

2021 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

研究成果報告書

(1) 事業名 (下記より該当事業名を選択し、ほかは削除して下さい。)

共同研究員

(2) 研究代表者

氏名：禾 晃和

所属機関名・部局名・職名：横浜市立大学・大学院生命医科学研究科・准教授

(3) 研究課題名 (申請時に記載したものと同一課題名を記入して下さい。)

抗体標識技術の一般化に向けた抗原・抗体の最適化

(4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名：高木 淳一 (研究室名：分子創製学)

(5) 研究成果の概要 (公開)

本研究では、膜内切断プロテアーゼの結晶化を促進するために、受け入れ研究室の有する抗体を用いた構造解析技術について研究指導を受けた。フラグメント抗体は結晶化シャペロンとして有効であり、膜タンパク質などの結晶化能を向上させる。また、近年技術革新の目覚ましいクライオ電顕においても、フラグメント抗体は分子配向の決定を助ける目印として利用できる。このように様々な利点のあるフラグメント抗体を用いた構造解析を進めるに当たって、申請者は、二つのアプローチを計画した。一つは、膜内切断プロテアーゼを特異的に認識する抗体を利用するアプローチであり、もう一つは、既存の抗体のエピトープを膜内切断プロテアーゼに移植し、フラグメント抗体を結合させるアプローチである。申請者は、膜内切断プロテアーゼを認識するモノクローナル抗体を複数取得しており、本課題ではこれらの抗体の断片を利用することを計画した。ただし、これらの抗体は結合親和性が十分に高くないために、安定な複合体を形成しない可能性も考えられた。そこで、受け入れ先研究室において開発された PA タグシステムを用いた複合体試料の作製も検討した。PA タグシステムは、ヒト・ポドプラニン由来の 12 残基からなる PA タグとこれを超高親和性で認識する NZ-1 抗体からなる。PA タグは NZ-1 抗体に認識される際にループ状の構造をとることから、他のタンパク質のループに挿入した場合でも、NZ-1 によって認識されることが示されていた。申請者は、先行研究で、モデルタンパク質のループに PA タグを挿入し、NZ-1 抗体の Fab 断片を結合させることで結晶化可能な強固な複合体が形成されることを示した。さらに、PA タグの配列を改変し、最適化することで、標的タンパク質の構造変化を大きく抑えた状態で Fab との複合体の作製が可能なことも示した。本研究では、この抗体利用法を発展させて、膜内切断プロテアーゼに PA タグを挿入し、NZ-1 抗体の断片を結合させることとした。また、PA タグの配列をさらに改変することでより強固な複合体の作製を目指した。