

平成 21 年 6 月 3 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18570120

研究課題名（和文） バキュロウイルスディスプレイ法を用いた免疫担当細胞膜蛋白質間相互作用の解析

研究課題名（英文） Analysis of interaction of membrane proteins on immune cells by baculoviral display

研究代表者

先浜 俊子（SAKIHAMA TOSHIKO）

東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授

研究者番号：70187061

研究成果の概要：

近年、バキュロウイルス感染昆虫細胞培養上清中に産生される発芽バキュロウイルス（BV）上に種々の外来性膜蛋白質が発現することが明らかになっている。このバキュロウイルスディスプレイ法は、ヒトを始めとする真核生物の膜蛋白質およびその複合体を、生理機能を保持した状態で発現させることができるという点で、優れたシステムである。今回、この系を用いて、受容体とそのリガンドの関係にある膜蛋白質間の相互作用検出法を開発した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	630,000	4,230,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：免疫生化学、蛋白質相互作用

1. 研究開始当初の背景

膜蛋白質は刺激応答、細胞間相互作用などの重要な機能を担っており、様々な応用を考える上で最も重要な蛋白質の一群である。免疫系においてはB細胞による抗体産生、T細胞によるサイトカイン産生、キラー活性の発現などの諸現象が、ヘルパーT細胞とB細胞、ヘル

パーT細胞と樹状細胞、キラーT細胞とターゲット細胞（腫瘍細胞、ウイルス感染細胞など）などの、細胞間相互作用によって制御されている。細胞間相互作用の実体は、多様な細胞膜表面蛋白質の相互作用である。このような膜蛋白質間相互作用の解析、及びその相互作

用をモジュレートするシステムの開発に関する研究は、免疫系の基礎的研究に有効であるだけでなく、自己免疫病や癌の治療、移植臓器に対する拒絶反応の抑制などに貢献できると期待された。

2. 研究の目的

本研究では、東京大学先端科学技術研究センターの浜窪らにより開発された発芽型バキュロウイルス(BV)上への機能的膜蛋白質の発現系(バキュロウイルスディスプレイ法)を用いて、免疫系の制御に関与する膜蛋白質をBVに発現させ、蛋白質間相互作用解析や生理的リガンド(または受容体)蛋白質の探索への応用を目的とした。

具体的には (1) 自己免疫反応を抑制する免疫制御性T細胞の機能発現に重要な膜蛋白質であるGITR (glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene)とその生理的リガンドGITRL (GITRリガンド)の相互作用の研究、(2) 膜蛋白質発現ウイルスをプローブとしたcDNA発現ライブラリーのスクリーニングシステムの確立、(3) 抗原提示細胞上に発現する膜蛋白質であるクラスII MHC 分子とその生理的受容体であるT細胞抗原受容体との相互作用の研究、を行った。

3. 研究の方法

(1) GITR及びGITRリガンド発現組み換えバキュロウイルスの作成と遺伝子発現の確認

すでに単離されているマウスGITRリガンド cDNAをバキュロウイルス用トランスファーベクターに組み入れたコンストラクトを作成した。検出を容易にするために、GITRリガンド cDNAにはN末端にエピトープタグであるFLAGタグを付加した。このプラスミドを、バキュロウイルスゲノミック DNAとともに Sf9昆虫細胞にトランスフェクションし、細胞内での相同組換えにより生成する組み換えバキュロウイルスを単離した。GITRリガ

ンドの発芽型ウイルス(BV)上への発現を、FLAGタグに対する特異抗体を用いたウェスタンブロットで確認した。同様にしてGITR発現組み換えバキュロウイルスも作成し、C末端に付加したHAタグに対する特異抗体を用いたウェスタンブロットでBV上へのGITRの発現を確認した。

(2) GITR・GITRリガンド相互作用検出システムの開発

GITR発現 T細胞へのGITRリガンド発現BVの特異的な結合を、蛍光標識抗gp64(バキュロウイルス主要エンベロープ蛋白質)抗体を用いたフローサイトメーター解析により検討した。またGITR発現BVをプレートに固定し、GITRリガンド発現BVと抗gp64抗体または抗GITRリガンド抗体を用いた ELISA法によるGITRとGITRリガンドの相互作用の検出を検討した。

(3) 膜蛋白質発現BVをツールとしたcDNA発現ライブラリースクリーニングシステムの確立

膜蛋白質CD58発現BVと抗ウイルスエンベロープ蛋白gp64抗体および抗マウスIgG抗体結合磁気ビーズを用いた免疫磁気ビーズソーティングによりcDNA発現ライブラリーのスクリーニングを行い、CD58の生理的受容体である膜蛋白質CD2を発現する細胞の濃縮、単離を行った。

