

膜タンパク質研究を加速する モノクローナル抗体

千葉大学大学院 理学研究院
特任准教授 小笠原 諭

2022年10月20日

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 膜タンパク質のC末端に付加したHis-tagに対する高親和性モノクローナル抗体 (cHis8)
- 出願番号 : 特願2022-091863
- 出願人 : 千葉大学
- 発明者 : 小笠原 諭、村田武士

本技術に関する知的財産権

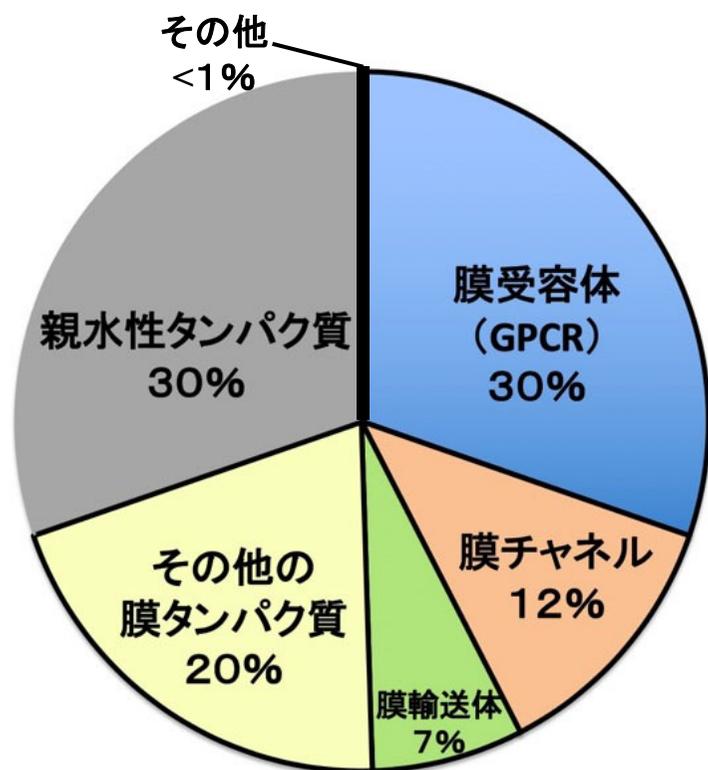
- 発明の名称 : ナノディスクに対する高親和性抗MSPモノクローナル抗体 (biND5)
- 出願番号 : 特願2022-091842
- 出願人 : 千葉大学
- 発明者 : 中川 史、小笠原 諭、村田武士

抗MSPモノクローナル抗体＝ナノディスク抗体

膜タンパク質研究の重要性

膜タンパク質は、ゲノムにコードされる全タンパク質の30%を占め、物質輸送、シグナル伝達、生体エネルギー産生・変換などの細胞機能において重要な役割を果たしている。

このため、創薬標的分子の約7割が膜タンパク質であると見積もられ、各種医薬品や農薬の開発に重要なターゲットである。



↓
膜タンパク質の形・働きが理解できれば創薬研究が進展する。

↓
しかし、ヒト膜タンパク質構造の9割以上は未解明！！

精製膜タンパク質の必要性



立体構造解析
X線結晶構造解析
クライオ電子顕微鏡



機能解析
ビアコア、ITC、
酵素活性測定



抗体作製



あらゆる研究において、狭雑のない **高純度な精製標品** が必要

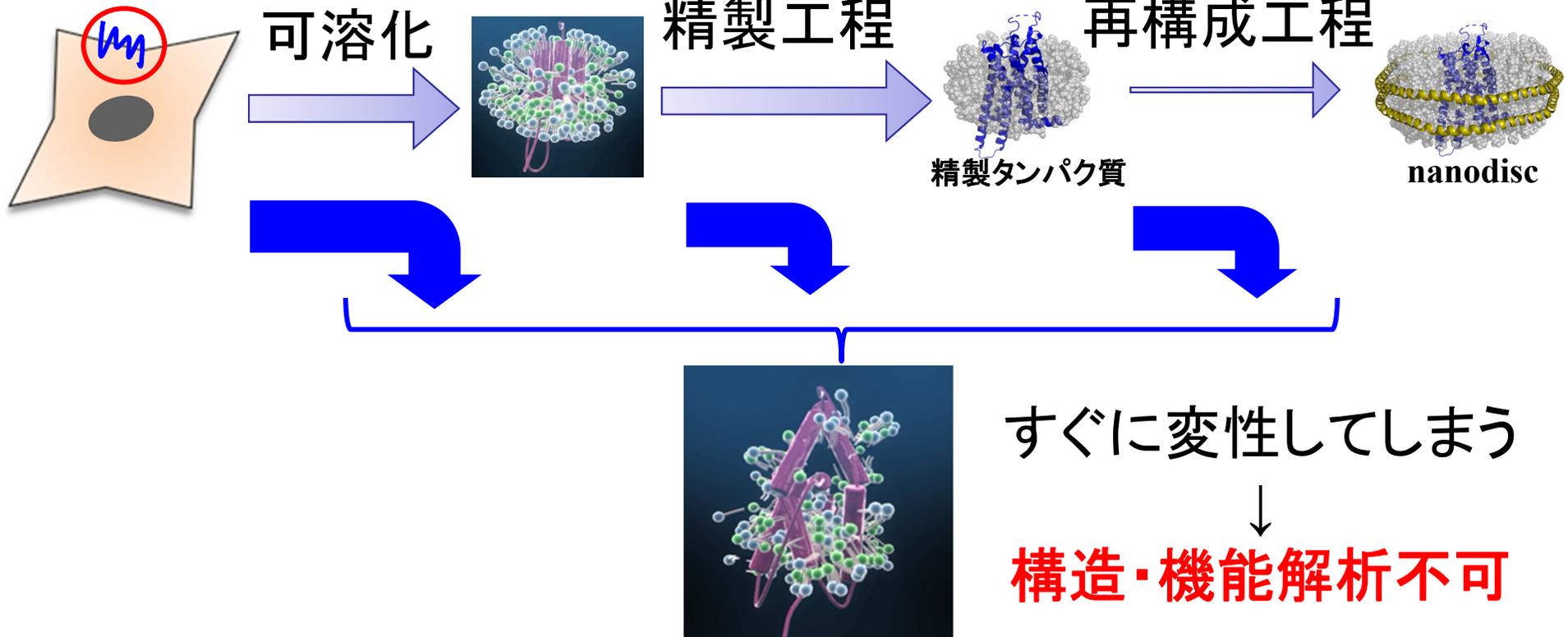
膜タンパク質研究の問題点

【膜タンパク質の欠点】

耐熱性が低く、すぐに変性する。

大量発現が困難。

工程が煩雑で再現性に乏しい精製効率。





膜タンパク質研究センター

2021年10月設立!!



武士
授

官

QST
高エネ研
理研、JAXA

学

千葉大学

共同研究者(千葉大内外)

産

製薬企業
食品企業
試薬メーカー

標的となる膜タンパク質



アカデミア創薬の基盤構築のために

- (1) 基盤技術(Key1-5)の高度化
- (2-5) 新規技術(Key 6-9)を導入

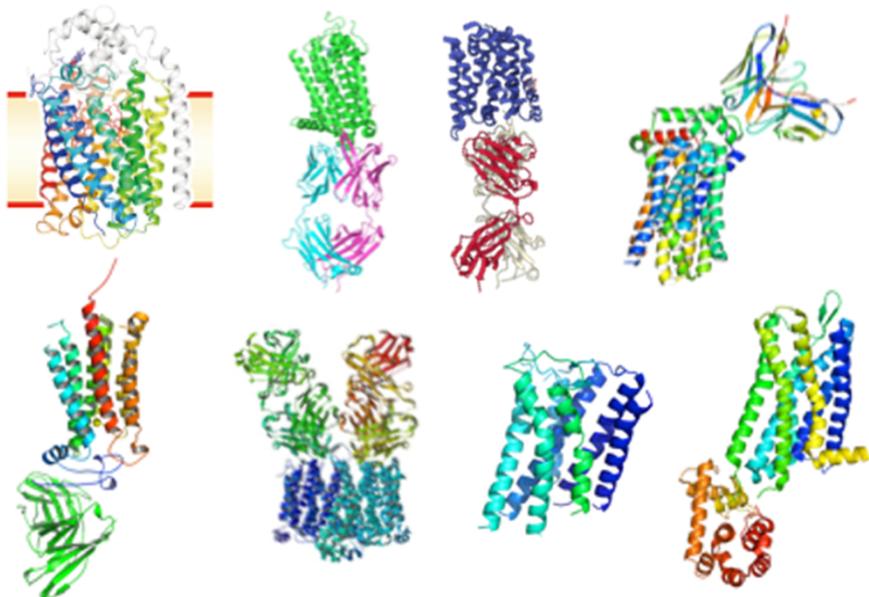
- 薬剤候補の創出
- 抗体医薬候補の創出
- 薬効を評価しPOCを得る!

膜タンパク質研究センターが 開発してきた基盤技術



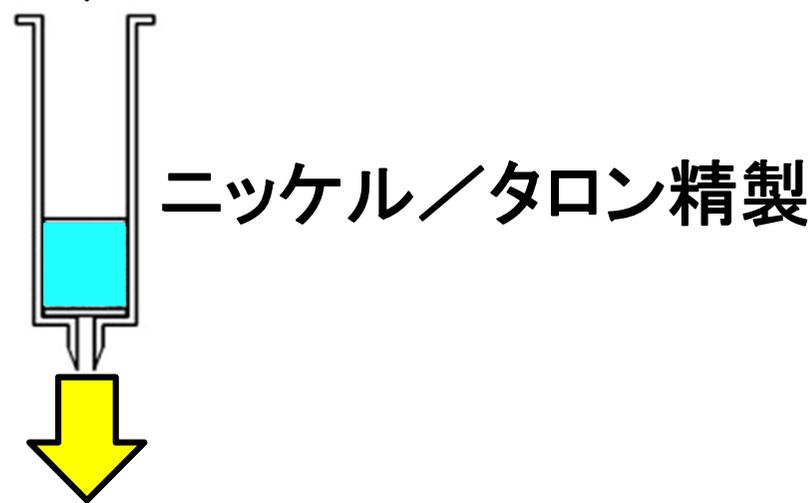
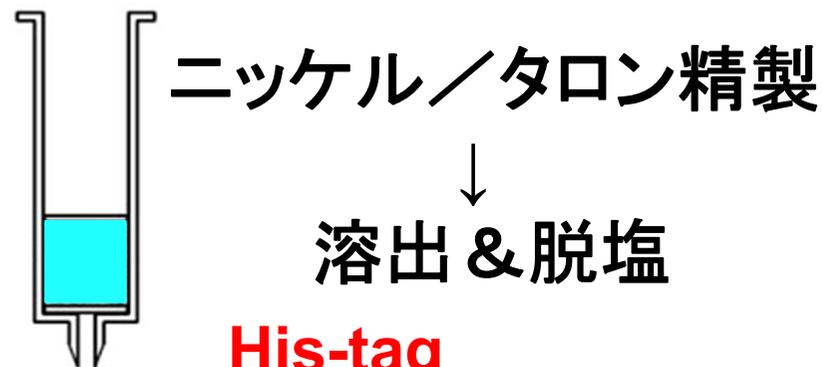
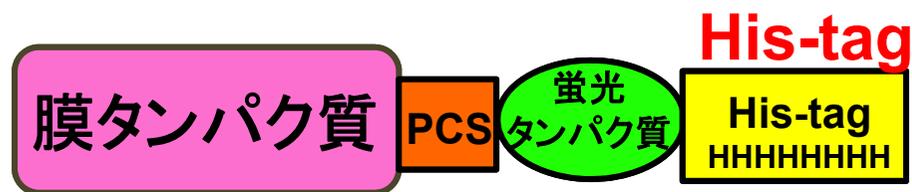
Key 1	理論を用いた耐熱化変異体作製技術	特許第6359656号
Key 2	抗体を用いたオンカラム精製技術	特願2022-091863
Key 3	結合化合物スクリーニング技術	特願2022-091842
Key 4	機能性抗体の作製技術	特許第5526448号
Key 5	膜タンパク質の立体構造解析技術	

本技術を用いて立体構造が解明された創薬標的膜タンパク質



緑膿菌由来NOR (Science 2011); ヒト由来アデニンA2a受容体 (Nature 2012); 細菌由来RCE1 (Nature 2013); ラット由来Glut5 (Nature 2015); ヒト由来アディポネクチン受容体 (Nature 2015); ヒト由来BandIII (Science 2015); ヒト由来プロスタノイドEP4受容体 (NCB 2018); ヒト由来アセチルコリンM2受容体 (NCB 2019); ヒト由来hERG (Structure 2021); ミトコンドリアSAM複合体 (Nature 2021)

一般的な膜タンパク質の精製方法



PCS: Protease cleavage site

HRV-3C: LEVLFQ↓GPを認識して切断

TEV : ENLYFQ↓Gを認識して切断

2回のカラム操作の煩雑さ
脱塩(濃縮 or 透析)による変性

従来技術とその問題点

既に実用化されているもの: His-tagの場合

・ニッケルやコバルトによる金属アフィニティ精製法
(問題点)

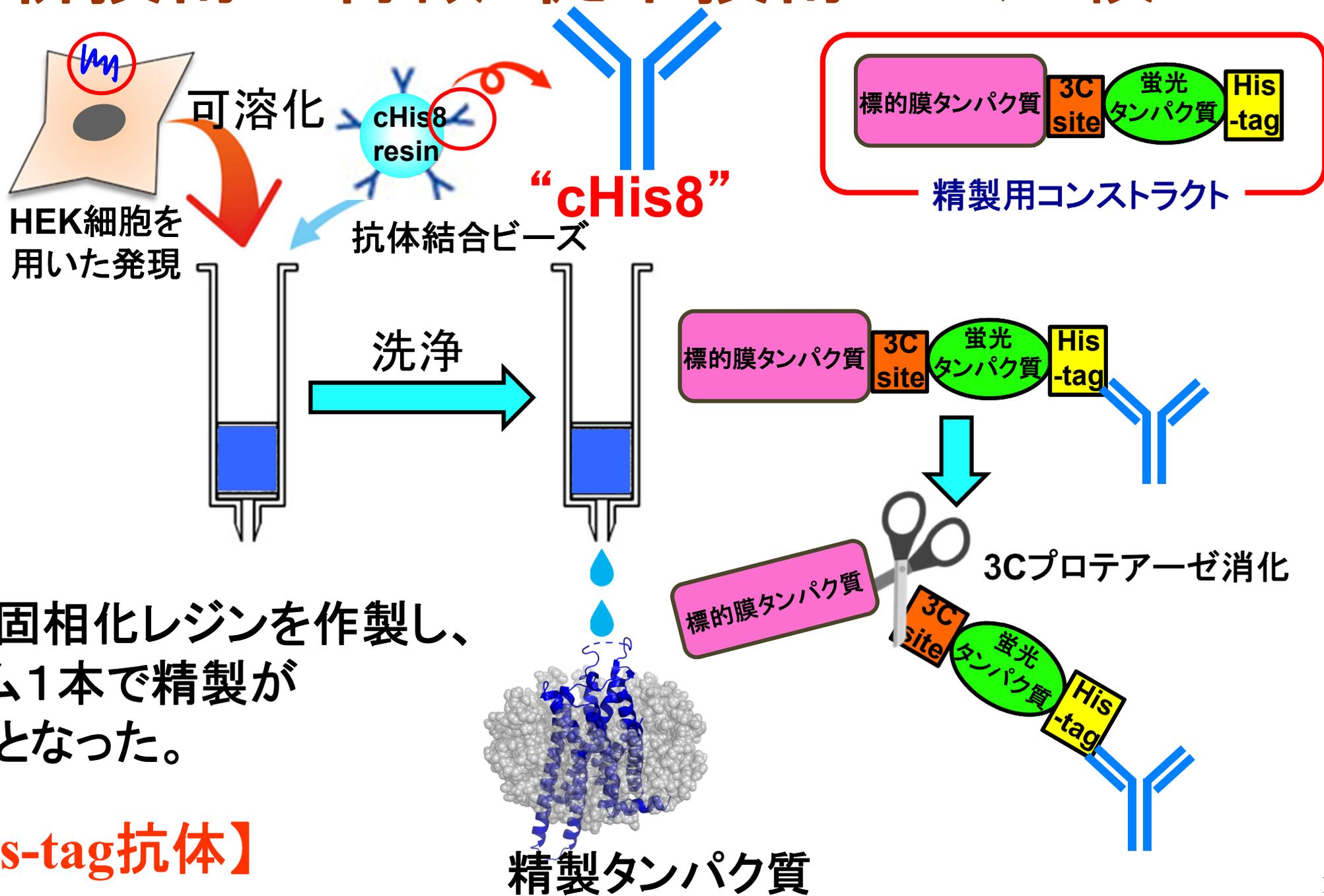
- キレート作用により、タンパク質の変性が起こる。
- 非特異的タンパク質の結合による精製度の低下
- 溶出効率の悪さ

既に実用化されているもの: 他のペプチドタグの場合

・抗ペプチドタグ抗体によるアフィニティ精製法
(問題点)

- 抗ペプチドタグ抗体(溶出ペプチド)のコスト
- 発現コンストラクトへのペプチドタグ挿入

新技術の特徴・従来技術との比較1



抗体固相化レジンを作製し、
カラム1本で精製が
可能となった。

【His-tag抗体】

新技術の特徴・従来技術との比較2

- 従来技術の問題点であった、精製度を改善することに成功した。
- 金属アフィニティ精製では変性するタンパク質についても、精製することが可能となった。
- 本技術では、酸溶出で洗浄、中和して再生し、再利用ができる。一方、金属アフィニティの再生は重金属を剥離、再配位を必要とするため、手間がかかり、廃液の問題も生じる。

想定される用途

- 構造解析、機能解析を目的とした高純度精製。
- 適切なHis-tagの融合で、膜タンパク質に限らず、精製可能。
- タンパク質の精製だけでなく、免疫沈降実験などにも応用可能。
- 本技術の特徴を生かすために、精製キットというパッケージ化！
「精製の初心者でも気軽にできる！」という触れ込みでライトユーザーへのアピールがしたい。
- 上記キット以外に、既存の発現用ベクターやプロテアーゼ、MSPを関連製品として付帯できることも期待される。

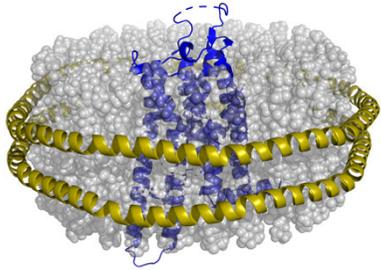
実用化に向けた課題

- 現在、cHis8のレジン化、および一般的な膜タンパク質のコンストラクトを用いた発現系から精製が可能なところまで実施・確認済み。
- 今後、His-tagの長さ、位置についてより詳細な実験データを取得し、精製可能な適用範囲について条件設定を行っていく。
- 実用化に向けて、ユーザーフレンドリーな精製カラムなどを確立する必要もあり。

企業への期待

- タンパク質精製に興味があり、プラスチック加工技術を持つ、企業との共同研究を希望。
- nanodisc作製用の精製カラムについては、プラスチック加工技術により克服できると考えている。そのアイデアについてはいくつか考案済みである。

nanodiscを用いた膜タンパク質研究



< nanodiscの利点 >

- ・脂質とベルトタンパク質(MSP)に巻かれた状態が、生体内の脂質二重膜を模倣した環境に似ているため、膜タンパク質として安定して存在できる。
- ・界面活性剤なしの環境で扱うことができる。

< nanodiscの研究用途 >

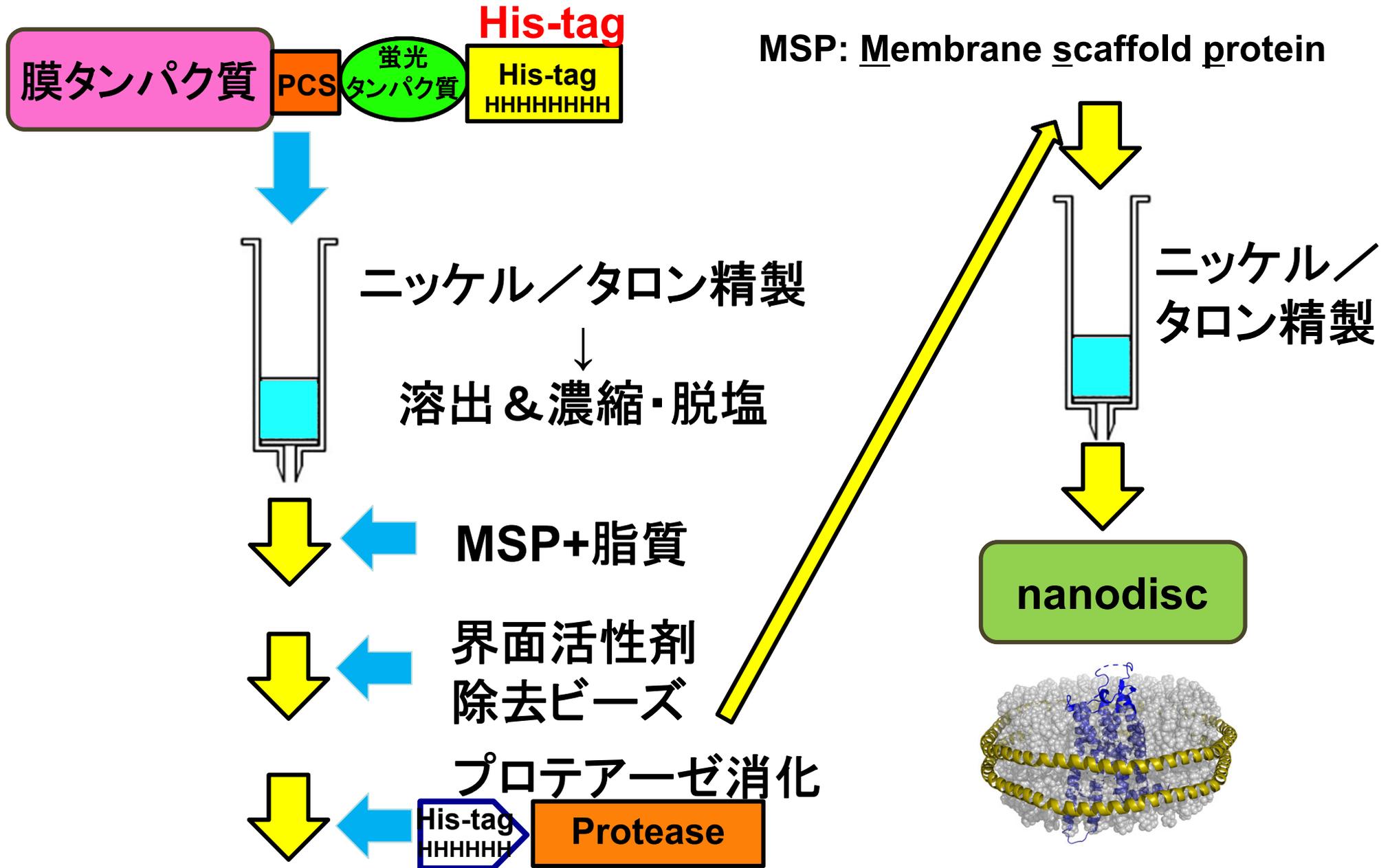
- ・立体構造解析(クライオ電子顕微鏡解析)
- ・分子間相互作用解析
標的分子と化合物(薬剤)・抗体などとの結合の強さを測る。



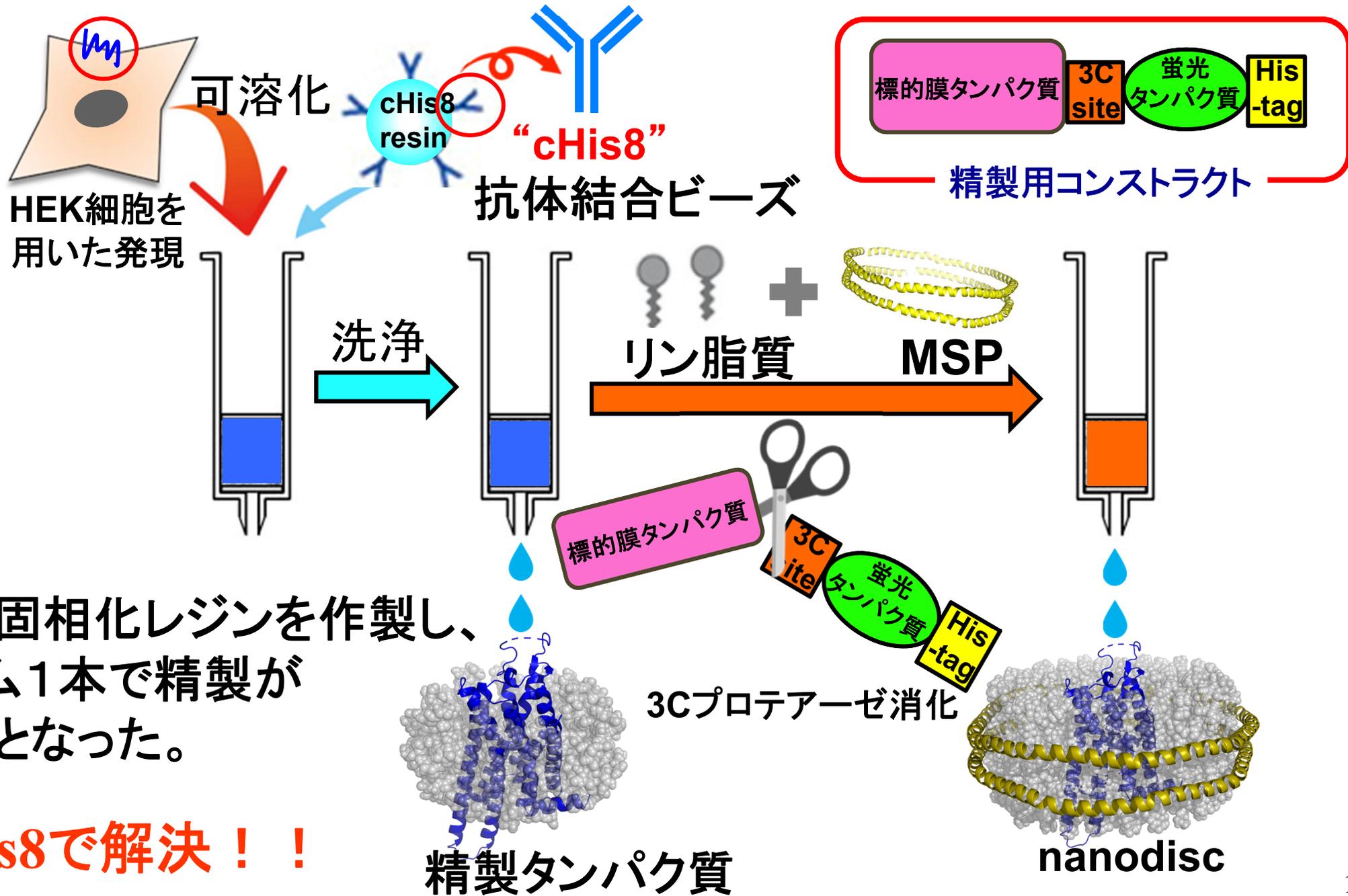
このような測定デバイス(CM5 chip; Cytiva社)にnanodiscを固定する必要がある。

分子間相互作用解析装置
Biacore (Cytiva社)

一般的なnanodiscの再構成方法



新技術の特徴・従来技術との比較



抗体固相化レジンを作製し、
カラム1本で精製が
可能となった。

cHis8で解決！！

従来技術とその問題点

分子間相互作用解析装置を用いた測定におけるNanodisc固定化法

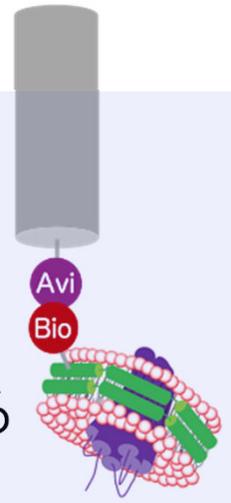
Ni-NTAで固定化

バイオセンサーが高価
再生が困難
親和性が低い



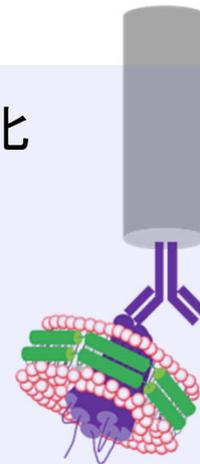
ビオチン-アビジンで固定化

バイオセンサーが高価
再生が困難
サンプル準備に工数がかかる
(ビオチン化の効率など)



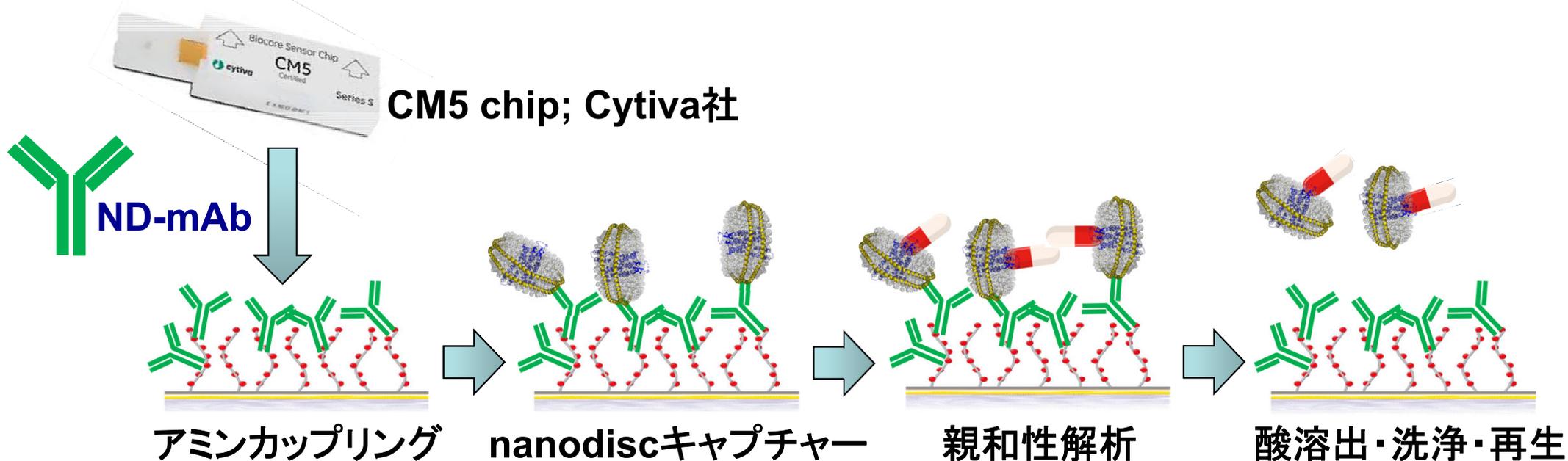
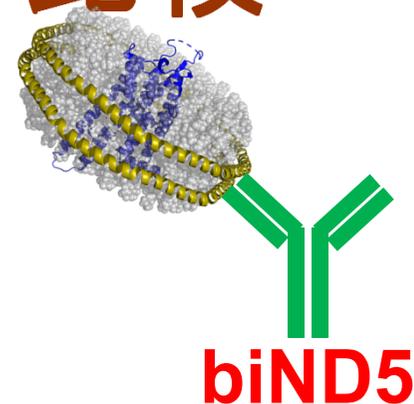
抗膜タンパク質抗体で固定化

バイオセンサーが安価
再生が容易
特異的抗体作製の煩雑さと
汎用性の低さ



新技術の特徴・従来技術との比較

- nanodiscに対する市販のモノクローナル抗体は2022年9月現在でないので、新規の抗体である。
- nanodiscに対して高親和性、特異性を有する。
- 本技術では、測定デバイスへの安定的な固相化、酸溶出で洗浄、中和して再生し、再利用ができることも確認している。



想定される用途

- 本技術の特徴は、分子間相互作用解析装置の検出デバイスに適用することで、分子種に捉われず、「nanodiscが作製できれば測定ができる」というメリットが生まれることである。
- この技術を用いた手法が確立すると、ハイスループットな化合物スクリーニングへ展開することが可能である。
- 上記以外に、タンパク質の配向性(向き)を揃える必要性のある実験(1分子測定、高感度顕微鏡解析)への応用が期待される。
- これらは「His-tag抗体を用いたnanodisc再構成方法」と連動させることができる。

実用化に向けた課題

- 現在、測定デバイスへの最適的な固相化量、酸溶出など、条件検討を行なっている。
- 今後、様々な膜タンパク質のnanodiscについて実験データを取得し、条件設定を行っていく。

企業への期待

- 分子間相互作用解析装置で使用する検出デバイスの共同開発。
- 化合物ライブラリーを保有する製薬企業等、試薬メーカー、アカデミアが、本技術を導入してスクリーニング実験を行い、有用な実績が得られれば、使用したい研究者が増えると思われる。

認知度アップへの試み

AMED-BINDS Phase II に採択

1-3 高難度タンパク質・複合体試料等の生産による支援と高度化

補助事業課題名	補助事業代表者名	代表機関名	役職
抗体を用いた膜タンパク質構造研究支援	岩田 想	京都大学	教授
高難度糖タンパク質生産のための糖鎖細胞工学による支援と立体構造認識抗体作製の高度化	加藤 幸成	東北大学	教授
エピジェネティクスの基盤原理解明と創薬のためのヒストンおよび再構成クロマチンの生産	胡桃坂 仁志	東京大学	教授
コムギ無細胞系とAirIDを基盤とした複合体生産・探索・解析技術の支援と高度化	澤崎 達也	愛媛大学	教授
創薬ターゲットおよびバイオ医薬候補品の高品質生産の支援	高木 淳一	大阪大学	教授
高難度膜タンパク質等の調製と構造解析可能なグリッド調製の支援	湊木 理	東京大学	教授
疾病関連膜タンパク質の生産および構造解析支援	村田 武士	千葉大学	教授

本案件を用いた技術支援を実施(少量の無償サンプル提供など)

お問い合わせ先

千葉大学
学術研究・イノベーション推進機構
プロジェクト推進部門

TEL 043-290-3048

FAX 043-290-3519

E-MAIL ccrcu@faculty.chiba-u.jp