

平成 22 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008 ～ 2009  
 課題番号：20770098  
 研究課題名（和文） シグナル伝達系再構成による伝達機構の解析  
 研究課題名（英文） Analysis on the signal transduction pathway by the reconstitution of signaling components  
 研究代表者  
 宮寺 浩子（MIYADERA HIROKO）  
 東京大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：40361464

## 研究成果の概要（和文）：

TRAIL Receptor 1 (TRAILR1)は、細胞内に Death Domain を持ち、アポトーシスを誘導する。(TRAILR1 の細胞外領域には非同義多型が存在し、それらは、結腸癌、膀胱癌に対する感受性と関連する。本研究では非同義置換による TRAIL - TRAILR1 間の親和性を解析するため、大腸菌発現系を用いてこれらの組み換えタンパク質発現・リフォールディングを行った。

## 研究成果の概要（英文）：

Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand/Apoptosis ligand 2 (TRAIL/Apo2L) induces tumor cell specific apoptosis. In the extracellular domain of TRAILR1, there are two SNPs (H141R and R209T) which were reported to be associated with cancers. We expressed and refolded TRAIL and TRAILR1 recombinant protein in *E. coli* in order to assess the effects of these polymorphisms to the ligand-receptor interaction.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：機能生物化学

キーワード：細胞情報伝達機構

## 1. 研究開始当初の背景

TRAIL Receptor 1 (TRAILR1)は、細胞内に Death Domain を持ち、アポトーシスを誘導する。また、TRAILR1 の細胞外領域に存在する、H141R と R209T の多型は、結腸癌、膀胱癌に対する感受性と関連していることが報告されている。さらに、141H-209R、141R-209T は強い連鎖不平衡にある。

このうち R209T はリガンド結合部位にあると予測されるため、これらの非同義置換により TRAIL との親和性が変化し、これが疾患感受性に関与している可能性がある。しかし TRAIL と TRAILR1 の多型による親和性への影響は解析されていない。

## 2. 研究の目的

本研究は TRAIL 及び TRAILR1 の可溶性領域を大腸菌発現系によって調製し、リガンド-受容体の親和性を QCM 法によって測定することを目的として行い、sTRAIL 及び sTRAILR1 の大腸菌発現系とリフォールディングを実施した。

## 3. 研究の方法

### (1)発現ベクター構築

pET16b-sTRAIL 発現ベクターを、TNFSF10 cDNA 可溶性領域を pET16b の Nde I、Bam HI サイトへの挿入により作成した。

### (2)発現系

*E. coli* Rosetta (DE3) pLysS を 37 °C で培養し、OD<sub>600</sub>=0.4 で IPTG 誘導を行った。細胞は回収後、30 mM リン酸カリウムバッファー(pH 8.0)で洗浄し、遠心 (1,000 x g、10 min) 後、-80 °Cにおいて保存した。細胞は培地 1/20 容の 10 mM リン酸カリウムバッファー (pH7.0)、1 mM EDTA、1/100 vol.protease inhibitor (SIGMA)、25 U Benzonase (Novagen)に懸濁し、ソニケーションにより破碎した。不溶性分画は遠心 (16,000 x g、10 min、4°C)し、-30°Cにて保存した。

### (3)封入体の精製

不溶性分画は、培地 1/20 容の 10 mM リン酸カリウムバッファー (pH7.0)、0-1 % Triton X-100、0-6 M urea、1 mM EDTA に懸濁し (160 rpm、30 min)、遠心した(19,000 x g、20 min)。沈澱を回収後、洗浄、遠心し、これを精製水に溶解後、遠心した(25,000 x g、2 min.)。

### (4) sTRAIL の変性とリフォールディング

精製した封入体を 50 mM Tris-HCl (pH 8.5)、5 M guanidine hydrochloride、20 mM 2-mercaptoethanol に懸濁し、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.4 M L-arginine、0.5 M NaCl、0.5 M urea、2 mM 2-mercaptoethanol 存在化でリフォールディングした。

## 4. 研究成果

TRAIL/Apo2L (Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand/Apo2 ligand)はTNF super familyに属するサイトカインであり、腫瘍特異的なアポトーシス誘導を行う。細胞膜外に TRAIL との結合領域を持つ 4 種類の TRAIL 受容体のうち、本研

究で解析対象とした TRAIL Receptor 1 (TRAILR1)は、細胞内に Death Domain を持ち、アポトーシスを誘導する。

本研究では、QCM (水晶結晶振動子) を用いて、TRAIL-TRAILR1 間の結合親和性を測定するため、まず、大腸菌発現系を用いたこれらのタンパク質の発現・リフォールディングを行った。

### (1)TRAILR1 発現ベクター構築

TRAILR1 の細胞外領域 (23-229) を、pET52b に挿入し、TRAILR1 発現ベクターを構築した。(図 1)

