

## 機能的なリコンビナント AIM (Apoptosis Inhibitor of Macrophage) タンパク質の作製

大場 麻生, 中島 克彦, 宮崎 徹

(東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター分子病態医科学部門)

### 1. AIM (apoptosis inhibitor of macrophage)

AIM は分化成熟したマクロファージが特異的に産生する約 50 kDa の分泌型タンパク質であり, 三つの SRCR (scavenger receptor cystein-rich) ドメインからなる. 1999 年に同定され, マクロファージ自身のアポトーシスを抑制する機能をもつことから apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) と命名された (他に CD5L, Sp $\alpha$ , Api6 などの呼称がある)<sup>1)</sup>. マクロファージが酸化 LDL (low density lipoprotein) を取り込んだ際, 核内受容体である LXR (liver X receptor)/RXR (retinoid X receptor) ヘテロ二量体が活性化されることで AIM の発現が誘起される<sup>2-4)</sup>. 分泌型タンパク質であることから, AIM は血中に存在し, 種々の疾患でその血中濃度が増加することが知られている<sup>1,5-7)</sup>. 例えば, マウスに高脂肪食 (high-fat diet; HFD) を負荷し肥満を誘導すると, AIM の血中濃度は 5~7 倍上昇する<sup>8)</sup>.

動脈硬化巣内で参加 LDL を取り込み泡沫化したマクロファージは酸化 LDL による発現誘導機序によって, AIM を強く産生する. 産生・分泌された AIM は泡沫化マクロファージのアポトーシスを抑制し, その結果細胞の局所への蓄積を招き硬化巣を肥厚させる. 実際に, AIM を欠損した動脈硬化モデルマウス (AIM<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup>マウス) では, 硬化巣においてマクロファージのアポトーシスの顕著な増加が見られ, さらにそれに伴う病巣の炎症反応の軽減により, 病態の初期から後期にかけて動脈硬化の著しい軽減が観察された<sup>4)</sup>. このように, AIM は硬化巣マクロファージにアポトーシス抵抗性をもたらすことで, 病態進行に深く関与している<sup>4)</sup>.

また AIM は CD36 を介したエンドサイトーシスにより脂肪細胞に取り込まれ, 細胞質内の脂肪酸合成酵素 (fatty acid synthase; FASN) に結合することによってその酵素活性を低下させる結果, 脂肪細胞内に蓄積していたトリアシルグリセロールを脂肪酸とグリセロールに分解し細胞外に放出させる, いわゆる脂肪分解効果を有することが最近明らかになった<sup>9)</sup>. この機能により, AIM は抗肥満効果を持つが, 肥満状態で過度に AIM が脂肪分解を行うと, 細胞外に放出された大量の脂肪酸が脂肪細胞上の Toll 様受容体 (Toll-like receptor; TLR) を刺激し, 肥満に伴う慢性炎症の引き金となり, インスリン抵抗性, ひいては 2 型糖尿病や動脈硬化を惹起する. したがって AIM<sup>-/-</sup>マウスに HFD を負荷しても, 肥満はするが慢性炎症やインスリン抵抗性は著しく抑制される<sup>9,10)</sup>.

このように, AIM は生活習慣病の様々な病態, 様々な局面に関与しており, 新しい治療のターゲットとしても有望であるため, AIM に対する関心度は急速に増加しており, 詳細な機能検討やモデル動物での疾患治療効果の解析のため, 機能性の高い recombinant AIM (rAIM) タンパク質を安定して作製・精製できるプロトコルを確立することが急務となっている.

### 2. 機能的 rAIM 作製のための宿主細胞培養条件とタンパク質精製法

以前我々が行った検討から, rAIM は動物細胞で産生させないと, アポトーシス抑制や脂肪分解の機能が著しく低下することが分かっていた (未発表データ). 動物細胞で組換えタンパク質を作製する場合, 精製の便宜性と効率を図るため, 無血清培地中でタグを負荷したタンパク質を産生させ, タグに対する抗体で精製することが多く行われる. 我々もまず, 専用の無血清培地に 0.1% のウシ胎仔血清 (fetal bovine serum; FBS) を加えて培養した HEK293T で, HA タグを C 末端に負荷した rAIM-HA を pCAGGS 発現ベクターを用いて産生させ, 培養上清から抗 HA 抗体カラムを用いて rAIM-HA を精製した. しかし, こうして作

An optimum method for generation of functional recombinant apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) protein  
Mai Ohba, Katsuhiko Nakashima, and Toru Miyazaki  
(Laboratory of Molecular Biomedicine for Pathogenesis, Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Faculty of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

製した rAIM-HA は極めて低い脂肪分解活性しか有しておらず、その力価（一定濃度での脂肪分解効果）は安定しなかった。これは細胞を CHO に変えても、あるいは培養液中 FBS を 0% から 0.5% の間で変化させても同様であった。

そこで、次に、5%FBS 存在下で HEK293T 細胞が産生した rAIM-HA を抗 HA 抗体カラムで精製しようとしたところ、興味深いことに、rAIM-HA は抗体カラムにほとんど吸着されず、最終的な精製後の収量はほぼ 0 であった。しかし、同じ培養上清から、我々の作製した抗 AIM モノクローナル抗体 (clone 11G3) カラムで精製した場合、

rAIM-HA は効率よく精製され、しかも前述の無血清培地中で産生させ、抗 HA 抗体カラムで精製した rAIM-HA に比較して高い脂肪分解機能を有していた。以上の結果を図 1 にまとめた。

したがって、その産生過程で正常に folding された rAIM-HA は、C 末端 HA タグを立体構造上露出しておらず、逆に抗 HA 抗体カラムで精製可能な HA タグを露出している rAIM-HA は正常な立体構造を取っていないため、その機能も非常に低いものと考えられる。FLAG や His タグを用いても同様の結果であった (未発表データ)。また、分泌タンパク質を作製する場合通常試みないことではある

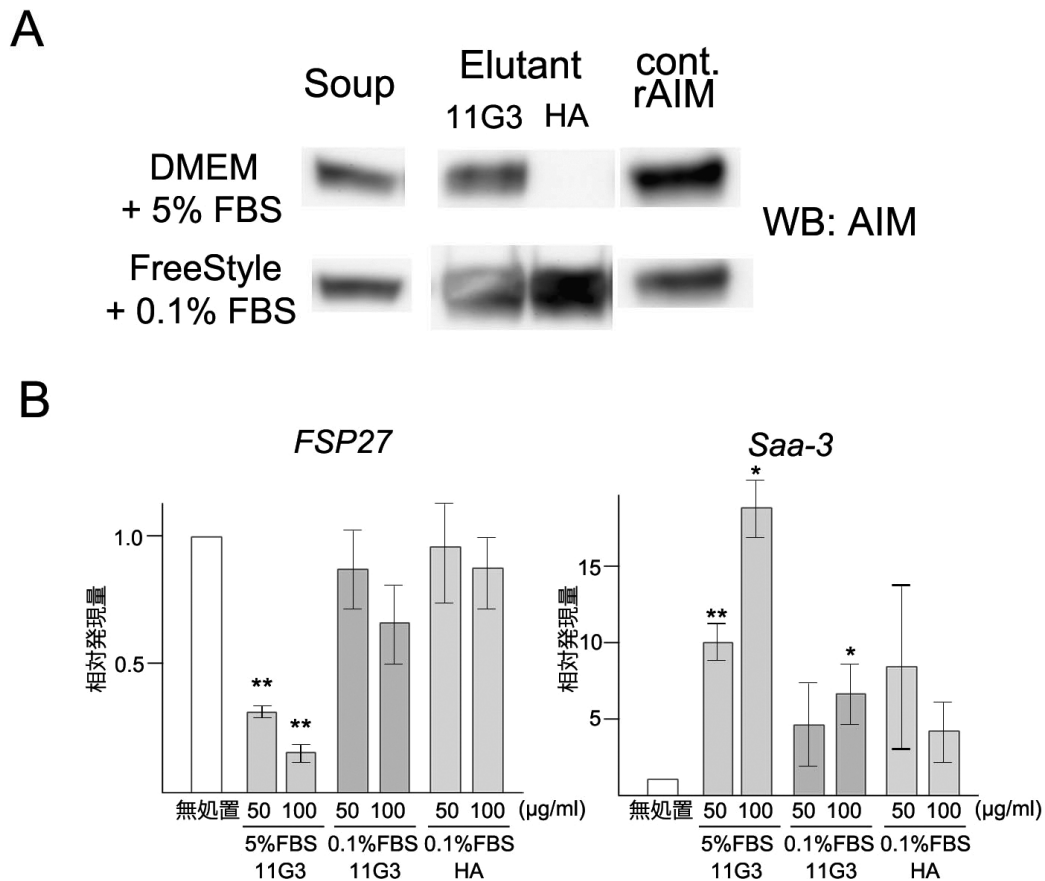


図 1 作製法の異なる rAIM の比較

(A) DMEM+5% FBS あるいは FreeStyle+0.1% FBS の培養条件で産生したマウス rAIM-HA の、培養上清 (Soup; 10 µl), 11G3 抗体カラム (11G3) あるいは抗 HA 抗体カラム (HA) で精製した溶出液 (Elutant; 10 µl) を抗マウス AIM ポリクローナル抗体でウェスタンブロット法を行った。コントロールとして精製済みの rAIM-HA 10 ng を用いている (cont. rAIM)。DMEM+5% FBS の培養条件で産生された rAIM-HA は抗 HA 抗体カラムによる精製後の溶出液では検出されない。

(B) DMEM+5% FBS の培養条件で産生し 11G3 抗体カラム (11G3) で精製した rAIM-HA、および FreeStyle+0.1% FBS の培養条件で産生し、11G3 抗体カラムあるいは抗 HA 抗体カラム (HA) で精製した rAIM-HA を、それぞれ 50 µg/ml, 100 µg/ml の濃度で分化した 3T3-L1 脂肪細胞に付加し、2 日後に脂肪分解のマーカーである FSP27 (脂肪分解が誘導されると低下する)<sup>8)</sup>、および脂肪分解によって排出される脂肪酸が TLR4 を刺激することによって誘導される炎症<sup>9)</sup>のマーカーの一つ Serum amyloid A-3 (Saa-3) の mRNA を定量的 RT-PCR によって解析した。rAIM を負荷しない細胞をコントロールとして、それとの相対値をグラフにした。n=3, Error Bar: S.E.M. \*: p<0.05, \*\*: p<0.01.

## テクニカルノート

が、HA タグをリーダー配列（シグナル配列）の直下に付加し、N 末端にタグを付加した HA-rAIM の場合も、活性化体 rAIM は抗 HA タグ抗体には保持されにくく、正常な folding を持ち高い脂肪分解機能を有する rAIM ではタグがタンパク質表面に露出していないと考えられる（未発表データ）。

また、今回使用した抗 HA 抗体カラムでは、無血清培地中で産生させた rAIM-HA も同様の効率で精製できたが、その活性はやはり著しく低いものであった。したがって、十分な FBS を含む培地中で宿主細胞を培養することが rAIM に正常な folding をさせるために必要な条件であると考えられた。

### 3. 抗 AIM 抗体

ここで使用した抗 AIM 抗体（11G3）は、実は無血清培地で HEK293T 細胞に産生させ、抗 HA 抗体カラムで精製した、機能が低い rAIM-HA をラットに免疫して得られた 50 クロンのモノクローナル抗マウス AIM 抗体の中の一

つである。前章で記載したように、クローン 11G3 抗体は、folding が不完全で活性が低い rAIM-HA も精製可能であった。したがって、本抗体のエピトープは、rAIM の活性の有無によらず rAIM が持つ部位だと予想される。このことから、抗 HA 抗体カラムで精製した機能が低い rAIM-HA を免疫しても、機能的 rAIM の精製に適した抗体が得られると考えられる。しかしながら、今回高機能の rAIM の精製に適する抗体は 50 クロンのうち数クローンに過ぎず、その率は低い。中には、抗 HA 抗体カラムと同じく、不完全な folding を持つと思われる rAIM-HA を優先的に精製してしまうクローンも存在していた。したがって、抗 AIM 抗体を使用する場合にも、十分な検討が必要である。

### 4. ま と め

以上のように、機能的 rAIM を作製するためには、(1) 動物細胞で作製する、(2) 宿主細胞は十分な血清濃度の培地条件で培養する、(3) タグを付加しても、タグによる抗

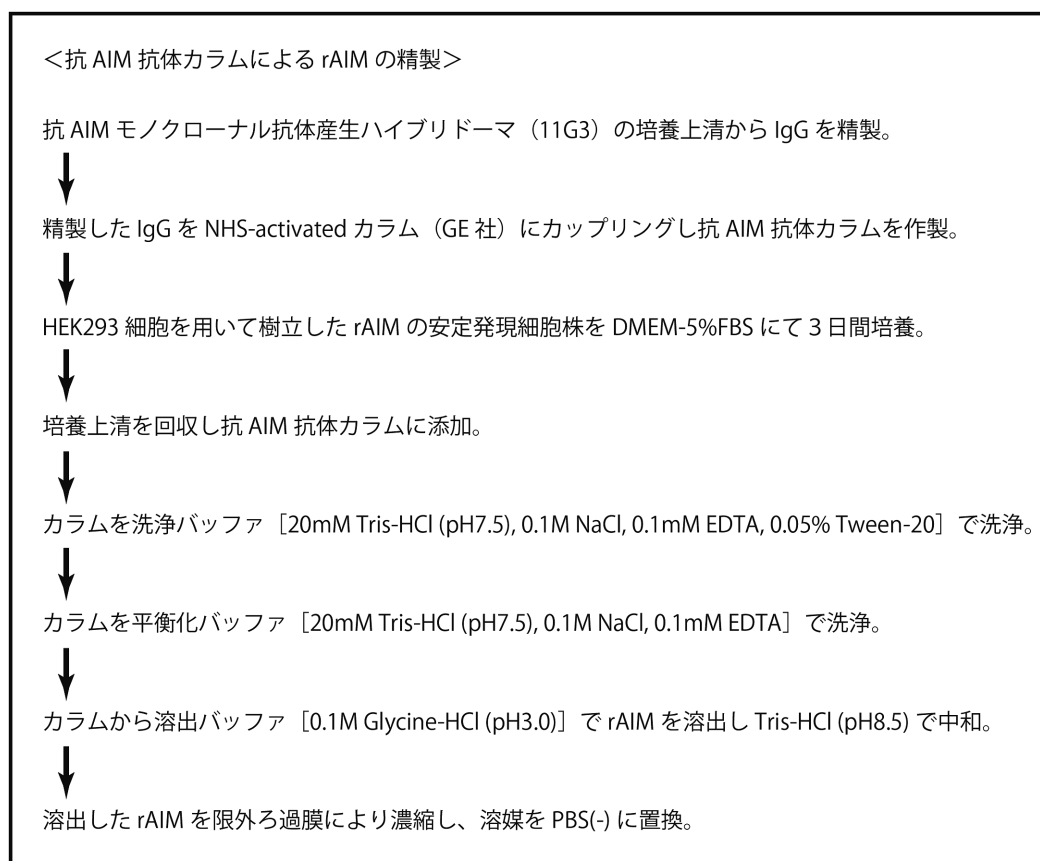


図 2 当研究室における rAIM の作製プロトコール

ここで使用している抗マウス AIM モノクローナル抗体（11G3）は、近く、(株)トランスジェニック (TransGenic Inc.) より一般入手可能となる予定である。

体ではなく活性化体 AIM を認識する抗 AIM 抗体で精製を行う、の三つの条件が最低限必要である。これは、ヒト rAIM の場合も全く同様である。(1), (2)は、rAIM の正常な folding に必要であり、(3)は十分 folding がなされ、活性を有する rAIM では導入したタグ (C 末端でも N 末端でも) はタンパク質表面に露出しておらず、タグ抗体により認識されない可能性が大きいからである。最初に述べたように、AIM は SRCR スーパーファミリーに属し、マウス AIM では 352 アミノ酸残基中に 26 個ものシステイン残基を有しているため、複雑な立体構造を取る可能性が高く、無血清などの厳しい培養条件では、正常な立体構造を持った rAIM がうまく作れないのであろう。また、特にマウス AIM には大きな糖鎖修飾が存在するため、動物細胞で作製する必要がある。このように、機能的な rAIM はどのような条件でも作製可能というわけではないが、問題は、得られた rAIM が正常な立体構造を有しているかどうかを見分けるのが困難であることである。そのため、例えば市販されている rAIM (rCD5L) を使用する場合、十分に注意が必要である。図 2 に、現在我々の研究室で用いている rAIM 作製のプロトコルを表記したが、この条件で作製する限り、得られた rAIM の機能は安定している。

抗体についても同様であり、どのような AIM 抗原を免疫するか、あるいはどのような動物に免疫するかによって、得られた抗体がどのような実験に使用可能であるか、大きな違いがある。例えば、非還元状態で rAIM を認識できる抗体であっても、必ずしも血液中の AIM を ELISA やウェスタンブロット法で native な AIM を完全に検出できるとは限らない。これも、その立体構造の複雑さや、血液

中での AIM の存在様式の変化に起因すると考えられる。実際に複数の抗 AIM 抗体が市販されているが、我々が検証したところ、それら全てが説明書に記載されている機能を持つわけではないことが分かっているので、注意が必要である。

- 1) Miyazaki, T., Hirokami, Y., Matsuhashi, N., Takatsuka, H., & Naito, M. (1999) *J. Exp. Med.*, **189**, 413–422.
- 2) Joseph, S.B., Bradley, M.N., Castrillo, A., Bruhn, K.W., Mak, P.A., Pei, L., Hogenesch, J., O'Connell R, M., Cheng, G., Saez, E., Miller, J.F., & Tontonoz, P. (2004) *Cell*, **119**, 299–309.
- 3) Valledor, A.F., Hsu, L.C., Ogawa, S., Sawka-Verhelle, D., Karin, M., & Glass, C.K. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17813–17818.
- 4) Arai, S., Shelton, J.M., Chen, M., Bradley, M.N., Castrillo, A., Bookout, A.L., Mak, P.A., Edwards, P.A., Mangelsdorf, D.J., Tontonoz, P., & Miyazaki, T. (2005) *Cell Metab.*, **1**, 201–213.
- 5) Gray, J., Chattopadhyay, D., Beale, G.S., Patman, G.L., Miele, L., King, B.P., Stewart, S., Hudson, M., Day, C.P., Manas, D. M., & Reeves, H.L. (2009) *BMC Cancer*, **9**, 271.
- 6) Gangadharan, B., Antrobus, R., Dwek, R.A., & Zitzmann, N. (2007) *Clin. Chem.*, **53**, 1792–1799.
- 7) Kim, W.K., Hwang, H.R., Kim, do H., Lee, P.Y., In, Y.J., Ryu, H.Y., Park, S.G., Bae, K.H., & Lee, S.C. (2009) *Exp. Mol. Med.*, **40**, 677–685.
- 8) Kurokawa, J., Arai, S., Nakashima, K., Nishijima, A., Miyake, K., Ose, R., Mori, M., Kubota, N., Kadowaki, T., Oike, Y., Koga, H., Febbraio, M., Iwanaga, T., & Miyazaki, T. (2010) *Cell Metab.*, **11**, 479–492.
- 9) Kurokawa, J., Nagano, H., Ohara, O., Kubota, N., Kadowaki, T., Arai, S., & Miyazaki, T. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 12072–12077.
- 10) Miyazaki, T., Kurokawa, J., & Arai, S. (2011) *Cir. J.*, **75**, 2522–2531.