

## 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 24 年 4 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659059

研究課題名（和文）GPCR の三次元構造解明を目指した活性型及び不活性型 GPCR 固定化抗体の作製

研究課題名（英文）Development of antibody stabilizing active or inactive state of GPCRs.

研究代表者 小林 拓也（TAKUYA KOBAYASHI）  
京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：20311730

研究成果の概要（和文）：本研究では、活性型および不活性型 GPCR の X 線結晶構造解析を目指している。そのために、活性型あるいは不活性型 GPCR を安定に固定化するモノクローナル抗体を作製し、平衡状態をどちらか一方に傾けることによって抗体の結合した活性型あるいは不活性型 GPCR を共結晶化する。その結果、アデノシン A2a 受容体を不活性型に固定化する抗体を作製し、アデノシン A2a 受容体の不活性型構造を分解能 3.1 Å で解くことに成功した（Nature 2012）。現在は、アデノシン A2a 受容体を活性型に固定化する抗体を作製することに成功し、結晶化を試みている。

研究成果の概要（英文）：G-protein-coupled receptors are the largest class of cell-surface receptors, and these membrane proteins exist in equilibrium between inactive and active states. Conformational changes induced by extracellular ligands binding to G-protein-coupled receptors result in a cellular response through the activation of G proteins. The adenosine A2a receptor (A2AR) is responsible for regulating blood flow to the cardiac muscle and is important in the regulation of glutamate and dopamine release in the brain. Here we report the raising of a mouse monoclonal antibody against human A2AR that prevents agonist but not antagonist binding to the extracellular ligand-binding pocket, and describe the structure of A2AR in complex with the antibody Fab fragment (Fab2838). This structure reveals that Fab2838 recognizes the intracellular surface of A2AR and that its complementarity-determining region, CDR-H3, penetrates into the receptor. CDR-H3 is located in a similar position to the G-protein carboxy-terminal fragment in the active opsin structure and to CDR-3 of the nanobody in the active  $\beta_2$ -adrenergic receptor structure, but locks A2AR in an inactive conformation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	0	2,000,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	240,000	3,040,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：モノクローナル抗体、GPCR、X 線結晶構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

### これまでの研究成果と着想に至った経緯

プロスタノイドは、生理作用や病態作用に深く関わる生理活性物質であり、9種類の受容体 (GPCR) に働いて作用を発揮する。これまでに申請者らは、動脈硬化の発症・進展におけるプロスタノイドの役割を解明するために、トロンボキサン受容体とプロスタサイクリン受容体欠損マウスに動脈硬化モデルマウスを掛け合わせた。その結果、動脈硬化の発症・進展において、**トロンボキサンは促進的にプロスタサイクリンは抑制的に**作用していることを解明した (Kobayashi, J. Clin. Invest. 2004)。このようにプロスタノイドの中には生体にとって有意な作用を持つものもあり、アスピリン等で全てのプロスタノイド作用を抑えることは必ずしも得策ではなく、受容体特異的なアゴニスト及びアンタゴニストによる制御が必要となる。そこで、申請者は一つの薬剤を投与することで同時に二つの受容体に作用し、動脈硬化を抑制する薬剤を開発したいと考えた。

### 国内・国外の研究動向及び位置づけ

二つの受容体に各々アゴニスト、アンタゴニストとして作用する薬剤の開発には、アゴニストやアンタゴニストの結合した GPCR の結晶構造を解き、受容体の活性化、不活性化のメカニズムを解明するだけでなく、リガンド結合ドメインの立体構造を解明する必要がある。これまでに、GPCR の結晶構造解析は非常に難しいとされていたが、近年になりウシのロドプシン (Science 2000) とオプシン (Nature 2008)、ヒトの  $\beta_2$  アドレナリン受容体 (Nature 2007, Science 2007) とアデノシン受容体 (Science 2008)、ターキーの  $\beta_1$  アドレナリン受容体 (Nature 2008) の結晶構造が解かれた。 $\beta_2$  アドレナリン受容体は、第三細胞内ループを認識する抗体を結合さ

せ、複合体として結晶構造が解かれている。

## 2. 研究の目的

本研究では、活性型および不活性型 GPCR の X 線結晶構造解析を目指している。そのために、活性型あるいは不活性型 GPCR を安定に固定化するモノクローナル抗体を作製し、平衡状態をどちらか一方に傾けることによって抗体の結合した活性型あるいは不活性型 GPCR を共結晶化する。将来的には、アゴニスト、アンタゴニストの結合様式や作用機序を解明するだけでなく、インバースアゴニストの開発や一つの薬剤で複数の受容体を同時に制御する理論的な創薬分子設計に寄与したい。

