

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：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)
Platform for production and crystallization of human membrane protein
(Support and development of production engineering of overexpressed
human membrane proteins caused by mutations)

補助事業担当者 千葉大学大学院理学研究科 教授 村田 武士

所属 役職 氏名：Takeshi Murata, Professor, Graduate School of Science, Chiba 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）

膜タンパク質生産技術の支援

- ・ 岡山大学 須藤雄気教授への支援---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ロドプシンについて発現・精製・結晶化を行い、山本雅貴グループと共同で本ロドプシンの X 線結晶構造を解明した（**JBC, 2016**）。本年度は、我々が開発した理論的熱安定化予測法を用いて本ロドプシンのさらなる耐熱化を試みた。そして、変性温度が 3 度程度上昇した世界で最も安定なロドプシンを得ることに成功した（**論文準備中**）。
- ・ 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の支援を行った。得られた耐熱化変異体を用いることにより、プロスタグランジン受容体とムスカリン受容体の X 線結晶構造解析に成功した（**論文投稿中**）。また、開発した構造認識抗体作製技術により得られた抗体フラグメントを用いることで、ヒト由来アディポネクチン受容体（**Nature 2015**）やヒト由来バンド 3（**Science 2015**）、ラット由来 GLUT5（フルクトース輸送体）（**Nature 2015**）の結晶構造解析に成功した。

- ・ 新潟大学小松雅明教授への支援---高度化した酵母大量発現技術を用いて、アミノ酸輸送体の大量発現系の構築および X 線結晶構造解析の支援を行った。ターゲット分子が大量に発現した酵母膜を界面活性剤で可溶化し、各種精製条件を検討することにより本輸送体の大量精製に成功した。
- ・ CN-PAGE法の支援---制御拠点合成領域の菅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)。

膜タンパク質生産技術の高度化

- ・ ランダム変異による高発現化変異体のスクリーニング法の開発---標的ヒト膜タンパク質の進化工学的アプローチによる大量発現変異体のスクリーニング法の確立を目標として以下の高度化を行った。エラープローン PCR を用いてランダム変異導入したヒト糖輸送体と、蛍光タンパク質を C 末端に融合するように設計した酵母発現用ベクターを混合し、酵母が持つ高い相同性組換え効率を利用して変異体ライブラリーを作製した。そして、蛍光強度が増大した高発現変異ヒト糖輸送体を生産する酵母を効率的にスクリーニングする技術を開発した。また、エラープローン PCR のランダム変異導入法の条件検討を行った。得られた変異株のうち、野生株と比べ最大で 10 倍程度の蛍光値を示す高発現変異ヒト糖輸送体を得ることができた。本年度は、酵母発現系に最適化したエラープローン法を大腸菌大量発現系に導入した。
- ・ 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、熱安定性の低いヒト膜タンパク質に対する理論的耐熱化変異体予測方法の検討を行った。ただし、この理論計算を行うためには標的分子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アデノシン受容体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の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。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 割の的中率まで向上している (**特願 2014-130560 号 ; PCT/JP2015/068277 ; JPCB 2016**)。

Production engineering support of membrane proteins:

- ・ Support and collaboration with Prof. Yuki Sudo at Okayama University---We established over-expression, purification and crystallization systems of thermophilic rhodopsin (TR), and obtained the x-ray crystal structure of TR in collaboration with Yamamoto's group at RIKEN (**JBC**, 2016). In this year, we succeeded in obtaining thermostabilized TR mutants using our theoretical method (Entropy-Based Methods) based on statistical thermodynamics (in preparation)
- ・ Support and collaboration with Prof. Takuya Kobayashi at Kyoto University---We succeeded in obtaining thermostabilized mutants using our Entropy-Based Methods and the crystal structures of prostaglandin and muscarinic receptors (**submitted**). We also succeeded in obtaining the crystal structures of human adiponectin receptors (**Nature** 2015), human Band III transporter (**Science** 2015), and rat GLUT5 transporter (**Nature** 2015) complexed with antibody fragments which were generated as functional mouse monoclonal antibodies.

- Support and collaboration with Prof. Masaaki Komatsu at Niigata University---We established over-expression in yeast and purification systems of an amino-acid transporter using our protocols for membrane protein crystallography.
- Support of clear-native PAGE method---we established a rapid and efficient method for precrystallization screening of membrane proteins using clear-native PAGE with modified Coomassie Brilliant Blue G-250 (mCBB) in collaboration with Kan's group at Shizuoka University, and provided the synthesized mCBB and protocols to six applicants.

Production engineering development of membrane proteins

- Development of a screening method for overexpressed human membrane proteins caused by random mutations---We established an efficient screening method for overexpressed human membrane proteins in yeast using by error-prone PCR methods, and succeeded in obtaining a overexpressed (ten-times) human transporter mutant. In this year, we introduced this method in *E.coli* expression system.
- Development of a prediction method of thermostabilized mutants of membrane proteins---We developed a physics-based method for identifying thermostabilizing mutations of a membrane protein. The method uses a free-energy function F where the importance of translational entropy of hydrocarbon groups within the lipid bilayer is emphasized. All of the possible mutations can rapidly be examined. The method was illustrated for the adenosine receptor whose three-dimensional structure experimentally determined. The success rate was remarkably high (**Patent:2014-130560, PCT/JP2015/068277, JPCB 2016**).

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 1 件、国際誌 5 件)

1. Satoshi Yasuda, Yuta Kajiwar, Yuuki Takamuku, Nanao Suzuki, *Takeshi Murata, and *Masahiro Kinoshita; Identification of Thermostabilizing Mutations for Membrane Proteins: Rapid Method Based on Statistical Thermodynamics., **J. Phys. Chem. B**, 120, 3833-3843 (2016).
2. Yuta Kajiwar, Takahiro Ogino, Satoshi Yasuda, Yuuki Takamuku, *Takeshi Murata and *Masahiro Kinoshita; Physical origins of remarkable thermostabilization by an octuple mutation for the adenosine A_{2a}receptor., **Chem. Phys. Lett.**, 657, 119-123 (2016).
3. Takashi Tsukamoto, Kenji Mizutani, Taisuke Hasegawa, Megumi Takahashi, Naoya Honda, Naoki Hashimoto, Kazumi Shimono, Keitaro Yamashita, Masaki Yamamoto, Seiji Miyauchi, Shin Takagi, Shigehiko Hayashi, *Takeshi Murata and *Yuki Sudo; X-ray Crystallographic Structure of Thermophilic Rhodopsin: Implications for High Thermal Stability and Optogenetic Function., **J. Biol. Chem.**, 291, 12223-12232 (2016).
4. Kano Suzuki, Kenji Mizutani, Shintaro Maruyama, Kazumi Shimono, Fabiana L. Imai, Eiro Muneyuki, Yoshimi Kakinuma, Yoshiko Ishizuka-Katsura, Mikako Shirouzu, Shigeyuki Yokoyama, Ichiro Yamato, and *Takeshi Murata; Crystal structures of the ATP-binding and ADP-release dwells of the V1 rotary motor., **Nat. Commun.**, 7, 13235 (2016).
5. Yuta Kajiwar, Satoshi Yasuda, Yuuki Takamuku, *Takeshi Murata, and *Masahiro Kinoshita; Identification of Thermostabilizing Mutations for a Membrane Protein Whose Three-Dimensional Structure is Unknown., **J. Comput. Chem.**, 38, 211-223 (2017).
6. 木下正弘、村田武士; 膜タンパク質の耐熱化につながるアミノ酸置換の理論的予測., バイオサイエンスとインダストリー, バイオインダストリー協会, 75, 33-36 (2017).

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 村田 武士; 膜蛋白質の耐熱化と発現・精製, 日本蛋白質科学会ワークショップ, 博多, 2016 年 6 月 7 日, 国内.
2. 高椋勇樹、鈴木七緒、日野智也、浅川朋宏、管敏幸、岩田想、村田武士; 改変型 CBB を用いた GPCR の熱安定性評価, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 福岡国際会議場, 2016 年 6 月 8 日, 国内.
3. Nanao Suzuki, Akane Saito, Kenta Hitomi, Yojiro Iizuka, Waki Ougiya, Shingo Sato, Kenji Mizutani, Yuta Kajiwara, Satoshi Yasuda, Masahiro Kinoshita, Takeshi Murata; Expression, purification and crystallization of 5-HT_{2A} receptor, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 福岡国際会議場, 2016 年 6 月 9 日, 国内.
4. 安田賢司、梶原佑太、高椋勇樹、鈴木七緒、村田武士、木下正弘; 膜タンパク質を熱安定化させるアミノ酸置換の理論的予測法の開発, 第 11 回トランスポーター研究会, 京都大学 宇治キャンパス, 2016 年 7 月 2 日, 国内.
5. 斉藤あかね、人見健太、安田賢司、梶原佑太、鈴木七緒、高椋勇樹、木下正弘、村田武士; 理論計算を用いたセロトニン受容体の耐熱化と結晶化の試み, 第 89 回日本生化学会大会, 東北大学 川内北キャンパス, 2016 年 9 月 25 日, 国内.
6. Satoshi Yasuda, Yuta Kajiwara, Takeshi Murata, Masahiro Kinoshita; Statistical Thermodynamics for Remarkably High Thermal Stability of Thermophilic Rhodopsin, 第 54 回生物物理学会年会, つくば国際会議場, 2016 年 11 月 25 日, 国内.
7. Takashi Tsukamoto, Kenji Mizutani, Taisuke Hasegawa, Megumi Takahashi, Naoya Honda, Naoki Hashimoto, Kazumi Shimono, Seiji Miyauchi, Shin Takagi, Shigehiko Hayashi, Takeshi Murata, Yuki Sudo; Structural basis for high thermal stability and efficient optogenetic function of thermophilic rhodopsin, 第 54 回生物物理学会年会, つくば国際会議場, 2016 年 11 月 26 日, 国内.
8. Sayaka Nemoto, Satoshi Yasuda, Takashi Tsukamoto, Yuki Sudo, Masahiro Kinoshita, Takeshi Murata; Identification of thermostabilizing mutations for the Thermophilic Rhodopsin based on statistical thermodynamics, 第 54 回生物物理学会年会, つくば国際会議場, 2016 年 11 月 27 日, 国内.
9. Yuta Kajiwara, Satoshi Yasuda, Yuuki Takamuku, Takeshi Murata, Masahiro Kinoshita, Identification of Thermostabilizing Mutations for a Membrane Protein Whose Three-Dimensional Structure is Unknown, 第 54 回生物物理学会年会, つくば国際会議場, 2016 年 11 月 27 日, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし