

## ERATO 岩田ヒト膜受容体構造プロジェクト事後評価報告書

【研究総括】 岩田 想 (京都大学大学院医学研究科／教授、インペリアルカレッジロンドン分子生命科学科／教授)

【評価委員】 (あいうえお順)

諏訪 牧子 (委員長；産業技術総合研究所生命情報工学研究センター／主幹研究員)

津本 浩平 (東京大学医科学研究所／教授)

村上 聡 (東京工業大学大学院生命理工学研究科／教授)

山本 雅貴 (理化学研究所播磨研究所放射光科学総合研究センター基盤研究部／部長)

### 評価の概要

ERATO 岩田ヒト膜受容体構造プロジェクトは、膜受容体、特に G タンパク質共役受容体 (GPCR) の構造決定のために、発現・精製、結晶化、X 線回折データ測定におけるボトルネックを平行して解消しながら、困難とされる膜タンパク質の立体構造決定の技術を確立することを目的としている。重要な創薬ターゲットである GPCR の系統的な構造解析は、ポストゲノム時代の構造生物研究の中でもとりわけ重要視されている挑戦的な研究課題であり、達成されたときの学問的、社会的インパクトは極めて大きい。

本プロジェクトでは、構造解析のステップ (発現・精製→結晶化→データ測定) ごとに研究グループを構成しており、それぞれにおいて顕著な成果が生まれている。例えば、発現・精製においては、出芽酵母による GPCR の高速・高効率な発現株スクリーニング技術や、メタノール資化酵母と昆虫細胞を用いた大量安定生産技術を開発した。結晶化においては、哺乳類膜タンパク質に向けて、新規の免疫法およびモノクローナル抗体スクリーニング技術を開発した。抗体スクリーニングはハイブリドーマを使う方法、高品質なファージディスプレイを用いる技術などを確立した。さらにデータ測定においては結晶の迅速スクリーニングと微結晶から高精度データ収集を行うための基盤技術を確立した。これらの技術はいずれも、従来の構造解析の困難性を解消するブレークスルーとして高く評価できるものである。またこれらの成果は若手研究者を積極的に登用した結果生まれたものであり、次世代を担う研究者の育成という意味でも本プロジェクトは貢献している。

プロジェクト期間の前半では、日本と英国に研究拠点が分散し、各段階での上記個別技術の開発に注力していたこともあり、GPCR の構造解析がなかなか進展しない面があったが、中間評価以降、岩田総括の強力なリーダーシップのもと、解析すべき GPCR のターゲットを絞り込み、各研究グループ間の連携を急速に強化した。また、かつての競合相手との共同研究を行ってキュービック結晶化法等の新技术を導入するなど柔軟な軌道修正を行い、プロジェクト目標の完遂に向けて邁進した。その結果、ターゲットとする GPCR より、ヒスタミン H1 受容体をはじめとする 3 種の結晶を得て立体構造解析に成功したのに加え、技術開発のためのモデル膜タンパク質に関しても 6 種の立体構造解析にも成功するという極めて顕著な研究成果を上げることができた。これらを総合的に評価すれば、岩田プロジェクトの研究は卓越した水準にあり、戦略目標「遺伝子情報に基づくたんぱく質解析を通じた技術革新」に資する十分な成果が得られたと評価する。

## 1. 研究プロジェクトの設定および運営

### 1-1. プロジェクトの全体構想

本プロジェクトは、ヒトゲノム配列解析の成果を活用し、膜タンパク質の大量発現・精製技術、膜タンパク質の可溶化・結晶化技術、新世代放射光技術等、各種技術を組み合わせることにより、ヒト GPCR の構造決定を系統的に行う技術の確立を目指し、実施された GPCR は特に発現、結晶化が困難な標的であり、多くの研究者が失敗を積み重ねてきた経緯からも、この目標は極めてチャレンジングであったと言える。構造解析の対象を一般の膜タンパク質と曖昧にせず GPCR と明示した上で、その構造決定を最終目標とした以上、各要素技術の研究開発のみでは目標達成には不十分であり、各グループが開発した新規基盤技術を結集させる必要がある。その点からも、ERATO の研究課題として、適切であったと言える。GPCR の系統的な構造解析は、ポストゲノム時代における構造生物学研究において、とりわけそれらの構造決定と応用が期待されている重要な課題である。なかでも GPCR は医薬品開発のターゲットとして重要視されており、本プロジェクトの社会的意義は極めて大きい。2000年にウシロドプシンの構造決定以降、2007年、2008年の海外のグループによる複数個の構造決定まで、GPCR の構造解析に関する報告がなかった点からも、本プロジェクトは、戦略目標「遺伝子情報に基づくたんぱく質解析を通じた技術革新」に適うプロジェクトとして、研究目標および実施時期ともに適宜を得たものと判断できる。

### 1-2. プロジェクトの枠組みや研究体制、および研究活動の状況

本プロジェクトの構想を実現するために、プロジェクト開始時に、(1) 受容体産生グループ、(2) 結晶創成グループ、(3) 結晶化・X線測定システム開発グループの3つのグループを設置した。受容体産生、結晶創成のグループは、日本の高度なタンパク質生産技術を有した研究施設に付随した形で設置・立上げを行い、結晶化およびX線測定システム開発のグループは英国の新しいシンクロトロン放射光施設（ダイヤモンド）に設置した。2008年1月に結晶創成グループから、結晶化リガンド構築グループを独立させ、最終的に4つの研究グループで本プロジェクトに取り組んだ。

プロジェクトの前半においては、研究実施場所が日本と英国に分かれている点もあり、個々のグループにおける技術開発の達成度は非常に高いものであったにも関わらず、各グループ間の連携が十分ではなかった。しかし、プロジェクト後半においては、岩田総括の強力なリーダーシップにより、グループ相互のコミュニケーションの強化や、情報やサンプルの共有徹底などグループ間の連携が強化された。

また中間評価での指摘を受け、中間評価以降の研究方針について、「これまでに確立した技術について実証すること」を研究の中心と定め、解析対象とする GPCR を絞り込んだ上で、可能性のある方法論の構築に向けた研究を実施するなど、目標達成を意識したプロジェクト運営が施された。特に、達成度のやや劣る技術課題については、競争相手の一つでもあった海外のグループと連携し、新規技術の導入により軌道修正を図り柔軟に対応するなど、岩田総括の積極的なプロジェクト運営により、見事に GPCR の構造解析に成功している。またプロジェクト前半における各グループの着実な要素技術開発は、後半の構造解析成功につなが

る重要なステップであったと改めて評価できる。

さらに、本プロジェクトに若手研究者を積極的に登用し、次世代の人材を育成したことや、最終の2年で急速に研究グループ間の連携を強化するなど、岩田総括のマネジメントに長けた面も十分に発揮され、素晴らしい成果を生み出すこととなった。結果的に、的確かつ効果的な運営であったと評価する。

〔研究プロジェクトの設定および運営〕 a (的確かつ効果的であった)

〔研究活動の状況〕 a+ (特筆して望ましい研究展開を示した)

## 2. 研究成果

### 2-1. 発現・精製

GPCRの大量生産に向けて、大量発現ならびに活性を保持した状態での精製法の確立を目指した。酵母の系を用いてGPCRの高発現株をスクリーニングし、安定な変異体を作成し、メタノール資化酵母と昆虫の系を用いて大量生産する技術を確認した。さらに、コバルトカラム溶出とレクチンカラム未吸着という簡便な二段階精製法を開発し、高純度に精製する方法を確認した。また、蛍光ゲル濾過法、CPMアッセイ、Clear Native PAGE法などタンパク質の安定性を評価する方法も開発した。

中間評価の時点では、発現・精製に関する成果がなかなか見えず、当時GPCRの立体構造決定が進んでいた海外のグループの追試を行うことや、酵母の系でなく昆虫の系に重みを置くことを指摘された。しかし、中間評価後の2年間で、酵母の系を用いた手法の有用性について確認できたばかりでなく、GPCRの結晶を複数種得ることに成功しており、中間評価以降において大きな進歩が見られた。

特に酵母によるGPCRの産生については、*Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) と *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) の2種類の酵母を用いた発現システムを構築し、それぞれの酵母の特徴を生かした、高速で高発現のスクリーニングを実現している。*S. cerevisiae*を用いた発現系では、C末端にGFPを融合したGPCRの蛍光シグナルによるスクリーニング技術を導入し、糖鎖修飾部位の変異やC末端ドメインの削除、安定化のための変異体作成など、発現条件の最適化に向け、高速初期スクリーニング技術を確認した。特にGPCR変異体作成における熱安定化の戦略については、いくつかの知見が有効に機能し、構造決定を加速する一助となっている。これらの成果は、今後のGPCRの解析に多大な影響を与えるものとして、高く評価される。

また、GPCRのi3ループをT4リゾチームで置換する技術の導入など、欧米で用いられてきた手法についても積極的に取り入れ、新規の結晶を生成することに成功している。さらに*S. cerevisiae*により安定化された変異体を利用し、*P. pastoris*あるいは昆虫の系を用いたGPCR大量生産のパイプライン構築を可能とするなど、これら一連の技術開発は、GPCRの構造解析を可能にする上で、大変重要な成果であったと言える。

上記の手法はGPCRにのみ適用される方法ではなく、その基礎開発において試されてき

た他の膜タンパク質においても応用可能であることが、トランスポーター、呼吸鎖タンパクなど哺乳類由来のものを含む種々の膜タンパク質結晶化の成功によって確認されている。このように、あらゆるファミリーに対応できるよう、普遍的な手法として開発した点は高く評価したい。また産業・社会的側面においても、従来用いられてきた発現細胞による低分子スクリーニングから、当該開発技術を用いた産生により得られた膜タンパク質を用いたスクリーニングへと移行が図られる可能性も考えられ、この先、新たな価値が見いだされるものと期待される。

発現・精製の技術開発については、結晶構造解析という目標を達成するために可能と思われる戦略を立て、ごく短期間で各々の要素技術を結合させることに成功している。さらに他の技術開発と有機的に連携させることにより、結果として、質、量、速さ、という観点で他の追随を許さない優れた研究成果を得ることができた点も高く評価できる。

## 2-2. 結晶化技術 1

ヒト GPCR の結晶性を向上させるモノクローナル抗体を作製するための普遍的な技術体系の確立を目指した。

マウスを用いて哺乳類膜タンパク質に対する構造認識抗体を作製することは、免疫寛容の点から難しい、とされている。そこで、膜タンパク質をリピッド A およびホスファチジルコリンとともに再構成し、この「プロテオリポソーム」を抗原として、マウスに免疫する技術（リポソーム免疫法）を開発した。これは、免疫寛容の回避を可能とするものである。科学的に見ても本質的な問題解決につながる大きな前進であり、ブレイクスルーとなりうる成果と言えよう。

また、上記の方法で得られた抗体のスクリーニング法について、培養上清からの一次スクリーニングのためのリポソーム ELISA 法、培養上清からの二次スクリーニングのための立体構造を認識する抗体のスクリーニング法、ピアコアを用いた総合評価技術、GPCR 用の新規抗体エピトープマッピング法など、様々な新規かつ汎用的な手法を開発した。さらに、これらの技術について特許を出願しており、この点も高く評価できる。特にリポソーム ELISA 法による抗体スクリーニング技術は、未変性膜タンパク質に対する信頼性の高い抗体スクリーニング法として期待できる独自の技術であり、本プロジェクトの大きな研究成果の一つである。抗体エピトープマッピング法においては、そのスクリーニング結果より i3 ループがエピトープになりやすいという興味深い成果が得られている。

この技術開発には、より多くの膜タンパク質を必要とすることが考えられるが、同時に高生産法の確立にも取り組んでいたことから、その成果を有機的に結びつけることができた。結果として、7 つの膜タンパク質について複数の抗体を取得し、その機能を評価した上で、4 つの膜タンパク質についてすでに良好な分解能での構造解析を行うことができています。これらの業績は、国際的にも追随を許さない極めて高いレベルに位置する。プロジェクト中に得られた立体構造認識モノクローナル抗体についても、それ自体の実用化が期待され、医薬分野等への波及効果は大きいと思われる。また今後、開発した技術は、他の膜タンパク質にも次々と応用されていくことが強く期待される。

## 2-3. 結晶化技術 2

膜タンパク質に対する高親和性抗体をハイスループットで作製する技術を確立し、ヒト GPCR のみならず膜タンパク質全般の X 線結晶構造解析において普遍的に応用できる結晶化リガンド構築システムを創出することを目指した。

具体的には、高品質なファージライブラリーの構築、結晶化リガンド候補である scFV クローンのハイスループットスクリーニング技術、結晶化に必要な mg オーダーの組換え型抗体の大量生産など、ファージディスプレイ法による結晶化リガンド作製全体における個々の要素技術を確立した。

ここで開発に取り組んだ要素技術は、世界の数多くのグループがその確立に向けて努力しているにもかかわらず、成功していないグループも多い。その中で、技術開発のためにモデル膜タンパク質を利用し、単に特定の膜タンパク質に通用する技術としてではなく、普遍的な技術として用いることができるレベルにまで高めている。最終的に、抗体作成期間 2~3 カ月、発現に *Brevibacillus* 系を用いて 10mg/L の Fv フラグメント収量を可能とする迅速大量作成技術を確立した。この通り scFV (一本鎖 Fv) ファージディスプレイを用いた結晶化リガンド作成法は、マウスを用いたハイブリドーマ法を補完する 2 つめの手法として、本プロジェクトの大きな武器になっている。また大変興味深いことに、岩田総括は、「膜タンパク質結晶化を促進させるリガンドとして選ぶモノクローナル抗体は、結晶化の対象となる膜タンパク質の種類・分子サイズに応じて、Fab、scFV のどちらかを選択すべきである」というアイデアを提唱している。今後、scFV ファージディスプレイを用いた結晶化リガンド作成法は、膜タンパク質結晶化に最適な抗体を選択するための有用な技術となることが期待される。

さらに、開発された結晶化リガンドによる膜タンパク質結晶化の技術は、膜タンパク質の構造解析を加速する重要な技術であると評価できる。特に膜タンパク質の構造決定は、医薬品開発において極めて需要の高い研究分野である。したがって、ファージディスプレイ法や Fab ファージライブラリーなどの抗体作成技術は、医薬品開発にイノベーションをもたらす可能性も高く、産業・社会的側面から見ても十分評価できる成果であると言える。

## 2-4. 結晶化・X線測定システム開発

英国にあるダイヤモンド放射光施設において、結晶化・X線測定システム開発に関する研究が実施され、少量サンプルの自動結晶化技術と膜タンパク質結晶のスクリーニング及びデータ測定のための新しいシステム開発、統合を目指した。また、日本サイトにおいても、主に中間評価以降、結晶化や構造解析に取り組んだ。

プロジェクトの前半においては、同施設における Membrane Protein Laboratory (MPL) とマイクロフォーカスビームライン I 24 の新規立ち上げを行った。MPL では、GPCR の構造解析に向けて自動結晶化ロボットや Off-line での結晶観察およびスクリーニング装置など広範な技術開発を進め、構造決定に向けた各種基盤技術を着実に整備した。プロジェクト開始当初において、これらの設備設置に遅れが出たことが問題であったが、設置後は急速に日本-英国間の共同体制が進展した。

本プロジェクト推進中である 2007 年、2008 年の Raymond C. Stevens (スクリプス研

究所)らによるアドレナリン受容体・アデノシン受容体の構造解析の成功により、現在、GPCRの細胞内第3ループ(i3ループ)へのT4リゾチームの導入と脂質キュービック相結晶化法は、GPCRの結晶化にとって先端的かつ重要な手段であると一般的に認識されている。そこで、上記の報告の後、Stevens研究室との共同研究体制をいち早く構築し、日本サイトからスクリプス研究所に研究員を派遣するなど緊密な連携を図った。T4リゾチーム導入技術や脂質キュービック相結晶化法の技術導入を積極的に進め、英国サイトにてキュービック相結晶化法の自動結晶化スクリーニングロボットや自動結晶観察装置の立ち上げを進めた。

キュービック相結晶化法は、本プロジェクトで新規に開発されたものではないため、独創性の観点から課題が残るかもしれない。しかし、中間評価時点においてGPCRの結晶化が困難であったことから技術受け入れを決断し、しかも急速に新技術を獲得したことは柔軟な対応であった、とむしろ高く評価できる。これまで通常の結晶化スクリーニングを尽くしても結晶化が困難であったGPCRについて、結晶を得ていることは、大量発現系構築や精製法開発、さらには強力な結晶化リガンド取得に依拠する点が大いと思われるが、それでも微量の標品を結晶化に繋げた点は、研究装置と研究者のアイデアがうまく働いたことを意味している。酵母の系を使った高発現クローンの迅速スクリーニング、キュービック相結晶化法、構造解析システムを有機的に組み合わせることにより、GPCR構造決定に向けたパイプライン構築を実現した点は評価に値する。当該技術の普及は、今後の膜タンパク質研究を加速させるものであり、当該分野の研究コミュニティへのインパクトも大きい。

## 2-5. 構造解析

プロジェクト終盤において、プロジェクトのメンバー全員が一丸となってGPCRの構造解析に取り組んだ結果、アデノシンA2a受容体、ヒスタミンH1受容体で詳細な構造を決定した。また、ムスカリン性アセチルコリンM2受容体については、構造決定の一手手前の段階まで進捗している。GPCR以外に7つのモデル膜タンパク質に取り組み、うち6つ(アニオン交換輸送体:Band3、オリゴペプチド輸送体:PepTSo、一酸化窒素還元酵素:NOR、ヒダントイン輸送体:Mhp1、胆汁酸輸送体:ASBT、NADH-キノン酸化還元酵素:Ndi1)については構造を決定しており、他1つ(フルクトース輸送体:GLUT5)については結晶化とデータ取得に成功している。

特に結晶化リガンドの抗体を用いたアデノシンA2a受容体の構造解析においては、他グループが決定した構造ではT4リゾチームに置換され、構造不明になっていたi3ループの構造を新たに決定するとともに、アンタゴニストとして働く抗体とアデノシンA2a受容体との複合体の構造解析に成功している。また、ヒスタミンH1受容体と第1世代の抗ヒスタミン薬であるドキセピンとの複合体の構造解析にも成功した。これにより、ヒスタミンH1受容体がβ2アドレナリン受容体やドーパミンD3受容体とよく似た構造をしていることや、ドキセピンがヒスタミンH1受容体以外のアミン受容体とも結合しやすい理由を見出すなど、大変興味深い結果が得られている。さらに、この結果を用いて、結合選択性の高い第2世代の抗ヒスタミン薬とヒスタミンH1受容体との相互作用についてコンピューター解析を行い、ヒスタミンH1受容体特有のアミノ酸との相互作用が結合選択性において重要な役割を担うことが判明するなど、より効果的な薬剤開発につながる成果が得られたと認められる。

これらの構造解析は、GPCRの活性化機構解明に迫るものであり、本プロジェクトの顕

著な研究成果として世界に誇れるものである。得られた構造解析結果は、近年発展しつつある構造情報に基づくドラッグデザインに直結するものとして、科学技術的側面だけでなく、産業・社会的側面においても、高く評価できる。

〔研究成果（科学技術的側面）〕 a+ （成果として秀逸である）

〔研究成果（産業社会的側面）〕 a+ （成果として秀逸である）

### 3. 総合所見

GPCR は、発現・精製、結晶化が非常に難しく、ERATO の 5 年間に於いて、ヒトの GPCR を複数個解析することは困難と考えられていた。その観点では、本プロジェクトの目標としては、ERATO の目標として妥当なものであり、十分にチャレンジングであったと言える。岩田総括ご自身が GPCR の構造解析の専門家でなかったこともあり、中間評価の時点まではプロジェクト全体の焦点が絞れていない状態であった。各グループの技術開発は個々には極めて秀逸な内容であるにも関わらず、お互いの連携が十分とは言えない状況であり、GPCR の構造解析まで向かうには厳しい状況であったと思われる。しかし、中間評価以降の 2 年間に於いて、岩田総括の強いリーダーシップのもと、連携体制の強化が図られ、プロジェクト前半で個々のグループが着実に開発してきた要素技術を上手く結合させることができた。その結果、本プロジェクトは素晴らしい進展を遂げた。また構造解析の成功に加え、本プロジェクトを通じて得られた抗体の利用価値、要素技術開発過程で得られた知見に基づく新しい研究展開、構造情報の創薬への応用など、当初の期待をはるかに上回る成果が生まれている。

また、本プロジェクトにおける GPCR の構造解析の結果は、科学技術的側面、産業・社会的側面の両方において、非常に注目を集めることは疑う余地もない。特に GPCR は、市場で扱われている薬の約 30% が GPCR に関係するシステムの制御を目指しており、創薬において重要なターゲットとされている。しかしながら、ヒトにおいて数百ある GPCR の遺伝子のうち、まだ数種類しか構造が決まっていない状況である。したがって、本プロジェクトで開発された技術や得られた知見により GPCR の構造決定がより早く進められることとなれば、産業・社会的側面においても、そのインパクトは計り知れない。GPCR の構造解析に関する研究は、単純に数年単位のことではなく、今後も長期にわたりますます重要性が増すとされる。本プロジェクトの学術的、技術的な成果としては、申し分なく、卓越した水準にあると認められる。以上を総合的に判断し、ERATO 岩田ヒト膜受容体構造プロジェクトは戦略目標「遺伝子情報に基づくたんぱく質解析を通じた技術革新」に資する十分な成果が得られたと結論する。

〔総合評価〕 A+ （戦略目標に資する十分な成果が得られた）

以上