

(様式 1-2)

提出日：2020 年 5 月 14 日

2019 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		超高親和性抗体の難解析性膜蛋白質の構造解析への応用	
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○)		○	共同研究員
			超高磁場NMR 共同利用研究課題
			クライオ電子顕微鏡共同利用研究課題
			客員フェロー
蛋白研受入担当教員名		高木 淳一	
抗体断片は結晶化シャペロンとして有効であり、膜タンパク質や糖タンパク質などの結晶化能を向上させることが知られる。また、近年技術革新の目覚ましいクライオ電子顕微鏡単粒子解析においても標的タンパク質に抗体断片を結合させることで、標的粒子の判別や2次元クラス分けが効率化するという利点がある。本研究では、構造未解明の膜タンパク質に対して抗体断片を結合させることで、X線結晶解析やクライオ電子顕微鏡単粒子解析による構造決定を行うための条件検討に取り組んだ。 抗体断片を利用するためには、まず標的のタンパク質に特異的に結合する抗体を取得する必要があるが、本研究では2つのアプローチで抗体を準備した。一つは、標的タンパク質を認識するモノクローナル抗体を取得するアプローチであり、もう一つは、標的タンパク質に外来のエピトープを挿入することでこれを認識する抗体を結合させるというアプローチである。前者に関しては、構造未知の膜タンパク質の可溶性領域を断片化し、マウスに免疫することでモノクローナル抗体を複数取得して、その中から解離速度が遅く安定に結合する抗体を選別した。最終的に、全長の膜タンパク質に対して安定に結合するクローンを数種取得し、断片化して構造解析に利用することとした。取得したモノクローナル抗体の3つについては、Fab断片とエピトープである可溶性領域断片との複合体のX線結晶構造を決定し、詳細な分子認識の様式が明らかになった。さらにうち1種については、全長の膜タンパク質とも安定な複合体を形成することが確かめられ、ネガティブ染色法による電子顕微鏡単粒子解析を行ったところ、全長タンパク質に対するFabの配向が明らかになった。このモノクローナル抗体については、ハイブリドーマから抽出したmRNAを鋳型として逆転写PCRを行うことで塩基配列を決定した。現在、取得したcDNAを用いて、受入担当研究室で開発されたフラグメント抗体Fv-claspに改変する作業を進めている。一方、既存の抗体のエピトープの挿入による抗体断片複合体の作製法については、挿入方法の最適化を行ったことで、標的タンパク質の構造変化を低く抑えた状態でのエピトープの挿入とFab断片との複合体形成が可能になった。今後は、2つのアプローチを並行して進めることで、標的の膜タンパク質の立体構造の決定に取り組んでいくことを計画している。			