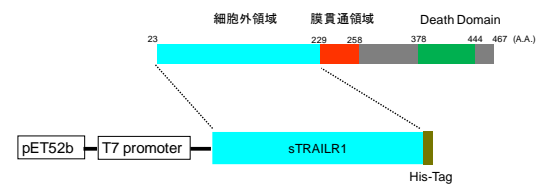


図 1 組換え型 sTRAILR1 の一次構造

### (2) TRAILR1 発現

*E. coli* Rosetta (DE3) pLysS を用い、組換え型 sTRAILR1 を発現した。大腸菌を OD=0.4 まで 37 °C で培養し、IPTG (0.1 mM または 0.4 mM) で発現誘導後、30°C 6時間または 15°C 22時間培養した。発現温度及び誘導に用いた IPTG 濃度の関係を図 2 に示す (図 2)。

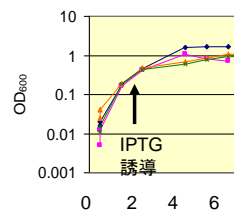


図 2 組換え型 sTRAILR1 発現大腸菌増殖曲線

sTRAILR1 を発現後、細胞破碎処理し各分画を電気泳動後 CBB 染色を行った。いずれの発現条件においても沈澱分画 (図 6 Ppt.2) に発現が確認された。また、IPTG 濃度、培養温度の異なる発現条件間での大きな差異は見られなかった (図 3)。

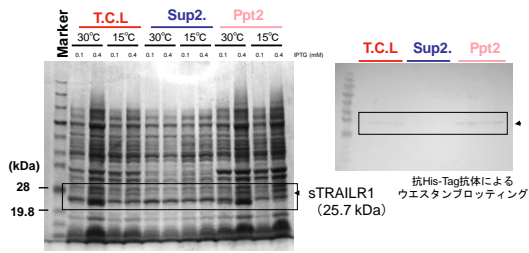


図3 組換え型 sTRAILR1 の大腸菌発現

(3) 組換え型 sTRAILR1 のリフォールディング

タンパク質発現後、菌体を回収し超音波処理によって細胞破碎した。可溶性分画と、沈殿分画に遠心分離後、沈殿分画を wash buffer で洗浄し、封入体を得た。得られた封入体を還元剤、変性剤を含む denaturation buffer で変性後、oxidization buffer で酸化し、refolding buffer でリフォールディングを行った (図4、5)。この際、封入体の洗浄条件を検討したが、Triton X-100 (1%) 含有、非含有による差異は認められなかった (図4)。

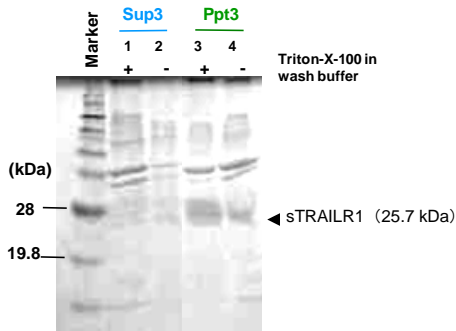


図4 組換え型 sTRAILR1 封入体の洗浄条件

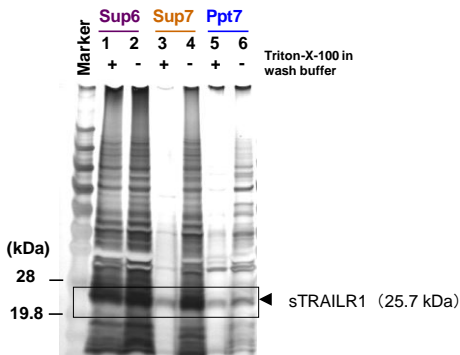


図5

組換え型 sTRAILR1 のリフォールディング

sTRAILR1 の封入体を変性、酸化、リフォールディング後、各分画を電気泳動後、銀染色した結果、目的の位置にリフォールディングされたタンパク質を同定した (図5)。図6に実験条件を示す (図6)。

