



# 高等真核細胞を用いた組換え体 タンパク質の産生向上を可能にする スタビロンタグの開発

日本大学 生物資源科学部 応用生物科学科  
准教授 舩廣 善和

令和 2 年 10 月 13 日

# 従来技術とその問題点

タンパク質の産生向上に繋がるタンパク質の安定化や分解耐性を目的とした“ タグ ”はこれまでにはない。

検出や精製面で評価を得ているタグシステムには、Flagタグシステム等があるが、免疫沈降法や免疫染色法によるタンパク質間相互作用の解析などでは2種以上の極めて特異性の高いモノクローナル抗体が必要である(ポリクローナル抗体は動物愛護の観点から好ましくない)。

# 従来技術とその問題点

タグ種名	タグ配列	抗体	特徴・問題点
Flag	DYKDDDDK 人工配列	M2	非常に特異性が高い
Myc	EQKLISEEDL	9E10	タグを繰り返した方が 結合が強い(6xMycなど) 前後の配列に影響される
HA	YPYDVPDYA	4B2、6B3 など多数	いい抗体を選ぶ 必要がある

※昨今、高親和性のタグ、モノクローナル抗体のコマーシャルが多くなってきている

# 新技術発見の背景

E2F-1

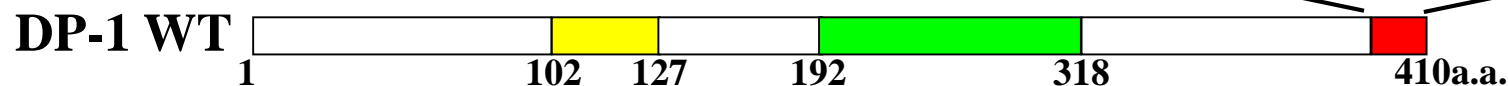
DP-1

DP-1 スタビロン

転写因子DP-1 (E2Fファミリーとヘテロダイマーを形成し細胞周期を制御)

-EDDEEDDDFNENDEDD

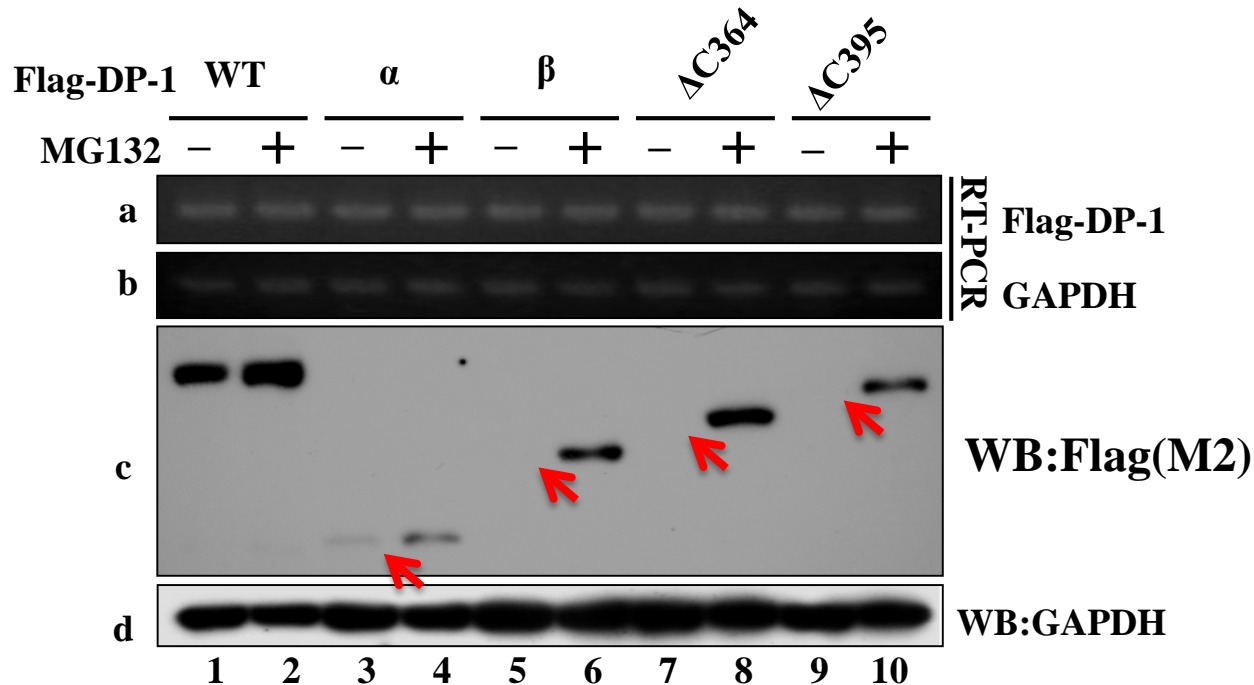
A



新規発見の  
アイソフォーム



B



C末が欠けると発現が見られない！C末の16アミノ酸がDP-1タンパク質の安定化に重要であった

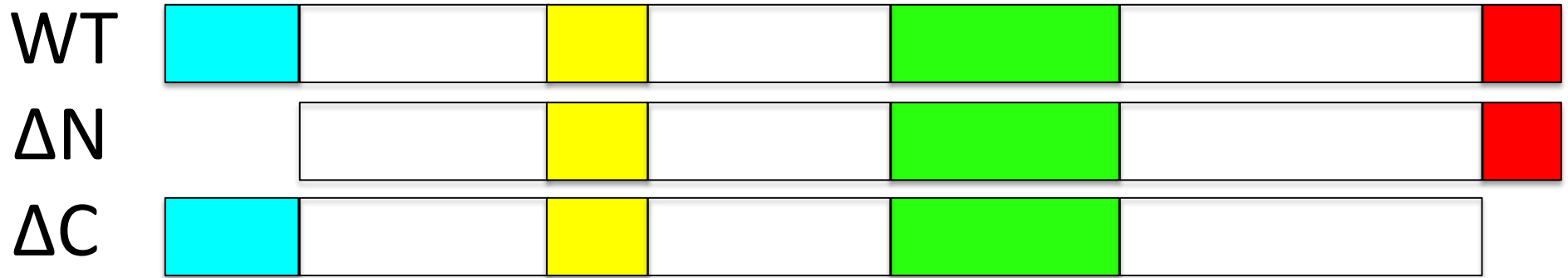
Masuhiko Y. et al

Biochem Biophys Res Commun. 2010  
397(2):345-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.05.127.

# タンパク質の安定化領域(スタビロン) / 不安定化領域(デグロン)

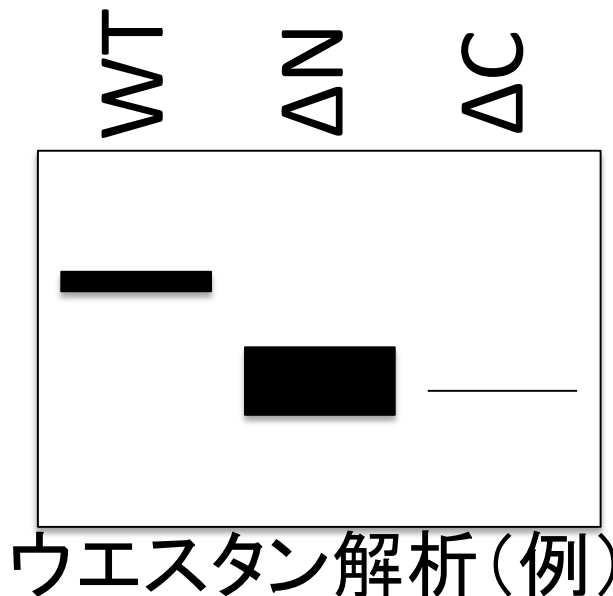
このような欠失変異体作製時、本来のタンパク質の発現が悪くなったり良くなったりすることがあります！

Factor X

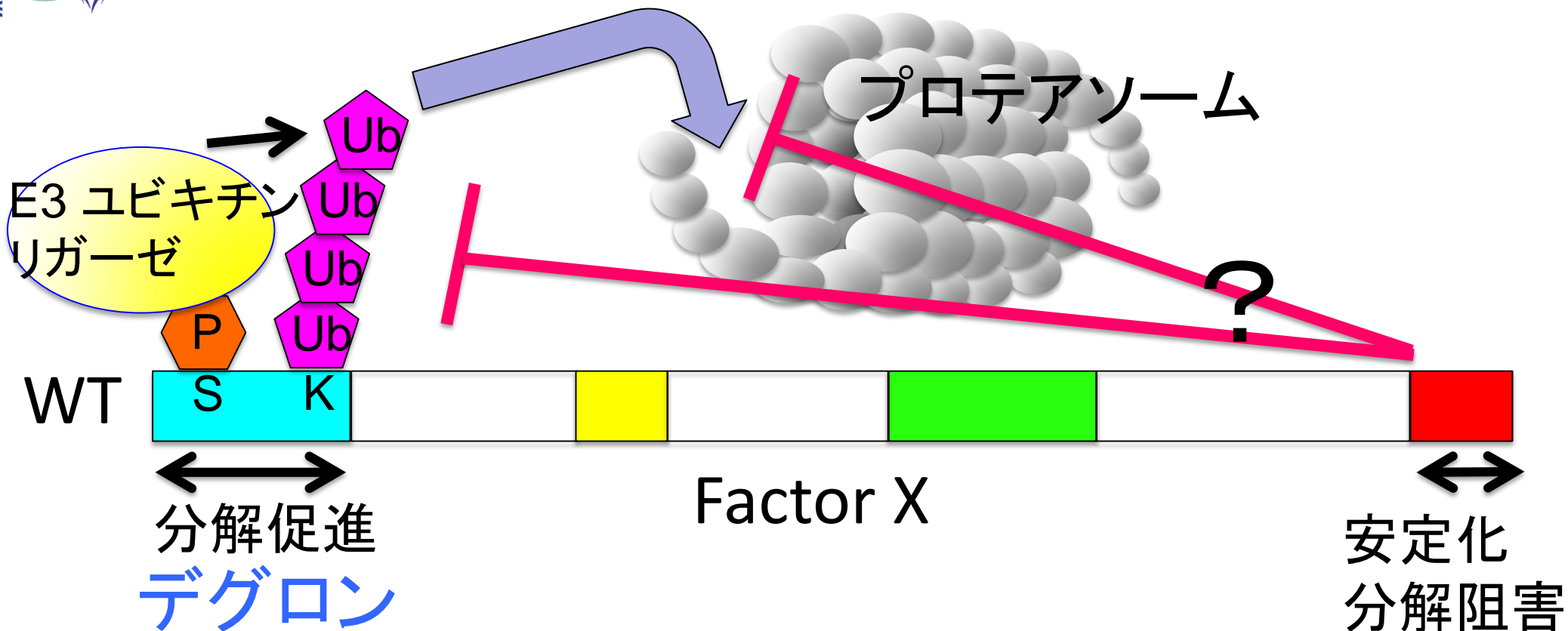


不安定化  
分解促進  
デグロン

安定化  
分解阻害  
スタビロン



# スタビロンとデグロンのメカニズムは？



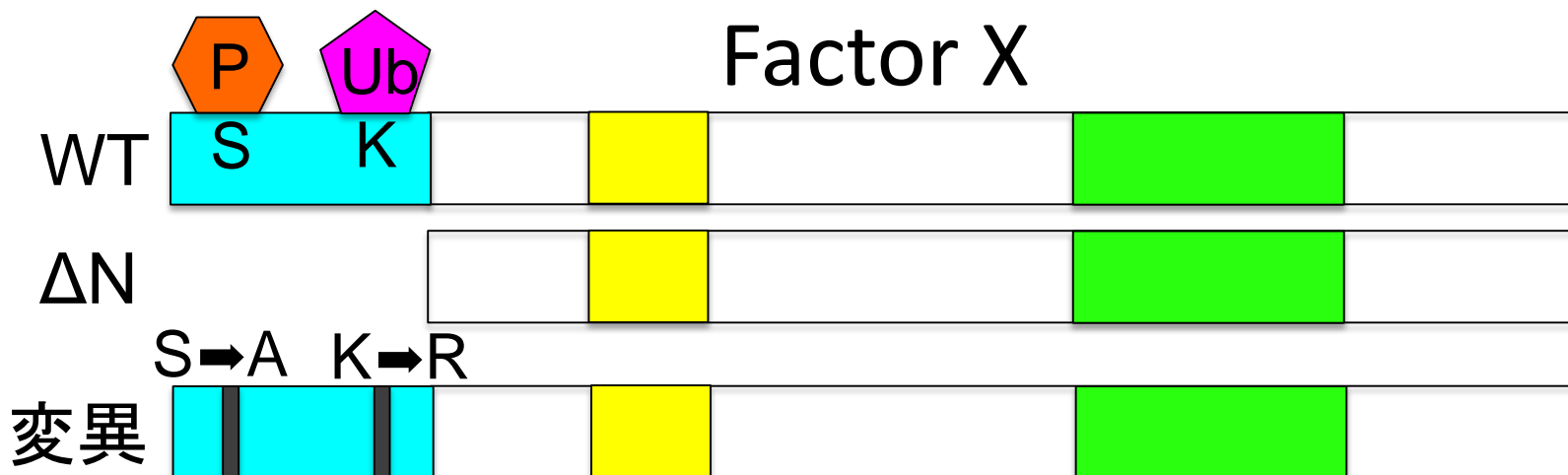
比較的良好に解析

PESTモチーフが有名  
ユビキチン化リジン(K)  
Phospho-デグロン(S/T)など

メカニズムはあまり  
知られていない

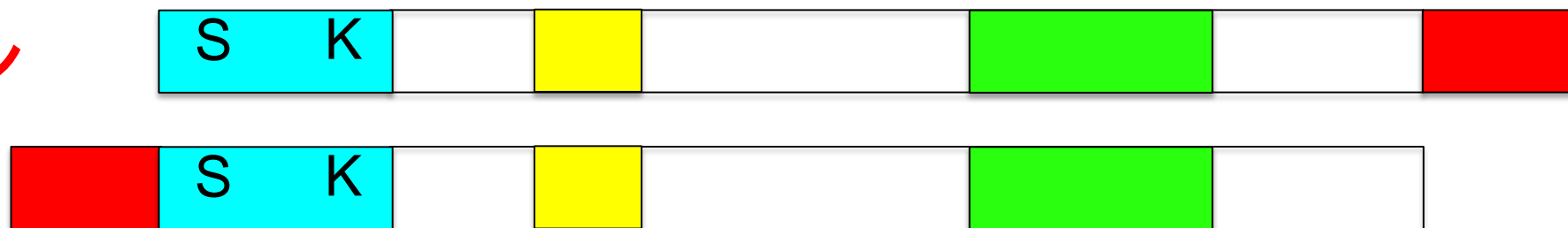
# タンパク質を安定化するには

デグロンの  
欠失、変異

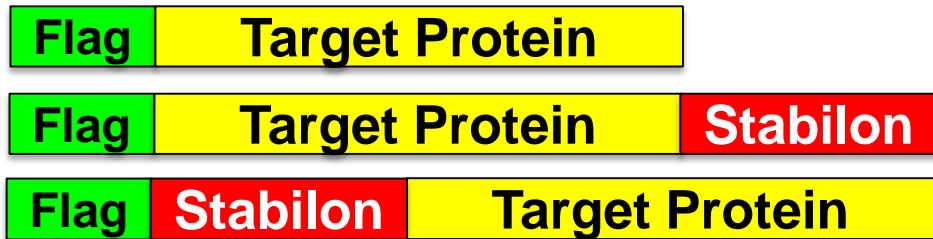


デグロンの除去もしくは変異導入という方法があるが、これはデグロンが判明しているタンパク質にのみ適応。さらに、欠失や変異で機能が変わることも！

スタビロン  
融合



融合はどのタンパク質にもトライできる！汎用性高い！  
分子内部への融合も有効！（全てに効く保証はないが）



核タンパク質

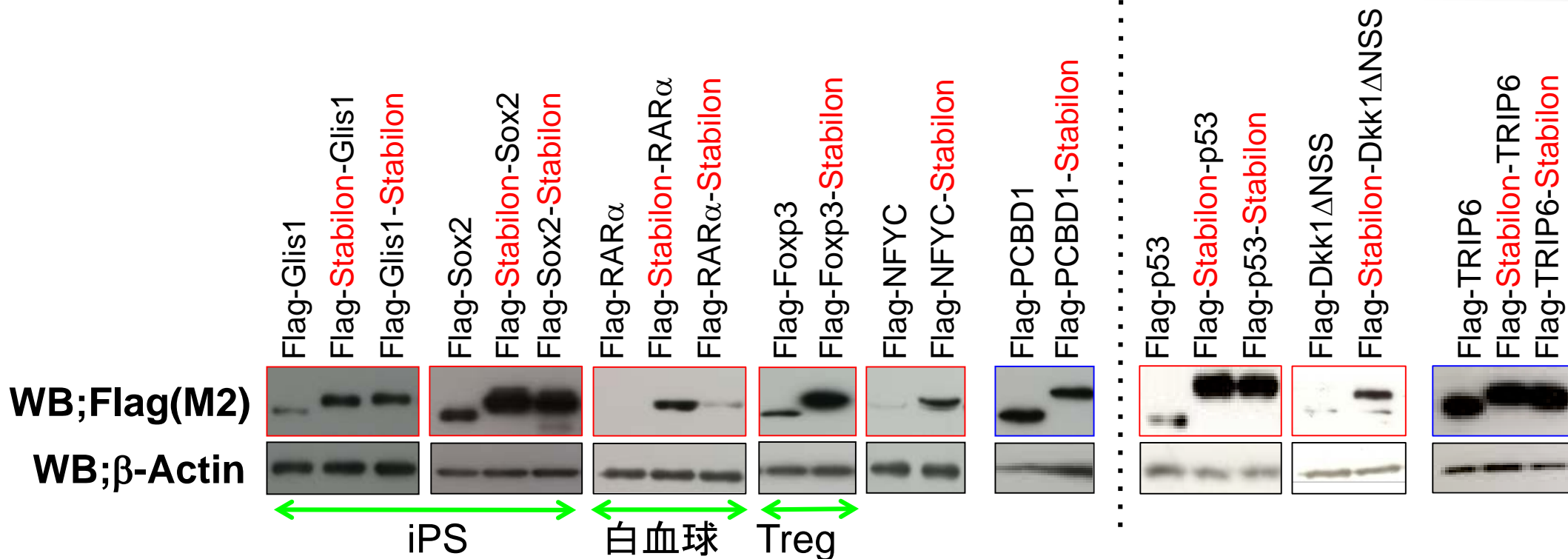
主に細胞質局在  
タンパク質(一部  
両局在タンパク質)

安定化した

安定化み  
られない

安定化した

安定化み  
られない

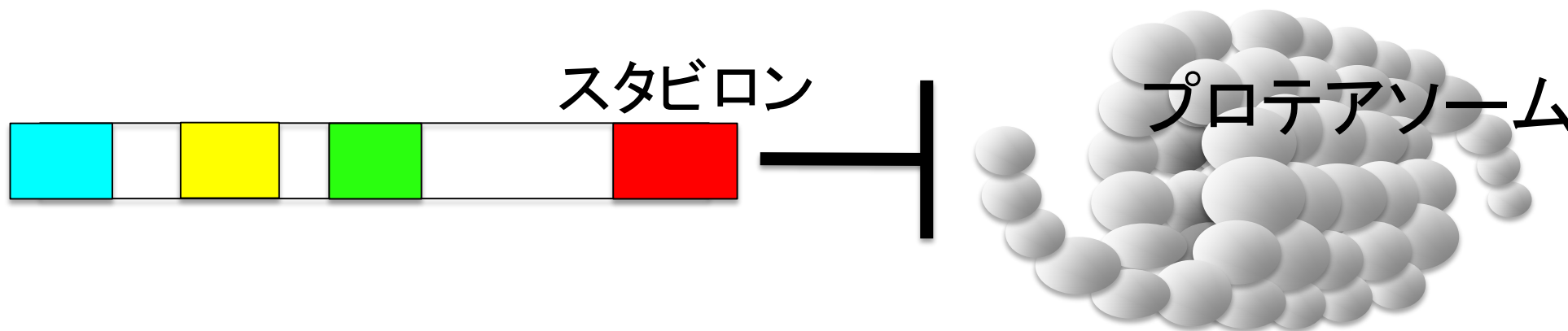
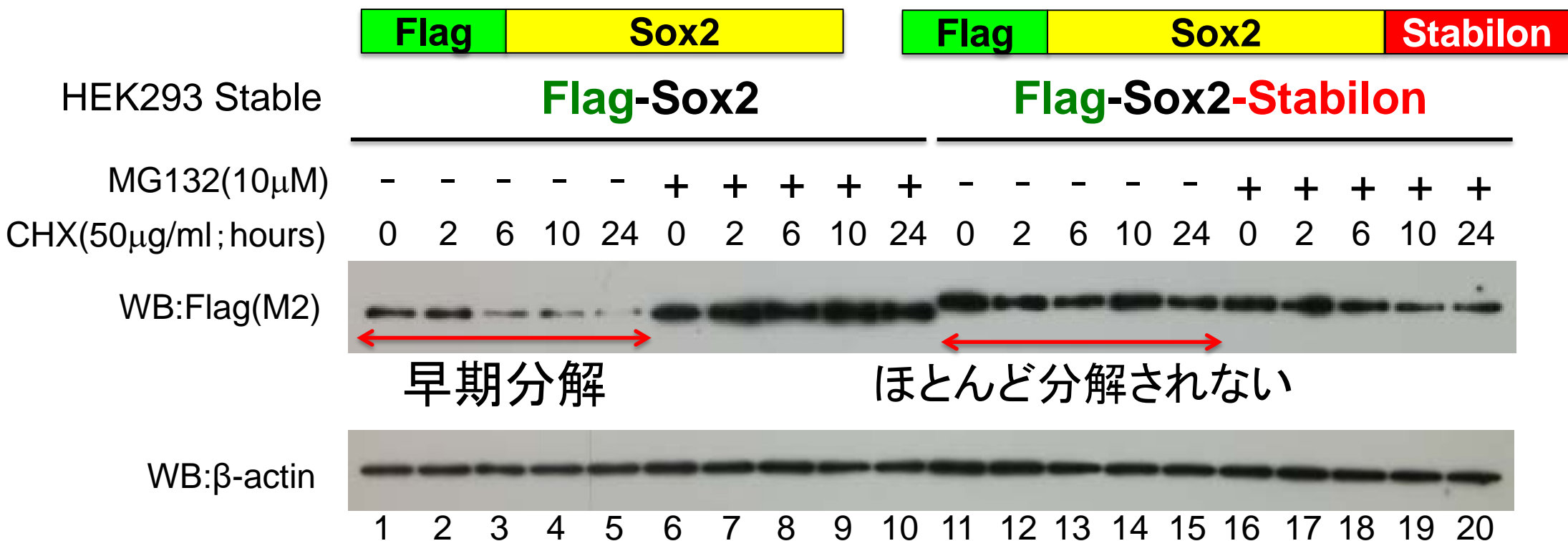


上記コンストラクトをHEK293細胞(ヒト胎児腎由来培養細胞)にトランスフェクトし、24時間後に全抽出液を作製。等量のアプライし左記抗体を用い、ウエスタンブロットで検出



# DP-1スタビロンはプロテアソームによる タンパク質分解を防ぐ

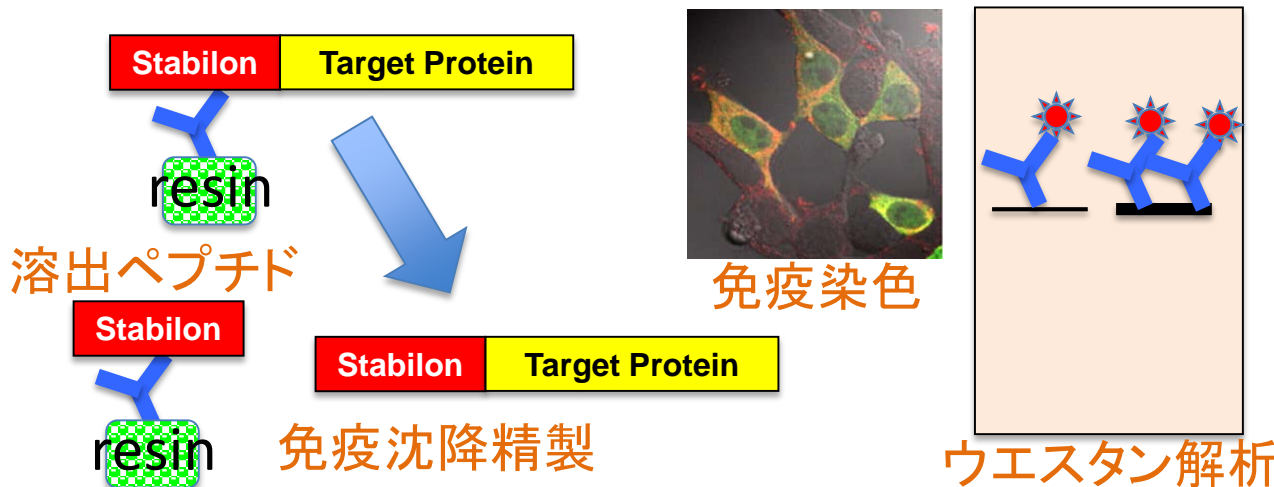
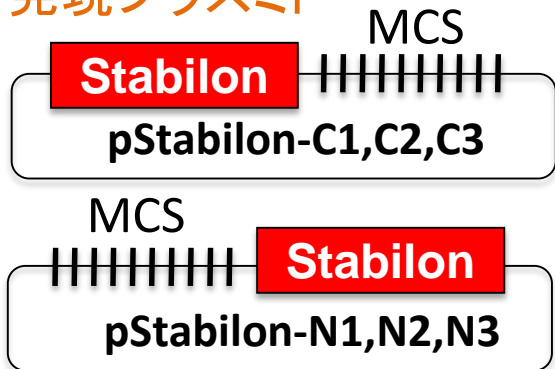
## シクロヘキシミド pulse chase assay



# 想定される用途

(1) 発現プラスミドのタグとして(発現向上・分解耐性・特異的検出 / 精製用)

発現プラスミド

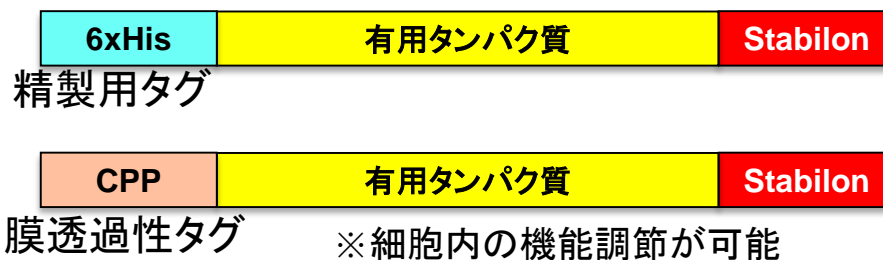


製品リスト

- # 発現プラスミド
- # 検出用抗体 (HRP融合, 蛍光ラベル等)
- # 抗体レジン
- # 溶出ペプチド

(2) 有用タンパク質の大量産生に

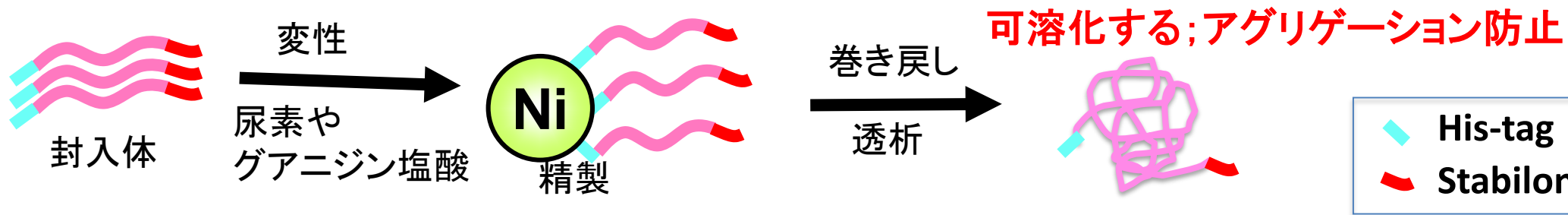
医療用タンパク質  
(ワクチン、バイオ医薬品)  
研究用酵素、生理活性タンパク質、  
基剤、洗剤(酵素等)



CHO細胞、HEK細胞  
植物細胞、昆虫細胞、  
大量産生可能な動植物、  
酵母などで発現

※細胞内の機能調節が可能

(3) 変性状態タンパク質のリフォールディング時の再凝集防止に(大腸菌等で封入体誘導時に)



※ 塩基性タンパク質は透析時再凝集し易いが、スタビロン融合で等電点が低下し(酸性寄りになる)可溶化する。

# 人工配列(多くの生物種の内因性タンパク質に存在しない配列)へ



番号	配列
No.0	<b>EDDEEDDDFNENDEDD</b> (ヒト DP-1 395-410a.a.)

No.1	<b>DFNDNEDEDEFNDNED</b>
No.2	<b>EFNDNDDEEDFNNDNED</b>
No.3	<b>DEEDDEEEFNNDNENEE</b>
No.5	<b>DEEDDEEEDEDEE</b>
No.6	<b>EEDEFNENDEDED</b>
No.7	<b>EEDEEDEDDED</b>
No.8	<b>EFNDNEFNNDNDEEDFNNDNED</b>
No.4	<b>DEEDDEEEFNNDNEDEE</b>
No.9	<b>EFNDNDEEDDEEEFNNDNEDEE</b>
No.10	<b>EFNDNEFNNDNDEEDDEEEFNNDNEDEE</b>

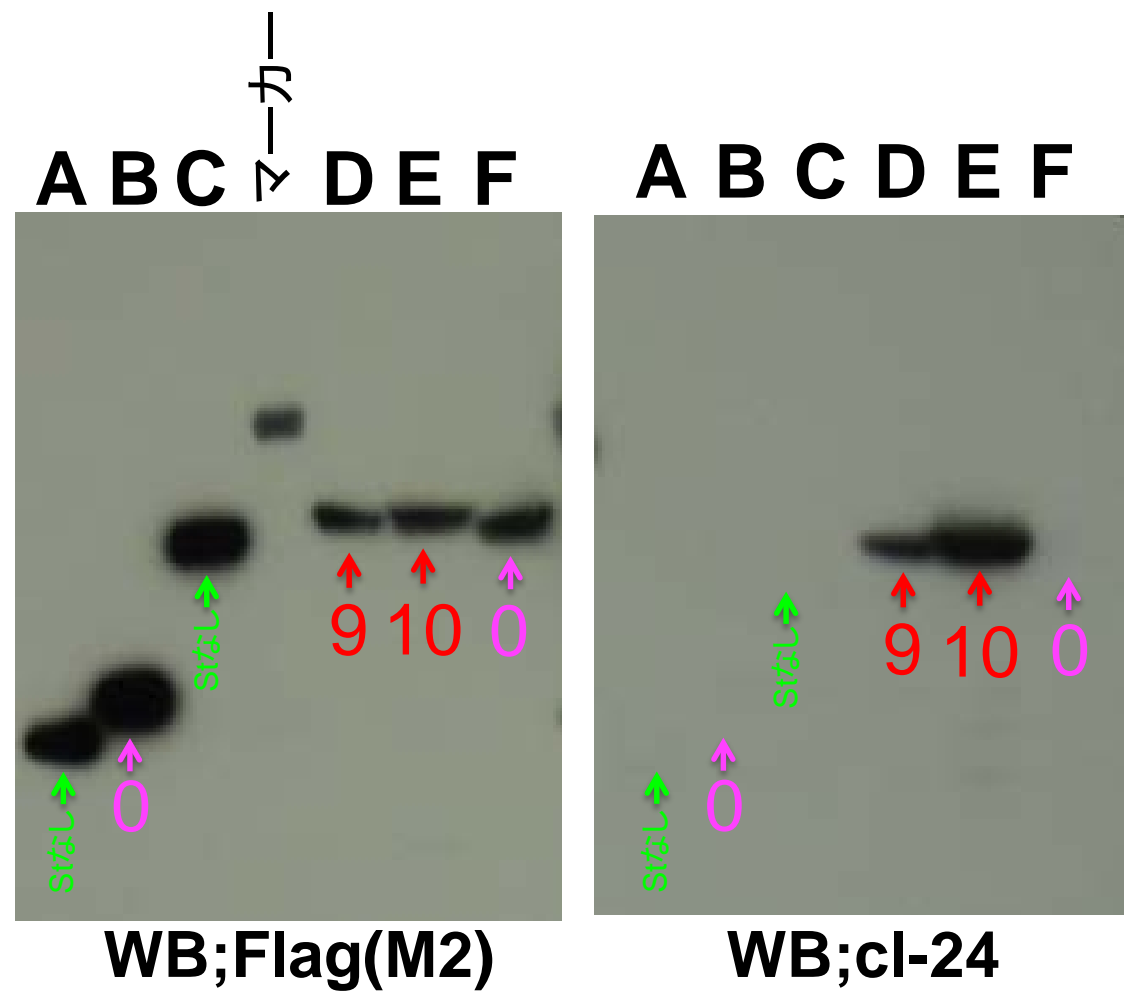
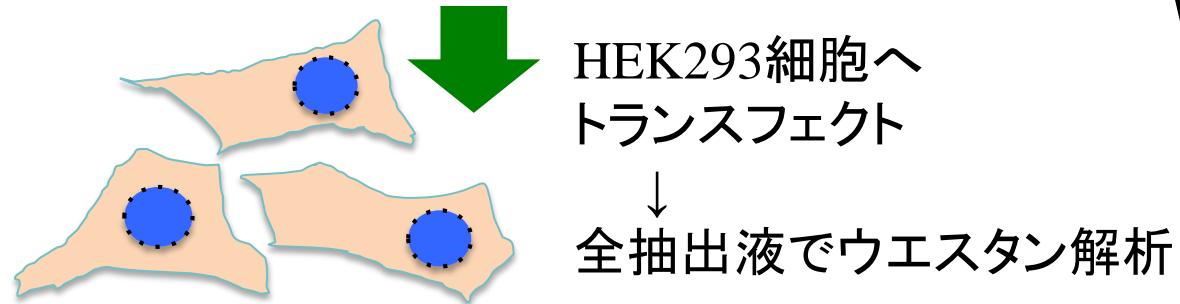
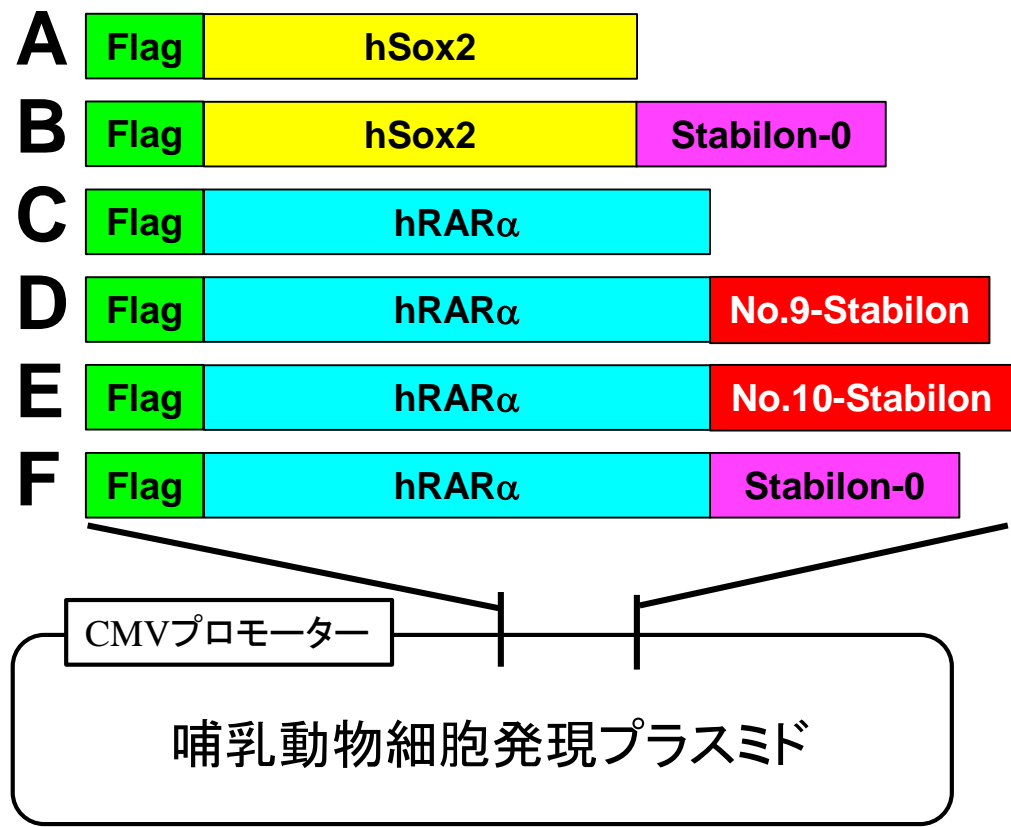
タグ用に設計した新規配列  
(Blastで検索し非存在を確認)  
いくつかのタンパク質のN末、  
C末に融合し、発現向上度を調べたところ、No.4, 9, 10が好成績!  
その中でもNo.9が好成績!

No.4 < No.10 < No.9

← No.9ペプチドを抗原に  
モノクローナル抗体作製

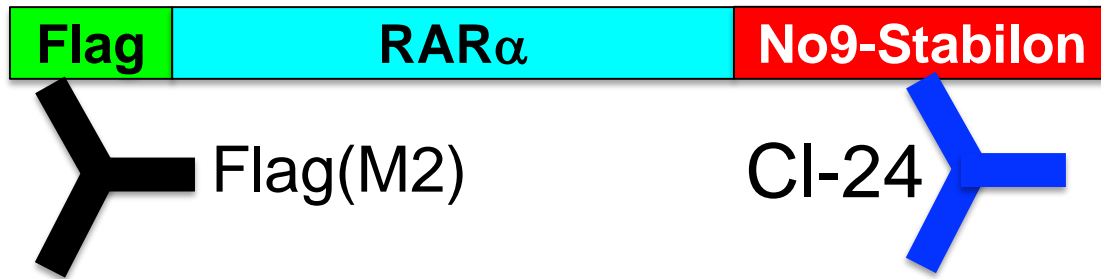
E;グルタミン酸、D;アスパラギン酸、F;フェニルアラニン、N;アスパラギン

# ELISA法でスクリーニングしたモノクローナル抗体のうちcl-24は全抽出液から単一バンドで検出可能な抗体だった

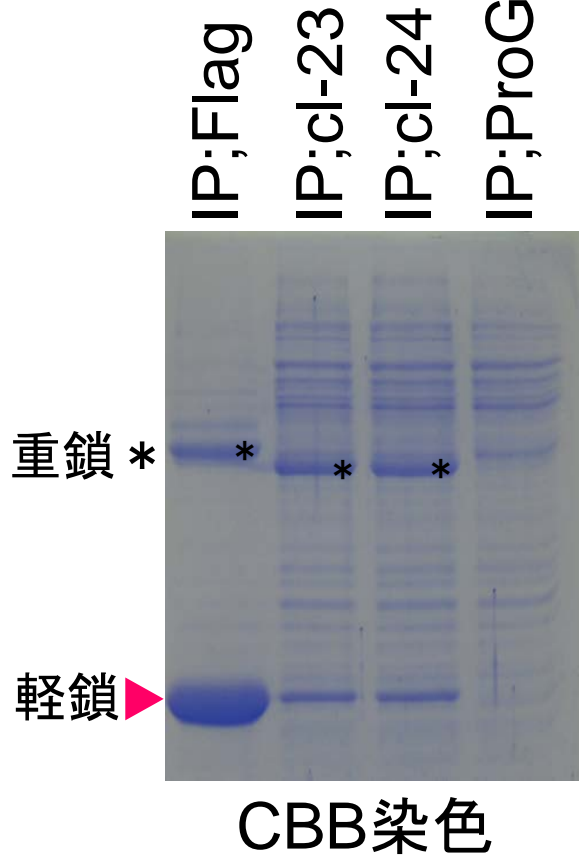


※No.10-StabilonはNo.9-Stabilonと同じ配列を含んでいます

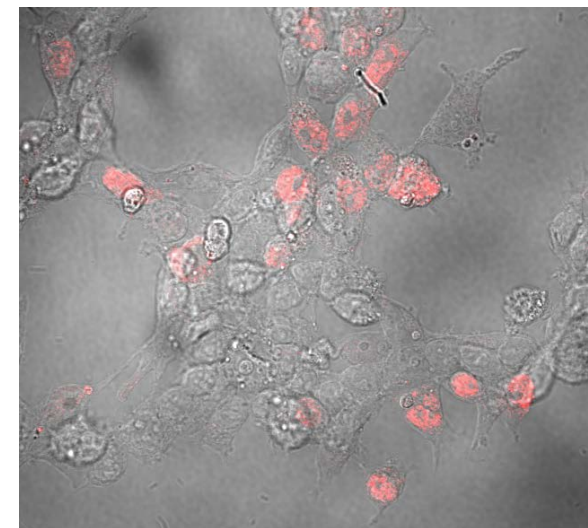
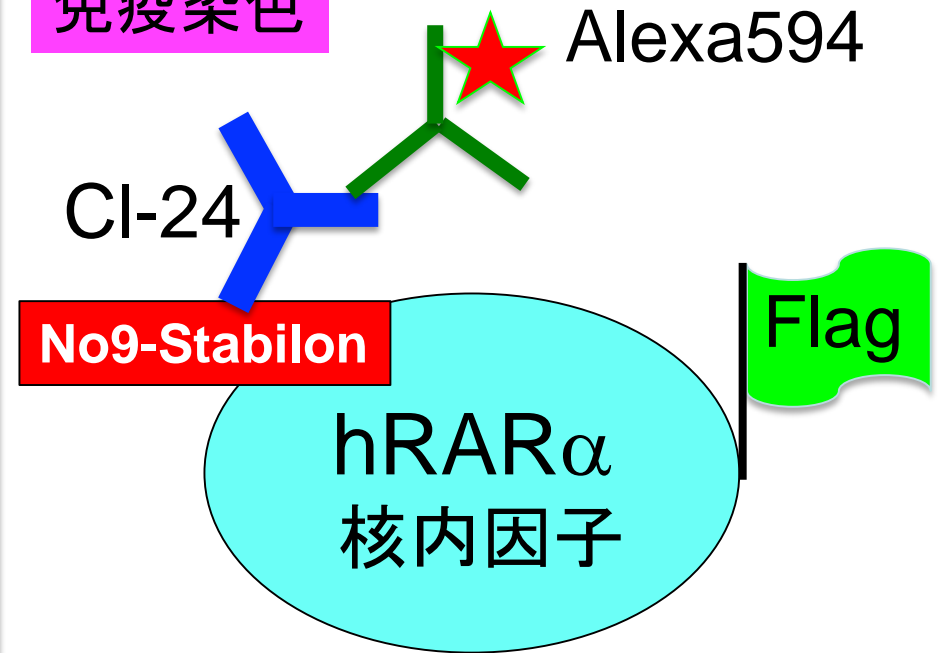
## 免疫沈降精製



※cl-23はcl-24と同じ抗体です



## 免疫染色



Alexa594検出と微分干渉の重ね合わせ



# モノクローナル抗体cl-24は植物やカイコタンパク質との交差性が低い



トマト(果実)



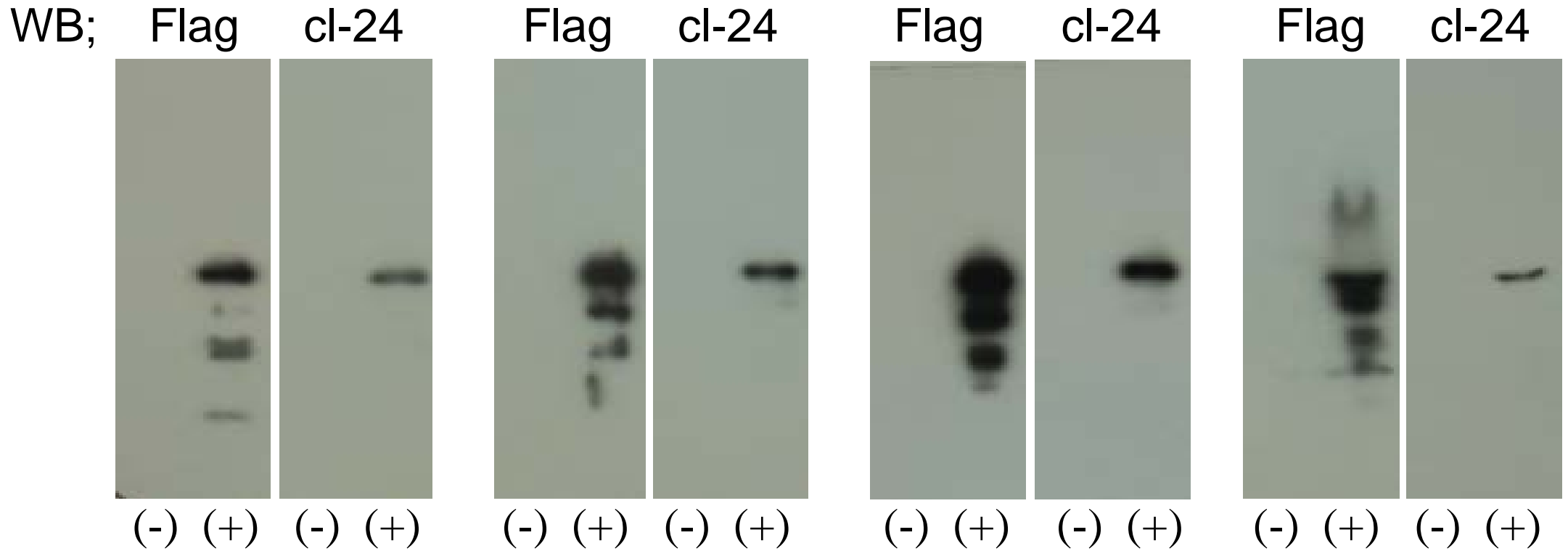
シャインマスカット(果実)



コセンダングサ(葉)



カイコ(成虫体液)



(-)は各抽出液総タンパク質量5 $\mu$ g、(+)には各抽出液に加え下記の精製組換え体20ngがアプライされている





# 新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術にはなかった、タンパク質の安定化、分解耐性による発現向上にはじめて成功した。
- 極めて特異的な検出および精製が可能なモノクローナル抗体の開発に成功した。
- 本技術の適用により、有用タンパク質の増産が期待できるため、生産コストが大幅に削減されることが期待される。



# 想定される用途

- 本技術の特徴を生かすためには、種々の生物種（動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、酵母など）の発現系のタグに適用することで、高機能有用タンパク質の大量産生系開発へのメリットが大きいと考えられる。
- ワクチンやバイオ医薬品などの高度修飾タンパク質の大量産生、ゲノム編集や遺伝子治療時の長寿命タンパク質の開発に期待される。
- 上記以外に、酸性アミノ酸が多い点に着目すると、大腸菌発現系での可溶性発現や、封入体タンパク質の尿素・グアニジン塩酸変性可溶化後の透析による巻き戻し時の可溶化度向上にも期待される。



# 実用化に向けた課題

- 現在、スタビロンモチーフとその抗体についてはウエスタンブロットや免疫沈降、免疫染色での特異的検出が可能なところまで開発済み。エピトープ部位も確認済みである。しかし、溶出ペプチドの開発が未解決である。
- 今後、溶出ペプチドについて設計を行い(エピトープのみや、その繰り返しなど)、実験データを取得し、免疫沈降精製に適用していく場合の条件設定を行っていく。
- 実用化に向けて、植物や昆虫細胞、酵母まで応用可能か(安定化能を発揮するか)を検討する必要あり。

# 企業への期待

- 未解決のカイコ個体内での安定化に関しては、遺伝子組み換えカイコ技術により克服できると考えている。
- 未解決の植物細胞での安定化については、効率のよい遺伝子導入法やゲノム編集、膜透過性組換え体タンパク質技術により克服できると考えている。
- タグ、モノクローナル抗体（検出、精製用）の技術を持つ、企業との共同研究を希望。
- また、ゲノム編集や発現系で組換え体タンパク質を開発中の企業、バイオ医薬品分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

# 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 抗体又はその抗原結合フラグメント、抗体又はその抗原結合フラグメントをコードする核酸、ベクター、形質転換体、及び、スタビロン改変体検出キット
- 出願番号 : 特願2020-150003
- 出願人 : 日本大学
- 発明者 : 舩廣善和



# お問い合わせ先

**日本大学 産官学連携知財センター (NUBIC)**

**日本大学 研究推進部 知財課**

**TEL : 03-5275-8139**

**FAX : 03-5275-8328**

**e-mail : nubic@nihon-u.ac.jp**