

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
（安定化改変体スクリーニング系の高度化・支援）
（英語） Platform for Production and Crystallization of Human membrane protein
(Support and development of the screening system for the stabilization
of membrane proteins)

補助事業担当者（日本語）九州大学大学院薬学研究院 助教 白石充典
所属 役職 氏名：（英語） Mitsunori Shiroishi, Assistant Professor,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu 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）

黄色ブドウ球菌由来毒素タンパク質の標的膜受容体（G タンパク質共役型受容体（GPCR）の一つ）の結晶構造解析を目指し、受容体の安定化と大量調製系の構築を行った。出芽酵母を用いたスクリーニング系により 30 種類の改変体を作製・評価し、安定な改変体を取得した。続いて出芽酵母を用いた受容体タンパク質の大量調製系の構築をおこなった。酵母の培養条件、界面活性剤、精製条件の検討を行い、培地 1L 当たり 0.5 mg 以上の高純度な受容体タンパク質を得る系を確立した。

GPCR の一つであるプリン作動性受容体について、機能性抗体作製の際の抗原として用いるための、安定な受容体タンパク質の作製と大量調製系の構築を行った。出芽酵母を用いたスクリーニング系を用い、経験則による改変（115 種類）および計算科学による安定化変異（28 種

類)について、改変体を作製・評価した。それらのうち高発現・安定化に寄与した改変を組み合わせた改変体を作製し、出芽酵母を用いた大量発現系を構築した。最終的に培地 1L あたり 1 mg の高純度な受容体タンパク質を得る系を構築した。

プロスタノイド受容体の 1 つである GPCR について、活性型構造を明らかにするために、アゴニスト結合能を保持したまま安定化を試みた。膜貫通ヘリックス TM1, TM2, TM3, TM7 における 115 残基について網羅的に部位特異的セミランダム変異を導入し、出芽酵母を用いてスクリーニングを行ったところ、33 箇所にて安定化または発現の向上を確認した。

マウス由来嗅覚受容体の構造解析を目指し、4 種類の嗅覚受容体について出芽酵母を用いたスクリーニング系を用いて合計 25 種類の改変体を作製・評価した。

(高度化)

これまでに構築してきた出芽酵母を用いた膜タンパク質改変体の作製・評価システムをハイスループット化するために、96 ウェルプレート形式でのシステムを構築した。出芽酵母の植菌から、植継ぎ、集菌、細胞破碎、可溶化および蛍光ゲルろ過 (FSEC) による受容体の物性評価までの一連の操作を最適化することで、ウェル間誤差が小さく信頼性の高いスクリーニングシステムを構築した (Shiroishi et al., *Protein Sci.*, 2016)。また本システムを用いた改変体の評価が、多くの GPCR や、GPCR 以外の膜タンパク質にも適用可能であることを示した。さらに構造未知である GPCR_A をモデルケースとして、出芽酵母を用いた安定化改変体のスクリーニングから大量調製までをシームレスに行うシステムを構築した。特に大量調製系を最適化することで、出芽酵母培地 1L あたり 1 mg 以上の精製受容体タンパク質を得ることができるようになった。

経験則による安定化設計では安定化できない受容体に対応するため、出芽酵母を用いたセミランダム変異導入による安定化改変体スクリーニング系の構築を行った。プロスタノイド受容体の 1 つである GPCR をモデルケースに系の構築を行った。一人の研究者が 3 ~ 4 ヶ月で、1 つの GPCR の膜貫通領域 (約 200 残基) の安定化評価が可能な系を構築した。

(Support)

We stabilized a G-protein coupled receptor (GPCR), which is a target of a *Staphylococcus aureus* toxin, and developed a large-scale production system of it for structural analysis. About thirty variants were constructed and evaluated using the screening system in *Saccharomyces cerevisiae*, and some stabilized variants were obtained. Then we constructed a large-scale expression system of the membrane receptor variants in *S. cerevisiae*. Over 0.5 mg of the purified receptor protein was obtained from 1 L culture, after the optimizations of expression condition, detergents, and purification methods.

We stabilized a purinergic GPCR, and developed a large-scale production system for producing the antigen proteins for generating functional antibodies. One hundred and fifteen heuristic variants and twenty-eight variants from computer simulation were constructed and evaluated using the *S. cerevisiae* screening system. The variants that contributed to a higher expression and a stability improvement were combined, and a large-scale expression condition in *S. cerevisiae* was established for the variants. More than 1 mg of the purified receptor protein was obtained from 1 L culture.

We stabilized a prostanoid GPCR with its ability of agonist binding kept, to elucidate the crystal

structure of the agonist-binding form of the receptor. Each residue in the transmembrane helix (TM1, TM2, TM3, and TM4) was mutated by semi-randomized mutagenesis and the mutants were evaluated by the *S. cerevisiae* screening system. Thirty-three mutants that is stabilized or showed higher expression were obtained.

We tried to stabilize four mouse olfactory receptors for structural study. Twenty-five variants were constructed and evaluated using the screening system in *S. cerevisiae*.

(Development)

To develop more high-throughput screening system for the stabilization membrane proteins using *S. cerevisiae*, the ninety-six well plate format screening system was constructed. We developed a highly reliable screening system with small errors among wells, after optimizing a series of procedure including inoculation, subculturing, harvesting, disrupting cells, solubilization and evaluation of the membrane protein by fluorescence size exclusion chromatography (FSEC) (Shiroishi et al., Protein Sci., 2016). We showed that the evaluation using this system could be applied to many GPCRs and other membrane proteins. Moreover, using a structurally unclear GPCR (designated GPCR_A) as a model membrane protein, we optimized a large-scale expression system in *S. cerevisiae*, and developed a seamless system that enable screening of variant and a large-scale expression in the same expression host. Finally, we obtained more than 1 mg of purified GPCR_A from 1 L culture.

To handle the membrane proteins that are unable to stabilize by the heuristic strategies, we developed a screening system with a semi-random mutagenesis method in combination with the ninety-six well plate system in *S. cerevisiae*. We developed this system with a prostanoid GPCR as a model system. This system enabled one researcher to construct and evaluate mutants to two-hundred residues, which corresponds to seven transmembrane regions of GPCR, in three or four months.

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 0 件、国際誌 2 件）

1. Shiroishi M, Moriya M, Ueda T. “Micro-scale and rapid expression screening of highly expressed and/or stable membrane protein variants in *Saccharomyces cerevisiae*.” Protein Sci. (2016) 25, 1863-1872.
2. Shiroishi M, Kobayashi T. “Structural Analysis of the Histamine H1 Receptor. “ Handb Exp Pharmacol. (2017) 241, 21-30.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. *Saccharomyces cerevisiae* を用いたケモカイン受容体 CCR5 の大量調製系の確立, ポスター, 松原直紀, 白石充典, 植田 正, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 2016/6/7, 国内.

2. *Saccharomyces cerevisiae* 発現系による微小スケールでの膜蛋白質安定化変異体の評価～アデノシン A2A 受容体を例に～, ポスター, 白石充典, 森谷真衣, 植田 正, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 2016/6/8, 国内.
3. *Saccharomyces cerevisiae* を用いた膜蛋白質安定化改変体作製・評価システムのハイスループット化とその有効性の検証, 白石充典, 森谷真衣, 植田 正, 第 40 回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 2016/8/27, 国内.
4. *Saccharomyces cerevisiae* における哺乳類由来 GPCR の発現, 白石充典, 松原直紀, 森谷真衣, 中野祐毅, 小林拓也, 岩田想, 植田 正, 第 89 回日本生化学会大会, 2016/9/27, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

なし