

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460551

研究課題名(和文) HIVによるT細胞脂質ラフト機能停止の抗ミリストイル基ダイアボディによる機能回復

研究課題名(英文) Recovery of functional suspend of T-cells membrane lipid raft caused by HIV using anti-myristoylation diabody.

研究代表者

林 宣宏 (HAYASHI, Nobuhiro)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：80267955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： 独自に開発した抗ミリストイル基抗体を脂質ミセル存在下でミリストイル化された HIV-Nefと混和すると、遠心してもHIV-Nefは脂質ミセルと共沈せず、この抗体がHIV-Nefと膜との相互作用を抑えることが分かった。

次に、抗体ライブラリーを用いて、特異性が非常に高く、解離定数が10のマイナス9乗の抗HIV Nef抗体を開発した。

この抗体に先の抗ミリストイル基抗体をつなげたダイアボディを作成した。これを用いて細胞膜を模した脂質ミセルとHIV-Nefとの相互作用の阻害実験を行った結果、プレリミナリーではあるが、HIV-Nefの膜への相互作用を抑えるという結果を得た。

研究成果の概要(英文)： Addition of original anti-myristoylation antibody reduced precipitation of myristoylated HIV-Nef in the presence of lipid micelle, and this result indicates inhibitory effect of the antibody restraining interaction between myristoylated molecules and lipid membranes.

Next, anti HIV-Nef antibody with capacities of high specificity and low dissociation constant (10^{-9}) was developed by original antibody library technique.

A diabody was constructed by a fusion of the antibody with the anti-myristoylation antibody. Addition of the diabody preliminary reduced precipitation of myristoylated HIV-Nef in the presence of lipid micelle again. The remaining subject is specificity of the diabody to myristoylated proteins in the cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミリストイル化 抗体 HIV AIDS membrane lipid raft 抗体ライブラリ

1. 研究開始当初の背景

ミリスティル化(飽和脂肪酸による翻訳後修飾)タンパク質は細胞膜との可逆的な相互作用によって、細胞の状態に応じて細胞膜と細胞質を移行することで様々な生理機能を担っていることを申請者は明らかにしてきた(*Protein Science* **9**: 1905-1913, 2000、*J.Biol.Chem.* **278**: 48898-48902, 2003、*J.Mol.Biol.* **338**: 169-180, 2004、*Proc.,Jpn., Acad.,Ser.B*, **86**:494-508, 2010)。感染後に発現すると宿主細胞内でミリスティル化される HIV の nef 遺伝子産物(HIV-Nef)は、生体内にもともと存在する他のミリスティル化タンパク質の働きに介在することでT細胞の機能を停止し、AIDS が発症すると考えられている(*Protein Science* **11**: 529-537, 2002、*Protein Sci.* **14**: 494-503, 2005)。遺伝子変異によりミリスティル化されないようになった Nef を有する感染者では AIDS が発症しないことから、Nef の機能にはそのミリスティル基が必須であることが分かった。さらに、ミリスティル化タンパク質の多くが細胞膜脂質ラフトにおいて機能することから、Nef も T細胞のラフトにおいてその機能を阻害すると考えられる。

ミリスティル化蛋白質は細胞の状態に応じてラフトから離れたり、あるいは、付け加わったりすることでラフトの機能チェンジを担っているが、迅速かつ柔軟にラフトが機能するためには、ミリスティル化蛋白質が状況に応じてすんなりとラフトから離れなければならない。それを可能としているのは、ミリスティル基と膜との弱い相互作用である。Nef のミリスティル化が AIDS の発症に必須であるということは、T細胞を殺すこと無くその機能だけを停止するには、この弱い相互作用が必須であることを示唆している。そこで申請者らは、以下のように、弱い相互作用を調べるために有効なタンパク質の部位特異的標識法を開発した。これまで、細胞内の分子の挙動に関する研究は数多く行われてきたが、その際、分子の位置を可視化するプローブの付与が不可欠となる。その代表的なものは GFP であるが、その分子量は 27k もあり (HIV-Nef の分子量も約 27k)、また、付与出来る場所も基本的にはタンパク質の両端に限られていた。この場合、膜貫通ドメインを有し、膜に埋没して遊離しないような膜タンパク質の挙動を調べる場合は有効だが、ミリスティル化タンパク質の場合には、その膜との相互作用が弱いので、GFP を融合させると分子量が大きくなって膜につなぎとめることが出来なくなってしまふ。そこで申請者らは、サプレッサー-tRNA を、変異体アミノアシル tRNA 合成酵素を用いて非天然アミノ酸であるアジドチロシンでアミノアシル化し、ストップコドンを導入した任意の位置にアジドチロシンを導入することで、アジドチロシンを介して任意のプローブを導入できる技術を開発した(*J.Biochem.* **141**:

335-343, 2007、*J.Biochem.*, **153**,317-326, 2013)。この手法により、追跡対象分子の生理機能に影響を与えない部位に、その動きを阻害しない軽くて小さなプローブ(蛍光素子)を導入できる。また、異なる分子それぞれに異なる色を導入することで、複数の分子の挙動の同時観察が可能となった。

他方、申請者らは、細胞内の全タンパク質の 1%弱がミリスティル化されていることも明らかにした(*Genome Biology* **5**: Article **R21**, 2004)。この結果をうけて、リン酸化や糖鎖修飾と同様に、各タンパク質のミリスティル化の状態を簡便に調べる方法が求められたが、これまではタンパク質のミリスティル化を検出する簡便な方法は存在しなかった。ミリスティル基は化学的に安定なので化学反応による検出は難しい。次に抗体による検出が考えられるが、ミリスティル基の化学構造は生体膜の構成成分と酷似しているため、通常の動物免疫法ではミリスティル基で免疫しても、自己免疫反応を避けるために免疫応答が惹起されず、抗体を得るのも困難であった。そこで、申請者らは独自の抗体ライブラリー法(特願 2007-058458、出願日:2007年3月7日)を用いて、さらに、抗原を工夫することで、抗ミリスティル基抗体の開発に成功した(特願 2013-088891、出願日:2013年4月19日)。

2. 研究の目的

その機能不全が各種疾患の原因となる脂質ラフトの作動原理を、細胞の状態に応じてその構成因子がどのように変化し、どのように配置を変えてラフトの機能を制御しているのかを調べることで明らかにする。その過程でどこがどのように破綻、あるいは、操作されると、どのようなラフトの機能障害を生じ、それが疾患の発病にどのようにつながるのかを、HIV-Nef が AIDS 発症 (T細胞の機能停止) のためにどのようにラフトの機能を抑えるのかを観察することで同定する。さらに、新たに HIV-Nef の機能を抑えるダイアボディを開発し、どのタイミングで HIV-Nef の機能を抑えれば T細胞の機能停止を阻止出来るのか、すなわち、AIDS の発症を回避出来るのかを調べて、治療法の開発にもつながる知見を得る。

本研究では、細胞が外部刺激に対して迅速かつ、適切に応答するために細胞膜近傍で機能していて、その機能不全が各種疾患の原因となる脂質ラフトの作動原理を、そこでのシグナル処理を担うミリスティル化タンパク質に着目して解明する。そのために、ラフトにおけるミリスティル化タンパク質の機能を最も効果的に阻害していると考えられる HIV-Nef を手がかりにする。HIV-Nef がどのようにラフトの機能を停止しているのかが解れば、ラフトがどのように機能しているのか、その本質を理解できる。さらに、本研究で使用するプローブは、対象疾患治療のための分

子標的薬のプロトタイプとなる。

本研究は、弱い相互作用を観るための手法（部位特異的タンパク質標識法）、および、その弱い相互作用を制御できる手法（抗ミリストイル基抗体）の開発に成功した状況で立案された。

予測不可能な環境の変化に迅速、かつ、適切に対処するために機能しているマイクロドメインの形成（構成因子による秩序形成）と、その自立的な時間発展には、構成因子間の弱い相互作用（KDが 10^{-5} 以下）が本質的に重要である。この弱い相互作用は構成因子の結合様式を素早く組み替えることで迅速な応答を可能とするだけでなく、平時における構成因子の秩序構成にも大きなふれ幅を生じさせ（常に秩序構造が変化して（“揺れて”）いる）、それにより緊急時の適切な秩序構成の選択を可能としていると考えている。HIVは、その遺伝子産物である Nef によって、本来は感染宿主細胞（T細胞）が使用しているこの弱い相互作用を使って効果的にT細胞の機能を停止しているとする仮説によりその分子機構を解明するということが本研究の特色である。そのために本研究では、これまでは扱いが困難であった分子素子の弱い相互作用を調べることが出来る独自に開発した手法を駆使して解析が行われる。

また、既存の手法では解析が難しい微量な調製ラフトの構成因子の同定を独自のプロテオミクス法で調べる（未来材料、11(1),42-49,2011）。

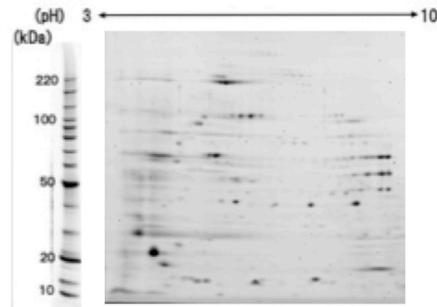
さらに、本研究では新たに開発した抗体を用いて AIDS の治療薬のプロトタイプになるプローブ（ダイアボディ）を作製する。ミリストイル化はがん（Inhibition of protein N-myristoylation: a therapeutic protocol in developing anticancer agents. *Curr Cancer Drug Targets*. 2012 12:667-92.）や様々な疾患の治療対象になる（Protein myristoylation in health and disease. *J.Chem.Biol.*2010 3:19-35）ことが、近年、明らかになった。本研究で開発するミリストイル化タンパク質の機能を制御するダイアボディは、AIDS 以外の、がんをはじめ種々の疾患の治療薬のプロトタイプともなる。

3. 研究の方法

課題1 ラフトの動的構成因子の同定

1) 二次元電気泳動により得られる各スポットを切り出して質量分析することにより、Jurkat 細胞のラフトを構成するタンパク質を網羅的に同定する。プロテオミクスでは良質の二次元電気泳動像を取得することが成否を決定する。申請者は既に HIV の感染宿主細胞であるヒト T細胞由来株細胞である Jurkat 細胞のラフトの良質な二次元電気泳動像を取得するためのサンプルの前処理法と泳動条件を決定済みである（Jurkat 細胞

のラフトの二次元電気泳動像：下図）。



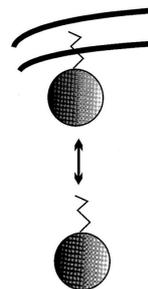
2) Jurkat 細胞を、マイトジェンとして T細胞の活性化に用いられる phytohemagglutinin (PHA)、および、Protein Kinase C が関連する細胞内シグナル伝達系の下流を活性化し、T細胞に添加された場合は NF- κ B パスウェイを活性化することが知られている Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)で刺激した後、ラフトの構成因子を同様に同定する。これを未刺激の細胞の結果と比較することで、PHA/PMA 刺激の前後で変化したラフト構成因子を特定する。

課題2 構成因子の1分子観察

機能を阻害しない部位を蛍光色素で標識した HIV-Nef と、その機能を制御している分子のひとつである calmodulin を HIV-Nef とは異なる色素で標識したものを（蛍光標識分子は作成済み）を、エレクトロポレーションにより刺激を与える前の Jurkat 細胞に導入する（細胞導入条件は GFP を用いて予備的に検討済み）。この細胞の CD4 の発現の有無をチェックし（Nef が CD4 の発現を抑えることが知られている）、PHA/PMA で刺激した後、形態変化を顕微鏡で観察するとともに、HIV-Nef、calmodulin、および、ラフトのマーカーである LAT（GFP と融合させた LAT を発現する Jurkat 細胞を準備済み）の各輝点の動きを観察することで、細胞の刺激のどのタイミングで HIV-Nef や calmodulin がラフトに移行するのかを観察する。

課題3 HIV-Nef の機能を制御するダイアボディの開発

原理：分子標的治療はこれまでも検討されてきたが、標的分子の、①どの部分を、②どのように抑えれば効果的か（ただそこに結合すればよいのか、あるいは、活性化に伴う構造変化を抑える必要があるのか、等）を知ることが困難で、それを何らかの制御分子で実現出来るかも不確かであった。しかしながら、ミリストイル化タンパク質の場合は、ミリストイル基がその機能発現に必須であり、その作用機序（生体膜との相互作用によってミリストイル化タンパク質を膜



につなぎとめる：右図）を鑑

みれば、ミリストイル基になんらかの分子が結合さえすれば、その機能が失われることが解る。分子の活性中心を抑えるのではなくて、細胞内移行をブロックすることでその機能を制御するという戦略である。しかしながら、これまではそのための方法が存在しなかった。本研究では、課題申請者が開発した抗体で病原ミリストイル化タンパク質のミリストイル基を標的化する。

4. 研究成果

課題1 ラフトの動的構成因子の同定

1) Jurkat 細胞のラフトの構成タンパク質を網羅的に同定するためのショットガンプロテオミクスによりラフトを構成する膜タンパク質の特性が解った。

2) Jurkat 細胞を、マイトジェンとして T 細胞の活性化に用いられる PHA および Protein Kinase C が関連する細胞内シグナル伝達系の下流を活性化し、T 細胞に添加された場合には NF- κ パスウェイを活性化することが知られている PMA で刺激した後、ラフトの構成因子をショットガンプロテオミクスで同定した。これを未刺激の細胞と比較することで、PHA/PMA 刺激の前後で変化したラフト構成因子を特定した。

課題2 構成因子の1分子観察

機能を阻害しない部位を蛍光色素で標識した HIV-Nef を調製するために、Nef 遺伝子のコドン使用頻度をサンプル調製系で用いる大腸菌のそれと合わせたところ、有意な合成量の増加を確認した。さらに、このリコンビナント Nef の in vitro ミリストイル化調製系を構築した。

課題3 HIV-Nef の機能を制御するダイアボディの開発

特異性が非常に高く (HeLa 細胞の抽出物を用いた実験では非特異的な結合が全く見られなかった)、結合力の強い ($KD \sim 10^{-9}$) 抗 HIV Nef 抗体の、抗体ライブラリーを用いたクローニングに成功した。この抗 HIV Nef 抗体は、当該研究開発でのエイズウイルス遺伝子産物の標的化に用いられる。他方、先にクローニングに成功していた抗ミリストイル基抗体とミリストイル化された HIV-Nef と細胞膜を模した脂質ミセルを混和し、遠心操作を行うと、HIV-Nef は脂質ミセルと共に遠心管の底に沈むことはなく、液層に残存した。このことは、この抗体が HIV-Nef と膜との相互作用を抑えたことを示唆する。

ミリストイル基によるミリストイル化タンパク質の膜へのつなぎとめの親和力はそれほど強く無い ($KD=10^{-4}$: この弱い親和力がミリストイル基の生理機能には非常に重要) ので、これを阻害するための抗ミリストイル基抗体の抗原に対する結合力は $KD=10^{-4}$ より強ければ良い。むしろ、その結合力が強いと他のミリストイル化タンパク

質に作用してしまい、副作用を生じる。このとき、通常の動物免疫法では結合力が弱い抗体の取得が難しいが、本研究では抗体ライブラリー技術を使って結合力の異なる複数の抗ミリストイル基抗体を取得した。ミリストイル基に対する親和性が $KD=10^{-6}$ の抗体を使用することで、ミリストイル化タンパク質と膜との相互作用をブロックする。このコンセプトを証明するために、抗 HIV Nef 抗体に抗ミリストイル基抗体をつなげたダイアボディを作成した。これを用いて細胞膜を模した脂質ミセルと HIV-Nef との相互作用の阻害実験を行った結果、プレリミナリーではあるが、HIV-Nef の膜への相互作用を抑えるという結果を得た。

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)

[学会発表] (計2件)

①「ミリストイル基を介した HIV Nef の免疫細胞のシグナル伝達への介入」猫田侑希¹、雨宮愛美¹、細谷悟史¹、伊藤由馬¹、十川久美子¹、朴明宣²、大野敏²、横川隆志²、西川一八²、徳永万喜洋¹、林宣宏¹ (¹東工大・院・生命理工、²岐大・工)、第38回日本分子生物学会年会(2015年12月1日~4日、神戸)

②「AIDS 治療のための二重特異性抗体の開発」橋本庸平¹、来見田遥一¹、渡邊和哉²、加藤和子¹、赤堀泰³、林宣宏^{1,2} (¹東工大・院・生命理工、²東工大・生命理工学院³三重大学・院・医)、第39回日本分子生物学会年会(2016年11月30日~12月2日、横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 宣宏 (HAYASHI, Nobuhiro)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号 : 80267955