

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（安定化改変体スクリーニング系の高度化・支援）
3. 研究開発代表者：国立大学法人九州大学 大学院薬学研究院 助教 白石充典

4. 研究開発の成果

(1) 支援：安定化膜タンパク質の高速スクリーニングに関する技術支援

①細菌毒素の標的となるヒト G タンパク質共役型受容体 (GPCR) のサッカロマイセスを用いた大量調製系の確立を行った。これまで 30 種類程度改変体を作製した中で最も安定なものについて、サッカロマイセスを用いた大量培養の条件検討、界面活性剤や精製方法の最適化により、ミリグラムオーダーで調製可能な方法を確立した。また精製した受容体と低分子アンタゴニストとの相互作用を等温滴定型カロリメーター (ITC) により確認した。②プリン受容体 (GPCR の 1 種) の安定化およびサッカロマイセスを用いた大量調製系の確立を行った。高発現する (培地 1L あたり 1mg 程度) 改変体を作製したが、精製時の安定性に難があったため、千葉大学の村田武士教授に依頼し理論的熱安定化予測法により 25 種類の変異を提案頂いた。これらの変異を 2 種類の改変体に導入し (計 50 種類)、その中から最も熱安定性が向上した変異体 1 つについてサッカロマイセスを用いた大量調製系の確立を行った。③課題内の技術共有として、課題管理者 (京都大学小林拓也准教授) グループの博士研究員 1 名に、サッカロマイセスを用いた膜タンパク質スクリーニングシステムの技術指導を行った。

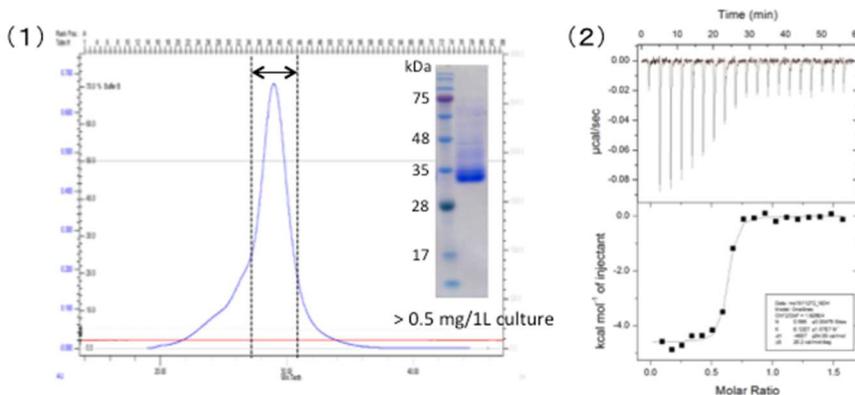


図 (1) 毒素標的受容体のゲル濾過による最終精製, (2) ITCによる低分子リガンドとの相互作用解析

(2) 高度化：膜タンパク質改変体スクリーニングシステムの高速化・高度化

本研究にて開発してきた、サッカロマイセスを用いた 96 ウェルプレート形式での膜タンパク質改変体スクリーニングシステムに関して、種々の GPCR を用いてバリデーションを行った。その結果ウェル間の誤差が小さく信頼性が高いこと、これにより小さな安定性の向上でも判別できることを示した。また構造未知の GPCR_A を中心に、高発現・安定化に必要な因子の探索をおこなっているが、今年度はこれまでよりも 2 倍程度発現が向上する新たな変異を発見した。結晶性を向上させるために細胞内第 3 ループに蛋白質を融合するが、融合蛋白質の種類によっては発現が大幅に低下する。今回発見した変異はこの問題の解決につながり、困難であった融合蛋白質の大量調製に貢献した。高速スクリーニングシステムを応用し、京都大学の小林拓也准教授との課題内連携として、大規模変異体スクリーニング (構

造未知 GPCR_B の活性型構造の安定化を目指した受容体の膜貫通領域（約 250 残基）に対するセミランダム化スクリーニング）に着手した。現在までにヘリックス 1 および 2 の計 60 ヶ所について解析を行い、19 ヶ所で安定化または発現の向上が確認できた。

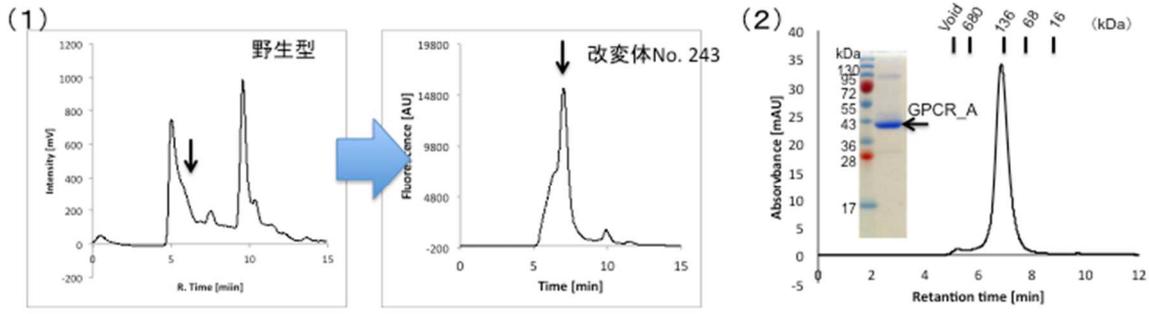


図 (1) GPCR_A について野生型と改变体No.243の蛍光ゲル濾過(FSEC)パターン, (2) 精製後の GPCR_A のゲル濾過パターンと SDS-PAGE