

3Ea05 G 蛋白質共役型受容体のヘテロダイマー形成ベアの探索のための新規検出システムの開発

○中村 泰之¹, 石井 純², 近藤 昭彦¹
 (¹神戸大院・工・応化,²神戸大・自・研究環)
 093t452t@stu.kobe-u.ac.jp

【目的】G 蛋白質共役型受容体(GPCR)は、ホモダイマーだけでなくヘテロダイマーを形成するベアが存在することが報告されている。GPCR のヘテロダイマー形成ベアの探索とその機能解明は、新規作用機序による新薬開発に応用できると期待されている。そこで、これまでの手法では不可能であった GPCR ヘテロダイマーの組み合わせをハイスループットに探索する手法として、細胞内での蛋白質間相互作用の検出に利用されている分割ユビキチンを利用した酵母 2 ハイブリッド系を応用することで、GPCR のヘテロダイマー形成ベアの探索を簡便かつ迅速に網羅的スクリーニングを可能とするシステムを開発することを目指す。

【方法と結果】本研究で用いるユビキチン分割体は C 末端側 (Cub) と N 末端側 (NubG) より構成され、これらが接近した状態になると相補し合うため再会合し、ユビキチンの機能を回復する。この再会合によりレポーター遺伝子が発現するため、融合蛋白質の相互作用を検出することができる。モデル系として酵母内性 GPCR (Ste2p) をそれぞれ Cub と NubG に融合し、酵母の増殖によりレポーター遺伝子の発現を評価したところ、Ste2p のダイマー形成が確認された。また、アドレナリン受容体などを含む 8 種類のヒト GPCR のヘテロダイマー形成ベアの探索に本系を応用したところ、新たにヘテロダイマー形成を示唆するベアの検出に成功した。本システムは 700 種類以上存在するヒト GPCR の網羅的なヘテロダイマー形成ベアの探索への応用が可能であると期待される。

Development of a novel detection system to identify heterodimer forming pairs from human G-protein-coupled receptors

○Yasuyuki Nakamura¹, Jun Ishii², Akihiko Kondo¹
 (¹Grad. Sch. Eng., Kobe Univ.,²Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ.)

Key words G-protein-coupled receptor, yeast two-hybrid system, *Saccharomyces cerevisiae*

3Ea08 ヒト由来μ-オピオイド受容体OPRM1とその変異体A118Gの酵母による発現と機能解析

○SAVANGSUKSA Aulaphan, 福谷 洋介, 萬 麻衣子, 養王田 正文
 (農工大・院工・生命工)
 yohda@cc.tuat.ac.jp

μオピオイド受容体は、7回膜貫通型のGタンパク質共役型受容体(GPCR)に属し、リガンドであるモルヒネやβ-エンドルフィンなどと結合することにより、生体内において鎮痛作用を生じる生理作用を引き起こすことが報告されている。主にがん患者などに施されるモルヒネなど麻薬性鎮痛薬剤を用いた疼痛管理において、このμオピオイド受容体の遺伝子多型(SNP)が、薬効効果における個人差を引き起こす原因となっていることが示唆され、オピオイド受容体の遺伝子多型によって生じる変異体の生化学的な解析が求められている。そこで、本研究では、出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*を用いたヒト由来μオピオイド受容体OPRM1の機能的発現系およびリガンドアッセイ系を構築し、受容体の遺伝子多型と薬剤応答性の関連を解析することを目的とした。ヒト由来 OPRM1 野生型の酵母発現ベクターを作製し、出芽酵母に導入した。OPRM1 のタンパク質発現は Western blot で確認した。OPRM1 発現酵母の培養液にリガンドであるβ-エンドルフィンを追加し、酵母内在 GPCR シグナル伝達経路下流で発現するように設計した緑色蛍光タンパク質 GFP およびホタルルシフェラーゼの発現に由来する蛍光や発光を測定することにより、酵母細胞での OPRM1 機能的発現を解析した。さらに、ヒトにおいて薬物やアルコール依存に関連があると言われている OPRM1 Exon1 の SNP (A118G) を有する変異体を構築し、リガンド応答性の変化の有無を解析した。本発表においては、OPRM1 の機能的発現の成否、また A118G 変異体の発現や機能の変化の有無について報告する。

Expression of the human μ-Opioid receptor OPRM1 and that variant A118G in yeast

○Aulaphan SAVANGSUKSA, Yosuke FUKUTANI, Maiko YOROZU, Masafumi YOHDA
 (Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words opioid receptor, SNP, *S. cerevisiae*

