

東海大学大学院平成 26 年度博士論文

ニワトリ卵白中の新規タンパク質の  
構造と機能に関する研究

指導 松下 操 教授

東海大学大学院総合理工学研究科

総合理工学専攻

柳 華英

## 目次

### 略語一覧

第一章 緒論 .....	1
1.1 ニワトリの卵の構造 .....	1
1.2 ニワトリ卵白タンパク質 .....	1
1.3 SRCR ドメインスーパーファミリー .....	7
1.4 本研究の背景、目的、概要 .....	10
第二章 EW135 の精製法 .....	11
要約 .....	11
2.1 序論 .....	11
2.2 材料と方法 .....	12
2.2.1 試薬 .....	12
2.2.2 EW135 の精製法 .....	12
2.2.3 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 法 .....	13
2.2.4 糖タンパク質の染色法 .....	13
2.2.5 EW135 の N 末側アミノ酸配列の決定法 .....	14
2.2.6 EW135 に対する抗血清の作製法と抗体の精製法 .....	14
2.2.7 ELISA による EW135 の定量法 .....	15
2.2.8 抗 EW135 抗体-Sepharose の作製法 .....	16
2.2.9 高濃度塩による EW135 の可溶化法とイムノブロッティング法 .....	16
2.2.10 ELISA による EW135 複合体の解析法 .....	17

2.2.11	抗 EW135 抗体-Sepharose を用いた EW135 結合タンパク質の探索法	17
2.2.12	抗 EW135 抗体-Sepharose を用いた EW135 の精製と複合体の解析法	17
2.3	結果	19
2.3.1	EW135 の精製	19
2.3.2	糖タンパク質の検討	21
2.3.3	N 末側アミノ酸配列	23
2.3.4	ニワトリ卵白中の EW135 の定量	24
2.3.5	高濃度塩による EW135 の可溶化	24
2.3.6	ELISA による EW135 複合体の解析	26
2.3.7	抗 EW135 抗体-Sepharose を用いた EW135 結合タンパク質の探索	28
2.3.8	抗 EW135 抗体-Sepharose を用いた EW135 の精製と複合体の解析	30
2.4	考察	32
第三章	EW135 の構造解析	35
	要約	35
3.1	序論	35
3.2	材料と方法	36
3.2.1	試薬	36
3.2.2	部分アミノ酸配列決定法	37
3.2.3	cDNA クローニング法	38
3.2.4	RT-PCR 法	44
3.3	結果	46
3.3.1	EW135 の部分アミノ酸配列	46

3.3.2	cDNA クローニング	48
3.3.3	全アミノ酸配列	57
3.3.4	EW135 の SRCR ドメイン間の比較	60
3.3.5	EW135 遺伝子のエクソン・イントロン構造	63
3.3.6	EW135 メッセージの組織分布	75
3.4	考察	77
第四章 EW135 の機能		94
要約		94
4.1	序論	94
4.2	材料と方法	95
4.2.1	試薬	95
4.2.2	EW135 とプロテイン A Sepharose の結合性の検討	95
4.2.3	ELISA による EW135 とプロテイン A の Ca <sup>2+</sup> 依存的結合性の検討	96
4.2.4	黄色ブドウ球菌のホルマリン処理法	96
4.2.5	ELISA による EW135 と黄色ブドウ球菌の結合性検討	96
4.3	結果	98
4.3.1	EW135 とプロテイン A-Sepharose の結合性	98
4.3.2	EW135 とプロテイン A の結合性	98
4.3.3	EW135 と黄色ブドウ球菌の結合性	98
4.4	考察	102
第五章 総括		104
参考文献		107
謝辞		113

## 略語一覽

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
AIM	apoptosis inhibitory molecule
ALCAM	activated leukocyte-cell adhesion molecule
BNHS	N-hydroxysuccinimido-biotin
CBB	coomassie brilliant blue R-250
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CUB	2Clr/Cl <sub>s</sub> Uegf Bamp 1
DMBT1	deleted in malignant brain tumors
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
gp120	glycoprotein 120
gp340	glycoprotein 340
HIV- I	human immunodeficiency virus type I
HRP	horseradish peroxidase
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylene glycol
PRRs	pattern-recognition receptors
PVDF	polyvinylidene difluoride
RACE	rapid amplification of cDNA ends

RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SAG	salivary agglutinin
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SP-A	surfactant protein-A
SP-D	surfactant protein-D
SP $\alpha$	secreted protein $\alpha$
SRCR	scavenger receptor cysteine-rich
SRCR-SF	scavenger receptor cysteine-rich superfamily
TMB	3, 3', 5, 5' -tetramethylbenzidine
Tris	Tris (Hydroxymethyl) aminomethane (Trizma Base)
ZP	a zona pellucida

## 第一章 緒論

本論文は、ニワトリ卵白より発見されたスカベンジャー受容体システインリッチドメインスーパーファミリーに属する新規タンパク質に関する内容である。本章では、ニワトリの卵白タンパク質と SRCR ドメインスーパーファミリーについて概説し、次に本研究の背景、目的、概要を述べる。

### 1.1 ニワトリの卵の構造

ニワトリの卵は Fig. 1-1 に示すように、卵殻部、卵白部、卵黄部に大別される。卵殻部はクチクラ、卵殻、卵殻膜から、卵白部は外水様卵白 (outer thin albumen)、濃厚卵白 (thick albumen)、内水様卵白 (inner thin albumen)、カラザ (chalazae)、カラザ層から、卵黄部は卵黄膜、胚、卵黄からそれぞれ構成される。胚が存在する卵黄部は内水様卵白に包まれ、これを濃厚卵白と外水様卵白が包むことにより外部の衝撃から守られている。また、卵黄部を感染から守るため卵白中にはさまざまな抗菌性物質が含まれている。(中村 良, 2001)。

### 1.2 ニワトリ卵白タンパク質

卵白は約 75%の水、12%のタンパク質、脂質と糖質、ミネラルとビタミンのような微量物質から構成されている (Kovacs-Nolan et al. 2005)。主要な卵白タンパク質はオボアルブミン (54%)、オボトランスフェリン (12%)、オボムコイド (11%)、オボムチン (3.5%)、リゾチーム (3.4%) が挙げられる (Mine et al. 1995)。卵白タンパク質の主要な機能は 病原体の侵入に対して卵黄を守ることである

(Mine, 2007)。以下に、主なニワトリ卵白タンパク質の特徴を記す (Table. 1)。

### オボアルブミン

オボアルブミンは卵白の主要タンパク質であり、分子量 44.5 KDa のリン酸化糖タンパク質である (Doi et al. 1997)。機能については不明である。

### オボトランスフェリン

オボトランスフェリンは分子量77.7 KDaの糖タンパク質である (Mine et al. 1995)。オボトランスフェリンはトランスフェリンとして知られる鉄結合タンパク質群のメンバーである。オボトランスフェリンは、成長に不可欠である鉄を吸収することによってグラム陰性菌の増殖を抑制する (Lock and Board. 1992)。

### オボムコイド

オボムコイドは分子量が28 KDaの糖タンパク質であり、糖の比率は約25%と高い。トリプシンインヒビターとしての機能を持つ (Mine et al. 1995)。

### オボムチン

オボムチンは分子量 $5.5-8.8 \times 10^3$  KDaの粘性糖タンパク質である (Mine et al. 1995)。オボムチンは塩の存在下または $\text{pH} > 9$ の条件では水に可溶であるが、その以外の条件では、水に不溶である (Nakamura et al. 2000)。卵白中には均一な形では存在しておらず、濃厚卵白のゲル状部分から得られる不溶性オボムチンと、濃厚卵白のゾル状部分と水様卵白から得られる可溶性オボムチンに分けられる。オボムチンは糖含量約15%の $\alpha$ -オボムチンと糖含量約50%の $\beta$ -オボムチンで構成される。不溶性オボムチンでは $\alpha$ -オボムチンと $\beta$ -オボムチンの比率が



84:20であり、可溶性オボムチンは40:3である(Nakamura et al. 2000)。卵白中のシアル酸のほとんどがオボムチンの構成糖鎖に含まれており、オボムチンの生理活性がそのシアル酸に由来している場合が多い。オボムチンは特定のウイルス（牛ロタウイルスおよび家禽のニューカッスル病ウイルス、ヒトインフルエンザウイルス）に対して赤血球凝集インヒビターとして機能する(Tsuge et al. 1996)。

### リゾチーム

リゾチームは分子量 14.3 KDa の塩基性タンパク質である。その塩基性のため、リゾチームは卵白中のオボアルブミン、オボムチン、オボトランスフェリンと結合する (Ibrahim et al, 2002) 。リゾチームは細菌の細胞壁の構成成分であるペプチドグリカンの N-アセチルムラミン酸と N-アセチルグルコサミンの間の  $\beta$ -1-4 結合を加水分解し、溶菌作用を示す (Volcadlo et al. 2001)。グラム陰性菌よりも外膜のないグラム陽性に対して高い抗菌活性がある。自然食品防腐剤 (Johnson, 1994) や、細菌、ウイルス、炎症性疾患に対する医薬品 (Lacono et al. 1980) として幅広く使用されている。

### オボインヒビター

オボインヒビターは分子量 49 KDa で、オボムコイドと同様にトリプシンインヒビター活性を持ち、トリプシン、キモトリプシンなど多種類のタンパク質分解酵素に対して阻害活性を示す (Sugino et al. 1997)。

### オボフラボプロテイン

オボフラボプロテインは分子量 32-36 KDa で酸性糖タンパク質である。卵白

中のほとんどのリボフラビン(Vitamin B2)はオボフラボプロテインと結合している。微生物からリボフラビンを奪うことにより抗菌性を示す (Ibrahim et al. 1997)。

### オボマクログロブリン

オボマクログロブリンは分子量 760-900 KDa の糖タンパク質である。オボムチンのように、ウイルスによる赤血球凝集を阻害する (Sugino et al. 1997)。

### アビジン

アビジンは分子量が 68.3 KDa であり、同一のサブユニットからなる四量体の糖タンパク質である。アビジンの各サブユニットはビタミンの一つであるビオチンと特異的に結合する。ビオチンに対するアビジンの高親和性は分子生物学、アフィニティークロマトグラフィー、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)、組織化学および細胞化学における生化学的ツールとして広く利用されている (Green. 1975)。

### シスタチン

シスタチンは分子量が 12.7 KDa で、チオールプロテイナーゼインヒビターとして抗菌および抗ウイルス活性 (Ebina et al. 1991) がある。

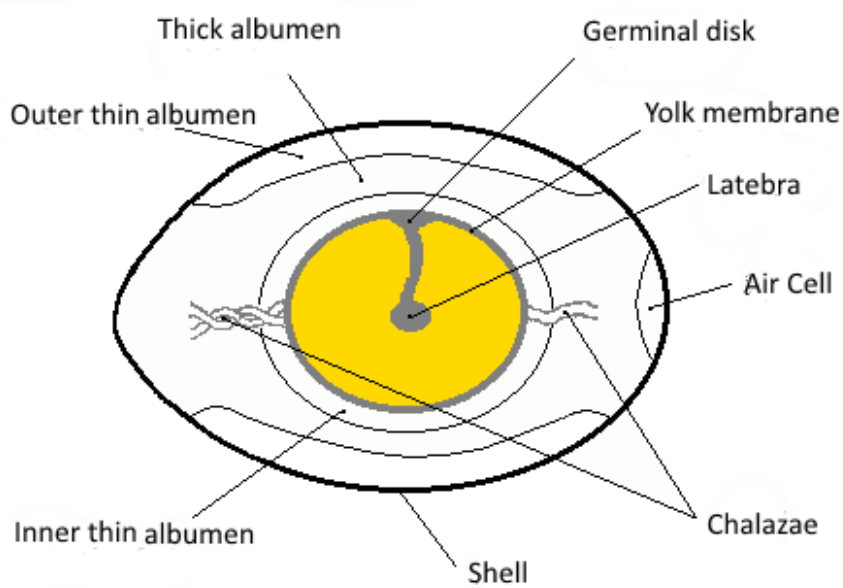


Fig.1-1. Cross Section of egg

([http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%83%95%E3%82%A1%E3%82%A4%E3%83%AB:Egg\\_cross\\_section.png](http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%83%95%E3%82%A1%E3%82%A4%E3%83%AB:Egg_cross_section.png)) の改変

Table.1. Major proteins presenting in egg white

Name	Amount (%)	M.W.(KDa)	Residues	Characteristics
Ovalbumin	54	44.5	385	Phosphoglycoprotein
Ovotransferrin	12	77.7	683	Binds iron ion Inhibit the growth of bacteria
Ovomucoid	11	28	185	Inhibit trypsin
Ovomucin	3.5	5500-8800	-	Sialoprotein, viscous Hemagglutination inhibitor(influenza etc)
Lysozyme	3.4	14.3	129	Lyse bacteria
Ovoinhibitor	1.5	49	449	Inhibit serine protease
Ovoflavoprotein	0.8	32-36	219	Binds riboflavin
Ovomacroglobulin	0.5	760-900	1437	Hemagglutination inhibitor
Avidin	0.05	68.3	128x4	Binds biotin Antibacterial
Cystatin	0.05	12.7	116	Inhibit thiolprotease Antibacterial Antiviral

<http://www2.ktokai-u.ac.jp/~nougaku/Bio/araki/egg.htm> の表  
 (東海大学農学部バイオサイエンス学科タンパク質化学研究室  
 作成) 改変

### 1.3 SRCRドメインスーパーファミリー

スカベンジャー受容体は、酸化、アセチル化などで変性した低濃度リポタンパク質 (low density lipoprotein ; LDL) のようなポリアニオン分子の認識及びエンドサイトーシスに係わる膜結合または可溶性の糖タンパク質である (Sarrias et al. 2004)。スカベンジャー受容体システインリッチ (scavenger receptor cysteine-rich ; SRCR) ドメインはよく保存された 100-110 アミノ酸残基から構成されている。SRCR ドメインスーパーファミリーはグループ A とグループ B に分類される。一般的に、グループ A に属する分子は SRCR ドメインに 6 個のシステイン残基を持ち、ドメインは 2 個以上のエクソンでコードされている。一方、グループ B に属する分子は SRCR ドメインに 8 個のシステイン残基を持ち、ドメインは 1 個のエクソンでコードされている。SRCR ドメインのシステ

インの相対的な位置とジスルフィド結合パターンはよく保存されている。グループ B ドメインのシステイン 1-8 においてジスルフィド結合パターンは C1-C4, C2-C7, C3-C8, C5-C6 である (Resnick et al. 1996)。一方、グループ A に属する分子は通常コラーゲン様ドメインのような他の機能ドメインを含むマルチドメインモザイクタンパク質として存在する (Fig. 1-2)。一方、グループ B に属する分子は一般的に SRCR ドメインの反復配列 (tandem repeat) で構成されているが、2Clr/Cl<sub>s</sub> UegfBamp 1 (CUB) ドメインや , zona pellucida (ZP) ドメインを持つこともある (Fig. 1-3)。

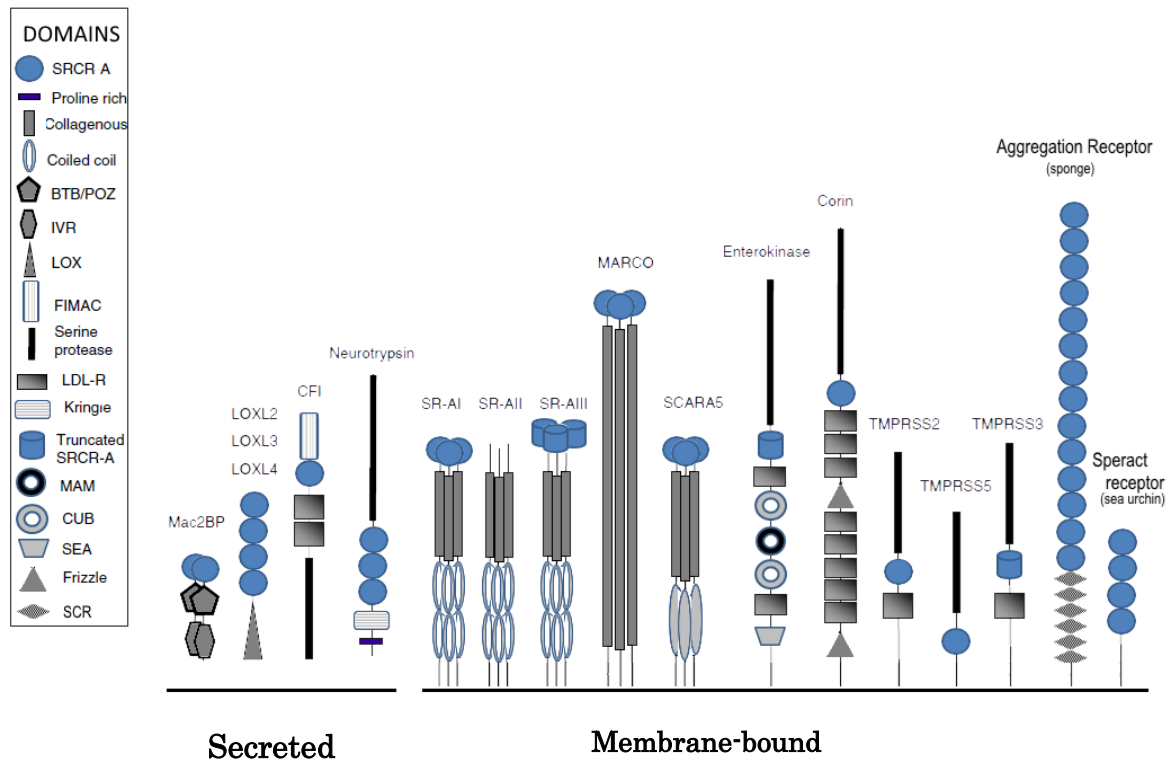


Fig.1-2. Schematic representation of several group A SRCR members

SRCR A; group A scavenger receptor cysteine-rich domain  
 BTB/POZ; *D. melanogaster* kelch protein dimerization domain, CUB; C1r/C1s  
 Uegf Bmp1 domain FIMAC, factor I membrane attack complex, IVR; intervening  
 region from *D. melanogaster* kelch protein, LOX; lysil oxidase, LDL-R; low  
 density lipoprotein receptor, MAM; domain homologous to members of a family  
 defined by motifs in the mammalian metalloprotease meprin, the *X. laevis*  
 neuronal protein A5, and the protein tyrosine phosphatase  $\mu$ , SEA; domain  
 found in sea urchin sperm protein, enterokinase, and agrin, SCR; short  
 consensus repeat. Proteins described in mammals (especially human), unless  
 indicated. (Sarrias et al. 2004; Martínez et al. 2011を改変)

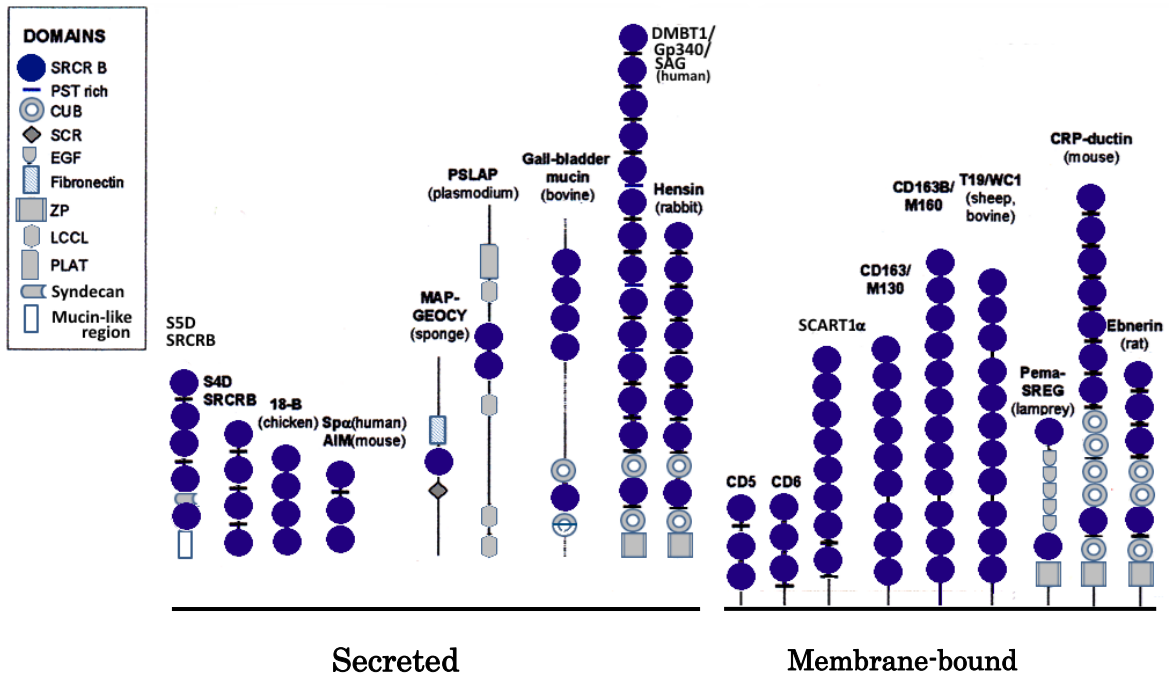


Fig. 1-3. Schematic representation of several group B SRCR members

SRCR B; group B scavenger receptor cysteine-rich domain  
 PST; proline-, serine-, and threonine-rich sequence, CUB; C1r/C1s Uegf Bmp1 domain; SCR, short consensus repeat, EGF; epidermal growth factor, ZP; zona pellucida domain, LCCL; Limulus factor C, Coch-5b2 and Lgl1 domain, PLAT; polycystin-1, lipoxigenase and alpha toxin. Proteins described in mammals, unless indicated. (Sarrias et al. 2004; Martínez et al. 2011を改変)

#### 1.4 本研究の背景、目的、概要

1.2で述べたように、ニワトリの卵白中には多くのタンパク質が存在し、主に生体防御に働いている。最近のプロテオーム解析により、ニワトリ卵白中には150種類以上のタンパク質が存在することが報告されている (Mann, 2011)。

生体防御に関わる動物血清中のレクチンの研究が主要なテーマの松下研究室では、生体防御タンパク質が重要な役割を担っているニワトリ卵白に注目し、この中からCa<sup>2+</sup>依存的に*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)に結合するタンパク質の探索を目指す先行研究が以下のように行われた。ニワトリ卵白の希釈液を10%のポリエチレングリコールで分画し、得られた沈殿をCa<sup>2+</sup>を含む緩衝液に溶かし、これをGlcNAc-agaroseカラムに添加後、EDTAにより溶出を行った。その結果、溶出液には還元下135 kDaの分子量のタンパク質(EW135)が含まれていた。しかし、この方法は、再現性が乏しく、また操作の過程でカラムが詰まるなどの問題点があり、EW135の単離法の確立と構造・機能の解析には至っていなかった。

そこで、本研究はEW135の精製法を確立し、その構造と機能の解析を目的とした。本研究の概要は以下の通りである。EW135の精製法を確立し、抗体を用いた解析を行った (第二章)。単離されたEW135の部分アミノ酸配列を決定し、それを基にcDNAクローニングを行った。その結果、EW135はグループBのSRCRドメインを複数持つ新規タンパク質であることを明らかにした (第三章)。さらにEW135の機能解析を行い、黄色ブドウ球菌とその構成成分のプロテインAにCa<sup>2+</sup>依存的に結合することを明らかにした (第四章)。



## 第二章 EW135 の精製法

### 要約

ポリエチレングリコール沈殿とイオン交換クロマトグラフィーを用いて、ニワトリの卵白より、還元下 135 kDa、非還元下 100 kDa の糖タンパク質 EW135 を単離した。また、抗 EW135-Sepharose を用いる方法によっても直接希釈卵白液から EW135 を単離した。前者の精製過程において、EW135 は卵白中の成分と  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に複合体を形成しており、EW135 が EDTA により遊離した。後者の精製やその他の解析から、EW135 は卵白中では単量体で存在しているが、前者の精製過程で EW135 同士が  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に複合体を形成するものと推定された。

EW135 の N 末端アミノ酸配列を決定したところ、ニワトリのゲノム解析をもとにデータベースに登録されている SRCR ドメインを複数持つタンパク質のアミノ酸配列の一部と一致した。EW135 の単離の報告はなく、EW135 はニワトリの新規卵白タンパク質である。

### 2.1 序論

第一章で述べたように、ニワトリの卵白にはオボアルブミン、オボムチン、リゾチームなどの多くのタンパク質が存在している。単離解析されたこれらの卵白タンパク質に加えて、プロテオーム解析から、多くのニワトリの新規卵白タンパク質が特定された。Guerin-Dubiard ら (2006) は二種類の新規タンパク質である Tenp と VM0-1 を発見した。Mann (2007) は新しく同定された 54 種類を含む計 78 種類のタンパク質を報告している。さらに、Mann (2011) は dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument (LTQ Orbitrap Velos) を用いてニワトリ

卵白中の 158 種類のタンパク質を同定し、報告している。

上述のように、プロテオーム研究により数多くのニワトリ卵白タンパク質が同定されているが、卵白より新規タンパク質を単離して研究することは近年なされていない。本研究では、ポリエチレングリコール沈殿とイオン交換クロマトグラフィーを用いてニワトリ卵白より新規タンパク質の単離を行った。

## 2.2 材料と方法

### 2.2.1 試薬

ニワトリ（シェーバーホワイト種）の卵は地元業者より購入した。以下に挙げる試薬類は括弧内のメーカーのものを使用した。

Tris aminothane (Sigma Aldrich), Q Sepharose (GE Healthcare) ,  
Pierce™ Glycoprotein Staining Kit (Thermo science), Protein A-agarose (GE Healthcare Life Science) , Starting block™ (Thermo Fisher Scientific),  
Avidin-biotin-peroxidase キット (Vector Laboratories), ABTS;  
2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (Invitrogen) ,  
CNBr-activated Sepharose (GE Healthcare Life Science), horseradish  
peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG (Jackson Immuno Research Laboratories),  
TMB; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (Promega),  
Block Ace (雪印乳業株式会社)、一般試薬は和光純薬工業のものを使用した。

### 2.2.2 EW135 の精製法

EW135 の精製は以下の 4 つのステップで行った。

1) ニワトリ卵白を 3 倍量の水で希釈し、その希釈液を 30 分間、攪拌した後、

遠心分離した (4°C、15,000×g、20 分間)。

2) 得られた上清にポリエチレングリコール(PEG)4000 を 10% (w/v)になるように添加し、室温で 1 時間攪拌した。その後、遠心分離 (4°C、15,000×g、20 分間) して、得られた沈殿物を TBS-Ca 溶液 (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.8) に溶解した。この溶液を 4°C で一晩放置した後、遠心分離した (4°C、15,000×g、20 分間)。得られた沈殿物を TBS-Ca で洗浄した。

3) その後、得られた沈殿物に TBS-EDTA (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 7.8) を添加し、試験管を 4°C、30 分間ローテーターで回転させた。遠心 (4°C、1,400×g、20 分間) 後、回収した上清をビーカーに移し、それに 1N HCl を添加して pH 5.0 に調整した。その後、遠心 (4°C、1,400×g、20 分間) して得られた上清を 20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl 溶液 (pH 8.0) に対して透析した。

4) 最終的に、透析内液を TBS-Ca で平衡化した Q Sepharose カラムに添加した。カラムを TBS-Ca を十分に洗浄後、溶出は NaCl の 0.2 M から 0.6 M まで直線濃度勾配的に行った。その結果、EW135 を含んでいる画分を回収し、Amicon Ultra (Millipore) で濃縮した。

### 2.2.3 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 法

SDS-PAGE は Laemmli の方法 (1970) を用い、試料の還元には 2-メルカプトエタノールを、タンパク質の染色には CBB を用いた。

### 2.2.4 糖タンパク質の染色法

EW135、Horseradish Peroxidase (糖タンパク質染色のポジティブコントロール)、Soybean Trypsin Inhibitor (糖タンパク質染色のネガティブコントロール)

の SDS-PAGE (12%分離ゲル、還元下)の後、過ヨウ素酸シッフ (Periodic acid schiff;PAS)染色法を基本とした Pierce™ Glycoprotein Staining Kit を用いて以下の通りに糖タンパク質の染色を行った。すなわち、電気泳動後のゲルを固定するために 50% メタノールに 30 分間浸した後、3% 酢酸で洗浄、Oxidizing solution にゲルを移し 15 分間攪拌した。次に、3% 酢酸でゲルを洗浄した後、Glycoprotein Staining Reagent にゲルを移し、15 分間攪拌した。次に、Reducing Solution にゲルを移し 15 分間攪拌した後、3%酢酸、続いて水で洗浄した。

#### 2.2.5 EW135 の N 末側アミノ酸配列の決定法

2-メルカプトエタノールによる還元下、EW135 の SDS-PAGE (10% gel)を行い、その後、PVDF 膜(Immobilon P, Merk Milipore, Billerica, MA)へ転写した。CBB を用いて染色後、バンドを切り出してアミノ酸配列を Protein sequencer (Shimazu PPSQ-21, Shimadzu, Kyoto)で解析した。

#### 2.2.6 EW135 に対する抗血清の作製法と抗体の精製法

##### EW135 に対する抗血清の作製法

精製した EW135 をウサギに免疫(毎回 150  $\mu$ g の EW135 を 2 週間の間隔で 5 回) することにより EW135 に対するポリクローナル抗体を作製した。抗血清は最後に追加免疫してから 2 週後に採取した。

##### 抗 EW135 抗体 (IgG 画分) の精製法

9 ml の抗血清に 9 ml の PBS と 18 ml の飽和硫酸液(pH 7.0)を添加し、4°C で 1 時間攪拌した後、遠心した (4°C、15,000  $\times$  g、20 分間)。得られた沈殿物を 10

ml の PBS に溶解して、これを 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して 4°C で一晩透析した。その後、透析内液をリン酸緩衝液で平衡化した Protein A-agarose カラム (GE Healthcare Life Science) に添加した。カラムをリン酸緩衝液で十分に洗浄後、抗 EW135 抗体の溶出は 40 ml の 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 3.0) で行った。溶出の際、フラクションコレクターの試験管 40 個に予め各 1 ml の 1 M Tris-HCl (pH 9.0) を添加しておき溶出液を中和した。

