

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19510221
 研究課題名（和文） 新規 7 回膜貫通型受容体を内包するウイルス様粒子を用いたリガンドスクリーニング
 研究課題名（英文） Reconstitution of transmembrane receptor protein-containing virus-like particles for ligand screening of orphan receptors
 研究代表者
 神田 宏美（KANDA HIROMI）
 北里大学・理学部・助教
 研究者番号：80234160

研究成果の概要：生体膜内在性のバクテリオファージ PR772 由来の 3 種のウイルス構成タンパク質、メジャーキャプシドタンパク質、マイナーキャプシドタンパク質、及びペントンタンパク質と、リガンド既知の 7 回膜貫通型受容体とウイルス膜タンパク質との融合タンパク質を大腸菌で共発現させ、その菌体内で、生体膜中に融合タンパク質を保持すると推測されるウイルス様粒子の再構成及び精製に成功。新規 7 回膜貫通型受容体のリガンドスクリーニングのための基本プロセスを構築した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：生体機能関連物質

1. 研究開始当初の背景

膜貫通型の受容体タンパク質のうち、G タンパク質共役受容体（G protein-coupled receptor:GPCR）は、細胞膜を 7 回貫通する特徴的な構造を有し、細胞外からの刺激であるリガンドを受容して、ヘテロ三量体 G タンパク質を介して細胞内にシグナルを伝達する。ヒトゲノムでは、1,000 以上の GPCR 遺伝子が存在すると推定されており（全受容体の 80%）、最も大きなファミリーを形成している。GPCR のリガンドは、光、カルシウムイオン、匂い、フェロモン、アミン、

ペプチド、脂質、ホルモン、酵素など多岐にわたり、GPCR は、感覚・認知、循環調節、内分泌代謝、生体防御、発生・分化など様々な生理活性機能に関与している。このように、GPCR は様々な物質をリガンドとするが、匂いやフェロモンなどをリガンドとし、嗅覚に関わる GPCR は 400 個あまりで、それ以外の 600 個くらいの GPCR のうち、約 140 個の GPCR は内因性のリガンド、生理的機能が不明の、“オーファン受容体”である。近年、新規オーファン GPCR とそのリガンドが次々と同定されつつあり、生理学的解析から、

精神疾患、脳疾患、循環器系疾患、代謝性疾患、免疫系疾患、炎症アレルギー、癌、などの疾患に深く関わっていることがわかってきた。リガンドには比較的分子量のものが多く、リガンドのアンタゴニストやアゴニストを GPCR に作用させることで、その生理機能を修飾し、疾患の治療につなげることが可能であることから、医薬品開発のターゲットとして新規オーファン GPCR とそのリガンドの探索が注目されている。しかしながら、GPCR は生体内で極微量しか存在せず、疎水性の膜貫通領域を有しているために難溶性で、界面活性剤を用いて可溶化を行なうが、膜から分離すると不安定になりやすく、一般的に生体内からの精製が難しい。また、異種生物を用いた大量発現系の構築、精製が試みられているが、GPCR は発現しにくく、新規オーファン GPCR とリガンドの同定、さらにその機能解析はなかなか進んでいないというのが現状である。

PRD1 と PR772 は、テクチウイルスファミリーに属し、大腸菌やサルモネラ菌などのグラム陰性菌を宿主とするバクテリオファージである。テクチウイルスファミリーの中で、最も解析が進んでいるのが PR772 のプロトタイプ PRD1 ウイルスであり、完全なウイルス粒子は、66 MDa で、外側は正二十面体のキャプシドタンパク質の殻に覆われ、内側に宿主由来の生体膜を内包し、約 15 kbp の二本鎖 DNA をゲノムとしてもつ。ウイルス粒子は直径約 63 nm で、20 種以上のタンパク質から構成されており、ウイルス粒子形成にはメジャーキャプシドタンパク質 P3、膜タンパク質 P16、マイナーキャプシドタンパク質 P30、ペントンタンパク質 P31 の 4 種のタンパク質が必要と考えられている。以下にそのライフサイクルを述べる。ファージは、宿主の表面に吸着すると DNA を中に挿入し、挿入されたゲノム DNA は複製され、一方、ウイルスタンパク質が合成される。合成されたメジャーキャプシドタンパク質は多量体を形成し、ウイルス膜タンパク質は宿主の生体膜に結合し、生体膜の一部と共に移動してキャプシドに包まれ、空の粒子が形成される。続いてウイルス DNA がパッケージングされて成熟した粒子となり、溶菌後、放出される。PR772 は、PRD1 とゲノム DNA の塩基配列が 97.2 % 同一であり、PRD1 とほとんど同じ構造とライフサイクルをもつと考えられている。

我々は、今までに、PR772 由来の上記 4 種のウイルスタンパク質、P3、P16、P30、及び P31 に His タグを付加した His・P31 を大腸菌で共発現させることにより、キャプシドの表面に His タグが露出したウイルス様粒子 (His・VLP) を菌体内で再構成させ、Ni-アガロースを用いて精製することに

成功している。His・VLP は、PR772 wild-type と同様に、宿主由来の生体膜 (脂質成分) を含有しており、よって、PR772 のウイルス粒子形成機構を利用した発現系は、GPCR を生体膜に浮かんだ状態で大量に発現させる系として有用であり、リガンドスクリーニングに応用できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究課題では、新規オーファン GPCR をクローニングし、宿主の生体膜を内包するバクテリオファージ PR772 のウイルス粒子産生機構を利用して、その生体膜中に GPCR を発現させ、組織抽出液と混合し、GPCR に結合したリガンドのスクリーニング法を確立し、リガンドを同定することを目指している。

3. 研究の方法

まず、本研究の基本プロセスを確立するために、リガンド不明なオーファン GPCR が多く存在すると推定されているファミリー 1a のなかで、リガンドが既知な GPCR について、GPCR を内包した His・VLP の再構成を試みた。

(1) GPCR のクローニング及び発現用プラスミドの構築

GPCR としては、放射性リガンドが入手可能なヒトの β_2 -アドレナリン受容体 (ADRB2) を選んだ。ADRB2 遺伝子は単一エクソンから成るので、ヒト胎児繊維芽細胞由来の 293T 細胞からゲノム DNA を抽出し、ADRB2 の翻訳領域の DNA 断片を PCR により増幅した。塩基配列を確認後、ADRB2 の C 末にペプチドリンカーを介して PR772 の膜タンパク質である P16 を連結して大腸菌用発現ベクターに組み込み、ADRB2-P16 融合タンパク質の発現用プラスミドを構築した。なお、融合タンパク質の発現を確認するため、ADRB2 の N 末端に FLAG タグを付けた。

(2) 大腸菌における ADRB2-P16 融合タンパク質と 3 種のウイルス粒子構成タンパク質、P3、P30、及び His・P31 の発現解析

大腸菌に、ADRB2-P16 融合タンパク質発現用プラスミド、3 種のウイルス粒子構成タンパク質、P3、P30、及び His・P31 の発現用プラスミドを、単独あるいは一緒に導入し、Overnight Express Autoinduction System (OnEx) の Instant TB 培地 (Novagen 社)、或は OnEx System1 を加えた培地を用いて 37°C で 16 時間培養し、タンパク質の発現を誘導した。この大腸菌の一部を回収して総抽出液を調製し、SDS-14% PAGE 及び抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行なった。

(3) His・VLP 及び融合タンパク質を内包すると推測される His・VLP の調製及び精製

4 種のウイルス粒子構成タンパク質、P3、P16、P30、及び His・P31 を共発現させた大腸菌、或は、ADRB2-P16 融合タンパク質と 3 種のウイルス粒子構成タンパク質、P3、P30、及び His・P31 を共発現させた大腸菌を大量調製し、これらの大腸菌を超音波破碎後、可溶性分画を濃縮して 15-70% ショ糖密度勾配超遠心にかけて、遠心チューブの上から一定量ずつ回収して分画した。各分画に含まれるタンパク質成分を SDS-14% PAGE 及びウェスタンブロットにより解析し、His・VLP を含む分画を回収して Ni-アガロースにより精製した。

(4) His・VLP 及び融合タンパク質を内包すると推測される His・VLP のネガティブ染色による電子顕微鏡観察

(3) で回収した分画の一部、或は精製した His・VLP 及び融合タンパク質を内包すると推測される His・VLP を緩衝液で適当に希釈し、ブタバルでコーティングしたグリッドに吸着させた。乾燥後、ネガティブ染色し、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

4. 研究成果

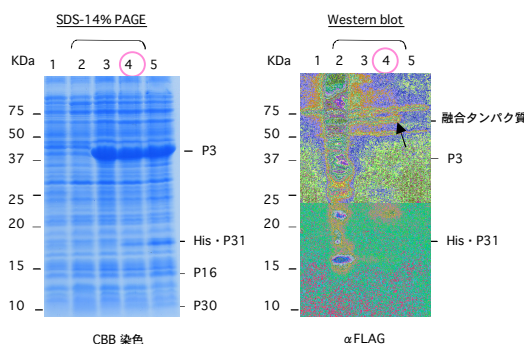
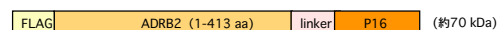
(1) 大腸菌における ADRB2-P16 融合タンパク質と 3 種のウイルス粒子構成タンパク質、P3、P30、及び His・P31 の発現解析

予備実験で、ヒトの ADRB2 と同じファミリー 1a に属する GPCR で、比較的安定なことが知られているウシのオプシンを用いて、大腸菌でオプシン-P16 融合タンパク質と 3 種のウイルスタンパク質を共発現させると、ウイルスタンパク質の発現が抑制され、理由はわからないが、ペプチドリンカーの長さを 3 アミノ酸残基から 27 アミノ酸残基と徐々に長くすると、ウイルスタンパク質の発現が回復することが示され、融合タンパク質に用いるペプチドリンカーの長さは 18 アミノ酸残基以上が望ましいと考えられた。

そこで、まず、ADRB2 の N 末端に FLAG タグを付け、C 末端に 18 アミノ酸残基から成るペプチドリンカーを介して P16 を連結した融合タンパク質の発現用プラスミドを構築し(図 1-上段の模式図参照)、単独、或は、3 種のウイルスタンパク質、P3、P30、及び His・P31 発現用プラスミドと一緒に大腸菌に導入し、OnEx Instant TB 培地を用いて大腸菌を培養、タンパク質を発現誘導させた。大腸菌総抽出液を調製して SDS-PAGE にかけて、タンパク質を分離後、CBB (Coomassie brilliant blue) 染色し、ウイルスタンパク質の発現を調べた。なお、コントロールとして、His・VLP を再構成できる 4 種のウ

イルスタンパク質、P3、P16、P30、及び His・P31 を共発現させた大腸菌の総抽出液を用いた(図 1-左、レーン 5)。その結果、融合タンパク質と 3 種のウイルスタンパク質を共発現させた大腸菌において、コントロールと同程度のウイルスタンパク質の発現が確認された。しかしながら、SDS-PAGE 後、タンパク質をゲルからフィルターに転写し、融合タンパク質の発現量を、抗 FLAG 抗体を用いてウェスタンブロット解析により調べた結果、融合タンパク質単独では高い発現が確認されたが(図 1-右、レーン 2)、ウイルスタンパク質と共発現させた場合、発現量が著しく減少した(図 1-右、レーン 4、矢印)。

ヒトβ2-アドレナリンレセプター(ADRB2)とP16との融合タンパク質 FLAG-ADRB2-P16の構造模式図



- 1: 空の発現用プラスミドを導入した大腸菌の総抽出液
- 2: 融合タンパク質の発現用プラスミドを導入した大腸菌の総抽出液
- 3: ウイルスタンパク質 P3 と融合タンパク質の発現用プラスミドを導入した大腸菌の総抽出液
- 4: ウイルスタンパク質 P3 と融合タンパク質の発現用プラスミドと共にウイルスタンパク質 His・P31 と P30 の発現用プラスミドを導入した大腸菌の総抽出液
- 5: ウイルスタンパク質 His・P31 と P30 の発現用プラスミドと共にウイルスタンパク質 P3 と P16 の発現用プラスミドを導入した大腸菌の総抽出液

図1 大腸菌における ADRB2-P16 融合タンパク質と 3種のウイルスタンパク質 (P3、P30、His・P31) の発現解析

また、図には示さないが、オプシン-P16 融合タンパク質をウイルスタンパク質と共発現させた場合でも、融合タンパク質の顕著な発現量の減少が示された。

PR772 ウイルス粒子を1つ形成するのに必要なウイルスタンパク質は、P3が720コピー、P16が60コピー、P30が60コピー、そしてP31が60コピーであると考えられている。従って、ADRB2-P16融合タンパク質の発現量の著しい低下は、ウイルス様粒子の産生量の低下につながる。実際、ADRB2-P16融合タンパク質と3種のウイルスタンパク質を共発現させた大腸菌を大量培養してウイルス様粒子の形成を調べたが、粒子の存在は確認できなかった。

そこで、この発現系において、融合タンパク質の発現量を向上させるため、幾つか条件検討を行った。その結果、宿主大腸菌や培養温度を変更しても発現量の増加は認められなかったが、培地の検討を行ったとこ

ろ、OnEx Instant TB 培地を用いたときよりも、2X YT に System 1 を添加した培地で、融合タンパク質の高い発現が認められた（図 2-右、レーン 1）。なお、ウイルスタンパク質の発現量は、2X YT に System 1 を添加した培地を用いたときと、OnEx Instant TB 培地を用いたときと同程度で（図 2-左、コントロールの His・VLP を再構成できる 4 種のウイルスタンパク質、P3、P16、P30、及び His・P31 を共発現させた大腸菌における発現量とほとんど同じであった（図 2-左、レーン 1 及び 2）。

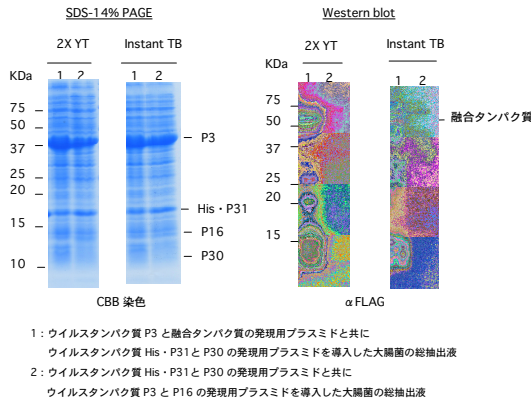


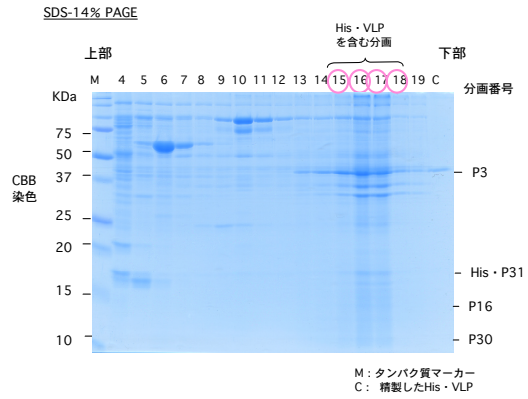
図 2 2XYT 培地と Instant TB 培地における ADRB2-P16 融合タンパク質とウイルスタンパク質の発現量の比較

(2) ADRB2-P16 融合タンパク質と 3 種のウイルスタンパク質を共発現させた大腸菌におけるウイルス様粒子形成の確認

2X YT に System 1 を添加した培地を用いて ADRB2-P16 融合タンパク質と 3 種のウイルスタンパク質を共発現させた大腸菌において、融合タンパク質の発現量の向上が認められた。そこで、この大腸菌の菌体内でウイルス様粒子が形成されているかどうか検証を行なった。

まず、大腸菌からウイルス様粒子を分離するため、大量培養した大腸菌を超音波破碎し、その可溶性分画を硫酸沈殿により濃縮して 15-70% ショ糖密度勾配超遠心にかけた。超遠心後、遠心チューブの上から一定量ずつ分画し、各分画に含まれるタンパク質成分を SDS-PAGE 及びウェスタンブロット解析により調べた。

なお、コントロールとして、His・VLP を再構成することができる、P3、P16、P30、His・P31 を共発現させた大腸菌を用いた（図 3）。コントロールでは、分画番号 15-18 にウイルス粒子の主成分である P3 や他の 3 種のウイルスタンパク質が多く含まれており（図 3-上段）、これらの分画に直径約 63 nm の His・VLP が存在することが電子顕微鏡観察により示されている（図 3-下段、矢印）。



電子顕微鏡観察

図 3 15%-70% ショ糖密度勾配超遠心による His・VLP の分離

ADRB2-P16 融合タンパク質と 3 種のウイルスタンパク質を大腸菌で共発現させた再構成系において、CBB 染色の結果、分画番号 16-17 にウイルス粒子の主成分である P3 が多く検出され（図 4-上段、矢印）、抗 P3 抗体を用いたウェスタンブロット解析においても、分画番号 16-17 に P3 が多く存在することが示された（図 4-中段、矢印）。さらに、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロット解析により、分画番号 16-17 に融合タンパク質も含まれていることが確認できた（図 4-下段、矢印）。以上の結果から、これらの分画に、融合タンパク質を内包すると推測される His・VLP が含まれていると予想された。

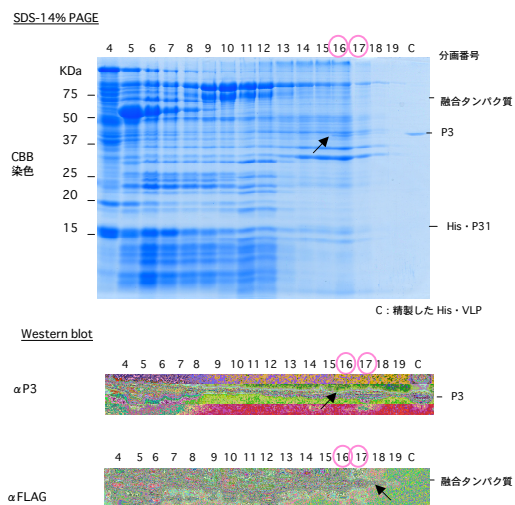


図 4 15%-70% ショ糖密度勾配超遠心後、分画した試料のタンパク質成分の解析

次に、これらの分画の一部を電子顕微鏡で観察した。その結果、図5の電子顕微鏡写真(矢印)に示されたように、粒子がグリッド上の支持膜に引っ張られてやや細長くなっているのが正確な大きさはわからないが、予想通り、図3の電子顕微鏡写真(矢印)に示された His・VLP と構造的に類似な粒子が確認された。

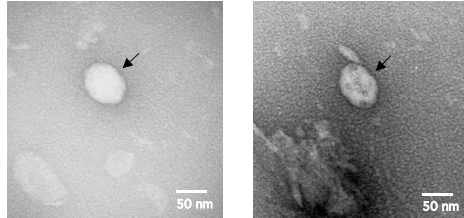


図5 電子顕微鏡観察による粒子の確認

(3) ADRB2-P16 融合タンパク質を内包すると推測される His・VLP の精製

ADRB2-P16 融合タンパク質と P3、P30、及び His・P31 を大腸菌で共発現させた再構成系において、粒子の存在が確認された 15~18 番の分画をまとめ、P3、P16、P30、及び His・P31 を大腸菌で共発現させた再構成系において、His・VLP を含む 15~18 番の分画をコントロールとし、Ni-アガロースを用いて粒子の精製を行なった。精製した試料を電子顕微鏡で観察した結果を図6-右に示した。ADRB2-P16 融合タンパク質と、P3、P30、及び His・P31 を大腸菌で共発現させた再構成系で(下段)、コントロールの His・VLP (上段、矢印) と形態的に同様な、直径約 63 nm の粒子が観察された(下段、矢印)。また、これらウイルス様粒子のタンパク質成分を確認するため、精製した試料を SDS-PAGE 後、ゲルを Silver 染色及び抗 FLAG 抗体を用いてウェスタンブロット解析した。その結果、ADRB2-P16 融合タンパク質と、P3、P30、

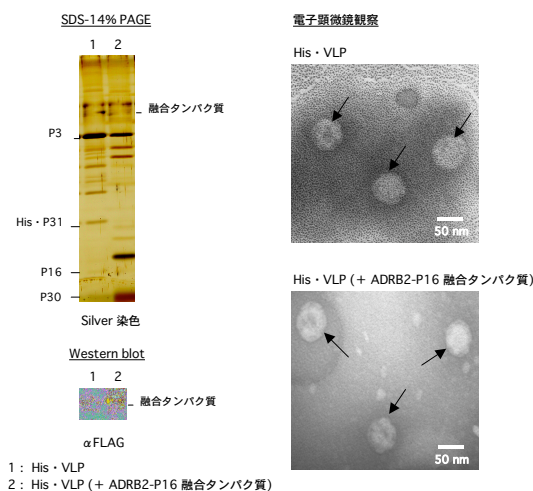


図6 Ni-アガロースにより精製したウイルス様粒子の解析

及び His・P31 を大腸菌で共発現させた再構成系で、3種のウイルスタンパク質と融合タンパク質のバンドが検出された(図6-左、レーン2)。よって、Ni-アガロースにより、ADRB2-P16 融合タンパク質を内包すると推測される His・VLP を回収することができた。

一般的に、膜貫通型受容体タンパク質、中でも GPCR を人工的に大量発現させることは難しく、本研究においても、ウイルス様粒子を再構成可能なレベルまで、ADRB2-P16 融合タンパク質を大腸菌で発現させ、さらにウイルスタンパク質と共発現させる条件を検討するのに時間を要した。現在、Ni-アガロースを用いて精製した ADRB2-P16 融合タンパク質を内包すると推測される His・VLP に、ADRB2 の放射性リガンドである $[^3\text{H}]$ -DHA を作用させ、粒子内に取込まれた放射能を液体シンチレーションカウンターを用いて測定することにより、粒子内の生体膜中に ADRB2 がきちんと活性のある状態で配置されているかどうか検証しているところである。今後は、ウイルス様粒子の産生量を向上させるためのさらなる工夫も必要と考えているが、ADRB2-P16 融合タンパク質を内包する His・VLP に、リガンドを含む組織抽出液を作用させ、ADRB2 のリガンドを単離することができるかどうか確認し、基本プロセスを確立した上で、新規オープン GPCR のリガンドスクリーニングに応用していきたいと考えている。

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 2 件)

① T. Yamaguchi, C. Miyashita, S. Koyano, H. Kanda, K. Yoshioka, T. Shiba, N. Takamatsu, M. Ito. JNK-binding protein 1 regulates NF- κ B activation through TRAF2 and TAK1. Cell Biology International. 33, 364-368, 2009. 査読・有

② K. Yamada, H. Kanda, T. Aihara, N. Takamatsu, T. Shiba and M. Ito. Mammalian Sox15 Gene: Promoter Analysis and Implications for Placenta Evolution. 25(3), Zool. Sci. 313-320, 2008. 査読・有

[学会発表] (計 4 件)

① 瀧澤登、山田佳代、神田宏美、塚本大輔、柴忠義、高松信彦、伊藤道彦：筋芽細胞における Sox15 の機能解析。日本分子生物学会年会・日本生化学会大会 合同大会 (2008 年 12 月 11 日) 神戸ポートアイランド

② 神田 宏美、高松 信彦、木村 武俊、亀甲 龍彦、岩淵 紳一郎、茶竹 俊彦、伊藤 道彦、久保木 芳秀、松田 進、柴 忠義、松本 治：GPCR 構造解析のための生体膜内在性 PR772 フェージ粒子の再構成系の確立. 日本分子生物学会年会・日本生化学会大会 合同大会 (2007 年 12 月 13 日) パシフィコ横浜

③ 岡田絵真、伊藤道彦、吉本真、神田宏美、池田望、田村啓、柴忠義、高松信彦：ZZ/ZW 型性決定様式をもつアフリカツメガエルにおけるアロマターゼ遺伝子 P450arom の発現機構の解析. 日本分子生物学会年会・日本生化学会大会 合同大会 (2007 年 12 月 13 日) パシフィコ横浜

④ 瀧澤登、伊藤道彦、山田佳代、神田宏美、塚本大輔、柴忠義、高松信彦：筋分化における Sox ファミリーメンバー (Sox15 および Sox8) の解析. 日本分子生物学会年会・日本生化学会大会 合同大会 (2007 年 12 月 12 日) パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

神田 宏美 (KANDA HIROMI)

北里大学・理学部・助教

研究者番号：80234160

(2)研究分担者

伊藤 道彦 (ITO MICHHIKO)

北里大学・理学部・准教授

研究者番号：90240994