

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659132

研究課題名(和文) 受容体の立体構造を基盤とするリガンド探索を目指したオーファン受容体の構造解析

研究課題名(英文) Search for the endogenous ligand based on the orphan receptor structure

研究代表者

小林 拓也 (Kobayashi, Takuya)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20311730

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)：ヒト遺伝子には約600種のGPCRが存在すると言われているが、約160種のGPCRは内在性リガンドが不明な「オーファン受容体」と呼ばれている。本研究は、GPCRの立体構造を基盤としたリガンドの探索を目指している。そのために、オーファン受容体を発現・精製、結晶化することにより、原子分解能レベルでリガンド結合ドメインの構造解明したい。受容体を昆虫細胞で大量発現・精製後、リボソームに再構築してマウスに免疫し、次にリボソームELISA法とドットプロテイング法を併用して立体構造認識抗体のスクリーニングを行った。その結果、N末端、C末端のシークエンシャルエピトープを認識する抗体のみがスクリーニングされた。

研究成果の概要(英文)：G protein coupled receptors (GPCRs) are nature's most versatile chemical sensors. There are over 600 GPCRs in the human genome and they respond to a broad spectrum of chemical entities ranging from photons, protons and calcium ions, to small organic molecules (including odorants and neurotransmitters), to peptides and glycoproteins. However, for 25% of GPCRs, endogenous ligands have not yet been identified. We would like to determine the structure of orphan receptor and search for the endogenous ligands based on these structures. To determine the structure of orphan receptor, we have tried to develop the monoclonal antibody recognizing the conformational epitope of receptor. As a result, several monoclonal antibodies recognizing the sequential epitope of orphan receptors have been screened.

研究分野：GPCR生化学・薬理学

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

GPCR の立体構造を体系的かつ網羅的に解明してゆくことは、迅速な候補化合物探索手法の開発、候補化合物の最適化、副作用の少ない化合物の分子設計に繋がる。しかし、GPCR の構造解析は非常に難しく、2000 年にウシ・ロドプシンの構造が報告されて以来、7 年間 GPCR の構造は解かれなかった。2007 年は GPCR の結晶構造解析において大きな転機となった。ヒトの β_2 アドレナリン受容体の結晶構造が世界で初めて明らかとなった。GPCR の構造解析には、立体構造を認識し特定のコンフォメーションに固定化する抗体を作製するか、第 3 細胞内ループを T4 lysozyme (T4L) に置き換えて安定化した GPCR を脂質キュービック相に結晶化する必要があった。そこで小林らは、同様な解析技術を立ち上げ、三つの GPCR (アデノシン A2a 受容体、ヒスタミン H1 受容体、ムスカリン M2 受容体) の結晶構造を高分解能で解明することに成功した。アデノシン A2a 受容体については、立体構造認識抗体を作製し、受容体 / 抗体複合体の結晶構造を 2.7 Å で決定した (Nature 2012)。

国内・国外の研究動向及び位置づけ

従来、オーファン受容体のリガンド探索は、何らかの細胞にターゲットとなる GPCR を発現させ、その細胞に生体材料からの抽出物を作用させて、その結果引き起こされる細胞内でのセカンドメッセンジャーの量の変化を用いて行われていた。しかし、この方法では既存のリガンドがないオーファン受容体が、どのような細胞内情報伝達系を活性化させるか不明な場合が多い。そこで、近年著しく進歩した GPCR の構造解析技術を利用して、構造生物学的アプローチによりオーファン受容体の立体構造を基盤としたナチュラルリガンドの探索、合成アゴニスト、合成アンタゴニストの開発を行いたいと考えている。

ヒスタミン H1 受容体とムスカリン M2 受容体の場合、オルソステリックリガンド結合部位に加え、アロステリック結合部位の構造も明らかとなり、今後システムバイオロジーと融合させることにより、新たな制御因子の開発やバーチャルスクリーニングも可能になると期待している。

2. 研究の目的

小林らは、その殆どがオーファン受容体として知られている苦味受容体を酵母に強制発現させ発現量の高い受容体をスクリーニングしている (BBRC 382, 704-10, 2009)。また、約 24 時間周期でおこるサーカディアンリズムに關与するオーファン受容体を昆虫細胞に強制発現させ高純度精製することにも成功している (未発表データ)。次に、これらのオーファン受容体を用いて立体構造を認識する抗体と第 3 細胞内ループを T4L に置き換えた変異体を作製する。研究期間内に、受容体 / 抗体複合体と (あるいは) T4L 融合型オーファン受容体の脂質キュービックフェーズ法による結晶を創出し、高分解能で結晶構造を決定したい。二つの異なる手法を用いることで成功の可能性を向上させる。

3. 研究の方法

これまでに酵母において発現の高かった苦味受容体と昆虫細胞において発現の高かった (サーカディアンリズムに深く関連した) GPCR を発現、精製、リポソームに再構築した後、マウスに免疫する (リポソーム免疫法)。スクリーニングには、リポソーム ELISA 法、ドットプロットティング、Biacore を用いる。これらのスクリーニング方法により、GPCR の立体構造を認識する抗体を得る。また、GPCR の第 3 細胞内ループを T4L に置き換えて安定化した GPCR (GPCR-T4L) も調整する。GPCR / 抗体複合体と GPCR-T4L は、脂質キュービック相に結晶化する。膜蛋白質用の微量サン

プル結晶化ロボット (LCP モスキート) を用いれば、僅か 50 μ g の蛋白質で 100 条件のスクリーニングが可能となる。精製した GPCR を用いて順次結晶化条件のスクリーニングを行う。可能であれば、データ測定、構造解析へと進みたい。

4. 研究成果

酵母において、最も発現の高かった苦味受容体 (TAS2R16, 41) と昆虫細胞において発現の高かった (サーカディアンリズムに深く関連した) GPCR を大量発現・精製した。精製した GPCR は、サルモネラ菌由来の lipid A とホスファチジルコリンで再構成しプロテオリポソームとしてマウスに免疫した。結晶化リガンドとしての立体構造認識抗体のスクリーニングには、SDS で変性させた GPCR (フレキシブルな領域) を認識する抗体を除去するために、リポソーム ELISA 法とドットブロッキング法を併用した。その結果、苦味受容体については、C 末端に親水性蛋白質 (bRIL など) を融合することで単一に精製できることが明らかとなった。サーカディアンリズムに関与する GPCR については、精製した蛋白は凝集しやすいものの、ほぼ単一に精製することができた。次に、これらの精製蛋白をプロテオリポソームとしてマウスに免疫したところ、苦味受容体については、C 末端に融合した親水性蛋白質に対する抗体がスクリーニングされた。サーカディアンリズムに関与する GPCR については、ドットブロッキング陽性のペプチドシーケンスを認識する抗体がスクリーニングされた。GPCR の立体構造を認識する抗体は取得できなかった。

また、GFP を指標とした出芽酵母発現システム (Micob. Cell Fact. 2012) を用いて第 3 細胞内ループを T4L や bRIL に置き換えて安定化した苦味受容体のコンストラクトをスクリーニングした。このシステムは、幾つかの PCR フラグメントと発現ベクターを酵母と

一緒に混ぜるだけで、簡単に変異体の作製が可能となり、目的蛋白質の C 末端に GFP を融合させることで、精製することなく目的蛋白質の単分散性を評価することができる。その結果、第 3 細胞内ループの短い苦味受容体に T4L や bRIL を挿入すると全体構造が崩れて不安定になることが明らかとなった。さらに、C 末端に GFP を融合したコンストラクトは、単分散性を保持したまま安定に精製することができることから、GFP を T4L や bRIL に置き換えてみると、同様に精製できることが明らかとなった。これらの精製サンプルを脂質キュービック相に結晶化を試みたが、回折像の得られる結晶は取得できていない。

平成 25 年度からは、愛媛大学の澤崎先生との共同研究により、コムギ無細胞系を導入した。本系を用いる利点は、膜蛋白質をリポソームに直接発現させることができるため、精製する必要がなくなることである。まず始めにプロスタグランジン E 受容体をモデルにスタートさせた。コムギ無細胞系で発現させた受容体は、リガンド結合実験により、活性があることを確認し、マウスに免疫した。その結果、ウェスタンブロッキング陰性の抗体をスクリーニングすることができた。N 末端を含む複数の領域を認識している可能性が示唆されている。現在、オーファン受容体をターゲットとして検討している。

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 4 件)

1. Shiroishi, M., Kobayashi, T., Ogasawara, S., Tsujimoto, H., Ikeda-Suno, C., Iwata, S. and Shimamura, T. Production of the stable human histamine H1 receptor in *Pichia pastoris* for structural determination. *Methods* 55, 281-286, 2012.
2. Shiroishi, M., Tsujimoto, H., Makyio, H., Asada, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shimamura, T., Nomura, N., Haga, T., Iwata, S. and *Kobayashi, T. Platform for the rapid construction and evaluation of GPCRs for crystallography in *Saccharomyces cerevisiae*.

- Micob. Cell Fact. 11, 78, 2012.
- Murai, Y., Masuda, K., Ogasawara, Y., Wang, L., Hashidoko, Y., Hatanaka, Y., Iwata, S., Kobayashi, T., and Hashimoto, M. Synthesis of photoreactive 2-phenethylamine derivatives - Synthesis of adenosine derivative enabling functional analysis of adenosine receptors by photoaffinity labeling. Eur. J. Org. Chem. 2013, 2428-2433, 2013.
 - Suharni, Nomura, Y., Arakawa, T., Hino, T., Abe, H., Nakada-Nakura, Y., Sato, Y., Iwanari, H., Shiroishi, M., Asada, H., Shimamura, T., Murata, T., Kobayashi, T., Iwata, S. and Nomura, N. Proteoliposome-based selection of a recombinant antibody fragment against the human M2 muscarinic acetylcholine receptor. Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother. 33, 378-385, 2014.

〔学会発表〕(計9件)

- 小林拓也, GPCR をターゲットにした「構造に指南された創薬」を目指すための三つの戦略、構造活性フォーラム 2012、京都、2012年6月22日。
- 小林拓也, GPCR をターゲットにした X 線結晶構造解析の現状と今後の展望、2012年日本神経化学会公開シンポジウム、神戸、2012年9月30日。
- 小林拓也, GPCR の X 線結晶構造解析と創薬に必要な GPCR の構造情報について、よこはま NMR 構造生物学研究会、横浜、2013年7月3日。
- 小林拓也, GPCR のシグナル伝達分子機構の解明から創薬に向けて、第 86 回日本生化学会大会、横浜、2013年9月12日
- 小林拓也, 機能性抗体を利用した GPCR の X 線結晶構造解析への試み、千里ライフサイエンスセミナー、大阪、2013年10月16日。
- 小林拓也, GPCR の立体構造を認識する抗体から広がる新たな生命科学、第 87 回日本内分泌学会学術総会、福岡、2014年4月25日。
- 小林拓也, G 蛋白質共役受容体の構造生物学の進展とその創薬への応用、第 87 回日本内分泌学会学術総会、福岡、2014年4月25日。
- 小林拓也, シグナル伝達の選択的な制御を指向した GPCR の構造生命科学を目指して、ERATO 末松最終研究成果報告会、東京、2015年1月29日
- 小林拓也, シグナル伝達の選択的な制御を指向した GPCR の構造生命科学、日本薬学会第 135 年会、神戸、2015年3月27日。

〔図書〕(計7件)

- Shiroishi, M. and *Kobayashi, T. Chapter 9: Screening of stable G-protein-coupled

- receptor variants in *Saccharomyces cerevisiae*. “Structural Proteomics High-Throughput Methods”. Methods in Molecular Biology 1261, 159-170, 2015.
- 小林拓也, 岩田 想, GPCR の X 線結晶構造解析に成功するための技術的進展、実験医学、羊土社、Vol. 31、No. 3、PP. 358-366、2013年。
 - 浅田秀基, 小林拓也, 昆虫細胞による生産、膜タンパク質構造研究 最前線、化学同人、PP.96-102、2013年。
 - 小林拓也, ムスカリン性アセチルコリン受容体、膜タンパク質構造研究 最前線、化学同人、PP. 19-25、2013年。
 - 村田武士, 野村紀通, 小林拓也, 岩田 想, 「膜タンパク質」の重要性とその構造が拓く未来、膜タンパク質構造研究 最前線、化学同人、PP. 1-10、2013年。
 - 小林拓也, G 蛋白質共役受容体の X 線結晶構造解析の進歩、血栓と循環、メディカルレビュー、Vol. 21、No. 3、PP. 34-40、2013年。
 - 小林拓也, 岩田想, GPCR の立体構造から解き明かす生命科学、実験医学 増刊、羊土社、Vol. 32、No. 10、pp. 84-91、2014年。

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://cell.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/>

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

なし

(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