

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

脳の科学 (1999.05) 21巻5号:537～542.

ニューロサイエンスの研究法  
キメラタンパク作成法と利用

船越 洋, 紀氏A.優子, 中村敏一

// ニューロサイエンスの研究法 //

キメラタンパク作成法と利用

船越 洋\*, 紀氏 A. 優子\*, 中村 敏一\*

はじめに

古くは化学修飾, 例えば活性エステルとのカップリング, テトラニトロメタンや塩化N-メチルニコチンアミドとの反応によりその分子の構造や機能的部位の解析を行うことが主流であったが, 遺伝子工学的手法によるタンパク質の化学的・物理的な特性修飾の実現で, 構造・機能相関解析手法は大きく改変された。これを可能にしたのは, オリゴヌクレオチドを用いた遺伝子変異の手法とポリマーゼ連鎖反応(PCR)法で, それぞれM. SmithとK. Mullisに1992年ノーベル化学賞をもたらしている。さらにT. A. Kunkelは部位特異的遺伝子変異を行う一般的手法であるクンケル法の基礎を提供し, この方法の確立でキメラ分子作

成がより容易となった。これに加え最近キメラ分子作成にPCR法の応用例が増加し, PCR法が次第にクンケル法に取って代わろうとしている。神経科学の分野でもキメラ分子を用いた解析は, 多くの成果をもたらしつつある。本稿では, まずキメラ分子の作成法について, 次いでその神経科学への応用について私たちの研究例を中心に紹介したい。

I. キメラ分子作成法

1. クンケル法を用いたキメラ分子作成法<sup>9)</sup>(図1A)

①まずキメラ作成に必要なオリゴヌクレオチドをデザインする。この方法では極端に長い配列を置換するキメラは作成しにくい。そのため, どの領域を他の分子と置換するかは十分な検討を有する。具

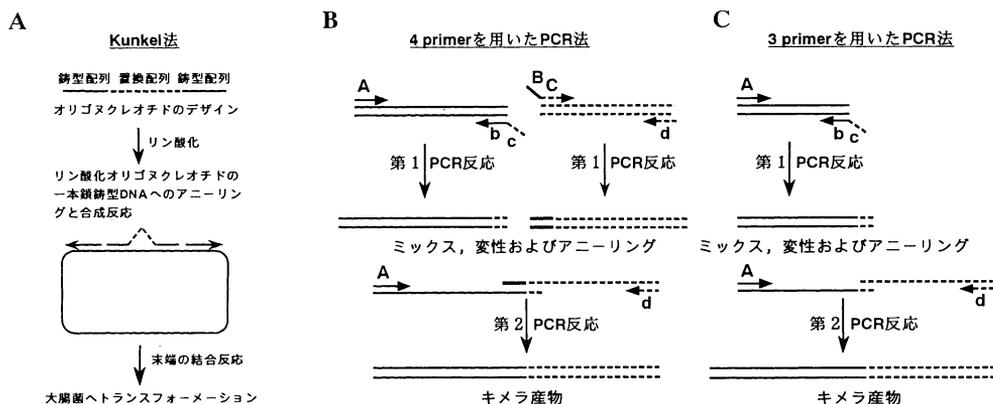


図1 キメラ分子作成の模式図

Techniques and application of chimeric protein synthesis.

\*大阪大学医学部バイオメディカル教育研究センター腫瘍生化学研究部 [〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2]

Hiroshi Funakoshi, Yuko A. Kishi, Toshikazu Nakamura: Division of Biochemistry, Department of Oncology, Biomedical Research Center, Osaka University Medical School, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka, 565-0871 Japan.

体的には鋳型と異なる置換配列の両側に鋳型配列と同じ配列を十分な長さ付加したオリゴヌクレオチドをデザインする。②用いる鋳型 DNA をチミジンのかわりにウラシルを用い一本鎖で合成する。③合成オリゴヌクレオチドをリン酸化し、置換に用いる鋳型一本鎖 DNA にアニールさせる。④オリゴヌクレオチドの伸張反応を行い、末端の結合反応を行う。⑤こうしてできたウラシルを含む野性型 DNA とウラシルを含まないキメラ DNA 鎖との 2 本鎖 DNA を大腸菌にトランスフォームすると、野性型 DNA 鎖はウラシル-N-グリコシラーゼで分解され、変異の入ったキメラ DNA 鎖が鋳型となって DNA 合成が行われる。⑥次いでキメラ DNA 含有大腸菌からプラスミドを抽出し、塩基配列を確認する。この方法の利点は、遺伝子置換のために合成するオリゴヌクレオチド以外の配列中に遺伝子変異がおこることが非常にまれな点である。

## 2. PCR 法を応用したキメラ分子作成法<sup>1,7)</sup>

PCR 法を応用したキメラ分子作成法は、クンケル法に比べて置換できる領域のサイズの制約が少なく、操作も比較的煩雑でない点が利点である。但し増幅領域全体のシーケンスを行い遺伝子変異がないことを確認することが必須である。

### 2-1. 4 プライマーを用いた PCR 法によるキメラ分子作成法

2 つの分子各々に相補的な配列を連続に接続したキメラプライマー（仮称）を設定することにより 2 つの異なる遺伝子を PCR 法でつなぐ方法である。このため図 1 B のように 4 つのプライマーを設定する。この方法ではセンス・アンチセンスの 2 種類のキメラプライマーを合成することで 2 つの遺伝子断片をそれぞれ一旦増幅し、改めてその 2 断片を接続する方法である。一見複雑に見えるが確実性は高い。

### 2-2. 3 プライマーを用いた PCR 法によるキメラ分子作成法

4 プライマーを用いた PCR 法と基本的には全く同じ概念に基づいている。ただし、キメラプライマーはアンチセンス 1 つのみ作成するため合計 3 つのプライマーしか設定する必要がない点が上

記と異なる(図 1 C)。この方法では、アンチセンスキメラプライマーで増幅した遺伝子断片と、もう 1 つの遺伝子断片とを、キメラプライマーの配列でアニールさせ PCR 法で接続する。アニールできる長さが 4 プライマー法に比し多少短くなる傾向があるため、アニールの安定性という意味では 4 プライマーに比し低い、より単純で有効性も高い。

## II. キメラ分子の *in vitro* 応用例

### 1. 受容体細胞外ドメインとイムノグロブリン Fc の融合キメラ分子の作成と応用 (HGF ファミリーの受容体-Fc 融合キメラタンパク質による受容体機能阻害実験)

最近 HGF の神経栄養作用が注目されている<sup>2,3)</sup>。HGF のファミリー分子 HGF-like protein (HLP) も *in vitro* 初代培養ニューロンに対し濃度依存性に神経栄養作用（神経突起伸長，細胞移動促進作用）を示すが，その効果発現には極低濃度の他の因子の共存が必要であった<sup>4)</sup>。HLP に純粋に由来する神経栄養作用の同定は，HLP の特異的受容体である Ron の機能を阻害することで可能となる。そこで私たちは PCR 法を応用して Ron の細胞外ドメインとイムノグロブリン Fc とのキメラ分子 (Ron-Fc) を作成し，Ron の機能を特異的に阻害して HLP 依存性神経栄養作用を評価することに成功した<sup>4)</sup>(図 2 A)。さらに私たちは Ron-Fc や HGF の特異的受容体 c-Met を用いた同様のキメラ分子 (Met-Fc) のリコンビナントタンパク質による *in vivo* 機能解析も試みている。これらの方法の応用により，神経系における新規分子やその受容体分子の機能解析が進むと期待されている。

### 2. リガンドファミリーのドメイン置換 (キメラ分子作成) による構造・機能相関解析

神経系の解析の中でも有名な応用例は，ニューロトロフィンのキメラ (NGF/BDNF) の解析例で，筆者の留学先であるカロリンスカ研究所分子神経生物学教室で行われた<sup>8)</sup>。NGF と BDNF のアミノ酸配列の中で保存領域と非保存領域（可変領域）の 2 つのドメインに分類し，このうち NGF

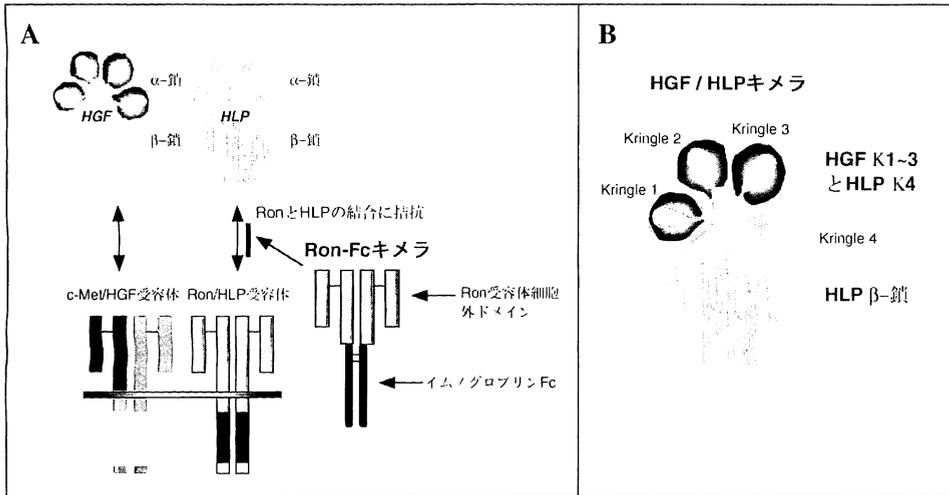


図2 HGFとHLPおよびその受容体を基盤としたキメラ分子作成応用例

A. Ron/HLP 受容体の細胞外ドメインとイムノグロブリンFcとのキメラ分子の作成と応用。Ron 受容体のうち膜貫通領域と細胞内ドメインを欠如させた細胞外ドメインとFcとのキメラ分子は、可溶性分子であり、リガンドであるHLPとの結合性が保持されているためHLPと内因性Ronとの結合を競合阻害するRon機能阻害分子として機能する。B. HGFとそのファミリー分子HLPは4つのクリングルドメイン(K1~K4)からなるα鎖とβ鎖から構成されるヘテロダイマーである<sup>9)</sup>。HGFおよびHLPの各ドメインの構造・機能相関は、それぞれのドメインを置換したHGF/HLPキメラ分子を作成することで解析できる。

とBDNFの非保存領域を置換したキメラ分子を作成し、それぞれの特異的機能を解析したものである。この解析はさらにNGF、BDNFとNT-3のキメラ分子の解析に発展した(キメラニューロトロフィンの項参照)。他の分子への応用例としてはFGFとKGFのキメラ分子の解析例が知られる。私たちはHGFとHLPのキメラ分子(HGF/HLP)各種をPCR法を応用して作成し、解析を進めている(図2B)。

3. 未知のリガンドのクローニング

受容体に対するリガンドが不明である際、受容体細胞外ドメインとイムノグロブリンFcとのキメラ分子を作成し、このアフィニティーカラムにより直接リガンドを精製することでリガンドの一部アミノ酸配列を決定することができる。私たちが最近新規神経栄養システムとして機能することを同定したGas6-Skyチロシンキナーゼ型受容体ファミリーのSky<sup>3)</sup>に対するリガンドもこの方法で同定されている<sup>10)</sup>。

III. キメラ分子作成によるin vivo応用例：キメラニューロトロフィン(人工神経栄養因子)の神経再生促進作用

私たちはキメラニューロトロフィン“汎ニューロトロフィン(pan-neurotrophin: PNT-1)”遺伝子を神経損傷時に特異的に誘導できるトランスジェニックマウスを作成し、このマウスの神経再生時における機能を解析することで、神経再生促進への臨床応用の可能性を模索した<sup>5)</sup>。

1. PNT-1分子の構造とin vitro活性

PNT-1は、神経栄養因子であるニューロトロフィンの各メンバーNGF、BDNFおよびNT-3の一部遺伝子配列を入れ替えたキメラ分子である(図3A)。具体的にはTrkC受容体を特異的受容体とするNT-3遺伝子を骨格とし、NGFのTrkA受容体結合活性化に重要なN末端領域およびBDNFのTrkB受容体活性化に重要な第5可変領域をNT-3の相当領域と置換することで、すべてのTrk受容体を活性化できる、すなわち

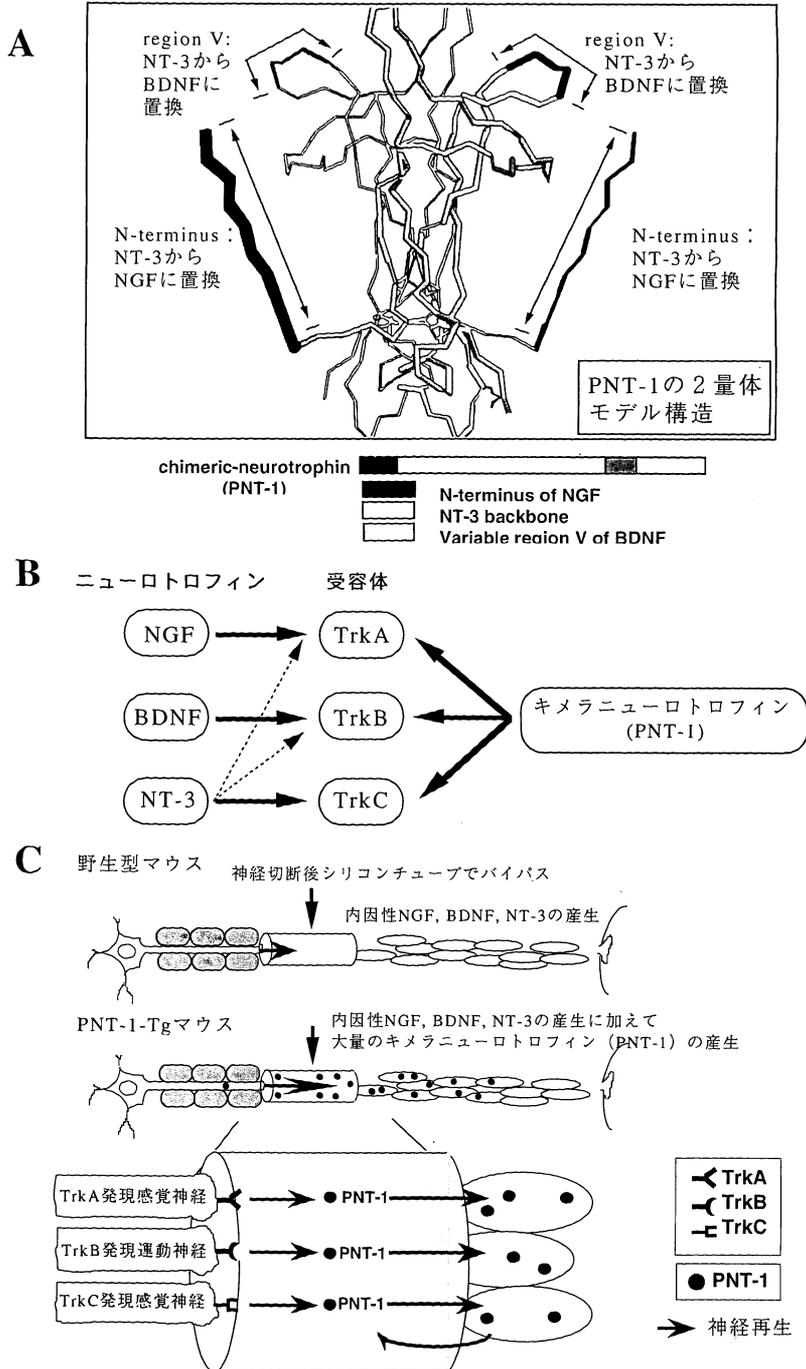


図3 人工神経栄養因子（キメラニューロトロフィン：PNT-1）の構造と機能

A. PNT-1の2量体のモデル構造。B. ニューロトロフィンの各メンバーNGF, BDNF, NT-3および人工分子PNT-1の受容体との結合, リン酸化, 活性化の特異性。直線は結合親和性が高いことを, 波線は結合親和性が低いことを示している。C. PNT-1のin vivo神経再生促進作用。

NGF, BDNF, NT-3 すべての活性をもつことを期待し作成された (図 3 B)。私たちはまず PNT-1 遺伝子を Fisher ラット NIH3T3 細胞に安定遺伝子導入しその細胞上清がニワトリ後根神経節の細胞生存を促進すること, その促進活性が NGF, BDNF および NT-3 各々単独での作用の累積分に相当することを確認した。さらにリコンビナント PNT-1 タンパクを用いて詳細な解析を行った結果, PNT-1 はすべての Trk 受容体に結合しリン酸化すること, それらのすべての受容体の生物活性を促進できることが証明された。

## 2. PNT-1 分子の *in vivo* 神経再生促進活性

末梢神経は, TrkA, TrkB または TrkC 受容体の特異的に発現した感覚・運動混合神経である (図 3 C)。末梢神経損傷時にニューロトロフィンを受容体と協調して損傷神経遠位グリア細胞で発現制御を受ける<sup>5)</sup>。もし発現制御を受けたニューロトロフィンが神経再生を促進するとしても, その標的神経特異性から 1 つのニューロトロフィンで末梢感覚・運動両神経の再生を促進するのは難しいことになる。私たちは, BDNF プロモーターのうち神経損傷で特異的に活性化される一部領域 (BDNF プロモーター IV) の下流に PNT-1 遺伝子を接続した構築を用い, PNT-1 発現トランスジェニックマウスを作成した<sup>6)</sup>。このマウスは通常 PNT-1 は発現しないが, 神経損傷時に PNT-1 遺伝子を損傷神経遠位グリア細胞特異的に誘導できる。このマウスと野性型マウスで座骨神経を大腿中央部で切断し, 切断両端をシリコンチューブで架橋した。電気生理学的・組織学的解析結果, 野性型マウスに比べ PNT-1 遺伝子誘導マウスではシリコンチューブを超え再生する神経数が明らかに増大しており, その神経再生促進作用は運動・感覚両神経に認められた<sup>6)</sup>。これはキメラ分子が NGF, BDNF, NT-3 すべての活性を *in vivo* で示したためと考えられる。また, この実験により損傷神経遠位グリア細胞に誘導されるニューロトロフィンが神経再生を促進するというこれまでの仮説を証明することができた。これは人工神経栄養因子というキメラ分子の神経科学分野での新しい応用例である。

## IV. キメラ分子を用いた解析の問題点と利点

キメラ法は遺伝子変異法の一つであり, 内因性の分子に比べ立体構造が多少修飾される可能性がある。また接続部の配列によっては, 重要な機能が隠れてしまったり, 逆に人工的な機能が出現する可能性もゼロとは言えない。これらのことが実験結果に影響することはまれであるし, 私たちはキメラ分子作成による実験結果の評価を慎重に行っている。また複数のキメラ分子を解析することでこれらの影響を最小限にできると考えている。

