

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710251

研究課題名(和文) GPCRを対象とした無細胞発現プロテオリポソームを用いた機能性抗体検出技術の開発

研究課題名(英文) Assay development for analyzing high performance antibody selection based on cell-free synthesized GPCR proteoliposome.

研究代表者

竹田 浩之(Takeda, Hiroyuki)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・助教

研究者番号：40609393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：リポソーム添加コムギ無細胞タンパク質合成技術を用いて合成したGPCRプロテオリポソームを基盤として、AlphaScreen、ELISA、Biacoreによる膜タンパク質抗原と抗体間の相互作用解析技術を開発した。AlphaScreenとELISAはスループットが高く抗体一次選抜に適しているが、特にAlphaScreenは構造認識抗体の検出率に優れていた。本研究で開発した手法を用いてDRD1抗体の選抜および性状解析を行なった。その結果、無細胞合成プロテオリポソームを用いた免疫および抗体選抜手法は、これまで困難であった抗膜タンパク質抗体開発を加速させるに十分なポテンシャルをもつことを示している。

研究成果の概要(英文)：We developed a high-throughput screening method using cell-free synthesized proteoliposome based on AlphaScreen, ELISA, Biacore, respectively. AlphaScreen and ELISA had excellent throughput, thus suitable for primary screening of monoclonal antibodies. Especially AlphaScreen was superior for conformational sensitive antibody selection. Using the methods developed in this study, we conducted screening and functional analysis of anti-GPCR monoclonal antibody. We immunized mice with cell-free synthesized and purified DRD1 proteoliposome and developed 800 hybridoma lines. Primary screening of 800 hybridoma was performed using AlphaScreen and ELISA, respectively, and 36 specific monoclonal antibodies were selected. They were high affinity and applicable for multiple applications. These results demonstrated that the technology based on cell-free synthesized GPCR proteoliposome may provide advantageous materials and assay methods for monoclonal antibody production.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：膜タンパク質 無細胞タンパク質合成 プロテオリポソーム GPCR モノクローナル抗体 スクリーニング AlphaScreen

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質はヒトゲノムがコードするタンパク質の1/3を占め、シグナル伝達の受容体や物質輸送に関わる輸送体として機能しており、細胞膜によって仕切られた細胞の内外を取りもつ重要な存在である。しかし、その重要性にも関わらず膜タンパク質の機能・構造の解析は可溶性タンパク質に比べてはるかに遅れている。その原因の一つが膜タンパク質を大量に生産する大量発現技術や膜タンパク質に特異的に結合する抗体、相互作用検出法などの研究ツールの不備である。

特に、抗膜タンパク質抗体は膜タンパク質の局在解析、機能解析やX線構造解析など膜タンパク質研究に必須なツールであり (Bill et al. Nature Biotechnol 2011)、また抗体医薬への応用も期待されている。これらの目的のためには、抗体は結合親和性の高さだけではなく、さらに未変性タンパク質に結合できることが求められる。細胞で発現している膜タンパク質は複雑な立体構造をとっており、タンパク質の一部のアミノ酸配列のみを認識する配列認識抗体では結合できないことも多い。

構造認識抗体作製を困難にしているのは、正しい立体構造を維持した膜タンパク質抗原が大量に必要なためである。従来、抗膜タンパク質抗体作製のための抗原としては昆虫細胞などで発現させた膜タンパク質を界面活性剤でミセル状に可溶化したものや、一度可溶化した膜タンパク質を人工的に作成した脂質小胞 (リポソーム) に再構成したプロテオリポソームが用いられてきた。しかし、ミセル中の膜タンパク質は不安定で変性しやすく、また膜タンパク質の発現やリポソーム再構成の条件は膜タンパク質の種類により異なるため汎用的に用いることができないなどの問題点があった。

近年、我々はリポソームをコムギ無細胞タンパク質発現系に添加することで、膜タンパク質を従来よりも簡便にかつ大量に生産する技術を開発した (Nozawa et al. BMC Biotechnol 2011)。本手法は試験管内において (図1) に埋包した状態で発現させることを特徴とする。我々は、生理的に正しい構造を認識する抗体を作製・選抜するための抗原に、コムギ系で発現させたプロテオリポソームが適していると考え、コムギ無細胞系で合成したプロテオリポソームをマ

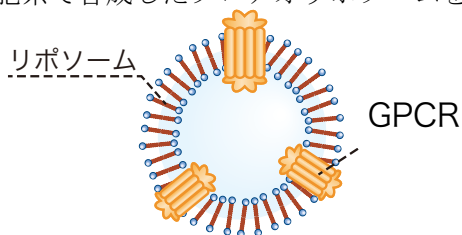


図1. プロテオリポソーム

ウスに免疫し、抗膜タンパク質モノクローナル抗体を作製する技術の開発に取り組んできた。その過程でこれまで我々が改良してきたハイスループットスクリーニング法 (Matsuoka et al. J Proteome Res 2010) をベースに、リポソーム上の抗原膜タンパク質と抗体との反応を高感度に検出する方法を新たに考案した (AlphaScreen 法、図2)。本手法は2種類のビーズを用いてビオチン化プロテオリポソームと抗体の相互作用を高感度で検出する手法で、洗浄過程を必要としないホモジニアス系で高速なスクリーニングを可能とする。

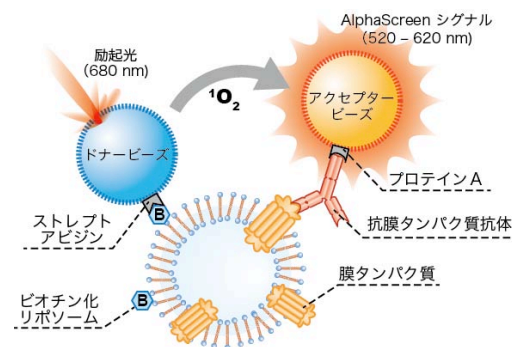


図2. AlphaScreen 法

2. 研究の目的

コムギ無細胞系で発現させたプロテオリポソームは抗膜タンパク質特異的抗体の作製において免疫抗原としてだけではなく、モノクローナル抗体の選抜やエピトープマッピングなど様々な局面で用いることができる可能性がある。本研究では、コムギ無細胞合成プロテオリポソームを軸として、それを AlphaScreen や ELISA、Biacore などに展開した新たなアッセイ系の構築を目的とした。コムギ発現プロテオリポソームを免疫抗原として作製した GPCR に対するモノクローナル抗体を材料に、ポジティブクローンのスクリーニングや得られた抗体の性状解析を行なうための抗体検出技術の開発とその評価を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

ドーパミン受容体 DRD1 をコムギ無細胞タンパク質合成系を用いて合成した。アゾレクチンを用いて直径 100 nm のリポソームを調製し、コムギ無細胞蛋白質合成系に添加した。合成したプロテオリポソームは必要に応じて遠心、バッファー再懸濁を行なうことで精製した。

DRD1プロテオリポソームを抗原としてマウスに免疫し、約 800 クローンのハイブリドーマラインを作製した。800 種類のハイブリドーマ上清を direct ELISA および AlphaScreen 法を用いて抗原 DRD1 への結合を確認した。

本研究ではスクリーニングのために

ELISA と AlphaScreen の 2 つのアッセイ法を用いた。ELISA は抗原膜タンパク質を合成したリポソームを直接タイタープレート固相上に固定化する Direct ELISA 法を用いた。スキムミルクによるブロッキング、抗体溶液処理後、抗原に結合した抗体を二次抗体に結合した HRP で検出した。AlphaScreen による抗原抗体反応検出は下記のとおり実施した。少量のビオチン化脂質をアズレクチンに混和した混合脂質を薄膜化しバッファーで膨潤超音波処理し、ビオチン化リポソームを調製した。ビオチン化リポソーム上に無細胞系を用いて膜タンパク質を合成し、ビオチン化プロテオリポソームを得た。ビオチン化リポソームに抗体溶液を混和し、リポソーム上の抗原と抗体の結合を AlphaScreen ビーズで検出した。

他に、抗体の親和性解析のためには Biacore を用いた。Biacore のためには、界面活性剤を用いてプロテオリポソームを可溶化したプロテオミセルを調製した。センサーチップ上に Protein G をアミンカップリングを用いて固定化し、抗体をキャプチャーした。抗原プロテオミセルをアナライトとして流し、結合様式を SPR で観察した。

抗体の結合様式の解析はウェスタンブロットティングと免疫沈降を用いて行なった。ウェスタンブロットのためには合成した DRD1 プロテオリポソームを SDS-PAGE にかき PVDF メンブレンにブロットした。メンブレンをレーンごとに切断し、各断片を異なる抗体希釈液で処理し、結合した抗体を抗マウス二次抗体で検出した。免疫沈降のためには ^{13}C -Leu ラベルを添加して翻訳した DRD1 リポソームを調製した。Protein G マグネットビーズに抗体をキャプチャーさせた後に、アイソトープラベル DRD1 リポソームと結合させた。洗浄後、ビーズを SDS-PAGE サンプルバッファーで処理して結合した DRD1 を遊離させ、オートラジオグラフィーで検出した。

抗体のエピトープマッピングは以下のとおり実施した。DRD1 の細胞内/細胞外ループおよび N 末、C 末領域を他の GPCR と入れ替えたスワップクローンを PCR を用いて作製した。スワップクローンをコムギ無細胞系を用いてビオチン化プロテオリポソームとして合成した。抗体との相互作用を AlphaScreen を用いて解析した。

4. 研究成果

無細胞合成したプロテオリポソーム抗原を用いた抗膜タンパク質抗体解析法の開発を進めた。ELISA 法はプロテオリポソーム抗原の添加量や洗浄回数、384 well プレートによる高密度化を検討し、スループットの向上に成功した。

AlphaScreen 法は至適実験条件の検討により、当初よりも数倍の感度向上を達成した。また、実際にスクリーニングを実施したことにより、培地の種類によっては抗原抗体反応の検出ができないという問題点が判明した。これは培地によってはビタミンであるビオチンや、界面活性剤を添加していることが原因であった。ビオチンは AlphaScreen においてビオチン化リポソームとストレプトアビジンビーズの間の相互作用を拮抗的に阻害する。界面活性剤はリポソームの構造を不安定にする。この問題を解決するためにハイスループットな抗体簡易精製系を導入した。Protein G セファロースと 96 穴フィルタープレートを用いることにより、2000 サンプルのハイブリドーマ培養上清から抗体を 2 時間以内に精製する手法を開発した。本手法を用いることによりビオチンや界面活性剤を含まない抗体をアッセイすることが可能になった。

無細胞合成プロテオリポソームと Biacore を用いたアッセイ系構築を予定していたが、プロテオリポソームを Biacore にインジェクトすると高確率で流路が目詰まりすることが判明すること、スループットがどうしても限定的であることなど、一次スクリーニングには適さないことがわかった。しかしリポソームを界面活性剤で可溶化したプロテオミセルは目詰まりすること無くアッセイすることが可能であった。抗原あるいは抗体をセンサーチップ上にキャプチャーする 2 つのアッセイ法を開発した。1 つはビオチンキャプチャー法である。翻訳時に酵素的に GPCR をビオチン化し、その後可溶化したビオチン化抗原を調製した。ヌクレオチドリンカー融合ストレプトアビジンを介してビオチン化抗原を CAP センサーチップ上にキャプチャーし、抗体をアナライトとして流し抗原抗体相互作用を検出した。リンカーストレプトアビジンごと抗原、抗体をチップ上から剥がすことによりセンサーチップを再生し、数十回の連続アッセイを可能とした。もう一つは Protein G キャプチャー法である。Protein G をセンサーチップ上にアミンカップリングを用いて固定化した。そのチップ上に抗体をキャプチャーし、ミセル化した抗原をアナライトとして添加して結合を検出した。Protein G 再生液の検討により、数十回の使用に耐える条件を見いだした。これらの手法を用いて抗体の K_D 値の算出、抗体液中の抗体濃度の見積もりなどが可能になった。

ドーパミン受容体 DRD1 のプロテオリポソームをコムギ無細胞タンパク質合成系を用いて合成し、これを抗原としてマウスに免疫し、約 800 クローンのハイブリドーマを作製した。本研究で開発したスクリーニング手法の比較のため、800 種類全てについて ELISA および AlphaScreen 法の両方でスクリーニングした。その結果、

AlphaScreen と ELISA で DRD1 に対する結合が異なる抗体を産生する株が多数見られた (図 3)。

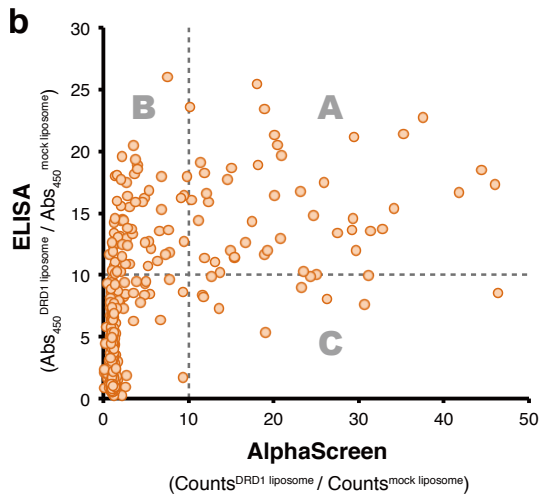


図 3. 800 クローンのハイブリドーマ上清のスクリーニング

反応性の異なる 143 抗体についてウェスタンブロッティングと免疫沈降法により結合様式を精査した (図 4)。ウェスタンブロッティングは SDS によって変性した抗原に結合する抗体を検出する。一方、免疫沈降は未変性の抗原に結合する。その結合パターンを比較することにより、抗体の結合様式を決定することができる。AlphaScreen で高い値を示した抗体は構造認識型抗体、すなわち未変性抗原に結合するが変性抗原に結合しない抗体が比較的多かった。一方で ELISA は AlphaScreen に比べると偽陽性クローンの可能性がやや高くなる傾向が見受けられた。この結果は AlphaScreen 法が構造認識抗体の選抜に有効であることを示している。

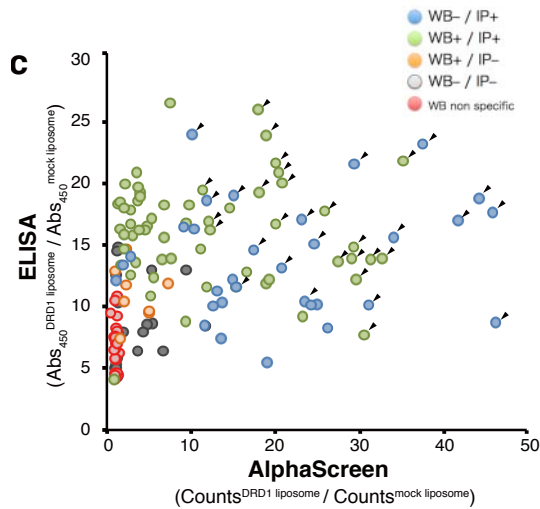


図 4. 抗体の結合様式の比較. 青は構造認識抗体を示す。

AlphaScreen 法を応用して抗体のエピトープを決定する系を開発した。抗原 DRD1 の各ループ領域を別の GPCR と交換したスワップ変異体を作製し抗体との結合を AlphaScreen で観察した。本手法を用いれば、抗原 GPCR のおおまかな構造を維持したままエピトープの探索が可能で、インバース PCR による鋳型改変、コムギ無細胞系、AlphaScreen の組み合わせにより迅速にエピトープを決定することが可能である。一次スクリーニングの結果反応性の高かった 36 抗体についてエピトープを決定した (図 5)。そのほとんどは DRD1 の C 末領域を認識する抗体であったが、1 抗体のみ細胞外第二ループを認識、結合することが分かった。

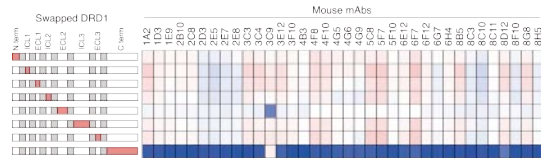


図 5. エピトープマッピング

同様の手法を用いて、抗体のサブタイプ特異性を確認した。DRD1 のマウスおよびヒトホモログ 6 種を無細胞系を用いてプロテオリポソーム上に合成し、抗体と反応させた。抗原-抗体反応は AlphaScreen を用いて検出した。その結果、得られた全ての抗体は DRD1 以外のファミリーには交差反応しない非常に特異性の高い抗体であることがわかった。そのうち 1/3 はマウス Drd1 にも反応せず、ヒト DRD1 特異的な抗体であった。

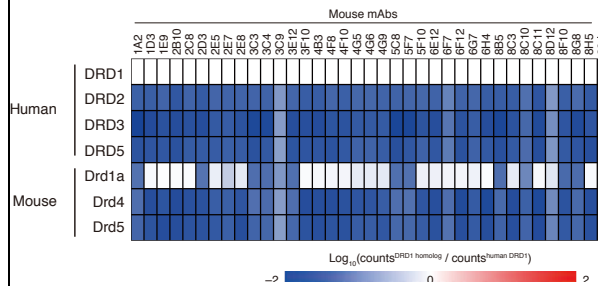


図 6. サブタイプ特異性

また、抗体の詳細なアフィニティを算出した。得られた抗体の半数は Biacore で全く解離が見られず、正確なカイネティクスを算出できないものもあったため、ELISA とスキャッチャードプロットによる手法も用いてアフィニティを算出した。調べた抗体のうち、約半数は Kd 値が 0.1 nM 程度と非常に高いアフィニティを示した。

本研究により、プロテオリポソームをベースとした ELISA, AlphaScreen, Biacore という 3 つの抗原抗体反応解析手法が確立

した。前者2つはスループット性に優れ、多数のハイブリドーマ上清をアッセイする一次スクリーニングに適している。特にAlphaScreenは構造認識抗体の検出率に優れ、スループット性は際立って高い。一方で、ELISAはコストパフォーマンスに優れ、特別な機材を必要としない。いずれの手法でも適切にアッセイを行なうことで質の高い抗体を取得することが可能である。Biacoreのスループットは他の手法より低く、スクリーニングには適さないが、本研究によりプロテオミセルとキャプチャー法を用いて、同じセンサーチップ上で繰り返しアッセイする2つのプロトコルを確立した。詳細な相互作用解析にはBiacoreは最適であり、キャプチャー法の導入によるスループットおよびコストパフォーマンス向上は今後の抗体機能解析を行なう上で重要である。

本研究で開発した手法を用いてDRD1抗体のスクリーニングおよび性状解析を行なった。その結果、無細胞合成したGPCRを抗原として免疫し、得られたハイブリドーマから36の特異抗体が得られ、その半数は高親和性抗体であった。これらの結果は、無細胞合成プロテオリポソームを用いた免疫および抗体スクリーニング手法は、これまで困難であった抗膜タンパク質抗体開発を加速させるに十分なポテンシャルをもつことを示している。

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 1件)

1) 澤崎達也、竹田浩之、高橋宏隆、根本圭一郎 (2013) 無細胞タンパク質アレイを用いたプロテインキナーゼおよびユビキチンリガーゼの基質タンパク質探索技術, 生化学, 85, 438-446, 社団法人日本生化学会, 査読無し

[学会発表] (計 8件)

1) Hiroyuki Takeda, Tomio Ogasawara, Tatsuhiko Ozawa, Atsushi Muraguchi, Yaeta Endo, Tatsuya Sawasaki
Synthesis of GPCR by Wheat Cell-free Protein Synthesis System, Which is Suitable for Biochemical Analysis and Monoclonal Antibody Production
Keystone Symposia: G Protein-Coupled Receptors - Structural Dynamics and Functional Implications・2014年3月30日～4月2日・Snowbird, Utah, United States

2) Hiroyuki Takeda, Tomio Ogasawara, Tatsuhiko Ozawa, Atsushi Muraguchi, Yaeta Endo, Tatsuya Sawasaki

Synthesis of GPCR by Wheat Cell-free Protein Synthesis System, Which is Suitable for Biochemical Analysis and Monoclonal Antibody Production
GPCR workshop 2013・2013年12月1～12月5日・Maui, Hawaii, United States.

3) 竹田 浩之、小笠原 富夫、小澤龍彦、村口篤、澤崎 達也
リポソーム添加コムギ無細胞系によるGPCRの発現と抗GPCRモノクローナル抗体作製
第8回 無細胞生命科学研究会・2013年10月21日・新潟

4) 竹田浩之 リポソーム添加コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた膜タンパク質の汎用的合成法とそのアプリケーション. 日本プロテオーム学会主催 プロテオサイエンスセンター・JHUPO サテライトジョイントシンポジウム・2013年6月7日・松山

5) Hiroyuki Takeda, Tomio Ogasawara, Mamoru Takahashi, Yaeta Endo, Tatsuya Sawasaki
Synthesis of GPCR by Wheat Cell-free Protein Synthesis System; Application for Functional Analysis and Monoclonal Antibody Production. IBC 23rd Annual International Conference Antibody Engineering & Therapeutics・2012年12月02日～2012年12月06日・San Diego, CA, USA

6) Hiroyuki Takeda, Tomio Ogasawara, Mamoru Takahashi, Yaeta Endo, Tatsuya Sawasaki
Synthesis of GPCR by Wheat Cell-free Protein Synthesis System; Application for Functional Analysis and Monoclonal Antibody Production.
The 4th Membrane Protein Technologies Meeting・2012年11月28日～2012年11月30日・San Francisco, CA, USA

7) 竹田 浩之、小笠原 富夫、平賀 清貴、遠藤 弥重 太、澤崎 達也
ポソーム添加コムギ無細胞系による GPCR の発現と抗 GPCR モノクローナル抗体作製
第 7 回 無細胞生命科学研究会・2012 年 11 月 16 日～2012 年 11 月 17 日・松山

8) Hiroyuki Takeda, Tomio Ogasawara, Kenta Kohara, Kiyotaka Hiraga, Yukiko Washino, Takahiro Iwasaki, Yaeta Endo, Tatsuya Sawasaki
Membrane protein synthesis by wheat cell-free system with liposome.

Protein Island Matsuyama 2012・2012年
09月25日・松山

〔図書〕（計 件）

〔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

澤崎研究室ホームページ

<http://www.ehime-u.ac.jp/~cellfree/sawa-sakilab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹田 浩之 (TAKEDA, Hiroyuki)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター

研究者番号：40609393

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし