

抗体を用いた膜蛋白質結晶化技術の確立

岩田 想
京都大学大学院医学研究科

膜蛋白質のX線結晶構造解析

- 系統的・網羅的解析の重要性

受容体、トランスポーター、チャネル、接着分子は創薬における重要なターゲット
「構造に指南された創薬戦略 (Structure Guided Drug Development)」の基盤づくり

- 現在の技術水準では著しく難度が高い

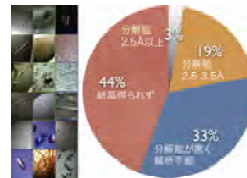
とくに哺乳類由来の内在性 (複数回膜貫通) 膜蛋白質

42,000 2007年5月時点でのPDBの全構造データ (X線, NMR, 電顕を含む)

125 独立な膜蛋白質の構造 (細菌からヒトまで)

8 哺乳類由来の内在性膜蛋白質

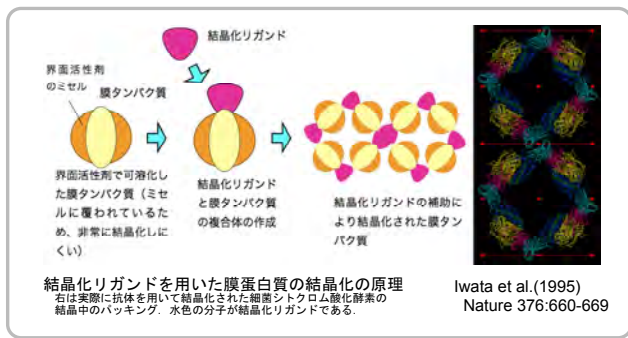
膜蛋白質の生産だけでは構造は解けない!
-結晶化の確率が低い (20%)
-例えとけても分解能が低く創薬に使える



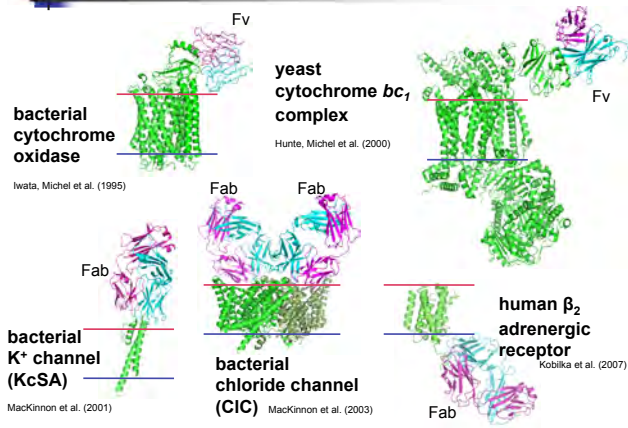
良好に精製された膜蛋白質結晶化の結果

結晶化リガンドとしての抗体の有用性

- 膜蛋白質の親水性表面が拡大して結晶性が向上する
- 抗体部分を用いた分子置換によって構造が解ける
- 得られた抗体はイメージングや抗体医薬にも応用可能

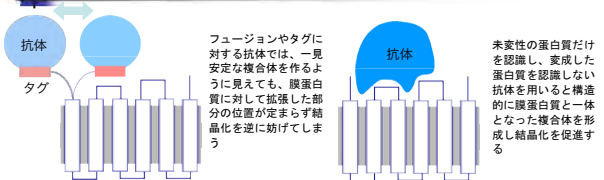


Antibody Fragments for Membrane Protein Crystallography

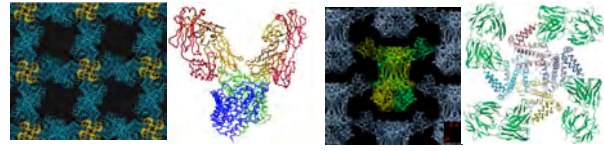


なぜ未変性膜蛋白質に対する抗体が必要か?

-フュージョン蛋白質やタグに対する抗体は結晶化に不適当



-抗体以外で膜蛋白質の結晶化に一般的に有効である事が証明された技術はない
-良好な抗体さえ取れば、膜結晶化に有効である事は証明されている



唯一の問題点: 哺乳類の未変性膜蛋白質に対する抗体は極めて取得しにくい

達成目標

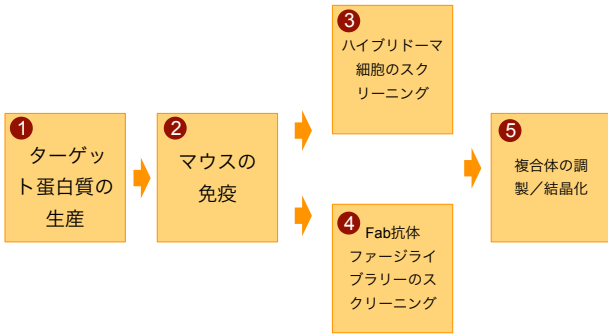
- 任意の膜蛋白質 (特に哺乳類由来) に対して高い特異性と親和性 (10^{-9} Mオーダーの解離定数をもつ) を兼ね備えた抗体を生産するための一連の技術を開発する

- その技術を用いて本プロジェクト期間中に膜蛋白質/抗体複合体の新規構造を、2Å付近での高分解能で決定する

開発すべき3つの要素技術

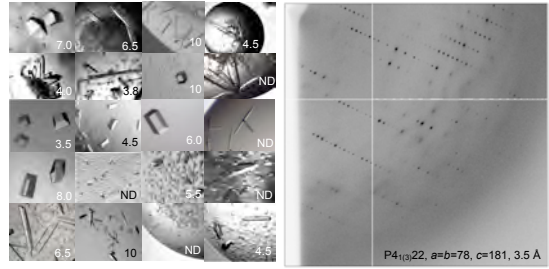
- (1) 膜蛋白質の機能的構造 (天然のコンフォメーション) を保持したままマウスに免疫する技術
- (2) 結晶化リガンド候補のハイスルーブットスクリーニング系
- (3) 生体免疫系から得られた抗体を進化分子工学の手法により高機能化する技術

