

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) 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)  
(英語) Production and evaluation of nuclear proteins and so on for structural analysis. (Production and supply of nuclear proteins and so on using wheat germ cell-free expression system.)

補助事業担当者 (日本語) 株式会社セルフリーサイエンス 執行役員 森下 了  
所属 役職 氏名：(英語) Ryo Morishita, Executive Officer, CellFree Sciences Co., Ltd.

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)

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の開発を行った。

### 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

プロタミンについて特定タグを付加することで合成を可能にし、さらに相互作用タンパク質と共発現させることで目的タンパク質の合成量と精製度の向上を確認し、発現精製法の確立に成功した。インテグララーゼについて、活性を保持したタンパク質の調製方法と活性評価方法の開発に成功した。A3B について酵素活性評価系を確立させ、良好なスペクトル (HSQC) を得たサンプルの作製に成

功した。CHD7 のクロモドメインの発現（4 種類）、Raf2 タンパク質の RFTS ドメインの発現に成功し、DNA 結合能を確認することが出来た。

## 2) 翻訳後修飾技術の開発と高度化：

リン酸化のモデルタンパク質として、大腸菌では調製が困難ながん抑制タンパク質 p53TAD および部位特異的なリン酸化に関わる kinase を 5 種類選定して合成検討を行い、コムギ無細胞系による安定調製に成功した。さらに kinase をカスケードの状態で共発現させることにより効率的なリン酸化にも成功した。メチル化/アセチル化のモデル基質としたヒストン 4 種（複合体タンパク）を合成検討し、変性すること無しに複合体（H2A/H2B）を調製することに成功した。

## 3) 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した。モデルタンパク質としてカルモジュリン (CaM) を選定し、既知の CaM 結合因子であるカルモジュリンキナーゼ (CaMK) を複数個プレートに固定して試験したところ、特異的な複合体形成を検出することが出来た。2 万タンパク質を用いた相互作用解析を行い、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。核内タンパクモデルでの相互作用検出系開発では、核内タンパク質 p53TAD と p62PH を標的とした。2 万タンパク質を用いた相互作用解析で、51 サンプルのヒットタンパク質（転写因子や DNA、RNA 結合タンパク質）が検出された。感度向上を目的にデバイスの改良を行い、搭載タンパク量として最大 10 倍を達成し、検出感度は 3～5 倍を達成した。

Protein production and characterization analysis suitable for NMR and X-ray crystal structure analysis were carried out on cytoplasmic proteins containing eukaryotic nuclear proteins and disordered domains. CellFree Sciences Co., Ltd., realized protein production for structural analysis using wheat germ extract preparation technology and cell-free protein synthesis technology. As a goal, we supported the production of proteins, developed post-translational modification technology, and preparation method for protein complex.

### 1) Protein production support using wheat germ cell-free expression technology

We succeeded in the development of protamine preparation method. Purification of protamine by adding specific tag and coexpression with interactive protein. We have succeeded in developing a method for preparing a protein that activity evaluation for integrase. We established an enzyme activity evaluation system for A3B and succeeded in producing a sample for HSQC. We expressed the chromo domain of CHD7 (4 types), the RFTS domain of Raf2 protein, and confirm DNA binding ability.

### 2) Development and advancement of post-translational modification technology:

As a model protein of phosphorylation, 5 kinase related to cancer-suppressing protein p53TAD

and site-specific phosphorylation, which are difficult to prepare in *E. coli*, were expressed. We succeeded in stable preparation by wheat cell-free system. Furthermore, efficient phosphorylation was successfully achieved by co-expressing kinase in a cascade. As a model substrate for methylation / acetylation, we succeeded in preparing a complex (H2A / H2B) without denature by co-expressing four kinds of histones.

### 3) Development and advancement of protein complex preparation technology

Protein Active Array (PAA) carrying about 20,000 human proteins which is our proprietary technology, we search for unknown proteins that interact with proteins with disordered domains, and unstable target proteins. We aimed to develop a technology to stably prepare an unstable target protein. Calmodulin (CaM) was selected as a model protein and a plurality of calmodulin kinase (CaMK) which is known CaM binding protein was immobilized on a plate and tested, it was possible to detect specific complex formation. Interaction analysis using 20,000 proteins was performed, and the results of the screening of calmodulin binding protein could be published. In the development of interaction detection system in nuclear protein model, we targeted nuclear proteins p53TAD and p62PH. Hit protein (transcription factor, DNA, RNA binding protein) of 51 samples was detected by interaction analysis using 20,000 proteins. Improvement of the device to improve sensitivity, up to 10 times the amount of protein loaded, achieved detection sensitivity of 3 to 5 times.

## III. 成果の外部への発表

1. Takeda H, Ogasawara T, Ozawa T, Muraguchi A, Jih PJ, **Morishita R**, Uchigashima M, Watanabe M, Fujimoto T, Iwasaki T, Endo Y, Sawasaki T. Production of monoclonal antibodies against GPCR using cell-free synthesized GPCR antigen and biotinylated liposome-based interaction assay. *Sci Rep*. 2015 Jun 10;5:11333.
2. Furuya Y, Denda M, Sakane K, Ogusu T, Takahashi S, Magari M, Kanayama N, Morishita R, Tokumitsu H. Identification of striated muscle activator of Rho signaling (STARS) as a novel calmodulin target by a newly developed genome-wide screen. *Cell Calcium*. 2016 Jul;60(1):32-40.

### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. インターラクトーム解析法を用いたヒト S100A6 標的分子の探索, ポスター, 坂根恭平, 西口みゆ, 古谷雄穂, 傳田美和子, 山口文徳, 曲正樹, 金山直樹, 森下了, 徳光浩, 第 38 回日本分子生物学会大会, 2015/12/01, 国内.
2. Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin 結合型転写因子の網羅的同定, ポスター, 太尾田泰成, 大西和貴, 古谷雄穂, 傳田美和子, 金山直樹, 曲正樹, 森下了, 徳光浩, 第 38 回日本分子生物学会大会, 2015/12/03, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
記載なし

(4) 特許出願  
記載なし