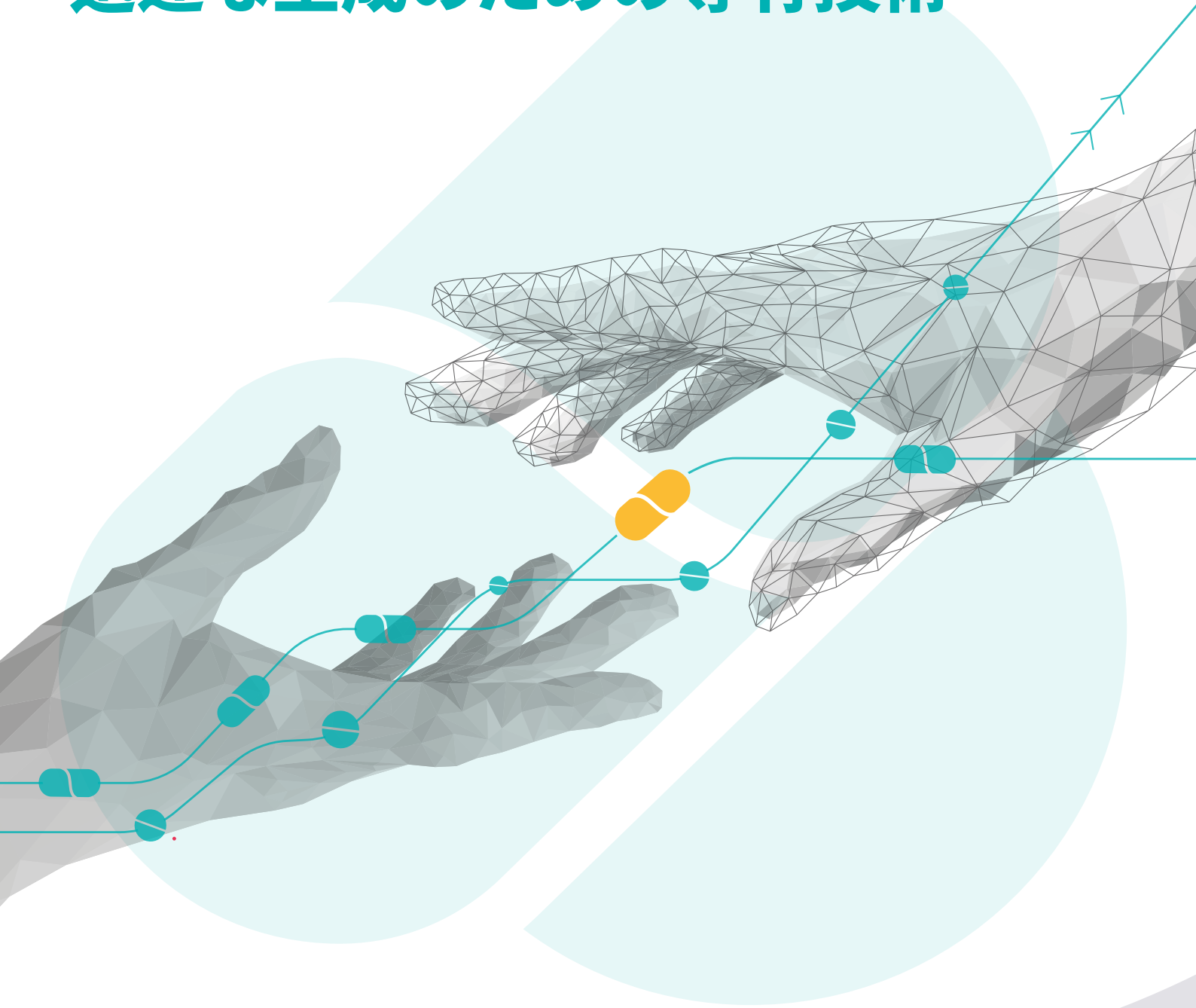


新規タンパク質コンストラクトの 迅速な生成のための専有技術



タンパク質発現技術

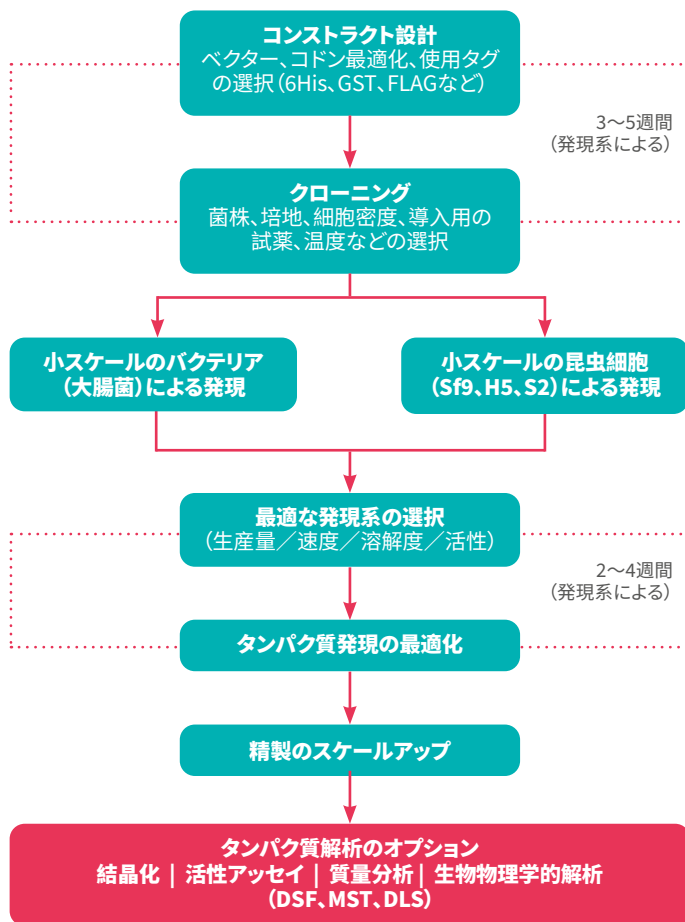
Domainexは、分子生物学やタンパク質の発現と精製における豊富な経験を、サービスとして提供しています。

当社ではプロジェクトのデザインからタンパク質精製までを、最速2週間でいきます。

精製後は、専門知識と経験を生かした、総合的なタンパク質解析を行います。

Domainexのタンパク質発現サービスの主な特徴

- **スピード**
 - ・ アミノ酸配列からタンパク質発現まで最速で2週間
- **カスタマイズ**
 - ・ タグの選択
 - ・ 発現系の選択
 - ・ タンパク質クロマトグラフィーカラムの選択 (アフィニティー、SEC、IEX)
- **スケール**
 - ・ 最高30リットルの発現培養
 - ・ 数ミリグラム量の精製タンパク質の提供可
- **品質**
 - ・ 様々な解析技術 (DSF、MST、SEC、UV、MS、DLS)
 - ・ X線結晶構造解析、NMR、バイオアッセイ、フラグメントスクリーニング、抗体の生物学的分析目的等に使用できる高品質のタンパク質を提供可能。



ケーススタディ1: KMT2D (MLL4)

Francis Crick 研究所のウィルソン博士とのコラボレーションにおいて、CDHを用いて結晶構造解析に適するKMT2D (MLL4) SETドメインコンストラクトを特定することに成功しました。

それ以前の様々な試みでは、MLL4コンストラクトで結晶を生成するまでには至っていませんでした。

我々は3ヶ月以内に、157,000個のクローンのCDHライブラリーを作成し、うち25,000個のクローンをスクリーニング、SETとpostSETドメインの両方をカバーする18個の固有の発現良好な水溶性コンストラクトを特定しました。

