

(第7号様式)

学位論文審査結果の要旨

氏名	鈴木 康之
審査委員	主査 小林 直人 副査 田中 潤也 副査 田中 亮裕 副査 楠目 和代 副査 武森 信暁

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 受容体の薬理学的検討

審査結果の要旨

細胞膜に存在する受容体蛋白質、特に G 蛋白質共役型受容体 (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だと考えられる。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は、機能を有した蛋白質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 は疎水性ドメインを持つ7回膜貫通型受容体という蛋白質分子の性質上、大量合成は容易ではなかった。これまでに申請者らのグループは、本学で開発された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膜蛋白質を大量に合成する技術を確立した。そこで申請者は、リポソームの最適化によって本合成系をより汎用性が高い方法にするため、グリセロソームと呼ばれる高濃度のグリセロールを含有するリポソームに注目した。本研究では、将来の分子創薬への展開を想定し、GPCR の一つでこれまでに多くの検討がされているヒトヒスタミン H1 受容体 (HRH1) を、特異的なリガンド結合能を有する状態で大量合成することを目的とした。

その結果、グリセロソームを添加した小麦無細胞蛋白質合成系を用いて、リポソーム膜内に蛋白質が挿入された HRH1 プロテオグリセロソームの大量合成が可能であった。合成反応1回あたりの収量は、WT-HRH1 (野生型) は $434 \pm 66.6 \mu\text{g}$ 、D107A-HRH1 (リガンド結合能がないとされる変異型) は $437 \pm 68.1 \mu\text{g}$ であった。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 に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考えられた。さらに追加実験として、合成タンパク質の細胞内ドメインと G 蛋白との相互作用を BIACORE アッセイにより検討し、特異的な結合を示唆する予備的な結果が得られた。本研究の結果、リガンド結合能を有する状態で合成できる GPCR の収量が増え、本合成系の汎用性がより高いものになり得ることが示された。今後、様々な GPCR に対する新規薬剤開発において、本研究の成果が重要な役割を果たすと期待される。

平成 30 年 1 月 12 日に実施された学位審査において、申請者は学位論文の内容について、英語と日本語で説明した。審査委員からの主な質問事項は以下の通り（括弧内は回答内容）であり、申請者は予備実験や追加実験の結果も踏まえて適切に回答した。

- ・本研究の成果はどのように臨床応用できるのか？応用面での汎用性はあるか？（他の受容体分子にも注目し、大量に合成された蛋白質を鋳型として DNA アプタマーをスクリーニングすることによる核酸創薬を検討している。本研究で採用した実験系では合成タンパク質の分離回収が容易であることが、スクリーニングに有利になるのではないかと考えている。）
- ・小麦胚芽の抽出物に含まれる夾雑物を除去して、合成蛋白質の純度をもっと上げられないか？（ゲル濾過等で精製するとロスが多くなるため、本研究では遠心法を採用した。）
- ・リポソーム中のグリセロールの役割は何か？（一種の分子シャペロンとして働いて、リポソーム膜中への合成タンパク質の挿入を助けていると考えている。）
- ・グリセロールの濃度は高いほうが効果的なようだが、濃度を 20%以上にするとどうなるのか？（リポソームがミセル化して逆に回収しにくくなった。）
- ・追加実験で合成蛋白質の細胞内ドメインと G 蛋白との結合を検証しているが、この実験で使用する HRH1 分子は可溶化しているのか？（リポソームに挿入されたままでは非特異的に結合してしまうため、可溶化せざるを得なかった。）
- ・リポソームに合成蛋白質が挿入された状態のまま、セカンド・メッセンジャーの生成を測定できないか？（HRH1 分子と G 蛋白との共発現実験も試行してみた。サイズがずっと大きくなってしまいが、人工細胞という方法で試行している報告はある。）
- ・合成蛋白質の 0.1%にしかリガンドが結合しないということだが、この比率をもっと高くするアイデアはあるか？（脂質の組成を変えれば向上する可能性はあるが、0.1%という数値が生理的なものかもしれない。他施設ではナノディスクを使った成功例が徐々に始まっている。）
- ・リガンドに結合している比率が低い理由として、合成された蛋白質の立体構造や配向性が維持されていないことが考えられる。薬理的なアプローチ以外に、合成蛋白質の構造を検証する方法について検討して欲しい。実験をデザインするにあたって、糖鎖が結合しないなどの小麦胚芽無細胞合成系の限界を把握しておく必要がある。その上で、複数種類の蛋白質を並行して合成できるという本合成系のメリットを活かした研究に発展させて欲しい。

審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。なお、本研究の成果にもとづく英文論文は *Frontiers in Pharmacology* 誌に採択されている。