(4) クラスII MHC cDNA保有組み換えバキュロウイルスの作製とclass II MHC ヘテロダイマーのBV上での再構成

マウスclass II MHC I^A_d 鎖、鎖 cDNAをcDNAライブラリーより単離し、これらを各々、バキュロウイルス用トランスファーベクターに組み入れたコンストラクトを作成した。class II MHC 鎖cDNAの3'末端にはFLAGタグを付

加した。(1)と同様にして、鎖、鎖のcDNAを各々保有する組み換えバキュロウイルスを単離した。鎖組み換えウイルスと鎖組み換えウイルスをSf9細胞に共感染させ、培養上清よりBVを回収して、BV画分でのclass II MHC蛋白質鎖・鎖ヘテロ二量体の発現を、抗FLAGタグ抗体を用いたウェスタンブロットあるいは抗class II MHC抗体を用いたELISAにより確認した。

4. 研究成果

(1) GITR と GITR リガンド相互作用検出系の構築

GITR 発現 T 細胞への GITR リガンド発現 BV の特異的な結合を、蛍光標識抗 gp64 (バキュロウイルス主要エンベロープ蛋白質) 抗体を用いたフローサイトメーター解析により検出した。(図 1、2)

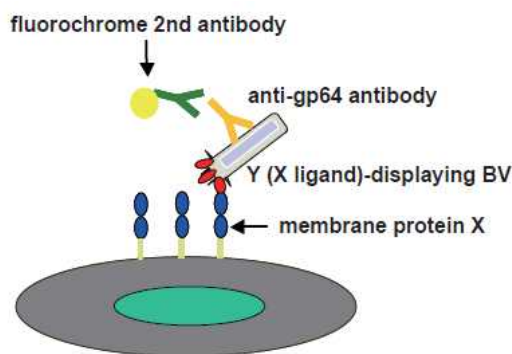


図 1. 受容体発現細胞へのリガンド発現 BV の検出法の模式図

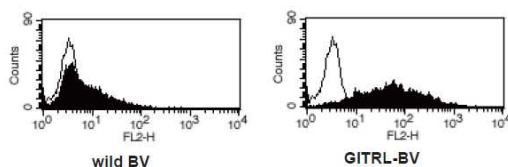


図 2. GITR 発現細胞への GITR リガンド発現 BV の特異的な結合の検出

さらに GITR 発現 BV をポリスチレンプレー

トに固相化し、GITR リガンド BV を加えて、2 種類の膜蛋白質を発現する BV の特異的な結合を、抗 GITR リガンド抗体を用いた ELISA 法で検出することに成功した。(図 3、4)

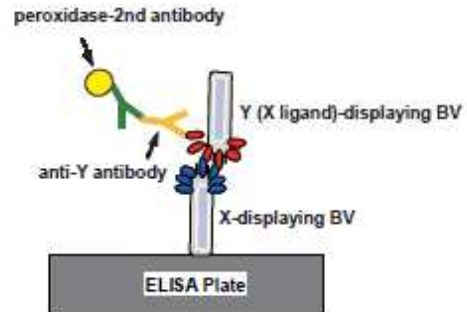


図 3. ELISA 法による膜蛋白質間相互作用検出系の模式図

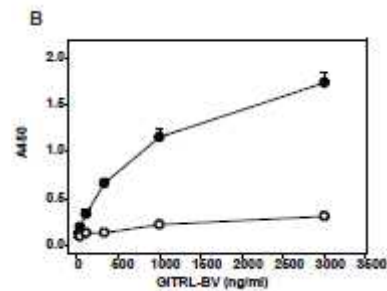


図 4. プレート固相化 GITR 発現 BV への GITR リガンド発現 BV の結合

逆の組み合わせである固相化 GITR リガンド発現 BV に対する GITR 発現 BV の結合も同様の方法で検出可能であった。さらにこの結合は、固相化 BV (この場合は GITR リガンド発現ウイルス) を特異抗体 (この場合は抗 GITR リガンド抗体) とプレインキュベートすることにより、完全にブロックされた。この結果は、ブロッキング抗体や結合阻害活性を持つ低分子化合物のスクリーニング系への応用に道を開くものである。

(2) 膜蛋白質発現BVをツールとしたcDNA

発現ライブラリースクリーニングシステムの確立

ヒト抗原提示細胞上の膜蛋白質CD58を発現するBVと抗ウイルスエンベロープ蛋白質gp64抗体、及び抗マウスIgG結合磁気ビーズを用いて、ヒトT細胞cDNAライブラリーを発現するマウスBaF/3細胞のスクリーニングを行った。CD58を介して磁気ビーズに結合した細胞の選別を3回繰り返し、CD58の生理的受容体であるT細胞の膜蛋白CD2を発現する細胞を濃縮することができた。(図5)

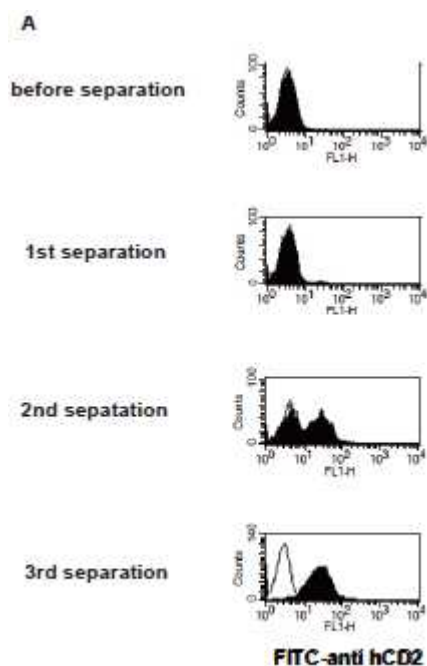


図5. CD58発現BVと磁気ビーズを用いたCD2発現細胞の濃縮

この細胞からPCR法により、ヒトCD2 cDNAを増幅・単離することができた。すなわちヒトCD2 cDNAの発現クローニングに成功した。

このシステムは、完全長の膜蛋白をネイティブな形でウイルス上に発現させることができるため、細胞外ドメインのみを可溶性の組み替え蛋白として発現させる従来の方法で膜蛋白がリガンド(又は受容体)結合能を失う場合に特に有効であり、膜蛋白の生理的

リガンド(または受容体)の探索に有用と期待される。

(3) class II MHC・抗原ペプチド複合体ディスプレイ BV の作成と抗原特異的 T 細胞との結合の検出

卵白アルブミン(OVA)由来のペプチドが共有結合した class II MHC I-Ad β 鎖を発現する組み換えバキュロウイルスを作成した。このウイルスと、別途に作成した class II MHC I-Ad α 鎖を発現する組み換えバキュロウイルスを昆虫細胞 Sf9 に共感染させて、培養上清より BV を回収した。BV 上に抗原ペプチドと class II MHC ヘテロダイマーの複合体がディスプレイされていることを class II MHC に対する特異抗体を用いた ELISA 法で確認した。この BV とバキュロウイルスエンベロープ蛋白 gp64 に対する抗体を用いて、OVA ペプチド-I-Ad 特異的な T 細胞受容体を発現する細胞への BV の結合をフローサイトメーターで検出した。

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 2 件)

1 Toshiko Sakihama, Takato Sato, Hiroko Iwanari, Toshio Kitamura, Shimon Sakaguchi, Tatsuhiko Kodama, Takao Hamakubo, A simple detection method for low affinity membrane protein interactions by baculoviral display, PLoS ONE, 3, e4024, 2008, 査読有

2 Toshiko Sakihama, Kazuyuki Masuda, Takato Sato, Takefumi Doi, Tatsuhiko

Kodama, Takao Hamakubo, Functional reconstitution of G-protein-coupled receptor-mediated adenylyl cyclase activation by a baculoviral co-display system, Journal of Biotechnology, 135, 28-33, 2008, 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

先浜俊子、佐藤敬人、北村俊雄、児玉龍彦、浜窪隆雄、Baculovirus display 系を用いた膜蛋白質間相互作用検出法とその応用、日本分子生物学会第 30 回年会、2007 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜

〔その他〕

ホームページ

<http://www.lsbm.org>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

先浜 俊子 (SAKIHAMA TOSHIKO)
東京大学・先端科学技術研究センター・
特任准教授
研究者番号：70187061

(2)研究分担者 (2006, 2007 年)

浜窪 隆雄 (HAMAKUBO TAKAO)
東京大学・先端科学技術研究センター・
教授
研究者番号：90198797

(3)連携研究者 (2008 年)

浜窪 隆雄 (HAMAKUBO TAKAO)
東京大学・先端科学技術研究センター・
教授
研究者番号：90198797