学生中心の大学　地域にあって輝く大学

PRESS RELEASE

愛媛大学 EHIME UNIVERSITY

平成２７年６月１１日
愛　　媛　　大　　学

創薬ターゲット GPCR に対するモノクローナル抗体の新しい作製技術を確立

― GPCR 抗体医薬開発の新機軸として期待 ―

このたび，愛媛大学プロテオサイエンスセンターの竹田 浩之助教，澤崎 達也教授らの共同研究チームは，愛媛大学発の技術であるコムギ無細胞タンパク質合成技術を応用し，GPCR（G タンパク質共役受容体）タンパク質の大量合成法と抗 GPCR 抗体選抜法を開発し，新たな抗 GPCR モノクローナル抗体作製技術を確立しました。

GPCR は最も重要な創薬ターゲットのひとつと知られ，その機能解析や活性制御のためには GPCR を特異的に認識する抗体が必要でした。しかし，従来の発現系では抗体作製に必要な大量の GPCR の調製が困難であり，また有用な抗体を効率的に選抜する手法がなかったため，GPCR に対する抗体開発は難しいのが現状でした。本技術を用いれば有用な抗 GPCR 抗体の作製が容易になり，GPCR を対象とした基礎研究のみならず GPCR を標的とした抗体医薬開発への貢献が期待できます。

なお，本研究成果は，総合学術誌 Nature の姉妹誌である英国科学誌「Scientific Reports」に平成 27 年 6 月 10 日 18:00（日本時間）にオンライン掲載されました。

つきましては，ぜひ取材くださいますようお願いいたします。

記

掲　載　誌：Scientific Reports

論文タイトル：Production of monoclonal antibodies against GPCR using cell-free synthesized GPCR antigen and biotinylated liposome-based interaction assay
（和訳）無細胞合成GPCR抗原とビオチン化リポソーム基盤相互作用解析法を用いた抗GPCRモノクローナル抗体作製法

共同研究者：	愛媛大学プロテオサイエンスセンター	助教	竹田 浩之
	〃	助手	小笠原 富夫
	〃	研究員	岩崎 隆宏
	〃	教授	澤崎 達也
	愛媛大学先端研究・学術推進機構	特別栄誉教授	遠藤 弥重太
	富山大学大学院医学薬学研究科	助教	小澤 龍彦
	〃	教授	村口 篤
	Abnova Corp.（台湾）	研究員	Pei-Ju Jih
	株式会社セルフリーサイエンス	開発部長	森下 了
	北海道大学大学院医学研究科	助教	内ヶ島 基政
	〃	教授	渡邉 雅彦
	名古屋大学大学院医学系研究科	教授	藤本 豊士

本件に関する問い合わせ先
担当部署：プロテオサイエンスセンター
担当者名：助教　竹田　浩之
TEL：089-927-8285，9686
Mail：takeda.hiroyuki.mk@ehime-u.ac.jp

※送付資料 3 枚（本紙を含む）

別紙資料

創薬ターゲットGPCRに対するモノクローナル抗体の新しい作製技術を確立

GPCRを標的とする抗体医薬品の開発促進へ期待

研究成果のポイント

1．愛媛大学発の技術であるコムギ無細胞タンパク質合成法とリポソーム技術を組み合わせ、従来よりも高効率なGPCR（Gタンパク質共役受容体）タンパク質合成法を開発しました。

2．無細胞技術とスクリーニング技術を応用し、抗GPCR抗体を高速かつ高感度で選抜する手法を開発しました。

3．これらの技術を用いることで、これまで作製が困難であったGPCRに対する有用なモノクローナル抗体を効率的に取得できることを実証しました。これにより、主要な創薬ターゲットであるGPCRに対する抗体医薬の開発が促進されることが期待されます。

研究の背景

生体膜にある膜タンパク質はヒトゲノムにコードされたタンパク質の1/3を占め、シグナル伝達や物質輸送・代謝といった重要な役割を担っています。そのため、既存薬もしくは開発中の医薬品のほぼ半数が膜タンパク質を標的にしているといわれています。特に最大の膜タンパク質グループであるGタンパク質共役型受容体（GPCR）は神経伝達物質を始めとする様々な刺激受容やシグナル伝達に関わる受容体が含まれ、最も重要な創薬ターゲットに位置づけられています。GPCRの機能を解明し薬剤開発を行なうためには、高純度かつ大量の組換えGPCRタンパク質や、GPCRに特異的に結合する抗体（抗GPCRモノクローナル抗体）が必要です。しかし、GPCRの重要性、注目度にも関わらず、高品質の抗GPCRモノクローナル抗体は市場にごくわずかしかなく、医薬品開発の大きな足かせになっています。

抗GPCRモノクローナル抗体開発が困難な理由は大きく2つあります。一つは抗体作製に必要な大量のGPCRを調製することが難しいことです。GPCRが複雑な構造を持ち不安定なタンパク質であること、また重要なシグナル伝達を担うGPCRを細胞の中で大量に発現させると細胞内の恒常性を乱してしまうことなどから、従来の細胞を用いたタンパク質発現法では大量発現が困難です。また、細胞膜から純度の高いGPCRを得るためには可溶化や精製など非常に複雑な工程が必要で、その過程で目的GPCRが失われてしまったり、壊れて（変性して）しまったりすることがよくあります。細胞系での発現を安定化させるために、アミノ酸変異をおこなったり、T4LやBRILのような安定な構造蛋白質を挿入したりすることもよく行われますが、そのような変異を導入したタンパク質を抗原に用いるとその変異箇所に体する抗体ができやすいという問題も起こります。もう一つの理由は、抗GPCRモノクローナル抗体を効率良く選抜する手法がなかったことです。モノクローナル抗体作製の過程で、抗体を産生する多数のハイブリドーマの中から、目的のGPCRを特異的に認識して結合する抗体分子を作る細胞を選抜する必要

があります。従来の手法では速度や感度が不十分で、大規模な探索には大変な手間と時間がかかっていました。

研究内容と成果

我々は、愛媛大学発の技術であるコムギ無細胞タンパク質合成法を用いることで抗 GPCR 抗体作製におけるこれらの問題点が解決できると考えました。開放系である無細胞合成では反応液に脂質や界面活性剤などの添加剤を加える事で、膜タンパク質を安定して合成することができます。また細胞系とは異なり、翻訳機構のみを試験管内で再構成した無細胞系では GPCR を大量合成しても撹乱を受けず、生産性が落ちることがありません。私達は、コムギ無細胞合成系の反応液に直径約 100 nm（ナノメートル）の脂質小胞（リポソーム）を添加してGPCRを合成しました。さらに、本研究で我々は透析カップを用いて反応液を基質液の層で上下から挟む、透析重層法という新しい翻訳法を開発し、従来法に比べて GPCR の生産量を8倍増加させることに成功しました（図1A）。この方法で合成されたGPCRは合成反応過程でリポソームの表面に埋め込まれ（プロテオリポソーム）安定に存在できます（図1B）。さらにプロテオリポソームは遠心で容易に沈殿するため、遠心と洗浄を繰り返すことで合成したプロテオリポソームをコムギ胚芽抽出液と分離し精製することが可能です。この透析重層法を用いて、様々なサブファミリーからランダムに選抜した 25 種類の GPCR を合成し、全ての GPCR の合成と精製に成功しました（図1C）。透析重層法の高い生産性と成功率により、数 mg の抗原 GPCR プロテオリポソームを容易に生産することが可能になりました。

