

(第3号様式)

## 学位論文要旨

氏名 鈴木康之

論文名 機能性 G 蛋白質共役型受容体の合成：グリセロソーム添加型小麦胚芽無細胞蛋白質合成系で合成したヒトヒスタミン H1 受容体の薬理的検討

---

### 学位論文要旨

#### 背景：

細胞膜に存在する受容体蛋白質は様々な生理的シグナルを細胞内に伝達している。特に G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) は重要な受容体蛋白質として知られ、ヒトゲノム中に 800 種類以上の GPCR が存在している。一方で GPCR を介するシグナル伝達系の異常が様々な病態を引き起こすことから、GPCR は疾患に対する治療法を検討する上で、重要な標的蛋白質と考えられてきた。また、未だリガンドが発見されていない GPCR も多数存在しているため、薬剤開発に直結する構造解析などの様々な研究を遂行するために、機能性を有した GPCR を大量に合成する方法を確立することは急務である。しかし、GPCR は 7 回膜貫通型の受容体という性質上、水溶性溶液中では容易に凝集してしまう問題点や、立体構造を維持した合成が難しい点などから、大量合成は容易ではなかった。これまでに申請者のグループは小麦胚芽無細胞蛋白質合成系に、疎水環境であるリポソームを添加することで、リポソーム膜に立体構造を維持した状態で膜蛋白質を大量に合成する技術を確立し、リガンド結合能を有するドパミン D1 受容体の合成に成功したが、他の GPCR の合成に適した条件を満たしていなかった。そこで申請者は、この合成技術をより汎用性が高い方法にするために、GPCR 発現の土台となるリポソームの最適化に注目した。近年、グリセロソームと呼ばれる、高濃度のグリセオールを含有するリポソームがドラッグデリバリーシステムに応用され注目されている。リポソームに比べ、グリセロソームは形態学的に安定するとともに膜の流動性が高いといわれている。本研究では、グリセロソーム添加型小麦胚芽無細胞蛋白質合成系を用いて、これまでに多くの検討がされている GPCR の一つである、ヒトヒ

スタミン H1 受容体 (HRH1) がリガンド結合能を有する状態での大量合成を可能になることを目的とした。

**方法：**

1. **無細胞蛋白質合成系による HRH1 の合成：**HRH1 受容体遺伝子が無細胞蛋白質合成系専用ベクター (pEU-E01-MCS) に組み込んだ。また、リガンド結合能が低下すると報告されている Asp107 を Ala に変異させた D107A-HRH1 の蛋白質合成用ベクターも同様に作成した。作成した専用ベクターを用いて、重層透析法によるグリセロソーム添加型小麦無細胞蛋白質合成系で野生型 (WT)-HRH1 と D107A-HRH1 の合成を行った。また合成時に [<sup>14</sup>C]ロイシンを添加し、放射性同位体で標識した [<sup>14</sup>C]HRH1 を合成した。

2. **スクロース密度勾配遠心分離法による HRH1 プロテオグリセロソームの分離：**スクロース溶液を用いて密度勾配を作成した遠心管内の上層に [<sup>14</sup>C] HRH1 プロテオグリセロソームを重層し、超遠心分離 (200,000g, 4°C, 18h) による HRH1 プロテオグリセロソームの分離を行った。

3. **トリチウム標識リガンドを用いた結合実験：**トリチウムで標識された H1 受容体拮抗薬である [<sup>3</sup>H]ピリラミンを用いて、合成した WT-HRH1 と D107A-HRH1 のリガンド結合能を検討すると同時に、非標識リガンドを用いた競合試験を行った。

**結果：**

1. 合成反応 1 回あたり、WT-HRH1 は 434 ± 66.6 μg、D107A-HRH1 は 437 ± 68.1 μg が合成された。

2. スクロース密度勾配遠心分離法では、グリセロソームが 2 層に分離された。<sup>14</sup>C のカウント測定から、 [<sup>14</sup>C]HRH1 は高密度の部位に分布するプロテオグリセロソーム層のみに分布しており、合成された HRH1 はグリセロソーム膜内に挿入されていることが分かった。

3. [<sup>3</sup>H]ピリラミンに対する合成した WT-HRH1 の最大結合能は 21.4 ± 0.936 pmoles/mg protein、解離定数は 9.62 ± 1.25 nM であった。一方、D107A-HRH1 では有意な結合を認めなかった。また競合試験では、ヒスタミン H1 受容体に作用するリガンドのみが競合し、ヒスタミン H2・H3・H4 受容体に対するリガンドは競合しなかった。

**考察：**

グリセロソーム添加型小麦無細胞蛋白質合成系で、グリセロソーム膜内に挿入された HRH1 プロテオグリセロソームの大量合成が可能となった。合成された WT-HRH1 は、ヒスタミン H1 受容体に対するリガンドに特異的な結合を示したが、D107A-HRH1 では有意なリガンド結合が見られなかったことから、本合成方法は機能性を有する HRH1 を大量に合成することが出来る優れた方法であるといえる。本研究で、リガンド結合能を有する状態で合成できる GPCR が増えたことにより、本合成方法がより汎用性が高いものになり得ると確信している。今後、様々な GPCR に応用し、GPCR に対する新規薬剤開発において本研究が重要な役割を果たしていくと考える。

キーワード (3~5)	G蛋白質共役型受容体 無細胞蛋白質合成 膜蛋白質 グリセロソーム ヒスタミンH1受容体
-------------	---