

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
(小麦胚芽無細胞発現系を用いた核内タンパク質等の生産と供給)
3. 研究開発代表者：株式会社セルフリーサイエンス 執行役員／研究開発統括部長 森下 了
4. 研究開発の成果

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為、株式会社セルフリーサイエンスでは、無細胞合成用の小麦胚芽抽出液製造技術およびタンパク質合成技術を用いて、構造解析可能なタンパク質の安定生産を実現させ、達成目標として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の生産支援と、品質向上の為の翻訳後修飾技術開発および複合体調製法開発の高度化を行った。

小麦胚芽無細胞タンパク質合成技術の概要

基礎研究 (愛媛大学)	重要基盤研究	応用研究
小麦胚芽調製技術 翻訳阻害因子除去	転写翻訳効率向上 発現ベクターの開発 無細胞用PCR法の開発 合成法(重層法、繰り返しパッチ、F-and-F)	膜タンパク質合成・精製技術 基質タンパク質スクリーニング技術 自己抗体・自己抗原探索技術



小麦無細胞技術の普及

源流技術開発 小麦品種 栽培の方法 種子の処理方法	製品化技術 (試薬) 精製抽出液シリーズ 大量合成用抽出液シリーズ 高効率標識抽出液シリーズ	応用技術開発 標的蛋白質探索 薬剤探索技術 膜タンパク質合成法 特定の疾病の研究 タンパク質アレイの研究
技術移転/企業化 (セルフリーサイエンス)	製品化技術 (自動合成機) Protemist XE Protemist DTII GenDecoder	

小麦胚芽無細胞タンパク質合成 (支援)

2,000個/年のタンパク合成受託を行ってきたノウハウを活かしたタンパク供給



大規模施設用 GenDecoder® 少量多品種 重層法	大規模施設用 Protemist® 中量合成 繰り返しパッチ法	普及版 卓上タイプ Protemist® DT II 高信頼性、精製機能 重層法、精製法	普及版 卓上タイプ Protemist® XE 大量合成 Filter-and-Feed法
Screening: 10 μg/sample crude 4 - 32 mg	Screening: 0.1 mg/sample crude 0.5 - 3 mg	Screening: 0.1 mg/sample crude 20 - 100 - 1000 mg	

◎ロボットを活用したシステマチックなタンパク質生産体制
・これまでの核内タンパク質合成知見を利用した発現ライブラリ
・性状解析結果(代表機関)を速やかに生産にフィードバックする体制

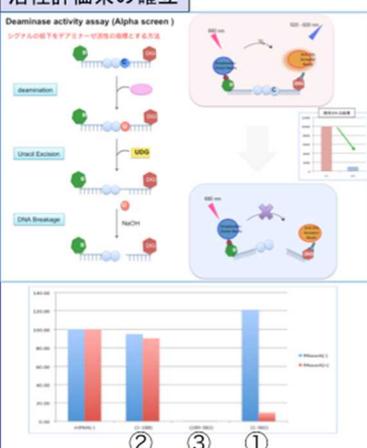
1) 小麦胚芽無細胞発現技術を用いたタンパク質生産支援

真核細胞型である小麦胚芽無細胞発現系の強みと自社オリジナル自動合成機を活かし、安定的なタンパク質の生産/供給を可能にする支援体制を構築する。平成 27 年度は、新たに採択された[課題 1294]について、ゲノム変異導入タンパク質の NMR / X 線結晶構造解析用タンパク質生産について支援を進めた。酵素活性評価系を確立させ、阻害剤スクリーニングからいくつか

支援課題1294 NMR並びにX線結晶構造解析用タンパク質生産

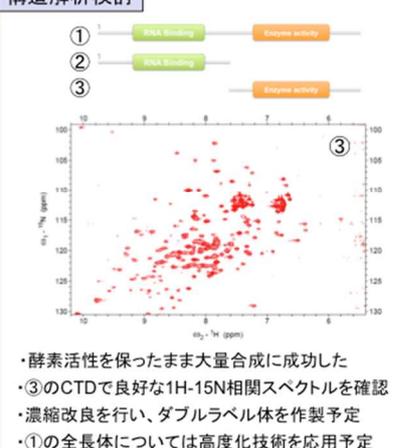
目的: 遺伝子編集酵素の発現/精製検討および大量調製支援

活性評価系の確立



② ③ ①

構造解析検討



① ② ③

- ・酵素活性を保持したまま大量合成に成功した
- ・③のCTDで良好な1H-15N相関スペクトルを確認
- ・濃縮改良を行い、ダブルラベル体を作製予定
- ・①の全長体については高度化技術を応用予定

の候補化合物を得た。これらの結果を基に、活性を保ちつつ良好なスペクトル (HSQC) を得たサンプルの作製に成功した。また代表機関と連携し、難発現タンパク質である CHD7 のクロモドメインの発現 (4 種類) に成功した。精製方法を検討することでそれぞれ解析に必要な十分量のタンパク質を供給し、DNA 結合能を確認することが出来た。また他系では全く発現しなかった Raf2 タンパク質の RFTS ドメインの発現にも成功した。

2) 複合体調製技術の開発と高度化

当社独自技術である約 2 万種類のヒトタンパク質を搭載したプロテインアクティブアレイ (PAA) を活用し、天然変性領域を持つタンパク質と相互作用する未知のタンパク質を探索し、不安定な標的タンパク質を複合体として安定調製させる技術開発を目指す。平成 27 年度は、核内タンパクモデルでの相互作用検出系開発では、代表機関と連携し核内タンパク質 p53TAD と p62PH を標的として用いて、適切な検出用タグの組み合わせ等を検討した。代表機関で確認した既知結合タンパク質を搭載したテストアレイを作製し、至適条件を用いて相互作用試験検討を行った結果、アレイ上で特異的な相互作用の検出を認めることが出来た。また 2 万タンパク質を用いた相互作用解析では、カルモジュリン結合タンパク質のスクリーニング結果を論文化することが出来た。

