

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金  
(創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業) 補助事業成果報告書

## I. 基本情報

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）  
Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research  
(Platform for Drug discovery, Informatics, and Structural life science)

補助事業課題名：（日本語）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  
（英語）Platform for production and crystallization of human membrane protein

補助事業担当者 （日本語）京都大学大学院医学研究科 准教授 小林拓也  
所属 役職 氏名：（英語）Takuya Kobayashi, Associate Professor,  
Graduate School of Medicine, Kyoto University

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

## II. 成果の概要（総括研究報告）

### 「支援」

#### ①膜タンパク質の安定化技術を用いた支援

蛍光タンパク質（GFP）を指標とした出芽酵母発現システムを利用して、膜タンパク質の単分散性を評価した。GPCR の場合は、融合タンパク質（リゾチーム）の第三細胞内ループ内への挿入位置を決めることで、安定化変異体を作製することができる。既存のシステムで安定化できない場合は、アミノ酸変異を導入した。また、同時に立体構造認識抗体を取得することで膜タンパク質の安定性を向上させた。

#### ②膜タンパク質の大量生産技術を用いた支援

メタノール資化酵母と昆虫細胞を利用して膜タンパク質の発現条件の最適化と大量生産を試みた。宿主が異なると膜タンパク質の安定性や結晶性が異なることがあるので、大量生産した膜タンパク質は、順次、精製、結晶化及び性状評価を行った。

### 「高度化」

#### ③高難度膜タンパク質の生産と高度化

野生型では発現の認められない膜タンパク質、オリゴマー化した GPCR、GPCR/シグナル伝達分子複合体などを生化学的な活性を指標としながら安定化し、発現量及び精製効率の向上を試みた。精製方法によって高難度膜タンパク質の安定性に違いがないか等、安定化技術の高度化を目指した。

#### ④ コンフォメーション安定化リガンド作製技術の確立と高付加価値バインダーの探索

高難度な構造解析を可能にする結晶化バインダー創生技術を基盤として、コンフォメーション安定化リガンドの作製技術を確立した。免疫寛容等のため得られにくい抗体は、ターゲットタンパク質を欠損した遺伝子改変マウスに免疫した。また、cDNA ライブラリーを PCR でランダムライズして人工抗体ライブラリーを構築し、ターゲットタンパク質に対するより高親和性の抗体をスクリーニングする方法も立ち上げた。

“Support”

##### 1. Stabilization of membrane protein

In *Saccharomyces cerevisiae* system using GFP protein the most stabilized mutant could be screened. This system is useful to determine the position of the third intracellular loop for the fusion of T4 lysozyme etc. or find the amino acids to improve the thermo stability of GPCRs.

##### 2. Production of a large amount of membrane protein

Production of membrane proteins has been tried using *Pichia pastoris* and Sf9 insect cells. Membrane proteins produced in a large amount have been purified and crystalized, and then evaluated the quality of them.

“Improvement”

##### 3. Production of high difficulty membrane proteins

We have been trying to stabilize the high difficulty membrane proteins such as the oligomer GPCRs, the complex of GPCRs/signal transduction molecule and etc.. Improvement of our expression system has been done.

##### 4. Development of functional antibody recognizing the conformational epitope

We have improved our artificial binder or antibody production system to fix the membrane protein in a specific position. To screen the high affinity and specific binder or antibody, knockout mice were used as host and randomized cDNA library was developed.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 3 件、国際誌 4 件)

1. Haem-dependent dimerization of PGRMC1/sigma-2 receptor facilitates cancer proliferation and chemoresistance. Kabe Y, Nakane T, Koike I, Yamamoto T, Sugiura Y, Harada E, Sugase K, Shimamura T, Ohmura M, Muraoka K, Yamamoto A, Uchida T, Iwata S, Yamaguchi Y, Krayukhina E, Noda M, Handa H, Ishimori K, Uchiyama S, Kobayashi T, Suematsu M. *Nature Commun.* 2016, 7, 11030.
2. Kabe Y, Yamamoto T, Kajimura M, Sugiura Y, Koike I, Ohmura M, Nakamura T, Tokumoto Y, Tsugawa H, Handa H, Kobayashi T, Suematsu M. Cystathionine  $\beta$ -synthase and PGRMC1 as CO sensors. *Free Radic Bio Med.* 2016, 99, 333-334.

3. “Muscarinic Receptor: From Structure to Animal Models”, Chapter 1: Towards the crystal structure determination of muscarinic acetylcholine receptors. Suno R, Asada H, Kobayashi T. *Neuromethods*. 107, Human Press, 2016, pp. 1-13, ISBN: 978-1-4939-2857-6.
4. “Histamine and histamine receptors in health and disease”, Chapter 4: Structural analysis of the histamine H<sub>1</sub>-receptor. Shiroishi M, Kobayashi T. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer, 2017 in press, ISBN 978-3-319-58194-1.
5. GPCR 研究の最前線 2016:GPCR の構造解析から目指すもの. 小林拓也. *医学のあゆみ*. 2016, 256, 357-64.
6. カレントトピックス:ヒト赤血球バンド3の陰イオン交換ドメインの立体構造を解明. 小林拓也, 濱崎直孝, 岩田想. *実験医学*. 2016, 34, 935-38.
7. シグナル選択的な制御を指向した GPCR の構造生命科学. 小林拓也. *YAKUGAKU ZASSHI*. 2016, 136, 179-84.

## (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 抗体を用いたプロスタグランジン受容体の X 線結晶構造解析, ポスター, 豊田洋輔, 森本和志, 寿野良二, 関口雄介, 山下恵太郎, 平田邦夫, 安田賢司, 白石充典, 堀田韻虹, 浅田秀基, 中根崇智, 椎村祐樹, 中北智哉, 稲住知明, 告恭史郎, 梶原佑太, 清水朋子, 漆畑祐司, 吉田 優, 栗原ともこ, 細谷孝充, 木下正弘, 杉本幸彦, 野村紀通, 村田武士, 高山喜好, 山本雅貴, 成宮周, 岩田 想, 小林拓也, 第 13 回 GPCR 研究会, 2016/5/13, 国内
2. プロスタグランジン受容体を中心としたシグナル選択的な制御を目指して, 口頭(招待), 第 381 回 CBI 学会学術講演会, 2017/2/16, 国内
3. プロスタグランジン E 受容体の X 線結晶構造解析を目指して, 口頭, 小林拓也, 第 90 回日本薬理学会年会, 2017/3/15, 国内
4. 甘味抑制物質ラクチゾール及びその誘導体に対する甘味抑制能の検証, ポスター, 中北智哉, 石田明子, 小林拓也, 広川貴次, 橋本誠, 三坂 巧, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017/3/18, 国内
5. プロスタグランジン E 受容体の X 線結晶構造解析を目指して, 口頭, 小林拓也, 日本薬学会第 137 年会, 2017/3/25, 国内

## (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

## (4) 特許出願