

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293068

研究課題名(和文) ヒトアンジオテンシン受容体の構造情報に基づく血圧調節機構の理解から創薬へ

研究課題名(英文) Crystallization of Angiotensin receptor type 2 with its specific antibody

研究代表者

浅田 秀基 (Asada, Hidetsugu)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20399041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：血圧の調節はアンジオテンシン受容体というGタンパク質共役受容体により行われており、昇圧を担う1型と降圧を担う2型(AT2R)が存在する。特にAT2Rは血圧調節以外に血管保護作用においても重要な役割を担っている。

我々は生理的に重要な機能を果たすAT2Rの立体構造から血圧調節機構の解明を目指した。AT2R単独では結晶化が困難であったが、AT2Rを特異的に認識する抗体と複合体を形成させることで結晶化に成功した。さらにSPring-8のマイクロフォーカスビームラインであるBL32XUにより構造解析に必要なデータを収集することに成功した。現在、このデータを用いて構造決定を行っているところである。

研究成果の概要(英文)：Angiotensin II receptor type2 (AT2R) play an important role for regulating blood pressure. Recent studies strongly suggest that AT2R not only mediates blood pressure control but also plays an important role in cardiovascular protection such as anti cardiac hypertrophy. To solve AT2R structure is important for understanding of the molecular mechanism of blood pressure control and developing of drug against cardiac hypertrophy.

In this study, our aim is to solve the AT2R structure. We developed AT2R structure specific recognition antibodies to crystallize of AT2R. And we screened more stable AT2R mutant. In the result of this study, complex of AT2R mutant and its specific Fab is crystallized by lipidic cubic phase method successfully. The data of these crystals were collected by micro focus beam line, BL32XU (SPring-8). We have been trying to determine the AT2R structure.

研究分野：構造生物学

キーワード：Gタンパク質共役受容体 X線結晶構造解析 膜蛋白質

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初から現在に至るまで G タンパク質共役受容体 (GPCR) の構造解析は極めて難しい標的分子である。研究開始年度以前に構造が明らかにされた GPCR はわずか9種類のみであった。これは Protein Data Bank に登録されている全タンパク質の 1% 以下である。このことから考えても GPCR の構造解析は非常に難しい研究分野であることが分かる。GPCR の構造解析が困難である要因は、①GPCR そのものの安定性が低く容易に精製できない、②GPCR のほとんどが疎水性領域で構成されており結晶化がしにくいことが考えられていた。GPCR の構造を解く為にこれらの構造解析を困難にしている要因を克服する技術開発が期待されていた。

2. 研究の目的

本研究課題採択以前から GPCR であるアンジオテンシン II 2 型受容体 (AT2R) の構造解析を目的とした研究を遂行して来た。その結果、安定変異体の作製および昆虫細胞を用いた大量発現系の確立に成功していた。そこで本研究課題では AT2R の立体構造を特異的に認識する抗体の取得およびその抗体を用いた AT2R の結晶化を行い、その結晶から構造決定することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題を遂行する為に行った方法を以下に示す。AT2R の安定化変異体は昆虫細胞を用いた大量発現系により生産させ、これを抗体作製用の免疫源とする為に精製した。抗体作製用の抗原として精製された AT2R は EGG-PC によるリポソームに再構築された。この抗原を AT2R ノックアウトマウスへ免疫(計3回)し、脾臓細胞とミエロマを細胞融合させることで AT2R を特異的に認識する抗体を生産するハイブリドーマを作製した。これらのハイブリドーマが生産する抗体の中から AT2R の立体構造を認識するもののみをスクリーニングすることで AT2R の構造認識抗体を取得した。さらに精製した AT2R は取得した抗体と複合体を形成させた後、キュービック液晶法により共結晶化した。得られた結晶は SPring-8 のマイクロフォーカスビームである BL32XU を用いて回折実験を行い、データ収集および構造解析を行った。また、共結晶化に成功した AT2R 特異的構造認識抗体は単独で蒸気拡散法による結晶化を行った。得られた結晶は放射光科学研究施設 (高エネルギー加速器研究機構) の BL-1A により回折実験を行い、その構造を決定した。

4. 研究成果

AT2R の立体構造を特異的に認識する抗体を取得した。具体的には、精製した AT2R をリポソームに再構成したものを免疫原とし、AT2R ノックアウトマウスに1回あたり 50 µg/mouse (初回は 100 µg) のリポソーム化

AT2R を隔週、計3回マウスの腹腔へ接種した。最終免疫から3日後に脾臓を摘出し、脾細胞とミエロマを細胞融合させることでハイブリドーマを作製した。これらのハイブリドーマから目的の構造認識抗体をスクリーニングする為に、リポソーム ELIZA 法、Dot plot 法、FSEC 法、FACS 法によるスクリーニングを行なった。その結果、13種類の AT2R の立体構造を特異的に認識する抗体が得られた。これらの抗体はパピイン処理することで結晶化用に Fab 化を行い、安定化 AT2R 変異体との複合体を形成させた。この複合体をキュービック液晶法による共結晶化を行なった結果、得られた Fab のうち1種類から初期の結晶を得ることに成功した。得られた初期結晶を SPring-8 のマイクロフォーカスビームである BL32XU にて回折実験を行った結果、最大回折点が約 5Å であった。この結晶から得られるデータから構造解析を行うことはデータの量および質からも不可能であった。そこで共結晶化の最適化条件の検討およびデータ測定法の改善をさらに進めた。その結果、最大分解能が 3.03 Å まで向上し、得られたデータのうち解析可能なものを merge することにより 3.2 Å でデータセットの取得を完了することができた (図1)。これらの最適

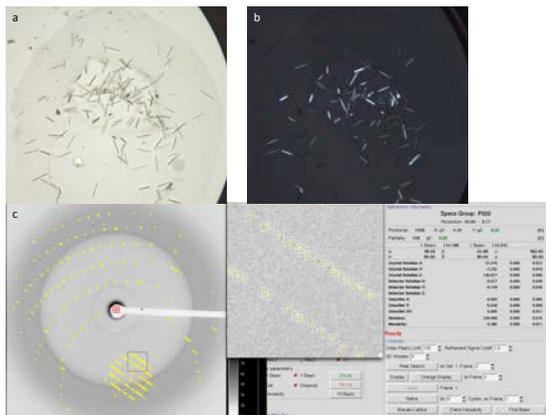


図1 AT2RとFabの共結晶 (a, b) およびその回折実験結果 (c) キュービック液晶法により得られた結晶 (a) とその偏光像 (b)、この結晶を用いた回折実験の結果、最大3.03Åの回折点が得られた。また、このデータを処理することで3.2Åのデータセットが取得できた。

化された結晶は SPring-8 のマイクロフォーカスビームである BL32XU でデータ測定を行い、このデータセットを用いて分子置換法により構造解析を行った。構造解析は、これまで

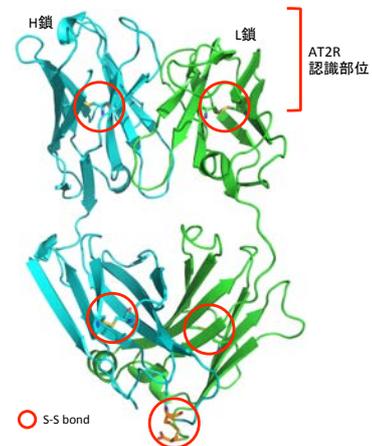


図2 AT2Rの立体構造を特異的に認識するFabの構造

る Fab 単独の構造を決定し、それをモデルに分子置換することにした。Fab は蒸気拡散法により結晶化を行い、さらに得られた結晶から Seeding 法による結晶の質の向上を行った。この結晶を用いて Photon Factory (高エネルギー加速器研究機構) の BL-1A ビームラインで回折実験を行った。その結果、1.7Å の分解能でデータセットを取得でき、このデータから構造決定を行った (図 2)。この Fab の構造を分子置換のモデルとして利用した結果、全体構造を得ることに成功した (図 3)。また、得られた結晶の空間群は P2₁2₁2、格子定数は a = 49.03 Å, b = 56.07 Å, c = 467.39 Å であった。

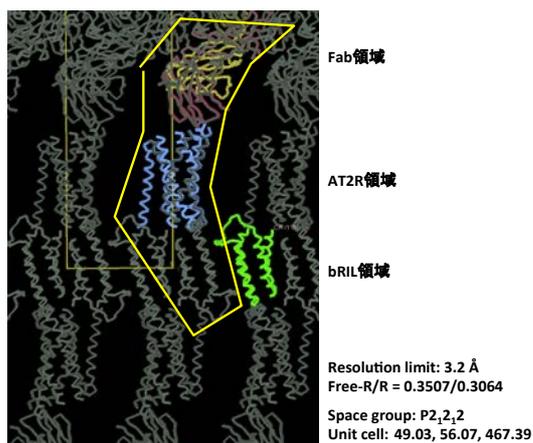


図3 AT2RとFabの全体構造

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)

1. Shiroishi, M and Kobayashi T. 2015. Screening of stable G-protein-coupled receptor variants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol.* 1261, 159-170 (査読有り)
2. Suharni, Y. Nomura, T. Arakawa, T. Hino, H. Abe, Y. Nakada-Nakura, Y. Sato, H. Iwanari, M. Shiroishi, H. Asada, T. Shimamura, T. Murata, T. Kobayashi, T. Hamakubo, S. Iwata, and N. Nomura. 2014. Proteoliposome-based selection of a recombinant antibody fragment against the human M2 muscarinic acetylcholine receptor. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* 33: 378-385. (査読有り)

3. Kuroki K, Hirose K, Okabe Y, Fukunaga Y, Takahashi A, Shiroishi M, Kajikawa M, Tabata S, Nakamura S, Takai T, Koyanagi S, Ohdo S, Maenaka K. 2013. The long-term immunosuppressive effects of disulfide-linked HLA-G dimer in mice with collagen-induced arthritis. *Hum Immunol.* 74, 433-438 (査読有り)
4. G タンパク質共役型受容体の構造解析に向けた戦略 ~ヒスタミン H1 受容体を例に~, 白石充典, *YAKUGAKU ZASSHI*, 2013 133(5), 539-547

[学会発表] (計 2 件)

1. 第 11 回 GPCR 研究会、アンジオテンシンタイプ 2 受容体とその特異的抗体を用いた共結晶化、浅田秀基、白石充典、岩成宏子、植村智子、辻本浩一、新井修、島村達郎、稲上正、浜窪隆雄、小林拓也、岩田想、日本科学未来館 (東京、2014 年 5 月 9~10)
2. GPCR workshop 2013, Crystallization of Angiotensin receptor type 2 with its specific antibody, Hidetsugu Asada, Tomoko Uemura, Mitsunori Shiroishi, Tatsuro Shimamura, Hirokazu Tsujimoto, Hiroko Iwanari, Osamu Kusano-Arai, Takao Hamakubo, Tadashi Inagami, So Iwata and Takuya Kobayashi, Hyatt Regency Maui Resort & Spa, Hawaii (USA, 2013 年 12 月 1-5 日)

[図書] (計 2 件)

1. Suno, R., H. Asada and T. Kobayashi, Muscarinic Receptor: From Structure to Animal Models, *Neuromethods*, vol. 107, J. Myslivecek and J. Jakubik

(eds.), Towards the Crystal Structure Determination of Muscarinic Acetylcholine Receptors, p1-13 (chapter 1), 2015, DOI 10.1007/978-1-4939-2858-3_1, Springer (Humana Press)

2. 膜タンパク質構造研究、Part2 膜タンパク質構造研究のための技術《膜タンパク質の発現と精製》、第11章 昆虫細胞による生産、浅田秀基、小林拓也、p96-102、2013年10月、株式会社化学同仁

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅田秀基 (Asada Hidetsugu)
京都大学・大学院医学研究科・特定助教
研究者番号：20399041

(2) 研究分担者

白石充典 (Shiroishi Mitsunori)
九州大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：00380527

(3) 連携研究者

()

研究者番号：