

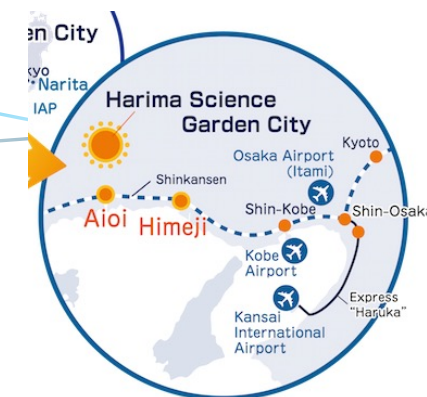
多段階自動精製システム構築を中心とした
医薬品標的タンパク質の精製から構造解析・機能解析までの
効率的ワークフロー

Kohei Takeshita

RIKEN SPring-8 Center/Univ. of Hyogo, Japan

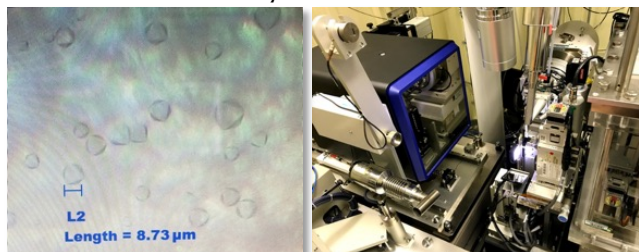


Structural Biology Beam-Lines Group



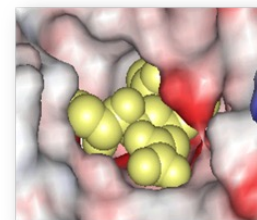
BL32XU

- ✓ Automation (ZOO system)
- ✓ High-energy/Micro-focused beam
- ✓ For micro crystal (< 10 micron)



BL45XU

- ✓ For Structural-based drug design
- ✓ Mail-in, Automation
- ✓ High-energy beam



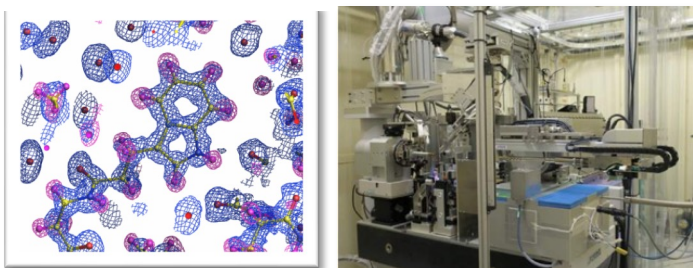
BL26B1

- ✓ Routine measurement
- ✓ Micro-spectroscopy
- ✓ For R&D



BL41XU

- ✓ High-energy beam
- ✓ For high resolution (< 1 Å)
- ✓ Time-resolved measurement



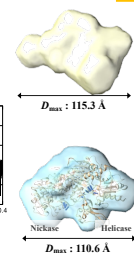
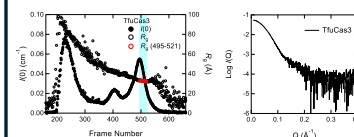
BL44XU

- ✓ For supramolecular
- ✓ multi-axis goniometer

BL12B2 (NSRRC, Taiwan)

BL38B1

- ✓ For Bio-SAXS



Cryo-EM facility

- ✓ Titan Krios (300K)
- ✓ Glacios (200K)
- ✓ CRYO ARM™ 200 & 300



タンパク質結晶構造解析の潜在的ユーザーの動向



構造生物 専門家

構造解析試料
を調製できる
+
結晶などの
解析用サンプル
を調製できる

資料評価から支援



潜在的 研究者

生化学者
細胞生物学者
動物実験学者
創薬志向研究者

フルサポートが必要



- 構造解析可能か、構造解析に手を出していいか分からない
 - ✓ 構造既知か？データベースを参照
 - ✓ PDBやPymolの使い方を紹介
- アッセイ用で蛋白質は作っているけど、
 - ✓ 構造解析に向けた配列設計（結晶化）
 - ✓ 精製法
 - ✓ サンプル評価
- 新規化合物との複合体構造を知りたい
 - ✓ リファレンスとなる蛋白質調製と結晶化および回折実験
 - ✓ どういった官能基をつけるといいかを議論



Today's Topics

多段階自動精製システム
+Cytiva™ Protein Select™ システム

AKTAと他Cytiva製品間のシームレスアクセス

創薬研究への応用



Today's Topics

多段階自動精製システム
+Cytiva™ Protein Select™ システム

AKTAと他Cytiva製品間のシームレスアクセス

創薬研究への応用

タンパク質精製に自動化が必要か？

- 生産性の向上
- ヒューマンエラーの回避
- リソースの節約
- 閉鎖系での精製 (in chamber)
- 人材育成





精製自動化のための標準化

- **Buffer**

Tris, リン酸, **Hepes** 等

- **Affinity tag**

ペプチドタグ(**HisTag**), プロテインタグ 等

- **Removal of the affinity tag**

特異的プロテアーゼ (**TEV, 3C**)

(その他)

- Expression plasmids

各種発現系ベクターの**マルチクローニングサイト**の共通化

*大腸菌, バキュロウイルス昆虫細胞, 動物細胞用など

Multi-Step Automated Protein Purification System

Combination of Loops valve (V9-L) and column valve (V9-C)



ÄKTA avant 25



V9-C



V9-L

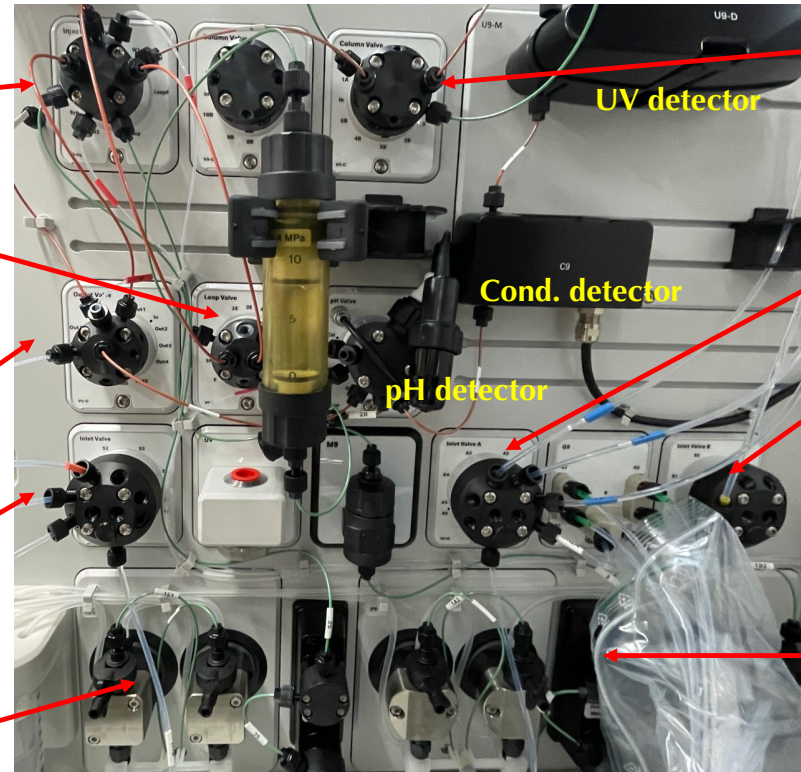
Inject valve
(V9-Inj)

Loop valve
(V9-L)
*5 loops

Outlet valve
(V9-O)
*7ports

Inlet valve
(V9-IS)
*7 ports

Sample pump



UV detector

Cond. detector

pH detector

Column valve
(V9-C/C2)
*10 columns

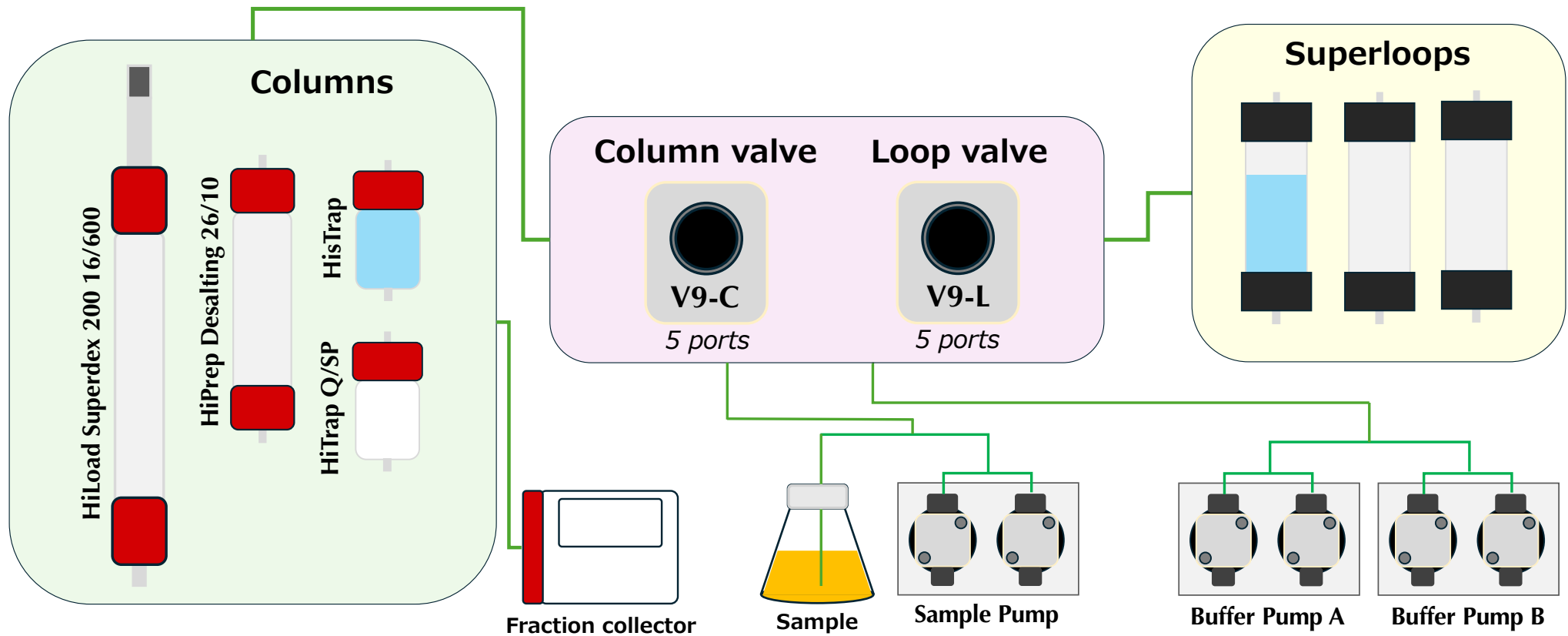
Buffer Inlet A
*7 lines

Buffer Inlet B
*7lines

Buffer pump
(A/B)

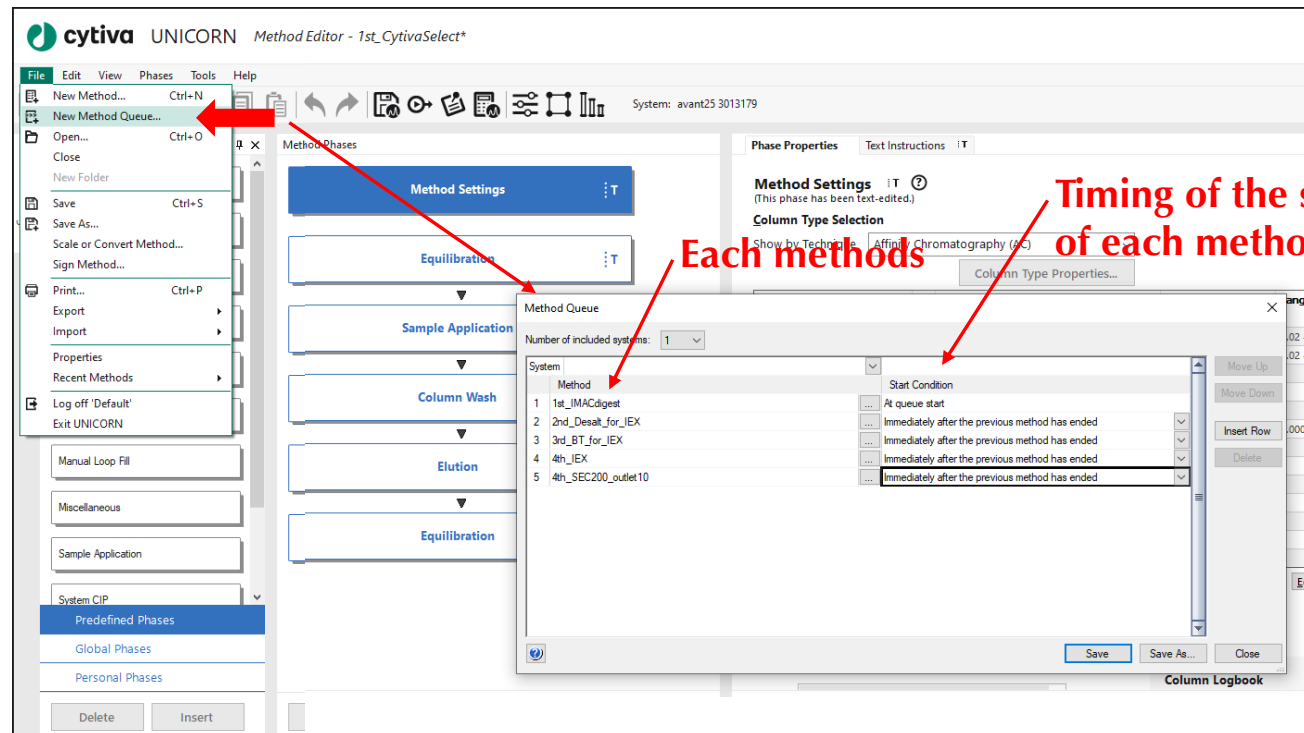
Multi-Step Automated Protein Purification System

“Multi-step peak to loops”



Automated purification system on ÄKTA

Execution of each purification programs in the queue



Method Queue

System	Method	Start Condition
1	1st_IMACdigest	At queue start
2	2nd_Desalt_for_IEX	Immediately after the previous method has ended
3	3rd_BT_for_IEX	Immediately after the previous method has ended
4	4th_IEX	Immediately after the previous method has ended
5	4th_SEC200_outlet10	Immediately after the previous method has ended

Timing of the start of each method

Each methods

Programs for IMAC, ion-exchange, Size exclusion chromatography, etc. are individually set and executed in the queue.

Multi-step AKTA automation ~Example 1~

Target Protein: Enzyme (30 kDa)
Expression system: Baculovirus-Sf9

Purification Step

1. Ni-IMAC
2. TEV digestion (overnight)

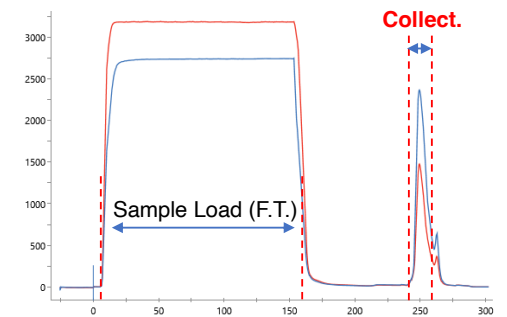
TEV protease is pre-loaded into a super-loop that will collect the Ni-IMAC elution fraction.

**TEV
protease**

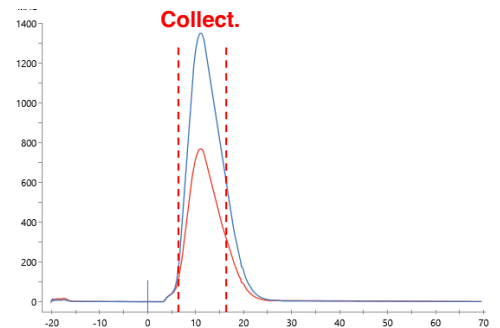


3. Desalt
For imidazole removal
4. Reverse-trap (Ni column)
For HisTag removal
5. Size exclusion chromatography

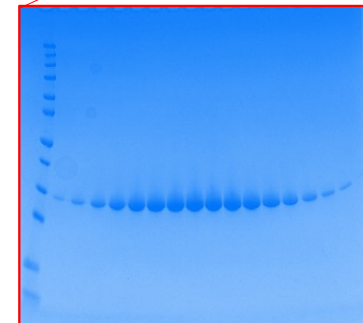
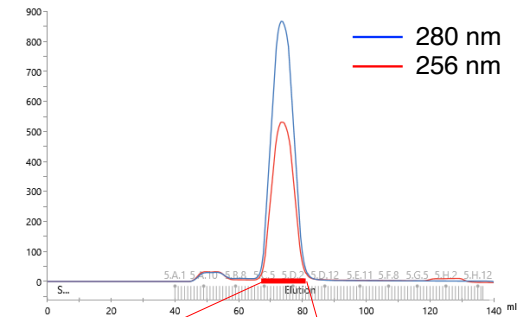
1. Ni-IMAC



4. Reverse-trap (Ni-column)



5. Size exclusion chromatography



Multi-step AKTA automation ~Example 1~

Target Protein: Enzyme (30 kDa)
Expression system: Baculovirus-Sf9

Purification Step

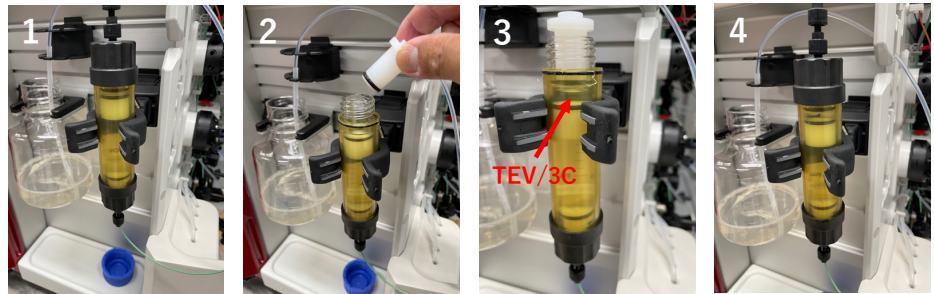
1. Ni-IMAC
2. TEV digestion (overnight)

TEV protease is pre-loaded into a super-loop that will collect the Ni-IMAC elution fraction.

TEV
protease



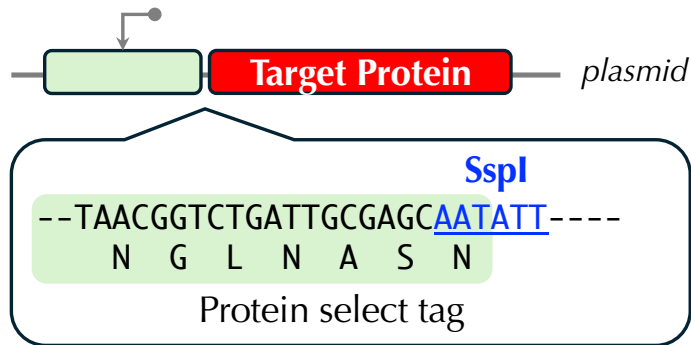
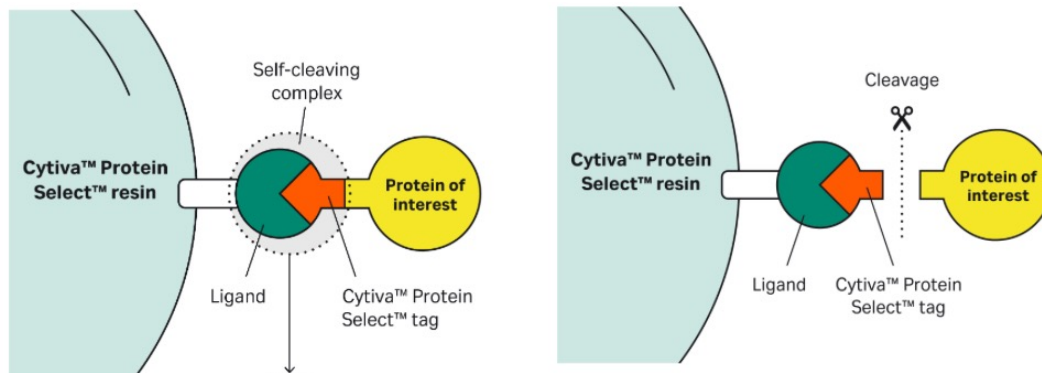
Pre-load of TEV or 3C protease



煩わしい、、、

3. Desalt
For imidazole removal
4. Reverse-trap (Ni column)
For HisTag removal
5. Size exclusion chromatography

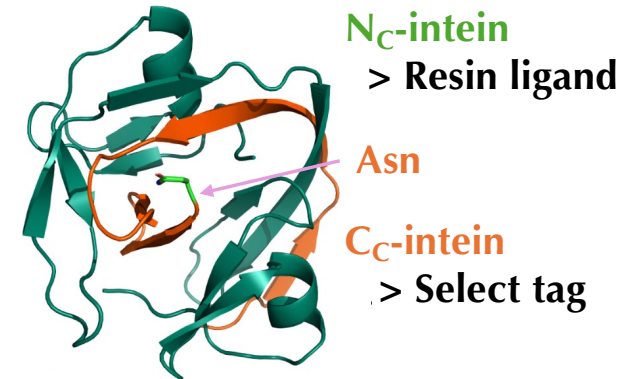
New Automated system including Cytiva™ Protein Select™



Cloning of target genes

- Seamless or blunt-end cloning after SspI digestion.

- Applications of protein splicing by intein

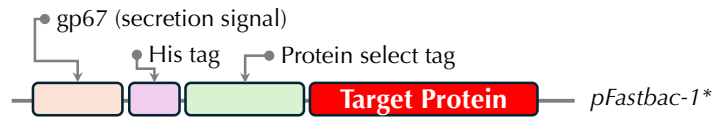


- N-terminal intein segment (N_C -intein)
- C-terminal intein segment (C_C -intein)
- High affinity ($K_D < 1.0 \text{ pM}$)
- Cysteine-less (No reducing agent required)

New Automated system including Protein Select™

Target Protein: Extracellular domain (70 kDa)

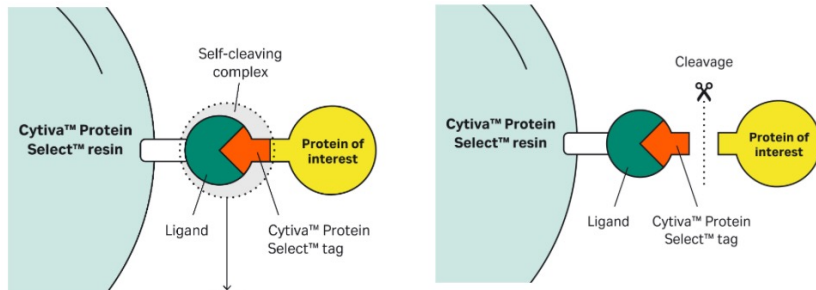
Expression system: Secretory expression using baculo.-Sf9



Purification Step

1. Ni-IMAC

2. Protein Select



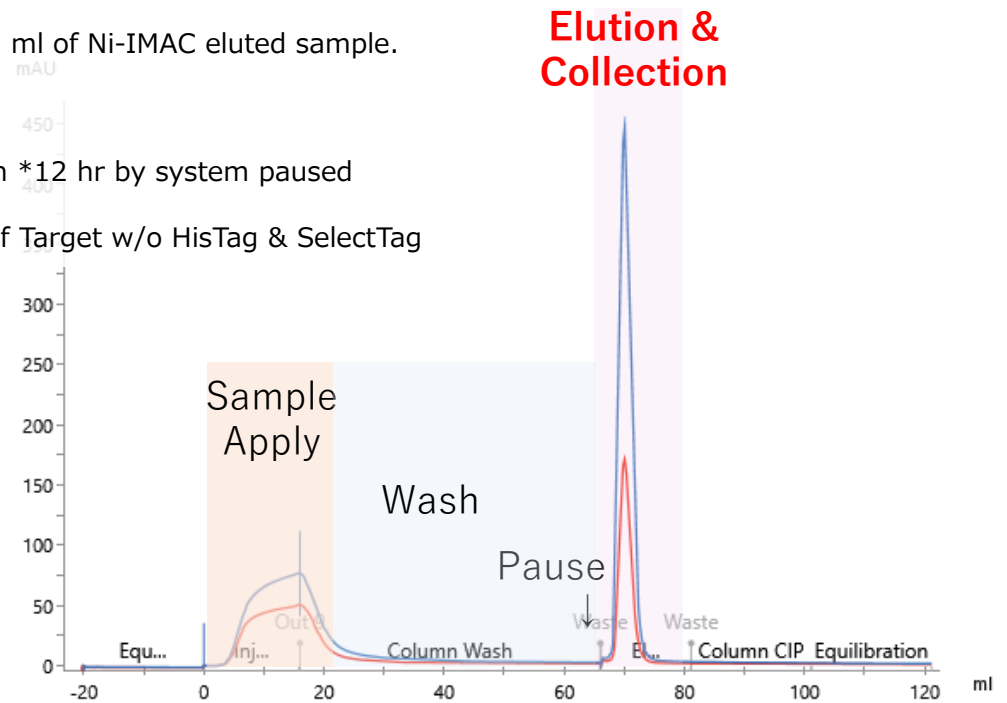
5. Size exclusion chromatography

Apply 40 ml of Ni-IMAC eluted sample.

↓
Wash

↓
Digestion *12 hr by system paused

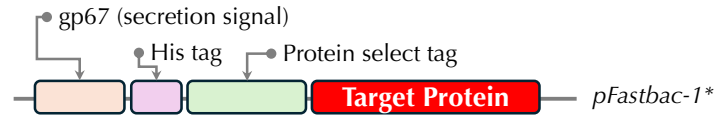
↓
Elution of Target w/o HisTag & SelectTag



New Automated system including Protein Select™

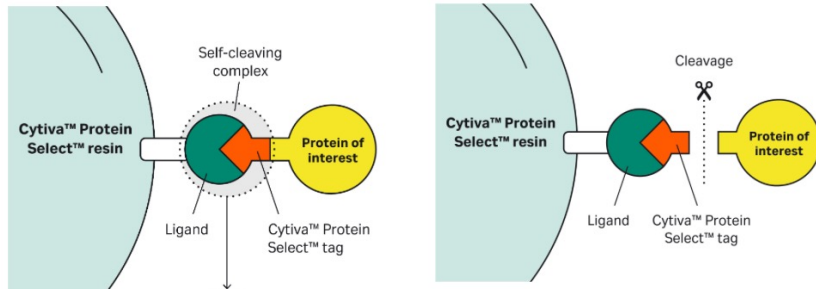
Target Protein: Extracellular domain (70 kDa)

Expression system: Secretory expression using baculo.-Sf9

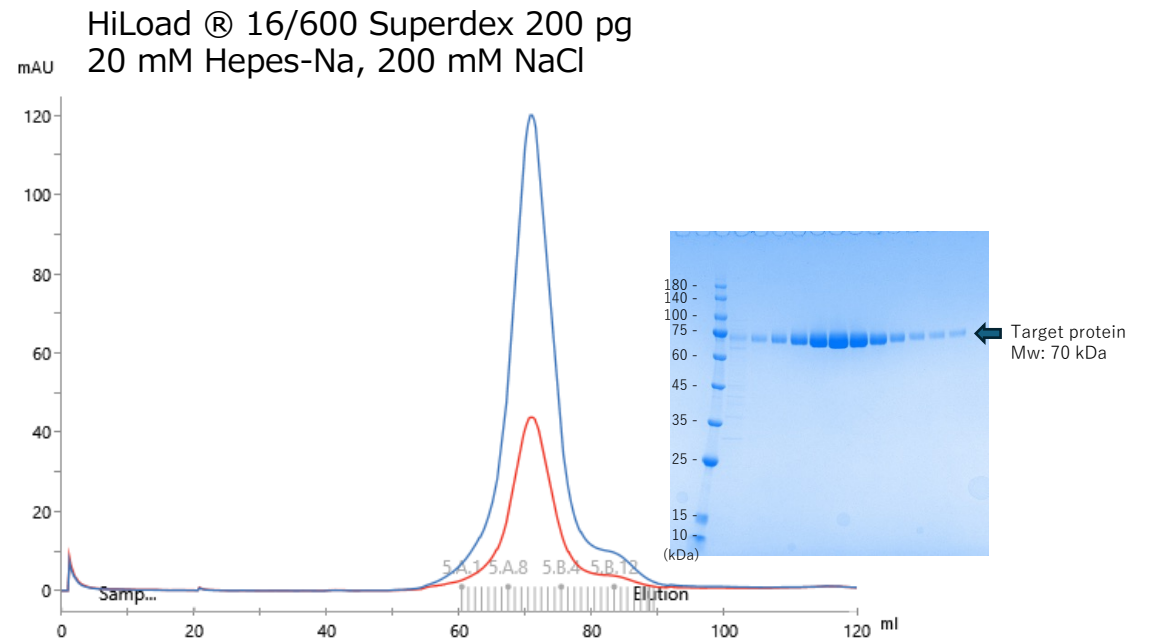


Purification Step

1. Ni-IMAC
2. Protein Select



5. Size exclusion chromatography



Protein Select™

～特殊な例～

The 2nd position is proline.

- select tag - Gly^{1st}-Pro^{2nd}-His^{3rd}-Met^{4th}-....
- Histamine methyltransferase

Homo-oligomer

- Trimer
- Dioxygenase

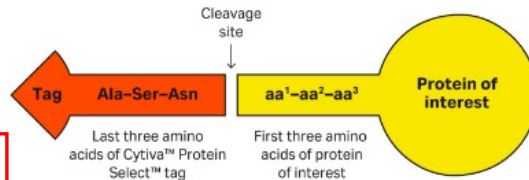
Membrane protein

- Voltage sensor(4TM)
- Voltage-gated H⁺ channel

Main factor affecting tag cleavage kinetic: 1-3 amino acids of N-terminus of target protein

- Amino acid residues of the target protein will affect the active-site formation and spatial arrangements of catalytic amino acids.

- Proline in the first or second position of the target protein causes an extremely slow cleavage reaction.



約20℃で二晩で切れる

Results from the cleavage kinetics studies*

Second amino acid (aa²)	First amino acid of the target protein (aa¹)					
	Charged		Small		Hydrophobic	
	Glu E	Arg R	Ser S	Ala A	Leu L	Phe F
Glu E	Slower	Slower	Slower	Slower	Slower	Medium
Arg R	Slower	Medium	Faster	Slower	Faster	Faster
Ser S	Slower	Faster	Medium	Slower	Medium	Medium
Ala A	Slower	Medium	Medium	Slower	Medium	Faster
Leu L	Slower	Faster	Faster	Medium	Faster	Faster
Phe F	Faster	Faster	Faster	Faster	Faster	Faster

切断しやすい配列を検討しても切れず..

二番目がプロリンでも切れる
*ほぼ切れる (4℃ x 一晩)

Protein Selectも万能ではない (と思います)



Cost comparisons

*my own research

	Protein Select	HisTag/Enzyme
タグの位置	N末	N末, C末
結合容量 (per ml)	20 mg	15– 80 mg
切れ残り	なし	TEV: G HRV3C: GP
K_D	< 1 pM	数十 μ M
規格	カラム, 樹脂	カラム, 樹脂
価格 (per ml)	3,347円 100 mlから換算	Ni-NTA: 2,200円 TEV: 24,000円/mg 3C: 30,000円/mg



Today's Topics

多段階自動精製システム
+Cytiva™ Protein Select™ システム

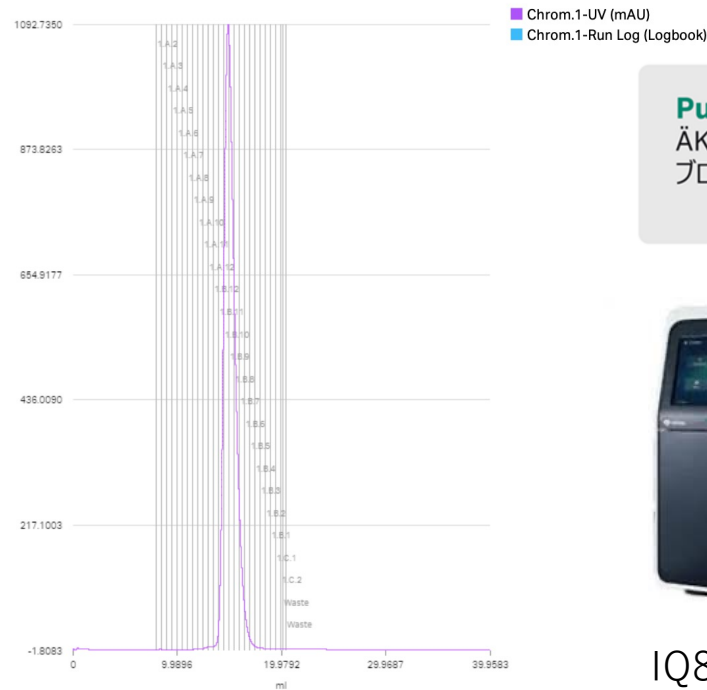
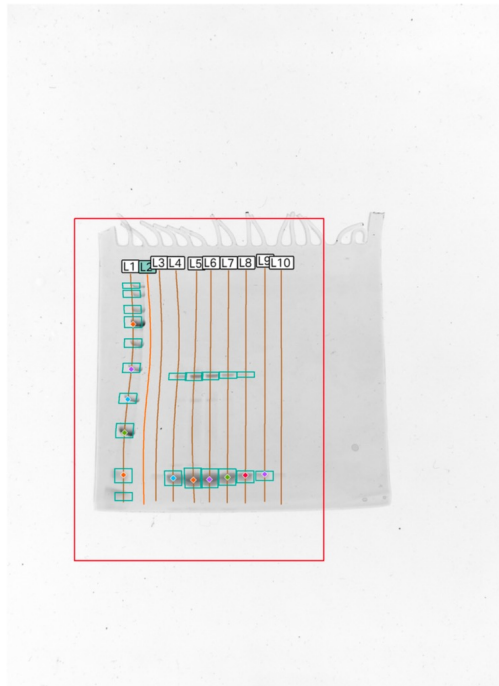
AKTAと他Cytiva製品間のシームレスアクセス

創薬研究への応用

IQ800/IQTL



VI. Purity



Purity analysis

ÄKTA™からクロマトグラムをインポートし
プロットングデータと統合



IQ800/IQTL



AKTA series

AKTAとImageQuant800/ ImageQuant TLをシームレスに使い
クロマト結果とPAGE結果を一括管理

IQ800/IQTL

The screenshot displays the IQ800/IQTL software interface. On the left is a sidebar with navigation options: Image, Lanes, BG, Bands, MW, Compare, Normalize, Quant. Cal., Purity, and Results. The main area is divided into several sections:

- Top Left:** A small image of a 10-lane PAGE gel with lanes labeled L1 to L10.
- Top Center:** A chromatogram plot showing intensity versus volume (ml) for Lane 3. The x-axis ranges from 0 to 39.9583 ml, and the y-axis ranges from -1.8083 to 1092.7350.
- Bottom Center:** A zoomed-in chromatogram plot for Lane 3, showing two peaks labeled 1 and 2. The x-axis is Position (mm) from 0 to 75.1300, and the y-axis is AU from -0.0016 to 0.1070.
- Bottom Right:** A table of results for Lane 3, showing Volume, Band %, and Lane % for two bands.
- Right Panel:** A 'Link to Chromatogram' section with a list of steps: 1. Import Chromatogram Curves, 2. Input Sample Information, 3. Add Method Information, 4. Link Chromatogram Peaks to Lanes, 5. Export PDF. Below this is an 'Import Chromatogram' button and a 'COMMENT' field. At the bottom of the right panel are checkboxes for 'Image', 'Lanes', 'Lanes and Bands', 'None (image only)', 'Chrom. 1 UV (mAU)', and 'Chrom. 1 Run Log (Logbook)', as well as 'Lane Table', 'Band Table', 'Chromatogram', 'Fractions', and 'Lane Profile'.

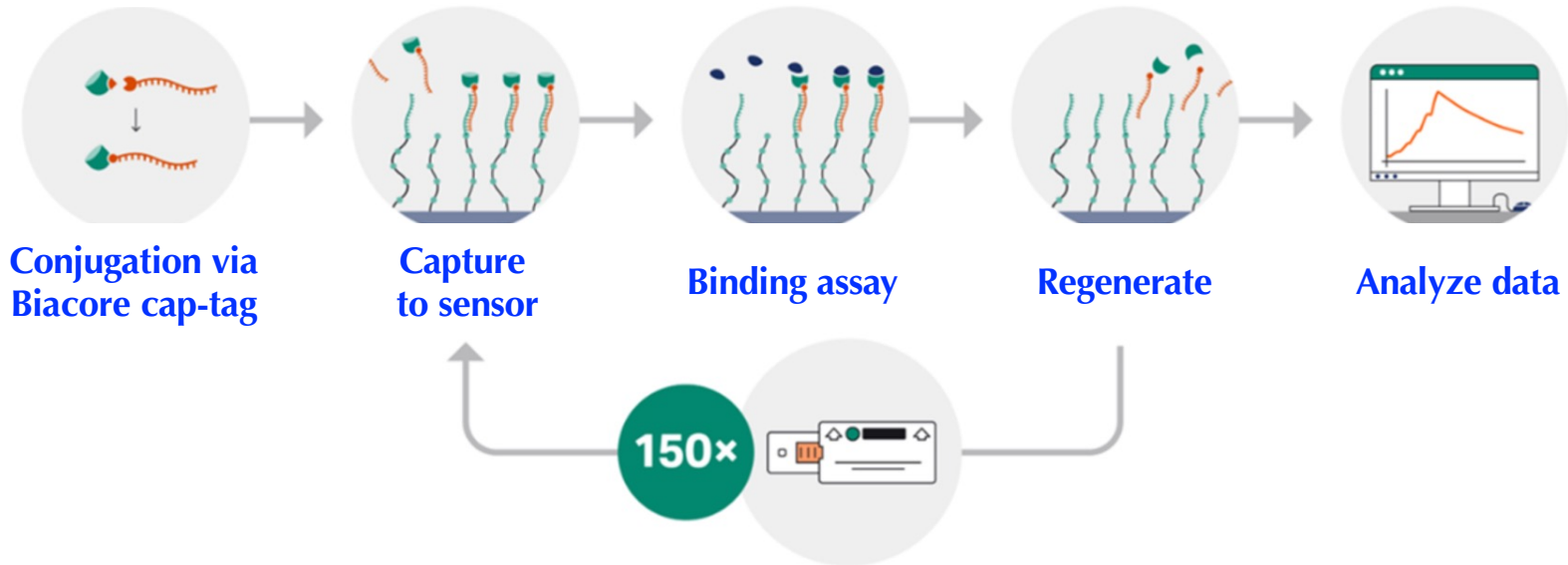
Lane #	Volume	Band %	Lane %
L3 1	41.3356	9.6792	8.1679
L3 2	385.7179	90.3208	76.2181
L4 1	124.2120	15.6469	13.9535
L4 2	669.6334	84.3531	75.2238
L5 1	106.2468	15.5743	13.9919
L5 2	575.0469	84.4257	75.9476

AKTAとImageQuant800/ ImageQuant TLをシームレスに使い
クロマト結果とPAGE結果を一括管理

Biacore™ Cap-tag capture

タグがないことが困ることも、

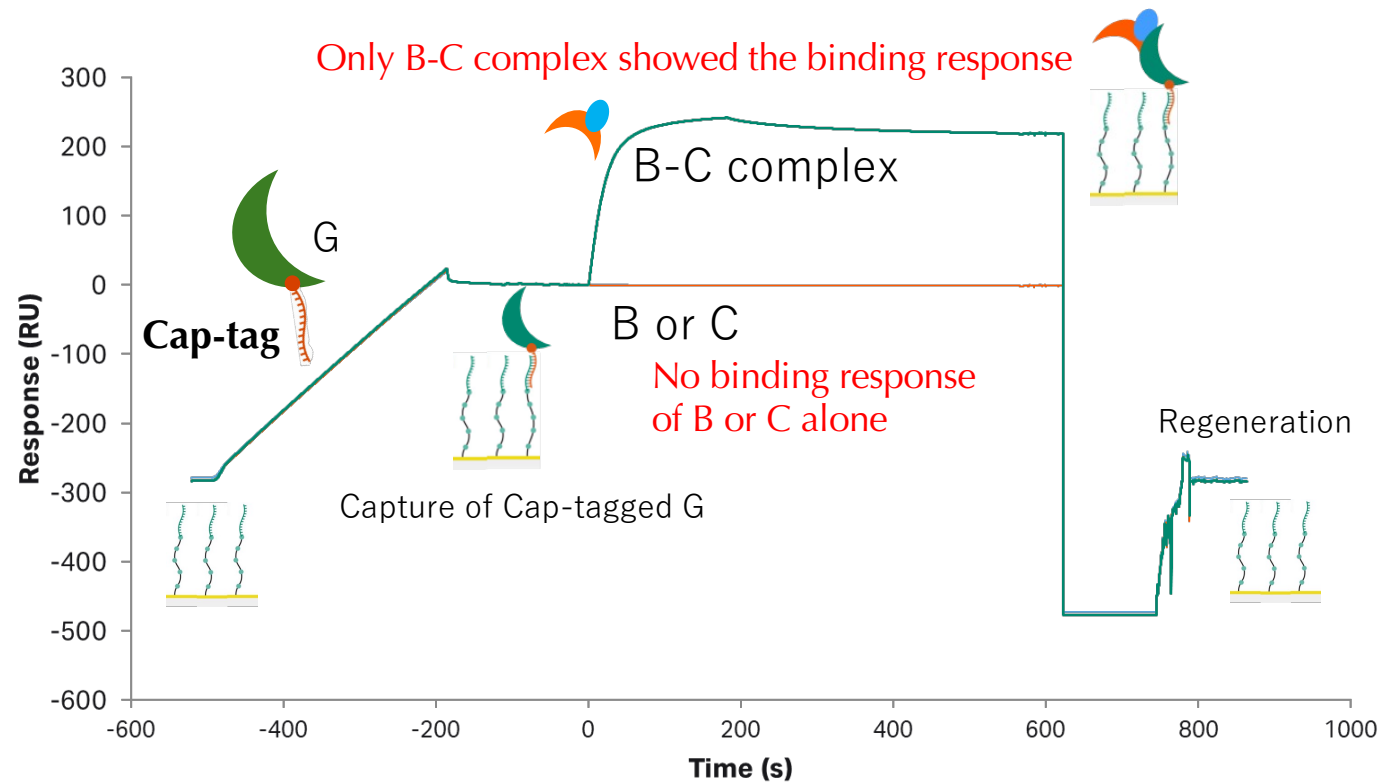
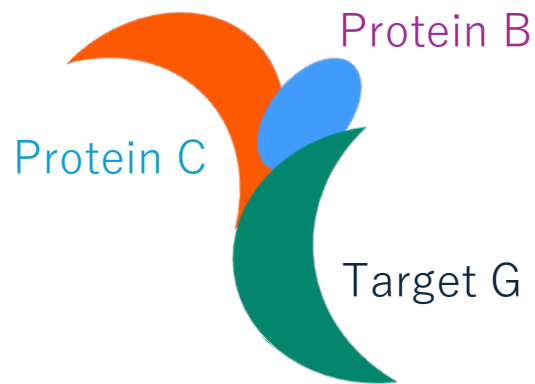
*Cap-tag: Proprietary ssDNA



- Simple and stable capture of tag-free proteins
- Mild immobilization method
- No need to develop attachment or regeneration conditions
- Reusable and cost-effective

Protein - Protein Interaction (Ternary interaction)

Structural information



A combination of **Protein-Select tag** & **Cap tag capture system** is compatible.

Amine coupling vs Cap-tag capture

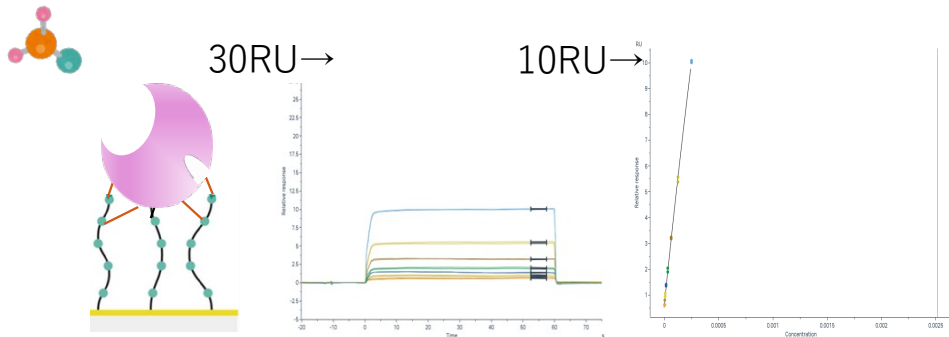
HNMTに対するTacrine (MW=198)の相互作用

Amine coupling

K_D 解析不可能

結合レスポンスが飽和しない

⇒ 検出レスポンスは非特異的結合

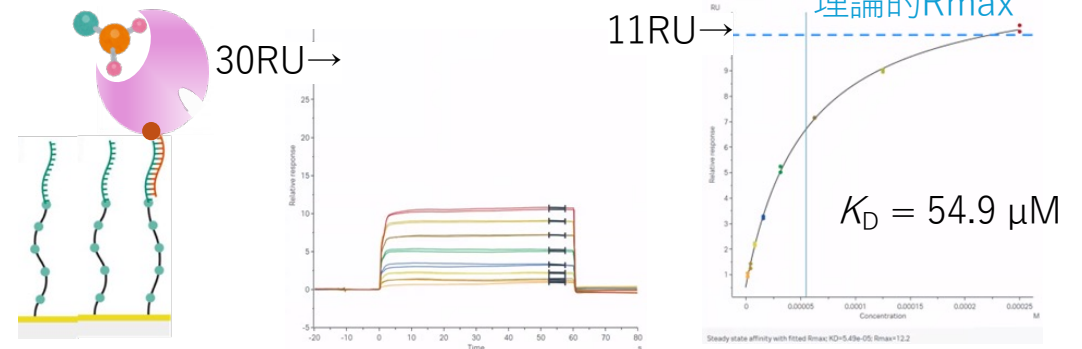


Cap-tag capture

$K_D = 54.9 \mu\text{M}$

結合レスポンスが理論的Rmaxで飽和

⇒ 検出レスポンスは特異的結合



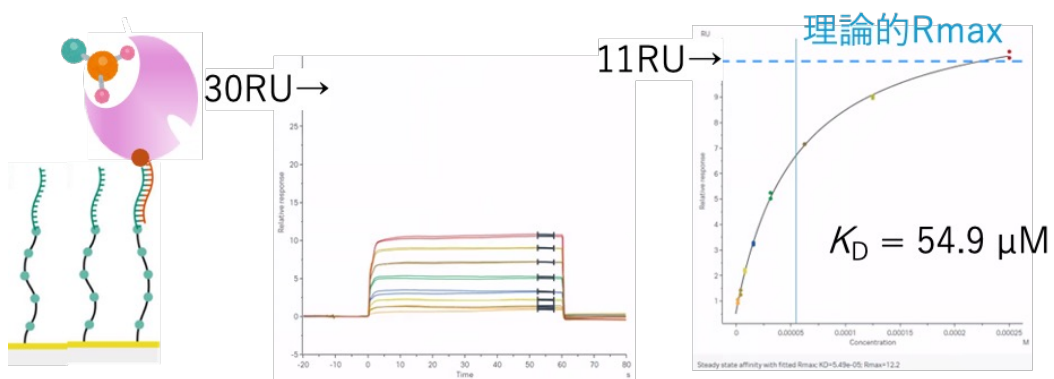
- 弱酸性条件下で行うアミンカップリングにより変性する場合がある
- Cap-tag captureはマイルドなリガンド固定化法である
 - アミンカップリングでは検出しにくく相互作用も
- Cap-tag captureでは良好に検出できる場合がある

結合部位数情報の複合体結晶構造との相関

HNMTに対するTacrine (MW=198)とAmodiaquine (MW=356)の相互作用比較

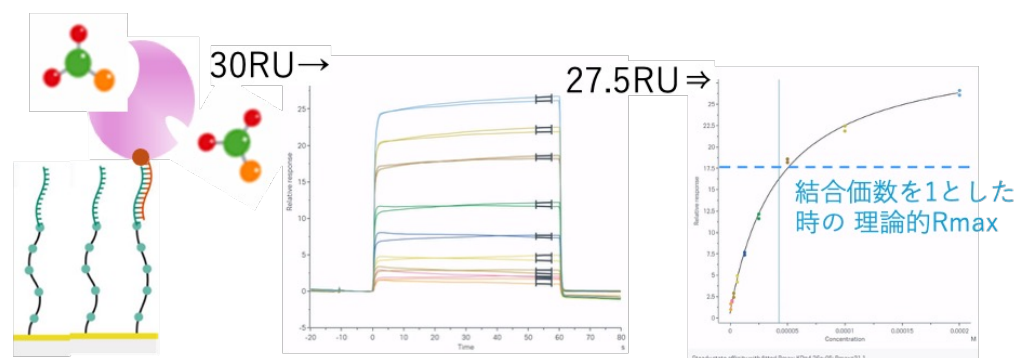
Tacrine (1か所に結合)

レスポンスは理論的Rmaxとほぼ等しい高さで飽和する



Amodiaquine (2か所に結合)

レスポンスは結合価数を1とした場合より大幅に高い高さで飽和する



- ・ SPRのレスポンスは密度変化（正確には屈折率変化）と比例関係
- ・ 質量あたりの屈折率が等しい前提ではあるが結合数部位数の参考情報になる



Today's Topics

多段階自動精製システム
+Cytiva™ Protein Select™ システム

AKTAと他Cytiva製品間のシームレスアクセス

創薬研究への応用

Connect to Structural biology

Auto-purification



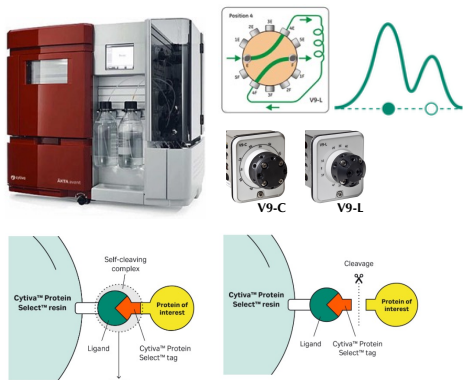
Crystallization



XRD



Peak-to-loop by Avant



Seamless Link



Purity analysis
ÅKTA™からクロマトグラムをインポートし
プロテティングデータと統合

**ImageQuant TL analysis
software modules**
再現性の高いデータを誰でも簡単に



Crystallization & Liquid Handler



Observation & recording

BL32XU

- ✓ Automation (ZOO system)
- ✓ High-energy/Micro-focused beam
- ✓ For micro crystal (< 10 micron)

BL45XU

- ✓ For Structural-based drug design
- ✓ Mail-in, Automation
- ✓ High-energy beam

BL26B1

- ✓ Routine measurement
- ✓ Micro-spectroscopy
- ✓ For R&D

BL44XU

- ✓ For supramolecular
- ✓ multi-axis goniometer

BL12B2 (NSRRC, Taiwan)

BL41XU

- ✓ High-energy beam
- ✓ For high resolution (< 1 Å)
- ✓ Time-resolved measurement

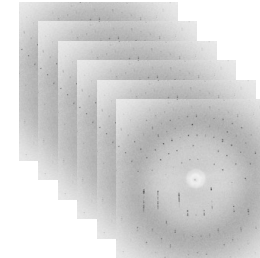
BL38B1

- ✓ For Bio-SAXS

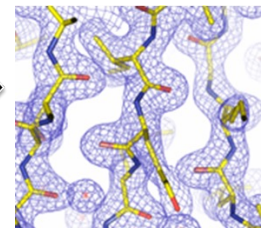
Cryo-EM facility

- ✓ Titan Krios (300K)
- ✓ Glacios (200K)
- ✓ CRYO ARIM™ 200 & 300

XRC



Diffraction data set



0.000001 mm

～過眠症治療薬開発研究～

- ・主なタイプ
ナルコレプシー、特発性過眠症、睡眠時無呼吸症候群、
反復性過眠症（眠り姫症候群）
ポストウイルス症候群（COVID-19感染後）
- ・根治的治療法が確立されていない

<ナルコレプシー>

- ・日本での有病率は世界的に高い
- ・発症年齢は若年層（10～20代前半）

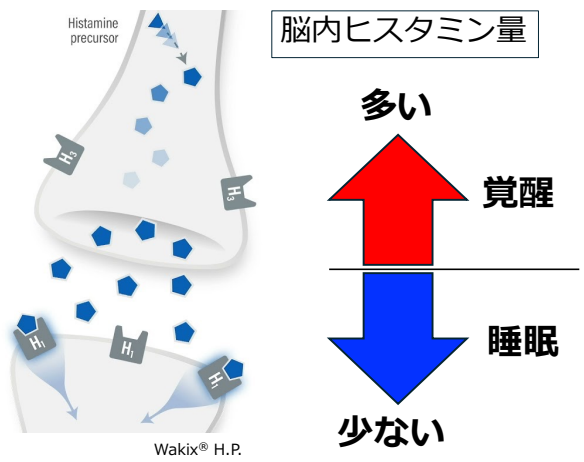
受験など重要な試験中で寝てしまった、
取引先で話している途中で寝てしまった、
日常生活で壮絶なトラブルがある。
運転中などでも起こり得る。

症候学的な3つの基本的特徴

- ① 眠気発作の反復
- ② 情動脱力発作
- ③ REM睡眠先行

**学業や就業における困難など、日常生活に深刻な影響をもたらす
日本では1万人当たり16人～18人（全世界で300万人以上）**

脳中ヒスタミン量と覚醒作用



脳の中のヒスタミン作用を減らすと、
2/3の人が眠気を訴える

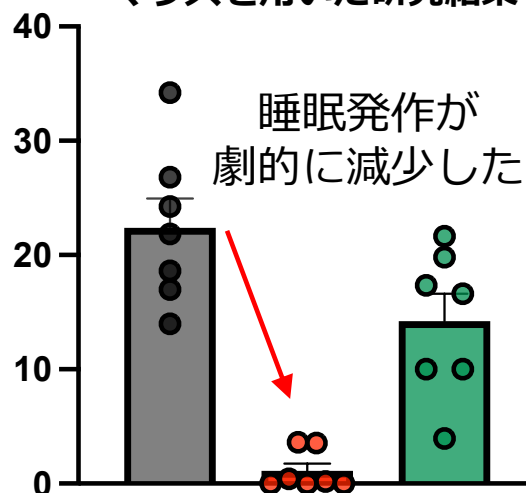
Weather news : 2019/3/31

東京都医学総合研究所が日本の
ナルコレプシー患者を対象に行った解析

	相対的ヒスタミン濃度
健常対照群	0.287
ナルコレプシー患者群	0.057

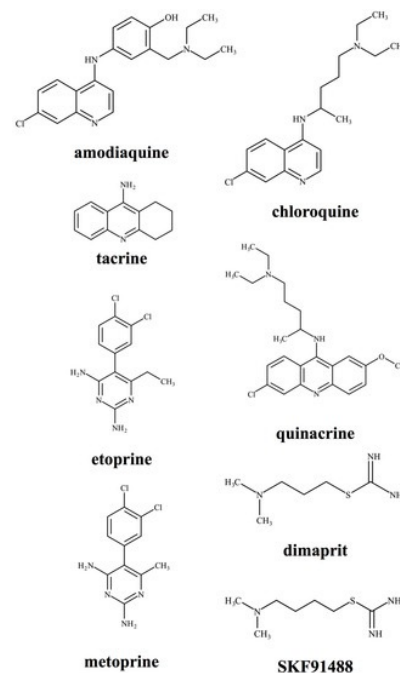
Sleep : zsaa095, 2020

ナルコレプシー患者さんと類似の症状をもつ
マウスを用いた研究結果



■ 対照薬
■ HNMT阻害薬
■ ピトリサント
(欧米の治療薬)

既知のHNMT阻害薬



Int J Mol Sci, 2019, 20: 737

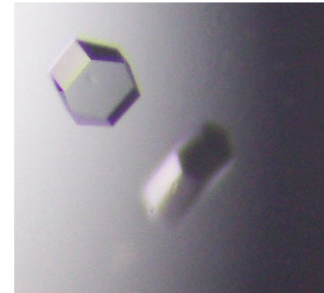
標的特異性が低い
脳移行性が低い

新規HNMT阻害薬の
開発が必須

脳内ヒスタミン量を高めれば症状が改善すると期待される

Automated purification system to Structural based drug design

- Crystall-based SSDB requires large amounts of protein, resulting in a routine purification work cycle.
- An automated purification system is used to ensure a stable sample supply.



Protein sample purified by automation system

- High enough purity for crystallization.
- It should be fully adaptable to

Green: target protein (enzyme)

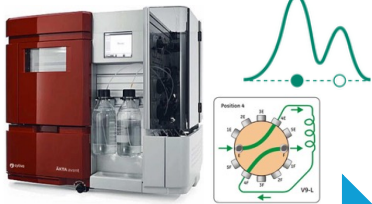
Black mesh: Ligand (inhibitor) ***confidential**

Yellow: coenzymes

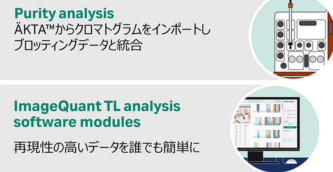
Automated purification system seamlessly links to various studies

Automated Purification

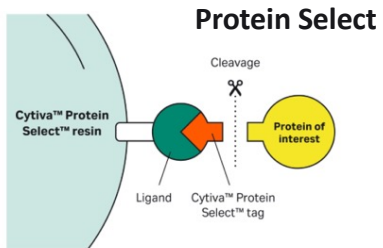
Peak-to-loop by Avant



Multi-step Automation



Evaluation

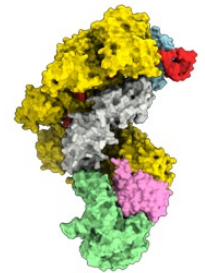
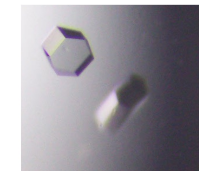


tag-free
protein

Analysis

Structural Study

- MX, Cryo-EM, SAXS
- **Structural-based drug design**



Functional Research

- Biological assay
- **Molecular interaction analysis**





Summary

多段階自動精製システム
+Cytiva™ Protein Select™ システム

AKTAと他Cytiva製品間のシームレスアクセス

創薬研究への応用

