

国際共同研究事業
国際化学研究協力事業
平成 27 年度実施計画書

平成 27 年 2 月 13 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

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)

3. 共同研究代表者

機関所在地・電話等 〒606-8501

京都市左京区吉田近衛町

TEL 075-753-4389

FAX 075-753-4660

e-mail t-coba@mfour.med.kyoto-u.ac.jp

4. 共同研究代表者の受託機関事務連絡担当者

部課名・職・氏名 医学・病院構内共通事務部 経理・研究協力課 国際掛 谷垣幸太

所在地・電話等 〒606-8501

京都市左京区吉田近衛町

TEL 075-753-9516

FAX 075-753-4348

e-mail 060intl-aff@mail2.adm.kyoto-u.ac.jp

(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
前田将司	京都大学・研究員	生化学、構造生物学、GPCR の生産、結晶化及び構造解析

* 新規の共同研究で申請書から新たに参加者を追加する場合、または、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。

- 平成 26 年度に引き続き、受容体のアロステリック部位を明確にするためにアロステリック化合物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 以外にも、Strychnine、Brucine、Alcuronium、Gallamine などを使用する。これらの化合物は、市販品を購入することもでき、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る。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 50 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。受容体の生産には、既存のイノーバ インキュベーターシェーカーを使用する。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 5 回の培養を計画している。
- 平成 26 年度に引き続き、結晶化で使用するムスカリン M2 受容体の生産は、京都大学で小林が行う。小林は、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 FLAG 抗体をレジンに結合させたアフィニティーカラムを作製し、受容体の N 末端にある FLAG タグを利用して精製する。リガンドアフィニティーカラムより精製効率が上がり、結晶化にも遜色がないことを既に証明している。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、50 リッターの培養で、1 kg の膜画分を調製したい。界面活性剤で可溶化し、アフィニティー精製することにより、約 50 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。
- 本事業は最終年度に入るため、米国側で著しく進歩した結晶化及び構造解析技術を学び、お互いの技術のさらなる発展に努めると共に、日本側に米国側の技術を導入したいと考えている。具体的には、アロステリック化合物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、昨年度に引き続き雇用している研究員(前田)がスタンフォード大学の Kobilka 研究室に客員研究員(Visiting researcher)として、常に京都大学に情報を供与することで、同時平行で京都大学にスタンフォード大学と同じシステム(結晶化及び構造解析など)を導入する。短時間でリアルタイムに系を導入するには、日米の密接な情報交換が必要となる。スタンフォード大学滞在中の研究員(前田)の研究費は Kobilka 研究室が負担する。当初の申請書の計画にある「若手研究者養成への貢献」の一環も兼ねている。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おり、アロステリック化合物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。
- カリフォルニア大学の Shoichet 教授らは、これまでに決定されたムスカリン M2 受容体と M3 受容体の立体構造を用いて新規リガンドのインシリコスクリーニングを行っている。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やムスカリン受容体の新しいタイプのリガンドの探索に成功している(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 6843-8, 2009; Mol. Pharmacol. 84: 528-540, 2013)。スクリーニングされた新規リガンドは、M2 受容体と M3 受容体と共結晶化を試みる。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。
- 平成 26 年度に引き続き、ムスカリン M2 受容体と Gi 蛋白質の複合体の共結晶化も行う。Kobilka 教授らは、 β_2 アドレナリン受容体と Gs 蛋白質の複合体の共結晶化に成功しており(Nature 477, 549-55, 2011)、 β_2 アドレナリン受容体/Gs 蛋白質の結晶構造解析で培った技術を M2 受容体にも応用する。昨年度に雇用した研究員(前田)がスタンフォード大学の Kobilka 研究室に滞在して行っている。既に、研究は順調に進んでおり、残された時間で最大限の技術開発に繋げ、それらの技術を同時に日本でも立ち上げる。打ち合わせは、Skype などを使って行い、今後の対策や実験の方向性を確認する。

7. 本年度経費総額 8,020 千円

(単位：千円)

研究経費							業務委託手数料
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				
0	2,540	0	2,400	2,100	100	360	520

* 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。

* 委託費の上限は申請額に基づき、次のとおりとします。

- ・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

左の欄は該当する場合のみ記入してください。
(単位：千円)

* 委託費の上限は申請額に基づき、次のとおりとします。

- ・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

研究計画全体必要額
46,840

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)

* 研究計画全体必要額の上限は申請書記載の額とします。

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 (単位：千円)	積算内訳
設備備品費	なし		
	計	0	
消耗品費	昆虫細胞培地 50L 血清 2.5L プラスチック器具等 界面活性剤 25g 6本 カラム・レジン等 一般試薬等	4千円×50 (200) 10千円×5 (50) 600 100千円×6 (600) 650 440	本年度 50 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、ピペット、遠心用チューブ(蛋白質濃縮用の遠心式フィルターを含む)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(25 グラムで 10 万円)。GPCR の精製には、ゲル濾過カラムなどを使用する。一般試薬には GPCR を安定化する化合物(リガンド)や抗 FLAG 抗体を含む。
	計	2,540	
人件費・謝金等	研究員 1 名	2,100	年棒制(35 万円/月×5 ヶ月、社会保険 35 万円/5 ヶ月)で研究員(前田将司)を 1 名採用する。
	計	2,100	
その他経費	運搬費	100	京都大学で生産したサンプルを米国に輸送する。
	計	100	

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 8-8 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）の国内出張計画

出張者 (氏名)	出発地 (都市名)	用務先 (都市名)	旅行期間*	用 務 (用務先・用務内容)	経費負担**
予定なし					

* 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）の米国への渡航計画

出張者 (氏名)	出発地	用務先 (都市名)	旅行期間*	用 務 (用務先・用務内容)	経費負担**
前田将司	京都	サンフランシスコ	4月頃 (5ヶ月間)	スタンフォード大学・受容体の結晶化及び構造解析	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

(c) 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)	出発地	用務先 (国名・都 市名)	旅行期間**	用 務 (用務先・用務内容)	経費負担***

* 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

(d) 米国側研究者の来日計画

出張者 (氏名)	用務先	旅行期間*	用 務 (用務先・用務内容)

* 旅行期間の欄の記入例：「6月頃、10日間」