

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25709080

研究課題名(和文) 安定化GPCR改変体の革新的創出システムの開発

研究課題名(英文) Development of the strategy for creating stabilized GPCR variants for large-scale preparation

研究代表者

白石 充典(Shiroishi, Mitsunori)

九州大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00380527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、不安定で調製が困難なG蛋白質共役型受容体(GPCR)について、安定化改変体を迅速に作製し大量調製することを可能にするシステムの構築を目的とする。S. cerevisiaeを用いた96ウェルプレート形式での迅速なスクリーニングシステムを確立し、さらにS. cerevisiaeによるGPCRの大量発現系を確立した。また不安定で調製が困難であった構造未知のGPCR_Aの安定化に成功し、ミリグラムレベルで精製可能な方法を確立し、リガンドとの相互作用の物理化学的解析、および受容体の構造解析を目指した結晶化を行った。

研究成果の概要(英文)： The aim of this project is to develop the strategy for stabilization of unstable G-protein coupled receptors (GPCRs) for large-scale preparation. We tried to establish the screening system of stabilized GPCRs using the signal transduction system in S. cerevisiae. We also established the rapid screening system in 96-well plate format. Using this system, stabilized variants of GPCR_A, whose structure has not solved, were successfully selected. Then we established the large-scale expression strategy in S. cerevisiae. The stabilized variants of GPCR_A were purified in milligram quantities, and the ligand-receptor interactions were biophysically examined. We also tried crystallization of the purified GPCR_A for determination of its structure.

研究分野：蛋白質工学

キーワード：G蛋白質共役型受容体 出芽酵母 安定化 大量調製 膜蛋白質

1. 研究開始当初の背景

G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) は、7 回膜貫通型の膜受容体で、市販あるいは開発中の薬の約 50% が標的としている重要な蛋白質ファミリーである。近年、薬の標的となる受容体の立体構造を利用した *in silico* スクリーニングや、受容体と候補化合物の物理化学的な相互作用情報を組み合わせた『合理的な創薬』の試みが盛んに行われてきている。このような手法は、次世代創薬の新たな突破口を開くことが期待されている。

受容体の立体構造解明や物理化学的な相互作用解析に共通して必要なことは、受容体分子を安定かつ大量に発現、精製することである。しかしながらおよそ 800 種類存在する GPCR のうち、いまだ 13 種類の立体構造しか解明されていないという事実は、GPCR の大量調製がいかに困難かということを物語っている。創薬ターゲットとして重要な GPCR の多くは本質的に不安定であり、それを克服するためには受容体に改変を施し安定化することが必須である。GPCR の安定化に関しては、英国のグループが網羅的アラニンスクニングにより変異体を作製し、1 アドレナリン受容体やアデノシン A2A 受容体の結晶構造解析に成功している (Warne et al., Nature, 2008, Lebon et al., Nature, 2011)

国内においては、申請者らが先頭に立ち GPCR の安定化研究を行ってきた。申請者らは出芽酵母 (*S. cerevisiae*) を利用し、構造解析に供する安定な GPCR 改変体を迅速に構築・評価するシステムを構築してきた (**引用文献**)。このシステムを利用し、ヒト由来ヒスタミン H1 受容体の安定化改変体の作成に成功し、結晶構造解析に成功した (**引用文献**)。しかし他の GPCR の安定化を試みてきたが、高発現・安定化が達成できない受容体がほとんどであった。このような受容体の安定性・発現の向上には、ランダム変異や Ala スクニングなど大規模な改変体ライブラリーの作製とスクリーニングが必要であると考えられる。また多くの受容体で共通に利用できる安定化手法 (安定化残基の導入やタンパク質の融合) が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、蛋白質工学的手法 (変異導入、蛋白質融合) 分子生物学的手法 (酵母のシグナル伝達システムの利用) を利用したスクリーニングシステムを開発し、『機能を保持し、高発現で安定な』GPCR 分子を創出することを目的とする。安定化とは、受容体分子に以下の性質を付与することを意味する。(1) 宿主内で分解されずに安定に発現・保持されること。(2) 受容体分子抽出のための界面活性剤中や、異なる脂質環境下においても構造・機能を保持できること。

