

## 平成 27 年度 全体研究開発報告書

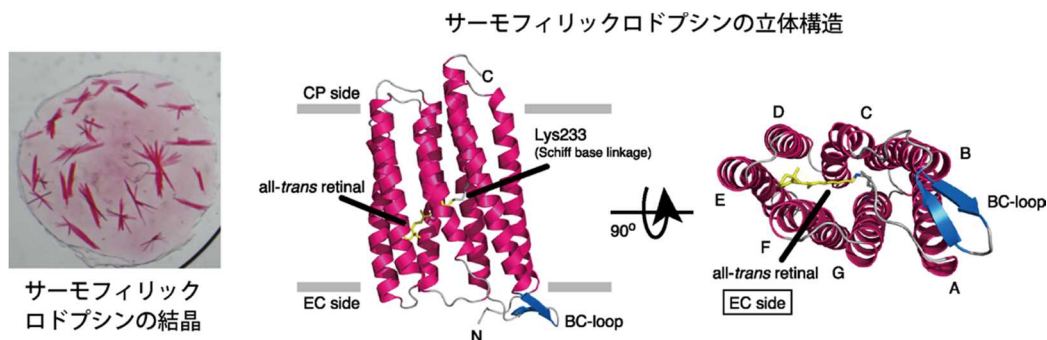
1. 補助事業名：創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業  
(創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業)
2. 補助事業課題名：創薬ターゲットとして重要なヒト膜タンパク質の生産及び結晶化支援基盤  
(高発現変異ヒト膜タンパク質の生産技術の支援と高度化)
3. 研究開発代表者：千葉大学大学院理学研究科 教授 村田武士
4. 研究開発の成果

### 「支援」

#### ①高発現変異ヒト膜タンパク質の生産技術の支援

##### ①-1 岡山大学への支援 (課題番号：1032)

高発現変異ヒト膜タンパク質の生産技術は他のタンパク質生産技術にも適用可能であるため、本依頼を採択し、支援課題としている。平成 26 年度はオプトジェネティクスへの利用価値が期待されている好熱菌由来のサーモフィリックロドプシン (TR) の X 線結晶構造解析に成功した。本年度は得られた結晶構造から予測される耐熱化メカニズムを考察し、論文にまとめた (下図; Tsukamoto, T. *et al.* **J. Biol. Chem.** 印刷中)。



##### ①-2 課題代表者 (小林) との連携と支援

課題代表者 (小林) を補完する形で理論的熱安定化予測法 (高度化の欄に記載) の支援を行った。ヒト・プロスタグランジン受容体に関しては、提案した10種類の理論的熱安定化予測変異体のうち、2種類が実際に耐熱化していた。これらの耐熱化変異体を用いることで、結晶の分解能が4.5 Åから3.0 Åに向上し、構造解析に成功した (論文準備中)。また、同予測法によりアンタゴニスト結合型 (不活性型) に安定化する方法を見出した。これまでに結晶すら得ることのできなかつた低親和性リガンドが結合したヒト・受容体Xの高分解能結晶を取得し、構造解析に成功した (論文準備中)。

##### ①-3 新潟大学への支援 (課題申請中)

出芽酵母発現システムを用いてトランスポーターX (リソソームアミノ酸輸送体) の大量発現系の構築を行った。現在精製条件を検討中である。

##### ①-4 自治医科大学への支援 (課題申請中)

愛媛大学から提供いただいたコムギ無細胞系で発現させたヒト・オキシトシン受容体について、界面活性剤やコレステロール、リガンドなどの影響を調べた。得られた最適条件下で、ヒスタグを用いた部分精製を行った。今後は大量精製系を確立し、機能性抗体の取得や共結晶構造解析を目指

す。

#### ①-5 製薬企業への支援

製薬企業に対して、ヒト膜タンパク質（創薬標的GPCR）の酵母および大腸菌を用いた大量生産方法についての技術指導を行った。

#### ①-6 CN-PAGE法の支援

制御拠点合成領域のグループと共同で開発した Clear Native-PAGE (CN-PAGE) について、サンプルやプロトコルを提供した（計6件）。

### 「高度化」

#### ②高発現変異ヒト膜タンパク質の生産技術の高度化

##### ②-1 大腸菌を用いたヒト膜受容体の大量発現技術の高度化

大腸菌発現系ではヒト膜受容体の大量生産は難しい場合が多いことが知られている。我々はN末端のタグの種類や培養条件を検討することにより、比較的耐熱性が高いと知られているヒト・アデノシン受容体の生産技術を確立した。しかし、耐熱性が低いヒト膜受容体では発現量が低く、生産システムとして利用するのは難しかった。今後は以下に示した理論的熱安定化予測法により耐熱化後、本技術の検証を行う予定である。

##### ②-2 理論的熱安定化予測法の開発

理論科学を専門とする京都大学の木下正弘教授と共同で、ヒト GPCR に対して、理論計算を用いて耐熱化変異体を予測する技術の開発を行った。理論計算を行うためには標的 GPCR の詳細構造情報が必要となる。そこで、我々が明らかにしたヒト・アデノシン受容体 (A<sub>2A</sub>R) の結晶構造情報を用いて、すべてのアミノ酸置換に伴う生体膜のエントロピーの利得（損失）を液体の統計力学理論と形態熱力学的アプローチの統合型方法論により計算し、耐熱化変異体を予測した（下図）。そして実際に変異体を作製し熱安定性を調べ、実験結果を理論予測にフィードバックし、パラメータを精密化するプロセスを繰り返した。そして現在は、耐熱化すると予測された上位で約5割的中率まで向上している（WO2015/1991621A1 ; Yasuda, S. *et al.* **J. Phys. Chem. B**, 120, 3833-3843, 2016）。