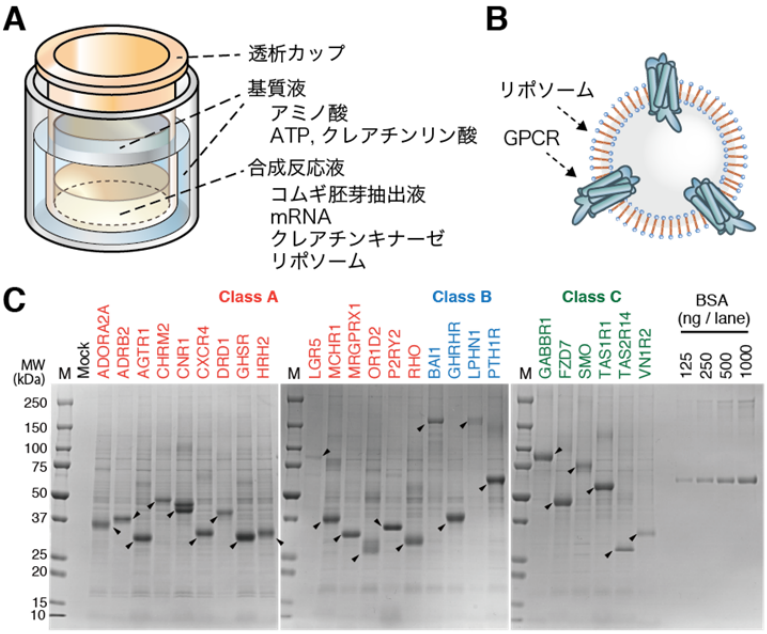

図１　無細胞 GPCR 合成. A, 透析重層法. 透析カップを基質液に浸し、そのカップ内でさらに基質液と合成反応液を重層する. 反応液の上下に基質液を配することによりアミノ酸などの基質の供給と反応副産物の放出がより効率的に行なわれ、合成量が高くなる. B, 無細胞合成プロテオリポソーム. 膜上に埋め込まれた GPCR の方向はランダムである. C, 透析重層法の汎用性. 透析重層法を用い、25 種類の GPCR を同じ条件で合成した。合成したプロテオリポソームを遠心洗浄により精製し、一部を SDS-PAGE と CBB 染色に供した。矢頭は合成された目的 GPCR のバンドを示す。GPCR 名の色はそれぞれの GPCR が属するサブクラスを示す。

また我々は高速・高感度に抗 GPCR モノクローナル抗体を検出できる探索手法の開発を試みました。愛媛大学プロテオサイエンスセンターでは無細胞技術と、タンパク質間の相互作用を超高感度・高速で検出可能な AlphaScreen という技術を組み合わせて、タンパク質の機能解析を大規模に行なう手法を開発しています。本研究ではビオチン化されたリポソームの表面に GPCR を無細胞合成し、AlphaScreen を用いて GPCR と抗体の結合を検出する手法（BILIA 法）を新たに開発しました（図2A）。BiLIA 法と愛媛大学プロテオサイエンスセンターに整備されたスクリーニング設備を組み合わせることで数千から1万の抗体サンプルを 3～4 時間でスクリーニングすることが可能です。また、本手法では抗原 GPCR の固相化や洗浄工程を含まないため、不安定な抗原 GPCR が変

性する可能性が低くなります。実際、我々が実施した抗体スクリーニング結果では、BiLIA 法を用いることで、未変性な抗原に結合するが変性した抗原には結合しない、いわゆる構造認識抗体が優先的に選抜されてきていました(図2B)。BiLIA 法のこのような特性は機能性抗体を取得する際には有効であると考えられます。

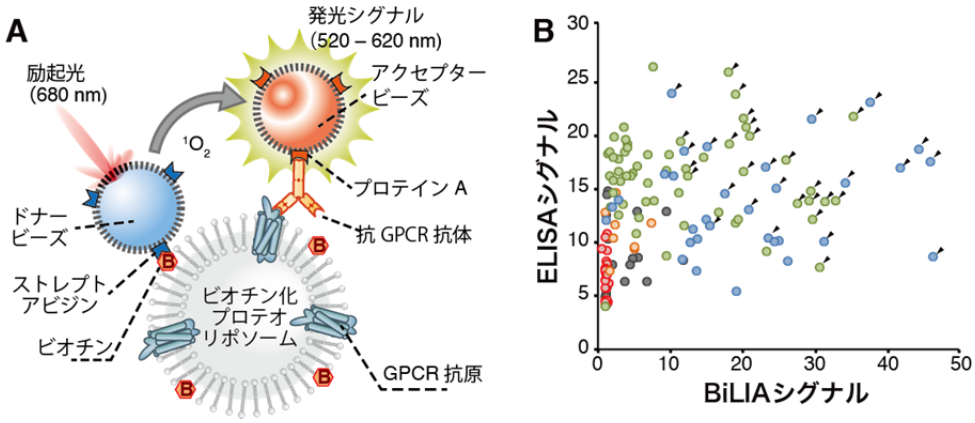

図２　BiLIA 法．A, BiLIA 法の模式図．ビオチン化プロテオリポソーム上の GPCR に抗体が結合すると図のような複合体を形成し、２種類の AlphaScreen ビーズが近接、励起光を受けて発光シグナルを発する．B, BiLIA 法と ELISA の比較．無細胞合成 DRD1 を免疫したマウスから作製したハイブリドーマ上清を BiLIA および ELISA でスクリーニングした．各プロットはそれぞれの抗体の結合様式を示し、青丸で示される構造認識抗体は BiLIA のスコアが高いことがわかる．

これらの技術の有効性を実証するため、我々はいくつかの GPCR についてモノクローナル抗体作製を試みました。まず、1mg のドーパミン受容体(DRD1)を無細胞合成しマウスを免疫してハイブリドーマを用いた抗体作製を行い、ELISA 及び BiLIA 法による抗体スクリーニングを実施した結果、構造認識型抗体 17 クローンを含む 36 クローンの抗体を得ました。また、高親和性抗体を得やすいウサギに 5 mg の DRD1 を免疫し、ISAAC 法を用いて抗体遺伝子を単離することで6クローンのウサギ抗体を得ました。マウスから得られた抗体は親和性の高い(10^{-9}～10^{-11} M)グループと比較的低いグループ(10^{-7}～10^{-8} M)にほぼ二分されましたが、ウサギ抗体は全て親和性が高い抗体でした(図3A)。DRD1 のループ領域を他の GPCR と入れ替えた変異体を用いた BiLIA により得られた抗体のエピトープ領域を決定したところ、DRD1 の細胞外第二ループに結合する抗体がマウスとウサギでそれぞれ1つずつ含まれていることが分かりました。その2抗体をFACS でさらに解析した結果、マウスから得られた 3C9 抗体

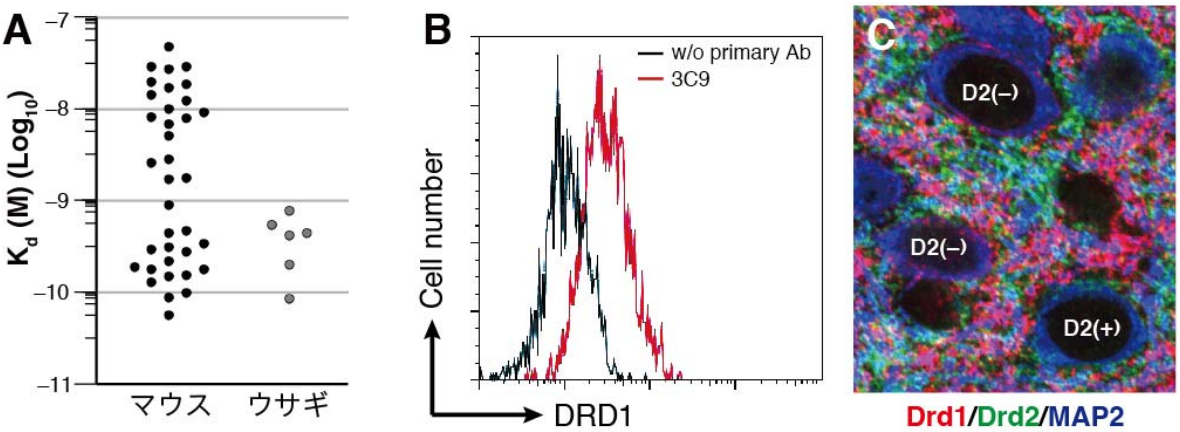

図３　取得した抗 DRD1 抗体の解析．A, 抗体の親和性．各プロットは個別のマウスまたはウサギ抗体を示す．B, 3C9 抗体の FACS 解析．DRD1 の細胞外第二ループに結合するマウス 3C9 抗体を FACS 解析にかけた．ヒストグラムのピークがシフトしたことから、3C9 は DRD1 を発現した HeLa 細胞へ結合したことがわかる．C, マウス脳切片の組織免疫染色．マウス線条体切片を本研究で取得したウサギ抗 DRD1 抗体 Ra60（赤）、既知の DRD2 抗体（緑）、神経細胞帯のマーカーとして MAP2（青）の３抗体で染色した。DRD2 が発現していない細胞［D2(–)］でだけ DRD1 抗体のシグナルが認められ、抗体の特異性が高いことがわかる。

はDRD1を発現させた細胞にも結合することが確認されました。また、得られたウサギ高親和性DRD1抗体を用いてマウス脳切片の免疫染色を行なったところ、DRD1 が高発現している線条体などが強く染色され、さらに DRD2 特異抗体との共染色により、得られたウサギ抗体は DRD2 には全く反応せず DRD1 発現細胞を特異的に染色していることがわかりました。また、本研究ではDRD1の他にもGHSR(クラスA), PTGER1(クラスA), T1R1(クラスC)の抗体作製も実施し、いずれの抗原に対しても複数のマウスモノクローナル抗体を取得しました。これらの結果は本研究で開発した無細胞合成GPCR抗原とBiLIAが抗GPCR抗体作製に対して有効であることを示しています。

社会的意義と今後の展開

前述のとおり、GPCR を始めとする膜タンパク質は非常に重要な創薬ターゲットであり、膜タンパク質をターゲットとした医薬品開発に製薬メーカーは鎬を削っています。その中で、膜タンパク質に体する質の良い抗体が得られるかどうかは、創薬の成否を握る一つの重要な要因です。特に近年注目を集めている抗体医薬開発のためにはできるだけ多くの抗体候補（～数万クローン）を準備し、その中から未変性の抗原タンパク質の細胞外領域に結合し活性制御を行なう抗体を選抜しなければなりません。本研究で新たに開発した膜タンパク質の大量合成法と BiLIA という無細胞系を基盤とした二つの技術は、抗体作製における問題点、大量の抗原調製と抗体選抜を解決するものです。本技術により GPCR に対するモノクローナル抗体作製の成功率が高まり、同時に製造期間やコストは大幅に削減できるものと期待されます。

【発表論文】

論文タイトル：Production of monoclonal antibodies against GPCR using cell-free synthesized GPCR antigen and biotinylated liposome-based interaction assay　（無細胞合成 GPCR 抗原とビオチン化リポソーム基盤相互作用解析法を用いた抗 GPCR モノクローナル抗体作製法）

掲載誌：Scientific Reports

著者（掲載順）：Hiroyuki Takeda[1], Tomio Ogasawara[1], Tatsuhiko Ozawa[2], Atsushi Muraguchi[2], Pei-Ju Jih[3], Ryo Morishita[4], Motokazu Uchigashima[5], Masahiko Watanabe[5], Toyoshi Fujimoto[6], Takahiro Iwasaki[1], Yaeta Endo[7] & Tatsuya Sawasaki[1]

所属：[1]愛媛大学プロテオサイエンスセンター、[2]富山大学大学院医学薬学研究科、[3] Abnova Corp.　（台湾）、[4]（株）セルフリーサイエンス、[5]北海道大学大学院医学研究科、[6]名古屋大学大学院医学系研究科、[7]愛媛大学先端研究・学術推進機構

掲載日：2015年6月10日 18:00（日本時間）

DOI : 10.1038/srep11333