

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	原圭祐
論文題目	Studies on the membrane-displayed ligand technology targeting G protein-coupled receptors in yeast, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (酵母を用いたGタンパク質共役受容体を標的とするリガンド細胞膜提示技術に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
Gタンパク質共役型受容体(G-protein-coupled receptor = GPCR)はヒトゲノムの約3%を占める7回膜貫通型細胞膜受容体であり、視覚・味覚・嗅覚・代謝・内分泌・情動・循環・炎症・免疫などの様々な生理的機能に関与している。本研究では酵母を用いたGPCRアッセイ系を構築し、ヒトGPCRを標的としたペプチドアゴニスト探索手法の開発を目的として「ペプチドリガンド細胞膜提示技術」を新規に考案し、その適用研究を行った。			
1. Ste2p-αファクター相互作用をモデルとした細胞膜提示ペプチドリガンドの有効性検証			
酵母フェロモン応答経路をモデルシステムとして、酵母内在性GPCRとそのペプチドアゴニストの相互作用に着目し実験を行った。Ste2pは酵母フェロモン応答経路の受容体(GPCR)であり、α-ファクターはSte2pを活性化するアゴニストである。13アミノ酸残基からなるペプチド (WHWLQLKPGQPMY)であるα-ファクターのペプチド配列を、FLAGタグ及びリンカー配列を介してYps1pの細胞膜アンカー領域に融合した構造のプラスミドを構築した。Yps1pはグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカー型細胞膜タンパク質の代表例であり、その局在は細胞膜上である。GPCRとの相互作用を考え、リンカー長を1アミノ酸レベルで変化させた様々なリンカー長を持つプラスミドを構築した。GPCRシグナル応答性プロモーターによりEGFPを発現できるシグナル検出用プラスミドによる蛍光レポーターアッセイやフローサイトメーター解析、および蛍光顕微鏡解析の結果、細胞膜提示α-ファクターを発現する酵母細胞では蛍光量の増加が見られた。細胞外からのα-ファクター添加時の応答と比較したところ、細胞膜提示型で最も応答の良かった細胞は、リンカー長が3アミノ酸残基であり、最大活性の約54%の応答が得られた。これらの結果から、Yps1pのアンカー領域に融合した細胞膜提示α-ファクターが酵母フェロモン応答経路を活性化できることが明らかとなった。			
2. キメラGαタンパク質の構築および機能評価			
GPCRは細胞膜内側に裏打ちされた3量体型Gタンパク質と共役することで細胞外			

刺激を細胞内へと伝達する。中でもGPCRとの共役に関しては、G α サブユニットのC末端領域が重要であることが知られている。ヒトGPCRを酵母細胞に発現させる場合、酵母内在性G α のままではヒトGPCRと共役しない事例を踏まえ、G α サブユニットのC末端領域をヒト型配列に置換したキメラG α サブユニットを構築した。ヒト苦味受容体と共役するG α であるgustducinをモデルとして用い、酵母内在性G α であるGPA1を母体にC末端配列をgustducin配列に置換した複数のキメラ体を構築した。Ste2pシグナリングを指標にその機能を評価したところ、苦味受容体との共役に必須であると言われている領域を置換したキメラG α タンパク質（GPA1/gust37）は酵母細胞において機能を維持し、C末端領域を欠損させたG α タンパク質やキメラG α タンパク質(GPA1/gust44)は機能しないことが明らかとなった。以上のように、構築した酵母GPCRアッセイを用いることにより、ヒトGPCRとの共役に必要な領域を持つキメラG α タンパク質の機能評価できることが明らかとなった。

2. ヒトソマトスタチン受容体発現酵母における細胞膜提示ソマトスタチンによるシグナル活性化

「ペプチドリガンド細胞膜提示技術」が実際にヒトGPCRに対しても有効であるかを検証するため、ヒトソマトスタチン受容体サブタイプ2(SST2R)を酵母細胞に発現させ、さらにソマトスタチンを細胞膜上に提示した。この際、SST2Rと共役するG α タイプであるGi配列に置換したキメラG α タンパク質を構築し導入した。ソマトスタチンは14アミノ酸残基からなるペプチドリガンド（AGCKNFFWKTFSTSC）であり、分子内に2つのシステインを持つことでS-S結合を形成する環状ペプチドである。環状ペプチドは、構造的に安定で血中安定性が高く、将来的にペプチド医薬を目指したリガンドスクリーニングを行う場合に好都合な骨格ペプチドとなる。様々なリンカー長を持つプラスミドを構築し、シグナル検出用プラスミドによる蛍光レポーターアッセイを行った結果、幅広いリンカー長においてシグナル活性化を引き起こすことが明らかになった。細胞外からソマトスタチンを添加した場合の応答と比較したところ、リンカー長が21アミノ酸残基の時に最高の応答が得られ、それは、最大活性の約69%であった。以上のように、酵母に異種発現させたヒトソマトスタチン受容体サブタイプ2がキメラG α タンパク質と共役することで機能的に発現し、細胞膜提示ソマトスタチンによってシグナル活性化を引き起こすことが明らかとなった。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

Gタンパク質共役型受容体 (G-protein-coupled receptor = GPCR) は人間の基本感覚を司るセンサータンパク質であり、創薬研究における最も重要な創薬ターゲットの一つでもある。新規なりガンド探索手法が求められる中、本研究はヒト GPCRを標的としたペプチドアゴニスト探索手法として「ペプチドリガンド細胞膜提示技術」を提唱した研究である。成果として評価すべき点は以下の通りである。

1. 蛍光レポーターアッセイによりシグナル伝達の活性化を可視化・定量化できるアッセイ系を構築し、GPI アンカー型細胞膜タンパク質 (Yps1p) のアンカー領域に結合した細胞膜提示型 α -ファクターが酵母フェロモン応答経路を機能的に活性化することを明らかにした。
2. 苦味受容体と共役する G α サブユニットである gustducin の配列を持つキメラ G α タンパク質を構築し、酵母における機能性を評価した。酵母 GPCR アッセイ系を用いることにより、ヒト GPCR との共役に必要な領域を持つキメラ G α タンパク質の機能評価が可能であることを示した。
3. 酵母細胞に異種発現させたヒトソマトスタチン受容体サブタイプ 2 (hSST2R) が共発現させたキメラ G α タンパク質と共役して機能することを示し、さらに、細胞膜提示型ソマトスタチンによって SST2R を機能的に活性化できることを明らかにした。

以上のように本論文は、提唱した「ペプチドリガンド細胞膜提示技術」によって、酵母細胞に異種発現させたヒトGPCRを機能的に活性化できることを示し、安価で簡便な酵母細胞を用いてヒトGPCRの機能評価を可能としたものであり、細胞生化学、応用微生物学および生体高分子化学に寄与することが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成24年4月12日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注)Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降