

変異型ヒトプロウロキナーゼの一次構造解析

本 間 信 幸
新 谷 晃 司
竹 本 久 雄

Study of the Primary Structure of Recombinant Modified Human Pro-urokinase

Nobuyuki HONMA
Koji SHINTANI
Hisao TAKEMOTO

Recombinant modified human pro-urokinase (TM-164), which was introduced two amino acid substitutions (135Lys→Gln and 157Phe→Asp), was examined to confirm the amino acid sequence. The protease mapping was performed using endoprotease A β p-N, endoprotease Lys-C, and trypsin after reduction and S-carboxymethylation. The protease-digested fragments were collected by reversed-phase high performance liquid chromatography and the amino acid sequences were determined by the Edman degradation. As a result, TM-164 was composed of 411 amino acids and its sequence completely corresponded to the one deduced from the cDNA sequence including the two amino acid substitutions introduced. Moreover, no amino acid modification, insertion, or deletion was detected.

1. はじめに

プロウロキナーゼは血漿中では線溶活性を有さないが、プラスミンによりウロキナーゼに変換され、プラスミノゲンを活性化してプラスミンに変換、線溶活性を示すようになる。すなわち、血漿中ではフィブリノーゲン分解作用を有さないため、全身性の出血傾向が少なく、血栓部位でかなり選択的に血栓溶解作用を示すという特徴があり、組織プラスミノゲンアクチベーター (tPA) とともに開発が期待されている血栓溶解剤である¹⁾。変異型ヒトプロウロキナーゼ (以後 TM-164 と呼ぶ) はトロンビンに対し強い抵抗性を示すと共に、プラスミンにより緩やかに活性化を受ける等の天然型とは異なる特徴を有する²⁾。

近年の遺伝子工学による技術の進歩により、目的とす

る蛋白質、ペプチド等を大腸菌、枯草菌、酵母等の菌体中で製造することが可能となった。目的とする蛋白質は通常、宿主として使用する菌体が天然には製造することのない、いわゆる異種蛋白質であることが多い。

いかなる理由であるかは明らかでないが、大腸菌を宿主として製造された多くの目的蛋白質は、菌体中で不溶性蛋白質として「不溶性塊」(inclusion body) と呼ばれる形態で菌体内に蓄積されることが知られている³⁾。この様な不溶性塊を形成した目的蛋白質は、本来の生理活性を発現し得る形態、すなわち高次構造を有していないため、可溶化 (脱折畳) およびリフォールディング (再折畳) と呼ばれる操作が必要となる。今回著者らは、大腸菌により TM-164 を inclusion body として大量生産し、この inclusion body を可溶化、リフォールディングを行い、カラムクロマトグラフィーによって精製し、

単一の TM-164 を得た。本研究の目的はこのようにして得られた TM-164 が、その生産・精製過程で、cDNA 配列から正確に翻訳され、しかも135位と157位の2カ所の改変部位が正しく改変されているかどうかを確認し、また411個のアミノ酸からなる配列中でアミノ酸の欠落や修飾などが起こっていないかどうか確認することである。ここでは TM-164 のペプチドマップを作成し、それを解析し、精製された TM-164 が cDNA 通りの配列をもつ蛋白質であることを確認したので報告する。

2. 実験および結果

(1) TM-164 の調製

TM-164 を大腸菌により大量生産させた後、大腸菌を高圧ホモジナイザーで破碎して得られた inclusion body を可溶化、リフォールディングを行った。その後、硫酸分画、種々のカラムクロマトグラフィー（疎水、金属キレート、イオン交換）を繰り返し、最終的に SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以後 SDS-PAGE と呼ぶ）、種々の高速液体クロマトグラフィー（以後 HPLC と呼ぶ）による分析でほぼ単一の TM-164 を得た (Fig. 1)。

(2) TM-164 の還元カルボキシメチル化

TM-164 は411個のアミノ酸より成り、その分子中に12個のジスルフィド結合をもつ分子量約4万6千の蛋白質である。酵素消化を行うに先立ち、12個のジスルフィド結合をすべて還元し、一本鎖の状態にした後、ある特定の酵素によって TM-164 を断片化して、逆相クロマトグラフィーによってペプチドの分離を行って解析を行った。そこでジスルフィド結合の還元、還元カルボキシメチル化 TM-164（以後 rcmTM-164 と呼ぶ）の酵素消化、酵素消化物の分離および分取、分取ペプチドのアミノ酸の配列決定、そして最後にいくつかの酵素で消化して得たペプチドマップの重ね合わせにより TM-164 の全一次配列の決定を行った。

(1) TM-164 の pH 安定性

Fig. 2 に TM-164 の pH 安定性について、種々の pH で 37°C、15時間インキュベーションした後の残存活性について調べた結果を示した。活性は、試料をプラスミンにより活性化後、L-Pyroglutamyl-Glycyl-Arginine p-nitroanilide (S-2444) を基質として (S-2444 活性測定) 測定した。この結果から、TM-164 の活性については pH 4 から 8 の間では比較的安定であることがわかった。

