

氏名 櫻井 貴志

Gタンパク質共役受容体（GPCR）は、酵母からヒトに至る真核生物に存在する7回膜貫通型受容体の一種である。GPCRは細胞外からの神経伝達や細胞増殖などの様々なシグナルを受容し、細胞内へ伝える役割を担っているため、多くの治療薬がこれを標的としている。現在も新薬候補となるリガンドの探索が精力的に行われているが、化合物ライブラリーと既存のリガンドアッセイ系を用いた探索では、新規構造を有する活性化合物を得ることが難しくなっている。この問題を解決するため、櫻井は液滴内で一種類の遺伝子型とそれに対応する表現型を共存させる手法を用いて、出芽酵母を利用したGPCRに作用するペプチドアゴニストの効率的な創出システムを開発した。

本論文は、7章より構成されている。第1章「序論」では、本研究の目的と背景、および概要が記載されている。櫻井が構築したペプチドアゴニスト創出システムの概要は図1のとおりである。第2章から第5章では、各ステップの要素技術の開発が記述されている。

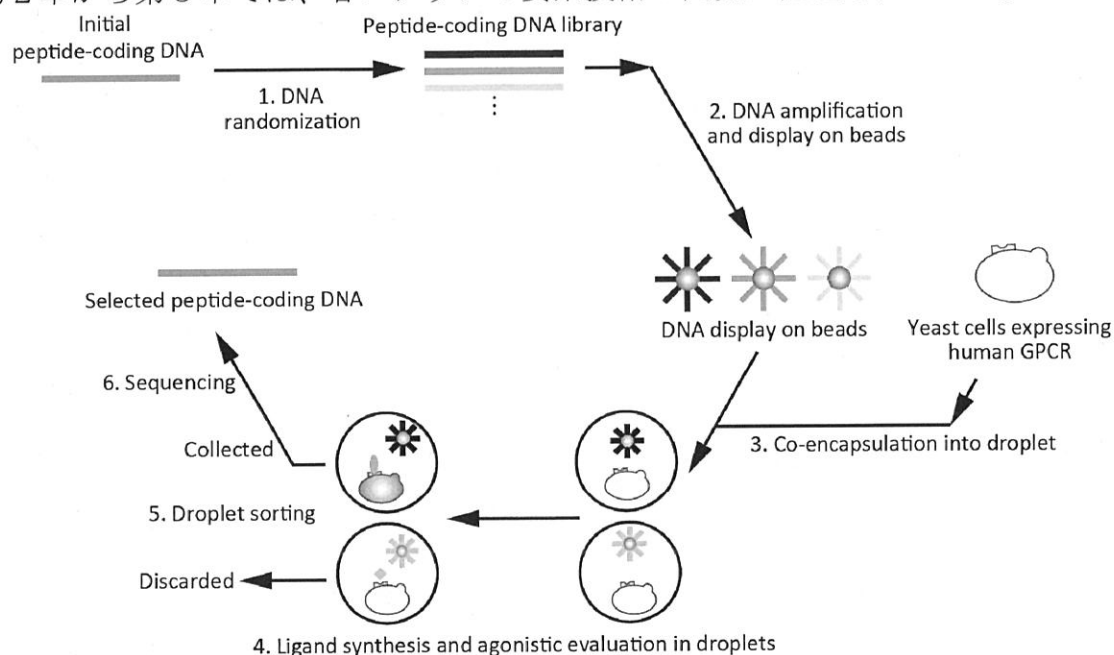


図1 ペプチドアゴニスト創出システムの概要

第2章「高速かつ均一な液滴作製システムの構築」では、マイクロ流体デバイスを用いたW/O（Water-in-Oil）型液滴の作製法について記述されている。本研究では液滴を作製し、その内部でPCR、リガンド合成・リガンドアッセイを行う。そのため、均一な大きさの液滴を作製する必要がある。液滴を作製する手法として、水溶液とオイル溶液を混合し遠心する方法が知られているが、この方法では均一な大きさの液滴を作製することは難しい。櫻井は、十字状の流路を持つマイクロ流体デバイスを用いてこの問題を解決した。流路の中央に水溶液を、その左右方向から4.5%（v/v）Span 80、0.45%（v/v）Tween 80、0.05%（v/v）Triton X-100を含むミネラルオイル溶液を空気圧によって一定速度で送液し、その合流部において水溶液を剪断応力により切り取ることで液滴を作製した。その結果、変動係数2%以下の均一な大きさの液滴を、1秒あたり $10^3 \sim 10^4$ 個の高速で作製することに成功した。

第3章「液滴 PCR を用いた DNA 提示ビーズの作製」では、液滴内 PCR を用いて一種類の DNA を増幅し、磁気ビーズに結合させる方法が述べられている。同一液滴内でリガンド合成とリガンドアッセイを行う際、リガンド応答に十分量のペプチド分子を液滴内で合成する必要がある。また、液滴を回収して DNA の配列を決定する際に、DNA 分子数が微量であると、PCR 反応によって増幅することが難しい。これらの問題を解決するためには、液滴内に封入する DNA の分子数を増やす必要がある。櫻井は磁気ビーズ表面に同一の DNA を多数固定し、この磁気ビーズをリガンド合成及びリガンドアッセイを行う液滴内に封入することにより、この問題を解決した。まず、ビーズに結合した DNA 量を定量するため、Cy5 標識したプライマーを用いて液滴内で PCR を行い、ビーズ表面に結合した DNA の Cy5 の蛍光強度を測定した。次に対照試料として、1 ビーズあたり 10^5 分子の蛍光 DNA が結合したビーズの蛍光強度を測定した。また、バックグラウンドとして、何も結合していないビーズの蛍光強度も測定した。これらの結果から、液滴内 PCR によってビーズ 1 個あたり、約 3×10^4 分子が結合していると見積もられた。液滴体積は 33 pL なので、液滴内に約 1.5 nM の DNA 分子が存在していることになる。液滴内では、1 分子の DNA から約 100 分子のリガンドが合成されることから、構築したシステムにおいては、約 150 nM のリガンドが液滴内において合成されると推定された。

