

細胞表層工学を用いた動物細胞の育種

長棟 輝行*・河原 正浩・油谷 隆秀・上田 宏

動物細胞培養によって抗体、サイトカインなどの有用タンパク質の生産が工業的に広く行われている。動物細胞の増殖には炭素源や窒素源などのいわゆる栄養源に加えて各種の増殖因子が必要であり、通常はこれらの因子を豊富に含む牛血清を培地に添加することにより細胞増殖を促進し、目的タンパク質の工業的生産が行われている。

しかし、最近では牛血清由来の多くの夾雑タンパク質を含む培養液から目的タンパク質を高純度に分離精製するプロセスの負荷を軽減するために、細胞を十分に増殖させた後で、培地を血清培地から無血清培地あるいは無タンパク質培地に交換して目的タンパク質の生産を行う二段階培養法も採用されている。また、ヨーロッパではプリオン病との関連で動物細胞培養に牛血清を用いることが困難となり、無血清培地への転換が求められている。しかし、無血清培地を用いる場合には細胞増殖を活性化するために高価な増殖因子の添加が必要となる場合が多く、培地コストの観点から工業的規模の動物細胞培養の大きな問題点になりつつある。

さて、動物細胞の増殖は、増殖因子が細胞膜に存在する増殖因子受容体に結合し、そのシグナルが細胞内情報伝達系を経由して核内に伝達され、細胞増殖に関わる各種タンパク質遺伝子群の転写活性が向上することによって促進される。したがって、増殖因子とは異なる安価なタンパク質に応答して、細胞内へそのシグナルを情報伝達できるような人工受容体を持つ細胞を遺伝子工学的に育種することができれば、高価な増殖因子を用いることなく、安価なタンパク質によって細胞増殖を促進することが可能になる。我々は、このような観点から、エリスロポエチン受容体 (EPOR) のリガンド結合部位を抗体可変領域 Fv で置き換えたキメラ受容体の分子構築を行った。ここでは、このようなキメラ受容体発現細胞の増殖を抗原添加によって促進する試みについて、当研究室で得られた実験結果を中心に紹介する。

1. 抗体 Fv と EPOR のキメラ受容体の構築

EPOR は動物細胞の細胞膜を貫通して存在し、サイトカインの一種であるエリスロポエチン (EPO) との結合によって、細胞増殖やアポトーシス抑制といったシグナルを細胞内に伝達する受容体である。最近、EPO と

EPOR の複合体⁵⁾およびリガンドなしの状態⁶⁾での EPOR の X 線結晶構造解析の結果が報告された。それによると、EPOR はリガンドがない状態でも二量体を形成しているが、シグナル伝達に関わる細胞内ドメインが互いに離れているため、シグナル伝達が生じない。それに対し、リガンドである EPO が結合すると、EPOR にコンフォメーション変化が起こって細胞内ドメイン同士が近接し、Jak2, STAT5 などのシグナル伝達系のタンパク質群がリン酸化を受けて活性化され、二量化したリン酸化 STAT5 が核に移行して転写調節因子として機能し、細胞増殖に必要なタンパク質群の遺伝子発現が促

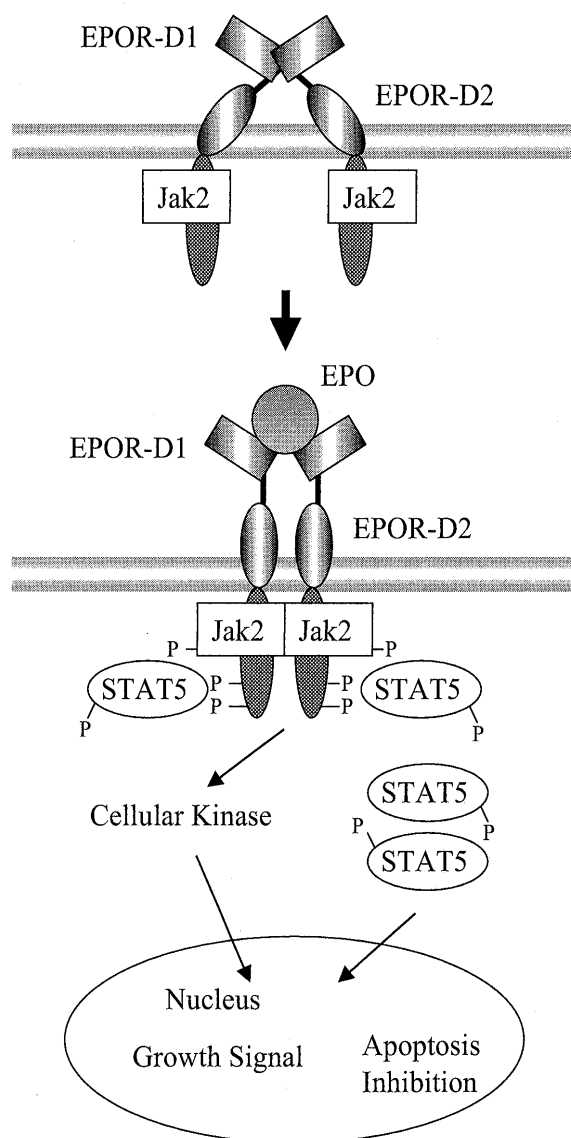


Fig. 1. Activation mechanism of EPOR.

*著者紹介 (代表) 東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻 (教授)

〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1

TEL. 03-5841-7328 FAX. 03-5841-8657

E-mail: nagamune@bio.t.u-tokyo.ac.jp

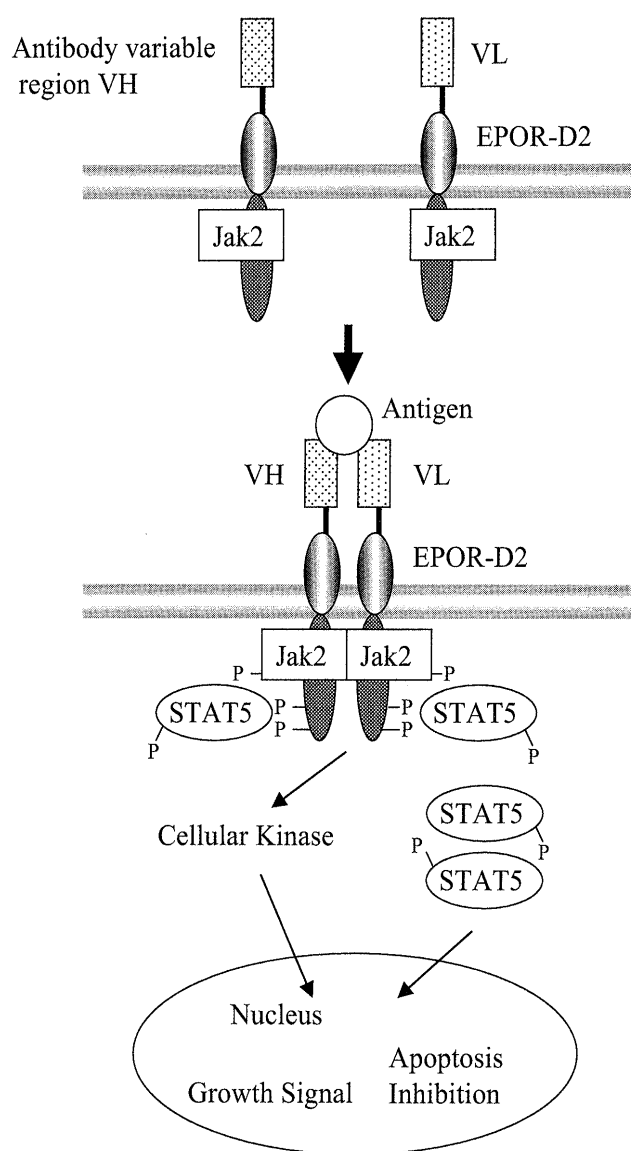


Fig. 2. Activation mechanism of antibody/receptor chimera.

進されるという機構が考えられている (Fig. 1). この野生型 EPOR の活性化機構を模倣し、抗原によってキメラ受容体が活性化されるための条件は、抗原がない状態ではキメラ受容体が互いに近接せず、抗原がある状態で初めて近接して二量体化するということである。この条件を満たす系として、抗体濃度依存的な VH, VL 複合体の形成が見られるニワトリ卵白リゾチーム (HEL) とそれに対する抗体 HyHEL-10 の可変領域 VH, VL を選定した。すなわち、マウス EPOR のリガンド結合部位を含む細胞膜外ドメインの一部を、HyHEL-10 の可変領域 VH あるいは VL に置換したキメラ受容体 (VH-EPOR, VL-EPOR) の発現ベクターを構築した (Fig. 2)。その際に、可変領域 VH あるいは VL と EPOR とを直接結合したもの (VH/VL-EPOR(-)), 間にリンカーとしてグリシンを挿入したもの (VH/VL-EPOR(G)), 同じく

リンカーとしてグリシン-セリン-グリシンの三つのアミノ酸を挿入したもの (VH/VL-EPOR(GSG)) の合計 6 種類のキメラ受容体遺伝子を構築した。ここで Fv と EPOR の間にリンカーを導入したのは、Fv と EPOR の結合に伴う両者間の立体的障害やひずみを回避するためである。

2. キメラ受容体を導入した Ba/F3 細胞⁸⁾

まず、リンカーを含まない VH/VL-EPOR(-) のキメラ受容体ペアを IL-3 依存性のマウス pro-B 細胞株 Ba/F3 (EPOR は持たないが、その下流の情報伝達経路が共通な IL-3 受容体の情報伝達系を持つ細胞、後述の 32D 細胞も同様) に電気穿孔法により同時に導入し抗生物質 G418 耐性により導入株を選択した。また、IL-3 非存在下、HEL 存在下で増殖してくる細胞をクローニングした。

得られたクローン十数個のキメラレセプター発現量を Western Blotting により確認したところ、VH-EPOR, VL-EPOR がほぼ等量発現していることが分かった。次に、代表的なクローンについて、HEL, VH-EPOR, VL-EPOR から成る三者複合体形成の確認を行った。すなわち、細胞懸濁液に種々の濃度のビオチン化 HEL を加えて複合体を形成させた後、バッファーで洗浄して未結合のビオチン化 HEL を除去した。この細胞を破碎して得られるライセートに、適量のストレプトアビジン-アガロースビーズを加えて、細胞膜上で形成されたビオチン化 HEL とキメラ受容体の複合体を回収した。Western Blotting によって、ビオチン化 HEL に結合して回収されたキメラ受容体の存在の有無を調べた。すると、キメラ受容体と思われる 2 本のバンドが各ビオチン化 HEL 濃度でほぼ等量検出され、これらのバンドは HEL 濃度依存的に濃くなった。このことから、細胞膜上で HEL 濃度依存的に、VH-EPOR, VL-EPOR が HEL に対し 1:1 で結合して複合体を形成することが明らかとなった。

HEL 添加により細胞内にシグナルが伝達されるかどうかを確認するために、EPOR のシグナル伝達の結果活性化される STAT5B のリン酸化の有無を調べた。HEL で細胞を刺激後、ライセートを作製し、抗 STAT5B 抗体で免疫沈降後、anti-PY を用いた Western Blotting でリン酸化された STAT5B 量を検出した (Fig. 3-A)。また、その時の全 STAT5B 量を anti-STAT5B を用いて測定した (Fig. 3-B)。その結果、HEL 濃度および刺激時間依存的な STAT5B のリン酸化が見られた。

さらに、細胞増殖アッセイを行ったところ、HEL 濃

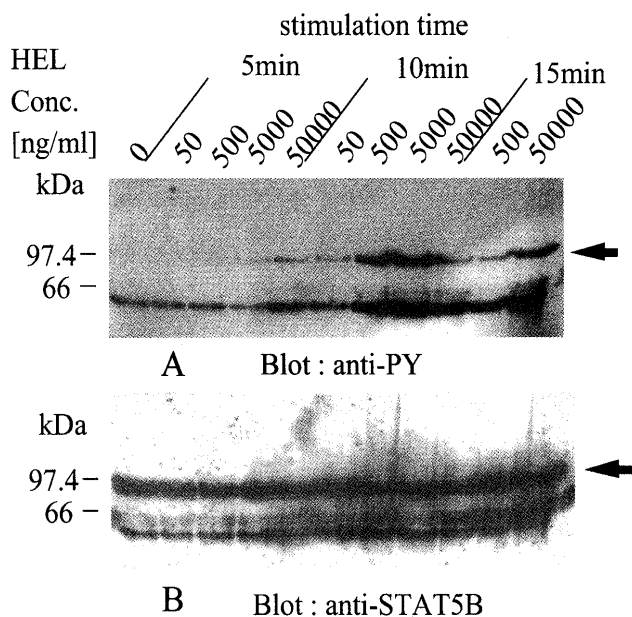


Fig. 3. Phosphorylation of STAT5B induced by HEL addition.

度依存的に細胞増殖が促進され、その増殖速度は野生型 EPOR 導入細胞における EPO 依存的増殖速度に匹敵した (Fig. 4). EPO と EPOR の結合が 2 分子反応と考えられるのに対し、キメラ受容体ペアと抗原の結合が 3 分子

反応であること、また、解離定数が HEL-VH-VL 複合体では約 $1 \text{ nM}^7)$ なのに対し、EPO-EPOR では約 $180 \sim 670 \text{ pM}^{5,9)}$ であることから考えると、キメラ受容体は充分効率よく抗原によって活性化されていることが示唆された。また、この時、細胞生存率の向上、すなわち EPOR からの増殖シグナルに特徴的なアポトーシス抑制作用も観察された。しかし、HEL 非存在下でもある程度の増殖が見られ、シグナルのオン・オフ制御を厳密に行うことは困難であった。

3. キメラ受容体を導入した 32D 細胞

異なる細胞株でもキメラ受容体による増殖制御が可能かどうかを調べることを目的として、キメラ受容体ペアを IL-3 依存性のマウス骨髄系細胞株 32D に導入した。その際、キメラ受容体発現 Ba/F3 細胞の HEL 非存在下での増殖は、抗体可変領域と EPOR を直接連結したことによる立体障害やひずみに原因があると考え、前述のリンカー挿入 (VH/VL-EPOR(G), VH/VL-EPOR(GSG)) およびリンカーなし (VH/VL-EPOR(-)) の 3 種類のキメラ受容体ペアを 32D 細胞にそれぞれ遺伝子導入し、HEL 添加による増殖応答の比較を行った。

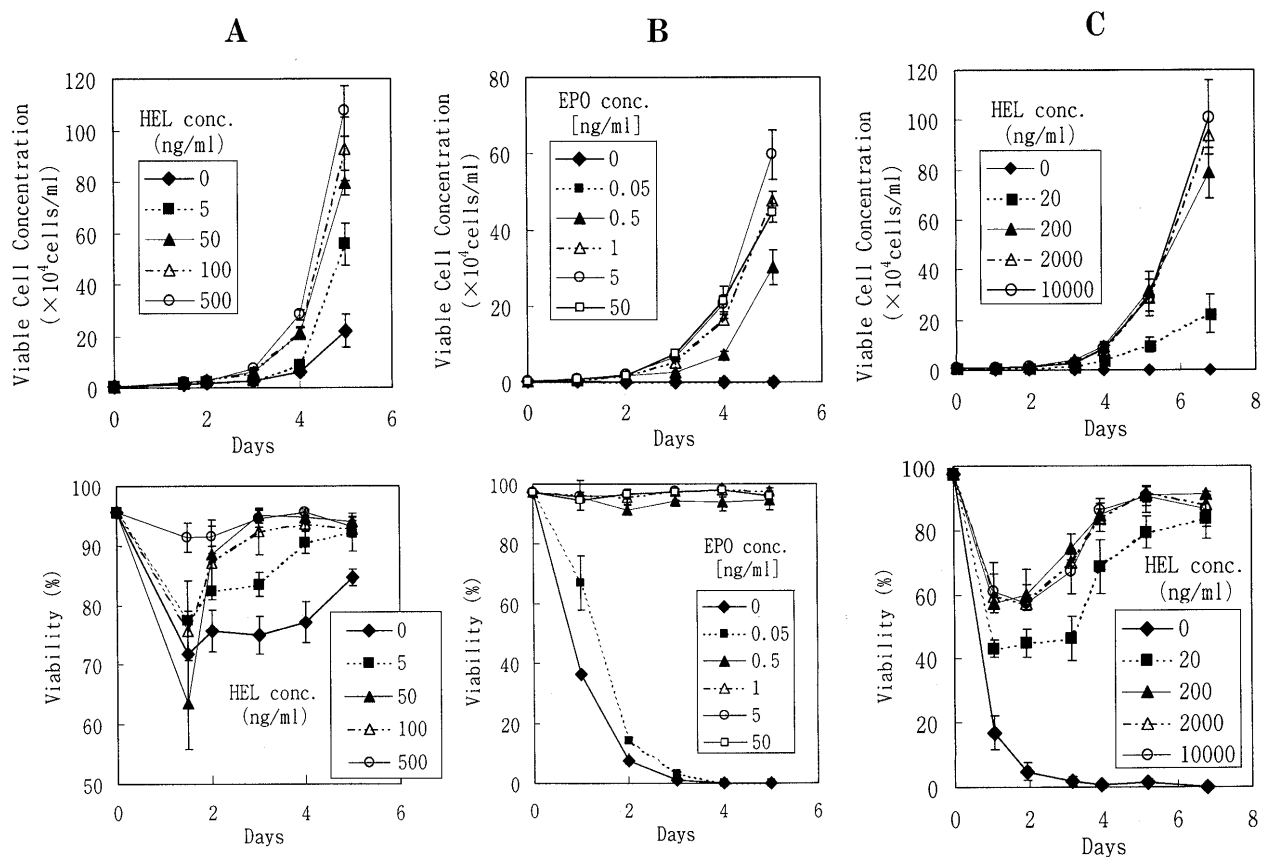


Fig. 4. Ligand-dependent proliferation of (A) Ba/F3 transfectant expressing VH/VL-EPOR(-), (B) Ba/F3 transfectant expressing wild type EPOR, and (C) 32D transfectant expressing VH/VL-EPOR(GSG).

増殖因子 IL-3 無添加の条件下では 32D 細胞はすみやかに死滅するのに対して, VH/VL-EPOR(-)あるいは VH/VL-EPOR(G) を発現している 32D 細胞の場合には, 増殖因子 IL-3 無添加の条件下において抗原 HEL の添加の有無, 添加濃度にかかわらず同じ程度の細胞増殖が観察された. これらのキメラ受容体では, 抗体可変領域と EPOR の一部を融合することにより何らかの構造変化が起こり, 32D 細胞の場合には Ba/F3 細胞の場合以上に, 抗原のない条件でもキメラ受容体のホモダイマーあるいはヘテロダイマーが常に生成し, 増殖シグナルを細胞内に伝達している可能性が考えられる. これに対して, VH/VL-EPOR(GSG) を発現している細胞 32D/GSG では, HEL 無添加の場合にはすみやかに細胞が死滅し, HEL を添加した場合には HEL 濃度依存的な増殖と細胞生存率の向上 (アポトーシス抑制) が観察された (Fig. 4). この場合には, 抗原 HEL の添加により初めて VH-EPOR(GSG) と VL-EPOR(GSG) が会合し, 核への増殖シグナル伝達が起こり, その結果, 培地に添加した抗原濃度に依存した細胞増殖の促進が起こったと考えられる.

