

学位論文(要約)

モノクローナル抗体の作製と応用による  
ヒトケモカイン受容体 XCR1 の研究

(A study of human chemokine receptor XCR1  
by generation and application of monoclonal antibodies)

平成 26 年 12 月博士（理学）申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

森 慎滋

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.



# 第1章 序論

## 1.1. ケモカイン受容体 XC chemokine receptor 1 (XCR1)とケモカイン XC chemokine ligand 1 (XCL1)

ケモカインファミリーは細胞の遊走や分化、活性化を通して、リンパ組織の維持や炎症の制御に関与している(Allen et al., 2007). ケモカインファミリーは70-100アミノ酸残基からなるタンパク質であり、システイン残基を中心とするアミノ酸配列モチーフからCCサブファミリー, CXCサブファミリー, CX<sub>3</sub>Cサブファミリー, Cサブファミリーの4つに分類される(Allen et al., 2007). Cサブファミリーに属するケモカインとしてマウスではXCL1が(Kelner et al., 1994), ヒトではXCL1 (Muller et al., 1995; Yoshida et al., 1995)とXCL2 (Yoshida et al., 1996)が知られている. XCL1はlymphotactin (Ltn), activation-induced, T cell-derived and chemokine-related cytokine (ATAC), single C motif-1 (SCM-1)とも呼ばれる. ヒトXCL1とXCL2のアミノ酸配列を比較すると、シグナルペプチドを除いた93残基のうち7残基目と8残基目の2残基のみが異なり高い相同性を持つ(Yoshida et al., 1996). Cサブファミリー以外のケモカインは2本のジスルフィド結合を保存しているのに対して、Cサブファミリーはそのうちの1本を欠失しており(Kelner et al., 1994; Muller et al., 1995; Yoshida et al., 1995; Yoshida et al., 1996), 温度や塩濃度の環境に応じてほかのケモカインにはみられない構造変化を行うことが確かめられている(Fox et al., 2014; Kuloglu et al., 2002). XCL1は低温・高塩濃度の条件では通常のケモカインと同様の構造をとる(図1-1左)(Kuloglu et al., 2001). それに対して、高温・低塩濃度の条件では2量体となりβストランドのみからなるXCL1特有の構造をとる(図1-1右)(Tuinstra et al., 2008). 前者の構造はLtn10型、後者の構造はLtn40型と呼ばれ(Tuinstra et al., 2008), XCL2でも同様の構造変化が観察される(Fox et al., 2014).

XCL1はCD8<sup>+</sup>T細胞, CD4<sup>+</sup>T細胞, NK細胞, 髄質上皮細胞から分泌される(Lei and Takahama, 2012). XCR1はXCL1およびXCL2の唯一の受容体である(Yoshida et al., 1998). XCR1は遺伝子クローニングされた当初、オーファン受容体であったことからGPR5と名付けられた(Heiber et al., 1995). XCL1およびXCL2はLtn10型の構造のときXCR1のアゴニストとして機能し, Ltn40型の構造のときグリコサミノグリカン結合活性を持つ(Fox et al., 2014; Tuinstra et al., 2008).

マウスではXCR1はリンパ組織や末梢組織において主にCD8 $\alpha$ <sup>+</sup>/CD103<sup>+</sup>樹状細胞に発現している(Dorner et al., 2009; Lei et al., 2011). ヒトXCR1はマウスCD8 $\alpha$ <sup>+</sup>/CD103<sup>+</sup>樹状細胞と似た表現型のCD141<sup>+</sup>樹状細胞に発現している(図1-2)(Bachem et al., 2010). マウスCD8 $\alpha$ <sup>+</sup>/CD103<sup>+</sup>樹状細胞とヒトCD141<sup>+</sup>樹状細胞はXCL1によって誘引される(Bachem et al., 2010; Dorner et al., 2009). マウスCD8 $\alpha$ <sup>+</sup>/CD103<sup>+</sup>樹状細胞とヒトCD141<sup>+</sup>樹状細胞は強いクロスプレゼンテーション能を持つ(Bachem et al., 2010; den Haan et al., 2000). 通常の細胞の抗原

提示は細胞質のプロテアソームの分解産物を主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラス I に載せて CD4<sup>+</sup> T 細胞に提示し、細胞外から食作用によって取り込まれエンドソームやリソソームで分解された産物を MHC クラス II に載せて CD8<sup>+</sup> T 細胞に提示することにより行われる。それに対して、クロスプレゼンテーションではエンドソームやリソソームで分解された産物を MHC クラス I に載せて CD8<sup>+</sup> T 細胞に提示することで細胞傷害性 T 細胞への分化・増殖を誘導する(Shen and Rock, 2006)。クロスプレゼンテーションはウイルスによる感染や腫瘍に対する細胞傷害活性に重要と考えられる。XCL1—XCR1 シグナルは CD8<sup>+</sup> T 細胞の細胞傷害活性に影響を与える(Dorner et al., 2009)。CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>/CD103<sup>+</sup>樹状細胞の抗原刺激下で CD8<sup>+</sup> T 細胞は XCL1 を分泌する。すると、CD8<sup>+</sup> T 細胞は増殖し IFN- $\gamma$ の分泌能を得て、細胞傷害活性を増強させる。

CD141<sup>+</sup>樹状細胞を介した細胞傷害活性の誘導はウイルスやがんのワクチンの開発につながる可能性がある(Radford and Caminschi, 2013)。反対に、細胞傷害活性の過剰な活性化は自己免疫疾患の原因となり XCL1—XCR1 の関与の可能性が考えられる(Lei and Takahama, 2012)。このため、XCR1 を通して細胞性免疫を制御できる可能性があり、XCR1 は創薬ターゲットになり得る。抗 XCR1 抗体を作製することができれば、CD141<sup>+</sup>樹状細胞特異的な抗原の輸送因子として用いることで効率的に細胞傷害活性を誘導することや、抗体医薬として用いることで CD141<sup>+</sup>樹状細胞の殺傷し細胞傷害活性を抑制することが可能になる。

## 1.2. 抗体の生理的機能

抗体は獲得免疫系における主要な因子であり、病原体の感染を防ぐ役割を果たす。B 細胞から産生され、抗原と高い親和性で結合する。その結果、抗原の毒性部位が不活性化される中和活性、食細胞による抗原の貪食を促進するオプソニン化、抗原発現細胞に抗体の定常領域が補体を誘導して細胞膜に孔を開け細胞死に導く complement-dependent cytotoxicity (CDC)活性、抗原発現細胞に対するナチュラルキラー細胞等の細胞傷害活性により細胞死へと導く antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC)活性といった現象により、感染が抑制される(Burton, 2002)。

抗体は H 鎖と L 鎖の 2 種類のタンパク質により構成され、各鎖は可変領域と定常領域と呼ばれる領域に分けられる(図 1-3)。

可変領域は抗原結合部位として機能する。多様な抗原への結合を可能にするしくみとして、V(D)J 組み換えによる遺伝子の再編成、高頻度の体細胞変異といった現象が知られており、多様なアミノ酸配列を生み出すことができる(Tonegawa, 1983)。可変領域の中でも、ドメインを形成するための領域 framework region (FR)と抗原結合能を持つ領域 complementarity-determining region (CDR)に分けることができる。CDR は各鎖に 3 つずつ存在し体細胞変異が生じやすいことが知られている。また、CDR3 は V(D)J 組み換えにより多様性が生み出される箇所である(Tonegawa, 1983)。V(D)J 組み換えでは、H 鎖では染色体上の V,

