

試験管内タンパク質合成系による新規創薬基盤の構築

東京工業大学地球生命研究所

車 愈 激

1. はじめに

緒言： 抗体医薬は、従来の低分子医薬とは異なり、身体が持つ免疫システムを利用し、ガン細胞など特定の細胞を狙い打ちする画期的な医薬品である。本研究の狙いは、抗体作製に関わる主要プロセスを全てin vitroで行い、ハイスループット化によるシステムティックな生産・解析基盤を構築することである。

目的： 重要な創薬ターゲットである受容体膜タンパク質、特にGPCR型タンパク質の試験管内合成と、リガンド分子の探索、さらに受容体特異的結合ペプチドの高効率スクリーニングを可能とする、新しい試験管内選択法による創薬研究基盤の構築を目的とする。受容体タンパク質は、生細胞を用いた系による発現・精製が一般的に困難な為、試験管内タンパク質合成系を用いるのがもっとも合理的である。これに、人工的に調製した脂質膜を加えることで、天然型と同じ膜配向性を維持した受容体タンパク質の合成が可能である。さらに、同系を用いて、合成した受容体に特異的に結合するペプチド鎖をランダムアミノ酸配列からスクリーニングすることが可能である。つまり本計画では、ターゲットとなる受容体の調製から、それらに結合する抗体配列の決定までを、全て試験管内で行うことを目的としている。これにより、ハイスループット化による大規模スクリーニングへの応用に直結するだけでなく、受容体タンパク質への部位特異的変異体導入を容易にし、ターゲット受容体自体の生化学的解析にも応用することが可能である。

背景： 細胞膜に存在する各種受容体膜タンパク質は、一般に生体を用いた系では発現・精製が困難であり、時間とコストがかかることが問題とされている。ターゲット受容体タンパク質が入手できなければそれに特異的に結合する抗体を作製することができないため、受容体膜タンパク質を効率良く入手できる基盤技術の開発が求められてきた。これに対し本研究では、試験管内タンパク質合成系を膜タンパク質合成に特化した系に改良し、これによりターゲットとなるGPCR型の受容体タンパク質の合成を行う。また、同合成系によりランダム配列から抗体候補となる選別しそのアミノ酸配列を決定することも行う。これらを組み合わせることで、生体を全く使用せずに抗体のアミノ酸配列が入手可能な、新規創薬基盤技術の開発を目指す。

序論： 試験管内タンパク質合成系は、転写・翻訳反応に関わる全酵素と基質・エネルギーを1試験管内に混合したものである。この反応液に目的のタンパク質の遺伝子をコードした鋳型DNAを投入することで、数時間のうちにタンパク質を最大1mg/mLほど合成することが可能である。また系内に人工膜などの追加因子を加えることで、活性を維持した膜タンパク質も合成することが可能である。さらに、ランダムな塩基配列から成る鋳型DNA（またはmRNA）を投入した場合、ランダムアミノ酸配列を持つペプチドが合成され、リボソームディスプレイ法やmRNAディスプレイ法により目的の受容体に結合するペプチドをスクリーニングすることが可能である。これらの試験管内合成系を基盤とした手法は、自動化やハイスループット化と相性が良いため、システムティックに抗原・抗体を作製するための技術として期待が持てる。

2. 方法

2.1 Nanodiscの調製

Nanodiscの構成因子であるmembrane scaffold protein 1 (MSP1)は、アフィニティークロマトグラフィーやゲルろ過クロマトグラフィーを行い精製した。これを、リン脂質 (DMPC) と界面活性剤に混合した後、BioBeadsによって界面活性剤濃度を低下させることで、Nanodiscを自己集合的に形成させた。最後に再びゲル濾過カラムを通すことでFreeのリン脂質を除き、純度の高いNanodiscを入手した。

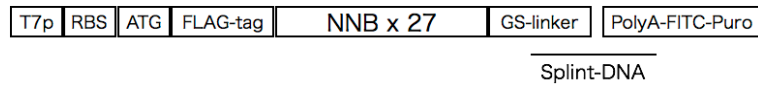
2.2 試験管内タンパク質合成系によるGPCR型膜タンパク質の合成

試験管タンパク質合成系は、GeneFrontier社のPUREflex2.0を購入し使用した。PUREflexはSol. I (Buffer)、Sol. II (酵素類)、Sol. III (リボソーム) から構成されており、これに鋳型DNAとddH₂Oを混合することで反応液を調製する。今回、モデル受容体膜タンパク質として*Halobacterium salinarum*由来のbacteriorhodopsin (bR) を合成した。bRはC末端側にHAtagが追加されるよう、PCRにより鋳型DNAを調製した。反応液中、ddH₂Oのスペースを用いて、bRの補因子であるall trans-retinalと、bRの局在場所であるNanodiscを投入した。Nanodiscはリン脂質をディスク上に束ねたものであり、1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) とバンドの役割をするmembrane scaffold protein 1 (MSP1) (HisTag付き) から構成される人工膜である。タンパク質合成反応は37°Cで6時間行った。反応後のサンプルはNiNTAをチャージしたマグネットビーズで処理することで、Nanodiscを反応液中から単離する。単離

したNanodiscにはbRを含んだものと含んでいないもの2種類があるため、さらにanti-HAtag抗体をチャージしたマグネットビーズで処理することで、bRを含んだNanodiscのみを単離した。これを続く抗体配列スクリーニングのための抗原とした。

2.3 ランダム配列を持つライブラリーの作成

27アミノ酸のランダム配列を合成するためNNB (N:A/G/C/T, B:G/T/C) の繰り返し配列を持つ下記のコンストラクトをデザインした。これをin vitro転写し、Splint-DNAを用いて転写産物にPolyA-FITC-Puroをligationした。これをmRNAディスプレイ用の鋳型mRNAとして使用した。

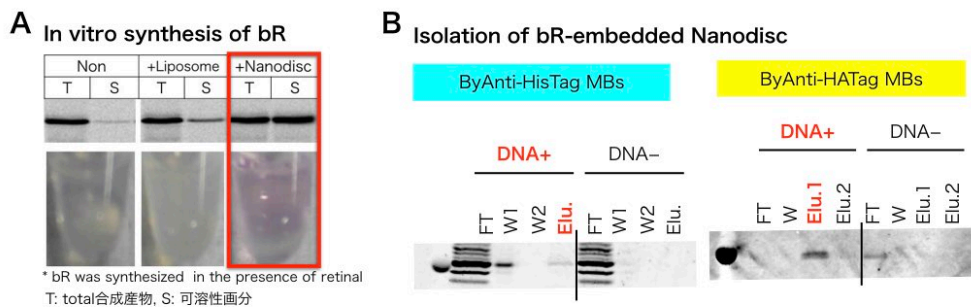


2.4 試験管内タンパク質合成系によるスクリーニング

PURE *frex2.0* に鋳型mRNAを投入しタンパク質合成を行なった。合成後の反応液をanti-FLAGtag抗体をチャージしたマグネットビーズで処理し、反応産物を単離した。単離したペプチドライブラリーに対しbRを含まないNanodiscを混合し、インキュベーション後、NiNTAをチャージしたマグネットビーズで処理しそのflow through (FT) 画分を回収した。回収したFT画分に対してbRを含んだNanodiscを投入しインキュベートした。その後、NiNTAをチャージしたマグネットビーズで処理しそのelution画分を回収した。回収したelution画分を用いて逆転写反応を行い、続いてPCRを行うことで優位な配列が選択されたかを確認した。

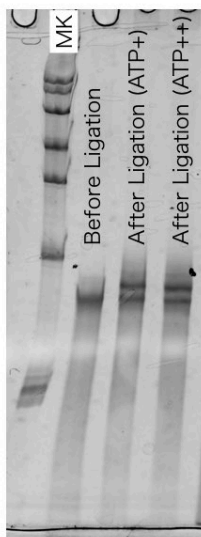
3. 結果 研究成果

- 3.1. ゲルろ過カラムにより最終精製したNanodiscを濃縮し、280nmの吸光度から濃度を定量したところ、500 μ Mであった。これをNanodiscサンプルとし、10 μ Mで使用した。
- 3.2. PCRで調製したbRの鋳型DNAをPURE *frex2.0* に投入しタンパク質合成反応を行ったところ、投入したDNA依存的に反応液が赤色に変色した。これは合成されたbRが正しい立体構造を維持しつつNanodiscに取り込まれたことを示唆するものである (A)。また、反応液を各種マグネットビーズで処理することでbRを含んだNanodiscのみを単離できたことを確認できた (B)。



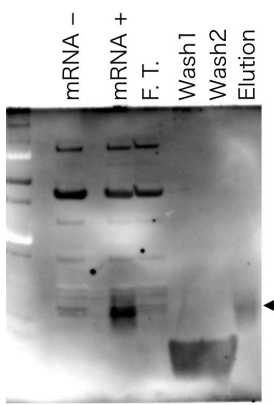
A: 膜画分存在下 (+Liposome or +Nanodisc), 非存在下におけるbRの合成. +Nanodiscにおいて呈色反応が見られる. B: Anti-HisTag Magnet Beads (MBs)とAnti-HATag MBsによるbR-Nanodiscの単離. bRの鋳型DNAを投入したもののみ、溶出 (Elu.) 画分にバンドが確認できる。

- 3.3. ランダム配列をもつライブラリーをin vitro転写後、PolyA-FITC-Puroをligationし、6% TBE Urea-PAGEにてmRNAにPolyA-FITC-Puroがついたことを確認できた。尚、見反応のmRNAとを分離する場合、サイズの大きいUrea-PAGEによる切り出しが必要である。



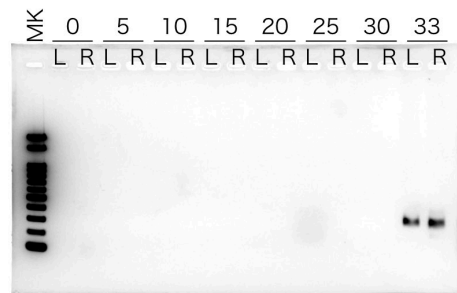
MK: マーカー. Ligation後のサンプルにおいて、ligation前よりサイズの大きい、PolyA-FITC-Puro の付加を示唆するバンドが得られた。

- 3.4. PUREflex2.0にPolyA-FITC-PuroのついたmRNAを投入しタンパク質合成を行い、合成後の反応液をanti-FLAGtag抗体をチャージしたマグネットビーズで処理し、各画分を用いSDS-PAGEを行ったところ、elution画分に反応産物があることを確認できた。



mRNA-: 鋳型mRNA非存在下, mRNA+: 鋳型mRNA存在下, F.T.: Anti-FLAGtag抗体付きMBsにより処理したFlow Through画分, Wash1 or 2: wash画分, Elution: 溶出画分. 溶出画分にライブラリー配列の合成産物と思われるプロダクトが検出された。

- 3.5. 3.4で得られた溶出画分を用いて試験管内スクリーニングを行った。得られたサンプルをrtPCRし、その後PCRによる選択配列の増幅を行なった。しかし優位な配列の増殖は確認できず、サイクル33において非特異的なバンドが検出された。



MK: マーカー, 0-33: PCRのサイクル数, L: bRを含まないNanodisc (コントロール), R: bRを含むNanodisc.

本研究課題で得られた実験データを元に、科研費萌芽（H27 採択「Nanodisc とセルフリー合成系による創薬基盤技術の構築」・90万円 x 3年間）に採択された。

4. 考察 まとめ

- bRの合成と膜挿入、bR-Nanodiscの単離は非常に良い状態で成功した。また、Liposome（膜小胞）を用いた系において、in vitro合成したbRが、光依存的にプロトンポンプ活性を示す結果を得ることができた。
- 転写後のライブラリー配列へのPolyA-FITC-Puro配列の付加の効率は約50%であった。今後はさらに効率よく付加する条件を検討する必要がある。
- PUREflexによる、ライブラリー配列の合成は確認できた。またMBsを用いて迅速に単離することにも成功した。
- 得られたライブラリーペプチドからbRに特異的に結合する配列の選択を試みたが、PCRの結果、優位な配列は得られなかった。この原因はペプチドプールの濃度とbR-Nanodiscの濃度のアンバランスによるものと考えられるため、今後系の最適化を行う。
- 今回、mRNA display法によるスクリーニングを試みたが、他の手法であるRibosome Display法も検討し、より良好な結果が得られる系にてスクリーニングすることにする。

5. 発表論文、参考文献

- 車 愈澈, 上田卓也「膜タンパク質の無細胞合成法」生物物理56 (3), 162-164 (2016)
- 車 愈澈, 上田卓也「クローズアップ実験法: PUREシステムを用いた膜タンパク質の無細胞合成」実験医学34 (3), 471-476 (2016)
- 車 愈澈「無細胞タンパク質合成系とベシクルによる人工細胞の構築」, CMC出版『人工細胞の創製とその応用』(2017) (in Press)
- 金森崇, 杉本(永池) 崇, 車愈澈, 網藏和晃, 上田卓也「総説: 無細胞タンパク質合成系と利用」, 生化学 (2017) (in Press)