

C1-1 クライオ電子顕微鏡法のための膜タンパク質複合体の生産と試料調製技術

膜タンパク質複合体の発現と精製、クライオ電子顕微鏡観察用試料調製、界面活性剤除去法

[1] 支援担当者

所属		①名古屋大学 細胞生理学研究センター ②大阪大学 蛋白質研究所
氏名		①大嶋 篤典、阿部 一啓 ②Christoph Gerle
AMED 事業	ユニット／領域名 課題名	構造解析ユニット（タンパク質生産領域） クライオ電子顕微鏡を用いた膜タンパク質の高分解能動的構造解析と技術人材育成支援
	代表機関 代表者	名古屋大学 大嶋 篤典
支援技術のキーワード		クライオ電子顕微鏡、試料作製、膜タンパク質複合体の発現・精製、界面活性剤除去、マニュアルプロットイング

[2] 支援技術の概要

- 昆虫細胞や動物細胞を用いてターゲットとなる真核生物由来膜タンパク質複合体を大量発現。



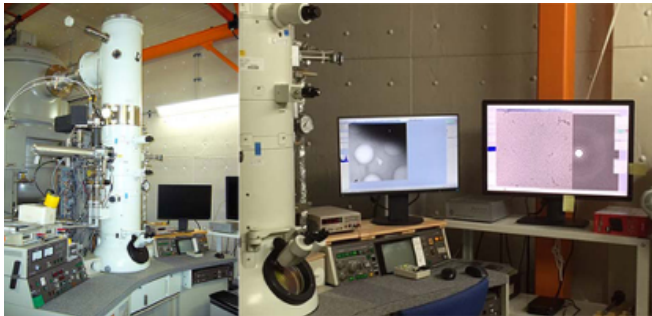
- 膜タンパク質複合体精製標品の品質を評価する蛍光ゲル濾過法や負染色電子顕微鏡法。



- 膜タンパク質複合体のクライオ電子顕微鏡用試料の作製効率を上げる界面活性剤除去法とプロットイング法。



- オンサイトクオリティチェックが可能な膜タンパク質複合体を高分解能単粒子解析するためのクライオ電子顕微鏡。

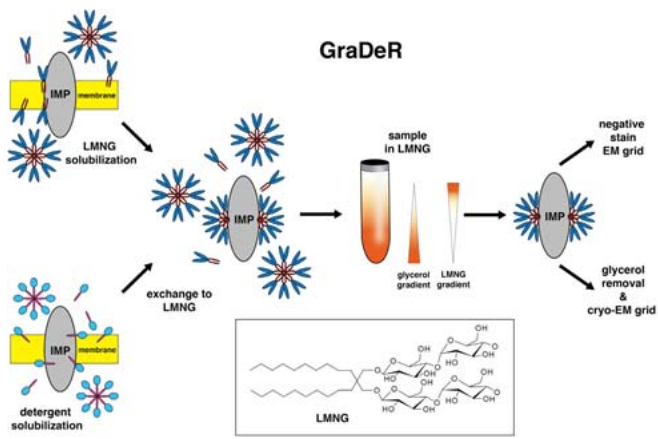


[3] 支援技術の利用例

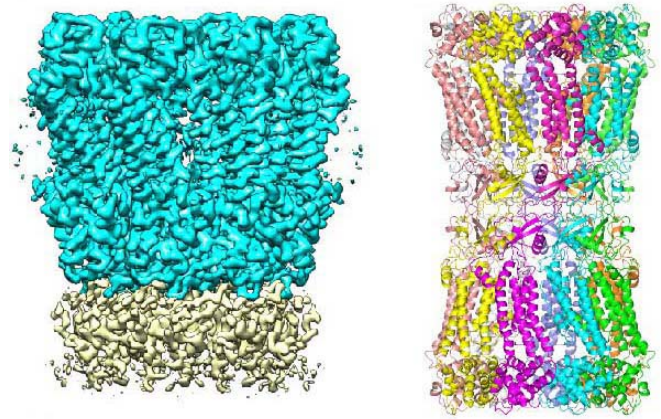
- 真核生物由来膜タンパク質複合体の発現と精製の最適化
ギャップ結合チャネルの発現・精製を昆虫細胞と哺乳動物細胞で行っている。サブタイプによって細胞系を使い分けている。
- 界面活性剤除去法GraDeRによって、膜タンパク質複合体を変性させずにフリーのミセルを除去。
光合成エネルギー変換の膜タンパク質複合体において、GDNを用いたGraDeRを行って、粒子の分散性のよいクライオグリッドの作製に成功した。
- 昆虫細胞を用いた哺乳類の時計タンパク質の大量発現
概日時計の機能を変化させるユニークな化合物の作用機序の解明を目指し、化合物とその標的タンパク質との複合体のX線結晶構造解析を試みている。対象となる哺乳類の時計タンパク質を昆虫細胞において大量発現し、安定供給する系を構築することに成功した。

[4] 支援担当者の研究概要

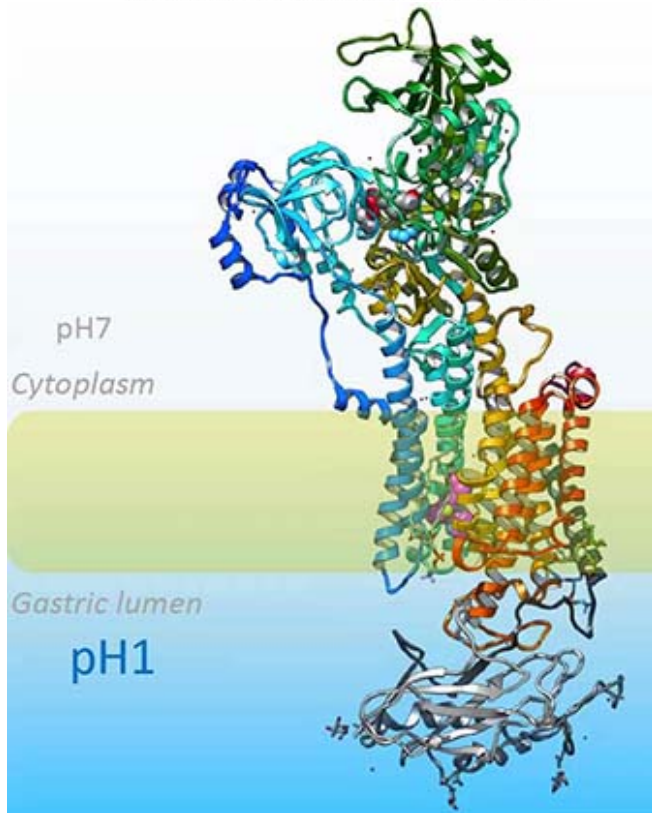
- 膜タンパク質複合体のクライオ電子顕微鏡用試料調製法の技術開発
クライオ電子顕微鏡用試料（グリッド）作製において、膜タンパク質複合体の精製標品に含まれる界面活性剤の除去法のほか、多様な膜タンパク質複合体に対応したグリッド作製法を探索している。例えばGraDeR(Gradient based Detergent Removal)はグリセロールの密度濃度勾配超遠心法を用いたフリーの界面活性剤ミセルを除く手法である（Hauer and Gerle et al., Structure 23, 1769-1775(2015)）。最近ではナノディスク、amphipolといった手法も手掛けている。
- 膜タンパク質複合体の高分解能単粒子解析
グリッド作製の最適化から、膜タンパク質複合体といった難易度の高い試料のクライオ電子顕微鏡による高分解能単粒子解析を目指している。特にギャップ結合チャネルのinnexinやconnexinを中心とした対称性の高い膜タンパク質複合体を中心に、複数の試料調製法を用いて構造解析に取り組んでいる(Oshima et al., Nat. Commun. 7, 13681 (2016))。線虫に存在するギャップ結合チャネルinnexin-6は、可溶化状態とナノディスク再構成状態で構造解析に成功している。
哺乳動物細胞による大量発現系を用いて、プロトンポンプ H^+, K^+ -ATPaseの構造研究をX線や電子線を用いて行っている。特にX線結晶構造解析から、 H^+, K^+ -ATPaseがどのようにして胃の中にpH 1という強酸性溶液を作り出しているかが理解できた (Abe et al., Nature 556, 214-218 (2018))。



Hauer et al. (2015) *Structure* **23**, 1769–1775



Oshima et al. (2016) *Nat. Commun.* **7**, 13681



Abe et al. (2018) *Nature* **556**, 214

C2-1 高難度創薬ターゲット蛋白質の構造解析品質での迅速生産

高難度タンパク質の動物細胞発現系を用いた高品質組換え生産と精製

[1] 支援担当者

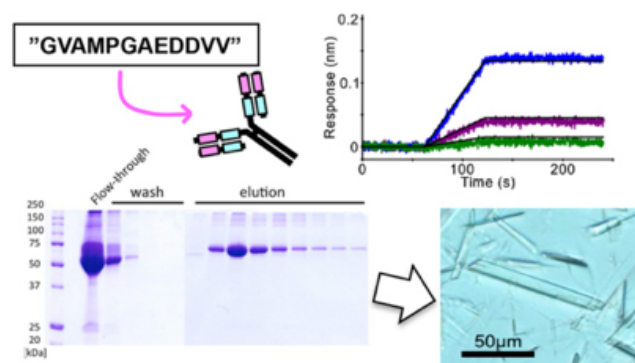
所属		①大阪大学 蛋白質研究所
氏名		①高木 淳一、北郷 悠、有森 貴夫
AMED 事業	ユニット／領域名 課題名	構造解析ユニット（タンパク質生産領域） Structure-based protein designを駆使した抗体代替物の創成と高難度組換え蛋白質生産
	代表機関 代表者	大阪大学 高木 淳一
支援技術のキーワード		動物細胞発現系、糖タンパク質、タグシステム、受容体リガンド

