

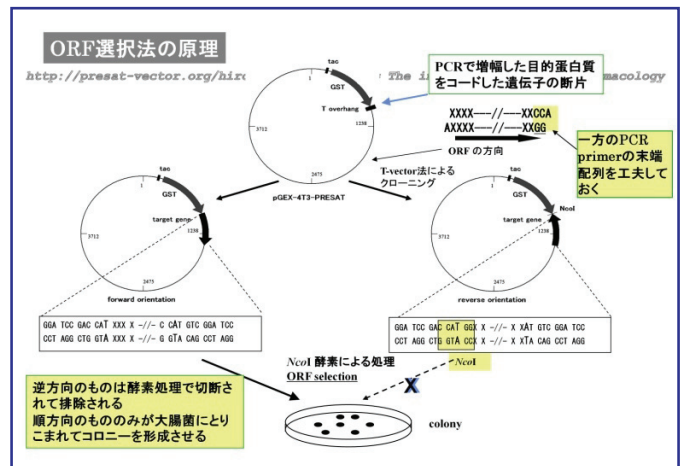
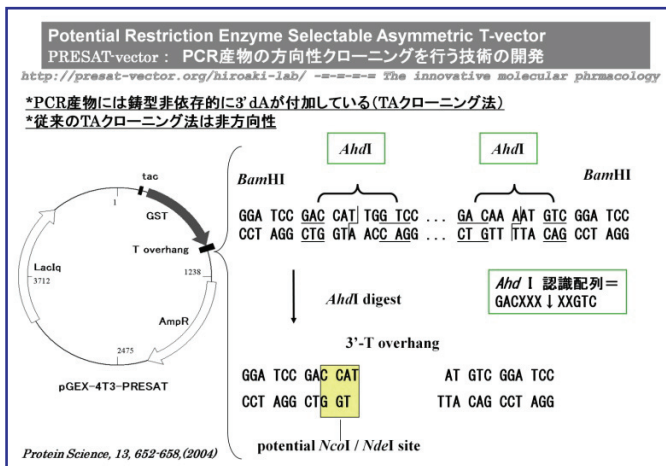
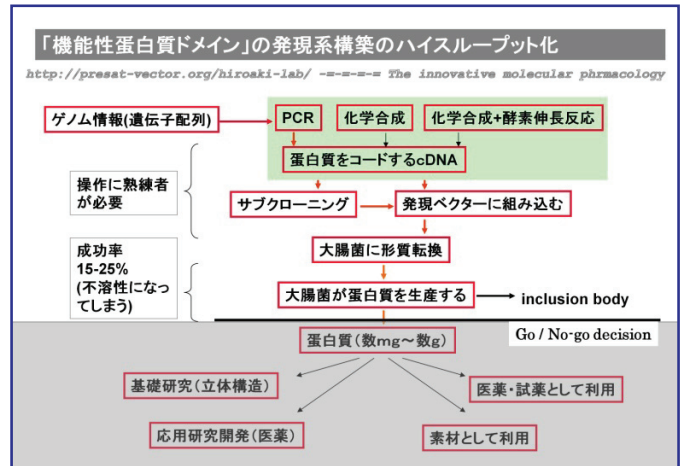
タンパク質ドメインを標的とした創薬シーズ探索

(1) タンパク質発現用プラスミドの高速構築技術 (PRESAT ベクター法)

創薬科学研究科 構造分子薬理学分野 天野名都子, 天野剛志, 廣明秀一

研究開発の概要

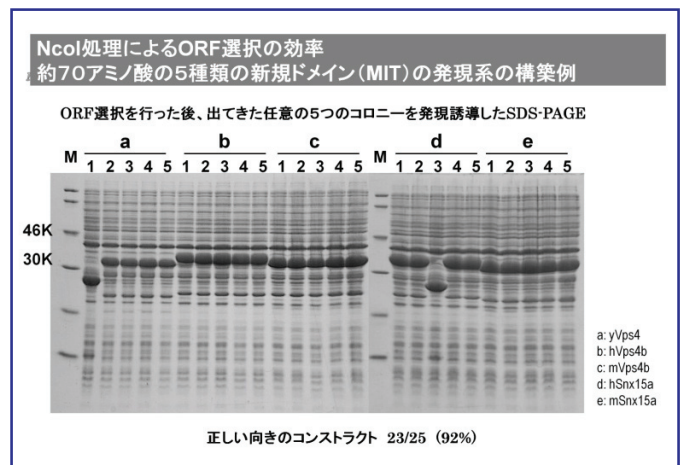
3'突出末端を生成する特殊な制限酵素AhdI切断部位とそこに一部重複するNcoIまたはNdeIの切断部位を含むリンカーを新規に設計し、これをグルタチオン硫黄転移酵素 (GST)をはじめとする、タンパク質科学実験によく用いられる融合タンパク質発現ベクターのクローニング部位に導入した。これにより(1)融合発現系のプラスミドを作成する際の手法として、いわゆるTA-cloningを用いることができ、かつ(2)一方向のみに目的遺伝子が挿入された産物のみをセレクションできる。このベクターを用いることで機能性蛋白質の様々な長さのドメインから溶解度の高いものだけをハイスループットにスクリーニングすることが可能となる。



新規性・独創性

- 1 T-vectorを用いたクローニング法 (PCRで増幅されたDNA断片を後処理なしでサブクローニング可能、低バックグラウンド)。
- 2 他の方法よりも純度の高くライゲーション効率の高いT-vectorを低コストで作製可能。
- 3 幅広い応用性 (GSTベクターに限らず任意の蛋白質発現用ベクターをPRESAT-vectorに拡張できる)。
- 4 例えば96穴プレートを用いて、溶解度の高い蛋白質変異体の網羅的選別に応用可能。

発明名称: 新規ベクター及びその利用
(特許権者: 横浜市立大学)
特許番号: 4487036号 (特願2003-308773)
2010年4月9日



9割を超える高効率で正しい向きのクローニングに成功し、融合遺伝子が構築できた。

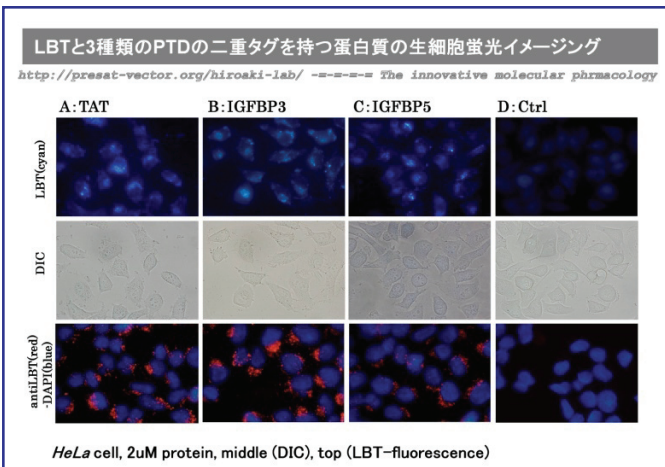
タンパク質ドメインを標的とした創薬シーズ探索

(2) ランタニド蛍光を利用したタンパク質の細胞内動態の観察技術

創薬科学研究科 構造分子薬理学分野 天野名都子, 天野剛志, 廣明秀一

研究開発の概要

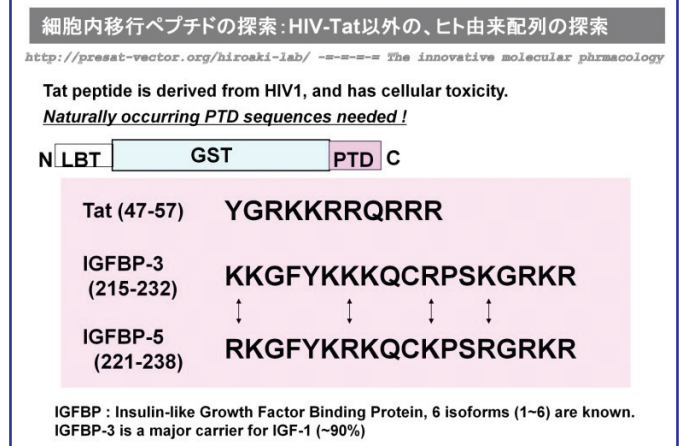
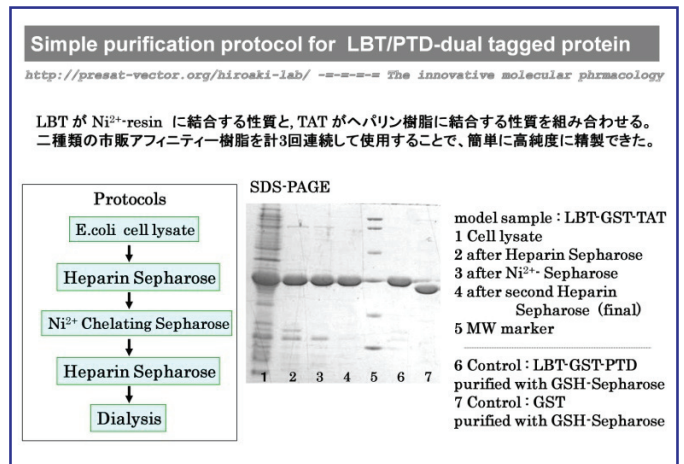
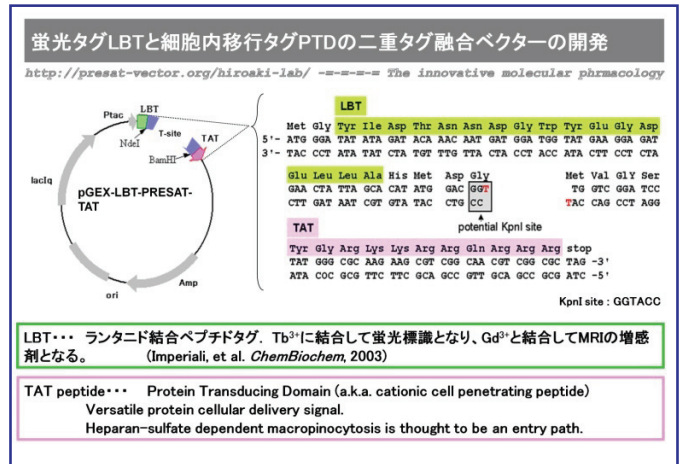
我々は、米国のインペリアリらが開発したランタニド結合ペプチドタグ (LBT) を利用した生体イメージング技術の開発を志向した。LBTは、 Tb^{3+} 、 Gd^{3+} などのランタニドイオンに結合し、前者に結合した時には青色蛍光色素として蛍光観察に、後者に結合した時には、MRI増感剤として利用可能である。しかし動物細胞では、 Tb^{3+} は細胞膜を透過しないため、あらかじめLBT融合タンパク質と Tb^{3+} を試験管内で結合させたのち、そのタンパク質を細胞内に導入してやるという必要がある。我々は、タンパク質を細胞膜移行させる別の種類のペプチドタグとLBTとを併せ持つ二重標識タグシステムを開発した。具体的には、タンパク質細胞移行活性を持つタンパク質として、既存のHIV-Tatペプチドの他に、ヒト細胞由来の新規タグ二種類を単離同定して、それらすべてと、LBTを組み合わせた。



新規性・独創性

LBTの開発者である米国のインペリアリらは、 Tb^{3+} が細胞内には浸透しないという技術的問題点を克服できなかったために、「生体イメージング」分野には活かせなかった。我々は、PTDとLBTを組み合わせて用いる方法を考案した。生きた細胞内での Tb^{3+} 蛍光によるタンパク質の細胞内動態のイメージングに成功しているのは世界で我々のグループのみである。

更に、PTDとして、ヒト免疫不全症候群ウイルス由来のTatタグに替わる安全性の高い配列として、同等の活性を有するヒト成分由来のタグペプチドを、我々はすでに二種類単離した。



企業への期待

新規技術を共同研究していただけるパートナー企業を募集しております。特に、LBT蛍光に適した顕微鏡用光源を開発したいと思っています。