

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14460

研究課題名(和文)結晶化促進バインダー抗体の効率的取得に向けた膜受容体抗原粒子の創出

研究課題名(英文)Creation of the membrane-protein-particle antigen for the effective production of a crystallization-facilitator antibody

研究代表者

白石 充典(Shiroishi, Mitsunori)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：00380527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はGタンパク質共役型受容体(GPCR)の結晶化を促進するバインダー抗体、あるいはGPCRの機能を制御する機能性抗体を効率的に取得するための、抗原の開発を目的とする。まず高親和性型ヒスタミン受容体の改変体について、出芽酵母を用いた大量調製系を改良した。調製した受容体タンパク質を、C末端のHis-tagを介してビーズに固定化し、脂質とアジュバントによる脂質二重膜で表面を覆った“抗原粒子”を作製した。抗原粒子とプロテオリポソームをマウスに免疫し、血清の受容体結合性をELISAで比較したところ、抗原粒子において受容体の細胞外領域を認識する抗体の割合が高いことを示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is the production of novel antigen molecule for acquisition of “binder antibodies” to facilitate crystallization of G protein coupled receptor (GPCR), and for acquisition of “functional antibodies” to regulate the activity of GPCR. Firstly, we have improved the expression and purification system using budding yeast for producing the stable variant of a high-affinity type histamine receptor. The purified receptor variant was immobilized on the affinity beads via its C-terminal His-tag. Then the beads were covered by a lipid bilayer consisting of lipid and adjuvant, which gave “antigen particle”. The antigen particle and a proteoliposome containing the receptor were injected into mice for immunization, and the antibody titer for the receptor was measured using ELISA experiment. The ELISA showed that the serum for the antigen particle contained a higher ratio of the antibodies that recognize extracellular domain of the receptor.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：Gタンパク質共役型受容体 抗原 膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

ヒトで約 800 種類存在すると言われる G タンパク質共役型受容 (GPCR) は、医薬品の 30% 以上がターゲットとしている極めて重要なタンパク質ファミリーである。ゆえに合理的な創薬に向けた高分解能の立体構造が求められている。しかし実際には GPCR の結晶構造解析は依然困難な状況にある。最大のボトルネックである受容体の大量調製に成功しても、特にリガンドがアゴニスト (活性化リガンド) である場合や、低親和性のアンタゴニスト (不活性化リガンド) の場合は、受容体分子の揺らぎが大きいため結晶化が困難となる。すでに受容体タンパク質を安定に大量調製できている状況下では、立体構造を認識する安定化バインダー分子を用いるのが有効な策である。バインダー分子により、受容体の安定化のみでなく、結晶中のパッキングを改善し結晶性を大幅に改善することが期待できる。

一方、抗体医薬品は現在、医薬品の売上の上位を占めるほどの売上を伸ばしてきた。今後も抗体医薬品の需要は増え続けると考えられる。現在市販されている抗体医薬品は、可溶性タンパク質もしくは細胞外領域の大きな膜タンパク質に対して結合し、機能する抗体である。しかしながら、膜外領域の小さな膜タンパク質に対する機能性抗体はほとんど開発されてきていない。それは、このような膜タンパク質に対する機能性抗体を作製するのが非常に困難であることが大きな要因の 1 つである。

ゆえに、膜タンパク質の細胞外領域を認識し、かつ膜タンパク質のコンホメーションを認識するモノクローナル抗体を効率的に取得することができる方法が不可欠であると考えている。

2. 研究の目的

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は最も大きな創薬ターゲットであり、合理的な創薬に向け、高分解能での立体構造解明が望まれている。GPCR の多くは元来不安定な膜タンパク質であるため、大量調製が困難であるが、たとえ安定化し大量調製に成功したとしても結晶化が依然困難であるケースが多い。特にアゴニストが結合した活性型構造や、低親和性リガンドとの複合体においては、受容体の揺らぎが大きいため結晶化が難しく、バインダー分子によるコンホメーションの安定化が必須である。本研究では、アゴニストや低親和性リガンドと GPCR の複合体を安定化し、結晶化を促進するバインダー抗体、あるいは GPCR の機能を制御する機能性抗体を効率的に取得するための、抗原分子の開発を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、高親和性型ヒスタミン受容体の構造解析を促進するバインダー抗体の作製を行う。さらにはプリン受容体 P2Y12 の機能を制御する機能性抗体の取得を目指す。これらの受容体に対して細胞外領域を認識する抗体を作製するためには、抗原の向きを揃える必要がある。本研究ではビオチン-ストレプトアビジンの結合を介して向きを揃えた抗原の調製を行う。受容体の細胞内第 3 ループにビオチン化配列を導入し、受容体を特異的にビオチン化する。次に抗原を安定化するため、①ビオチン化受容体をストレプトアビジンを介して 4 量体化した抗原、②ストレプトアビジンビーズ上にビオチン化受容体を固定した抗原粒子を作製する。そしてこれらのデザインされた抗原を用いてマウスを免疫し、モノクローナル抗体の作製を行う。

(1) ビオチン化受容体の作製

受容体の細胞内第 3 ループ (ICL3) に、ビオチン化配列を挿入した改変受容体を作製し、改変受容体の大量調製を行う。対象とする受容体はすでに出芽酵母を用いて大量発現系を構築しており、改変受容体についても同様の手法で行う。界面活性剤で可溶化後、金属キレートアフィニティーカラム (IMAC) により精製し、TEV プロテアーゼで C 末端のタグを切断後、再び IMAC カラムを通すことで、素通り画分に受容体タンパク質を得る。

精製した改変受容体をビオチン化酵素と反応させ、特異的ビオチン化を行う。ビオチンはビオチン化配列中のリジン残基に特異的に導入される。フリーのビオチンを除くため、ゲル濾過による最終精製を行う。

(2) ストレプトアビジン (SA) を介した 4 量体化抗原の作製

細胞外領域を露出し、細胞内領域をマスクするため、ビオチン化受容体をストレプトアビジンに結合させ、4 量体を形成させる。次にこの 4 量体を安定化させるため、脂質二重膜に再構成する。脂質二重膜への再構成は、非極性ポリスチレン吸着ビーズまたは透析により界面活性剤を除くことでおこなう。この時に高濃度のリガンドを共存させ、再構成した小胞中にリガンドを取り込ませる。またアジュバントとして大腸菌由来の LipidA を脂質二重膜中に添加する。粒子の大きさをゲル濾過により評価する。抗原の安定性の評価は、作製した抗原粒子を高温でインキュベーション後、界面活性剤で再可溶化し、RI 標識リガンドを用いた結合試験を行うことで、受容体のリガンド結合残存活性を測定する。

(3) SA ビーズを用いた抗原粒子の作製

本研究ではコンホメーション認識抗体の効率的な取得を目指し、免疫に用いる抗原の更なる安定化を試みる。その方法としては高分子ポリマービーズを土台とした抗原粒子の作製を行う。まず表面にアミノ基を有する

ビーズに、アミンカップリングでストレプトアビジンを固定化する。次にビオチン化受容体を固定化する。そして界面活性剤—脂質の混合ミセル中で、非極性ポリスチレン吸着ビーズを用いて界面活性剤を除くことで、ビーズ上に脂質二重膜を構築する。その際に高濃度のリガンドをビーズと脂質二重膜の間に取り込ませ、さらにアジュバントとして大腸菌由来の LipidA を脂質二重膜に添加する。安定性は、高温でインキュベーション後、受容体の残存活性を測定することで評価する。

(4) 新規抗原を用いたマウスの免疫とモノクローナル抗体の作製

抗原の安定性を確認した後、作製した抗原をマウスに免疫し、モノクローナル抗体の作製を試みる。マウスはモノクローナル抗体作製に一般的に利用される Balb/c マウスを用いる。抗体価が上がらない場合は自己免疫疾患マウスを用いる。ハイブリドーマの作製は PEG 法により行う。コンホメーション認識抗体を選択するため、ハイブリドーマのスクリーニングにおいて、リポソーム再構成受容体を用いた ELISA で反応し、変性した受容体を用いたドットプロットで反応しないクローンを選択する。またクローンを選択する際に、ハイブリドーマの抗体産生能力の高さも基準の1つとする。受容体との複合体のゲル濾過解析、および BIAcore を用いた相互作用解析により、結晶化に供する抗体を決定する。

4. 研究成果

(1) 高親和性型ヒスタミン受容体の改変体の作製と大量調製

細胞内第3ループにチトクロム b₅₆₂RIL 変異体タンパク質 (BRIL) を融合した改変体 (HR-BRIL) については、すでに大量調製系を確立している (1回の調製で数 mg)。今回は BRIL を除き、代わりにビーズへの固定化のためのビオチン化タグを導入したコンストラクトを作製し発現を試みた。しかし発現量が大幅に低下し、十分な量のタンパク質を得ることができなかった。

そこで HR-BRIL を用いて、C 末端の His タグを介してビーズに固定化する方法で安定化抗原を作製する戦略をとることにした。本研究期間内に、酵母を用いた培養条件の最適化を行い、受容体分子の収率を 1.5 倍に増加させた。HR-BRIL の大量調製において、単量体と二量体をきれいに分離できないのが問題であった。もし逆平行の二量体を形成していた場合、抗原粒子状態で抗原 (受容体) の向きを揃えることができないからである。そこで界面活性剤の種類および精製方法を工夫することで、高い割合で単量体を得ることができるようになった。また精製した単量体は濃縮しても二量体を形成しにくいことを確認した。

精製した HR-BRIL 分子について、等温滴

定型カロリメーターを用いてリガンドとの結合を測定したところ、界面活性剤中では文献値と比較して 20 分の 1 程度親和性が低下していたが、放射性同位体標識リガンドを用いた脂質膜中での相互作用解析では、ほぼ文献値と同様の親和性が観察された。精製した HR-BRIL を金属キレートアフィニティビーズへ His タグを介し固定化したところ、受容体はリガンド結合活性を保持していることを確認した。

(2) P2Y₁₂ 受容体の安定化改変体の作製と大量調製

P2Y₁₂ 受容体タンパク質の安定性を向上させるため、2014 年に報告された結晶構造を基に、計算科学を用いた安定化残基の予測を行い、発現量が向上する 2 つの改変体 (hY12_{102,113}) を見出した。今年度はこれらの改変受容体について、出芽酵母による大量培養の条件検討を行い、発現量を 1.7 倍向上させる培養条件を決定した。それら 2 つの改変体について放射性同位体ラベルリガンドを用いた結合試験を行い、リガンド結合活性を有することを確認した。さらに、可溶性、精製のための界面活性剤の検討を行った。その結果、酵母培養液 1 リットルあたり約 1.0mg の P2Y₁₂ タンパク質が得られる系を確立した。

(3) 抗原粒子を用いたマウス抗体の作製と評価

まず精製した HR-BRIL を埋め込んだ“プロテオリポソーム”を抗原として抗体の作製を試みた。精製した HR-BRIL タンパク質、卵黄由来フォスファチジルコリン、およびアジュバントとしてサルモネラ菌由来 Lipid-A を用いて抗原となるプロテオリポソームを作製した。リガンド結合試験により、埋め込んだ受容体の約 30~40% が活性を有することを確認した。作製したプロテオリポソームを自己免疫疾患モデルマウスに免疫し、脾臓からハイブリドーマを作製し、モノクローン化を行った。立体構造を認識しかつ受容体の細胞外領域を認識する可能性の高い抗体クローンを数個得ることができた (モノクローナル抗体作製は京都大学医学研究科分子細胞情報学分野との共同研究で行った)。しかし細胞外領域を認識すると思われるクローンは全体の 5% 以下であり、使用する抗原に工夫が必要であることは明らかである。

