Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2024-06-11

Microbial yeast biosensors to monitor signal transmission and heterodimer formation for human G-protein-coupled receptors

Nakamura, Yasuyuki

(Degree)
博士（工学）

(Date of Degree)
2014-03-25

(Date of Publication)
2016-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第6090号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006090

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（別紙様式 3）

論文内容の要旨

氏　　名　中村　泰之

専　　攻　応用化学

論文題目（外国語の場合は，その和訳を併記すること。）

Microbial yeast biosensors to monitor signal transmission and heterodimer formation for human G-protein-coupled receptors

ヒト G タンパク質共役型受容体のシグナル伝達およびヘテロ二量体形成モニタリングのための酵母バイオセンサー

指導教員　近藤　昭彦

7 回膜貫通型構造を有する G タンパク質共役型受容体（GPCR）は、膜タンパク質最大のファミリーを形成している。GPCR は、外部からのリガンド刺激に応答し、細胞内への情報（シグナル）へと変換することで、多様な生理活性を制御している。GPCR はゲノム創薬の最も主要な標的であり、合理的な創薬設計のためにその機能や構造を明らかにすることは極めて重要な課題である。

今なお主要な標的であるが、製薬企業を含む激しい研究競争によって多くの医薬品が上市された結果、新薬の発見が次第に難しくなってきたため、市場におけるシェアは徐々に減衰してきている。こうした背景から、GPCR に対する新たな作用機序を介した医薬品開発が求められている。GPCR は、細胞膜上の種々の GPCR 間でホモ二量体もしくはヘテロ二量体を形成し、生理的な機能に関与することが近年明らかとなっており、GPCR シグナル伝達の多様性を生み出す要因と目されているヘテロ二量体形成機構の解明は重要な課題となっている。GPCR の二量体形成は、受容体の立体配座、リガンド結合、局在性、脱感作、細胞内移行、シグナル伝達能など、様々な変化を与えることが近年明らかとなっており、新たな創薬戦略を考案する上での重要な機構として注目を集めている。

そこで本研究では、GPCR の機能（シグナル伝達）と構造（ヘテロ二量体形成）の関連を調べるための酵母バイオセンサーの開発を目指した。

まず、第一部では GPCR が生理機能を発現するために必須なシグナル伝達能の解析のための酵母バイオセンサーの開発を行った。GPCR にリガンドが反応すると細胞内シグナル伝達系が活性化されるため、シグナルに応答して緑色蛍光タンパク質が発現するよう酵母の遺伝子を改変することで、蛍光によってリガンドを検出・同定することが可能である。しかし、従来の検出系においては、リガンドに反応した細胞の蛍光強度が弱いという問題があった。そこで、第一章では高感度シグナル伝達解析系の開発を行った。その結果、レポーターとして、4 量体構造を取る緑色蛍光タンパク質 ZsGreen を用いることでシステムの検出感度の向上に成功した。また本研究では細胞表層提示技術を応用し、ペプチドリガンドであるソマトスタチンやニューロテンシンを細胞表層に提示させ、ヒト GPCR の一種であるソマトスタチンレセプターおよびニューロテンシンレセプターのシグナル伝達活性化に成功した。さらにニューロテンシンのアナログを表層提示させた場合においてもレセプターの活性化を検出できたことから、本系はペプチドリガンドとしてライブラリ遺伝子を導入することにより、ヒト GPCR の新規リガンドを同定するのに非常に有力な手法となることが期待される。

第一部、第二章では第一章で開発した高感度シグナル伝達解析系をヒト GPCR であるセロトニンレセプターの解析へ応用した。従来の酵母シグナル伝達解析系ではセロトニンレセプターの解析は困難であったが、高感度シグナル伝達解析系を用いることによってセロトニンレセプターのアッセイが可能となった。本系を利用することで、セロトニンレセプターに対するアンタゴニストの評価系や変異解析への応用も可能であることを示した。

第一部、第三章ではこれまで酵母では報告例のないヒト GPCR であるアンジオテンシンレセプターのシグナル伝達の検出に成功した。野生型のアンジオテンシンレセプターを発現させた場合では、酵母 G タンパク質との共役が機能しなかったことから、変異型のアンジオテンシンレセプターを構築し、さらに酵母/ヒトキメラ型 G タンパク質を導入することで、酵母のシグナル伝達経路との共役が可能となった。さらに、アンジオテンシンレセプターのアッセイ系を発展させ、アンジオテンシンおよびそのアナログを分泌発現させてもレセプターの活性化を検出できたことから、本系もペプチド配列のライブラリ遺伝子を導入することで、リガンドスクリーニングへの応用が可能であると期待される。第一部の研究成果により、酵母におけるシグナル伝達解析系をスクリーニングに利用できるレベルにまで検出系を高感度化するとともに、応用できる GPCR の種類を大幅に拡充することに成功した。

次に、第二部では GPCR のヘテロ二量体形成を解析するための酵母バイオセンサーの開発を行った。GPCR はヒトで 800 種類以上存在するため、ヘテロ二量体の組み合わせをすべて同定することは困難を極める。こうした背景を踏まえ、第一章ではタンパク質間相互作用のスクリーニングに適した酵母 2 ハイブリッド系を基盤とし、ヘテロ二量体を形成するヒト GPCR の組み合わせを簡便に同定できるシステムの開発に取り組んだ。従来の酵母 2 ハイブリッド系では、GPCR にリガンド結合すると MAP キナーゼ（MAPK）が活性化されて細胞の増殖阻害を引き起こすため、タンパク質相互作用のレベルを定量的に評価できない。そこで、酵母内のリガンド応答によるシグナル伝達系の活性化の有無にかかわらず、二量体を形成する GPCR の組み合わせを同定できる新たな技術を開発するため、MAPK 関連遺伝子の欠失変異体を作成した。これにより、酵母 2 ハイブリッド系の特徴である寒天培地上での生育評価や、酵素活性（lacZ 活性）による定量評価が可能となり、ヒト GPCR の二量体形成候補のスクリーニングが可能となった。本システムは、リガンド結合に起因する受容体の立体配座変化をモニターすることも可能であったことから、GPCR 二量体化を多面的な角度から解析することが可能である。また、クローニングした 8 種類のヒト GPCR 発現プラスミドをライブラリとして、ヒトアンジオテンシンレセプターに対してヘテロ二量体形成する GPCR をスクリーニングしたところ、これまでに報告されていない新たなヘテロ二量体形成候補を見いだすことに成功した。このことから、ヒト GPCR 発現プラスミドをライブラリとして拡充することで、標的 GPCR に対するさらなるヘテロ二量体候補を探索することが可能であると示唆される。

第二部、第二章ではこれまでのシステムを発展させ、GPCR のヘテロ二量体検出だけでなく、リガンド結合に応答してシグナル伝達を活性化するかどうかも同時に解析できるシステムの開発を行った。二量体形成を検出すると赤色蛍光タンパク質が発現し、シグナル伝達を検出すると緑色蛍光タンパク質が発現するシステムを構築することで、酵母内在性 GPCR をモデル系として、GPCR の二量体化解析とシグナル伝達の応答を同時にモニタリングできるシステムの開発に成功した。本システムを利用して、二量体形成とシグナル伝達の関連性を探るため、酵母 GPCR の変異体を用いた機能解析も可能であることを示した。さらに、ヒト GPCR であるソマトスタチンレセプターのヘテロ二量体形成とシグナル伝達の同時検出への応用も可能であった。これによりシグナル伝達に関与するヘテロ二量体のみを探索することが可能であると示唆され、新しい切り口での医薬品の開発や機能・構造解析などの GPCR 研究へ展開が期待できる。

以上のことから、GPCR の二量体形成を多面的な角度から解析できる新たな酵母バイオセンサーの開発に成功した。本系を応用することで、無数に存在する GPCR ヘテロ二量体の組み合わせを網羅的に解析すると共に、シグナル伝達との因果関係を調べることが可能となり、新規作用機序を介した医薬品の開発や、今まで治療法のなかった難病の治療薬開発へつながると期待される。

（別紙１）　　　　　　　　　　　　　　論文審査の結果の要旨

氏名	中村　泰之		
論文題目	Microbial yeast biosensors to monitor signal transmission and heterodimer formation for human G-protein-coupled receptors ヒトＧタンパク質共役型受容体のシグナル伝達およびヘテロ二量体形成モニタリングのための酵母バイオセンサー		
審査委員	区　分	職　名	氏　　　名
	主　査	教授	近藤　昭彦
	副　査	教授	西野　孝
	副　査	教授	山地　秀樹
	副　査	准教授	田中　勉
	副　査		

要　　旨

本論文では創薬の分野において主要な分子標的となっているＧタンパク質共役型受容体（GPCR）のヘテロ二量体形成とシグナル伝達の関連を明らかにするためのシステムを構築することを目的とし、新たな作用機序を介した創薬ターゲットの探索のためのバイオセンサーとして展開していくことを目指した内容となっている。

GPCRは生体内の様々な生理機能を制御しており、医薬品の中で最主要な創薬ターゲットとなっている。これら創薬標的としてのGPCRはゲノム解読とともにそのほとんどがクローニングされ、新規作用機序を介した医薬品開発はかなり飽和状態に近づきつつある。そのため、製薬業界における医薬品としてのシェアだけでなく、創薬の分子標的としての利用も徐々に減衰してきている。しかし、近年の研究動向を見ると、ヘテロ二量体を形成するGPCRの存在が明らかとなっており、その生理的機能との関係や作用機序の解明が新規創薬につながるとして注目が集まっている。そこで本論文では、GPCRのシグナル伝達およびヘテロ二量体形成をモニタリングするための酵母バイオセンサーの開発を行った。

本論文では第一部において酵母を宿主としたヒトGPCRのシグナル伝達解析系を開発した。第二部ではGPCRのヘテロ二量体形成を迅速に探索できるシステムを構築するとともに、GPCRの二量体化がシグナル伝達の活性化にどのように関与しているかを簡便に解析できるシステムを開発した。以下、その詳細を述べる。

これまでに、酵母を宿主としたヒトGPCRのシグナル伝達解析系の開発が行われており、GPCRにリガンドが反応すると細胞内シグナル伝達系が活性化されるため、シグナルに応答して緑色蛍光タンパク質が発現するよう酵母の遺伝子を改変することで、蛍光によってリガンドを検出・同定することが可能である。しかし、従来の検出系において、リガンドに反応した細胞の蛍光強度が弱いという問題があった。そこで第一部、第一章では、高感度シグナル伝達解析系の開発を行った。その結果、レポーターとして、4量体構造を取る緑色蛍光タンパク質ZsGreenを用いることでシステムの検出感度の向上に成功した。また本章では細胞表層提示技術を応用し、ペプチドリガンドであるソマトスタチンやニューロテンシンを細胞表層に提示させ、ヒトGPCRの一種であるソマトスタチンレセプターおよびニューロテンシンレセプターのシグナル伝達活性化に成功した。さらにニューロテンシンのアナログを表層提示させた場合においてもレセプターの活性化を検出できたことから、本系はペプチドリガンドとしてライブラリ遺伝子を導入することにより、ヒトGPCRの新規リガンドを同定するのに非常に有力な手法となることが期待される。

第一部、第二章では第一章で開発した高感度シグナル伝達解析系をヒトGPCRであるセロトニンレセプターの解析へ応用した。従来の酵母シグナル伝達解析系ではセロトニンレセプターの解析は困難であったが、高感度シグナル伝達解析系を用いることによってセロトニンレセプターのアッセイが可能となった。本系を利用することで、セロトニンレセプターに対するアンタゴニストの評価系や変異解析への応用も可能であることを示した。

氏名	中村　泰之

第一部、第三章ではこれまで酵母では報告例のないヒトGPCRであるアンジオテンシンレセプターのシグナル伝達の検出に成功した。野生型のアンジオテンシンレセプターを発現させた場合では、酵母Ｇタンパク質との共役が機能しなかったことから、変異型のアンジオテンシンレセプターを構築し、さらに酵母/ヒトキメラ型Ｇタンパク質を導入することで、酵母のシグナル伝達経路との共役が可能となった。さらに、アンジオテンシンレセプターのアッセイ系を発展させ、アンジオテンシンおよびそのアナログを分泌発現させてもレセプターの活性化を検出できたことから、本系もペプチド配列のライブラリ遺伝子を導入することで、リガンドスクリーニングへの応用が可能であると期待される。第一部の研究成果により、酵母におけるシグナル伝達解析系をスクリーニングに利用できるレベルにまで検出系を高感度化するとともに、応用できるGPCRの種類を大幅に拡充することに成功した。

つづいて第二部、第一章では、タンパク質間相互作用のスクリーニングに適した酵母２ハイブリッド系を基盤とし、ヘテロ二量体を形成するヒトGPCRの組み合わせを簡便に同定できるシステムの開発を行った。従来の酵母２ハイブリッド系では、GPCRにリガンド結合するとMAPキナーゼ（MAPK）が活性化されて細胞の増殖阻害を引き起こすため、タンパク質相互作用のレベルを定量的に評価できない。そこで、酵母内のリガンド応答によるシグナル伝達系の活性化の有無にかかわらず、二量体を形成するGPCRの組み合わせを同定できる新たな技術を開発するため、MAPK関連遺伝子の欠失変異体を作成した。これにより、酵母２ハイブリッド系の特徴である寒天培地上での生育評価や、酵素活性（lacZ活性）による定量評価が可能となり、ヒトGPCRの二量体形成候補のスクリーニングが可能となった。本システムは、リガンド結合に起因する受容体の立体配座変化をモニターすることも可能であったことから、GPCR二量体化を多面的な角度から解析することが可能である。また、クローニングした８種類のヒトGPCR発現プラスミドをライブラリとして、ヒトアンジオテンシンレセプターに対してヘテロ二量体形成するGPCRをスクリーニングしたところ、これまでに報告されていない新たなヘテロ二量体形成候補を見いだすことに成功した。このことから、ヒトGPCR発現プラスミドをライブラリとして拡充することで、標的GPCRに対するさらなるヘテロ二量体候補を探索することが可能であると示唆される。

第二部、第二章ではこれまでのシステムを発展させ、GPCRのヘテロ二量体検出だけでなく、リガンド結合に応答してシグナル伝達を活性化するかどうかも同時に解析できるシステムの開発を行った。二量体形成を検出すると赤色蛍光タンパク質が発現し、シグナル伝達を検出すると緑色蛍光タンパク質が発現するシステムを構築することで、酵母内在性GPCRをモデル系として、GPCRの二量体化解析とシグナル伝達の応答を同時にモニタリングできるシステムの開発に成功した。本システムを利用して、二量体形成とシグナル伝達の関連性を探るため、酵母GPCRの変異体を用いた機能解析も可能であることを示した。さらに、ヒトGPCRであるソマトスタチンレセプターのヘテロ二量体形成とシグナル伝達の同時検出への応用も可能であった。これによりシグナル伝達に関与するヘテロ二量体のみを探索することが可能であると示唆され、新しい切り口での医薬品の開発や機能・構造解析などのGPCR研究へ展開が期待できる。

以上のことから、GPCRの二量体形成を多面的な角度から解析できる新たな酵母バイオセンサーの開発に成功した。本系を応用することで、無数に存在するGPCRヘテロ二量体の組み合わせを網羅的に解析すると共に、シグナル伝達との因果関係を調べることが可能となり、新規作用機序を介した医薬品の開発や、今まで治療法のなかった難病の治療薬開発へつながると期待される。

本研究はGPCRの機能と構造の関連を明らかにするためのシステム開発を研究したものであり、バイオテクノロジーによる医療・ライフサイエンス分野への貢献において重要な知見を得たものとして価値ある集積である。提出された論文は工学研究科学位論文評価基準を満たしており、学位申請者の中村泰之は、博士（工学）の学位を得る資格があると認める。