mlの培養液を回収しOD600が0.4~0.8程度であることを確認した後, 残りの培養液に0.1M IPTG溶液62.5  $\mu$ l (終濃度0.5 mM) を加え, さらに37 $^{\circ}$ Cで3時間振とう培養した。その後, 培養液は, 4 $^{\circ}$ Cで3,000 rpm, 20分間遠心し, 上清を取り除き, 沈殿を直ちに-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。

-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存しておいたGST融合タンパク発現ベクターを有する大腸菌にPBS (Phosphate-buffered saline) 3 mlを加え, 恒温槽で大腸菌を融解し, 懸濁させた。この懸濁液を超音波処理 (10秒×3回) を行い, 細胞を破碎した後, 4 $^{\circ}$ Cで12,000 rpm, 20分間遠心し, 上清を回収した。回収した上清を, PBSにより平衡化済みのGSTrap FFカラム (1 ml; GE Healthcare) に, 約6 ml/hrで添加した。その後, PBSでカラムを洗浄し, 溶出buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0) /10 mM glutathione (reduced)) で溶出を行い, 10分ごとに試験管に分取した。

GSTrapカラムの結合画分をPBSに対して十分透析した後, タンパク量100mgに対して, 4 NIH unitの割合で, thrombinを加え, 室温で24~32時間インキュベートした。その後, Tricine-SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて確認を行った。

Thrombin 処理した組換え体を逆相 HPLC にて、最終精製を行った。カラムは YMC-Pack PROTEIN-RP (150×4.6 mmID; 5 μm 径の粒子; ワイエムシイ) を用い、1% TFA 存在下、80% までのアセトニトリル濃度勾配にて、タンパクを分離した。検出は、220 nm における吸収をもとに行った。その後、Tricine-SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて確認を行った。

#### 4. Tricine-SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

組換え体タンパクの確認を、H. Schägger, G. von Jagow らの方法<sup>9)</sup> に従って、Tricine-SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により行った。

ゲルは 3 段で構成されており、下段から 16.5% アクリルアミド濃度のゲル (Separating gel), 10% アクリルアミド濃度のゲル (Spacer gel), 4% アクリルアミド濃度のゲル (Stacking gel) の順で作製した。泳動用 buffer は、陽極側に 0.2 M Tris-HCl (pH 8.9) を、陰極側に 0.1 M Tris-HCl/0.1 M Tricine/0.1% SDS (pH 8.25) をそれぞれ使用した。泳動には、日本エイドー(株)のミニスラブ電気泳動装置を使用し、定電流下 (15mA/ sheet) 行った。試料は、sample buffer に溶解し、添加した。泳動終了後、ゲルを取り出し、CBB 染色液で染色後、脱色液で脱色し、タンパクを検出した。

#### 5. 6×His tag 融合タンパク発現ベクターの構築

1. の各 cDNA 断片を挿入したベクターを *Bam*H I, *Xho* I で処理し、目的の cDNA 断片を回収、精製後、同じく *Bam*H I, *Xho* I で処理した pET-28a と ligation した。これをさらに、*E. coli* XL-1 Blue に transform した。目的の DNA 断片の挿入が確認されたものを、*E. coli* BL21 pLys に transform した上で、融合タンパクの発現に用いた。

#### 6. 6×His tag 融合タンパクの発現と精製、回収

6×His tag 融合タンパクの発現は、pET-28a が、カナマイシン耐性遺伝子であるため、培地中にアンピシリンではなく、カナマイシンを加え培養を行う以外、原則として 2. と同様に行った。

-80℃ で凍結保存しておいた 6×His tag 融合タンパク発現ベクターを有する大腸菌に 50 mM sodium phosphate (pH 7.0) / 300 mM NaCl 3ml を加え、恒温槽で大腸菌を融解し、懸濁させた。この懸濁液を超音波処理 (10 秒×3 回) を行い、細胞を破碎した後、4℃ で 12,000 rpm, 20 分間遠心し、上清を回収した。回収した上清 500 ml を、同 buffer で平衡化済みの Co-agarose (和光純薬) 100 μl と混合し、シーソー型の振とう機上、4℃ で 3 時間反応させた。その後、遠心により非結合画分を回収し、樹脂を 2 回同 buffer にて洗浄した。その後、イミダゾール (150 mM) を含む同 buffer にて、樹脂を 3 回処理した。

