

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19580395

研究課題名（和文）生物種特異的分子識別機構に関する研究

研究課題名（英文）Studies on the Molecular Mechanism of Species-specific Recognition in Biological Diversity

研究代表者

谷 史人 (TANI FUMITO)

京都大学・地球環境学堂・准教授

研究者番号：70212040

研究成果の概要（和文）：ストレスタンパク質 (HSP) の C 末端可変領域を識別する膜受容体を株化細胞 P388D1 から同定したところ、分子サイズ 130～300kDa にかけて 6 種類の受容体候補を見出した。生細胞における Hsp70 の C 末端領域の役割を検討したところ、マウス肺癌カルシノーマ LL/2 細胞では非致死的な温熱処置により細胞表面に提示すること、CD11b, CD11c, NK1.1 陽性を示す自然免疫系にかかわる免疫細胞が結合すること、ナイーブ T 細胞の制御性 T 細胞への分化にかかわることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Murine lymphoid neoplastic P388D1 cells were found to have six receptor candidates with the molecular sizes in the range from 130 to 300 kDa which discriminate species-specificity among the C-terminal variable regions of heat shock protein 70 (HSP70). We revealed that species-specific diversity contributes in the cell-surface presentation on murine LL/2 lung carcinoma upon non-lethal heat shock, in the binding to CD11b-, CD11c-, or NK1.1-positive innate immune cells, and also in the differentiation to regulatory T cells from naïve T cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：分子情報、ストレスタンパク質、多様性識別、種特異性、免疫生物学

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の構造を考えたとき、生命維持に必要な不可欠な普遍領域は機能的に共通な立体構造やアミノ酸配列として高度に保存

されている。特に、生物活性を発現する部位はモチーフとして定義され、タンパク質の結晶構造からモチーフを網羅的に見出すことによって構造を分類することが世界的に盛

んに行われている。しかしその一方で、局所的に多様化した可変領域の生物学的意義について明らかにしようとする研究はあまり顧みられていない。

可変領域の多様性は、遺伝子上における中立的な変異の導入により生じる。生物はさまざまな環境に適応するために、遺伝子重複機構を巧みに駆使して多くの機能を獲得する。それぞれの生物は、それらの共存関係において互いに相互作用するが、多様な生物応答のなかでは生物種に特徴的なものをシグナルとして相互作用するであろう。このような観点から、各タンパク質の生物機能に直接関係しないところに蓄積した変異はそれぞれの生物種において特徴的なものとなり、それらが進化の流れの中で多様性が選択されていくのではないか、という作業仮説を検証する。

2. 研究の目的

生物がもつタンパク質や核酸のポリマーの構造には、すべての生物種において普遍的に存在する部分（普遍領域）と一見不必要に思える多様化した部分（可変領域）とがある。申請者は、「この可変領域には本来その生物固有の意味づけがなされ得る可能性が非常に高く、生物間における応答の多様性を生み出す源となっている」という仮説を立て、その証拠や反証を見出すことによって生物種特異的な分子応答識別機構の概念を提唱し確立することを目的としている。

そこで、ストレスタンパク質70（熱ショックタンパク質:HSP70）の構造的特徴に着目し、HSP70に存在する可変領域の生物学的意味を生物間における生体防御の観点から考察する。本研究では以下の項目について取り組む。

- (1) HSP70のC末端可変領域を識別できる株化細胞P388D1の細胞表面に存在するHSP70多様性識別受容体を同定する。
- (2) この種特異性を識別する受容体をもつ細胞の種類や分布などを調べ、生体防御における分子識別機構を調べる。
- (3) 上記の仮説を核酸のポリマーにも拡張できるか否かを考え、共生菌間あるいは共生菌と病原菌間で異なる種特異的な核酸配列を選択し、核酸による生物種特異的な細胞応答を調べる。

