

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業ソロタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域  
(英語) Advanced Research & Development Programs for Medical Innovation, Solo-type, “Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop Innovative Medical Technologies”

研究開発課題名： (日本語) プロスタグランジン受容体の立体構造を基盤とした創薬開発を目指す革新的技術の創出  
(英語) Technical innovation for drug discovery based on the 3D-structures of prostaglandin receptors.

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人京都大学 大学院医学研究科 准教授 小林拓也  
所属 役職 氏名： (英語) Kyoto University, Associate Professor, Takuya Kobayashi

実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語)  
開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)  
所属 役職 氏名： (英語)

## II. 成果の概要（総括研究報告）

本研究は、プロスタグランジン（PG）受容体をモデルとして、立体構造を基盤とした創薬開発を目指している。同じターゲットに対して異なる技術を融合することで、創薬に向けた新しい技術基盤を立ち上げることを目標としている。本年度は以下の研究成果を得た。

小林は、①受容体の構造をアンタゴニスト結合型に固定化するアミノ酸残基を同定する方法を立ち上げた（論文投稿中）。これにより脂質受容体の結晶の分解能は著しく上昇し、アンタゴニストの結合した脂質受容体の X 線結晶構造解析に成功した（論文投稿中）。この技術は非常に汎用性が高く、別の種類の受容体の同じ場所にアミノ酸変異を導入すると、これまで分解能が伸びなかったターゲットにおいても、分解能を向上させられることを実証することができた（投稿準備中）。②同様に、このような技術を利用して、アゴニストの結合した脂質受容体の X 線結晶構造解析を目指している。本年度は、あるアミノ酸変異を受容体に導入することで、生産効率（リッターあたりの精製サンプル量）が向上し、アゴニスト存在下で再現性よく安定に精製することが可能になった。生化学的手法（リガンド結合実験など）により、発現量や熱安定性の向上した変異体は、アゴニストがしっかりと結合していることを確認した。このように、本年度は計画通り、精製可能な変異体を見出すことができた。③さらに、本年度は、通常、微小結晶に使用している大型放射光施設の X 線（マイクロフォーカスビーム）だけでなく、X 線自由電子レーザーを使って受容体の構造解析に成功した（論文投稿中）。これにより、結晶を凍結せずに X 線を照射することができるようになった。今後、凍結による蛋白質や結合するリガンドへのダメージを抑えることが可能になる。脂質受容体にも応用できる技術として期待している。④また、多発性骨髄腫など難治性の高いがん細胞に多く発現している PGRMC1/Sigma-2 受容体がヘムを介してホモダイマーを形成することで、がん細胞の増殖と薬剤耐性に関与していることをダイマーの立体構造を基に検証することに成功した（*Nature Commun* 2016、*Free Radic Bio Med* 2016）。脂質受容体においても、ホモダイマーの重要性を確かめていく必要がある。今後は、広川と連携して、PG 受容体の不活性型の結晶構造を基にアロステリック部位を予測、化合物ライブラリーによるインシリコスクリーニングにより、アロステリック制御因子（NAM）の探索を推進する。

枋尾は、NMR 測定のための安定同位体標識を試みた。PG 受容体は収率が低いため同位体標識の条件検討を行うには作業効率が悪い。そこで、より高収率で調製でき、安定性が高いことがわかっている他の GPCR で同位体標識条件の検討を行った。特定のアミノ酸を除去した Sf9 用の培地に <sup>13</sup>C 標識した同アミノ酸を補給し、Sf9 を培養し当該 GPCR の発現を試みたところ、問題なく発現・精製ができることを確認した。ここで確立した方法は PG 受容体にも適用可能であると考えられる。また、脂質二重層ナノディスクの作成の検討を進め、PG 受容体ではないが、他の GPCR をナノディスクに埋込むことに成功した。

広川は、小林から提供される PG 受容体の不活性型構造の結晶構造を用いて、1 μ秒の分子動力学シミュレーションを実施した。その結果、PG 受容体およびアンタゴニストの構造が結晶構造周辺で安定であること、アンタゴニストと PG 受容体間のアミノ酸残基の相互作用寄与率、アンタゴニスト周辺の新規結合部位が示唆された。今後、これらの情報を基に、アロステリック部位領域予測、化合物ライブラリーによるインシリコスクリーニングを行い NAM の探索を試みる。また、小林・細谷と連携して、選定した化合物の活性評価および最適化設計を始める予定である。

細谷は、報告されているが、市販されていない高親和性 EP4 アンタゴニストの合成経路の確立に成功した。また、アライン中間体の変換を利用することで、新規類縁体の合成にも成功した。合成した化合物は小林に提供し活性評価を行った。その結果、オリジナル化合物と同程度の活性を示すことが分かった。さらに、細谷はアラインを利用した多様性指向型合成法の開発にも成功した。

**Kobayashi** has determined the structure of the antagonist bound GPCR. (1) To stabilize the receptor in an antagonist bound form, some point mutations which were found by our original strategy has been introduced into the receptor. This strategy we developed has been applied to the other GPCRs and succeeded in the improvement of their crystal resolution. (2) We also have been trying to determine the structure of the agonist bound GPCR using our techniques for the X-ray crystallography. To improve the efficacy of GPCR production, we found new amino acids to stabilize the receptor in an agonist bound form. (3) Furthermore, we have determined the structure of GPCR by the use of X-ray Free Electron Laser; XFEL, in this case we do not need the crystals to be frozen. (4) Progesterone-receptor membrane component 1 (PGRMC1/Sigma-2 receptor) is a haem-containing protein that interacts with epidermal growth factor receptor (EGFR) and cytochromes P450 to regulate cancer proliferation and chemoresistance. Crystallographic analyses of the PGRMC1 cytosolic domain at 1.95 Å resolution reveal that it forms a stable dimer through stacking interactions of two protruding haem molecules. This study demonstrates protein dimerization via haem-haem stacking, which has not been seen in eukaryotes, and provides insights into its functional significance in cancer. We think it critical that lipid GPCRs are dimerized in vivo.

**Tochio** has studied stable-isotope labeling of a GPCR. Because of their low yield and lower stability, it was not practical to employ PG receptors for optimizing protocols for the isotope labeling. Instead, the other GPCR, which was known to exhibit higher stability and higher yield, was used for the protocol optimization. Sf9 growth media, in which an amino acid type was substituted with the same amino acid type but harboring <sup>13</sup>C, were used for expressing the GPCR. The expression and purification have been successfully carried out. The group has also established a protocol to prepare GPCR samples in nanodiscs. Although PG receptors were not tried yet, the protocol can be applied to PG receptors with minor modifications.

**Hirokawa** has performed 1μsec molecular dynamics (MD) simulation study of the antagonist bound PG receptor. The analysis of the MD trajectories showed that (1) X-ray structure of PG receptor-antagonist complex was stable during the simulation, (2) detail antagonist atom interactions and contributions with the PG receptor residues, and (3) identification of additional pockets around the antagonist binding site. These findings should prove useful in allosteric site prediction, in silico screening and lead optimization in collaboration with **Kobayashi** and **Hosoya** groups.

**Hosoya** established an efficient synthetic route of one of the commercially unavailable EP4 antagonists with a potent activity. He also succeeded in synthesizing a novel derivative by means of a transformation via an aryne intermediate. Evaluation by **Kobayashi** indicated that this compound is an EP4 antagonist with a similar activity compared to the original compound. **Hosoya** also developed a diversity-oriented synthetic method based on an aryne chemistry.

### 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. 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), 小林拓也, 第 381 回 CBI 学会学術講演会, 2017/2/16, 国内
2. 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
3. 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
4. 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  
該当なし

(4) 特許出願  
該当なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 革新的先端研究開発支援事業ソロタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域

(英語) Advanced Research & Development Programs for Medical Innovation, Solo-type, “Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop Innovative Medical Technologies”

研究開発課題名：(日本語) プロスタグランジン受容体の立体構造を基盤とした創薬開発を目指す革新的技術の創出

(英語) Technical innovation for drug discovery based on the 3D-structures of prostaglandin receptors.

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人京都大学 大学院医学研究科 准教授 小林拓也

所属 役職 氏名：(英語) Kyoto University, Associate Professor, Takuya Kobayashi

実施期間：平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) NMR による PG 受容体の動的構造解析

開発課題名：(英語) NMR analysis of structural dynamics of PG receptors

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人京都大学 大学院理学研究科 教授 朽尾豪人

所属 役職 氏名：(英語) Kyoto University, Professor, Hidehito Tochio

## II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：国立大学法人京都大学・大学院医学研究科・小林拓也 総括研究報告を参照。

## 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 0 件）

1. ナノダイヤモンドNVCを使った新しい生体・細胞計測法 五十嵐龍治, 朽尾豪人, 白川昌宏. 光技術コンタクト 2016, 54, 3-11.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表  
該当なし。

(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。

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業ソロタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域  
(英語) Advanced Research & Development Programs for Medical Innovation, Solo-type, “Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop Innovative Medical Technologies”

研究開発課題名： (日本語) プロスタグランジン受容体の立体構造を基盤とした創薬開発を目指す革新的技術の創出  
(英語) Technical innovation for drug discovery based on the 3D-structures of prostaglandin receptors.

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人京都大学 大学院医学研究科 准教授 小林拓也  
所属 役職 氏名： (英語) Kyoto University, Associate Professor, Takuya Kobayashi

実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) PG 受容体の立体構造情報を基にしたバイオインフォマティクス解析  
開発課題名： (英語) Bioinformatics analysis based on the 3D-structures of prostaglandin receptors

研究開発分担者 (日本語) 産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター  
研究チーム長 広川貴次  
所属 役職 氏名： (英語) Molecular Profiling Research Center for Drug Discovery,  
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology,  
Team Leader, Takatsugu Hirokawa



## II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：国立大学法人京都大学・大学院医学研究科・小林拓也 総括研究報告を参照。

## 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 1 件）

1. Wada Y, Nakano S, Morimoto A, Kasahara KI, Hayashi T, Takada Y, Suzuki H, Niwa-Sakai M, Ohashi S, Mori M, Hirokawa T, Shuto S. Discovery of Novel Indazole Derivatives as Orally Available  $\beta$ 3-Adrenergic Receptor Agonists Lacking Off-Target-Based Cardiovascular Side Effects. J. Med. Chem. 60(8), 2017, 3252-3265.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. GPCR 立体構造データに基づくインシリコ解析, 口頭, 広川貴次, 第 90 回日本薬理学会年会, 2017/3/15, 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

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 革新的先端研究開発支援事業ソロタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域  
(英語) Advanced Research & Development Programs for Medical Innovation, Solo-type, “Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop Innovative Medical Technologies”

研究開発課題名 : (日本語) プロスタグランジン受容体の立体構造を基盤とした創薬開発を目指す革新的技術の創出  
(英語) Technical innovation for drug discovery based on the 3D-structures of prostaglandin receptors

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人京都大学 大学院医学研究科 准教授 小林拓也  
所属 役職 氏名 : (英語) Kyoto University, Associate Professor, Takuya Kobayashi

実施期間 : 平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 構造多様化法にもとづく PG 受容体関連化合物の有機合成  
開発課題名 : (英語) Synthesis of PG receptor targeting compounds based on diversity-oriented approach

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授 細谷孝充  
所属 役職 氏名 : (英語) Tokyo Medical and Dental University, Professor, Takamitsu Hosoya

## II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：国立大学法人京都大学・大学院医学研究科・小林拓也 総括研究報告を参照。

## 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 0 件）

今年度は該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

今年度は該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

今年度は該当なし

(4) 特許出願

今年度は該当なし