このような安定な受容体分子を創出するためには、多くの変異体を作製し、酵母細胞

に発現させ、界面活性剤で受容体を可溶化してゲルろ過で物性評価する、という工程を迅速に行う必要がある。そのために出芽酵母を用いたスクリーニングシステムのスループットを大幅に向上させることが必須である。また、アゴニストの開発のためには GPCR の活性化状態の構造を解析する必要があるが、通常は活性化状態を保持したまま安定化することは困難である。しかし GPCR の中には基底状態の平衡が活性化状態に傾いた「恒常的活性の高い」受容体も存在するため、そのような受容体を作製することは可能であると考えられる。このような受容体を得るため、標的受容体と酵母のもつ G 蛋白質をカップリングした変異体スクリーニングシステムの構築を試みる。

本研究ではまた、構築したシステムを用いて、発現レベルが非常に低い GPCR_A (中枢神経系に主に発現する GPCR) をターゲットとし、“活性化を保持したまま” 高発現・安定化するような改変体を作製し、大量調製系を確立し、進行状況によっては化合物との相互作用の物理化学的解析、受容体の結晶化、構造解析を試みる。

3. 研究の方法

(1) 大規模スクリーニングに対応するための新規酵母株の作製

以下の改変が施された酵母株を作製する。性フェロモン受容体 *Ste2* 遺伝子の破壊。

G 蛋白質活性化の制御因子である *Sst2* 遺伝子の破壊。酵母の三量体 G 蛋白質 *Gpa1* の C 末端を、ヒト GPCR とカップリングするようにヒト G の配列に置換する。細胞周期停止に関わる *Far1* 遺伝子の破壊。 *FUS1* プロモーターの下流への *HIS3* 遺伝子の挿入。蛋白質分解を抑制するために液胞の主要プロテアーゼである *Pep4* 遺伝子を破壊。①～

の改変により目的 GPCR の変異体が機能を保持していれば、アゴニストの存在下で MAP キナーゼ経路が活性化され、*HIS3* 遺伝子が発現することで、ヒスチジン欠損培地上で選択が可能となる。発現した受容体は、界面活性剤で可溶化し、受容体の C 末端に融合した緑色蛍光蛋白質 (GFP) を利用した蛍光ゲルろ過 (FSEC) を行うことで、物性 (安定性) を評価する。

(2) 96 ウェルプレートを用いたハイスループットスクリーニングシステムの構築

数多くの形質転換体コロニーを培養し、迅速に破砕、可溶化を行い、発現した GPCR 改変体を蛍光ゲルろ過による物性評価を行うため、96 ウェルプレートを用いたスクリーニング系を新たに構築する。系の構築にあたり、モデル受容体として、すでに構造が明らかとなっているアデノシン A2A 受容体 (ADORA2A) とヒスタミン H1 受容体 (H1R) を用いる。また他の GPCR や他の膜蛋白質の高発現・安定

化に本システムが適用できるかどうか評価する。

(3) GPCR の高発現・安定化に関わる因子の探索

構築したハイスループットスクリーニングシステムを用いて、様々な改変（フレキシブルな領域の削除、部位特異的変異導入、蛋白質融合など）を施し、界面活性剤中での安定性を評価する。これらの検討を各種 GPCR 分子について行い、共通して高発現・安定化に関わる因子を探索する。

(4) 安定化 GPCR の大量調製系の構築

申請者らはこれまでメタノール資化性酵母 (*P. pastoris*) を用いた GPCR の大量調製系を確立してきた（引用文献）。本研究では、構造未知の GPCR について高発現・安定化の改変体を選択し、*P. pastoris* や *S. cerevisiae* を用いた大量発現系の構築を行う。培地組成、振盪方法、培養時間、培養温度などの検討を行う。また安定に精製するための界面活性剤や精製方法の検討を行う。

4. 研究成果

(1) 新規酵母株を用いたヒト由来 GPCR の発現

計画当初は、ヒト由来 GPCR とカップリングする酵母株が入手不可であったため酵母 BY4741 株をベースに自身で作製することを試みたが、期間の途中で Roth らのグループから、ヒト GPCR とカップリングする酵母株三種（YB1, YB11, YB14）の入手が可能となったので、以後これらの株を用いることにした。YB1 は Gi、YB11 は Gq、YB14 は Gs に対応している。これらの株を用いてヒスタミン H1 受容体（H1R）および構造未知 GPCR_A の発現実験を行った。発現ベクターは高コピータイプ（p426）構造未知 GPCR_A は主に中枢神経系に発現し、神経伝達を制御する受容体である。H1R は Gq とカップリングすることが知られているが、YB11 のみアゴニスト濃度の上昇による菌の増殖が観察され、正しくシグナル伝達が行われていることが示された。また GPCR_A は Gi とカップリングするが、Gi をもつ YB1 株でのみアゴニストによる菌の増殖が確認できた。

発現した GPCR に関して、蛍光ゲルろ過（FSEC）にて物性を評価したところ、目的の GPCR のピークが観察された。しかし分解されて生成したと思われるフリーの GFP のピークも観察された。これまでのスクリーニングで用いてきた FGY217 株では *Pep4* 遺伝子が破壊されており、フリーの GFP のピークはほとんど観察されない。よってこれらの酵母株においても、液胞の主要プロテアーゼである *Pep4* 遺伝子を破壊した株を作製することが望まれる。

次にランダム変異を導入した GPCR_A を YB1 株に形質転換し、アゴニスト存在下で生育したコロニーを培養し、発現した GPCR_A 変異体を FSEC により評価したが、鋭いピークを与えるような安定な変異体を得ることはできなかった。ランダム変異の頻度を上げ、ライブラリーを大きくし、高発現・安定化する改変体を粘り強くスクリーニングする必要があると考えている。

(2) 96 ウェルプレートを用いた受容体スクリーニング系の構築

出芽酵母を用いた膜蛋白質のスクリーニングシステムのハイスループット化を行った。96 ウェルプレート形式で行うために、植菌、培養、植継ぎ、集菌、菌体破碎、可溶化、FSEC でのサンプル調製の一連の操作を最適化した。培養にはタイテック社のマキシマイザーが適していた。また植継ぎ時の菌濃度を揃えるために植菌後 30 で 16 時間以上前培養することが重要であることがわかった。ガラスビーズよりもジルコニア-シリカビーズを用いた方が、菌体の破碎時間を 5 分の 1 に短縮できた。またこれまでの方法では、菌体の破碎後に、破碎した細胞壁（デブリ）を遠心で除いていたが、この細胞壁に目的蛋白質が多く残存しており、これが 96 ウェルプレートでのピペット操作時にウェル間の誤差を生み出す原因であることが判明した。そこでデブリを含んだ状態で可溶化し、FSEC に供することにした。これら一連の最適化により、FSEC 解析時のウェル間誤差が 5% 以内となるような、信頼性の高い微小ハイスループットスクリーニングシステムを構築することに成功した。この成果は Shiroishi et al., *Protein Science* (2016) で発表した。

本スクリーニングシステムは主にアデノシン A2A 受容体や GPCR_A の改変体を用いて構築してきた。特に GPCR_A に関しては、細胞内第 3 ループに蛋白質を融合することで、アゴニスト結合能を保持したまま安定化した改変体を得られたため、以降はこの改変体をベースに更に発現・安定性を向上させることに注力した。申請者らはさらに構造既知の 21 種類の GPCR について、野生型と構造解析された改変体を発現し、FSEC による評価を行った。その結果 16 種類の GPCR について、構造解析された改変体が野生型よりも良好なクロマトグラムを与えることがわかった。GPCR 以外の膜蛋白質（酵母由来のトランスポーター Hxt3, Vgr4, Ssh1, Dur3）に関しても適用できることが示され、膜蛋白質に広く利用可能であることが示された。また、膜貫通領域に導入することで受容体の発現が向上する変異を見出した。これは GPCR_A のみでなく他の ADORA2A や CCR5 など他の GPCR にも適用可能であった。変異の詳細については特許申請の可能性もあるためここでは公開できない。

(3) 安定化 GPCR の大量発現系の構築

安定化改変を施した構造未知 GPCR_A について、まずこれまで大量調製の実績がある *P. pastoris* を用いた大量発現系の構築を試みた。安定化改変体の遺伝子を発現ベクター pPIC9K に挿入し、*P. pastoris* 株 SMD1163 株に形質転換し、受容体の C 末端に融合した GFP の蛍光強度と FSEC のピークパターンにより高発現株を選択した。BMMY 培地で大量調製を行い、ガラスビーズによる破碎後、超遠心により膜画分を得た。この膜画分を用いて精製を行ったところ、分子量約 90kDa の夾雑蛋白質が受容体よりも多く見られ、精製効率を低下させていることがわかった。この夾雑蛋白質はすべての GPCR_A 改変体の場合で見られた。原因が特定できなかったため、発現宿主を出芽酵母 (*S. cerevisiae*) に変えることにした。高コピーの p426 ベクターを用いた *S. cerevisiae* での発現は、ゲノムに組み込む *P. pastoris* よりも、操作がシンプルであるという利点がある。また安定化受容体のスクリーニングにも用いていることから、*S. cerevisiae* での大量発現が可能となれば、スクリーニングから大量発現まで同一宿主でシームレスに行うことが可能である。

S. cerevisiae による大量発現の問題点の 1 つは、合成培地をベースとした選択培地を用いるため、培養時の菌体密度を上げることができないことであった。また栄養豊富な培地で培養すると、プラスミドが抜けてしまい、単位菌体あたりの発現量が低下してしまう。申請者らは、培養方法と培地組成を検討することで、合成培地使用時と同じ単位菌体あたりの発現量を保ちながら、菌密度を 5 倍以上向上させることに成功した。*S. cerevisiae* において *P. pastoris* と同等あるいはそれ以上の発現レベルを達成することができた。

(4) GPCR_A の安定な精製方法の開発

まずは GPCR_A をドデシルマルトシド (DDM) とコレステロール (CHS) の混合ミセルを用いて可溶化、精製を行った。まず TALON 樹脂を用いた金属キレートアフィニティー精製を行い、TEV プロテアーゼで GPCR と GFP の間を切断した後、Ni-Sepharose 樹脂で未切断の GPCR、切断後の GFP および TEV プロテアーゼを除いた。最後に Superdex200 を用いたゲルろ過を行うことで高純度の GPCR_A 分子を得ることができた。しかしゲルろ過においてモノマーとダイマーのピークが近接して分けることができなかった。そこで界面活性剤としてラウリルマルトシドネオペンチルグリコール (LMNG) を用いたところ、モノマーとダイマーを明確に分けることができた。最終精製物の収量は、改変体を改良するたびに向上しているが、最近では培地 1L あたりから 1mg の受容体分子を精製できるまでに向上している。

また、受容体の安定な精製のためにはリガンド存在下での精製が有効である。GPCR_A に

ついてはこれまでに開発されてきた多くのリガンドが市販されている。精製した GPCR_A を用い、様々なリガンド存在下で CPM アッセイによる熱安定性の評価を行ったところ、熱安定性を 15 向上させるアゴニストを 1 種類、20 向上させるアンタゴニストを 1 種類見出した。今後はこれらのリガンド存在下で精製することで収量の向上、結晶構造解析の促進が期待できる。

(5) 精製した GPCR と化合物の相互作用の物理化学的解析、および結晶化の試み

高純度に精製した ADORA2A、ケモカイン受容体 CCR5、および GPCR_A について、等温滴定型カロリメーター (ITC) を用いた相互作用解析を行った。ADORA2A については DDM/CHS で精製し、アンタゴニスト ZM241385 およびアゴニスト NECA について相互作用解析を行ったところ、文献値より数倍親和性が低下するが 0.7~0.8 のストイキメトリーで相互作用を確認することができた。大きいストイキオメトリーは受容体が安定に精製できている指標となると考えられる。CCR5 においては精製受容体とアンタゴニスト Maraviroc との相互作用解析を行った。その結果、LMNG/CHS で精製したサンプルの方が DDM/CHS よりも 2 倍以上大きなストイキオメトリーとなることから、LMNG/CHS がより安定に精製できることが確認された。GPCR_A においては、DDM/CHS、LMNG/CHS で精製したサンプル共に 0.6~0.7 程度のストイキオメトリーで相互作用解析されたが、LMNG/CHS で精製されたサンプルの方がより低い親和性であった。受容体の親和性に影響を与える要因を明らかにするのが今後の課題であろう。

GPCR_A (細胞内第 3 ループを bRIL で置換した改変体) について、キュービック相結晶化法による結晶化を試みた。ある Buffer、塩、PEG300 の組み合わせにおいて微結晶が観察されたが、再現性に乏しいことが問題である。また結晶化仕込み後、多くの条件でキュービック相が壊れてしまうことも問題である。これを解決するために現在幾つかの試みを行っている。例えば細胞内第 3 ループ部分へ PGS (*Pyrococcus abyssi* glycogen synthase) を融合した改変体の作製を行っている。また結晶化を促進するバインダーとなる抗体を作製している。さらにより安定性を向上させるための改変体の作製を行っている。

<引用文献>

Shiroishi M, Tsujimoto H, Makyio H, Asada H, Yurugi-Kobayashi T, Shimamura T, Murata T, Nomura N, Haga T, Iwata S, Kobayashi T. "Platform for the rapid construction and evaluation of GPCRs for crystallography in *Saccharomyces cerevisiae*." *Microb. Cell Fact.*, 11, 78. (2012)
doi: 10.1186/1475-2859-11-78.

Shimamura T, Shiroishi M, Weyand S, Tsujimoto H, Winter G, Katritch V, Abagyan R, Cherezov V, Liu W, Han GW, Kobayashi T, Stevens RC, Iwata S. "Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin." *Nature*, 475, 65-70 (2011) doi: 10.1038/nature10236.

Shiroishi M, Kobayashi T, Ogasawara S, Tsujimoto H, Ikeda-Suno C, Iwata S, Shimamura T. "Production of the stable human histamine H₁ receptor in *Pichia pastoris* for structural determination." *Methods*, 55, 281-286. (2011) doi: 10.1016/j.jymeth.2011.08.015.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6件)

Shiroishi M and Kobayashi T, "Structural Analysis of the Histamine H1 Receptor" *Handbook of Experimental Pharmacology*, 241, 21-30 (2017) 査読無し doi: 10.1007/164_2016_10.

Shiroishi M, Moriya M and Ueda T "Micro-scale and rapid expression screening of highly expressed and/or stable membrane protein variants in *Saccharomyces cerevisiae*" *Protein Science*, 25, 1863-1872 (2016) 査読あり doi: 10.1002/pro.2993.

Shiroishi M and Kobayashi T "Screening of stable G-protein coupled receptor variants in *Saccharomyces cerevisiae*" *Methods in Molecular Biology*, 1261, 159-170 (2015) 査読あり doi: 10.1007/978-1-4939-2230-7_9.

Suharni, ..., Shiroishi M (9番目), ..., and Nomura N "Proteoliposome-based selection of a recombinant antibody fragment against the human M2 muscarinic acetylcholine receptor" *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 33, 378-385 (2014) 査読あり doi: 10.1089/mab.2014.0041.

Shiroishi M "Strategies for the Structural Determination of G protein coupled receptors: from an example of histamine H1 receptor" *Yakugaku Zasshi*, 133, 539-547 (2013) 査読なし <https://www.jstage.jst.go.jp/article/ya>

kushi/133/5/133_13-00001-4/_pdf

白石充典「出芽酵母 (*S. cerevisiae*) を用いた高発現・安定化 GPCR 改変体の作製と評価」*蛋白質科学会アーカイブ*, 6, e072 (2013) 査読あり http://www.pssj.jp/archives/protocol/expression/cerevisiae_02/cerevisiae_02.html

[学会発表](計 15件)

白石充典、松原直紀、森谷真衣、中野祐毅、小林拓也、岩田想、植田正「*Saccharomyces cerevisiae*における哺乳類由来GPCRの発現」第89回日本生化学会大会、2016年9月27日、仙台国際センター(仙台市)

松原直紀、白石充典、植田正「*Saccharomyces cerevisiae*を用いたケモカイン受容体CCR5の大量調製系の確立」第16回日本蛋白質科学会年会、2016年6月8日、福岡国際会議場(福岡市)

白石充典、森谷真衣、植田正「*Saccharomyces cerevisiae*発現系による微小スケールでの膜蛋白質安定化変異体の評価～アデノシンA2A受容体を例に～」第16回日本蛋白質科学会年会、2016年6月8日、福岡国際会議場(福岡市)

白石充典、森谷真衣、植田正「高難度膜蛋白質の迅速な安定化のための酵母を用いた微小ハイスループットスクリーニングシステム」BMB2015、2015年12月3日、神戸国際展示場(神戸市)

森谷真衣、小林拓也、岩田想、植田正、白石充典「アデノシンA2A受容体-リガンド相互作用の等温滴定型カロリメーターによる脂質二重膜中での解析に向けた試み」第15回日本蛋白質科学会年会、2015年6月26日、あわぎんホール(徳島市)

白石充典、森谷真衣、中野祐毅、植田正「高難度膜蛋白質の大量調製に向けた安定化改変体の微小ハイスループットスクリーニング系の構築」第15回日本蛋白質科学会年会、2015年6月25日、あわぎんホール(徳島市)

白石充典「膜蛋白質の大量調製に向けた出芽酵母 (*S. cerevisiae*) の利用: GPCR を例に」第15回日本蛋白質科学会年会、2015年6月25日、あわぎんホール(徳島市)

中野祐毅、島村達郎、岩田想、植田正、白石充典「ヒスタミンH1受容体のリガンド認識におけるアニオン結合部位の寄与」第14回日本蛋白質科学会年会、2014年6月26日、ワークピア横浜(横浜市)

Mitsunori Shiroishi "Protein engineering for mass production of integral membrane proteins; the case of G-protein coupled receptors" Korea-Japan Smart Biodesign Workshop: Technology exchange for green chemistry, 2014年1月21日、東北大学(仙台市)

他 6 件

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白石 充典 (SHIROISHI, Mitsunori)
九州大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：00380527

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()