

## 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 5日現在

機関番号：13901  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011 ～ 2012  
 課題番号：23760748  
 研究課題名(和文) 新規ネイティブフォームGPCR提示システムによる抗GPCR抗体アッセイ法の創製  
 研究課題名(英文) Construction of assay method for detection of anti-GPCR antibody  
 研究代表者  
 秋山 真一 (AKIYAMA SHINICHI)  
 名古屋大学・医学系研究科・特任講師  
 研究者番号：20500010

## 研究成果の概要(和文)：

次世代の組換えタンパク質発現宿主である小型魚類のゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) 初期胚を用いて、ヒト膜タンパク質の一つである Phospholipase A2 receptor (hPLA2R) をネイティブフォームの立体構造を保ったまま効率良く調製することに成功し、得られたリコンビナント hPLA2R を抗原として、hPLA2R の立体エピトープを特異的に認識する特発性膜性腎症患者由来イムノグロブリン G を測定することに成功した。

## 研究成果の概要(英文)：

Using zebrafish, *Danio rerio*, embryo which is known for next generation recombinant expression host, a recombinant human phospholipase A2 receptor (hPLA2R) protein, a kind of membrane associate protein, with native-form conformation was successfully generated. Moreover, we demonstrated that anti-hPLA2R IgG which recognize a epitope structure from patient with membranous nephropathy were successfully measured with this recombinant hPLA2R protein as antigen.

## 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	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 研究分野：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：ゼブラフィッシュ、抗体測定、ネイティブフォーム抗原、膜タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

現代の医学をもってしても極難治性疾患の代表格である自己免疫疾患の研究や、分子標的医薬として需要と市場規模が共に著増している抗体医薬の研究では、ヒトの生体内に存在する抗原タンパク質のネイティブフォームの立体構造を認識する抗体分子の機能解析が極めて重要である。一方、自己免疫疾患を引き起こすような抗原タンパク質や抗体医薬の標的となる抗原タンパク質には、膜タンパク質、特に G 蛋白質共益型受容体 (GPCR) が多く存在する。したがって、これらの研究では膜タンパク質をネイティブフ

ォームの立体構造を保ったまま抗原として調製し、研究対象となる抗体分子の機能解析を進める必要がある。しかしながら、ヒト膜タンパク質に対する抗体の機能解析を、現実的なコストと時間で実施できる適切な実験プラットフォームが存在しないことが、自己免疫疾患研究や抗体医薬開発を進める上で大きなボトルネックとなっている。すなわち、組換え体ヒトタンパク質の宿主として従来から汎用されている CHO 細胞や HEK 細胞などの哺乳類培養細胞の膜タンパク質の発現効率は極めて低い。この理由としては、膜タンパク質は生命維持において重要な機能を

担っていることが多いため、強力な発現プロモーターを用いて強制的に発現させようとしても、発現を抑制する方向にフィードバックがかかったり、細胞死が誘導されたりすることが言われている。さらに、培養細胞は裸の細胞を培養するために培養スケールや攪拌速度などの変化によって、立体構造を維持する上で重要な糖鎖のパターンが変化する問題を抱えている。

このように、ヒト膜タンパク質の立体構造を認識する抗体の機能解析研究に最適な評価系プラットフォームの開発が待ち望まれている。

一方、本研究代表者らは、世界で初めて魚類初期胚細胞を発現宿主としたヒト膜タンパク質リコンビナント発現システムを開発し、これまでに従来の哺乳動物培養細胞では生産困難だったオーファン GPCR である leucine-rich repeat containing G-protein coupled receptor (LGR)をはじめ、発現を試みた種々のヒト膜タンパク質の全てにおいて、それらの発現・生産に成功した。

## 2. 研究の目的

本研究の一番の特色は、本研究代表者らが開発した“魚類初期胚細胞によるヒト膜タンパク質リコンビナント発現システム”を応用して、ゼブラフィッシュに抗原となるヒト膜タンパク質を発現・生産させて、抗体の機能評価を行うことである。また、魚類はヒト型糖鎖修飾機構を有しており、ヒト型翻訳後修飾を伴った機能的なタンパク質の生産が可能で、さらに、哺乳動物細胞系と比べて、培地が水道水で済む魚類初期胚の培養コストはその数十万分の一と極めて安価で、タンパク質発現時間が1~2日間と短く、トランスジェニック個体を繁殖させて容易に収量増大も図れるなど、生産コストと生産期間において極めて大きな優位性を有している。また、品質面でも、魚類初期胚は卵膜に囲まれた閉鎖的なバイオリアクターカプセルであるため、哺乳類培養細胞のように裸の細胞を培養する場合に比べて、糖鎖修飾が極めて安定している。

