

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月5日現在

機関番号：82110

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570123

研究課題名（和文） アレルギー発症に関わる細胞外マトリックス蛋白質の活性化機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of Activation Mechanism of Extracellular Matrix Protein in Related to Allergosis

研究代表者

玉田 太郎（TAMADA TARO）

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究主幹

研究者番号：50391248

研究成果の概要（和文）： アレルギー疾患に関わる細胞外マトリックス蛋白質ヒト・ペリオスチンの機能領域 R1-R4（4つの連続したファスクリン1様ドメインを含む）を大腸菌発現系を用いて巻き戻し法により取得することに成功した。引き続き、ゲル濾過を用いた相互作用解析によって結合能の高い抗ヒト・ペリオスチン抗体を2種選出し、Fab 複合体試料を用いた結晶化実験を実施した。

研究成果の概要（英文）： Human periostin is an extracellular matrix protein in related to allergosis. We succeeded in preparation of functional region (R1-R4), including four sequential fasciclin 1 like domains, of human periostin using *E. coli* expression system combined with refolding method. Continuously, two anti-human periostin antibodies with sufficient binding ability to antigen were selected by gel filtration analysis, and then crystallization experiments using complex between R1-R4 and Fabs from these antibodies were carried out.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物化学・構造生物化学

キーワード：ペリオスチン、アレルギー疾患、活性化機構

1. 研究開始当初の背景

ヒト・ペリオスチンは、気管支喘息をはじめとする種々のアレルギー疾患に関わる細胞外マトリックス蛋白質である。近年、特に若年層のアレルギー発症患者が増加傾向にあり、喘息による死亡数は年間3000人以上にも達している。連携研究者がこれまでに行った研究により、ペリオスチンは、気道上皮細胞においてTh2サイトカインであるインターロイキン4（IL-4）あるいは

IL-13の刺激により誘導され、テネシンC、フィブロネクチン、コラーゲンV等の他の細胞外マトリックス蛋白質と結合することで気管支喘息の線維化を引き起こすことが明らかになっている。気管支喘息の線維化と症状の重症度は相関すると言われており、ペリオスチンは創薬の標的分子として注目されている。

ヒト・ペリオスチンは全長 836 残基のアミノ酸から構成されており、分子内には、N末

端側からシステインリッチドメイン、4つのファスクリン1様 (FAS1) ドメイン (R1、R2、R3、R4)、およびスプライシングバリエーションが見つかっている C 末領域を有する。FAS1 ドメインは、蛋白質-蛋白質相互作用に関与することが知られているため、ペリオスチンは4つの FAS1 ドメインにおいて、先述のテネシン C、フィブロネクチン、コラーゲン V などと相互作用すると考えられるが、その結合比、親和性、さらに立体構造情報は全く不明なままである。

また、連携研究者は既に複数の抗ペリオスチン抗体を所有しているが、ペリオスチンの機能を阻害する抗体はアレルギー疾患発症を抑える治療薬として機能する可能性を有している。よって、抗ペリオスチン抗体とペリオスチンの相互作用機構を解明することにより、抗体医薬品開発の上で重要な知見を得ることが期待されている。

2. 研究の目的

ヒト・ペリオスチンの全長、あるいは複数のドメインを含む機能領域の立体構造を解明し、これまで全く不明であったペリオスチンの立体構造に関する知見を得る。また、ヒト・ペリオスチンと他の細胞外マトリックス蛋白質や抗ペリオスチン抗体との相互作用解析、および複合体状態での立体構造解析を実施し、ペリオスチンの活性化機構や抗ペリオスチン抗体の作用機序を原子レベルで解明する。

3. 研究の方法

(1) 試料の大量調製

前述のようにペリオスチンは複数のドメインから構成されているが、結晶化の成功率の向上を目指して、ドメインの組み合わせを変えた発現コンストラクトを複数作製する。各コンストラクトは大腸菌発現系によって大量発現させ、可溶性で発現したものはそのまま試料の精製を行い、不溶性で発現したものは封入体を変性剤により可溶化後、巻き戻しを行うことにより調製する。いずれにおいても、ゲル濾過およびイオン交換クロマトグラフィーによる精製を実施する。

(2) 抗体の選択

連携研究者のグループが保有している数種類の抗ペリオスチン抗体の中で結合能が高い抗体を選択する。前述の医薬品開発という観点に加え、抗体と複合体化することによる結晶化促進も目的としている。結合能の強さは、ペリオスチンと各種抗体を混合後、抗体複合体の形成量をゲル濾過カラムにより評価する。結合が強いと判断したものを結晶化スクリーニングに用いる。

(3) 立体構造解析

精製後のペリオスチンの試料を用いて結晶化スクリーニングを実施する。さらに、3-(2)で選択した抗ペリオスチン抗体を Fab 断片化し、取得した Fab をペリオスチン試料と混合し、ペリオスチン/Fab 複合体をゲル濾過により調製した後に、結晶化スクリーニングを実施する。結晶の析出を確認できた場合は、引き続き回折データ収集および構造解析を実施する。

4. 研究成果

(1) ヒト・ペリオスチン試料の調製

構成するドメインの組み合わせが異なる発現コンストラクトを計 12 種類作製し、pCold1 ベクター、pET30a ベクター、pET28a ベクターを用いて大腸菌による大量発現系を構築した。なお、FAS1 領域には5つのシステイン残基が存在するが、過去に報告されたヒト TGF- β 誘導蛋白質の FAS1 ドメイン (FAS1 ドメインにおけるヒト・ペリオスチンとのアミノ酸配列の相同性は約 20%) の立体構造 (PDB code: 1X3B) から、4つのシステイン残基についてはジスルフィド結合を形成すると予測し、遊離型システイン残基であると予測した残りの 1 残基 (R1 中の Cys208) についてはアラニンに置換した。

12 種類の発現コンストラクトのうち、他分子との相互作用において特に重要と考えられる FAS1 ドメインを4つ全て含む3種、すなわち、シグナルペプチドを除いた 815 残基を含む全長体、N 末端のシステインリッチドメインを除く 740 残基を含むコンストラクト (R1C)、および4つの FAS1 ドメインの 532 残基を含むコンストラクト (R1-R4) はいずれも不溶性蛋白質として発現した。これらの封入体を変性剤により可溶化した後に、N 末端側に付加した His-tag を利用したアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、巻き戻し実験に供した。巻き戻しは、変性剤濃度を希釈法により下げることにより実施した。その際、巻き戻し条件を検討するため、ジスルフィド結合形成に影響を与える酸化・還元試薬の組み合わせ、および巻き戻し時間を変えた試料を調製した。全長体は、いずれの条件においても希釈時に大量に沈殿が生じたが、沈殿が見られなかった R1-C および R1-R4 については、希釈後の溶液をゲル濾過カラムに供し、比較的単量体試料が多く得られ、かつ試料の凝集および分解が少ない条件を決定した。この巻き戻し条件において、最終的に大腸菌 1L 培養液あたり、R1C は 1mg 弱、R1-R4 は約 3.2 mg 取得できた (試料①)

(図 1)。SDS-PAGE により純度を確認したところ、R1-R4 については単一のバンドが確認されたが、R1C は精製直後から著しい分解が見られた。R1C で見られる分解は、R1-R4 で

は観測されず、また、時間が経つと分子量約 65 k 程度で収束する傾向にあることから、C 末ドメインにおいて分解が起こっていると考えられた。

また、R1-R4 については、さらなる純度向上のため、Resource Q カラムを用いた陰イオン交換精製を行った。近接した3つの溶出ピークが確認されたため、それぞれを分けて回収した(試料②-I、②-II、②-III)。最終的に大腸菌 1L 培養液あたり、試料②-Iは 0.20 mg、試料②-IIは 0.15 mg、試料②-IIIは 0.24 mg の試料を取得できた。

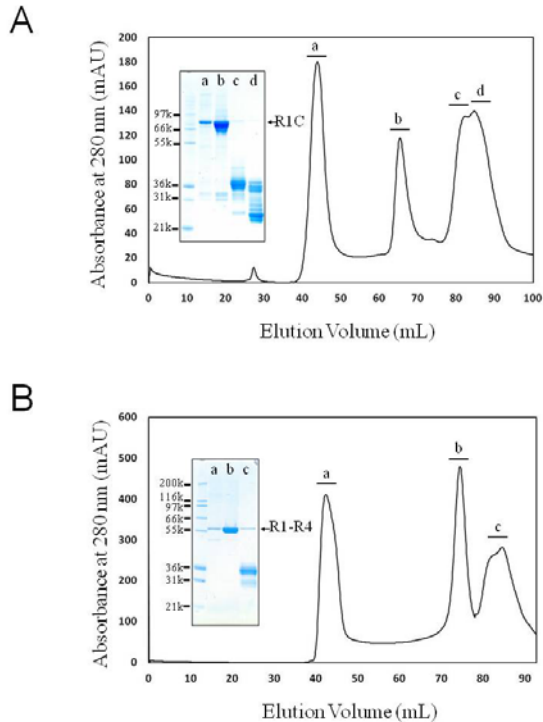


図1 R1C および R1-R4 のゲル濾過カラムによる精製
(A) R1C 単独、(B) R1-R4 単独。下線のピーク a, b, c, d および a, b, c で溶出された試料について SDS-PAGE 分析した。いずれにおいても、a は凝集体、b は単量体、c および d は分解物または夾雑蛋白質であると考えられた。
カラム：HiLoad Superdex 200 16/60 prep grade、緩衝液：20 mM HEPES (pH7.5)、0.2 M NaCl、流速：0.4 mL/min。

(2) 抗体の選択

10 種以上の抗ペリオスチン抗体の中から、連携研究者の研究室における知見に基づき、C 末領域と結合する AbC-1 (マウス IgG1)、AbC-2 (ラット IgG2a)、変性状態のペリオスチンを認識しない抗体で、かつ R1 ドメインに結合する AbR1 (ラット IgG1)、R3 ドメインに結合する AbR3-1 (ラット IgG1)、AbR3-2 (マウス IgG1)、の計 5 種類を選択し、大腸菌発現系を用いた調製したペリオスチン試料との結合評価実験をゲル濾過により実施した。

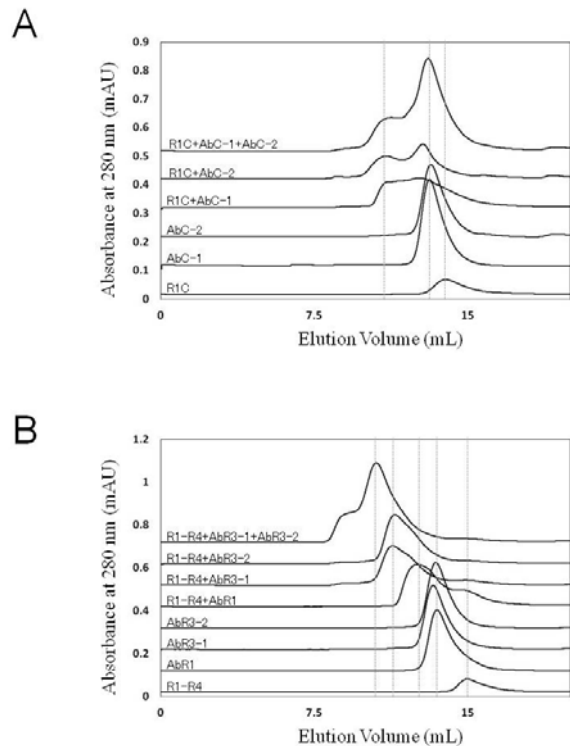


図2 R1C および R1-R4 と抗ヒト Periostin 抗体のゲル濾過カラムによる結合確認

(A) R1C と各種抗体の混合試料。試料は、下から R1-C、AbC-1、AbC-2、R1C + AbC-1、R1C + AbC-2、R1C + AbC-1 + AbC-2。

(B) R1-R4 と各種抗体の混合試料。試料は、下から R1-R4、AbR1、AbR3-1、AbR3-2、R1-R4 + AbR1、R1-R4 + AbR3-1、R1-R4 + AbR3-2、R1-R4 + AbR3-1 + AbR3-2。

カラム：Superdex 200HR 10/30、緩衝液：20 mM HEPES (pH7.5)、0.2 M NaCl、流速：0.3 mL/min。

C 末領域を認識する 2 種の抗体 AbC-1 および AbC-2 の R1C に対する結合確認実験結果を図 2 A に示す。R1C (約 85kDa)、AbC-1 および AbC-2 (いずれも約 150kDa) 単独では、R1C は約 13.9 mL、抗体は約 13.5 mL に溶出した。R1C と各抗体をモル比 2:1 で混合し、1 時間経過後にゲル濾過カラムに供した結果、高分子量側へのピークのずれ (12.6 mL) が観測されたものの、抗体もしくはペリオスチン単独由来の試料も多く共存しており、結晶化目的としては結合能が不十分であることが示唆された。さらに、AbC-1 と AbC-2 が、R1C の C 末ドメインの結合において競合するか否かを調べるため、R1C、AbC-1、AbC-2 をモル比 2:1:1 で混合し、同様に結合確認したところ、さらなる高分子量側への溶出位置のずれは観測されず、これらの抗体の結合が競合することが考えられた。また、本研究を通じて、C 末領域は分解を受けやすいことが確認されていたが、AbC-1、AbC-2 のいずれの抗体を添加した場合においても R1C 試料の分

解の抑制効果は見られなかった。

続いて、R1 ドメインを認識する抗体である AbR1、R3 ドメインを認識する抗体である AbR3-1 および AbR3-2 の R1-R4 に対する結合能を確認した(図 2 B)。R1-R4 単独(約 60kDa) および、各抗体単独(約 150kDa) では、それぞれ約 14.3 mL、約 13.5 mL に溶出した。R1-R4 に AbR3-1 および AbR3-2 をモル比 2:1 で混合した試料においては、高分子量側に溶出位置がずれ、約 11.3 mL に溶出したのに対し、AbR1 を混合したものにおいては、12.3 mL から 13 mL あたりに幅の広いピークが観測された。また、R3 ドメインを認識する AbR3-1 と AbR3-2 の R1-R4 への競合確認実験も実施した。R1-R4、AbR3-1、AbR3-2 をモル比 2:1:1 となるように混合し、同様に結合確認した結果、R1-R4/抗体(2:1 と推定)複合体よりもさらに高分子量側へ溶出位置がずれ、約 10.5 mL にピークが観測された。この結果から AbR3-1 と AbR3-2 の R3 ドメインへの結合は競合しないことが確認できた。

以上の結果から、結合評価実験に使用した 5 種の抗体のうち、AbR3-1 および AbR3-2 は大腸菌発現系で取得したヒト・ペリオスチン(R1-R4) に対する結合能が比較的高く、また、この 2 種の結合は競合しないことが分かった。AbR3-1 および AbR3-2 を産生するハイブリドーマの大量培養(各 5L) を外部発注し(2011 年度直接経費として計上)、培養上清を Protein G sepharose Fast Flow を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。その結果、5L 分の培養上清から AbR3-1 を約 108 mg、AbR3-2 を約 132 mg 取得できた。続いて、これらの抗体を Fab 断片化し、結晶化に供することとした。各抗体を消化酵素パピインを用いて Fab 断片化した後に、陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製し、AbR3-1(Fab) および AbR3-2(Fab) を取得した。

(3) 立体構造解析

精製したペリオスチン単独(R1-R4: 試料①、試料②-I、試料②-II) について、市販のスクリーニングキットを用いて約 900 条件を検索したが、結晶の析出を確認するには至らなかった。また、R1-R4/AbR3-1(Fab) (1:1) 複合体および R1-R4/AbR3-2(Fab) (1:1) 複体の結晶化を実施した。R1-R4 試料(試料①、試料②-I、試料②-II、試料②-III) と過剰量の AbR3-1(Fab) または AbR3-2(Fab) を混合し、ゲル濾過カラムによって、R1-R4/AbR3-1(Fab) 複合体、R1-R4/AbR3-2(Fab) 複合体と思われる高分子量側にシフトしたピークを分取した(図 3 AB)。これらの溶出各分を SDS-PAGE および光散乱分析した結果、いずれも 1:1 複合体を形成していることを確認できた。さらに、AbR3-1(Fab) と AbR3-2(Fab) の双方を過剰量加えることにより、R1-R4/AbR3-1(Fab)/

AbR3-2(Fab) (1:1:1) 複合体の作製も試みたが、1:1 複合体に比べ、さらに高分子量側にシフトしたピークを確認できた(図 3 C)。得られた複合体試料について、市販のスクリーニングキットを用いて 2000 条件以上を検索したが、現時点で結晶の析出を確認するには至っていない。

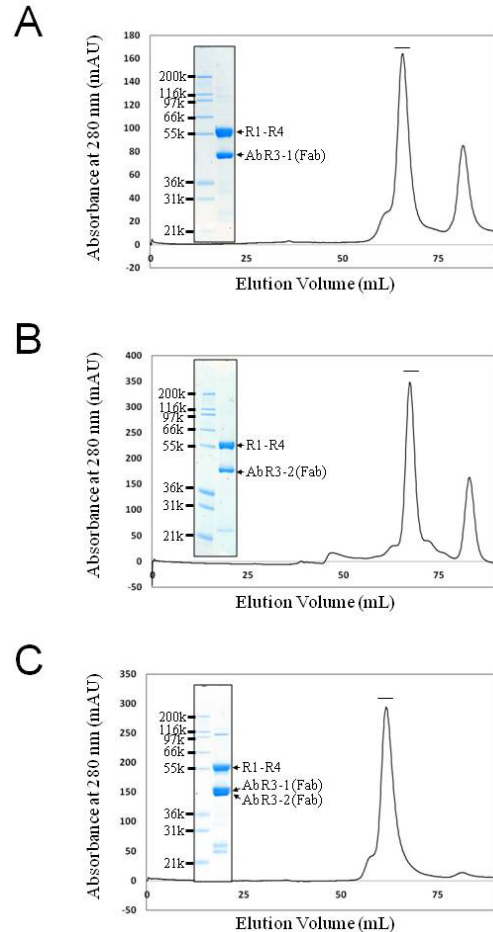


図 3 R1-R4/Fab 複合体のゲル濾過カラムによる調製

(A) R1-R4 / AbR3-1、(B) R1-R4 / AbR3-2。いずれにおいても、下線のピークに 1:1 複合体が溶出されたことを SDS-PAGE および光散乱分析にて確認した。

(C) R1-R4 / AbR3-1 / AbR3-2。下線のピークに R1-R4/AbR3-1/AbR3-2 複合体が溶出されたことを SDS-PAGE 分析にて確認した。

カラム: HiLoad Superdex 200 16/60 prep grade、緩衝液: 20 mM HEPES

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)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 玉田 太郎、「創薬標的タンパク質の構造研究」、茨城大学第 8 回生体分子科学コロキウム、2010 年 2 月 23 日、茨城大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉田 太郎 (TAMADA TARO)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究主幹

研究者番号：5 0 3 9 1 2 4 8

(2) 研究分担者

安達 基泰 (ADACHI MOTOYASU)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究副主幹

研究者番号：6 0 2 9 3 2 5 8

(3) 連携研究者

出原 賢治 (IZUHARA KENJI)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：0 0 2 7 0 4 6 3