

高分解能結晶取得システム

[技術の概要]

結晶の品質が低い原因のひとつとして、タンパク質分子表面の結晶パッキング部位におけるリジン残基の存在が挙げられます。タンパク質分子表面のリジン残基を実験的に検出できればタンパク質結晶の高品質化につながります(図1)。我々は化学修飾によるタンパク質の分子表面リジン残基の簡便な検出法を開発しています(図2)。

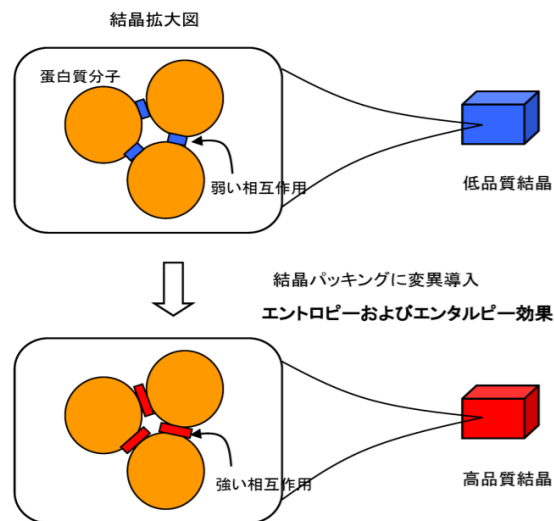


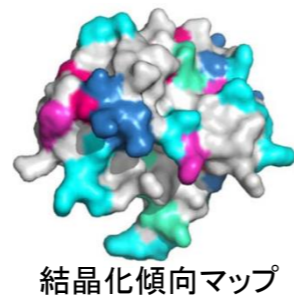
図1 結晶パッキング部位への変異導入による結晶品質の向上

パッキング部位の表面リジン残基は弱い相互作用の原因となるので、そこに変異導入を行う。

図2 分子表面リジン残基の特定手順

最終的にペプチドマッピングを行って、標識された分子表面リジン残基を特定する。

実験的に検出された分子表面リジン残基を結晶化傾向の高いアミノ酸残基に置換する変異体設計を行い、解析目的タンパク質の初期結晶を取得します。



[技術の利用例]

左記の技術で得られた変異体の初期結晶に当グループで開発した下記の要素技術を適用することで、解析目的タンパク質の高分解能結晶を効率的に取得できます。

1. ゼオライトによるタンパク質の結晶化制御
ヘテロエピタキシャル成長を促進する鉱物を用いてタンパク質を結晶化します。

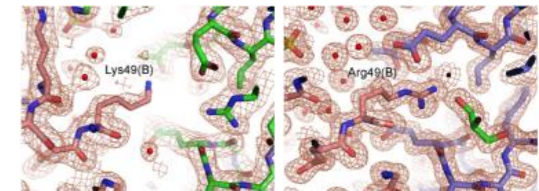


ゼオライト表面に析出したタンパク質結晶

Sugahara *et al.* (2008) *Acta Cryst. D* **64**, 686-695
Sugahara *et al.* (2011) *Crystal Growth & Design* **11**, 110-120

2. 変異導入によるタンパク質結晶の品質改善

結晶パッキングを強化する変異導入によりタンパク質結晶のX線回折能を改善します。



野生型

変異型

Mizutani *et al.* (2008) *Acta Cryst. D* **64**, 1020-1033

連絡先

[所属] 理化学研究所
放射光科学総合研究センター

[名前] 国島直樹

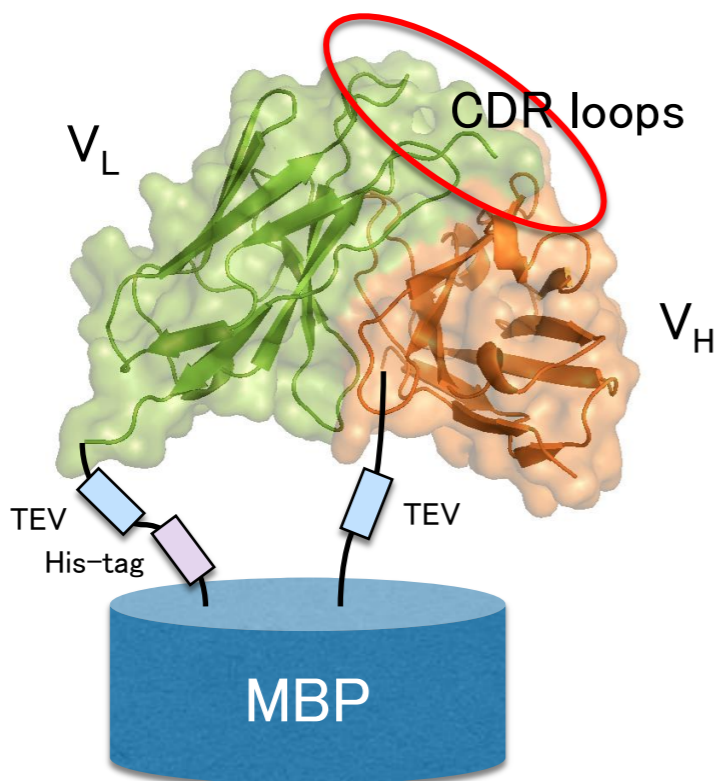
[E-mail] kunisima@spring8.or.jp

結晶化シャペロンとして用いる Fvフラグメントの大量生産技術:IRAT法

[技術の概要]

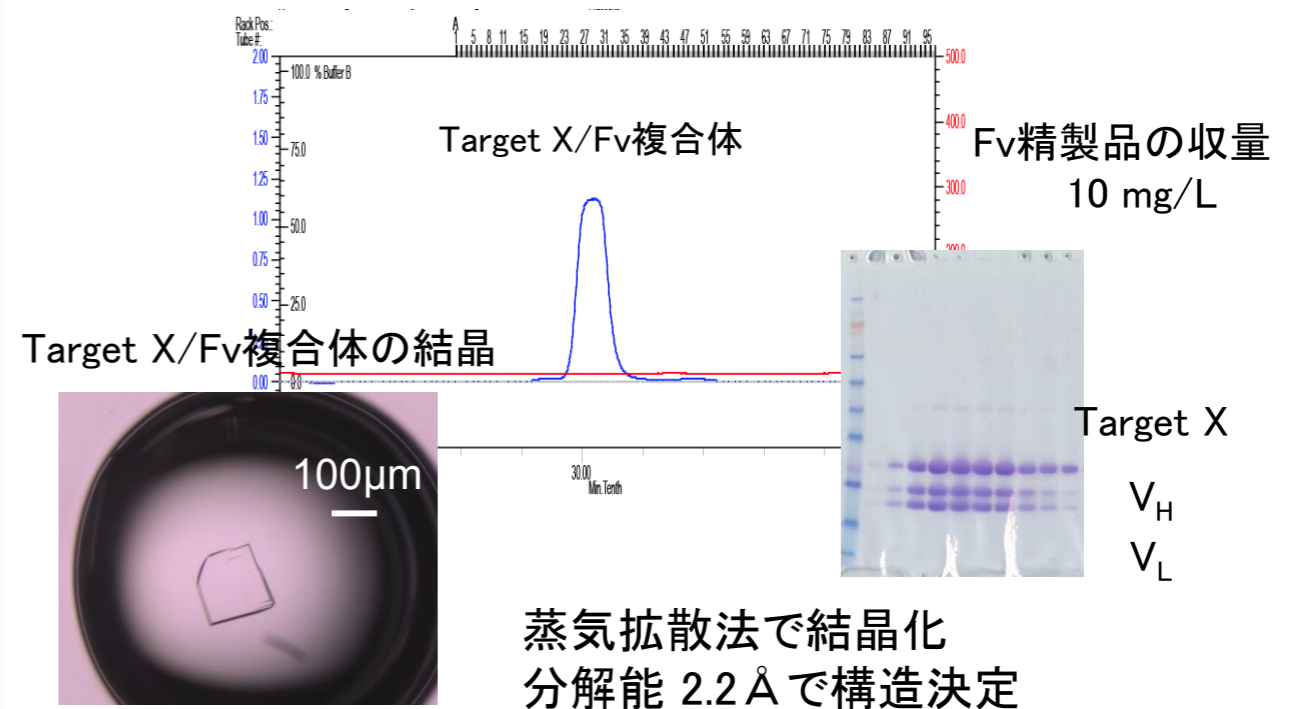
IRAT法 (Intervening Removable Affinity Tag法)

- 膜タンパク質の結晶化用のFv生産法として開発
- 抗体医薬のFv部分 (V_L 、 V_H) をMBPを介在させてグラム陽性細菌 (*Brevibacillus*) で分泌発現
- リンカーにTEVサイトとHisタグが挿入
- 簡便・迅速にFvの精製が可能 (5-10 mg/L以上)
- ターゲット分子/Fvを共結晶化することが可能
- 抗体医薬の結合様式・作用機序を解明
- 立体構造を基に低分子リガンド設計に寄与



[技術の利用例]

- 市販の抗体医薬のFv部分とターゲット分子Xの共結晶化



連絡先

[所属] 京都大学

[名前] 小林拓也

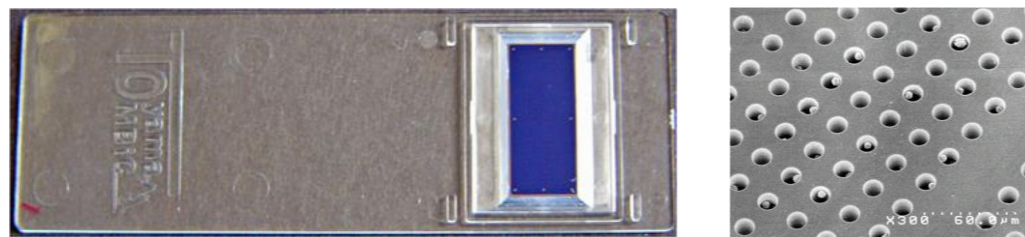
[E-mail] t-coba@mfour.med.kyoto-u.ac.jp

ISAAC法を用いたモノクローナル抗体単離

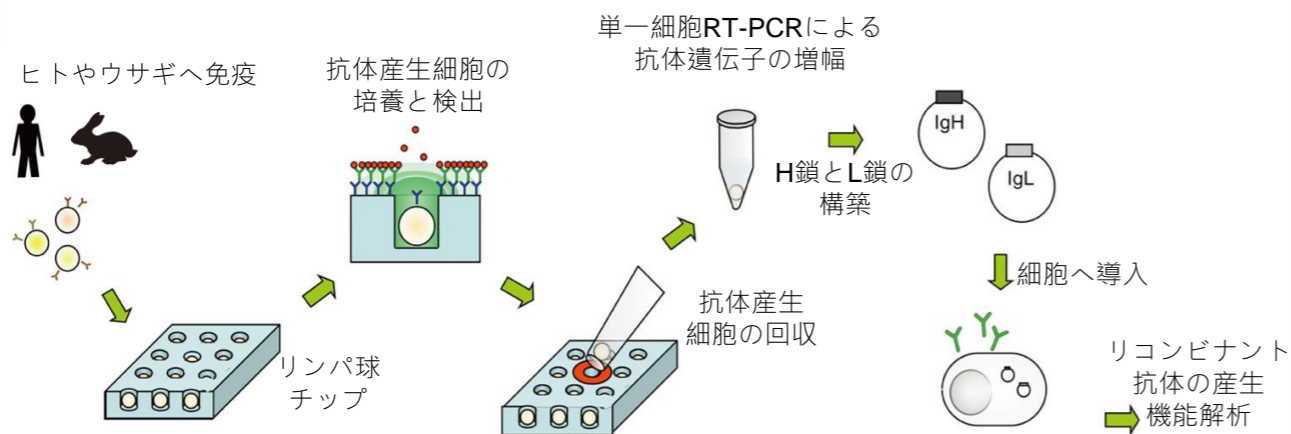
[技術の概要]

ヒトやウサギのモノクローナル抗体を
ISAAC法を用いて迅速かつ網羅的に単離

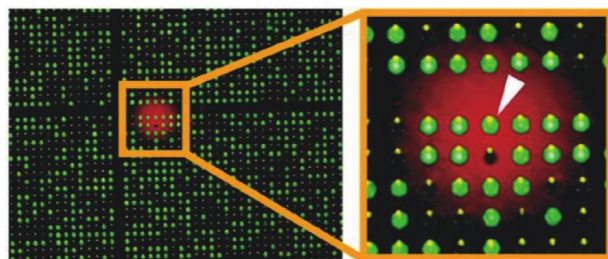
リンパ球チップ



ISAAC法の概要



ISAAC法による検出例



[技術の利用例]

今まで単離した抗体及び可能な支援例

ウイルス(ヒト)

自己抗原(ヒト)

ガン抗原(ヒト、ウサギ)

GPCR(ウサギ)

タンパク質複合体(ウサギ)

リン酸化ペプチド(ウサギ)

連絡先

[所属] 富山大学医学部免疫学

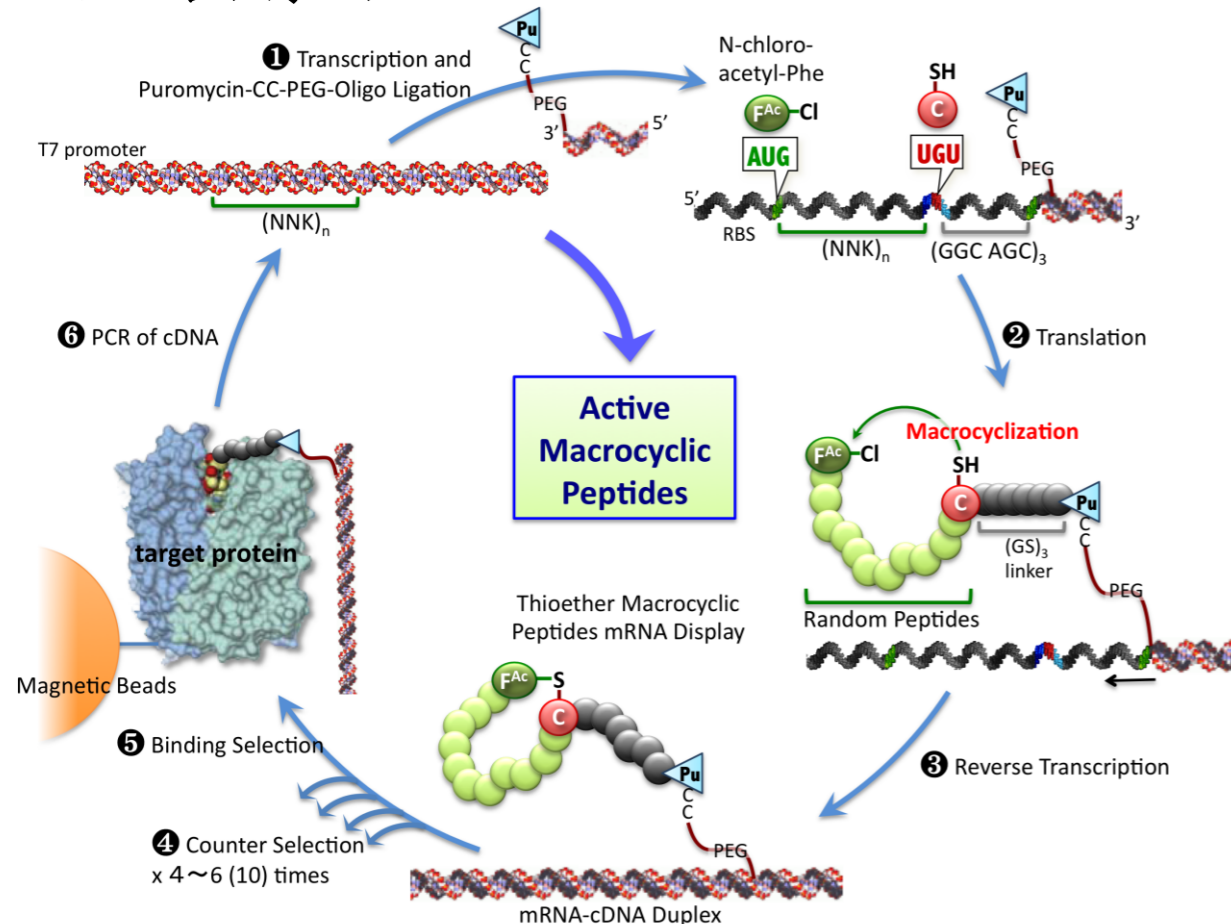
[名前] 村口 篤

[E-mail] gucci@med.u-toyama.ac.jp

RaPIDシステム：特殊ペプチドリガンドの発見

[技術の概要]

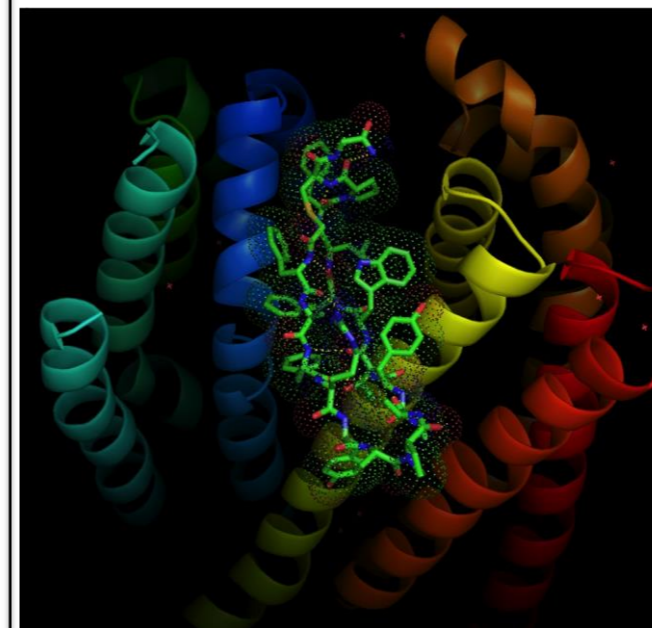
支援研究：標的特異的な特殊ペプチドリガンド(阻害剤)の発見 RaPIDシステム



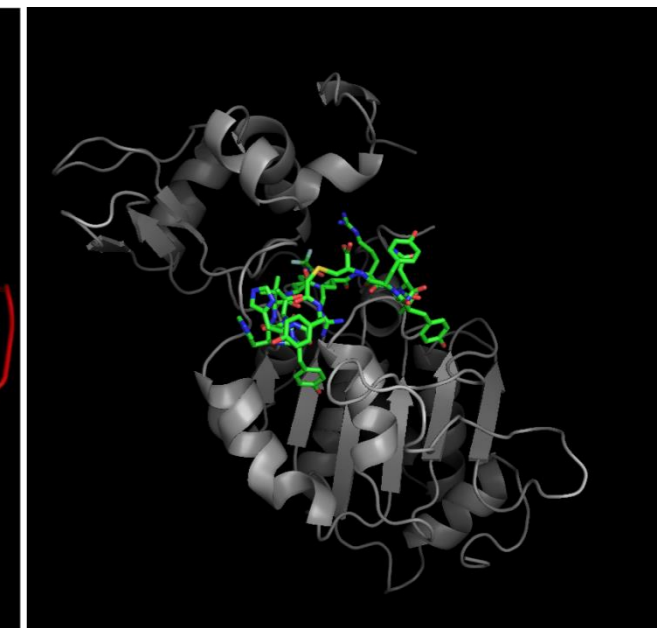
RaPIDシステムは、標的のタンパク質に対し、迅速且つ確実に高親和性・高特異性をもつ短鎖の特殊ペプチドリガンドを発見するプラットフォーム技術である。本支援では、このRaPID技術を駆使して、様々なタンパク質(膜タンパク質・酵素他)に特異的に結合する特殊ペプチドを発見し、その特殊ペプチドを化学合成して共同研究者に提供する。共同研究者は、特殊ペプチドを阻害剤として生物学的研究に役立てたり、特殊ペプチドと標的タンパク質を共結晶化することで解像度の高いX線結晶構造解析を行う。

[技術の利用例]

MATE薬剤輸送体膜タンパク質と特殊ペプチドの共結晶化によるX線構造解析の解像度の向上



アイソフォーム選択的な「SIRT2阻害剤の発見」



連絡先

[所属] 東京大学大学院理学系研究科

[名前] 菅 裕明

[E-mail] hsuga@chem.s.u-tokyo.ac.jp

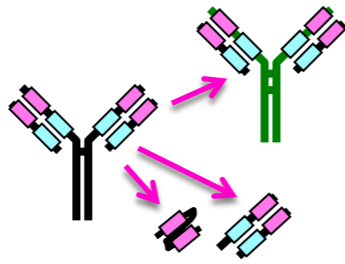
高付加価値抗体作製とその包括的エンジニアリング

[技術の概要]

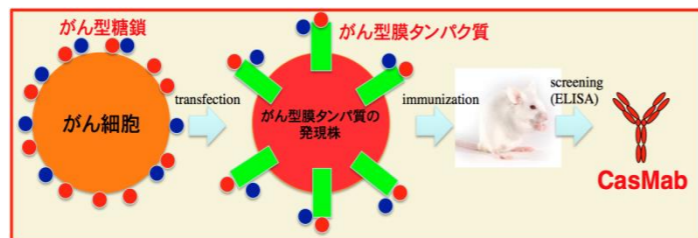
☆マウスモノクローナル抗体作製の膨大な経験に基づき、高難度ターゲットに対する抗体取得とその改変、組換え生産を支援。

支援メニュー

- ・手持ちハイブリドーマからの抗体遺伝子の高速クローニング¹。
- ・医薬化、生物活性賦与等のためのキメラ抗体、サブクラス変換抗体、抗体フラグメントの作製^{1,2}。



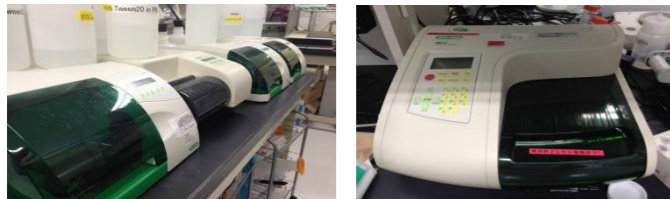
- ・特殊糖鎖つき抗原の利用を基盤とした抗鎖抗体、抗糖ペプチド抗体の作製¹。



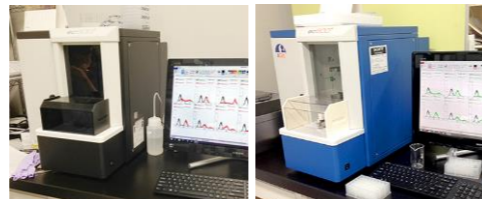
- ・RESET法による休眠ハイブリドーマの賦活化¹。
- ・コンフォーメーション依存抗体、活性阻害抗体などの高付加価値抗体の取得^{1,2}。

支援に供する設備

- ・高速抗体スクリーニング装置 (プレートウォッシャー、プレートリーダー)

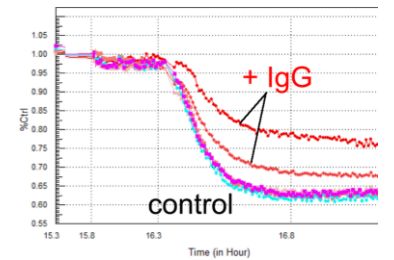
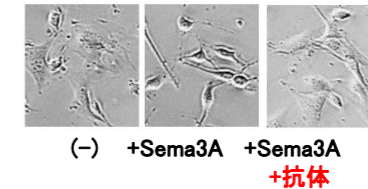


- ・細胞アナライザー (フローサイトメーター)

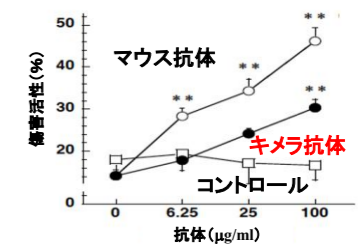
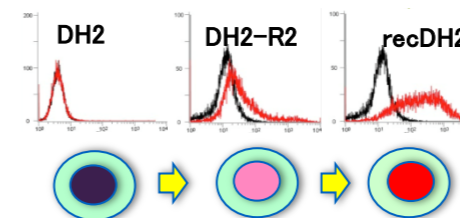


[技術の利用例]

- ・アトピー性皮膚炎、免疫難病などの疾患鍵分子であるセマフォリン3Aに対する阻害抗体を開発。



- ・がん悪性化に関わる肝細胞成長因子(HGF)の活性化型のみを認識する抗体の作製に成功。
- ・RESET法で貴重なガングリオシド抗体産生ハイブリドーマを救済！
- ・抗体医薬として期待されるマウス抗体をヒトキメラ化し、ADCC/CDC活性を賦与。



連絡先

- [所属] 1. 東北大学医学部
2. 大阪大学蛋白質研究所

[名前] 加藤幸成¹、高木淳一²

[E-mail] yukinarikato@med.tohoku.ac.jp
takagi@protein.osaka-u.ac.jp