

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 補助事業名：創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業）
2. 補助事業課題名：動物細胞発現系を用いた高難度タンパク質生産支援と、糖鎖工学・抗体工学を用いたその高度化（動物細胞安定発現系を用いた膜タンパク質の生産と精製）
3. 研究開発代表者：横浜市立大学 准教授 禾 晃和
4. 研究開発の成果

本課題では、創薬等に重要な蛋白質の構造機能解析を飛躍的に加速するために、ヒト蛋白質などの困難なターゲットの発現精製を動物細胞発現系を利用して生産するパイプラインを構築し、高度な発現精製技術の共有とさらなる技術革新によるソリューションを確立するとともに、新規高付加価値分子の創成、試料評価法の改善、糖蛋白質生産用細胞株の樹立などを通して将来のさらなる汎用化、共有化、および高難度ターゲットの構造解析や医薬開発に大きく寄与する新規技術を開発し、支援と高度化をすることを目的として研究開発を行った。この目的を達成すべく、公立大学法人横浜市立大学では以下の事業を行った。

【支援】

・高難度タンパク質の発現戦略立案支援

外部研究者等に対し、動物細胞発現系を採用する場合のコンストラクト最適化、精製法最適化等について戦略立案（コンサルテーション）を中心に支援を行った。細胞外に分泌される糖蛋白質のみならず、複数回膜蛋白質、細胞内蛋白質などを対象として、計6件のコンサルテーションを行うとともに、標的蛋白質のテスト発現を行った。

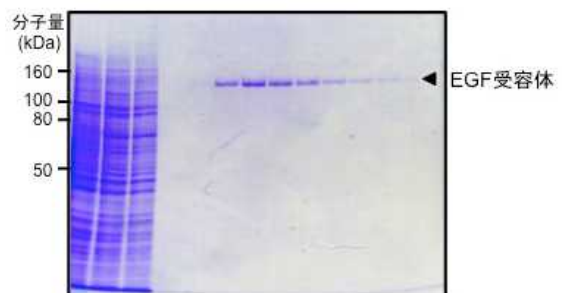
・動物細胞を用いた蛋白質生産支援

接着系及び浮遊系動物細胞を用いた生産パイプラインの最適化を行うとともに、高度化研究で開発するタグ技術なども導入することで精製システムを強化し、蛋白質の生産の支援を行った。主に神経発生や神経疾患などに関わる1回膜貫通型蛋白質や膜表在型蛋白質など、複雑な翻訳後修飾を受ける蛋白質を対象として、計5件の支援課題に取り組んだ。発現蛋白質の翻訳後修飾状態の確認や会合様式の検証など、性状解析を入念に行うことで、より純度と安定性の高い蛋白質試料の調製に取り組んだ。生産支援によって得られた高品質の蛋白質試料を活用することで、支援先において研究対象の機能解析に進展が見られた課題もあった。

【高度化】

・精製および検出のためのタグシステムの高度化

阪大代表機関、東北大分担機関とともに、超高親和性のPAタグシステムの開発に取り組み、特にPAタグシステムを利用した膜タンパク質の一段階完全蛋白質精製方法の検討を行った。抗がん剤のターゲットとして知られる一回膜貫通型受容体であるEGF受容体の全長蛋白質を糖蛋白質発現用細胞株で高発現させた後、可溶化した膜画分から一段階で高純度に精製することに成功した。EGF受容体の発現精製の成果に関しては、阪大代表機関と東



PAタグによる一回膜貫通型蛋白質の一段階精製

北大分担機関との共著で論文発表を行った (Fujii *et al.*, *Protein Exp. Purif.* **95**, 240, 2014)。また、大腸菌で発現させた膜内在性蛋白質の精製にPAタグシステムが適用可能かを検証し、結晶化品質の蛋白質試料

が得られることを示した。PA タグを融合することによって、既存のポリヒスチジンタグなどに比べて精製純度が高まるだけでなく、膜から可溶化した後の安定性も向上することが示された。

- ・構造解析のための新規糖蛋白質発現用動物細胞株の樹立

阪大代表機関と東北大分担機関で樹立した新規細胞株を支援課題で取り上げた蛋白質などの発現に利用し、糖鎖構造が整ったタンパク質が発現することを確かめた。

- ・一回膜貫通型蛋白質の生産方法の高度化

複数回貫通膜蛋白質に比べて遅れている一回膜貫通型蛋白質の構造解析を加速するため、発現コンストラクトおよび高発現細胞株の選別方法の改良、迅速精製をセットにした一過性大量発現系の構築などの高度化を進めた。発現コンストラクトの選別方法の改良では、蛋白質の安定性を評価するために、熱変性アッセイを導入した。数 mL 程度の培地を用いた小スケールの発現から得られる微量蛋白質を用いることでアッセイを行うことが可能であることが分かった。

接着細胞を用いた蛋白質の大量生産に必須である培養装置の高度化も進め、既存の装置が抱える問題を解決し、省スペース型でかつ操作性も向上した高密度培養装置を製作した。また、改良型高密度培養装置は、糖タンパク質発現用の HEK293 細胞、CHO 細胞の変異株いずれについても有効であることが開発の過程で確かめられた。この改良型高密度培養装置を支援活動にも導入することで、蛋白質生産支援を効率的に進めることが可能となった。

一方、接着系高密度培養による発現と試料調製が困難なケースを想定し、浮遊細胞による大量発現手法に開発にも取り組んだ。特に事業 3 年目に高発現性の細胞株を導入したことで、数十から数百 mL の比較的小さなスケールの培養からも構造機能解析に使用可能な収量での蛋白質生産が可能となった。支援課題で取り上げた膜蛋白質の細胞外領域断片に関しては、浮遊細胞発現系を活用することで、接着系安定発現株による発現では達成できなかった結晶化品質の蛋白質生産に成功した。

本事業において開発した接着細胞安定発現株による大量生産や浮遊系細胞による迅速一過性発現の系を活用することで、脳神経の発生や機能を制御する受容体とリガンドのペアの複合体構造を複数決定することに成功した。高度化で取り上げた受容体に限らず、一般に一回膜貫通型の細胞表面受容体やその細胞外リガンドは複数のモジュールからなるマルチドメイン蛋白質であり、糖鎖修飾などの翻訳後修飾を受けることから構造が柔軟であることが多い。そのため、結晶が得られた場合も高分解能の X 線回折データの取得が困難な場合や、一部のモジュールの電子密度が不明瞭になる場合など、構造決定を進める上での問題も多い。本事業では、解析拠点での拠点内連携によって、不明瞭な電子密度に対して分子モデルを当てはめる計算手法を考案し、上記の複合体構造を完了させることに成功した。

- ・細胞外蛋白質への標識導入技術の高度化

受容体と細胞外リガンドのペア等を対象として相互作用解析を行う際に有用なビオチン化修飾や蛍光標識などの導入技術の開発を阪大の代表機関とともに行った。ビオチン化修飾に関しては、単一のベクターから標的蛋白質とビオチン化酵素を発現させることで、簡便にビオチンを導入する系を構築した。部位特異的にビオチンを導入した蛋白質試料は、表面プラズモン共鳴法による相互作用解析にも有用であり、受容体とリガンドの結合特異性の評価や低親和性の相互作用の検出が可能となった。