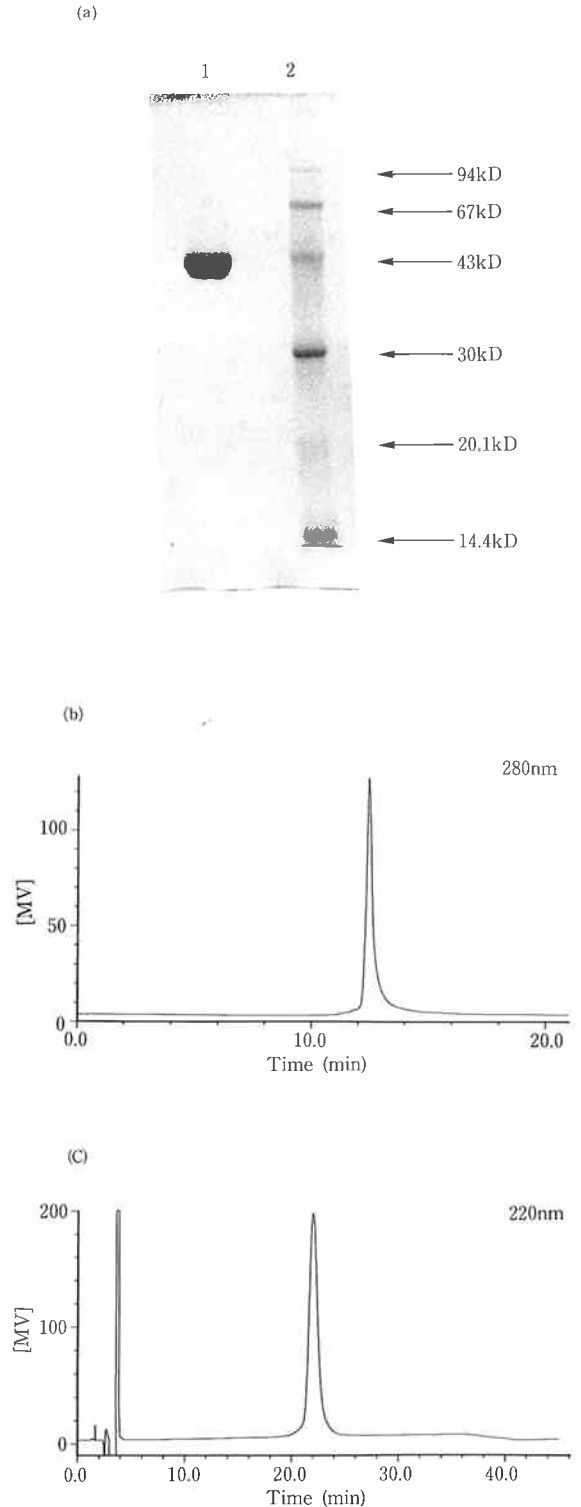


Fig. 1 Analysis of modified pro-urokinase, TM-164. (a) SDS-PAGE analysis. TM-164 was analyzed by electrophoresis on a 0.1% SDS/12.5% polyacrylamide gel under reducing condition. Lane 1, 10 μ g of TM-164; lane 2, Mw (kDa) of standards. (b) Cationic ion exchange HPLC (SP-NPR) pattern of TM-164. (c) Reversed phase HPLC (ODS-120T) pattern of TM-164.

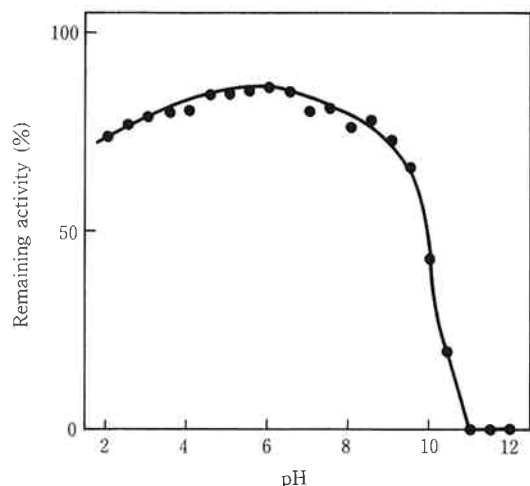


Fig. 2 pH stability of TM-164

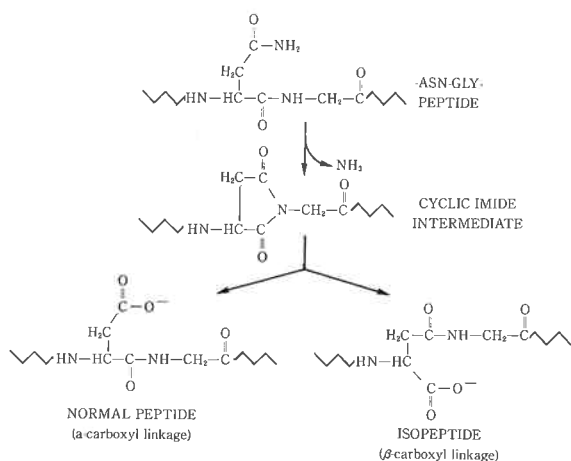


Fig. 3 Mechanism of deamidation of TM-164. The deamidation of Asn-407 through a cyclic imide intermediate involving the α -amino group of Gly-408. Hydrolysis of the cyclic imide produces two products, one containing an α -carboxyl-linked Asp-Gly peptide bond and the other a β -carboxyl-linked isoAsp-Gly bond.

しかしながら TM-164 の一次アミノ酸配列を確認していく上で注意しなければならないことがある。上記のような条件で反応を行う際に、操作上で Fig. 3 でみられるようなペプチドの脱アミド化、 β -転移等の修飾を起こさせてはならないということである。つまり TM-164 の還元カルボキシメチル化、酵素消化を行っていく上で、常にアーティファクトに注意しなければならないのである。

TM-164 はその cDNA から予想されるアミノ酸配列上、いくつか脱アミド化や β -転位等の修飾を受けやす

い箇所が考えられる。それは例えば54位、75位、238位、302位、407位のアスパラギンが考えられる。その中で特に C 末端近傍の407位のアスパラギンについては、陽イオン交換カラムで検出される多くのアイソマー（疎水クロマト的均一性、SDS-PAGE 等では区別がつかない）で、脱アミド化や β -転位していることが知られている⁴⁾。

(2) TM-164 の C 端部分配列の保存安定性

前述のように TM-164 の C 末端近傍の407位のアスパラギンが脱アミド化や β -転位といった修飾を受けやすいことが知られているので、どのような条件で反応が起こるのかを調べるため、TM-164 の401位のセリンから C 末端のロイシンまでペプチド合成を行い、その pH 安定性について検討した。その結果を Fig. 4 に示す。pH 7 または 8 のトリス塩酸緩衝溶液中に合成ペプチドを溶解し、37°C でそれぞれ 3、20、42 時間インキュベートし、逆相クロマトグラフィー（東ソー製 ODS-120T, 4.6 mmID \times 25 cm）で分析した。この合成ペプチドは pH 8 ではもちろんのこと、驚くことに pH 7 でも 20 時間インキュベーションすると、20% 以上が 407 位のアスパラギンのところで修飾がおこってしまうことが明らかとなった。したがって Crestfield 等の方法⁵⁾ に基づく還元カルボキシメチル化の際、TM-164 の修飾が容易に起こることが予想される。そこで TM-164 を試料として実際に Crestfield 等の方法の改良を行った。

(3) TM-164 の還元カルボキシメチル化

脱アミド化や β -転位といった修飾から考え、ここでは特に反応 pH や反応時間について検討した。なお実際に還元カルボキシメチル化されたかどうかはカルボキシメチルシステイン (cm-Cys) のアミノ酸分析より定量

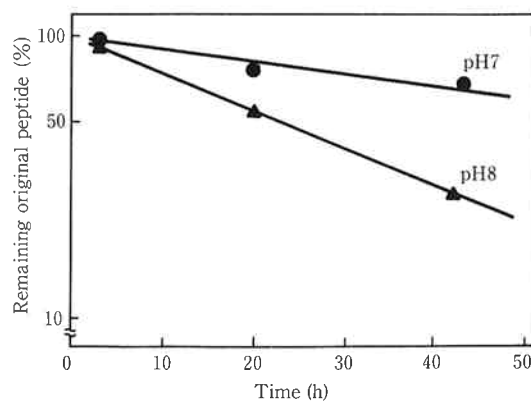


Fig. 4 Stability of synthetic peptide SHTKEENGLAL

Table 1 Study of reduction and S-carboxymethylation of TM-164.

pH	reaction time (min)			CM-Cys	Cys-Cys
	solubilization	reduction	S-carboxymethylation		
7	20	20	20	2	4
	60	60	60	2	2
8	20	20	20	24	0
	60	60	60	24	0
9	20	20	20	24	0
	60	60	60	22	0

