

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650024

研究課題名(和文) 温度感受性モノクローナル抗体を利用した新しいタンパク質精製・制御系の確立

研究課題名(英文) Development of a novel protein purification/regulation methodology by using a temperature-sensitive monoclonal antibody.

研究代表者

岡野 俊行 (Okano, Toshiyuki)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：40272471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々が開発したニワトリCRY4のC末端付近をエピトープとするモノクローナル抗体は、抗原ペプチドとの結合において温度依存性を示す。

本研究では、これを利用し、エピトープをタグとして利用することによって、任意のタンパク質の精製に利用できる可能性を検討した。その結果、グルタチオンSトランスフェラーゼや黄色蛍光タンパク質を温度依存的に精製することに成功した。

本技術は、タンパク質の新しいタグおよび精製方法の確立であり、タンパク質の局在や機能の温度依存的な制御をはじめ、さまざまな分野への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We recently developed a monoclonal antibody that shows strong temperature dependence in the binding to the epitope peptide, a carboxyl-terminal sequence of chicken CRY4.

In this study, we tested the possibility to use this epitope peptide as a tag for temperature-dependent affinity purification of the tagged-proteins. We found the binding of the antibody with epitope-tagged glutathione S-transferase (GST) and yellow fluorescent protein (YFP) in a temperature-dependent manner. We also succeeded in the temperature-dependent purification of those proteins.

This technology is the establishment of a new tag and purification methods of proteins, and also it would be applicable in a various fields to the temperature-dependent control of protein localization and function.

研究分野：生化学

キーワード：モノクローナル抗体 タンパク質相互作用 一本鎖抗体

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、光受容分子クリプトクロム(CRY)研究の過程で、ニワトリCRY4のC末端付近をエピトープとするモノクローナル抗体が、抗原ペプチドとの結合において温度依存性を示すことを見いだした[辻ら、第35回日本分子生物学会大会(2012)ほか]。このように、抗体と抗原の結合定数が温度に依存して変化する現象は、従来から経験的に知られているが、これを利用したタンパク質精製のタグなどは実用化されていない。この理由はおそらく、(1)認識配列の決定に時間と労力を要すること、(2)顕著な温度依存性を示すものが得られていないこと、(3)温度上昇により目的タンパク質が分解する可能性を恐れてあえて実用化しようとする試みがないこと、等が考えられる。

これまでの基礎的な解析によって、申請者が得た温度感受性抗体は、4 と 37 において抗原との結合が大幅に低下することが分かった。

2. 研究の目的

これまでに得た成果は、本抗体と抗原の組合せが、新規の温度依存性のタンパク質精製系(図1)として利用可能であることを強く示唆している。将来的には、温度変化による生体制御への応用を視野に、エピトープ配列(単独および繰り返し配列)を付加したモデルタンパク質の作製、温度変化によるアフィニティ精製を行い、抗体を温度感受性タグとして利用可能とすることを目指した。また、ハイブリドーマの安定性を考え、抗体を一本鎖抗体に置き換えることも試みた。

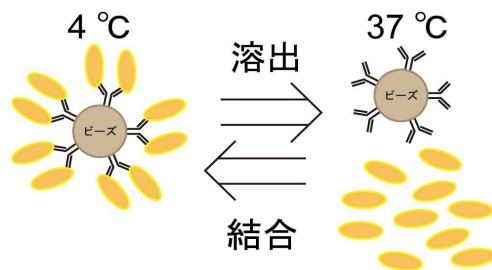


図1 温度感受性抗体によるタンパク質精製

3. 研究の方法

エピトープ配列を付加したモデルタンパク質を大腸菌で発現させ、温度変化を利用して精製を試みた。モデルタンパク質には、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)や蛍光タンパク質を用いた。融合タンパク質の発現においては、タグ配列を繰り返し導入することにより抗原と抗体の親和性が飛躍的に増大する可能性が考えられるので、抗原部位を繰り返したタンパク質等も精製・解析した。精製したタンパク質と抗体の結合について、温度条件を変えたELISA、および免疫沈降実験を行った。さらに、温度を変化させた温度溶出を行い、溶出率やタンパク質回収率を測定した。

並行して、本抗体の抗原部位の配列を改良するための情報を得るために、ニワトリ以外の生物のクリプトクロムの配列や発現を調べた。

また、本抗体の遺伝子を細胞に導入して温度依存的なタンパク質制御に利用することを考え、本抗体の遺伝子をハイブリドーマより単離し、一本鎖抗体をコードするcDNAを作製した。これを大腸菌に導入し、一本鎖抗体を得た。

4. 研究成果

抗原配列をタンデムに繰り返した配列をGSTのアミノ末端またはカルボキシル末端に融合したタンパク質を作製し、抗体との結合とその温度依存性を調べた。その結果、すべてのタンパク質が抗体と結合することができ、抗原配列をタンパク質に付加する際の自由度が高いことがわかった。また、すべてのタンパク質で温度依存性が見られ、結合力は概して繰り返し回数の多いもので増大した。また、黄色蛍光タンパク質と抗原配列の融合タンパク質も温度変化により精製することができた。

ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエル、ドジョウなど、ニワトリ以外の各種のクリプトクロムの配列を決定し、配列を比較したところ、抗原部位は種およびグループを越えて保存されていないことがわかった。このことから、本抗体が結合する配列はニワトリクリ

プトクロム4に特有の配列であり、他の類縁分子と共通する機能に関わる可能性は低いと考えられた

一本鎖抗体は、重鎖および軽鎖の可変領域のcDNAを単離し、スペーサ配列と結合した上で、大腸菌での発現ベクターにおける発現プラスミドを構築した。このコンストラクトを大腸菌BL21に導入して大量発現および精製を試みた。さまざまな条件検討の結果、抗原ペプチドとの結合能を保った状態で、高効率かつ高純度での精製に成功した。得られた一本鎖抗体を解析した結果、完全抗体と同様に温度依存的に抗原と結合・解離することがわかった。さらに、一本鎖抗体を固定化したビーズを用いて、光受容能をもつニワトリクリプトクロム4を精製することができた。

以上から、本抗体およびその一本鎖抗体は、任意のタンパク質の温度依存的な精製や細胞内での局在・機能の制御に応用可能であると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

[1] R Sakata, R Kabutomori, K Okano, H Mitsui, A Takemura, T Miwa, H Yamamoto, and T Okano Rhodopsin in the dark hot sea: Molecular analysis of rhodopsin in a snailfish, *Careproctus rhodomelas*, living near the deep-sea hydrothermal vent. *PLoS One*, 10(8):e0135888 (2015) (査読あり)

[2] H Mitsui, T Maeda, C Yamaguchi, Y Tsuji, R Watari, Y Kubo, K Okano and T Okano Overexpression in yeast, photocycle, and in vitro structural change of an avian putative magnetoreceptor Cryptochrome4. *Biochemistry*, 54(10), 1908-1917 (2015) (査読あり)

[3] T Takeuchi, Y Kubo, K Okano and T Okano Identification and characterization of cryptochrome4 in the ovary of western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Zool Sci*, 31, 152-159 (2014) (査読あり)

[4] R Toda, K Okano, Y Takeuchi, C Yamauchi, M Fukushiro, A Takemura and T Okano Hypothalamic expression and moonlight-independent changes of cry3 and per4 implicate their roles in lunar clock oscillators of the lunar-responsive goldlined spinefoot. *PLoS One*, 9 (10), e109119 (2014) (査読あり)

[学会発表] (総件数46件)

招待講演

[1] Toshiyuki OKANO “Biological Rhythms and Cryptochromes in *Xenopus tropicalis*” International Meeting on Aquatic Model Organisms for Human Disease and Toxicology Research, March 18-19, 2016, Okazaki Conference Center (Okazaki)

[2] Toshiyuki OKANO “Thermo-sensitive antibody and its molecular biological application” UCLA-Waseda University International Training Program, Oct 5-8, 2015, UCLA (LA)

[3] 岡野俊行 『ネットイツメガエルの光と時間の生物学』 日本動物学会第86回大会新潟シンポジウム 2015年9月17-19日 新潟コンベンションセンター(新潟市)

[4] 岡野俊行 『生体リズムの光科学～光受容体から光治療まで～』 第59回東邦大学薬学部公開講座 薬と健康の知識『生体リズムと時間薬理学』 2015年5月16日 東邦大学習志野キャンパス(習志野市)

[5] 岡野俊行 『生物の青色光センサーと体内時計』 光電相互変換第125回委員会『本委員会第227回研究会』主題: 光電相互変換の医学・生理学応用 独立行政法人日本学術振興会 2014年12月17日 早稲田大学西早稲田キャンパス(新宿区)

[6] 岡野俊行 『脊椎動物クリプトクロムの多様性、機能および分子応用』 シンポジウム: 生物界における光とは?: 動物・植物・

微生物の光科学、そしてオプトジェネティクス 日本生物物理学会第52回年会 2014年9月25-27日、札幌コンベンションセンター(札幌市)

[7] Toshiyuki OKANO

“Non-circadian functions of circadian factor cryptochromes” UCLA-Waseda University International Training Program, Sep 6-10, 2014, UCLA (LA)

学会発表

[8] 三浦宏太、大嶋拓哉、熨斗洋星、辻悠佑、三井広大、岡野恵子、岡野俊行 「温度依存的な抗原-抗体反応を利用したタンパク質精製系の開発」 時間生物フォーラム東京2016 2016年3月16日 早稲田大学(新宿区)

[9] 伊藤正晴、岡野恵子、小澤翔一、佐藤駿、小太刀佐和、宮台俊明、竹村明洋、岡野俊行 「フグ眼球由来培養細胞を用いた光誘導遺伝子の解析」 時間生物フォーラム東京2016 2016年3月16日 早稲田大学(新宿区)

[10] 更谷有哉、竹内悠記、岡野恵子、岡野俊行 「ドジョウ(*Misgurnus anguillicaudatus*)の末梢組織における時計遺伝子の光同調」 日本動物学会関東支部大会 2016年3月12日 神奈川大学(横浜市)

[11] 兎森椋、竹内悠記、山内千裕、宮城ひとみ、竹村明洋、岡野恵子、岡野俊行 「月周性産卵魚類ゴマアイゴの脳内時計遺伝子発現に月光が与える影響」 日本動物学会関東支部大会 2016年3月12日 神奈川大学(横浜市)

[12] 大嶋拓哉、三浦宏太、熨斗洋星、岡野恵子、岡野俊行 「温度依存的に親和性を变化させるモノクローナル抗体を利用したタンパク質精製・動態制御系の構築」 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会 2015年12月1-4日 神戸ポートアイランド(神戸市)

[13] 竹内悠記、更谷有哉、阿部大輝、岡野

恵子、岡野俊行 「ドジョウCryファミリー遺伝子の同定と発現解析」 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会 2015年12月1-4日 神戸ポートアイランド(神戸市)

[14] 玉澤歩実、岡野恵子、戸田りこ、岡野俊行 「ゼブラフィッシュにおけるクリプトクロムの発現変動解析」 第22回日本時間生物学会学術大会 2015年11月21-22日 東京大学(文京区)

[15] 伊藤正晴、岡野恵子、小澤翔一、佐藤駿、小太刀佐和、宮台俊明、竹村明洋、岡野俊行 「フグ眼球由来培養細胞における時計関連遺伝子の光応答性」 第22回日本時間生物学会学術大会 2015年11月21-22日 東京大学(文京区)

[16] Hiroki Abe, Keiko Okano, Toshiyuki Okano “Behavioral approach to photo- and magneto-responses in aquatic animals.” UCLA-Waseda University International Training Program, UCLA-Waseda University International Training Program, Oct 5-8, 2015, UCLA (LA)

[17] MITSUI Hiromasa, OKANO Keiko, OKANO Toshiyuki 「ニワトリクリプトクロム4の光反応の特性解析」 生物物理学会第53回年会、2015年9月13-15日 金沢大学(金沢市)

[18] JARISAWA Yudai, MITSUI Hiromasa, OKANO Keiko, OKANO Toshiyuki “Structural change and chromophore-redox cycle of chicken Cryptochrome4.” Sep 7-9, 2015, National University of Singapore, Mechanobiology Institute, Singapore (MBI) and Biopolis (Singapore)

[19] OSHIMA Takuya, MIURA Kota, NOSHI Yosei, OKANO Keiko, OKANO Toshiyuki “A single-chain Fragment variable for thermal protein engineering.” Sep 7-9, 2015, National University of Singapore,

Mechanobiology Institute, Singapore (MBI) and Biopolis (Singapore)

[20] 佐藤駿、小太刀佐和、岡野恵子、金光陽子、広瀬亘、林泰弘、岡野俊行 『入眠前のリラックスメートルに与える夜間の室内照度の影響』 日本睡眠学会第40回定期学術集会 2015年7月2-3日 栃木県総合文化センター(宇都宮市)

[21] 蓮沼佑太、北原拓、岡野恵子、岡野俊行 『複数のモノクローナル抗体を用いたゼブラフィッシュクリプトクロム4の局在解析』 時間生物フォーラム東京2015 2015年3月28日 早稲田大学(新宿区)

[22] 近藤慎吾、荒井雄仁、岡野恵子、岡野俊行 『変異体を用いたcCRY4の立体構造変化の解析』 時間生物フォーラム東京2015 2015年3月28日 早稲田大学(新宿区)

[23] 酒井一輝、三井広大、岡野恵子、岡野俊行 『*Pichia Pastoris*によるニワトリクリプトクロム4の発現系の構築と分光学的解析』 日本動物学会第67回関東支部大会 2015年3月14日 早稲田大学・先端生命医科学センター(新宿区)

[24] 兜森椋、坂田利江、岡野恵子、竹村明洋、三輪哲也、山本啓之、保智己、岡野俊行 『深海性魚類パラビクニン及びザラビクニンロドプシンの分光解析』 日本動物学会第67回関東支部大会 2015年3月14日 早稲田大学・先端生命医科学センター(新宿区)

[25] 大塚裕介、葛川純也、岡野恵子、岡野俊行 『CRIP4との相互作用におけるニワトリCRY1のヘム調節モチーフの役割』 第21回日本時間生物学会学術大会 2014年11月8-9日 九州大学医学部百年講堂(福岡市)

[26] 小太刀佐和、岡野恵子、小澤翔一、佐藤駿、宮台俊明、竹村明洋、岡野俊行 『トラフグ眼球由来の培養細胞における光感受性および光誘導遺伝子の網羅的解析』 第21回日本時間生物学会学術大会 2014年11月8-9日 九州大学医学部百年講堂(福岡市)

[27] Keiko Okano, Shoichi Ozawa, Hayao Sato, Sawa Kodachi, Toshiaki Miyadai, Akihiro Takemura, and Toshiyuki Okano "Ocular clock in the light: Photic induction and circadian oscillation of mRNAs in the fish ocular cells." 16th International Conference on Retinal Protein (ICRP2014) Oct 5-10, 2014、長浜ロイヤルホテル(長浜市)

[28] Ryo Kabutomori, Rie Sakata, Keiko Okano, Yoko Kubo, Akihiro Takemura, Tetsuya Miwa, Hiroyuki Yamamoto, and Toshiyuki Okano "Analysis of rhodopsin and clock genes in a snailfish, *Careproctus rhodomelas*, living near the deep-sea hydrothermal vent." 16th International Conference on Retinal Protein (ICRP2014) Oct 5-10, 2014、長浜ロイヤルホテル(長浜市)

[29] 三井広大、前田俊徳、山口千秋、辻悠佑、酒井一輝、岡野恵子、岡野俊行 『ニワトリクリプトクロム4の光反応特性に外部環境が与える影響』 日本生物物理学会第52回年会 2014年9月25-27日、札幌コンベンションセンター(札幌市)

[30] 佐藤駿、岡野恵子、小澤翔一、小太刀佐和、宮台俊明、竹村明洋、岡野俊行 『Fugu Eye細胞を用いた光誘導遺伝子の網羅的解析』 日本動物学会第85回大会 2014年9月11-13日、東北大学(仙台市)

〔図書〕(計2件)

岡野俊行、岡野恵子

明るいのと暗いのとどっちが好き? マイコンを使ってアフリカツメガエルの光走性実験を自動化する 比較生理生化学会編「研究者が教える動物実験 第一巻 感覚」共立出版、2015年、pp104-107

岡野俊行 「光と生命の事典」共著、朝倉書店(2016)

〔その他〕

岡野俊行研究室ホームページ

<http://www.okano.sci.waseda.ac.jp/>

6．研究組織

(1)研究代表者

岡野俊行 (OKANO TOSHIYUKI)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：40272471