

細胞を使うことなく受容体膜タンパク質の人工進化に成功

－ 阻害剤感受性を 10 倍向上させた G タンパク質共役型受容体

「アデノシン 2A 受容体」の新規変異体を同定し、細胞種特異的なシグナル制御を実現－

【ポイント】

- 従来は困難だったヒト由来 G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の実験室内人工進化を無細胞タンパク質合成系とナノディスク技術の組み合わせで実現
- 新規「アデノシン A_{2A} 受容体 (A_{2A}R)」変異体を同定。哺乳動物細胞内で内因性リガンドであるアデノシンへの応答性を保持しながら、阻害剤感受性を 10 倍以上に向上
- 新規変異体を用いることで、A_{2A}R シグナルを細胞種選択的に制御できることを実証
- 細胞を用いることなく、GPCR 変異体ライブラリーサイズを約 1 兆 (10¹²) 規模に拡大可能に

【概要】

東京科学大学 (Science Tokyo) 生命理工学院 生命理工学系の深澤元喜修士課程学生 (研究当時)、北尾彰朗教授、同大学 地球生命研究所の松浦友亮教授、福永圭佑特任助教 (現：宮崎大学研究・産学地域連携推進機構 テニュアトラック推進室 准教授)、名古屋大学大学院工学研究科 松岡佑真博士後期課程学生、清中茂樹教授、千葉大学 大学院理学研究院 村田武士教授らの研究チームは、細胞を用いずに膜タンパク質を実験室内で人工進化させる技術を開発し、リガンド結合能が 10 倍程度向上したヒト由来アデノシン「A_{2A} 受容体 (A_{2A}R)」の変異体を同定しました。この変異体を用いることで細胞種特異的なシグナル伝達系の制御が可能です。

細胞外のシグナルを細胞内に伝える役割を担う「**G タンパク質共役型受容体 (GPCR: G Protein-Coupled Receptor)** (用語 1)」の機能を改変した変異体を、合理的に設計することは、膜タンパク質の柔軟性・不溶化しやすい特性から難しく、多くの試行錯誤を要します。本研究では、**無細胞タンパク質合成系** (用語 2) とナノディスク技術を組み合わせ、GPCR の 1 つである A_{2A}R が機能発現するよう条件を最適化しました。さらに、実験室進化と**次世代シーケンサー** (用語 3) 解析を用いて、変異体集団から特定の阻害剤に対する結合能が向上した変異体を同定しました。変異体は、哺乳動物細胞においてシグナル阻害活性が 10 倍程度向上しており、この分子機構を原子レベルのシミュレーションで明らかにしました。さらに獲得された変異体の特性を利用し、細胞種特異的に GPCR シグナル伝達を抑制可能であることも示しました。

本研究で開発した手法は、約 10^{12} 種類規模の GPCR ライブラリーから目的の機能を持つ変異体をスクリーニング可能とするものであり、創薬やケモジェネティクス（用語 4）分野における新規 GPCR 変異体探索の基盤技術となることが期待されます。

本成果は、3月6日付（現地時間）の「*Journal of the American Chemical Society*」誌に掲載されました。

●背景

細胞を用いることなく実験室で人工進化を行う方法（*in vitro* 進化分子工学）は、変異と選択を繰り返すことで、抗体や酵素などの可溶性タンパク質の機能を人為的に改変・最適化する技術として発展してきました [参考文献 1-2]。リボソームディスプレイ法（用語 5） [参考文献 3] をはじめとする *in vitro* 進化分子工学は、細胞を介さずに大規模な変異体ライブラリーを扱える点で大きな利点を持ちます。一方、膜タンパク質、特に G タンパク質共役型受容体（GPCR）は、無細胞タンパク質合成系では凝集・不溶化しやすく、*in vitro* 進化分子工学への適用は困難でした。そのため、GPCR の機能改変は主として生細胞を用いた実験系に依存してきました [参考文献 4-5]。しかし、生細胞系では取り扱える変異体数や選択条件に制約があり、探索可能な変異体空間は制限されていました。

●研究成果

GPCR はヒトゲノム中で最大級の受容体ファミリーです。現在承認されている医薬品の約 3~4 割が GPCR を標的としています。GPCR の 1 つである $A_{2A}R$ は神経疾患、免疫疾患、炎症、がん免疫など幅広い疾患領域に関与する重要な創薬標的 です [参考文献 6]。しかし、特定の細胞種における $A_{2A}R$ の機能を厳密に制御することは、従来の薬理学的手法では困難でした。内因性リガンドへの応答性を維持しつつ、特定の阻害剤にのみ高感受性を示す $A_{2A}R$ 変異体を設計できれば、細胞種特異的な $A_{2A}R$ のシグナル抑制が可能になると考えられますが、そのような変異体を設計・探索する手法は確立されていませんでした。

本研究では、 $A_{2A}R$ をモデルとして、内因性リガンドであるアデノシンへの応答性を保持したまま、阻害剤 ZM241385 に高感受性を示す $A_{2A}R$ 変異体の創出を目指しました。まず、無細胞タンパク質合成系に膜タンパク質を安定化するためのディスク状人工脂質膜（ナノディスク）を組み合わせることで $A_{2A}R$ を可溶発現し、ZM241385 と特異的に結合することを確認しました。これにより、リボソームディスプレイ法 [参考文献 1] を用いた阻害剤結合能に基づく *in vitro* 進化分子工学が可能となりました。次に、アデノシンおよび ZM241385 が結合した $A_{2A}R$ の構造情報を基に、飽和変異（用語 6）を導入する 2 残基を選定しました。これらを全アミノ酸に置換した 400 種類の変異体ライブラリーを構築し、阻害剤結合に基づくスクリーニングを 3 回実施しました。得られ

た遺伝子配列を次世代シーケンサー (NGS) で解析したところ、特定変異を有する A_{2A}R が顕著に濃縮されていました (図 1A)。

同定した変異体をヒト由来の培養細胞株に導入し機能評価を行ったところ、内因性リガンドであるアデノシンへの応答性は野生型と同程度に維持されていました。一方で、ZM241385 に対する感受性は 10 倍以上向上していました (図 1B)。この結果は、同定された A_{2A}R 変異体が、細胞内においても設計通りの機能を発現することを示しています。さらに、分子動力学シミュレーションにより、ZM241385 に対する応答が向上した構造的要因を探索しました (図 1C)。その結果、導入変異は直接的な相互作用の変化ではなく、構造的再配置を介して A_{2A}R と ZM241385 の結合様式を変化させていることが分かりました。

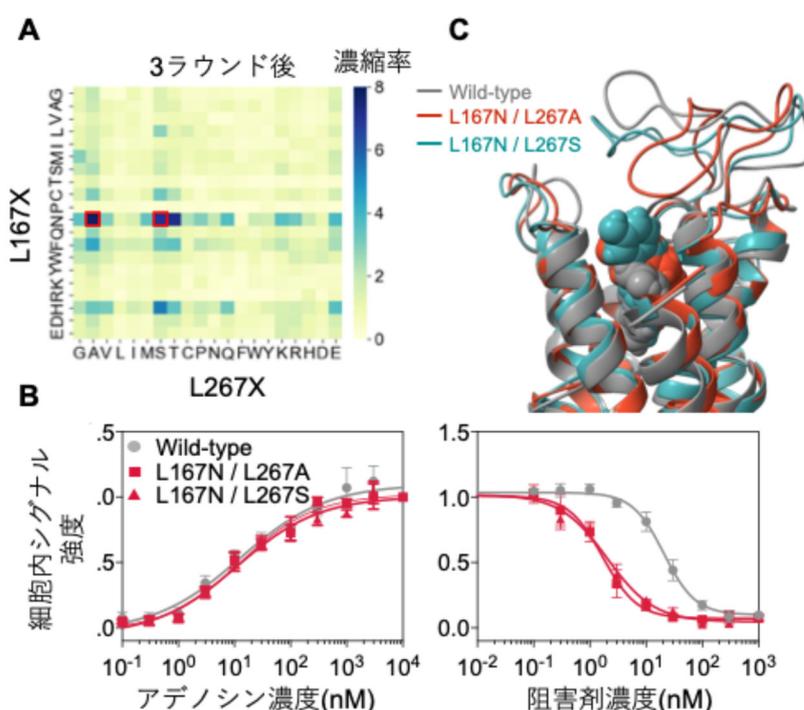


図 1：人工進化により得られた A_{2A}R 変異体。A) NGS 解析の結果、400 種類の変異体のうち赤で囲った 2 つが顕著に濃縮されていた。B) 取得した 2 つの変異体は、アデノシンでは野生型と同様に活性化されたが、阻害剤を加えた場合は、野生型よりも 10 倍低い阻害剤濃度で効果が見られた。C) 分子動力学シミュレーションの結果。野生型と変異体は阻害剤と異なる結合様式を持つことが分かった。

さらに本研究では、獲得した変異体の特性を応用し、異なる細胞種のうち特定細胞種の A_{2A}R シグナルを ZM241385 により選択的に抑制できるかを検証しました。野生型または変異体を発現する細胞を共培養し、アデノシンと ZM241385 を添加したところ、変異体を発現する細胞群でのみ A_{2A}R シグナル抑制が起きていることを確認しました (図 2)。この結果は、受容体分子設計と既存阻害剤の組み合わせにより、細胞種特異的な GPCR シグナル制御が可能であることを示唆しています。

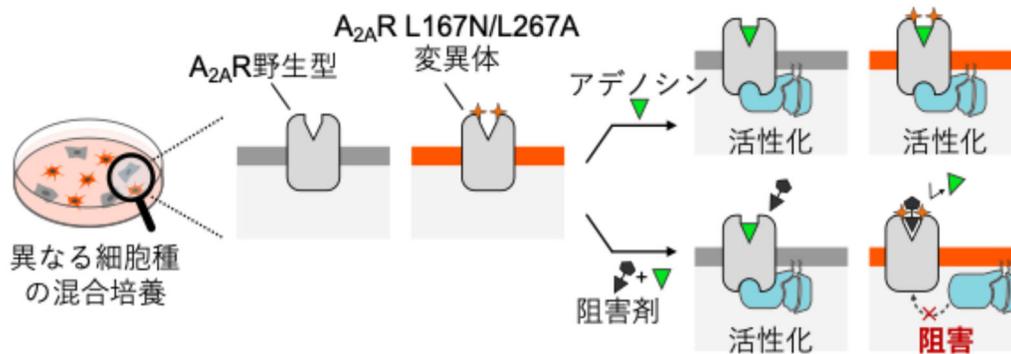


図 2：取得した変異体は、細胞種特異的シグナル阻害を可能とする。2つの異なる細胞種を共培養し、アデノシンを加えた場合は、両細胞とも活性化されたが、アデノシンと阻害剤を加えた場合は、変異体発現細胞でのみシグナル阻害が観測された。

●社会的インパクト

本研究によって、細胞を用いることなく効率的に有用な GPCR 変異体の取得が可能であることが示されました。この成果は、創薬研究への波及が期待されます。例えば、膜タンパク質の進化分子工学を加速し、GPCR 創薬における受容体最適化やリガンド設計の新たな戦略を提供する可能性があります。また、本研究は既存の活性化型ケモジェネティクスに対して「阻害」に基づく制御戦略を提示するもので、技術の高度化にも寄与します。この制御戦略は、今後、生体内における受容体機能解析において高い汎用性を有すると考えられます。

●今後の展開

本研究では A_{2A}R の 2 残基に飽和変異を導入し、限定的な配列空間（400 種）から変異体をスクリーニングしました。しかし、*in vitro* 進化分子工学では、ライブラリーサイズを 10¹² 規模まで拡張可能です。今後、より広範な配列領域に変異を導入することで、さらなる機能改変や新規特性の獲得が見込まれます。また、無細胞系では、温度や塩濃度などの条件を柔軟に制御できるため、細胞系では実施困難な条件下での人工進化実験も可能です。次世代シーケンサーから得られる大規模データと機械学習を組み合わせたライブラリー設計により、より効率的な変異体探索が実現すると考えられます。

将来的にはバイオセンシング、創薬、ケモジェネティクスなど幅広い分野への応用が期待されます。

●付記

本研究は、ヒューマン・フロンティア・サイエンス・プログラム（HFSP）（RGP003／2023、RGEC29／2025）、JSPS 科学研究費助成事業（22K21344、21H05228、24H00492、24KJ1275、23K14154、23H02445、24H01357、24H02259）、宮崎大学テニュアトラッ

ク推進室、AMED (JP24ama121013)、MEXT「富岳」成果創出加速プログラム (JPMXP1020230120)の支援を受けて実施されました。また MD 計算は、TSUBAME4.0 (東京科学大学)、スーパーコンピュータ富岳 (HPCI、理研、AMED (JP24ama121013))、岡崎計算科学研究センター (25-IMS-C045)、東京大学物性研究所 (2025-Ca-0038)で行われました。

【参考文献】

- [1] Porebski, B. T.; Balmforth, M.; Browne, G.; Riley, A.; Jamali, K.; Furst, M.; Velic, M.; Buchanan, A.; Minter, R.; Vaughan, T.; Holliger, P., Rapid discovery of high-affinity antibodies via massively parallel sequencing, ribosome display and affinity screening. *Nat Biomed Eng* **2024**, 8 (3), 214-232.
- [2] Kondo, T.; Iwatani, Y.; Matsuoka, K.; Fujino, T.; Umemoto, S.; Yokomaku, Y.; Ishizaki, K.; Kito, S.; Sezaki, T.; Hayashi, G.; Murakami, H., Antibody-like proteins that capture and neutralize SARS-CoV-2. *Sci Adv* **2020**, 6 (42), eabd3916.
- [3] Hanes, J.; Plückthun, A., In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, 94 (10), 4937-4942.
- [4] English, J. G.; Olsen, R. H. J.; Lansu, K.; Patel, M.; White, K.; Cockrell, A. S.; Singh, D.; Strachan, R. T.; Wacker, D.; Roth, B. L., VEGAS as a Platform for Facile Directed Evolution in Mammalian Cells. *Cell* **2019**, 178 (3), 748-761 e17.
- [5] Klenk, C.; Scrivens, M.; Niederer, A.; Shi, S.; Mueller, L.; Gersz, E.; Zauderer, M.; Smith, E. S.; Strohner, R.; Plückthun, A., A Vaccinia-based system for directed evolution of GPCRs in mammalian cells. *Nat Commun* **2023**, 14 (1), 1770.
- [6] Carpenter, B.; Lebon, G., Human Adenosine A(2A) Receptor: Molecular Mechanism of Ligand Binding and Activation. *Front Pharmacol* **2017**, 8, 898.

【用語説明】

- (1) **G タンパク質共役型受容体 (GPCR: G Protein-Coupled Receptor)** : 細胞膜に存在する受容体タンパク質のファミリーで、ホルモンや神経伝達物質、光、匂い物質など、細胞外のシグナルを細胞内に伝える役割を担う。
- (2) **無細胞タンパク質合成系** : 転写に必要な RNA ポリメラーゼや翻訳に必要なリボソームなどタンパク質合成に必要な成分を含む反応液である。試験管内で本反応液に DNA/mRNA を追加するだけでタンパク質を合成できる。
- (3) **次世代シーケンサー** : DNA の塩基配列を高速かつ大量に読み取る技術。

- (4) **ケモジェネティクス**：遺伝子工学と化学物質を組み合わせ、特定の細胞内シグナル伝達を選択的に操作する技術。
- (5) **リボソームディスプレイ法**：mRNA とタンパク質を、リボソームを介して複合体を合成することで、標的タンパク質を提示する *in vitro* 進化分子工学の手法。
- (6) **飽和変異**：タンパク質の 1 つの残基を、天然で良く使われる 20 種類のアミノ酸に置換する変異の導入方法

【論文情報】

掲載誌：*Journal of the American Chemical Society*

論文タイトル：*In vitro* evolution of the adenosine A_{2A} receptor based on an antagonist binding using a ribosome display

著者：Genki Fukasawa[#], Yuma Matsuoka[#], Duy Phuoc Tran, Haruka Nishigaki, Keisuke Fukunaga, Takayoshi Watanabe, Tomohiro Doura, Naohiro Terasaka, Ako Kagawa, Takeshi Murata, Akio Kitao,* Shigeki Kiyonaka,* Tomoaki Matsuura*

DOI：10.1021/jacs.6c02372

[#]：共同筆頭著者、*：責任著者

【研究者プロフィール】

深澤 元喜（フカサワ ゲンキ） Genki Fukasawa

東京科学大学 生命理工学院 生命理工学系 博士前期課程（研究当時）

研究分野：合成生物学

西垣 遥（ニシガキ ハルカ） Haruka Nishigaki

東京科学大学 生命理工学院 生命理工学系 博士前期課程 2 年

研究分野：合成生物学

福永 圭佑（フクナガ ケイスケ） Keisuke Fukunaga

東京科学大学 未来社会創成研究院 地球生命研究所 特任助教（研究当時）／

宮崎大学 研究・産学地域連携推進機構 テニユアトラック推進室 准教授

研究分野：進化分子工学、核酸化学

チャン・フ・ズイ Duy Phuoc Tran

東京科学大学 生命理工学院 生命理工学系 助教

研究分野：理論物理学、計算生物物理学

北尾 彰朗（キタオ アキオ） Akio Kitao

東京科学大学 生命理工学院 生命理工学系 教授

研究分野：生物物理学、計算生物学、計算化学

松浦 友亮（マツウラ トモアキ） Tomoaki Matsuura

東京科学大学 未来社会創成研究院 地球生命研究所 教授

研究分野：生物工学、合成生物学、生物物理学

村田 武士（ムラタ タケシ） Takeshi Murata

千葉大学 大学院理学研究院 教授

研究分野：構造生物学、蛋白質工学