

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：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23770133

研究課題名（和文） 構造安定化と抗体との複合体化によるロイコトリエンB₄受容体の結晶化研究課題名（英文） Crystallization of stabilized leukotriene B₄ receptor mutant and monoclonal antibody complex.

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・専任研究員

研究者番号：20344054

研究成果の概要（和文）：

ロイコトリエン B₄受容体 (BLT1) の結晶構造解析を目標に、BLT1 の安定化変異体を構築し、立体構造認識型抗 BLT1 モノクローナル抗体を作製した。合理的設計により計画した2残基変異により、熱安定性が5°C向上し、発現量が6倍向上した (B_{max}=311 pmol/mg)。SDS変性 BLT1 は認識しないが非変性 BLT1 には結合するモノクローナル抗体を作製した。現在結晶化を進めている。

研究成果の概要（英文）：

For the crystallization of leukotriene B₄ receptor (BLT1), the stabilized mutant was constructed and the anti-BLT1 monoclonal antibody which recognized three-dimensional structure of BLT1 was generated. The rationally designed two point mutations were improved the thermal-stability by 5 °C and the expression level of active form BLT1 by 6 times (B_{max}=311 pmol/mg). The antibody which bound the none-denatured BLT1 but did not recognize the SDS-denatured BLT1 was generated. The crystallization of BLT1-Fab complex has been promoted.

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	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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受容体、G-タンパク質共役型受容体、メタノール資化酵母、安定化変異体、モノクローナル抗体、大量発現、精製、結晶化

1. 研究開始当初の背景

(1) ロイコトリエン B₄ 受容体について

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。

(2) 研究開始時の進捗状況

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メタノール資化酵母 (*Pichia pastoris*) による BLT1 の大量発現 (Hori 2010)。

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、³H-LTB₄ 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 Western blot での発現量はヒトやモルモット BLT1 と同程度であったが、³H-LTB₄ 結合活性は無かった。Scatchard plot 測定実験の結果、³H-LTB₄ に対する結合パラメーターはモルモット BLT1 は $K_d = 5.8 \pm 0.27$ nM, $B_{max} = 11.2 \pm 0.29$ pmol/mg, ヒト BLT1 は $K_d = 24.0 \pm 2.39$ nM, $B_{max} = 25.2 \pm 2.00$ 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。モルモット BLT1 の大量調製研究を進めることにした。

②翻訳後修飾の解析 (Hori 2010)

モルモット BLT1 の Asn4 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 への変異体解析により、*P. pastoris* で発現した場合は Asn4 にのみ糖鎖が付加することを明らかにした。

精製 BLT1 のトリプシン消化ペプチドの質量分析の結果、Ser309 が部分的にリン酸化されていることが明らかになった。

③翻訳後修飾を受けない BLT1 の迅速な調製法確立 (Hori 2010)

糖鎖付加、リン酸化修飾を受けない BLT1 変異体を構築した。N 末 1-14 番を除去し、Ser309Ala 変異を導入した変異体 dN15/Ser309Ala を *P. pastoris* で発現した結果、³H-LTB₄ 親和性は $K_d = 7.6 \pm 0.67$ nM, $B_{max} = 57.5 \pm 3.0$ pmol/mg であった。1L 培養スケールから 0.3mg の精製 BLT1 を調製できるようになった。

(3) 他の研究者の状況について

2000 年にウシロドプシン、2007 年にヒト β_2 アドレナリン受容体の結晶構造が報告されて以来、2011 年までに 7 つの GPCR の構造が報告されていた。ロドプシン以外は、安定化変異体または T4 リゾチーム融合体として、またはモノクローナル抗体との複合体として結晶化を行っていた。

2. 研究の目的

他の GPCR の結晶化の成功例から、本申請研究では安定化 BLT1 変異体の構築と、立体

構造を認識するモノクローナル抗体を作製することにした。

3. 研究の方法

(1) 安定化変異体構築

①立体構造モデリングとアミノ酸保存性を考慮した、知識ベース手法による変異体計画

ウシロドプシンや $\beta 2$ 受容体を基にした BLT1 モデリング構造を構築し、立体構造を安定化するための置換対象残基を考察した。ヘリックスキャッピング部位で立体構造を不安定化させている要因 2 か所 (His83, Lys88)、立体構造を安定化する可能性がある水素結合の導入 2 か所 (Ala56, Leu109) を対象残基として候補に挙げた。

前者 2 残基は、28 生物種の BLT1 のうち、それぞれ 23 種、22 種で当該残基はキャッピング部位として最も好ましい Gly であった。His や Lys はヘリックス末端の水和の阻害とヘリックス極性モーメントとの反発のために、構造を不安定化する。いずれも Gly への置換はリガンド結合能に影響することなく立体構造を安定化すると考えた (His83Gly, Lys88Gly)。

また、後者 2 残基のうち Leu109 について、274 種のヒト GPCR のうち、Leu109 に相当する残基は 139 種で親水性残基であり、いずれも膜貫通ヘリックス束内部で水素結合を形成していた。44 種で Ser、40 種で Thr であったので、両置換体を作製することにした

(Leu109Ser または Leu109Thr)。また、Ala56 に関して、立体構造既知 GPCR では当該アミノ酸はいずれも親水性アミノ酸であり、ヘリックス 2 の N キャッピング側鎖と水素結合を形成していた。274 種のヒト GPCR のうち、BLT1 を含む 198 種でヘリックス I と II の間のループ領域のアミノ酸残基数が同じであるが、うち 174 種で当該残基は親水性アミノ

酸、さらに 102 種で Asn であった。したがって、Asn への置換により GPCR で保存されている水素結合が導入でき、安定性が向上すると期待した (Ala56Asn)。

②共通配列法による変異体計画

他生物種の BLT1 では高度に保存されているが、モルモット由来 BLT1 では別のアミノ酸である場合、保存されているアミノ酸に置換することにより安定性が向上すると考えた (共通配列法)。24 か所の置換を計画した。

(2) 立体構造認識型モノクローナル抗体の構築

本実験の一部は、理化学研究所放射光科学総合研究センター内の競争的資金により遂行した。当該資金により、精製 BLT1 のマウスへの免疫、ハイブリドーマ作製、株化の作業を株式会社免疫生物研究所に委託した。科研費のテマーマーとして、株化に移行するハイブリドーマ 20 種の選定と、株化作業における亜種の選定を行った。

株化に移行するハイブリドーマの選定には、プロテイン G アガロースを使用した免疫沈降法を利用した。非変性 BLT1 を認識するが、SDS 変性 BLT1 には結合しない抗体産生ハイブリドーマを選択した。

亜種の選択の際には、結合強度を選択の基準とした。ハイブリドーマ培養液中の抗体と精製 BLT1 を反応させ、ゲルろ過で解離しない亜種を選択した。

4. 研究成果

(1) 安定化変異体構築

①知識ベース手法による変異体計画

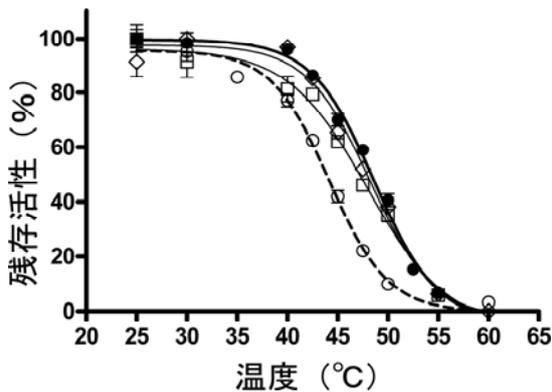
4 か所、5 種の置換計画について (Ala56Asn, His83Gly, Lys88Gly, Leu109Ser または Leu109Thr)、5 種の一残基置換と 18 種の多重置換を、dN15/Ser309Ala (Hori 2010) に導入

した。

初期実験として、10ml スケールで培養した膜画分を 25 °C または 40 °C で 30 分間処理した後、³H-LTB₄ 結合能の比を残存活性として定義した。dN15/Ser309Ala の残存活性は 45%、多重変異体 His83Gly/Lys88Gly、His83Gly/Lys88Gly/Leu109Ser、His83Gly/Lys88Gly/Leu109Thr はそれぞれ、78, 95, 93% であった。

dN15/Ser309Ala を含む上記 4 種の変異体について、大量調製時と同じ 1L スケールで培養し、熱安定性を再確認した。それぞれの膜画分を所定の温度で 30 分間処理した後、³H-LTB₄ 結合能の比を残存活性としてプロットした (図 1)。

(図 1) 安定化変異体の安定性



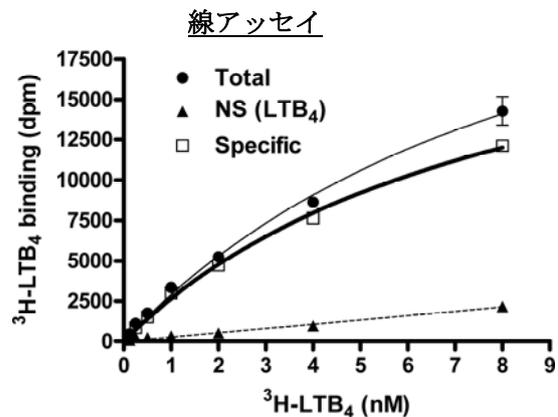
各温度での残存活性をプロットした。
His83Gly/Lys88Gly (●)、
His83Gly/Lys88Gly/Leu109Ser (□)、
His83Gly/Lys88Gly/Leu109Thr (◆) および
dN15/Ser309Ala (○)。

変性中点 T50 値は、His83Gly/Lys88Gly、His83Gly/Lys88Gly/Leu109Ser、His83Gly/Lys88Gly/Leu109Thr および dN15/Ser309Ala でそれぞれ、 48.6 ± 0.1 °C、 47.9 ± 0.04 °C、 48.0 ± 0.2 °C and 43.5 ± 0.5 °C であった。同じ実験を 2 回行い、T50 値の平均値で示した。2 残基変異体 His83Gly/Lys88Gly は、dN15/Ser309Ala よりも T50 値は 5°C 向上

した。

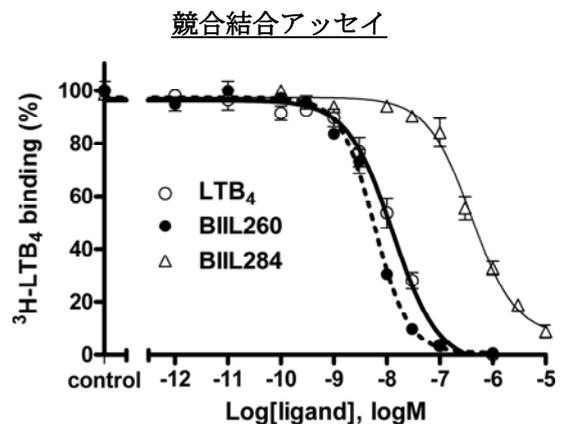
最も安定性が高かった His83Gly/Lys88Gly について、膜画分でのリガンド結合能を確認した。変異によるリガンド親和性への影響は無かった (図 2, 3)。飽和曲線アッセイの結果、 $K_d = 8.2$ nM、 $B_{max} = 311$ pmol/mg であった。変異導入により活性体発現量は 6 倍向上した (図 2)。アンタゴニストへの結合能にも影響が無かった (図 3)。

(図 2) His83Gly/Lys88Gly の飽和曲線アッセイ



反応液中の膜画分量は 0.4μg である。

(図 3) 膜画分 His83Gly/Lys88Gly の競合結合アッセイ

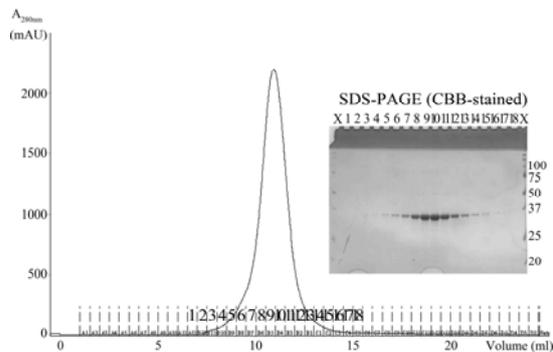


反応液中の膜画分量は 0.2μg である。

②精製 His83Gly/Lys88Gly の特性評価

His83Gly/Lys88Gly をドデシルマルトシドで可溶化後、コバルトキレートカラムとゲルろ過で精製した。1L の培養酵母から、1mg 以上の精製 BLT1 が単分散状態で調製できるようになった (図4)。

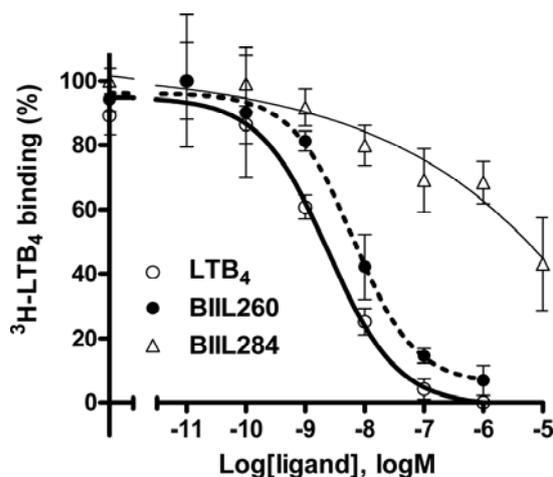
(図4) His83Gly/Lys88Gly のゲルろ過



Superose-12 カラムによる精製最終段階のクロマトチャートと SDS-PAGE を示した。

精製 His83Gly/Lys88Gly のリガンド結合能を確認した。競合結合アッセイでは、膜画分と同様な結果が得られた (図5)。

(図5) 精製 His83Gly/Lys88Gly の競合結合アッセイ



精製 His83Gly/Lys88Gly (25ng) を $^3\text{H-LTB}_4$ および cold リガンドと反応後、M2-FLAG 抗体アガロースに結合させることで遊離リガンドを除去した。

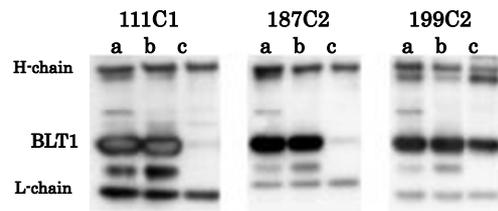
③共通配列法による変異体計画

共通配列法により計画した一残基変異体 24 種を COS-7 細胞で一過性発現し、膜画分の残存活性を評価した。安定性は向上しなかった (data not shown)。

(2) モノクローナル抗体の作製

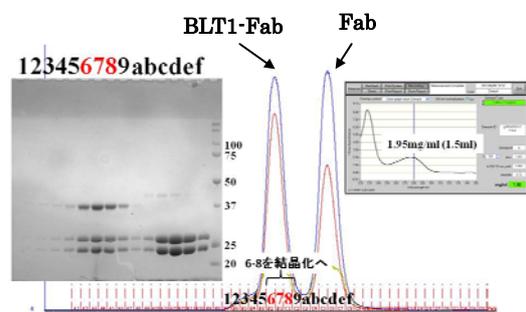
立体構造を認識するモノクローナル抗体を選択した。株化前の陽性ハイブリドーマ 200 ウェルの培養上清を使用した免疫実験により、非変性 BLT1 には結合するが、SDS 変性 BLT1 には結合しないハイブリドーマ 15 種を選択した (図 6 参照)。また、株化の過程で培養上清中の IgG と精製 BLT1 の結合能をゲルろ過で分析し、結合強度が十分な亜株を選択した (Data not shown)。

(図6) 免疫沈降法による選択。



a: BLT1-アゴニスト複合体。b: BLT1-アンタゴニスト複合体。c: SDS 変性 BLT1。

(図7) 熱安定化 BLT1 と抗 BLT1 モノクローナル抗体 Fab 断片との複合体の精製。



精製最終過程のゲルろ過の結果

187C2 株は立体構造を認識し、かつ

His83Gly/Lys88Gly 変異体との複合体形成後も単分散で精製できた (図 7)。

(3) His83Gly/Lys88Gly 変異体-Fab 複合体 (187C2 株) の結晶化

蒸気拡散法で複合体の結晶化を行った。母液に有機溶媒または低分子 PEG が存在する条件では、低分子が析出した。また、キュービックフェーズ法で結晶化を行った。針状微結晶が得られ、Spring-8 の BL32XU でデータ収集を行った。構造解析の結果、複合体が解離し Fab 断片のみが結晶化していたことが明らかになった。

(参考文献)

Hori T. et al. *Protein Exp. Puri.* 72, 66-74 (2010)

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 2 件)

(国内外ポスター発表)

①タイトル: **Thermostabilization and generation of monoclonal antibody to leukotriene B₄ receptor (BLT1) for crystallization,**

氏名: **Hori T.**, Sugahara M., Nakamura M., Yokomizo T., Shimizu T., and Miyano M.

会議名: GPCR Workshop 2011、マウイ (2011年12月5日)

②タイトル: **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**

氏名: **堀 哲哉**、菅原光明、中村元直、横溝岳彦、清水孝雄、宮野雅司

会議名: 第84回日本生化学会大会(BMB2011)、京都 (2011年9月22日)

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・専任研究員

研究者番号: 20344054