

国際化学研究協力事業
平成 24 年度実施計画書

平成 24 年 8 月 30 日

共同研究代表者

所属機関・部局 京都大学・大学院医学研究科

職・氏名 准教授・小林 拓也 (こばやし たくや)

1. 研究課題名 (和文) G 蛋白共役受容体のアロステリック制御を目的とした新しい化学的基盤の確立

(英文) The Chemical Basis for Allosteric Regulation of G Protein Coupled Receptors.

2. 共同研究実施期間

平成 24 年 9 月 1 日 ~ 平成 27 年 8 月 31 日 (3 年 ヶ月)

(注) 本計画書は、受託機関を通して電子データにて提出してください。

5. 共同研究参加者

(1) 日本側参加者* (代表者を除く)

氏名	所属研究機関・職名	専門及び本研究における役割
万木貴美	京都大学・研究員	内科学、生化学、GPCR の生産及び結晶化
辻本浩一	京都大学・研究員	生化学、分子生物学、GPCR の生産及び結晶化
新規採用予定 (未定)	京都大学・研究員	

*継続の共同研究で前年度から新たに参加者を追加する場合は、追加する参加者に (新) のマークをつけてください。

(2) 米国側参加者* (代表者を含む**)

氏名	所属研究機関・職名	専門及び本研究における役割
○Brian Kobilka	スタンフォード大学・教授	生化学、構造生物学、結晶化実験をマネージメント
Brian Shoichet	カリフォルニア大学サンフランシスコ校・教授	バイオインフォマティクス、ドッキングシミュレーションをマネージメント
Thor Thorsen	スタンフォード大学・研究員	生化学、分生生物学、GPCR の生産及び結晶化
Dahlia Weiss	カリフォルニア大学サンフランシスコ校・研究員	バイオインフォマティクス、ドッキングシミュレーション

* 継続の共同研究で前年度から新たに参加者を追加する場合は、追加する参加者に (新) のマークをつけてください。

** 米国側代表者の氏名の前に、「○」のマークをつけてください。

6. 本年度実施計画の概要

※ 申請書の内容を踏まえて、日本語にて記入してください。

※ 経費との関連がわかるように具体的に記入してください。

- ・ ムスカリン M2 受容体のオルソステリック部位にアンタゴニスト(QNB)の結合した結晶構造を解くことに成功している。さらに、受容体のアロステリック部位を明確にするためにEli Lilly社の開発したアロステリック化合物(LY2033298)の結合したムスカリンM2受容体の結晶構造を決定したい。LY2033298は、5種類全てのムスカリン受容体サブタイプに結合することから各受容体サブタイプに共通した構造を認識・同定すると考えられており、結晶化に適した水溶性も兼ね備えている。ムスカリン M2 受容体の生産は、昆虫細胞を用いる。プロジェクト期間中は常にムスカリン M2 受容体を生産する計画にしている。本年度は 100 リッターの培養を計画している。培養にはオートクレーブ可能なプラスチック製のフラスコを使用するが、何度かオートクレーブを繰り返すと潰れてしまうことが分かっているので、定期的に新しいものと交換する。受容体の生産を行うためにイノーバ インキュベーターシェーカーを購入する予定にしている。本シェーカーにより、一度に 10 リッターの培養が可能となり、本年度は 10 回の培養を計画している。
- ・ 結晶化で使用するムスカリン M2 受容体の生産は、京都大学で小林らが行う。小林らは、昆虫細胞を用いて培養溶液 1 リッターあたり 1~2 mg の受容体を大量発現させることに成功している。精製には、抗コリン作用を持つ aminobenzotropin をレジンに結合させたりガンドアフィニティーカラムを作製し、活性を保持した受容体を精製するところに大きな特徴がある。プロジェクト期間中は、結晶化用に常にムスカリン M2 受容体を精製する計画にしている。本年度は、100 リッターの培養で、2 kg の膜画分を調製したい。界面活性剤で可溶化し、リガンドアフィニティー精製することにより、約 30 mg のムスカリン受容体を獲得する。ムスカリン受容体の可溶化に使用する界面活性剤は、高価な試薬であるので、まとめて購入することでディスカウントする。
- ・ LY2033298 の結合したムスカリン M2 受容体の結晶化及び構造解析は、スタンフォード大学で Kobilka 教授らが行う。そのため、精製したサンプルを定期的にスタンフォード大学に送る。結晶化には、モノオレインなどの脂質とコレステロールを混ぜて創成した脂質キュービックフェーズ(LCP)と呼ばれる中間相にムスカリン M2 受容体を再構成する。これまでにアロステリック制御因子の結合には、オルソステリック部位に結合するリガンド(アゴニスト、アンタゴニスト)の影響を受けることが報告されている。そこで、LY2033298 と共に異なる種類のアゴニストやアンタゴニストを結合させ、順番に脂質キュービックフェーズに結晶化を試みる。本年度中に新規雇用する研究員と代表者で渡米し、ムスカリン受容体の結晶化及び構造解析を行うと共に、それらの技術を日本にも導入する。
- ・ LY2033298 の結合したムスカリン M2 受容体の結晶構造が決定されるまで、カリフォルニア大学の Shoichet 教授らは、既に決定されたムスカリン M2 受容体と M3 受容体のオルソステリック部位の立体構造を用いて新規オルソステリックリガンドのインシリコスクリーニングを行う。Shoichet 教授と Kobilka 教授は、DOCK というプログラムを使い、 β_2 アドレナリン受容体の新しいタイプのオルソステリックリガンドの探索に成功している(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 6843-8, 2009)。日常的な打ち合わせは、Skype などを使って行う予定にしている。