一方、これまで立体構造を保ったヒト膜タンパク質に対する抗体の評価系の開発が困難だった理由として、抗ヒト膜タンパク質抗体を検出するためには抗原となる立体構造を保ったヒト膜タンパク質が必要だが、既存の組換えタンパク質発現系ではリコンビナントヒト膜タンパク質の発現効率が極めて悪いこと、稀に発現させることができても立体構造を保ったまま精製や提示させる技術が無かったことが挙げられる。本研究では、“魚類初期胚細胞によるヒト膜タンパク質リコンビナント発現システム”を用いることでネイティブフォームのヒト膜タンパク質

を発現しようとする点で独創的である。

本研究課題の遂行によって、ネイティブフォームの立体構造を保ったヒト膜タンパク質を認識するヒト抗体の機能解析が著しく進展し、自己免疫疾患研究や抗体医薬品開発のスピードアップと低コスト化に多大な貢献をすることが期待されると考えた。

本研究では、小型実験魚類として注目されるゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) にヒト由来膜タンパク質の cDNA を遺伝子導入し、発現したヒト膜タンパク質を抗原として用いて、抗原のネイティブフォームの立体構造に依存的に結合活性を有する抗ヒト膜タンパク質抗体の評価系の開発を目指す。さらには、本システムの実証しけんとして、患者から採取した抗原の立体構造を認識する自己抗体の検出を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗原タンパク質および評価用抗体セットの選定と材料の入手

本研究の目標は、既存の組換えタンパク質発現系では現実的な予算と時間で調製が困難なヒト膜タンパク質 (例えば、GPCR) のネイティブフォームの立体構造を認識する抗体の評価系を構築することであることから、抗原タンパク質の選定に当たっては、抗原の立体構造 (立体エピトープ、不連続エピトープ) を認識する抗体が存在する抗原をモデル抗原-抗体セットとして選定した。実験計画の段階においては、抗原-抗体セットのモデルとしてヒト Ca sensing receptor を抗原とすることを想定していたが、ヒト Ca sensing receptor の立体構造を認識する動物由来抗体および患者由来抗体の入手が困難だったことから、抗原-抗体セットを自己免疫疾患である特発性膜性腎症の責任抗原として知られる human Phospholipase A2 receptor (hPLA2R) とそれに対するウサギポリクローナル抗体および特発性膜性腎症患者由来 IgG に決定した。

### (2) 遺伝子発現用コンストラクトの構築

ゼブラフィッシュ発現用ベクターとして三重大学生物資源学部の田丸浩博士より分与して戴いた pZex-GFP-His を用いた。なお、pZex はゼブラフィッシュ孵化腺酵素遺伝子のプロモーターを搭載しており導入遺伝子を孵化腺細胞特異的に発現させることができる。pZex のプロモーター領域と GFP cDNA との間に、hPLA2R の cDNA をインフレームとなるように Gap repair cloning 手法を用いて挿入して、pZex-hPLA2R-GFP-His を構築した。各プラスミド DNA は Top10 *E. Coli* (Invitrogen) で増幅し、PlasmidPrep kit (Qiagen) を用いて OD260/280 比=1.7 以上に精製した。

### (3) ゼブラフィッシュの維持、採卵および遺伝子導入

本研究に供試したゼブラフィッシュは、ゴールドタイプ野生型および AB 系統を用いた。ゼブラフィッシュは、明期 14 時間、暗期 10 時間周期の下、アルテミア幼生を一日一回、飽食給与して、性成熟が認められるまで飼育した。受精卵の採取は、採卵用水槽に雌雄ペアとなるように収容し、日周周期に合わせた光刺激により産卵を誘発させて行った。産卵された受精卵を直ちに回収して、マイクロインジェクション法による遺伝子導入を行った。すなわち、インジェクション針は、ガラス製キャピラリー (Narishige, GD-1) を、プラー (NARISHIGE, PB-7) を用いて針状に引き延ばし、針先端を 30 度の角度に研磨機 (NARISHIGE, EG-4) で研磨して調製した。マイクロインジェクション用のアガプレートは、スライドガラスを 90mm プラスティックシャーレに立てかけて熱溶解した 2%アガーを流し込んで固めてから、スライドガラスを取り外してゼブラフィッシュ受精卵が一行にアレイン可能な V 字溝を作った。注入するプラスミド DNA は、滅菌蒸留水にて 50-100 ng DNA/ $\mu$ l となるように調製し、20 $\mu$ l のサンプル溶液に対して 0.5 $\mu$ l のフェノールレッド指示薬 (Sigma) により着色した。マイクロインジェクションは、マイクロインジェクション用のアガプレートに受精卵を並べて微量注入装置 (NARISHIGE, IM-90) を用いて手動にて行った。なお、インジェクション操作はできる限り 1 細胞の間 (30-40 分以内) に行った。マイクロインジェクション後のゼブラフィッシュ受精卵は 0.001%のメチレンブルーを含有する E3 バッファーを満たした滅菌 90mm シャーレに収容し、28°C に保持したインキュベーター内にて培養した。

### (4) 導入したヒト膜タンパク質の発現確認

蛍光顕微鏡による発現確認：遺伝子導入した hPLA2R-GFP 融合タンパク質の発現確認は、マイクロインジェクションから約 24 時間後に蛍光実体顕微鏡を用いてゼブラフィッシュの孵化腺細胞に現れる GFP の緑色蛍光に基づいて判定した。蛍光顕微鏡は GFP 用フィルターを搭載した Zeiss Lumor V12 を用いた。続いて、GFP の緑色蛍光が認められた個体のみを選別・収集して、さらに培養を継続し受精後 48 時間に孵化時期に達したサンプルを回収した。なお、孵化時期にサンプルを回収する理由は、孵化腺酵素プロモーターで発現誘導されるリコンビナントタンパク質の発現量が孵化時に最大値に達するためであり、それ以降になると孵化腺細胞自体が消失するためリコンビナントタンパク質の収量も

減少する。

### (5) 魚類組換えヒト膜タンパク質を抗原とした各種抗体の検出

①ホールマウント免疫染色による組換えタンパク質の検出：受精後 48 時間にサンプリングしたゼブラフィッシュ稚魚は、共存する E3 バッファーを除去してから 4%パラフォルムアルデヒド PBS (ファルマ) に浸漬して 4°C で 24 時間固定後、75%PBS/25%メタノール、50%PBS/50%メタノール、25%PBS/75%メタノール、100%メタノールに順に置換して脱水し、染色操作を行うまで -30°C で保存した。免疫染色に先立ち、サンプルをメタノールおよび PBS を適宜濃度で混合した溶液で再水和し、最終的に Tween 20 を 0.05%含む PBS (PBST) にバッファー置換した。さらに、Protenase K 溶液 (Sigma) に浸漬して 37°C で適宜インキュベートした後、ブロッキングワン (ナカライ) に浸漬して 37°C で 60 分間ブロッキング操作を行った。続いて、検出したい抗原タンパク質特異的な一次抗体を PBST で 1/100~1/2000 希釈した一次抗体溶液に浸漬して 37°C で 2 時間または 4°C で一晩インキュベートした。37°C に加温した PBST で 15 分間×4 回洗浄した後、一次抗体に適した Alexa 色素標識二次抗体を PBST で 1/1500 希釈した二次抗体溶液に浸漬して 37°C で 2 時間または 4°C で一晩インキュベートした。37°C に加温した PBST で 15 分間×4 回洗浄した後、蛍光実体顕微鏡を用いて抗原の存在を確認した。

②ウエスタンブロットによる組換えタンパク質の検出：受精後 48 時間にサンプリングしたゼブラフィッシュ稚魚は、共存する E3 バッファーを除去してから分析に供するまで -80°C で保存した。ゼブラフィッシュ稚魚を収容したエッペンドルフチューブに RIPA buffer (SIGMA) を適宜容量加え、21G 注射針を備えた 1ml 容ディスプレイサブルプラスティックシリンジにてサンプルを溶解した。溶解後のサンプルの一部を用いて、Bradford 法によりタンパク質濃度を測定した。続いて、アクリルアミド電気泳動によるタンパク質の分離を行った。PBS で適宜希釈した各サンプル 10 $\mu$ l に対して 3.3 $\mu$ l の Novex 4x LDS sample buffer (Invitrogen) を加えて、70°C で 10 分間加熱処理してから、NuPAGE 3-8% 15well Tris-acetate アクリルアミドプレキャストゲル (Invitrogen) の各ウェルにアプライし、150V 定電圧で 60 分間泳動した。泳動後のゲルは直ちに iBlot トランスファー装置

(Invitrogen) を用いて PVDF 膜へ転写し、転写後の PVDF 膜をブロッキングワン (ナカライ) に浸漬して室温で 30 分間反応させブロッキングした。続いて、検出したい抗原タンパク質特異的な一次抗体を 5%ブロッキングワン含有 PBST で 1/100~1/10000 希釈した

一次抗体溶液に浸漬して37°Cで1時間または4°Cで一晩反応させた。その後、PVDF膜をPBSTで5分間×3回洗浄してから、一次抗体に適したHRP標識二次抗体を1/7500~1/15000希釈した二次抗体溶液に浸漬して37°Cで1時間または4°Cで一晩反応させた後、PBSTで5分間×3回洗浄し、PVDF膜をHRPの基質であるImmunoStar (Wako) に浸漬してからゲルイメージャーLAS4000 (GE) を用いて、目的タンパク質に結合した一次抗体を検出した。なお、hPLA2Rに対する患者由来IgGはhPLA2Rのジスルフィド結合に支持された立体構造(立体エピトープ)を認識するため、その検出においてウエスタンブロットの全行程にDTTなどの還元剤は使用しなかった。

#### 4. 研究成果

##### (1) 蛍光観察による導入遺伝子の発現確認

hPLA2R cDNAにレポーターとしてGFP cDNAを連結したpZexプラスミドおよびhPLA2R cDNAを含まないpZexプラスミドを、各々ゼブラフィッシュ受精卵にマイクロインジェクションした結果、いずれの区においても受精後24~72時間において孵化腺細胞特異的にGFPの発現を認めた。受精後48時間における生残率およびGFP陽性率はいずれの区でもそれぞれ50%および30%で、hPLA2R cDNAの融合発現の有無に基づくGFP発現率の差異は認められなかった。

##### (2) ホールマウント染色による導入遺伝子の発現確認

pZex-GFP-Hisで形質転換したゼブラフィッシュ稚魚、ならびに、pZex-hPLA2R-Hisで形質転換したゼブラフィッシュ稚魚を用いて、それぞれ抗Histagモノクローナルマウス抗体(MBL)および抗hPLA2Rポリクローナルウサギ抗体(Atlas)を一次抗体とするホールマウント免疫染色を行った結果、pZex-GFP-Hisで形質転換したゼブラフィッシュ稚魚の孵化腺においてHisタグを検出することに成功したが、pZex-hPLA2R-Hisで形質転換したゼブラフィッシュ稚魚の孵化腺ではhPLA2Rを明瞭な染色像により検出することができなかった。そこで、膜性腎症患者血清由来抗PLA2R IgGを一次抗体として同様にホールマウント免疫染色を試みたが、PLA2Rを検出することはできなかった。この理由として、一次抗体の特性の差異やhPLA2R-GFP-Histag融合タンパク質と一次抗体が何らかの理由により接触できないことが推察された。

##### (3) ウエスタンブロットによる導入遺伝子の発現確認

pZex-GFP-Hisで形質転換したゼブラフィッシュ稚魚の粗抽出液を抗原試料として抗

Histagマウスモノクローナル抗体(MBL)を一次抗体としたウエスタンブロットを行い、既知濃度のGFP-Hisタグタンパク質を流したレーンとのシグナル値を比較した結果、受精後48時間のゼブラフィッシュ稚魚一頭あたり数百pgの組換えタンパク質が発現していることを確認した。

さらに、pZex-hPLA2R-GFP-Hisで形質転換したゼブラフィッシュ稚魚の粗抽出液を抗原として抗hPLA2Rウサギポリクローナル抗体(Atlas)を一次抗体としたウエスタンブロットを行った結果、一頭あたりの発現量がGFP-Histagと同程度のhPLA2R-GFP-Histag組換えタンパク質が発現していることを確認した。

##### (4) 魚類で生産した組換えヒト膜タンパク質を用いた患者由来立体構造特異的イムノグロブリンの検出

pZex-hPLA2R-GFP-Hisで形質転換したゼブラフィッシュ稚魚の粗抽出液を抗原として、特発性膜性腎症患者から採取した抗hPLA2R自己IgGを一次抗体とした非還元条件下ウエスタンブロットを行った結果、抗原PLA2Rタンパク質の立体エピトープを厳しく認識する患者由来抗hPLA2R IgGを特異的に検出することに成功した。さらに、複数の患者由来IgGを用いて解析した結果、IgG量や力価を反映したシグナル値が得られた。

以上の結果より、ゼブラフィッシュ初期胚で生産したhPLA2Rリコンビナントタンパク質はジスルフィド結合で支持された立体エピトープを認識する患者由来IgGの検出に利用できることが明らかとなった。ゼブラフィッシュ受精卵の生産に係るコストや時間、遺伝子導入の容易さ、繁殖させてトランスジェニック系統化することにより組換えタンパク質を半永久的に稚魚から回収できる本組換えタンパク質発現系のアドバンテージを踏まえると、従来はヒト培養細胞を宿主としても非常に低効率(培養1Lあたり数ng)にしか生産できなかったhPLA2Rのようなヒト膜タンパク質を、そのネイティブフォームの立体構造を保存したまま組換え生産できるゼブラフィッシュ初期胚を用いた本システムは、今後、自己抗体の定性定量だけでなく、抗体医薬品の開発などにも重要な基盤技術となる可能性が示唆された。

#### 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) E. Avsar-Ban, H. Ishikawa, S. Akiyama, H. Manya, T. Endo, Y. Tamaru. Functional and heterologous expression of human

protein O-linked mannose  $\beta$  -1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1 in zebrafish. *J. Biosci. Bioengin.*, 査読有, 2012, 114(2):237-239.

(2) H. Nakajima, Y. Nakajima-Takagi, T. Tsujita, S. Akiyama, T. Wakasa, K. Mukaigasa, H. Kaneko, Y. Tamaru, M. Yamamoto, M. Kobayashi. Tissue-restricted expression of Nrf2 and its target genes in zebrafish with gene-specific variations in the induction profiles. *PLoS ONE*, 査読有, 2011, 6(10):e26884.

[学会発表] (計4件)

①S. Akiyama, S. Maruyama, S. Matsuo, E. Imai, Development of ELISA for detection of anti-phospholipase A2 receptor autoantibodies as a biomarker of idiopathic membranous nephropathy, 55<sup>th</sup> Annual meeting of the Japanese Society of Nephrology, Yokohama, 2012年6月1日.

②S. Akiyama, S. Maruyama, S. Matsuo, E. Imai, Development of ELISA for detection of anti-phospholipase A2 receptor autoantibodies as a biomarker of idiopathic membranous nephropathy, CKD Frontier, Nagoya, 2012年2月18日.

③S. Akiyama, T. Ozaki, S. Maruyama, H. Yokoyama, G. Lambeau, D. Salant, S. Matsuo, E. Imai, “Prevalence of autoantibody against PLA2R1 in patients with membranous nephropathy in Japan”, American Society of Nephrology 2012, アメリカ合衆国 San diego, 2012年11月3日.

④秋山真一、アヴシヤル坂恵利子、石川文啓、田守彩子、萬谷博、遠藤玉夫、田丸浩、魚類発現系による活性型組換えヒト POMGnT1 タンパク質の生産、第63回日本生物工学会大会、東京、2011年9月27日.

[図書] (計3件)

(1) 秋山真一、今井圓裕、医薬ジャーナル社、医薬ジャーナル2012年11月号 (Vol. 48 No. 11)、腎疾患診療の最前線 3. 膜性腎症の抗 PLA2R 抗体測定 of 現状と展望、2012、P71(2565)-76(2570).

(2) 秋山真一、日本生物工学会誌、90巻4号、第3の水産業への期待、2012、199.

(3) 秋山真一、田丸浩、食のバイオ計測の最前線-機能解析と安全・安心の計測を目指して- 7 バイオ計測への魚類バイオテクノロジーの応用、2011、CMC 出版.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋山 真一 (AKIYAMA SHINICHI)

名古屋大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号：20500010

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし