構造解析ユニット

補助事業代表者（所属・職名）
高木　淳一　（大阪大学蛋白質研究所・教授）

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

補助事業分担者（所属・職名）
有森　貴夫（大阪大学蛋白質研究所・准教授）、三原　恵美子（大阪大学蛋白質研究所・特任研究員）、的場　京子（大阪大学蛋白質研究所・特任研究員）

概要

本課題は、当グループが平成28年度までのPDIS事業、R3年度までのBINDS事業への参画を通してこれまでに蓄積させた高難度蛋白質生産のノウハウとリソース、そして高度化研究を通して開発に成功した数々の新技術を集結し、よりバージョンアップした外部研究者支援を本事業に提供するものである。さらに、難発現性・易凝集性蛋白質の生産技術や、社会の期待が大きい遺伝子治療分野に貢献するAAVベクターの調製技術の革新を図る高度化研究を通じて、創薬と生命科学の分野に大きなインパクトを与えることを目的とする。

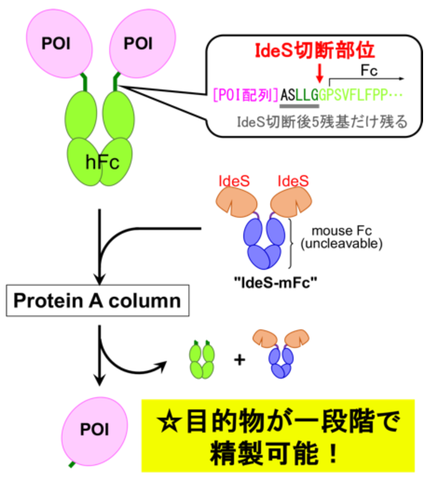
支援の内容

支援活動には2つのサブ項目を設定し、それぞれがさらに3つのサブテーマに分かれている。

1. 高難度な疾患関連蛋白質の調製とその構造解析のための特殊改変
   - 1−1. 動物細胞発現系を用いた糖蛋白質の発現と精製
   - 1−2. 構造均一化シャペロンの生産とその標的複合体の構造解析
   - 1−3. 創薬ターゲット抗体の改変と組み換え生産
2. バイオ医薬品候補等の高品質ラボスケール生産と性状解析
   - 2−1. バイオ医薬候補品等の中規模生産
   - 2−2. バイオ医薬候補品の性状評価系の確立
   - 2−3. in vivo試験グレードのAAVベクターの調製

支援の成果

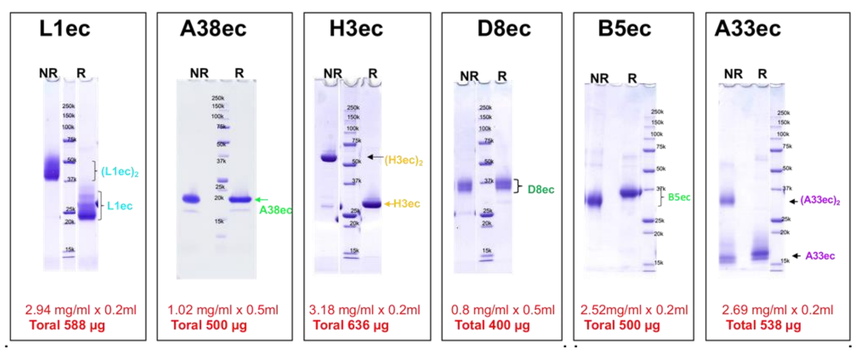
short hinge(sh)Fc法の開発（高度化分だが支援で多用した）



受容体（ウイルスのエンベロープ蛋白質を含む）の細胞外領域断片は、IgGの定常領域であるFcを融合することで安定性が増大して凝集変性が抑制され、しかもProtein Aによる精製ができるというメリットがある。しかしFc部分は切断除去する必要があり、じつはIgGのヒンジ部に特有の性質のためにこれが難しいことが知られている。我々は、化膿レンサ球菌由来のIdeSプロテアーゼがIgGヒンジを特定の配列で効率よく切断することを利用し、切断後に余分なペプチドが残らないような「short hinge(sh)Fc」のデザインを考案した。これにより、以下のような難発現性・易凝集性タンパク質の超迅速生産パイプラインが完成した。

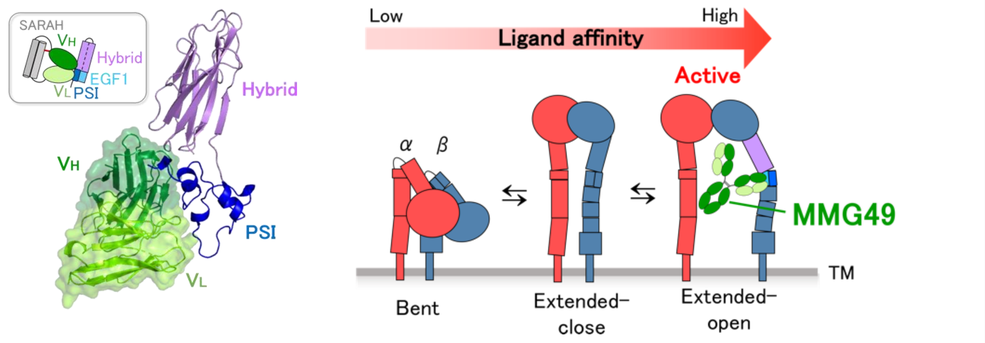
(i) 目的タンパク質をshFc融合で発現、ProteinAカラムで精製
(ii) IdeS-mFcと37℃、2時間反応させることで切断
(iii) 反応物を再びProteinAカラムに通し、未結合画分を回収

サル痘ウイルス抗原の生産（SCARDA-BINDS連携課題）



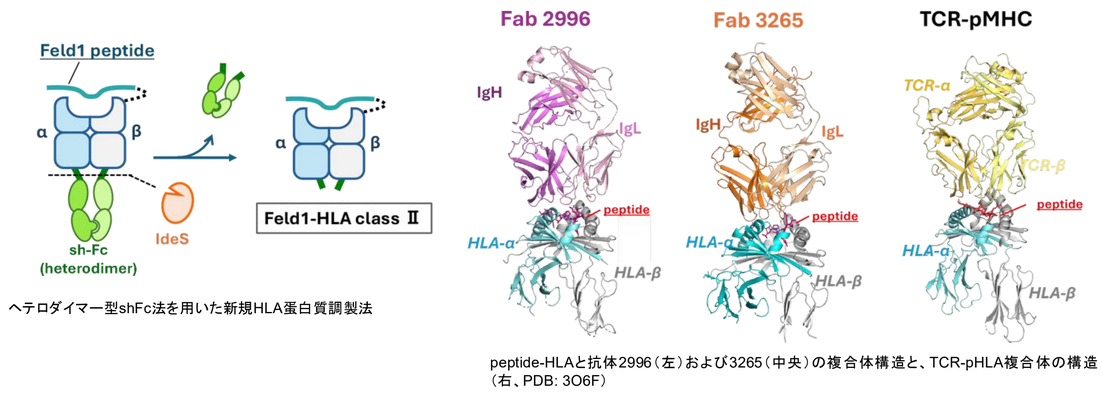
SCARDA石井班にてサル痘ワクチンデザインのために、天然痘ウイルス（サル痘の近縁ウイルス）感染者において中和抗体の標的となる6種類のタンパク質を合成する必要が生じ、井上PSの指令の下、SCARDA-BINDS連携の枠組みでこれに協力をすることになった。高度化で開発した「shFc融合法」を早速採用し、6つの候補（D8、L1、H3、A38、B5、A33）の調製をわずか3ヶ月で達成した。石井Gの小檜山博士によって、弱毒ワクチンLC16m8株を投与したマウスで、これらのタンパク質全てに対して抗体価の上昇が確認されたことから、評価抗原として十分な品質を有していることが確認できた。

骨髄腫特異的MMG49抗体が認識するβ7インテグリンの複合体の構造（課題4130）



保仙Gで開発した抗体MMG49は、多発性骨髄腫（MM）に発現するβ7インテグリンのみを特異的に認識する抗体で、これを用いたMMに対するCAR-T療法の治験が現在進んでいる。ところが、なぜMMG49ががん細胞のみを認識するのかが不明であり、そのメカニズム解明のためにMMG49-β7インテグリン複合体の構造解析を依頼された。本案件は難航したが、インテグリン側について思い切ったドメイン欠失デザインを採用し、しかもその生産にshFc法を応用することにより、初めて複合体の結晶化に成功し、分解能1.99Åで複合体の構造決定を達成した。その結果、MMG49はがん細胞上でインテグリンが特異的に取る「extended-open」構造を認識することがわかった。

MHCII複合体を認識する抗体の結合メカニズムの解明（課題5448）

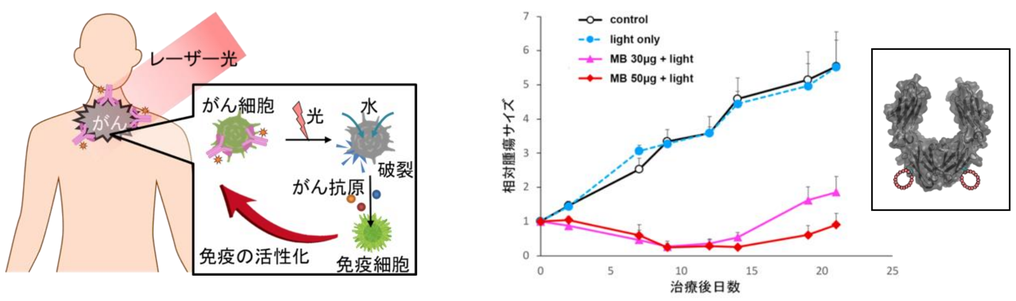


ヘテロダイマー型shFc法を用いた新規HLA蛋白質調製法

peptide-HLAと抗体2996（左）および3265（中央）の複合体構造と、TCR-pHLA複合体の構造（右、PDB: 3O6F）

荒瀬グループはこれまで、抗原に対する免疫応答の過程でMHCと抗原ペプチドの複合体に対する抗体が誘導され、この抗体がT細胞受容体による抗原認識を競合阻害することで、ヒトの免疫制御（終息）に関わるという仮説を提唱しているが、この証明のため、HLA/抗原複合体に対する多数のモノクローナル抗体とペプチド提示HLAとの複合体の網羅的構造解析を目指した。しかし、HLA蛋白質は結晶化品質の蛋白質を調製することが極めて難しいことで有名であった。そこで、高度化研究で開発したshort-hinge Fc融合法を適用し、HLA-IIヘテロダイマーを安定かつ高収率で生産する方法を確立した（左図）。これをもちい、すでに2つの抗体について複合体構造を解くことに成功した。得られた構造から、どちらの抗体もペプチドとHLAを同時に認識し、その形状がTCRがHLA複合体を認識する様子と酷似していることがわかった（右図）。

Mirabodyを用いた光免疫療法の評価（課題5783）



光免疫療法の概念図（左）とEGFR結合性Mirabody（inset）による治療効果（右）

光免疫療法は、光に反応する色素であるIR700を結合したIgG抗体をがん細胞特異的に集積させ、その後がん組織全体に光を照射することで、がん細胞のみを選択的に殺傷する治療法であるが、IgG抗体の組織浸透性の低さがネックとなっている。花岡教授らは抗がん抗体の低分子化を模索する中で、当研究室で開発したMirabody（MB）に注目した。MBは抗体のFc断片に標的結合性ペプチドをグラフトした人工分子で、抗体同様の結合特異性を持ちながら分子量は約1／3で、しかも血中半減期の長さなどは抗体と遜色無く、光免疫療法薬のモダリティとして最適である。そこで、当研究室ですでに作製ずみであったヒトEGFRに結合するMBを大量合成して提供し、担がんマウスで強い治療効果を持つことを明らかにした（図）。本成果は依頼者と共著で論文として発表した（Biomedicine & Pharmacotherapy, 202: 119793 (2026)）。

COIの開示：課題代表者および分担者は本ポスターの内容につき開示すべきCOIはありません