D, J の 3 つの遺伝子セグメント群から 1 つずつ遺伝子配列が選択され 3 つの遺伝子配列が結合する。L 鎖の場合は V, J の 2 つの遺伝子セグメント群から 1 つずつ遺伝子配列が選択され 2 つの遺伝子配列が結合する。各セグメントの組み合わせが多様性を生み出すとともに、遺伝子配列の結合部位での塩基配列のゆらぎによりさらなる多様性が生まれる。H 鎖の CDR3 は D セグメントとほぼ同等の領域であり、L 鎖の CDR3 は V セグメントと J セグメントの結合部位である。

H 鎖の定常領域には IgA, IgD, IgE, IgG, IgM の 5 種類のクラスが存在する。定常領域の遺伝子の組み換えによりクラスが変わることをクラススイッチと呼ぶ。それぞれのクラスによって生理活性や結合分子が異なり、生体防御を効率的に行うことができる。また、パパインで処理をすると CH1 ドメインと CH2 ドメインのリンカー部位で切断され、可変領域を含む側を Fab 断片と呼ぶ。

抗体は本来病原体からの感染防御に用いられるタンパク質であるが、抗原に対する高い親和性と高い安定性を持つことから、抗原の検出、抗体医薬品の創出、免疫沈降実験や X 線結晶構造解析への利用といったことへと応用されてきた。

### 1.3. 無細胞タンパク質合成系を用いた抗原の調製

抗体を作製するにあたり、抗原を調製し免疫する必要がある。

オリゴペプチドを抗原とする場合、化学合成により容易に抗原を調製できる。しかし、抗体が認識するエпитープは免疫した抗原に含まれる部分に限られる。構造をエпитープとして認識する抗体は抗原の構造の安定化に寄与すると考えられるが、タンパク質の一部の領域に対してオリゴペプチドを抗原として用いたときにタンパク質全体を安定化するような構造認識抗体を得ることは困難である(Hino et al., 2013)。

構造をエпитープとして認識する抗体を作製するには正しいフォールドを持つ抗原の調製が求められる。無細胞タンパク質合成系を用いてタンパク質を合成させる場合、広い探索空間から理想的な発現条件を検討することが可能である(Katzen et al., 2005)。無細胞タンパク質合成系は細胞の抽出物を用いてタンパク質を合成させるため、リガンドや結合タンパク質といった結合因子、界面活性剤や脂質といった疎水性環境を構成する物質、酸化還元状態を制御する酸化剤や還元剤、細胞毒性を有する物質等を添加することが容易であり、細胞発現系と比べ高い自由度で試行することができる(図 1-4) (Katzen et al., 2005)。これらの物質の添加によりタンパク質の折りたたみの促進や合成後のタンパク質の熱安定性の向上が見込まれ、膜貫通タンパク質をはじめとする安定性が低いタンパク質の調製が可能になると考えられる。よって、構造を安定化する抗体を得るために不安定なタンパク質を抗原として調製する、という難点に対して有効なアプローチとなる。また、精製後のタンパク質を抗原として用いることは、ターゲット以外の抗体が免疫した動物の中で産生されるのを減らすことにつながり、抗体スクリーニングを効率化する。

## 1.4. GPCR の構造解析における抗体の機能および無細胞タンパク

### 質合成系の利点

XCR1をはじめとするケモカイン受容体ファミリーは G タンパク質共役型受容体(GPCR)ファミリーのクラス A に属するタンパク質である(Heiber et al., 1995). GPCR ファミリーは 7 回膜貫通タンパク質であり、ヒトでは 800 種類以上存在する(Fredriksson et al., 2003). 上市された医薬品の 30% 以上が GPCR をターゲットとしている(Wise et al., 2002). そのため、GPCR に対する薬剤の作用機序の解明および立体構造をもとにした薬剤設計の観点から高分解能での構造解析が求められてきた。しかし、GPCR ファミリーの X 線結晶構造解析は高難度とされてきた。理由としては、リガンド非存在下であっても活性型と不活性型の平衡関係にあり構造が不安定であること(Kofuku et al., 2012)、熱安定性が低いこと、親水性領域の少なさが結晶内での分子間パッキングを難しくすることが挙げられる。

組み換え発現系から調製・構造解析された最初の GPCR は 2007 年の  $\beta_2$  アドレナリン受容体である(Rasmussen et al., 2007). 以降組み換え発現系由来の GPCR の結晶化が実現してきた。その際に熱安定性の上昇が必要とされ、リガンドを添加して構造変化を抑制しつつ、抗体との複合体の形成(Rasmussen et al., 2007)、T4 リゾチーム(T4L) (Cherezov et al., 2007)やアポシトクロム b<sub>562</sub>変異体(BRIL) (Liu et al., 2012)といった安定なタンパク質との融合、複数の熱安定性点変異の導入(Warne et al., 2008)といったコンストラクト面での改変や、脂質メソフェーズ法という脂質環境下で結晶化を行う方法の導入(Cherezov et al., 2007)により実現されてきた。

ケモカイン受容体ファミリーのうち X 線結晶構造解析された例として、ヒト由来の CXCR4 (Qin et al., 2015; Wu et al., 2010)と CCR5 (Tan et al., 2013), human herpesvirus 8 由来の US28 (Burg et al., 2015)がある。CXCR4 と CCR5 はともに阻害活性のあるリガンドとの複合体の構造が解明され、不活性型の構造であった(Qin et al., 2015; Tan et al., 2013; Wu et al., 2010). US28 はウイルスがヒトから遺伝子を奪い分子進化させてできたと考えられ(Murphy, 2001), 恒常的なシグナル伝達活性を持つ(Casarosa et al., 2001). US28 と阻害活性を持つケモカインリガンド CX<sub>3</sub>CL1 との複合体の構造が解明されたが、活性型としての構造的特徴を示していた(Burg et al., 2015). このように、ケモカイン受容体の構造はいくつか解明されているものの、その活性化メカニズムは十分に解明されていない。

これまで、結晶化を目的とした GPCR の調製には昆虫細胞発現系が用いられることが多かった。それに対して、熱安定変異体の作製と昆虫細胞発現系の相性は良好とはいえない。昆虫細胞発現系の欠点は、変異体の作製から大量発現までに 2 ヶ月程度の時間を要することである。特に、複数の点変異を組み合わせる安定化を図る方法では変異体の活性や熱安定性の測定を繰り返し行う必要があり、多大な時間が経過してしまう。そのため、点変異を組み合わせる場合には、大腸菌(Serrano-Vega et al., 2008)または HEK293 細胞発現系

(Hirozane et al., 2014)を用いて点変異体の調製, 活性測定試験, 変異の融合を繰り返し, その結果をもとに昆虫細胞発現系でのコンストラクトの変異を選択することで構造解析が実現されてきた. それらの系と比較して, 無細胞タンパク質合成系は発現までを短時間で行える点, 調製が難しいターゲットに対して発現条件を柔軟に設定できる点から有用であると考えられる.

