

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：構造解析用核内タンパク質等の生産と評価
3. 研究開発代表者：公立大学法人 横浜市立大学 特別契約教授 西村善文
4. 研究開発の成果

（1）補助事業の目的

真核生物の核内タンパク質や天然変性領域を含む細胞質タンパク質を対象に NMR や X 線結晶構造解析に適したタンパク質の生産と性状解析を行う。

このため、公立法人大学横浜市立大学、学校法人早稲田大学、株式会社セルフリーサイエンスは共同で事業を行う。

公立法人大学横浜市立大学では核内タンパク質や天然変性領域を含んだ細胞質タンパク質の一部生産と性状解析を支援する。

支援

1. 結晶化用タンパク質の生産：タンパク質発現系の選択を行い生産する。
2. NMR 用タンパク質の生産：タンパク質発現系の選択を行い安定同位体ラベルタンパク質を生産する。
3. 質量分析（MS）による性状解析：ヌクレオソームのように 100 kDa を超えるタンパク質複合体でも、ネイティブの状態 で質量測定を行うことで、0.1% 程度の誤差で複合体を解離させずに分子量を決定し、生産されたタンパク質複合体の品質保証を行う。
4. X 線溶液散乱（SAXS）による性状解析：タンパク質試料の溶液中での構造情報を調べ、試料の性状を評価し、外部研究者の構造生物学的研究を支援する。
5. 超遠心分析法による性状解析：タンパク質溶液を高速で遠心し、分子量と構造（流体力学的形状）の分布状態を解析する。

高度化

1. NMR 用タンパク質生産の高度化：創薬標的に向けた種々の安定同位体ラベルしたタンパク質構成因子を大量調製しタンパク質複合体を再構成する技術開発を行う。
2. MS によるタンパク質性状解析の高度化：タンパク質の修飾に伴うタンパク質複合体のコンフォメーションと機能変化の関係を解析する。
3. X 線溶液散乱の高度化：実験室系の X 線を使った世界に例のない最高水準の X 線溶液散乱解析システムの構築を目指す。
4. 抗体を用いたタンパク質生産の高度化：インフルエンザ RNA ポリメラーゼの断片に結合するモノクローナル抗体作製を例として、医薬品用抗体の生産や標的タンパク質結晶化用の抗体の生産を行う。

（2）補助事業成果の内容

・支援

1. 結晶化用タンパク質の生産：酵酵母発現系とバキュロウイルス（昆虫細胞）発現系の培養設備の補充などを行って支援の体制を整え、課題番号 1169-1（東邦大・伊関）新規青色光センサー「光活性化アデニル酸シクラーゼ OaPAC の大量発現調製、および結晶化、構造解析に成功した。OaPAC は細胞内 cAMP の光操作ツールとしてメディカル・シーンから注目される分子で、OaPAC 光活性化の構造・機能解明し、マウスの海馬の神経細胞に OaPAC を供発現させ、青色光センサーにより

cAMP を介した神経軸索の分枝・伸長を光でコントロールする事に成功した。今後、2nd メッセンジャーの *optogenetics* に関する包括的な技術基盤を確立しており、神経疾患や、再生医療への発展に貢献できる (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA. in press*)。

2. NMR 用タンパク質の生産：安定同位体でラベルした NMR 用タンパク質の調製と NMR の測定を行った。課題番号 1121 (名市大・中山) クロモドメインによるクロマチン結合様式の解明：前年度に引き続き HP1 α のクロモドメインのリン酸化体と非リン酸化体の各フリーの構造とリン酸化体とヒストン H3K9me との複合体構造を NMR で解析し、HP1 α のクロモドメインの N 末テイルのリン酸化によりヒストン H3K9me との相互作用が強くなる機構を解明し論文に発表した (*Sci. Rep.* 6, 22527, 2016)。また Suv-39 のクロモドメインは溶解度が悪く NMR 構造解析としては不適だったが、ITC でヒストン H3K9me との相互作用を解析した (論文投稿中)。Clr4 や CBX のクロモドメインの発現系を作成しタンパク質生産を行い、NMR で測定を行い Clr4 とヒストン H3K9me との相互作用や CBX2 のクロモドメインとヒストン H3K27me との相互作用を NMR で解析した。課題番号 1122：新規クロマチン関連タンパク質 HiTAP1 とヒストン H3-H4 相互作用解析 (名市大・田上) 酵母 HiTAP1 の C 末ドメインの構造を NMR で解析し球状ドメイン構造を決定したのに基づいて、引き続き田上が機能解析を行い論文にまとめている。課題番号 2079：分裂期特異的な染色体パセンジャー複合体の動的構造解析 (がん研・広田) がんで発現が高い Hec1(Highly expressed protein in cancer)のリン酸化ドメインの NMR 用安定同位体ラベルタンパク質を調製し、NMR を測定し天然変性タンパク質である事を確認し、AuroraB によるリン酸化反応をリアルタイムに追跡した。HP1 との結合で AuroraB による Hec1 のリン酸化の活性が上昇した。
 3. 質量分析 (MS) による性状解析：100 kDa を超える複合体のネイティブ質量分析を行う技術基盤を構築した。課題番号 2021 (理化学研究所・山口芳樹) について、生産領域・禾に協力し、筋ジストロフィー関連糖リン酸化酵素 SGK196 の質量分析による性状解析を行った。課題番号 2149 (東工大・岩崎博史) について、相同組換えに関連するタンパク質の質量分析による性状解析を行い支援した。
 4. X線溶液散乱 (SAXS) による性状解析：前年度に引き続き理研・松井 (課題番号：1054) 及び横浜市大・医・中村 (課題番号：1109) の支援依頼に協力して各々のタンパク質の性状解析を行った。具体的には結晶化スクリーニングを行い、結晶の得られなかったタンパク質試料に対し、会合状態、分子形状の解析、および推定される分子構造と実際の溶液中での分子構造の比較を SAXS により行った。結果、結晶構造解析にむけて溶液状態のさらなる改善が必要であることを報告した。
 5. 超遠心分析法による性状解析：複雑なタンパク質自己会合系や、タンパク質間相互作用解析のためのソフトウェアの整備を行った。課題番号 1223: Human NBR1-UBA domain の構造解析 (京都大・栃尾) について超遠心分析を用いて自己会合状態の解析支援を行い、タンパク質挙動の濃度依存性から解離定数を計算した。課題番号 2016 : AL アミロイドーシス関連免疫グロブリン軽鎖の可変ドメイン二量体の解離会合平衡に関する超遠心分析 (神戸大・浜田) 解析を行い、疾病関連タンパク質の濃度依存性から解離定数を計算した。また、超遠心分析を用いて人工設計タンパク質の性状解析を行った。
- ・高度化
1. NMR 用タンパク質生産の高度化：安定同位体ラベルしたがん抑制遺伝子産物 p53 の転写活性化ドメイン中に存在する 9 個のセリンやトレオニンの特異的なリン酸化反応を種々の酵素を用いて追跡し、さらにリン酸化に伴い基本転写因子 TFIIH の p62 サブユニットの PH ドメインとの結合反応をリアルタイムに NMR で追跡した。またヌクレオチド除去修復因子 XPC の酸性ドメインの特異的なリン酸化反応を引き起こす酵素を同定し、更に p62 との複合体形成反応も NMR によりリアルタイムに追跡した (*Oncogenesis*, 4, e150, 2015)。各々安定同位体ラベルした XPC の酸性ドメインと p62 の複合体構造を NMR で解析した (*Structure* 23, 1827, 2015)。前年度に引き続き安定同位体ラベルした

ヒストン H2A と H2B 複合体の各々の安定同位体ラベルタンパク質を生産し複合体を再構築し NMR による主鎖の化学シフトを用いてバイオインフォマティクス領域の池口との共同研究で CS-Rosetta を用いて初めて H2A-H2B 単独の構造を決定した (*Sci. Rep. in press*)。前年度に引き続きヒストン H2A-H2B との相互作用を検討するためにヒストンシャペロン NAP1 の全長、N 末欠損体、C 末欠損体、C 末酸性ドメインなどの試料調製を行い NAP1 の C 末酸性ドメインはヒストン H2A-H2B との結合に必要ながヒストン H3-H4 との結合には必要ないことを確認し、MS との共同研究で論文を発表した (*Genes Cells 21, 571, 2016*)。前年度に引き続き線維筋痛症の標的タンパク質と考えられる Sin3 と NRSF の相互作用を阻害する化合物の新規デザインを NMR スクリーニングの結果に基づいてインシリコで行いこれらの化合物について新たに NMR で解析を行った。

2. 質量分析 (MS) によるタンパク質性状解析の高度化：テイル部分にアセチル化および脱イミノ化を行ったヒストン H2A-H2B 二量体の MS による性状解析を行い、脱イミノ化により高塩濃度に対する安定性が高くなるがアセチル化では変化がなく電荷を打ち消す修飾でも構造に対する影響には違いがあることを発見し論文発表した (*Protein Sci. 24, 1224, 2015*)。テイル欠損させたヒストン H2A-H2B 二量体を含むヌクレオソームコアも再構成できることを電気泳動や ESI-MS により確認し、性状解析を行った。ヒストンシャペロン NAP1 とヒストン多量体の複合体のネイティブ質量分析に成功し、NAP1 の C 末端の酸性領域がヒストンの認識において重要であることを確認した (*Genes Cells 21, 571, 2016*)。
3. X線溶液散乱 (SAXS) の高度化：試料自動交換装置を設置するとともに、既存の SAXS 装置の光学系および検出系の一部を改良した。さらに、光学系および検出系を改良した X線溶液散乱装置に試料自動交換装置を組み込み、両者が連動して作動する制御系を開発するとともに、安定的に作動することを確認した。高度化においては、既存の SAXS 装置の光学系および検出系の一部の改良により、放射光と同程度の SAXS データを放射線損傷なく測定できるようになった。具体的には、阪大蛋白質研究所・栗栖、広島大・小田らとの共同研究により、慣性半径が 40Å を超える大型のタンパク質や、タンパク質濃度 1mg/ml 以下の SAXS としては非常に希薄なサンプルからも放射光と同程度の SAXS データを収集でき解析できることを明らかにした。これらのサンプルについては溶液中での会合状態は単分散であることを報告した。また東工大・岩崎らとの共同研究では SAXS データから目的タンパク質が天然変性状態であることが示され、そのままでは結晶化が難しく、NMR など他の手法との組み合わせた解析が妥当であると推測された。
4. 抗体を用いたタンパク質生産の高度化：インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ断片を抗原としてモノクローナル抗体を作成した。RNA ポリメラーゼの断片 (PA,PB1,PB2) の RNA 結合部位の発現系の構築・大量生産・精製を行い、タンパク質をマウスに免疫し、合計 28 種類のハイブリドーマを得る事ができた。マウスから、腹水を採集して単離精製を行い、抗原タンパク質との結合確認を行った。その結果、PA に特異的に結合し、ウイルス増殖を阻害する抗体 PA11.9 を開発する事ができた。また、抗体 PA11.9 の可変領域のアミノ酸配列を決定し、抗体の構造解析にも成功した。また、PB2 の RNA 結合部位からの 2 個の抗体が抗原タンパク質と結合確認が認められ、合計 3 個の抗体作製に成功した。その中から、PB2 3-1.6 抗体は分子生物学的研究ツールでの診断試薬の使用可能として特許出願(特願 2014-068824)をしており、民間社へのライセンス契約を進めている。

5. 課題の総合的推進

課題全体の連携を密としつつ円滑に運営していくため、機関内や機関間で定期的に会合を持った。西村、佐藤、朴、明石はお互いの実験で密接な議論を行い、西村と明石および西村と佐藤は共同研究の成果を論文として発表した。また西村や分担機関の胡桃坂が調製した試料での明石による MS 実験での議論、西村と胡桃坂による試料調製の共同実験での議論、分担機関セルフサイエンスが調製し

た試料の西村による NMR 実験での議論など機関内や機関間で密接な議論を行い本課題の支援や高度化が総合的に推進できる体制を構築している。