### 実験結果

#### 1. GST-C3βc 融合タンパクの発現の確認と粗精製

ラット C3 cDNA クローン pCRC201 を鋳型として、所定のプライマーの組合せにより、目的

とするDNA断片を増幅した。これらを回収・精製後、pBluescriptのEcoR V領域にligationした。これをさらに、*E. coli* XL-1 Blueにtransformした。目的のDNA断片の挿入が示唆されたプラスミドDNAについて、塩基配列を確認した。その結果、C3 $\beta$ c cDNAの挿入されたベクター（pB34と呼ぶ）、C3 $\beta$ c Arg cDNAの挿入されたベクター（pB35と呼ぶ）、C3a cDNAの挿入されたベクター（pA67と呼ぶ）、およびC337 cDNAの挿入されたベクター（pC337と呼ぶ）が得られた。このうち、C3aコード領域を持つクローン、すなわちpA67およびpC337のすべてのクローンで、ラットC3 cDNAの2150、2151番目に相当する位置の塩基が、三角博士の報告<sup>11,12</sup>のCとは異なり、いずれもAと解析された（data not shown）。ただ、発現ベクターの作製に対しての影響はないため、これらをGSTおよび6 $\times$ His tag融合タンパク発現ベクターの作製に供した。

これらをもとに構築したGST-C3 $\beta$ c融合タンパク発現ベクターを有する大腸菌に融合タンパクを発現させ、その発現が確認された（data not shown）。この菌体破碎液をGSTrapカラムにかけることで粗精製し、さらには、この粗精製した融合タンパクをthrombinで処理した。その結果、thrombin処理前では、約37 kDaのバンドが検出され、処理後には、約26 kDaのメインバンドのほか、処理前と同じ約37 kDaのバンド、またうっすらとであるがC3 $\beta$ cと推測される11 kDaのバンドが、それぞれSDS-PAGEで検出された（Fig.3）。これに引き続き、C<sub>18</sub>カラムを用いた逆相HPLCによる精製を試みたが、C3 $\beta$ cを得ることはできなかった（data not shown）。

なお、データには示していないが、C3 $\beta$ c Argについても、同様に精製を行ったが、C3 $\beta$ cの場合と同様に、逆相HPLCの段階でC3 $\beta$ c Argが消失してしまい、C3 $\beta$ c Argを得ることはできなかった。一方、C3a、C337については、大腸菌内での発現が認められず、発現ベクターの再構築、発現条件の検討を行っても同様の結果であった。

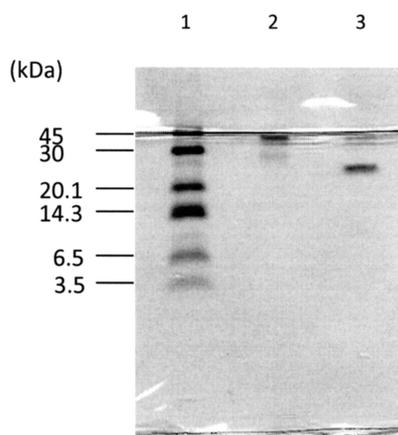


Fig.3 Thrombin treatment of recombinant GST-C3 $\beta$ c

Lane 1; Mr Std., Before (Lane 2) and 25-hr after (Lane 3) thrombin treatment of GST-C3 $\beta$ c.

## 2. 6×His tag 融合タンパクの発現の確認と粗精製

構築の確認された6×His tag 融合タンパク発現ベクターを有する大腸菌に融合タンパクを発現させ、C3βcについて発現が確認された (data not shown)。この菌体の破碎液上清中の6×His-C3βcをCo-agaroseに結合させておき、樹脂ごとthrombin処理を行い、C3βc部分のみを切り離すことが可能であることが確認された (Fig.4.)。この段階までで、ほぼpureなC3βcが得られたものと考えられた。そこで、それまでより10倍強の培養液からのC3βcの大量精製を試みた。その結果、少量で精製を行った場合とは異なり、80%程度の精製度のC3βcが得られたと考えられた (data not shown)。また、データには示していないが、6×His-C3βc Argについては、その発現を確認したが、精製にまでは至っていない。6×His-C3a, 6×His-C337発現ベクターを有する大腸菌についても発現を試みたが、培地、培養温度、タンパク発現の誘導の条件等、詳細に検討したわけではないが、検討した条件においては、どちらのタンパクの発現も確認されなかった。

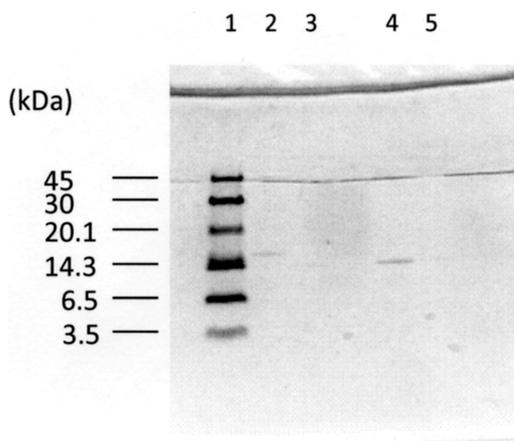


Fig.4 Thrombin treatment of bound fraction to Co-agarose resin.

Lane 1; *Mr* Std., Lane 2; Bound fraction to resin, Lane 3; Thrombin-treated bound fraction, Lane 4; Thrombin-treated 6His-C3βc eluted from resin, Lane 5; Eluate of resin

## 考 察

抗体の反応を補い、殺菌反応や溶血反応を起こす新鮮血清中の因子として発見された補体は、20種類以上の多数の血清タンパクから構成される反応系であり、血液中の生体防御に働く主要なシステムである。質・量ともに補体系の最も主要な構成成分であるC3は、活性化されC3aとC3bに分解される。C3bは、病原体表面に沈着し、貪食細胞の補体レセプターによって認識され、病原体の貪食を刺激する。一方、C3aはアナフィラトキシンとも呼ばれ、血管透過性の亢進、平滑筋収縮作用、ヒスタミン放出刺激作用などの活性を持つ<sup>10)</sup>。

1993年、富山医科薬科大学 (当時) の中川らにより、ラット・カラゲニン空気嚢炎症の慢性

期（7日目）の滲出液から、補体成分C3に由来する2つの好中球走化性因子が精製された。このうち一方は、C3a（既知）であった。もう一方は、そのN末端アミノ酸配列、およびSDS-PAGEより得られた分子量から、ラットC3 $\beta$ 鎖のC末端フラグメントであると推測され、C3 $\beta$ cと命名された<sup>1)</sup>。

ところで、C3aやC5aに代表されるアナフィラトキシンは、通常C末端にArg残基を持ち、このArgが欠けると（C3a<sub>desArg</sub>、C5a<sub>desArg</sub>などと呼ばれる）その生物活性は1/1,000程度に低下することが知られている。C3 $\beta$ 鎖のC末端アミノ酸はAlaであるが、これにArg 4残基からなる $\alpha$ 鎖とのリンカーペプチド、 $\alpha$ 鎖と続く。通常、リンカーペプチドのArg 4残基は、プロセシングによって欠けるものと考えられている。もしこのうちAlaに続くArg 1残基が欠けずに残っているのだとすれば、後に明らかとなったC3 $\beta$ cがアナフィラトキシン様の活性を持つことと考え合わせ、C末端が明らかとなっていない中で、推測の域を出ないが、C3aなどと同様に、C末端のArg残基の有無で活性が調節されている可能性を推測した。

