様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ５ 月 ２８ 日現在

機関番号：１５３０１
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2013～2014
課題番号：２５８９１０１７

研究課題名（和文）味覚受容体T1Rに作用する機能性抗体の作製とその機能発現メカニズムの精密解析

研究課題名（英文）Generation and characterization of monoclonal antibodies against the extracellular regions of taste receptors

研究代表者
安井　典久（Yasui, Norihisa）

岡山大学・医歯（薬）学総合研究科・助教

研究者番号：９０４６７５１４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では，味覚認知を担う味覚受容体タンパク質の動作メカニズムの解明を見据えて，味覚受容体に対する機能性抗体の作製と，それらの性状解析行うことを目的とした。味覚受容体の細胞外領域断片を抗原として得たマウスモノクローナル抗体より，高品質で高純度なFab断片を調製する方法を確立した。また，調製したFab断片は，味覚受容体の細胞外領域断片に高い親和性で結合することを，物理化学的手法を用いて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The sense of tastes by human and other animals depends on the recognition of tastant molecules by taste receptor proteins. In this project, we generated and characterized monoclonal antibodies against the extracellular regions of taste receptors. We have established the method to prepare the high-quality Fab fragments from IgGs and analyzed their interaction with recombinant proteins of the extracellular regions of taste receptors by using biochemical/biophysical techniques. We confirmed that the Fab fragments prepared here had the ability to bind the extracellular regions of taste receptors with high affinity.

研究分野：タンパク質化学，タンパク質工学

キーワード：抗体　味覚受容体　Fab断片　GPCR　相互作用

１．研究開始当初の背景

味覚の受容と認知は，味細胞上の膜受容体が味物質を認識することで開始される。ヒトが感知する５種類の味のうち，甘味とうま味を認知する膜受容体は，taste receptor type 1 (T1R)ファミリーに属する３種類のタンパク質（T1R1，T1R2 および T1R3）である。これら３種類のうちの２種類がヘテロ二量体を形成して機能し，T1R1/T1R3 ヘテロ二量体がうま味物質の受容を，T1R2/T1R3 ヘテロ二量体が甘味物質の受容を，それぞれ担っていることが知られている。これら T1R ファミリータンパク質による味物質の認識に関する知見は，細胞やマウスを用いた研究によって得られた例がほとんどで，細胞膜上に存在する T1R タンパク質による味物質の認識と，それに引き続く細胞への情報伝達の構造化学的基盤はほとんど明らかにされていない。

T1R の構造化学的研究が立ち遅れている大きな理由として，T1R ファミリータンパク質を物質として取り扱うことが困難であることがあげられる。事実，T1R は G タンパク質共役型受容体(GPCR)で，７回膜貫通タンパク質であることから，精製サンプルの調製が極めて困難である。味物質の認識部位を有するリガンド結合ドメインとシステインリッチドメインとから構成される N 末端の細胞外領域に限っても，この領域は，S-S 結合や糖鎖の付加など多数の翻訳後修飾を受けることから，組換えタンパク質の作製とその精製にも様々な工夫が必要となる。また，上述の通り，T1R ファミリータンパク質の機能単位がヘテロ二量体であることが，精製サンプルの調製とそれを用いた分子機能の解析をさらに困難にしている。精製サンプルの調製が難しいことに加えて，抗体をはじめとする T1R の分子機能の解析に有用な分子ツールが，ほとんど開発されていないことも，T1R ファミリータンパク質の機能発現の構造化学的基盤の解明が進まない原因である。

２．研究の目的

本研究では，味物質結合部位が存在し，細胞上の T1R 分子を標的とした場合でも抗体がアクセス可能な細胞外領域に着目した（図1)。この領域の味物質結合活性を有する高品質な組換えタンパク質を抗原として用い，T1R に対するモノクローナル抗体を作製することを目的とした。

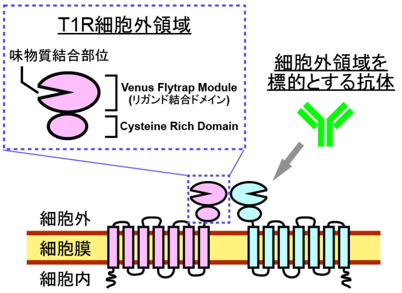

図 1. 味覚受容体 T1R ファミリーの模式図

３．研究の方法

本研究では，機能性抗体を作製することにとどまらず，抗体の諸性質や T1R の分子機能に対する影響を，物理化学的手法を用いて詳細に解析することを重要視した。そのために，以下にあげる実験項目を実施した。

(1)Fab 断片および T1R 細胞外領域断片の調製

所属研究室において，味覚受容体の細胞外領域に対する５種類のモノクローナル抗体が取得されていた。いずれの抗体も IgG のクラスである。IgG は，分子量が大きいことや二価であることからから，本研究の主目的である抗原との相互作用の物理化学的手法による解析には，不向きである。そこで，はじめに，IgG から Fab 断片を高い純度で精製する方法を確立した。具体的には，IgG のパパインによる限定分解と，Protein-A 固定化ビーズを用いた Fc 断片の除去により，Fab 断片を粗精製した。その後，より高純度で高品質な Fab 断片を得るために，陽イオン交換クロマトグラフィーを用いた。

一方，味覚受容体の細胞外領域に由来する断片を，昆虫培養細胞で安定発現させ，その培養上清から，アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。

(2)Fab 断片と味覚受容体細胞外領域断片の相互作用の解析

上述(1)において調製した Fab 断片と味覚受容体細胞外領域断片の相互作用を，ゲルろ過クロマトグラフィーにより解析した。

４．研究成果

(1)Fab 断片の調製法の確立

IgG を，パパインを用いて Fab 断片と Fc 断片とに限定分解した。Protein-A 固定化ビーズを用いて，Fc 断片を除去し，Fab 断片を粗精製した。常法である Protein-A 固定化ビーズを用いた精製ステップに加えて，Fab 断片を，酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)を溶離液とする陽イオン交換クロマトグラフィーに供した。0−300 mM の塩化ナトリウムのグラジエントにより，Fab 断片を溶出したところ，主ピークに加え，副ピークを確認した（図 2)。主ピークを回収することにより，純度と均一性を向上させたサンプルを調製することができた。得られたゲルろ過クロマトグラフィーを用いて，Fab 断片の溶液挙動を評価し，良好な単分散状態であることを確認した。取得していた５種類の IgG すべてについて，本調製法で，Fab 断片を精製することができた。

(2)Fab 断片と T1R 細胞外断片の相互作用解析

昆虫培養細胞の培養上清より精製した T1R 細胞外領域断は，ゲルろ過クロマトグラフィーにおいて，単一のピークを与える。そこで，先に調製した Fab 断片と，T1R 細胞外領域断片との相互作用を，ゲルろ過クロマトグラフ

ィーを用いて解析した。

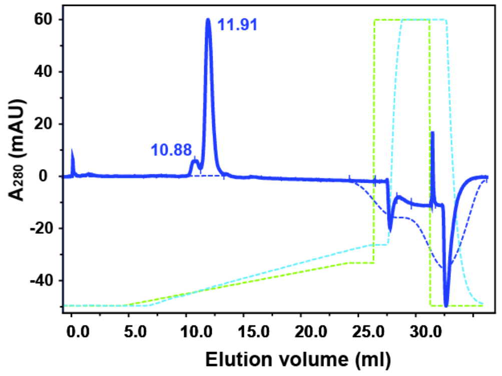

図 2. 抗 T1R 抗体に由来する Fab 断片のイオン交換クロマトグラフィーを用いた精製

５種類の Fab 断片は，T1R 細胞外領域断片と安定な複合体を形成することを確認した(図 3)。数μM 以下の濃度においても，安定な複合体を形成することから，すべての Fab は，T1R 細胞外領域に対し，高い親和性で結合することが予想された。Fab 断片と T1R 細胞外領域断片のモル比を変えて複合体形成を調べた結果，Fab 断片と T1R 細胞外領域断片は，期待通り，１：１のモル比で結合することが分かった。また，複合体の形成を，T1R のリガンド存在下および非存在下の両条件で調べたところ，リガンドの有無に関わらず，安定な複合体を形成することがわかった。

５種類の Fab 断片のエピトープ領域について，それらの重複の有無を検討するために，同時に複数種類の Fab 断片を，T1R 細胞外領域断片と混合し，ゲルろ過クロマトグラフィーにより解析した。その結果，５種類の Fab のうちの４種類で，エピトープが共通している可能性が考えられた。この得られたエピトープに関する情報は，T1R 抗体を様々な研究で利用する上で，有用である。

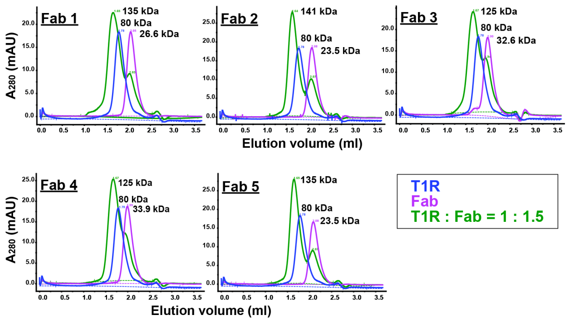

図 3. ゲルろ過クロマトグラフィーを用いた Fab と T1R 細胞外領域断片の相互作用の解析

(3)T1R のリガンド結合に対する Fab 断片の影響の有無の検討

所属研究室において，蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)に基づく T1R のリガンド結合測定実験系が確立されていた。この実験系では，リガンドの T1R への添加に伴い，FRET シグナルが増加する。作製した抗体が T1R の分子機能に対して与える影響を調べるために，この実験系に，Fab 断片を供した。加えた Fab 断片の濃度に依存して，FRET シグナルが減少することがわかった。これは，T1R ヘテロダイマーを構成する各サブユニットの細胞外領域 C 末端に配した蛍光標識間の相対位置に影響を与える部位に，抗体のエピトープが存在することを示唆している。一方で，Fab の添加に伴う FRET シグナルの減少の大きさは，リガンド添加に伴うその増加の大きさに比べて大きいため，T1R リガンド結合に対する Fab の影響を，FRET に基づく実験系では明らかにできなかった。

(4)Fab 断片の結晶化への利用

確立した調製法を用いて，結晶化を行うに十分な量の Fab 断片を調製することができた。ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて，Fab 断片と T1R 細胞外領域断片の複合体を精製し，結晶化に取り組んだ。結晶化条件の探索を行った結果，一種類の Fab 断片については，複合体結晶を得ることができた。また，結晶は，Fab 断片をイオン交換クロマトグラフィーで高度に精製することにより，はじめて得ることができた。

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１件）

(1) Yasui, N., Findlay, G.M., Gish, G.D., Hsiung, M.S., Huang, J., Tucholska, M., Taylor, L., Smith, L., Boldridge W.C., Koide, A., Pawson, T, Koide, S. Directed network wiring identifies a key protein interaction in embryonic stem cell differentiation. ***Mol Cell***, 査読有, 2014 年, 54 巻, 1034-1041 頁. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.05.002.

〔学会発表〕（計５件）

(1) 安井　典久, Greg M. Findlay, Gerald Gish, Marilyn S. Hsiung, Jin Huang, Monika Tucholska, Lorne Taylor, Louis Smith, W. Clifford Boldridge, 小出 明子, Tony Pawson, 小出　昌平; 特定の配列モチーフに単一特異的に結合する人工タンパク質の作製とその利用によるタンパク質間相互作用の機能アノテーション, 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 2014 年 6 月 26 日, ワークピア横浜/横浜産貿ホール　マリネリア (神奈川県・横浜市), (招待講演).

(2) 安井　典久, Greg M. Findlay, Gerald Gish, Marilyn S. Hsiung, Jin Huang, Monika Tucholska, Lorne Taylor, Louis Smith, W. Clifford Boldridge, 小出 明

子，Tony Pawson，小出　昌平；人工タンパク質を用いた細胞内相互作用ネットワークの再構築によるマウス ES 細胞の分化に重要なタンパク質間相互作用の同定，第 37 回分子生物学会年会，2014 年 11 月 26 日，パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）．

(3) 伊藤　愛優美，安井　典久，山下　敦子；味覚受容体 T1R とカルモジュリンの相互作用，第 37 回分子生物学会年会，,2014 年 11 月 25 日，パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）．

(4) 平井　秀憲，安井　典久，田畑　早苗，山下　恵太郎，山本　雅貴，高木　淳一，禾　晃和；リーリン-ApoER2 複合体の結晶構造解析，第 14 回日本蛋白質科学学会年会，2014 年 6 月 26 日，ワークピア横浜/横浜産貿ホール　マリネリア（神奈川県・横浜市）．

(5) 山下　恵太郎，平井　秀憲，安井　典久，田畑　早苗，高木　淳一，禾　晃和，山本　雅貴；フラグメントの制約付き実空間探索による不明瞭な電子密度へのモデルのアサイン，第 14 回日本蛋白質科学学会年会，2014 年 6 月 26 日ワークピア横浜/横浜産貿ホール　マリネリア（神奈川県・横浜市）．

〔図書〕（計１件）
安井　典久，小出　昌平；細胞におけるネットワークの再構築により明らかにされたマウスの ES 細胞において原始内胚葉への分化に重要なタンパク質間相互作用，ライフサイエンス新着論文レビュー（オンライン）．
URL:http://first.lifesciencedb.jp/archives/8970

〔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〕
所属研究室ホームページ
URL:http://www.pharm.okayama-u.ac.jp/lab/a_yama/Structure/Top.html

６．研究組織
(1)研究代表者
安井　典久（YASUI NORIHISA）
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：90467514

(2)研究分担者
（　　）

研究者番号：

(3)連携研究者
（　　）

研究者番号：