新しい免疫センサーのための IgM-上皮増殖因子受容体融合タンパク質の試作とそのミエローマ細胞における膜発現[†]

上田 宏・菊地昌子・西村 肇

東京大学工学部 化学工学科^{††}

長谷川明・八木慎太郎

(株)東燃 基礎研究所^{†††}

新しい免疫センサーシステムの可能性を探るために、抗原結合能をもつ抗体分子に、EGF 受容体チロシンキナーゼの信号発生能を持たせた融合タンパク質を遺伝子レベルで作成し、ミエローマ細胞で発現させた。この融合タンパク質は元の抗体と同様にH鎖2本とL鎖2本が共有結合したヘテロテトラマー状態をとっており、抗原ニトロフェナセチル基に対する結合能を保持していた。セルソーターを用いた細胞膜表面抗体検出法と、細胞内オルガネラ分画により、このタンパク質が粗面小胞体からゴルジ装置を通り、抗体部分を外側にして細胞膜表面に発現されていることが確認された。これに対して膜型 IgM は粗面小胞体画分にしか発現が見られなかった。またこの受容体タンパク質は細胞内への信号伝達に必要な、タンパク質チロシンキナーゼ活性を持っていた。以上の結果から、ミエローマ細胞はこの様なセンサータンパクの発現系として充分利用可能であると考えられた。

緒 言

免疫グロブリンを用いたバイオセンサー（免疫センサー）は、モノクローナル抗体を用いることによる応用性の高さから近年魅力的な研究対象となっている。免疫センサーは抗原分子を結合、認識する部分（抗体）とその結合シグナルを増幅する部分とで構成される。この信号増幅部として補体とリポソームを使う方法¹⁾、電気化学ルミナセンスを使う方法²⁾など多数が提案されているが、これらの方法はまだ感度と安定性の両立に問題をかかえている。しかし、もし免疫グロブリン分子そのものに抗原結合によって制御される酵素活性を持たせることができれば、抗原結合シグナルを外部へ信号として取り出すのはかなり容易になり、高感度かつ安定なセンサーが実現できると考えられる。

単に抗体に酵素活性をもたせる為ならば他の酵素（ペルオキシダーゼなど）と化学的に結合させればよいが、それでは酵素活性を抗原結合の有無で制御することは不

可能に近い。そこで我々は遺伝子工学的手法を用いて抗体と酵素との融合タンパク質を作成し、できたタンパク質の評価を容易にしよう系を確立した。

抗体と結合させる酵素としては上皮性細胞や繊維芽細胞の細胞膜に存在するEGF（上皮細胞増殖因子）受容体の細胞質部分を用いることとした。EGF受容体は細胞質外側のリガンド結合部位へのEGFの結合により、その細胞質部分のタンパク質チロシンキナーゼ活性が上昇し、その結果細胞の増殖を誘導する事が知られている¹²⁾。またEGF受容体はインシュリン受容体とそのリガンド結合部位を交換してもそのリガンド（インシュリン）依存性チロシンキナーゼ活性を保持することが報告されている⁸⁾。そこで今回我々は、このEGF受容体のリガンド結合部位を免疫グロブリンIgMにかえたタンパク質を培養細胞表面に発現させ、これを細胞センサーとして上清中の抗原の検出に用いる系の作成を試みた。

この融合タンパク質を作成するために、ヒトおよびニワトリEGF受容体cDNAのEGF結合部位を、抗原(NP)特異的なマウスIgM遺伝子と交換したハイブリッド受容体遺伝子を作製し、これを免疫グロブリンL鎖を産生するミエローマ細胞に導入して発現させた。ミエローマ細胞では膜型IgMは膜まで輸送されないにもかかわらず¹¹⁾、我々が発現させた融合タンパク質は細胞膜表面に輸送さ

† 1990年7月31日受理；化学工学会第22回秋季大会（東京、1989年10月）および日本生化学会第62回大会（京都、1989年11月）にて発表

†† 〒113 文京区本郷7-3-1

††† 〒354 入間郡大井町西鶴ヶ岡1-3-1

れた。そしてこの融合タンパク質は細胞膜外側で抗原 (NP) を結合し細胞質部分でタンパク質チロシンキナーゼ活性を持つ、ハイブリッド受容体として存在することが確かめられた。

1. 実験方法

1.1 遺伝子構築

前項で述べたようにマウス IgM ゲノム遺伝子とヒト EGF 受容体遺伝子 cDNA を結合させて発現ベクターに組み込み、免疫グロブリン λ 1 鎖を分泌するマウスミエローマ細胞 J558L⁹⁾ に導入して目的タンパク質を発現させた。

