

令和元年6月25日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07281

研究課題名(和文) グレリン受容体を活性化するアルパカ由来ナノボディの作製と結晶構造解析への応用

研究課題名(英文) Preparation of alpaca-derived nanobody which activates ghrelin receptor and its application to the crystal structure analysis

研究代表者

児島 将康 (Kojima, Masayasu)

久留米大学・付置研究所・教授

研究者番号：20202062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：グレリン受容体の立体構造を特異的に認識するアルパカ・ナノボディは残念ながらまだ取得できていない。今後もさらにスクリーニングを継続する必要がある。その一方で並行して進めていたグレリン受容体に対するマウス・モノクローナル抗体を取得することができ、これを用いて予定外にグレリン受容体の不活性型の構造を得ることができた。TM6とTM7の間のフェニルアラニン・クラスターとグレリンの脂肪酸修飾基が相互作用し、これによってグレリン受容体が活性型に変化することが想定された。これによって、なぜグレリンのオクタン酸が受容体活性に必要なのか、そのメカニズムの一端が明らかにされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グレリンは典型的なGタンパク質共役型受容体(GPCR)であるグレリン受容体に結合して、その生理作用を現す。グレリンはペプチド・ホルモンであるが、N末端から3番目のセリン残基が中鎖脂肪酸のオクタン酸によって修飾されており、しかもこのオクタン酸が受容体の活性化に必須であるという極めて珍しい構造をしている。今回の研究によって、なぜグレリンがペプチド部分だけでは受容体を活性化できず、オクタン酸の修飾があって始めて受容体を活性化できるのかが明らかになった。この知見はグレリン受容体の新しいアゴニストやアンタゴニストの合成に応用でき、摂食障害や食欲不振症などへの応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Alpaca nanobodies that specifically recognize the conformation of the ghrelin receptor have not been obtained yet. It is necessary to continue the screening further in the future. On the other hand, it was possible to obtain a mouse monoclonal antibody against the ghrelin receptor, and using this antibody for a crystallization, it was possible to obtain a structure of the inactive ghrelin receptor. It was assumed that the phenylalanine cluster between TM6 and TM7 interacts with the fatty acid modifying group of ghrelin, thereby changing the ghrelin receptor to the active form. This clarified one of the reasons why octanoate of ghrelin is required for receptor activity.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：ペプチドホルモン グレリン グレリン受容体 GPCR 結晶構造解析 膜タンパク質 ナノボディ アルパカ

1. 研究開始当初の背景

本研究計画の最終目標は、グレリンが結合したグレリン受容体の立体構造を明らかにして、グレリンの脂肪酸修飾(主にオクタン酸)がなぜ受容体の活性化に必要なのかを明らかにすることである。

申請者らは1999年に摂食亢進・成長ホルモン分泌促進作用を有するペプチド・ホルモンのグレリンを胃から発見し (Kojima et al. Nature 1999)、その生体内での役割について研究を進めてきた。グレリンは典型的なGタンパク質共役型受容体(GPCR)であるグレリン受容体に結合して、その生理作用を現す。グレリンはペプチド・ホルモンであるが、N末端から3番目のセリン残基が中鎖脂肪酸のオクタン酸によって修飾されており、しかもこのオクタン酸が受容体の活性化に必須であるという極めて珍しい構造をしている (Kojima et al. Nature 1999 & Physiol Rev 2005)。なぜグレリンがペプチド部分だけでは受容体を活性化できず、オクタン酸の修飾があって始めて受容体を活性化できるのか?それを明らかにするためには、グレリン受容体の結晶構造の解明が必要であり、不活性型の構造だけでなく、リガンドが結合して活性型になった構造の両方を明らかにして、受容体の動きを見る必要がある。

これまでに結晶構造解析のためのグレリン受容体を改変したいくつかのコンストラクトを作製し、大量発現による精製から、結晶化のスクリーニングにまで進んでいる。不活性型のグレリン受容体については、アンタゴニストが結合した状態の受容体タンパク質を精製し、結晶化の条件検討にまで至っている。しかし活性型のグレリン受容体については、グレリンや合成アゴニストが結合したグレリン受容体は極めて不安定で、活性型のままでは精製ができず、結晶化にまで至っていない。

そのため、まずモノクローナル抗体を使ってグレリン受容体を活性型に固定させることを計画した(挑戦的萌芽研究 H26~27 年度)。しかしマウスのモノクローナル抗体は受容体のグレリン結合部位に対して大きいことや、融合細胞のスクリーニングには限度があるため、現在でもグレリン受容体を活性型に固定する抗体は得られていない。そこでモノクローナル抗体に代わるツールとして、分子量が小さく、受容体のリガンド結合部位の認識も可能なナノボディの作製を考えた。

ラクダやアルパカなどのラクダ科の動物には、一般的な重鎖と軽鎖からなる免疫グロブリンのほかに、それとは別の遺伝子にコードされ、軽鎖がなく重鎖だけからなる1本鎖抗体が存在する。この1本鎖抗体の可変領域はナノボディ(あるいはVHH抗体)と呼ばれ、この部分だけで完全な抗原結合能を持つため、GPCRの共結晶化において、次のような利点がある。

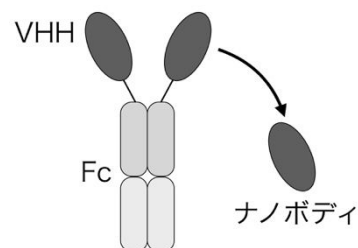
(1) 分子量が約15kDaと低分子でコンパクトであるため、受容体のリガンド結合部位を認識できる。

(2) 1本鎖タンパク質なので大腸菌や酵母で簡単に発現させることができ、ファージディスプレイ法によって100,000種くらいの多数のクローンをスクリーニング可能である。

(3) 非常に安定であり、熱や変成剤などに強い。

(4) 1本鎖のタンパク質なので、アミノ酸配列の改変や、他のタンパク質との融合体を作りやすい。

このような特徴からナノボディは、結晶化が難し



ラクダ科の動物種には一本鎖の重鎖抗体が存在し、抗原認識部位のVHH領域はナノボディと呼ばれる。

いGPCRなどの膜タンパク質を安定化させ、結晶構造解析を成功させるための良いツールである。しかしGPCRの立体構造を認識するナノボディの作製は、GPCRの結晶構造解明でノーベル賞を受賞したKobilka博士たちのグループによる、細胞内ドメインを認識してGタンパク質と同様な機能を示すナノボディの例しか作製に成功していない。また国内ではGPCRに対するナノボディの作製はまだ行われていない。このようにナノボディの作製があまり行われなないのは、国内で(国外でも)ラクダやアルパカを飼育し、ナノボディ作製を行える施設がほとんどないからである。国内では熊本県のアークリソース社が唯一の、アルパカでのナノボディ作製が可能な施設であり、申請者はこのアークリソース社とグレリン受容体タンパク質をアルパカに免疫して、グレリン受容体を活性化型に固定するナノボディのスクリーニングを行った。

2. 研究の目的

この研究ではグレリン受容体のグレリン結合部位を認識し、受容体を活性化することができるナノボディの作製を試みる。そして作製したナノボディによってグレリン受容体を活性化型に固定し、結晶化して構造解析することで、活性化型グレリン受容体の構造を得る。これによって不活性化型と活性化型の両方のグレリン受容体の結晶構造が解明でき、グレリンが結合したときのグレリン受容体の動きや、グレリンのオクタン酸の修飾部分がどのように受容体を活性化型に変換するのかが明らかになると考える。

3. 研究の方法

本研究ではグレリン受容体の結晶構造解析のための共結晶化ツールとして、グレリン受容体の立体構造を認識するアルパカ由来のナノボディの作製とスクリーニングを試みた。

研究の進め方は、(1) グレリン受容体を無細胞タンパク質合成系で発現させてアルパカに免疫する。(2) リンパ球からmRNAを抽出して、ナノボディcDNAをPCRで増幅し、ファージディスプレイ・ライブラリを作製する。(3) 1次スクリーニング: ファージディスプレイ・ライブラリからグレリン受容体を認識するナノボディを選択する。(4) 2次スクリーニング: 選択したナノボディをグレリン受容体発現細胞に加え、細胞内カルシウム濃度の上昇活性を指標に、グレリン受容体のグレリン結合部位に作用し、受容体を活性化するナノボディを選び出す。この順に研究を進めた。

4. 研究成果

まずファージディスプレイ・ライブラリを作製してグレリン受容体の立体構造を認識するナノボディクローンの取得を試みた。そのために様々に条件を変えてパンニング操作を行った。

- (1) ネガティブ・パンニング用にA2Aリポソームを使い、これに結合しないファージをまず選択したのち、グレリン受容体に結合するファージを探索した。
- (2) グレリン受容体をアビジン・ビオチン結合ではなく、リポソームを直接プレートに固定し、パンニングを行った。
- (3) 無細胞系で合成したグレリン受容体リポソームではなく、昆虫細胞で発現したグレリン受容体を精製し、それをプレートに固定してパンニング操作を行った。

その結果、(1)~(3)において、いずれも非特異的な結合が多く、回収したナノボディ・ファージはグレリン受容体を認識するものではなかった。

パンニング操作では当初、非特異的な結合が多く、グレリン受容体リポソームとコントロールとの差ができなかった。様々な改良の後に、ようやく両者の差があるパンニング操作を見出したが、それでもその差はわずかであった。その後は同様なパンニング操作を3~4回と繰り返し、グレリン受容体に対するナノボディを濃縮していったが、特異的なナノボディは得られなかった。

結論として、グレリン受容体の立体構造を特異的に認識するアルパカ・ナノボディは残念ながらまだ取得できていない。今後もさらにスクリーニングを継続する必要がある。

その一方で並行して進めていたグレリン受容体に対するマウス・モノクローナル抗体を取得することができ、これを用いて予定外にグレリン受容体の不活性型の構造を得ることができた。これによって、なぜグレリンのオクタン酸が受容体活性に必要なのか、そのメカニズムの一端が明らかにされた。

得られたグレリン受容体の構造は、アンタゴニストが結合した不活性型構造で、GPCRに特徴的な7回膜貫通領域を有していた。他のペプチド性GPCRと異なっている点が大きくは二点ある。一つはリガンド(アンタゴニスト)結合ポケットの構造で、グレリン受容体においてはリガンド結合ポケットが二股構造になっていた。またもう一点は、第6と第7ヘリックスの間の大きく開いたギャップ構造である。このギャップ構造には疎水性のアミノ酸残基、とくにフェニルアラニンが多く存在した。われわれはこの部分をフェニルアラニン・クラスターと名付けた。フェニルアラニンの側鎖は疎水性が強いことから、このフェニルアラニン・クラスターとグレリンの脂肪酸修飾基が相互作用し、これによってグレリン受容体が活性型に変化することが想定された。

今後はグレリンとグレリン受容体が結合した活性型構造を解明して、今回の結果を確認していく計画である。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計5件)

Kojima M, Hamamoto A, Sato T. Ghrelin O-acyltransferase (GOAT), a specific enzyme that modifies ghrelin with a medium-chain fatty acid. J Biochem. 2016 Oct;160(4):189-194. Epub 2016 Aug 3. Review. PubMed PMID: 27489223. (査読あり)

Yuge K, Hara M, Okabe R, Nakamura Y, Okamura H, Nagamitsu S, Yamashita Y, Orimoto K, Kojima M, Matsuishi T. Ghrelin improves dystonia and tremor in patients with Rett syndrome: A pilot study. J Neurol Sci. 2017 Jun 15;377:219-223. doi: 10.1016/j.jns.2017.04.022. Epub 2017 Apr 12. PubMed PMID: 28477699. (査読あり)

Kawai K, Nakashima M, Kojima M, Yamashita S, Takakura S, Shimizu M, Kubo C, Sudo N. Ghrelin activation and neuropeptide Y elevation in response to medium chain triglyceride administration in anorexia nervosa patients. Clin Nutr ESPEN. 2017 Feb;17:100-104. doi: 10.1016/j.clnesp.2016.10.001. Epub 2016 Oct 19. PubMed PMID: 28361739. (査読あり)

Ohno H, Yoshida M, Sato T, Kato J, Miyazato M, Kojima M, Ida T, Iino Y.

Luqin-like RYamide peptides regulate food-evoked responses in *C. elegans*. *Elife*. 2017 Aug 29;6. pii: e28877. doi: 10.7554/eLife.28877. PubMed PMID: 28847365; PubMed Central PMCID: PMC5576490. (査読あり)

Suzuki H, Ataka K, Asakawa A, Cheng KC, Ushikai M, Iwai H, Yagi T, Arai T, Yahiro K, Yamamoto K, Yokoyama Y, Kojima M, Yada T, Hirayama T, Nakamura N, Inui A. *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin A Causes Anorexia and Anxiety via Hypothalamic Urocortin 1 in Mice. *Sci Rep*. 2019 Apr 12;9(1):6011. doi:10.1038/s41598-019-42163-4. PubMed PMID: 30979915; PubMed Central PMCID:PMC6461611. (査読あり)

【学会発表】(計7件)

児島将康、モデル生物における新規生理活性ペプチドの発見と臓器関連生理学研究所研究会「臓器関連」2017年9月

西芳寛、那須沙織、細田洋司、御船弘治、久志野彰寛、田中永一郎、児島将康 放射線被ばく後のグレリン産生・分泌動態とグレリンによる血球保護効果の検討 第89回日本内分泌学会学術総会 2016年04月21日京都国際会館

御船弘治、原健人、坂井勇介、岩田慎平、西芳寛、田尻祐司、児島将康、満園良一 グレリン遺伝子欠損マウスの制限給餌下における自発運動について 第89回日本内分泌学会学術総会 2016年04月22日京都国際会館

佐藤貴弘、大石佳苗、児島将康 摂餌に関する記憶学習および探索行動に及ぼすグレリンの役割 第89回日本内分泌学会学術総会 2016年04月22日京都国際会館

児島将康、グレリン研究のこれから、第36回内分泌代謝学サマーセミナー、2018年7月(蔵王)

児島将康、高齢者の食欲と健康 ～摂食亢進ホルモンのグレリンの役割～、第6回日本介護予防・健康づくり学会大会

児島将康、摂食亢進ホルモンのグレリンと生体内のエネルギー代謝、第18回日本ミトコンドリア学会年会、2018年(久留米)

【図書】(計1件)

児島将康 (分担) 下垂体疾患診療マニュアル、診断と治療社、2016、総ページ数285

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）:

(2)研究協力者

研究協力者氏名：澤崎 達也
ローマ字氏名：(Tatsuya Sawazaki)

研究協力者氏名：竹田 浩之
ローマ字氏名：(Hiroyuki Takeda)

研究協力者氏名：伊東 祐二
ローマ字氏名：(Yuji Ito)

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。