次に HR-BRIL を金属キレートアフィニティビーズに固定化し、さらに受容体を脂質に埋め込んだ“安定化抗原粒子”の作製および熱安定性評価を行った。使用した脂質およびアジュバントは、上記のプロテオリポソームと同様である。比較対象として、上記の作製法で調製した HR-BRIL のプロテオリポソームを用いた。熱安定性評価は以下のように行った。抗原粒子およびプロテオリポソームを PBS 中で「37、24 時間」、「37、40 時間」、

「50、30分」、「60、30分」インキュベーションし、それらの残存リガンド結合活性を、「on ice」でインキュベーションしたものと比較した。その結果、どちらの抗原も各温度で同等の残存活性を有していた。つまり熱安定性自体はビーズに固定することで向上するわけではないことがわかった。

抗原粒子およびプロテオリポソームをマウスに免疫し、4回免疫後のマウス血清中の抗体価をELISAにより評価した。その結果、抗原粒子のほうが抗体価はやや低かったが、細胞外領域を認識する抗体の割合が高いことを示唆する結果が得られた(図1)。つまり受容体の向きを揃えた抗原を作製し、免疫を行うことの有効性が示されたといえる。

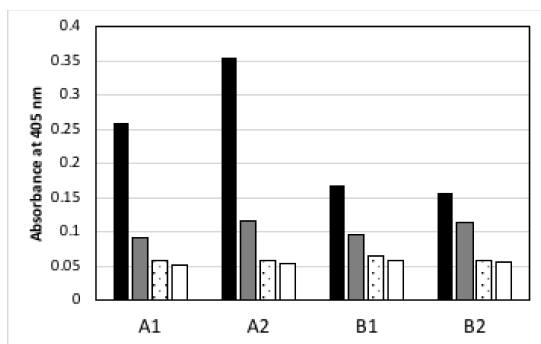


図1 マウス血清のELISAによる評価
A1&A2: プロテオリポソームを免疫した個体由来
B1&B2: 抗原粒子を免疫した個体由来
ELISAにはストレプトアビジン固定化プレートを用いた。プレートに固定化した抗原は以下の通り。
(白) 抗原なし。(ドット) 受容体不含リポソーム。(灰色) 細胞内第3ループにBRILではないタンパク質を融合したHRを含むリポソーム。(黒) HR-BRILを含むリポソーム。

今後は、ヒスタミン受容体について得られたモノクローナル抗体について、受容体との結合を精査後、結晶化バインダーとしてヒスタミン受容体の構造解析に供する予定である。また安定化抗原粒子を用いてマウスの免疫、ハイブリドーマの作製を進め、細胞外領域を認識する機能的抗体の効率的な取得を目指す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

Shiroishi M., Moriya M. and Ueda T., "Micro-scale and rapid expression screening of highly expressed and/or stable membrane protein variants in *Saccharomyces cerevisiae*" *Protein Sci.*, 25, 1863-1872 (2016) doi: 10.1002/pro.2993.

[学会発表](計 4件)

白石充典, 森谷真衣, 中野裕毅, 植田正
「高難度膜蛋白質の大量調製に向けた安定化改変体の微小ハイスループットスク

リーニング系の構築」第15回日本蛋白質科学会年会(2015年)

白石充典, 森谷真衣, 植田正「高難度膜蛋白質の迅速な安定化のための酵母を用いた微小ハイスループットスクリーニングシステム」BMB2015(2015年)

白石充典, 森谷真衣, 植田正「*Saccharomyces cerevisiae*を用いた膜蛋白質安定化改変体作製・評価システムのハイスループット化とその有効性の検証」第40回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム(2016年)

白石充典「構造解析に向けた高親和性型ヒスタミン受容体の大量調製系の構築」平成29年度膜タンパク質研究会(2017年)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白石 充典 (SHIROISHI, Mitsunori)
九州大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号: 00380527