

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26660289

研究課題名(和文)受容体を触媒に：膜内在人工酵素の創生

研究課題名(英文)Studies on the Construction of Biocatalysts with the Structural Framework of GPCR

研究代表者

荒川 孝俊 (ARAKAWA, Takatoshi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：30523766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は近年集積されつつある膜受容体の立体構造情報を活用して受容体の合成リガンドへの新規化学プロセス能を付与することならびに構造観測を目的とする。5種のクラスA型GPCRに対して酵母宿主を用いた発現精製を進め、アデノシンA2a受容体に対してエステラーゼ型あるいはペプチダーゼ型の加水分解活性付与を想定した変異体を取得し、リガンド結合性試験と活性測定系の策定を行った。ドーパミンD1受容体については3Lスケールからの単離精製を行い、最終的にアンタゴニスト結合性を有し、熱分析による融解温度が60℃を超える標品およそ0.15 mgを得た。この標品を用いて結晶化を実施した。

研究成果の概要(英文)： Growing number of structures are available for the integral membrane proteins. Especially G protein coupled receptors (GPCRs) are the major family encoded by mammalian genomes and extracellular surfaces of them are diversified and are specific for the respective ligands. While several bacterial and algal paralog proteins of GPCR have the other functions such as channels or pumps, no proteins are found as a seven transmembrane (7-TM) enzyme. Here our team performed first attempts to adapt the 7-TM frameworks to enzymes. Point mutations are done for the two residues of the agonist-binding site of the A2a adenosine receptor and then subtle changes in the affinities for the agonist are observed compared with the intact protein. Together, efforts are also focused on the preparation of GPCRs to visualize the resultant 7-TM catalysts. Through the trials of four other class A GPCRs, we have developed the methodology for large-scale preparations, stability analyses, and crystallizations.

研究分野：構造生物学、蛋白質工学

キーワード：タンパク質工学 代謝型受容体 膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の機能と立体構造は密接に関連している。例えば酵素では基質周りに触媒残基が配置され、基質への特異性と処理能力を両立させている。一方で、受容体は細胞外に開かれたリガンド結合サイトでシグナル分子を強固に結合し分子内部のメッセンジャーの活性化を促す。とりわけ G タンパク質共役型受容体ファミリー(GPCR)は高等生物において多様であり、細胞機能を形作るリガンド結合面も合目的性をもった進化を遂げていることが知られている。

2007年のβ2 アドレナリン受容体を皮切りに、20種類を超える GPCR 三次元構造が立て続けに明らかにされてきた。同時に観察されるリガンドの結合表面からは、当時唯一の GPCR 構造基盤であった視細胞ロドプシンをモデルとしたドッキング計算からは予想し得ない様式で相互作用する事実が判明した。特に薬剤ターゲットとして医学薬学方面での関心が高く無数の薬剤リガンドが発明されている GPCR へは立体構造情報の発展的利用、例えば動力学シミュレーションや標的受容体へのバーチャルスクリーニングを絡めた計算化学への期待が寄せられており、次世代創薬を目指した高性能スーパーコンピュータを用いた大規模研究も盛んに進められている。

2. 研究の目的

ロドプシンには、ポンプやチャネルといった物質輸送活性を持つ類縁タンパク質がバクテリアや藻類に存在することが知られている。この例が端的に示すように自然界の七回膜貫通型蛋白質フォールドは受容体のみならず物質輸送に対する構造枠組も提供しうる。その一方で、受容体の枠組を持つ酵素は自然界では見出されない。両者を比較すると、外部分子が結合する点までは共通するものの、受容体では酵素で保有する触媒能力が欠落する点異なる。上記受容体類縁タンパク質は光受容性を利用した革新的なツールとして実用されているが、それらとは別方面で、受容体型酵素もプロセス化学など物質生産方面に貢献できるのではないかと考えられる。そこで本研究では、多彩な受容体を起点・鋳型として利用し、合成錯体に対して有利な特異性や反応性を持った触媒の作成

に挑戦し、新たな人工ツール作出を目指す。そして、変異箇所実測のための細胞膜貫通型受容体構造解析手段を模索し、より精密な分子設計に役立てる。

3. 研究の方法

実施にあたっては、アミン作動性受容体を主として、ヒトアデノシン A2a 受容体(hA2a)、ヒトセロトニン 1D 受容体(m5HT1D)、マウス痕跡アミン受容体(mTA1)、マウス PGE2 受容体(mEP3)、マウスドーパミン D1 受容体(mDRD1)を対象に選定し、組換え体の作成、発現と活性・可溶性調査、大量発現・精製・結晶化を行った。

(1) 受容体変異体設計

該当遺伝子の cDNA 配列を酵母発現用ベクターに挿入し、出芽酵母の相同組換えを利用した形質転換系を作成した。hA2a においてはアゴニスト UK432097 複合体結晶構造のリガンド結合部位には、リガンドを挟んで酸性残基に向かい合った極性残基、および His・Ser 残基が隣り合う配置がリガンド骨格のエステルまたはペプチド結合近傍に見出された。これらはそれぞれ、エステラーゼ様の一般酸塩基型加水分解酵素、セリンプロテアーゼ様の触媒三つ組型加水分解酵素と見立てられることから、触媒残基が補完されるように酸性アミノ酸への置換変異を施した。

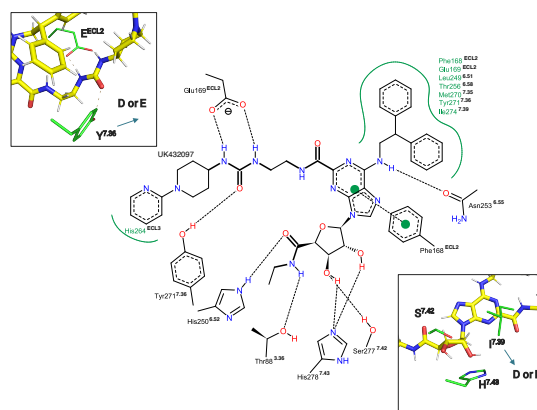


図 1: hA2a におけるアゴニスト UK432097 相互作用部位と変異箇所

加えて構造観測に向けるために、以下のように受容体の発現量向上を図った。対象受容体遺伝子配列内には GPCR 構造の中核である 7本の膜貫通ヘリックスをつなぐグループ領域で、発現の不安定性を引き起こす残基が不

規則に含まれることから、この部分を削除あるいは結晶化の際足場となる球状ドメインタンパク質(アポ型シトクロム b_{562} RIL (BRIL) 等)に置換した。これとともに糖鎖修飾残基置換および膜内ホットスポットに対する安定化変異を施した。

(2) 発現、活性・可溶化調査

上記コンストラクトを用いて *S. cerevisiae* FGY217 株を組換え、ウラシル欠乏培地で選択し、GAL1 プロモータ制御下で誘導発現した細胞から膜画分を抽出した。C 末端に付加した緑色蛍光タンパク質 (EGFP, λ_{\max} 510 nm) の蛍光強度を発現量の指標として、細胞総蛍光強度あるいは膜画分の SDS-PAGE バンドのゲル内蛍光強度を比較した。界面活性剤やコレステロール添加量等の可溶化条件は蛍光ゲル濾過法 (FSEC) によりピーク形状を観察することで検討した。また、放射性同位体標識体を用いた細胞膜のリガンド結合性を調査した。

(3) 精製・結晶化

上記実験で発現性状の良好な変異体について、高密度培養ならびに強力な AOX プロモータ制御領域の逐次組換えが可能であり大量発現に向けた宿主であるメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* 発現系に移した。ORF を pRS426 から pPIC9K に移植し、これを用いて SMD1163 株を形質転換し、コロニー選抜によって遺伝子多重導入株を確立した。

スケールアップ培養菌体から膜を調製し、可溶化タンパク質に対して C 末端に付加した His₁₀-tag を用いて固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (IMAC) 精製し、その後 TEV プロテアーゼ処理をすることで EGFP-His₁₀-tag を分離し、受容体の精製を行った。また、チオール修飾プローブを用いた熱変性温度測定により、構造安定性の評価を行った。得られた精製試料に対して脂質キュービック相法による結晶化を行った。

4. 研究成果

(1) 触媒残基置換体の獲得と結合活性

hA2a の 7.36 残基および 7.39 残基に対して各々の Asp および Glu 点変異体を作成し、出芽酵母へ発現させて膜画分を得た。発現膜

の UK432097 親和性を [³H]-NECA に対する追い出し実験により調査すると、野生型 A2a と比べておおよそ 3 倍以内の K_d 低下にとどまった。触媒機能付与にあたってはリガンドの高親和性は産物解離の面での不利となることから、さらに周辺残基へ変異を加えるなどの対応が必要である。

(2) 発現スクリーニングと活性測定

構造安定化変異体のコンストラクトを mTA1、mEP3、h5HT1D、mDRD1 について作製した。mTA1 に対して 4 mL 培養系にて SDS-PAGE にて各バンドの蛍光強度を比較した結果、mTA1 の N 末を 18 残基除去し細胞内側第三ループ (ICL3) を BRIL 置換させた変異体 (mTA1 Δ N18-BRIL) が全長タンパク質よりも発現が高く、hA2a と同等レベルの発現量 (0.29 mg/L 培地) まで上昇することが見出された。mEP3 に関しては N 末または細胞内第 3 ループに BRIL を導入した変異体を試験したが発現量の改善は見られなかった。mDRD1 では、C 末 79 残基を取り除き、ICL3 を BRIL 置換した変異体 (mDRD1 Δ C79-BRIL)、ならびに ICL3 への BRIL の挿入箇所が異なる 3 種の融合変異体が選別された。

mTA1、mDRD1、h5HT1D 変異体について Superdex200 カラムを用いた FSEC に供して可溶化条件を探索した。その結果、h5HT1D-BRIL に関してはアンタゴニスト (ゾテピン) を添加した DDM と MNG の混合界面活性剤条件において概算分子量約 180 kDa の単分散ピークが観察されることを見出した。また mDRD1 Δ C79-BRIL に対してはアンタゴニスト (SCH23390) 存在下で β ドデシルマルトシド (β DDM) 及びコレステロール誘導体 (CHS) の混合ミセル条件で可溶化することにより、概算分子質量約 195 kDa のピークが確認された。一方で mTA1 Δ N18-BRIL では界面活性剤の種類やリガンド有無に関係なく、より高分子量 (約 460 kDa) で主ピークが観察されたことから mTA1 では複数分子が会合し可溶化される性質が強いことが判明した。これに加えてそれぞれのリガンド結合活性を調査した。h5HT1D-T4L はアンタゴニスト ([³H]-ケタンセリン) に対して $K_d = 129$ nM の親和性を持ち、 B_{\max} からおおよそ 144 pmol/mg の比結合活性を持つことが確認されたが、mTA1 Δ N18-BRIL 発現膜は変異体、野生型ともにアゴニスト ([³H]

-チラミン)に対して非特異吸着レベルの結合性を示すにとどまった。以上より、mDRD1、h5HT1D は酵母発現系において活性を保っており、大量精製および結晶化を行う前提条件を設定できたが、mEP3 は酵母での発現性が乏しく、mTA1 は膜から可溶化する過程以前で分子が会合・不安定化し失活していると結論された。

(3) 受容体の大量精製・結晶化

P. pastoris を宿主とした高密度培養系により、mDRD1-EGFP 融合変異体をスケールアップ生産し、上で検討された条件で可溶化したのち EGFP 蛍光を指標に IMAC 精製を進めた。精製後半の EGFP-His₁₀-tag をプロテアーゼ消化し IMAC 通過画分を回収する段階において、樹脂への非特異吸着力が強く、収率が大きく減弱したことから条件を再検討を行うことで、電気泳動及びゲル濾過クロマトグラフィー (UV 検出) においてモノマーピークの存在が確認された。*P. pastoris* 発現膜を用いて放射性リガンドの飽和結合解析を行い mDRD1 Δ C79-BRIL のリガンド結合能を検証し、SCH23390, [N-Methyl-³H]-に対し $K_d = 0.6$ nM の親和性を持つことが確認された。

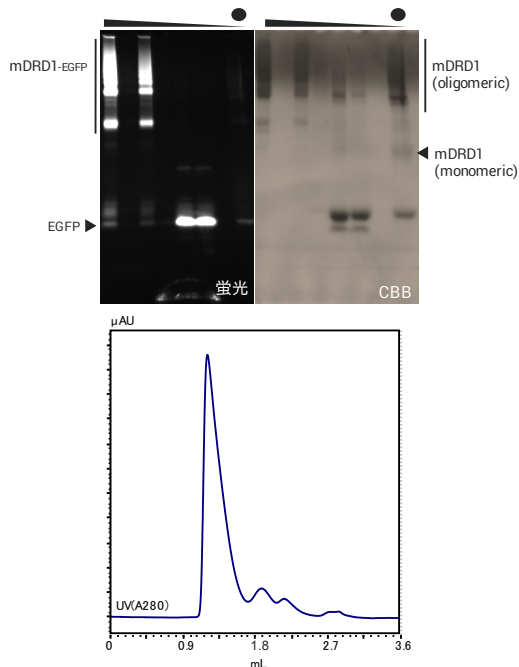


図2 : mDRD1 Δ C79-BRIL 精製過程における PAGE 及び終画分 (・) のゲル濾過分析

同様にして得られた計4種の mDRD1 変異体に対して示差走査蛍光測定を行った。このとき、

近紫外範囲に励起波長をもつマリン色素に代えて可視光励起可能な BODIPY を蛍光団に有するマレイミドプローブを採用して計測した。結果、いずれの変異体も融解温度 (T_m) が概ね 60°C を超えることから、変異体が高い熱安定性を有することが示唆された。精製標品を濃縮し、モノオレイン:コレステロールと混合し脂質キュービック相を調製し、結晶化スクリーニングを行った。当報告時点で結晶は観察されなかった。

以上の結果、本研究により受容体機能変換の端緒となる知見が得られ、また受容体異種発現に対する生産性、精製条件、性状評価の点においても有用な更新がなされた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計1件)

- ① 和田京子、Yuwono Wibowo、伏信進矢、荒川孝俊 (2017): ドーパミン受容体の結晶化に向けた発現と精製、2017年度生命科学系学会合同年次大会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 孝俊 (ARAKAWA, Takatoshi)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
助教

研究者番号 : 3 0 5 2 3 7 6 6