GPCR が抗体との複合体として構造解析された例として,  $\beta_2$  アドレナリン受容体 (Rasmussen et al., 2011a; Rasmussen et al., 2007; Rasmussen et al., 2011b; Ring et al., 2013) と アデノシン  $A_{2A}$  受容体 (Hino et al., 2012), M2 ムスカリン性アセチルコリン受容体 (Kruse et al., 2013), US28 (Burg et al., 2015),  $\mu$ -オピオイド受容体 (Huang et al., 2015) が挙げられる.  $\beta_2$  アドレナリン受容体の最初の例と アデノシン  $A_{2A}$  受容体の例は Fab 断片との複合体であり (Hino et al., 2012; Rasmussen et al., 2007), ほかの例ではリャマ由来の nanobody と呼ばれる抗体が用いられている (Burg et al., 2015; Huang et al., 2015; Kruse et al., 2013; Rasmussen et al., 2011a; Rasmussen et al., 2011b; Ring et al., 2013).  $\beta_2$  アドレナリン受容体・アドレナリン・nanobody 複合体の構造は本来のアゴニストと受容体の複合体の構造であり受容体を活性型の構造で解明した実績があるため (Ring et al., 2013), 抗体との複合体化による活性型 GPCR の X 線結晶構造解析は有望であると考えられる.

そこで, 無細胞タンパク質発現系を用いて XCR1 を調製し, 複合体の X 線結晶構造解析に適した抗体を得ることで, X 線結晶構造解析の基盤を作ることを目指す. GPCR は創薬ターゲットとして有望な遺伝子ファミリーであるため, 迅速な構造解析技術の開発は創薬研究に大きな意義を持つ. 特に, XCR1 の活性を制御する低分子化合物は現在知られていない. 高分解能での構造を明らかにできれば, 活性を制御する低分子化合物の設計の際のガイドとして有用であると考えられる. また, ケモカイン受容体の活性化メカニズムは十分に説明されておらず, 構造情報はそのメカニズムの解明の手掛かりとなる.

特許申請および 5 年以内の雑誌等での刊行予定のため, 非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.



## 第2章 材料と方法

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため，非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開。

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.



特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

## 第3章 結果と考察

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開。

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開。

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.



特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開。



特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開。

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.



## 第4章 総合討論

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため，非公開．

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開。

## 略語表

略称	英語表記	日本語表記
ADC	antibody-drug conjugate	抗体薬物複合体
ADCC	antibody-dependent cell cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害活性
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	
BR	bacteriorhodopsin	
BRIL	apocytochrome b <sub>562</sub> mutant	アポシトクロム b <sub>562</sub> 変異体
CBB	Coomassie Brilliant Blue	
CCR	CC chemokine receptor	
CD	cluster of differentiation	
CDC	complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害活性
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	相補 DNA
CDR	complementarity-determining region	相補性決定領域
CHS	cholesteryl hemisuccinate	
CXCR	CXC chemokine receptor	
DDM	n-dodecyl β-D-maltoside	
DM1	a derivative of maytansinoid	
DTT	dithiothreitol	
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	
Fab	fragment antigen binding	抗原結合領域
FACS	fluorescence activated cell sorting	
FITC	fluorescein isothiocyanate	
FR	framework region	フレームワーク領域
FSEC	fluorescence size-exclusion column chromatography	蛍光ゲルろ過カラム クロマトグラフィー
Fv	fragment variable	可変領域
GPCR	G protein-coupled receptor	G タンパク質共役型受容体
HEK293 細胞	human embryonic kidney 293 cells	ヒト胎児腎細胞
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	
HRP	horse radish peroxidase	
HSQC	heteronuclear single quantum coherence	
H 鎖	heavy chain	重鎖

略称	英語表記	日本語表記
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン
KSHV	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus	カポジ肉腫関連 ヘルペスウイルス
Ltn	lymphotactin	
L 鎖	light chain	軽鎖
MAG	monoacylglycerol	
MHC	major histocompatibility complex	主要組織適合遺伝子複合体
MMAE	monomethyl auristatin E	
<i>M. mazei</i>	<i>Methanosarcina mazei</i>	
mRNA	messenger RNA	伝達 RNA
NMR	nuclear magnetic resonance	核磁気共鳴
ORF	open reading frame	
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	ポリアクリルアミドゲル 電気泳動
PBS	phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
PBST	PBS with 0.05% (v/v) Tween 20	
PCR	polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PDB	Protein Data Bank	
PEG	polyethylene glycol	
PylRS	pyrrolysyl-tRNA synthetase	ピロリジル tRNA 合成酵素
RACE	rapid amplification of cDNA ends	
RF-1	release factor 1	
RMSD	root mean square deviation	平均二乗偏差
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
SDS	sodium dodecyl sulfate	ドデシル硫酸ナトリウム
TEV	tobacco etch virus	
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane	
tRNA	transfer RNA	転移 RNA
TyrRS	tyrosyl-tRNA synthetase	チロシル tRNA 合成酵素
T4L	T4 lysozyme	T4 リゾチーム
vMIP	viral macrophage inflammatory protein	
XCL	XC chemokine ligand	
XCR	XC chemokine receptor	

## アミノ酸の表記

### 天然アミノ酸

1 文字表記	3 文字表記	英語表記	日本語表記
A	Ala	alanine	アラニン
C	Cys	cysteine	システイン
D	Asp	aspartic acid	アスパラギン酸
E	Glu	glutamic acid	グルタミン酸
F	Phe	phenylalanine	フェニルアラニン
G	Gly	glycine	グリシン
H	His	histidine	ヒスチジン
I	Ile	isoleucine	イソロイシン
K	Lys	lysine	リジン
L	Leu	leucine	ロイシン
M	Met	methionine	メチオニン
N	Asn	asparagine	アスパラギン
P	Pro	proline	プロリン
Q	Gln	glutamine	グルタミン
R	Arg	arginine	アルギニン
S	Ser	serine	セリン
T	Thr	threonine	スレオニン
V	Val	valine	バリン
W	Trp	tryptophan	トリプトファン
Y	Tyr	tyrosine	チロシン
O	Pyl	pyrrolysine	ピロリジン
U	Sec	selenocysteine	セレノシステイン

### 非天然アミノ酸

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開。



## 参考文献

- Adams, G.P., and Weiner, L.M. (2005). Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 23, 1147-1157.
- Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkoczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., *et al.* (2010). *PHENIX*: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 213-221.
- Allen, S.J., Crown, S.E., and Handel, T.M. (2007). Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 25, 787-820.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410.
- Axup, J.Y., Bajjuri, K.M., Ritland, M., Hutchins, B.M., Kim, C.H., Kazane, S.A., Halder, R., Forsyth, J.S., Santidrian, A.F., Stafin, K., *et al.* (2012). Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 16101-16106.
- Bachem, A., Guttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H.W., *et al.* (2010). Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c<sup>+</sup>CD141<sup>+</sup> cells as homologues of mouse CD8<sup>+</sup> dendritic cells. *J Exp Med* 207, 1273-1281.
- Basu, D., Castellano, J.M., Thomas, N., and Mishra, R.K. (2013). Cell-free protein synthesis and purification of human dopamine D2 receptor long isoform. *Biotechnol Prog* 29, 601-608.
- Blight, S.K., Larue, R.C., Mahapatra, A., Longstaff, D.G., Chang, E., Zhao, G., Kang, P.T., Green-Church, K.B., Chan, M.K., and Krzycki, J.A. (2004). Direct charging of tRNA<sub>CUA</sub> with pyrrolysine *in vitro* and *in vivo*. *Nature* 431, 333-335.
- Burg, J.S., Ingram, J.R., Venkatakrishnan, A.J., Jude, K.M., Dukupati, A., Feinberg, E.N., Angelini, A., Waghray, D., Dror, R.O., Ploegh, H.L., and Garcia, K.C. (2015). Structural basis for chemokine recognition and activation of a viral G protein-coupled receptor. *Science* 347, 1113-1117.
- Burton, D.R. (2002). Antibodies, viruses and vaccines. *Nat Rev Immunol* 2, 706-713.
- Casasosa, P., Bakker, R.A., Verzijl, D., Navis, M., Timmerman, H., Leurs, R., and Smit, M.J. (2001). Constitutive signaling of the human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28. *J Biol Chem* 276, 1133-1137.
- Chen, V.B., Arendall, W.B., 3rd, Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J., Murray, L.W., Richardson, J.S., and Richardson, D.C. (2010). *MolProbity*: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 12-21.
- Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.J., Kuhn, P., Weis, W.I., Kobilka, B.K., and Stevens, R.C. (2007). High-resolution crystal structure

