

(様式 1-2)

提出日：2021 年 5 月 11 日

2020 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	抗体標識技術を活用した難解析性膜タンパク質の構造解析		
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>標的タンパク質に対して、Fab 断片や Fv 断片などの抗体断片を結合させる抗体ラベリング技術は、X 線結晶解析やクライオ電子顕微鏡など、タンパク質の原子レベルの立体構造を決定可能な構造解析法を効率化する技術として頻りに利用されている。X 線結晶解析の前提条件となる結晶化においては、界面活性剤ミセルに覆われた膜タンパク質や糖鎖に覆われた糖タンパク質に抗体断片が結合することで、結晶のパッキング形成が促進される場合がある。一方、クライオ電子顕微鏡では、電子顕微鏡像中の配向決定が難しい低分子量タンパク質に抗体断片が結合することで、クラス分けが効率化し、高分解能での構造決定が可能になる場合がある。このように抗体ラベリング技術は、構造生物学的研究において有用なツールであるが、標的タンパク質を認識する抗体を取得していなければ適用できず、抗体作製が困難な標的タンパク質には適当が難しいという問題があった。そのような状況の中、研究代表者等は、受入研究室において開発された PA タグシステムを用いて、新たな抗体ラベリング技術の開発に取り組んできた。具体的には、PA タグと呼ばれる 12 残基からなるエピトープを標的タンパク質のループ領域など内部に挿入し、PA タグを認識する NZ-1 抗体の断片を結合させる技術を開発してきた。研究代表者は、まず先行研究において、好熱菌由来の膜内切断プロテアーゼのペリプラズム領域に存在する PDZ タンデムの可溶性断片をモデルタンパク質として用い、PA タグを挿入し NZ-1 抗体の Fab 断片を結合させることで、結晶化可能な安定な複合体が作製可能であることを示した。しかしながら、この先行研究では、NZ-1 抗体との結合によって PDZ タンデムの構造が一部壊れてしまうことが明らかになったことから、本研究において、さらなる検討を進めた。その結果、PA タグの N 末端側に 2 残基付加した PA14 タグを挿入することで、PDZ タンデムの構造が維持された状態で NZ-1 抗体と安定な複合体が形成されることが示された。さらに、この抗体ラベリング法を全長の膜内切断プロテアーゼにも適用し、蛋白質研究所の電子顕微鏡装置を利用して負染色単粒子解析を行うことで、全長タンパク質の 3 次元モデルを取得した。このモデルから、抗体の結合部位に基づいて、全長タンパク質の中での PDZ タンデムの空間配置を正確に推定することができた。一連の成果は、構造生物学分野の専門誌においてすでに公表済みである (<i>Acta Cryst</i> (2021) D77, 645-662)。</p>			