

国際共同研究事業
国際化学研究協力事業
平成 25 年度実施報告書

平成 26 年 4 月 16 日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

所属機関・部局 京都大学大学院・医学研究科

職・氏名 ^(ふりがな) 准教授 小林 拓也

1. 事業名 国際共同研究事業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 3 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

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)	6,757,731 円 (社会保険含む)	平成 25 年 4 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 25 年 6 月 1 日～平成 27 年 5 月 31 日」

7. 渡航実施状況

(a) 日本側参加者（代表者を含む）の国内出張

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**
寿野 良二	京都市	兵庫県 淡路市	9月19日 -20日、 2日間	研究成果報告会参加、情 報・資料収集	有
寿野 良二	京都市	兵庫県 佐用郡 佐用町	10月9日 -11日、 3日間	理化学研究所 Spring8 にて 蛋白質構造解析	有
寿野 良二	京都市	兵庫県 佐用郡 佐用町	10月30日 -11月1日、 3日間	理化学研究所 Spring8 にて 蛋白質構造解析	有
寿野 良二	京都市	兵庫県 佐用郡 佐用町	11月7日 -10日、 4日間	理化学研究所 Spring8 にて 蛋白質構造解析	有
寿野 良二	京都市	兵庫県 佐用郡 佐用町	11月26日 -29日、 4日間	理化学研究所 Spring8 にて 蛋白質構造解析	有
寿野 良二	京都市	兵庫県 佐用郡 佐用町	12月15日 -17日、 3日間	理化学研究所 Spring8 にて 蛋白質構造解析	有
寿野 良二	京都市	東京都 目黒区	1月22日 -24日、 3日間	東京大学先端科学技術研 究センターにて蛋白精製 に関する技術習得	有

* 旅行期間の欄の記入例：「6月10～19日、10日間」

** 本経費使用予定の有無を記入すること

(b) 当該年度に米国を訪問した日本側参加者

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**
寿野 良二	京都市	ハイアット・リージェンシー・マウイリゾート (カフルイ・ハワイ州)	11月30日-12月7日、8日間	GPCR Workshop2013 出席、情報収集および共同研究者とのディスカッション	有
寿野 良二	京都市	スタンフォード大学 (スタンフォード・カリフォルニア州)	2月21日-3月31日、39日間	スタンフォード大学、共同研究先にて技術習得、情報交換	有

* 旅行期間の欄の記入例：「6月10～19日、10日間」

** 本経費使用予定の有無を記入すること

(c) 当該年度に米国以外の国を訪問した日本側参加者*

出張者 (氏名)	出発地 (都市名)	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***
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10～19日、10日間」

*** 本経費使用予定の有無を記入すること

(d) 当該年度に受入れた米国側参加者

出張者 (氏名)	用務先	旅行期間*	用務
Brian Kobilka	京都大学大学院医学研究科	5月30日～ 6月2日、 4日間	共同研究について打ち合わせ、京都大学の酵母を使った GPCR 発現技術の見学・習得、京都大学のその他のラボとのディスカッション

* 旅行期間の欄の記入例：「6月10～19日、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。

- ・ ムスカリン受容体のアロステリック部位を明確にするため、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する。本年度は約 200 リッターの培養を行った。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した。受容体の生産には、既存のインノーバ インキュベーターシェーカーを使用した。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 20 回の培養を試みた。
- ・ 結晶化で使用するムスカリン M2 受容体の生産は、京都大学で行った。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、これまで使用してきた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に代わり、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製作した。受容体の N 末端にある FLAG タグを利用して精製する。その結果、昨年度まで使用していた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も証明することができた。
- ・ アロステリック化合物には、LY2033298 以外にも、Strychnine、Brucine、Alcuronium、Gallamine などを使用した。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ており、結晶化に適した水溶性も兼ね備えている。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、研究員（寿野）がスタンフォード大学の Kobilka 研究室に短期留学して学んだ。その後、京都大学でも結晶化及び構造解析が行えるように系を立ち上げた。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 受容体を結晶化した。現在、分解能~3.5 Å の結晶が得られており、結晶化条件の最適化及び構造解析を進めている。
- ・ M2 受容体と Gi 蛋白質の複合体の共結晶化も試みた。スタンフォード大学の 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 受容体にも応用したいと考えた。研究員（寿野）がスタンフォード大学の Kobilka 研究室に短期留学して、Gs 蛋白質の発現・精製系と G 蛋白質の構造を安定化する抗体分子（ナノボディ）の発現・精製系の日本への導入を試みた。スタンフォード大学では、短期留学した研究員と Kobilka 教授で、今後の対策や実験の方向性を確認すると共に、京都大学でも Skype などを使ってカリフォルニア大学の Shoichet 教授やスタンフォード大学の Kobilka 教授と日常的な打ち合わせを行い、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 25 年度の研究成果）

【雑誌論文】 計（3）件 うち査読付論文 計（1）件

相手国研究代表者との共著の有無*	著者名	論文標題			
	無	Murai Y., et al.	Synthesis of photoreactive 2-phenethylamine derivatives - Synthesis of adenosine derivative enabling functional analysis of adenosine receptors by photoaffinity labeling.		
雑誌名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
	Eur. J. Org. Chem.	有	2013	2013	2428-2433
無	著者名	論文標題			
	小林拓也、岩田想	GPCRの立体構造から解き明かす生命科学			
無	雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
	実験医学増刊 羊土社	無		2014	未定
無	著者名	論文標題			
	小林拓也	G蛋白質共役受容体のX線結晶構造解析の進歩			
無	雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
	血栓と循環 メディカルレビュー社	無	Vol.21, No.3	2013	33-40

【学会発表】 計（5）件 うち招待講演 計（5）件

発表者名	発表標題	
Kobayashi T.	Crystallization of human membrane proteins using antibody fragments.	
学会等名	発表年月日	発表場所
Protein Island Matsuyama (PIM) International Symposium 2013	2013年9月18日	愛媛県 松山市

発表者名	発表標題	
Kobayashi T.	Crystallization of mammalian membrane proteins using antibody fragments.	
学会等名	発表年月日	発表場所
4 th International Symposium on Diffraction Structural Biology	2013年5月29日	愛知県 名古屋市

発表者名	発表標題	
小林拓也	機能性抗体を利用したGPCRのX線結晶構造解析への試み	
学会等名	発表年月日	発表場所
千里ライフサイエンスセミナー	2013年10月16日	大阪府 大阪市

発表者名	発表標題	
小林拓也	GPCRのシグナル伝達分子機構の解明から創薬に向けて	
学会等名	発表年月日	発表場所
第86回日本生化学会大会	2013年9月12日	神奈川県 横浜市

発表者名	発表標題	
小林拓也	GPCRのX線結晶構造解析と創薬に必要なGPCRの構造情報について	
学会等名	発表年月日	発表場所
よこはまNMR構造生物学研究会 第47回ワークショップ	2013年7月3日	神奈川県 横浜市

【図書】 計(3)件

相手国研究代表者との共著の有無*	著者名	出版社		
	村田武士、小林拓也、野村紀通、岩田想	化学同人		
無	書名	発行年	総ページ数	
	「膜タンパク質」の重要性とその構造が拓く未来 膜タンパク質構造研究 最前線	2013	pp.1-10	

相手国研究代表者との共著の有無*	著者名	出版社		
	小林拓也	化学同人		
無	書名	発行年	総ページ数	
	ムスカリン性アセチルコリン受容体の構造解析から創薬に向けて 膜タンパク質構造研究 最前線	2013	pp.19-25	

相手国研究代表者との共著の有無*	著者名	出版社		
	浅田秀基、小林拓也	化学同人		
無	書名	発行年	総ページ数	
	膜タンパク質の発現と精製 「昆虫細胞による生産」 膜タンパク質構造研究 最前線	2013	pp.96-102	

*相手国研究代表者との共著がある場合は○、相手国研究代表者との共著であり論文内に事業名を明記している場合は◎と記入した上で、明記されている箇所（頁、巻頭、巻末等）を記入。

*足りない場合は適宜行を追加して下さい。