7. 本年度経費総額 7,600 千円

(単位：千円)

研究経費							事務委託手数料
設備備品費	消耗品費	旅費等		人件費・謝金等	その他経費	外国旅費・人件費・謝金等に係る消費税*	
		国内旅費	外国旅費				
2,750	1,405	0	500	2,400	300	145	100

* 外国旅費・人件費・謝金等に係る消費税を本経費から支出しない場合は、その理由等を「外国旅費・人件費・謝金等に係る消費税」欄に記入してください。

* 委託費の総額の上限は、次のとおりです。

- ・平成 23 年度以前の採択課題・・・2,000 万円/年（うち事務委託手数料は、研究経費に対し 10%以内）
- ・平成 24 年度以降の採択課題・・・研究経費 1,500 万円/年に、研究経費に対し 10%以内の事務委託手数料を加えた額

翌年度所要見込額	翌々年度所要見込額	3 年度後所要見込額
15,700	15,700	7,800

左の欄は該当する場合のみ記入してください。
(単位：千円)

*

研究計画全体必要額
46,800

2 年度目以降の場合は、前年度までの執行済額も含めて記載してください。
(単位：千円)

8. 設備備品費、消耗品費、人件費・謝金等、その他経費

	細 目	金 額	積 算 内 訳
設 備 備 品 費	イノーバ インキュ ベーターシェーカー 44R	2,750	イノーバ インキュベーターシェーカー 44R 1 台 2,750 (千円) を購入する。
	計	2,750	
消 耗 品 費	昆虫細胞培地 100L 血清 5L プラスチック器具 界面活性剤 10g 10 本 一般試薬	400 (4×100) 100 (10×10) 300 (7.5×40) 500 (50×10) 105	本年度 100 リッター培養し (培地 1 リッターあたり 4 千円、血清 500 ミリリッターあたり 1 万円)、培養にオ ートクレーブ可能なプラスチックのフラスコ (1 フラ スコあたり 7.5 千円、40 個) を使用する。GPCR を可溶 化するために界面活性剤をまとめ買いする (10 グラム で 5 万円)。一般試薬には GPCR を安定化する化合物 (リ ガンド) を含む。
	計	1,405	
人 件 費 ・ 謝 金 等	新規採用予定 (研究 員)	2,400	研究員 (未定) を公募し、雇用する。年棒制 (40 万円 /月×6 ヶ月) を考えている。
	計	2,400	
そ の 他 経 費	運搬費	300	京都大学で生産したサンプルを米国に輸送する。
	計	300	

備考：

- ① 細目は設備備品費、消耗品費、人件費・謝金等、その他経費 (「通信費 (切手・電話等)」「運搬費」「印刷費」等 (手引 8-9 参照)) の別に記入してください。
- ② 設備備品費、消耗品費、人件費・謝金等、については、「積算内訳」の欄に品名または人物名、単価および数量を明記してください。

9. 交流計画

(a) 日本側参加者（代表者を含む）の米国への渡航計画

出張者 (氏名・職名)	出発地	用務先 (都市名)	旅行期間*	用 務	経費負担**
小林拓也・准 教授 新規採用研 究員	京都	サンフラ ンシスコ	3 月頃、1 週間	受容体の結晶化、構造解析	有
	京都	サンフラ ンシスコ	3 月頃、1 週間	受容体の結晶化、構造解析	有

* 旅行期間の欄の記入例：「6 月頃、10 日間」

** 本経費使用予定の有無を記入すること

(b) 日本側参加者（代表者を含む）の米国以外の国への渡航計画*

出張者 (氏名・職名)	出発地	用務先 (国名・都 市名)	旅行期間**	用 務	経費負担***
予定なし					

* 外国出張の渡航先は原則として、米国のみを渡航先とします。ただし、当該共同研究の研究成果発表を目的とする学会等への出席や、フィールドワーク等で当該第三国へ行くことが必須である研究上の理由がある場合に限り、米国以外の国を訪問することは可能です。

** 旅行期間の欄の記入例：「6月頃、10日間」

*** 本経費使用予定の有無を記入すること

(c) 米国側研究者の来日計画

出張者 (氏名・職名)	用務先	旅行期間*	用 務
未定			

* 旅行期間の欄の記入例：「6月頃、10日間」