

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32682

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15030

研究課題名(和文)汎用的な構造解析ツールの開発を目指した抗bRILサメVNAR抗体の取得とその検証

研究課題名(英文)Acquisition and validation of anti-bRIL shark VNAR antibodies for the development of a versatile structural analysis tool

研究代表者

中北 智哉(Nakagita, Tomoya)

明治大学・農学部・助教

研究者番号：40852786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は構造解析に頻繁に用いられる安定化タンパク質、アポシトクロムb562RIL(bRIL)と呼ばれるタンパク質を抗原とした抗bRILサメ抗体の取得を目指しました。ヒト抗体は抗原を2つのドメインで挟み込むのに対して、サメ抗体は1つのドメインで突き刺さるように認識します。このような性質の違いから、サメ抗体の構造解析への応用が期待されました。サメに対するbRILタンパク質の免疫で血中抗bRIL抗体価の上昇が確認されたため、ファージディスプレイ法による抗bRIL抗体の取得を目指しましたが、至りませんでした。本研究より、抗原タンパク質の形状によってサメ抗体の得意不得意が存在することが見出されました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではアポシトクロムb562RIL(bRIL)に対するサメ抗体の取得を目指しましたが、取得には至りませんでした。同時並行していた別のタンパク質でのサメ抗体取得には成功しましたので、手法の問題とは考えにくく、bRILが有している安定なヘリックス構造という特徴が、サメ抗体の特徴である突き刺さるように認識するという性質とは合わなかったのではないかと推察されました。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to obtain a shark antibody against apocytochrome b562RIL (bRIL) which is frequently used for stabilizing membrane-proteins. Human antibodies grab antigens by using two domains, whereas shark antibodies pierce them by its single domain. Because of this difference, we aimed to apply shark antibodies to structural analysis. Since the titer of the anti-bRIL antibody in blood was gradually increased, immunizing with bRIL protein against sharks, we attempted to obtain anti-bRIL antibodies by phage display method. However, we couldn't obtain the antibody. It was found that strengths and weaknesses of shark antibodies depending on the shape of the antigen protein in this study.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：食品化学

キーワード：VNAR bRIL anti-body

1 . 研究開始当初の背景

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)などの膜タンパク質の構造解析には構造の揺らぎを抑える安定化タンパク質を融合させる手法が用いられる。この代表的なものにアポシトクロム b₅₆₂RIL (bRIL)が挙げられ、これまでも多くのX線結晶構造解析などの構造決定に用いられてきた。昨今、cryo-EMによる構造決定が主流になっているが、cryo-EMは低分子量の構造決定は苦手としており、測定可能な分子量が150 kDa程度より大きいことが求められる。ところが、GPCR単独では40 - 50 kDa程度であるため、抗体やGタンパク質との複合体形成など、見かけの分子量の増加をさせるなどさまざまな工夫をすることで解決を図っている。

抗体を用いて見かけの分子量を増大させるには、GPCRそのものを抗原として特異的抗体取得をする場合が多い。しかしこれはこのターゲット毎に抗体取得をしなくてはならないため、スループット性にかけていた。そこで安定化タンパク質として広く用いられているbRILに対する抗体を取得することでこの問題を解決しようと図った。bRILについては既に得意的に認識するFabが取得されてはいるがFabは分子量自体は大きいものの、重鎖、軽鎖の2ドメインからなる構造であるため、リコンビナント体の形成が困難であるという欠点がある。

我々が注目したサメ抗体IgNARの可変領域であるVNARはシングルドメインからなるという特徴を有し、Fabが2つの鎖で挟み込むように認識するのに対し、VNARは突き刺さるようにして認識するという性質の違いがある。また、シングルドメインであることからリコンビナントの作製が容易であるというメリットが存在する。このような違いから、bRILを特異的に認識するVNARの開発は構造解析を支えるツールとして有用であると考えた。

2 . 研究の目的

bRIL特異的、且つ上記Fab bRIL抗体と異なる位置を認識するサメ抗体VNARを取得することで、構造を安定化する結晶化ツールとして。また分子量を増大させるcryo-EMにも適用可能なツールを作製することを目指した。

3 . 研究の方法

C末端にHis-tagを付したbRILを大腸菌により発現させ、これをHisタグ精製し、単離した。愛媛県水産研究センターにて飼育委託しているエイラクブカに対し、得られたbRILを1回につき100 µg、アジュバントとともに2週間に1回免疫を実施した。ELISAによる血漿中の抗bRIL抗体の抗体価を評価することで最適な脾臓回収のタイミングを図り、十分な抗体価の上昇が認められた2ヶ月-3ヶ月ほど経過したタイミングで脾臓を摘出した。

摘出した脾臓を乳鉢ですり潰し、そこからRNAを得、RT-PCRを行うことでVNARのcDNAを取得した。これをファージディスプレイ法によってセレクションすることで、目的の抗bRIL抗体の取得を図った。

4 . 研究成果

エイラクブカ 2 匹に対する免疫を実施し、ファージディスプレイ法による抗 bRIL 抗体の抽出を試みたが、ついにうまくはいくことはなかった。計 4 回 (8 匹) のトライアルを実施したもののいずれも抗 bRIL 抗体の取得には至らなかった。この間同時に進めた他のターゲットについては抗体取得に成功しているため、実験手技によるものではなく、bRIL の性質によるものであることが考えられた。bRIL はコンパクトに折り畳まれた構造をとっているため、VNAR の性質である突き刺さるように認識することが難しかったのかもしれないと考えている。今後はターゲットとするタンパク質の性質をあらかじめ見極めて、VNAR が得意とするタンパク質を見極めるようにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中北 智哉、竹田 浩之
2. 発表標題 コムギ無細胞系を用いた網羅的プロテインアレイの確立
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------