- of an engineered human  $\beta_2$ -adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* *318*, 1258-1265.
- Corin, K., Baaske, P., Ravel, D.B., Song, J., Brown, E., Wang, X., Geissler, S., Wienken, C.J., Jerabek-Willemsen, M., Duhr, S., *et al.* (2011). A robust and rapid method of producing soluble, stable, and functional G-protein coupled receptors. *PLoS One* *6*, e23036.
- Day, P.W., Rasmussen, S.G., Parnot, C., Fung, J.J., Masood, A., Kobilka, T.S., Yao, X.J., Choi, H.J., Weis, W.I., Rohrer, D.K., and Kobilka, B.K. (2007). A monoclonal antibody for G protein-coupled receptor crystallography. *Nat Methods* *4*, 927-929.
- den Haan, J.M., Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2000). CD8<sup>+</sup> but not CD8<sup>-</sup> dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* *192*, 1685-1696.
- Dore, A.S., Robertson, N., Errey, J.C., Ng, I., Hollenstein, K., Tehan, B., Hurrell, E., Bennett, K., Congreve, M., Magnani, F., *et al.* (2011). Structure of the adenosine A<sub>2A</sub> receptor in complex with ZM241385 and the xanthines XAC and caffeine. *Structure* *19*, 1283-1293.
- Dorner, B.G., Dorner, M.B., Zhou, X., Opitz, C., Mora, A., Guttler, S., Hutloff, A., Mages, H.W., Ranke, K., Schaefer, M., *et al.* (2009). Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunity* *31*, 823-833.
- Egloff, P., Deluigi, M., Heine, P., Balada, S., and Pluckthun, A. (2015). A cleavable ligand column for the rapid isolation of large quantities of homogeneous and functional neurotensin receptor 1 variants from *E. coli*. *Protein Expr Purif* *108*, 106-114.
- Egloff, P., Hillenbrand, M., Klenk, C., Batyuk, A., Heine, P., Balada, S., Schlinkmann, K.M., Scott, D.J., Schutz, M., and Pluckthun, A. (2014). Structure of signaling-competent neurotensin receptor 1 obtained by directed evolution in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, E655-662.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., and Cowtan, K. (2010). Features and development of *Coot*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *66*, 486-501.
- Evans, P.R., and Murshudov, G.N. (2013). How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *69*, 1204-1214.
- Fossum, E., Grodeland, G., Terhorst, D., Tveita, A.A., Vikse, E., Mjaaland, S., Henri, S., Malissen, B., and Bogen, B. (2015). Vaccine molecules targeting Xcr1 on cross-presenting DCs induce protective CD8<sup>+</sup> T-cell responses against influenza virus. *Eur J Immunol* *45*, 624-635.
- Fox, J.C., Nakayama, T., Tyler, R.C., Sander, T.L., Yoshie, O., and Volkman, B.F. (2014). Structural and agonist properties of XCL2, the other member of the C-chemokine subfamily. *Cytokine* *71*, 302-311.
- Francisco, J.A., Cervený, C.G., Meyer, D.L., Mixan, B.J., Klussman, K., Chace, D.F., Rejniak, S.X., Gordon, K.A., DeBlanc, R., Toki, B.E., *et al.* (2003). cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. *Blood* *102*, 1458-1465.

- Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C., Lundin, L.G., and Schioth, H.B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63, 1256-1272.
- Geyer, H., Hartung, E., Mages, H.W., Weise, C., Beluzic, R., Vugrek, O., Jonjic, S., Kroczeck, R.A., and Voigt, S. (2014). Cytomegalovirus expresses the chemokine homologue vXCL1 capable of attracting XCR1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> dendritic cells. *J Virol* 88, 292-302.
- Ghosh, E., Kumari, P., Jaiman, D., and Shukla, A.K. (2015). Methodological advances: the unsung heroes of the GPCR structural revolution. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 69-81.
- Golinelli-Pimpaneau, B., Goncalves, O., Dintinger, T., Blanchard, D., Knossow, M., and Tellier, C. (2000). Structural evidence for a programmed general base in the active site of a catalytic antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9892-9895.
- Hamblett, K.J., Senter, P.D., Chace, D.F., Sun, M.M., Lenox, J., Cervený, C.G., Kissler, K.M., Bernhardt, S.X., Kopcha, A.K., Zabinski, R.F., *et al.* (2004). Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate. *Clin Cancer Res* 10, 7063-7070.
- Hanson, M.A., Cherezov, V., Griffith, M.T., Roth, C.B., Jaakola, V.P., Chien, E.Y., Velasquez, J., Kuhn, P., and Stevens, R.C. (2008). A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human  $\beta_2$ -adrenergic receptor. *Structure* 16, 897-905.
- Hartung, E., Becker, M., Bachem, A., Reeg, N., Jakel, A., Hutloff, A., Weber, H., Weise, C., Giesecke, C., Henn, V., *et al.* (2015). Induction of Potent CD8 T Cell Cytotoxicity by Specific Targeting of Antigen to Cross-Presenting Dendritic Cells In Vivo via Murine or Human XCR1. *J Immunol* 194, 1069-1079.
- Heiber, M., Docherty, J.M., Shah, G., Nguyen, T., Cheng, R., Heng, H.H., Marchese, A., Tsui, L.C., Shi, X., George, S.R., and *et al.* (1995). Isolation of three novel human genes encoding G protein-coupled receptors. *DNA Cell Biol* 14, 25-35.
- Herring, S., Ambrogelly, A., Polycarpo, C.R., and Soll, D. (2007). Recognition of pyrrolysine tRNA by the *Desulfotobacterium hafniense* pyrrolysyl-tRNA synthetase. *Nucleic Acids Res* 35, 1270-1278.
- Hino, T., Arakawa, T., Iwanari, H., Yurugi-Kobayashi, T., Ikeda-Suno, C., Nakada-Nakura, Y., Kusano-Arai, O., Weyand, S., Shimamura, T., Nomura, N., *et al.* (2012). G-protein-coupled receptor inactivation by an allosteric inverse-agonist antibody. *Nature* 482, 237-240.
- Hino, T., Iwata, S., and Murata, T. (2013). Generation of functional antibodies for mammalian membrane protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol* 23, 563-568.
- Hirozane, Y., Motoyaji, T., Maru, T., Okada, K., and Tarui, N. (2014). Generating thermostabilized agonist-bound GPR40/FFAR1 using virus-like particles and a label-free binding assay. *Mol Membr Biol* 31, 168-175.
- Hofer, T., Skeffington, L.R., Chapman, C.M., and Rader, C. (2009). Molecularly defined antibody

- conjugation through a selenocysteine interface. *Biochemistry* 48, 12047-12057.
- Huang, W., Manglik, A., Venkatakrisnan, A.J., Laeremans, T., Feinberg, E.N., Sanborn, A.L., Kato, H.E., Livingston, K.E., Thorsen, T.S., Kling, R.C., *et al.* (2015). Structural insights into  $\mu$ -opioid receptor activation. *Nature* 524, 315-321.
- Hutchins, B.M., Kazane, S.A., Staflin, K., Forsyth, J.S., Felding-Habermann, B., Schultz, P.G., and Smider, V.V. (2011). Site-specific coupling and sterically controlled formation of multimeric antibody Fab fragments with unnatural amino acids. *J Mol Biol* 406, 595-603.
- Ishihara, G., Goto, M., Saeki, M., Ito, K., Hori, T., Kigawa, T., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2005). Expression of G protein coupled receptors in a cell-free translational system using detergents and thioredoxin-fusion vectors. *Protein Expr Purif* 41, 27-37.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (2003). X-ray structure of a voltage-dependent  $K^+$  channel. *Nature* 423, 33-41.
- Junge, F., Luh, L.M., Proverbio, D., Schafer, B., Abele, R., Beyermann, M., Dotsch, V., and Bernhard, F. (2010). Modulation of G-protein coupled receptor sample quality by modified cell-free expression protocols: a case study of the human endothelin A receptor. *J Struct Biol* 172, 94-106.
- Junutula, J.R., Bhakta, S., Raab, H., Ervin, K.E., Eigenbrot, C., Vandlen, R., Scheller, R.H., and Lowman, H.B. (2008a). Rapid identification of reactive cysteine residues for site-specific labeling of antibody-Fabs. *J Immunol Methods* 332, 41-52.
- Junutula, J.R., Raab, H., Clark, S., Bhakta, S., Leipold, D.D., Weir, S., Chen, Y., Simpson, M., Tsai, S.P., Dennis, M.S., *et al.* (2008b). Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. *Nat Biotechnol* 26, 925-932.
- Kabat, E.A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S., Foeller, C. (1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth edn (NIH Publication).
- Kabsch, W. (2010). *XDS*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 125-132.
- Kabsch, W., and Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22, 2577-2637.
- Katzen, F., Chang, G., and Kudlicki, W. (2005). The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol* 23, 150-156.
- Kelner, G.S., Kennedy, J., Bacon, K.B., Kleyensteuber, S., Largaespada, D.A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bazan, J.F., Moore, K.W., Schall, T.J., and *et al.* (1994). Lymphotoxin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 266, 1395-1399.
- Klammt, C., Perrin, M.H., Maslennikov, I., Renault, L., Krupa, M., Kwiatkowski, W., Stahlberg, H., Vale, W., and Choe, S. (2011). Polymer-based cell-free expression of ligand-binding family B G-protein coupled receptors without detergents. *Protein Sci* 20, 1030-1041.
- Klammt, C., Schwarz, D., Eifler, N., Engel, A., Piehler, J., Haase, W., Hahn, S., Dotsch, V., and Bernhard, F. (2007a). Cell-free production of G protein-coupled receptors for functional and structural

- studies. *J Struct Biol* 158, 482-493.
- Klammt, C., Srivastava, A., Eifler, N., Junge, F., Beyermann, M., Schwarz, D., Michel, H., Doetsch, V., and Bernhard, F. (2007b). Functional analysis of cell-free-produced human endothelin B receptor reveals transmembrane segment 1 as an essential area for ET-1 binding and homodimer formation. *FEBS J* 274, 3257-3269.
- Kofuku, Y., Ueda, T., Okude, J., Shiraishi, Y., Kondo, K., Maeda, M., Tsujishita, H., and Shimada, I. (2012). Efficacy of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region. *Nat Commun* 3, 1045.
- Krissinel, E. (2012). Enhanced fold recognition using efficient short fragment clustering. *Journal of Molecular Biochemistry* 1, 76-85.
- Kruse, A.C., Ring, A.M., Manglik, A., Hu, J., Hu, K., Eitel, K., Hubner, H., Pardon, E., Valant, C., Sexton, P.M., *et al.* (2013). Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 504, 101-106.
- Kuloglu, E.S., McCaslin, D.R., Kitabwalla, M., Pauza, C.D., Markley, J.L., and Volkman, B.F. (2001). Monomeric solution structure of the prototypical 'C' chemokine lymphotactin. *Biochemistry* 40, 12486-12496.
- Kuloglu, E.S., McCaslin, D.R., Markley, J.L., and Volkman, B.F. (2002). Structural rearrangement of human lymphotactin, a C chemokine, under physiological solution conditions. *J Biol Chem* 277, 17863-17870.
- Larson, R.A., Sievers, E.L., Stadtmauer, E.A., Lowenberg, B., Estey, E.H., Dombret, H., Theobald, M., Voliotis, D., Bennett, J.M., Richie, M., *et al.* (2005). Final report of the efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first recurrence. *Cancer* 104, 1442-1452.
- Lebon, G., Bennett, K., Jazayeri, A., and Tate, C.G. (2011a). Thermostabilisation of an agonist-bound conformation of the human adenosine A<sub>2A</sub> receptor. *J Mol Biol* 409, 298-310.
- Lebon, G., Warne, T., Edwards, P.C., Bennett, K., Langmead, C.J., Leslie, A.G., and Tate, C.G. (2011b). Agonist-bound adenosine A<sub>2A</sub> receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature* 474, 521-525.
- Lei, Y., Ripen, A.M., Ishimaru, N., Ohigashi, I., Nagasawa, T., Jeker, L.T., Bosl, M.R., Hollander, G.A., Hayashi, Y., Malefyt Rde, W., *et al.* (2011). Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. *J Exp Med* 208, 383-394.
- Lei, Y., and Takahama, Y. (2012). XCL1 and XCR1 in the immune system. *Microbes Infect* 14, 262-267.
- Lewis Phillips, G.D., Li, G., Dugger, D.L., Crocker, L.M., Parsons, K.L., Mai, E., Blattler, W.A., Lambert, J.M., Chari, R.V., Lutz, R.J., *et al.* (2008). Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer research* 68, 9280-9290.

- Liu, W., Chun, E., Thompson, A.A., Chubukov, P., Xu, F., Katritch, V., Han, G.W., Roth, C.B., Heitman, L.H., AP, I.J., *et al.* (2012). Structural basis for allosteric regulation of GPCRs by sodium ions. *Science* 337, 232-236.
- Luttichau, H.R., Johnsen, A.H., Jurlander, J., Rosenkilde, M.M., and Schwartz, T.W. (2007). Kaposi sarcoma-associated herpes virus targets the lymphotactin receptor with both a broad spectrum antagonist vCCL2 and a highly selective and potent agonist vCCL3. *J Biol Chem* 282, 17794-17805.
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of applied crystallography* 40, 658-674.
- Misquitta, L.V., Misquitta, Y., Cherezov, V., Slattery, O., Mohan, J.M., Hart, D., Zhalnina, M., Cramer, W.A., and Caffrey, M. (2004). Membrane protein crystallization in lipidic mesophases with tailored bilayers. *Structure* 12, 2113-2124.
- Mukai, T., Hayashi, A., Iraha, F., Sato, A., Ohtake, K., Yokoyama, S., and Sakamoto, K. (2010). Codon reassignment in the *Escherichia coli* genetic code. *Nucleic Acids Res* 38, 8188-8195.
- Mukai, T., Hoshi, H., Ohtake, K., Takahashi, M., Yamaguchi, A., Hayashi, A., Yokoyama, S., and Sakamoto, K. (2015). Highly reproductive *Escherichia coli* cells with no specific assignment to the UAG codon. *Scientific reports* 5, 9699.
- Mukai, T., Yanagisawa, T., Ohtake, K., Wakamori, M., Adachi, J., Hino, N., Sato, A., Kobayashi, T., Hayashi, A., Shirouzu, M., *et al.* (2011). Genetic-code evolution for protein synthesis with non-natural amino acids. *Biochem Biophys Res Commun* 411, 757-761.
- Muller, S., Dorner, B., Korthauer, U., Mages, H.W., D'Apuzzo, M., Senger, G., and Kroczeck, R.A. (1995). Cloning of ATAC, an activation-induced, chemokine-related molecule exclusively expressed in CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *Eur J Immunol* 25, 1744-1748.
- Murphy, P.M. (2001). Viral exploitation and subversion of the immune system through chemokine mimicry. *Nature immunology* 2, 116-122.
- Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in Enzymology* 276, 307-326.
- Panowski, S., Bhakta, S., Raab, H., Polakis, P., and Junutula, J.R. (2014). Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy. *MAbs* 6, 34-45.
- Park, S.H., Das, B.B., Casagrande, F., Tian, Y., Nothnagel, H.J., Chu, M., Kiefer, H., Maier, K., De Angelis, A.A., Marassi, F.M., and Opella, S.J. (2012). Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers. *Nature* 491, 779-783.
- Polycarpo, C., Ambrogelly, A., Berube, A., Winbush, S.M., McCloskey, J.A., Crain, P.F., Wood, J.L., and Soll, D. (2004). An aminoacyl-tRNA synthetase that specifically activates pyrrolysine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12450-12454.
- Proverbio, D., Roos, C., Beyermann, M., Orban, E., Dotsch, V., and Bernhard, F. (2013). Functional

- properties of cell-free expressed human endothelin A and endothelin B receptors in artificial membrane environments. *Biochim Biophys Acta* 1828, 2182-2192.
- Qin, L., Kufareva, I., Holden, L.G., Wang, C., Zheng, Y., Zhao, C., Fenalti, G., Wu, H., Han, G.W., Cherezov, V., *et al.* (2015). Crystal structure of the chemokine receptor CXCR4 in complex with a viral chemokine. *Science* 347, 1117-1122.
- Qiu, H., and Caffrey, M. (1998). Lyotropic and thermotropic phase behavior of hydrated monoacylglycerols: Structure characterization of monovaccenin. *Biophys J* 74, A374-A374.
- Radford, K.J., and Caminschi, I. (2013). New generation of dendritic cell vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 9, 259-264.
- Rasmussen, S.G., Choi, H.J., Fung, J.J., Pardon, E., Casarosa, P., Chae, P.S., Devree, B.T., Rosenbaum, D.M., Thian, F.S., Kobilka, T.S., *et al.* (2011a). Structure of a nanobody-stabilized active state of the  $\beta_2$  adrenoceptor. *Nature* 469, 175-180.
- Rasmussen, S.G., Choi, H.J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M., Ratnala, V.R., Sanishvili, R., Fischetti, R.F., *et al.* (2007). Crystal structure of the human  $\beta_2$  adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450, 383-387.
- Rasmussen, S.G., DeVree, B.T., Zou, Y., Kruse, A.C., Chung, K.Y., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Chae, P.S., Pardon, E., Calinski, D., *et al.* (2011b). Crystal structure of the  $\beta_2$  adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477, 549-555.
- Ring, A.M., Manglik, A., Kruse, A.C., Enos, M.D., Weis, W.I., Garcia, K.C., and Kobilka, B.K. (2013). Adrenaline-activated structure of  $\beta_2$ -adrenoceptor stabilized by an engineered nanobody. *Nature* 502, 575-579.
- Roth, C.B., Hanson, M.A., and Stevens, R.C. (2008). Stabilization of the human  $\beta_2$ -adrenergic receptor TM4-TM3-TM5 helix interface by mutagenesis of Glu122<sup>3,41</sup>, a critical residue in GPCR structure. *J Mol Biol* 376, 1305-1319.
- Ryden, S.M., and Isaksson, L.A. (1984). A temperature-sensitive mutant of *Escherichia coli* that shows enhanced misreading of UAG/A and increased efficiency for some tRNA nonsense suppressors. *Mol Gen Genet* 193, 38-45.
- Sansuk, K., Balog, C.I., van der Does, A.M., Booth, R., de Grip, W.J., Deelder, A.M., Bakker, R.A., Leurs, R., and Hensbergen, P.J. (2008). GPCR proteomics: mass spectrometric and functional analysis of histamine H<sub>1</sub> receptor after baculovirus-driven and *in vitro* cell free expression. *J Proteome Res* 7, 621-629.
- Schrodinger, L. (2014). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7 Schrödinger, LLC.
- Serrano-Vega, M.J., Magnani, F., Shibata, Y., and Tate, C.G. (2008). Conformational thermostabilization of the  $\beta_1$ -adrenergic receptor in a detergent-resistant form. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 877-882.
- Shen, L., and Rock, K.L. (2006). Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class

- I molecules. *Curr Opin Immunol* 18, 85-91.
- Shibata, Y., Gvozdenovic-Jeremic, J., Love, J., Kloss, B., White, J.F., Grisshammer, R., and Tate, C.G. (2013). Optimising the combination of thermostabilising mutations in the neurotensin receptor for structure determination. *Biochim Biophys Acta* 1828, 1293-1301.
- Shimamura, T., Shiroishi, M., Weyand, S., Tsujimoto, H., Winter, G., Katritch, V., Abagyan, R., Cherezov, V., Liu, W., Han, G.W., *et al.* (2011). Structure of the human histamine H<sub>1</sub> receptor complex with doxepin. *Nature* 475, 65-70.
- Srinivasan, G., James, C.M., and Krzycki, J.A. (2002). Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA. *Science* 296, 1459-1462.
- Su, H.P., Golden, J.W., Gittis, A.G., Hooper, J.W., and Garboczi, D.N. (2007). Structural basis for the binding of the neutralizing antibody, 7D11, to the poxvirus L1 protein. *Virology* 368, 331-341.
- Tan, Q., Zhu, Y., Li, J., Chen, Z., Han, G.W., Kufareva, I., Li, T., Ma, L., Fenalti, G., Li, J., *et al.* (2013). Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex. *Science* 341, 1387-1390.
- Tanabe, H., Fujii, Y., Okada-Iwabuchi, M., Iwabuchi, M., Nakamura, Y., Hosaka, T., Motoyama, K., Ikeda, M., Wakiyama, M., Terada, T., *et al.* (2015a). Crystal structures of the human adiponectin receptors. *Nature* 520, 312-316.
- Tanabe, H., Motoyama, K., Ikeda, M., Wakiyama, M., Terada, T., Ohsawa, N., Hosaka, T., Hato, M., Fujii, Y., Nakamura, Y., *et al.* (2015b). Expression, purification, crystallization, and preliminary X-ray crystallographic studies of the human adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2. *Journal of structural and functional genomics* 16, 11-23.
- Tian, F., Lu, Y., Manibusan, A., Sellers, A., Tran, H., Sun, Y., Phuong, T., Barnett, R., Hehli, B., Song, F., *et al.* (2014). A general approach to site-specific antibody drug conjugates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 1766-1771.
- Toleikis, L., Broders, O., and Dubel, S. (2004). Cloning single-chain antibody fragments (scFv) from hybridoma cells. *Methods Mol Med* 94, 447-458.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581.
- Tuinstra, R.L., Peterson, F.C., Elgin, E.S., Pelzek, A.J., and Volkman, B.F. (2007). An engineered second disulfide bond restricts lymphotactin/XCL1 to a chemokine-like conformation with XCR1 agonist activity. *Biochemistry* 46, 2564-2573.
- Tuinstra, R.L., Peterson, F.C., Kutlesa, S., Elgin, E.S., Kron, M.A., and Volkman, B.F. (2008). Interconversion between two unrelated protein folds in the lymphotactin native state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5057-5062.
- Wang, L., Amphlett, G., Blattler, W.A., Lambert, J.M., and Zhang, W. (2005). Structural characterization of the maytansinoid-monoclonal antibody immunoconjugate, huN901-DM1, by mass spectrometry. *Protein Sci* 14, 2436-2446.



- Wang, X., Corin, K., Baaske, P., Wienken, C.J., Jerabek-Willemsen, M., Duhr, S., Braun, D., and Zhang, S. (2011). Peptide surfactants for cell-free production of functional G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 9049-9054.
- Warne, T., Moukhametzianov, R., Baker, J.G., Nehme, R., Edwards, P.C., Leslie, A.G., Schertler, G.F., and Tate, C.G. (2011). The structural basis for agonist and partial agonist action on a  $\beta_1$ -adrenergic receptor. *Nature* 469, 241-244.
- Warne, T., Serrano-Vega, M.J., Baker, J.G., Moukhametzianov, R., Edwards, P.C., Henderson, R., Leslie, A.G., Tate, C.G., and Schertler, G.F. (2008). Structure of a  $\beta_1$ -adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 454, 486-491.
- White, J.F., Noinaj, N., Shibata, Y., Love, J., Kloss, B., Xu, F., Gvozdenovic-Jeremic, J., Shah, P., Shiloach, J., Tate, C.G., and Grisshammer, R. (2012). Structure of the agonist-bound neurotensin receptor. *Nature* 490, 508-513.
- Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G., McCoy, A., *et al.* (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67, 235-242.
- Wise, A., Gearing, K., and Rees, S. (2002). Target validation of G-protein coupled receptors. *Drug Discov Today* 7, 235-246.
- Wu, B., Chien, E.Y., Mol, C.D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F.C., *et al.* (2010). Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 330, 1066-1071.
- Yanagisawa, T., Ishii, R., Fukunaga, R., Kobayashi, T., Sakamoto, K., and Yokoyama, S. (2008). Multistep engineering of pyrrolysyl-tRNA synthetase to genetically encode *N*<sup>ε</sup>-(*o*-azidobenzoyloxycarbonyl) lysine for site-specific protein modification. *Chem Biol* 15, 1187-1197.
- Yang, J.P., Cirico, T., Katzen, F., Peterson, T.C., and Kudlicki, W. (2011). Cell-free synthesis of a functional G protein-coupled receptor complexed with nanometer scale bilayer discs. *BMC Biotechnol* 11, 57.
- Yoshida, T., Imai, T., Kakizaki, M., Nishimura, M., Takagi, S., and Yoshie, O. (1998). Identification of single C motif-1/lymphotactin receptor XCR1. *J Biol Chem* 273, 16551-16554.
- Yoshida, T., Imai, T., Kakizaki, M., Nishimura, M., and Yoshie, O. (1995). Molecular cloning of a novel C or  $\gamma$  type chemokine, SCM-1. *FEBS Lett* 360, 155-159.
- Yoshida, T., Imai, T., Takagi, S., Nishimura, M., Ishikawa, I., Yaoi, T., and Yoshie, O. (1996). Structure and expression of two highly related genes encoding SCM-1/human lymphotactin. *FEBS Lett* 395, 82-88.
- Zhang, Y., and Gladyshev, V.N. (2007). High content of proteins containing 21st and 22nd amino acids, selenocysteine and pyrrolysine, in a symbiotic deltaproteobacterium of gutless worm *Olavius*

*algarvensis*. Nucleic Acids Res 35, 4952-4963.

Zimmerman, E.S., Heibeck, T.H., Gill, A., Li, X., Murray, C.J., Madlansacay, M.R., Tran, C., Uter, N.T., Yin, G., Rivers, P.J., *et al.* (2014). Production of site-specific antibody-drug conjugates using optimized non-natural amino acids in a cell-free expression system. Bioconjug Chem 25, 351-361.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、指導教員の深田吉孝先生に感謝いたします。理化学研究所横山構造生物学研究室の横山茂之上席研究員には本研究のために研究環境を整えて下さり、研究を進めていく過程で様々なアドバイスを頂きました。理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター構造合成生物学部門の白水美香子部門長、染谷友美博士には研究の計画や議論を通じて示唆を頂きました。理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター構造合成生物学部門の保坂俊彰博士には膜貫通タンパク質の取り扱いおよび構造解析の際に多くの指導や助言をして頂きました。現在東京慈恵会医科大学の奥田賢一博士には抗体のスクリーニング、XCR1 の調製法、表面プラズモン共鳴の測定法に関してお世話になりました。表面プラズモン共鳴については理化学研究所横山構造生物学研究室の堀哲哉博士にもお世話になりました。理化学研究所ライフサイエンス技術基盤センターの田辺弘明研究員には抗体スクリーニングおよび抗体のクローニングに関してアドバイスを頂きました。X 線回折データの測定については保坂俊彰博士、田辺弘明研究員、SPRING-8 のビームラインスタッフの方々のお世話になりました。理化学研究所ライフサイエンス技術基盤センターの池田真理子研究員、脇山素明博士には細胞培養をして頂きました。理化学研究所ライフサイエンス技術基盤センターの大沢登博士には発現系プラスミドの作製においてお世話になりました。理化学研究所横山構造生物学研究室の寺田貴帆博士には XCL1 の調製法に関してアドバイスを頂きました。横山構造生物学研究室の柳沢達男博士には非天然アミノ酸の導入に関してご指導を頂きました。現在武蔵野大学の武藤裕博士には XCL1 の HSQC スペクトルを測定して頂きました。和歌山県立医科大学の改正恒康教授、香川大学の星野克明教授には抗体スクリーニングにおける FACS を行って頂くとともに、免疫系における XCR1 の役割に関してご教授頂きました。理化学研究所の斉藤隆グループディレクターには抗原の免疫およびハイブリドーマの作製、理化学研究所の竹森利忠ユニットリーダーには抗体の調製を行って頂きました。関西医科大学の伊藤量基準教授にはヒト CD141<sup>+</sup>樹状細胞の染色を行って頂きました。深田研究室の山木海絵子様、現在東京大学大学院理学系研究科菅研究室に在籍しております武藤(篠崎)貴理子様、理化学研究所の中山朋子様、寺田貴帆博士、東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻事務の皆様には学業や研究における事務面で様々な便宜を図って頂きました。その他横山構造生物学研究室の方々、理化学研究所ライフサイエンス技術基盤センターの皆様、かつて私が在籍した東京大学横山研究室の教員、先輩の方々には研究生活の多くの面で支えて頂きました。以上の方々に心から感謝いたします。

博士課程に在籍する間、理化学研究所の大学院生リサーチ・アソシエイト制度により経済面で支えて頂き研究に打ち込むことができました。最後に、生活面、精神面で支えてくださった両親、家族に心から感謝いたします。

## 図表

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

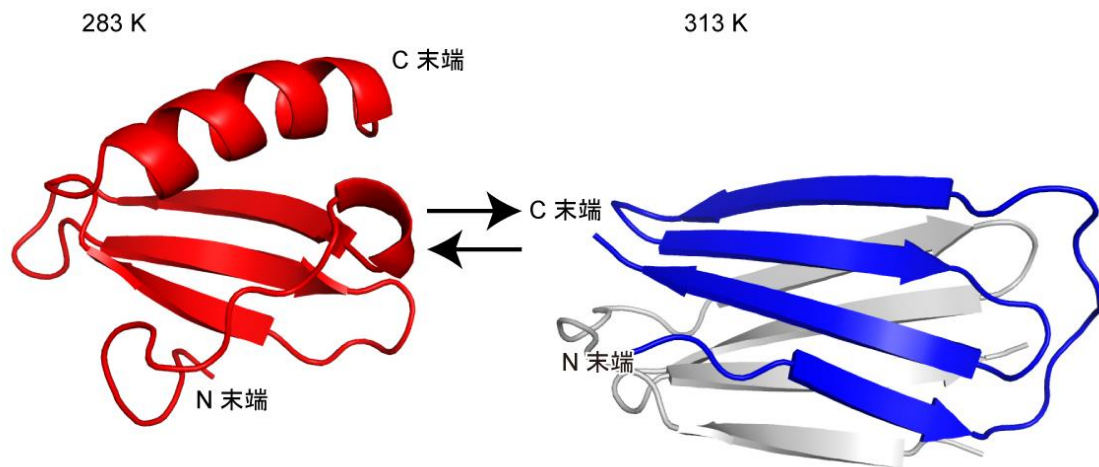


図 1-1: XCL1 の立体構造と構造変化

XCL1 は 283 K にて典型的なケモカイン型の構造(PDB ID: 1J8I)をとる(赤). それに対して, 313 K では XCL1 特有の $\beta$ シートからなる 2 量体構造(PDB ID:2JP1)をとる(青と灰色). 図では安定な構造をとる領域 PDB ID: 1J8I の 9-68(赤)と PDB ID: 2JP1 の 8-52(青と灰色)を表示した.

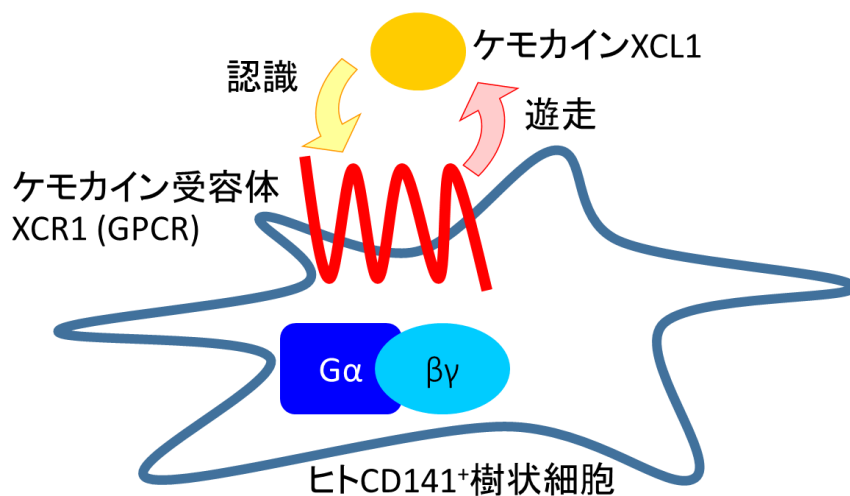


図 1-2: XCR1 の CD141<sup>+</sup>樹状細胞の機能

XCR1 は CD141<sup>+</sup>樹状細胞に発現しており, XCL1 を認識し活性化する. このシグナルにより CD141<sup>+</sup>樹状細胞を XCL1 の濃度の高いほうへと遊走させる.



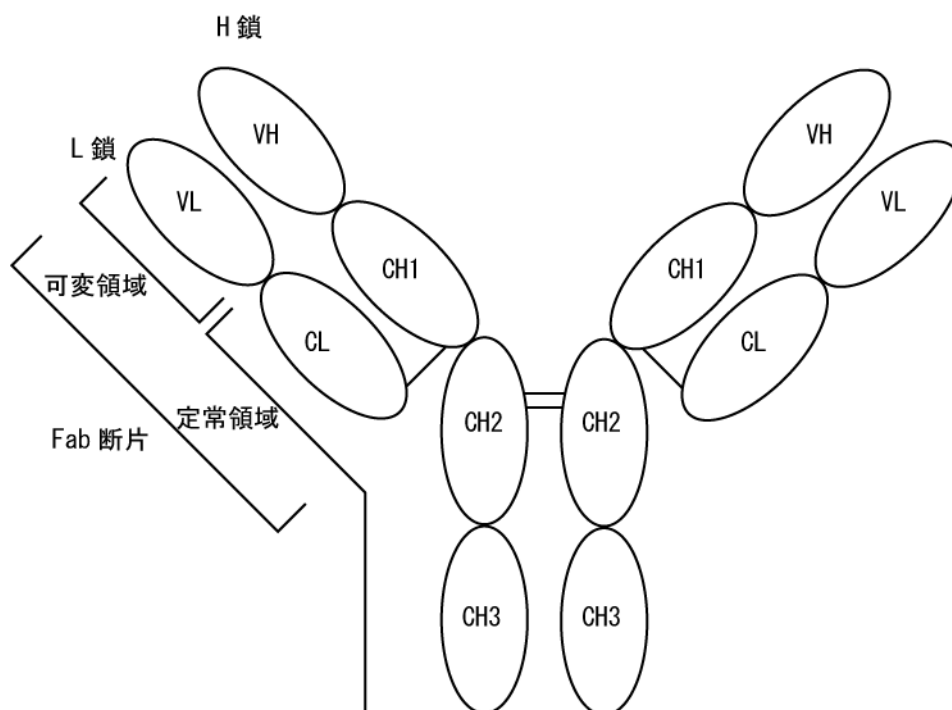


図 1-3: 抗体の模式図

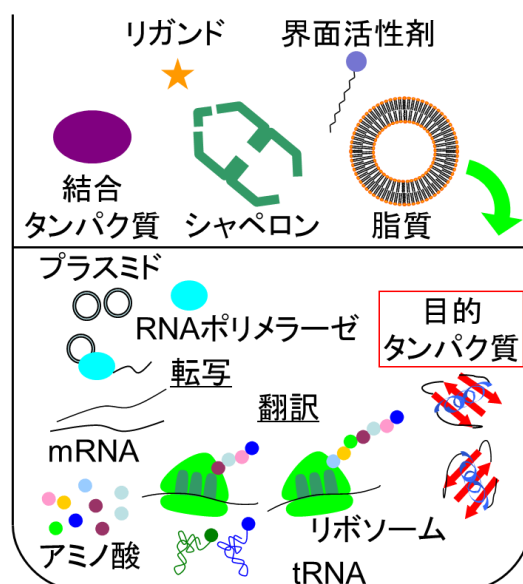


図 1-4: 無細胞タンパク質合成系の模式図

無細胞タンパク質合成系は細胞抽出物を用いて試験管内でタンパク質を合成する系であり、膜貫通タンパク質の安定化に寄与する因子を容易に添加できる。

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.



特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.



特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.



特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.



特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.



特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.



特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.

特許申請および5年以内の雑誌等での刊行予定のため、非公開.