

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：平成 22 年度～平成 24 年度

課題番号：22590270

研究課題名（和文）活性型 GPCR とその特異的抗体による共結晶化から構造解析へ向けて

研究課題名（英文）Crystallization of GPCR and its specific antibody

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

研究成果の概要（和文）：

本研究は昆虫（Sf9）細胞発現系を用いて、ヒトの膜タンパク質である GPCR（G タンパク質共役受容体）を当該細胞に大量に発現させる。大量発現させた受容体を精製し、タンパク質としての性質を検討する。精製した GPCR を用いて特異的な構造認識抗体を作製する。GPCR と抗体の共結晶を作製する。受容体の構造を X 線回折により解くことを目的とした。GPCR の構造解析は非常に難しく、本研究課題の遂行により GPCR の構造決定の進展に寄与するものと考えられる。本研究期間に、アンジオテンシン 2 型受容体（AT2）の大量生産、精製、特異的抗体、および共結晶化に成功した。AT2 の大量生産において、5L の昆虫細胞の培養を行い、FACS 解析から約 70% の AT2 が、またリガンド結合試験から平均 80.36 pmol/ml の AT2 が発現しているのを確認した。大量生産した昆虫細胞を用いた精製系の検討により、5L 培養分から約 2mg の AT2 が精製できるまでに至った。精製した AT2 はリポソームに再構成し、特異的構造認識抗体取得の為にマウスへ免疫した。免疫されたマウスの脾臓から免疫細胞を採取し、ミエローマ細胞と融合することでハイブリドーマを作製し、その中から AT2 特異的構造認識抗体のスクリーニングを行なった。1 次スクリーニングから 96 サンプルの候補を、2 次スクリーニングから 15 サンプルが得られた。これらの抗体について AT2 と共結晶化した結果、3 つの抗体において微結晶が得られた。このうちの 1 つについてさらに結晶化の条件を検討した結果、結晶の成長が認められた。この結晶を SPring-8 にて X 線による回折像の取得を試みたが、分解能が低く構造決定までは至らなかった。これらの結果から、本研究課題の目的は達成されたものと考えられる。今後は GPCR 特異的構造認識抗体との共結晶化の条件を更に検討し、AT2 の構造を決定したい。

研究成果の概要（英文）：

Angiotensin II receptor type 2 (AT2) play an important role for regulating blood pressure. Recent studies strongly suggest that AT2 not only mediates blood pressure control but also plays an important role in cardiovascular protection such as anti cardiac hypertrophy. To solve AT2 structure is important for understanding of the molecular mechanism of blood pressure control and developing of drug against cardiac hypertrophy. Recently, several GPCR structures have been solved. However, to determine of GPCR crystal structure still remains having some problems. In this study, we developed AT2 structure specific recognition antibodies to overcome these problems. We have been trying to crystallize of AT2 with Fab in order to solve the structure in this study. Stabilized AT2 mutant (AT2-T4L) has been constructed by deletion of the flexible N- and C-terminus and insertion of T4 lysozyme (T4L) to the third intracellular loop (i3). AT2-T4L has been expressed in Sf9 insect cells. The expression levels of AT2-T4L have been assessed by flow cytometric analysis (FACS) and specific ligand-binding assay. We have purified from the cell membrane expressing AT2-T4L using TALON resin and size exclusion chromatography (SEC). The characteristics of the purified receptors have been assessed by thermal stability (CPM) assay. The antibodies have been developed from immunization of mice with wild type AT2. The antibodies have been screened using liposome-ELISA, dot plot analysis, FACS, and fluorescence size exclusion chromatography (FSEC). We have prepared Fab region from the screened antibodies for crystallization. The purified AT2T4L has been incubated with its Fab. Then, the complex has been purified by means of SEC. The complex has been crystallized in vapor diffusion. The AT2-T4L

could be expressed and purified successfully. The expression level was 57.3±8.9% (Average±SD) of whole infected cells (FACS) and 91.7±37.8pmol/mg -membrane (ligand-binding assay). The thermal stability of AT2-T4L had melting temperature (T_m) of 34 and 58°C. This data show that thermal stability of AT2-T4L is not enough for crystallization. Actually, we could not acquire the crystals from this sample in LCP. To contribute improvement of AT2-T4L stability, we have established three AT2 specific antibodies via the screening steps. The complex of AT2-T4L and Fab had T_m of 62°C. This thermal stability was higher than AT2-T4L. Furthermore, the thermal stability of complex was maintained for a week at 4°C. These data strongly suggested the complex is more suitable for crystallization. The complex was crystallized in vapor diffusion. We acquired some crystals of complex but their resolution had very low at the present study. So, we have been trying to crystallization in vapor diffusion and LCP under the various conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,300,000	390,000	1,690,000
23年度	1,100,000	330,000	1,430,000
24年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：構造生物、GPCR、抗体、結晶化、X線結晶構造解析

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 GPCR の構造解析は極めて難しい標的分子である。2011 年の段階で構造が明らかにされた GPCR はわずか 4 種のみであった。これは GPCR が約 800 種類存在することから考えても非常に少ないことが分かる。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。以上のことから 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

昆虫 (Sf9) 細胞のバキュロウイルス発現系を用いて、①ヒトの膜タンパク質である GPCR (G タンパク質共役受容体) を当該細胞に大量に発現させる。大量発現させた受容体は、②精製し、タンパク質としての性質を検討する。③受容体特異的な抗体の作製に用いる。④抗体との共結晶を作製する。⑤受容体の構造を X 線回折により解く。GPCR の構造解析は非常に難しく、現在まで数例しか報告が無い。したがって、本研究課題では、特に GPCR の構造解析を行う為の前半～中盤のボトルネックである①～④に

焦点をあてて検討することを目的とする。⑤は研究の進展状況により可能な限り挑戦する。

3. 研究の方法

我々は酵母を用いたスクリーニングシステムにより GPCR の安定性を向上させた。また、これらの安定化変異体は昆虫細胞をもちいたバキュロウイルス発現系により大量生産させた。生産した GPCR は精製し抗体作製の免疫源とする為にリボソームに再構築した。マウスへの免疫を介して GPCR 特異的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 GPCR の構造を認識するもののみをスクリーニングし、GPCR とその特異的構造認識抗体とを共結晶化した。

4. 研究成果

酵母を用いたスクリーニングの結果、AT2 の安定化変異体が複数得られた。更にこれらの安定化変異体をそれぞれ昆虫細胞発現系で大量生産する為に、それぞれの遺伝子を発現するバキュロウイルスを作製した。この中で最も安定化された変異体について昆虫細胞発現系を用いて大量生産を行なった。その結果、ほぼ全ての細胞で安定化変異体の発現が認められ、さらに発現された変異体は特異的

リガンドに体する高い結合能を持っていた (図1)。

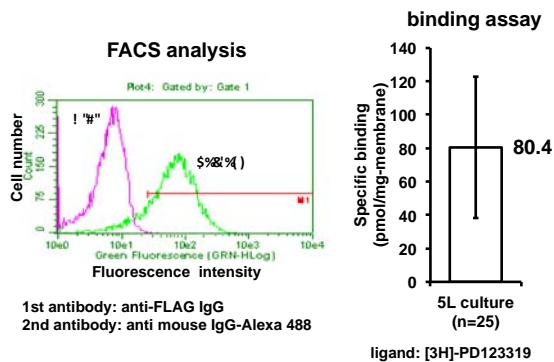
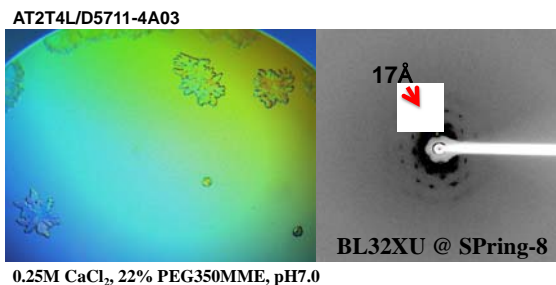


図1 昆虫細胞を用いたAT2安定化変異体の発現
左) Flow cytometry法を用いた解析。安定化変異体が殆どの細胞で発現している。
右) 特異的リガンドを用いた結合試験。発現させた安定化変異体はリガンド結合能を有している。

更に精製した AT2 をマウスに免疫することで AT2 特異的構造認識抗体を取得した。具体的には精製した AT2 をリポソームに再構成し、それを免疫源とし、1回 500 μ g の AT2 を週1回、計4回マウスの腹腔へ接種した。最終免疫から3日後にマウスから脾臓を摘出し、脾細胞とミエロー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、15種類の AT2 特異的構造認識抗体が得られた。これらの抗体はそのまま結晶化に用いるには大きすぎるのでパパイン処理により Fab 化を行なった。更に AT2 安定化変異体との共結晶化を行なった。その結果、3種類の Fab との共結晶化により初期の結晶が得られた。この中でもっとも結晶性が良いと考えられたものについて結晶化条件の最適化を行なうことで初期結晶よりも良いものが得られた (図2)。この結晶を採取し、SPring-8 のマイクロフォーカスビームである BL32XU で回折実験を行なった (図2)。その結果、低分解能ではあるがタンパク質だと思われる回折点を得られた。今後、結晶化条件をさらに最適化することで構造解析が可能な結晶が得られるものと期待さ



0.25M CaCl₂, 22% PEG350MME, pH7.0

図2 AT2安定化変異体とその特異的構造認識抗体の共結晶化
左) 共結晶化により結晶が得られた。
右) 左図の結晶を採取しX線回折実験を行なった結果、低分解能の回折点を得られた。
れる。

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10件)

- Haga, K*, A. C. Kruse*, H. Asada*, T. Yurugi-Kobayashi, M. Shiroishi, C. Zhang, W. I. Weis, T. Okada, B. K. Kobilka, T. Haga, and T. Kobayashi. 2012. Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* 482: 547-551. * These authors contributed equally to this work.
- Shiroishi, M., T. Kobayashi, S. Ogasawara, H. Tsujimoto, C. Ikeda-Suno, S. Iwata, T. Shimamura. 2011. Production of the stable human histamine H1 receptor in *Pichia pastoris* for structural determination. *Methods* 55, 281-286.
- de Graaf C, AJ. Kooistra, HF. Vischer, V. Katritch, M. Kuijter, M. Shiroishi, S. Iwata, T. Shimamura, RC. Stevens, IJ. de Esch, R. Leurs. 2011. Crystal structure-based virtual screening for fragment-like ligands of the human histamine H(1) receptor. *J Med Chem.* 54, 8195-8206.
- Kojima R, M. Kajikawa, M. Shiroishi, K. Kuroki, K. Maenaka. 2011. Molecular Basis for Herpesvirus Entry Mediator Recognition by the Human Immune Inhibitory Receptor CD160 and Its Relationship to the Cosignaling Molecules BTLA and LIGHT. *J Mol Biol.* 413, 762-772.
- Shimamura T*, M. Shiroishi *, S. Weyand, H. Tsujimoto, G. Winter, V. Katritch, R. Abagyan, V. Cherezov, W. Liu, GW. Han, T. Kobayashi, RC. Stevens, S. Iwata. 2011. Structure of the human histamine H(1) receptor complex with doxepin. *Nature.* 475, 65-70. * These authors contributed equally to this work.
- Tokuda, N., K. Igarashi, T. Shimamura, T. Yurugi-Kobayashi, M. Shiroishi, K. Ito, T. Sugawara, H. Asada, T. Murata, N. Nomura, S. Iwata, and T. Kobayashi. 2011. Cloning, expression and purification of the anion exchanger 1 homologue from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Protein Expr Purif* 79: 81-87.
- Ito, K., T. Sugawara, A. Koizumi, K.

- Nakajima, A. Shimizu-Ibuka, **M. Shiroishi**, **H. Asada**, T. Yurugi-Kobayashi, T. Shimamura, T. Asakura, T. Misaka, S. Iwata, T. Kobayashi, and K. Abe. 2011. Cysteine-to-serine shuffling using a *Saccharomyces cerevisiae* expression system improves protein secretion: case of a nonglycosylated mutant of miraculin, a taste-modifying protein. *Biotechnol Lett* 33: 103-107.
8. **Asada, H.**, T. Uemura, T. Yurugi-Kobayashi, **M. Shiroishi**, T. Shimamura, H. Tsujimoto, K. Ito, T. Sugawara, T. Nakane, N. Nomura, T. Murata, T. Haga, S. Iwata, and T. Kobayashi. 2011. Evaluation of the *Pichia pastoris* expression system for the production of GPCRs for structural analysis. *Microb Cell Fact* 10: 24.
9. Ito, K., T. Sugawara, A. Koizumi, K. Nakajima, A. Shimizu-Ibuka, **M. Shiroishi**, **H. Asada**, T. Yurugi-Kobayashi, T. Shimamura, T. Asakura, K. Masuda, M. Ishiguro, T. Misaka, S. Iwata, T. Kobayashi, and K. Abe. 2010. Bulky high-mannose-type N-glycan blocks the taste-modifying activity of miraculin. *Biochim Biophys Acta* 1800: 986-992.
10. Yokota A, K. Tsumoto, **M. Shiroishi**, T. Nakanishi, H. Kondo, I. Kumagai. 2010. Contribution of asparagine residues to the stabilization of a proteinaceous antigen-antibody complex, HyHEL-10-hen egg white lysozyme. *J Biol Chem*. 285, 7686-96.

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 0 件)

[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：
 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：