[2] 支援技術の概要

- 受容体蛋白質などの動物細胞を用いた発現支援（安定発現株の樹立と大量培養、浮遊細胞を用いた一過性大量発現）
- タグ抗体システムを活用した微量蛋白質の精製支援
- 糖転移酵素変異株を用いた結晶化品質の糖タンパク質生産



各種動物細胞発現システム



超高親和性アフィニティー精製システム
“PAタグ”の利用

[3] 支援技術の利用例

☆超迅速構造解析支援の例（糖転移酵素X）

day 1 メールにて打診、コンサルテーション

day 3 DNA受領、コンストラクトデザイン開始

day 20 発現テスト開始、最適化

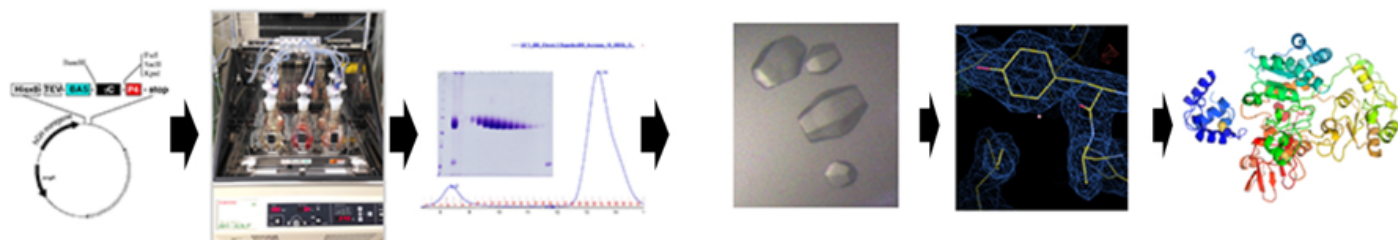
day 50 スケールアップ、PAタグ精製

day 58 結晶化スクリーニング

day 68 2Aデータセット取得、S-SADデータ取得

day 98 位相決定、モデル構築終了

（このうち、生産と精製に要したのは10日間！）

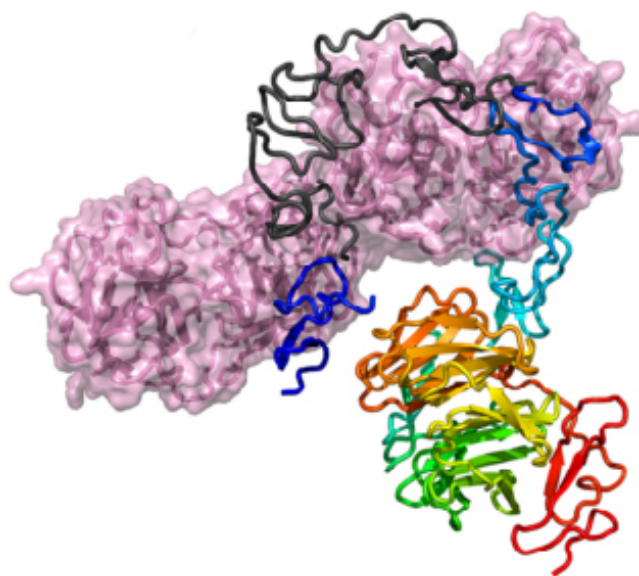


[4] 支援担当者の研究概要

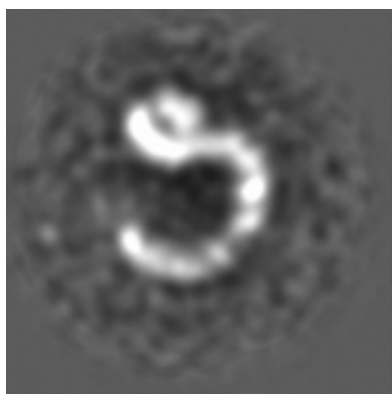
当研究グループでは、「生体膜」近傍での生物学的現象を蛋白質構造化学の目で切り取り、生物学研究の新たなステージを切り開くため、最新の構造生物学的手法を駆使した研究を行っている。細胞は外からの刺激を受容してその情報を細胞内で処理し、外的環境にたいしてどう対処するかを決定するが、ここで対象とするのは、ヒトの疾患に関わる種々の膜蛋白質、特に、脳・神経系で働く受容体やシナプス構成因子、神経細胞死や軸索ガイダンスに関わる分子、生物の発生や形態形成に関わるシグナル分子などの蛋白質である。レセプターが細胞外でその特異的パートナー（リガンド）と結合する際に起こる構造上の変化を「可視化」することが求められるが、そのために用いる構造生物学の手法はX線結晶構造解析と電子顕微鏡イメージングである。それらに用いるタンパク質試料の調製（発現と精製）や、巨大で不安定な複合体を結晶化する技術にはまだ改良の必要な点が数多くある。たとえばヒトを含む高等生物の細胞外リガンドやその受容体は組み替え発現・精製が困難で有り、既存の生産システムに依存しては、国際的な競争に勝つことができない。そこで、困難な組み替えタンパク質の「生産」を、動物細胞培養系の高度化、新しいアフィニティタグシステムの開発、発現法の改良・開発、などを通して確立することを目指している。本事業では、それらのノウハウと独自技術を結集し、外部研究者が構造・機能解析に供するための「高難度創薬ターゲット蛋白質」の生産を支援する。



プレキシシン(マゼンタ)とその阻害環状ペプチド(黄色)複合体の結晶構造
(Cell Chem Biol 2016)



リーリン(ピンク)とその受容体 ApoER2(虹色)複合体のX線結晶構造
(EMBO Rep 2017)



プレキシシン受容体の電子顕微鏡像と
予想モデル
(PLoS One 2016)

C2-2 創薬ターゲットに対する構造認識抗体/バインダーの生産支援

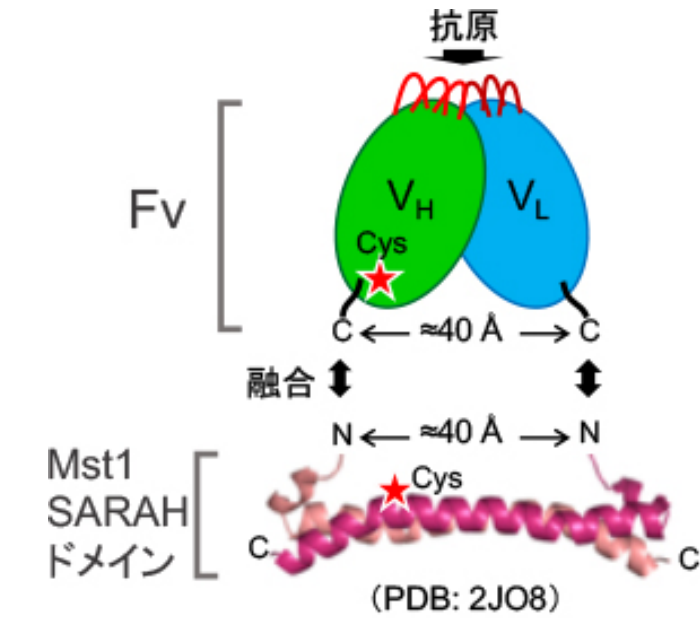
Fv-clasp法による小型抗体の生産、シャペロン戦略による結晶化支援

[1] 支援担当者

所属		①大阪大学 蛋白質研究所
氏名		①高木 淳一、有森 貴夫
AMED 事業	ユニット／領域名 課題名	構造解析ユニット（タンパク質生産領域） Structure-based protein designを駆使した抗体代替物の創成と高難度組換え蛋白質生産
	代表機関 代表者	大阪大学 高木 淳一
支援技術のキーワード		抗体、Fv-clasp、結晶化シャペロン

[2] 支援技術の概要

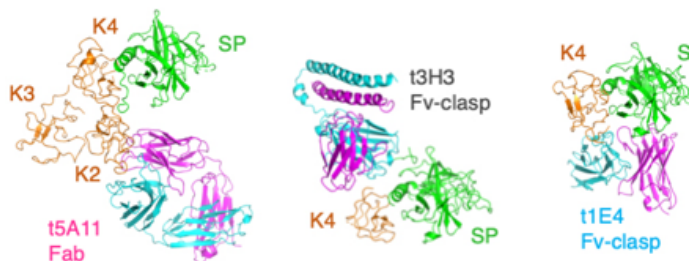
- 抗体、バインダー取得のための高品質抗原調製
- 組換え抗体の大量発現と調製
- 抗体のFv-clasp化と大量生産
- PAタグ挿入法による「ポータブルシャペロン」結晶化支援



Fv-claspのデザイン

[3] 支援技術の利用例

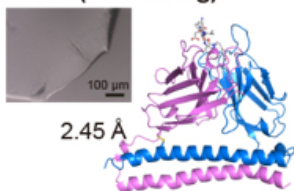
がん進展に関わる肝細胞増殖因子（HGF）は6つのドメインからなるフレキシブルなマルチドメインタンパク質であり、これまでその全長構造はもちろん、受容体結合部位であるSPドメインとその上流のK4ドメインを含む断片も立体構造情報が得られていない。HGFの前駆体型から成熟型への変換メカニズムを解明したいというがん生物学者からの依頼に応じ、このタンパク質の結晶構造解析を支援した。まず複数の抗HGFモノクローナル抗体を作成し、それらをFabもしくはFv-claspの状態で「結晶化シャペロン」として用いることで、下図のように複数のHGF断片の立体構造を決定することに成功した。



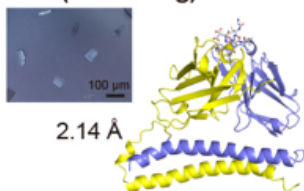
[4] 支援担当者の研究概要

Fv-claspは、VHとVLのC末端に抗体とは全く関係のないヒトMst1という分子が持つSARAHドメインを融合したものである。SARAHドメインの立体構造は2007年に最初に報告されたが、これが実に都合の良い構造だった。SARAHドメインは短長2本の α ヘリックスのみで構成され、そのうち長いヘリックスが逆平行のコイルドコイルを形成し二量体構造を作る。N末端側の短いヘリックスは特定の角度で折れ曲がっており、二量体構造中のN末端間の距離は、VHとVLのC末端間の距離とほぼ一致した。そこで我々は、VHとVLそれぞれのC末端にSARAHドメインの配列を融合し、さらに2本のポリペプチド鎖の間にジスルフィド結合を導入することでFvの構造の安定化を試みた。“Fv”をSARAHドメインという“留め金（clasp）”で安定化させていることから、このフォーマットを「Fv-clasp」と名付けた。これまでにヒト、マウス、ラット由来の20種以上の抗体について大腸菌発現系（巻き戻し）によるFv-claspの調製を試みたが、全てにおいて単一のプロトコルで簡単に調製することができた。しかもこれらの中には、scFvの調製ができない抗体が含まれていることも注目すべき点である。さらに、Fv-claspは抗原結合活性を保持しているのはもちろんのこと、対応するscFvと比べて4°C~11.5°Cも高い変性温度（Tm値）を示した。また、結晶化実験においてもFv-claspはFabやscFvと比べて優れた性質を示し（下図）、Fv-claspは非常に均一な立体構造を有していることが示唆された。

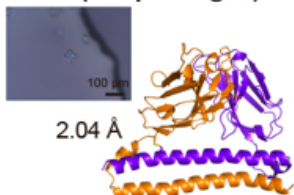
12CA5 (anti-HA-tag)



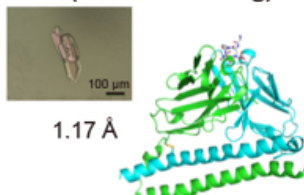
NZ-1 (anti-PA-tag)



TS2/16 (anti- β 1 integrin)



P20.1 (anti-TARGET-tag)



C3-1 エピジェネティクス研究と創薬のための再構成クロマチンの提供

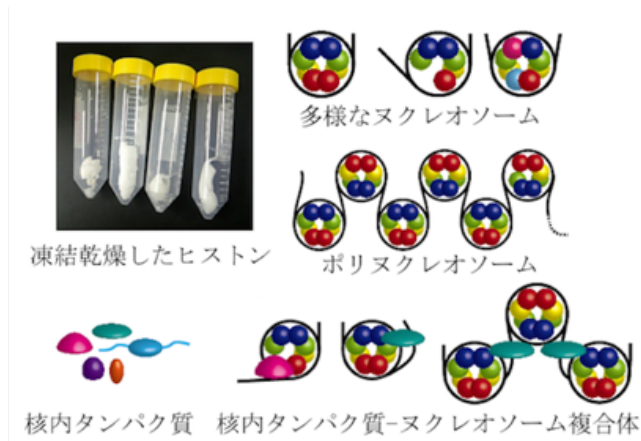
エピジェネティクス研究と創薬研究に用いる、多様なヒストンや再構成ヌクレオソーム・クロマチン、核内タンパク質の提供

[1] 支援担当者

所属		①東京大学 定量生命科学研究所 ②横浜市立大学 生命医科学研究
氏名		①胡桃坂 仁志 ②明石 知子、朴 三用
AMED 事業	ユニット／領域名 課題名	構造解析ユニット（タンパク質生産領域） エピジェネティクス研究と創薬のための再構成クロマチンの生産と性状解析
	代表機関 代表者	東京大学 胡桃坂 仁志
支援技術のキーワード		エピジェネティクス、クロマチン、ヌクレオソーム、ヒストン

[2] 支援技術の概要

- ・ヒストンバリエント、変異体ヒストン、修飾ヒストン、モデル生物のヒストンなど、多様なヒストンの生産
- ・多様なヌクレオソームの試験管内再構成
- ・多様なポリヌクレオソームの試験管内再構成
- ・核内タンパク質の生産および核内タンパク質-ヌクレオソーム複合体の試験管内再構成



[3] 支援技術の利用例

- ・特定のヒストンバリエント、変異体ヒストン、修飾ヒストンやそれらを含むヌクレオソーム、ポリヌクレオソームを用いて、生化学的解析や物理化学的解析を行う。
- ・特定のヒストンやヌクレオソーム、ポリヌクレオソームの構造生物学的解析を行う。
- ・核内タンパク質と特定のヒストンやヌクレオソーム、およびポリヌクレオソームとの相互作用解析を行う。
- ・核内タンパク質とクロマチンの結合に影響を及ぼす低分子化合物のスクリーニングを行い、エピジェネティック創薬の発展につなげる。

[4] 支援担当者の研究概要

真核生物の核内において、長大なゲノムDNAは4種類のヒストンからなるヒストン8量体に巻き付いてヌクレオソーム構造を形成し、コンパクトに折りたたまれて収納されている。ヒストンには様々な亜種（バリエーション）や修飾状態が存在し、これらが特定の細胞の特定のクロマチン領域に取り込まれることによって、クロマチン動態ひいてはゲノムDNAの機能発現が厳密に制御されている。これらの制御機構の破綻は、がんや精神疾患、感染症、メタボリックシンドロームなど、様々な疾患の原因となることが知られている。私たちは、これまでに様々なヒストンバリエーションやがん関連変異ヒストンをリコンビナントタンパク質として大量に発現精製し、これらのヒストンを含むヌクレオソームを試験管内で再構成して高純度に精製する系を確立してきた。また、特定のヒストンの特定の位置に任意の修飾基をもつ、修飾ヒストンの作製法も確立している。このように様々な種類のヒストンやそれらを含むヌクレオソームについて、生化学的解析や物理化学的解析、構造生物学的解析を行ってきた。

代表的な研究成果として、2011年に、ヒトのセントロメアに局在するH3バリエーションであるCENP-Aを含むヌクレオソームを試験管内で再構成し、その立体構造をX線結晶構造解析により明らかにした（図1、Tachiwana et al., 2011, Nature 476: 232-235）。その結果、CENP-Aヌクレオソームでは、ヒストン8量体に巻き付いたDNAの末端が主要型のヌクレオソームと比較してフレキシブルな性質をもつことが明らかになった。また、2017年には、クロマチンリモデリング因子によるゲノムDNA上でのヌクレオソーム再配置の過程で形成される中間体と考えられている、オーバーラッピングダイヌクレオソームの結晶構造を決定することに成功した（図2、Kato et al., 2017, Science 356: 205-208）。

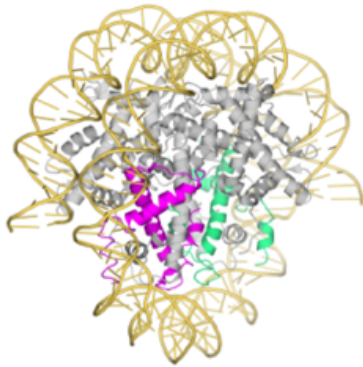


図1 CENP-Aヌクレオソームの結晶構造（PDB ID: 3AN2）。ヌクレオソーム内の2分子のCENP-Aを、緑色とマゼンタ色で表示した。

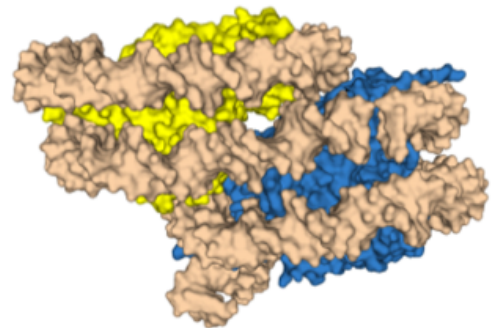


図2 オーバーラッピングダイヌクレオソームの結晶構造（PDB ID: 5GSE）。ヒストン6量体を黄色で、8量体を青色で表示した。

C4-1 コムギ無細胞系を用いた複合体タンパク質の生産及び低分子抗体作製

タンパク質発現、抗体作製、複合体構造解析、相互作用解析、相互作用パートナー探索、薬剤探索アッセイ系構築・スクリーニング

[1] 支援担当者

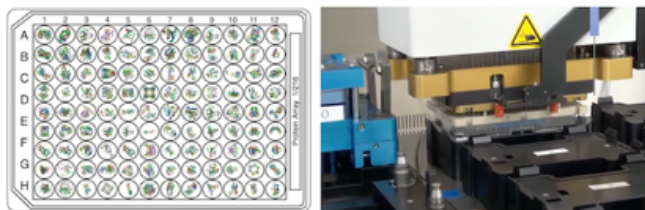
所属		①愛媛大学 プロテオサイエンスセンター ②東京大学 大学院農学生命科学研究科 ③富山大学 大学院医学薬学研究部
氏名		①澤崎 達也、竹田 浩之 ②宮川 拓也 ③小澤 龍彦
AMED 事業	ユニット／領域名 課題名	構造解析ユニット（タンパク質生産領域） コムギ無細胞系による構造解析に適した複合体タンパク質生産・調製技術と低分子抗体作製技術の創出
	代表機関 代表者	愛媛大学 澤崎 達也
支援技術のキーワード		コムギ無細胞タンパク質合成、タンパク質複合体、構造解析、低分子抗体、ISAAC法

[2] 支援技術の概要

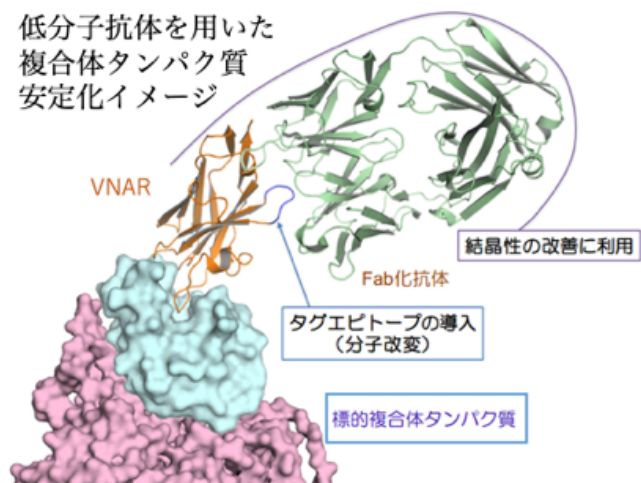
- コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた発現困難なタンパク質の生産。



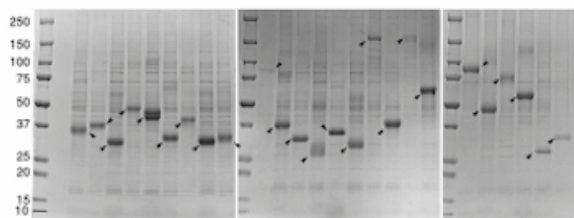
- 無細胞共発現系による複合体タンパク質合成。
- プロテインアレイを用いた複合体パートナー解析。最大2万5千種のヒトタンパク質を搭載したヒトプロテインアレイ。他に、プロテインキナーゼ、転写因子、RING型E3リガーゼ、GPCR、イオンチャネルのフォーカスドアレイも提供可能。



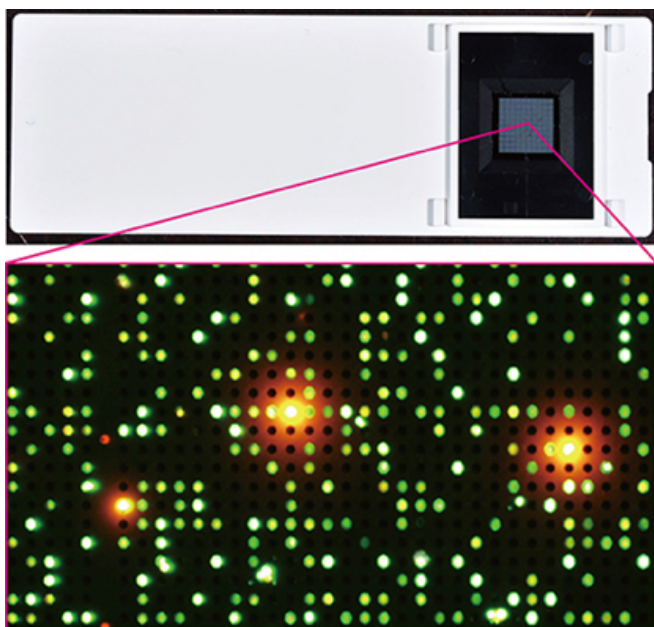
低分子抗体を用いた
複合体タンパク質
安定化イメージ



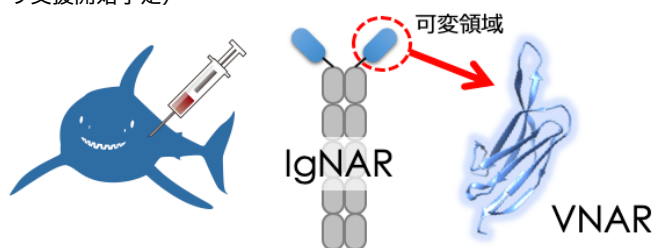
- 複合体タンパク質のX線結晶構造解析。タグ挿入、Fabを用いた構造安定化技術。
- 独自に開発した3種類のタンパク質精製システム。（AGIA-TEV法、CP5精製システム、BISOP法）
- 無細胞膜タンパク質大量合成技術。数mgの膜タンパク質を短期間に生産。免疫抗原等に使用実績あり。



- 抗体遺伝子単離（ISAAC法）。リンパ球チップを用いて、1細胞のBリンパ球からヒト抗体、マウス抗体、ウサギ抗体の遺伝子を単離し、リコンビナントモノクローナル抗体を迅速に作製することができる。



- リコンビナントFab抗体の直接発現技術。パプインを用いたFabの作製法では、末端が不均一であった。我々の方法では、末端が完全に揃ったFabが得られる。タンパク質の構造解析におけるシャペロンバインダーとして有用。
- サメシグールドメイン抗体（VNAR）作製技術。哺乳動物から進化的に遠いサメへの免疫、小さく安定なVNAR生産。（2019年度後期より支援開始予定）



[3] 支援技術の利用例

- 機能解析あるいは構造安定化を目的とした複合体パートナー探索
- 結晶化・クライオ電子顕微鏡解析のための高純度タンパク質試料調製
- 抗膜タンパク質抗体の作製のための無細胞系を用いた膜タンパク質抗原大量合成
- FabまたはVNARを用いた複合体安定化・結晶性改善
- 自己免疫疾患の患者末梢血リンパ球からモノクローナル自己抗体遺伝子を単離
- 作製困難なモノクローナル抗体の作製（例：リン酸化ペプチド、GPCR など）

[4] 支援担当者の研究概要

コムギ無細胞タンパク質合成技術の開発（澤崎・竹田）

無細胞系とは試験管内でタンパク質の翻訳を行う技術である。私たちが開発したコムギ無細胞系は非常に高い翻訳効率をもち、ヒトのタンパク質をはじめ、ほとんどの原核生物・真核生物のタンパク質の合成が可能。無細胞系は解放系なので、複数のmRNA鋳型を同時に添加でき、複合体タンパク質の合成に有利である。また、脂質小胞リボソームを系に添加することでGPCRやイオンチャネルなどの膜タンパク質を合成することができる。

プロテインアレイを用いた複合体パートナー探索（澤崎・竹田）

コムギ無細胞系の高い合成効率は少量多検体のタンパク質調製に最適。私たちは数百から最大2万種のタンパク質のセット、プロテインアレイを作製した。AlphaScreen技術を用いて開発した相互作用スクリーニングアッセイ系により、標的タンパク質の相互作用相手をプロテインアレイの中から探索することが可能である。プロテインアレイはマイクロタイターウェルに個別のタンパク質が搭載されており、濃度もほぼ一定であるため、相互作用をクリアに検出することができる。

ISAAC法を用いたモノクローナル抗体の迅速作製と創薬への応用（小澤）

今までに、ウイルスに対して中和活性を持つヒト抗体、自己免疫疾患患者由来の自己抗体、GPCRに対するウサギ抗体など、様々な抗原に対して、数多くの抗体を作製してきた。これらの抗体を用いて、ウイルス感染症の治療、自己免疫疾患発症メカニズムの解明、GPCRを標的とした創薬開発などの研究を行っている。

タンパク質複合体の構造解析（宮川）

コムギ無細胞系、昆虫細胞等の宿主、高圧リフォールディング技術等により生産した、ヒト疾患関連タンパク質、植物ホルモン受容体タンパク質、有用物質合成酵素等の構造解析を行ってきた。X線結晶構造解析を基盤に多様な構造生命科学の手法を利用し、創薬を含む医農工分野への応用のため、分子構造に基づく生命現象の理解に取り組んでいる。

C5-1 高難度モノクローナル抗体開発とその包括的エンジニアリング

抗体の大量精製、抗体遺伝子クローニング、タグシステムや糖鎖不全株提供

[1] 支援担当者

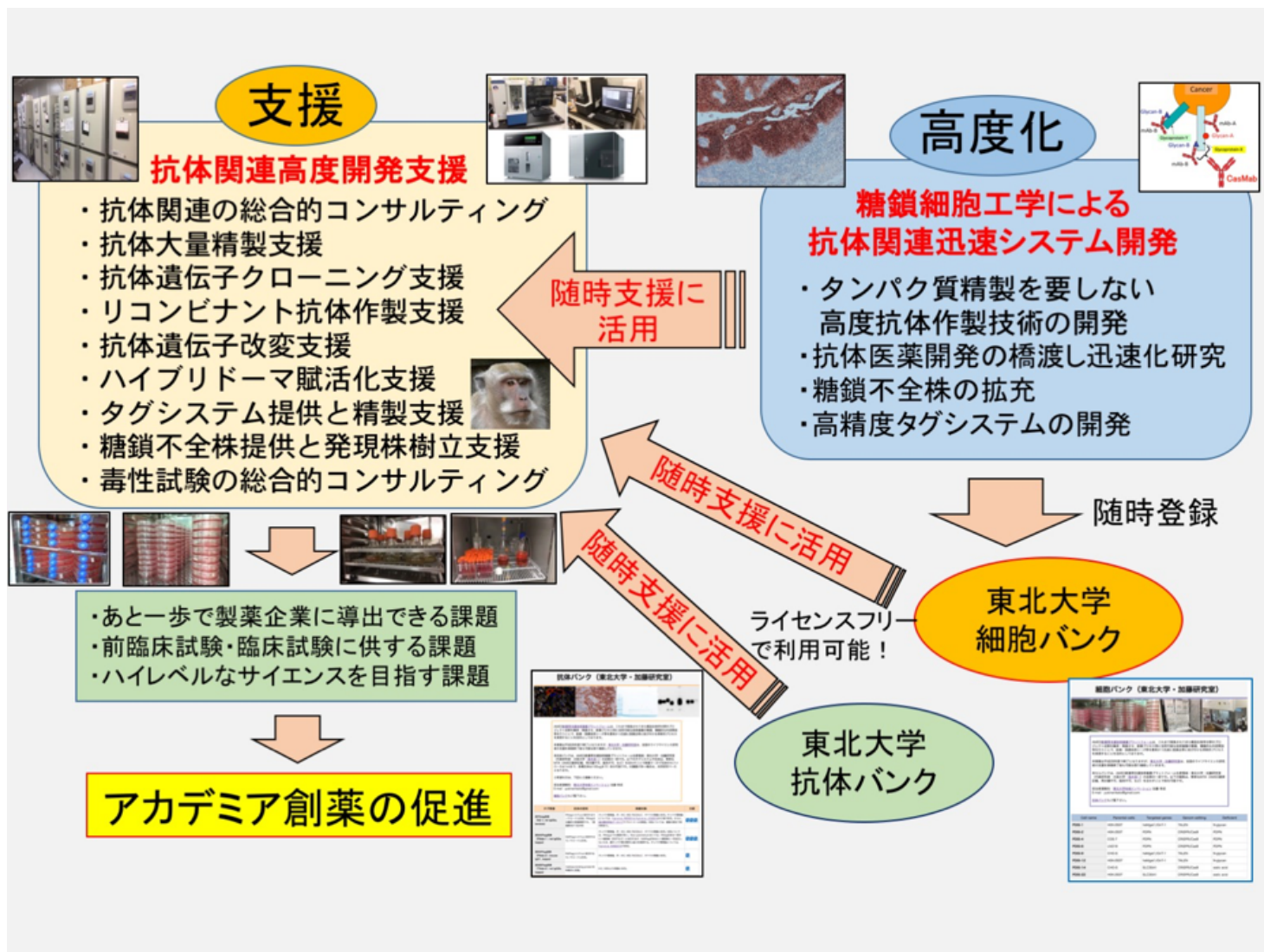
所属		①東北大学 大学院医学系研究科
氏名		①加藤 幸成
AMED 事業	ユニット／領域名 課題名	構造解析ユニット（タンパク質生産領域） 抗体関連高度開発支援と糖鎖細胞工学による高度化
	代表機関 代表者	東北大学 加藤 幸成
支援技術のキーワード		モノクローナル抗体、抗体遺伝子クローニング、リコンビナント抗体、タグシステム、糖鎖不全株

[2] 支援技術の概要

- 抗体作製に関する総合的コンサルティングの実施
- ハイブリドーマや抗体産生細胞を無血清培地で大量培養し、mg単位からg単位に至るまで、モノクローナル抗体の大量精製
- マウス・ラットモノクローナル抗体の抗体遺伝子クローニング（最速1週間以内で実施）
- 各種リコンビナント抗体の作製
- 各種キメラ抗体、ヒト化抗体の作製
- 抗体のクラス変換、サブクラス変換
- 独自開発のペプチドタグシステムの大量提供
- 様々な糖鎖不全株の提供
- 糖タンパク質発現株の作製

[3] 支援技術の利用例

- 大型動物用の抗体医薬品を開発し、g単位でモノクローナル抗体やキメラ抗体を生産
- 抗体医薬として期待されるマウス抗体をヒトキメラ化し、ADCC/CDC活性を付与
- 疲弊化した抗体産生細胞を独自技術（RESET法）で賦活化
- 精製が困難な膜タンパク質に対し、最適のペプチドタグシステムを選択
- 様々な遺伝子導入法を駆使し、さらにFACSによる高発現株のセレクションの実施

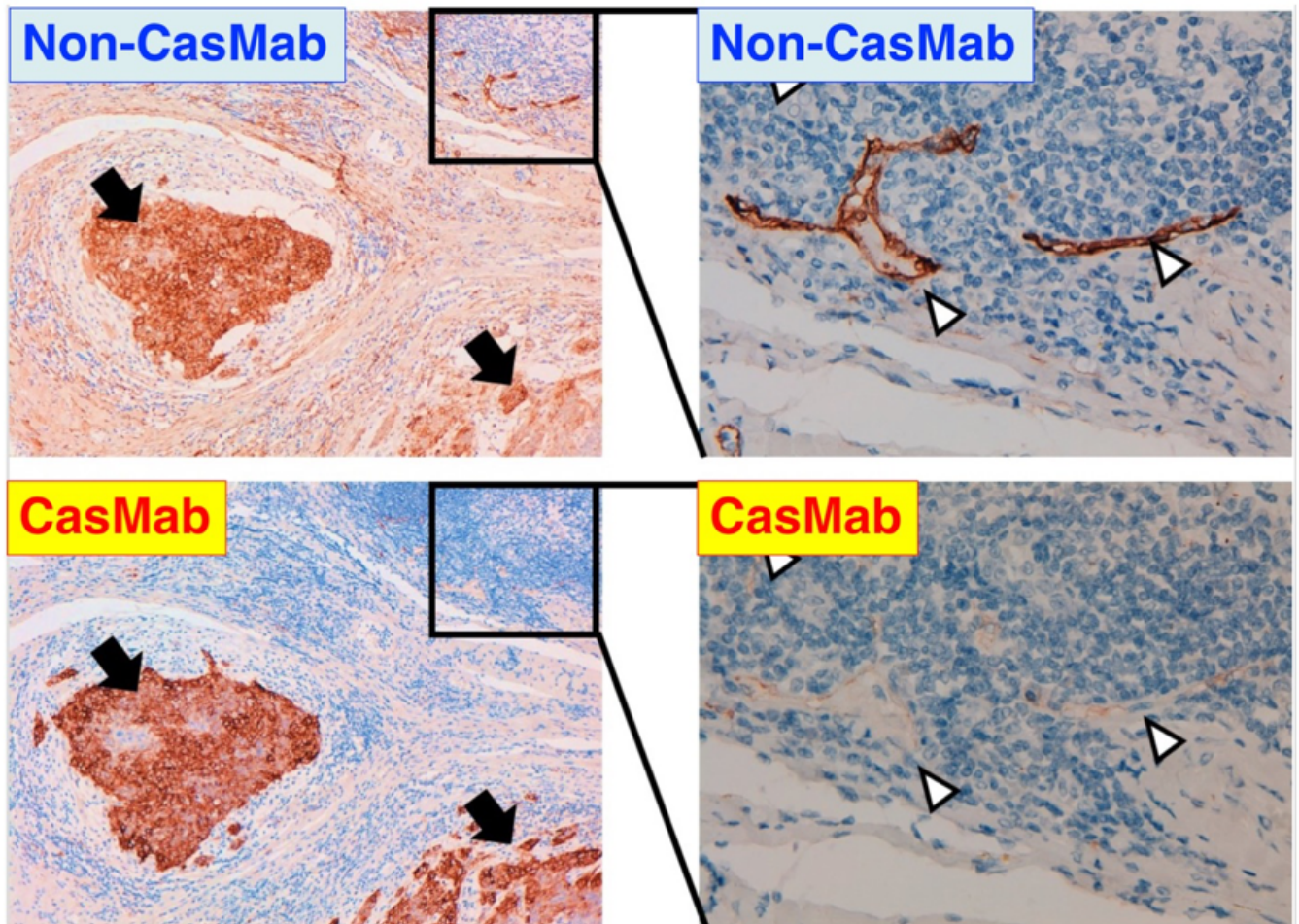


[4] 支援担当者の研究概要

東北大学ではこれまで、がん細胞に特異的反応性を示すモノクローナル抗体（CasMab；キャスマブ）を作製する技術を開発した。CasMab法は、がん細胞のみを攻撃する抗体を高い効率で作製する戦略的プラットフォームである。これにより、新規の標的に対する抗体医薬の開発だけでなく、既存の抗体医薬品を副作用のほとんどない抗体医薬品に置き換えることが可能となった。がん細胞に高発現しているが正常細胞にも発現していることで、抗体医薬の開発が断念されていたような標的に対しても、再び抗体医薬の開発に挑戦することができる。

従来の抗体医薬開発では、その標的の絞り方や開発方法には複数の問題点があった。例えば、DNAマイクロアレイなどの遺伝子発現解析により、がん細胞/正常細胞比が高い抗原が標的となっていたため、がん細胞に高発現していても正常組織にも発現していると、最初から候補分子から外れるというのが一般的であった。また、がん細胞と正常細胞に共通に発現している膜タンパク質の糖鎖構造の差を質量分析計などによって検出しようとしても、膜タンパク質への糖鎖付加には不均一性があるため、がん細胞特異的糖鎖構造の検出には限界がある。さらに、がん特異的糖鎖構造が発見されたとしても、特にO型糖鎖を人工的に大量合成することは非常に困難である。従って、がん特異的糖鎖構造を付加した膜タンパク質を、免疫原やスクリーニングのために、十分に用意する段階には至っていない。これらの問題点をすべて解決する方法を検討した結果、CasMab法の開発に至った。

すでに我々は、ポドプラニンという血小板凝集因子/転移促進因子に対するCasMabの開発に成功した。ポドプラニンは、腎上皮細胞、リンパ管内皮細胞、肺胞上皮細胞のような全身の正常細胞にも高発現しており、抗体医薬の標的にはならないとされていた。しかし、ポドプラニンに対するCasMabを作製することにより、ポドプラニンが高発現する脳腫瘍・肺がん・食道がん・悪性中皮腫などを抗体医薬で治療することが現実的となってきた。



口腔がん組織に対する免疫組織染色において、CasMab（左下図）とnon-CasMab（左上図）は共に、口腔がん組織のがん細胞に対して反応性を示す（矢印）。一方、CasMabはリンパ管内皮細胞には反応しないのに対し（右下図、矢頭）、non-CasMabはリンパ管内皮細胞にも反応性を示す（右上図、矢頭）。このように、同じ配列のタンパク質ががん細胞と正常細胞の両方に高発現している場合でも、CasMabはがん細胞のみを識別できる。

C6-1 次世代構造創薬研究を先導するヒト膜タンパク質・抗体の生産技術支援

膜タンパク質に対する立体構造認識抗体を作製・提供し、X線結晶構造解析やクライオ電顕単粒子解析による構造研究を支援

[1] 支援担当者

所属		①京都大学 大学院医学研究科
氏名		①岩田 想、野村 紀通
AMED 事業	ユニット／領域名 課題名	構造解析ユニット（タンパク質生産領域） 次世代構造創薬研究を先導するヒト膜タンパク質・抗体の生産技術支援
	代表機関 代表者	京都大学 岩田 想
支援技術のキーワード		Gタンパク質共役受容体 (GPCR)、トランスポーター、チャネル、立体構造認識抗体、抗体医薬

[2] 支援技術の概要

- ＜膜タンパク質の生産技術支援＞ 酵母を用いて安定化変異体を高速スクリーニングした後、有望コンストラクトを昆虫細胞で大量生産。
- ＜立体構造認識抗体の生産技術支援＞ 膜タンパク質に対する立体構造認識抗体を作製し、それを用いてX線結晶構造解析やクライオ電顕単粒子解析による構造研究に応用するための技術・ノウハウを支援。

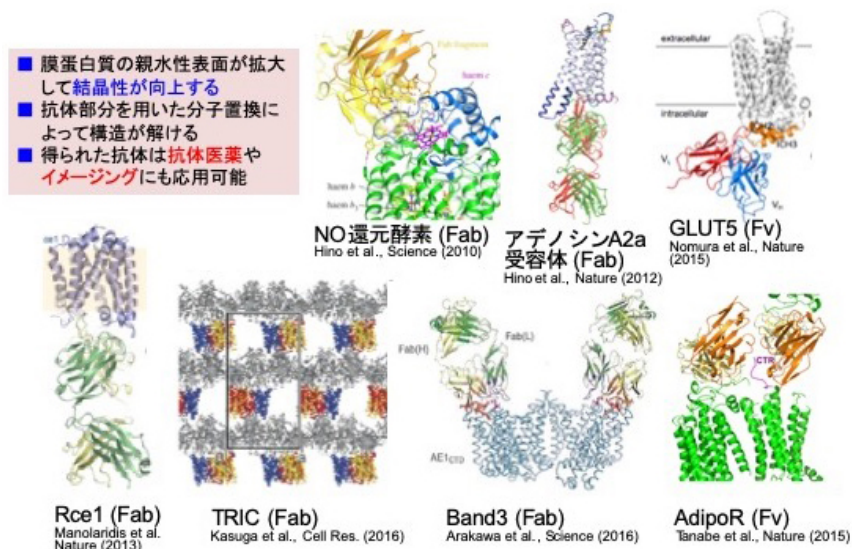
[3] 支援技術の利用例

- ＜膜タンパク質の生産技術支援＞
- ・構造解析に適した膜タンパク質の安定化変異体の作製・大量生産
 - ・膜タンパク質／抗体複合体のX線結晶構造解析
- ＜抗体の生産技術支援＞
- ・膜タンパク質のX線結晶構造解析やクライオ電顕単粒子解析に用いる立体構造認識抗体の作製・大量生産
 - ・抗体医薬品／標的分子複合体の生産と高分解能構造解析

[4] 支援担当者の研究概要

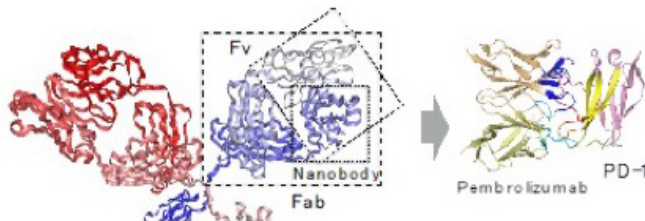
膜タンパク質は、生体膜を介したシグナル伝達・物質輸送・生体エネルギー産生など、細胞機能において基幹的な役割を担っており、創薬ターゲットとして重要な研究対象である。Gタンパク質共役受容体（GPCR）、トランスポーター、チャネル、内在性膜酵素といった膜タンパク質の立体構造をシステムティックに解明することにより、「構造に基づいた医薬品設計戦略」により創薬リード化合物を効率よく探索することが可能になると期待される。しかしながら、高分解能でヒト・哺乳類の膜タンパク質結晶構造を解明することは依然として難しいのが現状である。

私たちは膜タンパク質の大量生産、結晶化、X線回折データ測定等の技術を開発・高度化するとともに、その最新技術を用いて種々の膜タンパク質の立体構造を解析している。これまでに、ヒスタミンH₁受容体、ムスカリン性アセチルコリンM₂受容体、ヒトアデノシンA_{2a}受容体、ヒトアディポネクチン受容体、ヒト赤血球膜イオン交換体（Band3）、ラットフルクトース輸送体（GLUT5）、創薬ターゲット膜酵素の細菌ホモログRce₁等の結晶構造解析を成功させている。



抗体フラグメントを用いた膜タンパク質のX線結晶構造解析例

膜タンパク質にモノクローナル抗体フラグメントを結合させて膜外親水性表面を拡張すると結晶化が促進されることに着目し、膜タンパク質に対する立体構造認識抗体の作製を進めてきた。立体構造認識抗体は、X線結晶構造解析のみならず、クライオ電顕単粒子解析においてもfiducial markerとして有用であることを既にいくつかの例で実証している。また最近では、抗体医薬として大きなポテンシャルがある細胞外ドメイン構造認識抗体も取得できるようになっている。抗体医薬品／標的分子複合体を用いた構造解析では、免疫チェックポイント阻害剤Pembrolizumabとその標的分子PD-1の複合体の高分解能構造解析などにも成功している。



抗体医薬品（Pembrolizumab）／標的分子（PD-1）複合体の高分解能X線結晶構造解析

C7-1 創薬関連ヒト膜タンパク質の生産から結晶化／ワンストップ支援とその高度化

創薬に直結するヒト膜タンパク質の立体構造解析に向け、独自の発現・精製・結晶化技術で取り組む

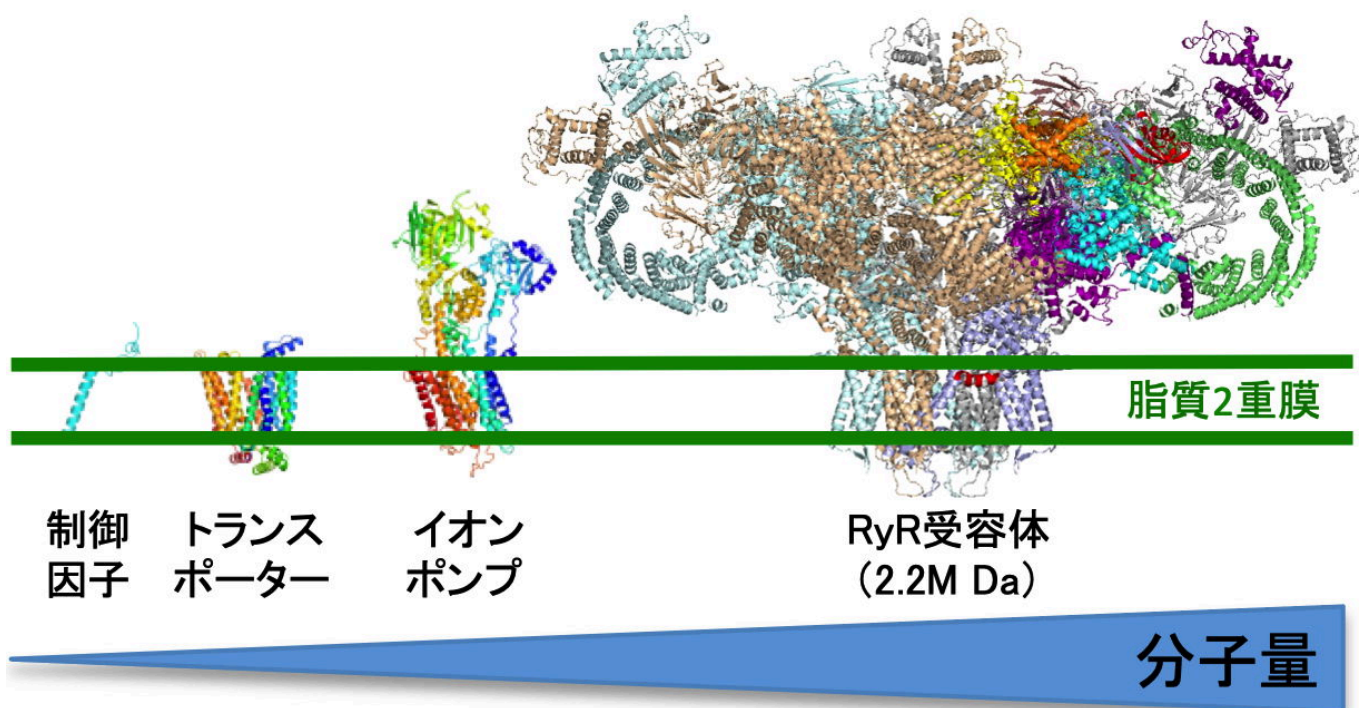
[1] 支援担当者

所属		①京都大学 大学院薬学研究科 ②順天堂大学 医学部
氏名		①小川 治夫 ②村山 尚
AMED 事業	ユニット／領域 名 課題名	構造解析ユニット（タンパク質生産領域） 哺乳類細胞発現系を用いた創薬関連高難度ヒト膜タンパク質の生産から結晶化へ向けたワンストップ支援とその高度化
	代表機関 代表者	京都大学 小川 治夫
支援技術のキーワード		哺乳類培養細胞発現系、膜蛋白質、構造解析

[2] 支援技術の概要

創薬に直結するヒト膜タンパク質の立体構造解析に向け、独自の発現・精製・結晶化技術で取り組んでおります。具体的な技術は以下の3点です。

- 哺乳類培養細胞系を用いた哺乳類（ヒトを含む）膜タンパク質の大量生産・精製
- 哺乳類培養細胞を用いた超巨大膜タンパク質の大量生産・精製
- 「脂質を添加」して結晶化を行う独自膜タンパク質結晶化法



[3] 支援技術の利用例

- 膜タンパク質の結晶化・分解能向上へ向けた取り組み（独自の「脂質を添加して結晶化を行う膜タンパク質の結晶化法」）
- ヒトをはじめとする哺乳類膜タンパク質の大量発現系・精製系の構築（ウサギ筋小胞体カルシウムポンプ（約110kDa）の場合、培養液1L当たり4mgの精製標品を得ており、結晶構造も報告）
- 哺乳類超巨大膜タンパク質の大量発現・精製系の構築（リアノジン受容体（約2.2MDa）の場合、培養液1L当たり0.4mgの精製標品を取得）
- 膜タンパク質の結晶化・分解能向上へ向けた取り組み（独自の「脂質を添加して結晶化を行う膜タンパク質の結晶化法」）

ヒト膜タンパク質の大量生産・精製



膜タンパク質結晶化



高度化

超巨大
膜タンパク質
複合体の
大量生産・精製

[4] 支援担当者の研究概要

[P型ATPaseに関する研究] P型イオンポンプタンパク質はATPの化学エネルギーを利用し、ナトリウム・カルシウム等の陽イオンを能動輸送する、きわめて重要な分子である。これまでにSERCAをはじめNa⁺,K⁺-ATPaseの結晶構造を発表し、Nature誌等に報告している。また、独自の発現・精製系の構築により、変異体の結晶構造解析や生体内からの精製が不可能な分子の解析も行っている。能動輸送の構造的解明を目指し、結晶構造解析に取り組んでいる。

[GCase受容体に関する研究] 血圧・体液バランスの維持に不可欠な心房性利尿ペプチド（ANP）受容体に代表されるグアニル酸シクラーゼ（Gcase）受容体を対象に、生化学実験とX線結晶解析とを組み合わせ、受容体がホルモンを認識しシグナルを伝達する機構の解明を目指している。心筋梗塞等の創薬などの社会的要請にも応えることが可能である。

[リアノジン受容体に関する研究] リアノジン受容体（RyR）は筋小胞体の巨大なCa²⁺遊離チャネルであり、骨格筋及び心筋の興奮収縮連関において中心的な役割を果たす。RyR1の変異は筋疾患と、RyR2の変異は不整脈性心疾患と関連する。これまでに多くの変異の機能解析を行って疾患の発症機構を解明してきており、創薬へ向けた薬物探索も進めている。近年クライオ電験による近原子分解能の構造が報告されているが、不明瞭な部分も多く、その構造活性相関・疾患の理解・薬剤の作用機序の理解には程遠い。現在、独自の超巨大膜タンパク質を発現する系により構造決定に取り組んでいる。

C8-1 無細胞系・生細胞系による高難度タンパク質生産支援

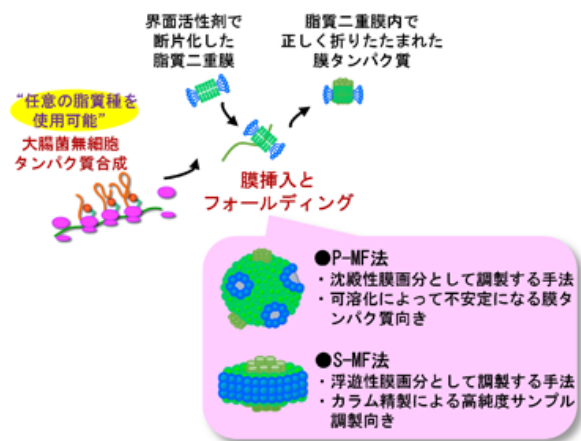
大腸菌無細胞合成系・生細胞発現系（昆虫細胞・動物細胞等）による高難度タンパク質生産、結晶化スクリーニング

[1] 支援担当者

所属		①理化学研究所 生命機能科学研究センター
氏名		①白水 美香子、伊藤 拓宏
AMED 事業	ユニット／領域名 課題名	構造解析ユニット（タンパク質生産領域） 統合的構造解析に向けた高難度複合体の生産支援と高度化
	代表機関 代表者	理化学研究所 白水 美香子
支援技術のキーワード		大腸菌無細胞タンパク質合成系、昆虫細胞・動物細胞発現系、結晶化スクリーニング、膜タンパク質

[2] 支援技術の概要

- X線結晶構造解析のための高難度タンパク質試料調製
大腸菌無細胞タンパク質合成系による調製
生細胞発現系（昆虫細胞・動物細胞等）による調製
- 非天然型アミノ酸導入
- 脂質メソフェーズ法などによる結晶化スクリーニング



膜タンパク質無細胞生産技術の模式図

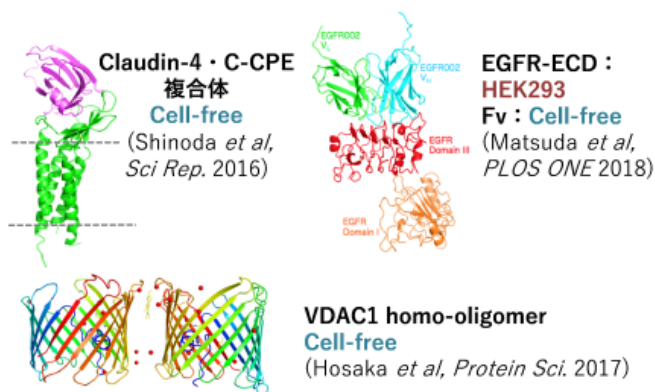
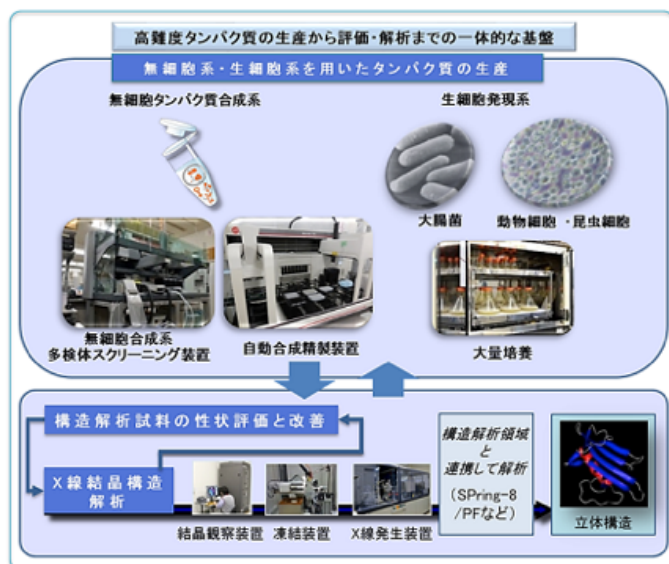
[3] 支援技術の利用例

- 無細胞タンパク質合成系を用いて膜タンパク質を生産、高純度精製し、脂質メソフェーズ法により得られた結晶から構造解析を行う。
- 動物細胞発現系により高分子複合体を生産し、無細胞系により生産した抗体断片と複合体を形成させることにより、結晶化用試料調製を行う。
- 抗体断片に非天然アミノ酸を導入したものに蛍光を付加し、標的分子を発現する細胞での結合を確認する。

[4] 支援担当者の研究概要

理化学研究所・横浜事業所では、細胞・無細胞系を用いたタンパク質試料の調製技術、タンパク質複合体や膜タンパク質等の高難度タンパク質の調製技術、人工アミノ酸・天然修飾アミノ酸の導入技術、タンパク質の結晶化技術を開発・高度化し、これらを用いて、X線結晶構造解析等に向けた試料調製を行っている。これまでに、EGF受容体+抗体断片のような複合体や、Claudin-4やVDAC1などの膜タンパク質を生産し、結晶構造解析を成功させてきた。

このような幅広い手法を用いることにより、利用者のニーズに応じて適切な解析手法を選択または組み合わせ、解析手法に適した試料生産、性状評価、および構造解析を行うことで、創薬研究から難解な複合体の機能・構造解析まで、幅広い研究をシームレスに支援することが可能である。



C8-2 単粒子解析に向けたタンパク質複合体の生産

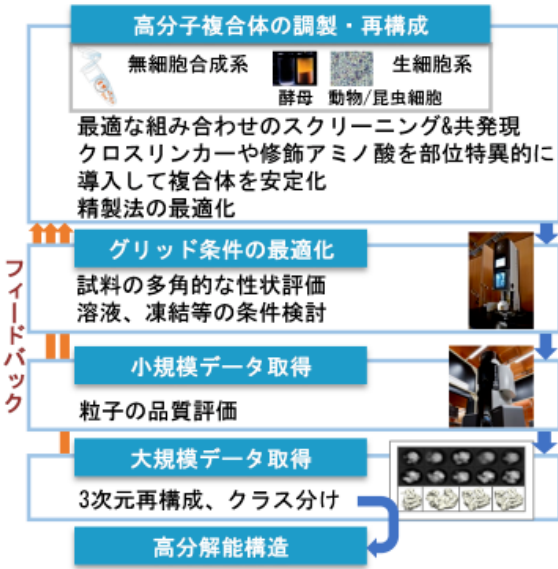
高分子複合体生産、グリッド条件の最適化、クライオ電顕による性状チェック、モデリングを駆使した構造決定

[1] 支援担当者

所属		①理化学研究所 生命機能科学研究センター
氏名		①白水 美香子、伊藤 拓宏、Kam Zhang、関根 俊一
AMED 事業	ユニット／領域名 課題名	構造解析ユニット（タンパク質生産領域） 統合的構造解析に向けた高難度複合体の生産支援と高度化
	代表機関 代表者	理化学研究所 白水 美香子
支援技術のキーワード		単粒子解析、電子顕微鏡、超分子複合体、転写・翻訳、構造予測

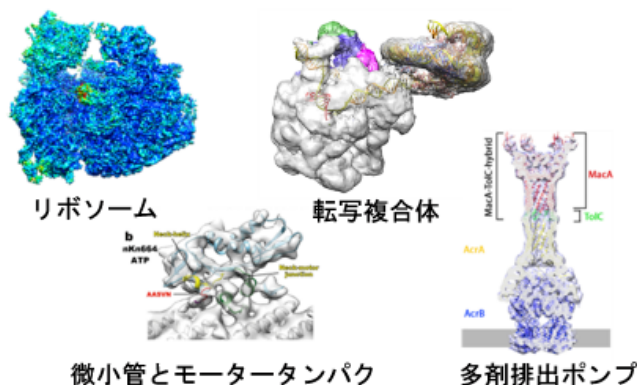
[2] 支援技術の概要

高難度複合体について、クライオ電子顕微鏡での構造解析が可能な試料調製を支援する。



[3] 支援技術の利用例

様々な超分子複合体を近原子分解能で構造決定した。



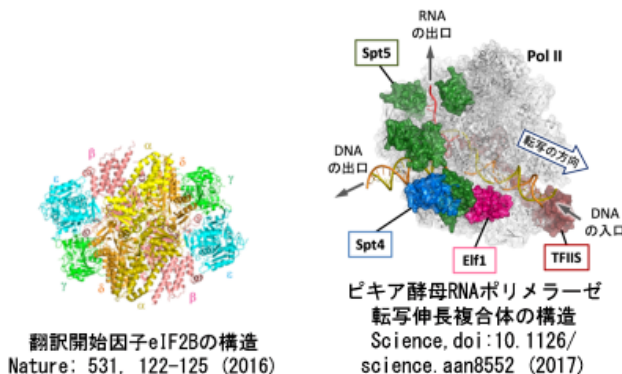
[4] 支援担当者の研究概要

内在性複合体の調製

分子量500kDaヘテロ10量体からなる翻訳開始因子eIF2Bや、分子量630kDaのRNAポリメラーゼII転写伸長複合体などの内在性超分子複合体を調製し、構造解析した。

内在性複合体の調製

ピキア酵母のゲノムタグ付加法を用いて、超分子複合体を調製
高度化：複数のタグの組み込み
培養細胞へのタグの組み込み
微量精製、nativeな複合体の精製

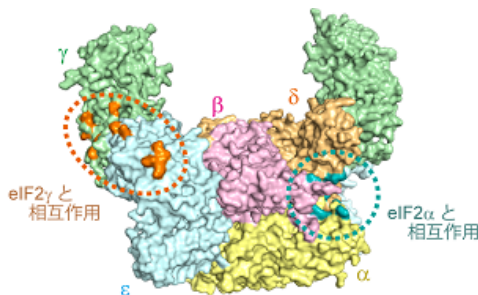


タンパク質の修飾

タンパク質修飾技術を用いて、翻訳開始因子eIF2/eIF2Bの相互作用領域を決定し、機能発現における空間配置の意義を解明した。

タンパク質の修飾

クロスリンカーの部位特異的導入
→複合体の安定化
修飾アミノ酸の部位特異的導入
→複合体の均一化
高度化：修飾・人工アミノ酸に対応した構造計算技術の開発



統合的構造解析

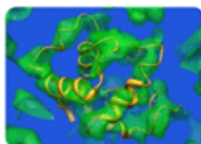
De novoモデルEdafold法、フラグメントによる構造予測FRAP法を開発した。

(PLoS ONE; 7, e38799 (2012), PLoS ONE; 8, e68954 (2013), Acta Cryst., D71, 304-312 (2015))

この2つの方法をもとに、クライオ電顕マップへの構造モデル構築法を開発中である。動きがあって高分解能に達しない箇所などに適用する。

統合的構造解析

X線結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡法モデリングを駆使した統合的構造解析



C9-1 X線結晶構造解析のための全自動大規模結晶化スクリーニング

対象は可溶性・膜タンパク質（及び複合体）の大規模結晶化スクリーニング、結晶化事前性状評価（膜タンパク質耐熱化予測など）

[1] 支援担当者

所属		①高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所構造生物学研究センター ②千葉大学 大学院理学研究院 ③北海道大学 大学院先端生命科学研究院
氏名		①加藤 龍一 ②村田 武士 ③姚 閔
AMED 事業	ユニット／領域名 課題名	構造解析ユニット（タンパク質生産領域） 全自動大規模結晶化スクリーニングシステムを用いたX線結晶構造解析の支援と高度化
	代表機関 代表者	高エネルギー加速器研究機構 加藤 龍一
支援技術のキーワード		結晶化スクリーニング、可溶性タンパク質、膜タンパク質、結晶化サンプル性状解析

[2] 支援技術の概要

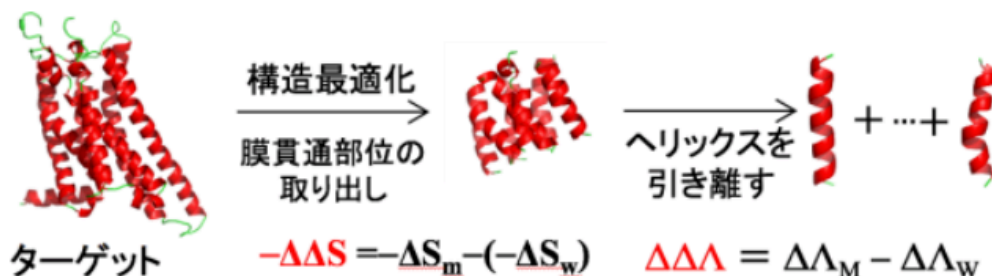
- 結晶性事前評価

結晶化スクリーニングを前提としたサンプルの純度、均一性、会合状態などを、電気泳動、カラムクロマトグラフィー、光散乱などを用いて測定し、結晶化実験に適したサンプルの事前評価を行う（可溶性タンパク質および膜タンパク質）。

結晶化に適したサンプルを得るため、耐熱化予測を行う（膜タンパク質）。

膜タンパク質用の自由エネルギー関数

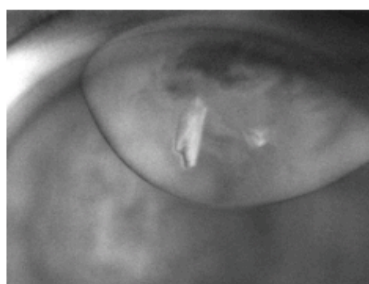
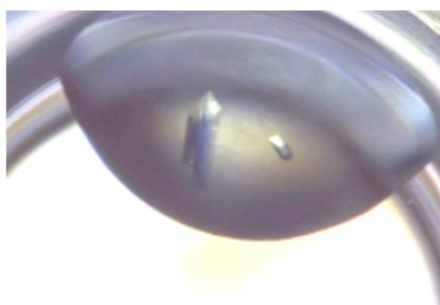
$$F/(k_B T_0) = -S/k_B + \Lambda/(k_B T_0), T_0 = 298 \text{ K.}$$



計算結果の上位20では5割の的中率！

- 結晶化スクリーニング

市販結晶化キットを用いて、蒸気拡散法およびバイセル法による大規模結晶化スクリーニングを行う。温度は20°Cおよび4°C。結晶化ドロップの観察は、可視光、蛍光およびSHGによる。



結晶化プレートのままのX線回折実験（in situ 測定）にも対応可能。



[3] 支援技術の利用例

- より速やかに高い成功率で結晶構造解析を行う。
膜タンパク質の耐熱化予測を行うことにより、結晶化の成功率の向上を図る。
- 全自動結晶化ロボット（最小分注量 100 nL）を使用し、より少ないサンプルでハイスループットで結晶化スクリーニングを行う。

[4] 支援担当者の研究概要

代表者の加藤は、ロボティクスの専門家の平木博士（高エネ機構、機械工学センター）との共同研究で全自動結晶化ロボットの開発と高度化を行い、また、高エネ機構の放射光ビームラインスタッフとの連携で、X線回折実験の自動化なども進めてきた。

構造生物学的研究としては、翻訳後修飾に関連するタンパク質群について研究を行い、ユビキチン、脂質、糖鎖の認識や代謝に関わるタンパク質群をその主な対象としてきた。最近では、筋ジストロフィーの原因タンパク質で糖代謝に関わる POMGnT1 の立体構造を明らかにした（PNAS 113, 9280-, 2016）。また近年、感染症や抗体についての構造生物学研究の展開も図っている。

分担者の村田は、創業等支援技術基盤プラットフォーム事業において、管教授（静岡県立大学）らと共同で開発したNative-PAGE法（CN-PAGE法：特許第5213967号）を応用し、膜タンパク質の単分散性や熱安定性を簡便に調べる方法を確立した。さらに、木下教授（京都大学）らと共同で統計熱力学理論計算を用いた膜タンパク質の耐熱化変異体予測法（エントロピー基盤法：特願2014-130560号；WO2015/1991621A1）を開発した。これらの開発技術を支援に活用し、Gタンパク質共役型受容体（GPCR）などの重要な創薬標的膜タンパク質の耐熱化に成功し、これらの新規結晶構造解析を進めている。

タンパク質の形や大きさ、表面電荷の分布などがさまざまであるため、その結晶化条件は一定ではなく、さまざまな条件を試してX線回折実験に適した結晶を得る必要がある。そのためには、数多くの結晶化条件の検討が必要で、サンプルの調製と結晶化条件探索そのものの双方の点で膨大な手間を要する。より少ない結晶化条件で求める結晶が得る事が出来れば、その改善になり立体構造解析自体のスループットの向上に大きく寄与する。そのため結晶化を促進するタグの開発や試薬の探索が行われてきたが、特定の条件で有効なものも一般性のあるものはなかった。分担者の姚は、新しい発想に基づいた結晶化促進試薬の開発を行い、複数のテストサンプルでその有効性を示した。