

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19099

研究課題名（和文）新たな膜挿入促進因子の活用によるGPCRの無細胞再構成系の構築

研究課題名（英文）Construction of a cell-free reconstitution system for GPCRs using a novel membrane insertion promoter

研究代表者

戸澤 譲（Tozawa, Yuzuru）

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：90363267

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では、創薬重要標的膜タンパク質GPCRの再構成系構築と、GPCR特異的に結合するペプチドアプタマーを効率的に選抜する無細胞翻訳系の構築を進めた。GPCR再構成効率の鍵を握ると想定したAsterixの解析については、自律的膜挿入能と2量体形成能などを明らかにした一方、GPCRとのキメラ分子作成による膜挿入促進効果は確認できなかった。細胞より精製したGPCRをナノディスクへ再構成し、抗体ライブラリーからGPCR細胞外領域を認識可能な8種類の人工抗体の取得に成功した。これらは実際に膵臓がんなどの細胞表面にも結合することまで確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、GPCRの中でも膵臓がん細胞などのマーカー候補プロスタグランジン受容体EP4に対し、細胞外領域を特異的に認識可能な人工抗体を取得できた点で、学術的・社会的意義が大きい。良質な標的分子を準備さえすれば、無細胞翻訳系にもとづく進化分子工学の手法により、創薬展開に適する人工抗体などを効率的に選抜可能になった。産業応用のゴールは、需要が大きな創薬用人工抗体の効率的取得システムの提供であり、社会貢献に直結する成果と考えている。また、学術的にもGPCRを含む膜タンパク質の品質管理の鍵を握るAsterixの基本的な分子挙動について生化学的な知見が得られた点では進捗があったと考えている。

研究成果の概要（英文）：In this project, we constructed a reconstitution system for the G protein coupling receptor (GPCR), an important target membrane protein in drug discovery, and an evolutionary engineering system to select peptide aptamers that specifically bind to this GPCR efficiently. Analysis of Asterix, which is assumed to hold the key to the efficiency of GPCR reconstitution, revealed its autonomous membrane insertion and dimer formation abilities. However, we could not confirm the effect of promoting membrane insertion by creating a chimeric molecule with GPCR. On the other hand, we reconstituted GPCR purified from cells into nanodiscs, and by using this as bait for evolutionary engineering, we succeeded in obtaining eight artificial antibodies from an antibody library that can recognize the extracellular domain of GPCR. We even confirmed that these antibodies actually bind to the cell surface of pancreatic cancer cells and other cancer cells.

研究分野：無細胞翻訳系

キーワード：無細胞翻訳系 GPCR ペプチドアプタマー 進化学 プロスタグランジン受容体

1. 研究開始当初の背景

機能的構造をもつ膜タンパク質を簡便に調製する技術は、抗体創薬を中心とする応用研究ではニーズが極めて高い。研究代表者は無細胞翻訳系を基盤として、様々な膜タンパク質を対象にリボソームの存在下での再構成系の構築に成功してきた。この無細胞翻訳系を基盤とする膜タンパク質再構成技術は、複数膜貫通領域をもつ膜タンパク質の膜上再構成を終夜の試験管内反応だけで実現させる。その多くは6回膜貫通型の Mitochondrial carrier (MC)及び Plastidic phosphate translocator (pPT)のようなミトコンドリアや葉緑体などオルガネラの内膜に局在する膜輸送体であった。この高い再構成効率は、細胞レベルでの解析では得られない多くの示唆を与えている。研究代表者は、30種以上の膜輸送体の再構成を可能としたこのシステムは、膜タンパク質の膜内フォールディングが自律的に安定して進み得ることを示し、初期の膜挿入のエネルギー障壁を乗り越えることが成功の鍵となるすなわち「多くの膜タンパク質は N-terminal domain (TMD)の膜挿入が律速となり、この行程を乗り越えると膜内での残りのフォールディングは比較的自発的に進む」という仮説にたどり着いた。さらに、最近の G protein coupled receptor (GPCR)の biogenesis に関する論文の中で特に新規の膜タンパク質シャペロン Asterix の機能を独自に調べた際に、Asterix 自体の自律的な多量体形成能と CCDC47 の N-TMD 膜挿入促進機能を見出した。Asterix が植物や昆虫にも普遍的に存在し、昆虫培養細胞が効率的なヒト GPCR の発現系であるという多くの報告例から、Asterix がコムギや昆虫細胞由来の無細胞翻訳系においても GPCR の N-TMD 膜挿入促進装置として機能し得るのではないか、という着想を得た。

研究代表者がこれまで確立してきた無細胞翻訳系を基盤とする膜タンパク質再構成系は、アドレナリン受容体 β_2 AR を除き多くの GPCR は思うように機能再構成ができなかった。そこで GPCR 膜挿入機構に関する文献情報にヒントを得て、Asterix に着目した N-TMD 挿入促進効果に関するインビトロでの先行実験を重ねてきた。本研究では、開始時までには得た独自の生化学データに基づき、GPCR の N-TMD の膜挿入促進システムを人為的に構築することに取り組み、簡便かつ高効率なインビトロ GPCR 再構成技術の確立に挑戦することとした。

この研究領域は創薬業界での過当競争が熾烈であり、GPCR の試験管内再構成系に汎用化のめどがつくと、国内の関連分野の応用研究に格段に弾みがつくことが期待できることから、積極的に技術の権利化にもつなげたいと考えている。現在、GPCR タンパク質の調製は、ヒトあるいは昆虫の培養細胞系を利用する手間と時間を要する系に依存している。アウトプットの一つとして GPCR に特異的に結合するペプチドアプタマーを創薬シーズとして探索することを想定していたため、本研究で確立を目指す GPCR の自律的再構成系の構築が成功が約束されていない挑戦的試みである点から、並行して昆虫細胞系によりコントロール用 GPCR (プロスタグランジン受容体 EP4) を調製し、EP4 をナノディスクに再構成した GPCR ナノディスク複合体の調製と、この EP4 に特異的に結合する抗体の選別系の構築についても並行して開始した。

2. 研究の目的

研究代表者は、細胞中の膜貫通型タンパク質は、基本的にトランスロコンにより目的の膜へ正しい向きに組み込まれ、その膜挿入機構はブラックボックスであるが、N 末端領域の膜挿入が律速となり、この行程を乗り越えると以降の膜内フォールディングは自発的に進むものなのではないかという仮説を立てた。本研究では、無細胞翻訳系での再構成が困難であった GPCR を対象に、研究代表者が最近インビトロでの機能を確認した N 末端領域の膜挿入を促進する機能を持つ補助タンパク質を利用し、無細胞翻訳系による GPCR 再構成系を確立することを目的に研究を進めた。

本研究の展開上の最終ゴールは、成果の社会貢献である。具体的には、創薬標的の GPCR を特異的に結合し、機能制御する新たな抗体やペプチドの創出および創薬への利用である。この究極の目的を達成するために、無細胞翻訳系による効率的な GPCR 再構成技術の開発と並行して、同じく無細胞翻訳系を基盤とした進化分子工学的手法に基づき、標的 GPCR を特異的に認識する人工抗体の選抜システムの構築を目指して研究に取り組んできた。

3. 研究の方法

GPCR の ER 膜への組み込みには、N 末端膜貫通領域(N-TMD)の膜挿入に特化した PAT10 複合体の構成因子 Asterix による直接的な相互作用が必要という報告がある(Chitwood & Hegde, *Nature*, 584, 630, 2020). 研究代表者はすでに無細胞翻訳系により Asterix の機能解析を進め、Asterix の多量体形成と Asterix 依存的な CCDC47(PAT10 のもう一つの構成因子)の膜挿入が起こる現象を確認している。これらインビトロ系でのタンパク質新機能の発見は、「研究代表者の仮説「N-TMD 膜挿入促進がその後のフォールディング効率(GPCR 全体の再構成効率)を決定付ける」を裏付ける可能性を秘めていると考えた。本研究では、当初の 2 項目に加え、項目 3 を新たに設定して 2 力年の計画で研究を遂行した。いずれの項目も、他の競争的資金のサポートを受けた研究課題との重複は一切なく、本課題で専念して遂行した。

(1) 項目 1: 膜シャペロン因子 Asterix による N 末端領域の膜貫通促進機能の解析

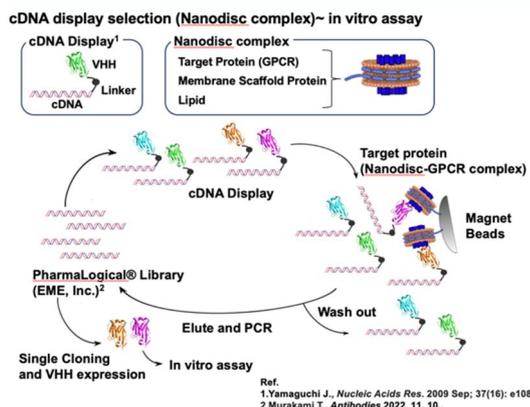
本項目では、先行により見出した Asterix の 1) 自律的多量体形成の様式、2) PAT10 パートナーとしてすでに同定されている CCDC47 タンパク質 N-TMD の膜挿入促進作用、に関する分子機構の解明を進めた。材料とする Asterix 及び CCDC47 は先行して試験を進めているヒトのタンパク質に加え、昆虫(カイコ)や植物(コムギ)の各ホモログについて同様な機能の有無を検証し、その機能・構造的な普遍性を確認した。

(2) 項目 2: 再構成が困難な GPCR の Asterix による膜挿入効率の改善の試み

本項目では、Asterix タンパク質の機能を利用し、再構成が困難であった GPCR としてムスカリン受容体(Muscarinic acetylcholine receptor, HM2)、再構成を確認済みの β_2 AR を材料として、Asterix 共発現型の GPCR 再構成系の構築を進め、N-TMD 膜挿入促進による再構成効率の変化を検証した。本項目の実験では、合成中・合成直後の膜タンパク質の膜挿入の配向性及び高次構造について、FLAG や His₆ などのペプチドタグを両末端または片方に付加した材料を用い、必要に応じて HSP70 結合アッセイを取り入れ、Proteinase K による部分分解法を用いて特異的にタグを認識する抗体を利用したウェスタンブロット法により配向性と膜貫通状態の解析を行った。

(3) 項目 3: 機能評価用のコントロール GPCR の調製と創薬応用基盤の準備

本項目は当初の計画書には記載していなかったものである。ここでは、目的通りに研究が進まない場合に備えて、機能的 GPCR として調製可能なことが報告されているプロスタグランジン受容体のタンパク質を発現精製し、これを新たにデザインした membrane scaffold protein (MSP)を利用してナノディスクに再構成する実験を進めた。プロスタグランジン E2 の受容体は G タンパク質共役受容体 (GPCR) ファミリーの一つであり、ヒトでは EP1, EP2, EP3 および EP4 の 4 種類が存在する。このうち EP4 は生活習慣病や慢性炎症に関与していることが知られ、潰瘍性大腸炎や急性心不全などの治療薬の候補、さらには、がん免疫療法のターゲットとしても注目されている。本研究では、EP4 特異的な治療薬の開発を目指し、従来の低分子医薬品や抗体医薬品に次ぐ創薬モダリティとして注目されている Variable domain of Heavy chain of Heavy-chain antibody (VHH 抗体)に着目した。EP4 特異的な治療薬の候補としての VHH 抗体を取得するために、昆虫細胞-バキュロウイルス発現系で構造解析用にデザインされた変異型 EP4 を発現し、アフィニティカラムを用いた精製を行ったのち、EP4 をナノディスクに再構築した。続いて、精製したナノディスク-EP4 複合体をターゲットとして、進化分子工学の手法を基盤とした VHH 抗体の探索を進めた(右図)。鋳型として PharmaLogical® Library (EME 社)を用い、cDNA display 法によるスクリーニングを実施した。試験管内淘汰により絞り込まれた分子集団より EP4 結合型 VHH 抗体の候補を選抜し、組み換えバクテリアの系により精製タンパク質を調製し、野生型 EP4 発現細胞を用いた結合評価を行った。



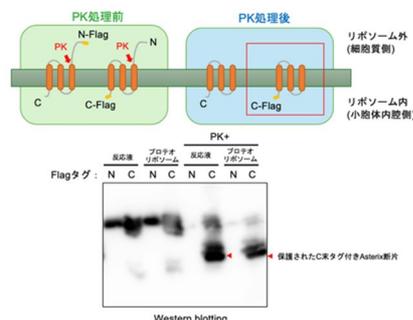
4. 研究成果

(1) 項目 1: 膜シャペロン因子 Asterix による N 末端領域の膜貫通促進機能の解析

「膜シャペロン因子 Asterix による N 末端領域の膜貫通促進機能の解析」を実施した。先行実験より見出した Asterix の自律的多量体形成の様式や PAT10 パートナーとしてすでに同定されている CCDC47 タンパク質 N-TMD の膜挿入促進作用に関する分子機構の解明を進めた。材料とする Asterix は先行して試験を進めているヒトのタンパク質に加え、昆虫(カイコ)や植物(シロイヌナズナ)のホモログについて同様な機能の有無を検証した。

Asterix のプロテアーゼ保護アッセイによる配向性実験

右図に示すように、Proteinase K (PK)の部分分解法により、付加したタグを認識する抗体を利用して分解から保護された領域を確認する実験を行った。右図に示すように、N末端をリポソーム外、C末端をリポソーム内という配向性で組み込まれていることを確認した。抗体反応の強度からも、配向性には自律性があることが強く示唆される。



自律的多量体形成の様式の解析

ヒト以外の生物種として、モデル生物 3 種 *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ), *Bombyx mori* (カイコ), *Caenorhabditis elegans* (センチュウ)より Asterix ホモログをクローニングし、無細胞翻訳系によりタンパク質合成試験を行った。下図のように、自律的な膜挿入が生物種横断的に共通した性質であることを確認できた。

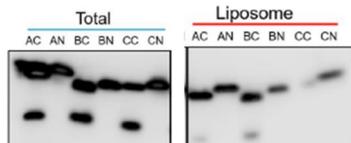


図. 各種生物の Asterix の合成試験。

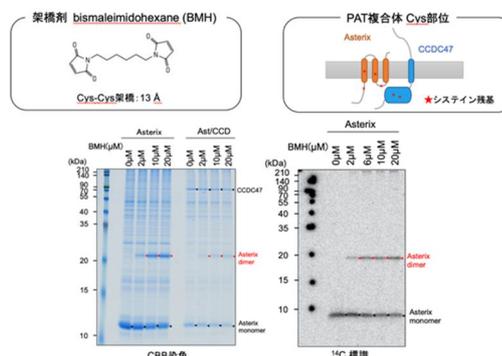
翻訳時に ¹⁴C-Leu で標識した各生物由来の Asterix のリポソーム自律的組み込みを確認。A は *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ), B は *Bombyx mori* (カイコ), C は *Caenorhabditis elegans* (センチュウ)の Asterix を示す。AN, BN, CN の「N」は N 末 FLAG を、AC, BC, CC の「C」は C 末 FLAG を示す。

Asterix と CCDC47 の共発現による脂質二分子膜上への再構成実験

CCDC47 の全長からシグナル配列 (SP) を除去 (CCDC47_ΔSP) したところ、Asterix と共発現すると、CCDC47_ΔSP はより膜上に合成された。この実験結果は、CCDC47 の SP 配列以外の領域において Asterix が相互作用している可能性が示唆された。

化学架橋剤を用いた PAT 複合体形成及び Asterix 多量体形成の検証

Asterix と CCDC47 の相互作用を検証する目的でシステイン (Cys) 残基同士を架橋する bismaleimido-hexane (BMH) を利用したクロスリンク試験を実施した (右図)。Asterix と CCDC47 の架橋物は検出されなかった。ただし、架橋産物が不溶化するなどの理由で検出できていない可能性も残る。一方、Asterix のホモダイマーの架橋が観察された。この結果から Asterix は 2 量体を基本単位として安定構造を取ることが示唆された。



PAT 複合体による GPCR の再構成効率の検証

Asterix と CCDC47 の共存による β_2 AR およびムスカリン受容体 (Muscarinic acetylcholine receptor, HM2) の再構成を試みた。結果は良好なものではなかった。

(2) 項目 2: 再構成が困難な GPCR の Asterix による膜挿入効率の改善の試み

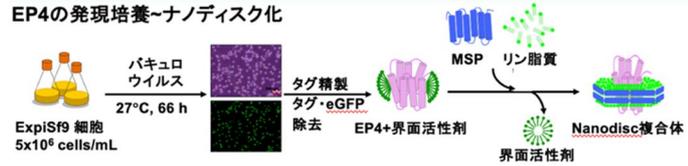
ここでは GPCR の Asterix による膜挿入効率の改善の試みを進めた。Asterix タンパク質の機能を利用し、GPCR として HM2 および β_2 AR を材料として、Asterix 共発現型の GPCR 再構成系の構築を進めたが、N-TMD 膜挿入促進による再構成効率の上昇効果を得るには至っていない。そこで、深煎りすることを回避し、項目 3 の GPCR を標的とする抗体選抜の実験系の確立に注力することとした。

(3) 項目 3: 機能評価用のコントロール GPCR の調製と創薬応用基盤の準備

ここでは、対照実験用に入手していた結晶構造解析用に変異を導入した GPCR の一つであるプロスタグランジン E2 受容体サブタイプ 4 (EP4) を昆虫細胞系で発現・精製し、これをナノディスクへ導入したところ、こちらはリガンドを受容する構造タンパク質として再構成可能であった。この系はさらに、進化工学的な手法で細胞外の受容体ドメインに特異的に結合する人工抗体の選抜まで成功しており、学会報告を行い、論文投稿の準備を進めている。多くのケースでは GPCR の細胞内側が抗原となるケースが多いのに対し、細胞外領域を特異的に認識できる 8 種の異なる VHH 抗体の取得の成功は予想外の大きな成果であった。少なくとも市販されている多くの GPCR 抗体により細胞染色する際には、細胞透過性を人為的に高めることで染色効率を向上させるケースが多いのに対し、現在までに得られている VHH 分子種を利用した細胞染色においては、細胞外領域を認識することよりこの操作が不要であり、今後の技術開発に弾みがつく結果となっている。

EP4 タンパク質の精製とナノディスクへの再構成

Sf9 細胞を宿主とする EP4 タンパク質発現から精製の行程は、既報に基づいて実施した。ナノディスク (ND) 用の Membrane scaffold protein (MSP) は、ストレプトアビジンビーズ精製を可能とするため、今回の実験で新たに設計したものをを使用した。ミセル化状態で精製した EP4 とリン脂質および MSP との再構成は既報に従って実施した。計画書に記載のない実験系であることより、下図にその概略を示す。



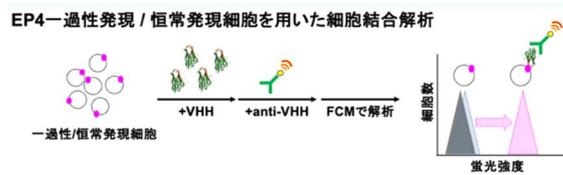
EP4-ND 複合体をベイトとする VHH スクリーニング

前述の図 (項目 3 の実験) に示したように、再構成後に精製した EP4 ナノディスク複合体を EP4 末端のタグを利用して磁気ビーズに結合させ、これをベイトとして cDNA-VHH 結合体のライブラリーのなかから EP4 ナノディスク複合体に結合する分子種を 3 回のサイクルで選抜した。中にはナノディスク自体に結合する候補も含まれるため、EP4 と結合していないナノディスクに結合する候補は除外している。

EP4 特異 VHH 抗体の細胞結合試験

EP4 に結合する候補 VHH ライブラリーから細胞表面領域に結合する分子種をさらに選抜するために以下のステップで実験を遂行した。

- EP4(wt)を発現する昆虫培養細胞 ExpiSf9(EP4-ExpiSf9 細胞)に対し、取得 192 クローンの VHH と蛍光標識結合二次抗体を反応させ、フローサイトメトリー (FCM) で結合解析を行った。

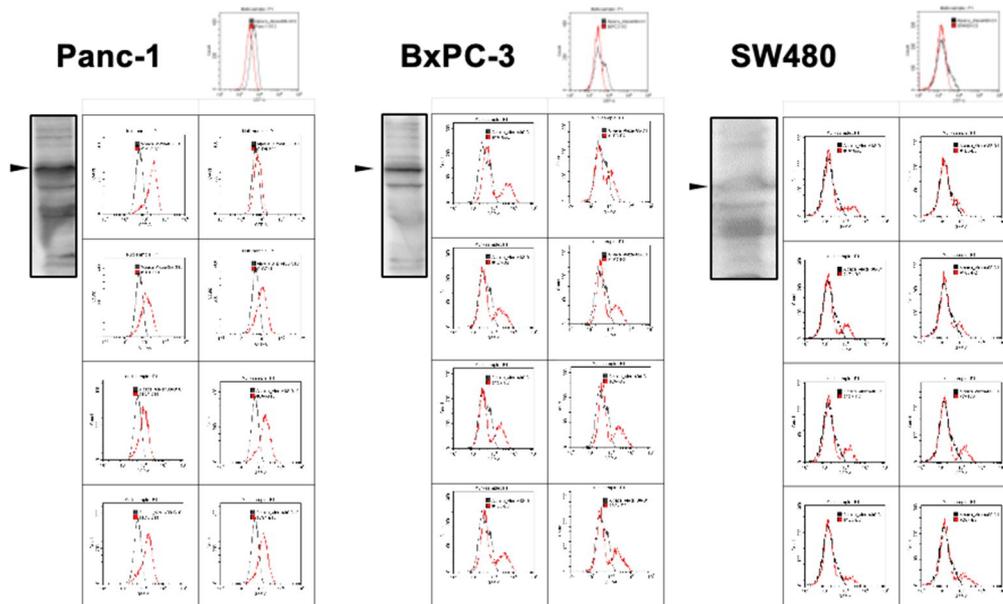


- EP4-ExpiSf9 細胞に結合が確認された VHH を、対照となる ExpiSf9 細胞と反応させ、結合しなかったクローンを EP4 結合 VHH 候補としてシーケンス解析を実施した。
- 取得したシングルクローンを再度培養し、発現させた VHH をアフィニティカラム精製し、EP4 が恒常発現しているがん細胞に対する結合解析を行った。

その結果、FCM を用いて EP4-ExpiSf9 細胞結合解析を行い、192 クローンから結合する 48 クローンを選抜できた。この 48 クローンから ExpiSf9 細胞非結合クローンを 14 選抜し、シーケンス解析を行いユニーククローンの VHH を 8 つ取得した。

EP4 特異 VHH 抗体の癌細胞結合試験

ウェスタンブロットで EP4 発現がん細胞を精製した VHH を、すい臓がん細胞 (Panc-1, BxPC3 細胞) および大腸がん細胞 (SW480) を用いて FCM による結合解析を行った。取得した 8 つの VHH を各がん細胞との結合確認を行ったところ、すい臓がん細胞に対して良好な結合が確認できた。大腸がん細胞にも結合する VHH が含まれていることも確認できた。本研究で取得した VHH 抗体は大腸がんよりもすい臓がんに対する創薬候補として期待できる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato M, Hariyama M, Komiya M, Suzuki K, Tozawa Y, Yamamoto H, Hirano-Iwata A	4. 巻 122
2. 論文標題 Model-free idealization: Adaptive integrated approach for idealization of ion-channel currents	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biophys J.	6. 最初と最後の頁 3959-3975
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bpj.2023.08.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木香絵、熊地重文、佐藤ももこ、高荷幸恵、戸澤譲
2. 発表標題 プロスタグランジンE2受容体の特異的に認識するVHH抗体のスクリーニングおよび機能解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Yuzuru Tozawa
2. 発表標題 Studies on industrially important proteins based in vitro translation
3. 学会等名 The 1st "Genomic Big Bang-Evolution, Biodiversity, and Sustainable Bio-Innovation."（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年～2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------