

新規タグ技術を中心とした膜蛋白質・細胞外蛋白質の高品質生産と精製システムの開発



代表機関：大阪大学蛋白質研究所

代表研究者：高木淳一

背景

- ヒトのタンパク質を研究するには、ヒトなど哺乳動物の細胞につくらせるほうがよい
- しかし、哺乳動物細胞にタンパク質をつくらせる場合、タンパク質を持続的に、たくさん生産する細胞クローンを選別するのが難しい
- タンパク質を精製することは、結晶化させるにも、機能を研究するにも重要

成果

- 新しいタグ（TARGET タグ）を開発し、これを用いてタンパク質をたくさん生産する動物細胞クローンの選別に成功
- 第2のタグとして、目的タンパク質から簡単に切り離せる eTEV タグを開発
- 2つのタグの組み合わせで、どんなタンパク質でも簡単に検出・定量・精製が可能に



TARGETタグペプチド（棒模型で示す）と抗体の複合体の構造。
提供：高木淳一

タンパク質の構造と機能を解析するための試料は、大腸菌につくらせることが多いのですが、ヒトのタンパク質を大腸菌につくらせると、構造や機能が本来とは違ってしまうことがあります。このため、医療や創薬へ応用を考えれば、ヒトのタンパク質はヒトなど哺乳動物の細胞につくらせるほうがよいのです。しかし、哺乳動物細胞を使う場合、目的のタンパク質をたくさんつく細胞を選別するのがむずかしく、そのことが大きなネックとなっています。

一方、私たちは、目的のタンパク質にタグ（荷札）をつけておき、このタグを見分

けて結合する抗体を用いることで、タンパク質を精製する技術を開発してきました。抗体を固定しておいて、さまざまなタンパク質の入った溶液を流すと、タグのついたタンパク質だけを抗体が捕まえます。そのタンパク質を、あとから別の液体で流し出すのです。すでに、繰り返し使えてコストも安いシステムを完成させています。

そこで、この技術を活用して、細胞の培養液の上清（上澄み）に目的のタンパク質が含まれているかどうかを判定し、目的のタンパク質をたくさんつく細胞を簡単に選別する方法を開発しました。この技術の

ポイントは、タグと抗体がきちんと結合するようにすることです。そのために、私たちは、抗体が認識するタグのアミノ酸の並び方の特徴を突き止め、それをもとに、抗体との結合に優れたタグを設計し、TARGETタグと名づけました。実際に、このタグを使って、「医薬B3」グループのターゲットであるNPP2をつくる哺乳動物細胞を選別することができ、「医薬B4」グループとの連携では、sema6Aとプレキシニンについて、細胞選別から結晶化、構造決定まで成功しました。

また、第2のタグとして、eTEVというタグを用いる精製システムも開発しました。こちらの場合、eTEVをきちんと見分ける抗体をつくるのがポイントでした。eTEVタグは、ある酵素を使うと、目的のタンパク質から簡単に切り離すことができます。この特徴を生かして、eTEVタグとTARGETタグをタンデムにつなぎ、どんなタンパク質でも簡単に検出・定量・精製、さらにはタグの除去ができる「ダブルタグ」システムを構築しました。

抗体を用いたタグシステムのほかに、膜タンパク質や微量の可溶性タンパク質に対し、未精製状態でも蛍光ラベルができるABZipタグシステムも開発しています。

このように、私たちは「タグ」を利用してタンパク質を見分ける技術を開発することで、解析が困難なタンパク質の研究に貢献しています。