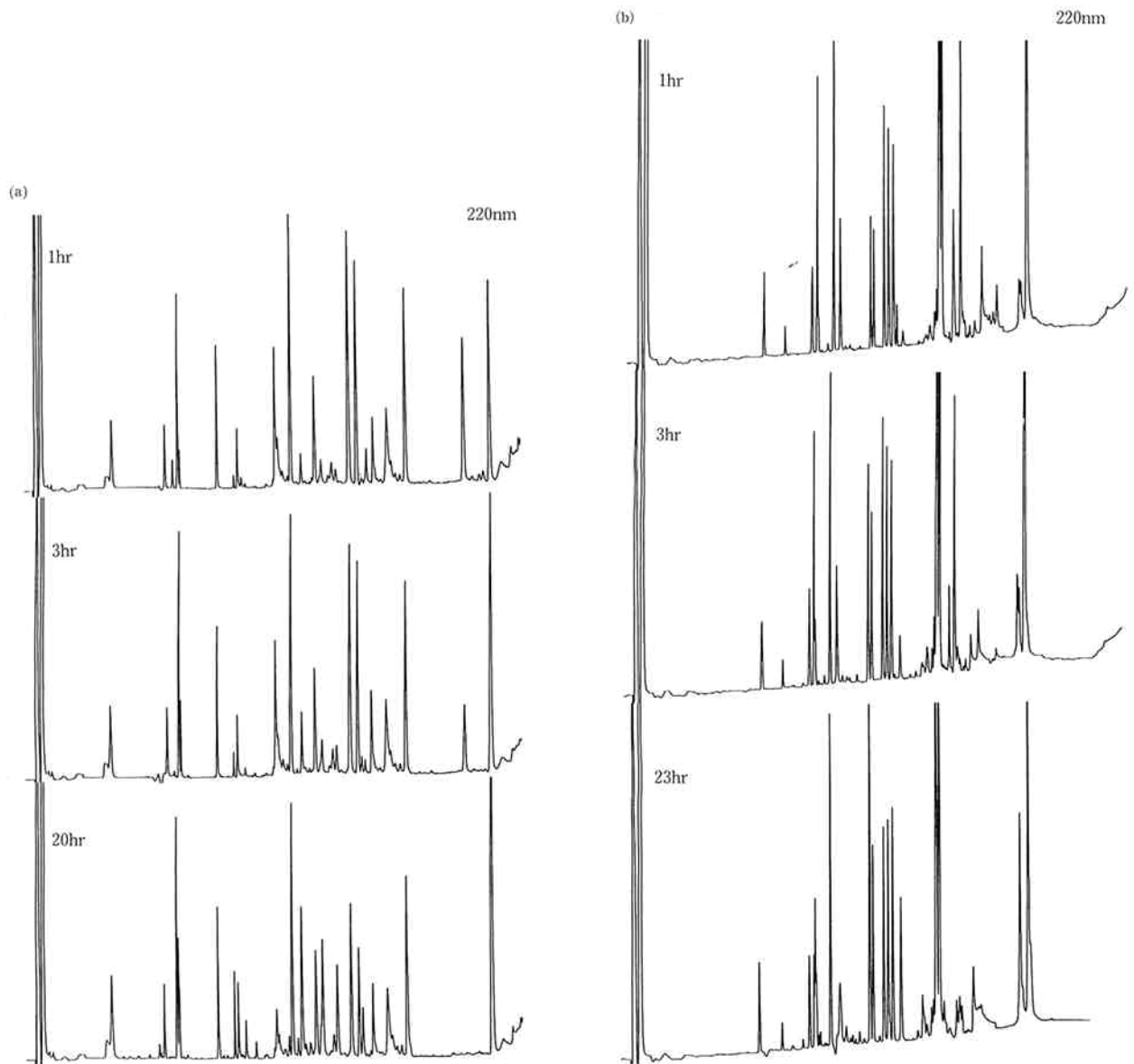


Fig. 5 Digestion of rcmTM-164 by Asp-N (a), Lys-C (b).

を行った。その結果を Table 1 に示す。還元カルボキシメチル化の操作を簡単に分けると、まず試料である TM-164 の溶解（可溶化）、ここでは 8 M の塩酸グアニジンを使用して可溶化を行い、次いでジチオトレイ

トル (DTT) によるジスルフィド結合の還元、そして還元により生じた遊離のスルフィド基 (SH 基) が再びジスルフィド結合しないようにモノヨード酢酸によって保護する反応に大別される。それぞれの反応は

37°C で一定とした。Table 1 に示したように還元カルボキシメチル化は pH 8 以上でないと起こらないことがアミノ酸分析による cm-Cys の定量より明らかとなった。しかし Fig. 4 から明らかのように pH が高い程、また時間が長い程修飾が起こりやすいので、TM-164 の還元カルボキシメチル化を以下のように改良した。

TM-164 の溶媒交換を行うため、1 mg をトリクロロ酢酸で 4°C、30分間の放置によって沈澱させ (TCA 沈澱)、遠心により得た沈澱にアセトンを加えて残存している TCA の除去を行う。こうして得た 1 mg の TM-164 に 1 mg/ml となるように 8 M 塩酸グアニジン、0.2 M トリス-塩酸 (pH 8.0) を加え 37°C、20分間可溶化を行った。次に 10 mM となるように DTT を加え 37°C、20分間ジスルフィド結合の還元を行った。続いて 30 mM となるようにモノヨード酢酸を加え 37°C、20分間のカルボキシメチル化をおこなった。続いて過剰のモノヨード酢酸を除去するため、2-メルカプトエタノールを反応溶液に加えた後、1%酢酸に対し 4°C で二晩、透析を行い、透析外液を2回以上交換した。なお反応はすべて副反応が起こらないように遮光して行った⁶⁾。このようにして得た rcmTM-164 を Speed Vac Concentrator で乾固して酵素消化に使用した。

〔3〕 酵素消化条件の検討

前述したように TM-164 はその構造遺伝子上、酵素反応中にも脱アミド化や β -転位といった修飾を受けることが容易に類推される。したがってこの様な修飾が起こらないように酵素消化についても反応条件を選定しなければならない。脱アミド化や β -転位は Fig. 4 に示し

たように温度、時間、pH といった要素に大きく影響される。そこで pH については修飾が起こりにくい pH、つまり中性から弱酸性で反応を行うのが良いと考えられる。そしてこのような pH で TM-164 を十分消化することができ、特異性が非常に高い酵素を選ばなくてはならない。本報告では構造遺伝子から推測される配列から考え、エンドプロテアーゼ Asp-N および Lys-C を TM-164 の消化に使用することとした。

次にこの2種のプロテアーゼが rcmTM-164 を十分に消化できるかどうかを検討した。その結果が Fig. 5 である。pH 7.0、37°C で酵素消化時間を変えて TM-164 をペプチド断片化し、逆相クロマトグラフィーで分離してみたところ、両酵素とも1~3時間の消化で TM-164 をかなり断片化していることが明らかとなった。次に逆相クロマトグラフィーで分離したペプチドを回収し、そのアミノ酸配列を決定した。なお回収量の少ないペプチドに関しては、酵素消化時間を変えて該当するペプチドを回収することとした。

〔4〕 cmTM-164 のアミノ酸配列の確認

(1) アミノ酸配列分析

後述の酵素消化により生じたペプチドは、逆相クロマトで回収した後、ただちに Speed Vac Concentrator で乾固して -80°C で保存した。回収したペプチドを実際にアミノ酸配列分析を行う時は、100 μ l の0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) に溶解させ、ポリブレン処理したガラスシートに添加し乾燥させた。ペプチドのアミノ酸配列分析には Applied Biosystems 社プロテインシーケンサー (477A) を使用した。

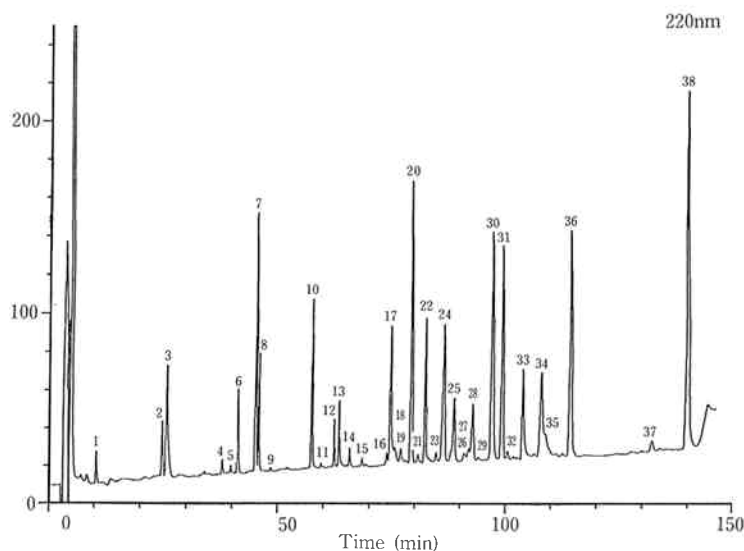


Fig. 6 Peptide map of rcmTM-164 by Asp-N.

Table 2 Amino acid sequence of Asp-N fragments

Asp-N peptide No.	Residue No.	Observations	Theoretical peptide	
Ddf 1	130-132	DCA	D 7	
	2	244-247	DYSA	D12
	3	208-213	DYPKKE	D10
		248-254	DTLAHHN	D13
4		N. D.		
5	53-64	EGNGHFYRGKAST		
6	1-11	SNELHQVPSNC	D 1	
7	344-349	DPQWKT	D17	
8	45-64	DKSKTCYEGNHFYRGKAST	D 3	
9	45-51	DKSKTCY		
10	133-156	DGQKPSSPPEELKFQCGQKTLRPR	D 8	
11		N. D.		
12	90-105	DALQLGLGKHNCRNP	D 5	
13	286-302	DPQFGTSCEITFGFKENST	D15	
14	214-229	DYIVYLGRSRLNSNTQ	D11	
15	324-332	ECQQP?YYG-		
16	65-82	DT?GRPQLP?NSATVLQQ-	D 4	
17	12-47	DCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKKFGGQHCEIDKS-	D2-D3	
18	12-39	DCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKKFGG-	D 2	
	65-88	DTMGRPCLPWN?ATVLQQTY?AHR-	D 4	
19	12-27	DCLNGGTCV?NKYF?N-	D 2	
20	65-89	DTMGRPCLPWNSATVLQQTYHAHRS	D 4	
21	65-82	DTMGRPCLPWNSATVLQQ-	D 4	
22	12-44	DCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKKFGGQHCEI	D 2	
23	106-126	DNRRRPWCYVQVGLKP?VQEC-	D 6	
24	255-285	DIALLKIRSKEGRCAQPSRTIQTICLPSMYN	D14	
25	384-404	DKPGVYTRV?HFLPWIRSHTK	D20	
	229-243	GEMKFEVEN?IL?K		
26	90-93	DALQ-	D 5	
27	90-127	DALQLGLGKHNCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQECM	D5-D6	
28	106-128	DNRRRPWCYVQVGLKPLVQECMV-	D 6	
29		N. D.		
30	90-129	DALQLGLGKHNCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQECMVH	D5-D6	
31	384-411	DKPGVYTRVSHFLPWIRSHTKKEENGLAL	D20	
32	384-406	DKPGVYTRVSHFLPWIRSHTKKEE	(D20)	
33	214-243	DYIVYLGRSRLNSNTQGEMKFEVENLILHK	D11	
	384-401	DKPGVYTRV?HFLP?IRS-	D20	
34	355-381	DSGGPLVCSLQGRMTLTGKVSWSGRGCA-	D19	
35	355-383	DSGGPLVCSLQGRMTLTGKVSWSGRGCALK	D19	
36	305-343	DYLYPEQLKMTVVKLI SHRECQPHYGGSEVTTKMLCAA	D16	
37	157-176	DKIIGGEFTTIENQP?FAAI-	D 9	
38	157-197	DKIIGGEFTTIENQPWFAAIYRRRRHGGSVTYVCGGSLISPC-	D 9	

N. D.: not detected

(2) エンドプロテアーゼ Asp-N 消化

エンドプロテアーゼ Asp-N はアスパラギン酸のN端側を特異的に消化するプロテアーゼである。TM-164 が Asp-N によって完全に消化されて生ずるペプチドは、その cDNA 配列から全部で20個と予測される。