抗体を用いた膜蛋白質結晶化の流れ



1. ターゲット蛋白質の生産

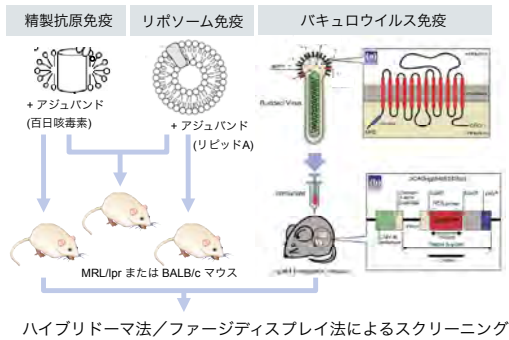
我々の開発した出芽酵母の系を主に用いて80種類以上のほ乳類由来のトランスポーターの発現試験を行い、このうち良好に精製できるものを(初期)ターゲットとして設定した。



今回の報告する蛋白質
ラット/ヒトグルコーストランスポーター (rGLUT5, hGLUT7) - ターゲット
ヒトアデニンA2A受容体 (hAA2a) - 技術開発用モデル

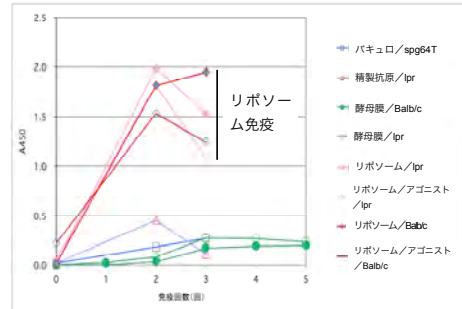
2. マウスの免疫: 各種免疫法の検討

- 膜蛋白質を安定かつ多量に免疫する方法を検討した



2. マウスの免疫: 免疫法による抗hAA2a血清価上昇度の違い

- リポソーム免疫が最も効果的であることが分かった

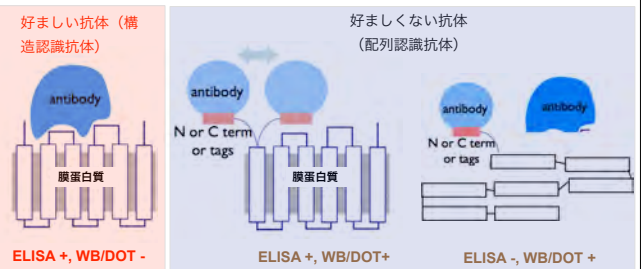


hAA2aの各種抗原を免疫した場合の抗体作製状況の比較 (ハイブリドーマ法)

No.	免疫原	免疫マウス	screening方法	選別well数
1	BV+精製抗原	gp64 Tg/BALB/c系	1.精製抗原ELISA 2.BV ELISA	5
2	精製抗原	MRL/lpr	1.精製抗原ELISA 2.BV ELISA	26
3	liposome アнтаゴニスト添加	MRL/lpr	1.liposome ELISA 2.精製抗原ELISA 3.BV ELISA	> 80
4	liposome アнтаゴニスト添加	BALB/c	1.liposome ELISA 2.精製抗原ELISA 3.BV ELISA	> 80
5	liposome アнтаゴニスト無添加	MRL/lpr	1.liposome ELISA 2.精製抗原ELISA 3.BV ELISA	> 80
6	liposome アнтаゴニスト無添加	BALB/c	1.liposome ELISA 2.精製抗原ELISA 3.BV ELISA	> 80

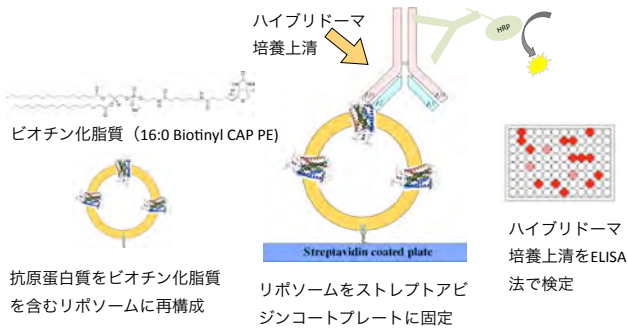
3. ハイブリドーマ細胞のスクリーニング: 構造認識抗体のスクリーニング法

未変性蛋白質を用いた結合アッセイ (ELISA)と変性蛋白質を用いた結合アッセイ (ウエスタンブロットWBまたはドットブロットDOT) を組み合わせることにより、構造認識抗体を選択できる。



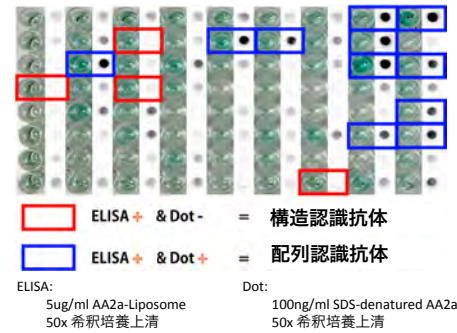
3. ハイブリドーマ細胞のスクリーニング: リボソームELISA法 (L-ELISA)

- ELISAプレート上での膜蛋白質変性を防ぐ



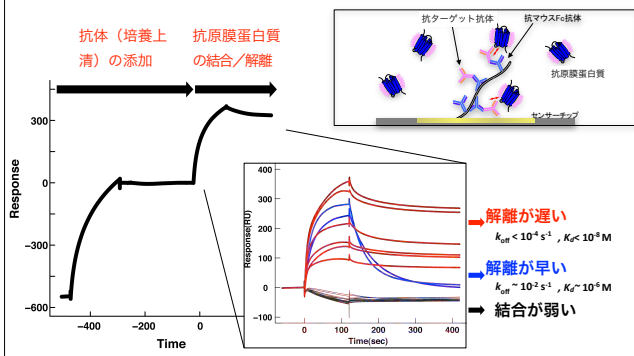
3. ハイブリドーマ細胞のスクリーニング: 構造認識抗体の選別 (1)- L-ELISA/DOT

L-ELISA+, DOT-の構造認識抗体を得ることができた



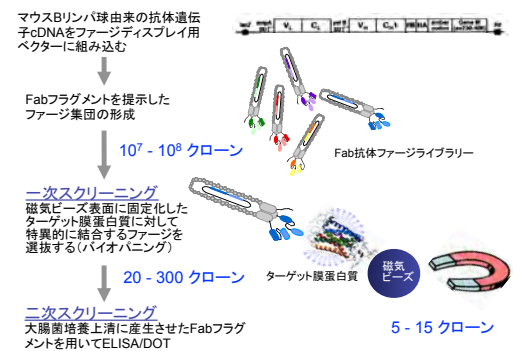
3. ハイブリドーマ細胞のスクリーニング: 構造認識抗体の選別 (2) - Biacore

- 構造認識抗体の内、安定な複合体を形成する物だけを選択



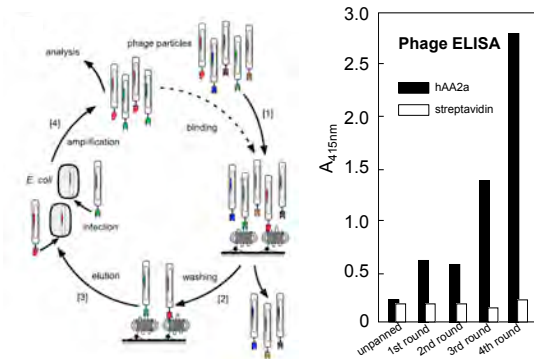
4. Fab抗体ファージライブラリーのスクリーニング

- ハイブリドーマを使う系に比べて、迅速に抗体をスクリーニングできる



Screening Cycle of Fab Phages by Panning

- Library: pComb3XSS-based anti-hAA2a Fab phages (Library size: 3×10^7 cfu)
- Bait: hAA2a-SBP captured on streptavidin-coated ELISA plates
- Buffer containing 0.05% DDM and 0.01% CHS



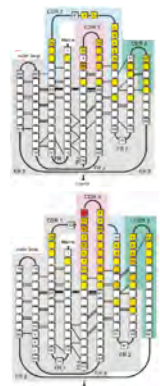
Diversity of an Anti-hAA2a Fab Library

- DNA sequence analysis of randomly selected 10 Fab phage clones from a library
- Deduced a.a. seq of V_L -CDR

	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
# 1	KASQVGVNVAW	ASNRHFG	QYSSPLPF
# 2	KASQVGVNVAW	ASNRPFG	QYSSPLPF
# 3	KASQVGVNVAW	ASNRPFG	QYSSPPFF
# 4	KASQVGVNVAW	ASNRPFG	QYSSPLPF
# 5	KASQVGVNVAW	ASVRYSG	QYSSPPFF
# 6	KASQVGVNVAW	ASNRPFG	QYSSPPFF
# 7	(Frame Shift)	(Frame Shift)	(Frame Shift)
# 8	KASQVGVNVAW	ASNRPFG	QYSSPLPF
# 9	KASQVGVNVAW	ASNRPFG	QYSSPLPF
# 10	KASQVGVNVAW	ASNRPFG	QHYSSPLPF

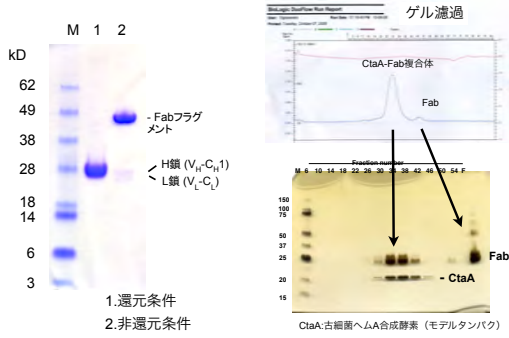
- Deduced a.a. seq of V_H -CDR

	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
# 1	DDYMH	RIDPANGTKYAKPFQD	-----YAMDY
# 2	SSWNI	RIYDGDGTYNKKFKG	SE-----GAPY
# 3	GYNH	YIDPYNGATNYNKKFKG	SYGYYSYDLFPAY
# 4	GYNH	MINPYGTSYNYNKKFKG	GRYYGVEGAMDY
# 5	SSWNI	RIYDGDGTYNKKFKG	EM-GE-----HAMDY
# 6	GYNH	LIIPYNGTSSNKKFKG	C-----ARATPFAY
# 7	DDYMH	RIDPANGTQYTKPFQD	P--GDYGGNYFDV
# 8	DDYMH	RIDPANGTKYAKPFQD	G-----ISNIWYFDV
# 9	QTFNI	RINPYGTSYNYNKKFKG	SYGYYSYDLFPAY
# 10	DYGMH	YISRGSSTIYADTVKG	A-----LPVDY



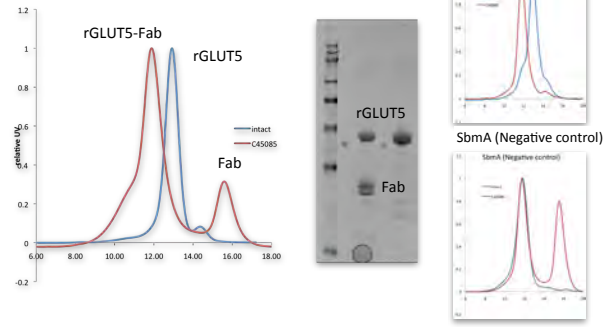
4. Fab抗体ファージライブラリーのスクリーニング： 大腸菌を用いたリコンビナントFabの生産

-抗原と安定な複合体を形成できるリコンビナントFabを生産できた



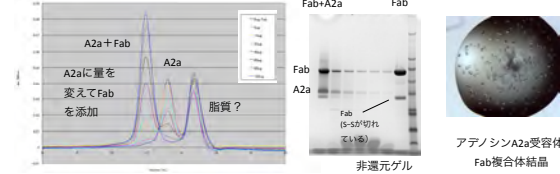
膜蛋白質-Fab複体の調製/結晶化(1)： rGLUT5-Fab複合体

- rGLUT5とFabの安定な複合体を調製できた。
このFabはhGLUT7とも複合体を形成できる

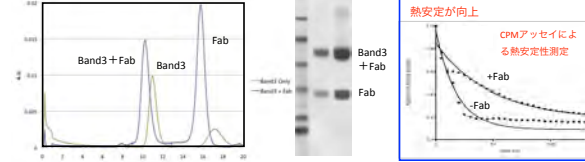


膜蛋白質-Fab複体の調製/結晶化(2)： アデノシンA2a受容体/Band3

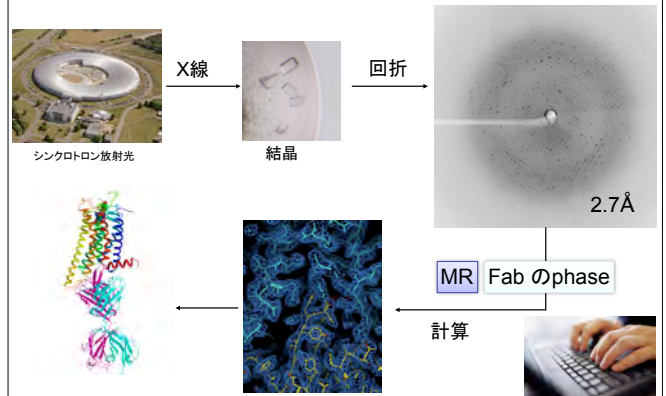
アデノシンA2a受容体



Band3

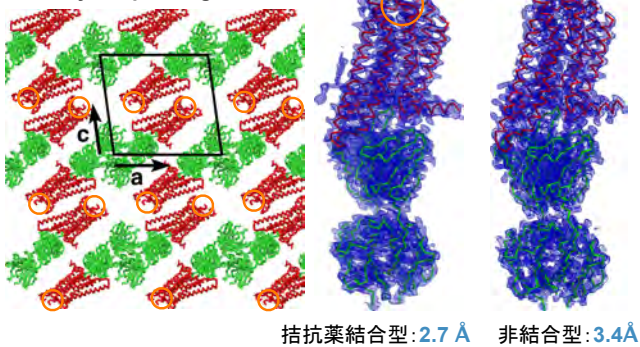


A2a-Fab結晶の構造解析



A2a-Fab結晶構造

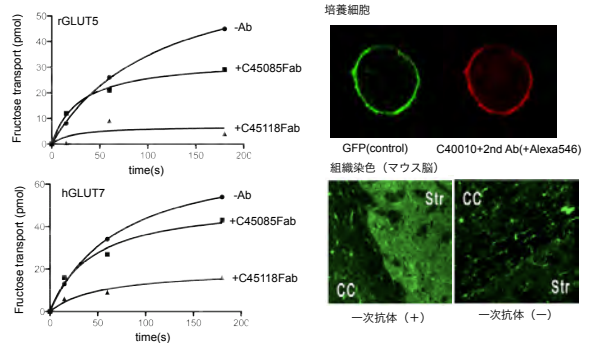
Crystal packing

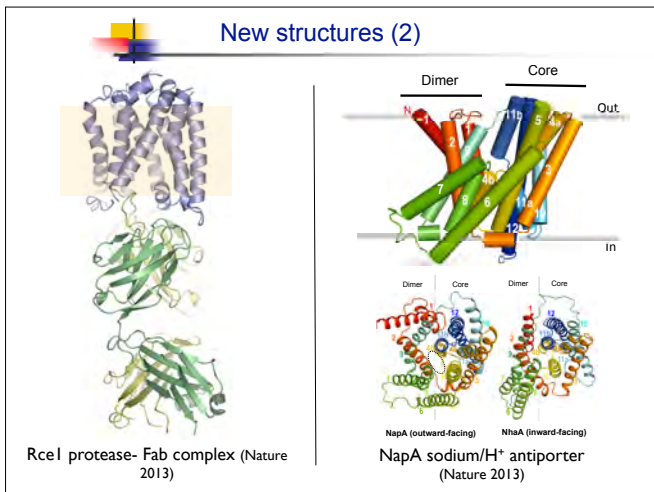
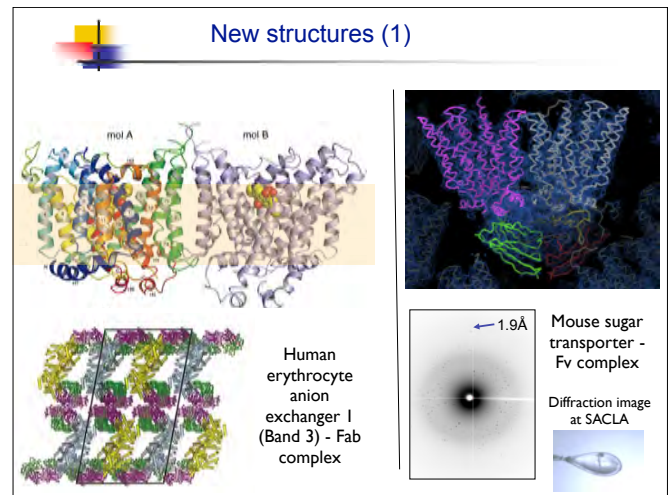
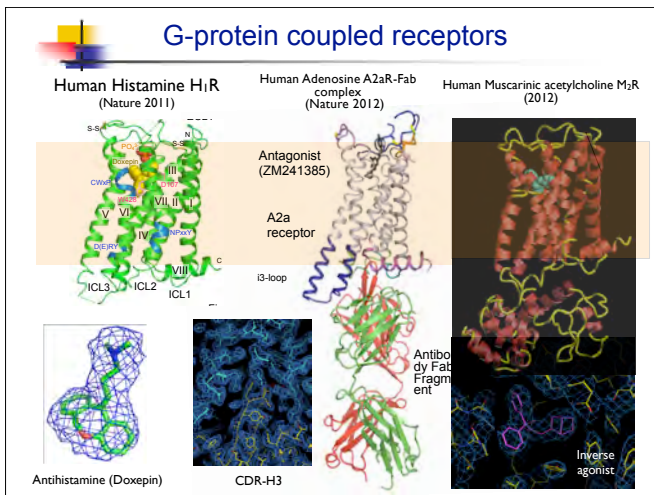


抗体医薬/イメージングへの応用

GLUT (グルコース輸送体) 抗体による GLUT5/7のラクトース輸送活性の阻害
- GLUT5は乳がん細胞特異的に発現

GPCR抗体 (アロステリックインバースアゴニスト) による細胞のイメージング





がんを引き起こす膜たんぱく質の立体構造と動きを解明
 ～がんを抑制する薬剤の設計へ～

岩田 想
 (京大大学院医学研究科 教授)

28

ポイント

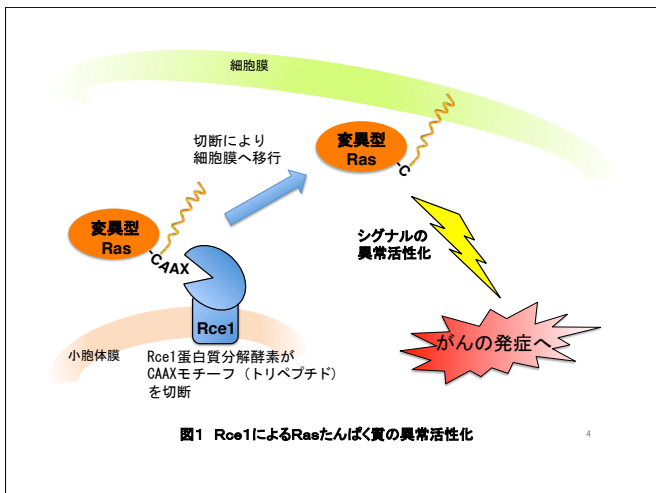
- 発がん遺伝子の活性化に必須の膜たんぱく質の立体構造を、世界で初めて解明。
- 抗体を用いる新技術により、膜たんぱく質の結晶化に成功。
- 発がん遺伝子の活性を抑え、がんを抑制する薬剤を設計することが可能に。

29

研究の背景

- ・細胞制御に関わる重要な分子である Ras(ラス)たんぱく質は、常に活性化(スイッチオン)の状態されるような突然変異により、高頻度(全体で20-30%、大腸がんで40%、すい臓がん90%)でがんを誘発することが知られる。
- ・Rasたんぱく質の特定の部分が、Rce1(アールシーイーワン)というたんぱく質分解酵素によって切断されることで活性化し、がんを引き起こす(図1)。
- ・がんの増殖は、突然変異型のRasたんぱく質に強く依存し、この活性化を妨ぐることにより、がんの増殖を抑制することができる。

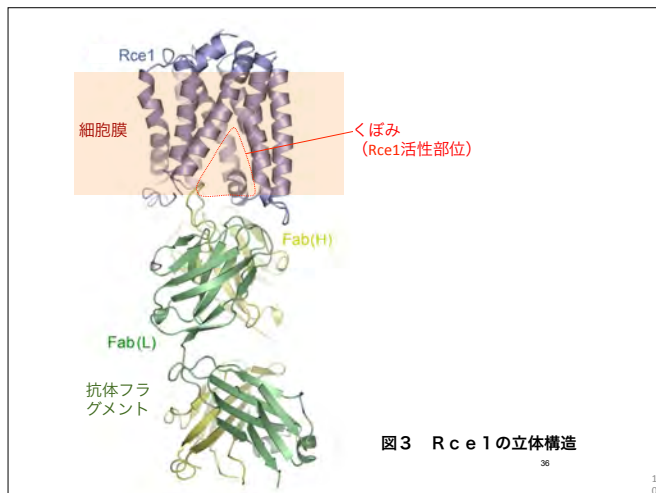
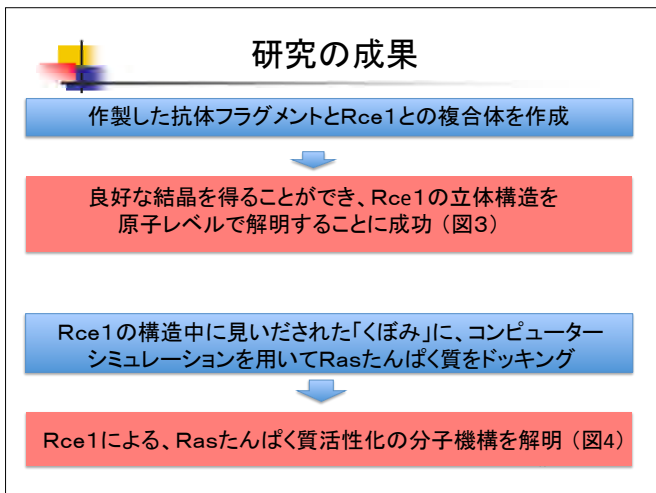
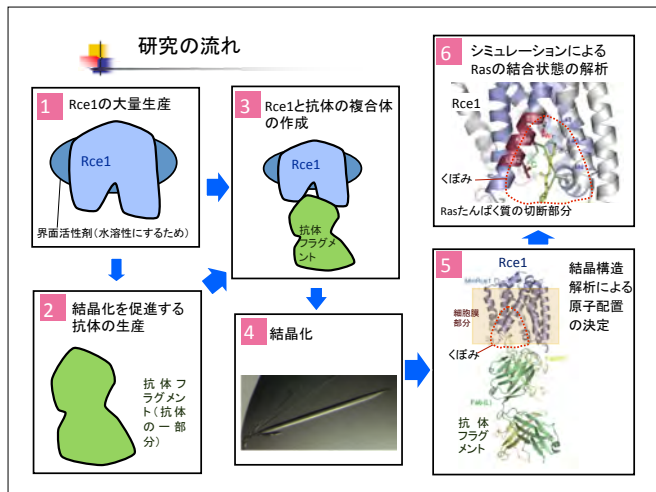
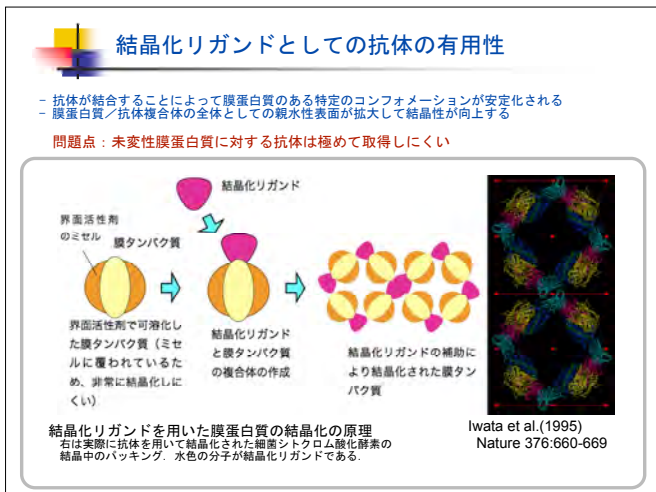
30

