

D308

G 蛋白質共役型受容体における二量体化解析のための新規検出システム

(神戸大院工)○(学)中村 泰之・(神戸大研究環)(正)石井 純・

(神戸大院工)(正)近藤 昭彦*

【緒言】

G 蛋白質共役型受容体(GPCR)は 7 回膜貫通型蛋白質として細胞膜に局在し、受容体における最大のファミリーを構成している。約 3 割の FDA 認可医薬品が GPCR を標的としていることから、GPCR の機能や構造を理解することは合理的な創薬設計のために不可欠といえる。

リガンド結合により構造変化が喚起された GPCR は、細胞内 3 量体型 G 蛋白質との共役を経てシグナルを伝達することで種々の生理機能を発現する。近年多くの GPCR がホモダイマーもしくはヘテロダイマーを形成することが報告されており、リガンド結合やシグナル伝達など多様な機能に関与することが示唆されている。生体内での二量体化を検出するには特殊な技術を必要とし、その検出感度の低さや解析技法の難しさからその構造上の特徴やシグナル伝達に関わるメカニズムはいまだ未解明な部分が多く、汎用的な GPCR 二量体化の検出方法が望まれる。そこで本研究では、細胞内でのタンパク質間相互作用の検出に利用されている分割ユビキチン法を応用することにより、GPCR の二量体化(多量体化)を簡便かつ定量的に検出できるシステムを構築することを目的とした。酵母内在性 GPCR である酵母フェロモンレセプター(Ste2)をモデルとして解析基盤の確立を試みた。

【実験操作】

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、相補しあうため再会合し、ユビキチンの機能を回復する。これによってレポーター遺伝子が発現し、それぞれに融合させたタンパク質間の相互作用を検出することができる。

遺伝子操作により Ste2 に Cub を融合させたプラスミド(pBT3-STE2)と Ste2 に NubG を融合させたプラスミド(pPR3-STE2)を構築し、これらのプラスミドを酵母 *Saccharomyces cerevisiae* NMY51 株(ユビキチン応答性レポーター発現株)由来の派生株に形質転換し、共発現させた。得られた形質転換体を 37°C で 18 時間培養した後、β-ガラクトシダーゼ活性によりレポーター遺伝子の発現を測定し、Ste2 の二量体化(多量体化)レベルを数値化した。

続いてドメイン解析として、Ste2 の 1 番目から 5 番目までの膜貫通ドメインを欠損させた Ste2(Ste2-TM6-7)と 6 番目から 7 番目までの膜貫通

ドメインを欠損させた Ste2(Ste2-TM1-5)を構築し、同様にβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した。

【結果と考察】

Fig.1 より、Ste2-Cub と Ste2-NubG を共発現させたときのみβ-ガラクトシダーゼ活性が確認された。また、Ste2 に Cub と NubG のどちらか一方のみを融合させたときは活性を示さなかったことから、Ste2 の二量体化(多量体化)を定量的に検出できたといえる。

さらに Fig.2 の変異解析の結果より Ste2-TM1-5 は二量体化し、Ste2-TM6-7 は二量体化しないことが確認された。TM1 と TM4 が Ste2 の二量体化に関与するという以前の報告と一致していることから本システムがドメイン解析に応用できることが示唆される。

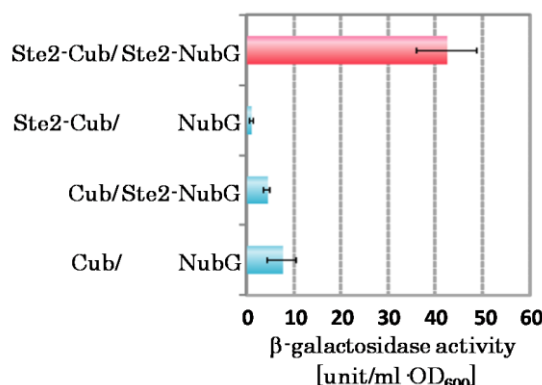


Fig.1 β-galactosidase activity assay

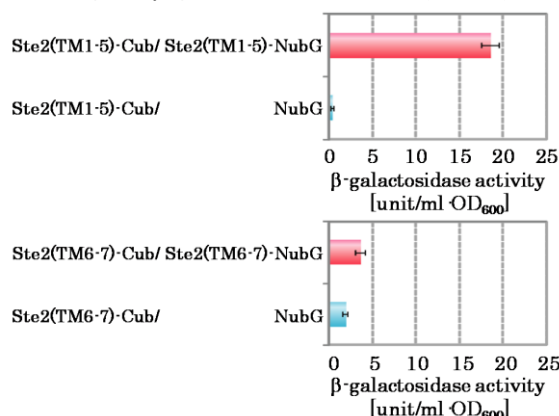


Fig.2 Mutational analysis for Ste2

【結言】

分割ユビキチン法を用いて GPCR の二量体化を簡便かつ定量的に検出できるシステムの確立に成功した。今後、ヒトなど様々な種類の GPCR にも適用可能か検討し、汎用性を高めることを目指す。

*TEL/FAX:078-803-6196

E-mail:akondo@kobe-u.ac.jp