

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19770095
 研究課題名（和文） 酵母を用いたロイコトリエンB₄受容体の大量発現、精製、結晶化
 研究課題名（英文） Expression, purification and crystallization of leukotriene B₄ receptor in yeast expression system
 研究代表者
 堀 哲哉 （ HORI TETSUYA ）
 独立行政法人理化学研究所・宮野構造生物物理研究室・研究員
 研究者番号： 20344054

研究成果の概要：

結晶化に向けてメタノール資化酵母によるモルモット由来ロイコトリエンB₄ (LTB₄) 受容体 (BLT1) の大量発現系構築を行った。100種類を超える変異体実験の結果、特にアミノ酸残基1-14番欠損体/Ser309 リン酸化部位変異体 (dN15/S309A) の³H-LTB₄親和性は、Kd=7.6nM, Bmax=57.5pmol/mgであり、生体組織中のBLT1の親和性と同程度であった。1L培養スケールで180・gの精製サンプルを調製した。SDS-PAGEでの分子量は約40kDであるが、ゲルろ過では分子量約100kDであり、二量体で精製されていることになる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	0	2,500,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	270,000	3,670,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：ロイコトリエンB₄、Gタンパク質共役型受容体、酵母、大量発現、翻訳後修飾、変異体、リガンド結合活性、精製

1. 研究開始当初の背景

(1) ロイコトリエンB₄ (LTB₄) は、炎症初期に白血球や免疫細胞を活性化する脂質メディエーターである。LTB₄は白血球や肥満細胞などで産生され、標的細胞表面に発現するLTB₄受容体 (BLT1) を活性化する。BLT1はGタンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、喘息やリウマチなどの炎症性疾患の創薬ターゲットとしてアンタゴニストの開発が進められている。BLT1の結晶構造は、薬剤

デザインにおいて有効な情報となる。そこで結晶化を目的にBLT1の大量発現系構築と精製系確立を行っている。

(2) 申請者は本申請研究を開始する前に、BLT1の大量発現系構築実験を行っており、下記の結果を得ていた。

①大腸菌C43株を用いたBLT1の大量発現 (未発表データ)。発現量は十分であった。様々な発現コンストラクトを作成し発現条

件を検討したが、 $^3\text{H-LTB}_4$ 結合能が無かった。

②メタノール資化酵母 (*Pichia pastoris*) を用いたBLT1の大量発現 (未発表データ)。89アミノ酸残基からなる細胞外分泌シグナルタンパクと、9アミノ酸からなる精製用FLAGタグをN末にタンデムに融合したヒトおよびモルモットBLT1について、 $^3\text{H-LTB}_4$ 結合活性が認められた。全く同じコンストラクトでも、マウスやラットBLT1では発現量はヒトやモルモットBLT1と同程度であったが、 $^3\text{H-LTB}_4$ 結合活性は無かった。また、N末にHisタグ、FLAGタグ、HAタグ、StrepIIタグを融合させたBLT1では、受容体の種の由来によらずに $^3\text{H-LTB}_4$ 結合活性は無かった。

③②で $^3\text{H-LTB}_4$ 結合活性が認められたモルモットおよびヒトBLT1について、膜画分を用いたScatchard plot測定実験の結果、 $^3\text{H-LTB}_4$ に対する結合パラメータはモルモットBLT1は $K_d = 5.8 \pm 0.27 \text{ nM}$, $B_{\text{max}} = 11.2 \pm 0.29 \text{ pmol/mg}$, ヒトBLT1は $K_d = 24.0 \pm 2.39 \text{ nM}$, $B_{\text{max}} = 25.2 \pm 2.00 \text{ pmol/mg}$ であった。結合親和性は、モルモットBLT1はモルモット白血球膜のBLT1と同程度であったが、ヒトBLT1はヒト白血球膜のBLT1よりも100倍程度低かった。

(3)本申請研究を開始した時点で報告されていたGPCRの結晶構造はウシロドプシンのみであった。

2. 研究の目的

本研究開始当初、BLT1の精製量を向上させるためには発現BLT1の比活性、つまりポリペプチドとしてのBLT1総発現量に対する三次元構造を形成している活性体BLT1の発現量を向上させることが至上課題であると考えており、下記の対策を考えた。

(1)ウシロドプシンの結晶構造から、細胞質内領域の構造はGPCR一般に不安定であると考えられた。そこで、下記の発現コンストラクト作成を行うことにする。

①モルモットBLT1とGタンパク質 α サブユニット ($G_{\alpha 2}$ および $G_{\alpha 16}$)共発現系を構築する。 α サブユニットは不安定な細胞質内領域と相互作用すると考えられているので、共発現することにより立体構造がより安定化すると考えられる。

②構造フレキシビリティが高いC末領域欠損変異体BLT1の発現系を構築する。

(2)発現コンストラクトによる比活性の相違を確認するために、簡便な活性測定系を確立することが必要であると考えた。当研究所にはRI実験施設がないため、非RI実験系の活性測定方法を確立する必要があったためである。そのために、

① LTB_4 不活性化酵素 (LTB_4 12-水酸化酸化

酵素/15-ケトプロスタグランジン還元酵素)と分光蛍光光度計を利用した新規BLT1活性測定法を確立する。

②従来法として $^3\text{H-LTB}_4$ を使用した活性測定も行い、 LTB_4 不活性化酵素を使用した活性測定の結果を評価する。

3. 研究の方法

(1)メタノールによる誘導開始後に菌体増殖はほぼ停止状態になるので、より大量の菌体量を得るために培養方法の検討を行った。対数増殖期から誘導開始するのではなく、大量前培養で得られた菌体をすべて誘導に使用することによる高密度培養を試みた。発現BLT1の LTB_4 親和性をScatchard plot測定により評価した。

(2)結晶化を行うためには糖鎖の除去が必要であるので、糖鎖が付加しない変異体の発現系を構築した。

①Asn4とAsn165がNグリコシル結合による糖鎖付加予測部位であり、AlaまたはGlnへの変異を組み合わせて合計9種類の変異体の発現、活性チェックを行った。

②糖鎖が付加しない変異体の一つであるN4Aについて、発現条件による比活性の評価を行った。

③N4Aについて、Scatchard plot測定を行った。

④N4Aを精製後、質量分析とペプチドシーケンスによる評価をおこなった。

⑤N4Aについて、精製タグの種類の検討を行った。

(3)上記変異体N4Aの評価結果を基にして、さらに変異体の発現系を構築した。

①N末領域の消化部位の変異体や欠損体の構築を行った。

②発現条件による比活性の評価を行った。

(4)上記の結果から、最も比活性が高い変異体dN15A/S309Aについて活性・品質評価を行った。

①膜画分dN15A/S309AについてScatchard plot測定を行った。

②精製dN15A/S309Aについてリガンド結合活性の評価を試みた。

(5)Gタンパク質 α サブユニット ($G_{\alpha 2}$ および $G_{\alpha 16}$)共発現系を構築、構造フレキシビリティが高いC末領域欠損変異体BLT1の発現系を構築して、活性評価を行った。

4. 研究成果

(1)培養方法の検討

対数増殖期で誘導開始した菌体湿重量は6L培養スケールでも25g程度であり十分量では

ない。膜画分タンパク量と B_{max} 値から計算した活性のあるBLT1の最大量は200 μ gである。高密度培養により1L培養スケールでも25gの菌体を得ることができた。膜画分に対するScatchard plot測定の結果、BLT1 (wild type) の $^3\text{H-LTB}_4$ 親和性は、対数増殖期で誘導開始した場合は $K_d = 5.8 \pm 0.27 \text{ nM}$, $B_{max} = 11.2 \pm 0.29 \text{ pmol/mg}$ 、高密度培養を行った場合は $K_d = 2.7 \pm 0.25 \text{ nM}$, $B_{max} = 9.4 \pm 0.37 \text{ pmol/mg}$ であり、親和性や発現量に影響しないことから高密度培養が有効であることが明らかになった。

(2)糖鎖付加を受けない変異体の評価

アミノ酸配列から糖鎖結合部位と考えられるAsn4とAsn165をAlaやGlnに置換した変異体にはすべて $^3\text{H-LTB}_4$ 結合活性があった。変異体に対する糖加水分解酵素処理の結果から、Asn4のみに糖鎖は付加していた。糖鎖が付加しない変異体の一つであるN4Aを大量培養して、膜画分中の活性の評価と精製サンプルの状態評価を行った。膜画分に対するScatchard plot測定の結果、 $^3\text{H-LTB}_4$ 親和性は $K_d = 8.7 \pm 1.2 \text{ nM}$, $B_{max} = 49.7 \pm 4.4 \text{ pmol/mg}$ であり、糖鎖が付加しないことによる $^3\text{H-LTB}_4$ 結合能の影響はほとんどないことが明らかになった。精製は、Q-セファロース、脱塩 (G25)、コバルト親和性カラム (TALON)、抗FLAG抗体-アガロースを使用した。CBB染色 SDS-PAGEではほぼ純品として精製できている。精製N4Aのゲルろ過分析の結果、精製N4Aは単量体または二量体であることが明らかになった。ペプチドシークエンスの結果、N4AはN末端細胞外領域のArg3またはArg8のC末側で部分的に消化されていた。質量分析の結果、C末領域のSer309が部分的にリン酸化を受けていた。N4Aに対し、Hisタグの位置やタグと受容体間のリンカー配列の検討を行った結果、N末にHisタグを融合させた場合は $^3\text{H-LTB}_4$ 結合活性はあるものの、シグナル配列の消化効率が低く、さらに金属アフィニティークラムへの吸着効率も低かった。C末にHisタグを融合させた場合のリンカー配列は、Precisionプロテアーゼ認識配列とmycタグは $^3\text{H-LTB}_4$ 結合活性があるが、V5タグでは結合活性が無かった。これらの結果から、Precisionプロテアーゼ認識配列をリンカー配列としたC末Hisタグ融合体としてさらなる変異体作成を継続することにした。

(3) N末端細胞外領域の消化を受けない変異体の評価

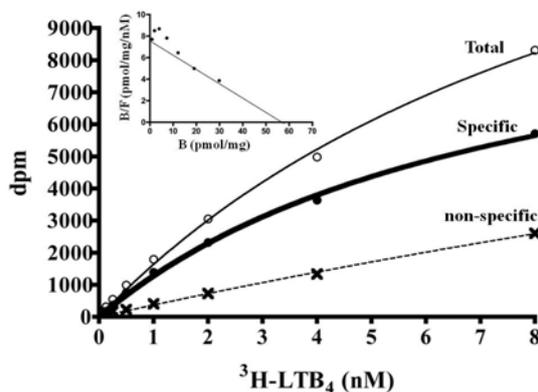
Arg3とArg8で消化を受けない変異体を構築

した。具体的には、Arg3とArg8はいずれもすべてのBLT1で保存されていないので、マウス、ヒト、ラットのアミノ酸への置換体、消化部位を含むN末領域のアミノ酸残基1-8番、1-11番、1-14番の欠損体を構築した。さらに部分的にリン酸化を受けるSer309をAlaへ置換した変異も組み合わせた。その結果、N末領域1-14番欠損体は309番がSerでもAlaでもいずれも他の変異体と比較して比活性がより高かった。N末1-14番欠損体/S304A変異体 (N15A/S309A) を継続することにした。

(4)変異体dN15A/S309Aの評価

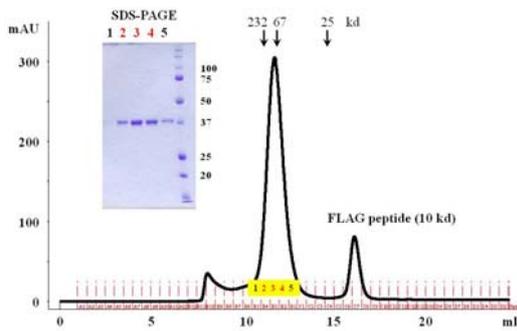
膜画分に対するScatchard plot測定の結果 dN15A/S309Aの $^3\text{H-LTB}_4$ 親和性は $K_d = 7.6 \pm 0.67 \text{ nM}$, $B_{max} = 57.5 \pm 3.0 \text{ pmol/mg}$ であった (図1)。

(図1) Scatchard plot測定の結果



培養方法を改良することにより、1L培養スケールで湿重量約50gの菌体、タンパク量約1gの膜画分を得た。 B_{max} 値と膜画分タンパク量から、膜画分中に活性体dN15A/S309Aは約2mg存在する計算になる。精製はQ-セファロース、脱塩 (G25)、コバルト親和性カラム (TALON)、抗FLAG抗体-アガロース、ゲル濾過 (Superose 12) を使用した。ゲル濾過の結果、精製dN15A/S309Aは分子量約100kDであり、SDS-PAGEでは40kDであるのでおそらく二量体で精製されていることが考えられる (図2)。精製dN15A/S309Aのタンパク量は、BCA法で測定した場合はBSA換算で0.18mgであった。dN15A/S309Aの場合、抗FLAG抗体アガロースカラムに対する吸着効率が低下したが、抗FLAG抗体アガロースカラムを使用せずにTALONとゲル濾過で同様に精製することができている。この場合、精製量は0.3mgであった。

(図2) ゲル濾過の結果



ペプチドシーケンスの結果、dN15A/S309Aのシグナル配列は酵母内在性エンドペプチダーゼKex2で除去されているが、引き続いて起こるエキソペプチダーゼSte13によるGlu-Ala-Glu-Ala繰り返し配列の消化は不十分で、最初のGlu-Ala配列のみ切断されているdN15/S309Aと、Glu-Ala-Glu-Ala配列が未消化であるdN15/S309Aの混合物であることが明らかになった。これらの原因として考えられることは、N末領域を除去したdN15/S309Aのアミノ酸配列上で、Ste13消化部位やFLAG配列の直後に膜貫通領域となるために、Ste13や抗FLAG抗体が精製dN15/S309Aに接近しにくくなったためであると考えられる。

また、アンタゴニストを官能基とするアガロースカラムを作成し、精製dN15A/S309Aが特異的に吸着することを確認した。

(5)Gタンパク質共発現系、C末欠損体の構築
発現BLT1の安定化のために、BLT1と共役するGタンパク α サブユニットであるGai2をBLT1 (wild type) と共発現させた。Gaiの発現は抗Gai抗体を使用したWesternブロットで確認できた。しかしながら、膜画分に対する ^{35}S -GTP γ Sの結合量は、LTB $_4$ の添加の有無で変化しないばかりか、mock膜画分に対する ^{35}S -GTP γ Sの結合量と同程度であった。したがって、酵母中でGai2を発現させても酵母のGタンパク質 $\beta\gamma$ サブユニットと相互作用できていないためにGai2が機能していないと考えられる。哺乳類の $\beta\gamma$ サブユニットも共発現する必要があると考えられる。

BLT1のC末端の立体構造も不安定であると考えられたので、様々なC末欠損体の発現実験を行った。いずれもWesternブロットでは発現が確認できるものの、 ^3H -LTB $_4$ 結合能が低下するか消失した。ヒトBLT1のC末欠損体を哺乳類細胞で発現させた場合、逆に ^3H -LTB $_4$ 結合能は向上するという結果が出て

いるので、モルモットBLT1のC末欠損体とメタノール資化酵母の相性が悪いのではないかと考えられる。

(6)今後の展望

2007-8年にGPCRである β_2 及び β_1 アドレナリン受容体、A $_2$ Aアデノシン受容体の結晶構造、イカロドプシンの結晶構造が報告された。このうち、アドレナリン受容体とアデノシン受容体は昆虫細胞による大量発現系により受容体を調製して結晶化を行ったものである。結晶化が成功した要因は、立体構造を安定化させるためのアミノ酸置換や異種タンパクの挿入、抗体との複合体化を行い、さらにアンタゴニストとの複合体として結晶化させることによりさらに立体構造の安定化を図っていたことである。これらの成功例に倣い、BLT1においても抗体作成を行う予定である。また、精製の段階で活性のないBLT1との分離をおこなうために、リガンドアフィニティークラムの調製を行っている。可溶化BLT1の活性測定は、LTB $_4$ が界面活性剤のミセル中に取り込まれてしまうために測定できていない。最終精製量が向上したので、物理化学的方法を使用して、精製BLT1の活性測定を行う予定である。酵母を使用したBLT1の発現系を構築してきたが、発現量は先にあげた結晶構造解析に成功した受容体の発現量と同等であり、精製BLT1の分析ゲル濾過のピークの形状も良好であるので、さらに立体構造の安定化を図るための工夫が必要化もしれないが、この発現精製方法も継続して結晶化を行っていく予定である。

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4件)

①Yasuda D, Okuno T, Yokomizo T, Hori T, Hirota N, Hashidate T, Miyano M, Shimizu T, Nakamura M. Helix 8 of leukotriene B $_4$ type-2 receptor is required for the folding to pass the quality control in the endoplasmic reticulum, FASEB J, in press, 査読あり

②Miyano, M., Ago, H., and Hori, T., Membrane protein crystallography for structure-based drug design, Medchem News, 19, 20-31, 2009, 査読なし

③Tatsuro Shimamura, Kenji Hiraki, Naoko Takahashi, Tetsuya Hori, Hideo Ago, Katsuyoshi Masuda, Koji Takio, Masaji Ishiguro and Masashi Miyano, Crystal structure of squid rhodopsin with intracellularly extended cytoplasmic region, J. Biol. Chem., 283, 17753-17756,

2008、査読あり

④吾郷日出夫、堀哲哉、宮野雅司、脂質メ
イエータ合成酵素の構造と機能；最近の進展、
分子心血管病、9、63-70、2008、査読なし

〔学会発表〕（計1件）

堀 哲 哉、Leukotriene B₄
12-hydroxydehydrogenase/15-oxo-prostagl
andin 13-reductase complex structure with
anticonfiguration of indomethacin、第30
回日本分子生物学会年会・第80回日本生
化学会大会（BMB2007）、平成19年12月12日、
横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 哲哉 (Hori Tetsuya)

独立行政法人理化学研究所・宮野構造生物
物理研究室・研究員

研究者番号：20344054