

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 2 8 年 度

研究開発課題名：

理論計算と進化分子工学を融合した G 蛋白質共役型受容体 (GRCR) の革新

的耐熱化法の開発

研究開発機関名：

国立大学法人千葉大学

研究開発責任者：

村田 武士

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

G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) は、ホルモンや神経伝達物質などの情報を受容する最も重要な創薬標的ファミリーである。しかし、GPCR は熱安定性が低いため精製が難しい場合が多く、新薬開発を妨げるボトルネックとなっていた。本研究では、理論計算と進化分子工学を融合した GPCR の革新的耐熱化変異体作製技術を開発する。そして、数種類の創薬標的 GPCR の耐熱化変異体を創出し、製薬企業等へ導出することを研究目標とする。以下に H28 年度の実施計画について記載した。

A.基盤技術開発

- A-1.ホモロジーモデル作製法の検討の実施：蛋白質の立体予測プログラムと膜蛋白質用自由エネルギー関数を組み合わせた方法を検討する。
- A-2.統計力学理論計算法の精密化：形態熱力学的表現中のパラメータを精密化する。
- A-3.変異遺伝子ライブラリーの作製法：理論予測により耐熱化に寄与するホットスポット残基をランダム化した変異遺伝子ライブラリーの作製技術を開発する。
- A-4.リボソームソーティング技術を用いたスクリーニング法：大阪大学（課題 2B）と共同で耐熱化変異体のスクリーニング技術の開発を進める。
- A-5.大腸菌を用いたスクリーニング法：耐熱化変異体のスクリーニング技術を開発する。
- A-6.簡便な変性温度測定法：培養段階や膜画分の状態で安定性を評価できる手法を確立する。

B.産学連携構想

- B-1.パートナー企業との契約：パートナー企業を探索し、共同研究契約を締結する。

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

A.基盤技術開発

- A-1.ホモロジーモデル作製法の検討：ホモロジーモデル作製法を確立した（達成度：100%）。
- A-2.統計力学理論計算法の精密化：形態熱力学的表現中のパラメータを精密化し、的中率が5%以上向上した（達成度：100%）。
- A-3.変異遺伝子ライブラリーの作製法：変異遺伝子ライブラリーの作製技術の大枠を開発した（達成度：90%）。
- A-4.リボソームソーティング技術を用いたスクリーニング法：耐熱化変異体のスクリーニング技術の開発を進めた（達成度：100%）。
- A-5.大腸菌を用いたスクリーニング法：耐熱化変異体のスクリーニング技術を開発した（達成度：100%）。
- A-6.簡便な変性温度測定法：培養段階や膜画分の状態で安定性を評価できる手法を確立した（達成度：100%）。

B.産学連携構想

- B-1.パートナー企業との契約：パートナー企業を探索し、共同研究契約を締結した（達成度：100%）。

2-2 成果

A.基盤技術開発

- A-1.ホモロジーモデル作製法の検討の実施：蛋白質の立体予測プログラムと膜蛋白質用自由エネルギー関数

を組み合わせた方法を検討することにより、ホモロジーモデル構造選抜方法を確立し、最適な初期モデル作成法を決定した (*J. Comput. Chem.*, 2017)。

A-2. 統計力学理論計算法の精密化：ターゲット膜蛋白質の耐熱化に寄与するホットスポットの同定法を開発した (*J. Phys. Chem. B*, 2016、プレスリリース、新聞発表)。エネルギー項のパラメーターを精密化し、アラニン変異体の耐熱化理由についても理論計算で明らかにすることに成功した (*Chem. Phys. Lett.*, 2016)。また、本理論計算法を用いて耐熱化したことにより構造解析に成功したアセチルコリン受容体とプラスタノイド受容体の結晶構造について理論解析を行い、計算方法の検証と評価を行なった (論文投稿中)。

A-3. 変異遺伝子ライブラリーの作製法：セロトニン受容体について4箇所のホットスポットを同定し、トリムテクノロジーを用いてランダム化した変異遺伝子ライブラリーを作成した。また、アデノシン受容体について2箇所のホットスポットを同定し、ランダム化した変異遺伝子ライブラリーを作製した。ランダム化した変異遺伝子ライブラリーを調べたところ、欠損等のエラーが含まれていた。PCR の条件等のライブラリー作製方法の再検討を行い、効率的な方法を決定した。

A-4. リボソームソーティング技術を用いたスクリーニング法：モデルGPCRであるアデノシン受容体とセロトニン受容体について、耐熱化変異体を含め計7種類の遺伝子を大阪大に郵送し、リボソーム内での合成実験を行った。得られたサンプルを千葉大に郵送し、リガンドの結合活性や機能性抗体との結合能を調べた。

A-5. 大腸菌を用いたスクリーニング法：変異遺伝子ライブラリーを大腸菌に形質転換し、蛍光タンパク質の蛍光強度でのスクリーニング条件を決定した。さらに、セルソーター (FACS) を用いた高発現大腸菌のスクリーニング法を開発し、セロトニン受容体の変異遺伝子ライブラリーから高発現株を分取した。得られた変異体の多くは耐熱性も向上していた。

A-6. 簡便な変性温度測定法：以前に開発した Clear Native-PAGE を用いて、変性温度を短時間で見積もることができる方法や、精製条件や溶液条件のスクリーニング方法、構造安定化抗体のスクリーニング法を開発した (論文準備中)。

B. 産学連携構想

B-1. パートナー企業との契約：パートナー企業の選定と契約に向けて、製薬企業4社に、技術を紹介した。そして、製薬企業1社とGPCRの耐熱化変異体創出に関する共同研究契約を締結した。また、ベンチャー起業を視野に入れ、ベンチャーキャピタルと交渉を継続している。

2-3 新たな課題など

なし。

3. アウトリーチ活動報告

千葉大学のオープンキャンパスの際に、一般参加者に本研究内容を紹介した。