3. 研究の方法

- (1) HSP70多様性識別受容体の部分精製とモノクローナル抗体の作製：

細胞株P388D1を低張液により破碎し、超遠心分離により細胞膜画分を回収した。可溶化剤オクチルグルコシドを含む緩衝液で膜画分を処理し、可溶化膜成分の粗画分を得た。固定化Hsp72カラムに可溶化上清画分を供与し、Hsp72に結合した画分を塩溶出した。この溶出画分をマウスに免疫し、脾細胞を採取後、定

法に従ってミエローマと融合させ、可溶化膜成分に対するモノクローナル抗体を作製した。ハイブリドーマのスクリーニングは、P388D1細胞へのマウス Hsp72 の結合阻害を指標にフローサイトメーターを用いて行った。

- (2) Photo-affinity labeling による膜受容体の同定：

P388D1細胞と結合するマウス Hsp72 を光反応性架橋剤 SBED で修飾した。SBED-Hsp72 を P388D1 細胞と反応させた後、UV 照射を行い HSP-DDR と Hsp72 を光架橋した。架橋剤 SBED 分子内にはビオチンが存在しており、光架橋後、膜受容体をビオチンで標識できる。処理した細胞を可溶化し、抗ビオチン抗体でビオチン標識された膜受容体を免疫沈降した。SDS-PAGE とウェスタンブロッティング法を用いて標識された膜受容体を分離した。

- (3) マウス肺癌カルシノーマ LL/2 細胞における Hsp72 の表面発現：

単層培養したマウス肺癌カルシノーマ LL/2 細胞を 42°C で 2 時間の温熱処置を施した。生細胞の割合は、トリパンブルー染色ならびにヨウ化プロビジウム染色により評価した。細胞内における誘導型 Hsp72 の発現の増減はウェスタンブロッティングにより比較した。生細胞における Hsp72 およびその N 末端や C 末端領域の細胞表面への提示は、細胞表面ビオチン化法ならびにモノクローナル抗体を用いたフローサイトメーターにより解析した。

- (4) HSP70 の C 末端フラグメントを結合する免疫細胞の解析：

マウス C57BL/6 の脾細胞懸濁液を調製した。また、4%チオグリコール酸をマウスの腹腔内に注入し、4日後に腹腔マクロファージを回収した。

全長の Hsp72、その C 末端を順次欠失させた変異体は、大腸菌において発現させた組換えタンパク質を用いた。C 末端のフレキシブルな領域を欠失した変異体 d615、ヘリックス C 以降の C 末端領域を欠失させた変異体 d562、ヘリックス B の途中の基質結合ドメインまでを含む変異体 d543、ヘリックス A 以降の C 末端領域を欠失させた変異体 d510、N 末端のスクレオチド結合ドメインのみを含む変異体 d384 を作製した。各タンパク質を精製した後、ビオチン標識したものをを用いた。

50x10⁴ 個の細胞に対して各種ビオチン化タンパク質を反応させ、間接蛍光法にてフローサイトメーターにより結合性を解析した。

- (5) 腸間膜リンパ節のナイーブ T 細胞に対する分化誘導の解析：

C57BL/6 マウスの腸間膜リンパ節を摘出し、

コラゲナーゼと DNaseI で消化した後、細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液を磁気細胞分離システム (MACS) に供し、CD4+ CD62L+ T 細胞をナイーブ T 細胞として精製した。

同様に調製した細胞懸濁液に抗 CD3 抗体磁気ビーズを添加し、MACS により T 細胞群を除去し、その後、CD11c+ならびに PDCA1+樹状細胞を MACS にて抗原提示細胞として調製した。

ナイーブ T 細胞と抗原提示細胞を細胞数において 10:1 の比率で混合し、IL-2 と各種のマウス HSP 存在下にて 6 日間培養した。培養後、転写因子 Foxp3 の発現の有無を指標に制御性 T 細胞 (Treg) の誘導をフローサイトメーターにより解析した。

4. 研究成果

(1) HSP70 多様性識別受容体に対するモノクローナル抗体の作製 :

固定化マウス Hsp72 カラムに結合した可溶性膜画分に対するモノクローナル抗体を作製することを試みたが、特異的な抗体の取得に成功しなかった。得られた抗体の P388D1 細胞に対する特異性は、Hsp72 を結合しない株化細胞 P815 や EL4 には結合しないこと、および、マウス Hsp72 の C 末端と高い相同性を示すハウレンソウ Hsc70 共存下で結合が部分的に阻害されることを指標に検討した。これは、用いた可溶性膜画分における目的とする膜受容体が極微量しか存在しなかったことが原因と考えられ、目的物の部分的な濃縮法を検討する必要があったと考えられた。

(2) Photo-affinity labeling による膜受容体の同定 :

マウス Hsp72 (MO) と大腸菌 DnaK (EC) をそれぞれ光反応性架橋剤 SBED で修飾したリガンドを P388D1 細胞と反応させて解析した結果、MO に対してのみ検出されたバンドを目的の候補分子と見なして、分子サイズ 130~300kDa にかけて 6 種類のタンパク質が得られた (図1)。

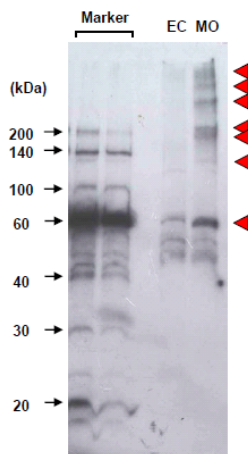


図1 HSP70のC末端可変領域を認識するP388D1細胞表面上の候補受容体タンパク質(赤矢印)

ビオチン標識された候補受容体を可溶化剤中においてストレプトアビジン支持体で回収し、そのプロテオミクス解析を試みたが有望な情報は得られなかった。回収量に問題があったと考えている。

(3) マウス肺癌カルシノーマ LL/2 細胞における Hsp72 の表面発現 :

マウス肺癌カルシノーマ LL/2 細胞を 42°C で温熱処理しても 3 時間までの処理では細胞の生存率は 98% 以上であった。2~3 時間の温熱処理を施すと、細胞内に Hsp72 が顕著に誘導された。また、マウス LL/2 細胞を 42°C で 2 時間の温熱処理を施したところ、その 31.5% が細胞表面に Hsp72 を提示していた。また、温熱処理された LL/2 細胞は、Hsp72 の 504~617 アミノ酸残基を認識する抗体 MA-006 と特異的に反応したが、122~264 残基を認識する抗体 MA-007 とは反応しなかったことから、この提示には Hsp72 の C 末端が関係していることを明らかにした (図2)。

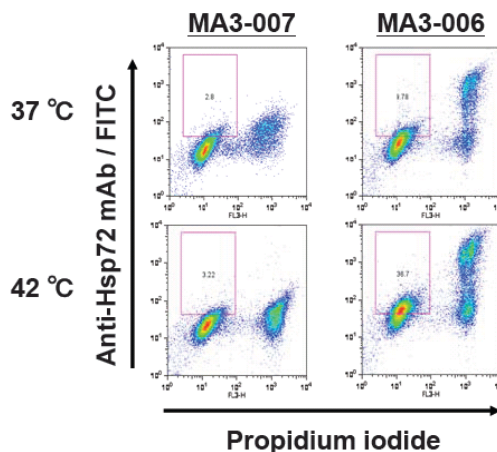


図2 マウス LL/2 細胞の表面に提示される Hsp72 の C 末端領域

抗体 MA3-007 と MA-006 は、各々 Hsp72 のアミノ酸残基 122-264 と 504-617 と反応する。

(4) HSP70 の C 末端フラグメントを結合する免疫細胞の解析 :