こうしたことから、本研究で新規の好中球走化性因子であるラットC3 $\beta$ c組換え体タンパクの作製を行うにあたり、C末端アミノ酸をC3 $\beta$ 鎖C末端と同じAla残基とした組換え体タンパクC3 $\beta$ cと、この後にArg 1残基を付加した組換え体タンパクC3 $\beta$ c Argの2種類を作製することにした。これに加え、本研究ではC3a、便宜上C337と呼ぶC3 $\beta$ cからC3aにかけての領域の組換え体も、組換え体作製上のコントロールのような意味合いもあり、作製した。C3aは記述のように、強力なアナフィラトキシンの一つであり、実験上のコントロールとして利用価値があり、それ以前にコントロールとして当然用いられなければならない。C337は、C3 $\beta$ c生成のメカニズムを明らかにする上で有用と考える。すなわち、上述の「C3 $\beta$ cからC3aにかけての領域」とは、C3 $\beta$ c、Arg 4残基からなるリンカーペプチド、C3aの順に並んでいる。仮にC3 $\beta$ c生成酵素、というものが存在するのならば、C3 $\beta$ c生成酵素は、リンカーペプチドのArgをC3 $\beta$ cに1残基残した形でC3 $\beta$ cを生成するのか否か、といったことを検討する目的で使用すべく、同時に作製を試みたものである。

一連の組換え体タンパクは、まずGST融合タンパク発現ベクターpGEX-4T-2を用いてGST融合タンパクという形で作製した。pGEX-4T-2ベクターは、GST (Glutathione-S-transferase) 遺伝子の下流にマルチクローニングサイトがあり、ここに目的のタンパクをコードするC3 $\beta$ cおよびC3 $\beta$ c Arg cDNAを導入すると、目的のタンパクはGST-C3 $\beta$ c融合タンパクおよびGST-C3 $\beta$ c Arg融合タンパクという形で得られる。こうしてGSTをタグとしてつけることにより、容易に目的のタンパクを精製・検出し得る。pGEX-4T-2ベクターを用いて発現させたGST融合タンパクには、目的のタンパクとGST部分との間にthrombinの認識部位をもつため、融合タンパクを精製した後、thrombinで消化することで、最終的にはGST部分を除去することができる。目的のタンパクに、thrombinの認識配列の一部としてGly-Ser 2残基は残るが、GST融合タンパクから目的のタンパクのみを得ることができる。既に述べたように、C3 $\beta$ c組換え体タンパクのC末端アミノ酸は何か、という点は非常に重要であるが、N末端側アミノ酸は（後述のようにホルミルメチオニンでない限りは）さほど重要ではないと考えられるため、タグの位置もN末端側に設定した（このベクターを用いた場合には、タグの位置は必然的にN末端側になる）。GST-C3 $\beta$ c融合タンパク発現ベクター作製にあたり、まずラットC3 cDNAクローンを鋳型とするPCRを行い、目的とする各種cDNAを回収し、pBluescriptにサブクロー

ニングを行った。これらの塩基配列を確認した結果、データには示していないが、C3aをコードする領域を持つクローン、すなわちpA67およびpC337のすべてのクローンで、ラットC3 cDNAの2150、2151番目に相当する位置の塩基が、三角博士らの報告<sup>11,12)</sup>のCとは異なり、いずれもAと解析された。これは、pCRC201の該当箇所の配列を解析した場合でも同様の結果が得られたこと (data not shown) に加え、別の報告<sup>13)</sup> とは一致していることから、おそらく三角博士らの読み間違いによるものと推測された。なお、三角博士らの報告<sup>11,12)</sup> では、この箇所のコドンはCCGであり、コードされるアミノ酸はProであったが、CがいずれもAであるならばAAGとなり、コードされるアミノ酸はLysとなる。これは、当然別の報告<sup>13)</sup> ととも一致する。ただ、発現ベクターの作製に対しての影響はないため、これらをGSTおよび6×His tag融合タンパク発現ベクターの作製に供した。

次いで各種cDNAをGST融合タンパク発現ベクターpGEX-4T-2に組換えて、GST融合タンパク発現ベクターを作製した。このうち、GST-C3βcおよびGST-C3βc Arg発現ベクターを有する大腸菌に融合タンパクを発現させた結果、いずれにおいても融合タンパクの発現が認められた (data not shown)。GSTrapカラムクロマトグラフィーでGST融合タンパクの粗精製を行い、回収したGST-C3βc融合タンパクを、thrombinによりGST部分とC3βcに切断したところ、うっすらではあるがSDS-PAGEではC3βcと推測されるバンドが確認された (Fig.3)。精製の最終段階との認識において行った逆相HPLCでは、C3βcは消失してしまい、精製には至らなかった。なお、データには示していないが、C3βc Argについても、同様に精製を行ったが、C3βcの場合と同様に、逆相HPLCの段階でC3βc Argが消失してしまい、C3βc Argを得ることはできなかった。一方、C3a、C337については、大腸菌内での発現が認められず、発現ベクターの再構築、発現条件の検討を行っても同様の結果であったことから、後述の6×His tag融合タンパクとして発現させることにした。

またC末端Arg残基は、外れやすいことが経験的に知られており、本研究の場合で言えば、C3βc Argを精製し、C3βc Argについて生物活性の検討を行ったつもりが、C末端Arg残基が外れていたために実はC3βcであった、という可能性がないとも限らない。こうしたことを防ぐためには、質量分析機による質量分析も有用であろうし、例えばC3βc Argをカルボキシペプチダーゼ処理することで、その前後で生物活性が変化するか否か、ということなどは確認しなければならない。

pETベクターは、その発現系が優れているだけでなく、種々のタグを組換え体タンパクのN末端やC末端に付加させることが可能であることから、大腸菌における組換え体タンパクの発現に汎用されている。本研究では、pGEXベクターを用いた発現系ではGST-C3a、GST-C337で発現しないなどの点で問題があったことから、pETベクターを用いた発現系を新たに構築することにした。今回用いたpET-28シリーズは、(発現ベクター構築の戦略にもよるが) 発現させたいタンパクのN末端側に6×His tagおよびT7 tagを、C末端側に6×His tagを付加させて発現させることが可能なベクターである。6×His tagは、Niなどの親和性が高く、Niを用いたレジンと処理することで (本研究ではCoレジンを用いたが) 容易に精製できることから、発現の容易さと合わせ、組換え体タンパクの発現の際、タグとしてよく用いられる。かつpET-28シリーズの発現タンパクのN末端側6×His tagとT7 tagの間にthrombin認識部位があり、thrombin処理によりT7 tagなど17残基は残るが、N末端側のホル

ミルメチオニンを含む17残基を除去することが可能である。加えて、pET-28aには、事前に作製していたpB34などから*Bam*HI, *Xho*I処理により切り出したcDNAを、読み枠がずれることなく挿入が可能であることから、短時間で発現ベクターの作製が可能なることも、6×His tag融合タンパク発現ベクターとして、今回pET-28aを用いた理由である。

ところで、大腸菌などの細菌では、N末端がN-ホルミルメチオニンとしてタンパクが発現される。この細菌由来の(低分子)ホルミルペプチドは、IL-8ほど強力ではないが好中球などの遊走を引き起こす因子の一つである。前述のように、C3βcなどが精製できた場合に、検討すべき生物活性の一つに好中球走化性活性がある。しかしながら、組換え体がN末端にホルミルペプチドを持っていたのでは、仮に活性が認められた場合に、ホルミルペプチドに起因して活性が示されたのか、C3βcに起因するのかわからないのでは困る。そこで、pGEXベクターを用いて発現させた場合でも同様であるが、N末端側のGSTや6×His tagを切り離すことができれば、そのような可能性を排除でき好都合である(N末端がホルミルメチオニンでないような発現系を用いれば、はじめからそのような心配はないのであるが)。このように、タグを切り離せる、ということもpET-28aを利用したことの理由である。発現させた6×His-C3βcをCo-agaroseに結合させておき、このまま樹脂ごとthrombin処理が可能であれば、上述のようにいろいろな意味で不要となるN末端側のペプチド(6×His tag)は樹脂に結合させたまま、必要なC3βc部分のみを樹脂およびN末端側のペプチドから切り離し回収が可能である、ということになる。そこで、このことが可能であるか検討した結果、予想通りthrombin処理によりC3βc部分のみを切り離すことが可能であった(Fig.4)。