前述のようにして調製した rcmTM-164 を最初に 8 M 塩酸グアニジン溶液で可溶化した後、最終的に rcmTM-164 が 1 mg/ml となるように終濃度で 0.2 M トリシュー塩酸 (pH 7.0), 10 mM 塩化マグネシウム, 1 M 塩酸グアニジン溶液を加えた後、重量比で 1% の

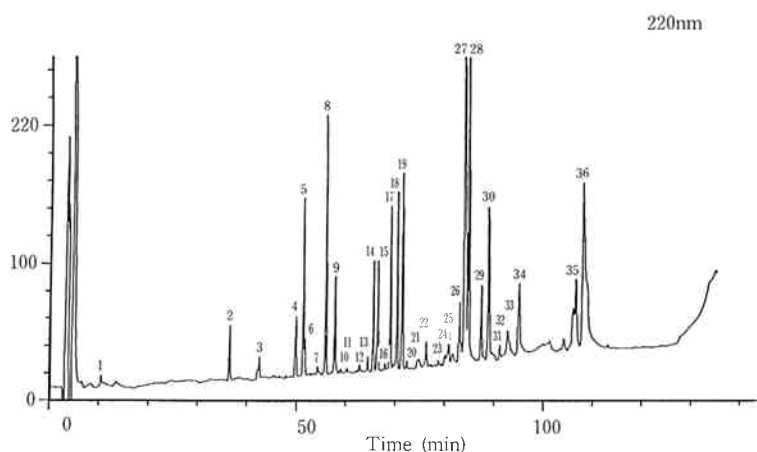


Fig. 7 Peptide map of rcmTM-164 by Lys-C.

Asp-N を加えて、37°C で酵素消化を行った。反応停止には3倍量の8M塩酸グアニジンを加え、更に0.1% TFA となるように TFA を加えて4°C で保存した。

得られた酵素消化物は、逆相クロマト（東ソー製 ODS-120T）で分離し、38個のペプチドを回収した（Fig. 6）。前述の方法に従って、それぞれをプロテインシーケンサーで分析した結果、理論上から推測される20個のペプチドのうち、D18（350-354）を除く19個のペプチドが3時間の消化から確認することができた（Table 2）。D18ペプチドについては、1時間の消化から確認できたので、この Asp-N 消化によって理論上から推測されるすべてのペプチドを1回のクロマト上で確認することができた。また天然型ヒトプロウロキナーゼからの変異部位である、TM-164 の DNA 配列上での変換部位135位（Lys→Gln）の変換と157位（Phe→Asp）の変換を蛋白質配列上で確認できた（Table 2, Ddf 10, 37, 38）。なお存在量はわずかではあるが、Ddf 32 ペプチドは407位のアスパラギンのところでβ-ペプチド結合したと予想されるペプチドが確認された。このことについては後述のトリプシン消化の項で考察する。ところで Asp-N による分析だけでは、411個のアミノ酸すべてを、またそのペプチド断片がどの様に並んでいたのかを決定することはできない。したがって Asp-N 以外のプロテアーゼによって消化し、Asp-N とは異なったペプチドマップを作成する必要がある。

(3) エンドプロテアーゼ Lys-C 消化

エンドプロテアーゼ Lys-C はリジンのC端側を特異的に消化するプロテアーゼである。TM-164 が Lys-C によって完全に消化されて生ずるペプチドは、その

cDNA 配列から全部で24個と予測される。

前述のようにして調製した rcmTM-164 を最初に8M塩酸グアニジン溶液で可溶化した後、最終的に rcmTM-164 が1mg/ml となるように終濃度で0.2M トリプシン塩酸（pH 7.0）、1M塩酸グアニジン溶液を加えた後、重量比で1%のLys-Cを加えて、37°Cで酵素消化を行った。反応停止には3倍量の8M塩酸グアニジンを加え、更に0.1%TFAとなるようにTFAを加えて4°Cで保存した。得られた酵素消化物は、逆相クロマト（東ソー製 ODS-120T）で分離し、36個のペプチドを回収した（Fig. 7）。それぞれをプロテインシーケンサーで分析した結果、理論上から推測される24個のペプチドのうち、K12（212）およびK13（213-233）を除く22個のペプチドを回収した（Table 3）。このLys-C消化によって、Asp-N消化で確認できなかったTM-164のアミノ酸がすべて確認でき、しかもそのペプチド断片のつながり方をも決定することができた（Fig. 8）。

Asp-N, Lys-C 消化によって TM-164 が cDNA から予想されるアミノ酸配列を有していることが確認されたが、Asp-N, Lys-C 消化ともにわずかではあるが407位のアスパラギンのところでβ-ペプチド結合したペプチドが確認されている。このペプチドが還元カルボキシメチル化や酵素消化といった操作上で生じたアーティファクトなのか、それとも実際に存在しているのかを確認しなければならない。したがってもっと温和な条件での酵素消化を試みた。

〔5〕 TM-164 のC端部分配列の確認

ここでは TM-164 の全アミノ酸配列を決定するためのペプチドマップではなく、TM-164 のC端部分配列、

Table 3 Amino acid sequence of Lys-C fragments

Lys-C peptide No.	Residue No.	Observations	Theoretical peptide
Kdf 1	261-264	IRSK	K16
2	146-151	FQCGQK	K 9
	152-158	TLRPRDK	K10
3	314-318	MTVVK	K19
4	36-46	KFGGQHCEIDK	K3-K4
	37-46	FGGQHCEIDK	K 4
5	47-61	SKTCYEGNGHFYRGK	K5-K6
6	49-61	TCYEGNGHFYRGK	K 6
7	49-55	SKTCYEG-	K5-K6
8	319-338	LISHRECQQPHYYGSEVTTK	K20
9	1-23	SNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNK	K 1
10	1-8	SNELHQVP-	K 1
11	1-10	SNELHQVPSN-	K 1
12	405-411	EENGLAL	K24
13	85-95	HAHRSDALQLG-	
14	339-348	MLCAADPQWK	K21
15	301-312	ENSTDYLYPEQL	K18
16		N. D.	
17	24-36	YFSNIHWCNCPKK	K2-K3
18	244-260	DYSADTLAHHNDIALLK	K15
19	24-35	YFSNIHWCNCPK	K 2
20	24-32	YFSNIHCN-	K 2
21	99-111	HNYCRNPDNRRRP-	K 8
22		N. D.	
23		N. D.	
24	234-243	FEVENLILHK	K14
	99-118	HNYCRNPDNRRRPWCYVQVG-	K 8
	265-280	EGRCAQPSTRIQ?ICL-	K17
25	99-125	HNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQE-	K 8
26	62-91	ASTDTMGRPCLPWSATVLQQTYHA?RSDA-	K 7
27	99-137	HNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQECMVHDCADGQKP-	K 8
	384-404	DKPGVYTRVSHFLPWIRSHRTK	K23
28	62-93	ASTDTMGRPCLPWSATVLQQTYHAHRSDALQ-	K 7
	265-289	EGRCAQPSRTIQTICLP?MYNDPQF-	K17
29	265-302	EGRCAQPSPTIQTICLPSMYNDPQFGTSCEITGFG?EN-	K17-18
30	384-409	DKPGVYTRVSHFLPWIRSHTKENGL	K23-24
31	386-397	DKPGVYTRVSHFLP-	K23
32		N. D.	
33	349-371	TDSCQG?SGGPLVCSLQGRMTL-	K22
34	339-363	MLCAADPQWKTDSCQG?SGGPLVC-	K21-22
35	159-196	IIGGEFTTIENQPWFAAIYRRHRGGSVTTYVCGGSLISP-	K11
36	159-210	IIGGEFTTIENQPWFAAIYRRHRGGSVTTYVCGGSLISPCWVISATH?FIDYP-	K11

すなわち407位のアスパラギンにだけ着目して分析することとした。

精製された 1 mg の TM-164 に 3MTCA を加えて 4°C, 30分間 TCA 沈澱を行った。得られた沈澱を 1 万 5 千回転, 10分間の遠心によって回収し, 更に氷冷したアセトン 0.4 ml を加えて再び 1 万 5 千回転, 10分間遠

心し, この操作を 2 回繰り返して残存している TCA の除去を行った。こうした得た沈澱を Speed Vac Concentrator で乾固した後, 0.3 ml のリン酸緩衝溶液 (pH 7.0) を加えて超音波を利用してよく分散・可溶化させ, 40 µg のトリプシンを加えて 37°C, 3 時間消化を行った。続いて 4 µl の酢酸を加えて反応を停止し, 1 万 5

Theoretical	SNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKFKGGQHCIEDKSKTCYEGNHFYRGKASTDTMGRPCLPWN SATVLQ
Asp-N	SNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKFKGGQHCIEDKSKTCYEGNHFYRGKASTDTMGRPCLPWN SATVLQ
Lys-C	SNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKFKGGQHCIEDKSKTCYEGNHFYRGKASTDTMGRPCLPWN SATVLQ
Theoretical	QQTYHAHRSDALQLGLGKHNCRNPDRRRPWCYVQVGLKPLVQECMVHDCADGQKPSPPPEELKFQCGQKTLRPRDKII
Asp-N	QQTYHAHRSDALQLGLGKHNCRNPDRRRPWCYVQVGLKPLVQECMVHDCADGQKPSPPPEELKFQCGQKTLRPRDKII
Lys-C	QQTYHA?RSDA HNYCRNPDRRRPWCYVQVGLKPLVQECMVHDCADGQKPSPPPEELKFQCGQKTLRPRDKII
Theoretical	GGEFTTIENQPWFAAIYRRRHGGSVTVVCGGSLISPCWVISATHCFIDYPKKEDYIVYLGRSRLNSNTQGEMKFEVENLI
Asp-N	GGEFTTIENQPWFAAIYRRRHGGSVTVVCGGSLISPC DYPKKE DYIVYLGRSRLNSNTQGEMKFEVENLI
Lys-C	GGEFTTIENQPWFAAIYRRRHGGSVTVVCGGSLISPCWVISATH?FIDYP FEVENLI
Theoretical	LHKDYSADTLAHHNDJIALKIRSKEGRCAQPSRTIQTICLPSMYNDPQFGTSCEITGFGKENSTDYLYPEQLKMTVVKLI
Asp-N	LHKDYSADTLAHHNDJIALKIRSKEGRCAQPSRTIQTICLPSMYNDPQFGTSCEITGFGKENSTDYLYPEQLKMTVVKLI
Lys-C	LHKDYSADTLAHHNDJIALKIRSKEGRCAQPSRTIQTICLPSMYNDPQFGTSCEITGFG?ENSTDYLYPEQL MLVVKLI
Theoretical	SHRECQPHYHYGSEVTTKMLCAADPQWKT DSCQGD SGGPLVCSLQGRMTLPGIVSWGRGCALKDKPGVYTRVSHFLPWIR
Asp-N	SHRECQPHYHYGSEVTTKMLCAADPQWKT DSCQGD SGGPLVCSLQGRMTLPGIVSWGRGCALKDKPGVYTRVSHFLPWIR
Lys-C	SHRECQPHYHYGSEVTTKMLCAADPQWKT DSCQGD SGG?PLVCSLQGRMTL DKPGVYTRVSHFLPWIR
Theoretical	SHTKEENGLAL
Asp-N	SHTKEENGLAL
Lys-C	SHTKEENGLAL

Fig. 8 Summary of the proof of structure of TM-164.

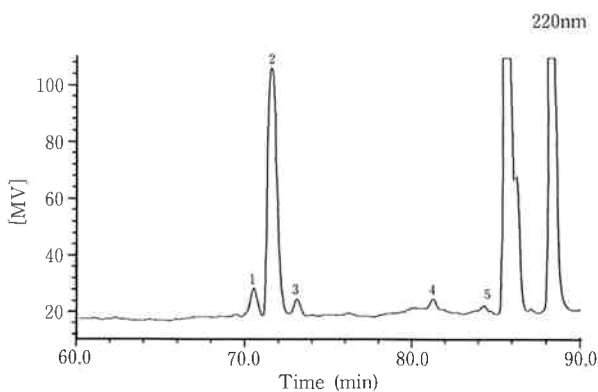


Fig. 9 Peptide map of rcmTM-164 by trypsin.

千回転、10分間の遠心した上清をミリポア社製ウルトラフリーC3LGCで遠心濾過し、更に純水0.3mlを加えて洗浄した。こうして得た濾過液約0.6mlを分析に使用した。その結果をFig. 9に示した。またこの消化によって得られたペプチド断片の配列をTable 4に示した。この結果によって、TM-164を温和な条件で酵素消化すれば、407位のアスパラギンが修飾されたペプチドが確認されないことが明らかとなった。またデータは示していないが、陽イオン交換カラムで検出されるアイソマーでは407位のアスパラギンが修飾されたペプチドがFig. 9に示されている時間内で確認された。以上のことからAsp-N, Lys-C消化で確認された修飾ペプチ

Table 4 Amino acid sequence of tryptic fragments

Trypsin peptide No.	Observations		
Tdf 1	SSGTSYPDVLK	Trypsin	132-142
2	SHTKEENGLAL	TM-164	401-411
3	EENGLAL	TM-164	405-411
4	MLCAAD	TM-164	339-344
5	N. D.		

ドは、おそらくpH8で行った還元カルボキシメチル化の際にわずかに生じてしまったものと思われる。

3. ま と め

大腸菌により大量生産させて得られたTM-164の全アミノ酸配列の分析を行うため、実験操作上でのアーティファクトが無いようにジスルフィド結合の還元、酵素消化の条件等の検討を行った。その結果を踏まえてAsp-N, Lys-C, トリプシンによるペプチドマップを作成してTM-164の全アミノ酸配列を調べたところ、TM-164は、その生産・精製過程で、cDNA配列から正確に翻訳され、しかも135位と157位の2カ所の改変部位が正しく改変されていることが確認でき、また411個のアミノ酸からなる配列中でアミノ酸の欠落や修飾などが起こっていないことも確認できた。

最後に、解析研究部・伊藤俊一副主任研究員、同・逸見隆史研究員、同・荒井栄子研究員に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 高田明和, 阪口周吉; 最新の血栓溶解療法 t-PA と pro-UK
- 2) Miyake et al; J. Biochem., 104, 643-647, (1988)
- 3) M. Ikehara, E. Ohtsuka, T. Tokunaga, Y. Taniyama, S. Iwai, K. Kitano, S. Miyamoto, T. Ohgi, Y. Sakuragawa, K. Fujiyama, T. Ikari, M. Kobayasi, T. Miyake, S. Sibahara, A. Ono, T. Ueda, T. Tanaka, H. Baba, T. Miki, A. Sakurai, T. Oishi, O. Chisaka, AND K. Matsubara; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81, 5956-5960, (1984)
- 4) 近藤 淑; 平成元年 GE 第2四半期報告 (1989)
- 5) A. M. Crestfield, S. Moore, W. H. Stein; J. Biol. Chem., 238, 622, (1963)
- 6) K. A. Wilson, M. Laskowski, Sr.; J. Biol. Chem., 260, 4261 (1975)



著 者

氏名 本 間 信 幸
Nobuyuki HONMA
入社 昭和62年4月1日
所属 研究本部
 生物学研究所
 第4研究室
 副主任研究員



著 者

氏名 新 谷 晃 司
Koji SHINTANI
入社 昭和62年4月1日
所属 研究本部
 生物学研究所
 第3研究室
 副主任研究員



著 者

氏名 竹 本 久 雄
Hisao TAKEMOTO
入社 昭和46年4月16日
所属 研究本部
 生物学研究所
 第4研究室
 第4研究室長