上記問題点を考慮にいられてもキメラ分子の作成には, 大きな利点がある。従来タンパク質分解酵素で切断した部分断片を用いたり, 化学的修飾ではじめて可能であった構造・機能相関を迅速に決定するのに有利である。また, 迅速に各ドメイン構造等の重要性を同定するのに有効であるばかりでなく, ファミリー分子やレセプターの機能解析に有利である。

## おわりに

キメラタンパク質の作成と応用例について紹介した。キメラタンパク質の作成は, PCR 法を応用することで比較的容易に作成できるようになってきている。その利用法は多岐にわたるが, 特に神経系における応用例としては, 既知の栄養因子を基盤とした人工神経栄養因子等の開発応用や, 受容体の細胞外ドメインにイムノグロブリンの Fc を結合させたレセプターパディー等があり, 魅力的である。これらのトランスジェニックマウスやノックインマウス作成による *in vivo* での機能解析もさらに進んでいくと考えられる。

またキメラ分子解析により同定された重要な機能ドメインにさらにランダム遺伝子変異を導入した遺伝子変異ライブラリーの作成を行うことで, より精緻な解析が可能となると期待されている。このためにはスマートに迅速に大量のライブラリーをスクリーニングできる方法の適用 (例えば yeast two-hybrid 法やファージディスプレイ法) が必須である。私たちは後者の方法を用いて HGF およびそのファミリー分子の解析や HGF を基盤とした第 2 世代人工機能分子の開発研究を

進めている。これらのアプローチは、臨床医学への貢献の可能性を秘めた夢のある研究であり、今後さらに広く応用され、また発展していくことを願ってやまない。

### Acknowledgement

キメラニューロトロフィンの研究に関しては Carlos, F. Ibanez 教授, 現ドイツマックスプランク研究所 Leopold, L. Ilag 博士をはじめとする多くのカロリンスカ研究所分子神経生物学教室および神経科学部門の皆様に, また Ron レセプターバディーの研究に関しては, 熊本大学須田教授および現さわい製薬片岡先生に, また御推薦頂きました赤澤智宏博士に心より深謝致します。

### 文 献

- 1) Cho, M-J., Lemaux, P. G.: Rapid PCR amplification of chimeric products and its direct application of in vitro testing of recombinant DNA construction strategies. *Mol. Biotech.* 8, 13-16, 1997.
- 2) 船越洋: HGF と神経系: 新しい神経栄養因子としての HGF. HGF の分子医学. (中村敏一, 萩原俊男監修), pp. 61-67, メディカルレビュー社, 1998.
- 3) 船越洋, 紀氏 A. 優子, 中村敏一: 海馬ニューロンに対する新しい神経栄養因子—HGF/c-Met と Gas6/Sky ファミリーの新規神経栄養システムとしての同定—別冊・医学のあゆみ“神経細胞死制御”(三須良實, 赤池昭紀 編) pp. 209-213, 医歯薬出版, 1998.
- 4) 船越洋, 中村敏一: 未発表
- 5) Funakoshi, H., et al.: Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J. Cell Biol.*, 123 (2): 455-465, 1993.
- 6) Funakoshi, H. et al.: Targeted expression of a multifunctional chimeric neurotrophin in the lesioned sciatic nerve accelerates regeneration of sensory and motor axons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95 (9): 5269-5274, 1998.
- 7) Genevieve, P-K.: Construction of chimeric molecules by a two-step recombinant PCR method. *BioTechniques*, 16, 1010-1011, 1994.
- 8) Ibanez, C. F., Ebendal, T., Persson, H.: Chimeric molecules with multiple neurotrophic activities reveal structural elements determining the specificities of NGF and BDNF. *EMBO J.*, 10 (8): 2105-2114, 1991.
- 9) Kunkel, T. A., Bebenek, K., McClary, J.: Efficient site-directed mutagenesis using uracil-containing DNA. *Methods Enzymol.*, 204: 125-39, 1991.
- 10) Stitt, T. N. et al.: The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell*, 80 (4): 661-70, 1995.