本研究では中川らの報告<sup>1)</sup>と同じSDS-PAGEの系を用いているが、GST融合タンパク由来のC3βcは約11 kDaを示している(Fig.3)。C3のβ鎖544番目のProからC末端とされるAlaまでの理論分子量は10.7 kDaであり、このこともC3βcがC末端にArg 1残基を持つか否かは別として、C3βcはC3の544番目のProからβ鎖C末端までであるという以前の推測を支持する結果であると考えられた。6×His tag融合タンパク由来の場合には約2 kDaのN末端側のフラグメントを含め約13 kDaを示しており、この結果もまた同様の可能性を示唆しているものと考えられた。

この段階までで、ほぼpureなC3βcが得られたものと考えられた。しかし、C3βcなど一連の組換え体を精製し、生物活性を検討するには、大腸菌培養液10 ml程度のスモールスケールでの培養からの精製では、必要量は回収されない。そこで、これまでより十倍強の培養液からのC3βcの大量精製を試みた。その結果、データには示していないが、少量で精製を行った場合とは異なり、最終段階のもの(Co-agaroseに6×His-C3βcを結合させておき、このまま樹脂ごとthrombin処理をして得られた画分)として、80%程度の精製度のC3βcが得られたと考えられた。これを生物活性の検討に用いた場合に、画分中のマイナーなタンパクが活性の本体である、ということが得てしてあるので、このままの状態での生物活性の検討を行うべきかどうかは慎重に判断する必要がある。

データには示していないが、6×His-C3βc Argについては、発現が確認されたが、精製にまでは至っていない。6×His-C3a, 6×His-C337発現ベクターを有する大腸菌についても発現を試みたが、培地、培養温度、タンパク発現の誘導の条件等、詳細に検討したわけではないが、検討した条件においては、どちらのタンパクの発現も確認されなかった。

## 謝 辞

本研究は、平成18年度北陸大学学内助成を受け実施したものであり、深く感謝いたします。ラットC3 cDNAを供与くださいました福岡大学医学部三角博士に深く感謝いたします。本研究を進めていく上で、多大なるご協力を頂き、また機器類を快くお貸しいただきました本学の各研究室の先生方に深い感謝の意を表します。

## REFERENCES

- 1) Nakagawa H, Komorita N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **194**, 1181-1187 (1993).
- 2) Nakagawa H, Komorita N, Shibata F, Ikesue A, Konishi K, Fujioka M, Kato H. *Biochem. J.*, **301**, 545-550 (1994).
- 3) Nakagawa H, Ikesue A, Kato H, Debuchi H, Watanabe K, Tsurufuji S, Naganawa M, Mitamura M. *J. Pharmacobiodyn.*, **15**, 461-466 (1992).
- 4) Shiota S, Takano K, Nakagawa H. *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 835-837 (2001).
- 5) Nakagawa H, Shiota S, Takano K, Shibata F, Kato H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **220**, 945-948 (1996).
- 6) Takano K, Al-Mokdad M, Shibata F, Tsuchiya H, Nakagawa H. *Inflammation*, **23**, 411-424 (1999).
- 7) Nakagawa H, Sunada Y, Ando Y. *Immunology*, **94**, 253-257 (1998).
- 8) Cui L, Carney DF, Hugli TE. *Protein Sci.*, **3**, 1169-1177 (1994).
- 9) Schagger H, von Jagow G. *Anal. Biochem.*, **166**, 368-379 (1987).
- 10) Vogt W. *Complement*, **3**, 177-188 (1986).
- 11) Misumi Y, Sohda M, Ikehara Y. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 2178 (1990).
- 12) Genbank Accession number. X52477
- 13) Genbank Accession number. NM\_016994