

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金
(創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業) 補助事業成果報告書

I. 基本情報

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）
Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research
(Platform for Drug discovery, Informatics, and Structural life science)

補助事業課題名：（日本語）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）
（英語）High-throughput recombinant production of glycoproteins and
their binders using mammalian expression system
(Production of membrane proteins using mammalian stable cells)

補助事業担当者 （日本語）横浜市立大学大学院生命医科学研究科 准教授 禾 晃和
所属 役職 氏名：（英語）Terukazu Nogi, Associate Professor,
Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要（総括研究報告）

本分担機関では、主に、高等生物が有する膜タンパク質やその細胞外ドメイン、また膜タンパク質と相互作用する細胞外タンパク質など、糖鎖修飾などの翻訳後修飾を受けるタンパク質を取り上げ、動物細胞を用いた生産精製技術の支援と高度化に取り組んだ。

支援活動では、計 5 件の支援課題と計 6 件のコンサルテーション活動を担当した。代表的な研究成果としては、理化学研究所（山口芳樹博士）に対する支援で行なった細胞外リン酸化酵素 POMK の大量生産と X 線結晶構造解析が挙げられる。POMK は、II 型膜タンパク質であり、C 末端側の細胞外領域は α -ジストログリカンの糖鎖をリン酸化するキナーゼであり、POMK の機能異常は筋ジストロフィーの発症につながる。本支援では、POMK の立体構造を決定し、触媒機構と筋ジストロフ

イー発症の分子機構を解明することを目的として、細胞外のキナーゼドメインの大量発現と結晶解析の支援を行った。生産支援の過程で、POMK に対して不均一に糖鎖が付加される問題が起きたため、領域内連携で横浜市大明石知子准教授に質量分析を依頼し不均一性の要因を同定し、変異導入によって糖鎖修飾の均一化を行った。また、発現手法を接着細胞による安定発現から浮遊細胞による一過性発現に変更したことで大量発現に成功し、X線回折データの収集が可能な単結晶が得られるようになった。高エネルギー加速器研究機構（千田俊哉教授、松垣直宏准教授）との拠点内連携で、非標識のタンパク質による位相決定法である S-SAD 法を適用し、迅速に構造を決定することができた。最終的に基質との複合体構造も決定され、リン酸化における基質機構も明らかになった。

高度化研究では、高密度培養装置の改良による大量培養技術、PA タグを用いた 1 回膜貫通型タンパク質の精製法、細胞内ビオチン化技術などの高度化に取り組んだ。高密度培養に関しては、既存の装置に比べて小型でかつ操作性に優れた改良型の装置を製作し、HEK293 細胞や CHO 細胞などの代表的な細胞株については培養条件を最適化した。1 回膜貫通型タンパク質の精製法の高度化では、課題内連携で開発した PA タグシステムを用いることで、抗がん剤のターゲットとしても有名な EGF 受容体について、膜貫通部分も含む全長タンパク質を一段階で迅速かつ高純度に精製することに成功した。膜タンパク質や細胞外タンパク質への部位特異的な標識導入法の開発では、Internal ribosome entry site (IRES) 配列を持つベクターで標的遺伝子と分泌型ビオチンリガーゼ遺伝子を共発現させる系を構築し、細胞内ビオチン導入技術の簡略化を行った。

以上の高度化技術を活用することで得られた顕著な研究成果として、LDL コレステロールの代謝に関わる LDL 受容体の近縁のホモログである ApoER2 の細胞外領域と細胞外タンパク質 Reelin の活性断片の複合体構造の X 線結晶解析による解明が挙げられる。ApoER2 の細胞外領域や Reelin の活性断片は複雑な翻訳後修飾を受けるため、結晶化や相互作用解析を行うためのタンパク質試料を得るには動物細胞発現系の利用が必要不可欠であった。構造決定の過程では、理化学研究所（山本雅貴博士、山下恵太郎博士）との拠点内連携によって制約付き実空間探索のプログラムを作成することで、構造の揺らぎが大きく、電子密度が乱れた領域に対しても妥当なモデルを当てはめることができた。また、細胞内ビオチン化技術を用いることで表面プラズモン共鳴法によって高精度な相互作用解析が可能となった。従来、LDL 受容体は、細胞表面において伸張した構造をとって LDL などのリガンドを結合し、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた後に、収縮した構造に変化してリガンドを解離すると考えられてきた。しかしながら、ApoER2 は細胞表面において収縮した構造をとってリガンドであるリーリンを結合することが明らかになり、LDL 受容体ファミリーにおけるリガンド結合と解離の分子機構の解明に大きく貢献する重要な構造情報が得られた。

(英文)

In this project, we have developed production techniques for membrane proteins and extracellular proteins using mammalian expression systems and applied the established techniques to support for researchers working on biochemical and structural analyses of disease-related proteins and/or development of therapeutic strategies.

In the research support, we have worked on five projects and performed six consultation activities in total. A representative result is structure determination of protein *O*-mannose kinase (POMK) by x-ray crystallography, which was the support for Dr. Yoshiki Yamaguchi of RIKEN. POMK is a type II membrane protein containing a kinase domain in the C-terminal

extracellular region although the sequence similarities to general protein kinases are relatively low. POMK is a sugar kinase and phosphorylates the 6-position of *O*-mannose in the core M3 trisaccharide of the α -dystroglycan. It is known that Aberrant *O*-mannosylation of α -DG leads to severe congenital muscular dystrophies. For crystallization, we first designed truncation constructs of the kinase domain of murine POMK, and found that the fragment between residues 45 and 349 showed a high expression level in HEK293 cells, but it also showed heterogeneity due to incomplete *N*-glycosylation. Therefore, we next collaborated with Dr. Satoko Akashi of Yokohama City University, who also belonged to the PDIS project, and performed mass spectrometry to analyze the occupancies of *N*-glycosylation at each site. Based on the results, we eliminated the incomplete *N*-glycosylation by introducing mutations to the consensus sequences. We obtained diffraction-quality crystals from the homogeneous protein sample and the structure was determined by the S-SAD method with the diffraction data collected using low-energy x-rays of Photon Factory BL-1A, KEK, which has also been developed in the PDIS project. We also determined the crystal structure of the POMK-substrate complex and analyzed the catalytic mechanism as well.

In the development of research techniques, we have designed and made an improved version of high-density cell culture system, which have achieved the space-saving and improved operability. In addition, we applied the PA-tag system to purification of membrane proteins. For instance, we succeeded in the one-step purification of full-length PA-tagged EGFR, which is known as the drug target for cancer therapies. We also simplified the *in-vivo* biotinylation technique by expressing the target protein and biotin ligase from a single vector containing the internal ribosome entry site.

Furthermore, we have determined the crystal structure of ApoER2 ectodomain in complex with the fragment of extracellular protein reelin. In the process of structure determination, we collaborated with Dr. Masaki Yamamoto's PDIS group of RIKEN to assign the reliable model to highly mobile region in the crystal packing. ApoER2 is a close homologue of LDLR implicated in the clearance of LDL from blood plasma to maintain the LDL level. It is known that deletion or defects of LDLR causes familial hypercholesterolemia. Since no structures of the full-length LDLR ectodomain in complex with LDL or any other ligands have been determined due to the technical difficulties, our structure of ApoER2-reelin complex is expected to serve as a structural basis for analyzing the pH-dependent ligand capture and release mechanism conserved among the LDLR family members.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 6件)

1. PA tag: a versatile protein tagging system using a super high affinity antibody against a dodecapeptide derived from human podoplanin. Fujii Y, Kaneko M, Neyazaki M, Nogi T, Kato Y, Takagi J. Protein Expression and Purification. 2014, 95, 240-7.

2. Structural basis for amyloidogenic peptide recognition by sorLA. Kitago Y, Nagae M, Nakata Z, Yagi-Utsumi M, Takagi-Niidome S, Mihara E, Nogi T, Kato K and Takagi J. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2015, 22, 199-206.
3. Akiyama K, Mizuno S, Hizukuri Y, Mori H, Nogi T, Akiyama Y, Role of membrane-reentrant β -hairpin-like loop of RseP protease in selective substrate cleavage. *eLife*, 2015, 4, e08928.
4. Nogi T, Mihara E, Yasui N, Takagi J. Immunoaffinity Purification of the Glycosylated Extracellular Fragment of Mouse Plexin A2 Produced in a Mammalian Expression System. *Methods in Molecular Biology*. 2017, 1493, 57-72.
5. Nagae M, Mishra SK, Neyazaki M, Oi R, Ikeda A, Matsugaki N, Akashi S, Manya H, Mizuno M, Yagi H, Kato K, Senda T, Endo T, Nogi T, Yamaguchi Y. 3D structural analysis of protein O-mannosyl kinase, POMK, a causative gene product of dystroglycanopathy. *Genes to Cells*. 2017, 22, 348-59.
6. Hirai H, Yasui N, Yamashita K, Tabata S, Yamamoto M, Takagi J, Nogi T. Structural basis for ligand capture and release by the endocytic receptor ApoER2. *EMBO Reports* 2017, e201643521.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の保存された膜内挿入ループ領域の機能解析, 口頭 (若手奨励賞シンポジウム), 秋山光市郎, 水野慎也, 檜作洋平, 禾晃和, 森博幸, 秋山芳展, 第 14 回日本蛋白質科学会年会 (横浜), 2014/06/26, 国内.
2. リーリン-ApoER2 複合体の結晶構造解析, 平井秀憲, 安井典久, 田畑早苗, 山下恵太郎, 山本雅貴, 高木淳一, 禾晃和, 第 14 回日本蛋白質科学会年会 (横浜), 2014/06/26, 国内.
3. フラグメントの制約付き実空間探索による不明瞭な電子密度へのモデルのアサイン, ポスター, 山下恵太郎, 平井秀憲, 安井典久, 田畑早苗, 高木淳一, 禾晃和, 山本雅貴, 第 14 回日本蛋白質科学会年会 (横浜), 2014/06/26, 国内.
4. ApoER2 細胞外領域-リガンド複合体が明らかにする LDLR ファミリーのリガンド認識メカニズム, ポスター, 平井秀憲, 安井典久, 田畑早苗, 山下恵太郎, 山本雅貴, 高木淳一, 禾晃和, 第 16 回日本蛋白質科学会年会 (徳島市), 2015/06/26, 国内.
5. Crystallographic analyses of cell-surface receptors revealed the presence of low-affinity interfaces regulating the signal transduction, 口頭 (招待講演), Nogi T, The 53rd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (日本生物物理学会年会, 金沢市), 2015/09/14, 国内.
6. Analysis of the conserved membrane-reentrant loop of RseP, an intramembrane-cleaving protease, 口頭, Akiyama K, Mizuno S, Hizukuri Y, Mori H, Nogi T, Akiyama Y, EAJS2015: East Asia Joint Symposium 2015 (Okinawa), 2015/11/12, 国内.

7. 細胞表面受容体の機能解析に向けた部位特異的標識導入技術の検討, 一井紗恵, 根谷崎牧子, 大井里香, 佐藤毅, 禾晃和, 第 38 回日本分子生物学学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 (神戸市), 2015/12/01, 国内.
8. 表面プラズモン共鳴法を用いたセマフォリン 6D とプレキシシン A1 の結合選択性の検証, 金川櫻, 根谷崎牧子, 大井里香, 三原恵美子, 野田勝紀, 内山進, 高木淳一, 禾晃和, 第 38 回日本分子生物学学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 (神戸市), 2015/12/01, 国内.
9. S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼ RseP の膜内挿入ループ領域を介した基質選別, ポスター, 秋山光市郎, 水野慎也, 檜作洋平, 森博幸, 禾晃和, 秋山芳展, 第 38 回日本分子生物学学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 (神戸市), 2015/12/03, 国内.
10. 1 回膜貫通型受容体によるリガンド認識とシグナル伝達の分子機構解明に向けた構造生物学, 口頭 (招待講演), 禾晃和, 蛋白質研究所セミナー・Mechanism of Biology on the Membrane : 生体膜上での生物化学 (大阪府吹田市), 2016/03/04, 国内.
11. マルチドメイン型細胞表面受容体によるリガンド結合と解離の調節, 口頭 (招待講演), 禾晃和, 蛋白質研究所セミナー・「膜タンパク質の構造ダイナミクス」 Structural dynamics of membrane proteins (大阪府吹田市), 2016/5/13, 国内.
12. 神経軸索伸長ガイダンス分子セマフォリンと受容体プレキシシンのタンパク質複合体の分子モデリング, ポスター, 下地恵令奈, 浴本亨, 山根努, 禾晃和, 池口満徳, 第 16 回日本蛋白質科学会年会 (福岡市), 2016/06/07, 国内.
13. LDL 受容体ファミリーの立体構造解析から見えてきた脂質代謝のメカニズム, 口頭 (招待講演), 禾晃和, 金沢大学超然プロジェクト講演会 (金沢市), 2016/10/31, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. タンパク質構造解析入門, 禾晃和, 自己形成プログラム 金高リレー講座 (横浜市立金沢高校), 2013/10/28, 国内
2. 結晶の中で再現する蛋白質の生理機能, 禾晃和, 第 4 回 CSJ 化学フェスタ 2014, 2014/10/16, 国内

(4) 特許出願

該当なし