

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月22日現在

機関番号：82626

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23860074

研究課題名（和文） 酵母を用いたヒト上皮増殖因子受容体の機能解析

研究課題名（英文） Analysis of function of human epidermal growth factor receptor using yeast

研究代表者

福田 展雄（FUKUDA NOBUO）

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究員

研究者番号：00613548

研究成果の概要（和文）：

本研究では、酵母のシグナル伝達系を出力系として用いた、ヒト上皮増殖因子受容体の解析手法を確立した。当該受容体は二量化することで自己リン酸化反応を触媒して活性化状態へと変化するが、恒常活性を有する受容体変異体と、リン酸基を認識するアダプター分子の結合を、酵母のシグナル伝達へと変換する技術の作製に成功した。本技術を用いることで、抗癌剤のシード化合物である受容体阻害剤の簡便な評価が可能になると期待される。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we established a methodology to analyze function of human epidermal growth factor receptor (EGFR) by using yeast signal transduction as readout. EGFR is activated by autophosphorylation following dimerization. We succeeded in restoration of yeast signal transduction based on molecular interaction between constitutively activated EGFR and its adapter that recognizes and binds to the phosphorylated residue of EGFR. Our approach will provide a simple and easy tool for evaluation of EGFR inhibitors which are potential seed compounds for anticancer drugs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：酵母フェロモン応答、ヒト受容体、自己リン酸化、膜局在性

1. 研究開始当初の背景

ヒト遺伝子産物に対する創薬シード化合物の開発を行うためには、モデルとなる生物の表現型を活用したスクリーニング系の構築が重要である。出芽酵母は高等動物細胞のモデルとして有用であり、遺伝子操作が容易で

寒天培地・液体培地などで簡便に培養できることから、遺伝子の機能解析のみならず新たな細胞機能の制御物質探索系としても非常に優れている。

現在、創薬分野における抗癌剤の開発では、上皮増殖因子(EGF)受容体(EGFR)が代表

的な標的分子とされている。正常細胞においてEGFRはEGF存在下で特異的に二量体化され、細胞内のキナーゼドメインが接近することで、互いにリン酸化を施して活性化される。次にリン酸化された活性型EGFRを認識するアダプタータンパク質Grb2が結合することでシグナルが下流へと伝達される。一方、恒常活性を有するEGFRは細胞の癌化を誘導することが知られている。したがって、抗癌剤開発に向けて、活性型EGFRの検出技術が不可欠であった。

2. 研究の目的

EGFRを標的とした抗癌剤の開発において、最も時間と労力が必要とされている創薬シード化合物のスクリーニング工程の高効率化を目指し、酵母を用いた受容体活性化シグナルの新規検出技術を考案した。本研究ではこれまでに構築した酵母Gタンパク質シグナル伝達系の制御技術を基盤として増殖因子受容体の解析へと発展させることで、酵母の増殖速度を生かした短期間（培養期間3日以内）の解析手法の確立を目指した。

3. 研究の方法

EGFRの834位の1アミノ酸残基置換（Leu→Arg）を行い、恒常活性型のEGFR（EGFRact）を作成した。またアダプタータンパク質Grb2と酵母のGタンパク質変異体（G_γcyto）を融合したGrb2-G_γcytoを作成した。

G_γcytoは野生型が有する膜結合能を欠失した変異体であり、単独ではGタンパク質シグナルを伝達することができない。したがって、染色体上のG_γ遺伝子を破壊した酵母細胞に、上記の2つのタンパク質を共発現させた場合、EGFRとGrb2が結合したときのみ、G_γcytoが細胞膜へとリクルートされてシグナル伝達の回復が見られる。

シグナル伝達の回復は、その応答の1つである酵母の接合（二倍体細胞の形成）を利用して、接合体選択用の寒天プレート上でのコロニー形成を観察すること（接合試験）により評価した。

4. 研究成果

まずEGFRまたはEGFRactの全長と、Grb2-G_γcytoを発現する酵母形質転換体を創製し、接合試験を実施したところ、シグナル伝達の回復は全く見られなかった。

次に、シグナル伝達に対するEGFRの立体障害の効果を調べるために、EGFRとG_γcytoとの融合タンパク質（EGFR-G_γcyto）を発現する形質転換体を作製して接合試験を行った。EGFR-G_γcytoは細胞膜に局在するが、接合試験ではシグナル伝達の回復は見られなかった。すなわち、G_γcytoと比較して十倍以上の分子量を有するEGFRが、細胞膜近傍での、

G_γcytoの適切な空間的配置を妨げていると推察することができる。

そこでEGFRまたはEGFRactの細胞内ドメインの必要部位のみを選択し、細胞膜への局在化シグナルを付加して発現させることで、上記の障害の回避を図った。各形質転換体の接合試験の結果を図1に示す。

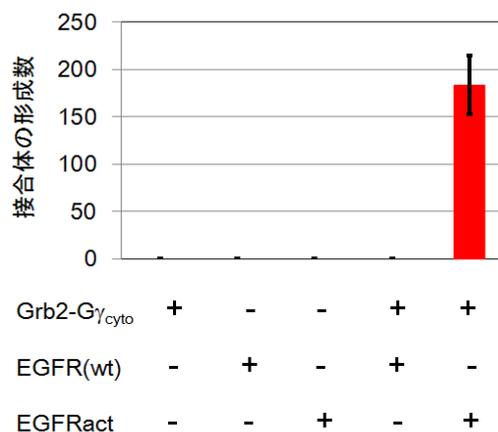


図1 接合試験において、各形質転換体の菌体懸濁液1 mL (OD₆₀₀=1) 中に形成された接合体の数を示す。(wtは野生型を表す)

図1より明らかのように、EGFRactとGrb2-G_γcytoが存在する場合にのみ、シグナル伝達が回復して接合体が形成された。この結果は、EGFRactに存在するリン酸化残基をGrb2が認識することで、G_γcytoが細胞膜へとリクルートされたことを示している。したがって本形質転換体を用いれば、キナーゼ活性を阻害することを作用機序とする創薬シード化合物の探索および評価が可能となる。本技術は出芽酵母の増殖特性を生かした簡便な評価系であり、EGFRを標的とした抗癌剤開発の促進に大きく貢献するものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

(1) Fukuda N, Ishii J, Kaishima M, Kondo A., “Amplification of agonist stimulation of human G-protein-coupled receptor signaling in yeast.” 査読有, Analytical Biochemistry, vol. 417, 182-187, 2011, DOI: 10.1016/j.ab.2011.06.006

(2) Fukuda N, Ishii J, Kondo A. “G_γ recruitment system incorporating a novel signal amplification circuit to screen transient protein-protein

interactions.” 査読有, FEBS Journal, vol.278, 3086-3094, 2011, DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08232.x.

(3) Ryo S, Ishii J, Iguchi Y, Fukuda N, Kondo A. “Transplantation of the GAL regulon into G-protein signaling circuitry in yeast.” 査読有, Analytical Biochemistry, vol.424, 27-31, 2012, DOI: 10.1016/j.ab.2012.02.005

(4) Fukuda N, Matsukura S, Honda S. “Artificial Conversion of the Mating-Type of *Saccharomyces cerevisiae* without Autopolyploidization” 査読有, ACS Synthetic Biology, in press, 2013, DOI: 10.1021/sb400016j

[学会発表] (計2件)

(1) 海嶋 美里、福田 展雄、石井 純、近藤 昭彦 “Developing a screening method for desirably altering affinities of protein mutants based on yeast cellular signaling” (第35回日本分子生物学会年会)、福岡、2012年12月14日

(2) 海嶋 美里、福田 展雄、石井 純、近藤 昭彦 “A new technology to screen desirably affinity-altered proteins based on yeast signal transduction machinery” (YABEC2012)、徳島、2012年10月27日

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 自己倍数化抑制に基づく酵母の育種方法

発明者: 本田 真也, 福田 展雄, 松倉 智子

権利者: 独立行政法人産業技術総合研究所

種類: 特許出願

番号: 特願 2013-014863

出願年月日: 2013/1/29

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 展雄 (FUKUDA NOBUO)

独立行政法人産業技術総合研究所・

バイオメディカル研究部門・研究員

研究者番号: 00613548

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者
なし