3Ea06 タンパク質アフィニティを自在に改変するための新規スクリーニングシステムの開発

○海嶋 美里¹, 福田 展雄¹, 石井 純², 近藤 昭彦¹
 (¹神戸大院・工・応化,²神戸大・研)
 akondo@kobe-u.ac.jp

【目的】進化分子工学はタンパク質を人工的に希望の方向へと改変する技術であり、なかでもタンパク質会合におけるアフィニティ改変は生体機能を調節できることから医薬品開発などへの応用が期待されている。こうした背景から、タンパク質のアフィニティを自在に強化および弱化するための新たなスクリーニングシステムを考案した。

【方法】酵母のGタンパク質シグナル経路において、リガンドが受容体へと結合すると三量体Gタンパク質が解離しシグナルを伝達する。Gタンパク質γサブユニットの脂質修飾による細胞膜への局在はシグナル伝達にとって必須であり、この特性を利用し以下のシステムの構築を行った。脂質化配列を削除したGγと標的タンパク質「Y」を融合タンパク質(Gγ-Y)として酵母の細胞質内に発現させるとともに、結合定数が異なる2種類のタンパク質「X₁」および「X₂」を発現させる。ここで「X₁」のみを細胞膜に局在化させると、X₁Y間の結合定数(K_{d1})がX₂Y間の結合定数(K_{d2})よりも大きい場合(K_{d1}>K_{d2})のみGγが細胞膜に局在できシグナルが伝達される。本原理を基盤に、X₁あるいはX₂をライブラリ化してシグナルが伝達された酵母を選別することで、アフィニティの強化または弱化に応用することが可能となる。本発表では、ここに提案した酵母シグナル伝達メカニズムを利用したアフィニティを自在に改変することのできる新規システムの原理について実証する。

A new screening technique for swingably altering affinities of protein

○Misato Kaishima¹, Fukuda Nobuo¹, Ishii Jun², Kondo Akihiko¹
 (¹Dept. Chem. Grad. Sci. Eng., Kobe Univ.,²Organ. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ.)

Key words protein-protein interaction, signal transduction, G-protein signaling

3Ea09 マウス由来嗅覚受容体の酵母における機能的発現効率向上を目指したRTPとの共発現系の構築

○神山 周也¹, 福谷 洋介², 内海 現太², 萬 麻衣子², 中村 智子², 養王田 正文²
 (¹東京農工大・工・生命工,²東農工大・院工・生命工)
 yohda@cc.tuat.ac.jp

嗅覚受容体は嗅細胞の細胞膜上に発現するGタンパク質共役型受容体(GPCR)である。細胞外の匂い分子を認識する高感度センサーであり、匂いセンサー開発への応用が期待されているが、異種細胞での発現が困難であることから、他のGPCRに比べて研究は遅れている。私たちは、嗅覚受容体の機能解析や相互作用する因子の特定・機能解析とともに、化学物質センサーとしての工学的利用を目的に、出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*を用いた嗅覚受容体の高効率発現系の構築を行っている。

本研究では、オイゲノール受容体であるマウス由来嗅覚受容体mOR-EGの酵母での機能的発現を行った。酵母α-因子フェロモン受容体をmOR-EGに入れ替え、シグナル伝達機構の下流にルシフェラーゼの遺伝子をレポーター遺伝子としての組み込み、オイゲノール応答酵母を作成した。

さらに受容体の発現効率を上げるため、ラット由来I7嗅覚受容体のNおよびC末端配列で置き換えたキメラ体嗅覚受容体を作成した。また、嗅覚受容体の細胞膜への効率的輸送を促すため、マウス由来Receptor transport protein(RTP)と嗅覚受容体との共発現酵母を作製した。キメラ体手法および、RTPとの共発現とも活性の向上がみられ、有効な手法であることが示唆された。これらの結果から、出芽酵母での嗅覚受容体の発現において有効なアプローチ法についてまとめ、報告する。

Effect of co-expression of RTP on functional expression of the olfactory receptor in yeast

○Shuya Kamiyama¹, Yosuke Fukutani², Arata Utsumi², Maiko Yoroazu², Tomoko Nakamura², Masafumi Yohda²
 (¹Dept. Biotechnol., Tokyo Univ. Agric. Technol.,²Dept. Biotech., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words G-Protein Coupled Receptor, RTP, Olfactory Receptor, *Saccharomyces cerevisiae*