

京都大学教育研究振興財団助成事業
成果報告書

平成25年 6月25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 分子細胞情報学

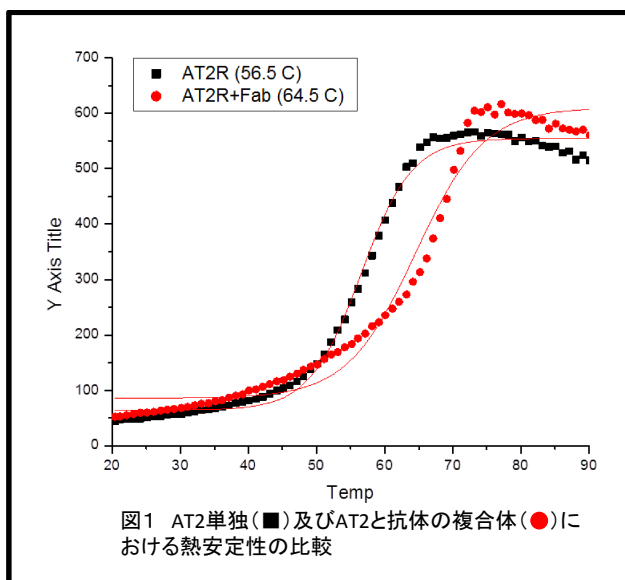
職名・学年 特定助教

氏名 浅田 秀基

助成の種類	平成25年度 ・ 研究者交流支援 ・ 在外研究短期助成		
研究課題名	ヒトアンジオテンシン受容体の結晶化および構造決定		
受入機関	Departments of molecular biology and chemistry, The Scripps Research Institute		
渡航期間	平成25年 4月28日 ~ 平成25年 5月27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 checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有()		
会計報告	交付を受けた助成金額	450,000円	
	使用した助成金額	450,000円	
	返納すべき助成金額	0円	
	助成金の使途内訳	航空運賃(往復):	190,000円
		宿泊費用:	130,000円
		日当(5200円/日、25日):	130,000円
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。)		

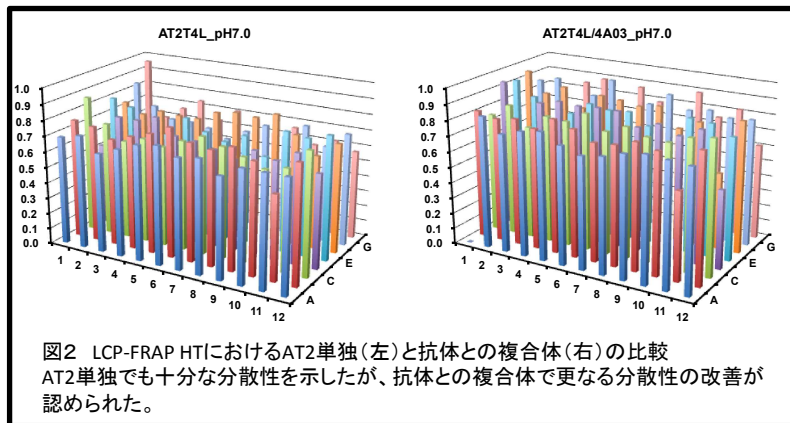
これまでに私は GPCR である 2 型アンジオテンシン II 受容体 (AT2) の X 線結晶構造解析を目的とした発現系、精製系の確立及びキュービック液晶 (LCP) 法による結晶化を行ってきた。しかしながら、現在まで結晶化には至っていないのが現状であった。結晶が得られない理由については、①AT2 の安定化が不十分である、②AT2 の精製純度が悪い、③AT2 の結晶化条件が合っていない等、いくつかの理由が考えられる。①については熱安定性試験や特異的リガンド結合試験等により AT2 の熱安定性は $T_m=58^{\circ}\text{C}$ でリガンドに対する結合親和性が $K_d=6.8\text{nM}$ 、 $B_{\text{max}}=360.3\text{pmol/mg}$ であり、AT2 が安定かつリガンド結合能を持つことを、②については精製後の SDS-PAGE 後の CBB 染色法でのバンドの確認やゲルろ過法を用いた単分散性の確認による精製純度の検討を既に行っており、これらの結果から AT2 の安定性、精製純度は十分であることが示唆されている。一方、我々は③についてこれを検討する術を持っておらず、このことが AT2 の結晶化に成功していない最大の要因であるのではないかと予想した。