最近の, EPO と EPOR,⁹⁾ ペプチドアゴニストと EPOR,¹⁰⁾ ペプチドアンタゴニストと EPOR¹¹⁾ の結晶構造解析の結果から, リガンド-レセプター複合体における細胞外ドメインの構造の微妙な相違がシグナル伝達に影響を及ぼすことが示唆されている. 本研究のようなキメラ受容体においても, さらに低い抗原濃度での効率良いシグナル伝達を実現するためには, 細胞外ドメイン構造を最適化する必要があると考えられる.

おわりに

抗体可変領域と受容体とを適当なリンカーで連結した

キメラ受容体を発現する細胞を, 遺伝子工学的に育種した. このような育種細胞では, 高価な増殖因子やサイトカインの代わりに安価な抗原を用いて増殖制御を行うことができるため, このような育種培養細胞を用いた有用タンパク質生産のコストダウンの可能性が期待される.

また, 目的遺伝子と同時にキメラ受容体ペアの遺伝子を細胞に導入すれば, 抗原によって目的遺伝子導入細胞の選択的増幅が可能となり, 遺伝子治療用ベクター導入細胞の選択マーカーとしての応用も可能であろう. 抗原-抗体系は無数に存在するため, 適切な抗原-抗体系を選択すれば, 複数の抗原によって細胞に入力したい複数のシグナルを同時に, あるいは必要な時に必要なシグナルだけを入力することも可能である. このように, キメラ受容体を用いた動物細胞表層工学は, さまざまな応用性を秘めており, 今後の益々の発展が期待される.

本研究は東北大学大学院工学研究科生物工学専攻 熊谷 泉教授, 津本浩平博士との共同研究の成果である. ここに厚く感謝の意を表します.

文 献

- 1) Jixian, D. *et al.*: *Chinese J. Biotechnol.*, **13**, 247 (1998).
- 2) Zang, M. *et al.*: *Bio/Technology*, **13**, 389 (1995).
- 3) Doverskog, M. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **59**, 103 (1997).
- 4) Heldin, C.-H.: *Cell*, **80**, 213 (1995).
- 5) Syed, R. S. *et al.*: *Nature*, **395**, 511 (1998).
- 6) Livnah, O. *et al.*: *Science*, **283**, 987 (1999).
- 7) Ueda, H. *et al.*: *Nature Biotechnol.*, **14**, 1714 (1996).
- 8) Kawahara, M. *et al.*: *Animal Cell Technology: Challenges for the 21st Century* (JAAC/ESACT), Sasaki, S. *et al.* (Eds), p. 255, Kluwer Academic Publishers (1999).
- 9) Watowich, S. S. *et al.*: *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 3535 (1994).
- 10) Livnah, O. *et al.*: *Science*, **273**, 464 (1996).
- 11) Livnah, O. *et al.*: *Nature Struct. Biol.*, **5**, 993 (1998).

糖鎖を介した細胞接着に関わる乳酸菌の表層タンパク質

山 本 憲 二

多くの病原性細菌やウイルスは宿主の細胞膜表面に存在する糖タンパク質や糖脂質の「糖鎖」を受容体として細胞に接着し感染することが知られている.^{1,2)}たとえば, ヒトインフルエンザウイルスは宿主の細胞膜上の糖タンパク質や糖脂質の糖鎖の非還元末端に存在するシアル酸をレセプターとして認識して細胞に結合し感染する. また, 病原性大腸菌などは繊毛を介して細胞膜上の糖鎖と結合して細胞に感染し, さらに細菌が生産する毒

素 (コレラ毒素など) も細胞膜上の糖脂質の糖鎖をレセプターとして細胞に結合して感染することが知られている. 病原性細菌やウイルスにとって細胞に結合することは宿主細胞に感染する一連の過程の中でもっとも重要なステップである. 微生物が宿主細胞に糖鎖を介して結合することは細胞と細胞の相互認識作用のモデルでもある.

一方, 腸内細菌にとっても腸の蠕動運動やあるいは食

著者紹介 京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻 (教授)

〒606-8502 京都市左京区北白川追分町 TEL. 075-753-6277 FAX. 075-753-6275 E-mail: yamamoto@kais.kyoto-u.ac.jp