

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650032

研究課題名(和文) 分裂酵母を用いたGタンパク質共役型受容体のリガンド探索のためのアッセイ系の構築

研究課題名(英文) Construction of assay system for the ligand of G protein-coupled receptor using a fission yeast

研究代表者

長田 俊哉 (Toshiya, Osada)

東京工業大学・生命理工学研究科・准教授

研究者番号：00201997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本プロジェクトの目的はGPCRを利用したバイオセンサーの開発およびオーファンGPCRのリガンド探索スクリーニングシステムの構築である。分裂酵母に外来性GPCRを発現させて、リガンド応答を検出するためのレポーター株を構築した。分裂酵母には二つのGPCR経路があり、接合フェロモンシグナル伝達経路とグルコース伝達経路の下流にGFPを置くことで、シグナルの定量的な評価が可能なアッセイを確立した。これらのレポーター株に外来性GPCRを機能的に発現させるため、外来性GPCRのN末端やC末端を改変した。この結果分裂酵母由来のP3シグナルをN末端に付加した場合に外来性GPCRの発言量の増加が見られた。

研究成果の概要(英文)：G-protein-coupled receptors (GPCRs) are seven transmembrane proteins and activated by hormones, odorants, neurotransmitters, and so on. GPCRs are one of the most potential drug targets. However, it is difficult to reproduce functional GPCR expression in heterologous cells due to the unknown mechanism of its trafficking and folding. The purpose of this project is the development of the ligand screening system for orphan GPCR and the construction of biosensor that utilizes the GPCR. The reporter strains for detecting a ligand response for an exogenous GPCR were constructed by using fission yeast. The fission yeast has two GPCR pathway. One is the glucose pathway and the other is the pheromone pathway. In this project, GFP reporter systems for both receptors have been constructed. The both transformed cells showed the ligand dependence activity. To increase the expression of the exogenous GPCR in the cells, the exogenous GPCR was modified with P3 signal derived from the fission yeast.

研究分野：神経科学

キーワード：GPCR fission yeast pheromone GFP

1. 研究開始当初の背景

G タンパク質共役型受容体 (GPCR : G Protein-Coupled Receptor) は、細胞膜を 7 回貫通する特徴的な構造をしている。GPCR が細胞外のホルモンや神経伝達物質などを受容すると、GPCR の構造変化が起こり、共役している三量体 G タンパク質が活性化され、さらに下流のシグナル伝達カスケードが活性化されていく。ヒトゲノムにコードされている GPCR は約 800 種類あり、その約半数が匂いを感知する嗅覚受容体である。その他のものは生体内の様々な生理作用に関与しており、疾病治療薬の開発研究の標的として注目されている。現在市場で流通している薬剤の約 40% は GPCR 標的薬だといわれている。創薬の対象となる生体反応に関わる GPCR のうち、約 150 種はリガンドが特定されていないオーファン GPCR とよばれるものである。そのため、こうしたオーファン GPCR のリガンド特定は新薬開発にとってキーポイントとなっており、世界の製薬企業が GPCR を対象とした研究を行っている。一方、ヒトの嗅覚受容体は 400 種類程度であり、我々の身の回りの匂い物質は数十万種類あるといわれている。これは、受容体と匂い物質は厳密な一対一の対応ではなく、ひとつの嗅覚受容体は共通の構造を持つ複数の匂い物質を認識することができるためである。しかし、個々の嗅覚受容体や匂い物質の機能解析は進んでおらず、ほとんどの嗅覚受容体はリガンドが特定されていない。このよう創薬や嗅覚研究に共通した課題がオーファン GPCR のリガンド特定である。このために GPCR の異種発現は様々な細胞株で試みられているが、どの宿主を用いても「機能的な膜発現」が最大の課題となっている。哺乳類 GPCR を異種発現させる場合、輸送経路や翻訳後修飾が最も適していると思われる動物細胞ですら、膜発現の成功は運による部分が大きいというのが現状である。HEK293 細胞を使用してマウス Trace

Amine Associated Receptor (mTAAR) ファミリーを異種発現させた実験を例に挙げる。この実験では HEK293 を宿主として用い、野生型の受容体を強制発現させた株と、膜移行促進のために N 末端ドメインから第一膜貫通領域をウシロドプシンのものと置換したキメラ受容体を発現させた株に対してレポーターアッセイを行っている。mTAAR1、5、7f は野生型とキメラ体の応答に違いはなかったが、mTAAR3 では野生型でしかリガンドに応答できなかった。逆に mTAAR4 はキメラ体でないリガンドに応答できなかった。異種発現系では、どうすれば機能的な GPCR を発現させることができるということが全く分かっていない状況であり、解決策を見つけるために、分裂酵母を異種発現のプラットフォームとした本プロジェクトの研究がある。