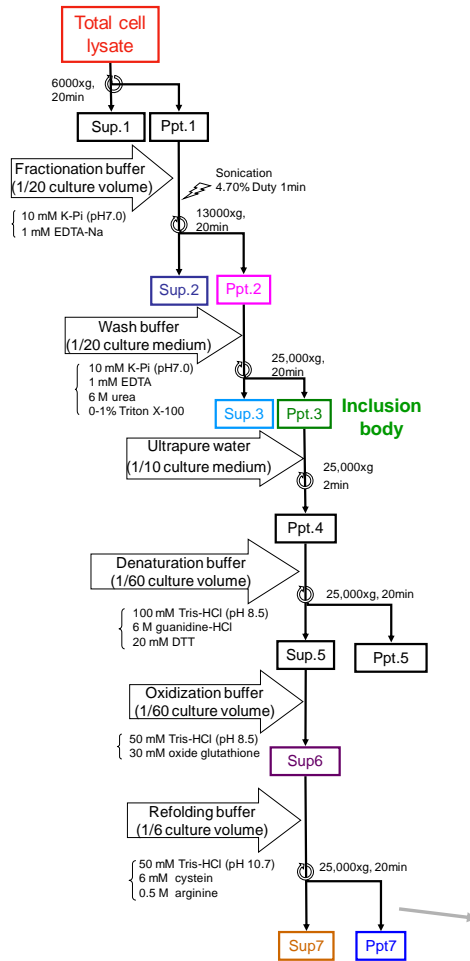


図6 sTRAILR1 リフォールディング方法

(4)TRAILR1 発現

sTRAIL の可溶性領域(40-281)を、pET16b に挿入し、発現ベクターを構築した (図7)。

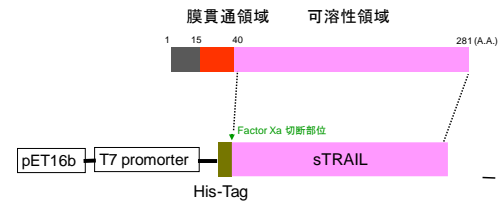


図7 組換え型 sTRAIL の一次構造

大腸菌発現系でのタンパク質発現後、菌体を回収し超音波処理によって細胞破碎した。

可溶性分画(図 8 Sup.2)と、沈殿分画(図 8 Ppt.2)に遠心分離後、沈殿分画を wash buffer で洗浄し、封入体を得た。得られた封入体を還元剤、変性剤を含む denaturation buffer で変性した後、refolding buffer でリフォールディングを行った。実験条件を図 8 に示す。

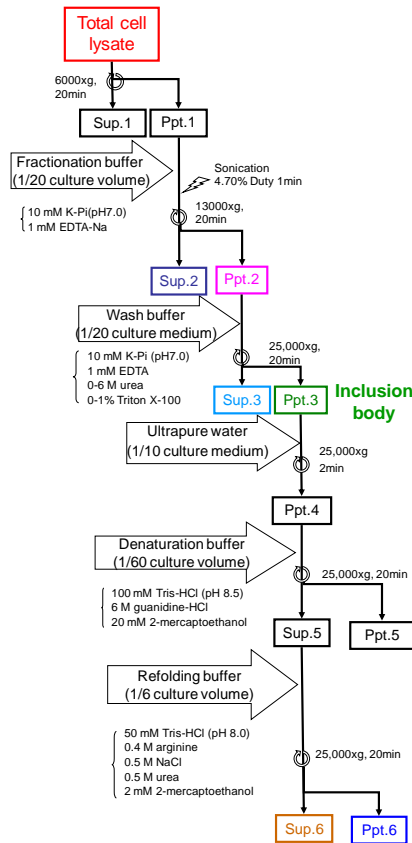


図 8 sTRAIL リフォールディング方法

sTRAIL を発現後、細胞破碎処理し各分画を電気泳動後 CBB 染色を行った。いずれの発現条件においても 沈殿分画(図 8 Ppt.2)に発現が確認された。また、IPTG 濃度、培養温度の異なる発現条件間での大きな差異は見られなかった (図 9)。

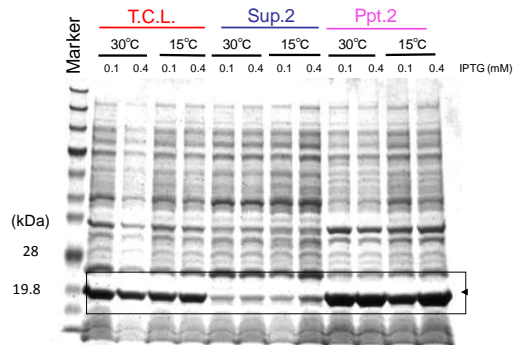


図 9 組換え型 sTRAIL の大腸菌発現

sTRAILR1 の封入体を変性、リフォールディング後、各分画を電気泳動し、銀染色した (図 10)。Refolding buffer のネガティブコントロールとして、50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl を用いた。ネガティブコントロールでは、タンパク質が不溶性分画(図 8 Ppt.6)のみに確認された。可溶性分画(図 8 Sup.6)に目的のタンパク質を得た。TNFR1、TNFR2 のリフォールディングを参考に、sTRAILR1 のリフォールディングを行った。今後、各タンパク質を精製後、生物活性の確認を行い、QCM 法による相互作用解析を行う予定である。

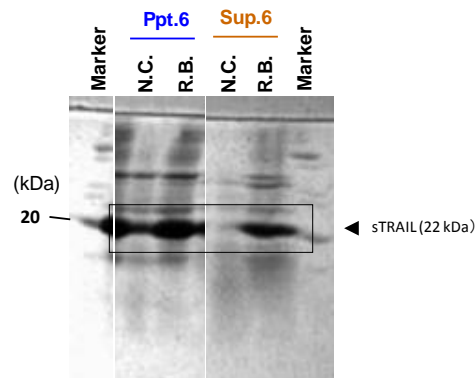


図 10 組換え型 sTRAIL のリフォールディング

## 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)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 古川英利、宮寺浩子、徳永勝士、  
組換え型 TRAIL 受容体 1 の発現系構築と  
非同義型多型によるリガンド結合能への  
影響 日本分子生物学会  
平成 20 年 12 月 11 日 (神戸国際会議場)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮寺 浩子 (MIYADERA HIROKO)  
東京大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：40361464

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし