

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18515

研究課題名(和文) グレリン受容体発現細胞の免疫による立体構造認識抗体および機能性抗体の作出

研究課題名(英文) Establishment of anti-ghrelin receptor antibodies for crystallization

研究代表者

椎村 祐樹 (Shiimura, Yuki)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：40551297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：グレリンは、胃から発見されたペプチドホルモンである。グレリンは、Gタンパク質共役型受容体のひとつであるグレリン受容体に結合することによって成長ホルモンの分泌促進や摂食亢進などの生理作用を示す。グレリンが受容体に結合するためには、3番目のセリン残基のオクタン酸修飾が必須であるがその分子機構は未だ明らかになっていない。そこで、X線結晶構造解析を用いたグレリン受容体のオクタン酸修飾グレリン認識機構の解明を目的として、抗グレリン受容体抗体の作出を試み、グレリン受容体の熱安定性を向上させる抗体を作出することができた。

研究成果の概要(英文)： Ghrelin was first discovered in rat stomach as an endogenous ligand of the growth-hormone secretagogue receptor (Ghrelin receptor), which is a G protein-coupled receptor. Ghrelin facilitates the release of growth hormone and stimulates appetite via Ghrelin receptor. Human ghrelin consists of 28 amino acid residues and a Ser3 is n-octanoylated, which is necessary for the activation of ghrelin.

To understand the mechanism of how Ghrelin receptor recognizes the acylated ghrelin at the molecular level, we are currently trying to solve the Ghrelin/Ghrelin receptor complex structure using X-ray crystallography. Antibody is a useful tool for membrane protein purification and crystallization, through improved thermostability and enlarged hydrophilic regions. Therefore, we prepared the anti-ghrelin receptor antibody prior to crystallization of the ghrelin receptor.

研究分野：内分泌

キーワード：グレリン グレリン受容体 X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

グレリンは、胃から発見されたペプチドホルモンである。グレリンは、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) のひとつであるグレリン受容体に結合することで成長ホルモン放出促進や摂食亢進など、多彩な生理作用を示すことが知られている。グレリンは、28 アミノ酸からなるペプチドであるが、受容体との結合には、3 番目のセリン残基に飽和脂肪酸のひとつであるオクタン酸の修飾を受けることが必須である。生体の恒常性を保つために様々なホルモンが同定されているが、脂肪酸の修飾によって活性が制御されるペプチドホルモンは、グレリンしか報告されていない。そのため、グレリンの脂肪酸修飾は、非常に興味深い研究テーマと考えるが、グレリン受容体がグレリンのオクタン酸修飾をどのように認識しているのか、その分子機構は明らかにされていない。

GPCR とリガンドの結合様式を解明する手法のひとつとして、X 線結晶構造解析がある。GPCR の X 線結晶構造解析は、困難な研究課題とされてきたが、安定化変異体や結晶化技術の革新によって近年、複数の GPCR の立体構造が決定されている。しかしながら、同様の方法でグレリン受容体の結晶化を試みたところ、結晶に至らなかった。そこでグレリン受容体の立体構造認識抗体を作出することを発想した。

立体構造認識抗体を作出する利点は、次の 2 点を想定している。

(1) 熱安定性の向上

立体構造認識抗体は、GPCR の立体構造を固定化する抗体である。GPCR は、構造的な「揺らぎ」の大きなタンパク質で安定性が非常に低い。GPCR に立体構造認識抗体を結合させることで GPCR の「揺らぎ」が抑えられ、熱安定性を向上させることが期待できる。

(2) 結晶格子形成の促進

GPCR は、7 回膜貫通型のタンパク質で、結晶化のためには可溶化する必要がある。可溶化された GPCR は、そのほとんどが界面活性剤のミセルに覆われてしまうため、結晶格子形成に寄与する可溶性領域の露出が少ない。しかしながら、可溶性タンパク質である抗体と複合体を形成させると、可溶化領域が拡大され、結晶格子の形成が促進されると考えられる。

以上の根拠から、グレリン受容体の立体構造を特異的に認識する抗体を作出し、生成グレリン受容体と複合体形成させることで、グレリン受容体の結晶化を容易にして、受容体の立体構造を決定する。

近年、グレリンは、拒食症やガンに伴うカヘキシアの治療薬として着目されている。本研究によってグレリン受容体の立体構造が決定されれば、構造を基盤とした創

薬につながる可能性があり、このような疾患の治療薬開発に大きく貢献できるものとする。

2. 研究の目的

上述のように本研究は、グレリン受容体の立体構造を決定するために、(1) グレリン受容体の熱安定性の向上と (2) 結晶格子形成を促進に寄与する、グレリン受容体の立体構造を特異的に認識する抗体を作出することを目的としている。

3. 研究の方法

グレリン受容体安定発現細胞または、精製グレリン受容体タンパク質を脂質に再構築したプロテオリポソームを免疫抗原としてグレリン受容体ノックアウトマウスに免疫する。免疫価の上昇が確認できれば、脾臓を摘出し、マウス脾臓細胞とミエローマ細胞を融合させてハイブリドーマ細胞を得る。その後、細胞培養上清を用いて ELISA 法とゲル濾過クロマトグラフィー法のスクリーニングを行い、抗グレリン受容体抗体を作出する。この際、3 つの ELISA 法を組み合わせる (図 1)。

(1) 免疫抗原 ELISA

免疫抗原として用いた、グレリン受容体安定発現細胞またはプロテオリポソームをプレートに固相して ELISA を行い、ELISA 陽性株を選択する。

(2) 空リポソーム ELISA

精製グレリン受容体を再構築していないリポソームだけをプレートに固相して ELISA を行い、空のリポソームに反応している抗体産生細胞株を除外する。

(3) 変性タンパク質 ELISA

本研究で作出を試みるのは、立体構造認識抗体である。そのため、グレリン受容体の立体構造を形成していない領域を認識する抗体を除く必要がある。そのためにグレリン受容体を還元剤などで変性させた後、ELISA を行い、陽性株を除外する。



図 1. 組み合わせる 3 種類の ELISA

本研究で作出を試みる抗体は、グレリン受容体の立体構造を認識する抗体である。そのため、ELISA では、免疫抗原 ELISA 陽性 (左) かつ、変性 ELISA および空リポソーム ELISA 陰性 (中、右) 株である。

作出した抗グレリン受容体抗体は、精製グレリン受容体タンパク質と複合体形成させて、熱安定性への寄与を検討する。熱安定性の測定は、GPCR で一般的な CPM アッセイによって、グレリン受容体抗体複体の融解温度 (T_m 値) を算出することによって行う。

また立体構造認識抗体作製過程で、グレリン受容体の細胞外領域を認識する抗体が作製できれば、グレリン受容体を介した細胞内シグナルに影響を及ぼす機能性抗体が作出される可能性もある。そのため、立体構造認識抗体作製のためのスクリーニング加えて、作出した抗体が細胞外領域を認識するかについて FACS 法を用いて検討し、細胞外認識抗体が作出できれば細胞内 Ca²⁺濃度を指標としたシグナルアッセイも同時に行う。

4. 研究成果

免疫原を作製するためにまず、マウスプロ B 細胞由来細胞株である Ba/F3 細胞にグレリン受容体を安定発現させた細胞株を樹立しようと考えたが、うまくいかなかった。この原因として、Ba/F3 細胞のトランスフェクション効率の問題と発現コンストラクトの問題が考えられる。特に、発現コンストラクトについては、立体構造認識抗体を作出するためにグレリン受容体のアミノ酸末端 (N 末端) を欠失させた変異体を細胞に発現させようとした。しかしながら、その後の検討によって、GPCR の N 末端は、発現に強く関連していることがわかり、その結果、十分な発現量が得られずに、安定発現細胞樹立に至らなかったのだと推察される。そこで、新たに見出したグレリン受容体変異体を精製し、リポソームに再構築したプロテオリポソームを作製した。このプロテオリポソームをマウスに免疫し、3 回の免疫でマウス血清中の抗体価が十分に上昇していることを確認した。そこで、マウス脾臓を摘出してミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマ細胞を得た。得られたハイブリドーマ細胞は、ELISA 法とゲル濾過クロマトグラフィー法によってスクリーニングをかけ、最終的に 10 株の抗グレリン受容体抗体を取得した。その後、抗グレリン受容体抗体とグレリン受容体の複合体を形成させ、抗体の熱安定性への寄与を検討したところ、グレリン受容体単体と比較して、T_m 値を 3 度以上上昇させる抗体を 2 株取得した (表 1)。

この 2 クローンについてアミノ酸シーケンス解析を行った。それぞれの細胞株から RNA を抽出し、逆転写反応によって cDNA を作製した。この cDNA を用いて L 鎖および H 鎖特異的なプライマーで PCR を行い、TA クローニングベクターに組み込み、大腸菌に形質転換した。その後、プラスミド抽出を行い、シーケンスを確認したと

ころ、この 2 クローンは、同一の細胞株であることが明らかとなった。

さらに得られた抗グレリン受容体抗体がグレリン受容体の細胞外領域を認識するかどうか、FACS 法によって検討した。HEK293 細胞にグレリン受容体を発現させ、作出した抗体をそれぞれ、10 μg/ml および 1 μg/ml の濃度で、氷上で 30 分反応させたのち、フローサイトメトリー解析を行った。その結果、10 μg/ml の濃度であってもグレリン受容体発現細胞は、染色されなかった。このことから作出した抗体はいずれもグレリン受容体の細胞内領域を認識する抗体であり、細胞内シグナルに影響を及ぼさないことが示唆された。

Clones	T _m (°C)	Δ (°C)
Control	50.5	-
1D11	51.5	1
3A10	51.5	1
3E11	51.5	1
4H6	41	-9.5
7H6	50	-0.5
8H1	50.5	0
9C1	45	-5.5
9D7	54	3.5
9G2	53.5	3
10G4	50	-0.5

表 1. 作製した抗体クローンとグレリン受容体複合体の CPM アッセイ

作出した 10 株の抗体クローンのうち、2 株がグレリン受容体の T_m 値を向上させることを確認した。

加えて、作出した抗体の結晶化を行った。これは、抗体単体の結晶構造モデルを取得しておけば、複合体の X 線回折データが明らかになった際、分子置換のモデル構造として利用できるためである。また作出した抗体は、IgG のままではなく、Fab 分子として結晶化に用いることを想定している。そこで、精製した抗グレリン受容体抗体 IgG をパパイニンで処理することによって Fab 分子を得た。この精製 Fab を 50 mM HEPES (pH7.5) で 6 mg/ml と 12 mg/ml に希釈した溶液を作製して結晶化を行った。市販の結晶化キットを用いて上記拡散法によって結晶化を行ったところ、30% PEG550MME、100 mM BICINE (pH9.0)、100 mM Sodium Chloride の条件で結晶が得られた。理化学研究所の大型放射光施設である SPring-8 BL32XL で回折実験を行ったところ、最大分解能 1.8 Å の良好な回折像を得ることができた (図 2a)。この回折データをもとに coot を用いてモデル構築を行い、作出した抗体の立体構造を得ることができた (図 2b)。現在、この抗体を用いて、グレリン受容体の結晶化を試みている最中である。

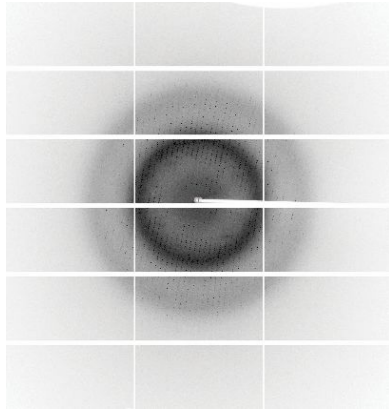


図 2a. SPring-8 で取得した回折データ
最大分解能 1.8 Å の良好な回折データを得ることができた。

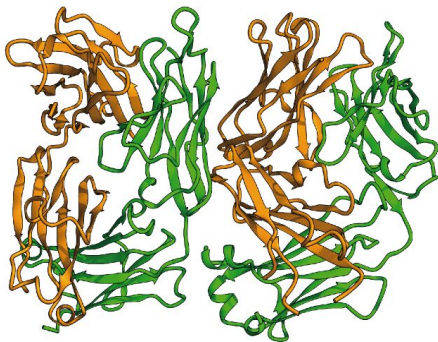


図 2b. 構造決定した構造認識抗体
H鎖をオレンジでL鎖をグリーンで示している。結晶格子中に抗体は2分子存在していた。

本研究によって、グレリン受容体の立体構造決定に寄与する可能性のある抗体を1株作出した。この抗体は、グレリン受容体の熱安定性を 3-4°C 高めるため、結晶化以外にも、精製時のタンパク質の安定性を高める目的でも使用できると考える。一方で、グレリン受容体の細胞外領域を認識し、細胞内シグナルに影響を与える機能性抗体の作出はできなかった。GPCR の細胞外領域を認識する抗体を作出するためには、本研究手法に加えて、スクリーニング時から FACS 法を取り入れるなど、細胞外領域を認識する抗体のみを取得できるような手法を積極的に取り入れるが必要であると考えられる。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

Establishment of anti-ghrelin receptor antibodies for crystallization.
Y. Shiimura, S. Horita, H. Asada, T.

Kobayashi, S. Iwata, and M. Kojima.
Keystone symposia on molecular and cellular biology. Feb. 16-20, 2018. New Mexico USA.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

該当なし

[その他]
ホームページ等

京都大学医学研究科分子細胞情報学
<http://cell.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

椎村 祐樹 (Shiimura, Yuki)
京都大学医学研究科・客員研究員
研究者番号: 40551297