

国際共同研究事業
国際化学研究協力事業
平成 26 年度実施報告書

平成 27 年 4 月 13 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 1 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
前田将司（研究員）	4,795,283 円 (社会保険含む)	平成 26 年 4 月 1 日～ 平成 27 年 3 月 31 日	生化学、構造生物学、GPCR の生産、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**

* 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**
前田将司	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）	4月10日－ 3月30日、 355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
なし			

* 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。

- ・ 昨年度に引き続き、QNB (アンタゴニスト) の結合したムスカリン M2 受容体にネガティブアロステリック制御因子 (Negative Allosteric Modulator; NAM) の一つである Dimethyl W-84 を結合させて得られた結晶 (分解能 ~ 3.5 Å) の最適化を行った。塩の種類と濃度、沈殿剤の種類と濃度、pH などの条件をふることで、分解能が少しずつ向上し、構造解析に成功した。しかし、QNB の結合しているオルソステリック部位は同定できたが、Dimethyl W-84 の電子密度は確認することができなかった。NAM は、オルソステリックリガンド (この場合 QNB) の結合親和性を弱くして、受容体から乖離させると考えられている。今回使用した QNB は Kd 値が pM オーダーと非常に結合親和性が高いため、NAM が QNB を乖離できなかった可能性がある。そこで、QNB よりも結合親和性の低い NMS (アンタゴニスト) を使用して同様の実験を試みた。しかし、NMS+NAM あるいは NAM 単独ではムスカリン M2 受容体の結晶を得ることができなかった。
- ・ 本年度は、NMS を結合したムスカリン M2 受容体にポジティブアロステリック制御因子 (Positive Allosteric Modulator; PAM) の一つである Alcuronium を結合させて結晶化を試みた。PAM は、オルソステリックリガンド (この場合 NMS) の結合親和性を強くすることで、二つのリガンド (NMS と PAM) が両方ともムスカリン M2 受容体に結合することができる。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 受容体を結晶化した。その結果、NMS+PAM および NMS 単独を結合させたムスカリン M2 受容体において、結晶を得ることに成功した。結晶の最適化を行うことにより、分解能が向上し、構造解析に成功した。現在、NMS+PAM については 2.9 Å で、NMS 単独については分解能 3.2 Å でデータの精密化、論文作成の準備を進めている。
- ・ ムスカリン M2 受容体の結晶構造を決定することを目的とし、本年度は昨年度と同様に、約 200 リッターの昆虫細胞の培養を行った。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。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た。受容体の N 末端にある FLAG タグを利用して精製する。これ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している。
- ・ ムスカリン M2 受容体と Gi 蛋白質の複合体の共結晶化も試みている。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 (前田) がスタンフォード大学の Kobilka 研究室に出張して、Gs および Gi 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・精製系を習得した。Gs 蛋白質およびナノボディの発現・精製系については、日本への導入を行い、京都大学にも同様のシステムを立ち上げることができた。スタンフォード大学では、研究員 (前田) と Kobilka 教授で、今後の対策や実験の方向性を直接確認すると共に、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 26 年度の研究成果）

【雑誌論文】 計 (2) 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			
		Suharni et al.	Proteoliposome-based selection of a recombinant antibody fragment against the human M2 muscarinic acetylcholine receptor.		
無	雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
	Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.	有	33	2014	378-385
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			
	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	無	32	2014	84-91	
	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 (6) 件 うち招待講演 計 (6) 件

発表者名	発表標題	
小林拓也	G蛋白質共役受容体の構造生物学の進展とその創薬への応用	
学会等名	発表年月日	発表場所
第87回日本内分泌学会学術総会	2014年4月25日	福岡

発表者名	発表標題	
小林拓也	シグナル伝達の選択的な制御を指向したGPCRの構造生命科学を目指して	
学会等名	発表年月日	発表場所
ERATO末松ガスバイオロジー最終研究成果報告会	2015年1月29日	東京

発表者名	発表標題	
小林拓也	GPCRの立体構造を認識する抗体から広がる新たな生命科学	
学会等名	発表年月日	発表場所
第87回日本内分泌学会学術総会	2014年4月25日	福岡

発表者名	発表標題	
小林拓也	シグナル伝達の選択的な制御を指向したGPCRの構造生命科学	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本薬学会第135年会	2015年3月27日	神戸

発表者名	発表標題	
Takuya Kobayashi	Structural biology of membrane proteins and drug discovery -GPCR structure determination-	
学会等名	発表年月日	発表場所
2 nd International Symposium Kyoto University-National Taiwan University	1 st Sep., 2014	Kyoto

発表者名	発表標題	
Takuya Kobayashi	Crystallization of human GPCRs using antibody fragment.	
学会等名	発表年月日	発表場所
6 th Special Conference of the International Society for	21 st Sep., 2014	Tokyo

Neurochemistry		
----------------	--	--

【図書】 計 (1) 件

相手国研究代表者との共著の有無*	著者名	出版社			
	Shiroishi M. and Kobayashi T.	Methods in Molecular Biology, Springer Protocols, Human Press			
無	書名	発行年		総ページ数	
	Structural Proteomics High-Through Methods “Screening of stable G-protein-coupled receptor variants in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .”	2	0	15	159-170/375

*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。