

プログラム名： 豊かで安全な社会と新しいバイオものづくり  
を実現する人工細胞リアクタ

PM名：野地 博行

プロジェクト名：「つくる」人工細胞デバイス

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平成28年度

研究開発課題名：

リポソーム型リアクターを用いた膜タンパク質進化分子工学技術の開発

研究開発機関名：

大阪大学

研究開発責任者：

松浦 友亮

# I 当該年度における計画と成果

## 1. 当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

我々は近年リポソームディスプレイ法と名付けた膜タンパク質進化分子工学を可能とする技術を開発した。本研究課題では、この手法を G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の熱安定性進化に適用することを目指す。まず機能を保持したまま熱安定性の向上した変異体をスクリーニングする技術を開発し、次にこの技術を GPCR の安定性進化に適用する。GPCR の安定化は、タンパク質の結晶構造解析ひいてはドラッグデザインに貢献する。加えて、ドラッグスクリーニングに使用できる特定の GPCR だけを膜タンパク質として持つ人工細胞の開発にも繋がる。

本研究の全体計画では、まず(1) 7回膜貫通領域を持つ GPCR を細胞サイズのリポソーム表面に機能発現可能な形で提示させる技術を確立し、つぎに、(2) ハイスループットスクリーニング技術を確立する。最後に、(3) GPCR を用いた耐熱性の進化実験を実施する。このため、平成28年度は、上記(1)を検討し、モデル膜タンパク質として Adenosine A2a receptor (A2aR)を用いて研究を進める。以下、研究実施内容を具体的に記載する。

- ① 合成した A2aR の膜挿入を定量可能なリポソーム型リアクター (人工細胞) の構築
- ② 合成した A2aR に付加した蛍光タンパク質の蛍光が検出可能なリポソーム型リアクターの構築
- ③ 合成した A2aR のリガンド結合が検出可能なリポソーム型リアクターの構築
- ④ 多様性を持つ A2aR ライブラリーのスクリーニングが可能となる技術を開発する
- ⑤ 耐熱性、リガンド結合に応じて1ラウンドのスクリーニングで遺伝子濃縮が行える技術を確立する

## 2. 当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

### 2-1 進捗状況

- ① 合成した A2aR の膜挿入を定量可能なリポソーム型リアクター (人工細胞) の構築  
バックグラウンドに対して2倍以上のシグナルを検出可能とすることにより、上記リポソーム型リアクターを構築した。具体的には A2aR を合成した場合に、その N 末端がリポソームの外部に存在するシグナルを検出した。
- ② 合成した A2aR に付加した蛍光タンパク質の蛍光が検出可能なリポソーム型リアクターの構築  
本年度は、実験を開始し、A2aR に付加した蛍光タンパク質の蛍光をリポソーム内で検出できるか確認した。
- ③ 合成した A2aR のリガンド結合が検出可能なリポソーム型リアクターの構築  
本年度は、実験を開始し、複数の蛍光リガンドを合成し、A2aR との結合を評価し、本手法の技術的課題を見いだした。具体的にはバックグラウンドに対して2倍以上のシグナルを検出可能とすることにより、上記リポソーム型リアクターを構築した。
- ④ 多様性を持つ A2aR ライブラリーのスクリーニングが可能となる技術を開発する  
本年度は、実験を開始し、本手法に技術的問題があるか検討した。
- ⑤ 耐熱性、リガンド結合に応じて1ラウンドのスクリーニングで遺伝子濃縮が行える技術を確立する。  
本年度は、実験を開始し、本手法に技術的問題があるか検討した。

## 2-2 成果

- ① 合成した A2aR の膜挿入を定量可能なリポソーム型リアクター（人工細胞）の構築
- ② 合成した A2aR に付加した蛍光タンパク質の蛍光が検出可能なリポソーム型リアクターの構築

上記の2項目に関しては図1に示すように、DNAがない場合（バックグラウンドシグナル）と比べて、GPCRを合成した場合は100倍以上のシグナルを達成した。

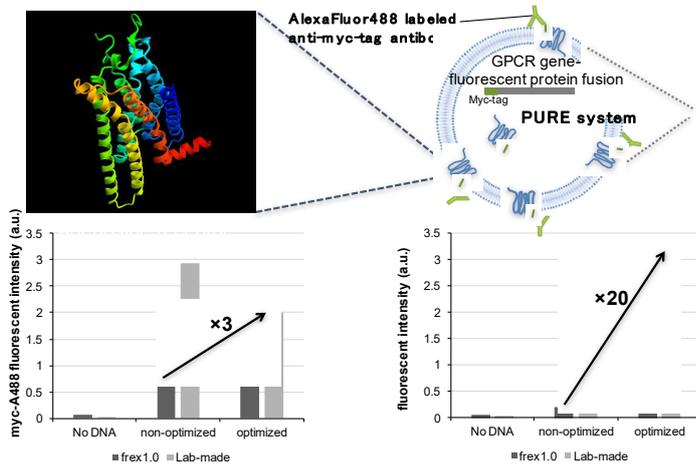


図1：リポソーム型リアクター内部でA2aRを合成する模式図。左下は、初期条件よりもA2aRのN末端の検出シグナルが、無細胞翻訳系と配列のコドンの最適化により3倍向上した事を示す。同様に右下は、初期条件よりもA2aRの蛍光シグナルが20倍向上した事を示す。結果として、DNAがない場合（バックグラウンドシグナル）と比べて、A2aRを合成した場合は100倍以上のシグナルを達成した。

- ③ 合成した A2aR のリガンド結合が検出可能なリポソーム型リアクターの構築

本年度は、複数の蛍光修飾したリガンドを合成し、リポソーム表面に存在するA2aRに結合するかを確認する事を目指した。バックグラウンドに対して2倍以上のシグナルを示すリガンドが存在した。

- ④ 多様性を持つGPCRライブラリーのスクリーニングが可能となる技術を開発する

本年度は、実験を開始し、本手法に技術的問題があるか検討した。具体的にはフローサイトメーターを用いたA2aRの変異型ライブラリーを分析する技術を確立した。

- ⑤ 耐熱性、リガンド結合に応じて1ラウンドのスクリーニングで遺伝子濃縮が行える技術を確立する。

本年度は、実験を開始し、本手法に技術的問題があるか検討した。その結果、リポソーム自体は70°C、30分の熱処理に対しても耐性を持つ事を明らかにした。

## 2-3 新たな課題など

課題③で合成したA2aRの蛍光リガンドは結合能が弱く、今後のスクリーニング実験には使えない可能性が高い。現在、新たなリガンドの合成や構造認識抗体で代用するなどの対応策を講じている。

## 3. アウトリーチ活動報告

2016年8月10日、大阪大学にて開催の高校生を対象に実施した夏の研究室体験において、ImPACTプログラムおよび本課題を紹介した。