マウス IgM ゲノム遺伝子としては抗原 (NP: 4-Hydroxy-3-Nitrophenyl acetic acid) 特異的ミエローマ B1-8 由来の変部と、IgM の定常部、および選択マーカーとして大腸菌のアmpicillin 耐性遺伝子とキサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (gpt) をコードするプラスミド pSV-V μ 1⁴⁾ を使用した。

ヒト EGF 受容体 cDNA としては、ヒト胎盤由来ライブラリーよりクローニングした EGF 受容体 cDNA (受容体タンパク C 末部分) および遺伝子バンク (JCRB-DNA) より供給を受けたプローブ cDNA である pE7³⁾ (受容体タンパク膜貫通領域〜キナーゼドメイン部分) を使用した。

双方の DNA を結合する際には、DNA アデニンメチラーゼ欠損株である大腸菌 GM33⁵⁾ より抽出した pSV-V μ 1 プラスミドと制限酵素 BclI の組み合わせで適当な場所 (分泌型 IgM C 末) での切断が可能となり、これと EGF 受容体遺伝子を合成 DNA リンカーを用いて結合させた (Fig. 1)。この結果抗原 (NP) 特異的分泌型 IgM の C 末に EGF 受容体の膜貫通配列と細胞質ドメインの結合したハイブリッド受容体タンパク質を発現させるベクターができ pSV-V μ ER と名付けた。

トリ赤芽球ウィルス AEV-H 由来のニトリ EGF 受容体遺伝子である erbB 遺伝子と IgM との結合は、pSV-V μ ER の膜貫通配列の 3' 側にある Dra III サイトを用いて行った。(pSV-V μ erb)

膜型 IgM 発現ベクター pSV-V μ m¹¹⁾ は、pSV-V μ 1 を Bcl I で切断しセルフライゲーションさせて作成した。

制限酵素、修飾酵素は (株) 宝酒造、(株) ニッポンジーン、(株) 東洋紡の製品を用いた。

1.2 遺伝子導入と発現

結合させた遺伝子 (pSV-V μ ER, pSV-V μ erb) および膜型 IgM 遺伝子 (pSV-V μ m) は大腸菌より抽出した後ゲルろ過で精製し、電気穿孔法によってミエローマ J558L に導入した。これらのプラスミドは pSV-V μ 1 由来のマーカー (gpt) をコードしているので、その後 250 μ g/ml キ

Fig. 1 Construction scheme of IgM-EGFR expression vector

サンチン-6 μ g/ml ミコフェノール酸入りの DMEM + 10% FCS 培地で選択した。

導入後約 2 週間で選択培地よりフィコール法で生細胞を回収し、DMEM+5%FCS 培地で培養した。

1.3 免疫沈降

対数増殖期の細胞 2×10^6 をメチオニンフリーの MEM + 1% FCS 培地で洗浄した後、3.7 MBq (100 μ Ci) の [³⁵S] メチオニンを含む 2 ml メチオニンフリー MEM + 1% FCS で 37°C, 16 時間培養した。PBS で 2 回洗浄し、0.5 ml の可溶性緩衝液 (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, 1.0 mM EGTA, 1% lmg/ml aprotinin, 1 mM PMSF, pH 7.5) で細胞膜を溶かし 0°C で 10 分間おいた後、15 krpm 10 分間遠心して核を除いた。上清を予め 30 分間、4°C でプロテイン A セファロースビーズ (Sigma) に結合させておいたウサギ抗マウス IgM (Zymed: コスモバイオ) と混合し、4°C, 120 分間回転混合させた。ビーズを洗浄緩衝液 1 (50 mM Hepes, 500 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.2% Triton X-100, 5 mM EGTA, pH 8.0) で 3 回、洗浄緩衝液 2 (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.2% Triton X-100, 5 mM EGTA, pH 8.0) で 3 回洗浄し、50 μ l の 2x 泳動用緩衝液 (0.125 M TrisCl, 4% SDS, 10% 2ME, pH 6.8) で 95°C, 3 分間処理して SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行った。泳動終了後 30% メタノール-10% 酢酸で 30 分処理したのち増感液 (EN³HANCE, Du Pont) で 30 分処理し、乾

Fig. 2 Immunoprecipitation of [^{35}S] labeled hybrid receptors expressed in J558L
7.5% SDS-PAGE of reduced protein is detected by autoradiography. Numbers leftside indicate molecular weight standards.

燥して -80°C , 1-2日オートラジオグラフィーを行った。

1.4 キナーゼ活性の測定

まず目的タンパク質を発現している細胞中からタンパク質発現量の多い物を限界希釈法によりクローニングした。それらの細胞を可溶性緩衝液で可溶化してウサギ抗マウスIgMおよびプロテインAセファロースを用いて免疫沈降させたのち、HNTG緩衝液(20mM Hepes, 150mM NaCl, 0.1% TritonX-100, 10% glycerol, pH7.5)で5回洗浄した。沈降物に r 位を $[^{32}\text{P}]$ でラベルしたATP 111kBq ($3\mu\text{Ci}$), 15mM MnCl_2 , 100 μM Na_3VO_4 を含むHNTG緩衝液25 μl を加えて室温で5分反応させ、タンパク質に取り込まれた $[^{32}\text{P}]$ をSDSポリアクリルアミド電気泳動後のオートラジオグラフィーで検出した。反応液には必要に応じてチロシンを含む合成基質を加えた。

抗原NPを用いたタンパク質精製とそれらのキナーゼ活性の測定は、免疫沈降の代わりにNP カブロン酸アフィニティークラムを作成して用い、カラムからの溶出には1mM NPカブロン酸(Cambridge Research Biochemicals: コスモバイオ)を用いた。

1.5 セルソーターによる膜表面受容体量の測定

細胞膜表面のIgM発現量を測定するために、セルソーター(EPICS-S(CS))を用いた。細胞表面の染色にはウサギ抗マウスIgM, ビオチン化抗ウサギIgおよびFITC-アビジンを用いた。

1.6 細胞内分画

常法に従い、不連続蔗糖密度勾配遠心法により細胞内

Fig. 3 *In vitro* autophosphorylation of immunoprecipitated hybrid receptors
 $[^{32}\text{P}]$ labeled protein is detected by autoradiography.

オルガネラ分画を行った¹⁾。その後、NP-BSAを抗原とし、二次抗体としてペルオキシターゼ標識抗マウスIgMを用いたELISA間接法により各画分のIgMの定量を行った。粗面小胞体とゴルジ装置の各画分の分布はそれぞれの標識酵素であるNADPH-チトクロムC還元酵素¹⁾とガラクトース転移酵素¹⁾の活性分布を測定する事で決定した。

2. 実験結果

2.1 融合タンパク質の発現

Fig.1の様に作成した遺伝子を導入した形質導入細胞について、細胞を $[^{35}\text{S}]$ メチオニンでラベルしてウサギ抗マウスIgMを用いて免疫沈降を行った(Fig. 2)。これより、形質導入細胞ではJ558Lには見られないバンドが出現しており、その分子量は120-140kdと予想されたものとはほぼ等しいことがわかる。

2.2 タンパク質チロシンキナーゼ活性の測定

次にこのように免疫沈降で精製したタンパク質について、*in vitro*での自己リン酸化反応をさせたもののオートラジオグラフィーを示す(Fig. 3)。Fig. 2の分子量にはほぼ対応した位置にはほぼ同じ強さのバンドが検出できたことから、抗IgM抗体で免疫沈降されたタンパク質が自分自身を基質としてリン酸化しており、その活性はC末がEGF受容体の受容体(V μ ER)とerbB遺伝子産物の受容体(V μ erb)ではほとんど変わらないことが認められた。

2.3 受容体の高次構造

この自己リン酸化活性は抗原であるNPを用いてアフィニティークラムした受容体タンパクについても検出された。V μ ER受容体タンパクを含む反応液に基質として外部からチロシン・グルタミン酸コポリマーを加えると、受容体自身に加えこの基質もリン酸化される(Fig. 4A)。このことから、受容体タンパクはタンパク質チロシン特

Fig. 4 Characterization of NP-affinity-purified receptor
A: Substrate phosphorylation activity detected by autoradiography; B: Reduced and unreduced molecular weights of the autophosphorylated hybrid receptor

異的キナーゼであることがわかる。又自己リン酸化反応後の $V\mu$ ER受容体を2-メルカプトエタノールで還元せずにSDSポリアクリルアミド電気泳動にかけると、約350kdを示す(Fig.4B)。受容体タンパクは抗原結合能があるのでH鎖とL鎖は1:1で結合して抗原結合部位を形成しているはずである。 $V\mu$ ER受容体のH鎖の分子量はFig.2より140kdであり、L鎖の分子量(30kd)を考えるとHL複合体の分子量は170kdとなり、少なくとも自己リン酸化活性を持つ受容体タンパク質は H_2L_2 のヘテロテトラマーを形成していると考えられる。

