

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：37104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650025

研究課題名(和文) グレリン受容体を活性化するモノクローナル抗体の作製と受容体結晶構造解析への応用

研究課題名(英文) Monoclonal antibody that activates the ghrelin receptor and its application to the crystal structure analysis

研究代表者

児島 将康 (Kojima, Masayasu)

久留米大学・分子生命科学研究所・教授

研究者番号：20202062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは1999年に摂食亢進・成長ホルモン分泌促進作用を有するグレリンを胃から発見し、グレリンの活性発現にはオクタン酸修飾が必要であることを明らかにした。

この脂肪酸で修飾されたグレリンが、どのようにグレリン受容体に結合して活性化するのかを明らかにするため、申請者らはグレリン受容体の結晶構造解明に取り組んだ。本研究では、グレリン受容体に作用して、これを活性化できるモノクローナル抗体の作製を試みた。その結果、いくつかのグレリン受容体の立体構造を認識する抗体を得て、現在はグレリン受容体の結晶化に応用している。

研究成果の概要(英文)： In order to clarify how this fatty acid modified ghrelin binds to and activates the ghrelin receptor, we started on elucidating the crystal structure of the ghrelin receptor. However, the ghrelin receptor is a typical GPCR, and it is generally difficult to analyze the crystal structure of GPCR. Furthermore, it is more difficult to analyze the crystal structure of an active form receptor with an agonist bound thereto.

In this study, we tried to prepare monoclonal antibodies that act on the ghrelin receptor and can activate it. We planned to elucidate the crystal structure of the active ghrelin receptor by applying the monoclonal antibody to enlarge the hydrophilic surface of the ghrelin receptor and increasing its thermal stability.

As a result, we have obtained antibodies recognizing the steric structure of the ghrelin receptor, and are now applied the antibodies to the crystallization of the ghrelin receptor.

研究分野：構造生物学

キーワード：グレリン オクタン酸 グレリン受容体 GPCR 脂肪酸修飾 モノクローナル抗体 ナノボディ 立体構造認識抗体

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは1999年に摂食亢進・成長ホルモンの分泌促進作用を有するペプチド・ホルモンのグレリンを胃から発見し (Kojima et al. Nature 1999)、このペプチドのN末端から3番目のセリン残基の側鎖が、中鎖脂肪酸のオクタン酸によって修飾されていることを明らかにした。しかもグレリンの活性発現には、このオクタン酸修飾が必要であるという、これまでのペプチド・ホルモンには知られていない構造であった。脊椎動物でのグレリンの構造を調べたところ、ほとんどの動物では中鎖脂肪酸のオクタン酸による修飾がメインであるが、鳥類や魚類ではデカン酸で修飾されたグレリンもかなりの割合で存在するなど、種間での違いが見られた。しかしどの脊椎動物のグレリンも脂肪酸修飾が活性発現に必須であることは共通であった。

この脂肪酸で修飾されたグレリンがどのようにグレリン受容体に結合して活性化するのか、そして、そのときの脂肪酸の立体構造的な役割についてなどは興味深い研究対象である。しかしグレリン受容体の立体構造が明らかでないので、グレリン受容体の活性化における脂肪酸の立体構造的な役割についてはわかっていなかった。そこで、なぜグレリンの脂肪酸修飾がグレリン受容体の活性化に必要なのかを明らかにするため、申請者らはグレリン受容体の結晶構造解析に取り組んだ。

近年の研究手法の開発によって膜タンパク質の結晶構造解析が可能な時代になった。生体の情報伝達に重要な役割をするGタンパク質共役型受容体 (GPCR: G-protein coupled receptor) に関しても、現在40種類近くの結晶構造が解明されている。

しかし、結晶構造が解明された論文に発表されているGPCRのほとんどが阻害剤やインバースアゴニストが結合した不活性型受容体であり、アゴニストが結合した活性型受容体の結晶構造解析の例はまだ少ない。これは活性型受容体として存在する時間は短く、動きが大きく構造が不安定で結晶化が難しいからである。

本研究では、グレリン受容体 (別名: GHS-R, growth hormone secretagogue receptor) に作用して、これを活性化できるモノクローナル抗体の作製を試みる。このグレリン受容体活性化のモノクローナル抗体を使ってGPCRの親水性表面を大きくし、熱安定性を高めることで、活性型GPCRの結晶化に応用しその構造を解明する。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者らが発見した摂食亢進ホルモンのグレリンを対象として、その受容体を活性化するモノクローナル抗体を作製し、活性型グレリン受容体の結晶構造解析のツールとして使うことである。

研究期間内にグレリン受容体を活性化できるモノクローナル抗体を作製し、グレリン受容体の結晶構造解析に応用する。具体的な研究の流れは

グレリン受容体を大腸菌あるいは無細胞合成系で発現させて精製する。

精製したグレリン受容体を人工リポソームに組み込む。

グレリン受容体にアゴニストを反応させた状態の人工リポソームを抗原としてモノクローナル抗体を作製する。

作製したモノクローナル抗体をグレリン受容体の安定発現細胞に加え、細胞内カルシウム濃度の上昇活性を指標に、受容体活性化抗体をスクリーニングする。

## 3. 研究の方法

グレリン受容体は熱安定性が弱く、そのままでは結晶化が困難である。そこでグレリン受容体にT4リゾチームやbRILタンパクとの融合体にすることや、受容体のアミノ酸を置換して熱安定性を高めるとともに、受容体抗体を作製して、この抗体を結晶化の共タンパク質とすることを計画した。

昆虫細胞で合成したグレリン受容体タンパク質をマウスに免疫し、定法に従ってモノ

クローナル抗体を作製した。グレリン受容体リポソームへの結合チェックによって、グレリン受容体に対する立体構造認識モノクローナル抗体がいくつか得られた。

またグレリン受容体に対するモノクローナル抗体とともに、グレリン受容体に対するアルパカ・ナノボディの作成も進めた。ナノボディは分子量が小さいため、グレリン受容体のリガンド結合部位に進入できると考えられるからである。

グレリン受容体は無細胞系で発現させ、リポソームに組み込み、これを抗原としてアルパカに免疫した。このアルパカからリンパ球を採取し、mRNAを分離した。ナノボディをコードするIgG、すなわち重鎖一本鎖抗体のIgG2とIgG3をPCRで増幅し、抗原認識部位のcDNAを得た。これを発現ベクターに組み込み、ファージに発現させ、ファージディスプレイ・ライブラリを構築した。ファージのタイターチェックでは、 $10^{13}$ - $10^{14}$ /mlと十分な数であるので、グレリン受容体タンパク質を標的としてパンニング操作を行った。

グレリン受容体タンパク質は無細胞系で合成しピオチン化リポソームに組み込んだものを、ストレプトアビジンでコートされた96well マイクロプレートに固定した。固定は室温で2時間行い、そのあと1%BSAのブロッキング液を満たして、非特異的な吸着を抑えるようにした。 $10^9$ - $10^{10}$ /mlのファージ液を200  $\mu$ l 各wellに加え、室温で1時間置いた。リポソームを使っているために洗浄液(PBS)には界面活性剤を含めなかった。PBSで5回ウォッシュし、0.1Mグリシン・バッファーでグレリン受容体リポソームに結合したファージを溶出した。コントロールとしてグレリン受容体ではなくアデノシンA2A受容体を用いて同様なパンニング操作を行い、非特異的な吸着を調べた。

#### 4. 研究成果

グレリン受容体に対するモノクローナル抗体について

定法に従ってグレリン受容体に対するモノクローナル抗体をいくつか得た。このうちひとつのモノクローナル抗体は細胞内ドメインの認識抗体であった。現在、その認識部位などをチェック中である。予備的な検討では、結晶化の際にこれらの抗体を加えることで、熱安定性に変化があることを確認した。

もうひとつのモノクローナル抗体は、グレリン受容体の細胞外ドメインを認識する可能性が示唆され、現在確認中である。

グレリン受容体に対するナノボディ作製について

グレリン受容体に対するナノボディの作製においては、グレリン受容体は無細胞系で発現させたものをリポソームに組み込み、これを抗原としてアルパカに免疫した。このアルパカからリンパ球を採取し、mRNAを分離した。ナノボディをコードするIgG、すなわち重鎖一本鎖抗体のIgG2とIgG3をPCRで増幅し、抗原認識部位のcDNAを得た。これを発現ベクターに組み込み、ファージに発現させ、ファージディスプレイ・ライブラリを構築した。ファージディスプレイ・ライブラリのタイターはスクリーニングに十分な数なので、このライブラリを用いてパイオ・パンニングを行った。

「3. 研究の方法」に記載した条件ではグレリン受容体とコントロールのリポソームの間で、結合したファージ数に差がなく、パンニング操作がうまくいかなかった。

そこでファージ液をコントロール・リポソーム(A2A)に5回連続で結合させて非特異的なファージを出来るだけ除き、そのあとにグレリン受容体リポソームに結合させることにした。さらにブロッキング液として1%BSAとともに1%スキムミルクも検討した。溶出においてもグリシン・バッファーではなく、トリプシン液を使って結合したファージをマイルドな条件で溶出するようにした。その結果、グレリン受容体に結合したファージ数が、コントロール・リポソームの約1.5~2倍になり、パンニング操作が改善された。

今後は、この条件でのパンニング操作を数回繰り返し、グレリン受容体に結合するファージを濃縮するとともに、ELISAによって結

合したファージの性質を調べる計画である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

1: Yuge K, Hara M, Okabe R, Nakamura Y, Okamura H, Nagamitsu S, Yamashita Y, Orimoto K, Kojima M, Matsuishi T. Ghrelin improves dystonia and tremor in patients with Rett syndrome: A pilot study. *J Neurol Sci*. 2017 Jun 15;377:219-223. doi: 10.1016/j.jns.2017.04.022.

2: Kawai K, Nakashima M, Kojima M, Yamashita S, Takakura S, Shimizu M, Kubo C, Sudo N. Ghrelin activation and neuropeptide Y elevation in response to medium chain triglyceride administration in anorexia nervosa patients. *Clin Nutr ESPEN*. 2017 Feb;17:100-104. doi: 10.1016/j.clnesp.2016.10.001.

3: Kojima M, Hamamoto A, Sato T. Ghrelin O-acyltransferase (GOAT), a specific enzyme that modifies ghrelin with a medium-chain fatty acid. *J Biochem*. 2016 Oct;160(4):189-194.DOI: 10.1093/jb/mvw046

4: Maeda T, Nakamura Y, Shiotani H, Hojo MK, Yoshii T, Ida T, Sato T, Yoshida M, Miyazato M, Kojima M, Ozaki M. Suppressive effects of dRYamides on feeding behavior of the blowfly, *Phormia regina*. *Zoological Lett*. 2015 Dec 8;1:35. doi: 10.1186/s40851-015-0034-z.

5: Mifune H, Tajiri Y, Nishi Y, Hara K, Iwata S, Tokubuchi I, Mitsuzono R, Yamada K, Kojima M. Voluntary exercise contributed to an amelioration of abnormal feeding behavior, locomotor activity and ghrelin production concomitantly with a weight reduction in high fat diet-induced obese rats. *Peptides*. 2015 Sep;71:49-55. doi: 10.1016/j.peptides2015.06.007.

6: Oya M, Kitaguchi T, Harada K, Numano R, Sato T, Kojima M, Tsuboi T. Low glucose-induced ghrelin secretion is mediated by an ATP-sensitive potassium channel. *J Endocrinol*. 2015 Jul;226(1):25-34. doi: 10.1530/JOE-15-0090.

7: Müller TD, Nogueiras R, Andermann ML, Andrews ZB, Anker SD, Argente J, Batterham RL, Benoit SC, Bowers CY, Broglio F, Casanueva FF, D'Alessio D, Depoortere I, Geliebter A, Ghigo E, Cole PA, Cowley M, Cummings DE, Dagher A, Diano S, Dickson SL, Diéguez C, Granata R, Grill HJ, Grove K, Habegger KM, Heppner K, Heiman ML, Holsen

L, Holst B, Inui A, Jansson JO, Kirchner H, Korbonits M, Laferrère B, LeRoux CW, Lopez M, Morin S, Nakazato M, Nass R, Perez-Tilve D, Pfluger PT, Schwartz TW, Seeley RJ, Sleeman M, Sun Y, Sussel L, Tong J, Thorner MO, van der Lely AJ, van der Ploeg LH, Zigman JM, Kojima M, Kangawa K, Smith RG, Horvath T, Tschöp MH. Ghrelin. *Mol Metab*. 2015 Mar 21;4(6):437-60. doi: 10.1016/j.molmet.2015.03.005.

8: Sano H, Nakamura A, Texada MJ, Truman JW, Ishimoto H, Kamikouchi A, Nibu Y, Kume K, Ida T, Kojima M. The Nutrient-Responsive Hormone CCHamide-2 Controls Growth by Regulating Insulin-like Peptides in the Brain of *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet*. 2015 May 28;11(5):e1005209. doi: 10.1371/journal.pgen.1005209.

9: Shiimura Y, Ohgusu H, Sato T, Kojima M. Regulation of the Human Ghrelin Promoter Activity by Transcription Factors, NF- $\kappa$ B and Nkx2.2. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:580908. doi: 10.1155/2015/580908.

10: Sato T, Ida T, Nakamura Y, Shiimura Y, Kangawa K, Kojima M. Physiological roles of ghrelin on obesity. *Obes Res Clin Pract*. 2014 Sep-Oct;8(5):e405-13. doi:10.1016/j.orcp.2013.10.002.

11: Kizaki J, Aoyagi K, Sato T, Kojima M, Shirouzu K. Production of ghrelin by the stomach of patients with gastric cancer. *Kurume Med J*. 2014;60(3-4):99-104.

12: Hara M, Nishi Y, Yamashita Y, Hirata R, Takahashi S, Nagamitsu S, Hosoda H, Kangawa K, Kojima M, Matsuishi T. Relation between circulating levels of GH, IGF-1, ghrelin and somatic growth in Rett syndrome. *Brain Dev*. 2014 Oct;36(9):794-800. doi: 10.1016/j.braindev.2013.11.007.

〔学会発表〕(計 9 件)

1 , 児島将康、様々な生物種のオーファンGPCRを起点とする新しい摂食調節ペプチドの探索、第87回日本内分泌学会学術総会教育講演、2014年4月25日「福岡国際会議場（福岡市）」

2 , 児島将康、様々な生物種のオーファンGPCRを起点とする新しい摂食調節ペプチドの探索、日本神経化学会シンポジウム、2014年9月30日「奈良県新公会堂（奈良市）」

3, 御船弘治、原健人、西芳寛、岩田慎平、徳淵市朗、田尻祐司、満園良一、山田研太郎、児島将康、高脂肪食負荷マウスにおけるグレリン末梢投与後の摂餌行動、第88回日本内分泌学会学術総会、2015年4月23日～2015年4月25日「ホテルニューオータニ東京（東京都千代田区）」

4, 佐藤貴弘、大石佳苗、児島将康、脳温に及ぼすグレリン作用の解析、第88回日本内分泌学会学術総会、2015年4月23日～2015年4月25日、「ホテルニューオータニ東京（東京都千代田区）」

5, 椎村祐樹、小林拓也、児島将康、岩田想、グレリン受容体の大量発現と結晶化第12回GPCR研究会、2015年5月15日～16日「日本科学未来館未来館ホール（東京お台場）」

6, 西芳寛、那須沙織、細田洋司、御船弘治、久志野彰寛、田中永一郎、児島将康、放射線被ばく後のグレリン産生・分泌動態とグレリンによる血球保護効果の検討、第89回日本内分泌学会学術総会、2016年4月21日～23日「京都国際会館（京都市）」

7, 御船弘治、原健人、坂井勇介、岩田慎平、西芳寛、田尻祐司、児島将康、満園良一、グレリン遺伝子欠損マウスの制限給餌下における自発運動について、第89回日本内分泌学会学術総会、2016年4月21日～23日「京都国際会館（京都市）」

8, 佐藤貴弘、大石佳苗、児島将康、摂餌に関する記憶学習および探索行動に及ぼすグレリンの役割、第89回日本内分泌学会学術総会、2016年4月21日～23日「京都国際会館（京都市）」

9, 児島将康、第20回心血管内分泌代謝学会学術総会 高峰譲吉賞受賞講演、グレリンの発見とその心血管内分泌系での生理機能の研究、2016年12月17日「東京コンベンションホール（東京）」

〔図書〕(計1件)

児島将康、診断と治療社、下垂体疾患診療マ

ニユアル 第1章グレリン、2016年11月25日発行、P24～25

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
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

児島 将康 (Kojima, Masayasu)  
久留米大学・分子生命科学研究所・教授  
研究者番号：20202062

(2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

(3) 連携研究者

( )  
研究者番号：

(4) 研究協力者

椎村 祐樹 (Shimura, Yuki)