

京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書

平成26年5月12日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 辻 井 昭 雄 様

所属部局・研究科 医学研究科

職 名・学 年 特定研究員

氏 名 寿野 良二

助成の種類	平成25年度 ・ 在外研究中期助成		
研究課題名	G蛋白共役受容体におけるアロステリック制御の化学的基盤の解明		
受入機関	スタンフォード大学医学部		
渡航期間	平成25年6月3日～平成25年7月6日 平成26年2月21日～平成26年3月31日		
成果の概要	タイトルは「成果の概要／報告者名」として、A4版2000字程度・和文で作成し、添付して下さい。「成果の概要」以外に添付する資料 <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有()		
会計報告	交付を受けた助成金額	750,000 円	
	使用した助成金額	750,000 円	
	返納すべき助成金額	0 円	
	助成金の使途内訳	費 目	金 額 (円)
		渡航費	253,110
		宿泊費	280,150
			200,000
			67,672
計		800,932	
	上記に助成金を充当		
当財団の助成について	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 渡米期間について、柔軟に対応していただき、大変感謝しております。		

研究課題：G 蛋白共役受容体におけるアロステリック制御の化学基盤の解明

昨年度、京都大学教育研究振興財団の在外研究中期助成の支援をいただき、スタンフォード大学 医学部 Brian Kobilka 研究室で研究活動を行った。研究の最終的な目標は G タンパク質共役受容体 (GPCR) の X 線結晶構造解析によるムスカリン M2 受容体の基質選択性の分子メカニズムの解明である。

G タンパク質共役受容体 (GPCR) は、ヒトゲノムにおいて非常に大きなファミリーを形成している。また、GPCR は市販の医薬品の作用点の約 40%を占めると言われており、創薬において重要なターゲットと位置づけられている。数多い GPCR ファミリーの中でも、ムスカリン受容体はオルソステリック部位とアロステリック部位を持つことが知られており、各々の部位を区別して結合する低分子化合物が報告されている。特にアロステリック部位は五種のムスカリン受容体サブタイプでそれぞれアミノ酸配列が大きく異なっており、構造が明らかになればこの部位に対する化合物を設計することで副作用のない薬剤開発が可能になると期待される。

今回、2 度に渡る私はスタンフォード大学 医学部 Kobilka 研究室の滞在中で GPCR の X 線結晶構造解析に必要な発現方法、精製法、結晶化方法を学び、その技術と知識を活かして日本でさらに研究を進めることで現在までに 4.2Å 分解能の新規リガンド結合型の M2 ムスカリン受容体の結晶構造を解析できるまでに至った。助成によって行った具体的な研究を以下に記します。

私のターゲットとしている GPCR、ムスカリン M2 受容体は昆虫細胞 Sf9 を用いて発現させている。Kobilka 研ではこの技術を 20 年以上用いており豊富な技術と情報を持っているので、特に Sf9 でのウイルス液の作成法、大量培養の際の条件検討の方法を学んだ。また、精製法は私がこれまで行っていたリガンドアフィニティーカラムを用いた精製法ではなく、Kobilka 研で独自にスクリーニングした FLAG 抗体を用いてカラムを作成して精製していた。このカラムを用いてより精製度の高いサンプルを高収率で精製することができる。この二つの方法を元に日本で更に条件検討した結果、ムスカリン M2 受容体の収率が 5~10 倍増加することができた。結晶化方法は日本で精製したサンプルをスタンフォード

大学に送り、脂質キュービック法 (LCP 法) と呼ばれる結晶化法を学び、セットした。その際、微結晶を観測することができたが、構造解析に用いるほどのものは得られなかった。このとき、Brian Kobilka 教授から親和性が高く構造解析に有望なネガティブアロステリックリガンドを提供していただいた。このリガンドを開発したのはオーストラリアのモナシュ大学の Arthur Christopoulos 研究室であったので、新たに共同研究を行う事になった。一旦、日本にそれらの技術や知識を持ち帰り、結晶化条件やコンストラクトの検討などの条件検討を行った。その結果、ムスカリン M2 受容体とこれまで報告されていないアンタゴニストの結晶化に成功することができた。また、この条件に様々なアロステリックモジュレータを添加して更に条件検討したところ、アロステリックリガンドとアンタゴニスト存在下でも結晶が観測された。種々の条件の結晶で X 線回折実験を行ったが、あるアロステリックリガンドとアンタゴニスト存在下での結晶は最大 3.4Å 分解能の回折点が観測され、4.2Å 分解能のデータを取得することができた。現在までに分子置換法で位相を決定し、精密化を行っているところである。Fo-Fc マップを見るとオルソステリックとアロステリック部位に電子密度が見られるので、それぞれアンタゴニストとアロステリックリガンドであると考えられる。

以上の結果を踏まえて、再度スタンフォード大学 医学部 Kobilka 研に出張して結晶化条件の検討を行った。この時、前述の新たなアロステリックリガンドを用いた。アロステリックリガンドはポジティブアロステリックモジュレータとネガティブアロステリックモジュレータがある。その多くは親和性が低いものがほとんどであるが、共同研究先のオーストラリアのモナシュ大学の Arthur Christopoulos 研究室が開発した比較的親和性の高いネガティブアロステリックリガンドである。2 度目の渡米では主に結晶化条件検討を行い、前回のコンストラクトと新たなコンストラクトを用いて両方のサンプルから結晶を得た。この結晶をシカゴの放射光施設 APS で X 線回折実験を行ったが、10Å 分解能の回折点を観測した。現在これらの条件をさらに最適化して良質な結晶を得るべく検討中である。

研究の効率的な進行のため 2 回に分けて渡米させていただき、現在までに構造解析できるデータを取得することができた。これらの成果をさらに押し進めて、様々な反応状態のムスカリン M2 受容体構造からリガンド選択メカニズムを解明したいと考えている。