

令和元年6月18日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01915

研究課題名(和文)人工デザイン膜タンパク質を用いた受容体の細胞外領域認識抗体作製法の開発

研究課題名(英文) Development of antibodies against extracellular region of receptors by using engineered membrane proteins

研究代表者

竹田 浩之 (Takeda, Hiroyuki)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授

研究者番号：40609393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：膜タンパク質の細胞外領域認識抗体は基礎研究、構造解析、抗体医薬開発などの様々な領域で重要である。しかし膜タンパク質の細胞外認識抗体の作製は困難である。我々は細胞内領域を免疫システムから隠すこと、または細胞外領域を免疫系に積極的に提示することにより、細胞外認識抗体をより効率的に取得できるのではないかと考えた。

クラスA GPCRであるヒスタミン受容体H1をモデルに、複数の人工的にデザインした膜タンパク質抗原をデザインした。無細胞技術を用いて人工デザイン抗原を生産し、マウスに免疫した結果、細胞外ループの基部に数アミノ酸のスペーサーを挿入した人工デザイン抗原を用いて細胞外認識抗体の誘導に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜タンパク質は主要な創薬標的である。膜タンパク質の細胞外領域を認識する抗体はフローサイトメトリー等で細胞を識別するマーカーとして欠かせないほか、膜タンパク質の機能構造解析や、抗体医薬開発の点からも求められている。しかし、膜タンパク質の細胞外認識抗体の作製は非常に困難であった。本研究は人工的に改変した膜タンパク質を免疫抗原として用いることで、膜タンパク質の細胞外認識抗体を効率的に取得する方法論を開発することを目的としている。本手法が完成すれば従来よりも高確率、短期間に細胞外認識抗体を開発する事が可能となり、基礎研究から診断薬、医薬開発、バイオセンサーなどの領域に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Antibodies recognizing extracellular region (ECR) of membrane proteins are important tool required for basic research, structural biology, and development of antibody therapeutics. However, it is very difficult to develop ECR-recognizing antibodies. We hypothesized concealing intracellular region from immune system of host animal, or exposing extracellular region to immune system is effective for induction of ECR-recognizing antibodies. We selected histamine receptor H1, a class A GPCR, and designed several artificial designed antigen membrane proteins. We produced designed antigens using a cell-free membrane production method. Immunization of those designed antigens to mice successfully induced antibodies recognizing extracellular region of HRH1.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：GPCR 膜タンパク質 抗体 受容体 人工デザイン抗原 HRH1 無細胞タンパク質合成 IgG

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞膜上に局在する膜タンパク質はシグナル伝達や物質輸送などの細胞機能を担う因子である。現在上市されている薬剤の半分は膜タンパク質受容体を標的とするように、膜タンパク質は主要な創薬ターゲットであり、また細胞を区別するためのマーカーとしても重要視されている。膜タンパク質を特異的に認識し結合する抗体は膜タンパク質の機能や局在の解析に必須である。とりわけ、膜タンパク質の細胞外領域を認識する抗体(細胞外認識抗体)は FACS 等で細胞を生きたまま識別するマーカーとして欠かせないほか、まれに細胞外から結合してアゴニストあるいはアンタゴニスト作用を示す生理活性を示すものもあり、膜タンパク質の機能構造解析だけではなく抗体医薬開発の点からも求められている。しかし、その重要性にも関わらず膜タンパク質に対する特異抗体は入手困難であり、とりわけ細胞外認識抗体の作製は難しいとされる。

抗膜タンパク質抗体の開発を困難にしている一因は抗体作製に必要な抗原の調製にある。GPCR のような膜貫通ドメインを複数もつ膜受容体はその構造の複雑さと不安定さのため、細胞発現系を用いた大量調製が困難であるため、抗体作製に必要な数 mg から数十 mg の精製膜受容体抗原を調製するのに多くのコストと時間がかかる。我々は無細胞技術を用いた抗 GPCR モノクローナル抗体作製法を開発した。免疫に必要な大量の GPCR の調製のため、我々はコムギ無細胞タンパク質合成法、人工脂質小胞(リポソーム)と透析膜を用いた GPCR の試験管内大量合成法(透析重層法)を開発した。本手法を用いればマウスから大型動物への免疫に十分な数 mg の GPCR プロテオリポソームを短期間に低コストで合成できる。また我々は高感度相互作用解析系(AlphaScreen)とビオチン化リポソームを用いた、膜タンパク質相互作用解析系(BiLIA 法)を開発した。我々は無細胞合成 GPCR 抗原と BiLIA 法を用いて、GPCR に対する高親和性抗体や、イオンチャネルに対する阻害抗体の取得に成功している。しかしながら、エピトープマッピングで確認したところ我々が取得した抗 GPCR 抗体のほとんどは抗原 GPCR の細胞内領域に結合する抗体で、細胞外認識抗体は数クローンのみであった。

2. 研究の目的

これまで試みた膜タンパク質に対する抗体作製の結果から、全長 GPCR 抗原を用いた免疫では、細胞外認識抗体は取得困難であると我々は考察した。もともと膜受容体は種間で非常によく保存されているうえ、抗原受容体の細胞外領域は免疫システムにさらされており、非自己として認識されにくい。そこで我々は免疫システムがエピトープとして認識しやすい細胞内領域をマスクあるいは削除し、細胞外領域を免疫系に積極的に提示すれば、細胞外認識抗体をより効率的に取得できるのではないかと、という仮説を立て、人工的に設計した膜タンパク質を免疫抗原として用いて抗体作製を実施した。

3. 研究の方法

人工デザイン膜タンパク質

本研究では GPCR の一つであるヒスタミン受容体 H1 (HRH1) をモデル受容体として人工デザイン抗原の作製と細胞外認識抗体の作製を実施した。先行研究でラジオリガンドアッセイを用いて無細胞合成 HRH1 のリガンド結合活性が確認できていること(1)、培養細胞を用いた HRH1 活性測定がシェディングアッセイを用いて良好に実施できることが(2)、HRH1 をモデル受容体として選定した理由である。

最初に、GPCR 細胞内領域を免疫系からマスクするという目的の人工膜タンパク質を設計した。野性型 HRH1 の細胞外領域と免疫動物であるマウスの mHrh1 細胞内領域を融合したキメラ抗原、野性型 HRH1 の細胞外領域をリポソーム膜の両側に対称的に配置したシンメトリック HRH1 抗原を考案した。キメラ抗原は受容体の細胞内領域を免疫動物の相同な配列と置換することで、宿主の免疫系が細胞内領域を認識しにくくなるのが狙いである。キメラ抗原では細胞内外のループ構成は基本的には野生型に類似しており、HRH1 本来の立体構造が概ね維持されると期待される。一方で、受容体の細胞内領域を除いたより野心的なデザインのシンメトリック HRH1 では、細胞内領域に対する抗体ができる可能性を無くする事ができる。シンメトリック抗原の細胞外領域の立体構造の再現度が未知数であるが、少なくともループの両端は膜にアンカリングされることから、単に細胞外ループをタンデムに連結するよりも抗原として優れている。HRH1 のループ領域およびその前後の膜貫通領域を連結し、キメラ抗原およびシンメトリック抗原のアミノ酸配列を決定した。考案した人工デザイン膜タンパク質抗原のアミノ酸配列をもとに人工遺伝子を合成し、細胞発現用ベクターおよびコムギ発現用ベクターに組み込んだ。

次いで、GPCR の細胞外ループの付け根に複数のアミノ酸残基を導入することで GPCR の細胞外領域の露出を人工的に高めた抗原を設計した。2つの抗原デザインを行なった。1つ目の抗原デザインは HRH1 の細胞外ループの付け根に 1,3,5 残基のフレキシブルなスペーサー配列(S or SGS or SSGSS)を挿入し細胞外ループの露出を向上させた Spacer inserted HRH1 である(それぞれ、S-HRH1、SGS-HRH1、SSGSS-HRH1)。細胞外ループの付け根に挿入したフレキシブルなアミノ酸残基は、細胞膜に埋まっている細胞外ループを膜外へ押し出す働きをする。細胞外ループが膜外へ押し出された結果、免疫系による細胞外ループの抗原提示が起りやすくなることが期待される。2つ目の抗原デザインは、GPCR の膜貫通領域の細胞外ループ側または細胞内ループ側の末端 3 アミノ酸を反復することで膜貫通領域を伸張した Elongated TM HRH1 である(ECL 伸長 HRH1、ICL 伸長 HRH1)。αヘリックス約 1 回転分に相当する、膜貫通領域末端の 3 アミノ酸を反復・延長させた。考案した人工デザイン膜タンパク質抗原のアミノ酸配列をもとに人工遺伝子を合成し、細胞発現用ベクターおよびコムギ発現用ベクターに組み込んだ。

人工膜タンパク質の評価

設計した人工膜タンパク質に FLAG タグを付加し、HEK293A 培養細胞にトランスフェクションした。細胞内局在を FLAG タグを用いた細胞免疫染色で解析した。フローサイトメトリーを用いて、人工膜タンパク質の細胞膜への移行を確認した。また、TGF- α shedding assay(2)を用いて、リガンド結合活性を確認した。

マウスへの免疫と抗血清の採取

無細胞大量合成したプロテオリポソーム抗原をそれぞれ 10 頭の BXS B マウスへ免疫した。2週おきに計 4 回免疫し、免疫時に微量採血し、最終免疫の2週後に最終採血を行なった。

マウス抗血清の解析

ウェスタンブロッティングにより、変性抗原に対する抗血清の反応性を評価した。BiLIA 法(3)でリポソーム上に局在する未変性抗原に対する抗血清の反応性を評価した。ヒト培養細胞に発現させた野性型 HRH1 の細胞外領域に対する抗血清の反応性を評価するために、フローサイトメトリーを行った。

4. 研究成果

まず、GPCR 細胞内領域を免疫系からマスクするというコンセプトのもと、キメラ HRH1 とシンメトリック HRH1 を設計した。設計したアミノ酸配列を膜貫通領域の予測プログラム(TMpred, SOSUI)で解析したところ、プログラムは期待した領域を膜貫通領域であると認識した。

キメラ HRH1 をトランスフェクションした HEK293A 細胞を用いて TGF- α shedding assay を行なった。HRH1 のリガンドであるヒスタミンを 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 100 nM, 10 nM の濃度でキメラ HRH1 発現 HEK293A に加え 1 時間反応させた結果、ヒスタミン濃度依存的な 405 nm の吸光度の上昇が確認された。シンメトリック HRH1 は HEK293A 細胞においては良好に発現しなかったため、活性評価できなかった。

コムギ無細胞系を用いて、キメラ HRH1 及びシンメトリック HRH1 を合成した。SDS-PAGE と CBB 染色で合成確認を行い、それぞれの人工デザイン膜タンパク質のバンドが予想分子量近くにある事を確認した。それぞれの膜タンパク質の CBB 染色のバンド強度からキメラ HRH1 とシンメトリック HRH1 のコムギ抽出液 (WEPRO7240) 1 ml あたりの合成効率を求めた。BSA スタンダードで作成した検量線を用いて合成量を算出し、合成効率を求めたところ、キメラ HRH1 は 2mg/ ml WEPRO 7240、シンメトリック HRH1 は 3mg/ ml WEPRO7240 の合成効率であった。シンメトリック HRH1 はヒト培養細胞で良好に発現させることが困難であったが、コムギ無細胞系では良好に発現した。シンメトリック HRH1 のような、タンパク質の一部を人工的に連結したタンパク質は一般に細胞発現が難しいとされる。この結果によって、大きく改変を加えた人工デザイン膜タンパク質の合成においてもコムギ無細胞系が有効なツールになることが示された。

人工デザイン抗原2種、および野性型野性型 HRH1 を無細胞系を用いて大量生産し、マウスに免疫した。抗血清に含まれる抗体の変性した抗原に対する結合を評価するために、Western blotting を行った。野性型 HRH1 抗血清は野性型 HRH1 にのみ反応を示した(最終採血した 8 頭分の野性型 HRH1 抗血清中、8 血清が反応)。キメラ HRH1 抗血清はキメラ HRH1 に反応した(9/9)。シンメトリック HRH1 抗血清は 10 頭分の抗血清中 3 頭の抗血清においてシンメトリック HRH1 に対しわずかなシグナルを検出した。

無細胞合成したプロテオリポソーム上の未変性抗原に対する結合を評価するために、BiLIA 解析(3)を行った。野性型 HRH1 抗血清は野性型 HRH1 にのみ反応を示した(8/8)。キメラ HRH1 抗血清はキメラ HRH1 に反応した(9/9)。野性型 HRH1 には反応しなかった。シンメトリック HRH1 抗血清は、10 頭分のシンメトリック HRH1 抗血清中 1 サンプルのみシンメトリック HRH1 にわずかに反応した。

HRH1 細胞外領域への結合評価を行うためにフローサイトメトリー解析を行った(図 9)。野性型 HRH1 を発現させた HEK293A 細胞を抗血清と反応させ、蛍光標識した抗マウス二次抗体処理後に FACS にかけて解析した。全ての野性型 HRH1 抗血清が全長野性型 HRH1 に反応した(8/8)。しかし、HRH1 の N 末端を削った Δ N HRH1 を発現させた HEK293A 細胞を用いて同様に FACS を行った結果、野性型 HRH1 抗血清のシフトは観察されなかった(0/8)。キメラ HRH1 抗血清及びシンメトリック HRH1 抗血清は、野性型 HRH1 を発現させた HEK293A 細胞に反応しなかった。また、キメラ HRH1 を発現した HEK293A 細胞にも反応しなかった。

以上の結果から、野性型の全長 HRH1、キメラ HRH1 および シンメトリック HRH1 を抗原として用いた免疫では、野性型 HRH1 の細胞外ループに対する抗体を誘導することはできなかった。野性型 HRH1 の細胞外ループには、ヒトとマウスの間で保存されていない残基がいくつかあるにも関わらず、細胞外ループに結合する抗体が誘導されなかったことから、HRH1 の細胞外領域が脂質膜から十分に露出しておらず、免疫系に対して十分に提示されていない可能性が考えられた。

HRH1 の細胞内領域は表面の凸凹が大きく、また脂質膜からの露出も多い。一方で細胞外領域は凸凹が小さく脂質膜からの露出が少ない。GPCR の立体構造モデルと脂質膜の厚みを比較してみると、GPCR の細胞外領域は脂質膜からの露出が極めて少ないことがわかる(図1)。細胞外領域の脂質膜からの露出の低さが、免疫系による抗原提示の障害になっている可能性がある。これらの考察から、脂質膜から細胞外領域の露出を高めた抗原が GPCR の細胞外領域に結合する抗体作製に有効ではないかと考えた。HRH1 に限らず、クラス A 型 GPCR の細胞外領域は脂質膜からの露出が極めて少なく、それが免疫系による抗原提示の障害になっている可能性がある。

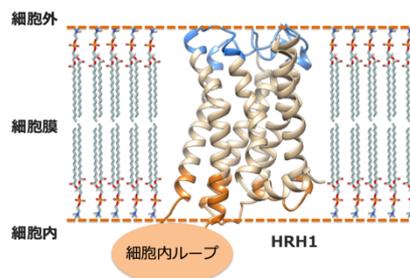


図1 細胞膜に埋め込まれた HRH1

そこで我々は、GPCR の細胞外領域の露出を人工的に高めた抗原を新たにデザインすることにした。2つの異なるアプローチで、GPCR の細胞外ループの付け根に複数のアミノ酸残基を導入し細胞外領域の露出を高めた抗原のデザインを行なった。

1つ目の抗原デザインは HRH1 の細胞外ループの付け根に 1,3,5 残基のフレキシブルなスペーサー配列(S or SGS or SSGSS)を挿入し細胞外ループの露出を向上させた Spacer inserted HRH1 である(S-HRH1, SGS-HRH1, SSGSS-HRH1)。細胞外ループの付け根に挿入したフレキシブルなアミノ酸残基は、細胞膜に埋まっている細胞外ループを膜外へ押し出す働きをする。細胞外ループが膜外へ押し出された結果、免疫系による細胞外ループの抗原提示が起りやすくなることが期待される。また、挿入したアミノ酸残基に含まれる親水性アミノ酸であるセリンが疎水的な細胞膜と反発しあうことで細胞外ループの膜外への押し出し効果が期待できる。

2つ目の抗原デザインは、GPCR の膜貫通領域の細胞外ループ側及び細胞内ループ側の末端 3 アミノ酸を反復することで膜貫通領域を伸張した Elongated TM HRH1 である(ECL 伸長 HRH1, ICL 伸長 HRH1)。膜貫通領域を構成する α ヘリックス構造は 3 アミノ酸で約 1 回転する。つまり、GPCR の膜貫通領域末端 3 アミノ酸を反復すれば膜貫通領域がヘリックス一回転分延長する。延長した膜貫通領域によって、膜外へ押し出された細胞外ループは、免疫系によって効率的に抗原提示を受けることが期待される。

設計した人工デザイン抗原を細胞発現ベクターへ挿入し、細胞系で発現を試みた。免疫染色法を用いて、Spacer inserted HRH1 及び Elongated TM HRH1 の細胞内での発現確認を行った。野性型 HRH1, S-HRH1, SGS-HRH1, SSGSS-HRH1, ECL 伸長 HRH1, ICL 伸長 HRH1 を同じ条件でトランスフェクションした HEK293A を用いて免疫染色を行なった。その結果、どの改変 HRH1 も細胞内におけるタンパク質レベルでの発現が確認された。

Spacer inserted HRH1, 及び Elongated TM HRH1 の細胞膜移行性を評価するためにフローサイトメトリー解析を行った。FLAG タグの付いた S-HRH1, SGS-HRH1, SSGSS-HRH1, ECL 伸長 HRH1, ICL 伸長 HRH1 をトランスフェクションした HEK293A を抗 FLAG 抗体で処理し、フローサイトメトリー解析を行ない、細胞表面への各膜タンパク質の移行性を評価した。その結果、ECL 伸長 HRH1, ICL 伸長 HRH1 ではわずかにヒストグラムのシフトが確認されたが、S-HRH1, SGS-HRH1, SSGSS-HRH1 はほとんどシフトしていなかった。

次いで、TGF- α shedding assay を用いて、HEK293A 上に発現させた Spacer inserted HRH1 及び Elongated TM HRH1 のリガンド結合活性を確認した。事前に野性型 HRH1, S-HRH1, SGS-HRH1, SSGSS-HRH1, ECL 伸長 HRH1, ICL 伸長 HRH1 をトランスフェクションした HEK293A にヒスタミン刺激を与えたが、野性型 HRH1 以外の改変 HRH1 ではリガンド濃度依存的な活性を確認することはできなかった。

コムギ無細胞系の透析重層法を用いて Spacer inserted HRH1 及び Elongated TM HRH1 の合成を行なった。無細胞合成した ECL 伸長 HRH1, ICL 伸長 HRH1, S-HRH1, SGS-HRH1, SSGSS-HRH1 を SDS-PAGE と CBB 染色にかけ、合成量を確認した。CBB 染色によるタンパク質のバンドが、ECL 伸長 HRH1, ICL 伸長 HRH1, S-HRH1, SGS-HRH1, SSGSS-HRH1 の予想分子量である約 50kDa の位置にあることを確認した。CBB 染色のバンド強度から ECL 伸長 HRH1, ICL 伸長 HRH1, S-HRH1, SGS-HRH1, SSGSS-HRH1 のコムギ抽出液 (WEPRO7240) 1 ml あたりの合成効率を求めたところ全て 4 mg/ml (WEPRO 7240) と非常に良好な合成効率であった(図2)。

リポソーム上に無細胞合成した改変 HRH1 と H1 リガンドとの結合をラジオリガンドアッセイ(1)によって解析した。アプレクチンリポソーム上に合成した野性型 HRH1, ECL 伸長 HRH1, ICL 伸長 HRH1, S-HRH1, SGS-HRH1, SSGSS-HRH1 を用いてアッセイを行なった。³H ラベルした H1 リガンドと無細胞合成した HRH1 に対して、ラベルされていない H1 アンタゴニスト・エピナスチンを過剰量加えたところ、³H のカウントが減少した。SSGSS-HRH1 以外の人工デザイン HRH1 では、³H カウンターの減少は、H2 アンタゴニストであるラニチジンを加えた時には確認されず、特異的なリガンド結合であることが確認された。しかし、SSGSS-HRH1 に関しては ³H のカウントが観察されたものの、H1 アンタゴニ

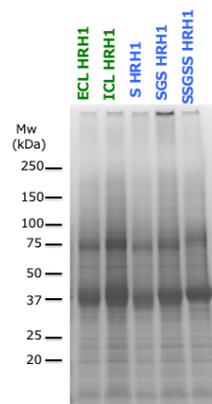


図2 人工デザイン HRH1 抗原の無細胞合成

ストを加えても ^3H カウントの減少を確認できなかったため、非特異的なラジオリガンドの結合であると判断した。

ラジオリガンドアッセイでリガンド結合能が確認できた抗原のうち、ECL 伸長 HRH1 と SGS-HRH1 の2種類の抗原を選択し、マウスに免疫し抗血清を得た。抗血清中に含まれる抗体と、変性した抗原の結合を評価するために、Western blotting を行った。免疫 5 週目の抗血清を用いて Western blotting を行なったところ、ECL 伸長 HRH1 抗血清と SGS-HRH1 抗血清は、いずれも野性型 HRH1 に反応した。

抗血清に含まれる抗体の野性型 HRH1 細胞外領域への結合を評価するためにフローサイトメトリー解析を行った。野性型 HRH1 を発現させた HEK293A 細胞に、免疫 5 週目の抗血清を反応させた。その結果、ECL 伸長 HRH1 抗血清、SGS-HRH1 抗血清のいずれもヒストグラムのシフトが観察された。また、野性型 HRH1 の N 末端を削った ΔN 野性型 HRH1 を用いたフローサイトメトリーでも、同様のシフトが観察された。このことから、ECL 伸長 HRH1 抗血清と SGS-HRH1 抗血清のいずれにも細胞外ループに結合する抗体が含まれていることが示された(図3)。

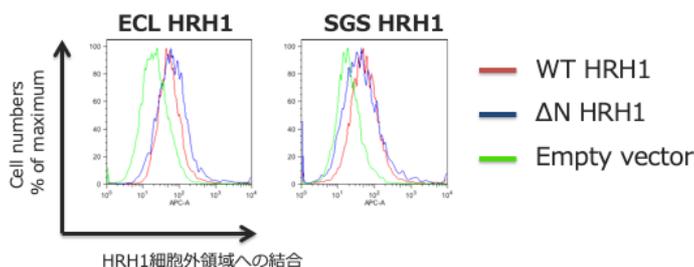


図3 マウス抗血清の HRH1 細胞外領域への結合評価

最後に、ECL 伸長 HRH1 抗血清と SGS-HRH1 抗血清に含まれるポリクローナル抗体の生理活性を評価する実験を試みた。Protein G セファロースを用いてそれぞれの抗血清からポリクローナル IgG を精製した。アズレクチンリポソーム上に無細胞合成した野性型 HRH1 に ^3H ラベル H1 リガンドとポリクローナル IgG を加え、野性型 HRH1 への ^3H カウントの変化を評価した。その結果、ECL 伸長 HRH1 抗血清あるいは SGS-HRH1 抗血清からそれぞれ精製したポリクローナル IgG で処理した区と、コントロールマウス IgG で処理した区との間に有意な差は確認されなかった。

以上のように、HRH1 の細胞外ループ領域の露出を改善した抗原を用いて、HRH1 の細胞外領域結合抗体を誘導することに成功した。この結果から GPCR の細胞外領域に対する抗体の作製が困難であるのは、GPCR の細胞外領域が膜に埋没しており、免疫系にさらされないことが原因である、という仮説が証明された。GPCR の細胞外ループの根本の伸長によるエピトープ露出の改善、という戦略は GPCR をはじめとした膜タンパク質抗体作製全般に適用できる可能性がある。今後、ECL 伸長 HRH1 や SGS-HRH1 を用いてモノクローナル抗体の作製を行い、詳細なエピトープ解析により抗原提示の詳細な解析をすすめたい。

一方で、GPCR の構造は非常にデリケートであるため、細胞発現系では膜貫通領域へのわずかな挿入によっても発現が攪乱されてしまう。その点、無細胞合成系では膜貫通領域の末端への3アミノ酸残基程度の挿入では、リガンド結合能を喪失することではなく、良好な合成量が得られた。無細胞系は本研究でデザインしたような人工改変抗原の生産には非常に適していることが示された。

(参考文献)

1. Suzuki Y, Ogasawara T, Tanaka Y, Takeda H, Sawasaki T, Mogi M, et al. Functional G-Protein-Coupled Receptor (GPCR) Synthesis: The Pharmacological Analysis of Human Histamine H1 Receptor (HRH1) Synthesized by a Wheat Germ Cell-Free Protein Synthesis System Combined with Asolectin Glycosomes. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:38.
2. Inoue A, Ishiguro J, Kitamura H, Arima N, Okutani M, Shuto A, et al. TGF[alpha] shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. *Nat Meth. Nature Research*; 2012 Oct 1;9(10):1021-9.
3. Takeda H, Ogasawara T, Ozawa T, Muraguchi A, Jih P-J, Morishita R, et al. Production of monoclonal antibodies against GPCR using cell-free synthesized GPCR antigen and biotinylated liposome-based interaction assay. *Sci Rep*. 2015;5:11333.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Zhou W, Takeda H. (責任著者)(2018) Production of Immunizing Antigen Proteoliposome Using Cell-Free Protein Synthesis System. Shuang Liu (ed.), *Rheumatoid Arthritis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* **1868**:49-67. doi: 10.1007/978-1-4939-8802-0_7.
2. Hashimoto Y, Zhou W, Hamauchi K, Shirakura K, Doi T, Yagi K, Sawasaki T, Okada Y, Kondoh M, Takeda H. (責任著者) (2018) Engineered membrane protein antigens successfully induce antibodies against extracellular regions of claudin-5. *Sci Rep*. 30;8(1):8383. doi: 10.1038/s41598-

018-26560-9.

3. Suzuki Y, Ogasawara T, Tanaka Y, Takeda H, Sawasaki T, Mogi M, Liu S, Maeyama K. (2018) Functional G-Protein-Coupled Receptor (GPCR) Synthesis: The Pharmacological Analysis of Human Histamine H1 Receptor (HRH1) Synthesized by a Wheat Germ Cell-Free Protein Synthesis System Combined with Asolectin Glycerosomes. *Front Pharmacol.* 9:38. doi: 10.3389/fphar.2018.00038.
4. Liu S, Hasegawa H, Takemasa E, Suzuki Y, Oka K, Kiyoi T, Takeda H, Ogasawara T, Sawasaki T, Yasukawa M, Maeyama K. Efficiency and Safety of CRAC Inhibitors in Human Rheumatoid Arthritis Xenograft Models. *J Immunol.* 2017 Jul 17. pii: ji1700192. doi: 10.4049/jimmunol.1700192.
5. Hashimoto Y, Shirakura K, Okada Y, Takeda H, Endo K, Tamura M, Watari A, Sadamura Y, Sawasaki T, Doi T, Yagi K, Kondoh M. (2017) Claudin-5-Binders Enhance Permeation of Solutes across the Blood-Brain Barrier in a Mammalian Model. *J Pharmacol Exp Ther.* 363:275-283. doi: 10.1124/jpet.117.243014.
6. Takeda H, Zhou W, Kido K, Suno R, Iwasaki T, Kobayashi T, Sawasaki T. (2017) CP5 system, for simple and highly efficient protein purification with a C-terminal designed mini tag. *PLoS One.* 12:e0178246. doi:10.1371/journal.pone.0178246.
7. Yano T, Takeda H, Uematsu A, Yamanaka S, Nomura S, Nemoto K, Iwasaki T, Takahashi H, Sawasaki T. (2016) AGIA Tag System Based on a High Affinity Rabbit Monoclonal Antibody against Human Dopamine Receptor D1 for Protein Analysis. *PLoS One.* 11:e0156716. doi: 10.1371/journal.pone.0156716.

[学会発表] (計 7件)

1. Engineered membrane protein antigens successfully induce antibodies against extracellular regions of claudin-5, ポスター発表, Takeda H, *Antibody Engineering & Therapeutics Asia 2019*, 2019/2/26-28, 国際
2. GPCR の細胞外領域認識抗体の効率的作製を目指した人工抗原デザイン, ポスター発表, 浜内孝太郎, 澤崎 達也, 竹田 浩之, 第 41 回分子生物学会年会, 2018/11/28, 国内
3. 人工デザイン膜タンパク質抗原を用いた Claudin-5 細胞領域結合抗体の開発, 口頭発表およびポスター発表, 橋本洋祐, Wei Zhou, 浜内孝太郎, 白倉圭佑, 土居健史, 八木清仁, 澤崎達也, 岡田欣晃, 近藤昌夫, 竹田浩之, 第 41 回分子生物学会年会, 2018/11/28, 国内
4. Production of monoclonal antibodies against GPCR using cell-free synthesized GPCR proteoliposome antigen, 口頭, Takeda H, *Discovery on Target 2017*, 2017/9/25, 国際
5. CP5 システム:C 末端ミニタグとウサギモノクローナル抗体を用いた高効率タンパク質精製システム ポスター発表 竹田浩之, Wei Zhou, 城戸康希, 寿野良二, 岩崎隆弘, 小林拓也, 澤崎達也 *ConBio2017* (2017 年度 生命科学系学会合同年次大会), 2017, 12 月 6~9 日, 国内
6. CP5 システム:C 末ミニタグを用いた高効率タンパク質精製法 ポスター発表 竹田浩之, 城戸康希, Wei Zhou, 矢野智也, 寿野良二, 小林拓也, 澤崎達也, 第 17 回日本蛋白質科学会年会, 2017, 6 月 20~22 日, 国内
7. 無細胞合成抗原を用いた 抗膜タンパク質抗体作製技術 口頭発表 竹田浩之・澤崎達也, 日本生物工学会 2016 年大会, 2016, 9 月 28~30 日, 国内

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

愛媛大学プロテオサイエンスセンター研究業績検索

<http://www.pros.ehime-u.ac.jp/result/index.php>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。