

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：
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 H29 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成：前年度に確立したホモロジーモデル作成法を用いて、構造未知である複数のターゲット GPCR に対するホモロジーモデルを作成する。
- A-3. 変異遺伝子ライブラリーの作製法：前年度に確立した変異遺伝子ライブラリー作製法を用いて、構造未知である複数のターゲット GPCR に対する変異遺伝子ライブラリーを作製する。
- A-4. リポソームソーティング技術を用いたスクリーニング法：作製した変異遺伝子ライブラリーを大阪大学に提供し、共同で耐熱化変異体 GPCR のスクリーニング技術を開発する。
- A-5. 大腸菌を用いたスクリーニング法：セルソータを用い、スクリーニング法の最適化および効率化を図る。そして、作製した GPCR 変異遺伝子ライブラリーから耐熱化変異体を同定する。
- A-7. 水溶性タンパク質に対する耐熱化変異体予測法の確立：統計力学理論計算法のパラメータを水溶性タンパク質用に最適化し、水溶性タンパク質に対する耐熱化変異体予測法を確立する。
- A-8. 水溶性タンパク質の耐熱化変異体の作製：A-7 で確立した予測方法を用いて、グルコシダーゼの耐熱化変異体候補のアミノ配列を共同研究先である東京大学に提案する。
- A-9. 精製サンプルを用いたリガンド結合評価系の確立：耐熱化変異体の精製サンプルを用いて、リガンドの結合親和性や特異性の変化を簡便に測定できる評価系を確立する。

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。
- B-2. パートナー企業への導出：パートナー企業との契約内容に従って耐熱化した GPCR を導出する。

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-1. ホモロジーモデル作成：初期モデル作成法を確立し、6 種類以上のホモロジーモデルを作成した（達成度：100%）。
- A-3. 変異遺伝子ライブラリーの作製法：アミノ酸残基をランダム化した変異遺伝子ライブラリーを 3 種類作製した（達成度：100%）。
- A-4. リポソームソーティング技術を用いたスクリーニング法：リポソームソーティング技術の評価を行うために、遺伝子ライブラリーやモノクローナル抗体を作製し、大阪大学に提供した（達成度：90%）。
- A-5. 大腸菌を用いたスクリーニング法：セルソータを用いて GPCR の変異体ライブラリーから高発現変異体をスクリーニングする技術を確立した（達成度：90%）。

- A-7. 水溶性タンパク質に対する耐熱化変異体予測法の確立：水溶性タンパク質に対する耐熱化変異体予測法を確立した（達成度：100%）。
- A-8. 水溶性タンパク質の耐熱化変異体の作製：グルコシダーゼの耐熱化変異候補のアミノ酸配列を共同研究先である東京大学に提案した（達成度：100%）。
- A-9. 精製サンプルを用いたリガンド結合評価系の確立：リガンドの結合親和性や特異性の変化を簡便に測定できる評価系を確立した（達成度：100%）。
- 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%）。
- B-2. パートナー企業への導出：パートナー企業に耐熱化した GPCR 配列を導出した（達成度：100%）。

2-2 成果

- A-1. ホモロジーモデル作成：エントロピー利得を計算して耐熱化変異体 GPCR を予測するには立体構造情報が必要であるが、構造未知の GPCR に対しては適用するのが困難である。そこで H28 年度は構造未知の GPCR に対し初期モデルを作成する方法を確立した。本年度は当該モデル作成法を用いてヒト由来のアデノシン受容体、セロトニン受容体、メラトニン受容体、プラスタノイド受容体の活性型および不活性型のホモロジーモデルを作成し、理論的耐熱化変異体予測法を実施した。アデノシン受容体の活性型構造に関しては、MD を用いたモデルの検証と評価を行なった (Kajiwara *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, 122, 4418-4427, 2018)。プラスタノイド受容体に関しては、モデル作成方法の検証と評価を行なった (Yasuda *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, 121, 6341-6350, 2017)。
- A-3. 変異遺伝子ライブラリーの作製法：変異予測で導き出されたホットスポット情報をもとに変異ライブラリーを効率よく作製する必要がある。ライブラリー作製法として FASTR 法に関して、プライマー配列、制限酵素反応条件、ライゲーション条件の検討を行った。これにより、検討前と比べ効率が 15 倍上昇し、FASTR 法による組み合わせランダムライブラリー作製法が確立できた。
- A-4. リポソームソーティング技術を用いたスクリーニング法：大阪大学と共同でのリポソームディスプレイを用いた耐熱化 GPCR 変異体スクリーニング技術確立に向け、リポソームソーティング技術の評価を行うために、3 種のセロトニン受容体の変異遺伝子ライブラリーを大阪大学に提供した。また、昨年度から進めている 2 種のアデノシン受容体に関して、リポソーム膜への発現量を定量する目的で細胞外認識モノクローナル抗体を作製し、大阪大学に提供した。
- A-5. 大腸菌を用いたスクリーニング法：GPCR 変異体ライブラリーから耐熱化変異体をハイスループットで選別する必要がある。そこでライブラリーを大腸菌に形質転換、発現させ、大腸菌から直接変異体遺伝子をハイスループットで選別する。蛍光タンパク質の蛍光強度と GPCR 熱安定性の正の相関にもとづきセルソータを用いて、セロトニン受容体の発現量と大腸菌生存率の相関を決定し、ソーティング範囲を決定した。また、リガンドを利用した変異体スクリーニング法を確立した。
- A-7. 水溶性タンパク質に対する耐熱化変異体予測法の確立：エントロピー利得を利用した耐熱化変異体予測法は原理的には水溶性タンパク質にも適応可能な方法である。そこで本法の水溶性タンパク質への適応を検証するため、構造既知であり、多数の変異体の耐熱性が明らかになっている水溶性タンパク質をモデルにして、計算結果と実験結果の相関解析を進め、パラメータを決定した。
- A-8. 水溶性タンパク質の耐熱化変異体の作製：A-7 で決定したパラメータを使用して、グルコシダーゼ

の耐熱化変異体を予測し、候補変異箇所を東京大学に提案した。

A-9. 精製サンプルを用いたリガンド結合評価系の確立：耐熱化変異体 GPCR のリガンド結合やその特異性を評価するには大量の試料と手間がかかるため、簡便に評価する系の確立が研究開発の効率化に必要である。そこで、以前に開発した Clear Native-PAGE 法を応用し、リガンドの結合親和性や特異性の変化を簡便に測定できる評価系を確立した (Suzuki *et al.*, **Anal. Biochem.**, 548, 7-14, 2018)。

B-1. パートナー企業との契約：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。

B-2. パートナー企業への導出：パートナー企業に耐熱化した GPCR 配列を導出した。

2-3 新たな課題など

特になし。

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（平成 28 年 8 月 6 日開催、参加者数約 300 名）の際に、一般参加者に本研究内容を紹介した。