



Title	Development of a novel and versatile affinity tagging system using an anti-podoplanin antibody NZ-1
Author(s)	藤井, 勇樹
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52245
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

[題名]

Development of a novel and versatile affinity tagging system using an anti-podoplanin antibody NZ-1

(ポドプラン抗体NZ-1を用いた新規アフィニティータグシステムの確立と応用)

学位申請者 藤井勇樹

Peptide-based epitope tagging technology is universally used in nearly all kind of research projects that involve biochemical characterization of a target protein, but not many systems are fully compatible with purification purpose. By utilizing an anti-human podoplanin antibody NZ-1, I constructed a novel epitope tagging system. NZ-1 possesses exceptionally high affinity toward a dodecapeptide (GVAMPGAEVV) dubbed “PA tag”, with a characteristic slow dissociation kinetics. Because of its high affinity, PA-tagged proteins in a dilute sample can be captured by immobilized NZ-1 resin in a near complete fashion and eluted by a solution of free PA peptide. This enabled efficient one-step purification of various proteins including soluble (e.g., an ectodomain fragment of neuropilin-1 and a human serum albumin) and membrane proteins expressed in mammalian cells. Mild regeneration condition of the peptide-bound antibody ensures repeated use of the antibody resin, indicating a cost-efficient nature of the system. PA tag/NZ-1 system also exhibits an outstanding performance in the immunodetection experiments (i.e., Western blotting and flow cytometry). An alanine scanning mutagenesis experiment revealed that many amino acid residues within the PA tag sequence contribute to the binding by NZ-1. To understand the molecular details of the PA tag-NZ-1 interaction at atomic resolution, I determined the X-ray crystal structure of the NZ-1 Fab fragment in complex with the PA tag peptide. In the structure, the PA peptide is docked in the antigen-binding cleft of the NZ-1, and there are numerous contacts involving the peptide region encompassing Met4-Asp10. In the NZ-1-bound conformation, the PA peptide assumed a tight 2-residue type II β -turn conformation at the Pro5-Gly6 sequence. This binding mode suggested an interesting possibility that PA tag may be inserted into a loop region of proteins, without losing its high affinity toward NZ-1. Using a cell adhesion receptor integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ as a model protein, I successfully inserted the PA tag into multiple loop regions in the ectodomain of $\alpha_{IIb}\beta_3$ and confirmed that all proteins were reactive with NZ-1. Moreover, by choosing the site of PA tag insertion, it was possible to modulate the function of resultant integrin by inducing conformational change upon the addition of NZ-1. As it is generally difficult to graft linear epitope tag in a structured protein domain, the PA tag system provide unique opportunity to attach purification/labeling handle to a target protein.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (藤井勇樹)	
	(職) 氏名
論文審査担当者	主査 教授 高木淳一 副査 教授 仲野徹 副査 教授 高島成二 副査 教授 中川敦史

論文審査の結果の要旨

対象論文 (Development of a novel and versatile affinity tagging system using an anti-podoplanin antibody NZ-1、和文タイトル: ポドプラニン抗体NZ-1を用いた新規アフィニティータグシステムの確立と応用) は、ヒトポドプラニン由来のペプチドに対する抗体NZ-1を利用して、極めて特異性と親和性の高い新規アフィニティータグシステム「PAタグ」を開発した研究について述べたものである。本論文では、12残基のリニアペプチド (PAタグ) を様々なモデル蛋白質に付加し、NZ-1の結合特性を詳細に調べることで、ペプチドと抗体の親和性が 10^{-10} Mオーダーの親和性を持つことを明らかにし、NZ-1を固定化したレジンを用いたアフィニティクロマトグラフィーによってPAタグを付加した蛋白質を極めて迅速に一段階精製できることを示した。また抗体レジンのマイルドな再生条件を発見し、60回以上も同じレジンでアフィニティー精製が可能なことも証明した。次にNZ-1のFabフラグメントとPAタグペプチドの複合体の結晶構造解析を行い、1.7Å分解能での構造決定に成功した。得られた構造から、NZ-1がPAタグ配列の中程のヘアピントーン構造を認識することが判明したが、これをヒントにPAタグを蛋白質の一次配列の中に挿入することを試みた。その結果、PAタグは非常にタイトなターン構造を取っているループ領域に挿入可能で、しかもその状態でもNZ-1による高親和性認識が保たれていることを明らかにした。このような「挿入可能なエピトープタグ」はこれまでに報告された例はない。これらの成果は組み換え蛋白質発現技術と精密な生化学および免疫学的分析手法を通して有用な精製方法の確立につなげただけではなく、その親和性と特異性の基盤を構造生物学的に解明し、さらにはその知見を蛋白質工学的手法を用いて新しい研究ツールの開発につなげたものである。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。