2.4 セルソーターによる受容体タンパクの膜発現の確認

ミエローマ細胞では膜型IgMは粗面小胞体に留まり、細胞膜上には発現されないことが知られている¹¹⁾。我々の作製した受容体発現細胞が細胞膜上に融合タンパクのIgM部分を発現しているかどうかを、細胞表面をウサギ抗マウスIgM、ビオチン化抗ウサギIgおよびFITC-アビジンで間接蛍光染色した後セルソーターを用いて観察した(Fig.5)。pSV- $V\mu$ ERおよびpSV- $V\mu$ erb導入細胞では明らかに蛍光強度のピークが右に移動しており、ハイブリッド受容体のIgM部分が細胞膜上に発現しているという確証が得られた。これに対して膜型IgM発現ベクターpSV- $V\mu$ mを導入した細胞では蛍光強度のピークの移動は見られなかった。(省略)

2.5 細胞内分画と受容体タンパク質の分布

$V\mu$ ERタンパクが膜(形質膜)まで輸送されているかどうかを別の角度から確認するために、細胞内オルガ

Fig. 5 Flow cytometric analysis of cell surface IgM expression of J558L and its transfectants

Fig. 6 IgM distribution of subcellular fractionated J558L cells

Cell homogenates are fractionated by step-wise sucrose density gradients and approximately equal volume of fractions are collected from the bottom.

ネラをその密度の違いによって分画し、各オルガネラ(粗面小胞体、滑面小胞体、コルジ装置)における受容体の存在比を膜型IgMと比較した(Fig.6)。分画後の粗面小胞体、ゴルジ装置の分布はそれぞれの標識酵素の活性で確認した。 $V\mu$ ERタンパクはゴルジ装置にピークが見られることから少なくともゴルジ装置までは輸送が行われている事がわかる。これに対して膜まで輸送されないことが知られている膜型IgMタンパクは、粗面小胞体画分にしかなピークが見られない。

本研究の結果として、チロシンキナーゼ活性を持った膜型抗体分子のミエローマ細胞における産生および活性評価系を確立することができた。動物細胞を用いた免疫センサーに関する報告は余り例がなく、特にミエローマ細胞に関しては初めてと思われる。ミエローマ細胞は他の付着性細胞に比べて継代が容易であり、単位培地当りに培養可能な細胞数も多いことから組み替えタンパクの大量生産系としては利点が多い。一方、ミエローマ細胞は抗体などの分泌性タンパク質の産生には適しているが、受容体などの膜タンパク質の生産には余り適していないと考えられてきた。しかし今回の我々の結果から、膜表面受容体の発現は十分可能であり、強力な抗体遺伝子のプロモーター、エンハンサーを利用して発現ベクターを作ることが出来る利点を考えれば十分実用性のある発現系であると言える。

我々の使用したJ558Lミエローマ細胞においては、膜型IgMは粗面小胞体に留まるのに対し我々の受容体は膜まで輸送されることが明らかとなった。膜型IgMと我々の受容体の違いはその膜貫通部分と細胞質部分のアミノ酸配列にある。細胞質部分を持った受容体と、その部分を欠失した受容体とともに高い効率で膜に発現する（投稿準備中）ことから、膜貫通部分のアミノ酸配列が膜輸送効率を決めていると考えられる。更に現在、その詳しい解析を進めている。

EGF受容体の行う信号伝達については近年その分子生物学的、生化学的解析が進み⁸⁾、特にそのチロシンキナーゼの活性化の持つ重要性についてはキナーゼ活性のないポイントミュータントを使った実験からそれが増殖信号の情報伝達において必須である事が明らかとなっている。またチロシンキナーゼ活性の制御メカニズムは、受容体同士の非共有結合的な多量体化による活性化という、アロステリック制御であることが明らかになりつつある。我々のハイブリッド受容体のキナーゼ活性が抗原によって制御されるかどうかは現在検討中であるが、ヒトCSF1受容体とT細胞表面抗原CD2とのキメラ受容体のチロシンキナーゼ活性が抗CD2抗体によって活性化され、増殖信号が伝達された⁹⁾という報告もあり、その可能性は充分にあると考えられる。

細胞が増殖を開始するときには細胞内のカルシウムイオンやマグネシウムイオン濃度、pH、膜電位などに様々な変化が生ずる。免疫センサーシステムとして細胞増殖信号を検出する場合には、このような細胞内の生理的变化を蛍光色素を用いて電気信号に変える事が可能であろう。

新しい免疫センサーシステムの可能性を探るために、

1) 抗原結合能をもつ抗体分子に、EGF受容体チロシンキナーゼの信号発生能を持たせた融合タンパク質を遺伝子レベルで作成し、ミエローマ細胞で発現させた。

2) この融合タンパク質は元の抗体と同様にH鎖2本とL鎖2本が共有結合したヘテロテトラマー状態をとっており、抗原ニトロフェナセチル基に対する結合能を保持していた。

3) セルソーターを用いた細胞膜表面抗体検出法と、細胞内オルガネラ分画により、このタンパク質が粗面小胞体からゴルジ装置を通り、抗体部分を外側にして細胞膜表面に発現されていることが確認された。これに対して膜型IgMは粗面小胞体画分にしか発現が見られなかった。

4) この抗原受容体タンパク質は細胞内への信号伝達に必要な、試験管内でのタンパク質チロシンキナーゼ活性を持っていた。以上の結果から、ミエローマ細胞がこのような受容体タンパクの発現系として利用可能であり、新しい免疫センサーとしての可能性を持っていることが示唆される。

[謝 辞] IgM遺伝子をコードするプラスミドpSV-V μ 1を供与頂いたイギリスMRCのNeuberger博士、erbB遺伝子をコードするプラスミドpAE7.7を供与頂いた東京大学医科学研究所の山本雅先生、セルソーターの使用にあたり便宜を図って頂いた東京大学応用微生物研究所の矢部勇先生に感謝する。

Literature cited

- 1) Bole, D.G., L.M. Hendershot and J.F. Kearney: *J. Cell. Biol.*, **102**, 1558 (1986)
- 2) Ikariyama, Y., H. Kunoh and M. Aizawa: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **128**, 987 (1985)
- 3) Merlino, G.T., S. Ishii, J. Whang-peng, T. Knutsen, Y. Xu, A.J.L. Clark, R.H. Stratton, R.K. Wilson, D.P. Ma, B.A. Roe, J.H. Hunts, N. Shimizu and I. Pastan: *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 1722 (1985)
- 4) Neuberger, M.S.: *EMBO. J.*, **2**, 1373 (1983)
- 5) Nishikura, K. and G.A. Vuocolo: *ibid.*, **3**, 689 (1984)
- 6) Oi, V.T., S.L. Morrison, L.A. Herzenderg and P. Berg: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 825 (1983)
- 7) Omura, T. and S. Takesue: *J. Biochem.*, **67**, 249 (1970)
- 8) Riedel, H., T.J. Dull, J. Schlessinger and A. Ullrich: *Nature*, **324**, 68 (1986)
- 9) Roussel, M.F., C. Transy, J. Kato, E.L. Reinherz and C.J. Sherr: *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 2407 (1990)

- 10) Shiba, K., Y. Umezawa, T. Watanabe, S. Ogawa and S. Fujiwara: *Anal. Chem.*, **52**, 1610 (1980) *J.*, **6**, 3969 (1987)
11) Sitia, R., M.S. Neuberger and C. Milstein: *EMBO* 12) Ullrich, A. and J. Schlessinger: *Cell*, **61**, 203 (1990)

Construction of Hybrid Protein Combining Immunoglobulin and Epidermal Growth Factor Receptor and Its Expression on the Myeloma Cell Membrane

Hiroshi Ueda, Masako Kikuchi and Hajime Nishimura

Dept. of Chem. Eng., Univ. of Tokyo, Tokyo 113

Akira Hasegawa and Shintaro Yagi

TONEN Co., Fundamental Research, Iruma 354

Key Words : Biochemical Engineering, Biosensor, Hybrid Protein, Immunoglobulin, Myeloma, Protein Engineering, Flow Cytometry

A hybrid receptor gene that combines the murine immunoglobulin IgM gene and a cDNA encoding the cytoplasmic domain of human epidermal growth factor receptor (EGFR) was constructed to cultivate the possibility of a new biosensor. The construct was transfected into myeloma cell which expresses Ig light chain. After selection, transfectant cells which express IgM-EGFR chimeric receptor protein were obtained.

The chimeric protein could assemble to H₂L₂ heterotetramer conformation and had the same antigen 4-Hydroxy-3-Nitrophenacetyl binding activity as its parent murine IgM. While wild-type membrane IgM is not transported to the plasma-membrane of this cell line, the chimeric receptor was transported from endoplasmic reticulum to the plasma membrane through Golgi apparatus. Moreover, this antigen receptor had *in vitro* protein tyrosine kinase activity, which was necessary for intracellular signal transduction. The results indicate that myeloma cells can be used as an expression system of such biosensor proteins.

~~~~~