

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750365

研究課題名(和文) 味覚受容体の生化学的解析および機能抗体作製に向けた基盤技術の開発

研究課題名(英文) Development of assays and antibodies for functional analysis of taste receptors.

## 研究代表者

竹田 浩之 (Hiroyuki, Takeda)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授

研究者番号：40609393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：甘味と旨味を感知するT1RファミリーGPCRは細胞系を用いた大量発現が困難で、抗体などの研究ツールも不足している。本研究では無細胞膜タンパク質合成系を用い、T1R1とT1R3を大量合成し、それぞれの受容体に特異的に結合するモノクローナル抗体を作成した。また、副産物としてアソレクチン脂質に対するモノクローナル抗体も取得した。この抗体はアソレクチン脂質を認識するが、EggPCには結合しない。この抗体を用いてリポソーム間の相互作用を検出する新しいアッセイ系を開発した。本研究で開発した抗体及び相互解析手法はT1Rを含む膜タンパク質の機能解析への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：T1R family GPCR is sweet/umami receptor. Overexpression system and specific antibodies of T1R family were not established. In this study, we synthesized T1R1 and T1R3 using cell-free membrane protein expression system. Using cell-free synthesized T1Rs, we developed specific monoclonal antibodies. In addition to anti-T1R antibody, we also obtained monoclonal antibody against asolectin lipid. Anti-asolectin antibody bound to asolectin liposome, however it did not EggPC liposome. We developed an assay method to detect interaction between liposomes. Monoclonal antibodies and assay methods developed in this study may contribute to functional analysis of membrane proteins including taste receptors.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：モノクローナル抗体 GPCR 抗原 無細胞タンパク質合成 味覚受容体 リポソーム

### 1. 研究開始当初の背景

五基本味のうち甘味と旨味は栄養学的にもっとも重要な糖質やアミノ酸を認識する化学感覚である。2000年代に甘味および旨味の受容体が G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の T1R ファミリーであることが明らかになった。T1R ファミリーは、長い N 末端細胞外領域(ATD)を持つクラス C GPCR に属している。甘味は T1R2 と T1R3、旨味は T1R1 と T1R3 のヘテロダイマーによってそれぞれ認識されることが知られているものの、甘味や旨味の受容機構は未解明の点が多い。また、甘味受容体が甘味の受容と一見関係ない臓器、例えば視床下部、十二指腸、小腸の内分泌細胞などで発現していることが報告されているなど、T1R ファミリー受容体が化学感覚機構として従来考えられていたよりも多様かつ重要な役割を担っていることが示唆されている。

味覚受容体の解析を困難にしている原因の1つが大量発現系や特異モノクローナル抗体などの解析ツールの不備である。現在のところ味覚受容体の解析は、受容体の発現量がわずかであっても機能するキメラ G タンパク質とカルシウムイメージングを用いた細胞実験系や、ノックアウトマウスによる解析などに限られている。味覚受容体の属するクラス C の GPCR は GPCR のなかでも特に大量発現が困難なことで知られ、T1R ファミリーも大腸菌や酵母、培養細胞を用いた大量発現の成功例は報告されていない。そのため、これまで構造解析はおろか、相互作用解析などの生化学的解析、抗体産生のための抗原タンパク質の調製などは実施できなかった。特に抗体産生に関しては構造認識抗体や高親和性抗体の作製に高品質のタンパク質抗原が必須である。現在、市販されているほとんど全ての抗 GPCR 抗体はペプチド抗体であり、これらは立体構造をとった GPCR に結合できないため免疫染色などに使用できずアフィニティも低い。一方、従来の細胞発現系における低い GPCR 発現や、可溶化/精製/リポソーム再構成の過程における失活などのため、免疫するに足るだけの質と量のタンパク質抗原を得ることは非常に困難であった。

申請者らはコムギ無細胞タンパク質合成系を用いた GPCR の発現、機能解析、抗体作製に取り組んでおり、最近、人工脂質小胞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膜タンパク質を翻訳と同時に直接リポソーム上に埋包し、プロテオリポソームとして発現することを特徴とする。さらに我々はドーパミン受容体 DRD1 をモデルに生化学的機能解析を進め、DRD1 がリガンド結合能と G タンパク質活性化能を保持していることを確認した。また、

無細胞合成した GPCR プロテオリポソームは抗 GPCR 抗体作製のための抗原に適していると考え、抗 DRD1 モノクローナル抗体 (mAb) の作製も試み、ウサギ高親和性モノクローナル抗体を含む複数の mAb を取得した。また我々は DRD1 以外にもいくつかの GPCR についても抗体作製を進めており、いずれも複数の mAb クローン取得に成功している。これらの結果は無細胞合成した GPCR プロテオリポソームが抗 GPCR 抗体作製のための免疫抗原として適していることを示している。

### 2. 研究の目的

本研究においては味覚受容体と抗味覚受容体の作製を行い、合成難 GPCR の解析のための技術開発を行うことを目標とした。具体的な実施項目は下記のように設定した。

- (1) 組換え味覚受容体の大量合成及び活性評価
- (2) 抗味覚受容体抗体取得
- (3) 抗味覚受容体抗体のエピトープマッピング
- (4) 抗味覚受容体抗体のアプリケーション開発

### 3. 研究の方法

#### (1) 組換え味覚受容体の大量合成

T1R1, T1R2, T1R3 の cDNA は東京大学三坂先生から分与していただいた。シグナル配列部分を除いた ORF をコムギ無細胞発現ベクターに組換えた。それぞれの受容体を単独、あるいは複数組み合わせ無細胞合成した。無細胞合成には透析重層法を用いた (発表論文)。透析カップの内外に無細胞合成の基質液を満たし、mRNA, コムギ胚芽抽出液、リポソームなどを含む反応液をカップ内基質液の下部に重層し、15 分で一晩静置することで反応させた。合成したプロテオリポソームは 15,000rpm, 10 分間の遠心で沈殿回収し、さらにバッファーで数回洗浄することで簡易精製した。

#### (2) 組換え味覚受容体の免疫

T1R3 は ISAAC 法を用いたウサギモノクローナル抗体作製を、T1R1 はハイブリドーマ系を用いたマウスモノクローナル抗体作製を試みた。T1R3 のウサギモノクローナル抗体は富山大学村口研究室の協力の元、ISAAC 法を用いて実施した。免疫には 5mg の T1R3 を調製した。ウサギに T1R3 を免疫後、血液、脾臓及び骨髄を回収し、リンパ球を単離した。細胞をマイクロチップ上に展開し分泌抗体をキャプチャーした後、ビオチン化 T1R3 プロテオリポソームを用いて T1R3 に対する抗体を分泌している細胞を特定、単離した。単離した細胞から抗体遺伝子の V 領域をクローニングし、抗体発現ベクターに組換え、培養細胞を用いて抗体産生を行った。T1R1 のマウスハイブリドーマ取得は定法によって

実施した。免疫のためには 1mg の T1R1 プロテオリポソームを調製し、抗体スクリーニングは ELISA と BiLIA 法（発表論文）を用いて実施した。

### (3) 抗体の評価

取得した抗体のサブタイプ特異性やエピトープ解析はウェスタンブロットティングと BiLIA 法を用いて実施した。エピトープ解析のためには味覚受容体の領域を別のエピトープに入れ替えたスワップ変異体を作製し、無細胞合成した抗原を用いた。また得られた抗体の免疫蛍光染色を味覚受容体を恒常発現または一過性発現させた培養細胞を用いて行った。味覚受容体恒常発現細胞は東大三坂先生から分与していただいた。抗体の生理活性を評価するため、カルシウムイメージングを実施した。味覚受容体とキメラ G タンパク質を恒常発現した細胞に味覚物質及び抗味覚受容体抗体を処理し、細胞内カルシウム濃度の変化を Fura2-AM を用いて観察した。

### (4) 人工デザイン膜タンパク質の作製

味覚受容体の細胞外領域に対する抗体を効率良く取得するため、受容体細胞外領域と膜貫通領域を連結した人工膜タンパク質をデザインした。デザインしたアミノ酸配列を元に、人工遺伝子を作製し、コムギ無細胞発現ベクターに導入した。人工デザイン膜タンパク質を無細胞合成し、ウサギに免疫し、モノクローナル抗体作製を実施した。

### (5) 抗アゾレクチン抗体の解析

アゾレクチンに結合する抗体の特異性を解析するため、各種脂質を含むリポソームを作製し、抗体との結合を確認した。抗体に結合しない EggPC を基盤脂質としてホスファチジン酸 (PA)、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルグリセロール (PG)、ホスファチジイノシトール (PI)、ホスファチジルセリン (PS) などの脂質及びビオチン化 DPPE を添加し、薄層化し、バッファーを添加してリポソームとした。調製したリポソームと抗体を反応させ、結合を BiLIA 法を用いて実施した。

### (6) リポソーム間相互作用解析法

取得した抗膜タンパク質抗体を用い、膜タンパク質間のトランス相互作用を解析するアッセイ系を構築した。アゾレクチンリポソームとビオチン化 EggPC リポソームのそれぞれに別々の膜タンパク質を無細胞合成した。2種類のプロテオリポソームを混合し反応させた後に、抗アゾレクチン抗体と AlphaScreen ビーズを添加し相互作用を検出した。

## 4. 研究成果

### (1) 組換え味覚受容体の大量合成系の確立

無細胞系を用いた組換え味覚受容体の合成

旨味受容体と甘味受容体を構成する T1R1, T1R2, T1R3 の 3 種の GPCR のコムギ無細胞系発現ベクターを構築した。リポソームを添加した透析重層法を用いて T1R を合成し、遠心法で粗精製を行った。いずれの T1R も合成効率は 0.8 mg / mL コムギ胚芽抽出液で、免疫に必要な数 mg の抗原調製に十分な生産性が得られた。

無細胞合成した味覚受容体の活性評価

無細胞合成した甘味受容体と甘味タンパク質であるソーマチンおよびブラゼインの結合を AlphaScreen およびピアコアを用いて試験した。しかし、受容体への特異的な結合は認められなかった。Biacore の場合は甘味タンパク質がセンサーチップに非特異的な結合が多く評価できなかった。また、いずれの場合も、味覚受容体と甘味タンパク質のアフィニティが弱すぎるために検出が困難であったと推察される。

### (2) 抗味覚受容体抗体作製

抗 T1R3 ウサギモノクローナル抗体作製

5 mg の T1R3 を無細胞合成し、ウサギに免疫した。ISAAC 法を用いて抗体産生細胞を回収し、抗体遺伝子を単離した。発現ベクターに抗体遺伝子をサブクローニングし、培養細胞で抗体を発現させた。発現させた抗体のスクリーニングを行った結果、2 クローンの抗体が T1R3 に結合することを確認した。

抗 T1R1 マウスモノクローナル抗体作製

1 mg の T1R1 を無細胞合成し、マウスに免疫した。免疫マウスの脾臓からハイブリドーマを作成した。ハイブリドーマ培養上清の抗体スクリーニングを行った結果、T1R1 に特異的に結合する 2 クローンの抗体を得た。

### (3) 抗味覚受容体抗体の評価

取得した抗体の特異性を BiLIA 法で確認した。T1R1, 2, 3 と抗体を反応させ、相互作用を BiLIA 法で確認した。いずれの抗体も標的受容体以外には反応せず、高い特異性を持つことが確認された（図 1）。

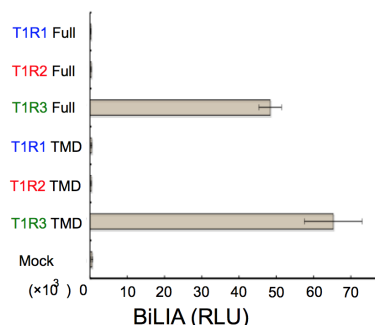


図1 抗 T1R3 ウサギ抗体の特異性試験。T1R3 のみに反応し、T1R1, T1R2 には反応しない。

取得した抗 T1R3 ウサギ抗体のエピトープマッピングをスワップ変異体と BiLIA 法を用い

て行ったところ、2クローンとも T1R3 の細胞内 C 末端領域に結合することがわかった (図 2)。また、同様に抗 T1R1 マウス抗体のエピトープマッピングを行ったところ、2クローンとも T1R1 の N 末細胞外ドメインに結合していた。

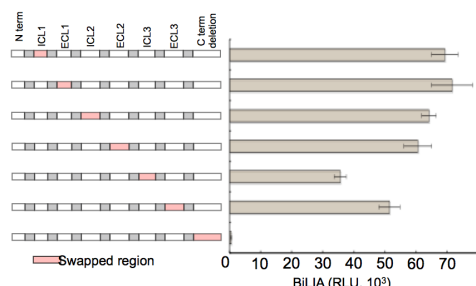


図 2 抗 T1R3 ウサギ抗体のエピトープマッピング。抗原の C 末端をスワップすると反応しなくなることから、この抗体は T1R3 の C 末端に結合することがわかる。

取得した抗体を用いて、味覚受容体を恒常発現した細胞のウェスタンブロッティングと細胞免疫染色を実施した。細胞抽出液のウェスタンでは、いずれの抗体も抗原受容体の特異的に検出した。抗 T1R3 抗体を用いた細胞免疫染色では、細胞質に細かい点状のスポットが検出され、一方で T1R1 抗体では細胞内で大きなスポットが見受けられた (図 3)。膜タンパク質を細胞内で過剰発現させた場合、しばしば凝集することが知られているが、用いた恒常発現細胞株内において、発現させた味覚受容体が凝集している可能性が示された。

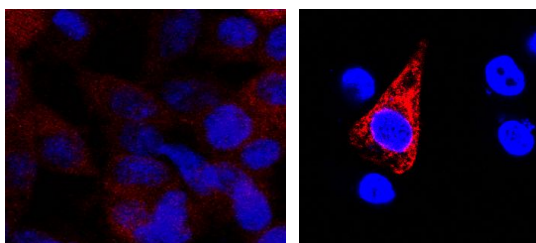


図 3 免疫染色。(左)抗 T1R3 抗体。(右)抗 T1R1 抗体。

カルシウムイメージング法を用いた味覚受容体評価法を東京大学三坂研究室に教わり導入した。細胞外領域結合抗体である T1R1 抗体の生理活性評価を実施した。単独、あるいはグルタミン酸ナトリウムとともに抗体を T1R1/T1R3/キメラ G タンパク質発現細胞に処理したが、抗体の有無でカルシウムイメージングのパターンに変化は見られなかった。

(4)人工膜タンパク質抗原を用いた抗体作製  
味覚受容体の細胞外ループに結合する抗体を効率的に取得するため、味覚受容体 3 種の膜貫通ドメインと細胞外ループをタンデムに連結した人工膜タンパク質のデザインを

試みた。設計した人工膜タンパク質をコードした人工遺伝子が無細胞発現ベクターに組み込んだ。無細胞合成した人工膜タンパク質をウサギに免疫し、ISAAC 法で抗体遺伝子の取得を試みた。しかし、残念ながら甘味受容体の特異的な抗体は取得できなかった。その代わりに、コントロールの Mock リポソーム (mRNA を加えていない膜タンパク質合成反応液) に反応するウサギモノクローナル抗体を 8 種取得した。

#### (5)抗アゾレクチン抗体の性状解析

Mock リポソームに結合する抗体の性状解析を進めた。これらの抗体は小麦胚芽抽出液には反応せず、ビオチン化アゾレクチンリポソームと強く結合した (図 4)。さらに、PA, PC, PE, PG, PI, PS などの脂質単独で形成したリポソームと反応させたところ、1 種の抗体を除き、単独脂質からなるリポソームとは反応しなかった。単独脂質と反応した抗体をさらに多種の脂質と反応させたところ、リゾ PC, リゾ PE などのリゾリン脂質と強く結合していた。取得したアゾレクチン抗体を用いて細胞の免疫染色を実施したところ、膜組織が強く染色された像が得られた。

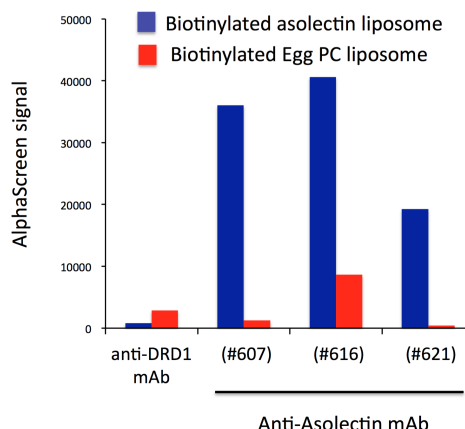


図 4 抗アゾレクチン抗体。(左)抗 T1R3 抗体。(右)抗 T1R1 抗体。ビオチン化アゾレクチンリポソーム、あるいはビオチン化 EggPC リポソームと抗アゾレクチン抗体を反応させ、BiLIA 法で検出した。

取得したアゾレクチン抗体を用いて、リポソーム間の相互作用検出系の構築を試みた。アゾレクチンからなるリポソームと、ホスファチジルコリンにビオチン化脂質を添加したビオチン化 PC リポソームをそれぞれ調製し、IkBa-DRD1 と ReIA-DRD1 という相互作用することが知られているタンパク質を融合した膜タンパク質 2 種をそれぞれのリポソーム上に合成した。ビオチン化 PC リポソームをストレプトアビジンビーズで、アゾレクチンリポソームを抗アゾレクチン抗体ビーズでラベルし、両ビーズの近接を AlphaScreen で検出したところ、リポソーム間の相互作用を示唆するデータが得られた (図 5)。本手法を用いることで、タンパク質を介した細胞間

の相互作用やシグナル伝達系を評価できる可能性がある。

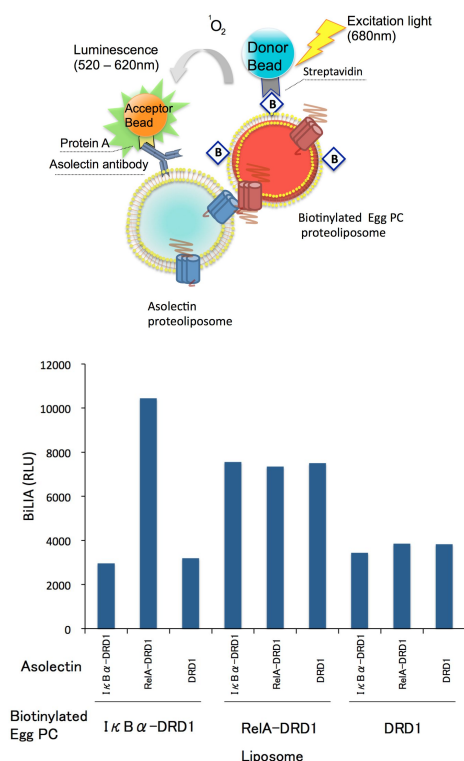


図5 抗アソレクチン抗体を用いたリポソーム間相互作用解析系。(上)アッセイの模式図。2種類のリポソームにそれぞれ異なる膜タンパク質を無細胞合成し、相互作用をBiLIA法で検出する。アソレクチンリポソームの検出のために抗アソレクチン抗体を用いる。(下)リポソーム間相互作用アッセイ試験。IkBa, RelAを融合した膜タンパク質を、それぞれのリポソーム上に合成し、リポソーム間の相互作用を観察した。向かって左側の、ビオチン化 EggPC リポソーム上にIkBa-DRD1を合成したものを、アソレクチンリポソーム上にRelA-DRD1を合成したものを反応させた際に高いシグナルが得られ、リポソーム同士が近接したことが示唆された。

## 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 5件)

竹田浩之、澤崎達也、無細胞技術を基盤とした抗GPCRモノクローナル抗体作製技術の開発、月刊バイオインダストリー、査読なし、Vol.32、2016、pp56-62.<http://www.fujisan.co.jp/product/1281680662/b/1324151/>  
Takeda H, Ogasawara T, Ozawa T, Muraguchi A, Jih PJ, Morishita R, Uchigashima M, Watanabe M, Fujimoto T, Iwasaki T, Endo Y, Sawasaki T. Production of monoclonal antibodies against GPCR using cell-free synthesized GPCR antigen and biotinylated liposome-based interaction assay. Scientific

Reports, 査読あり, vol.5, 2015, E11333.<http://www.nature.com/articles/srep11333>

Ohnishi T, Yanazawa M, Sasahara T, Kitamura Y, Hiroaki H, Fukazawa Y, Kii I, Nishiyama T, Kakita A, Takeda H, Takeuchi A, Arai Y, Ito A, Komura H, Hirao H, Satomura K, Inoue M, Muramatsu SI, Matsui K, Tada M, Sato M, Saijo E, Shigemitsu Y, Sakai S, Umetsu Y, Goda N, Takino N, Takahashi H, Hagiwara M, Sawasaki T, Iwasaki G, Nakamura Y, Nabeshima YI, Teplow DB, Hoshi M. Na, K-ATPase 3 is a death target of Alzheimer patient amyloid-assembly. Proc Natl Acad Sci U S A., 査読あり, Vol. 112, 2015, E4465-74. <http://www.pnas.org/content/112/32/E4465.abstract>

Nakajima M, Nagase S, Iida M, Takeda S, Yamashita M, Watari A, Shirasago Y, Fukasawa M, Takeda H, Sawasaki T, Yagi K, Kondoh M. Claudin-1 binder enhances epidermal permeability in a human keratinocyte model. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 査読あり, Vol. 354, 2015, p440-447. <http://jpet.aspetjournals.org/content/354/3/440.abstract>

竹田浩之、野澤彰、澤崎達也、リポソーム添加型コムギ無細胞合成系による膜タンパク質合成とその利用、ファルマシア、査読なし、Vol.51、2015、pp740-774. <http://farumashia.pharm.or.jp/mokujii/2015/51-08.html>

[学会発表](計 5件)

Hiroyuki Takeda, Tomio Ogasawara, Tatsuhiko Ozawa, Atsushi Muraguchi, Pei-Ju Jih, Ryo Morishita, Motokazu Uchigashima, Masahiko Watanabe, Toyoshi Fujimoto, Takahiro Iwasaki, Yaeta Endo, Tatsuya Sawasaki, Production of monoclonal antibodies against GPCR using cell-free synthesized GPCR antigen and biotinylated liposome-based interaction assay. 2015年12月1-5日、GPCR Workshop 2015 (国際学会), Kailua-Kona (米国)

Hiroyuki Takeda, Tomio Ogasawara, Tatsuhiko Ozawa, Atsushi Muraguchi, Pei-Ju Jih, Ryo Morishita, Motokazu Uchigashima, Masahiko Watanabe, Toyoshi Fujimoto, Takahiro Iwasaki, Yaeta Endo, Tatsuya Sawasaki, Production of monoclonal antibodies against GPCR using cell-free synthesized GPCR antigen and

biotinylated liposome-based interaction assay. 2015年9月25日、Protein Island Matsuyama International Symposium 2015 (国際学会)、松山市男女共同参画推進センター (愛媛県・松山市)  
栄谷 紘一、竹田 浩之、小澤 龍彦、村口 篤、三坂 巧、森下 了、澤崎 達也、コムギ無細胞系を基盤とした旨味/甘味受容体タンパク質の合成とモノクローナル抗体の作製、日本農芸化学会 2015 年度大会 (国内)、2015年3月26-29日、岡山大学 (岡山県・岡山市)  
Hiroyuki Takeda, Tomio Ogasawara, Tatsuhiko Ozawa, Atsushi Muraguchi, Yaeta Endo, Tatsuya Sawasaki, Cell-Free Synthesized G-protein-Coupled Receptor Proteoliposome is Efficient for Biochemical Analysis and Monoclonal Antibody Development. 2014年10月8-10日、Discovery on Target 2014 (国際学会) Boston (米国)  
栄谷 紘一、竹田 浩之、小澤 龍彦、村口 篤、澤崎 達也、コムギ無細胞タンパク質合成系を基盤とした甘味受容体機能構造解析のための技術開発、第 11 回 GPCR 研究会 (国内)、2014年5月9-10日、日本科学未来館 みらい CAN ホール (東京都・江東区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
愛媛大学プロテオサイエンスセンタープロテオ創薬科学部門 (竹田研究室)  
<http://www.pros.ehime-u.ac.jp/proteodrugdiscovery/index.html>

プレスリリース  
GPCR に対する抗体作製技術の論文が Scientific Reports 誌に掲載されたことをプレスリリースで発表し、愛媛新聞 (2015年6月22日朝刊)、日経新聞 (2015年7月6日全国版朝刊)、科学新聞 (2015年6月19日) にそれぞれ掲載された。

日経新聞  
[http://www.nikkei.com/article/DGXLASGG02H2G\\_U5A700C1TJM000/](http://www.nikkei.com/article/DGXLASGG02H2G_U5A700C1TJM000/)

愛媛大学プレスリリース  
[http://www.pros.ehime-u.ac.jp/upfile/1434934243\\_01.pdf](http://www.pros.ehime-u.ac.jp/upfile/1434934243_01.pdf)

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・准教授  
研究者番号: 40609393