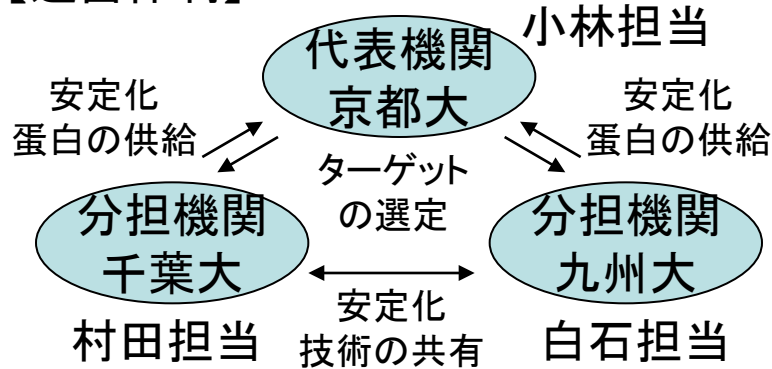


解析拠点 課題名 創薬ターゲットとして重要なヒト膜タンパク質の生産及び結晶化支援基盤
生産領域 京都大(小林拓也)、千葉大(村田武士)、九州大(白石充典)

【課題概要】

これまでに成功した三つのGPCRのX線結晶構造解析で立ち上げた技術をさらに使い易いものへと「高度化」とすると共にこれらの技術を広く外部の研究者に提供する。

【運営体制】



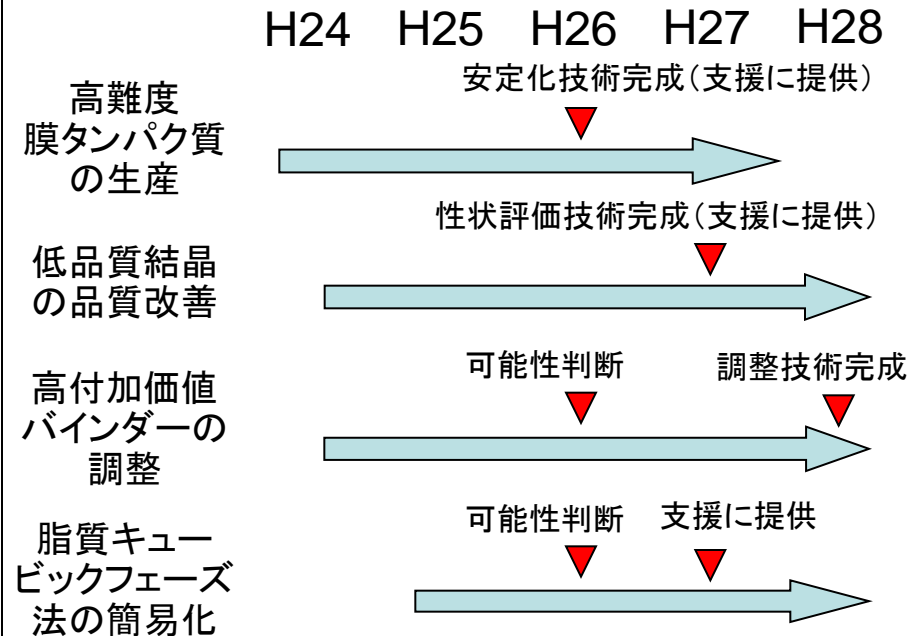
【連絡先】

京都大
小林拓也 (t-coba@mfour.med.kyoto-u.ac.jp)
千葉大
村田武士 (t.murata@faculty.chiba-u.jp)
九州大
白石充典 (shiroish@phar.kyushu-u.ac.jp)

【支援に供する技術】

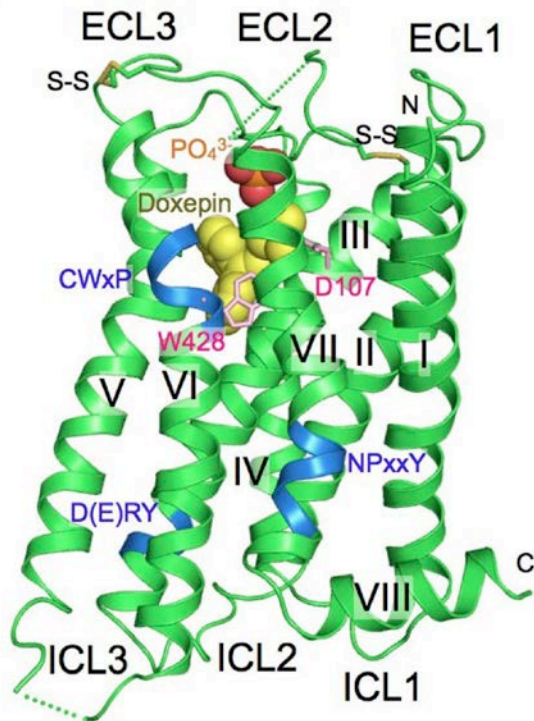
- ①膜タンパク質の発現技術
- ②膜タンパク質の精製技術
- ③膜タンパク質の結晶化技術
- ④膜タンパク質の性状評価技術
- ⑤高難度膜タンパク質の生産技術

【高度化研究】



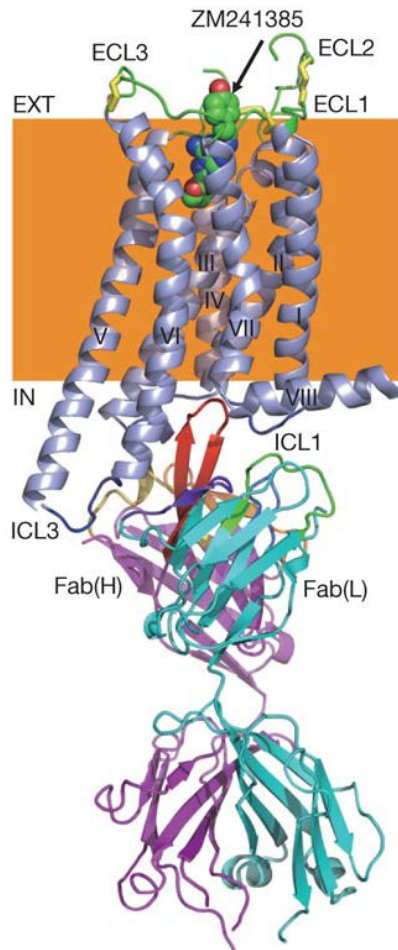
【これまでの研究実績と創薬等PFにおける事業内容】

ヒト・ヒスタミンH1受容体



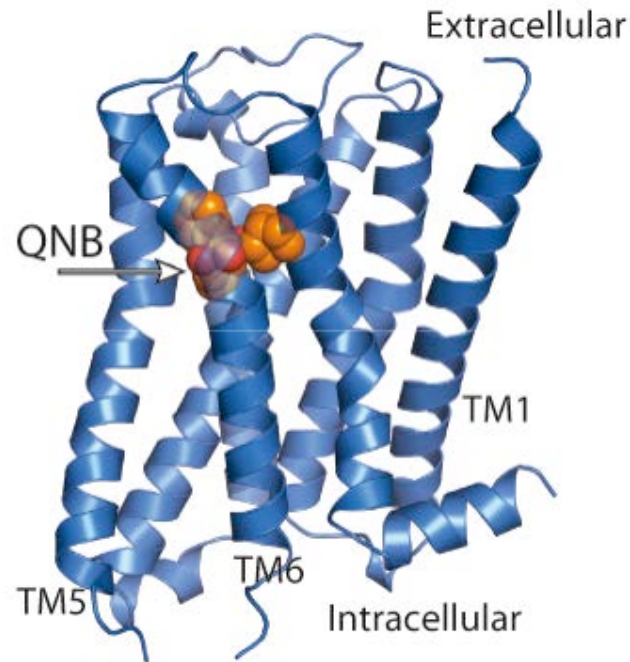
- ・出芽酵母を用いて安定化
- ・メタノール資化酵母で生産
- ・脂質キュービックフェーズ法

ヒト・アデノシンA2a受容体／抗体複合体



- ・メタノール資化酵母で生産
- ・不活性型固定化抗体を作製

ヒト・ムスカリンM2受容体



- ・昆虫細胞で生産
- ・低品質結晶の品質改善
- ・脂質キュービックフェーズ法

- 1) Haga, K., Kruse, A.C., Asada, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shiroishi, M., Zhang, C., Weis, W.I., Okada, T., *Kobilka, B.K., *Haga, T. and *Kobayashi, T. Structure of the human M₂ muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. **Nature** 482, 547-551 (2012).
- 2)*Shiroishi, M., Tsujimoto, H., Makyio, H., Asada, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shimamura, T., Nomura, N., Haga, T., *Iwata, S. and *Kobayashi, T. Platform for the rapid construction and evaluation of GPCRs for crystallography in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microb. Cell Fact.** 11, 78 (2012).
- 3) Hino, T., Arakawa, T., Iwanari, H., Yurugi-Kobayashi, T., Ikeda-Suno, C., Nakada-Nakura, Y., Kusano-Arai, O., Weyand, S., Shimamura, T., Nomura, N., Cameron, A.D., Kobayashi, T., Hamakubo, T., *Iwata, S. and *Murata, T. G protein-coupled receptor inactivation by an allosteric inverse-agonist antibody. **Nature** 482, 237-40 (2012).
- 4) Shimamura, T., Shiroishi, M., Weyand, S., Tsujimoto, H., Winter, G., Katritch, V., Abagyan, R., Cherezov, V., Liu, W., Han, G.W., *Kobayashi, T., *Stevens, R.C. and *Iwata, S. Structure of the human histamine H₁ receptor complex with doxepin. **Nature** 475,65-70 (2011).
- 5) Asada, H., Uemura, T., Yurugi-Kobayashi, T., Shiroishi, M., Shimamura, T., Tsujimoto, H., Ito, K., Sugawara, T., Nakane, T., Nomura, N., Murata, T., Haga, T., *Iwata, S. and *Kobayashi, T. Evaluation of the *Pichia pastoris* expression system for the production of GPCRs for structural analysis. **Microb. Cell Fact.** 10, 24 (2011).
- 6) Yurugi-Kobayashi, T., Asada, H., Shiroishi, M., Shimamura, T., Funamoto, S., Katsuta, N., Ito, K., Sugawara, T., Tokuda, N., Tsujimoto, H., Murata, T., Nomura, N., Haga, K., Haga, T., *Iwata, S. and *Kobayashi, T. Comparison of functional non-glycosylated GPCRs expression in *Pichia pastoris*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 380, 271-276 (2009).
- 7) Sugawara, T., Ito, K., Shiroishi, M., Tokuda, N., Asada, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shimamura, T., Misaka, T., Nomura, N., Murata, T., Abe, K., *Iwata, S. and *Kobayashi, T. Fluorescence-based optimization of human bitter taste receptor expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 382, 704-710 (2009).
- 8) Ito, K., Sugawara, T., Shiroishi, M., Tokuda, N., Kurokawa, A., Misaka, T., Makyio, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shimamura, T., Nomura, N., Murata, T., Abe, K., *Iwata, S. and *Kobayashi, T. Advanced method for high-throughput expression of mutated eukaryotic membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 371, 841-845 (2008).