今回、本助成金により派遣された Scripps 研究所の Raymond Stevens 博士は GPCR の構造研究において世界をリードしている研究者の一人である。彼らの開発した LCP-FRAP 法は実際の結晶化ドロップ内におけるタンパク質の流動性を調べる方法であり、この流動性が GPCR の結晶化における成功のキーになることを既に明らかにしている。そこで私は、Stevens 博士の元で LCP-FRAP 法による AT2 の結晶化条件の最適化を行なった。



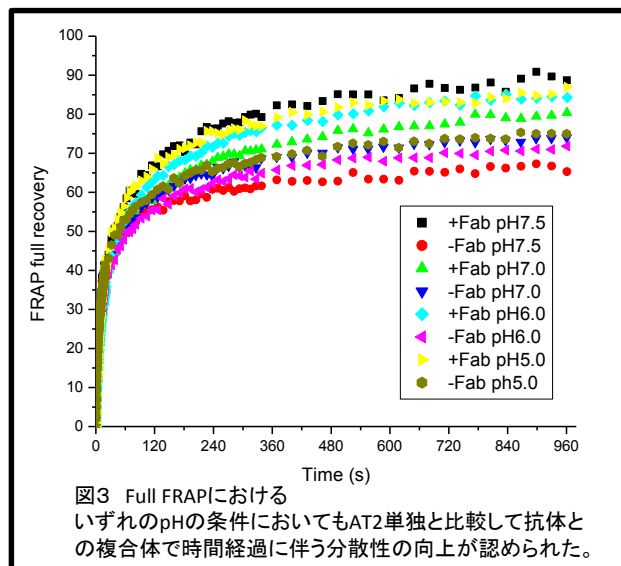
行なった。具体的には、AT2 の大量生産に Sf9 昆虫細胞を用いて 30L 分を行い、このうち 20L 分について細胞膜の調整を行ない、残り 10L 分については細胞のまま Scripps 研究所に輸送した。これらのサンプルは事前にフローサイトメトリー法及び特異的リガンド結合試験を行い AT2 の発現量及び機能を検討した。また、その他 AT2 の精製から結晶化に必要な AT2 特異的リガンド等の試薬もサンプルと共に輸送した。Scripps 研究所へ派遣後、まずこれらのサンプルを用いて京大での方法に準じて AT2 の精製を行なった。精製後、安定に精製できていることを CPM assay による熱安定性の評価を行った。その結果、京大と同様に精製できており、AT2 単独と比べて AT2 特異的抗体との複合体で熱安定性が向上していることを確認した (図 1)。このサンプルを用いて LCP 法による結晶化の最適化を目的とした LCP-FRAP 法を行なった。この方法を行なう為には AT2 を蛍光標識する必要があるが、精製時に Cy3-mono NHS ester (GE

healthcare) を結合させるステップを追加することで簡便に可能である。また、蛍光標識した AT2 の結晶化は通常通りの手法で行ない、我々の初期スクリーニング条件を用いた。ただし、



LCP-FRAP 法を行なう為には専用の測定器が必要である。LCP 法による結晶化後、十分に結晶化ドロップ内の蛍光標識化 AT2 が拡散するまで 20°C で保温 (通常 1 晩) し測定を開始する。測定には 96 条件を観察するハイスループットの FRAP-HT と 1 条件のみの時間経過を観察する Full-FRAP の 2 つのモードがあり、まず FRAP-HT で全ての条件を観察した後、その中で有望な条件についてのみ Full-FRAP を行なう。

FRAP-HT の結果、AT2 単独と比較してほぼ全ての条件において AT2 特異的抗体との複合体で結晶化ドロップ内のタンパク質の分散性の向上が認められた (図 2)。更に、この中で有望だと考えられた条件 (400mM Magnesium Acetate) について行なった Full-FRAP を行った結果、検討した pH のすべての条件において FRAP-HT と同様に AT2 特異的抗体との複合体で結晶化ドロップ内の分散性の向上が認められた (図 3)。



本共同研究により、いくつかの結晶化条件で非常に良い結果が得られたが実際に結晶が得られるところまでには至らなかったが、これらの条件について詳細なスクリーニングを継続することで AT2 の結晶が得られる可能性があると考えている。また、今回の Stevens 教授との共同研究から得られた結晶化に至るまでの技術、および結晶化技術の詳細を我々のラボに導入することができたことは、我々の研究室における GPCR の X 線結晶構造解析は更に加速されることと考えられる。今後はこれら得られた技術、情報を用いて AT2 の結晶化を成功させ、なるべく早く AT2 の構造を決定及び血圧調節機構が分子レベルでどのように制御されているかの詳細が明らかになりたいと考えている。また、これらの技術を利用して AT2 のみならず、我々が現在進めている他の GPCR の構造決定にも応用していきたいと考えている。