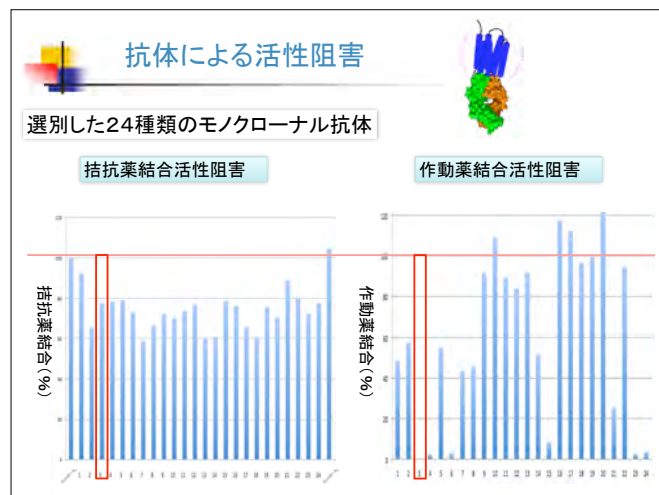
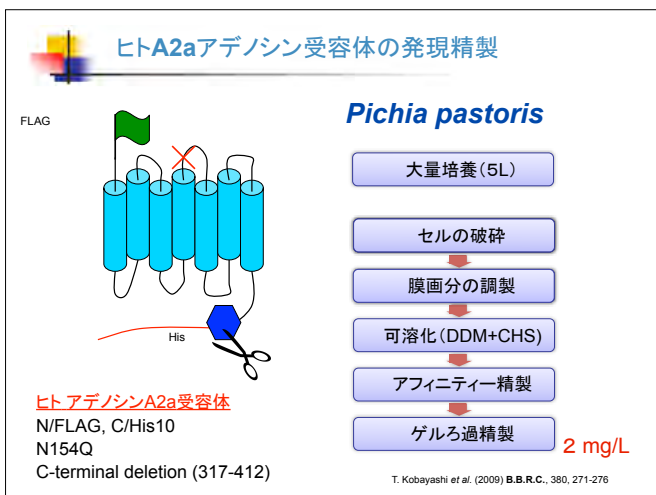
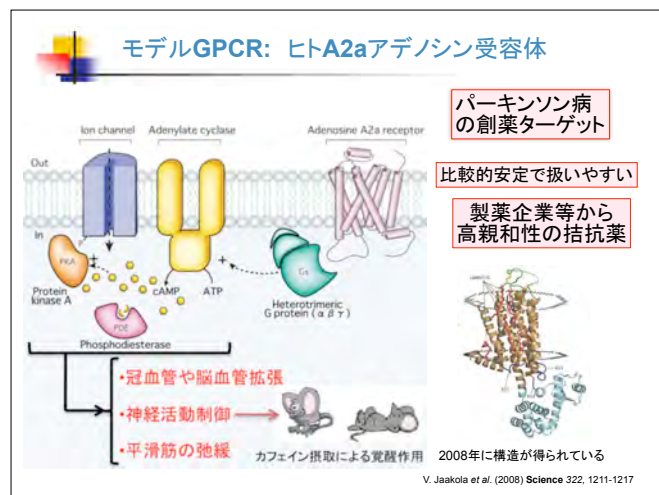
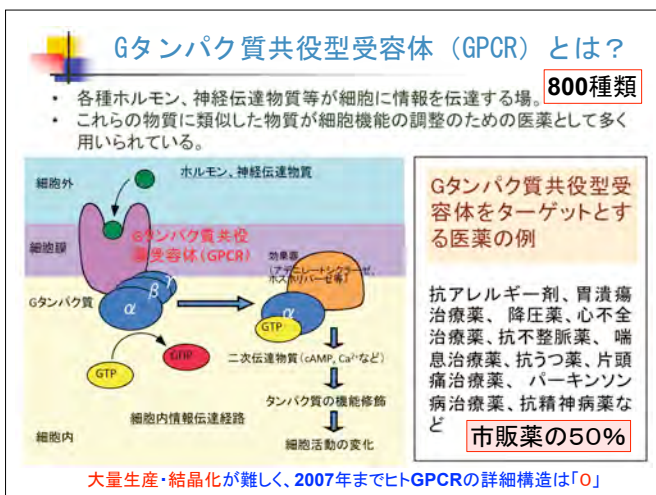
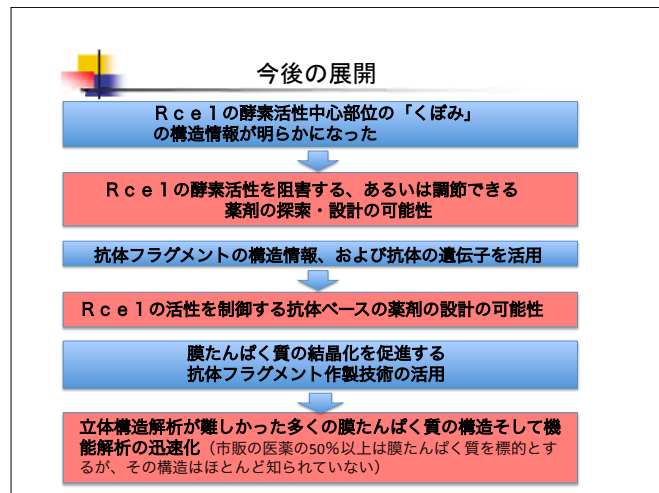
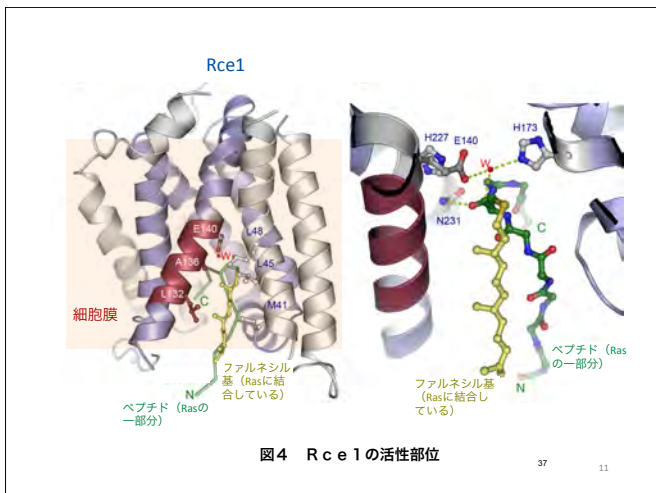


共同研究に至るまでの経緯

・英国がん研究所のバーフォード研究室では、Rce1の大量発現・精製に成功し、結晶構造解析を試みていた。膜たんぱく質を高純度に精製でき、結晶が得られるものの、結晶の質が悪いためX線回折実験の精度が低く、詳細な立体構造を得られていなかった。

