

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：23659157

研究課題名（和文）ナノ磁性微粒子と新規 FLAG 抗体を用いた新規 GPCR 結合因子の同定

研究課題名（英文）Identification of GPCR binding proteins by using a novel anti-FLAG antibody and magnetic nanobeads

研究代表者

横溝 岳彦 (YOKOMIZO TAKEHIKO)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：60302840

研究成果の概要（和文）：高感度・低バックグラウンドの高親和性抗 FLAG 抗体 2H8 の樹立を行い、本抗体と磁気ビーズを組み合わせた新規 G タンパク質共役型受容体 (GPCR) 免疫沈降法を開発した。本法を用いることで、これまで免疫沈降が困難であった GPCR の免疫沈降が可能になったのみならず、これまで不可能であった GPCR タンパク質の可視化にも成功した。本法を用いることで、新規 GPCR 結合タンパク質候補を複数同定した。

研究成果の概要（英文）：I established a novel anti-FLAG monoclonal antibody (2H8) with high-affinity and a low background. Combination of 2H8 antibody with a magnetic nanobeads enabled us to immunoprecipitate FLAG-tagged G-protein coupled receptors (GPCRs). Immunoprecipitated GPCRs were detectable by silver staining after separation by SDS-Page. I am analyzing some putative GPCR-binding proteins isolated by this novel immunoprecipitation techniques.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：GPCR、免疫沈降、結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は、ヒトゲノム中に約 1,000 種類もの遺伝子が存在する最大のタンパク質ファミリーである。GPCR は主として三量体 G タンパク質の活性化を介してシグナルを伝達するが、近年、三量体 G タンパク質以外のタンパク質に直接結合し、細胞内シグナルを伝達することが分かってきた。GPCR に対する高親和性の抗体の樹立は一般的に困難で、免疫沈降することも容易ではない。そのため、GPCR と結合するタンパク質の同定は困難である。

2. 研究の目的

申請者が樹立した高親和性 FLAG 単クローン抗体 2H8 と、ナノ磁性微粒子を用いた高効率免疫沈降法を用いて、複数の G タンパク質共役型受容体に結合する新規タンパク質の同定を行う。同定したタンパク質については、三量体 G タンパク質の活性化、他のシグナル伝達系路とのクロストーク、受容体の細胞内での挙動、受容体のユビキチン化に与える影響を検討し、G タンパク質共役型受容体の研究に新しい視点を加える。

3. 研究の方法

アミノ末端に FLAG 配列を付加した「糖鎖

付加フリー」GPCR を安定過剰発現させた HEK 細胞・CHO 細胞を材料に、我々が樹立した高親和性抗 FLAG 単クローン抗体 (2H8) を共有結合したナノ磁性微粒子を用いて GPCR をアフィニティ精製する方法を樹立する。ナノ磁性微粒子への抗体の結合法、洗浄法、GPCR の溶出法に関して緻密な検討を加える。実験系の評価には、FLAG 配列を用いたウェスタンブロット法と共に、CBB 染色・銀染色によるタンパク質染色を行い、夾雑物の少ない精製法を樹立する。質量分析機を用いて、リガンド刺激依存性・非依存性に GPCR に結合する新規タンパク質を同定する。

4. 研究成果

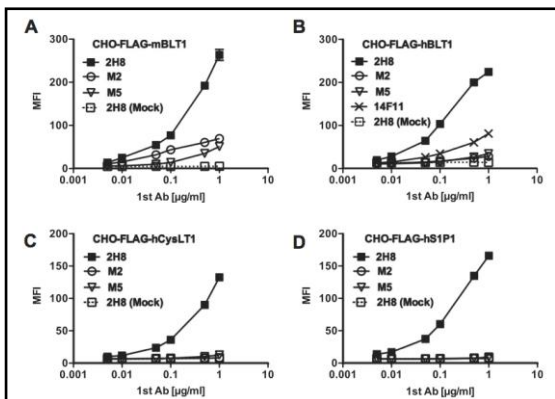
1) 高親和性抗 FLAG 抗体 2H8 の樹立

FLAG タグを付加したマウスロイコトリエン B4 第一受容体 (Flag-mBLT1) を安定発現する NIH-3T3 細胞を、Balb/c マウスの腹腔内に 10 回免疫し、経時的に血清を採取した。Flag-mBLT1 に対する抗体価の上昇を確認した後、マウス脾細胞を常法に従いミエローマ細胞 SP2 と融合し、HAT 培地で選択した。細胞をクローニングし、Flag-mBLT1 発現 L1/2 細胞を染色し、フローサイトメーターを用いてスクリーニングし、複数の抗 FLAG 抗体産生クローンを得た。その内、最も抗体力価が高かったクローン (2H8) を選び、その後の実験に供した。

2) 高親和性抗 FLAG 抗体 2H8 の評価

2H8 抗体産生クローンは、抗体の産生能力が高く、40 ml の培養上清から Protein A/G セファロースを用いることで、約 1 mg の精製抗体を得ることができた。本抗体と市販されている二つの抗 FLAG 抗体 (M2, M5) の比較を行った (図 1)。FLAG タグを付加したマウス BLT1 (A)、ヒト BLT1 (B)、ヒト CysLT1 (C)、ヒト S1P1 (D) のいずれの受容体に対しても、2H8 は他の二つの抗体よりも低い濃度で、FLAG を染色できたことから、2H8 は高感度の FLAG 抗体であることが分かった。

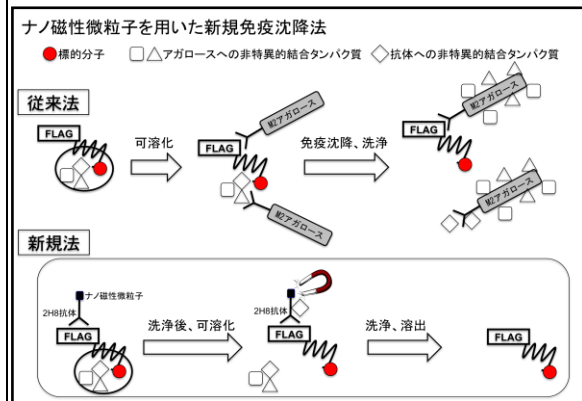
(図 1) 2H8 抗体の評価



3) 2H8 と磁器ビースを用いた高感度免疫沈降法の樹立

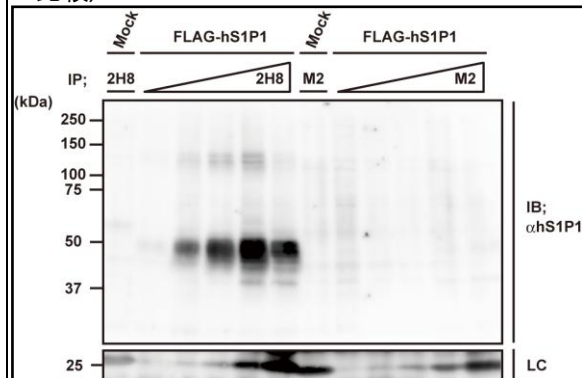
従来の GPCR 免疫沈降法 (図 2) では、抗体の抗原以外に、抗体のアーム部分や、アガロースビーズに対する非特異的なタンパク質の結合が問題であった。そこで、今回樹立した 2H8 抗体と、Dynabeads を用いた新規 GPCR 免疫沈降法を考案した。本法では、FLAG タグを付加した GPCR を細胞外から 2H8 で認識させ、結合しなかった抗体を洗浄したのち、抗マウス IgG ラベル dynabeads でキャプチャーすることで免疫沈降を行う事とした。

(図 2) 2H8 抗体と磁気ビーズを用いた新規免疫沈降法 (従来法との比較)



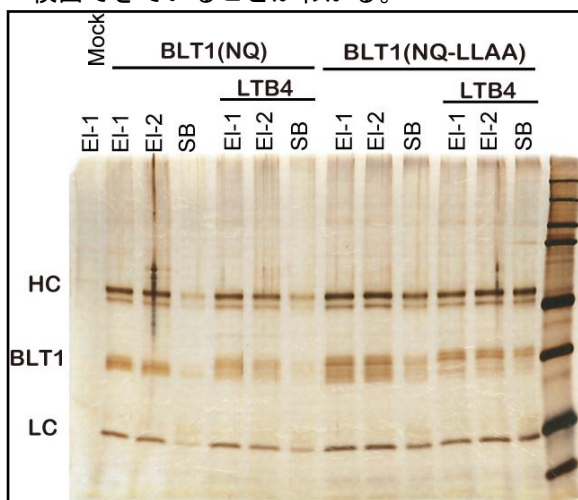
本法を用いることで、従来法では免疫沈降できなかった GPCR が効率よく免疫沈降できることを確認した。(図 3)

(図 3) 新規免疫沈降法の有効性 (従来法との比較)



さらに本法を用いた免疫沈降法では、従来法では検出できなかった GPCR タンパク質 (BLT1) を銀染色で確認することができた。

(図4) 新規免疫沈降法によるFLAG-BLT1のタンパク質の検出(銀染色):抗体の重鎖(HC)と軽鎖(LC)に加えて、FLAG-BLT1 タンパク質が検出できていることがわかる。



4) 高感度免疫沈降法を用いた新規 GPCR 結合因子の探索

今回開発した新規高感度 GPCR 免疫沈降法を用いて、複数の GPCR を対象に新規結合因子の探索を行った。具体的には、免疫沈降物を SDS-PAGE で展開後、目的とするタンパク質バンドを切り出し、トリプシン消化後に質量分析計で部分アミノ酸配列を決定した。現在、GPCR と同定したタンパク質の結合の特異性を検証しているところである。

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 3 件)

1. Sasaki F, Okuno T, Saeki K, Liu Min, Onohara N, Kato H, Shimizu T, Yokomizo T. A high-affinity monoclonal antibody against the FLAG tag useful for G-protein coupled receptor study. *Anal. Biochem.* 425, 157-165 (2012)
2. Aratake Y, Okuno T, Matsunobu T, Saeki K, Takayanagi R, Furuya S, Yokomizo T. Helix 8 of leukotriene B4 receptor 1 inhibits ligand-induced internalization. *FASEB J.*, 26, 4068-4078 (2012)
3. 佐々木文之, 横溝岳彦: クローズアップ実験法: 新規抗 FLAG 抗体 2H8 の活用法, 実験医学, 30, 2987-2992 (2012)

[学会発表] (計 11 件)

1. Yokomizo T. Generation of a high-affinity anti-FLAG monoclonal antibody 2H8. 5th

Annual International Congress of Antibodies, 2013 年 3 月 18-20 日, Hangzhou, China

2. Sasaki F, Yokomizo T. A high-affinity monoclonal antibody against the FLAG tag useful for G-protein coupled receptor study. 5th Annual International Congress of Antibodies, 2013 年 3 月 18-20 日, Hangzhou, China
3. 奥野利明, 荒武良総, 横溝岳彦 G タンパク質シグナルと受容体内在化を制御する GPCR ヘリックス 8 の役割. 第 85 回日本生化学会大会シンポジウム G タンパク質シグナルの最前線, 2012 年 12 月 14-16 日, 福岡
4. Yokomizo T. Generation of a novel anti-FLAG monoclonal antibody. The 7th Korea-Japan Conference on Cellular Signaling for Young Scientists, 2012 年 2 月 17-18 日, Ulsan, Korea
5. Aratake Y, Okuno T, Yokomizo T. Molecular mechanism of internalization of G-protein-coupled receptors (GPCRs). Keystone Symposium, 2012 年 2 月 17-22 日, Banff, Canada
6. 横溝岳彦 生理活性脂質受容体の同定と生体内機能の解析・高親和性 FLAG 抗体の樹立と応用. 第 2 回九州エリア薬理・生理学若手研究会, 2011 年 12 月 26 日, 福岡
7. Morisaki Y, Sasaki F, Aratake Y, Okuno T, Saeki K., Yokomizo T. Improved immunoprecipitation method for epitope-tagged GPCRs. The 10th JBS Biofrontier Symposium : New aspects of phospholipid biology and medicine, 2011 年 11 月 14-16 日, Fukuoka
8. 佐々木文之, 奥野利明, 佐伯和子, 横溝岳彦 GPCR の免疫沈降に有用な新規抗 FLAG 抗体の樹立と本抗体を用いた新規 GPCR 結合タンパク質の探索. 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 21-24 日, 京都
9. 森崎雄一, 佐々木文之, 荒武良総, 奥野利明, 佐伯和子, 横溝岳彦 Improved immunoprecipitation method for epitope-tagged GPCRs. 第 84 回日本生

学会大会, 2011 年 9 月 21-24 日, 京都

10. 荒武良総, 奥野利明, 横溝岳彦 Helix 8 of the leukotriene B4 receptor type 1 inhibits ligand-induced internalization. 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 21-24 日, 京都
11. 堀哲哉, 菅原光明, 中村元直, 横溝岳彦, 清水孝雄, 宮野雅司 結晶化のためのロイコトリエン B4 受容体(BLT1)の熱安定化と抗 BLT1 モノクローナル抗体の作製. 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 21-24 日, 京都

[その他]

ホームページ等

新規 FLAG 抗体 2H8 の紹介

http://plaza.umin.ac.jp/j_bio/Biochem1/2H8_Ab.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横溝 岳彦 (YOKOMIZO TAKEHIKO)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号 : 60302840