

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月4日現在

機関番号	12601
研究種目	挑戦的萌芽研究
研究期間	2011～2012
課題番号	23656516
研究課題名（和文）	増殖シグナルを指標とした動物細胞での蛋白質間相互作用のスクリーニング
研究課題名（英文）	Screening of protein-protein interactions based on a growth signal of mammalian cells
研究代表者	
	河原 正浩（KAWAHARA MASAHIRO）
	東京大学・大学院工学系研究科・講師
	研究者番号：50345097

研究成果の概要（和文）：本研究では、生きた動物細胞内での簡便な蛋白質間相互作用検出法の開発を目指した。既往の手法で多く用いられている、蛍光や発光を指標とした蛋白質間相互作用検出法の代わりに、細胞増殖の有無で蛋白質間相互作用を検出する新規手法を開発した。本研究の手法を用いて、相互作用することが知られている蛋白質を用いて実験を行った結果、蛋白質間相互作用依存的に細胞増殖を誘導することに成功した。

研究成果の概要（英文）： In this study, we aimed to develop a method to easily detect protein-protein interactions in live mammalian cells. Instead of conventional methods employing fluorescence or luminescence as a read-out, we developed a novel method to detect protein-protein interactions based on cell growth. Using known interacting protein pairs, we successfully induced cell growth dependent on the protein-protein interactions.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：細胞工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：蛋白質、細胞・組織、シグナル伝達、生体機能利用

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内で蛋白質は生体にとって不可欠な様々な機能を果たしており、それらの機能の多くが他の蛋白質との相互作用によって制御されている。そのため、疾患のメカニズムの解明や創薬ターゲットの選定などにおいて、注目する蛋白質が他のどの蛋白質と相互作用するのかという情報が重要となる。

現在、細胞内の蛋白質間相互作用を網羅的に調べる手法として、プルダウンと質量分析を組み合わせた系が広く用いられているが、

生きた細胞内での相互作用を検出できないという限界がある。一方、生きた細胞内での相互作用検出系としては、真核細胞の細胞内環境において相互作用を評価できるイーストツーハイブリッド法が広く用いられている。この手法では、相互作用の有無を調べたい二つの蛋白質をそれぞれ転写因子の DNA 結合ドメインと活性化ドメインと融合して酵母に共発現させる。相互作用に依存してレポーター遺伝子が発現するので、これを検出するが、得られる結果に偽陽性が多いことが問題とな

っている。また、分割した蛍光蛋白質や酵素、あるいは2種類の蛍光蛋白質の蛍光エネルギー移動 (FRET) を利用する系も開発されてきたが、実際のターゲット分子間の相互作用に起因しないバックグラウンドが顕著に多いため、スクリーニング結果に偽陽性が多数含まれてしまうことが問題である。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、蛍光・発光・酵素活性を指標として蛋白質間相互作用を検出する既往の手法の代わりに、細胞増殖の有無で蛋白質間相互作用を検出する新規手法を開発する。具体的には、二量体を形成して増殖シグナルを伝達するサイトカイン受容体の細胞内ドメインと、相互作用を検出したい蛋白質とを連結したキメラ受容体の発現ベクターを動物細胞に遺伝子導入して発現させる。相互作用が存在するときにはキメラ受容体は二量体を形成して増殖シグナルを伝達するので、細胞増殖の有無によって相互作用を検出できる。

## 3. 研究の方法

### (1) 同種の蛋白質間相互作用検出系の構築

小分子 AP20187 依存的にホモ二量体形成する FKBP<sub>F36V</sub> をモデル蛋白質として用い、幹細胞因子受容体 c-Kit の細胞内ドメインと連結したキメラ受容体を構築した。この際、FKBP<sub>F36V</sub> を c-Kit の N 末端側または C 末端側に配置したキメラ受容体、およびそれぞれに対して FKBP<sub>F36V</sub> と c-Kit の間にフレキシブルリンカー (G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub> を挿入したキメラ受容体を構築した。各キメラ受容体コンストラクトに対応する遺伝子を、抗生物質耐性マーカーを有するベクターに組み込み、インターロイキン 3 (IL-3) 依存性マウス pro-B 細胞株 Ba/F3 へ導入し、細胞質で発現させた。遺伝子導入細胞を抗生物質添加培地で選択培養した。得られた細胞について、キメラ受容体の発現確認をウエスタンブロッティングにより行った。

