

審査の結果の要旨

氏名 高山 英士

本学位論文は、ヒト膜蛋白質の大量機能発現の研究に関するものである。膜蛋白質は全ゲノムの約3割を占める生理学上極めて重要な蛋白質であるにも関わらず、特にヒト由来膜蛋白質の構造決定は進んでいない。市販の薬剤の5割以上は膜蛋白質を結合標的としており、膜蛋白質の構造決定は合理的な創薬開発に極めて有用である。構造解析のためにはミリグラムオーダーの大量発現が不可欠であるが、発現量が少ないこと、大腸菌などの大量発現系が膜挿入メカニズムなどが異なるため有効でないこと、過剰発現による細胞毒性などの課題がある。構造解析にむけたヒト膜蛋白質の大量機能発現には、迅速な発現配列の設計と作成、正しいフォールディングや局在を伴う機能性膜蛋白質の大量発現、脂質二重膜内在型と同等の活性を持つ均一な精製蛋白質を調製することが必要であることから、本検討では、PCR-based gene assembly 法による構造遺伝子の作成手法の開発、細胞毒性の問題を抑制するヒト由来 HEK293 細胞を用いたテトラサイクリン発現誘導系の開発、結合活性測定系によるアフィニティー精製後の活性評価を行っている。また脱糖鎖処理と天然変性領域を除去することで均一なサンプルの調製を行っている。

本論文は四章から構成されており、第一章では膜蛋白質の構造解析にむけた大量発現に関する課題について概観している。第二章では題材蛋白質として四回膜貫通型蛋白質の CD81 レセプター、第三章では十二回膜貫通型蛋白質セロトニントランスポーター (SERT) についてそれぞれ大量発現の検討、キャラクタライゼーションから精製蛋白質の活性評価まで総合的に検討している。第四章では大量発現とコドン頻度の最適化について総括的なまとめと考察を行っている。

技術開発としては、構造遺伝子を簡便かつ迅速に作成するため PCR-based gene assembly 法を開発している。従来用いられている cDNA ライブラリーを用いた方法は野生型の構造遺伝子が得られるが、オリゴ DNA 合成が安価になっていることやコドン頻度の最適化が容易であることから本手法を用いることでより柔軟な配列設計を行っている。また、ヒト膜蛋白質の機能発現のために HEK293 細胞を用いた同種発現を用いている。テトラサイクリン誘導発現系はエフェクターであるテトラサイクリンの培地添加により発現が開始されるため、潜在的に毒性のある膜蛋白質の過剰発現を細胞単層膜がコンフルエンスに達するまで抑えることができる。CD81 では 32、SERT では 24 の野生型安定発現株のクローンを取得しその発現量を精製タグの抗体を用いたウェスタンブロット (WB) 法によりスクリーニングし安定発現株を取得している。近年のバイオインフォマティクス及び生物物理学研究により真核細胞の蛋白質では約 30% が天然変性領域 (IDR: Intrinsically disordered region) を有すると報告されている。結晶化を目指した構造生物学研究のためには、活性に影響を与えない限りこれらを除去することが可能である。そこで CD81 と SERT の IDR 解析を行ったところ、CD81 では IDR が見られないものの SERT の N 末端に IDR を持つことが予測された。この領域は二次構造が少なく親水性残基を多く有している。開始残基の親・疎水性、IDR 確率、二次構造予測をもとに 6 種類のトランケーション体を設計しこれらの構造遺伝子を

野生型発現配列をもとに作成し大量発現及び活性評価に用いている。

第二章では CD81 の大量機能発現と活性評価が示されている。HEK293 細胞による発現は WB 法により 1.04 mg/L の発現が確認され、また rho-1D4 タグを用いたアフィニティー精製では 95% 以上の精製純度が得られている。細胞膜へのトラフィッキングは正しいフォールディングの指標になるため、抗 rho-1D4 抗体を用いて共焦点顕微鏡により局在を確認している。細胞膜に局在すると知られている cadherin との共局在性から適切なフォールディングが実現できていることを確認している。精製後の CD81 は ELISA アッセイにより結合パートナーである HCV-E2 糖蛋白質と $K_d = 3.8 \pm 1.2$ nM で結合し結合活性があることが確認され、大量機能発現系が四回膜貫通型蛋白質に有効に機能することを確認している。

第三章では十二回膜貫通型蛋白質 SERT の大量機能発現と活性評価を行っている。野生型 SERT とあわせてジスルフィド結合を抑制した変異体、糖鎖修飾欠損体、IDR を除いたトランケート体の構造遺伝子を作成し、それらの哺乳動物細胞による発現を確認したところ、野生型 SERT では 1.39 mg/L の発現量を得ている。SDS-PAGE 上で 90% 以上の精製純度が確認され、また BN-PAGE により非変性状態で電気泳動したところ野生型とトランケート体で四量体と思われるバンドが確認され、N 末端の IDR 領域の除去は多量体形成に影響がないことを示している。また、Lysyl endopeptidase でペプチド分解した精製サンプルを Electro Spray Ionization-MS/MS 解析に供し、全長発現を確認している。糖鎖修飾については発現誘導後 32 時間ではほとんどの SERT が複合型糖鎖修飾を受けていることを各種脱糖鎖酵素処理により確認している。精製後の SERT は非変性下で PNGaseF により容易に脱糖鎖することと、糖鎖修飾欠損変異体 (Asn207Gln, Asn 218Gln) では発現量が非常に少ないために、より均一な膜蛋白質を大量調製するためには脱糖鎖処理をすることで精製蛋白質を得る手法が結晶化などに有効であると結論付けている。SERT の各種変異体のトランスポート活性を蛍光アッセイを用いて確認し、細胞レベルで特異的なトランスポート活性を有していることを確認している。SERT の機能発現量は 0.99 mg/L であり、精製 SERT の 71% がリガンド結合型であることを示している。

以上をまとめると、本研究は、全く異なるトポロジーと翻訳後修飾を持つ CD81 と SERT に対して、各種構造遺伝子を PCR-based gene assembly 法により作成し、哺乳動物細胞を用いて発現しているが、これらは全長発現し、正しいフォールディングとトラフィッキングにより細胞表面に局在していることを示している。また細胞レベルの機能解析を行ったところ、SERT の各発現体はいずれもトランスポート活性を有することを示している。両膜蛋白質(野生型)はミグラムレベルの発現量であり、特に SERT では既報と比べ発現量、機能発現量ともに世界一の大量発現に達している。精製膜蛋白質は ELISA、ラジオリガンド結合アッセイからいずれも精製後の活性があることを示している。本研究は、従来難しいとされていたヒト膜蛋白質の大量機能発現が構造遺伝子の合成と哺乳動物細胞による発現誘導系の組み合わせにより、蛋白質サイズや翻訳後修飾によらず多くのヒト膜蛋白質の発現プラットフォームとして有効であることを示している。この方法論は今後のヒト膜蛋白質の構造決定への重要な方法論になることが期待されることから、本研究は博士(薬学)の学位授与に値すると判断した。