

提出日：2019年 4月 18日

平成 30 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

(2) 研究成果の概要

課題名	膜タンパク質の構造機能解析に向けた超高親和性抗体と Fv-clasp 技術の利用		
研究代表者	氏名	禾 晃和	
	所属機関名・部局名	横浜市立大学・大学院生命医科学研究科	
	職名	准教授	
事業名 (該当の事業名の右欄に○)	<input type="radio"/>	共同研究員	
	<input type="radio"/>	超高磁場NMR 共同利用研究課題	
	<input type="radio"/>	クライオ電子顕微鏡共同利用研究課題	
	<input type="radio"/>	客員フェロー	
蛋白研受入担当教員名	高木 淳一		
<p>Fab 断片や Fv 断片など抗原認識部位を含む抗体断片は、構造生物学的研究における有用なツールとなっている。例えば、構造解析の標的となるタンパク質と抗体断片との複合体を作製することで、結晶化においては、標的タンパク質の結晶化能が向上する効果が期待され、電子顕微鏡イメージングにおいては、マルチドメインタンパク質や超分子複合体の中でエピトープ領域の空間配置を推定することができるという利点がある。しかしながら、この手法を適用するためには、個々の標的タンパク質を特異的に認識する抗体を取得する必要があるため、マウス等の免疫によってモノクローナル抗体を作製する場合も、ファージディスプレイによって高親和性抗体を探索する場合も、多大な労力を要するという問題があった。そこで本課題では、この抗体取得の問題を解決するため、標的タンパク質に PA タグと呼ばれる配列を挿入し、これをエピトープとして認識する NZ-1 抗体の断片を結合させることで、X線結晶構造解析や電子顕微鏡イメージングに利用可能な複合体試料が作製できるかどうかを検討した。</p> <p>NZ-1 はヒトポドプラニン由来の 14 残基の配列を認識する抗体として作製され、その後の解析からエピトープのうち N 末端の 2 残基を除く 12 残基 (PA12) だけでも非常に高い親和性で認識することが明らかになっている。また、PA タグはループ状の構造をとって NZ-1 抗体と結合することから、他のタンパク質のループ領域に挿入した場合も NZ-1 抗体と安定に結合することも分かっている。そこで、本研究では、まず標的タンパク質に PA12 タグを挿入した上で、NZ-1 抗体の Fab 断片を結合させることで結晶化能の向上が見られるかどうかを調べることにした。標的タンパク質には、膜内切断プロテアーゼの可溶性断片を用いた。この可溶性断片については、すでに X線結晶構造が決定されており、その構造情報に基づいてタグ挿入部位を設計した。まず、可溶性断片のループ領域 5 箇所 PA12 タグを挿入したところ、うち 2 箇所については低分解能ながら NZ-1 抗体 Fab 断片との共結晶構造が決定できた。そして、低分解能構造に基づいてタグ挿入部位の最適化を行ったところ、標的タンパク質単独の結晶よりも高い分解能の共結晶構造を決定することに成功した。また、一連の結果は、ヘアピン領域が PA12 タグ挿入部位として適していることを示唆しており、他のタンパク質に応用する上での重要な知見も得られた。</p>			