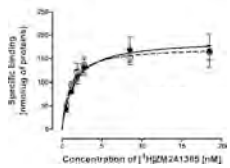
・これまでに、各種の技術開発を通じ、多くの膜たんぱく質の構造解析に成功していた本研究グループは、抗体フラグメント(断片)を用いた独自技術を適用し、Rce1結晶の質を向上させることを試みた(図2-1、補足:図2-2)。



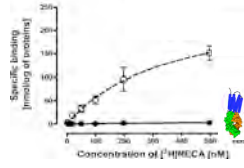


抗体による活性阻害

拮抗薬結合活性阻害



作動薬結合活性阻害



作動薬結合を阻害する機能性抗体が得られた！

不活性型アデノシン受容体を用いて免疫とスクリーニング

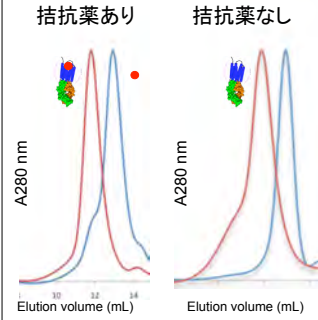
不活性型構造を認識して結合し、構造を固定化

抗体医薬への展開 特願2009-254463号

複合体精製と共結晶化

3 複合体精製/共結晶化技術の開発

±拮抗薬でそれぞれ精製結晶化



結晶化キット (Memsys, Memgold) 5 x 96 well

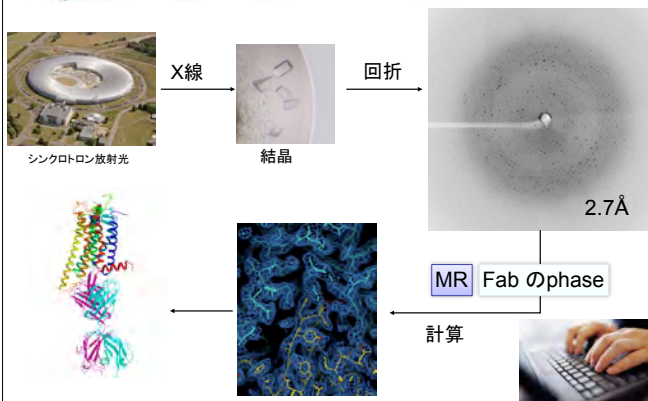
微結晶

展開1: pH vs ppt concentration
1 x 96 plate

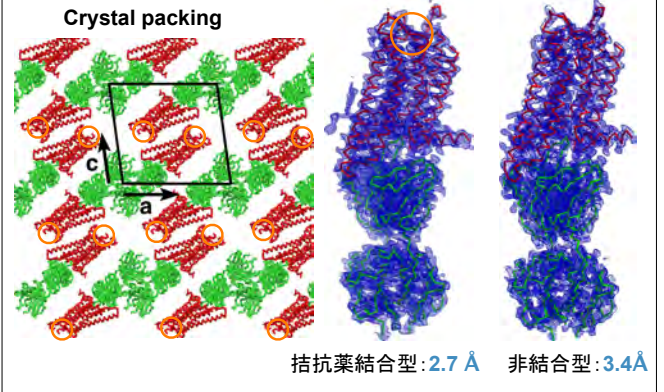
展開2: 24 detergent additives,
4 ppt concns, 1 x 96 plates

展開3: 96 additives, 1 x 96 plate

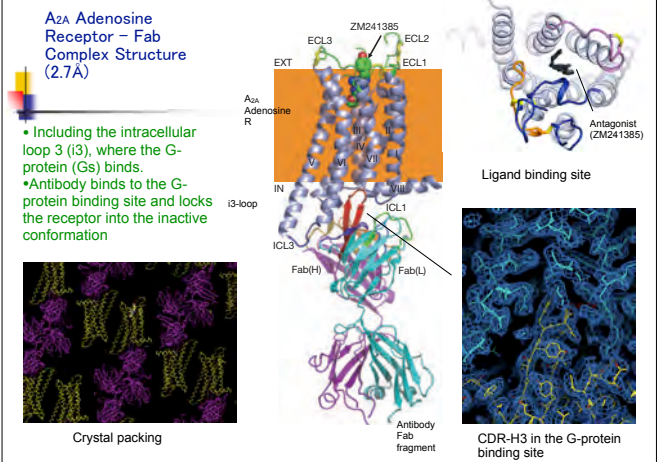
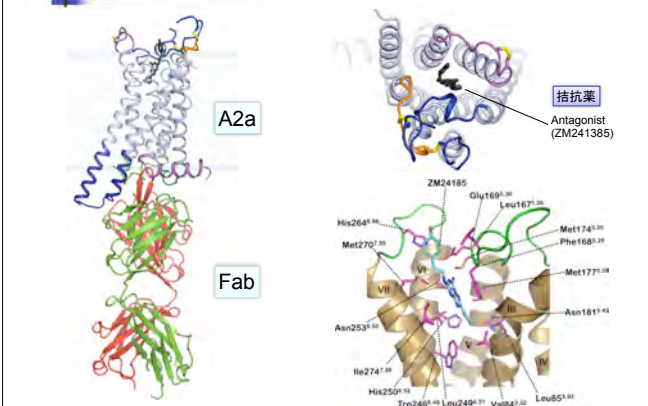
A2a-Fab結晶の構造解析

