

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12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：23657142

研究課題名（和文）膜結合型特異抗体を用いた生体膜上での分子間相互作用の解析ツールの開発

研究課題名（英文）Exploitation of a tool for analyzing molecular interactions on the plasma membrane by using membrane-bound antibodies

研究代表者

平良 真規 (TAIRA MASANORI)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号：60150083

研究成果の概要（和文）：

抗 HA と抗 Myc モノクローナル抗体の cDNA をクローニングし、それを基に膜結合型抗体のコンストラクトを作成し細胞に発現させたところ、実際に膜結合型抗体として機能することを確認した。これを用いて細胞外における分泌蛋白質の拡散性を調べることが可能となった。このコンストラクトを基に一本鎖抗体を作成し、抗体として機能することを示した。次に、膜結合型抗体を利用して、FRET 効率が変化する張力センサーモジュール (TSMoD) を向かい合う細胞間で橋渡しをすることで細胞間に働く張力の測定を試みた。また膜結合型抗体と膜結合型抗原で細胞間を架橋することで、原腸胚期の発生に影響が現れることを見出した。この架橋方法は、形態形成における細胞間の可塑性を解析するツールとなると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We cloned cDNAs for anti-HA and anti-Myc monoclonal antibodies, and made membrane-bound antibody constructs, which were verified to function as antibodies against HA- and Myc-tagged proteins. We further made single-stranded antibodies, which were verified to function as antibodies. Using membrane-bound antibodies, we next tried to measure the tension between two adjacent cells in *Xenopus* embryos by using the FRET-based tension sensor module (TSMoD). In addition, we found that development of *Xenopus* gastrulae is affected when cells are bridged with the membrane-bound antibodies and membrane-bound antigens. This bridging method can be used as a tool for investigation of intercellular plasticity during morphogenesis.

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：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：膜結合型抗体、一本鎖抗体、細胞間架橋、力学的相互作用

1. 研究開始当初の背景

生体膜が種々の反応の「場」として重要な役割を果たすことは広く認識される場所である。また多細胞生物における細胞間隙は細胞膜に挟まれた微小環境を形成し、細胞外基質 (extracellular matrix: ECM) も含めて二次元の「場」を形成している。そこでは数々の生体高分子や外来分子が相互作用し、会

合・離合することで機能していると考えられる。例えば、細胞間隙では、ECM 蛋白質や膜結合型糖蛋白質と分泌性蛋白質が相互作用し、濃度勾配の形成とそれによるシグナル伝達の調節を行っている。細胞膜の細胞質側では、膜蛋白質の細胞内ドメインと細胞質可溶性蛋白質や細胞骨格蛋白質と相互作用が行われている。さらに細胞核の内膜の核質側

に核内膜蛋白質が配向シラミンと共に核ラミナを形成し、ここでは種々の転写関連蛋白質、クロマチン蛋白質、核内骨格蛋白質などが相互作用している。しかしそれら個々の分子間やドメイン間の相互作用のもつ意義を抽出して解析する有効な手段がないのが現状である。

分子同士が生体膜を「場」として会合する生物学的意義としては、(i) 局所的な濃度を上げることで触媒反応や複合体形成を促進する、(ii) 関連する蛋白質のみを集め、雑物を排除する、(iii) 細胞極性に応じたテリトリーを定める、(iv) 細胞骨格の支点を形成する、(v) 核における核膜孔の分布やクロマチンのテリトリーを定める、などが考えられる。しかしこのような生体膜上での「場」特異的な分子の会合は、蛋白質の輸送シグナルや各種機能ドメインなどと密接に関連しているため、個々の分子間相互作用を他から分離して、その役割を解析することは困難である。

以上の問題点を克服するためには新たな解析ツールの開発が必要である。

2. 研究の目的

任意の蛋白質を生体膜上で相互作用させることができるようになれば、生体膜を足場とする種々の分子間相互作用を、単純化した実験系に置き換えて解析可能となる。そこで本研究は、膜結合型抗体を細胞膜や核内膜に特異的に発現させることで、生体膜という「場」における分子間相互作用の役割を解析するためのツールを開発することを目的とした。

具体的な目標は以下の通りである。モデル実験として用いる抗体は、汎用性が高い Myc タグと HA タグに対するモノクローナル抗体とする。これらは分泌型の抗体であるためハイブリドーマから得た cDNA には膜貫通ドメインがコードされていない。そこで膜結合型の H 鎖を作成するため、ゲノム DNA より H 鎖の膜貫通ドメイン (TM) のコード領域をクローニングして付加する。一方、細胞内に抗体分子を発現させる場合は、H 鎖と L 鎖をつなぐ S-S 結合は、還元状態の細胞内では形成されないため、H 鎖と L 鎖を繋げた「一本鎖抗体」を作成する必要がある。この一本鎖抗体が機能することを確認したのち、これを核内膜の核質側に配向させて発現させるため、N 末が核質に配向する核内膜蛋白質の局在シグナルを用いる。核内膜結合型一本鎖抗体が機能することは Myc か HA タグを付けた蛍光蛋白質 Venus の局在により確認する。このような手順でまず実験系を確立する。もしそれが成功したならば、様々な応用が可能となる。その例として、細胞間隙におけるタグ付き分泌性蛋白質の細胞膜結合型抗体

との相互作用による分布への影響、タグ付き転写因子と核内膜結合一本鎖抗体との相互作用による遺伝子発現への影響などが考えられる。

3. 研究の方法

Myc と HA タグのモノクローナル抗体の遺伝子を改変することで膜結合型抗体ならびに一本鎖抗体を作成し、抗原との結合特異性や抗体の細胞内局在や配向性を検討する。コンストラクト作成用のベクターは当研究室で改変した pCS107mT を用いる。このベクターは SP6 RNA ポリメラーゼで *in vitro* 転写が開始され、3' 側にある SP6 ターミネーターで終結するようになっている。転写反応液には m7GpppG を加えることで、5' 側にキャップ構造をもつ mRNA を合成する。

まず H 鎖と L 鎖の cDNA を pCS107mT に組み込んだコンストラクトを作成し、それら 2 つ合成 mRNA をアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 胚の 4 細胞期割球の動物極側へ顕微共注入し、胚を原腸胚期まで発生させる。抗体コンストラクトの抗原認識活性は、Myc あるいは HA タグを付加した蛋白質の mRNA を共注入して、原腸胚で回収し、胚抽出液をプロテイン A/G で共免疫沈降させ、ウエスタンブロットで検出する。

抗体コンストラクトの抗体活性が期待通りに得られたならば、膜結合型抗体あるいは一本鎖抗体を作成し、それを用いて以下のモデル実験を行う。

(1) 細胞間隙における分泌性蛋白質の動態の解析。分泌型蛍光蛋白質 Venus は細胞間隙に分泌されていることが予想されるにもかかわらず、蛍光シグナルが検出されない。そこで膜結合型抗体を発現させた細胞に HA タグ付き SP-Venus (SP-Venus-2HA) が集積するかを検討することで、分泌性蛋白質の細胞間隙での動態における細胞膜との相互作用の重要性を解析する。

(2) 核内膜局在型の膜結合型抗体の作成と核内膜上での相互作用の解析。一本鎖抗体を作成し機能することを確認した後、核内膜局在一本鎖抗体を作成する。それを発現させた細胞で、HA タグ付きの importin や核蛋白質を内膜上に捕捉させて遺伝子発現等への影響を解析する。

(3) 細胞間における張力の測定。膜結合型抗体とタグ付き FRET 力学プローブを細胞間で繋ぎ、胚の発生過程における細胞間張力の検出と、領域ごとの違いを比較検討する。

(4) 細胞間の架橋の形態形成に及ぼす影響の解析。膜結合型抗体と膜結合型タグを隣接した細胞にそれぞれ発現させることで、細胞間を架橋させ、それによる発生への影響を検討する。

以上により本研究で開発した解析ツール

の有効性を示す。

4. 研究成果

(1) 抗体 cDNA のクローニングと膜結合型抗体の作成。抗 HA と抗 Myc 抗体の H 鎖と L 鎖の cDNA をハイブリドーマ 9E10 (抗 Myc) と 12CA5 (抗 HA) からクローニングした。5' 側は 5' RACE を行って得た。抗体と抗原を発現させたアフリカツメガエル胚の胚抽出液を用いて共免疫沈降を行いウエスタンブロットで解析したところ、抗 HA 抗体と抗 Myc 抗体はそれぞれ HA タグ付きと Myc タグ付きの抗原蛋白質を沈降させた。一方、逆の組合せでは Myc タグ付きと HA タグ付きの抗原蛋白質は沈降させなかった。したがって、胚に発現させた抗体は予想通り抗原特異的に結合する抗体として機能することが示された。このようにアフリカツメガエル胚へ H 鎖と L 鎖抗体 mRNA を共注入して、抗体活性を得ることに初めて成功した。

次に膜結合型抗体のコンストラクトを作成し、抗 HA 膜結合型抗体を発現させたところ、HA タグ付き分泌性蛍光蛋白質 Venus を捕捉することが示された。この実験から 2 つの重要な知見が得られた。まず第 1 に、膜結合型抗体が予想通り抗体部位を細胞外に配向して存在し抗原と結合することが示された。第 2 に、分泌型 Venus を発現させても細胞間隙に蛍光は検出されないが、膜結合型抗体が存在するところでは検出されたことである。つまり、分泌型 Venus は確かに分泌されているにもかかわらず、結合するものがないところではそこに留まることができず検出されないことが初めて実験的に示された。逆に言えば、もし蛍光蛋白質で標識した蛋白質が細胞間隙で蛍光が検出されたならば、その蛋白質は細胞膜上の何らかの分子と相互作用していると結論される。このように細胞間隙における蛋白質の動態の原理が明らかになったことで、今後この観点から、分泌性蛋白質の動態解析が可能となった。

(2) 一本鎖抗体 (scFv) の作成。抗体を一本鎖で機能できれば、単一の mRNA の注入で抗体分子が作られることになり、取扱いが便利となる。そこで scFv を作成した文献を参考にして、H 鎖の後に L 鎖の cDNA を繋げることで scFv コンストラクトを作成した。この抗体をアフリカツメガエル胚に発現させて細胞外に分泌させ、抗体として機能するかを共免疫沈降・ウエスタンブロットで検討したところ、抗体活性が確認された。今後この抗体を核内膜局在蛋白質に融合させることで、核内膜局在と抗体活性の有無について調べることが可能となった。

(3) 力学的な相互作用の解析。細胞間の力学的な相互作用の解析のため、張力の大きさによって FRET 効率が変化する張力センサー

モジュール (TSMoD) を入手し、それに Myc タグと膜貫通ドメイン (TM) を融合させた Myc-TSMoD-TM を構築した。それを隣接する細胞の一方に発現させ、他方に抗 Myc 膜結合型抗体を発現させることで、抗原抗体反応で細胞間に架橋させることを目論んだ。しかし期待したほど FRET 効率の劇的な変化は認められなかった。今後はより厳密な測定方法の開発が必要と考えられる。

(4) 細胞間架橋による発生への影響。上記の (3) の解析過程で、抗 Myc 膜結合型抗体と Myc-TSMoD-TM により細胞間が架橋され、それにより発生異常が引き起こされることが見出された。この結果は、シグナル伝達に関わらない分子を用いて、人為的にかつ力学的に細胞間の滑りを阻害することが可能となったことを示している。今後この方法を用いることで、発生における細胞運動と力学的な滑りの強さとの関連性を検討できると考えられる。

5. 主な発表論文等

(本研究成果の一部は投稿中)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Sudou, N., Yamamoto, S., Ogino, H. and Taira, M. (2012). Dynamic in vivo binding of transcription factors to cis-regulatory modules of *cer* and *gsc* in the stepwise formation of the Spemann-Mangold organizer. *Development* 139, 1651-1661.

2. Moriyama, Y., Kawanishi, T., Nakamura, R., Tsukahara, T., Sumiyama, K., Suster, M., Kawakami, K., Toyoda, A., Fujiyama, A., Yasuoka, Y., Nagao, Y., Sawatari, E., Shimikzu, A., Wakamatsu, Y., Hibi, M., Taira, M., Okabe, M., Naruse, K., Hashimoto, H., Shimada, A., Takeda, H. (2012). The medaka enhancer mutant for *zic1/zic4* provides molecular insights into teleost caudal fin evolution. *Curr. Biol.*, 22, 601-607.

[学会発表] (計 3 件)

1. Masanori Taira and Yusuke Mii "Heparan sulfate nanostructures regulate extracellular Wnt distribution and act as a core for Wnt/Dishevelled signalosome formation" (三井、口頭発表) 14th International Xenopus Conference, Giens Peninsula (France) (2012 年 9 月 9 日~13 日)

2. Yusuke Mii, Kenichi Nakazato, Atsushi Mochizuki and Masanori Taira "Frzb

regulates extracellular distribution of Wnt8 via interactions with heparan sulfate”, (三井、口頭発表およびポスター発表) Wnt 2011 Meeting, UCLA, California, U.S.A. (2011年6月29日～7月3日)

3. Yusuke Mii, Kenichi Nakazato, Atsushi Mochizuki and Masanori Taira “Secreted Frizzled-related proteins (sFRPs) regulate extracellular distribution of Wnt ligands via interactions with heparan sulfate.” (分泌性 Frizzled 関連蛋白質 (sFRPs) はヘパラン硫酸を介して細胞外の Wnt リガンドの分布を制御する。) (三井、口頭発表およびポスター発表) 『日本発生生物学会第44回大会』、OP03-01 (P-1138)、沖縄コンベンションセンター、2011年5月19～21日

[その他]

ホームページ等

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/1mb/index.php?Home>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平良 眞規 (Taira Masanori)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号：60150083

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし