

哺乳動物細胞における可溶性リンフォトキシン受容体タンパク質の発現

(Received March 5, 2019)

免疫分子機能研究室 早坂 晴子

キーワード

無血清培地、タンパク質、リンフォトキシン

要旨

細胞膜貫通タンパク質として発現する分子を遺伝子組換え技術により可溶性分子として細胞外に分泌させることで、受容体が結合する新規リガンド分子のスクリーニングや内在性受容体の阻害など、有用な試験管内 (*in vitro*) および生体内 (*in vivo*) 研究ツールを得ることができると。本稿では、サイトカインの一つであるリンフォトキシン (LT) に対する受容体、マウスリンフォトキシン beta 受容体 (LTβR) の細胞外領域とヒトイムノグロブリン定常部 (Ig) 融合タンパク質を哺乳類細胞に発現させ、可溶性受容体 LTβR-Ig として回収することを試みた。LTβR-Ig 遺伝子発現プラスミドを HEK293T 細胞に遺伝子導入し、3 種類の異なるタンパク質発現用無血清培地 NeoPro-293A、HE400、HE200 で培養し、LTβR-Ig タンパク質の回収率を比較した。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果、いずれの培地においても、二量体 LTβR-Ig の想定分子サイズに近い 140 kDa にシグナルが検出された。ウェスタンブロットでは、非還元条件下では 140 kDa、還元条件下で 70 kDa 付

近に LTβR-Ig 由来のバンドが検出できた。これらはそれぞれ二量体および単量体 LTβR-Ig のサイズと一致するため、LTβR-Ig が回収できたと考えられる。次に LTβR-Ig の LT に対する結合活性を解析するため、細胞培養上清を回収し、限外ろ過フィルターを用いて各培養上清液の濃縮をおこない、細胞膜上に LT を発現するマウス B リンパ球への結合活性を解析した。B リンパ球に対する LTβR-Ig 結合レベルは control-Ig の約 5 倍であったが、非 B リンパ球では control-Ig と同レベルであった。以上から回収された LTβR-Ig は LT 発現細胞に結合活性をもつことが示された。

はじめに

サイトカイン受容体、G タンパク受容体、接着分子などに代表される細胞表面タンパク質は、リガンド結合依存的に細胞内にシグナルを伝達し、細胞の増殖、運動、接着、細胞死などを調節する。これらの分子はいずれも細胞膜貫通タンパク質であるため、細胞膜から機能を維持した状態で単離することが極めて困難である。このため、細胞膜外領域だけをもつ可溶性分子として細胞培養液中に分泌させ、親和性カラムなどを使って精製・回収したサンプルを用いて、細胞膜受容体分子などのリガンドとの結合親和性解析、構造解析などがおこなわれる。可溶性タンパク質産生に最もよく使われるのは、標的分子の細胞膜外領域にタグ配列を付加し、動物細胞に発現させる方法である。タグ付きの受容体細胞膜外領域タ

ンパク質をコードする遺伝子を哺乳動物細胞に遺伝子導入し、数日間培養をおこなう。このとき、培地にウシ胎児血清を添加せず、無血清培地を使うことで血清中に含まれる夾雑物を最低限に抑え、目的分子の精製効率をあげることができる。一方、多くの哺乳動物細胞は血清依存的に増殖するため、使用する無血清培地によっては、培地中に目的とするタンパク質が分泌されない場合もある。本稿では、市販されている数種類の無血清培地を用いて、マウス LT β R の細胞外領域とヒト Ig 融合タンパク質を哺乳動物細胞に発現させた結果について記述する。

研究の背景

リンフォトキシン LT は腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor: TNF) と類似の細胞傷害性因子であり、リンパ組織の形成あるいは細胞構築をコントロールするサイトカインである。LT には分泌型と膜結合型が存在し、分泌型 LT は LT α 分子のホモ 3 量体 (LT α_3) からなり、膜結合型 LT は 1 分子の LT α と 2 分子の LT β からなるヘテロ 3 量体 (LT $\alpha_1\beta_2$) を形成する。LT α_3 は活性化 T リンパ球から分泌され TNFR-I および TNFR-II に結合することでリンパ組織の形成に関与する。また、LT $\alpha_1\beta_2$ は活性化 T 細胞や B リンパ球、NK 細胞、樹状細胞の膜表面に発現し、LT β 受容体 (LT β R) との特異的な結合により受容体発現細胞へ細胞内シグナリングを誘導する。LT β R は 61 KDa の膜 1

回型貫通型タンパク質であり、リンパ組織の間質細胞、骨髄系細胞、血球単球、肺胞マクロファージ、肥満細胞、樹状細胞に発現する。一方、T および B リンパ球、静止期にある末梢血由来単球や樹状細胞では発現が低いとの報告がある。

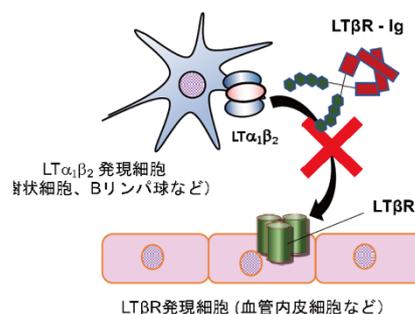


Fig. 1 LT β R-Igによる LT β Rシグナル阻害の模式図
細胞に発現する LT $\alpha_1\beta_2$ に LT β R-Ig が結合することにより、LT β R シグナルが阻害される。

私の研究室では、二次リンパ組織への選択的なリンパ球動員を媒介する特殊な血管である高内皮細静脈 (HEV) の分化メカニズムについて研究をおこなっている。HEV は脾臓を除く二次リンパ組織に存在し、リンパ球を血管系からリンパ組織へ選択的に移行させる。HEV 内皮細胞には末梢リンパ節アドレシン (PNAd: peripheral node addressin) や粘膜リンパ節アドレシン (MAdCAM-1: mucosal addressin cell adhesion molecule-1) と呼ばれる分子が発現する。血管アドレシンはリンパ球上に発現するホーミングレセプターと選択的に結合する。これらの分子は、HEV 内皮細胞上でのリンパ球ローリングや接着を媒介し、リンパ節特異的なリンパ球ホーミングに重要な役割を果たす。これまでの研究から、HEV 形成や機能維持は LT シグナルで

調節されることが示唆されている。

LT $\alpha_1\beta_2$ をラットインスリンプロモーターの制御下で発現するマウス脾臓では、PNAd 分子や HEV 関連分子を発現する血管が異所的に形成されることから、LT $\alpha_1\beta_2$ による LT β R を介したシグナル誘導が末梢リンパ節アドレシンの発現調節に関与することが示唆される (1)。また、LT β R の細胞外領域とヒト IgG 定常部の融合タンパク質 (LT β R-Ig, Fig. 1) の生体内投与により LT β R シグナルを阻害したマウスリンパ節では、HEV の PNAd および MAdCAM-1 発現が減少し、HEV を介したリンパ節へのリンパ球移入が減少する (2)。さらに、生体内で樹状細胞を欠損させたマウスでは、成熟型 HEV 内皮細胞マーカーである PNAd の発現が減少し、未熟 HEV 内皮細胞の表現型に変化することから、樹状細胞に発現する LT $\alpha_1\beta_2$ が HEV 内皮細胞の機能維持とアドレシン発現に重要であることが示唆される。

以上のように、HEV の形成や機能維持における LT β R シグナルの重要性があきらかになりつつある一方、リンパ節発生系譜における未熟血管から成熟 HEV への分化機構についてはいまだ解明されていない。そこで本研究では、成熟 HEV への分化における LT β R シグナルの重要性を調べるため、LT β R シグナル阻害の実験ツールとして LT β R-Ig を細胞培養上清から調製し、LT 発現細胞への結合能を解析した。

材料と方法

ヒト胎児腎細胞株 HEK293T 細胞は、10% (v/v) FCS (ウシ胎児血清、PAA Laboratories)、10 mM HEPES (Gibco)、2 mM L-glutamine、1 mM sodium pyruvate、100 U/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin、0.1 mM non-essential amino acid (以上富士フィルム和光純薬)、50 μ M 2-メルカプトエタノール (GE) 含有 D-MEM (High Glucose) with L-Glutamine and Phenol Red 培地 (富士フィルム和光純薬) で培養した HEK293T 細胞を 2.5×10^6 cells になるように 10 cm Dish に播種し、一晚培養した。PEI-MAX (Polysciences, Inc.) を使用し LT β R-Ig 発現プラスミドと control-Ig 発現プラスミドをそれぞれ遺伝子導入した。遺伝子導入細胞を一晚培養後、HE400、HE200 (以上 Gmep 株式会社)、NeoPro-293A (株式会社アステック) 培地に置換し 3 日間培養した。その後、それぞれの培地の上清 18 mL を回収し 50K Centricon (メルクミリポア) を用いて細胞培養上清を濃縮し、HE200 は 18 μ L、HE400 は 86 μ L、NeoPro-293A は 255 μ L の濃縮培養上清をそれぞれ得た。各濃縮培地 3 μ L を電気泳動後、2 \times SDS Sample buffer (0.5M Tris-HCL, pH 6.8、10% SDS 溶液、スクロース、BPB) あるいは 2 \times SDS Sample buffer に対して 1/10 量の 2-メルカプトエタノール (富士フィルム和光純薬) を加えた還元用 2 \times SDS Sample buffer を各濃縮培地 3 μ L を含むサンプル溶液と等量混合し、95 $^{\circ}$ C のイ

ンキュベータで5 分間煮沸処理後、SDS-PAGE を行い、10% ポリアクリルアミドゲルをクマシーブリリアントブルー (CBB) 溶液 (EzStain AQua) で染色した。また電気泳動後のポリアクリルアミドゲルから PVDF 膜に転写し、スキムミルクによりブロッキングしたのち HRP 標識ヤギ F(ab')₂ 抗ヒト IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories、80 ng/ml) を用いた化学発光検出システムでシグナルを検出した。

結果と考察

タンパク質発現用無血清培地間の LTβR-Ig 発現効率の比較

LTβR-Ig プラスミド遺伝子導入細胞からの LTβR-Ig タンパク質発現に適した細胞培養用培地を選択するため、タンパク質発現用無血清培地 NeoPro-293A、HE400、HE200 で培養し、培養上清濃縮液を SDS-PAGE、CBB 染色により解析した (Fig. 2)。総タンパク質量を解析したところ、HE200 は濃縮後の総タンパク質量が最も少なく 98.6 μg (濃度 5.5 mg/ml) であった。HE400 は 632.4 μg (濃度 7.3 mg/ml) であり、最も総タンパク質量が多かったものは NeoPro-293A で 1.6 mg (濃度 7.0 mg/ml) であった。同容量のサンプルを解析した場合、いずれの培地でも CBB 染色で 70 KDa、140 KDa 付近において強いシグナルが検出された。シグナルの強いものから順に HE200、HE400、NeoPro-293A であったが、解析したサンプルに含まれるタンパク質量が多い順から並べると

HE400、NeoPro-293A、HE200 であった。このことから、どの細胞培養用培地で培養した場合においても細胞培養上清に LTβR-Ig が含まれるが、総タンパク質に対する目的タンパク質の割合は異なることが示唆された。

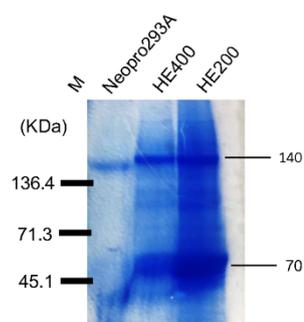


Fig. 2 無血清培地を用いた LTβR-Ig の回収

LTβR-Ig 発現プラスミドを遺伝子導入した HEK293T 細胞をタンパク質発現用無血清培地 NeoPro-293A、HE400、HE200 で培養した。各培養上清の濃縮サンプルを非還元条件下で SDS-PAGE 後、CBB 染色による総タンパク質の検出をおこなった

NeoPro-293A、HE400、HE200 はどれも高い細胞増殖活性を維持させ、良好な無血清培養が可能で HEK293T 細胞に最適な培地である。HE200 と HE400 で比べると細胞到達密度は HE200 で $3.0\text{-}6.0 \times 10^6$ (cells/mL)、HE400 で $0.7\text{-}1.0 \times 10^7$ (cells/mL) と HE400 の細胞到達密度の方が約 2 倍高く、細胞増殖能も約 2 倍高いといわれている (3)。今回の実験でも HE200 より HE400 の方が回収できたタンパク質量が多いことは、この記述と合致する。一方、NeoPro-293A は、高効率な遺伝子導入が可能なトランスフェクション試薬であり、HE400 と同等の細胞増殖活性を持つ (4)。HE400 と NeoPro-293A の実験結果を比較すると、NeoPro-293A の方がタンパク質回収量は多かつ

たが、目的のタンパク質の回収は HE400 の方が多かった。HE400 を用いた培養では、NeoPro-293A より LTβR-Ig 発現を調節する SRα プロモーターの活性が高いために遺伝子産物が多く発現した可能性が考えられる。

CBB 染色、ウェスタンブロット法による濃縮培養上清中の LTβR-Ig の検出
次に培地中に含まれる 70 KDa および 140 KDa 付近のシグナルが LTβR-Ig であることを確認するため、抗ヒト IgG 抗体を用いたウェスタンブロット法による LTβR-Ig の検出をおこなった (Fig. 3)。還元条件下での CBB 染色では、HE400 の方が NeoPro-293A より強いシグナルが検出されたが、どちらの培地でも 70 KDa 付近に複数のバンドが確認された。非還元条件下での CBB 染色では 140 KDa 付近に単独のバンドと 70 KDa 付近に複数のバンドが確認された。一方、還元条件下でのウェスタンブロットでは、70 KDa 付近にのみにバンドが観察された。また、非還元条件下でのウェスタンブロットでは、140 KDa 付近にのみにバンドが観察された。この

ことから、CBB 染色で検出された 70 KDa および 140 KDa のシグナルは、それぞれ LTβR-Ig 単量体、および二量体であることが示唆された。HE400 と NeoPro-293A で比較すると、HE400 の方が強いシグナルで検出されており実験で用いる事ができる回収量もあったため、最も LTβR-Ig 発現効率が良い培地であると考えた。

LTβR-Ig の α₁β₂ に対する結合解析

各培地に含まれる LTβR-Ig が LTα₁β₂ に対する結合活性をもつことを確認するため、LTα₁β₂ が発現することが知られている B リンパ球に対する結合活性による評価をおこなった (Fig. 4)。マウス脾細胞を用いた Flow Cytometry による解析の結果、脾細胞のうち 75.5 % がリンパ球と考えられる細胞集団として検出された。また、そのリンパ球集団に範囲を絞り解析したところ 51 % が B220 陽性細胞画分、46% が B220 陰性細胞画分 (非 B リンパ球)として検出された。B リンパ球マーカーである B220 陽性細胞画分と B220 陰性細胞画分 (非 B リンパ球) それぞれについて、LTβR-Ig 結合レベルを解析したところ、B220 陽性細胞画分では LTβR-Ig 由来蛍光シグナルの平均値は control-Ig の約 5 倍であった (Fig. 4)。一方、非 B リンパ球では LTβR-Ig 由来蛍光シグナルの中央値が control-Ig の約 0.7 倍であった。以上から LT 発現細胞に結合活性をもつ LTβR-Ig が回収できた可能性が高いと考えた。

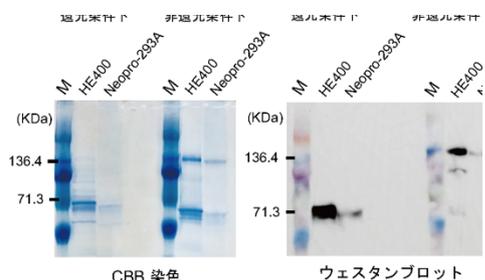


Fig. 3 CBB 染色、ウェスタンブロット法による LTβR-Ig の検出
LTβR-Ig 発現プラスミドを遺伝子導入した HEK 293T 細胞を NeoPro-

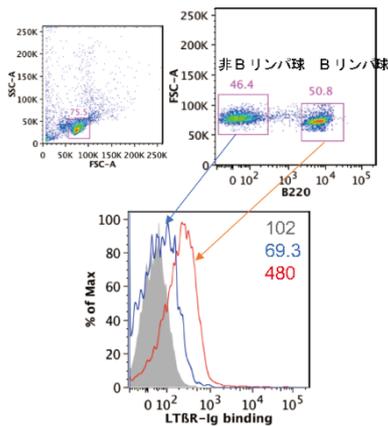


Fig. 4 LTβR-Ig の結合能解析

マウス脾臓細胞懸濁液を抗 B220 抗体および非濃縮 HE200 上清液で染色し、Flow Cytometry 法により B リンパ球および B リンパ球集団の LTβR-Ig 結合能を解析した。全細胞中の B リンパ球集団のみを解析対象とし、B220 陽性の B リンパ球集および陰性の非 B リンパ球集団それぞれについてヒストグラム成した。赤色のヒストグラムは B リンパ球中の LTβR-Ig 結合シグナル、青色は非 B リンパ球中の LTβR-Ig 結合シグナル、灰色は control-Ig 結合シグナルである。図中の数値は各ヒストグラムの平均値を示す。

LTβR は $LT\alpha_1\beta_2$ 以外に、腫瘍壊死因子の一つである LIGHT (homologous to lymphotoxins, exhibits inducible expression, and competes with HSV glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes) にも結合する (5)。これまで LTβR-Ig を用いたフローサイトメトリー法で LIGHT 発現レベルの解析が報告されている (6)。LIGHT は未熟樹状細胞で発現し、活性化に伴って発現が低下する分子である。リンパ球では活性化 T 細胞に発現するが、B リンパ球においては極めて低い (7, 8)。このことから、今回の実験では脾 B リンパ球中で LTβR-Ig の結合相手は $LT\alpha_1\beta_2$ である可能性が高いと考えられる。LTβR-Ig が B リンパ球表面の $LT\alpha_1\beta_2$ に選択的に結合することを確認するためには、抗 $LT\alpha_1\beta_2$ 抗体を

用いた阻害実験などを行う必要がある。一方、非 B リンパ球に対する LTβR-Ig の結合レベルは低く control-Ig と同等レベルであった。脾臓では LIGHT 陽性である活性化 T 細胞の割合は 25% であり (9)、LTβR-Ig が結合し得る細胞の割合が低いために陽性細胞集団として検出されなかった可能性が考えられる。

おわりに

これまで私の研究室では、無血清培地である Opti-MEM や無血清 D-MEM を用いて LTβR-Ig の回収を試みてきたが、培養上清中に LTβR-Ig の存在を示唆する結果は得られなかった。リコンビナントタンパク質を回収するための実験プロトコルでは、遺伝子導入後細胞がコンフルエントになるまで 3 日間培養したのち培養上清を回収することが推奨されているが、3 日間経過してもコンフルエントにはならなかったことから、これらの培地は、遺伝子導入用として適切な培地であるが、遺伝子導入後の細胞培養には適さないと考えられる。今回用いた 3 種類の培地では、いずれも細胞培養上清に LTβR-Ig の存在を示唆する結果が得られた。他の可溶性分子についても同様であるかは不明であるが、細胞培養液から高効率でタンパク質を回収するためには、細胞への遺伝子導入効率と併せて、異なる培地を用いた条件検討の必要かもしれない。

本研究では、LTβR-Ig が B リンパ球に発現する $LT\alpha_1\beta_2$ に対する結合活性

をもつことを示唆する結果が得られたが、得られた LT β R-Ig が機能的であるか、すなわち LT $\alpha_1\beta_2$ と LT β R の結合に阻害的に作用するかを確認する必要がある。本研究の最終目的である成熟 HEV 分化における LT β R シグナリングの関与を理解するためには、血管内皮細胞における LT β R シグナルが PNA β 分子や HEV 特異的に発現するアドレシンの発現を誘導することを示した上で、これらの分子発現が LT β R-Ig 添加によりが阻害されるか否かについて解析をおこなうことが重要である。

参考文献

1. Drayton DL, Ying XY, Lee J, Lesslauer W, & Ruddle NH (2003) Ectopic LT $\alpha\beta$ directs lymphoid organ neogenesis with concomitant expression of peripheral node addressin and a HEV-restricted sulfotransferase. *J. Exp. Med.* 197:1153-1163
2. Browning JL, *et al.* (2005) Lymphotoxin- β receptor signaling is required for the homeostatic control of HEV differentiation and function. *Immunity* 23:539-550
3. Gmep 株式会社 web サイト
4. 株式会社 アステック web サイト
5. Browning JL (2008) Inhibition of the lymphotoxin pathway as a therapy for autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 223:202-220.
6. Tamada K, *et al.* (2000) LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response. *J. Immunol.* 164:4105-4110.
7. Cohavy O, Zhou J, Granger SW, Ware CF, & Targan SR (2004) LIGHT expression by mucosal T cells may regulate IFN- γ expression in the intestine. *J. Immunol.* 173:251-258.
8. Duhen T, *et al.* (2004) Light costimulates CD40 triggering and induces immunoglobulin secretion: a novel key partner in T cell-dependent B cell terminal differentiation. *Eur. J. Immunol.* 34:3534-3541.
9. Harms R, Morsey B, Boyer CW, Fox HS, & Sarvetnick N (2012) Methamphetamine administration targets multiple immune subsets and induces phenotypic alterations suggestive of immunosuppression. *Plos One* 7.

本稿は理工学部生命科学科 免疫分子機能研究室 平成 30 年度卒業生である古川友香さんが実験をおこない、その成果をまとめた卒業論文もとに作成したものである。