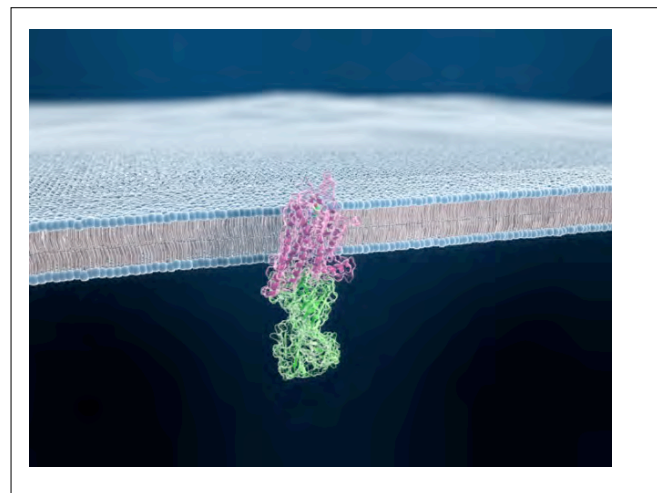
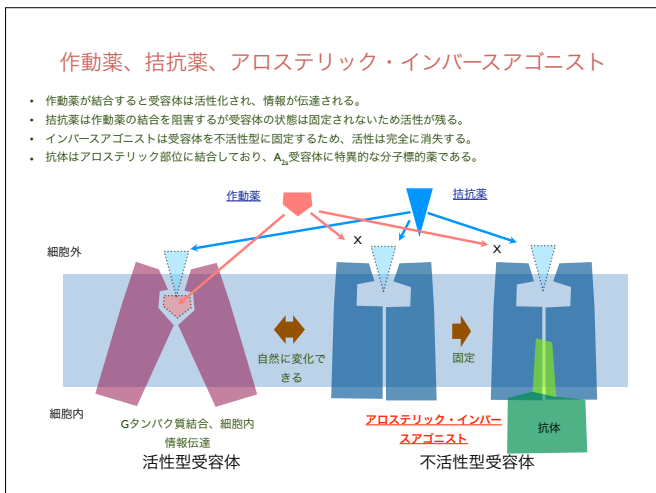
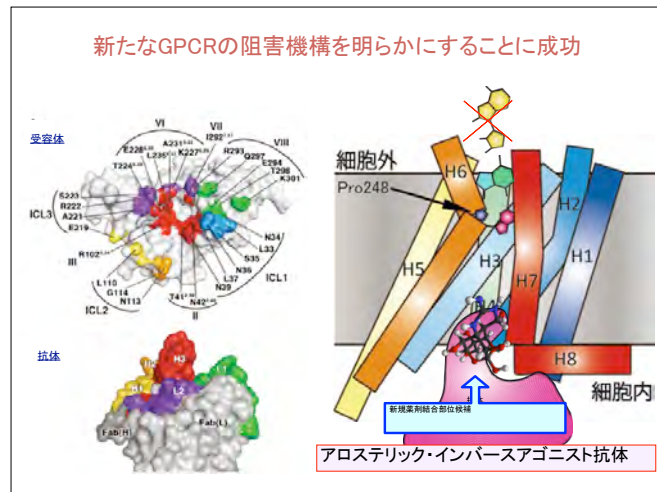
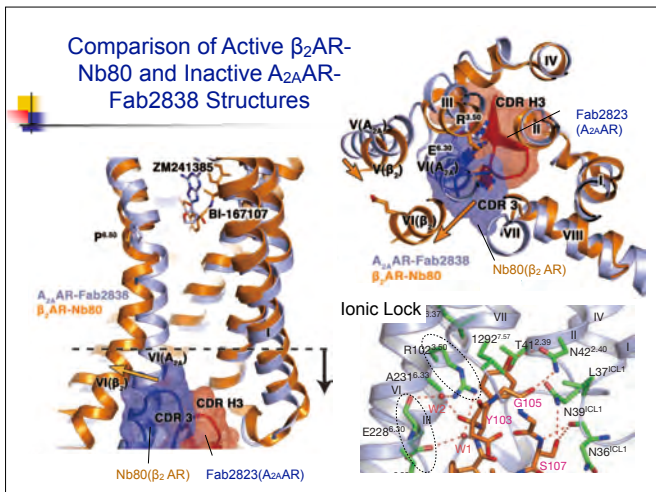
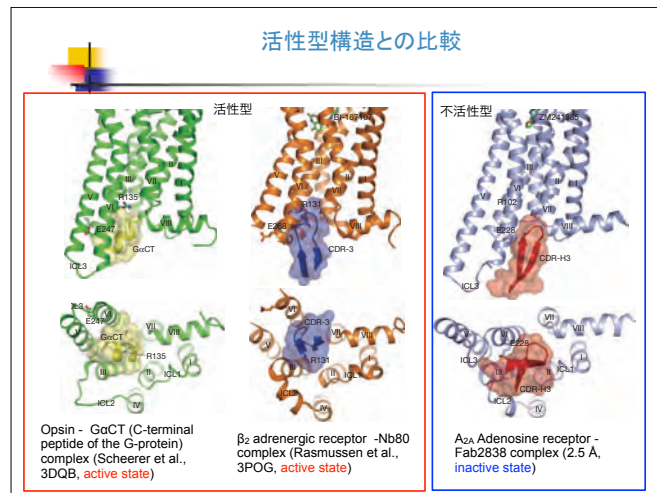
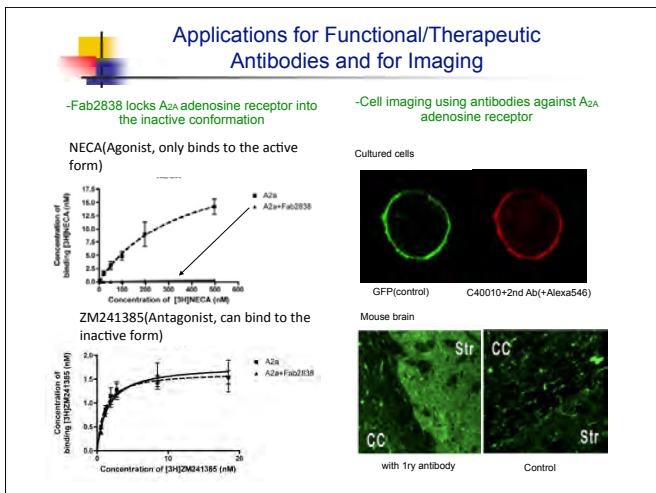


A2a-Fab結晶構造



A2a-Fab構造(リガンド結合部位)







これまでの研究成果／今後の展開

• 研究成果／進捗状況

- 良好な抗原用／結晶化用のほ乳類トランスポーターの生産
- リボソームを用いた膜蛋白質に適した免疫法の確立
- リボソームELISA法、Biacore法等の構造認識抗体スクリーニング法の確立
- Fab抗体ファージライブラリーを用いたリコンビナント抗体の作成法の確立
- 7種類の膜蛋白質に対する構造認識抗体を作成
- ターゲット／抗体複合体の調製、結晶化

• 今後の展開

- 複合体の構造解析（抗体構造を使った分子置換）
- 他のターゲットに対する抗体の作成
- 活性測定等をスクリーニングに組み込み、抗体医薬等に使用可能な機能性抗体を選択する技術を確認