リガンドとする HSP には、大腸菌にて組換えタンパク質として調製したものを用いた。全長の Hsp72、C 末端のフレキシブルな領域を欠失した変異体 d615、ヘリックス C 以降の C 末端領域を欠失させた変異体 d562、ヘリックス B の途中の基質結合ドメインまでを含む変異体 d543、ヘリックス A 以降の C 末端領域を欠失させた変異体 d510、N 末端のヌクレオチド結合ドメインのみを含む変異体 d384 の各種リガンドの構造は、抗 Hsp70 モノクローナル抗体との反応性で確認した。

Hsp72 の組換え体の脾細胞との結合性を調べたところ、それぞれ脾細胞の約 3.1%、2.2%、9.5%を占める CD11b, CD11c, NK1.1 陽性を示す自然免疫系にかかわる細胞群と結合することが判明した。また、脾細胞の 28.7%の MHC クラス II 陽性の細胞群とも強い結合を示し、B 細胞の多くが Hsp72 を結合することがわかった。

HSP70のC末端領域の欠失が結合に及ぼす影響について調べた。CD11b, CD11c, NK1.1陽性を示すマクロファージ、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞ともに同じ傾向を示した。対象とする細胞群への結合をGeometric Mean Fluorescence Intensity (GMFI)で比較すると、全長のHsp72と比べて、C末端領域の α ヘリックスCを欠失した変異体が最も強い結合を示した。さらに α ヘリックスAとBを欠失した変異体ではほとんど結合が認められなかった。それ故、これらの結果は、株化細胞のみならず本来の生体防御系においてHsp72のC末端領域が生物間のシグナル授受に寄与することを示している(図3)。

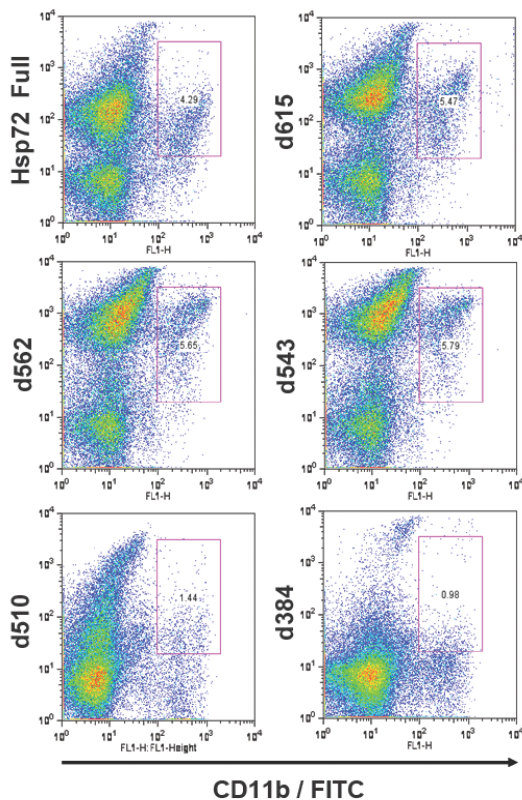


図3 脾細胞中のCD11b+細胞群との結合に及ぼすHsp72のC末端領域の影響

(5) 腸間膜リンパ節のナイーブ T 細胞に対する HSP70 の分化誘導能:

哺乳類の消化管内では、自己由来のものだけでなく腸内細菌などの異種生物の抗原の多くに曝されている。このような抗原に対処

するための粘膜免疫系を制御するリンパ球である制御性 T 細胞の形成に及ぼす HSP の作用について検討した。C57BL/6 マウスの腸間膜リンパ節から調製した CD4+ CD62L+ T 細胞をナイーブ T 細胞を、CD11c+ならびに PDCA1+ 樹状細胞と混合し、各種の HSP 存在下にて共培養した。培養後、転写因子 Foxp3 の発現を解析したところ、内因性のマウス Hsp72 存在下では 0.9%の T 細胞しか Foxp3 の発現誘導が観察されなかったのに対して、外因性の大腸菌 DnaK 存在下では 1.5%の T 細胞に発現が観察された。この分化誘導における差異は、HSP70 だけでなく、同様に C 末端領域において多様性を示す HSP60 においても観察されることを見出している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Fumito Tani, Michiko Ohno, Yuichi Furukawa, Masami Sakamoto, Seiji Masuda, Naofumi Kitabatake, “Surface expression of a C-terminal α -helix region in heat shock protein 72 on murine LL/2 lung carcinoma can be recognized by innate immune sentinels.” *Mol. Immunol.* **46**, 1326-1339 (2009), 査読有
- ② Michiko Ohno, Naofumi Kitabatake, Fumito Tani, “Functional region of mouse heat shock protein 72 for its binding to lymphoid neoplastic P388D1 cells.” *Mol. Immunol.* **44**, 2344-2354 (2007), 査読有
- ③ Yufeng Tao, Masayo Nomura, Naofumi Kitabatake, Fumito Tani, “Mouse CD40-transfected cell lines cannot exhibit the binding and RANTES-stimulating activity of exogenous heat shock protein 70.” *Mol. Immunol.* **44**, 1262-1273 (2007), 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 大植隆司、谷 史人、北島直文:「樹状細胞の形成と機能維持に及ぼす CpG オリゴヌクレオチドの影響」日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京大学 (東京都)
- ② 古川祐一、橋本恵以、中元昌広、大植隆司、谷 史人、北島直文:「腸間膜リンパ節の T 細胞増殖に及ぼすストレスタンパク質の影響」日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京大学 (東京都)
- ③ Fumito Tani, Michiko Ohno, Yuichi

Furukawa, Masami Sakamoto, Seiji Masuda, Naofumi Kitabatake, "Surface expression of a C-terminal α -helix region in heat shock protein 72 on murine LL/2 lung carcinoma can be recognized by innate immune sentinels.", The 1st International Kishimoto Foundation Symposium, Immune Regulation: Present and Future, 25 May 2009, Osaka International Convention Center (Osaka)

- ④ 中元昌広、大植隆司、谷 史人、北島直文：「免疫細胞の局在性が熱ショックタンパク質の識別に及ぼす影響」日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 28 日、マリンメッセ福岡（福岡市）
- ⑤ 大植隆司、谷 史人、北島直文：「核酸成分 CpG-ODN が樹状細胞に及ぼす影響」第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 10 日、神戸国際会議場（神戸市）
- ⑥ 谷 史人、西川 慧、山田祐香理、大植隆司、北島直文：「抗原提示細胞による熱ショックタンパク質の多様性識別」第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 10 日、神戸国際会議場（神戸市）
- ⑦ Ryuji Ohue, Fumito Tani, Naofumi Kitabatake, "Effects of CpG-oligodeoxynucleotides on dendritic cell development.", Joint Symposium of the 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids & the 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 12 September 2008, Kyoto University (Kyoto)
- ⑧ 古川祐一、谷 史人、北島直文：「マウス消化管内における腸内細菌由来熱ショックタンパク質 60 様物質の解析」日本食品科学工学会第 55 回大会、2008 年 9 月 7 日、京都大学（京都市）
- ⑨ 山田祐香理、谷 史人、北島直文：「食材中に存在する生体調節因子熱ショックタンパク質の挙動」日本食品科学工学会第 55 回大会、2008 年 9 月 7 日、京都大学（京都市）
- ⑩ 谷 史人：「食品の生理的機能への統合的アプローチ」日本食品科学工学会第 55 回大会、2008 年 9 月 5 日、京都大学（京都市）
- ⑪ 谷 史人、太野路子、北島直文：「マウス腫瘍細胞 LL/2 の表面に提示された熱ショックタンパク質 72 の特徴」日本農芸化学会 2008 年度大会、2008 年 3 月 27 日、名城大学（名古屋市）

〔図書〕（計 1 件）

- ① 谷 史人：地球環境学へのアプローチ 第 7 章「環境と食－生体防御からみた食の環境－」（丸善株式会社）2008 年、97-111.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷 史人 (TANI FUMITO)
京都大学・地球環境学堂・准教授
研究者番号：70212040