

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：コムギ無細胞合成系による蛋白質生産支援・高親和抗体構築技術開発
3. 研究開発代表者：国立大学法人愛媛大学 プロテオサイエンスセンター 教授 澤崎達也
4. 研究開発の成果

【支援】蛋白質生産

膜蛋白質生産 モノクローナル抗体作製のための免疫抗原およびスクリーニング抗原として GPCR 4 種、6 回膜貫通の脂質修飾酵素ファミリー 8 種を発現させた。そのうち 3 種については数 mg を超える量の免疫抗原とスクリーニング抗原をそれぞれ大量調製した。特に、GPCR を対象とした抗体作製支援案件では、ナノボディ作製のためラマに免疫を行う大量の免疫抗原が必要とされたが、本事業で開発した膜タンパク質大量合成法を用い、15 mg の GPCR を無細胞大量合成し提供することができた。

また 4 回膜貫通タンパク質やウイルス受容体については、ビオチン化プロテオリポソームとして無細胞合成を実施し、後述の化合物スクリーニングに提供した。

複合体・合成難蛋白質生産 転写因子や受容体型キナーゼの構造解析にむけた合成試験を行なった。また、複合体の安定化のためのウサギ抗体作製において、富山大グループと協力し、抗体発現ベクターの構築、培養細胞を用いた抗体発現を実施した。

【支援】相互作用解析

パートナータンパク質探索

無細胞合成法を用いて作製したユビキチンリガーゼアレイ 224 種を用い、薬剤標的タンパク質のユビキチン化に関わる因子を探索した。ここで見つかった相互作用を指標として、アッセイ系のブラッシュアップを行い、後述の化合物スクリーニング探索のうち 1 件を実施した。

化合物スクリーニング 東京大学創薬機構から化合物ライブラリーの供与をうけ、薬剤探索支援を 4 件実施した。実施にあたってはスクリーニング用の蛋白質生産、HTS アッセイ系構築、スクリーニング実施など全面的にサポートし、9,600 化合物から数十の Hit 化合物候補の選抜に成功した。

【高度化】膜蛋白質結晶至適化高親和抗体の構築

味覚受容体特異抗体作製 味覚受容体蛋白質発現は世界的に困難であることが知られている。しかし、透析重層法を用いた無細胞合成を用いれば味覚受容体の大量調製も可能であることが確認された。そこで甘味受容体のウサギ高親和性抗体の作製を試みた。愛媛大グループで T1R3 プロテオリポソームの大量合成を行い、富山大グループがウサギへの免疫および ISAAC を実施、愛媛大で抗体産生を行うというスキームで 2 クローンの抗体を得た。しかし、これらの抗体はいずれも C 末端を認識するものであったため、細胞外ループ領域に結合する抗体を得たいと考え、複数の味覚受容体の細胞外ループを近傍の膜貫通領域を含めタンデムに連結した人工抗原を合成し、これを免疫抗原として用いて抗体作製を行うことを着想した。人工抗原の大量調製には成功したものの、残念ながら味覚受容体に結合する抗体は得られなかった。

無細胞合成 GPCR の構造解析 コムギ無細胞合成 DRD1 の大量調製と安定化に取り組んだ。結晶化に適した DRD1 変異体を複数作製し、可溶化した DRD1 と抗体の複合体の調製と結晶化を試みた。構造認識抗体である Ra51 抗体をシャペロン抗体として用い DRD1 の構造安定化を行うことを検討している。これまでに Ra51 抗体の Fab 化、DRD1 との複合体形成に成功した。また、後述の CP5 タグでアフィニティ精製を行った。現在、京都大小林グループと連携し、純度の高い DRD1/Fab 複合体の大量調製を進

め、結晶化条件を検討している。

抗 DRD1 高親和性抗体とそのエピトープを用いた新規アフィニティタグ開発 これまでに富山大との連携により、結合親和性の高い抗体が複数得られている。これらの抗体を用いたアフィニティタグ開発を実施した。2つの抗体について最小エピトープ配列を決定し、これらの配列をタグとして標的タンパク質に融合したところ、抗体は非常に高感度かつ安定にタグ融合タンパク質に結合した。2種類のうち1種類は超高感度な検出用抗体、もう1種類はペプチド溶出が可能な精製タグと、それぞれ異なった特徴があるタグシステムである。

【高度化】相互作用解析技術の開発と高度化

相互作用パートナータンパク質探索 無細胞技術を用い、プロテインキナーゼやユビキチンリガーゼを数百種類搭載したプロテインアレイを構築した。無細胞合成プロテインアレイを用いたスクリーニングの有用性を実証するために、無細胞技術で作製した E3 リガーゼアレイを用い、がん抑制タンパク質のユビキチン化に関わる責任 E3 をスクリーニングにより解析した。それにより同定された新規責任 E3 は、標的タンパク質の K48 ユビキチン化を促し、結果的にウイルス感染に有利な環境を誘導していることを明らかにした。作製したプロテインアレイや相互作用解析技術をもとに相互作用パートナー探索支援を開始した。現在、プロテインアレイの規模をさらに拡大し、約2万種のヒトタンパク質を搭載したアレイを用いたアッセイ系の開発をセルフリースサイエンス社と実施している。

また、これまでに我々が蓄積した相互作用解析技術を応用し、無細胞合成タンパク質と AlphaScreen、さらに愛媛大のスクリーニング設備を用いた化合物スクリーニング系を開発した。東大創薬機構との連携により、東大創薬機構が提供するコアライブラリ 9,600 化合物をあらかじめ微量分注したプレートに無細胞合成タンパク質および検出試薬を高速分注することで9,600 化合物を3時間程度でアッセイ可能なシステムを構築した。化合物スクリーニングの試験のため、C型肝炎ウイルスの増殖に関与する宿主因子であるプロテインキナーゼと宿主因子の間の相互作用を阻害する化合物の探索を試みた。東大創薬機構の9,600 化合物コアライブラリーのスクリーニングの結果、複数のヒット化合物が得られ、解析の結果これらの化合物はいずれも宿主タンパク質に作用し相互作用を阻害することが明らかになった。また、我々は植物ホルモン ABA の受容機構を AlphaScreen で再構築することに成功し、この系を用いて9,600 コアライブラリーをスクリーニングしたところ、シロイヌナズナの ABA 受容体を活性化するアゴニストを同定した。得られた化合物の化合物展開を行い、植物体内でより安定な新規化合物を得た。この化合物はシロイヌナズナの乾燥耐性を向上させる ABA 様の効果を示した。現在、これらの成果をもとに、無細胞系と AlphaScreen を用いた HTS 系を構築し、東大創薬機構の化合物を愛媛大で受け入れ、化合物探索を実施するというスキームで実施する化合物スクリーニング支援の提供を開始している。