#### ビオチン標識抗 EW135 抗体の調製法

60  $\mu$ l の *N*-hydroxysuccinimido-biotin (Sigma Aldrich) (1 mg/ml in Dimethyl sulfoxide) を抗 EW135 抗体 (1 mg/ml in PBS) 1 ml に加えて室温で 4 時間反応させた。その後、反応液を PBS に透析して得られた透析内液を -80°C で保存した。

#### 2.2.7 ELISA による EW135 の定量法

10 個の鶏卵の卵白をそれぞれ、水で希釈し、4°C で 30 分間攪拌した後、遠心 (4°C、15,000  $\times$  g、20 分間) して上清を回収した。それを試料として ELISA を行った。0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で希釈した抗 EW135 抗体 (IgG 画分、80  $\mu$ g/ml) をマイクロプレート (IWAKI) に 4°C で一晩コートした。反応後、コート液を捨て Starting block 300  $\mu$ l を添加し、37°C で 2 時間ブロッキングを行った。その後、0.1% Tween 20 を含む PBS (PBS-T) で洗浄した。標準曲線作成用に PBS-T で段階的に希釈した EW135 (2 ng/ml ~ 500 ng/ml) と、試料 100  $\mu$ l をウェルに添加し、37°C で 1 時間保温した。PBS-T でウェルを洗浄した後、PBS-T で 100 倍希釈した ビオチン標識抗 EW135 抗体を 100  $\mu$ l を添加し、37°C で 1 時間保温した。ウェルを洗浄した後、PBS-T で 100 倍希釈した 100  $\mu$ l の Avidin-biotin-peroxidase 複合体を添加し、37°C で 1 時間保温した。ウェルを PBS-T と PBS で順次洗浄し

た後、0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 4.3) に ABTS と過酸化水素を混合した液を添加し、発色させた。マイクロプレートリーダー (BIO RAD) を用いて 415 nm における吸光度を測定した。

### 2.2.8 抗 EW135 抗体-Sepharose の作製法

0.1 M 炭酸緩衝液 (0.5 M NaCl を含む, pH 8.3) に溶解した抗 EW135 抗体 (IgG 画分) と CNBr-activated Sepharose の懸濁液をローテーターを用いてコンカルチューブ内で混合し、室温で 2 時間反応させた。抗体を反応させたゲルをグラスフィルターを用いて 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) で洗浄後にコンカルチューブに移し、室温で 2 時間反応させた (ブロッキング)。その後、0.1 M 酢酸緩衝液 (0.5 M NaCl を含む, pH 4.0) で洗浄し、続けて 0.1 M Tris-HCl (0.5 M NaCl を含む, pH 8.0) で洗浄し、これらの洗浄操作を 3 回繰り返した。最後に PBS で洗浄した。なお、抗 EW135 抗体なしで上記の操作を行い調製したゲルをコントロール用の Sepharose とした。

### 2.2.9 高濃度塩による EW135 の可溶化法とイムノブロットティング法

EW135 を含む沈殿物の調製の過程は、2.2.2 精製のステップ 1 や 2 と同様である。その後、50 mM Tris-HCl (0.3 M~1 M の NaCl を含む, pH 7.8) をステップ 2 で得られた沈殿に添加し、4°C で一晩静置した。遠心 (4°C、1,400 × g、20 分間) 後、上清を可溶化画分として回収した。還元下、SDS-PAGE (10%ゲル) を行った。その後、PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜 (Millipore) へ転写を行った。転写後、Block Ace を用いて 4°C で一晩ブロッキングを行った。PBS-T (0.1% Tween 20) で洗浄し、1 次抗体として抗 EW135 抗体を室温で 1 時間反応させた。その後、2 次抗体として HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体を室温で 1 時間反応させた。反応後、

PBS-T と PBS で洗浄し、TMB を用いて発色を行った。

#### 2.2.10 ELISA による EW135 複合体の解析法

2.2.9 において 50 mM Tris-HCl (0.5 M NaCl を含む, pH 7.8) により可溶化して得られた EW135 を含む画分をマイクロプレート (IWAKI) に 4°C で一晚コートした。Block Ace を用いて 37°C で 2 時間ブロッキングを行った。その後、TBS-Ca-T (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% Tween 20, pH 7.8) または TBS-EDTA-T (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.1% Tween 20, pH 7.8) で洗浄した。ウェルに TBS-Ca-T または TBS-EDTA-T を添加し、37°C で 30 分間保温した。それぞれの緩衝液でウェルを洗浄した後、それぞれの緩衝液で希釈した抗 EW135 抗体を添加し、37°C で 1 時間保温した。ウェルを洗浄した後、HRP 標識抗ウサギ IgG を添加し、37°C で 1 時間保温した。その後、TMB を添加し発色させた。HCl を添加し反応を停止後、マイクロプレートリーダー (BIO RAD) を用いて 450 nm における吸光度を測定した。

#### 2.2.11 抗 EW135 抗体-Sepharose を用いた EW135 結合タンパク質の探索法

2.2.9 において 50 mM Tris-HCl (0.5 M NaCl を含む, pH 7.8) により可溶化して得られた EW135 を含む画分を TBS-Ca で平衡化したカラムに添加した。カラムを TBS-Ca で十分に洗浄後、溶出を TBS-EDTA と 0.1 M Gly-HCl (pH 2.2) で順次行った。0.1 M Gly-HCl による溶出では、溶出液に等量の 1 M Tris-HCl (pH 8.3) を加えて混合した。

#### 2.2.12 抗 EW135 抗体-Sepharose を用いた EW135 の精製と複合体の解析法

Guerin-Dubiard ら (2005) を参考にして、ムチンフリーの卵白溶液を次のよう

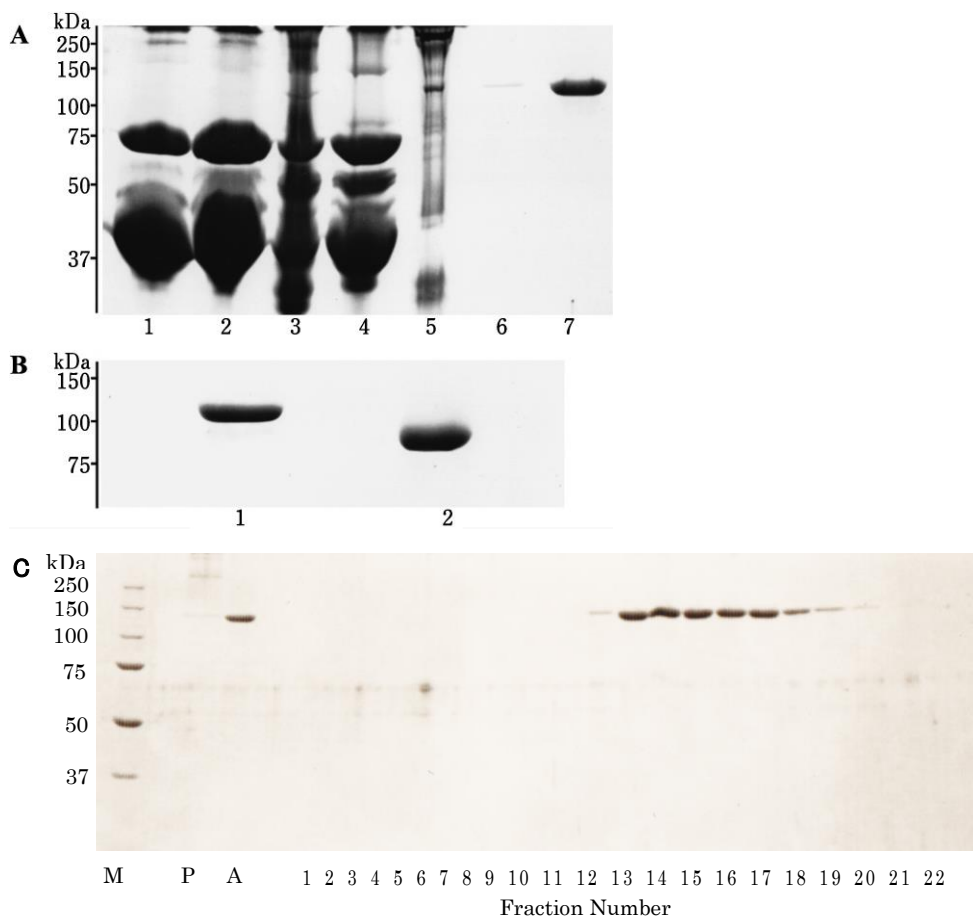
に作製した。卵白 (約 180 ml) を約 540 ml の水で 4 倍希釈後、1 M HCl を添加して pH 6.0 に調整し、これを一晩攪拌した。その後、遠心分離 (4°C、15,000 x g、20 分間) して得られた上清に同量の 2 x TBS-Ca (100 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 4 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5) を添加し 30 分間攪拌した。その後、遠心分離 (4°C、15,000 x g、20 分) した上清をガーゼに通して濾過した。濾過液を 2 つに分け、予め TBS-Ca で平衡化した抗 EW135 抗体-Sepharose カラムとコントロール用の Sepharose カラムにそれぞれ添加した。カラムを TBS-Ca で十分に洗浄後、溶出は TBS-EDTA と 0.1 M Gly-HCl (pH 2.2) で順次行った。0.1 M Gly-HCl による溶出では、溶出液に等量の 1 M Tris-HCl (pH 8.3) を加えて混合した。



## 2.3 結果

### 2.3.1 EW135 の精製

水で希釈した卵白を静置すると不溶性のオボムチンが沈殿した。これを遠心操作で除いた後、上清を PEG4000 で分画して得られた沈殿物をカルシウムイオン入り緩衝液に溶解し、反応した。その結果、新たに沈殿が生じた。SDS-PAGE の結果、この沈殿物には卵白 (Fig. 2-1A, lane 1) では検出されない EW135 を含んでいることが判明した (Fig. 2-1A, lane 5)。沈殿物に TBS-EDTA を添加して反応した結果、緩衝液中にこのタンパク質が回収された (Fig. 2-1A, lane 6)。次に、EW135 を含む画分を Q Sepharose を用いたイオン交換クロマトグラフィーにより分画した結果 (Fig. 2-1C)、高純度の EW135 が単離された (Fig. 2-1A, lane 7, Fig. 2-1B, lane 1)。一方、非還元下での EW135 の分子量は約 100 kDa であった (Fig. 2-1B, lane 2)。



**Fig. 2-1. Isolation of EW135 from chicken egg white**

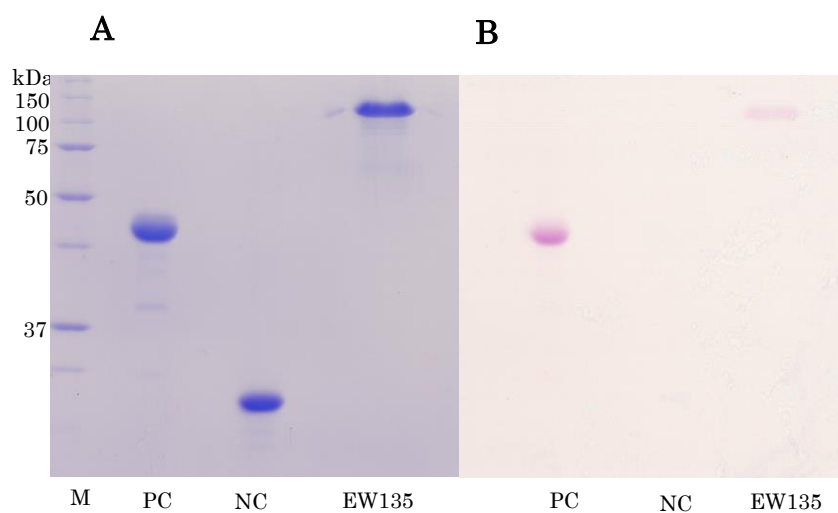
(A) SDS-PAGE profiles of proteins during the purification process. Samples at each step were subjected to SDS-PAGE (10% gel) under reducing conditions followed by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250. These consisted of lane 1: egg white, lane 2: the supernatant obtained after adding water to egg white, lane 3: the solubilized PEG precipitates, lane 4: the supernatant generated by leaving the solubilized PEG precipitates at 4°C overnight, lane 5: the precipitates generated after the solubilized PEG precipitates were left at 4°C overnight, lane 6: the supernatant obtained after treatment of the precipitates with TBS-EDTA, lane 7: the EW135 fraction collected using a Q Sepharose column. (B) SDS-PAGE profile of EW135. After chromatography on Q Sepharose, the purified EW135 was subjected to SDS-PAGE (10% gel) under reducing (lane 1) and non-reducing (lane 2) (C) SDS-PAGE profile of EW135 on Q Sepharose. Elution was performed by applying a linear NaCl gradient to 0.6 M. EW135 eluted at a concentration between 0.35 M and 0.45 M NaCl. (Yoo et al. 2013a)

M: Molecular weight marker      P: EW135 (Positive control)

A: Applied solution

### 2.3.2 糖タンパク質の検討

EW135 が糖タンパク質である可能性を探るため、PAS 染色のキットを用いて検討した。Horseradish Peroxidase をポジティブコントロール、Soybean Trypsin Inhibitor をネガティブコントロールとして EW135 の SDS-PAGE を行い、CBB 染色と PAS (Periodic acid-Schiff) 染色でバンドを検出した。その結果、Fig. 2-2 に示すように、CBB 染色ではポジティブコントロール、ネガティブコントロール、EW135 のバンドが観察された。一方、PAS 染色では、EW135 とポジティブコントロールのバンドのみが観察された。このことから、EW135 が糖タンパク質であることが判明した。



**Fig. 2-2. Staining of EW135**

EW135, Horseradish Peroxidase (positive control, PC) and Soybean Trypsin Inhibitor (negative control, NC) were subjected to SDS-PAGE (12% gel) under reducing conditions followed by staining with CBB (A) and PAS staining (B). M: Molecular weight marker

### 2.3.3 N末側アミノ酸配列

N末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサーで解析したところ、アミノ酸のシグナルが検出されなかった。このことから、EW135のN末端アミノ酸は修飾（ブロック）されていると推定された。タンパク質の多くはN末端のアミノ酸のアミノ基はホルミル化されており、HClによりホルミル基を外すことができる。そこで、SDS-PAGE後に切り出したEW135のバンドを0.6M HCl溶液に浸し、25°Cで24時間反応させ、その後、アミノ酸配列を解析した。その結果、N末端アミノ酸の10残基（APIRLVDGPN）が判明した。Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)で、この配列のホモロジー検索をしたところ、XP\_424435の部分配列と高い類似性を持つことが明らかになった。XP\_424435はニワトリのゲノム塩基配列（NW\_003764339）をもとに推定されたタンパク質のアミノ酸配列であり、600個のアミノ酸残基から成る。この配列の中で類似性を示すアミノ酸配列は、387番～396番のAPIRLVNGPNであり、393番目のアミノ酸残基がN（EW135ではDである）以外はEW135のN末側アミノ酸配列と一致した。XP\_424435は5つのグループB SRCR ドメインの構造を持っている。Blastで、配列の類似性検索の結果、EW135と一致するタンパク質の単離の報告は無いことから、EW135はニワトリの新規卵白タンパク質と考えられた。

#### 2.3.4 ニワトリ卵白中の EW135 の定量

2.2.7 にて得た上清を試料として、また精製 EW135 を標準物質として EW135 の ELISA を行った。

10 個の卵について EW135 を定量したところ、1 個の卵中の EW135 の量は  $485 \pm 20 \mu\text{g}$  であった。

#### 2.3.5 高濃度塩による EW135 の可溶化

2.3.1 で述べたように、EW135 の精製の過程で PEG4000 の沈殿物を溶解後インキュベートすると、新たに生成した沈殿物に EW135 が含まれていた。一般的にタンパク質は高濃度塩により沈殿するが、オボムチンのように可溶化することもある (Nakamura et al. 2000)。そこで次に、沈殿物を高濃度塩で処理することにより EW135 が可溶化するか検討した。

PEG4000 の沈殿物を溶解、インキュベート後に新たに生成した沈殿物を 0.2 M から 1 M までの濃度の NaCl を含む Tris-HCl 緩衝液にて反応させた。遠心後、上清中の EW135 の有無を抗 EW135 抗体を用いたイムノブロット法により調べた。その結果、Fig. 2-4 に示すように、0.2 M NaCl を含む緩衝液では EW135 は検出されなかったが、0.3 M 以上の濃度の NaCl では検出された。75 kDa 付近に薄いバンドも検出されたが、精製過程で分解した EW135 のフラグメントが抗 EW135 抗体と反応した可能性が考えられた。

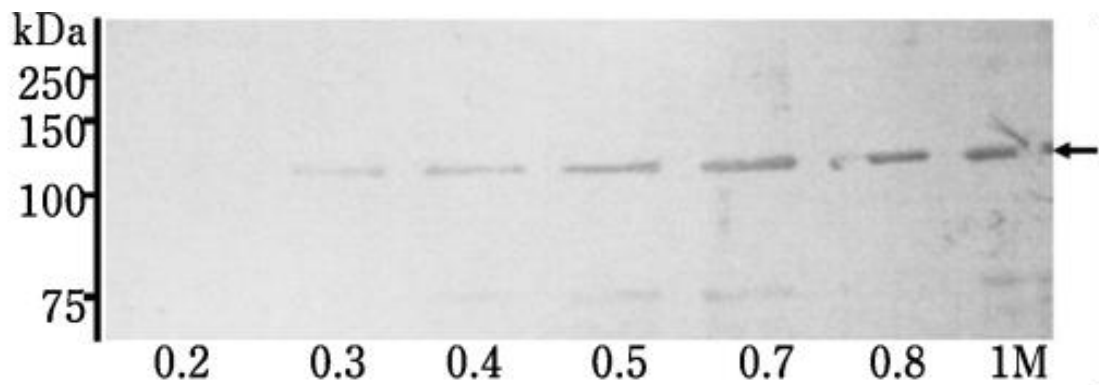


Fig.2-4. Solubilization of EW135 from the precipitates using high concentrations of NaCl.

The precipitates generated from the solubilized PEG precipitates were incubated with Tris buffer containing NaCl at concentrations ranging from 0.2 M to 1 M. After centrifugation, the supernatant was examined for the presence of EW135 by immunoblotting using anti-EW135 as a probe. The arrow indicates molecular weight corresponding to EW135. (Yoo et al. 2013a)

### 2.3.6 ELISA による EW135 複合体の解析

2.3.1 で述べたように、EW135 は卵白液の PEG 4000 の沈殿物を溶解し、反応後に生成する沈殿物を EDTA 処理することで得られた。これは、EW135 が  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に沈殿物中の成分と複合体を形成しており、EDTA 処理によってこの物質から解離したことを示唆している。そこで、これを検証する ELISA を行った。まず、沈殿物と 0.5 M NaCl を含む Tris 緩衝液を反応して得られた EW135 を含む画分をマイクロプレートウェルにコートし、 $\text{Ca}^{2+}$  または EDTA を含む Tris-HCl 緩衝液とインキュベートした。その後、抗 EW135 抗体を用いてウェル上の EW135 のレベルを測定した。Fig. 2-5 に示すように、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下の EW135 のレベルが EDTA 存在下の EW135 のレベルより 1.8 倍高かった。この結果は、ELISA に用いた検体中で EW135 が卵白の成分と  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に複合体を形成しており、EW135 がウェルに結合している場合は、EW135 は EDTA 存在下でもそのままの結合状態を保ち、一方、EW135 の結合相手の成分がウェルに結合している場合は、EW135 が EDTA によりこの成分より解離したことを示している。



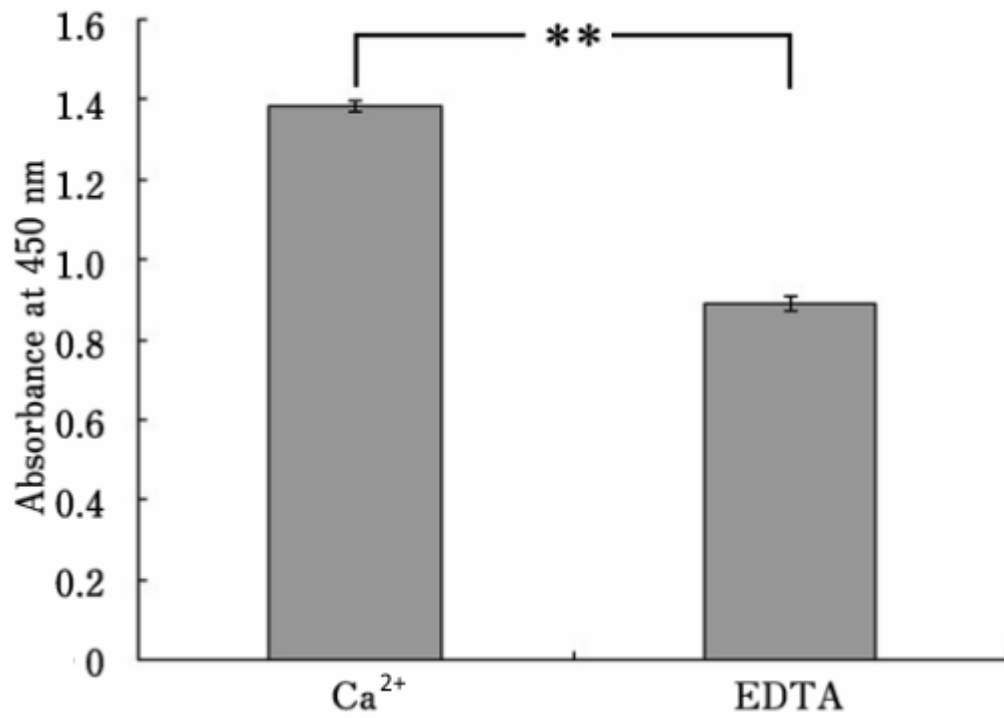


Fig. 2-5. Ca<sup>2+</sup>-dependent binding of EW135 to a substance(s) in chicken egg white

The EW135 preparation obtained by treatment of the precipitates with 0.5M NaCl containing buffer was coated on the microplate wells and incubated with buffer containing either Ca<sup>2+</sup> or EDTA. After incubation, EW135 levels in the wells were measured using anti-EW135. \*\*  $P < 0.01$  ( $n=3$ ). (Yoo et al. 2013a)

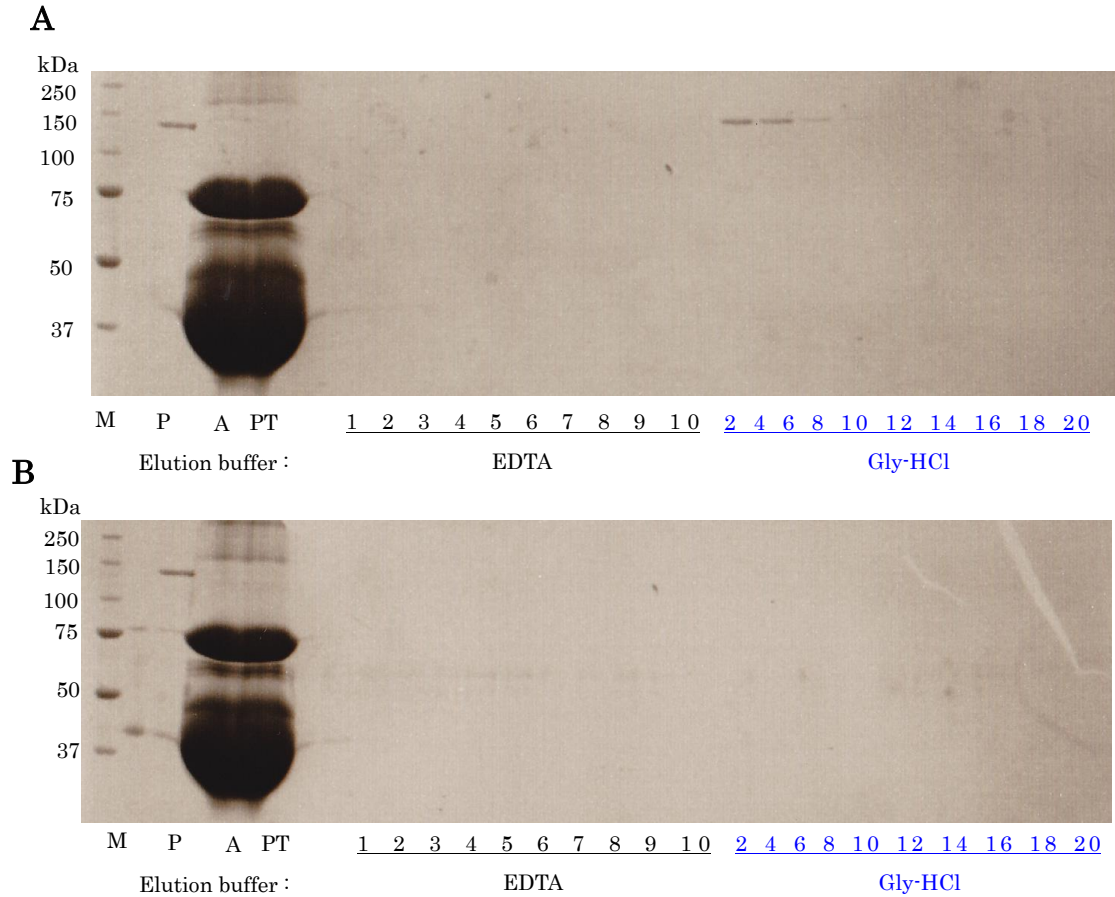
### 2.3.7 抗 EW135 抗体-Sepharose を用いた EW135 結合タンパク質の探索

2.2.9 の方法に従い、0.5 M NaCl を含む Tris-HCl (pH 7.8) により可溶化して得られた EW135 を含む画分を抗 EW135 抗体-Sepharose カラムに添加した。溶出は、2.2.11 の方法に従った。その結果、Fig. 2-6 に示すように、SDS-PAGE において TBS-EDTA 溶出画分と Gly-HCl 溶出画分の両方に EW135 が検出された。この結果は、EW135 同士が  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に複合体を形成していることを示している。



### 2.3.8 抗 EW135 抗体-Sepharose を用いた EW135 の精製と複合体の解析

EW135 は 2.2.2 に述べた PEG 沈殿等の操作を行い単離されたタンパク質である。ここでは、本単離方法の代わりに、抗 EW135 抗体-Sepharose を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、PEG 沈殿等の操作を経ずに卵白の希釈液から精製できるか検討した。また、同時に EW135 と  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に複合体を形成している成分を探索した。水で希釈した卵白に 1 M HCl を加え、生じた沈殿を遠心分離で除いた。次に、得られた上清に TBS-Ca pH 7.5 を添加して生じた沈殿を遠心分離で除いた。上清をろ過後、ろ液を EW135 抗体-Sepharose カラムと対照の Sepharose カラムにアプライした。溶出は TBS-EDTA pH 7.8 と 0.1 M Gly-HCl pH 2.2 の順で行った。EW135 の検出は、SDS-PAGE のタンパク質染色と ELISA を用いた。Fig. 2-7 に示すように、SDS-PAGE の結果から、抗 EW135 抗体-Sepharose カラムの EDTA 溶出画分には EW135 のバンドは検出されず、Gly-HCl 画分には検出された。一方、対照の Sepharose カラムでは、EDTA 溶出画分と Gly-HCl 溶出画分のいずれも EW135 のバンドが検出されなかった。抗 EW135 抗体-Sepharose と対照 Sepharose の TBS-EDTA 溶出液のフラクション 1 から 5 を、Gly-HCl 溶出液はフラクション 1 から 5 をそれぞれプールした。それらを検体として 2.2.6 の方法で ELISA を行った。抗 EW135 抗体-Sepharose における EW135 量は、TBS-EDTA 溶出液では  $5.7 \mu\text{g}$ 、Gly-HCl 溶出液では  $201.5 \mu\text{g}$  であった。一方、対照 Sepharose における EW135 量は、TBS-EDTA 溶出液では  $2.5 \mu\text{g}$ 、Gly-HCl 溶出液では  $19.4 \mu\text{g}$  であった。



**Fig.2-7. Elution profile of proteins on anti-EW135 antibody-Sepharose**

Egg white, which had been diluted with water and filtered was applied to an anti-EW135 antibody-Sepharose column(A)or a control Sepharose column(B). Elution was performed with TBS-EDTA followed by Gly-HCl. Eluted fractions were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and proteins were stained with CBB.

M: Molecular weight marker

P: EW135 (Positive control)

A: Applied solution

PT: pass-through fractions

## 2.4 考察

本研究では、ニワトリ卵白からタンパク質の EW135 を 2 つの方法で精製した。第 1 の方法は以下の通りである。不溶性オボムチンを除いたニワトリ卵白の希釈水溶液を PEG 沈殿で分画し、得られた沈殿物を  $\text{Ca}^{2+}$  入りの緩衝液に溶解しインキュベーションした。その結果生じた沈殿に TBS-EDTA を添加してインキュベーションした後、上清に回収されたタンパク質を Q Sepharose により分画して EW135 を得た。第 2 の方法では、ニワトリ卵白の希釈水溶液を抗 EW135 抗体-Sepharose に添加し、Gly-HCl 緩衝液による溶出で EW135 を得た。

第 1 の精製方法では、EW135 は PEG 沈殿の溶解液を静置して生じた沈殿中に存在し、EDTA 処理により沈殿から遊離した。従って、EW135 は  $\text{Ca}^{2+}$  を介して卵白中の成分と結合していることが推定された。PEG 沈殿の溶解液を静置して生じた沈殿の一部は高濃度の NaCl 水溶液で溶け、その中に EW135 が含まれていることが分かったが、この画分をマイクロプレートにコート後に EDTA 処理すると固相上の EW135 量が減少した。これは、上記の推定を支持する結果である。

EW135 が結合している卵白成分を同定する目的で、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下、上記の NaCl 水溶液を抗 EW135-Sepharose に添加後、EDTA により EW135 が溶出した。その後、Gly-HCl により EW135 が溶出した。このことは、NaCl 水溶液画分中で EW135 同士が  $\text{Ca}^{2+}$  を介して会合している可能性を示している。一方、ニワトリ卵白の希釈水溶液と抗 EW135-Sepharose を用いる第 2 の精製方法において、Gly-HCl による溶出操作の前に EDTA で溶出操作を行ったところ、EW135 はほとんど溶出されなかった。これらの事実は、EW135 は卵白中では EW135 同士が  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に複合体を形成して存在しているのではなく、第 1 の精製方法の PEG 沈殿の過程で EW135 同士が  $\text{Ca}^{2+}$  を介して会合した可能性を示唆している。

卵白の主要タンパク質のオボムチンは、その粘性の為に EW135 の精製過程でカラムが詰まる原因となり、これを除く必要があった。卵白中のオボムチンは水での希釈や HCl 処理により沈殿することから、その除去を試みたが完全に除去することができず上清に残った。EW135 の第 1 の精製方法において、この上清の PEG 沈殿物を溶解した液を静置して生じる沈殿を 0.5 M NaCl で溶かすと、その溶液は粘性があることから、溶液中にオボムチンが含まれていると推定された。オボムチンは高濃度の塩で可溶化することが知られており、沈殿に含まれるオボムチンが 0.5M NaCl で可溶化したものと考えられた。グループ B SRCR ドメインの構造をもつ gp340 は  $Ca^{2+}$  依存的にムチンと結合することが報告されていることから (Madsen et al. 2008)、0.5M NaCl で可溶化した溶液中でオボムチンと EW135 が  $Ca^{2+}$  依存的に結合している可能性が推定された。しかし、抗 EW135 抗体-Sepharose を用いた実験より、EW135 が  $Ca^{2+}$  依存的に複合体を形成している相手の成分は EW135 であることが分かった。

松下研究室では先行研究において、GlcNAc-agarose カラムから EDTA 依存的に溶出する卵白タンパク質として EW135 を見いだした。この精製方法では、卵白の 10% PEG 沈殿を  $Ca^{2+}$  を含む緩衝液に溶解し、GlcNAc-agarose カラムによる分画を行っている。しかし、緒論の 1.4 で述べたように、再現性やカラムが詰まるなどの問題点があった。本研究の第 1 の精製方法では、GlcNAc-agarose を用いた方法と同様に、まず卵白の希釈水溶液の 10% PEG 沈殿を  $Ca^{2+}$  を含む緩衝液に溶解した。しかし、GlcNAc-agarose を用いた方法と異なり、第 1 の精製方法では、溶解した PEG 沈殿をインキュベートする。この過程で生成する沈殿中に EW135 が含まれており、これから EDTA により EW135 が分画された。従って、両者の精製方法を比較して考察すると、GlcNAc-agarose の方法では、添加した PEG 沈殿の溶解液中の EW135 同士がカラム操作の過程で  $Ca^{2+}$  存在下会合し、不溶性となっ

てカラムに詰まり、EDTA で可溶化、溶出したものと推定される。

本研究では、ELISA による定量を行い、卵 1 個あたり約 480  $\mu$ g の EW135 が卵白中に含まれることを明らかにした。卵白タンパク質に占める EW135 の割合は不明であるが、SDS-PAGE (Fig. 2-1) において、精製の出発材料の卵白の希釈水溶液には EW135 のバンドが検出されないことから、量的には卵白中の主要なタンパク質ではないと推定される。



### 第三章 EW135 の構造解析

#### 要約

精製 EW135 の部分アミノ酸配列の解析から、EW135 にはグループ B SRCR ドメインに特徴的な配列が存在することが明らかになった。得られた EW135 の部分アミノ酸配列をもとに設計したプライマーを用いてニワトリ輸卵管 cDNA を鋳型にした PCR を行い、EW135cDNA の一部に相当する PCR 産物を得た。この cDNA クローニングを行い、さらには、3' RACE 法と 5' 側の解析により EW135 の完全長の塩基配列を決定した。また、その塩基配列よりアミノ酸配列を推定した。その結果、EW135 は 970 個のアミノ酸残基で構成され、7 アミノ酸から成るペプチドによってつながった 9 つのグループ B の SRCR ドメインのタンデムな繰り返しのみで構成されていることが判明した。また、EW135 遺伝子は 11 個のエクソンで構成されており、各々の SRCR ドメインは単一のエクソンでコードされていた。RT-PCR の結果、解析した 11 種類の組織の輸卵管のみにメッセージの発現が見られた。

#### 3.1 序論

第二章で述べたように、ニワトリ卵白から糖タンパク質の EW135 を単離した。N 末端アミノ酸配列から判断した場合、EW135 はこれまでに単離が報告されていない新規タンパク質であると考えられた。そこで、EW135 の全アミノ酸配列を明らかにする目的で実験を行った。一般的に、タンパク質のアミノ酸配列決定法として N 末端から決定するエドマン法 (Edman et al. 1950) が知られている。現在ではプロテインシーケンサーを用いて解析するが、目的のタンパク

質をそのまま解析しても EW135 のように N 末端から数十アミノ酸残基程度しか決定できず、しかも内部のアミノ酸配列は解析できない。そこで、タンパク質をトリプシン消化し、得られた複数のペプチド断片をカラムで分離後、それぞれのペプチドのアミノ酸配列を決定する方法が用いられている。一方、タンパク質のアミノ酸配列を遺伝子工学で明らかにする方法もある。すなわち上記のようにして得られたタンパク質の部分アミノ酸配列をもとに設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いてタンパク質の産生臓器の cDNA を鋳型にして PCR を行う。その後、得られた cDNA をクローニングベクターに組み換え、それを大腸菌に軽質転換するサブクローニングを行い、最終的に cDNA の塩基配列を決定し、アミノ酸配列を推定するものである。

本研究では、部分アミノ酸配列決定法やクローニング法により、EW135 の全アミノ酸配列を推定した。その結果、EW135 はグループ B の SRCR ドメインスーパーファミリーに属する新規タンパク質であることが明らかとなった。

## 3.2 材料と方法

### 3.2.1 試薬

以下に挙げる試薬類は括弧内のメーカーのものを使用した。

SYBR Green (Lonza)、MinElute Gel Extraction (Qiagen)、pGEM-T Easy Vector (Promega)、E. coli JM109 competent cell (Takara)、bacto trytone, bacto yeast extrat, bacto agar, ampicillin, SMARTer RACE cDNA Amplication Kit (Clontech Laboratories), nucleotrap of SMARTer RACE cDNA Amplication Kit (Clontech Laboratories), ニワトリ組織 ; 肝臓、睾丸、心臓、肺、脾臓、腎臓、盲腸、脳、小腸、筋肉のトータル RNA (Zyagen), PrimeScript RTase (Takara), 一般試薬

は和光純薬工業のものを使用した。

### 3.2.2 部分アミノ酸配列決定法

EW135 の部分アミノ酸配列の解析を以下の通り行った (東海大学農学部との共同研究)。

#### 3.2.2.1 EW135 のカルボキシメチル化

Crestfield ら (2006) の方法に従い、以下のようにしてカルボキシメチル化 EW135 を調製した。すなわち 0.2 mg の EW135 を 100  $\mu$ l の 1.4 M Tris-HCl 緩衝液, (pH8.6) に溶解した後、0.12 g の尿素、10ml の 5% EDTA と 3.3  $\mu$ l の 2-メルカプトエタノールを添加し、N<sub>2</sub> 存在下で 37°C、60 分間反応させた。その後、この反応液に 60  $\mu$ l の 1.0 M 水酸化ナトリウム溶液に溶解した 17.8 mg のモノヨード酢酸を添加し、暗所で室温、60 分間反応させた。その後、反応液を 0.2 M の水酸化アンモニウムで平衡化した Sephadex G-50 カラムに通して脱塩を行った。このようにして得られたカルボキシメチル化 EW135 は最終的に凍結乾燥して保存した。

#### 3.2.2.2 EW135 のトリプシン消化とペプチドの分離

カルボキシメチル化 EW135 (0.1 mg) を 50  $\mu$ l の 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) に溶解し、これにトリプシン (1/50, w/w, TR-TPCK, Cooper Biomedical Co.) を添加後、37°C、4 時間処理した。その後、トリプシン処理で得られた EW135 のペプチド断片は逆相 HPLC カラム (YMC ODS 120A S-5; 4.6×250mm, Yamamura Chemical Co.) に添加した。0.1% トリフルオロ酢酸 (solvent A) と 60% アセトニトリル in solvent A (solvent B) を用い、solvent A から 60% の solvent B まで 5 時間の直線的な勾配により溶出を行った。ペプチドの溶出は 220 nm

(Thammasirirak et al. 2002)の吸収で検出した。ペプチドのアミノ配列はプロテインシーケンサー (Model PPSQ21A, Shimadzu Co.)にて決定した。

### 3.2.3 cDNA クローニング法

#### 3.2.3.1 全 RNA の分離と cDNA の合成

一般的にニワトリの卵白タンパク質は輸卵管で作られる。そこで輸卵管からなる cDNA の合成を次のように行った。

ニワトリの輸卵管は国立感染症研究所の淺沼秀樹博士により供与された。本動物実験は the National Institute of Infectious Disease (NIID) の動物実験ガイドラインに従って行われ、the Animal Care and Use Committee of NIID (approval No. 110117)により承認されている。イソフルラン麻酔下、心臓より脱血したホワイトレグホンのメス (Line=M, 6 ヶ月, 日生研)より輸卵管を摘出し、これを RNA later (Qiagen, Valencia, CA)にて保存した。輸卵管からの全 RNA の抽出は Trizol reagent (Life Technologies, Carisbad, CA)を用いて行い、その後の一本鎖 cDNA の合成は SuperScript 111 First-Strand Synthesis System (Invitrogen)を用いた。

#### 3.2.3.2 EW135 cDNA の内部塩基配列決定のためのクローニング

EW135 のトリプシン消化ペプチド断片のアミノ酸配列の解析から、配列の一部はタンパク質データベース Uniparc のUPI0000611E45 とUPI000044AB0Dに見いだされた。また、これらの配列はタンパク質データベース RefSeq のXP\_424435にも含まれていた。EW135 の cDNA クローニングの最初のステップとして、PCR のためのプライマーを設計した。EW135 のトリプシン消化で得られた 2 種類のペ

プチド断片のアミノ酸配列、LVDGST と ESALSEC を選び、XP\_424435 に対応する核酸配列データベースの XM\_424435 の塩基配列をもとに、前者のアミノ酸配列に対応して F1-1 プライマー、一方後者のアミノ酸配列に対応して R1-1 プライマーを設計した (Table3-4)。これらのプライマーを用いてニワトリ輸卵管 cDNA を鋳型にし、以下の組成と条件 (Table. 3-1, Table. 3-2) で PCR を行った。

Table. 3-1. The reagents for the first PCR of EW135

Reagent	Volume ( $\mu$ l)
water	36
10 x cDNA PCR reaction buffer	5
2.5 mM dNTP mixture	4
10 $\mu$ M Forward primer	1
10 $\mu$ M Reverse primer	1
Advantage cDNA polymerase mix	1
Chicken oviduct cDNA	2
Total volume	50

Table. 3-2. The cycling protocol for PCR

condition	Temperature	Time	Number of cycles
Prior denaturation	94 °C	2min	1 cycle
Denaturation	94 °C	1min	30 cycles
Annealing	53 °C	30sec	
Extention	68 °C	2min 15sec	

この PCR 産物の 1.5%アガロースゲル電気泳動を行い、SYBR Green (Lonza) で染色した。染色されたバンドを切り出し、MinElute Gel Extraction (Qiagen) を用いて精製した。得られた PCR 産物を pGEM-T Easy Vector (Promega) にライゲーション反応を行った。反応の組成液は次表の通りである (Table3-3)。反応は 16°C で 1 時間行った。

Table.3-3. The composition of the reaction solution for Ligation

Reagent	Volume ( $\mu$ l)
2 x Rapid Ligation buffer, T4 DNA Ligase	5
pGEM-T Easy Vector	1
PCR product	1
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/ $\mu$ l)	1
Final volume by adding water	10

その後、PCR 産物が挿入された pGEM-T Easy Vector を大腸菌 (JM109) に形質転換を行った。組み換え体を寒天培地 (bacto trytone, bacto yeast extrat, NaCl, bacto agar, NaOH, 100mg/ml ampicillin) に播種し、37°C で一晩培養した。翌日、寒天培地上に形成されたコロニーを選択し、M13 primers (forward; 5' -TAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCAC-3' , reverse; 5' -TCATAGCTGTTTCCTGTGTGA-3' ) を用いてコロニー PCR を以下の条件で行った。すなわち 94°C の前熱変性, 5 分間の後、94°C の熱変性を 1 分間、50°C のアニーリングを 1 分間、68°C の伸長反応を 3 分間を 1 サイクルとし、これを 35 回繰り返した。コロニー PCR 産物を 1.5%アガロースゲル電気泳動後、約 2460 bp のバンドを切りだし MinElute Gel

Extraction(Qiagen)を用いて精製した。DNA 塩基配列解析は Applied Biosystems 3100 (Applied Biosystems)を用いて行った (Fig. 3-1)。cDNA の塩基配列を解析した結果、PCR 産物の全塩基配列の決定には至らなかった。そこで、さらに異なる位置にシーケンシングプライマーを設計して塩基配列解析を行い、全塩基配列を決定した。

**Table. 3-4. Primers for cDNA cloning of EW135**

	Primer name.	Primer sequence (5' -3' )	Base pair numbering
<b>Primers for cDNA cloing of internal regions</b>			
Forward primer	F1-1	CACTCCGATTAGTGGATGGATCAACC	704-729
	F1-2	ATTTGCTGAGCTTCTCCAGTCCGG	1, 011-1, 035
	F1-3	CAGACATACCAAGAGCTGTTC	1, 655-1, 676
Reverse primer	R1-1	GAATCAGCCCTCTCCGAGTGTGCA	2, 869-2, 892
	R1-2	CAGACGCCAATGTTGTG	2, 423-2, 439
<b>Primers for 3' RACE</b>			
Forward primer	3F	GCAAACACGGAGAAGATGCTGGTGTGG	2, 594-2, 620
Nested primer	3FN	CAGTGGGGAACAGTGTGCGAT	2, 710-2, 730
<b>Primers for cDNA cloing of 5' -terminal regions</b>			
Forward primer	5F	CTCTACATTGCCCATCCAGACCTGC	-134 to -110
Reverse primer	5R	GGATCAACCCACTGCTCTGGGAGAAT	721-746

The base pair numbering for EW135 is based on Fig. 3-10

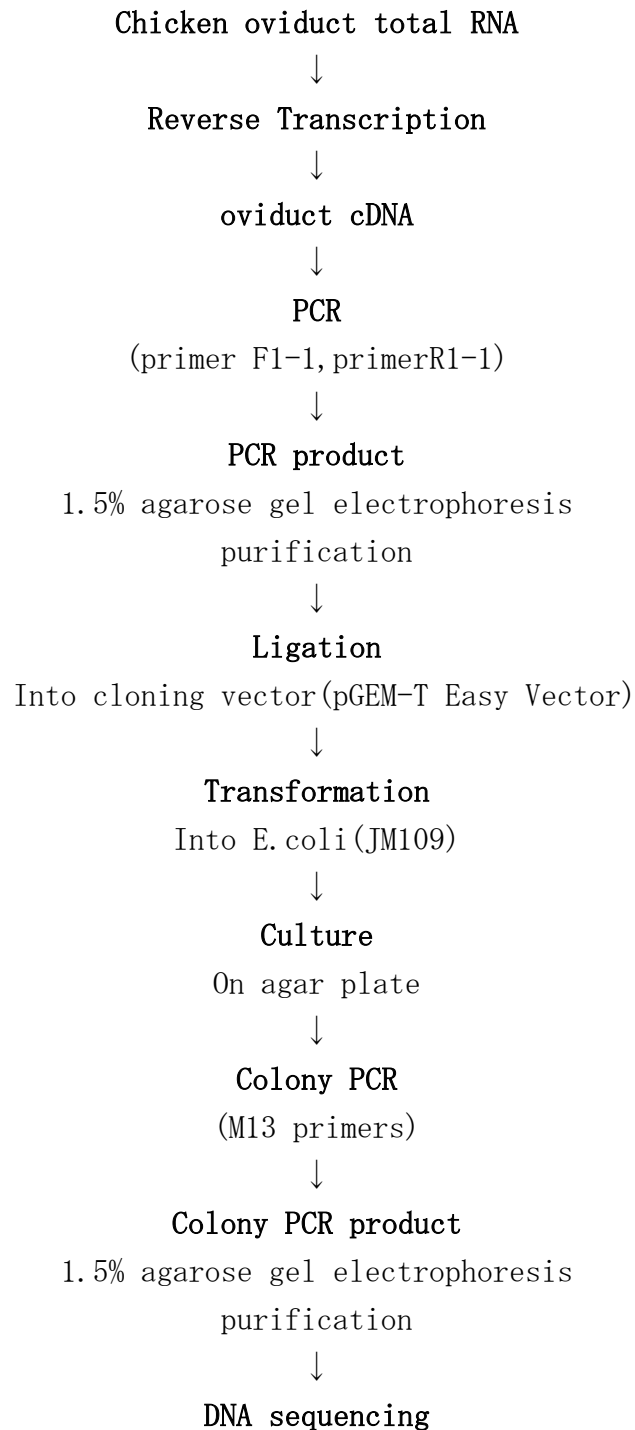


Fig.3-1. Flow chart of cDNA cloning of internal regions of EW135



### 3.2.3.3 3' RACE 法による EW135 cDNA の 3' 末端側塩基配列の解析

EW135 cDNA の 3' 末端側の塩基配列を決定するために、SMARTer RACE cDNA Amplification Kit(Clontech Laboratories) を用いて 3' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)を行った。まず、ニワトリ輸卵管 全 RNA を SMARTscribe Reverse Transcriptase を用いて完全長 cDNA に逆転写した。次に、合成された cDNA を鋳型として、3.2.5.2 で決定された EW135 cDNA の内部塩基配列の一部を重ねる 3F プライマー (Table. 3-4)に、Kit の 3' RACE アウタープライマーをリバースプライマーに使用して 3' RACE-PCR を行った。この PCR の条件は次の通りである。すなわち 94°C の 30 秒間、72°C の 3 分間を 1 サイクルとし、これを 5 回繰り返した後 94°C の 30 秒間、70°C の 30 秒間、72°C の 3 分間を 1 サイクルとし、これを 5 回繰り返した。その後、94°C の熱変性を 30 秒間、59°C のアニーリングの 30 秒間、72°C の伸長反応を 3 分間を 1 サイクルとし、これを 25 回繰り返した。次に、得られた PCR 産物を鋳型として、3FN プライマー (Table. 3-4) と 3' RACE インナープライマーを用いて、以下の条件によりネステッド PCR を行った。すなわち、94°C の前熱変性 3 分間の後、94°C の熱変性を 30 秒間、53°C のアニーリングを 30 秒間、72°C の伸長反応を 3 分間、これを 1 サイクルとし、40 サイクル繰り返した。得られた 3' RACE PCR 産物を 1.5%アガロースゲル電気泳動後、SYBR Green 染色した。その後、バンドを切り出し、抽出後 nucleotrap of SMARTer RACE cDNA Amplification Kit を用いて精製した。精製 PCR 産物を pGEM-T Easy Vector にサブクローニングし、塩基配列を前項のように決定した。

### 3.2.3.4 EW135 cDNA の 5' 末端側塩基配列の解析

3' RACE により決定された EW135 の翻訳領域と 3' 非翻訳領域の塩基配列をゲ

ノムデータベースで検索したところ、RefSeq の NC\_008466 に含まれていることが判明した。そこで、EW135 cDNA の 5' 末端側をクローニングするために、NC\_008466 の塩基配列において EW135 の 5' 非翻訳領域を推定し、5F プライマー (Table. 3-4) を設計した。また、5R プライマー (Table. 3-4) は、3.2.5.2 で決定された EW135 cDNA の内部配列の一部をもとに設計した。これらのプライマーを用いて、ニワトリ輸卵管 cDNA を鋳型に以下の条件で PCR を行った。すなわち、94°C の前熱変性 2 分間の後、94°C の熱変性を 1 分間、58°C のアニーリングを 30 秒間、68°C の伸長反応を 1 分間、これを 1 サイクルとし、30 回繰り返した。その後、得られた PCR 産物を pGEM-T Easy Vector にサブクローニングし、最終的に塩基配列を決定した。

### 3.2.3.5 シグナルペプチドの推定

EW135 のシグナルペプチドは SignalIP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) で予測した。

### 3.2.4 RT-PCR 法

RT-PCR には輸卵管及び市販の 10 種類のニワトリ組織 (肝臓、睾丸、心臓、肺、脾臓、腎臓、盲腸、脳、小腸、筋肉) のトータル RNA を使用した。計 11 種類の各組織の全 RNA と oligo dT プライマーを 70°C で 5 分間加熱し、その後、PrimeScript RTase (Takara) による逆転写反応で cDNA を合成した。EW135 は 9 つの SRCR ドメインで構成されているが、その塩基配列は互いに相同である。複数の RT PCR products を避けるために比較的 9 つの SRCR ドメインの間で低い相同性を示す塩基配列を RT-F プライマーとして選択した。RT-F プライマー

(5' -CATGCAGAACCAGAACTTGGGGGGA-3' , 塩基番号 293-317 in Fig. 3-10) と 5' 末端 cDNA クローニングのための 5R プライマー (Table. 3-4) が使用された。その PCR のための条件は次のとおりであった。すなわち、94°C の 熱変性を 30 秒間、54°C の アニーリングを 30 秒間、72°C の 伸長反応を 1 分間。これを 1 サイクルとし、30 回繰り返した。RT-PCR の内部標準として  $\beta$ -actin 遺伝子を検討した。Actin-F プライマー: 5' -AATGAGAGGTTTCAGGTGTCC-3' と Actin-R プライマー: 5' -AACACCCACACCCCTGTGAT -3' を用いて以下の条件で PCR を行った。すなわち、94°C の 熱変性を 30 秒間、50°C の アニーリングを 30 秒間、72°C の 伸長反応を 1 分間。これを 1 サイクルとし、30 回繰り返した。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 EW135 の部分アミノ酸配列

EW135 をトリプシンで消化して生成したペプチドをカラムで分離し、各ペプチドのアミノ酸配列を決定した。

BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)によるホモロジー検索から、EW135 のトリプシン消化で得られたペプチドのアミノ酸配列には group B SRCR ドメインに共通の配列が見いだされた。Mann はプロテオーム解析により多くの新規の卵白タンパク質を同定した。Mann は卵白タンパク質を SDS-PAGE で分離後、タンパク質のバンドをゲルから切り出し、トリプシン消化して得られたペプチドを質量分析した。その結果、卵白タンパク質の一つは分子量約 116 kDa であり、そのペプチドのアミノ酸配列はタンパク質のデータベース (UniParc) において、アクセッション番号 が UPI0000611E45 (以前は IPI00595253) と UPI000044AB0D (以前は IPI00584163) (Fig. 3-2) に含まれていた。Mann はこれらの二つのエントリーがオーバーラップしており、8 個の SRCR ドメインを持つ一つのタンパク質のアミノ酸配列であると推測している (Mann, 2007)。EW135 のトリプシン消化で得られたペプチドのアミノ酸配列もまたこれらの二つのエントリーにあり、異なる SRCR ドメインに分布していることが判明した。

**A**

SRCR1 LRLVNGTNHCSGRVEVLYGQQWGTVCDDNWDLIDAEVVCROLGCGTALSAAFSAYFGRGS 60  
 SRCR2 LRLVDGSTHCSGRIEVFYQHGWGTVCDDGWLADAEVVCROLGCGKALSAPHGAHFGQGS 168  
 SRCR3 VRLVNGSNFCSGRVEVFHEQQWGTVCDDSWDLTDAQVVCROLGCGEATSATGSARFGOGT 276  
 SRCR4 IRLVNGPSHCAGRVEVFHDR**OWGTVCDDNWDKAEANVVCRO**LGCGAALSAPGSARFGQGS 384  
 SRCR5 LRLINGPSRCSGRVEVFYGHQWGTVCDDNWDISDAEVVCQOLGCGRALSTATSASFEGGS 492  
 SRCR6 VRLVNGSNFCSGRVEVFHEQQWGTVCDDSWDLTDAQVVCROLGCGEAI**STPGSARFGOGT** 600  
 SRCR7 LRLVNGPSRCAGRVEVLHSQQWGTVCDDSWDLSDAAVV 686

SRCR1 **DPIWLDDVMCKGTEAAL**SECTAKPWGKHHDCGHGEDAGVVC**SGFAKPAP** 108  
 SRCR2 DPIWLDDVSCGTGTEAGLSTCKASAWGSHNCGHGEDAGVVCAGLAELLP 216  
 SRCR3 GTIWLDDVNCAGSETALTECPAKPWGDHNCNHGEDAGVVC**SGAAEPAP** 324  
 SRCR4 DPIWMDDVNCVGTEAALSQCQFRGWGSHNCKHGEDAGVVCSDI**PRAVP** 432  
 SRCR5 GPIWLDDVNCAGSETSLSKCETSLWGAHNCNHGEDAGVVC**LGVP**EPAP 540  
 SRCR6 GKIWLDDVNCAGSETALTECQVRPWGEHNCNHGEDAGVVC**SGTAEAAP** 648

**B**

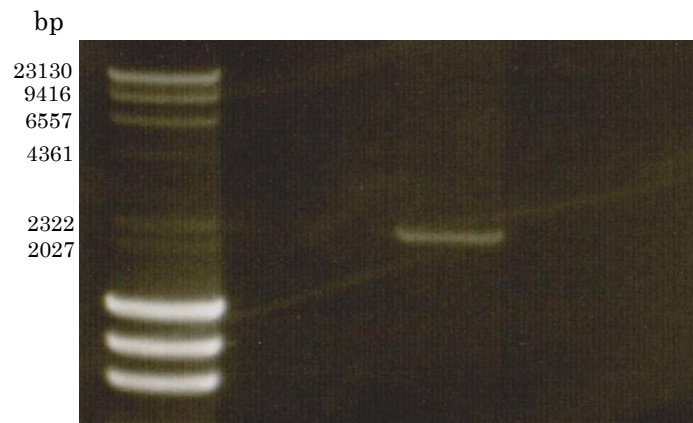
SRCR1 VRLVNGSNFCSGRVEVFHEQQWGTVCDDSWDLTDAQVVCROLGCGEAI**STPGSARFGOGT** 60  
 SRCR2 IRLVNGPNLCTGRVEVFHDHQWGTVCDDNWDKAEANVVCROLGCGAALSAPGSAHFGQGS 168  
 SRCR3 LRLVNGPSHCAGRVEVLHSQQWGTVCDDSWDLSDAAVVCQOLGCGTAMSAPGSAYFGQGY 276  
  
 SRCR1 GTIWLDDVNCAGSETALIECQVRPWGEHNCNHGEDAGVVC**SGIAEPAP** 108  
 SRCR2 DPIWMDDVSCVGTEAALSQCRCRFRGWGSHNCKHGEDAGVVC**SGTAEAAP** 216  
 SRCR3 GRIWLDDVKCSSRESALAECAARPWGVHNCNHGEDAGVIC**SGGI** 320

Fig. 3-2. Amino acid sequences of UPI0000611E45 and UPI000044ABOD

UPI0000611E45 (A) and UPI000044ABOD (B) are composed of seven SRCR domains, one of which is incomplete, and three SRCR domains, respectively. The sequences spanning amino acids 541 to 686 of UPI00003AF023 and amino acid 1 to 146 of UPI0000611E45 overlap. The peptides identified in EW135 are underlined. The peptide identified by Mann (2007) are in bold. (Yoo et al. 2013a)

### 3.3.2 cDNA クローニング

ニワトリ輸卵管 cDNA を鋳型にして、EW135 タンパク質 のトリプシン消化で得られたペプチドのアミノ酸配列とデータベース上の同一配列を持つシーケンスの情報に基づいて設計したプライマー (F1-1, R1-1) を用いて PCR を行った。その結果、約 2200 bp の PCR 産物 (Fig. 3-3) を得た。得られた PCR 産物の cDNA の塩基配列を解析した結果、PCR 産物の両末端側の 1326 bp の塩基配列が決定されたが、PCR 産物の全塩基配列の決定には至らなかった。そこで、一回目の解析で決された塩基配列と重なるプライマー (F1-2, R1-2, Table. 3-4) を用いて二回目の塩基配列解析を行った。一回目と二回目の塩基配列解析により合計 2169 bp の塩基配列が決定された。約 2200 bp の PCR 産物の残りの塩基配列を決定するために、さらに F1-3 (Table. 3-4) を用いて塩基配列解析を行った。その結果、PCR 産物 2189 bp の全塩基配列を決定した。全塩基配列と推定アミノ酸配列 (<http://web.expasy.org/translate>) は Fig. 3-4. のに示した。アミノ酸配列には、五つの完全な SRCR ドメインと一つの不完全な SRCR ドメインを含んでいることが Blast 検索から分かった。



**Fig.3-3. Agarose gel electrophoresis of the PCR products of EW135 cDNA covering internal region of EW135**

The first PCR products were subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis followed by staining with SYBR green.

a

1 5' CACTCCGATTAGTGGATGGATCAACCCACTGCTCTGGGAGAATCGAGGTGTTCTATGGCCAGCGCTGGGAACT 74  
75 GTGTGTGACGACGGCTGGGACTTGGCCGATGCAGAAGTTGTGTGCAGGCAGCTGGGCTGTGGGAAGGCCCTTGTGAGC 151  
152 TCCCCATGGGGCTCACTTTGGGCAAGGATCTGACCCCATCTGGCTTGATGATGTCAGCTGCACAGGGACTGAAGCTG 228  
229 GCCTCTCCACATGCAAAGCCAGTGCTTGGGGAAGCCATAACTGTGGGCATGGAGAAGATGCAGGCGTGGTGTGTGCA 305  
306 GGATTTGCTGAGCTTCTTCCAGTCCGGCTGGTGAATGGTTCCAATTTCTGCTCTGGAAGAGTCGAGGTGTTTCATGA 382  
383 GCAGCAATGGGGGACCGTCTGTGATGACAGCTGGGATTTAACAGATGCTCAAGTGGTGTGCAGGCAGCTGGGCTGTG 459  
460 GGAAAGCAATCTCAACCCCTGGCTCTGCTCGGTTTGGACAAGGAACTGGAACAATTTGGTTGGATGACATGAATTGT 536  
537 GCAGGATCTGAAACTGCCCTCACTGAGTGCCAGCCAAGCCTTGGGGAGACCACAACCTGCAACCATGGAGAGGATGC 613  
614 TGGTGTGGTGTGCTCAGGTGCTGCTGAACCAGCTCCCATCCGGCTTGTAATAGTCCGAGCCATTGTGCTGGGAGAG 690  
691 TCGAGGTGTTTCATGATCGTCAGTGGGGAACCGTATGTGATGACAACCTGGGATAAAGCAGAAGCCAATGTTGTGTGC 767  
768 AGGCAGCTGGGCTGTGGGGCAGCGCTATCAGCCCCTGGCTCAGCTCGCTTTGGACAAGGGTCTGACCCCATCTGGCT 844  
845 GGATGATGTCAATTGTGTAGGGACAGAGGCTGCCCTCTCCAGTGCCGGTCCAGGCTGGGGATCCCATAACTGCA 921  
922 AACACGGAGAAGATGCTGGTGTGGTGTGCTCAGACATAACCAAGAGCTGTTCCACTGCGGTTAACAAATGGGCCGAGT 998  
999 CGCTGCAGTGGGAGAGTTGAAGTTTTTTACGGCCATCAGTGGGGAACCGTGTGTGATGACAACCTGGGACATAAGTGA 1075  
1076 TGCTGAAGTTGTTTGCCAGCAGCTGGGCTGTGGGAGGGCTCTATCCACTGCAACTTCGGCTTCTTTTGGAGAAGGGT 1152  
1153 CTGGCCCAATCTGGCTGGATGACGTGAATTGCACAGGAGCTGAAACTAGCCTTTCCAAATGTGAGACCAGTCTGTGG 1229  
1230 GGAGCCATAACTGTAATCATGGAGAAGATGCCGGTGTGTGTGCTTGGGTGTTCCAGAACCAGCCCAGTCCGGCT 1306  
1307 GGTGAATGGTCCAATTTCTGCTCTGGAAGAGTCGAGGTGTTTCATGAGCAGCAATGGGGACCGTCTGTGATGACA 1383  
1384 GCTGGGATTTAACAGATGCTCAAGTGGTGTGCAGGCAGCTGGGCTGTGGGGAAGCAATCTCAACCCCTGGCTCTGCT 1460  
1461 CGGTTTGGACAAGGAACTGGAAAAATTTGGTTGGATGACGTGAACTGTGCAGGATCTGAAACTGCCCTCACTGAGTG 1537  
1538 CCAAGTCAGGCCTTGGGGAGAACAACAACCTGTAACCATGGAGAGGATGCTGGTGTGGTGTGCTCAGGTATTACAGAAC 1614  
1615 CAGCTCCCATCCGGCTAGTGAACGGCCCAAATCTCTGCACTGGGAGAGTTGAGGTGTTTCATGACCATCAGTGGGGA 1691  
1692 ACTGTGTGTGATGACAACCTGGGATAAAGCAGACGCCAATGTTGTGTGCAGGCAGCTGGGCTGTGGGCAGCGCTATC 1768  
1769 AGCCCCTGGCTCAGCTCACTTTGGACAAGGGTCGGACCCCATCTGGATGGATGATGTCAGTTGTATAGGGACAGAGG 1845  
1846 CTGCCCTCTCCAGTGCCGGTCCGGGGCTGGGGATCCATAACTGCAAACACGGAGAAGATGCTGGTGTGGTGTGT 1922  
1923 TCAGGCACTGCAGAAGCGGCTCCTCTCCGGCTGGTGAATGGCCCTAGTCGCTGTGCTGGGAGAGTCGAGGTGCTTCA 1999  
2000 CAGCCAGCAGTGGGGAACAGTGTGCGATGACAGCTGGGACCTGAGCGATGCTGCAGTTGTGTGCCAGCAGCTGGGCT 2076  
2077 GTGGGACAGCCATGTCAGCCCCAGGATCTGCTTATTTTGGGCAGGGCTACGGCCGTATCTGGCTGGATGATGTGAAA 2153  
2154 TGCTCCAGCAGGGAATCAGCCCTCTCCGAGTGTGCA 3' 2189



b

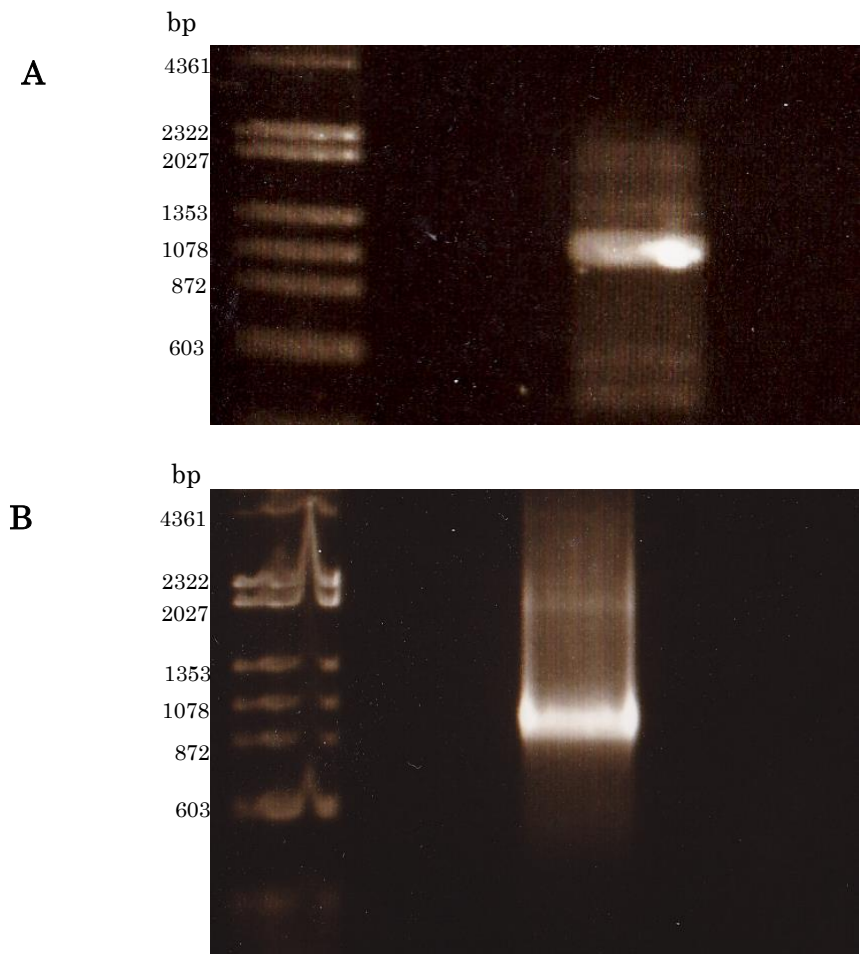
```
1  LRLVDGSTHCSGRIEVFYGQRWGTVCDDGWDLADAEVVCR 40
41  QLGCGKALSAPHGAHFGQGS DPIWLDDVSC TGT EAGLSTC 80
81  KASAWGSHNCGHGEDAGVVCA GFAELLP VRLVNGSNFCSG 120
121 RVEVFHEQQWGTVCDDSWDLTDAQVVC RQLGCGKAISTPG 160
161 SARFGQGTGTIWLDDMNCAGSETALTECPAKPWGDHNCNH 200
201 GEDAGVVCS GA AEPAP IRLVNSPSHCAGRVEVFHDRQWGT 240
241 VCDDNWDKAEANVVC RQLGCGAALSAPGSARFGQGS DPIW 280
281 LDDVNCVGTEAALSQC RFPGWGSHNCKHGEDAGVVCS DIP 320
321 RAVP LRLTNGPSRCSGRVEVFYGHQWGTVCDDNWDISDAE 360
361 VVCQQQLGCGRALSTATSASFGE GSGPIWLDDVNCTGAETS 400
401 LSKCETSLWGAHNCNHGEDAGVVCL GVPEPAP VRLVNGSN 440
441 FCSGRVEVFHEQQWGTVCDDSWDLTDAQVVC RQLGCGEAI 480
481 STPGSARFGQGTGKIWLDDVNCAGSETALTECQVRPWGEH 520
521 NCNHGEDAGVVCS GITEPAP IRLVNGPNLCTGRVEVFHDH 560
561 QWGTVCDDNWDKADANVVC RQLGCGAALSAPGSAHFGQGS 600
601 DPIWMDDVSCIGTEAALSQC RFRGWGSHNCKHGEDAGVV C 640
641 SGTAEAAP LRLVNGPSRCAGRVEVLHSQQWGTVCDDSWDL 680
681 SDAAVVCQQLGCGTAMSA PGSAYFGQGYGRIWLDDVKCSS 720
721 RESALSECA 729
```

**Fig.3-4. Nucleotide sequence of the 2189 bp-PCR product and its deduced amino acid sequence**

Complete nucleotide sequence of the 2189bp-PCR product (a) and its deduced amino acid sequence (b). SRCR domains are shaded and colored in (b) Seven amino acids between each domain are boxed.

決定された EW135cDNA の 2189 bp の内部塩基配列に基づいて、約 200 bp の重なる領域を持つように 2 種類の前プライマー (3F と 3FN, Table. 3-4) を設計し、まず、3F とキット (SMARTer RACE cDNA Amplification Kit) に含まれる 3' RACE アウタープライマーを用いて 3' RACE -PCR を行った (Fig. 3-5A)。次に、得られた PCR 産物を鋳型として、3FN と 3' RACE インナープライマーを用いてネステッド PCR を行った (Fig. 3-5B)。得られた約 900 bp の 3' RACE PCR 産物を用いて cDNA サブクローニングを行った。コロニー PCR と配列解析の結果、3' RACE PCR 産物の 5' 側の 713 bp の塩基配列を決定した。一方、3' 側については、終始コドン (TAA) は確認されたが、poly A 配列が確認されなかったため、3' UTR に新たにプライマー (5' -CAAAGCTGGTGTACCCAAATCAGGAG-3') を設計して、3' RACE cDNA PCR 産物を用いて塩基配列解析を行った。その結果、3' RACE PCR 産物の合計 868 bp の塩基配列が決定され、poly A 配列が確認された。しかし典型的な poly A signal の塩基配列 (AATAAA) は確認されなかった。以上の結果、決定した 3' RACE PCR 産物の塩基配列と推定アミノ酸配列を Fig. 3-6 に示した。

3' RACE の結果、決定された塩基配列は、3.2.5.4 の方法に述べたようにニワトリのゲノムデータベースの NC\_008466 の一部に認められた。そこで、NC\_008466 の解析により EW135 の 5' UTR の配列を推定し、これをもとに 5F プライマーを設計した。また、決定された 2189 bp の内部配列に基づいて、SRCR ドメインの類似性が低い配列であり、5' 末端側に重なる領域を持つように 5R プライマー (Table. 3-4) を設計し、PCR を行った (Fig. 3-7)。得られた約 900 bp の PCR 産物の cDNA サブクローニングを行った。塩基配列解析の結果、5' 末端領域の 919 bp の塩基配列を決定した。その塩基配列と推定アミノ酸配列を Fig. 3-8 に示した。



**Fig. 3-5. Agarose gel electrophoresis of 3' RACE PCR products of EW135 cDNA**

**(A)** 3' RACE PCR was performed with primer(3F)and 3' RACE outer primer in SMARTer RACE cDNA Amplication Kit. The 3' RACE PCR products were subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis followed by staining with SYBR green. **(B)**With primer(3FN)and 3' RACE inner primer, 3' RACE nested PCR was performed using the 3' RACE PCR products as template. The 3' RACE nested PCR products were then subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis followed by staining with SYBR green.

**a**

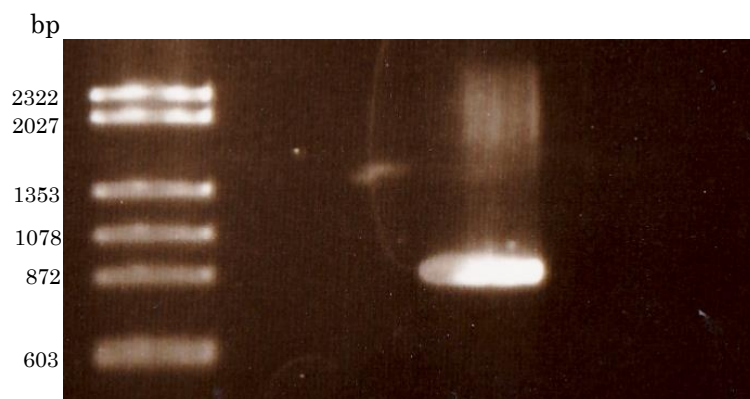
1	5'	GTTGTGTGCCAGCAGCTGGGCTGTGGGACAGCCATGTCAGCCCCAGGATCTGCTTATTTTGGGCAGGGCTACGG	74
75		CCGTATCTGGCTGGATGATGTGAAATGCTCCAGCAGGAATCAGCCCTCTCCGAGTGTGCAGCAAGGCCTTGGGGAG	151
152		TCCATAACTGCAACCATGGAGAAGATGCAGGCATCATATGCTCTGGTGGGATCTAAACATTGCAGACGTTCCAGAGT	228
229		GAAGAAGAGAGAGGACAGTGTGGCAAACATGTGTATGACATTTTCTCAACCCAAACAAAAGTCATCTTTGAAGGCC	305
306		TGAGTGCCCCCAGTACAGAAGCCAATCACGACACTCAGATCTATGTCACTGAATTATAAGCACAAAGCTGGTGTACC	382
383		CAAATCAGGAGTGCAATGGTCCCCTTCAGCTAATGAAGAGAGACAGGTTTTTGCACAGGAGATGCCTGTGAGCATT	459
460		TTAATGTCCTCTTCCCTCCAGATCCTTACCCAACCTTCATAGCCAACCTTTAGGCTTTCTCTAATAATTTTAAAACC	536
537		TTATATCACAGAGCCTAAAACAGCACAAACACTGCTCGAGGTGAGGCTGCACCTCCAAGATTGGGGCATCCACAAC	613
614		TCTCTGGACAGCTTCATCATCCTCTGAGTAAGGAATTTCTCCTAATATCTGACCAAAATCTCCCTTATTTTACTTA	690
691		AAATCTCCCATCCCTTTGCCCTAGACAAACAGACCTCCAGGTCCCTTTCAGTCTTAAACCTTCTGTAACCTCTGTA	767
768		ATCTCAAACACTGCAGCAAAAAGCATGGTGGGATCTTATGGAGTCTCCATTTTCTTGTGTAAACAAGCCCTGAGGAA	844
845		CCATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3'	868

**b**

1	V V C Q Q L G C G T A M S A P G S A Y F G Q G Y G R I W L D D V K C S S R E S A	40
41	L S E C A A R P W G V H N C N H G E D A G V I C S G G I *	69

**Fig.3-6. Nucleotide sequence of 3' -terminal regions of the EW135 cDNA and deduced amino acid sequence**

Nucleotide sequence of 3' -terminal regions of the EW135 cDNA analyzed by 3' RACE (a) and its reduced amino acid sequence (b). The sequence TAA in color in (a) indicates a terminal codon. Poly A sequence is marked in gray shaded in (a)



**Fig.3-7. Agarose gel electrophoresis of the PCR products of EW135 cDNA covering 5' terminal regions**

After PCR was performed with primers 5F and 5R, the PCR products were subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis followed by staining with SYBR green.

**a**

1 5' ATCATACAAAGTCTCTTCTACTGCCATGGGACCACCAGAAAATCTTTCCCATCTAGGCATGCCTATATCAGCA 74  
75 GTCTGTCTGCCTTTGCTGGAACCAGAATGGAACTGTGCTTTTCCTCCTGGTATGGCTTTGTGGAGTTGCCAACTCA 151  
152 GCTCCCATTAGACTCGTGGATGGCCCAACCACTGCGCGGGGCGTCTTGAGGTGCTTTGGAAACAGCAGTGGGGAAC 228  
229 AGTGTGCGATGATAGCTGGGACATATCTGATGCCACGGTTGTATGCAGGCAGCTGGACTGTGGGAAACCACTGTCTG 305  
306 CTCCTGGTTCCGCTCATTGTTGGTCAAGGAACTGGTCCTATCTGGCTGGATGACATGAAATGCAATGGTACAGAAGTT 382  
383 GACCTTTCTGCATGCAGAACCAGAACTTGGGGGAGCATAACTGCAACCATGGAGAAGATGCAAGCGTTGTGTGCTC 459  
460 AGGAAATAATAAAACAGTTCAACTGCGATTAGTGAATGGTACAGATCACTGCTCTGGGAGAGTGGAGGTGCTTTATG 536  
537 GCCAGCAATGGGGAACGGTCTGTGATGACAACTGGGATCTAATAGATGCTGAAGTTGTGTGCCGTCAGCTGGGCTGT 613  
614 GGGACAGCCCTATCTGCTGCTTCCTCAGCTTATTTTGGAAAGAGGATCTGATCCCATTTGGCTTGATGATGTTATGTG 690  
691 TAAAGGAACTGAAACTGCCCTGTCTGAATGCACTGCAAAACCTTGGGAAAACATGACTGTGGGCATGGAGAAGACG 767  
768 CTGGTGTGTATGCTCAGGTTTTGCAAAACCAGCCCCACTCCGATTAGTGGATGGATCAACCCACTGCTCTGGGAGA 844  
845 ATAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCT 919  
3'

**b**

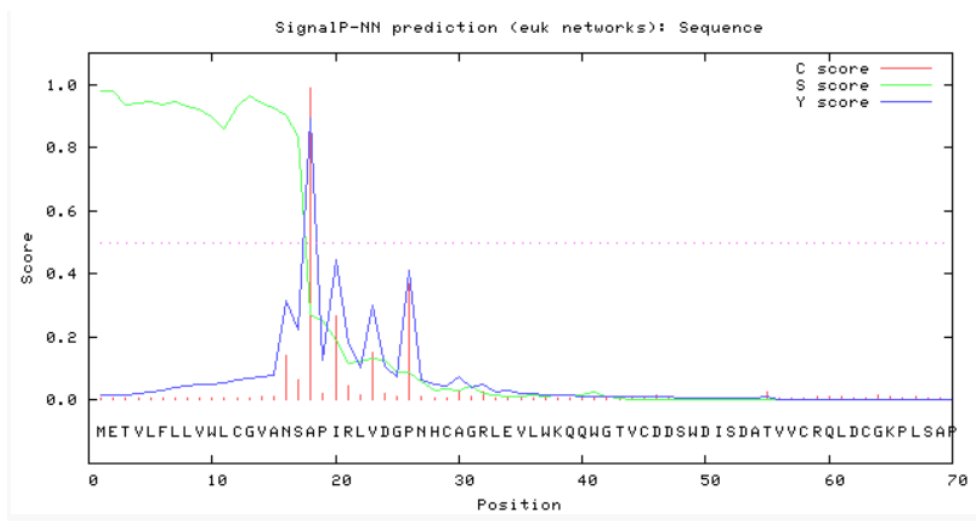
1 SYKVSSTAMGPPENLFPSRHAYISSLSAFAGTRMETVLFLLVWLCGVANSAPIRLVDGPNHCAGRLEVLWKQWGTV 74  
78 CDDSWDISDATVVCRLDCKPLSAPGSAHFGQGTGPIWLDDMKCNGTEVDLSACRTRTWGEHNCNHGEDASVVCSSG 151  
155 NNKTVQLRLVNGTDHCSGRVEVLYGQWGTVCDDNWDLIDAEVVCRLGCGTALSAASSAYFGRGSDPIWLDDVMCK 228  
232 GTETALSECTAKPWGKHDCGHGEDAGVVCSSGFAKPAPLRLVDGSTHCSGRIITSEFAAACRSTIWESSQRVGCIA 306

**Fig. 3-8. Nucleotide sequences of 5' -terminal regions of the EW135 cDNA and deduced amino acid sequence**

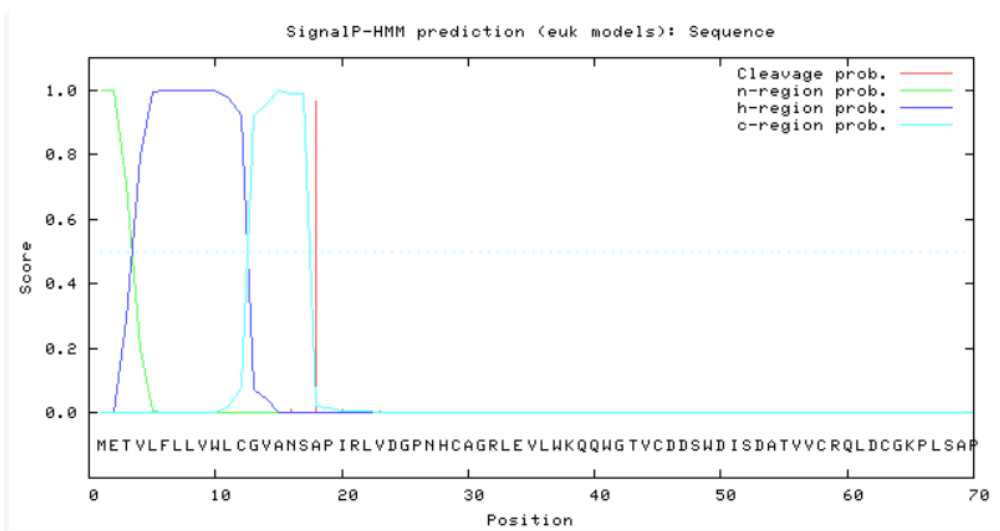
Nucleotide sequence of 5' -terminal regions of the EW135 cDNA (a) and deduced amino acid sequence (b).

### 3.3.3 全アミノ酸配列

内部配列、3' RACE, 5' 末端の cDNA クローニングの結果、EW135 cDNA の 2,961 bp の全塩基配列を決定した。第二章で述べたように、EW135 タンパク質の分析により、N 末端側の 10 残基のアミノ酸配列は APIRLVDGPN である。また、SignalIP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) を用いた解析により、上記 10 アミノ酸残基に先立つペプチドがシグナルペプチドと推定された (Fig. 3-9.)。以上のことから、EW135 は 17 アミノ酸残基のシグナルペプチドを持つ 970 アミノ酸で構成されることが明らかとなった。EW135 は 7 アミノ酸残基から成るペプチドが間に入った 9 個のグループ B SRCR ドメインのみで構成されている。各 SRCR ドメインは Ile、Leu または Val で始まり、2 番目は Arg である。また、ドメインの最後のアミノ酸は Ser、Ala または Leu である。決定された EW135 の全アミノ酸配列に基づいて計算される EW135 の分子量は 102,459 である。この値は、SDS-PAGE で推定した精製 EW135 の分子量 (135kD) よりも小さい。EW135 タンパク質は過ヨウ素酸-シッフ法で染色されることから、糖タンパク質である。このことから、EW135cDNA と精製 EW135 タンパク質の間の分子量の違いは EW135 の糖鎖付加に起因していると思われる。EW135 のアミノ酸配列には、3 カ所の可能な N-グリコシル化部位がある (Fig. 3-10)。



```
>Sequence                               length = 70
# Measure  Position  Value  Cutoff  signal peptide?
max. C     18         0.990  0.32   YES
max. Y     18         0.893  0.33   YES
max. S     2          0.980  0.87   YES
mean S     1-17        0.928  0.48   YES
D         1-17        0.911  0.43   YES
# Most likely cleavage site between pos. 17 and 18: ANS-AP
```



```
>Sequence
Prediction: Signal peptide
Signal peptide probability: 1.000
Signal anchor probability: 0.000
Max cleavage site probability: 0.967 between pos. 17 and 18
```

Fig. 3-9. Prediction of the signal peptide of EW135

Putative signal peptide of EW135 was determined by using SignalIP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalIP/>)





### 3.3.4 EW135 の SRCR ドメイン間の比較

EW135 の 9 個の SRCR ドメインのアミノ酸配列を clustal W ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)) でアライメントすると互いに高い類似性がある。EW135 の SRCR ドメインを構成している 101 アミノ酸残基のうち、8 つのシステイン残基を含む 48 アミノ酸残基が 9 個のドメインで完全に保存されている (Fig. 3-11, upper asterisk)。18-B はグループ B SRCR スーパーファミリーに属するニワトリ血清タンパク質で、4 個のグループ B SRCR ドメインのみで構成される。EW135 と 18-B の SRCR ドメインを比較すると、高い類似性を示すが、EW135 の SRCR ドメイン間の類似性よりは低い (Fig. 3-11, lower asterisk)。いずれの SRCR ドメインも 8 個のシステイン残基を持ち、そのドメイン内での分布パターンはグループ B SRCR の共通なパターン (X9-C1-X15-C2-X12-C3-X4-C4-X25-C5-X9-C6-X9-C7-X9-C8-X) (Fig. 3-11) に完全に一致している。

EW135 と 18-B の各 SRCR ドメインのアミノ酸配列を基に clustal X (<http://lhm.ab.a.u-tokyo.ac.jp/~omori/phylogeny/windows/>) を用いて分子系統樹の解析を行った結果 (Fig. 3-12)、EW135 の 9 つの SRCR ドメインは 18-B の SRCR ドメインとは別に 1 つのグループを形成することが判明した。また、EW135 の SRCR ドメインについて分岐パターンから推定すると、ドメイン 4 とドメイン 7、ドメイン 5 とドメイン 8 をコードする遺伝子は、それぞれが進化上比較的新しい段階で共通遺伝子の重複の結果生まれた可能性を示唆している。

```

EW135 D1 IRLVDGPNHCAGRLEVLWKQQWGTVCDDSWDISDATVVCRLDCGKPLSAPGSAHFGQGT 60
D2 LRLVNGTDHCSGRVEVLYGQQWGTVCDDNWDLIDAEVVCRLGCGTALSAASSAYFGRGS 60
D3 LRLVDGSTHCSGRIEVFYGQRWGTVCDDGWLDAEAVVCRLGCGKALSAPHGAHFGQGS 60
D4 VRLVNGSNFCSGRVEVFHEQQWGTVCDDSWDLTDAQVVCRLGCGKAISTPGSARFGQGT 60
D5 IRLVNSPSHCAGRVEVFHDRQWGTVCDDNWDKAEANVVCRLGCGAALSAPGSAHFGQGS 60
D6 LRLTNGPSRCSGRVEVFYGHQWGTVCDDNWDISDAEAVVCQQLGCGRALSTATSASFGECS 60
D7 VRLVNGSNFCSGRVEVFHEQQWGTVCDDSWDLTDAQVVCRLGCGEAIISTPGSARFGQGT 60
D8 IRLVNGPNLCTGRVEVFHDHQWGTVCDDNWDKADANVVCRLGCGAALSAPGSAHFGQGS 60
D9 LRLVNGPSRCSGRVEVLHSQQWGTVCDDSWDLSDAAVVCQQLGCGTAMSAPGSAYFGQGY 60
18-B D1 VRLVDGPNRCSGRVEVLHNDVWGTVCDEGDLREARVVCRLGCGTALSSPKSKYGECK 60
D2 LRLVGGPNRCAGRVEVLHEEQWGSVCHDEWDINDAQVVCCKQLGCGDAVLPIAAKFRGRGT 60
D3 VRLVGGPNRCSGRVEVLHNNVWGTVCDDNWDLREAKVVCCKQLGCGTALSALPESKYGECK 60
D4 VRLVDGPNQCAGRVEVFHENRWGSVCCDNWDMKDAKVVCCKQVCGSPLSALGSARYGRGP 60
** * ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
** * ** ** ** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** *
EW135 D1 GPIWLDDMKCNGTEVDLSACRTRTWGEHNCNHGEDASVVCS 101
D2 DPIWLDDVMCKGTETALSECTAKPWGKHDCGHGEDAGVVCS 101
D3 DPIWLDDVSCGTGTEAGLSTCKASAWGSHNCGHGEDAGVVCA 101
D4 GTIWLDDMNCAGSETALTECPAKPWGDHNCNHGEDAGVVCS 101
D5 DPIWLDDVNCVGTAAALSQCRFPGWGSHNCKHGEDAGVVCS 101
D6 GPIWLDDVNCTGAETSLSKCETSLWGAHNCNHGEDAGVVCL 101
D7 GKIWLDDVNCAGSETALTECXVRPWGEHNCNHGEDAGVVCS 101
D8 DPIWMDDVSCIGTEAALSQCRFRGWGSHNCKHGEDAGVVCS 101
D9 GRIWLDDVKCSSRESALSECAARPWGVHNCNHGEDAGVICS 101
18-B D1 GQIWLSDLCKGTEGSLSNCKSKPWGENICNHVEDASVECS 101
D2 DTIWLDDVNCTGSEASLSECQARPWGDHNCYHGEDASAICS 101
D3 GQIWLSDLNCTGTEGSLTECEAKPWGENVCNHVEDASVECS 101
D4 DVIWLDDVNCEGTEESIFDCKARPWGEHNCYHGEDASVFCT 101
** ** * * * * ** * * ** * ** *
** * * * * * ** * * ** *

```

**Fig. 3-11. Comparison of the SRCR domains structure of EW135 and 18-B**  
 Nine SRCR domains of EW135 and four domains of 18-B were aligned by ClustalW. Identical amino acids are indicated by *asterisks*. *Upper asterisks*, identical amino acids among all nine SRCR domains of EW135; *lower asterisks*, identical amino acids among all 13 SRCR domains of EW135 and 18-B. Cysteine residues are marked in *gray*. (Yoo et al. 2013b)

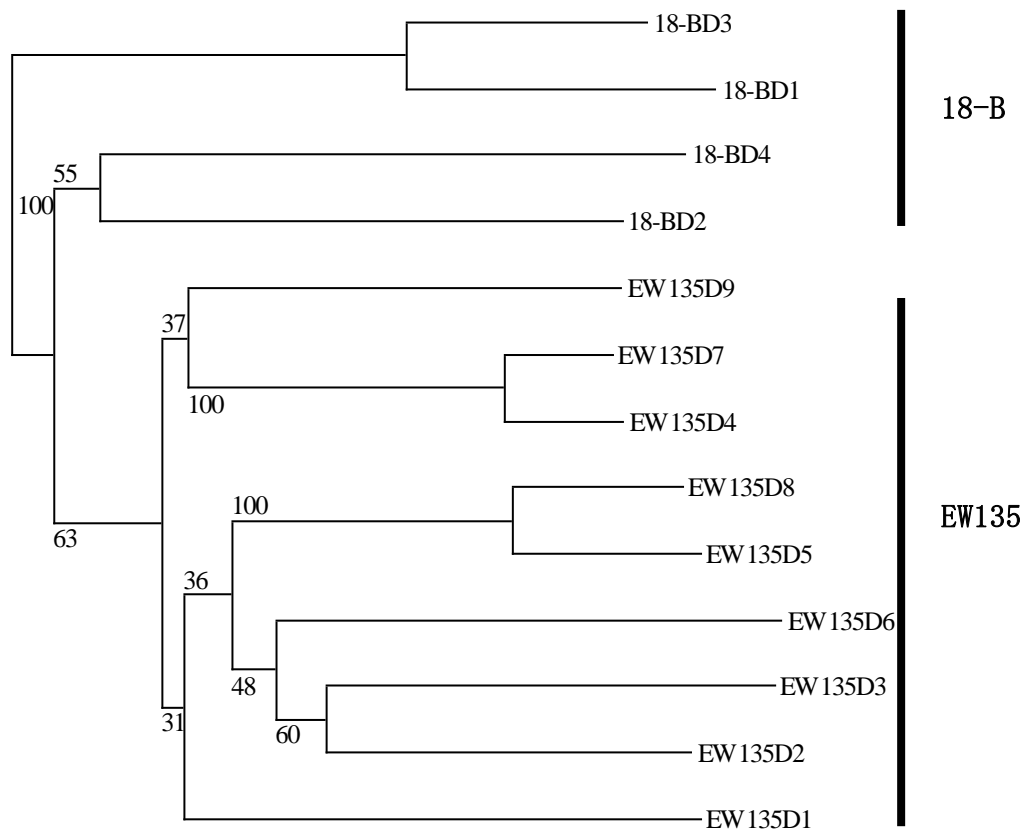


Fig. 3-12. Phylogenetic tree of SRCR domains of EW135 and 18-B.

The number at each branch point represents percentage of bootstrap value.

### 3.3.5 EW135 遺伝子のエクソン・イントロン構造

ニワトリゲノムデータベースのエントリーNC\_008466はEW135の塩基配列を含んでいる。NC\_008466はショットガン法により解読された約800kbpをカバーするニワトリ染色体LGE 64の塩基配列である。NC\_008466はEW135のほとんどのエクソンとイントロンを含むが、6番目のSRCRドメインの一部に相当する塩基配列は未解読であった (Fig. 3-13)。しかし、別のゲノム配列 (GenBank AADN03012381)では、このNC\_008466の領域が解読されていることが判明した (Fig. 3-14)。そこで、NC\_008466, AADN03012381およびcDNAクローニングによって決定されたEW135の塩基配列とアミノ酸配列をもとにEW135遺伝子のエクソン・イントロン構造を解析した。その結果、EW135遺伝子は約14kbであり、11個のエクソンで構成されていることが判明した (Fig. 3-15)。エクソンとイントロンの境界のアミノ酸は、エクソンVIとエクソンVIIにおいてはGACによりコードされるアスパラギン酸であるが、それ以外は全てグリシンであった。エクソンIは5' UTRとシグナルペプチドの一部をコードしている。エクソンIIはシグナルペプチドの残り、N末側の2つのアミノ酸残基 (AlaとPro) とそれに続く第1のSRCRドメインをコードしている。エクソンIII、IV、V、VI、VII、VIII、IXとXは第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9のそれぞれのSRCRドメイン、および各ドメインの前の7アミノ酸をコードしている。エクソンXIはC末側の3つのアミノ酸残基 (Gly-Gly-Ile)と3' UTRをコードしている。

AAAGTGGTGAGACACAGGAGCAGAATGCCAAGAGAACTGCAGATGCCCCATCCCTGAAGGCACTCAAGT  
CCAGGTTGCATGTGGCCCTCAACAGCCTGATGTAGTGGATGGCAACCAGTCAATGGCAGGAAGGTTGGAA  
CTGAGTGGGCTTTAAGGTCCCTTCTAGGTCTTCCCTGGGCACTGCCTGTTCTCAAGGAAGCCCTGCAAGT  
AGAGTGATGGTTTCAGAGAAATGAAAAGAAACAATTTGATTTTTGCTAAAACACTGACTGGACAAAAGATT  
GGGTTCTTTCTAGCGTGGTTTATTTTTCTCAATATGTTGACAAATTGAAGAGAACGGGAGGAGAGTAGC  
AGTATGAGGAGCTGCAAGGAAGCAGAGGTGGTTAGTGCTCTGACCGTGAAAAGAGAGAGGCCAATTAAG  
GGGAGGAGTCAGAGCAAGGAATATTTGTCATTTACCTCCGTCTTTGTCCCTGCTGTATTTTCTCTGCCA  
ACCCAGCCAGTCACCAACTCTAAGTTCTTTATCTCTCTCCAAGGACATTTCTGCTCTACATTGCCCATC  
CAGACCTGCAGGAATCAGATCATACAAAGTCTCTTCTACTGCCATGGGACCACCAGAAAATCTTTTCCCA  
TCTAGGCATGCCTATATCAGCAGTCTGTCTGCCTTTGCTGGAACCAGAAATGGAAACTGTGCTTTTCTCC Exon I  
TGGTATGGCTTTGTGGTAAAGTTTTCTCTTTGTTCCGTGAGAATGGAGTCCAGATATGGTCTGATAAAT  
GGTGCCCATGATGGATTGACCCCTCTCATATTCTCATTGGTGTCTTTTAGTCTGGAGAAGACAAGGATCT  
GGGGAGAATTTGTTGTCACCTTTCAATACTTAGAGGAGTCTTATAAGATGAGGAGAGACTTTTACAAGG  
ACATGTAGTGGTAGGACAAAAGGTAGTAGTTCTAAATCAAAAAGAGAAAAGATTTACGTTAGACATATAGA  
AGAAACTCTTCACTAAAAGGGTCATGAGGCACTGGAACAGGCTGCTTAGAGAAGTTGAGTGTGCTCCATT  
CCCAGAGGTGTTCAAGGTCAGGTTGGATGAGGTTTTGAGTAATGTGTTCTTGTGGGAGGTGTCCTTGCCC  
AATGGCAGGGGTTGGGAGGAGATGGTCTTTGAGGTTCTTTCCAAGCCAAGCCATTCTATGATTAATTA  
ATTTCTGGTGCAGGAAAACAGCATGACCTTTCTGAGGCAAGAAAAGACAGCATTAGTCATCATCATCTGG  
CTTCCAAAGATCACCTAGAGATTTAGAGGCATTATGAATGCAAACATTCATATACAAACCCTGAGAATAC  
ATCAATGCATGCATAAGGACAGAGCTTCCCTTGGTAGATTTCTGTAATCCAGAATGTAATCCTGTTTTCT  
TTGCCTCTCTTCTACACTCATAGACTGGACTTGAGCCAGGACCTAAGAACAAAATAAGAATAGCATGCCTC  
TCTGTCACTGTCAGTGCTTAACGCAGCTGCATTTATATCCTGTAAACCTGCACAGTCAAATCCTTAAACA  
AAAAGTAGTAAAATAATTGGATAAGGATTATCTGGAGACATTGGCATTGTAGTTTTTTTGACAAAAGCCTG  
ACACAAGTTAAGACTGCTTCACAGACTAGGATGAAGGGTGGAGTCAGAATTGTAATGATTAAGGAACAT  
AATTTGGCAGCTTAAAGCTTGTAAGGAAAATATCTATGCTCCAGTAATGTAGAAGAGTGGACCTGGCAA  
GCCCTGATATAGCAGTCCTTGTCTATAAACCCATGGTGTAAAGTATATAATGCTATGTGAAGCAGCACAA  
TGACCACAATTTAAGCACCAAAAAATATCTTTCTGAACAAGGGGGAACTTTGGCATCCTCTGCCAGGCT  
TGGGTCCCCATGGTAGTCTGGAGTTTTCTTGCACCTCATGAAGACTGTTTAGGACAGTTCTGCCAAGTGTT  
TTTTGTCAGAAAATCTTAAATCTTTTCATTTAATGTTGAAATCCTACCTTGTAACCAAGACGTGAACTAA  
AAGCTTCCCTCCATAACTTGCACAATGCAAGGACTGATGTAACCTAACAGGAGCATTTCATGGTCTTGTGC

ATGGAGCACCTGCTGCACAAAGATGGTGAACAGGGATGATGCCACAATAGTTCAGGTTACAGGGACACA  
CTGTGACCTCCATCTCCTTAGGGACCATATCCAGAGATTTTCTCTCATGGTAAATAATACAGCCTACAG  
TTTCTATGAAGTGGAGCTGTCACATCACATCAGATGGTGTATTGGGACTGTTCCATAGCTGGAAAATTAT  
CTGAGAAGGGCAAGTTACTAGGAACCCCATGATCAGGACTGTCCTGGGTGACGAGAAGAGCTTGCAGCTT  
CTTGTAGATAAGCAAAGATTCATTACATGCCCCAGCAACATCTGTGTAAGACATTTGCACCACAAATTAG  
CCAGCAATCATTTCTTTCTATGTTCTGCTGGAAGCACCAATGGTTAGCATGTCAGCAGTCCCTCCCCAG  
CCAAATCTGAAATGGCATATTCTACAAGAGCAACATGTTACATTCTCCACTATCAGCCAAAACCTGTT  
TTGTGTTCAATTTTCTACCTCGACTTTTTTTTCCAATTCAGGAGTTGCCAACTCAGCTCCCATCAGACTCGT  
GGATGGCCCCAACCACTGCGCGGGGCGTCTTGAGGTGCTTTGGAAACAGCAGTGGGGAACAGTGTGTGAT  
GATAGCTGGGACATATCTGATGCCACGGTTGTATGCAGGCAGCTGGACTGTGGGAAACCACTGTCTGCTC Exon II  
CTGGTTCAGCTCAATTTGGTCAAGGAACTGGTCCATCTGGCTGGATGACATGAAATGCAATGGTACAGA  
AGTTGACCTTTCTGCATGCAGAACCAGAACTTGGGGGGAGCATAACTGCAACCATGGAGAAGATGCAAGC  
GTTGTGTGCTCAGGTAACACTCATGTTCCACCCTCCCTGTAAGTGCTAAGTAGAAAAGAGGCTTTTAAAGC  
CTGTTTGCAAAATTTTATTTTTCAGTGCCACTCTTAGGATTCAGACTATATATAGATGGCTGTTTTAAAA  
CTGACCTGAGCCATGCTAAAGACAGTGTATCCATCTCAGTTAAATTGAGTGTGAGTGGTACTGCTGTTT  
TGTTCTGCTGTGCTCTGCTCTGGTTCTTATTCCATAACCATAGAGTAAATGAAGAAAGAACTGAAATG  
AACCTCATCTGGTTGCACAAGTTTCCATGGGTATATTTTATGGCTAACATAAGTCATGGGAGTGGAGCA  
TTTGAGACTTCTTCCATTTGTATTTTGGGACAGTACTACCAGTGGGTACATTTATTCTCCAAAATGGCA  
CTGAGATAAGAAATTCAGCTGTGGGCCATTTGTCCTGTGTCAGGTCTGACCTGGATGTGACAGCATGGT  
GTTGATGAATGCTGAGTAACAGAACTGGATGGGGAAGGTTTGGTAAACATAATGGTTAATTTGGAA  
ATAAAGCATGATCAAGTGGCACACAGGTTGCAGGAGGTTGAGAGGTGATTTGGAGGTGGATGGGCTGCC  
ATTGCCCTCTTTCATGACATTGTGTCACAAAGTGTCTGCTCCATTCAGTGAACAGCGAACCAGGTTTCCA  
AATGCGCATTTTCTGATTGGTCTAAAATGGGATTCAACTTCATATTGTTTCAATTAAGACTTAGACACAC  
CTGTGGAATTGCCACTGCTGCTGATGACCAGTGTGGGCAACTGAATCAAACCAAATGAGACACCAACAAC  
TAACTAGAGAGCACCAGTGTAGATGACCCACTGTTTCACAGCTGCTAAGATGGCATCACCGCTGAAGCAC  
ACCACTCATCACCTCACTGTGCTCACATCCACTGTTTGGTCTTTGGTTCAGCAATGATGAATGCCAATGG  
GTGCAATTTTTTCCACATGGAAGAATTCATATGCTCCACTTTGCTTCATATGCACTTCTATGACTGATGC  
CTTTTTGTGAGATTGACCCTCTGCACTCATAAGGCAACAAAACATAATGCAATATTGGTGGGAAGGTCCA  
ACTTCTACTCCATACTACCAATATCGGCCTCTGATGATAGAATCATAGAATTGCTCAGGTTGAAAAAGA  
CCTTCAAGGTCATCTAGTCCAACCACAAAACGATGTTGCAGGTCAACATAATAAAACAGGAGGCATTACT  
TTCGGAGCAAACATCATAAAATATCAGCACCCATCTCTCAAGGAGAAACAAAGAAGTGTGTGAGACATGG

GTGTCTTGATCTGCTGGCAGTTGCCACCCTTGGTGTAAACATCACAGCACTGGTTTTGGTCCTGCACTATA  
AAGCATTCCAATCTATTAATCTCTCTGATTGGGAAGTCTGAAGCCACAGAGAAAAATTCAGAATGTGTTC  
CTCATCAGTCTTTTCAAGTTCTGCACAATAATAGTGAAGAATTTTTCTCTCCTTCGTTCCCTATGGGCTC  
CTTCCTTGTCAAAACCTGATCCCGTTTTTTGTTGGTGGTGGGTGATTGATTTTTTTCTCTTGTGTTTG  
ATACTTTCTAATGCAGGAAATAATAAAACAGTTCAACTGCGATTAGTGAATGGTACAGATCACTGCTCTG  
GGAGAGTGGAGGTGCTTTATGGCCAGCAATGGGGAACGGTCTGTGATGACAGCTGGGATCTAATAGATGC  
TGAAGTTGTGTCCGTCAGCTGGGCTGTGGGACAGCCCTATCTGCTGCTTCCTCAGCTTATTTTGAAGA Exon III  
GGATCTGATCCCATTTGGCTTGATGATATTATGTGTAAAGGAACTGAAGCTGCCCTGTCTGAATGCACTG  
CAAAACCTTGGGGAAAACATGACTGTGGGCATGGAGAAGACGCTGGTGTGTATGCTCAGGTAACTCTCA  
TCCTACATAACACAAGTGAGTTTAGGGTAATGCTGTAGATGCTGTAGGGAGCTCTGTTCCCTTTGGAGCA  
AAGAAAACCCAGTGCTCAAGAGAACCAAAAGGTAAAATATGGTTTGTACTAAAATGACCTTGATCTTC  
TTGGCAATAAAAAAATTTTCTACTGCATGAGCCACTGGTAGAGCAGTGTTCGTGCAGGAATTATTAATAC  
ACTCTTACGGTATAGCACATTGGCAGTGATGCTTTGGTAGAGAATATTCTCTCACTGCCTTCAGCAGTCC  
CATCATCTCACTGTTCTATCAGTGGATTTAGTTTCTCCTAAGTACCCCTAAACTGTTGCATCAGGCAA  
GGAGCTACCATGGCACATGCTGACACTCCAAGTGTGTTAGTATCAAGTCCCGAAGACAACCATAAAACCC  
AAGGTCCATAAATCCTGCATCCAGATCATTAAACGAAAGCACTTAAGAGAACTGACCCCAAAATGCAACCT  
TTGGGAGCCTGAATAGTGATGCTGCTGAACATCTCCAAGTGTGATGATGGAAAAAGTGCTTGTGCTGCTC  
CCATGTGCAGTATTTTACCATGTCATAATGGCACAGAATGAAAAACAGAAGTAAAACCTCACTGTGTTTAT  
TGACAAATGGAGAAAAGACAAGTCAGATTCTGCATGACATTCTTCCCTGGCCTTTATTTTTTTTTCTTC  
CTTTAGGTTTTGCAAAACCAGCCCACTCCGATTAGTGGATGGATCAACCCACTGCTCTGGGAGAATCGA  
GGTGTCTATGGCCAGCACTGGGAACTGTGTGTGACGACGGCTGGGACTGGCCGATGCAGAAGTCGTG  
TGCAGGCAGCTGGGCTGTGGGAAGCCTTGTGAGCTCCCATGGGGCTCACTTTGGGCAAGGATCTGACC Exon IV  
CCATCTGGCTTGATGATGTCAGCTGCACAGGGACTGAAGCTGGCCTCTCCACATGCAAAGCCAGTCTTG  
GGGAAGCCATAACTGTGGGCATGGAGAAGATGCAGGCGTGGTGTGTGCAAGTACCCTTAAAGCAATGAGC  
ATTAAGAATATACTATCTTGGGTCAGCTGGGGCCAGGTCCTTCAGCACTAATAGGTGCTTGCAAAGA  
AAGCAGCACAGAGGGCTTCAAATGATGTGGCTATATCCATAGACAATTACAACCTTGTCTTTCCTTAAGT  
AGGTCTTTGTAATGGGGTGCTTCCAGGGTCAGTTTGTCTACCACAGATAGTGGTACACAGAGGGAACACA  
TTTCACTGTGAGGTGATTCTCATATCAGTTACTCTACAACCAATAACAGGGTTTATCTTCTTATTGTG  
TAAAGAGAAGAGCATGTGAAGTACAAGGAGTATTACTGCATAAGTCAGCCACAGCCCAAGTGACCAAGT  
TCTCAAGTTCGATCATTCTTCTTCTCTGTTTGTCTTCCCTCACACATTCCAAAAACATTTCTGTAA  
GGATGGCTGTAGGTCTCCAGTCCACTGCTCTGACAGTCTGAGCAGATCCCATCAATGGCTGCTTGTT



TGAGGAAGAGGAATTTATCTTTCAAACATCAGACACACAAAAAATTGTAGAATCAGAGAACCATAGAGT  
GGCTTGGGTGAAAAGGTCCCCAAAGTTCATCTAGTTTCAACCGCCCTGTTGGGCAGGGTTGCCAACCCAC  
TAGACCAGGCTGCCAGAGCCACATCCAGCCTTGCCTTAAATGCTTCCAGCGGTGGGGCATCCACCACCT  
TTCTGGCAGCAATATGAAGATTCTGAATTA AAAACGTGGGTTGGCTTCACATCTGTGAAGGAAATAAAAA  
CTTCTGGTGA AATTAGTCCGTCTTGTGTCACAGCTGTCCAAGAGAGATGCTGCTGAGCATTAAACGTG  
TATAATAGGCCACACCAATTCTGTCCTTGAATCTTATCGCTGTTCAAGGAATATTAATCAACTCTCAATA  
TTAATTGCAGAACTTCACCTGAGCAAGGACCCCTGCTCCAAATACTTGTGCTCACCATCAGCAGAGCTT  
TACAACTTCAACAAATGTTATTGGCAGCTATGGGTAATTGTGTCATACAGAAATTGCTGATCCCAACTGC  
TAAGAGTCCTAACACAGCCTTAATGTAGGCATGCCAGGGCTCCTACGGCAATGTTATTTCACTGGTTCC  
TTCTATGCTCAGCTCAGCAGCCCACATGACTCCCTCTAGTCTGTTTCAGCACAATAACAGGCTGCAGGCA  
TAAGTGTCATCTTCTGAGAAAATAAAGGTTCAAACAGCTGACTGATTTT TAGGTGAGACTAGCCAATGAG  
AGCGGTAACCAGAGACCACTATTCTATGGGACAAAAGCTGTTGCGAGGATCTATTGGTCTGTTACGGAAA  
AAAATGAGCAGTGCCTTGCCACACCACTGCTGTCCAGACATCATCAGCACAGACTAAAGTATGAAGGAA  
AGCAGAGAAA ACTGATGTCTTCACTATATCTCAATTACAGACTTGCTGAGCTTCTTCCAGTCCGGCTGG  
TGAATGGTTCCAATTTCTGCTCTGGAAGAGTCGAGGTGTTTCATGAGCAGCAATGGGGACTGCTGTGA  
TGACAGCTGGGATTTAACAGATGCTCAAGTGGTGTGCAGGCAGCTGGGCTGTGGGAAGCCACCTCAGCC Exon V  
ACTGGCTCTGCTCGGTTTGGACAAGGAACTGGAACAATTTGGTTGGATGACGTGAACTGTGCAGGATCTG  
AAACTGCCCTCACTGAGTGCCAGCCAAGCCTTGGGGAGACCACA ACTGTAACCATGGAGAGGATGCTGG  
TGTGGTGTGCTCAGGTACTGTCAATGAATGCCATTGTCTGTGGGGTATGATGCAGCCAATGTGTTTGTGG  
GAGGGTGTGGTAGATCTGGAGTCTCCTCAGAGTAAGGAGAATGAGTGCTCGTCATGCGATTGTAGGCTG  
AGATAAAGGAGAGTGGTATGTTGATGGTAAGGCTGTATTCCACCTGGACATCATAGCTCAAGATGATAC  
CGAAGGGATGCGATTCATGCAGAAGGTCGGTGTATCCCCTTGTGTCCAGGACAGTTATGGAGCCATGCT  
CCAGGGAGCAGCTT GAGCACTCATAGGGACTAAAATGCTGTGGACTGGATATTGAGTCTTGATGGTTGGG  
TATGTCAAGGCTCAGAGTTATGACTCAGTACTCCCAACATTCAGGTCCACACCCATTTCTGTGCCCTG  
CTGTTGAGGAAGAAACCTGCTGTTTGCTACCAGACCCCTGTGAGGATTTTCTGGCTCCTCCACAGCACTC  
TGAGACATATAATGATCCTGAACATTTTGAATTGCATTTGATGCAGGTGCTGCTGAACCAGCTCCCATC  
CGGCTTGTGAATGGTCCGAGCCATTGTGCTGGGAGAGTCGAGGTGTTTCATGATCGTCAGTGGGGAACCG  
TATGTGATGACAACTGGGATAAAGCAGAAGCCAATGTTGTGTCAGGCAGCTGGGCTGTGGGGCAGCGCT Exon VI  
ATCAGCCCCTGGCTCAGCTCGCTTTGGACAAGGGTCTGACCCCATCTGGCTGGATGATGTCAATTGTGTA  
GGGACAGAGGCTGCCCTCTCCAGTGCCGGTCCAGGCTGGGGATCCATAACTGCAAACATGGAGAAG  
ATGCTGGTGTGGTGTGTTACGTTAACTCCTGCCTATGCTTCTGTGTTACAGAGGAGGATTTCTTTTTCCA

TGAGGATTATTTGTATGCCAGCATAGCTGCAAACCTGTCTTGATGACAATGCAGGTCTGAATTTTGAA  
TATGCTGTGAGCTCTCTGTCATCATATGGGATATTTCTTTGAAATTCTCCTTTTCTGGAAAATGTGTAAC  
TGTTCTGTACTCAGAAGTTGTCCTTGCTTTAGAAAGAGAATGCAATGCATTGCAGTGCAAAGGGATGGA  
ATAGAATGGGATTAATGGAGTGGAACACAACAGAACAGAACAGAACAGAATAGAATAGAATAGA  
ATGGAATGGAATAGAACAGAACAGAACAGAACAGAACAGAACATTTGAGTAGGAAGGAGGTCACATCTTG  
GTCTCTCTTCTCCAAACTATATACTCTGTGTCCCATCCACTTCTGCGTGCCTTCCAGGCTTCTTAA  
GAGTTTTATTGCCAACCTGGTATGCATTGAGTACCCTAACCTTCTCTTTATATTGTAGAGCCCAGA  
GTACACCATACTGTGAGGATGCACAAACTAAATACAGCAGGAATGGCACTTCTTTTGTCTGGCTGGCT  
ATGCTCTGGGTATTACACCCAGAACGTGGTTGGTAGGGCACACTGCTGCCTTCCATTGAGCCTGCTTTC  
ACCAGGGCCCCACATCCCTTCTGTGGGCTGCTCTCCAGCCACTCACCTCACAGGCTGTGAATGAATG  
CAGCATTGCTCCACCCAGGTACAGCACCCAGCATTACCCTTGCCAGTGTCACTCTGTTGCCAAATGC  
CCAGTGCTCCAATGGATCTAGAACGCTCTGTAAGGCCTGCATCCCTCTGGAGAGTAAACAGCACCTCCC  
TGTTAGTGTGACAGCAAACCTGCTGAGGATACCTTTAATGACTACATCGAGGTCATTGGTAAAAATGT  
TGACTGGGACTGGCTGTAGGATTGAGTGGTGGGGAACACTGGTGGCGTCTTTCAGATGTAGCGCCAGTC  
ACTACAACCTTTGAACTCTACCACTGAGGCAGTTTATCACCCGGCATAGTAGGAATCTGTTTACCTCAC  
AGCTGGACAATTAGTTCAGAAGGATGCTGTGAGGGATGGCAGTGAAGGCCTTACTAAAATCCAGAAGGAT  
CACATCTGCTGCATTCTGTTTCATCCACCAAGCAGGTGACCTTATCATAGAAGGACACCTAATTACTAAGG  
CAGGACCTTACCGTTCATTAACCCATGTGACCTATGCTTTAAAATGCCTTTCAGTAGCACCCAGGAATAG  
CTTTTCCATAACTTTTCCAGGGACTGAGGTTAGACTGACAGGTCAGTCGTTTCTGGGTCATCTCTCATC  
CCTTCTCTCCTTGATGATGGGCATAACATTGCCTGGTTTCCAGTCATCTGGGACCTCCCAAGACTCCCA  
GACCTCTGATAAATTATACTAGCTTATACTGTATTTCTCTTACTTACATTCAGCAGAATATGGTACACT  
GTCTGTGTTTCATAGTTTTGAACTGGCAAAGACATCCCAACATCAGGCAAAGAATAAGTGCATCCTGGAT  
GTCACTAGACCCTCACTGGCATTATGCACCTGACCTTACTTTTAAATCAGGCCAGCGGCAACTCCGTAACA  
CATATCCCTGCCCTCTCTGTTTTCTT**AGACATACCAAGAGCTGTTCCACTGCGGTTAATAAATGGGACG**  
**AGTCGCTGCAGTGGGAGAGTTGAAGTTTTTACGGCCAAAAGGGGGGAACCGTGTGTGATGACAACTGGG**  
**ACATAAGTGATGCTGAAGTTGTTTCCAGCAGCTGGGCTGTGGGAGGGCTCTATCCACTGCAACTTCAGC** Exon VII  
**TTCTTTTGGAGAAGGGTCTGGCCCAATCTGGCTGGATGACGTGAATTGCACAGGAGCTGAAACAAGCCTT**  
**TCCAAATGTGAGACCAGTCTGTGGGGAGCCATAAC**NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
NN  
NN  
NN



TGACGTGCCTAGAAGGAATGTCTTTGCCAAAATAACTTGCTGCTCATTCCCTTTGTGCTTCAGGTGTTCC  
AGAACCAGCCCCAGTCCGGCTGGTGAATGGTTCCAATTTCTGCTCTGGAAGAGTCGAGGTGTTTCATGAG  
CAGCAATGGGGACCGTCTGTGATGACAGCTGGGATTTAACAGATGCTCAAGTGGTGTGCAGGCAGCTGG  
GCTGTGGGAAGCAATCTCAACCCCTGGCTCTGCTCGGTTTGGACAAGGAACTGGAACAATTTGGTTGGA Exon VIII  
TGACGTGAACTGTGCGGGATCTGAAACTGCCCTCATTGAGTGCCAAGTCAGGCCTTGGGGAGAACACAAC  
TGTAACCATGGAGAGGATGCTGGTGTGGTGTGCTCAGGTACGGTTAATTCACATAATCACAGACGTCCAG  
AGGGTGAAGGGACCTCTGGAGATTCCCCTGCTAGTGTTTTCCACAGTAGATTGCACAGGAAAGCATCC  
AGGAAGTTTTGAATATCTCCAGAGAAGGAGACTCCACAACCCTTCTAGGCAGCTTGTTCAGCGCTCGG  
TCATGCTCACACTAAAGAAGTTCTATCACATGTTCCGATGGAAGTACTGGGTTCCAGTTGGTGCCATT  
GCCCCTTTTCTGTTGCTAGGCACGACCTAAAAGAGCCTGGTCCCAACCACTGAAACCTGTTCATTAGAT  
ATTTAGAAGTGTGATAAGAATCCCCCTCAGCCTTCTCCACGCCATGCTGAACAAGCCCAACTCCCTCAG  
TCTGTCTCCATAGGAGAGGTGCTCCAGCTCTATGAGCAGCTTCATGTCTCTGAAATGCTCCAAAAGC  
TCCACATCCTTCTGTGTTGAGGGACCCAGGCCTGGAAGCAGTACTGCAGACGGAGGGGGCCAAATCCCT  
TGTTAAGCTCTCACCCAGCAGAACCCCAAGTCCTTCTCTGCAGCCCTGTTCTCAATGAGTTTTTCTCC  
CAGTCTGTATGCATATCAGGGATTACTCCAACCAAGTACAACACCCTGCACTTGGCCTAGGTGATCCTA  
ATTTGGTTCCTGTAGCTTGTCCATGTCCCTGGGATTTCTGTGTTTTGTGGATTTCTCCTGTGTTTGTG  
TGATTGCGATCTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCCCTTTGCCAGGTATTGCAAAAACAGCTCCCATCCGGCTT  
GTGAACGGTCCAAATCTCTGCACTGGGAGAGTTGAGGTGTTTCATGACCATCAGTGGGAACTGTGTGTG  
ATGACAACCTGGGATAAAGCAGAAGCCAATGTTGTGTGCAGGCAGCTGGGCTGTGGGGCAGCGCTATCAGC Exon IX  
CCCTGGCTCAGCTCACTTTGGACAAGGGTCGGACCCCATCTGGATGGATGATGTCAGTTGTGTAGGGACA  
GAGGCTGCCCTCTCCAGTGCCGGTCCGGGGCTGGGATCCATAACTGCAAAACACGGAGAAGATGCTG  
GTGTGGTGTGTTACGGTAAATTCCTGCCTATTTCTCAGTCTCAAAAGTGTGGGAAACACGGAAAAATGAT  
TTTCAGCCTCAGTAGAAGGTCTCCGTGAGCTCAGGCTGCTCCAAATGTCTGCTGTCAGTCACTGTGGTC  
TATTCAGCAGAGTTTAGGGTCTGATGCAGGTATTTATGTGTGCATTTCTCATTATTTATCTTGCTTCATG  
TGCAGGCACTGCAGAAGCAGCTCCTCTCCGGCTGGTGAACGGCCCTAGTCACTGTGCTGGGAGAGTCGAG  
GTGCTTACAGCCAGCAGTGGGAAACAGTGTGCGATGACAGCTGGGACCTGAGCGATGCTGCAGTTGTGT  
GCCAGCAGCTGGGCTGTGGGACAGCCATGTCAGCCCCAGGATCTGCTTATTTGGGCAGGGCTACGGCCG Exon X  
TATCTGGCTGGATGATGTGAAATGTTCCAGCAGGGAATCAGCCCTCGCCGAGTGTGCAGCAAGGCCTTGG  
GGAGTCCATAACTGCAACCATGGAGAAGATGCAGGAGTCATATGCTCTGTTAACCTTCATGCATGACCTG  
CCCTGCAAGGCATTTGTAGCAACTAAGCCTCTAATCTGGGTTTTGGGGCTGGTGGCTTTCATCCTTTCC  
CAGTCACAGAATCATAGAATCGTTTGTGAGTTGGAATGGGTATTTAATGTTTCATCTTGTCCAACGCCCTGC

AACGAACAGGAACACCTACAGTTAGATGAGGTTGCTCAGATTACGGTCCAACCTTCAAATGCCTCCAAGG  
ACAGGGCATCCACCACCTCTCTGGGCTATCTGTGCTGCTGTTTCTCTGCCTTCAGCAGAAAAAGCTGTT  
TCTAATATCCAACCTATGTCTCCCCTATTGCACCTTGTTCAGTCCAACCTCTTCTCAGAGATGTGTCAT  
GGGATGATGGCAGAGGTGTGAAGTTGGAGCTTGGCATTGAGGGATCATTCCCATCTCTCCACATGGCT  
TCTTATTCTCCTTTTTGTGCTTTTGAAGTATCTCTAGAATATTACATGCTCATATTGCACAAAAGAACT  
ATGTATGTCCCATCCCTGCAGATGTTGAAGGCCAGACTGGACGGGGTGCAGGGCAATCTGATCTGATGGG  
TGGCAACCCTACCTACGGAAGAGGGCTGAAATGGATGGGTCCCTTCCAACCAAGCCATTCTGTGATTC  
TATGATTCTACCATTCTATGATTATAACAATGCCACAATCCTATTTTTCTACGATTGATTCCCCGATCTTC  
ATAGTCCCTTCCAACCTCATGCTGTCCATGATTCTATGAACTTTTTGGTGCCTTCCAAGCCAAGCCACTC  
TGGGATTCTAAGATTTGATGATTCAGTGATTCTTTTACATGATTATGTGCATACTACTAACTTAAAGTGG  
CCGTGCAGGGTAAAGCAAGCTAGTTTTACAGGTCTGGATTGCATGCATTCTTTCCAGTGGGATCTAAA  
CATTGCAGACGTTCCAGAGTGAAGAAGAGAGAGGACAGTGTGGCAAACATGTGTATGACATTTTTTCAA  
CCCAAACAAAAGTCATCTTTGAAGGCCTGAGTGCCCTCAGTACAGAAGCCAATCACGACACTCAGATCTA  
TGTCACTGAATTGTAAGCACAAAGCTGGTGTACCCAAATCAGGAGTGAATGGTCCCCTCAGCTAATGA  
AGAGAGACAGGTTTTTGCACAGGAGATGTCCTGTGAGCATTTTAATGTCCTCTTCCCTCCAGATCCTTA  
CCCAACTTCATAGCCAACCTTTAGGCTTTCTCTAATAATTTTAAAACCTTATATCACAGAGCCTAAAACA Exon XI  
GCACAAACACTGCTCGAGGTGAGGCTGCACCTCCAAGATTGGGGCATCCACAACCTTCTCTGGACAGCTTC  
ATCATCCTCTGAGTAAGGAATTTCTCCTAATATCTGACCAAAATCTCCCTATTTTACTTAAAAATCTCC  
CATTCCCCTTTGCCCTAGACAAACAGACCTCCAGGTCCCTTTTTCAGTCTTAAACCTTCTGTAACCTGTAA  
TCTCAAACACTGCAGCAAAAAGCATGGTGGGATCTTATGGAGTCTCCATTTCTTGTGTAACAAGCCCT  
GAGGAACCAAGAGCATTTGTCAAGCCCTGAGTTTTTCTTTCTATTTTTCTGCAAGATATTCACAACAAGGC  
TGCATTACTTTCCATTAGCACCAGCCAGGCCATGAATTCCTCTTCCCTCATTCTACTTCCCTATACTCA  
CTGCAGCTTTTGTGGACCCTTTCACCTGCCAGCACTCCATGTACAGCTCTTTTTTTCTGCTCTCAAATT  
CATGTCCTTGCTTCAGGGATCTCCTCAAGATAAGGTCTGGTGGCTACCATACAGACCTGGGGTTGCGGAT  
GGTCACACCTGTCTTGTGGTGTGATCTCAATTCCCATGCTCCAGGATTGGGGTGTGCTGAGCAGGATCTGC

**Fig. 3-13. Exon-intron structure of the EW135 gene in NC\_008466**

Nucleotides of exon-intron boundaries (AG and GT) are underlined. Eleven exons are in blue. Nucleotide sequences found in the EW135 cDNA are marked in Exons I and XI. Nucleotides coding for preceding seven-amino acid peptide of SRCR domain are marked in gray. Initial codon (ATG) in Exon I and stop codon (TAA) in Exon XI are double underlined.

CAAGGAACTGGAACAATTTGGTTGGATGACGTGAACTGTGCAGGATCTGAAACTGCCCTC  
ACTGAGTGCCAGCCAAGCCTTGGGGAGACCACAACCTGTAACCATGGAGAGGATGCTGGT  
GTGGTGTGCTCAGGTGCTGCTGAACCAGCTCCCATCCGGCTTGTGAATGGTCCGAGCCAT  
TGTGCTGGGAGAGTCGAGGTGTTTCATGATCGTCAGTGGGGAACCGTATGTGATGACAAC  
TGGGATAAAGCAGAAGCCAATGTTGTGTGCAGGCAGCTGGGCTGTGGGCAGCGCTATCA  
GCCCCCTGGCTCAGCTCGCTTTGGACAAGGGTCTGACCCCATCTGGCTGGATGATGTCAAT  
TGTGTAGGGACAGAGGCTGCCCTCTCCAGTGCCGGTCCAGGCTGGGGATCCCATAAC  
TGCAAACATGGAGAAGATGCTGGTGTGGTGTGTTCAAGACATACCAAGAGCTGCTCCACTG  
CAGTTAACAAATGGGCCGAGTCGCTGCAGTGGGAGAGTTGAAGTTTTTTACGGCCATCA  
GTGGGGAACCGTGTGTGATGACAACCTGGGACATAAGTGATGCTGAAGTTGTTTGCCAGCA  
GCTGGGCTGTGGGAGGGCTCTATCCACTGCAACTTCAGCTTCTTTTGGAGAAGGGTCTGG  
CCCAATCTGGCTGGATGACGTGAATTGCACAGGAGCTGAAACTAGCCTTTCCCAAATGTG  
AGACCAGTCTGTGGGAGCCCATAACTGTAATCATGGAGAAGATGCCGGTGTGTGTGCT  
TGGGTAAAGTCTCATTATGCTACTTTCTGACTGAGGTTTAAGGTATGTGGAGGAATGCTT  
GAAACGCCACTGGGTGCCCTTTCCCATCTTACGACTCTAAAACCAGAGTACCGAACGGA  
AAAAATGCTGCTGGTCGGATGTGTGTGAATCCAGTGGTGTCCCTTTCCCTCCCCCTGCC  
AAAACCTCTCCACAGTATTGTGGTGTGCAGTCCAGAGCTTGTGTGCTGAAGAATTCAAT  
TCTGGGACACTTTCCCATGAATTTAAACCTGAGACTCTTCCCTGTGTGGGCTACAGATAA  
ATCTGATAGCGCTGCAGGACTGCTGTGATCACCTGTTATTGAGAACAGCGCACAAACCA  
CTTAGGTCTCTCTTGTGTTTGTCTCTCAAAGATCATGACATGCTCTGCATTTGTTGACC  
TTCTCTTCAGGACAGTAATATCAAAGGTCTTGCAGTACTCTACTTGCCCTTTCCCCC  
TCCTTAGTAAAACCATCTTCAGGAGATCTTTTTCCAGAATTTTCCAATGTCTTCTCT  
GAAACCTCAGCAGGTGAGGCAGTTTCTCAAACCTGTGCTTAGTTGCCACTAGAAGGAAA  
CCCTGACCTGACTATTGATTTTAGAATTTACAGTCTCTTGTGTTTCTTGTGTGCATTG  
CTACTTACTCTTTGCAACTACCTTTTGGTAAGAGTGTTATATCGCTTCTCGCCCCTTCA  
TATCTCCTTCTTGAGAAATGTTTTCAAGCCTCTTCTTATCTCCCTCCTTCTTCTGGTTT  
TCTCCTGGCTGCTGGGCATATTTCTTCTAATCTTTAACTGAGCTGAGGCTTTGGCTGTG  
TTGATTCATTCTGAAGGTTTGGTTTGGATATTTGTAGACAGCACTCCCTTTTATACTAA  
ACCATGTCTTTCTTGAACAACATGACACTTAAAAGTGCACTCTCAGTCCTTTCTCTAG

CTTTGTGAAGAACTGTCATTTAACTAACTGTTCTTCATCCTATGTTCTATCATTTTCTCT  
 CCCCAGAATGGGACACTTTTGAATTGCTCTCACTGGAGATAGCCTGTTTCTCTAAATTAC  
 TTATCCACACCTTGAATACCTTGTGGATTTGCTGTCTAAGCACAAAGTGCCTCTCTATGAA  
 TTCATCATTGTCTTTTTGCAGCCAGTGAAGACTTTGCACACTCCATAGCAGAATCTTCTC  
 CATCCTGATGACATTCTCTAAGCAAATTAAGAAAAGGGCAACCCAGTAATGTTTATTTC  
 TTTCTATGACTACAGAAGGAAATGAGGATATTCAATGGAGTAGTTAAGGGGGTTCCTTG  
 CAAAAACAACCTTGTTTTGTGTTGTCTAAGTTCACAGAATCATAGAACAGCTTGGGTGGC  
 AGGAACCTCAAGGATCAACAAGTTTCAACTGCCCTGTCACAGGCAGATTTGCCAGTCACT  
 AGATCAAATACTTGATCAGATAGCCTAGGGCCCCATTTAACTGGTCTTTAACACCTCCA  
 GGGATGGGGCATCGACAGCCTCTCTGGGCAACCTGGTCCAGCACCTCACCACCTTTAGCT  
 AAAA ACTTCCCCTGACATTTTATCTAAATCTCCCTCCTCCGCTTTAAAGCCACTTTTTC  
 TCTTCCTATCAC

**Fig. 3-14. Exon VII of the EW135 gene found in AADN03012381**

Nucleotides of exon-intron boundaries (AG and GT) are underlined. Exon VII is in blue. Nucleotides coding for preceeding seven-amino acid peptide of SRCR domain are marked in gray.

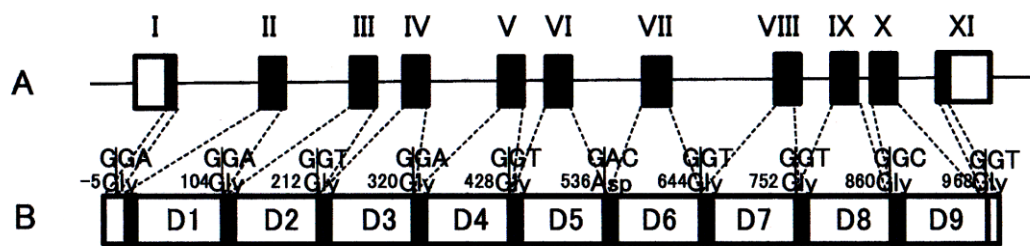


Fig. 3-15. Relationship between the genome structure and protein domain structure of EW135

A: Exon-intron structure of the EW135 gene. Exons are numbered using Roman numerals. B: Schematic representation of the SRCR domain structure of EW135 with the nucleotide and amino acid sequences of exon-intron boundaries. The relationship between the genome structure and protein domain structure of EW135 is indicated with *dotted line*. (Yoo et al. 2013b)



### 3.3.6 EW135 メッセージの組織分布

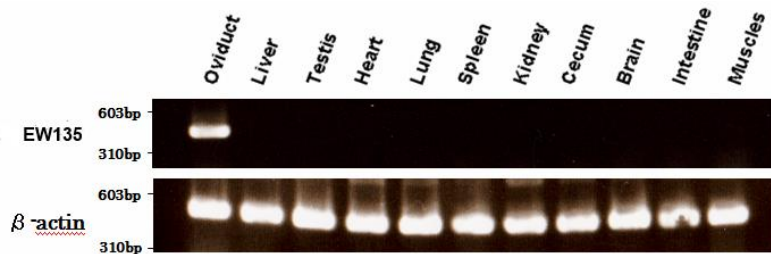
輸卵管を含む 11 種類の組織における EW135 のメッセージの発現を RT-PCR 方法により検討した (Fig. 3-16)。4 通りのプライマーの組み合わせ (C1, C2, C3, C4) (Table. 3-5) により RT-PCR を行ったところ、C1 では予想サイズ (454bp) のバンドが輸卵管のみで検出された。しかし、C2, C3, C4 の組み合わせでは、輸卵管の他の組織でもバンドが見られた。特に、肝臓では C2, C3, C4 の全てにおいて、輸卵管と同じサイズのバンドが検出された。なお、内部標準の  $\beta$  actin は検討した 11 種類のすべての組織で 409bp のバンドが確認された。

Table. 3-5. The pairs of primer of EW135 for RT-PCR

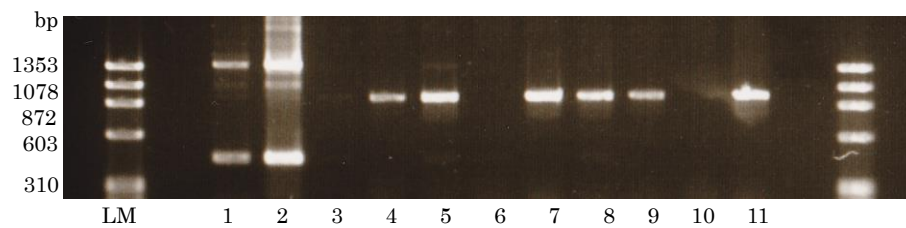
	Primer pair	Primer name	Sequence (5' -3' )	Base pair numbering
A	C1	RT-F	CATGCAGAACCAGAACTTGGGGGGA	293-318
		5R	GGATCAACCCACTGCTCTGGGAGAAT	721-746
B	C2	F1-2	ATTTGCTGAGCTTCTTCCAGTCCGG	1011-1035
		R1-2	CAGACGCCAATGTTGTG	2423-2439
C	C3	F1-1	CACTCCGATTAGTGGATGGATCAACC	704-729
		RT-R	GAAAGCAATCTCAACCCCTGGCTCTG	1164-1189
D	C4	F1-1	CACTCCGATTAGTGGATGGATCAACC	704-729
		R1-1	GAATCAGCCCTCTCCGAGTGTGCA	2869-2892

The base pair numbering for EW135 is based on Fig. 3-10

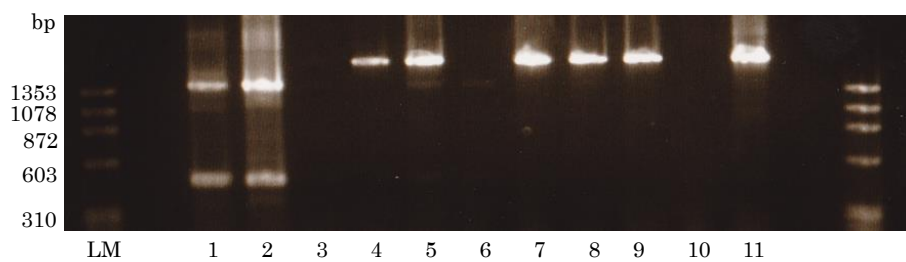
A



B



C



D

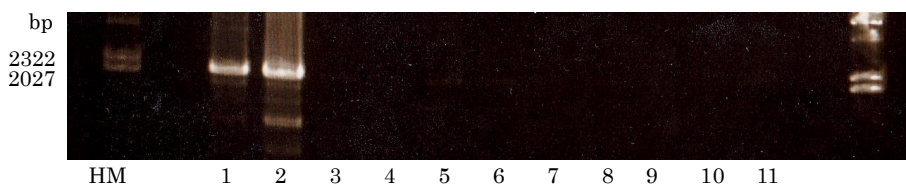


Fig. 3-16. Tissue expression of EW135 message

Eleven types of tissue including oviduct were examined for the presence of the EW135 message by RT-PCR.  $\beta$ -Actin message was used as a positive control for RT-PCR in A. Four types combinations of primers were examined. Combinations of primers used in A, B, C, D are C1, C2, C3 and C4, respectively.

Lane 1;oviduct, 2;liver, 3;testis, 4;heart, 5;lung, 6;spleen, 7;kidney, 8;cecum, 9;brain, 10;intestine, 11;muscles. (Yoo et al. 2013b)

### 3.4 考察

トリプシン消化ペプチドのアミノ酸配列解析と cDNA クローニングの結果、EW135 はグループ B SRCR ドメインスーパーファミリーのタンパク質に見られるコンセンサス配列の特徴がよく保存されており、このスーパーファミリーに属する新規タンパク質であることが分かった。SRCR スーパーファミリーは 100-110 アミノ酸 SRCR ドメインによって定義され、SRCR ドメインのそれぞれのタイプに従ってグループ A とグループ B の二つのグループに分類される (Sarrias et al. 2004; Martinez et al. 2011)。グループ A に属するタンパク質の SRCR ドメインは 6 つのシステイン残基を持ち、二つ以上のエクソンによってコードされている。一方、グループ B の SRCR ドメインは普通 8 つのシステイン残基を持ち単一のエクソンによってコードされている。DMBT1 (gp-340, SAG), M130 (CD163), S4D- SRCRB などの 13 以上のタンパク質がグループ B SRCR スーパーファミリーに属している。グループ B SRCR スーパーファミリーは膜結合型または分泌型のいずれかである。グループ B SRCR スーパーファミリーに属するタンパク質のほとんどは SRCR ドメインのタンデムな繰り返しで構成されているが、幾つかのメンバーは SRCR ドメインに加えてほかのドメインも持つ。例えば、S4D- SRCRB は 4 つの SRCR ドメインのみで構成されるタンパク質である (Padilla et al. 2002)。一方、DMBT1 は 14 個の SRCR ドメイン, 2Clr/Cls UegfBamp 1 (CUB) ドメイン, a zona pellucida (ZP) ドメインを持つマルチドメインである (Holmskov et al. 1997; Mollenhauer et al. 1997)。

EW135 は 9 個の SRCR ドメインがタンデムに並んだ構造をしており、各ドメイン間は 7 つのアミノ酸残基から成るペプチドで繋がっている。グループ B SRCR ドメインスーパーファミリーに属するニワトリタンパク質として 18-B があるが、これは 4 個の SRCR ドメインのみで構成され、各ドメインは 9 つのアミノ酸残基

から成るペプチドによって繋がっている。ハプトグロビンを持たないニワトリにおいて、血清中に存在する 18-B は主要なヘモグロビン結合タンパク質であり、強力な抗酸化物質として働いている。ニワトリのグループ B SRCR ドメインスーパーファミリーのタンパク質には、18-B の他に WC1 と CD5 が報告されている。WC1 は T 細胞に発現しているタンパク質であり、T 細胞受容体の補助受容体 (co-receptor) として機能する。WC1 は M130 と CD163B (M160) を含む CD163 ファミリーのメンバーである。GeneBank のデータベースには WC1 をコードする遺伝子が 18 個 登録されている。それらの WC1 の細胞外領域の SRCR の数は 1 から 9 である (Herzig et al. 2010)。ニワトリ CD5 は、3 個の SRCR ドメインから成る細胞外領域、疎水的な膜貫通ドメインと細胞質側末端 (cytoplasmic tail) で構成されている (Koskinen et al. 1998)。ニワトリ CD5 は T 細胞と B 細胞の細胞表面に発現しており、リンパ球の発達と機能に働いていると考えられている。グループ B SRCR ドメインスーパーファミリーのタンパク質において、SRCR ドメインの数は 1 から 14 まで様々である (Martinez et al. 2011)。EW135 と同様に、M130 も 9 個の SRCR ドメインのタンデムな繰り返し構造をしている (Law et al. 1993)。M130 は EW135 と異なり可溶性タンパク質でなく、多くの種においてマクロファージの細胞表面に発現している膜結合型タンパク質である。従って、M130 は細胞外の SRCR ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内領域から成る。ヒト M130 はハプトグロビン-ヘモグロビン複合体の受容体として機能する (Madsen et al. 2004)。本研究以前には、SRCR ドメインのみから構成される可溶性タンパク質として 18-B、AIM (Sp $\alpha$ )、S4D-SRCRB など多くが報告されていた。これらの SRCR ドメインの数は 1 から 5 であり、9 個の SRCR ドメインで構成される EW135 のドメインの数は最も多い。

本研究では、cDNA クローニングとニワトリゲノムのデータベースをもとに

EW135 遺伝子のエクソン-イントロン構造も解明した。その結果、EW135 遺伝子は 11 個のエクソンで構成されていることが判明した。グループ B の SRCR ドメインスーパーファミリーでは、一般的に一つの SRCR ドメインは一つのエクソンでコードされる (Sarrias et al. 2004)。EW135 遺伝子もまた、9 個の SRCR ドメインはそれぞれが別々の、9 つのエクソンでコードされている。また、各ドメインを繋ぐ 7 つのアミノ酸から構成されるペプチドは、ペプチドの後に続く SRCR ドメインと同じエクソンでコードされていることがわかった。ニワトリゲノムのデータベース (NC\_008466.2) をもとに 18-B 遺伝子のエクソン-イントロン構造を検討したところ、18-B の 4 個の SRCR ドメインは EW135 遺伝子と同様にそれぞれが別々の 4 つのエクソンでコードされていた (Fig. 3-17)。また、各ドメインを繋ぐ 9 つのアミノ酸から構成されるペプチドは、ペプチドの後に続く SRCR ドメインと同じエクソンでコードされていることがわかった。

EW135 の cDNA クローニングでは、EW135 のトリプシン消化で得られた二つのペプチド断片のアミノ酸配列とデータベースの XM\_424435 の塩基配列をもとにプライマーを設計したが、EW135 と XM\_424435 の塩基配列、EW135 と XP\_424435 のアミノ酸配列をそれぞれアライメントすると、プライマーの配列は EW135 の塩基配列に含まれることが確認された (Fig. 3-18b)。しかし、塩基配列、アミノ酸配列ともに類似性の高い領域はあるものの、EW135 の内部の一部の配列が XP\_424435 と XM\_424435 には無いことが判明した (Fig. 3-18a)。また、EW135 のタンパク質から決定した 10 残基の N 末端アミノ酸配列 (APIRLVDGPN) については 2.3.3 で述べたように、1 つのアミノ酸が異なる配列 (APIRLVNGPN) が XP\_424435 の 387 番~396 番に存在し、この配列は EW135 の 8 番目の SRCR ドメインに認められた。以上のことから、XP\_424435 は EW135 と一部高い類似性はあるものの、異なるタンパク質の配列であることが分かった。

本研究の RT-PCR の結果、調べた 11 種類の組織で見ると、EW135 は輸卵管のみで産生されていることが明らかになった。しかし、RT-PCR に用いたプライマーの組み合わせによっては、輸卵管と同じサイズの PCR 産物が肝臓でも検出された。このことは、EW135 と非常に類似したタンパク質が肝臓で作られている可能性を示している。また、XP\_424435 は EW135 とは類似しているものの異なるタンパク質の配列をしていることがわかった。そこで、データベースより EW135 の類似タンパク質を探索する目的で EW135cDNA の SRCR ドメインの塩基配列をもとに BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) で類似検索を行った。その結果、ニワトリのデータベースのゲノム配列 NC\_008466.2 において、EW135 遺伝子の下流に逆方向で EW135 の 2、3、7、8、9 番目の SRCR ドメインをコードするエクソンと一致または酷似の塩基配列を持つエクソンが存在することがわかった (Fig. 3-19, Fig. 3-20)。これら 5 個のエクソンの塩基配列を繋ぎ合わせて翻訳したところ、そのアミノ酸配列は XP\_424435 のアミノ酸配列と一致した (Fig. 3-21)。エクソンとエクソンの間には、塩基配列が未決定の領域があることから、仮に 5 つのエクソンが一つの遺伝子の一部であったとしても、未決定の領域に更に複数の SRCR ドメインをコードするエクソンが存在する可能性がある。いずれにしても、XP\_424435 は EW135 のアミノ酸配列ではなく、肝臓で産生されるタンパク質のアミノ酸配列の一部と考えられる。

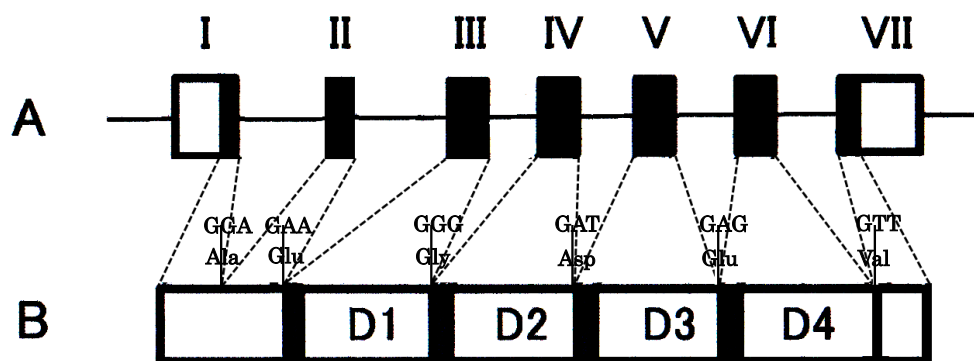


Fig. 3-17. Relationship between the genome structure and protein domain structure of B-18

A: Exon-intron structure of the B-18 gene. Exons are numbered using Roman numerals. B: Schematic representation of the SRCR domain structure of B-18 with the nucleotide and amino acid sequences of exon-intron boundaries. The relationship between the genome structure and protein domain structure of B-18 is indicated with *dotted line*

a

EW135	1	APTRLVGNPHCAGRLEVLWKQWGTVCDDSWDISDATVVCRQLDCGKPL	50
		.	
XP424435	1	-----MLE-----	3
EW135	51	SAPGSAHFGQGTGPIWLDDMKCNGTEVDLSACRTRTWGEHNCNHGEDASV	100
		: : ..  ... : : :  ... ..	
XP424435	4	---ADHYGDS---DSYQNI GNKVQME--RLKSNGRTN-----	32
EW135	101	VCSGNNKTVQLRLVNGTDHCSGRVEVLYGQWGTVCDDNWDLIDAEVVC	150
		.   .     :	
XP424435	33	---QNNKIVQLRLVNGTNHCSGRVEVLYGQWGTVCDDNWDLIDAEVVC	79
EW135	151	QLCGGTALSAASSAYFGRGSDPIWLDDVMCKGTETALSECTAKPWGKHDC	200
		..     ..	
XP424435	80	QLCGGTALSAAFSAYFGRGSDPIWLDDVMCKGTEALSECTAKPWGKHDC	129
EW135	201	GHGEDAGVVC SGFAKPA LRLVGNSTHCSGRIEVFYGQRWGTVCDDGWL	250
		..     ..	
XP424435	130	GHGEDAGVVC SGFAKPA LRLVGNSTHCSGRIEVFYGQHWGTVCDDGWL	179
EW135	251	ADAEVVCRLGCGKALSAPHGAHFGGSDPIWLDDVSCGTGTEAGLSTCKA	300
		..     ..	
XP424435	180	ADAEVVCRLGCGKALSAPHGAHFGGSDPIWLDDVSCGTGTEAGLSTCKA	229
EW135	301	SAWGSNCHGEDAGVVCAGFAELLPVRLVNGSNFCSGRVEVFHEQQWGT	350
		..     ..	
XP424435	230	SAWGSNCHGEDAGVVCAG-----	249
EW135	351	VCDSDWLTDAQVVCRLGCGKAI STPGSARFGQGTGTIWLDDMNCAGSE	400
		..     ..	
XP424435	250	-----	249
EW135	401	TALTECPAKPWGDHNCNHGEDAGVVC SGAAEPAPIRLVNSPSHCAGRVEV	450
		..     ..	
XP424435	250	-----	249
EW135	451	FHDRQWGTVCDDNWDKAEANVVCRLGCGAALSAPGSARFGGSDPIWLD	500
		..     ..	
XP424435	250	-----	249
EW135	501	DVNCVGTAAALSQCRFPWGSNCKHGEDAGVVCSDIPRAVPLRLTNGPS	550
		..     ..	
XP424435	250	-----	249
EW135	551	RCSGRVEVFYGHQWGTVCDDNWDISDAEVVCQLGCGRALSTATSASFGE	600
		..     ..	
XP424435	250	-----	249
EW135	601	SGSPIWLDDVNCTGAETSLSKCETSLWGAHNCNHGEDAGVVC LGVPEPAP	650
		..     ..	
XP424435	250	-----VPEPAP	255
EW135	651	VRLVNGSNFCSGRVEVFHEQQWGTVCDDSWLTD AQVVCRLGCGEAI ST	700
		..     ..	
XP424435	256	VRLVNGSNFCSGRVEVFHEQQWGTVCDDSWLTD AQVVCRLGCGEAI ST	305
EW135	701	PGSARFGQGTGKIWLDDVNCAGSETALTECQVRPWGEHNCNHGEDAGVVC	750
		..     ..	
XP424435	306	PGSARFGQGTGKIWLDDVNCAGSETALTECQVRPWGEHNCNHGEDAGVVC	355
EW135	751	SGITEPAPTRLVNGPNLCTGRVEVFHDHQWGTVCDDNWDKADANVVCRL	800
		: ..     ..	
XP424435	356	SGITKPAPTRLVNGPNLCTGRVEVFHDHQWGTVCDDNWDKAKPNVVCRL	405
EW135	801	GCGAALSAPGSAHFGGSDPIWDDVSCIGTEAALSQCRFRGWGSHNCKH	850
		..     ..	
XP424435	406	GCGAALSAPGSARFGGSDPIWDDVSCVGTAKAALSQCQFRGWGSHNCKH	455







EW135Nu	1551	TGATGTCAATTGTGTAGGGACAGAGGCTGCCCTCTCCCAGTGCCGGTTC	1600
XM424435	747	-----	746
EW135Nu	1601	CAGGCTGGGGATCCCATAACTGCAAAACACGGAGAAGATGCTGGTGGTG	1650
XM424435	747	-----	746
EW135Nu	1651	TGCTCAGACATACCAAGAGCTGTCCACTGCGGTTAACAAATGGGCCGAG	1700
XM424435	747	-----	746
EW135Nu	1701	TCGTCAGTGGGAGAGTTGAAGTTTTTACGGCCATCAGTGGGAACCG	1750
XM424435	747	-----	746
EW135Nu	1751	TGTGTGATGACAACTGGGACATAAGTGATGCTGAAAGTTGTTGCCAGCAG	1800
XM424435	747	-----	746
EW135Nu	1801	CTGGGCTGTGGGAGGCTCTATCCACTGCAACTCGGCTTCTTTGGAGA	1850
XM424435	747	-----	746
EW135Nu	1851	AGGGTCTGGCCCAATCTGGCTGGATGACGTGAATGCACAGGAGCTGAAA	1900
XM424435	747	-----	746
EW135Nu	1901	CTAGCCTTTCCAAATGTGAGACCAGTCTGTGGGAGCCATAACTGTAAT	1950
XM424435	747	-----	746
EW135Nu	1951	CATGGAGAAGATGCCGGTGTGTGTGCTGGGTGTTCCAGAACCAGCCCC	2000
XM424435	747	-----TGTCCAGAACCAGCCCC	764
EW135Nu	2001	AGTCCGGCTGGTGAATGGTTCCAATTTCTGCTCTGGAAGAGTCGAGGTG	2050
XM424435	765	AGTCCGGCTGGTGAATGGTTCCAATTTCTGCTCTGGAAGAGTCGAGGTG	814
EW135Nu	2051	TTCATGAGCAGCAATGGGGACCGTCTGTGTGATGACAGCTGGGATTAACA	2100
XM424435	815	TTCATGAGCAGCAATGGGGACCGTCTGTGTGATGACAGCTGGGATTAACA	864
EW135Nu	2101	GATGCTCAAGTGGTGTGCAGGCAGCTGGGCTGTGGGAAGCAATCTCAAC	2150
XM424435	865	GATGCTCAAGTGGTGTGCAGGCAGCTGGGCTGTGGGAAGCAATCTCAAC	914
EW135Nu	2151	CCCTGGCTCTGCTCGGTTTGACAAGGAACTGGAAAAATTTGGTTGGATG	2200
XM424435	915	CCCTGGCTCTGCTCGGTTTGACAAGGAACTGGAAAAATTTGGTTGGATG	964
EW135Nu	2201	ACGTGAACTGTGCAGGATCTGAAACTGCCCTCACTGAGTGCCAAGTCAGG	2250
XM424435	965	ACGTGAACTGTGCAGGATCTGAAACTGCCCTCACTGAGTGCCAAGTCAGG	1014
EW135Nu	2251	CCTTGGGGAGAACACAACCTGTAACCATGGAGAGGATGCTGGTGGTGTG	2300
XM424435	1015	CCTTGGGGAGAACACAACCTGTAACCATGGAGAGGATGCTGGTGGTGTG	1064
EW135Nu	2301	CTCAGGTATTACAGAACCAGCTCCCATCCGGCTAGTGAACGGCCAAATC	2350
XM424435	1065	CTCAGGTATTACAAAACCAGCTCCCATCCGGCTAGTGAACGGCCAAATC	1114
EW135Nu	2351	TCTGCACTGGGAGAGTTGAGGTGTTTCATGACCATCAGTGGGAACTGTG	2400
XM424435	1115	TCTGCACTGGGAGAGTCGAGGTGTTTCATGACCATCAGTGGGAACTGTG	1164
EW135Nu	2401	TGTGATGACAACTGGGATAAAGCAGACGCAATGTTGTGTGCAGGCAGCT	2450
XM424435	1165	TGTGATGACAACTGGGATAAAGCAAAACCAATGTTGTGTGCAGGCAGCT	1214





Fig.3-19. Location of the EW135 gene and the EW135-related gene in NC\_008466.2

TGATCCTGTTTTTGTGGTGGTGGGTGATTGATTTTTTCTCTTGTGTTGTTACTTTTTAATGCAGAAAAATAAT  
AAAAATAGTTCAACTGCGATTAGTGAATGGTACAAATCACTGCTCTGGGAGAGTGGAGGTGCTTTATGGCCAGCAATG  
GGGAACGGTCTGTGATGACAACTGGGATCTAATAGATGCTGAAGTTGTGTCCGTCAGCTGGGCTGTGGGACAGCCC  
TATCTGCTGCTTTCTCGGCTTATTTTGAAGAGGATCTGATCCCATTGGCTTGATGATGTTATGTGTAAGGAACT  
GAAGCTGCCCTGTCTGAATGCACTGCAAAACCTTGGGAAAAACATGACTGTGGGCATGGAGAAGACGCCGGTGTGT  
ATGCTCAGGTAACCTCATCTACATAACACAAGTGAGTTAGGGTAATGCTGTAGATGCTGTAGGGAGCTCTGTTC  
CCTTTGGAGACAAGAAAACCCCAACTCAAGAGAACCACAAGGTAATGTGGTTTGTACTGCCATGGTCTTTTCTC  
TATATTCTATATTAGTATTTTCTCTGTACTAAAAATTTCCACTGCATAAGCCACTGGTAGAGCACTGCTGGTGCAG  
GAATTATTTTTAGACTCCCAGTCCCTGAAGACAACAAAAGCCAGTGTCTCCCTACATGATTTATAAAGTCAAA  
GAGTCATAGAATCACCAAGGTTAAAAAGACCTACAACATCATCCAGTCCAACCATAACCTACCATCAATATTTCC  
CAGAAAACCATATCCCTCAGTACAACATCTAAATGTTTCTGAAACATCTCCAGGGATGGTATTCCACCACCTCCCT  
GGGAAGCCTGTTCTAGCACCTAACAGTCTTTCAAAAAATAAATTTTCCATAATCTGATCTGAACCTCCGCTAGC  
ACAGCTTGAGGCCATTCCCTCTTCCCTATCTCACCACAACCTCGTTTCAGGGTGTGTAGAGAGCGGTAAGGTCT  
CCCCTGAACCTCCTCTTCTCCAGACTAAACACAGTTCTCTCAACCGCTTCCATAACGTTTGTCTCCAGACCCCTC  
ACAGCTTCATTGCCCTTCTCTGGACATGCTCTGGGGCTCAGTGTCTTCTGTAGTGAGGAGCCCAACTGAACA  
CAATACTCGAGGTGCAGCCTCACCAGGGCTGAGTACAGAGGGATGATCACGTCCCTGCTCCTTCTGGCAGTGTATT  
TCTGATGCAAGCCAGGATTCCGTTGGCTTTCTTGGCCACCTGGACATACTGCTGGCTCATGTTACGTAAGTGTGA  
CCAACACTACTAGGTCCATTTCCCTCTACACAGTCTTCCATCCACTCTGCCCCAAGCCTGTAGCGTTGTCTAGGGTTG  
TTGTGGCCAAAGTGCCAGACCCAGAAGTGGTCTTGTGAACCTTCATCCACAGACCTCAACTCAACTATGCAGCCT  
GTCTAGATCACTCTGTAGGACCTTCCCTACCCAGATCCTCCTAGAAGCTACATTAAGGCACATACGAGATAAAGAGGT  
GATCCGAAACAGCCAGCATGGCTGAAGGAAGACCTCCTTGAGAGCAGCCCTGTGGAGAAGGACTTGGGGTCCTAGT  
AGATGAGAAGCTGGACATGAGCCAGCAGCATGCACTGGCAGCCTGGAAGGTGAACTATGTTCTGGGCTCATTAAAAG  
AGGAGTGGCCAGCAAGGAGAGGGAGGTGATTGTCCCCCTTACTCAGCTCTGTGAGGCCTCATCTGGAGTACTGTG  
TCCAGGCCTGGGACCCCCAGTACAGGAAGGACGTGGAGCTCTTGGAGCGGTCCAGAGGAGGGCCACTAAGATAATC  
AGAGGCCTGGAGCACCTCTCCTATGAGGAAAGGTTGAGGAACTGGGCTTGTTAGTTGAAGAAGAGAAGGCTCCG  
GGGAGACCTCACTGTGGCCTTCCCTGTACTTGAAGGGAGTGTATAAACAGGAAGGCAAGCGGCTGTTTACAAGGGTGG  
ATAGTGATAGGAGAAGGGGAATGGTTTTAAGCTGGGACAGGAGAGGATTAGGTTGGATATTAGAAGAAGTTTTTC  
ACACAGAGGGGGTAACCCACTGGAACAGGTTGCCAAGGAGGTTGTGGATGTCCCATCCCTGGACGCATTCAAAGG  
CAAGCTGGATGTGGCTCTGGGCAGGCAGCCTGATCTAGTGGTTGGCAACCCTGCACATGGCAGGGGATTTAAACTT  
GATAATCATTATGGTCTTTCCAACCCAGGCCGTTCTATGATGATTCTATGATACCCTCAGATATATTGGCACTTCC  
CCCCAGCTTGGTGTCAATTTGAAACTTACTGAGAGCGTGCTCAATCGCCTCCTCCAGGTCACCAATAAAGATATTA  
ACAGGGCCAACCCCAATAGCAACCCATAACCATCAGGGCCTGGTCCCCAGTTGTCTCACTCAAGGTGATCTGTCCA  
TAAACTTCCCTGTCACTGAGGTGAGGCTTACAGGCCTGTAGTTCCCCAGATCCTCCTTACAATTTCTTGTAGATG  
GGATTCACTGGCAAGCCTCCAGTCCCTCTGGGACCTCTCTGACTGACCAGGAATGGTGGTACGTAGTGGAGAGCAG  
CTTGGGTCTCCAACATCTCCTCAGCAGCCTGAGGTGGATCCCATCTGGTCCCATTGACTGTGACAGTCCAGATGG

EW135D2







AACCTCAAGGATCAACAAGTTTCAACTGCCCTGTCACAGGCAGATTTGTCAGTCACTAGATCAAATACTTGATCAGA  
TAGCCTAGGGCCCATTTAACCTGGTCTTTAACACATCCAGGGATGGGGCATCGACAAAAGCTCTGGGCAACCTGGT  
CCAGCACCTCACCCTTTTAGCTAAAACTTCCCCCTGACATTTTATCTAAATCTCCCTCCTCCGCTTTAAAGCCAC  
TTTTTCTCTCCTATCACTGTTTACCTGTGTA AAAAGTTGATTTTCCTTCATGTTTTTAAATCCCTTGAAATACTGG  
AAAGCCACAGTGATATCTCCATGCCGTCTTCTCTTTCCAGGCAGAATAAGCCCAGTTCCTTCAGCTTGTCTTCATA  
GGAGAAATGCTCCAGCCCTCTAATCATCTTTGTGGCCCTCCTCTGGACCCCTCCAAAAGCTCCACATCTTTCCTGT  
GTTGGAGGCCTCAGACCAGGTCGAGTACTCTTGCTGGGGACTCAGGAGGCATAATAGAGGGGGCCGGTTACCTCC  
TTCGCCCTCCTGGCCACCCCTCTTCTGATGGTGCACAGGATATCATTGGCTTTCAGGATGCAAGCGCACCCCTGCTG  
GCTCATGTTAACTTTTTACCTACCAGGACCCCTAAGTCCTTCTCAGCAGGGCTACTCACAAATTCTCCAGTTTAC  
ATACATAACTGGGATTACCTCAACCGAAATGCAAAACCTTGCACTTTTGTGTTGTTGAACCTCACTATCTTCACAGG  
GCCACCTTTTGTGTTGATCAAGTCCCCCTGGATGGCATCCTCTCCTTCTGCTACATCAACCGACCAATCAGCTT  
GGTGTATCAGCAAACCTTGCTGAAGGTGCACTCAATCCCATCATCTATGTCAGTATCAAGATGTTAAAGAGTACTG  
GACTCAAGACAGACCCCTGGGGACCCACTAGTTACCAGAATTCATCTGGACATAAAGCCATTGATCACAACCCTCT  
GACTGTAACCATCCAACCAATTCCTTATCCACCAAATAGTCCACCCGTCAAATCCACATTTCTGCAATTTAGTGACA  
TGGATGTGGTGGGGACCATATCAAAAAGCCTCGCAGAAATCCAGGCAGATTACATCAGTTGCCTTCCCTTTGTCCAC  
AAATAACACAGAGACATCCTGTGACGTCCCATTCTATCTCTAATTGCAGATATGGAAGAGTGGCCCCCTCCAGGAT  
CCTATGTCAAGTCTGCCAGGCTCATTGGATGTCTGGGATGCACCAGGCATCTCAAATGGCAATAGGTACCAATGCAC  
AGGAAAGTAAATGAGCCACTGAAAGCTGAAAGTCTGGTTGAGGACAATTGTACCCAGTTTTCTATCCACATTCCTGG  
CTAGTGCCTTTTTCTTGGGCAGTGGAGTTACCTGCATTCGCTGCCTGGGCACCCACTATCTCCTGGTAAAAGGAAG  
AGAGAAGAAGGCTTCAATCACCTCATGTTTGGGAGTGAAGCCAACAGTATATCTATTTTCTTAGTTTGGACCAGC  
ATTACTTGTGACCCCTGGGTCATGTGTGAGGAAAAGCAATAGGATTGAACCTTCTTCTTGATGCTTGTCCCTGGAT  
GTCATTACTAAACTAACCAGTGCACACAATGTTTCTGACGTGCCTAGAAGGAATGTCTTTGCTAAAATAA ACTTGCC  
TGCTCATTCCTTTGTGCTTCAAGTGTTCAGAACCCAGCCCCAGTCCGGCTGGTGAATGGTCCAATTTCTGCTCTGG  
AAGAGTCGAGGTGTTTCATGAGCAGCAATGGGGACCGTCTGTGATGACAGCTGGGATTTAACAGATGCTCAAGTGG  
TGTGCAGGCAGCTGGGCTGTGGGGAAGCAATCTCAACCCTGGCTCTGCTCGGTTTGGACAAGGAACTGGAAAAATT  
TGGTTGGATGACGTGAACTGTGCAGGATCTGAAACTGCCCTCACTGAGTGCCAAGTCAGGCCTGGGGAGAACACAA  
CTGTAACCATGGAGAGGATGCTGGTGTGGTGTGCTCAGTACGGTTAATTCACATAATCACAGACGTCCAGAGGGTG  
GAAGGGACCTCTGGAGATTCCTGCTAGTGTTCACAGTAGATTGCACAGGAAAGCATCCAGGAAGGTTTTGA  
ATATCTCCAGAGAAGGAGACTCCACAACCCCTTAGGCAGCTTGTTCAGCGCTCGGTCATGCTCACACTAAAGAAG  
TTCTATCACATGTTCCGATGGAACCTGACTGGGTTCCAGTTGGTGGCCATTGCCCTTTTTCTGTTGCTAGGCACGAC  
CTAAAAGAGCCTGGTCCAACCACTGAAACCTGTTTATTAGATATTTAGAAGTGTGATAAGAATCCCCCTCAGCCT  
TCTCCACGCCATGCTGAACAAGCCCAACTCCCTCAGTCTGTCTCCATAGGAGAGGTGCTCCAGCTCTATGAGCAGCT  
TCATGTCTCCTGGAAATGCTCCAAAAGCTCCACATCCTTCTTGTGTTGAGGGACCCAGGCCTGGAAGCAGTACTGC  
AGACGGAGGGGGCCAATCCCTGTTAAGCTATTCACCCAGCAGAACCCCAAGTCCTTCTCTGCAGCCCTGTTCTC  
AATGAGTTTTTCTCCAGTCTGTATGCATATCAGGGATTACTCCAACCAAGTACAACACCCTGCACTTGGCCTAGG  
TGATCCTAATTTGGTTCCCTGTAGCTTGTCCATGTCCCTGGGATTTCTTGTGTTTTGTGGATTTCTCCTTGTGTTTGT

EW135D7

GTAATTGCGATCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCCTGCCAGGTATTACAAAACCAGCTCCCATCCGGCT  
 TGTGAACGGCCAAATCTCTGCACTGGGAGAGTCGAGGTGTTTCATGACCATCAGTGGGAACTGTGTGTGATGACA  
 ACTGGGATAAAGCAAAACCCAATGTTGTGTGCAGGCAGCTGGGCTGTGGGCAGCGCTATCAGCCCCTGGCTCAGCT **EW135D8**  
 CGCTTTGGACAAGGGTCTGACCCCATCTGGATGGATGATGTCAGTTGTGTAGGGACAAAGGCTGCCTCTCCCAGTG  
 CCAGTTCGGGGCTGGGGATCCCATAACTGCAAACACGGAGAAAATGCTGGTGTGGTGTGTTAGTAACCTCCTGCC  
 TATTTCTCGGTCTCAGAAGTGTGGGAAACACGGAAAAATGATTTTCAGCCTCAGTAGAAGGTCTCCGTGAGCTCA  
 GGCTGCTCCAAATGTCTGCTGTCAGTCACTGTGGTCTATTCAGCAGAGTTTAGGGTTCTGATGCAGGGCATTATGT  
 GTGCATTTCTCATTTTATCTTGCTTCATGTGCAGGCACTGCAGAAGCGGCTCCTCTCCGGTGGTGAATGGCCCTAG  
 TCGCTGTGCTGGGAGAGTCGAGGTGCTTACAGCCAGCAGTGGGAAACAGTGTGCGATGACAGCTGGGACCTGAGCG **EW135D9**  
 ATGCTGCAGTTGTGTGCCAGCAGCTGGGCTGTGGACAGCCATGTCAGCCCCAGGATCTGCTATTTTGGGCAGGGC  
 TACGGCCGTATCTGGCTGGATGATGTGAAATGCTCCAGCAGGGAATCAGCCCTCTCCGAGTGTGCAGCAAGGCCTTG  
 GGGAGTCCATAACTGCAACCATGGAGAAGATGCAGGAGTCATATGCTCTGTAACCTTCATGCATGACCTGCCCTGC  
 AAGGCATTTGTAGCAACTAAGCCTCTAATCTGGGTTTTGGGGCTGGTGGCTTTCATCCTTTCCCA

**Fig. 3-20. EW135-related gene in NC\_008466.2**

Putative exon-intron structure of EW135-related gene in NC\_008466.2. Nucleotides of exon-intron boundaries (AG and GT) are underlined. Putative exons are in blue. EW135D2, EW135D3, EW135D7, EW135D8, EW135D9 represent that the base sequences of the corresponding putative exon are very similar or identical to the base sequences coding for second, third, seventh, eighth and ninth SRCR domain of EW135, respectively.

```

EW135R -----NN
XP_424435 MEGGFQIEGRSQCGDFSNTMPLGCMSCFLPAVFSVTNMRFILLPCLWASLAGVLLAENN
                                                    **

EW135R KIVQLRLVNGTNHCGRVEVLYGQQWGTVCDDNWDLIDAEVVCRLGCGTALSAAFSAYF
XP_424435 KIVQLRLVNGTNHCGRVEVLYGQQWGTVCDDNWDLIDAEVVCRLGCGTALSAAFSAYF
*****

EW135R GRGSDPIWLDDVMCKGTEAALSECTAKPWGKHDCGHGEDAGVVC SGFAKPAPLRLVDGST
XP_424435 GRGSDPIWLDDVMCKGTEAALSECTAKPWGKHDCGHGEDAGVVC SGFAKPAPLRLVDGST
*****

EW135R HCSGRIEVFYGQHWGTVCDDGWLDAE VVCRLGCGKALSAPHGAHFGQGS DPIWLDDV
XP_424435 HCSGRIEVFYGQHWGTVCDDGWLDAE VVCRLGCGKALSAPHGAHFGQGS DPIWLDDV
*****

EW135R SCTGTEAGLSTCKASAWGSHNCGHGEDAGVVCAGVPEPAPVRLVNGSNFCSGRVEVFHEQ
XP_424435 SCTGTEAGLSTCKASAWGSHNCGHGEDAGVVCAGVPEPAPVRLVNGSNFCSGRVEVFHEQ
*****

EW135R QWGTVCDDSWDLTDAQVVCRLGCGEAI STPGSARFGQGTGKIWLDDVNCAGSETALTEC
XP_424435 QWGTVCDDSWDLTDAQVVCRLGCGEAI STPGSARFGQGTGKIWLDDVNCAGSETALTEC
*****

EW135R QVRPWGEHNCNHGEDAGVVCSGITKPAPIRLVN GPNLCTGRVEVFHDHQWGTVCDDNWDK
XP_424435 QVRPWGEHNCNHGEDAGVVCSGITKPAPIRLVN GPNLCTGRVEVFHDHQWGTVCDDNWDK
*****

EW135R AKPNVVCRLGCGAALSAPGSARFGQGS DPIWMDDVSCVGTKAALSQCQFRGWGSHNCKH
XP_424435 AKPNVVCRLGCGAALSAPGSARFGQGS DPIWMDDVSCVGTKAALSQCQFRGWGSHNCKH
*****

EW135R GENAGVVC SGTAEAAPLRLVNGPSRCAGRVEVLHSQQWGTVCDDSWDLS DAAVVCQQLGC
XP_424435 GENAGVVC SGTAEAAPLRLVNGPSRCAGRVEVLHSQQWGTVCDDSWDLS DAAVVCQQLGC
*****

EW135R GTAMSAPGSAYFGQGYGRIWLDDVKSSRESAL SECAARPWGVHNCNHGEDAGVICSGG
XP_424435 GTAMSAPGSAYFGQGYGRIWLDDVKSSRESAL SECAARPWGVHNCNHGEDAGVICSGG
*****

```

**Fig. 3-21.** Alignment of the amino acid sequence of XP\_424435 and reduced amino acid sequence of joined five exons of EW135-related gene (EW135R)

## 第四章 EW135 の機能

### 要約

バッチ法で検討したところ、EW135 はプロテイン A-Sepharose に結合した。更に、ELISA 法で検討したところ、EW135 は  $\text{Ca}^{2+}$  存在下、黄色ブドウ球菌とその構成成分であるプロテイン A に結合性を示した。一方、EDTA 存在下、EW135 はいずれにも結合しなかった。グループ B SRCR ドメインスーパーファミリーのメンバーには DMBT1/gp340/SAG のように、 $\text{Ca}^{2+}$  依存的に細菌に結合するタンパク質があり、パターン認識分子として自然免疫に働いている。従って、EW135 も同様にパターン認識分子として卵の生体防御に働いている可能性が推定される。

### 4.1 序論

第二章で述べたように、EW135 は卵白中では単量体として存在するが、条件によっては、 $\text{Ca}^{2+}$  依存的に EW135 同士が  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に複合体を形成する可能性が推定された。また、第三章で述べたように、EW135 は 9 個の SRCR ドメインがタンデムに並んだ構造をしているグループ B SRCR ドメインスーパーファミリーに属する新規タンパク質であることが分かった。このスーパーファミリーのメンバーのタンパク質は一般的に SRCR ドメインのタンデムリピートが特徴であるが、SRCR ドメインの他に、Clr/Clr UegfBamp 1 (CUB) ドメイン、a zona pellucida (ZP) ドメインなどを持つタンパク質もある。SRCR ドメインを持つタンパク質の機能は多様であり、CD6、ALCAM (Bowen et al. 1996)、CD163、hemoglobin-haptoglobin complex (Kristiansen et al. 2001) はタンパク質 - タンパク質相互作用を媒介することができる。また CD5, CD6, SP $\alpha$ /AIM、CD163 などは病原体関連分子パターン (PAMPs) を認識するパターン認識分子である

(Sarrias et al. 2005, 2007; Fabrick et al. 2009; Vera et al. 2009)。SRCR-SF は膜結合型と分泌型が存在し、自然免疫と獲得免疫の両方の免疫の調節に関与している。本研究では、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) およびその構成成分であるプロテイン A に対する EW135 の結合性について検討した。

## 4.2 材料と方法

### 4.2.1 試薬

黄色ブドウ球菌 (11SN020) は女子栄養大学の高橋信二教授より供与された。

以下に挙げる試薬類は括弧内のメーカーのものを使用した。

プロテイン A-Sepharose (GE Healthcare Life Science)、Tris aminomethane (Sigma Aldrich)、TMB; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (Promega)、HRP 標識プロテイン A; horseradish peroxidase conjugated-recombinant protein A (Thermo Scientific)、Starting block™ (Thermo Fisher Scientific)、Avidin-biotin-peroxidase 複合体 (Vector Laboratories)、ABTS; 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (Invitrogen)、HRP 標識抗ウサギ IgG (Jackson Immuno Research Laboratories)、一般試薬は和光純薬工業のものを使用した。

### 4.2.2 EW135 とプロテイン A Sepharose の結合性の検討

TBS-Ca (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.8) で希釈した EW135 とプロテイン A-Sepharose をコンカルチューブ内で混合し、ローテーターを用いて 4°C で 1 時間反応させた。遠心 (4°C、1,400 × g、5 分間) 後、上清を回収した。沈殿物には SDS-PAGE 用のサンプル緩衝液 (2-メルカプトエタノール含有)

を添加、遠心 (4°C、1,400×g、5 分間) 後、上清を回収した。上清と沈殿について SDS-PAGE を行った。

#### 4.2.3 ELISA による EW135 とプロテイン A の Ca<sup>2+</sup>依存的結合性の検討

EW135 を TBS-Ca (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.8) で希釈してマイクロプレートに 4°Cで一晩コートした。Starting block 300 μl を添加し 37°Cで2時間ブロッキングを行った。その後、0.1% Tween 20 を含む TBS-Ca-T または TBS-EDTA-T (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.1 % Tween 20, pH 7.8) で洗浄した。ウェルの洗浄後、それぞれの緩衝液で希釈した HRP 標識プロテイン A を添加し、37°Cで1時間インキュベートした。その後、TMB を添加し発色させた。HCl を添加し反応を停止後、マイクロプレートリーダー (BIO RAD) を用いて 450 nm における吸光度を測定した。

#### 4.2.4 黄色ブドウ球菌のホルマリン処理法

4 ml の LB 培地入り L 字管に黄色ブドウ球菌を加え、37°Cで一晩培養した。600 nm における培養液の吸光度を測定後、新たなコニカルチューブに培養後の 2 ml の黄色ブドウ球菌を加え、さらに 4 ml の PBS を加えた。遠心 (4°C、1,400×g、10 分間) して得られた沈殿に 4 ml の PBS を添加、遠心して黄色ブドウ球菌を洗浄した。その後、沈殿に 4 ml の 0.5% ホルマリン (in PBS) を添加した。室温で1時間インキュベーション後、遠心 (4°C、1,400×g、10 分間) して沈殿に 4 ml の PBS を添加、遠心操作により3回洗浄後、沈殿に 4 ml の PBS を加え、吸光度を測定した。

#### 4.2.5 ELISA による EW135 と黄色ブドウ球菌の結合性検討

PBS で5倍 希釈したホルマリン処理の黄色ブドウ球菌をマイクロプレートに 4°Cで一晩コートした。反応後、コート液を捨て 300  $\mu$ l の VBSG (0.1% gelatin, 0.02%  $\text{NaN}_3$ , 10mM barbital, 145mM NaCl, pH7.4) を添加し、37°Cで 2時間ブロッキングを行った。その後、TBS-Ca-T(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.1% Tween 20, pH 7.5)または TBS-EDTA-T(50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 10mM EDTA, 0.1% Tween 20, pH 7.5)でウェルを洗浄した。それぞれの緩衝液で希釈した EW135(1  $\mu$ g/ml)を添加し、37°Cで1時間インキュベートした。それぞれの緩衝液でウェルを洗浄した後、それぞれの緩衝液で 100倍希釈した 100  $\mu$ l のビオチン標識 抗 EW135 抗体を添加し、37°Cで1時間インキュベートした。ウェルを洗浄した後、それぞれの緩衝液で 100倍希釈した 100  $\mu$ l の Avidin-biotin-peroxidase 複合体を添加し、37°Cで1時間インキュベートした。ウェルをそれぞれの緩衝液と TBS-Ca または TBS-EDTA で順次洗浄した後、0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 4.3) に ABTS と過酸化水素を混合した液を添加し、発色させた。マイクロプレートリーダー (BIO RAD) を用いて 415 nm における吸光度を測定した。

## 4.3 結果

### 4.3.1 EW135 とプロテイン A-Sepharose の結合性

カルシウム入り緩衝液で希釈した EW135 とプロテイン A-Sepharose のゲルをバッチ法での反応後、上清と沈殿を SDS-PAGE で解析した結果、上清には EW135 が検出されず、沈殿に EW135 が検出された。これは EW135 とプロテイン A-Sepharose が結合したことを示している (Fig. 4-1)。

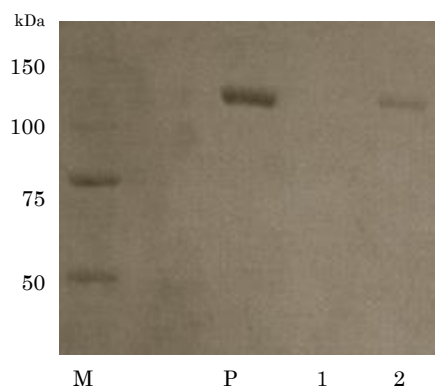
### 4.3.2 EW135 とプロテイン A の結合性

マイクロプレートウェルにコートした EW135 に TBS-Ca または TBS-EDTA で希釈した HRP 標識プロテイン A を添加してインキュベート後、その結合量を測定した。Fig. 4-2 に示すように、Tris-Ca 希釈の HRP 標識プロテイン A は EW135 に結合したが、Tris-EDTA 希釈の HRP 標識プロテイン A は EW135 に結合しなかった。これにより、EW135 は  $\text{Ca}^{2+}$  依存的にプロテイン A に結合することが分かった。

### 4.3.3 EW135 と黄色ブドウ球菌の結合性

マイクロプレートにコートしたホルマリン処理の黄色ブドウ球菌に  $\text{Ca}^{2+}$  または EDTA を含む Tris-HCl 緩衝液で希釈した EW135 を反応させ、黄色ブドウ球菌に結合した EW135 量をビオチン標識抗 EW135 抗体を用いて測定した。Fig. 4-3 に示すように、Tris-Ca で希釈した EW135 が高い値を示し、その値は EW135 の濃度依存的であった。この結果、EW135 は黄色ブドウ球菌と  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に結合することが分かった。





**Fig. 4-1 Binding of EW135 and protein A-Sepharose**

EW135 diluted with buffer containing  $\text{Ca}^{2+}$  was incubated with protein A-Sepharose gels. After centrifugation, the supernatant and precipitates were subjected to SDS-PAGE (10% gel) under reducing conditions followed by staining with Coomassie Brilliant Blue.

M: Molecular weight marker      P: EW135  
1: supernatant                      2: precipitates

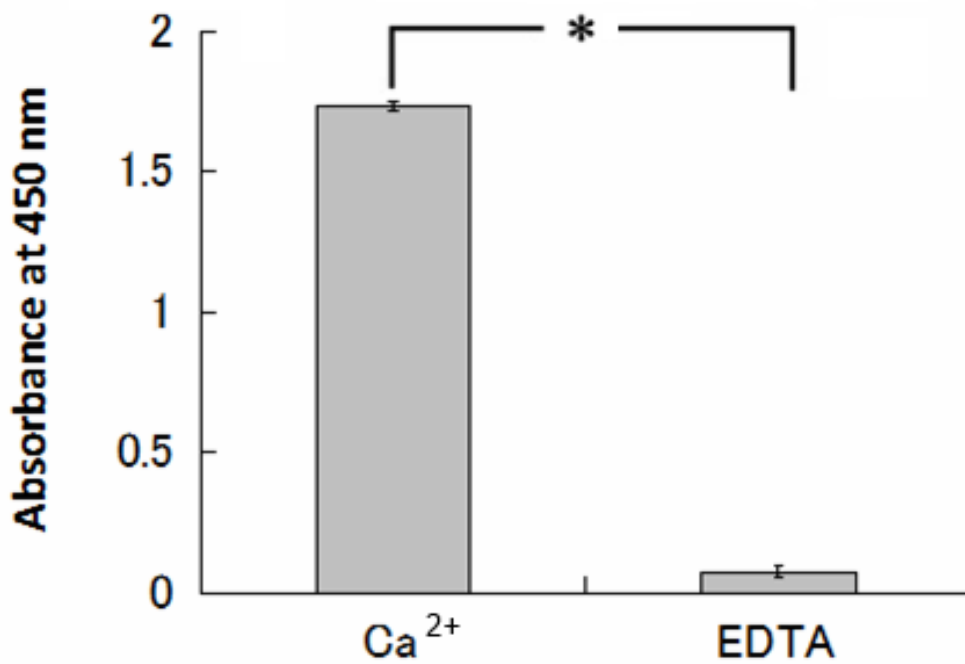


Fig. 4-2 Binding of EW135 and protein A

EW135 coated on the microplate wells was incubated with horseradish peroxidase conjugated-protein A (HRP-protein A) diluted with either TBS-Ca or TBS-EDTA. After incubation, the binding levels of HRP-protein A to EW135 were determined. \*  $P < 0.05$  ( $n=3$ ).

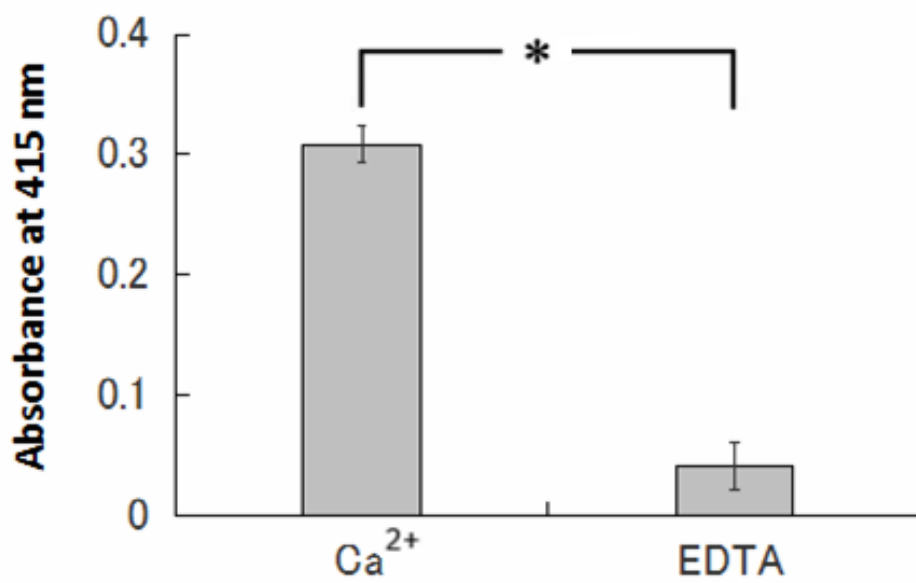


Fig. 4-3. Binding of EW135 and *S. aureus*

EW135 in Tris-HCl buffer containing either Ca<sup>2+</sup> or EDTA was incubated with formalin-treated *S. aureus*. After incubation, the binding levels of EW135 to *S. aureus* were measured using biotin-labeled anti-EW135 and the avidin-biotin-peroxidase complex. \*  $P < 0.05$  ( $n=3$ ).

#### 4.4 考察

EW135 は  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に黄色ブドウ球菌と結合し、黄色ブドウ球菌細胞壁プロテインであるプロテイン A とも結合することが明らかになった。この結果は、EW135 は黄色ブドウ球菌表面の成分の中で、少なくともプロテイン A に結合することを示している。グループ B SRCR ドメインスーパーファミリーに属する CD5, CD6, SP  $\alpha$  /AIM、CD163、DMBT1/gp340/SAG などは病原体の持つ PAMPs に結合するパターン認識分子であり、自然免疫に働いている。EW135 が黄色ブドウ球菌とその成分のプロテイン A に結合することから EW135 もパターン認識分子として卵の生体防御に働いている可能性が高い。

EW135 は黄色ブドウ球菌やプロテイン A との結合に  $\text{Ca}^{2+}$  を必要とする。2章で述べたように、EW135 同士の結合も  $\text{Ca}^{2+}$  依存的である。グループ B SRCR ドメインスーパーファミリーで  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に細菌などに結合性を示すタンパク質には CD163 と DMBT1/gp340/SAG がある。

CD163 はパターン認識受容体としてグラム陽性菌およびグラム陰性菌に結合する (Fabriek et al. 2009)。結合部位は第二の SRCR ドメインのペプチド GRIEIKFQGRW にマッピングされている。CD163 は hemoglobin-haptoglobin complex にも  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に結合する (Madsen et al. 2004)。

DMBT1/gp340/SAG は Streptococcus mutants (Ericson and Rundegren. 1983 ) E. coli, Lactobacillus casei, Helicobacter pylori, S. aureus, S. pneumoniae, Haemophilus, influenza (Prakobphol et al. 2000; Bikker et al. 2002; Madsen et al. 2003) などを含む多数のグラム陽性菌およびグラム陰性菌に  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に結合する。DMBT1/gp340/SAG の SRCR ドメインに存在する 11 アミノ酸から成るペプチド

(GRVEVLYRGSW) が細菌との  $\text{Ca}^{2+}$  依存的な結合部位であることが報告されている (Bikker et al. 2002)。このペプチドは 8 つの SRCR ドメインに存在し、複数の結合部位で細菌を凝集できる。DMBT1/gp340/SAG は Human immunodeficiency virus type I (HIV- I) のエンベロープの gp120 と  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に結合し、HIV- I 感染を阻害する (Wu et al. 2003)。また、DMBT1/gp340/SAG は SP-D, SP-A と  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に結合し、肺の粘膜の防御に関わる (Ligtenberg et al. 2001; Hartshorn et al. 2003)。EW135 にも CD163 と DMBT1/gp340/SAG が持つ GRxExxxxxxW のモチーフが全ての SRCR ドメインに存在する。EW135 と黄色ブドウ球菌やプロテイン A との結合にもこのモチーフが重要と推定される。

第二章で示したように、EW135 同士が  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に結合する。この論文では示していないが、2.2.9 の方法に従い、0.5 M NaCl を含む Tris-HCl (pH 7.8) により可溶化して得られた EW135 は  $\text{Ca}^{2+}$  存在下プロテイン A に結合しなかった。従って、EW135 上の EW135 同士の結合部位はプロテイン A との結合部位と同じである可能性が考えられる。第二章において、EW135 の第 1 の精製方法では、精製の過程で PEG 沈殿を行うが、EW135 はもともと卵白内では  $\text{Ca}^{2+}$  依存的な EW135 同士の複合体は存在しておらず、この操作により EW135 同士が複合体を結合したものと考えられる。

EW135 は黄色ブドウ球菌以外の細菌にも結合することが他研究機関の研究で明らかにされている (未発表)。EW135 が細菌に結合することは、EW135 が静菌的な抗菌活性により卵の生体防御に働いている可能性を示唆している。今後、抗菌活性を含め、EW135 のより詳細な機能の解明が期待される。

## 第五章 総括

本研究では、ニワトリ卵白中の新規タンパク質 EW135 の構造と機能を明らかにした。

第二章では、EW135 の精製を行った。希釈卵白液を出発材料にして、PEG 沈殿とイオン交換クロマトグラフィーにより EW135 を単離した。この精製の途中で PEG 沈殿を溶かした液を静置すると、新たに沈殿が生じ、これに EDTA を添加すると上清に EW135 が回収された。このことから、EW135 は沈殿物中で卵白成分と結合しており、EDTA により遊離したと考えられた。このことは、沈殿を高濃度の NaCl 水溶液により溶解して得られた上清を用いた ELISA により確かめられた。EW135 を含む当該の上清を  $\text{Ca}^{2+}$  存在下 ELISA プレートにコート後、EDTA 処理すると EW135 が一部遊離した。EW135 が  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に結合している成分が何であるかは、抗 EW135 抗体-Sepharose カラムを用いた実験により明らかになった。上記の上清を  $\text{Ca}^{2+}$  存在下、このカラムに添加し、その後 EDTA を含む緩衝液を流すと EW135 が溶出したことから、EW135 同士が  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に複合体を形成していることが分かった。更に、希釈卵白液を  $\text{Ca}^{2+}$  存在下、抗 EW135 抗体-Sepharose カラムに添加後、EDTA を含む緩衝液を流しても EW135 の溶出が確認されなかったことから、EW135 は卵白中では EW135 同士が  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に複合体を形成して存在しているのではなく、上述の精製過程の PEG 処理やその後の静置の段階で EW135 同士が会合したものと推定された。

第三章では、EW135 の構造解析を行った。精製 EW135 の部分アミノ酸配列の解析により、EW135 がグループ B SRCR ドメインスーパーファミリーに属するタンパク質である可能性が高いことが分かったが、cDNA クローニングを行い、全ア

ミノ酸配列を推定した結果、そのことを実証した。EW135 はグループ B SRCR ドメインのみが 9 回タンデムリピートしたユニークな構造を持つことが分かった。EW135 遺伝子のエクソン-イントロン構造の解析によって、グループ B SRCR ドメインスーパーファミリーに一般的に見られるように、1 つのエクソンが 1 つの SRCR ドメインをコードしていることも明らかになった。RT-PCR の結果から、調べた 11 種類の組織の中では、EW135 は輸卵管のみで発現することが分かった (Fig. 3-16A)。また、RT-PCR の結果からは、EW135 に類似構造のタンパク質が肝臓で発現する可能性も分かった (Fig. 3-16B, C, D)。

第四章では、EW135 の機能について検討した。その結果、EW135 は黄色ブドウ球菌とその構成成分であるプロテイン A に  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に結合することが明らかになった。

オボアルブミンやリゾチームなどのニワトリ卵白タンパク質が単離され構造と機能が研究されていたが、本研究により、単離・同定されたニワトリ卵白タンパク質として新たに EW135 が加わることになる。網羅的なプロテオーム解析により新たなニワトリ卵白タンパク質の存在が報告されてきたが、実際に卵白から新規タンパク質を単離・同定した例は最近では無い。従って、ニワトリの卵白研究における本研究の意義は大きいと考える。また、EW135 がグループ B の SRCR ドメインスーパーファミリーに属する新規タンパク質であることを明らかにしたことも科学的に重要なことと考える。従来、ニワトリにおいて、このスーパーファミリーに属するタンパク質として報告されているのは血清中の 18-B のみであった。従って、EW135 は 2 番目の報告になる。グループ B の SRCR ドメインスーパーファミリーのタンパク質は主に生体防御に働いているが、EW135 にも黄色ブドウ球菌に対する結合性があることから、卵の中でパターン認識分子として生体防御に関与した機能が推定される。18-B はニワトリ血清中でヘモグ

ロビン結合タンパク質として働いている。18-B に生体防御の機能があるかは不明である。本研究から、EW135 に構造類似のタンパク質が肝臓で作られている可能性が分かったが、もしそうであるならば、このタンパク質は血清中に分泌されるであろう。その機能は生体防御の可能性が推定される。今後、この可能性を検討することにより、ニワトリにおけるグループ B の SRCR ドメインスーパーファミリータンパク質の研究が進展することが期待される。以上のように、本研究は免疫や SRCR ドメインスーパーファミリーの研究において新たな展開をもたらすと考える。EW135 が生体防御の機能を有しているならば、医薬品としての応用が期待できる。黄色ブドウ球菌は膿瘍等の様々な表皮感染症や食中毒、肺炎、髄膜炎、敗血症等の起原菌でもある。プロテイン A は黄色ブドウ球菌の細胞壁に存在するタンパク質であり、抗体（免疫グロブリン）の Fc 領域に結合する性質を持ち、これにより抗体の持つ生物活性を抑制することで菌が免疫系によって排除されることを防ぐ働きがある。この研究により、EW135 はプロテイン A と黄色ブドウ球菌との結合性が明らかとなった。EW135 が黄色ブドウ球菌に対して殺菌作用を持っているのかは不明であるが、少なくとも、プロテイン A と結合してプロテイン A が持つ抗体の生物活性を阻害する可能性は考えられる。また黄色ブドウ球菌と結合してその働きを静菌的に阻害する可能性も考えられる。このように、本研究は EW135 の実用的な応用につながることも期待される。



## 参考文献

- Anastasi A, Brown MA, Kembhavi AA, Nicklin MJ, Sayers CA, Sunter DC, Barrett AJ (1983) Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases. Improved purification from egg white, characterization, and detection in chicken serum. *Biochem J* 211:129–138
- Bikker FJ, Ligtenberg AJ, End C, Renner M, Blaich S, Lyer S, Wittig R, van 't Hof W, Veerman EC, Nazmi K, et al. (2004) Bacteria binding by DMBT1/SAG/gp-340 is confined to the VEVLXXXW motif in its scavenger receptor cysteine-rich domains. *J Biol Chem* 279:47699-47703.
- Bikker FJ, Ligtenberg AJ, Nazmi K, Veerman EC, van 't Hof W, Bolscher JG, Poustka A, Nieuw Amerongen AV, and Mollenhauer J (2002) Identification of the bacteria-binding peptide domain on salivary agglutinin (gp-340/DMBT1), a member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily. *J Biol Chem* 277:32109-32115.
- Bou Abdallah F, el Hage Chahine JM (1998) Transferrins, Hen ovotransferrin, interaction with bicarbonate and iron uptake. *Euro J Biochem* 258:1022–1031
- Bowen MA, Bajorath J, Siadak AW, Modrell B, Malacko AR, Marquardt H, Nadler SG, and Aruffo A (1996) The amino-terminal immunoglobulin-like domain of activated leukocyte cell adhesion molecule binds specifically to the membraneproximal scavenger receptor cysteine-rich domain of CD6 with a 1:1 stoichiometry. *J Biol Chem* 271:17390-17396.
- Calvert JG, Slade DE, Shields SL, Jolie R, Mannan RM, Ankenbauer RG, and Welch SK (2007) SK CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J Virol* 81:7371-7379.
- Carlen A, Bratt P, Stenudd C, Olsson J and Stro ¨ mberg N. (1998) Agglutinin and acidic proline-rich protein receptor patterns may modulate bacterial adherence and colonization on tooth surfaces. *JDR*, 77:81-90.
- Crestfield AM, Moore S and Stein WH. (2006) The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and S-carboxymethylated protein. *J Biol Chem*, 54:3901-3910.
- Doi, E., & Kitabatake, N., (1997). Structure and functionality of egg proteins. In: Damodaran, S., & Paraf, A. (Eds). *Food proteins and their applications* (pp. 325-340). New York: Marcel Dekker.
- Ebina T, Tsukada K. (1991) Protease inhibitors prevent the development of human rotavirus induced diarrhea in suckling mice. *Microbio Immunol* 35: 583.

- Edman P. (1950) *Acta Chem. Scand.* 4: 283-293.
- Ericson T and Rundegren J (1983) Characterization of a salivary agglutinin reacting with a serotype c strain of *Streptococcus mutans*. *Eur J Biochem* 133:255-261.
- Fabrieck BO, Machteld M. J. Polfliet, Rianka P. M. Vloet, Roel C. van der Schors, Antoon J. M. Ligtenberg, Weaver LK, Geest C, Matsuno K, Moestrup SK, Christien D. Dijkstra and Timo K. van den Berg. (2007) The macrophage CD163 surface glycoprotein is an erythroblast adhesion receptor. *Blood*, 109: 5223-5229.
- Gebe J, Kiener PA., Ring HZ, Xu Li, Francke U, and Aruffo A. (1997) Molecular Cloning, Mapping to Human Chromosome 1 q21-q23, and Cell Binding Characteristics of Sp  $\alpha$ , a New Member of the Scavenger Receptor Cysteine-rich (SRCR) Family of Proteins. *J BIOL CHEM* 272: 6151-6158
- Giansanti F, Leboffe L, Pitare G, Ippoliti R, Antonini G (2012) Physiological roles of ovotransferrin. *Biochem Biophys Acta* 1820:218-225
- Green NM. (1975) Avidin. *Adv Protein Chem* 29: 85.
- Guerin-Dubiard C, Pasco M, Hietanen A, Quiros del Bosque A, Nau F, Croguennec T (2005) Hen egg white fractionation by ion-exchange chromatography. *J. Chrom A* 1090:58-67
- Guerin-Dubiard C, Pasco M, Molle D, Desert C, Croguennec T, Nau F (2006) Proteomics analysis of hen egg white. *J Agar Food Chem* 54:3901-3910
- Hartshorn KL, White MR, Mogue T, Ligtenberg T, Crouch E, and Holmskov U (2003) Lung and salivary scavenger receptor glycoprotein-340 contribute to the host defense against influenza A viruses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:L1066-L1076.
- Herzig CTA, Waters RW, Baldwin CL, Telfer JC. (2010) Evolution of the CD163 family and its relationship to the bovine gamma delta T cell co-receptor WC1. *BMC Evol Biol* 10:181-199
- Holmskov U, Lawson P, Teisner B, Tormoe I, Willias AC, Morgan C, Koch C, Reid KB, (1997) Isolation and Characterization of a new member of the Scavenger Receptor superfamily, glycoprotein-340 (gp-340), as a lung surfactant protein-D binding molecule. *J Biol Chem* 272:9400-9405
- Ibrahim HR, Aoki T, Pellegrini A. (2002) Strategies for new antimicrobial proteins and peptides: lysozyme and aprotinin as model molecules. *Curr Pharm Design* 8: 671.
- Ibrahim HR. (1997) Insight into the structure-function relationships of ovalbumin, ovotransferrin, and lysozyme. In: Yamamoto T, Juneja LR, Hatta H, Kim M, editors. *Hen Eggs: Their basic and applied science*. New York: CRC press, Inc.

- Iwasaki K, Morimatsu M, Inanami O, Uchida E, Syuto B, Kuwabara M, and Niiyama M. (2001) Isolation, Characterization, and cDNA Cloning of Chicken Turpentine-induced Protein, a New Member of the Scavenger Receptor Cysteine-rich (SRCR) Family of Proteins. *J. BIOL. CHEM*, 276: 9400-9405.
- Kato I, Schrode J, Kohr WJ, Laskowski M Jr(1987) Chicken ovomucoid: determination of its amino acid sequence, determination of the trypsin reactive site, and preparation of all three of its domains. *Biochemistry* 26:193–201
- Koskinen R, Goebel TWF, Tregaskes CA, Young JR, Vainio O(1998) The structure of avian CD5 implies a conserved function. *J Immunol* 169:4943–4950
- Kovacs-Nolan, J., Phillips, M., & Mine, Y. (2005). Advances in the value of eggs and egg components for human health. *J. Agric. Food Chem*, 53(22), 8421-8431.
- Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, S. K. Alex Law & Moestrup SK. ( 2001) Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409: 198-201.
- Kuwata K, Watanabe H, Miyazaki T, Naito M(2004) Pleiotropic role of AIM in Lymphocyte apoptosis and inflammation. *J Clin Exp Hematop* 44:1–9
- Lacono VJ, Mackay BJ, Dirienzo S, Pollock JJ. ( 1980 ) Selective antibacterial properties of lysozyme for oral microorganisms. *IAI* 29: 523.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. (1970) *Nature*, 227: 680-685.
- Law SK, Micklem KJ, Shaw JM, Zhang XP, Dong Y, Willis AC, and Mason DY (1993) A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily. *Eur J Immunol* 23:2320-2325.
- Levy SB, Marshall B(2004) Antibacterial resistance worldwide:causes, challenges and responses. *Nature medicine* doi:10.1038/nm1145
- Ligtenberg TJ, Bikker FJ, Groenink J, Tornøe I, Leth-Larsen R, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV, and Holmskov U (2001) Human salivary agglutinin binds to lung surfactant protein-D and is identical with scavenger receptor protein gp-340. *Biochem J* 359:243-248.
- LOCK, J.L. and BOARD, R.G. (1992) Persistence of contamination of hen' s egg albumen in vitro with Salmonella serotypes. *Epidem. Infect* 108: 389-396.
- Madsen J, Tornøe I, Nielsen O, Lausen M, Krebs I, Mollenhauer J, Kollender G, Poustka A, Skjødt K, and Holmskov U (2003) CRP-ductin, the mouse homologue of gp-340/deleted in malignant brain tumors 1 (DMBT1), binds gram-positive and gram-negative bacteria and interacts with lung surfactant protein D. *Eur J Immunol* 33:2327-2336.

- Madsen M, Møller HJ, Nielsen MJ, Jacobsen C, Graversen JH, Timo van den Berg, and Moestrup SK. (2004) Molecular Characterization of the Haptoglobin-Hemoglobin Receptor CD163. *J. Biol. Chem*, 279:51561-51567.
- Mann K (2007) The chicken egg white proteome. *Proteomics* 7:3558–3568
- Mann K, Mann M. (2011) In-depth analysis of the chicken egg white proteome using an LTQ Orbitrap Velos. *Proteome Sci*, 9:7
- Mann K, Olsen JV, Macek B, Gnad F, Mann M. (2008) Identification of new chicken egg proteins by mass spectrometry-based proteomic analysis. *World poul Sci J* 64:209–216
- Martínez VG, Moestrup SK, Holmskov U, Mollenhauer J, and Lozano F. (2011) The Conserved Scavenger Receptor Cysteine-Rich Superfamily in Therapy and Diagnosis. *Pharmacol Rev* 63:967-1000
- Mine, Y. (1995). Recent advances in the understanding of egg-white protein functionality. *Trends Food Sci Tech*, 6(7), 225-232.
- Mine, Y. (2007) Egg proteins and peptides in human health-chemistry, bioactivity and production. *Curr pharm Design* 13:875-884.
- Miró Julia C, Rosello S, Martínez VG, Fink DR, Escoda-Ferran C, Padilla O, Vázquez-Echeverría C, Espinal-Marin P, Pujades C, García-Pardo A, et al. (2011) Molecular and functional characterization of mouse S5D-SRCRB: a new group B member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily. *J Immunol* 186:2344-2354.
- Miyazaki T, Hirokami Y, Matsuhashi N, Takatsuka H, and Naito M. (1999) Increased Susceptibility of Thymocytes to Apoptosis in Mice Lacking AIM, a Novel Murine Macrophage-derived Soluble Factor Belonging to the Scavenger Receptor Cysteine-rich Domain Superfamily. *J Exp Med*, 413-22
- Molla A, Matsumura Y, Yamamoto T, Okamura R, Maeda H (1987) Pathogenic capacity of proteases *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa* and their suppression by chicken egg white ovomacroglobulin. *Infect Immun* 55:2509–2517
- Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W, Korn B, Hayashi Y, Wilgenbus KK, von Deimling A, and Poustka A (1997) DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumours. *Nat Genet* 17:32-39.
- NAKAI, S. (2000) Molecular modification of egg proteins for functional improvement. *Egg nutrition and biotechnology*, 205-217.
- Nakamura, R., & Doi, E., (2000). Egg processing. In: Nakai, S., & Modler, H. W. Food proteins : processing applications 171-207

- Padilla O, Pujana MA, AL-de la Iglesia , Gimferrer I, Arman M, Vila JM, Places L, Vives J, Estivill X, Lozano F. ( 2002) Cloning of S4D-SRCRB, a new soluble member of the group B scavenger receptor cysteine-rich family (SRCR-SF) mapping to human Chromosome 7q11.23. *Immunogenetics*. 54:621-634.
- Prakobphol A, Xu F, Hoang VM, Larsson T, Bergstrom J, Johansson I, Fra "ngsmyr L, Holmskov U, Leffler H, Nilsson C, et al. (2000) Salivary agglutinin, which binds *Streptococcus mutans* and *Helicobacter pylori*, is the lung scavenger receptor cysteine-rich protein gp-340. *J Biol Chem* 275:39860-39866.
- Resnick D, Chatterton JE, Schwartz K, Slayter H, and Krieger M (1996) Structures of class A macrophage scavenger receptors. Electron microscopic study of flexible, multidomain, fibrous proteins and determination of the disulfide bond pattern of the scavenger receptor cysteine-rich domain. *J Biol Chem* 271:26924-26930.
- Sarrias MR, Grønlund J, Padilla O, Madsen J, Holmskov U, and Lozano F (2004) The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system. *Crit Rev Immunol* 24:1-37.
- Sarrias MR, Rosello ´ S, Sa ´ nchez-Barbero F, Sierra JM, Vila J, Ye ´ lamos J, Vives J, Casals C, and Lozano F (2005) A role for human Sp alpha as a pattern recognition receptor. *J Biol Chem* 280:35391-35398.
- Stevens L (1991) Egg white proteins. *Comp Biochem Phys B* 100:1-9
- Levy SB, Marshall B (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine* doi:10.1038/nm1145
- Sugino H, Nitoda T, Juneja LR. ( 1997) General chemical composition of hen eggs. Hen eggs: *Their basic and applied science*. 13-24.
- Thammasirirak S, Torikata T, Takami K, Murata K, and Araki T. (2002) The primary structure of cassowary (*Casuarius casuarius*) goose type lysozyme. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 66:147-156.
- Tomimatsu Y, Clary JJ, Bartulovich JJ (1996) Physical characterization of ovoinhibitor, a trypsin and chymotrypsin inhibitor from chicken egg white. *Arch Biochem Biophys* 115:536-544
- Tsuge Y, Shimoyamada M, Watanabe K (1996) Differences in hemagglutination inhibition activity against bovine rotavirus and hen Newcastle disease virus based on subunits in hen egg white ovomucin. *Biosci Biotech Biochem* 60:1505-1506
- Valenti P, Antonini G, Von hunolstein C, Visca P, Orsi N and Antonini E. (1983) Studies of the antimicrobial activity of ovotransferrin. *Int J Tissue React.* 5:97-105
- Vera J, Fenutría R, Can˜ adas O, Figueras M, Mota R, Sarrias MR, Williams DL, Casals

- C, Yelamos J, and Lozano F (2009) The CD5 ectodomain interacts with conserved fungal cell wall components and protects from zymosan-induced septic shock-like syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:1506-1511.
- Vocadlo DJ, Davies GJ, Laine R, Withers SG (2001) catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature* 412:835–838
- Wicher KB and Fries E. ( 2006)Haptoglobin, a hemoglobin-binding plasma protein, is present in bony fish and mammals but not in frog and chicken. *PANS*, 103:4163-73.
- Wu Z, Van Ryk D, Davis C, Abrams WR, Chaiken I, Magnani J, and Malamud D(2003) Salivary agglutinin inhibits HIV type 1 infectivity through interaction with viral glycoprotein 120. *AIDS Res Hum Retroviruses* 19:201-209.
- Yoo W, Araki T, Saito J, Kurata Y, Tokita K, Kato K, Matsushita M(2013a) Isolation and Characterization of a Novel Chicken Egg White Protein with Scavenger Receptor Cystein-rich Domain. *J. Poul. Sci* 50:159-163
- Yoo W, Nakamura T, Asanuma H, Matsushita M(2013b) Molecular cloning, genomic structure, and tissue distribution of EW135, A novel chicken egg white protein with group B scavenger receptor cystein-rich domain. *Immunogenetics*. 65:785-793
- 中村 良 編集(2001) 卵の科学. 朝倉書店(株)

## 謝辞

私を長い間、忍耐深く、指導してくださった指導教授、松下先生に心からお礼を申し上げます。

本研究を行うにあたり、下記の先生方、施設に大変お世話になりました。ここに謹んで深謝いたします。

東海大学農学部バイオサイエンス学科・荒木朋洋教授、東京大学・野中 勝教授、国立感染症研究所・浅沼秀樹室長。女子栄養大学・<sup>敬</sup>高橋信二教授。東海大学生命科学統合支援センター。

また松下研究室の皆様にも感謝の心を伝えたいと思います。

奨学金などで支えてくださった東海大学、ロータリークラブの皆様にもお礼を申し上げます。

長いあいだ応援してくれた家族の方々にも感謝します。

初めから最後まですべてのことを導いて支えてくださった私の主イエス・キリストに感謝と栄光を捧げます。