

論文の内容の要旨

チロシン硫酸化酵素の遺伝子導入による発芽型バキュロウイルス系での 機能性ヒトケモカイン受容体タンパク質発現方法の開発

高橋 一彰

抗体医薬品をはじめバイオ医薬品の発展には、膜タンパク質を大量にかつ活性を保持した状態で発現させるシステムの開発が必要とされている。その中で一般的に用いられる哺乳類細胞を用いた発現系は、機能的に必要な翻訳後修飾が期待されるが、膜タンパク質の大量発現は困難である。一方バキュロウイルス発現系は、ポリヘドリンプロモーターを利用して昆虫細胞に目的タンパク質を発現させる系であり、翻訳後修飾は哺乳類細胞を用いた発現系よりは不完全ではあるが、目的タンパク質を大量に発現できる系として広く利用されている。バキュロウイルスは封入体ウイルスとして核内で増殖するほかに、感染するために細胞外に出る発芽型ウイルスという2つの形態をもつ。これまでに、さまざまな膜タンパク質が宿主細胞（Sf9細胞）の膜画分だけでなく、発芽型バキュロウイルス上に機能的に発現することが報告されている。本研究では、CCケモカイン受容体に属するCCR2bおよびCCR5を発芽型バキュロウイルス上に発現させて、解析を行った。

CCR2bおよびCCR5は、単球、マクロファージ、T細胞などに発現し、MCP-1やRANTESなどの刺激を細胞内に伝達し、細胞の走化性亢進などを誘導する。すべてのケモカイン受容体は7回膜貫通型のGタンパク質共役型受容体（GPCR）であり、そのN末端領域は比較的短く、GPCRの分類上、family Aに属する。そのN末端領域にはセリンやスレオニンが多く、O型糖鎖修飾が起こっていると考えられている。またチロシン

が多く点在し、その近傍にはアスパラギン酸やグルタミン酸といった酸性アミノ酸が多く存在することから、チロシンは硫酸化修飾されていると考えられている。これまでに CCR2b と CCR5 のチロシン硫酸化修飾は、リガンドとの結合に重要であることが報告されている。

また AIDS の原因ウイルスである HIV が、ヒトの細胞に感染するために CCR5 をコレセプターとして使用することから、HIV と CCR5 の関係についても数多くの研究が行われている。HIV がヒトの細胞に感染するには、HIV の表面に存在する gp120 が、T細胞やマクロファージの膜タンパク質 CD4 に結合することから始まる。それにより gp120 の立体構造が変化し、gp120 は T細胞やマクロファージの CCR5 や CXCR4 とも結合する。そして gp120 の立体構造がさらに変化することで、gp120 の内側に存在する gp41 が T細胞やマクロファージの細胞膜に挿入され、ウイルスが T細胞などの細胞膜に融合し、ウイルス感染が進行する。これまでに、CCR5 がコレセプターとして gp120 と結合するには、CCR5 の N 末端領域の硫酸化修飾されたチロシンおよび酸性アミノ酸が重要であると報告され、CCR5 と翻訳後修飾のさらなる解析が求められている。

このように CCR5 は HIV のコレセプターとして働くことが知られており、CCR5 に対する新規の抗体は、HIV が CCR5 と結合する機序をさら解明する道具となると思われる。また HIV と CCR5 の結合を阻害する抗体であれば、抗体医薬品としての使用が期待される。そこで CCR5 を発現した発芽型バキュロウイルスを抗原として、機能構造を保持した CCR5 を認識する抗体の作製を試みた。さらに作製した抗体を使用して、発芽型バキュロウイルス上に発現した CCR5 のチロシンの硫酸化修飾の解析をし、また、リガンド結合活性から発芽型バキュロウイルス上に発現した CCR2b のチロシンの硫酸化修飾の解析をした。さらにバキュロウイルス上に発現した CCR5 または CCR2b のチロシン残基を硫酸化修飾する方法を開発した。

はじめに CCR5 を発現した発芽型バキュロウイルスを抗原にして、機能構造を保持し

たCCR5を認識する抗体の作製を行った。ヒトCCR5とマウスCCR5は相同性が高く、またバキュロウイルス上にはウイルス由来の膜タンパク質であるgp64が多量に発現しているため、CCR5を発現した発芽型バキュロウイルスを通常のマウスに免疫した場合、gp64に対する抗体産生反応が強く誘導され、目的の抗原に対する抗体を得ることが困難であることが考えられた。そこでCCR5ノックアウトマウスと、gp64に対して免疫反応が著しく減弱しているgp64トランスジェニックマウスを交配して得られる、gp64発現CCR5ノックアウトマウスに免疫した。CCR5を発現した発芽型バキュロウイルスを96穴プレートに固層化してELISA解析を行い、陽性反応を示したハイブリドーマからCCR5のC端領域を認識するモノクローナル抗体を得た。このモノクローナル抗体はFACS解析において、CCR5を発現したCHO細胞にサポニンを添加して、細胞膜の透過性を上昇させることにより陽性反応が観察されることから、CCR5のC端領域の構造を認識していることが確認できた。しかし抗体医薬品として使用できるような、CCR5の細胞外領域を認識する抗体は作製できなかった。

作製したC端領域を認識する抗体と市販されているN端領域に対する抗体を用いて、発芽型バキュロウイルスに発現したCCR5とCHO細胞に発現したCCR5をウエスタンブロット解析で反応性を比較した。その結果、C端領域に対する抗体は、発芽型バキュロウイルスに発現したCCR5にもCHO細胞に発現したCCR5にも反応した。一方、N端領域に対する抗体は、CHO細胞に発現したCCR5には反応するが、発芽型バキュロウイルスに発現したCCR5には反応しなかった。

次に発芽型バキュロウイルスに発現したCCR2bの結合活性を、CCR2bのリガンドであるMCP - 1を用いて観察した。その結果、発芽型バキュロウイルスに発現したCCR2bには、MCP - 1との結合活性は観察されなかった。

これまでにCCR2bとMCP - 1との結合には、CCR2bのN端領域に存在するチロシン残基が重要であることが報告されている。また、本研究で使用したCCR5のN端領域の抗

体の認識配列にも、チロシン残基が含まれていることが報告されている。そこでバキュロウイルスに発現したCCR2bおよびCCR5は、チロシンの硫酸化修飾が不十分である可能性が考えられた。チロシンの硫酸化修飾は、トランスゴルジでおこるタンパク質の翻訳後修飾のひとつであり、チロシン残基を硫酸化する酵素、Tyrosylprotein sulfotransferase (TPST) がこの反応を行う。TPSTはII型膜タンパク質で、硫酸供与体であるadenosine 3' - phosphate 5' - phosphosulfate (PAPS)からチロシン残基のヒドロシキル基へ硫酸イオンを転移付加する反応を触媒する。これまでにヒトでは、TPST - 1とTPST - 2の2種類が存在することが報告されている。そこでTPST - 1リコンビナントウイルスをCCR2bリコンビナントウイルスまたはCCR5リコンビナントウイルスと共感染させて、sf9細胞中のTPST量を増加させた時に、CCR5に対する抗原抗体反応やCCR2bのリガンド結合反応に変化があるかを観察した。

発芽型バキュロウイルス上に発現したCCR5は、TPST - 1リコンビナントウイルスを共感染させることにより、C端領域の抗体と同様に、N端領域の抗体もCCR5を認識するようになった。さらに試験管内において、CCR5およびTPST - 1を発現した発芽型バキュロウイルスとPAPSを反応させると、N端領域の抗体がさらに強くCCR5を認識するようになった。このことから、使用したCCR5のN端領域の抗体は、硫酸化修飾したチロシンを認識し、発芽型バキュロウイルスに発現しているCCR5は、チロシン残基の硫酸化修飾が不完全であることが示された。

一方、発芽型バキュロウイルス上に発現したCCR2bは、TPST - 1リコンビナントウイルスを共感染させることにより、MCP - 1との結合活性が観察され、その解離定数は0.58 nMであった。このことから、発芽型バキュロウイルス上に発現したCCR2bもチロシンの硫酸化修飾が不完全であり、そのためにMCP - 1との結合活性が見られなかったことが示された。

以上のことから、発芽型バキュロウイルス上に発現したCCR5およびCCR2bは、それ

ぞれのリコンビナントウイルスを単独で感染させた場合、チロシンの硫酸化修飾がほとんど起こっていない状態で発現することが分かった。また、TPST-1リコンビナントウイルスを共感染させることで、硫酸化修飾された受容体を簡便に発現させることができることが分かった。CCR5とHIVの結合には硫酸化チロシンが重要であることが報告されており、本研究で開発したバキュロウイルスを使用したチロシンの硫酸化修飾法は、その修飾の有無の違いが大きく、硫酸化修飾にターゲットを絞ったAIDS治療薬のスクリーニングに用いることが可能であると思われる。