## 3. 研究の方法

通常、GPCR は活性型と不活性型の平衡状態にあり、アゴニストとインバースアゴニストが、活性型と不活性型に平衡状態を傾ける。GPCR の結晶構造解析を難しくしている一つの理由に、この平衡状態をどちらか一方に安定に固定化することが難しい事が挙げられる。全ての GPCR でインバースアゴニストが開発されている訳ではなく、特にアゴニスト結合型 (活性型) 受容体は、不安定であると考えられている。本研究は、GPCR を活性型あるいは不活性型に固定化するモノクローナル抗体の作製を試みる。我々は、GPCR を酵母 (Yurugi-Kobayashi, BBRC 2009, Sugawara, BBRC 2009) と昆虫細胞 (Asada, Microb. Cell Fact. 2011) に強制発現させ、発現量の高い GPCR をスクリーニングしている。アデノシン受容体については、精製受容体をリボソーム化し、マウスに免疫することで、モノクローナル抗体作製に成功している。また、アデノシン受容体を不活性型に固定化する抗体も得られた。同様に、その他の GPCR についてもモノクローナル抗体を作製し、活性型及び

不活性型固定化 GPCR 抗体をスクリーニングしたい。

#### 4. 研究成果

「構造に指南された創薬戦略」が期待されるケースは、特異的なリガンド（アゴニスト及びアンタゴニスト）の開発が難しい場合か、特異性は高いが結合親和性が向上しない場合である。一方、これまでの X 線結晶構造解析の成功例を振り返ってみても、GPCR に対する結合親和性の高いリガンドが必要不可欠とされている。明らかに GPCR の X 線結晶構造解析の目標と現実には、ジレンマが存在している。この問題を解決するために、小林は「結晶化補助因子」として GPCR に対して高い特異性と親和性を兼ね備えた抗体を創製する技術を確立した（特願 2009-110994、PCT 出願）。本抗体を用いることにより、GPCR は構造的なゆらぎ（動的構造）を生じない特定のコンフォメーションに安定化され、GPCR / 抗体複合体の全体としての親水性表面が拡大し、結晶性が向上する。小林らは、ヒト由来アデノシン A2a 受容体の構造認識抗体を作製し、アデノシン A2a 受容体 / 抗体複合体の結晶構造を分解能 3.1 Å で解くことに成功した (*Nature* 2012) (図 1)。この抗体はアロステリックなインバーサアゴニストとして作用し、アデノシン A2a 受容体を不活性型構造に固定化するので、結合親和性の低いカフェインと一緒に共結晶化することもできる（未発表データ）。今後は、リガンドの開発が難しい（結合親和性の高いリガンドのない）GPCR やオーファン受容体にも応用できる技術として期待している。また、アゴニストの親和性を向上させる抗体（活性型固定化抗体）も作製することに成功し、現在結晶化を試みている。

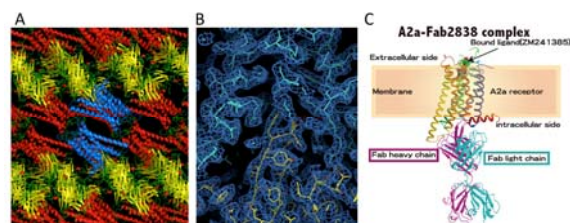


図 1. アデノシン A2a 受容体-抗体 Fab フラグメント複合体の結晶構造. (A) 結晶中でのアデノシン A2a 受容体と抗体 Fab フラグメントのパッキング. アデノシン A2a 受容体を赤色、抗体を黄色で描いた. 結晶中でアデノシン A2a 受容体は反平行ダイマーを形成していた (青で示した 2 分子). (B) アデノシン受容体と抗体 Fab フラグメント相互作用部位の 2.7 Å での電子密度図. (C) アデノシン A2a 受容体-抗体 Fab フラグメント複合体の全体構造. 抗体 Fab フラグメントはアデノシン A2a 受容体の細胞内側表面に結合している.

#### 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 9 件)

1. Haga, K., Kruse, A. C., Asada, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shiroishi, M., Zhang, C., Weis, W. I., Okada, T., \*Kobilka, B. K., \*Haga, T. and \*Kobayashi, T. Structure of the human M<sub>2</sub> muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* 482, 547-551 (2012), doi:10.1038/nature10753. 査読有
2. 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, A. D., Kobayashi, T., Hamakubo, T., \*Iwata, S. and \*Murata, T. G protein-coupled receptor inactivation by an allosteric inverse-agonist antibody. *Nature* 482, 237-40 (2012), doi:10.1038/nature10750. 査読有
3. Shimamura, T., Shiroishi, M., Weyand, S., Tsujimoto, H., Winter, G., Katritch, V., Abagyan, R., Cherezov, V., Liu, W., Han, G. W., \*Kobayashi, T., \*Stevens, R. C. and \*Iwata, S. Structure of the human histamine H<sub>1</sub> receptor complex with doxepin. *Nature* 475, 65-70 (2011), doi:10.1038/nature10236. 査読有
4. Tokuda, N., Igarashi, K., Shimamura, T., Yurugi-Kobayashi, T., Shiroishi, M., Ito, K., Sugawara, T., Asada, H., Murata, T., Nomura, N., \*Iwata, S. and \*Kobayashi, T. Cloning, expression and purification of the anion exchanger 1

homologue from basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Protein Expr. Purif.* 79, 81-87 (2011) (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592811000866>). 査読有

5. 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. and \*Kobayashi, T. Evaluation of the *Pichia pastoris* expression system for the production of GPCRs for structural analysis. *Microb. Cell Fact.* 10, 24 (2011) (<http://www.microbialcellfactories.com/content/10/1/24>). 査読有

6. Ito, K., Sugawara, T., Koizumi, A., Nakajima, K., Shimizu-Ibuka, A., Shiroishi, M., Asada, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shimamura, T., Asada, T., Misaka, T., Iwata, S., \*Kobayashi, T. and \*Abe, K. Cysteine-to-serine shuffling using a yeast expression system improves protein secretion: case of a nonglycosylated mutant of miraculin, a taste-modifying protein. *Biotech. Lett.* 33, 103-107 (2011) (<http://www.springerlink.com/content/j624126g77180652/>). 査読有

7. Ito, K., \*Ito, S., Shimamura, T., Kawarasaki, Y., Kobayashi, T. and Iwata, S. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a Glucansucrase from the dental caries pathogen *Streptococcus mutans*. *Acta. Crystallogr. Sect. F*, 66 (Pt9), 1086-1088 (2010) (<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S1744309110029714>). 査読有

8. Ito, K., Sugawara, T., Koizumi, A., Nakajima, K. I., Shimizu-Ibuka, A., Shiroishi, M., Asada, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shimamura, T., Asakura, T., Masuda, K., Ishiguro, M., Misaka, T., Iwata, S., \*Kobayashi, T. and \*Abe, K. Bulky high-mannose-type N-glycan blocks the taste-modifying activity of miraculin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1800, 986-992 (2010) (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416510001625>). 査読有

9. Sakurai, T., Misaka, T., Ishiguro, M., Masuda, K., Sugawara, T., Ito, K., Kobayashi, T., Matsuo, S., Ishimaru, Y., Asakura, T. and \*Abe, K. Characterization of the  $\alpha$ -D-glucopyranoside binding site

of the human bitter taste receptor hTAS2R16. *J. Biol. Chem.* 285, 28373-28378 (2010) (<http://www.jbc.org/content/285/36/28373.long>). 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. Ligand Recognition and Molecular Gating GRC in Ventura, CA, USA, 2012 年 1 月 20 日

2. 第 85 回日本薬理学会年会、「X 線結晶構造解析とシステムバイオロジーの融合による G 蛋白質共役受容体 (GPCR) の新たな創薬展開」、京都、2012 年 3 月 15 日

3. 第 84 回日本生化学会大会、「多様な生物種における膜蛋白質の機能理解を目指した新戦略」、京都、2011 年 9 月 24 日

4. 第 84 回日本薬理学会年会、構造生物学と薬理学「G タンパク質共役受容体 (GPCR) の三次元結晶構造解析への試み」、横浜、2011 年 3 月 24 日

5. GPCR Workshop 2010、「A GFP-based platform for rapid construction and evaluation of highly expressed and stable GPCR variants in *Saccharomyces cerevisiae*」、Hawaii、約 200 名、2010 年 12 月 9 日

[図書] (計 1 件)

G タンパク共役受容体 (GPCR) の三次元結晶構造解析への試み、小林拓也、バイオインダストリー、2011 年 3 月、総ページ数 10 ページ、シーエムシー出版

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称:「膜蛋白質の立体構造を認識するモノクローナル抗体のスクリーニング方法」

発明者: 岩田 想・小林拓也・野村紀通

権利者: 科学技術振興機構

種類: PCT 国際特許

番号: PCT/JP2010/57631

出願年月日: 2010 年 4 月

国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ等

[http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad\\_school/introduction/1502/](http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad_school/introduction/1502/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 拓也 (TAKUYA KOBAYASHI)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号: 20311730

(2)研究分担者

万木 貴美 (TAKAMI YURUGI)  
京都大学・医学研究科・研究員  
研究者番号：90467473

野村 紀通 (NORIMICHI NOMURA)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：10314246

(3)連携研究者

岩田 想 (SO IWATA)  
京都大学・医学研究科・教授  
研究者番号：60452330