

## 論文の内容の要旨

論文題目 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)

氏名 森 慎滋

ケモカイン—ケモカイン受容体シグナルは免疫系細胞の遊走, 分化, 活性化を制御する. ケモカインは 70-100 アミノ酸残基からなり, ケモカイン受容体によって認識される. ケモカイン受容体は G タンパク質共役型受容体(GPCR)ファミリーに含まれる 7 回膜貫通タンパク質である. XC chemokine receptor 1 (XCR1)はケモカイン受容体のひとつであり, ヒト CD141<sup>+</sup>樹状細胞およびマウス CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>/CD103<sup>+</sup>樹状細胞の遊走活性を制御している. これらの樹状細胞はクロスプレゼンテーション能を持ち, 細胞外の抗原を MHC クラス I によって提示することができる. クロスプレゼンテーション活性はウイルスや腫瘍に対する免疫反応において重要である. XC chemokine ligand 1 (XCL1)—XCR1 シグナルは細胞傷害性 T 細胞の細胞傷害活性に関与する. そこで, XCR1 の X 線結晶構造解析や抗体医薬への展開の基礎として, 抗 XCR1 モノクローナル抗体を作製することにした.

現在ケモカインと結合したケモカイン受容体の立体構造は, 阻害活性を持つウイルス由来のケモカインとヒト由来のケモカイン受容体の複合体, ヒト由来のケモカインと恒常的なシグナル伝達活性を示すウイルス由来のケモカイン受容体の複合体のみしか知られておらず, 本来のケモカイン受容体の活性化メカニズムについて構造生物学的知見からは十分に解明されていない. XCR1 のリガンドとなる低分子化合物も知られていない. XCR1 とケモカインの複合体の構造が明らかとなれば, ケモカイン受容体の活性化メカニズムの解明

へとつながるとともに低分子化合物の設計の際の鋳型として有用である。天然型のアゴニストと活性型 GPCR の複合体の構造はアドレナリン・ $\beta_2$  アドレナリン受容体・抗 $\beta_2$  アドレナリン受容体抗体の複合体が知られており, XCR1 と XCL1 複合体を X 線結晶構造解析するにあたり抗体を作製することは有望な方法であると考えられる。また, XCR1 に作用する低分子化合物が知られていないことから, 抗体医薬の果たす役割は大きいと考えられる。

大腸菌無細胞タンパク質合成系により  $^{15}\text{N}$  ラベルしたヒト XCL1 を合成し, カラムクロマトグラフィーで精製を行った。HSQC スペクトルの測定により, 調製した XCL1 は既知の構造を持つことが確かめられた。界面活性剤存在下における大腸菌無細胞タンパク質合成系によりヒト XCR1 を合成し, カラムクロマトグラフィーで精製後, リポソームへ再構成した。表面プラズモン共鳴による結合アッセイの結果, 調製した XCR1 は XCL1 と結合することが示唆され, リガンド結合活性を持つことを確認した。

リポソームに再構成した XCR1 を抗原としてマウスに免疫を行い, ハイブリドーマを作製した。リポソーム ELISA により結合能を持つ抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングした。FACS, 蛍光ゲルろ過クロマトグラフィー(FSEC), 変性ドットブロット, 表面プラズモン共鳴により XCR1 と抗体の関係性を決定した。

その結果をもとに, 目的に合致した抗体産生ハイブリドーマから抗体遺伝子をクローニングした。XCR1 との複合体の X 線結晶構造解析に適した Fab 断片について大腸菌無細胞タンパク質合成系にて合成し X 線結晶構造解析を行い,  $1.75 \text{ \AA}$  の分解能で構造を決定した。この Fab 断片と XCR1 を共結晶化した際に, 分子置換法による位相決定において最適な探索モデルとなる。抗原の細胞外領域と結合する Fab 断片についても X 線結晶構造解析を行い,  $2.0 \text{ \AA}$  の分解能で構造を決定した。

細胞外認識抗体の Fab 断片について, リジン類縁体の非天然アミノ酸を大腸菌無細胞タンパク質合成系のアンバー(UAG)コドンに割り当てることにより導入した。精製後, クリックケミストリーを用いて蛍光色素との架橋を行った。その結果, 導入した非天然アミノ

酸が蛍光色素との架橋部位として機能することを確認した。これを応用することにより、抗体薬物複合体の薬剤架橋部位としての利用が期待できる。