

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 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570114

研究課題名（和文） 膜蛋白質の結晶化を促進する人工蛋白質リガンドの構築法に関する研究

研究課題名（英文） Technological development for construction of synthetic proteins that facilitate membrane protein crystallization

研究代表者

野村 紀通（NOMURA NORIMICHI）

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：10314246

研究成果の概要（和文）：膜蛋白質の多くは重要な創薬ターゲットであるため、系統的かつ網羅的な精密立体構造データの蓄積が切望されているが、現在の技術水準では X 線結晶構造解析の難度はきわめて高い。膜蛋白質の結晶構造を高分解能で決定するには、膜蛋白質と特異的に結合して結晶性を向上させる人工蛋白質「結晶化リガンド（crystallizing ligand）」をテーラーメイドで作製し、膜蛋白質／結晶化リガンド複合体の良質な三次元結晶を回折実験に供するというストラテジーが有効である。

本研究では、任意の膜蛋白質に対する結晶化リガンドをハイスループットで作出する新規手法を確立することを目指した。結晶化リガンドとしては Fv 抗体フラグメント分子骨格を用いた。開発した技術を用いて哺乳類由来の促進拡散グルコーストランスポーター／Fv 抗体フラグメント複合体の新規構造を 3.5 Å 分解能で決定することに世界で初めて成功した。

研究成果の概要（英文）：Co-crystallization of membrane proteins with antibody fragments may emerge as a general tool to facilitate crystal growth and improve crystal quality. The bound antibody fragment enlarges the hydrophilic part of the mostly hydrophobic membrane protein, thereby increasing the interaction area for possible protein-protein contacts in the crystal. To serve as a ‘crystallizing ligand’, the antibody fragment has to recognize an epitope that is only present in the native conformation (and not in the denatured state) of the membrane protein, bind with high affinity, and form stable and rigid complexes. In this project, we developed a fast and reliable method for generating crystallizing ligands against various mammalian G-protein coupled receptors (GPCRs) and transporters in a phage display format. Using this method, the crystal structure of a mammalian facilitative glucose transporter complexed with a Fv fragment has been determined at 3.5 Å resolution.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：膜蛋白質、X 線結晶構造解析、結晶化リガンド、抗体フラグメント、ファージディスプレイ

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

膜蛋白質は、シグナル伝達、物質輸送などの生体膜を介した種々の生命現象において基幹的な役割を担っており、その精密立体構造解析は分子機構を解明する上での鍵となる。また、市販の医薬品の作用点の50%以上が膜蛋白質であることから明らかなように、受容体、トランスポーター、チャネル、接着分子といったさまざまな膜蛋白質の立体構造を系統的かつ網羅的に解明してゆくことは、「構造に指南された創薬戦略 (SGDD: Structure Guided Drug Development)」により創薬リード化合物を効率よく絞り込むための情報基盤を構築するという観点から産業界からの期待も大きい。しかしながら、2009年10月時点で Protein Data Bank (PDB) に登録された立体構造データ約 60,800 のうち膜蛋白質は 250 程度 (全体の 0.4%) しかなく、高分解能で膜蛋白質の構造を決定することは依然としてかなり難しいというのが現状である。

膜蛋白質の体系的な構造解析を困難にしている最大の要因として、膜蛋白質の精製標品の調製においては界面活性剤を用いて可溶化するので、疎水性領域がミセルで覆われており結晶格子が形成されにくいという点が挙げられる。とくに親水性表面が少ない多数回膜貫通型の膜蛋白質の結晶化ではその傾向が著しい。こうしたボトルネックを解消するために、膜蛋白質の親水性表面の立体構造を特異的に認識して結合するモノクローナル抗体を「結晶化リガンド (crystallizing ligand)」として利用し、膜蛋白質/抗体複合体を結晶化するという手法が比較的良好に知られている (図1)。この手法は、抗体が結合することによって膜蛋白質のある特定のコンフォメーションが安定化されるとともに、蛋白質/抗体複合体の全体としての親水性表面が拡大して結晶性が向上するという原理に基づく。また、膜蛋白質/抗体複合体結晶の X 線回折データを解析する際に抗体部分の構造モデルを用いて分子置換法により位相を決定できるというメリットもある。

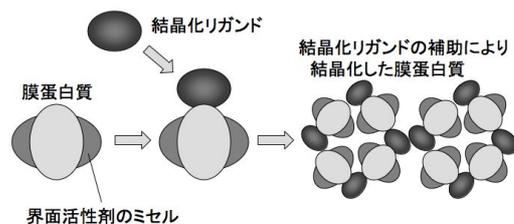


図1. 結晶化リガンドを用いた膜蛋白質の結晶化の原理

これまでに膜蛋白質の結晶化リガンドと

して Fab フラグメントが多用されてきたが、分子量が概ね 50 kDa 以下の比較的小さい膜蛋白質 (ヒト GPCR もこの範疇に含まれる) と共結晶化するために Fab フラグメントを用いた場合、抗体分子の高高さのために良好な結晶パッキングが形成されず高分解能での構造決定に至らない事例も報告されている。Fv フラグメント、あるいはラクダ型単鎖ドメイン抗体 V_HH 等のより小さいサイズの抗体フラグメント (低分子化抗体) を使えばこの問題が解消される可能性があり、それら低分子化抗体を効率よく選抜する実験系としてはファージディスプレイ法が有効であると考えられた。以上のような背景をふまえて、本研究では scFv (一本鎖 Fv) ファージディスプレイ法により高効率で結晶化リガンドを作製するための技術開発をめざした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ファージディスプレイ法を用いて膜蛋白質に対する高親和性抗体をハイスループットで作製する技術を確立し、膜蛋白質全般の X 線結晶構造解析において普遍的に応用できる結晶化リガンド構築システムを創出することである。マウスへの膜蛋白質抗原の免疫法や抗体スクリーニング法等、開発すべき技術は次の三点に集約される。

- ① 高品質の抗体ファージライブラリーの構築技術
- ② 結晶化リガンド候補の scFv クローンのハイスループットスクリーニング技術
- ③ 結晶化に必要な mg オーダーのレコンビナント抗体フラグメント生産技術

3. 研究の方法

(1) 構造解析のターゲット膜蛋白質

結晶化リガンド構築技術を確立し、それがうまく動作することを確認するためには安定な精製標品が比較的簡便に多量に得られるモデル膜蛋白質をターゲットとして試験する必要がある。そのことを考慮して、本研究では哺乳類由来の SLC 輸送体 (ラット・フルクトース輸送体 GLUT5 ; 12 回膜貫通型の内在性膜蛋白質) をターゲットとして選定した。哺乳類細胞における細胞膜を介した糖の輸送は、Na⁺/グルコース共輸送体 (SGLTs) による能動輸送、および Na⁺非依存性促進拡散ヘキソース輸送体 (GLUTs) による受動輸送により行われる。後者には 14 種類のアイソフォーム (GLUT1~14) が存在するが、それらの X 線結晶構造解析に関する知見は皆無である。GLUTs の構造を決定し、糖輸送の分子機構や基質認識特性の構造的基盤を明

らかにすることにより、細胞内のヘキソース濃度の調節、ひいては糖尿病や生活習慣病の予防・改善に資する新たな知見が得られると期待できる。GLUT5 ノックアウトマウスの解析から、この輸送体は特に小腸におけるフルクトースの吸収に必須であり、高フルクトース食摂取に起因する高血圧発症に深く関与することが明らかにされているため、本ターゲットは医学的に重要な膜蛋白質である。

(2) 結晶化リガンドスクリーニングの基本方針と工程の概要

結晶化リガンド分子は、膜蛋白質の親水性表面の立体構造を特異的に認識して結合し、親水性領域を拡張するとともに、膜蛋白質分子に構造ゆらぎ（動的構造）が生じないようにある特定のコンフォメーションを安定化することによって結晶中の分子パッキングを改善することが必要である（図2）。

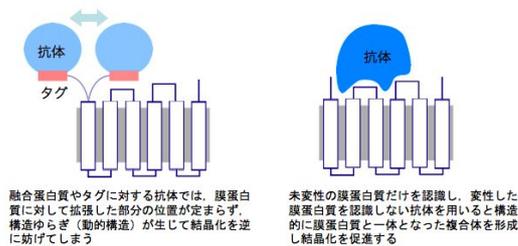


図2. 結晶化リガンドとして利用可能な抗体の概念図

したがって、膜蛋白質の結晶化リガンドとして利用可能な抗体とは少なくとも次のような条件をクリアするものと考えられる。

- 膜蛋白質との親和性が高く（nM オーダーの解離定数をもつ）、解離速度が小さい
- 膜蛋白質の親水性表面の立体構造に特異的に結合して構造を安定化する（膜蛋白質の部分ペプチド配列のみに特異的に結合するようなものではない）

これらの条件を満たす抗体フラグメントのスクリーニングのためには膜蛋白質の天然のコンフォメーションを安定に保持することが重要であり、免疫原やスクリーニング時のベイト (bait)として膜蛋白質再構成リポソームの技術を用いることにした。

(2) マウス免疫・scFv 抗体ファージライブラリー作製およびスクリーニング

膜蛋白質の機能的構造（天然のコンフォメーション）を保持したままマウスに免疫刺激を与えるために、ターゲット膜蛋白質を lipid A およびホスファチジルコリンとともに再構成したプロテオリポソームを抗原としてマ

ウスに免疫を行った。血清抗体価の上昇を確認後、脾臓を摘出した。

上記の脾細胞に由来する全 RNA を抽出後、抗体遺伝子の可変領域 (V_H および V_L) をコードする cDNA を可変領域特異的配列を有する混合プライマーを用いて RT-PCR により増幅した。これらの RT-PCR 産物をリンカー配列 (SSGGGSGGGGGSSRSS) を介して連結した scFv DNA 断片を二段階のオーバーラップ PCR により作製し、ファージディスプレイ用ベクター pComb3XSS (スクリプス研究所の Carlos F. Barbas 博士より供与) の SfiI サイトに組み込むことで、ライブラリーを構築した。得られたライブラリーのサイズは概ね $10^7 \sim 10^8$ cfu の規模であった。得られた各ライブラリーから無作為抽出した 20 クローンについて可変領域の DNA シーケンス解析を行った結果、ライブラリーを構成するクローンにおいて相補性決定領域(CDR)部分のアミノ酸配列上の重複がないことを確認した。この方法により、B リンパ球由来の V_H および V_L をコードする cDNA 集団を、その配列多様性を維持したままファージライブラリーの形で回収することが可能となった。

一次スクリーニングとして、ビオチン化プロテオリポソームを固定化した磁気ビーズ Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Invitrogen) を用いたバイオパニングを 4 回繰り返す行い、ターゲット膜蛋白質に結合する scFv ファージ集団を増幅した。この中から無作為に 100~200 個のクローンを選んで二次スクリーニングに供した。大腸菌ペリプラズム領域に産生させた scFv フラグメントを調製後、マイクロプレートに固相化した膜蛋白質再構成リポソームを結合標的として ELISA を行い (リポソーム ELISA)、膜蛋白質との結合が確認されるクローンを選抜した。

4. 研究成果

(1) 得られた結晶化リガンド候補の性状解析

ラット GLUT5 に対して 3 株 (クローン名: 4D111、4D151、4D160) の scFv クローンが取得できた。ELISA のようなエンドポイントアッセイでは膜蛋白質/抗体複合体形成のダイナミクス、とくに結合の安定性に関する情報が得られない。そのため表面プラズモン共鳴原理を基盤とした Biacore T-100 を用いて抗体フラグメントの結合・解離速度の評価技術を確認した。リコンビナント抗体フラグメントの C 末端 (H 鎖、L 鎖とも) に HA タグが未切断のまま残された標品を調製し、Biacore SA チップ上に固定化したビオチン化抗 HA タグ IgG に捕捉した。界面活性剤を含むバッファー中でアナライトとして膜蛋白質を添加し 2 分間の結合レスポンス、さらにその直後の 10 分間の解離レスポンスを観測することによって、結合の安定性を評価した。

この方法により多数の抗体フラグメントと膜蛋白質との結合・解離動態を繰り返し自動測定することが可能となった(図3)。

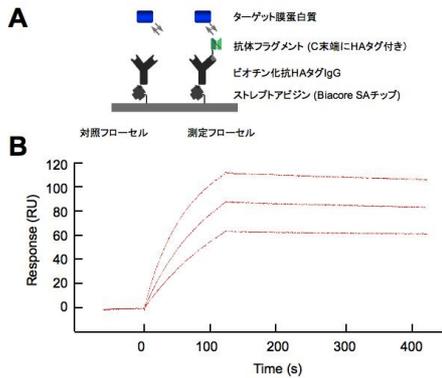


図3. Biacore による膜蛋白質/抗体フラグメントの相互作用解析

(2) リコンビナント抗体フラグメントの大量生産技術の確立

目的に合致するモノクローナル抗体を取得したものの、最終的にリコンビナント抗体の大量調製の段階で困難が生じるケースがあることは多くの研究者が経験している。大腸菌ペリプラズムでの発現、あるいは *Pichia pastoris* 分泌発現系を用いて活性を有する可溶性抗体フラグメントを生産する手法では低収量が問題となっている。また、大腸菌で発現後に不溶性顆粒から段階透析により巻き戻す手法も報告されているが実験に要する時間と操作の煩雑さが難点である。

本研究においては膜蛋白質と共結晶させる目的で大量に (mg オーダーの) 抗体フラグメント精製標品が必要となるため、*Brevibacillus choshinensis* 分泌発現系を用いて Fv および Fab フラグメントを生産し、可溶性かつ活性を有するリコンビナント抗体フラグメントの精製標品を簡便に得る方法を確認した。市販のベクター pNY326 (タカラバイオ) の Sec シグナルペプチド領域の下流に V_L をコードする cDNA を連結して発現プラスミドを構築し、*Brevibacillus* に導入することによって V_L 分泌発現株を作製した。同様にして V_H 分泌発現株も作製した。これら二種の発現株の対数増殖期の細胞を初期密度が 1:1 となるように混合後、25~30°C で二者培養を行った。65~70 時間後に培養上清を回収し、限外濾過膜を用いて分子量 10kDa 以上の画分を濃縮後、図 4 に示すような工程を経て Fv の精製標品を得た。

精製された Fv フラグメントの収量は 1 L 培養あたり 8~10 mg 程度であり、後述するように膜蛋白質に対する結合活性を有することが確認された。また、Fv フラグメント精製標品を 10 mg/mL 程度の高濃度に濃縮した

場合でも、溶液中での Fv フラグメントの凝集は認められなかった。

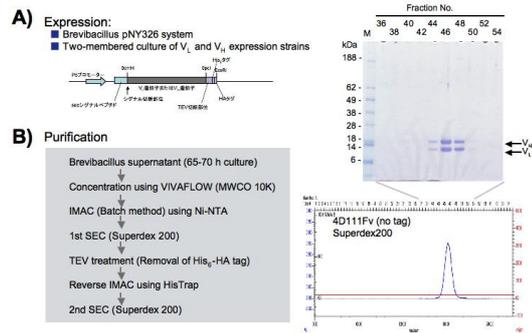


図4. レコンビナント Fv の生産

(3) 膜蛋白質/抗体フラグメント複合体の結晶化および構造解析

作製した抗体フラグメントとターゲット膜蛋白質との複合体をゲル濾過クロマトグラフィーに供した結果、ラット GLUT5 N50Y/Fv フラグメント複合体はゲル濾過の共溶出パターンがシャープな単分散ピークであることを確認したので(図5)、結晶化条件のスクリーニングを実施した。

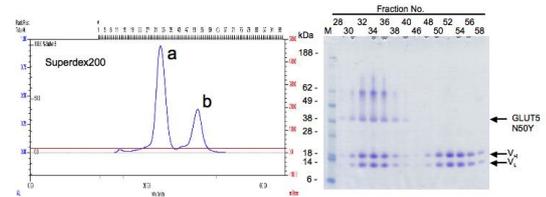
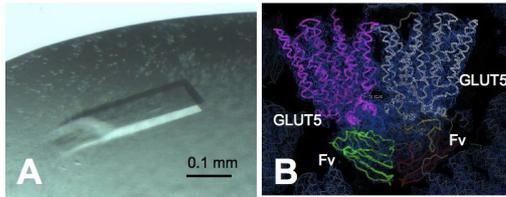


図5. 膜蛋白質/抗体フラグメント複合体のゲル濾過
a: 複合体, b: 抗体フラグメント単体

ある条件にて得られた GLUT5/Fv 抗体フラグメント複合体結晶を SPring-8 BL41XU での X 線回折実験を実施した結果、分解能 3.2 Å での構造解析に成功した(図6)。本成果は、哺乳類の糖輸送体としては初めての解析例となる。得られた構造は細胞外側に開いたコンフォメーション (outward-open conformation) であり、Fv フラグメントが細胞内の親水性ドメインに結合することによりこのコンフォメーションを安定化するものと考えられた。今後、輸送基質の認識に重要と考えられるアミノ酸残基を置換した多数の変異体についても生化学的解析・結晶構造解析を実施し、促進拡散グルコース輸送体の基質輸送の分子機構を解明するとともに、特異的阻害剤の結合様式も明らかにする予定である。



(A)ラットGLUT5 / Fvフラグメント複合体の結晶
(B)GLUT5 / Fv複合体の初期構造モデル

図6. 結晶化リガンドを用いたラット GLUT5 の構造解析

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 Tokuda N, Igarashi K, Shimamura T, Yurugi-Kobayashi T, Shiroishi M, Ito K, Sugawara T, Asada H, Murata T, Nomura N, Iwata S, Kobayashi T. Cloning, expression and purification of the anion exchanger 1 homologue from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Protein Expr Purif.* 2011 Sep;79(1):81-7. 査読有り.
DOI:10.1016/j.pep.2011.04.006
- ② Asada H, Uemura T, Yurugi-Kobayashi T, Shiroishi M, Shimamura T, Tsujimoto H, Ito K, Sugawara T, Nakane T, Nomura N, Murata T, Haga T, Iwata S, Kobayashi T. Evaluation of the *Pichia pastoris* expression system for the production of GPCRs for structural analysis. *Microb Cell Fact.* 2011 Apr 22;10:24. 査読有り.
DOI:10.1186/1475-2859-10-24
- ③ Hino T, Arakawa T, Iwanari H, Yurugi-Kobayashi T, Ikeda-Suno C, Nakada-Nakura Y, Kusano-Arai O, Weyand S, Shimamura T, Nomura N, Cameron AD, Kobayashi T, Hamakubo T, Iwata S, Murata T. G-protein-coupled receptor inactivation by an allosteric inverse-agonist antibody. *Nature.* 2012 Jan 29;482(7384):237-40. 査読有り.
DOI:10.1038/nature10750
- ④ Shiroishi M, Tsujimoto H, Makyio H, Asada H, Yurugi-Kobayashi T, Shimamura T, Murata T, Nomura N, Haga T, Iwata S, Kobayashi T. Platform for the rapid construction and evaluation of GPCRs for crystallography in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact.* 2012 Jun 13;11:78. 査読有り.
DOI:10.1186/1475-2859-11-78

[学会発表] (計1件)

野村紀通, 他 膜蛋白質の X 線結晶構造解析

を支援する抗体工学技術の確立 第 84 回 日本生化学会大会 シンポジウム「多様な生物種における膜タンパク質の機能理解を目的とした新戦略」2011年9月24日, 京都.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 抗ヒトバンド3モノクローナル抗体

発明者: 小林拓也 他

権利者: 科学技術振興機構

種類: 特許

番号: 特願 2011-246364

出願年月日: 2011年11月10日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

野村 紀通 (NOMURA NORIMICHI)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 10314246

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

岩田 想 (IWATA SO)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 60452330