これらのCDHコンストラクトの1つを用い、補因子と複合した2.2Åの結晶構造を作ることに成功しました。

この構造により、MLL1とMLL4の構造的差異に基づきSETドメインのメカニズムが解明されました (Zhang et al., (2015) Structure 23, 1-13)。

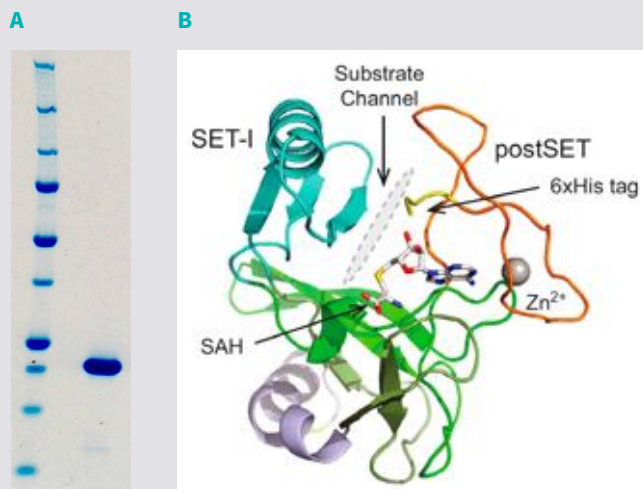
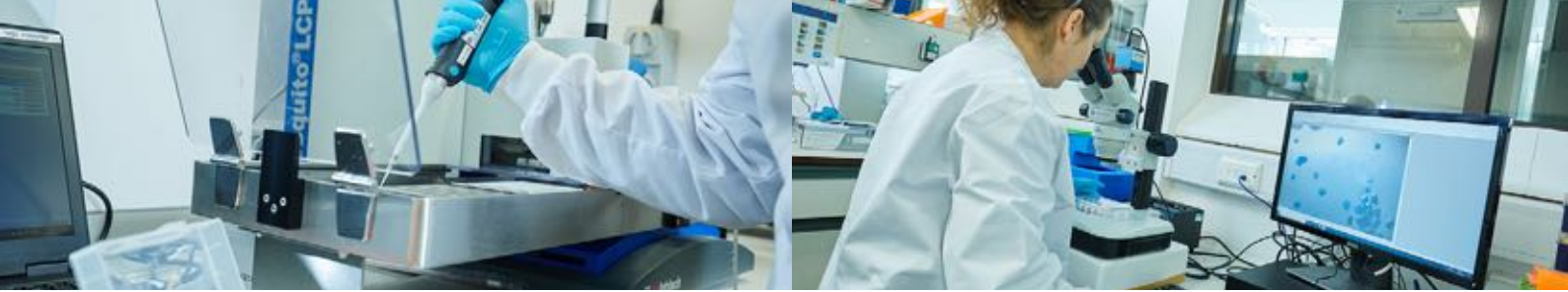


図1: (A) 大腸菌からほぼ同質に精製されたMLL4 CDHコンストラクトのSDS-PAGEゲル(B) 2.2Åの解像度でのMLL4の構造 (PDBエントリー: 4Z4P) C末端6xHisタグは黄色で表示。タグを外そうとすると、結晶化しない活性タンパク質が生成された。補因子産物のS-アデノシル-L-ホモシステインはスティックモデルで、単一配位されたZn²⁺イオンは球体で表現。MLL1の構造から推測される、基質結合チャンネルはグレーで表示。





はじめに

十分な収率、溶解度、結晶化度でタンパク質を発現させることに苦労されたご経験はありませんか。

ドメイン構成がほとんど解明されていないタンパク質や、既知の構造と関連がないタンパク質をお取り扱いですか。

Domainexが最適な解決方法をご提案します。

私達は包括的なタンパク質解析サービスを提供しています。

主となるのは特許取得済みのコンビナトリアル・ドメイン・ハンティング (Combinatorial Domain Hunting: CDH) 技術です。この技術は、DUB、エピジェネティック標的 (リジン、アルギニン、RNAメチルトランスフェラーゼなど) や、メタロプロテアーゼ、ポリメラーゼ、転写因子、生物学製剤など、広範な標的に応用されており、全体の成功率は90%を超えています。