また、得られた細胞を、IL-3 を除去し種々の濃度の AP20187 を添加した培地中で数日培養後、細胞数を計測することで蛋白質間相互作用依存的な細胞増殖が生じているか否かを確認した。

### (2) 異種の蛋白質間相互作用検出系の構築

小分子 AP21967 依存的にヘテロ二量体形成する FKBP と FRB 変異体をモデル蛋白質として用い、幹細胞因子受容体 c-Kit の細胞内ドメインと連結したキメラ受容体を構築した。この際、FKBP と FRB 変異体は c-Kit の N 末端側にフレキシブルリンカー (G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub> を介して配置した。さらに、同種の蛋白質同士の相互作用を検出することを避ける目的で、キメラ受容体の一方の c-Kit 細胞内ドメインにシグナル伝達分子の結合を阻害する変異 (5YF) を加えた。各キメラ受容体コンストラクトに対応する遺伝子を、抗生物質耐性マーカーを有するベクターに組み込み、インターロイキン 3

(IL-3) 依存性マウス pro-B 細胞株 Ba/F3 へ導入し、細胞質で発現させた。遺伝子導入細胞を抗生物質添加培地で選択培養した。得られた細胞について、キメラ受容体の発現確認をウエスタンブロッティングにより行った。また、得られた細胞を、IL-3 を除去し種々の濃度の AP21967 を添加した培地中で数日培養後、細胞数を計測することで蛋白質間相互作用依存的な細胞増殖が生じているか否かを確認した。

## 4. 研究成果

### (1) 同種の蛋白質間相互作用検出系の構築

各キメラ受容体コンストラクトを導入した抗生物質耐性細胞についてウエスタンブロッティングを行った結果、目的のキメラ受容体が発現していることが分かった。そこでこれらの細胞について増殖アッセイを行ったところ、フレキシブルリンカーを挿入していないコンストラクトでは一部の細胞しか増殖しな

かったのに対し、フレキシブルリンカーを挿入したコンストラクトでは顕著な AP20187 依存的な増殖を示した。なお、FKBP<sub>F36V</sub> を c-Kit のどちらの側に配置しても、同様の結果が得られた (Fig. 1)。

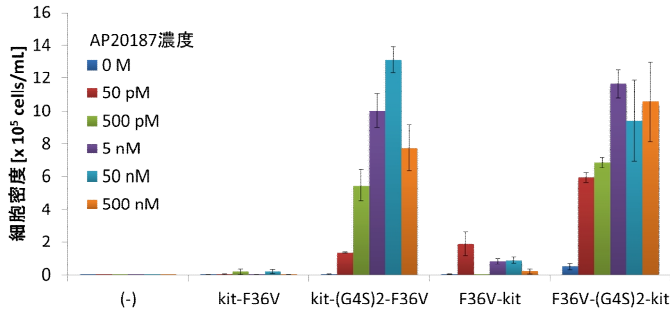


Fig. 1 同種の蛋白質間相互作用による増殖誘導結果

## (2) 異種の蛋白質間相互作用検出系の構築

各キメラ受容体コンストラクトを導入した抗生物質耐性細胞についてウエスタンブロッティングを行った結果、目的のキメラ受容体が発現していることが分かった。そこでこれらの細胞について増殖アッセイを行ったところ、シグナル伝達分子結合阻害変異を c-Kit に導入したコンストラクト (5YF) では、ホモ二量体の相互作用では増殖シグナルが抑えられ、変異を導入していない c-Kit とのヘテロ二量体が誘導された場合のみ増殖シグナル伝達が生じた (Fig. 2)。

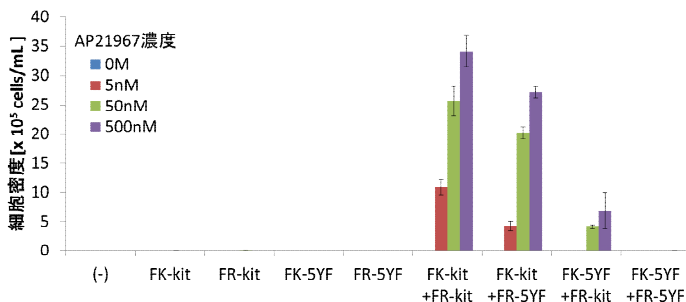


Fig. 2 異種の蛋白質間相互作用による増殖誘導結果

以上より、動物細胞の細胞質において、同種および異種蛋白質間相互作用を細胞増殖を指標として検出する系の開発に成功した。

## 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 7 件)

1. Nakabayashi, H., Kawahara, M., Tanaka, K., and Nagamune, T. "Construction of antibody/insulin receptor chimera for growth induction of mammalian cells." *Cytotechnology*, 2013, doi: 10.1007/s10616-013-9571-5. (査読あり)
2. Tone, Y., Kawahara, M., Kawaguchi, D., Ueda, H., and Nagamune, T. "Death signalbody: Inducing conditional cell death in response to a specific antigen." *Hum. Gene Ther. Methods*, 2013, doi: 10.1089/hgtb.2012.147. (査読あり)
3. Inagaki, T., Yoshimi, T., Kobayashi, S., Kawahara, M., and Nagamune, T. "Analysis of cellular phenotype during in vitro immunization of murine splenocytes for generating antigen-specific immunoglobulin." *J. Biosci. Bioeng.* **115**, 339-345, 2013, doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.10.008 (査読あり)
4. Kawahara, M., and Nagamune, T. "Engineering of mammalian cell membrane proteins." *Curr. Opin. Chem. Eng.* **1**, 411-417, 2012, doi: 10.1016/j.coche.2012.05.002. (査読あり)
5. Saka, K., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. "Activation of target signal transducers utilizing chimeric receptors with signaling-molecule binding motifs." *Biotechnol. Bioeng.* **109**, 1528-1537, 2012, doi: 10.1002/bit.24421 (査読あり)
6. Kaneko, E., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. "Growth control of genetically modified cells using an antibody/c-Kit chimera." *J. Biosci. Bioeng.* **113**, 641-646, 2012, doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.12.005. (査読あり)

7. Kawahara, M., Chen, J., Sogo, T., Teng, J., Otsu, M., Onodera, M., Nakauchi, H., Ueda, H. and Nagamune, T. "Growth promotion of genetically modified hematopoietic progenitors using an antibody/c-Mpl chimera." *Cytokine* **55**, 402-408, 2011, doi: 10.1016/j.cyto.2011.05.024. (査読あり)

[学会発表] (計 29 件)

1. 河原正造, 戸根悠一郎, 上田宏, 長棟輝行 “抗原依存的に細胞死シグナルを伝達する抗体/受容体キメラの創製” 第 85 回生化学会大会、2012.12.16、福岡国際会議場
2. 本田信吾, 河原正造, 長棟輝行 “キメラ受容体を用いたインフラマソーム活性化因子の探索” 第 85 回生化学会大会、2012.12.16、福岡国際会議場
3. MA YIDAN, 河原正造, 長棟輝行 “接着斑キナーゼを利用したタンパク質間相互作用検出系の構築” 第 85 回生化学会大会、2012.12.16、福岡国際会議場
4. Masahiro Kawahara, Yuichiro Tone, Daichi Kawaguchi, Hiroshi Ueda and Teruyuki Nagamune “A novel suicide switch utilizing an antigen-antibody system” JAACT2012, 2012.11.28, 名古屋国際会議場
5. Hideto Nakabayashi, Masahiro Kawahara, Hiroshi Ueda, Teruyuki Nagamune “Construction of Antibody/insulin Receptor Chimera for Mimicking Insulin Receptor Signaling” JAACT2012, 2012.11.28, 名古屋国際会議場
6. Masahiro Kawahara, Koichiro Saka, Hiroshi Ueda and Teruyuki Nagamune “Design of chimeric receptors to activate target signaling molecules in an antigen-dependent manner” YABEC2012, 2012.10.27, 徳島大学
7. 戸根 悠一郎,河原正造, 上田 宏, 長棟輝行 “抗体-Fas キメラを用いたがん細胞の細胞死誘導” 第 64 回日本生物工学会大会、2012.10.25、神戸国際会議場
8. 李 松熹, 河原正造, 加来 義浩, 井上 智, 上田 宏, 長棟 輝行 “細胞増殖を指標とした抗狂犬病ウイルス P 蛋白質細胞内抗体の直接選択” 第 64 回日本生物工学会大会、2012.10.25、神戸国際会議場
9. 吉田理恵, 河原正造, 上田 宏, 長棟輝行 “キメラ受容体を用いた抗フルオレセイン一本鎖抗体のライブラリー選択” 第 64 回日本生物工学会大会、2012.10.25、神戸国際会議場
10. 坂 晃一郎, 河原正造, 上田 宏, 長棟輝行 “受容体の再構成を通じた細胞内シグナル伝達機構の解明” 第 64 回日本生物工学会大会、2012.10.25、神戸国際会議場
11. 河原正造, 坂 晃一郎, 上田 宏, 長棟輝行 “細胞内シグナル伝達のカスタム設計” 化学工学会 第 44 回秋季大会、2012.9.20、東北大学
12. 間部 悟, 河原正造, 長棟 輝行 “タンパク質間相互作用検出を目指したキメラ受容体の構築” 化学工学会 第 44 回秋季大会、2012.9.19、東北大学
13. グエン トウイズオン, 河原正造, 加来 義浩, 井上 智, 上田 宏, 長棟 輝行 “増殖型と死誘導型キメラ受容体を組み合わせた細胞内抗体選択法の開発” 化学工学会 第 44 回秋季大会、2012.9.19、東北大学
14. 高須賀 仁・河原正造・グエン トウイズオン・加来 義浩・井上 智・上田 宏・長棟 輝行 “増殖誘導型キメラ受容体を用いたイントラボディー選択法の開発” 化学工学会 第 77 年会、工学院大学、2012.3.16
15. 寺西 佑理・河原正造・藤原 範子・上田 宏・鈴木 敬一郎・長棟 輝行 “細胞増

- 殖活性を指標とした抗体選択法” 化学工学会 第 77 年会、工学院大学、2012.3.16
16. 吉田 理恵・河原正造・上田 宏・長棟輝行 “抗体ライブラリー選択を指向したキメラ受容体構造の最適化” 化学工学会 第 77 年会、工学院大学、2012.3.16
17. 戸根 悠一郎・河原正造・上田 宏・長棟輝行 “キメラ受容体を用いた細胞の自殺スイッチの開発” 化学工学会 第 77 年会、工学院大学、2012.3.16
18. 中林秀人・河原正造・大津真・小野寺雅史・中内啓光・上田宏・長棟輝行 “抗体/受容体キメラを用いた胚性幹細胞の効率的分化法の開発” 化学工学会 第 77 年会、工学院大学、2012.3.16
19. 李 松熹・河原正造・加来 義浩・井上智・上田 宏・長棟 輝行 “キメラ受容体を用いた抗狂犬病ウイルス P 蛋白質抗体の細胞内選択” 化学工学会 第 77 年会、工学院大学、2012.3.16
20. 本田 信吾・河原正造・長棟 輝行 “キメラ受容体を用いたインフラマソーム活性化因子の探索” 化学工学会 第 77 年会、工学院大学、2012.3.15
21. 坂 晃一郎・河原正造・上田 宏・長棟輝行 “蛋白質結合モチーフを利用した細胞内シグナル伝達分子の活性化制御” 化学工学会 第 77 年会、工学院大学、2012.3.15
22. 坂 晃一郎, 河原正造, 上田宏, 長棟輝行 “シグナル伝達蛋白質結合モチーフを人工的に配置した新規受容体の構築 ”第 63 回日本生物工学会大会、東京農工大学、2011.9.26
23. 高須賀 仁, 鈴木菜央, 河原正造, 加来義浩, 井上智, 上田宏, 長棟輝行 “キメラ受容体を用いた intrabody 選択法の開発” 第 63 回日本生物工学会大会、東京農工大学、2011.9.26
24. 本田信吾、河原正造、長棟輝行 “キメラ受容体を用いたオリゴマー検出ツールの開発” 化学工学会 第 43 回秋季大会、名古屋工業大学、2011.9.14
25. 中林秀人・河原正造・大津真・小野寺雅史・中内啓光・上田宏・長棟輝行 “抗体/受容体キメラによる胚性幹細胞の運命制御” 化学工学会 第 43 回秋季大会、名古屋工業大学、2011.9.14
26. Masahiro Kawahara, Jianhong Chen, Takahiro Sogo, Jinying Teng, Makoto Otsu, Masafumi Onodera, Hiromitsu Nakauchi, Hiroshi Ueda, Teruyuki Nagamune “Receptor for expansion of genetically modified hematopoietic stem cells” Asian Congress on Biotechnology (ACB-2011), 2011.5.13, Shanghai (中国)

他 3 件

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

河原 正浩 (KAWAHARA MASAHIRO)  
 東京大学・大学院工学系研究科・講師  
 研究者番号：50345097

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：