

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 9 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。平成29年度は、H28年度に引き続き、上記(1)を検討するとともに、(2)、(3)の検討を開始した。また、これまで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てきたが、他の GPCR (合計4種類)でも検討した。以下、研究実施内容を具体的に記載する。

- ① 合成した GPCR の C 末端の蛍光タンパク質由来の蛍光が検出可能なリポソーム型リアクターの構築
- ② 合成した GPCR 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
- ③ 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
- ④ 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
- ⑤ 熱安定性(蛍光タンパク質由来の蛍光)とリガンド結合能(リガンド由来の蛍光)を指標とした遺伝子スクリーニング系を構築する。
- ⑥ 野生型よりも T_m が進化したリガンドが結合できる GPCR 変異体を取得する。

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 GPCR の C 末端の蛍光タンパク質由来の蛍光が検出可能なリポソーム型リアクターの構築
A2aR 以外の4種の GPCR についても蛍光タンパク質由来の蛍光が検出可能な条件を明らかにした。
- ② 合成した GPCR 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種の GPCR のうち、3種については蛍光リガンドを合成し、そのうち2種の GPCR と蛍光リガンドの結合を確認した。
- ③ 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
- ④ 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
③、④については、熱処理してもリポソームが壊れない条件を見いだした。
- ⑤ 熱安定性(蛍光タンパク質由来の蛍光)とリガンド結合能(リガンド由来の蛍光)を指標とした遺伝子スクリーニング系を構築する。

GPCR のうちの1つについて T_m 値と GPCR に融合した蛍光タンパク質由来の蛍光とに相関があることを確認した。

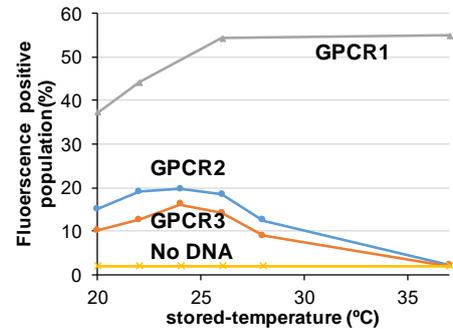
- ⑥ 野生型よりも T_m が進化しリガンドが結合できる GPCR 変異体を取得する。

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 GPCR の C 末端の蛍光タンパク質由来の蛍光が検出可能なリポソーム型リアクターの構築

A2aR 以外の3種の GPCR をリポソーム内で合成して、C 末端の蛍光タンパク質由来の蛍光を検出した。蛍光検出には温度が非常に重要である事を明らかにした。特に、2種の GPCR (GPCR2,3) については、低温での合成が蛍光タンパク質の活性化に必須であることを明らかにした。



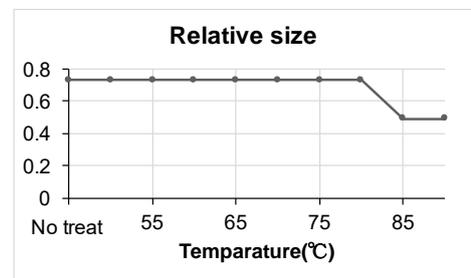
- ② 合成した GPCR のリガンド結合が検出可能なリポソーム型リアクターの構築

4種の GPCR のうち、3種はペプチドをリガンドとする GPCR を選択した。これにより、蛍光ラベルが容易になる。実際、AlexaFluor488 をラベルしたペプチドリガンドを合成し、これと昆虫細胞で発現・精製された GPCR との結合をゲルろ過クロマトグラフィーと蛍光偏光法で確認し、 K_D が 50nM 以下であることを明らかにした。

- ③ 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

- ④ 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

本研究課題では、リポソームを熱処理し、耐熱性の高い GPCR を選択する点が特徴である。そこで、本年度は③、④については、熱処理してもリポソームが壊れない条件を見いだした。具体的には、リポソーム外液の影響を強く受け、これを適切な組成することで 80°C まで熱処理してもリポソームが壊れない条件を見いだした。



- ⑤ 熱安定性 (蛍光タンパク質由来の蛍光) とリガンド結合能 (リガンド由来の蛍光) を指標とした遺伝子スクリーニング系を構築する。

GPCR のうちの1つについて T_m 値と GPCR に融合した蛍光タンパク質由来の蛍光とに相関があることを確認した。

- ⑥ 野生型よりも T_m が進化しリガンドが結合できる GPCR 変異体を取得する。

本年度は、変異型ライブラリーの作成に着手して、調製したライブラリーのクオリティを次世代シーケンサー解析により調べている。

2-3 新たな課題など

リポソーム内で合成する事で GPCR の C 末端の蛍光タンパク質由来の蛍光を検出する事は、現在用いている4つの GPCR いずれでも可能となった。一方で、リガンド結合に関しては、2種だ

けで弱いシグナルが見られるに留まっている。今後、条件検討する事でリガンド結合のシグナルを強化する。

ライブラリーの作成を進めており、現在、リガンド結合ではなく GPCR の C 末端の蛍光タンパク質由来の蛍光強度だけでも進化実験を進める事を検討している。

3. アウトリーチ活動報告

大阪大学工学部オープンキャンパスにて、本課題の紹介を行った（2017年8月10日、参加者数：150名）。