2. 研究の目的

本プロジェクトは GPCR を利用したバイオセンサーの開発およびオーファン受容体のリガンド探索スクリーニングシステムの構築である。宿主細胞としては動物細胞と比べて遺伝子導入・欠損や飼育が容易である酵母を選択した。さらに出芽酵母を含むすべての酵母の中でも進化、脂質修飾様式、遺伝子相溶性といった観点において最も哺乳類に近い特徴を持つという理由から分裂酵母を選択した。分裂酵母にはフェロモン系とグルコース系の二つの GPCR 経路がある。GPCR である接合フェロモン受容体 Map3、Mam2 の下流では接合フェロモンシグナル伝達経路上でシグナル伝達が行われる。どちらの GPCR も共通の伝送路を利用している。接合フェロモンを受容したこれらの GPCR は G タンパク質サブユニットである Gpa1 と共役し、MAPKKK である Byr2、MAPKK である Byr1、MAPK である Spk1 からなる MAP カスケードにシグナルを伝達する。このシグナルが減数分裂のキー転写因子である *ste11* 遺伝子の発現を促進し、さらに下流の関連タンパク質の発現が誘導

される。グルコースを受容する受容体 Git3 は、G サブユニット Gpa2 と共役している。Gpa2 は G サブユニット Git5、G サブユニット Git11 とヘテロ三量体を構成している。Gpa2 はアデニリルシクラーゼ Cyr1 を活性化して cAMP 濃度を増加させる。これらの経路のリガンド検出系を確立し、さらに分裂酵母の GPCR を哺乳類の GPCR と置換して、哺乳類の GPCR のリガンド検出系を構築することを本プロジェクトの目的としている。

3. 研究の方法

G タンパク質共役型受容体のリガンド探索のため、分裂酵母のシグナル伝達経路を利用し、伝達経路の下流シグナルによりレポーター遺伝子が発現するように酵母を設計する。フェロモン系では酵母の内在性 GPCR : Mam2 にそのリガンドである酵母接合フェロモン : P 因子添加時の下流シグナルの転写量増加を調べ、増加量の多いものをいくつか選択して、それらのプロモーター領域を使って GFP を発現させる。グルコースシグナル伝達経路では、グルコースシグナル伝達によって抑制される遺伝子である *fbp1* のプロモーターと GFP を融合したレポーターを導入し、この *fbp1*-GFP 融合レポーターの性能を評価する。フェロモンとグルコースシグナル伝達経路を並行して使用することによって異種発現させる GPCR の種類も増やせると考えられる。

次に分裂酵母の GPCR を哺乳類の GPCR に置換し、分裂酵母で機能的に発現させる。哺乳類の嗅覚受容体やフェロモン受容体などの GPCR を哺乳類の細胞で強制発現させた場合、理由は不明であるが発現後、細胞膜に移行できるものとできないものに分類される。酵母で哺乳類の外來性 GPCR を発現させた場合も同じように細胞膜に移行できるものとできないものに分類されると予想される。そこで、哺乳類のいろいろな種類の GPCR の C 端に GFP を導入し、細胞膜

への移行を調べる。細胞膜への移行が困難な受容体については、N 端領域の改変などをおこない、全ての外來性の GPCR が酵母の細胞膜で発現できるように工夫する。GPCR は、細胞膜移行には N 端近傍領域が、細胞内シグナル伝達系には C 端近傍領域、リガンドとの結合には中央の領域が主に関与していると考えられている。外來性の GPCR を酵母で発現させ、膜移行と酵母の細胞内シグナル伝達系とリンクさせるには、外來性の GPCR の N 端近傍領域と C 端近傍領域を酵母の GPCR に置き換えることが有効と考えられる。この際、リガンドとの特異性が変化してしまう可能性があるため、すでにリガンドが特定されている受容体について、キメラ蛋白質を作製し、リガンドとの特異性を調べる。G タンパク質との共役には C 末端だけではなく GPCR の細胞内第 3 ループや第 2 ループなども大きく関与しているとの報告もあることから、外來性 GPCR の細胞内ループを酵母の GPCR の細胞内ループと置換したキメラ受容体の作製試みる。

4. 研究成果

分裂酵母に外來性 GPCR を発現させて、リガンド応答を検出するためのレポーター株を構築した。これにより、創薬に結びつくリガンド検索を行うことや、リガンド既知の受容体に対するリガンドセンサーの開発が可能になる。分裂酵母には二つの GPCR 経路があり、接合フェロモンシグナル伝達経路の下流に GFP を置くことで、シグナルの定量的な評価が可能アッセイを確立した。具体的には P 因子添加後、急激に発現量が増える遺伝子を検索した。その結果、*sxa2*、SPBC4.01、*mam3* などの遺伝子の発現が確認されたことから、これらのプロモーター領域を使って GFP レポーター株を作成した。GFP レポーター株は Mam2 が P 因子を受け取ると細胞内のフェロモンシグナル伝達経路を活性化して GFP を発現

する株であり、P 因子濃度依存性に GFP を発現した。グルコースシグナル伝達経路の下流に GFP を置くことで、二つ目のアッセイ系を確立した。分裂酵母はグルコースの認識を Git3 という GPCR で行っている。Git3 は Gpa2 という G タンパク質のサブユニットと共役し、Cyr1 を活性化することで細胞内の cAMP の量を増加させる。細胞内で増加した cAMP が PKA である Pka1 を活性化する。Pka1 によって抑制される Fbp1 のプロモーターの下流に GFP を配置した株を作成した。Git3 へのグルコース入力がない時に GFP が発現する。このため今回作成したグルコースシグナル伝達経路では、通常 GFP を発現していて、シグナルを受け取ると、GFP の発現が押さえられる。

これらのレポーター株に外来性 GPCR を機能的に発現させるため、分裂酵母フェロモン受容体 (Mam2) に対して N 末端キメラ体を作成し、フェロモンシグナリングアッセイを行ったところ、タグを付加した Mam2 キメラ体ではシグナルは維持しており、外来性 GPCR に対してもタグ付加型の改変法が適していると考えた。外来性 GPCR の N 末端に p3 シグナル、C 末端に GFP をつけて、蛍光量の測定を行った場合に、p3 シグナルの有無で比べると、p3 シグナル付きのキメラ体の蛍光量が増加していた。この蛍光量の増加は、分裂酵母由来の配列である p3 シグナルの存在により、小胞体への取り込みが行われやすくなったためだと考えられる。今後は2種類のレポーター株に、p3 シグナルのついた外来性の GPCR を発現させ、外来性 GPCR の機能的解析を行いたい。

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. Sasuga S and Osada T (2012) The reporter system for GPCR assay with the fission yeast

Schizosaccharomyces pombe. Scientifica, Article ID 674256

2. Sasuga S, Hidaka S, Ohkura S, Okamura H, and Osada T (2013) Gene expression of bovine vomeronasal receptors, EJBS Article ID 7-05

3. Hidaka S, Nikaido O, Kiyosaki S, Ikai A, and Osada T. (2013) Interaction between peptide pheromone or its truncated derivatives and pheromone receptor of the fission yeast

Schizosaccharomyces pombe examined by a force spectroscopy study and a GFP reporter assay, Journal of Surface Engineered Materials and Advanced Technology 3 36-42.

4. Saito M, Watanabe-Nakayama T, Machida S, Osada T, Afrin R, and Ikai A(2015)

Spectrin-ankyrin interaction mechanics: A key force balance factor in the red blood cell membrane skeleton, Biophysical Chemistry 200-201 1-8

[学会発表](計 8 件)

2015 年度

1. 岸本 祐樹、長田 俊哉 「分裂酵母内での外来性 GPCR の発現」第 10 回日本ゲノム微生物学会年会 (東京 2016 3/4-6)

2. 日高 翔、長田 俊哉 「分裂酵母においてグルコースシグナル経路の G サブユニットである Gpa2 発現レベルはフェロモンシグナル経路のシグナル伝達に影響を与える」第 38 回日本分子生物学会年会 (神戸 12/1-12/4)

2014 年度

3. 日高 翔、長田 俊哉 「分裂酵母における 2 種類の GPCR シグナルトランスダクション系間のクロストーク」第 37 回日本分子生物学会年会 (横浜 11/25-11/27)

4. 大屋 昌士、長田 俊哉 「分裂酵母 GPCR-Rgs1 融合タンパク質の活性評価」第 37 回日本分子生物学会年会 (横浜 11/25-11/27)

2013 年度

5.有本 航、長田 俊哉 「分裂酵母フェロモン受容体のN末端領域の機能解析」
第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸 12/3-12/6)

6.小久保 悟、長田 俊哉 「分裂酵母フェロモン受容体の細胞内ループ置換がレポーターアッセイに与える影響」第 86 回日本生化学会大会 (横浜 9/11-9/13)

7.小久保 悟 長田 俊哉 「分裂酵母 G タンパク質 Gpa1、Gpa2 の N 末端配列欠損が各シグナル伝達に与える影響」第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸 12/3-12/6)

8.日高 翔 長田 俊哉 「分裂酵母 G タンパク質 C 末端の機能解析」第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸 12/3-12/6)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
長田 俊哉 (Toshiya, OSADA)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・准教授

研究者番号：00201997
(2)研究分担者

(なし)

研究者番号：

(3)連携研究者 (なし)

研究者番号：