第4章「同一液滴内リガンド合成・リガンドアッセイ系の構築」では、ヒト由来ソマトスタチン受容体を用いて、同一液滴内でリガンド合成し、さらにリガンドの活性をアッセイする方法について述べられている。櫻井は、ヒト由来の GPCR を発現する出芽酵母を用いてリガンド活性を評価した。出芽酵母には、一倍体世代と二倍体世代が存在し、一倍体世代には 2 種類の接合型、a 型及び α 型がある。一倍体世代の細胞は窒素源が枯渇していない環境においては、互いの細胞と接合することで二倍体世代に移行する性質を持つ。この際、互いの細胞を感知するために両細胞は性フェロモンである a 接合因子 (a-factor) あるいは α 接合因子 (α -factor) を発する。この性フェロモンの受容体が、出芽酵母に唯一存在する内在性 GPCR (a 型: Ste3、 α 型: Ste2) である。受容したシグナルは、G タンパク質を経由して細胞内の MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase) を経て、下流のシグナル伝達経路に伝わる。酵母細胞の内在性 GPCR をヒト標的 GPCR に置き換えると共に、酵母 G α タンパク質の C 末端側を、ヒト G α タンパク質の C 末端側に置換したキメラ G α タンパク質とすることにより、内在性のシグナル伝達経路を利用してリガンドアッセイを可能とした。また、酵母細胞の細胞内伝達経路の一部を遺伝子工学的に改変し、蛍光タンパク質をコードするレポーター遺伝子を組み込むことで、ヒト GPCR がリガンドを受容すると蛍光タンパク質が発現するようにした。モデルケースとして、ヒトのホルモンである Somatostatin (SST) 及びその受容体であるソマトスタチン受容体 (SSTR) に着目し、液滴内でのリガンド合成とリガンドアッセイが試みられた。W/O 液滴内に SSTR を発現した酵母と、SST をコードする DNA あるいは対照実験として内在性 GPCR (Ste2) のリガンドである α -factor をコードする DNA を提示したビーズをそれぞれ共封入した。その結果、SST 特異的に蛍光を検出することに成功した。

第5章「液滴回収と DNA 増幅」では、GPCR のアゴニスト活性を示した液滴の回収と、DNA の増幅と同定法が述べられている。櫻井は、蛍光を放つ酵母細胞と DNA 提示ビーズが共封入された液滴を、以下の 2 種類の方法を用いて回収した。一つ目は、液滴をマイクロ流路に次々に流し、液滴の散乱光と蛍光を検出し、蛍光を発する液滴のみに油圧を加えて弾き、回収する手法である。この方法では 10^5 程度の液滴から、蛍光を発する液滴を 10 秒で回収することが可能だった。もう一つは、ガラスベースディッシュに液滴を移した後、顕微鏡下で観察しながら、マイクロマニピュレータに接続したガラスキャピラリーを用いて標的となる液滴を個別に吸い上げる方法である。これらの手法によって回収した液滴から、遠心機を用いて DNA を PCR 溶液に抽出し、PCR 増幅した。この試料をシーケンス解析することによりペプチドアゴニストの配列を決定することに成功した。

第6章「構築した系の概念実証実験」では、ヒト SST と SSTR2 を用いて行った概念実証実験に

ついて述べられている。SST のアミノ酸残基のうち、GPCR との結合に重要であると報告されている 8-10 番目のアミノ酸配列をコードする遺伝子を NNS NNS NNS (N は A/T/G/C、S は C/G) とした DNA ライブラリー (3×10^4 種類) を作製した。そして、ライブラリー DNA に SST をコードする DNA を物質量比 1:0、100:1、1000:1 の割合になるように混合したものを試料とした。第 5 章までに開発した技術を用いて酵母と DNA を結合した磁気ビーズを含む約 10^5 個の液滴をソーティングした結果、数個の蛍光を発する酵母を回収することができた。このペプチドリガンドをコードする DNA 配列を調べたところ、いずれも SST の配列だった。このことから、GPCR に結合するリガンドを合成できる分子の割合を人工的に制御した条件において、構築したシステムが機能することが示された。しかし、SST をコードする DNA を意図的に加えない場合は蛍光を発する酵母を得られておらず、検査する規模が小さい点が今後の課題として残された。

第 7 章「総括および今後の展望」では、本研究の意義と今後の課題がまとめられている。

以上のように、櫻井は液滴内で一種類の遺伝子型とそれに対応する表現型を共存させる手法を用いて、出芽酵母を利用した、GPCR に作用するペプチドアゴニストの効率的な創出システムを開発し、GPCR に結合するリガンドを合成できる分子の割合を制御した条件においてシステム全体が機能することを示した。本システムを大規模なライブラリーに適用することにより GPCR に作用するペプチドアゴニストの開発に応用できると期待される。さらに、GPCR に対するアンタゴニストや GPCR 以外の受容体への応用も含め、広い発展性が期待される研究であり、創薬研究に貢献する内容である。よって本論文は博士(薬科学)の学位請求論文として合格と認められる。