CDHは、ランダムDNA遺伝子フラグメンテーションを、得られたタンパク質フラグメントの効率的なスクリーニングと組み合わせ、広範囲に応用できる**水溶性タンパク質ドメイン**を特定します。

CDHの特徴と長所

- 2~3ヶ月で何万もの標的遺伝子バリエーションをスクリーニング
- バリエーションの発現、溶解度、生物物理学的特性を比較して、最適なものを選択
- バリエーションライブラリーは、様々なタンパク質を網羅できるように偏りなく選出されたもの
- 事前の構造またはバイオインフォマティクスデータの必要なし
- フラグメントの長さを変更できるため、柔軟に対応可能
- **コア領域**を固定し、N末端とC末端の両方 (図1A) または使用するシークエンス全体の変更可 (図1B)
- また、内部ループに変更を加え、2つ以上の不動の**コア**をつなげることも可 (図1C)
- タンパク質間相互作用を調査するためにCDHの異型、CDH2の使用可
- タンパク質のフォールディングまたは結晶化が課題である場合、CDHによって解決する可能性あり

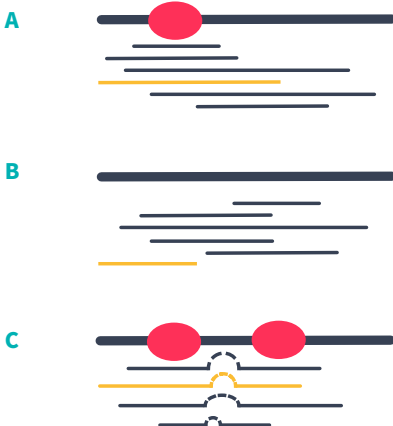


図1 DNAライブラリーのオプション。
(A) 固定されたコア、(B) ランダムフラグメンテーション、
(C) 2つの固定されたコアと変更を加えたループ

CDHは効率的な創薬を可能にします

CDHは、広範な目的 (アッセイ開発、フラグメントスクリーニング、X線結晶構造解析法など) に使用可能な新しいタンパク質コンストラクトを提供致します。

CDHは、Domainexのパッケージサービスの一部として提供可能です。

- X線結晶構造解析法
- バイオアッセイ開発
- 生物物理学的特性評価 (既知のリガンドまたは補因子など)
- 抗体産生と検証
- マイクロスケール熱泳動 (MST) を中心とした主要プラットフォーム、FragmentBuilderによるフラグメントベースの創薬

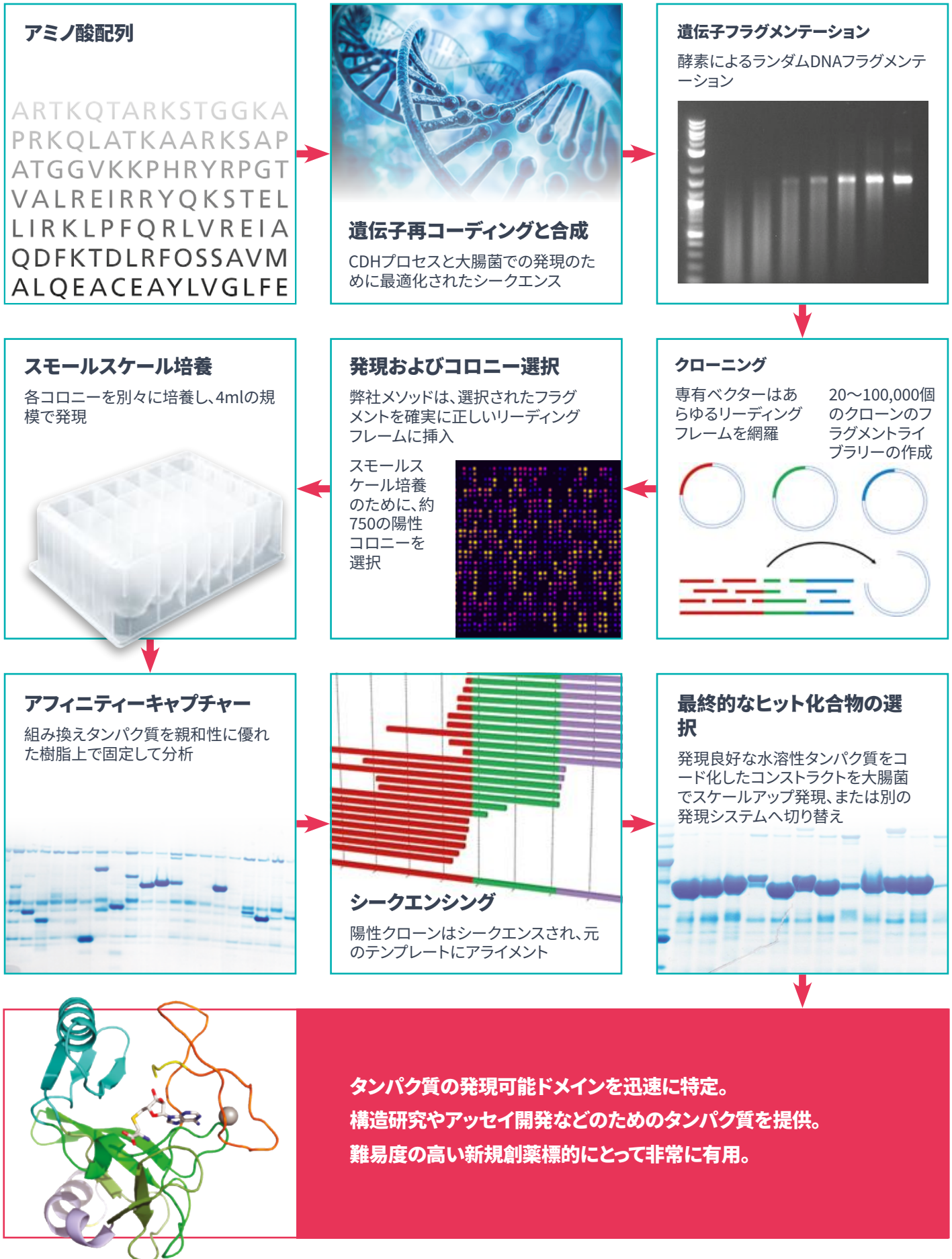
CDHの成果物

- 標的遺伝子に対し、最多で100,000クローンのスクリーニングライブラリーの作成
- 何百ものバリエーションのスマールスケール培養
- 部分的にシークエンスされ、水溶性でフォールドされたドメインを発現する最多20個のクローン
- 成功率の向上のため、複数の最適なコンストラクトを同時にスケールアップ
- 少なくとも低ミリグラム量において精製タンパク質の純度が90%以上
- 抗体結合活性またはオリゴマー状態の確認
- 低分子結合の確認 (DSFまたはMSTなどによる)
- 弊社の専門家が定期的に進捗をご報告し、貴組織のプロジェクトのニーズに迅速に対応
- 最終報告書で最適化された発現と精製プロトコールをご報告

表2. CDH応用の成功例

標的	標的クラス	発現ドメイン
Hsp90	シャペロン	N末端と中央
MEK1	Thr Tyrキナーゼ	キナーゼ
ヒトPI3Kデルタ	ホスホイノシチド3-キナーゼ	キナーゼ
BMX	非受容体Tyrキナーゼ	キナーゼ
MLL4	Lysメチルトランスフェラーゼ	SETおよびpostSET
ADAMTSS	メタロプロテアーゼ	スパーサー
PIKfyve	ホスホイノシチドキナーゼ	キナーゼ
トウモロコシ/エンドウヒゲナガアブラムシACCase	アセチルCoAカルボキシラーゼ	トランスフェラーゼ
ハンチンチン(HTT)タンパク質	PPI	N末端
Usp28	脱ユビキチン化酵素	USP

CDHプロセスのフローチャート



ケーススタディ2:ハンチンチン(HTT) タンパク質

ハンチントン病は、ハンチンチン(HTT) 遺伝子の変異により、HTTのN末端にポリグルタミン (polyQ) 反復配列が伸長することで生じます。

しかし、この研究の開始時にはHTTの構造に関する情報は限られていました。

HTTは非常に大きな(348 kDa) タンパク質で、胚発生に不可欠であり、小胞輸送、エンドサイトーシス、オートファジー、転写調節などの様々な細胞活動に関与しています。

このことは、HTTがタンパク質間相互作用の中心として機能していることを示唆しています。

このプロジェクトの目的は、HTT遺伝子のN末端領域から水溶性の安定したタンパク質構造を特定して生成することでした。

Hisタグの組み換えタンパク質の発現のために、約9万を超えるクローンを含む多様なライブラリーがテストされました。

最終的に、CDHによって2つのN末端HTTコンストラクトがそれぞれ7mg/Lと2.2mg/Lで生成され、2つのカラムを通じた後の純度は約90%でした。

両タンパク質とも、DSFによってフォールディングのエビデンスが示され、今後の研究にすぐに使用できます。

我々の知る限り、このような高い収率と純度でN末端HTTタンパク質が生成されたのはこれが初めてだと思われます。

これにより、HTTタンパク質のこの重要な領域の構造/機能分析をさらに進めることができます。

このプロジェクトは、ハンチントン病治療法の開発促進に取り組む研究機関、CHDI Foundationより研究費提供を受けました。

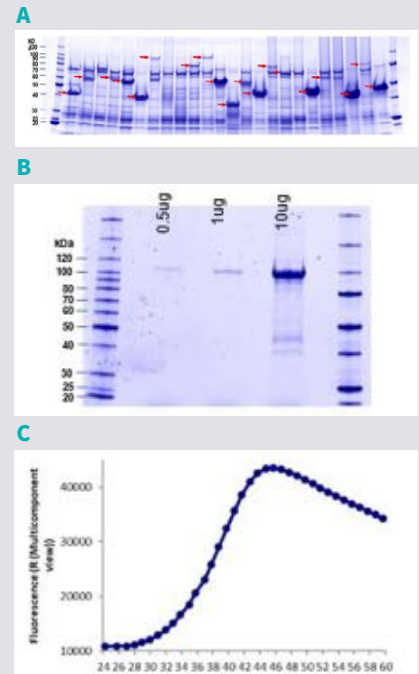


図1: (A) CDHスクリーニングからの典型的なSDS-PAGE分析 (B) SDS-PAGEおよび (C) DSF分析 (CDHによるN末端HTTタンパク質コンストラクト)

ケーススタディ3:CD73 - タンパク質産生

CD73 (別名:エクト-50-ヌクレオチダーゼ、e5NT) は真核性細胞外糖タンパク質で、がんや炎症疾患の治療での応用の可能性があります。

CD73は細胞外AMPのアデノシンへの加水分解を触媒し、プリン作動性シグナル伝達経路のP1受容体を介したアデノシンシグナル伝達の作動において中心的な役割を果たします。

Domainexは、低分子化合物の創薬プログラムの一環として、マイクロスケール熱泳動 (MST) を使用したCD73生化学分析とリガンド結合アッセイの確立を請け負いました。

市販のCD73の品質はMSTスクリーンには不十分であることが確認されたので、Domainexはこれらのアッセイをサポートするために高品質のCD73タンパク質の生成も担当することになりました。

組み換えCD73タンパク質を大腸菌封入体から分離、リフォールディングし、数ミリグラム量で均一に精製することに成功しました。

生成されたタンパク質は、LeadBuilderバーチャルスクリーニングからのヒットを生化学分析とMSTアッセイの両方でスクリーニングするために使用されただけでなく、さらに社内でSTD-NMRとX線結晶構造解析を行うのに十分な高い収率と品質でした。

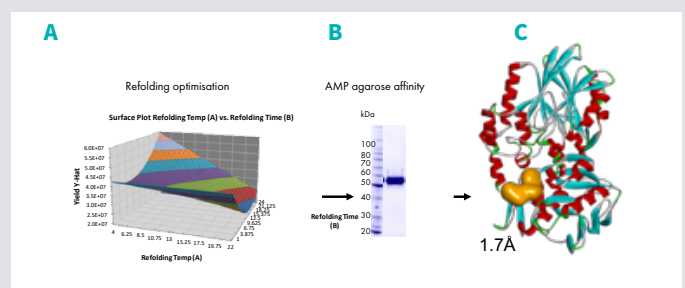


図1: (A) リフォールディングプロセスは、多様なリフォールディング温度、リフォールディング時間、タンパク質希釈率から最適化。(B) 数ミリグラム単位で均一の高純度のタンパク質を精製: SDS-PAGE分析。(C) CD73阻害物質であるアデノシン^{5'}-(α,β メチレン)ニリン酸塩 (AMPCP) に結合したCD73のX線結晶構造(データセット解像度1.7Å)。この構造はアポリタンパク質の開構造とよく重なり、これもまた解析された。

Domainexについて

Domainexは、英国のケンブリッジに拠点を置く、総合的創薬サービス会社です。

世界中で製薬会社、バイオテック、学術機関や、患者会にサービスを提供しています。

70名を超える経験豊かな生物学者と化学者とともに、疾患標的から候補化合物推薦まで、クライアント様とコラボレーションを行っています。

クライアント様に革新的なアイデアを提供し、高品質で画期的な実験を実施することで、確固たる評判を築いています。

私達は、クライアント様と強固でダイナミックな関係を築くことを目指しています。

2020年には、英国、ヨーロッパ、米国、オーストラリアの50を超えるクライアント様にサービスを提供し、プロジェクトの更新率は70%を上回ります。

Domainexは御社の創薬プロジェクトをどのように支援できるのか

分子生物学者、タンパク質生化学者、アッセイ生物学者、構造生物学者、医薬品化学者、計算化学者、分析化学者など、様々な分野の経験豊かな研究員が創薬プロジェクトを進行させることで、薬品開発を効果的かつ効率的にサポート致します。

弊社はカスタマイズされたプログラムを提供して、創薬の各段階において貴組織特有のニーズに対応致します。

過去20年間にわたって築かれた豊かな経験と専門技術を用いて、広範囲の創薬標的と治療領域に取り組んできました。

最新の先端技術にアクセスできる場所であるケンブリッジに拠点を集中させることで、貴組織の創薬パイプラインを強化し、目標達成に向けてご協力致します。

お問い合わせ

Domainexの創薬サービスについて詳細をご希望の場合、または御社の創薬ニーズについてご相談がある場合は、enquiries@domainex.co.ukまでお問い合わせください。

もしくは、次の担当者に直接ご連絡いただくこともできます。

トーマス・マンダー博士 MBA

最高経営責任者

tom.mander@domainex.co.uk

電話: +44 (0)1223 743174

携帯電話: +44 (0)7584 578024

Domainex

Chesterford Research Park

Little Chesterford

Cambridge

CB10 1XL, UK

ソーシャルメディア



Domainex



@Domainex_UK



発表論文

Reich et al., (2006) Combinatorial Domain Hunting: An effective approach for the identification of soluble protein domains adaptable to high-throughput applications. *Protein Sci.* Oct;15(10):2356-65

Maclagan et al., (2011). *Future Med Chem.* Mar;3(3):271-82

Meier et al., (2012). *J Struct Biol.* Feb;177(2):329-34

Zhang et al., (2015). *Structure.* Oct; 23: 1-13

McAlister M, et al. (2003). WO 03/040391



domainex.co.uk