

# 国際化学研究協力事業 平成 24 年度実施報告書

平成 25 年 4 月 10 日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

所属機関・部局 京都大学・医学研究科職・氏名 <sup>(ふりがな)</sup> 准教授・小林 拓也 (こばやし たくや)

1. 事業名 国際化学研究協力事業
2. 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.
3. 共同研究実施期間 (全採用期間)  
平成 24 年 9 月 1 日 ~ 平成 27 年 8 月 31 日 ( 3 年   ヶ月)
4. 研究参加者  
(1) 日本側参加者 4 名 (2) 米国側参加者 4 名
5. 主要な物品購入状況 (一品又は一組若しくは一式の価格が 50 万円以上のもの)

物品名	仕様 型・性能等	数量	単価(円)	金額(円)	設置研究機関名
大容量冷却遠心機 (日立工機製)	himac CR7	1 台	2,436,000 円	2,436,000 円	京都大学
アングル形ロータ (日立工機製)	R7A	1 個	1,470,000 円	1,470,000 円	京都大学

備考：50 万円以上の物品を購入等した場合のみ記入してください。

## 6. 人件費使用状況

氏名	金額	雇用期間	専門および本研究における役割
寿野良二（研究員）	587,792 円（社会 保険含）	平成 25 年 3 月 1 日～平成 26 年 3 月 31 日	受容体の発現、精製、結晶化及 び構造解析

備考： 研究者及び専門技術員・研究補助者を雇用した場合のみ記入してください。  
雇用期間の欄の記入例：「平成 23 年 6 月 1 日～平成 25 年 5 月 31 日」

7. 渡航実施状況

(a) 当該年度に米国を訪問した日本側参加者の明細

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**
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) 当該年度に米国以外の国を訪問した日本側参加者の明細\*

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***
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) 当該年度に受入れた米国側参加者の明細

出張者 (氏名・職名)	用務先	旅行期間*	用 務
なし			

\* 旅行期間の欄の記入例：「6月頃、10日間」

## 8. 研究実施状況

※ 申請書の内容および当該年度実施計画書の「6. 本年度実施計画の概要」と対応させつつ、当該年度の研究の実施状況を簡潔に日本語にて記入してください。

- ・ 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と考え、ムスカリン M2 受容体の生産を行った。本年度は100リッターの培養を行った。培養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した。大量の菌体を回収するために、本年度は大容量冷却遠心機 himac CR7(日立工機)とアングル形ロータ R7A(日立工機)を購入した。これにより一度に6リッターの培地を遠心することができるようになった。
- ・ 本年度は精製用に、抗コリン作用を持つ aminobenzotropin をレジンに結合させたリガンドアフィニティーカラムを作製した。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。膜画分を調製し、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、リガンド結合能を保持したムスカリン受容体を獲得した。
- ・ 精製したサンプルを使い、まず最初に京都大学で結晶化を試みた。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 受容体を再構成した。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、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ている。平成 25 年 3 月に新規雇用する研究員(寿野良二)は、5 月に渡米する予定で、Kobilka 研究室(スタンフォード大学)で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った。日常的な打ち合わせは、Skype などを使って行った。平成 25 年 1 月に Kobilka 教授がシンポジウムで発表するために名古屋に来たので、直接会って研究の進捗状況と今後の方向性を確認した。

9. 研究発表（平成 24 年度の研究成果）

【雑誌論文】 計（ 2）件    うち査読付論文 計（ 0）件

著者名	論文標 題						
小林 拓也	GPCRのX線結晶構造解析に成功するための技術的進展						
雑誌名	査読の有無	巻	発行年		最初と最後の頁		
実験医学 羊土社	無	Vol.31 No.3	2	0	1	3	358-366

著者名	論文標 題						
小林 拓也	ムスカリン受容体の立体構造が明らかに						
雑誌名	査読の有無	巻	発行年		最初と最後の頁		
医学のあゆみ 医歯薬出版	無	Vol.243 No.11, 12	2	0	1	2	983-984

著者名	論文標 題					
雑誌名	査読の有無	巻	発行年		最初と最後の頁	

【学会発表】 計（ 1）件    うち招待講演 計（1）件

発表者名	発表標 題		
小林 拓也	GPCRをターゲットにしたX線結晶構造解析の現状と今後の展望		
学会等名	発表年月日	発表場所	
神経化学会公開シンポジウム2012	2012年9月30日	神戸	

【図 書】 計（ ）件

著者名	出 版 社		
書 名	発行年		総ページ数