

# 審査の結果の要旨

氏名 ベライ ゲセセ ベザベヘ

本論文は、全3章から構成されている。医薬品開発において解決すべき問題点は、生細胞を用いた発現系では、主な創薬ターゲットである膜タンパク質の生産が困難なことにある。その問題点を克服する手法として、近年無細胞タンパク質合成系が注目を浴びている。大腸菌の翻訳因子を精製し再構築した無細胞タンパク質合成系 PURE system は、制御が容易であり安定な生産系である。本論文では、ナノディスク、リポソームなどの人工脂質や界面活性剤を共存させた PURE system を用いて、リガンドに結合活性を持つケモカイン G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を合成し、合成した GPCR の機能と構造についての解析結果について述べている。

第一章では、研究対象としたヒトケモカイン GPCR である CX3CR1 および CCR5 について、HIV-AIDS、癌、喘息および心臓血管疾患などの疾病との関連を中心とした研究状況と創薬開発における重要性について概説している。また PURE system の開発の現状と、膜タンパク質の合成法としての利点について記述している。

第二章では、実験材料の調製と実験手法について記載している。

第三章では、GPCR の合成とその機能と構造の解析の結果を述べている。ヒトケモカイン GPCR である CX3CR1 と CCR5 を、脂質の存在下の PURE system によって合成した。ナノディスクの存在下および非存在下の PURE system で CX3CR1 を合成したところ、それぞれ  $1.3 \mu\text{M}$  および  $1.8 \mu\text{M}$  の生産性が、また CCR5 では  $0.24 \mu\text{M}$  および  $0.9 \mu\text{M}$  の生産性が示された。ナノディスクの存在下では、CX3CR1 および CCR5 についてそれぞれ 92% および 74% が可溶性、つまり大半のタンパク質がナノディスクに挿入した形で合成されていることが示された。ケモカイン受容体の生産性は、生化学的な解析に十分であり、生産性の今後の改善により構造決定も十分に可能であることが示された。

円偏光二色性 (CD) により合成した受容体の二次構造の形成を確認した。ナノディスクでは足場タンパク質が  $\alpha$ -ヘリックスに多く含むため、ミセルを共存させた PURE system で受容体を合成した試料を用いた。CX3CR1 および CCR5 の両方とも、208nm と 222nm の波長で最小値となる典型的な  $\alpha$ -ヘリックスタンパク質の特徴を示した。CD スペクトルから、CX3CR1 および CCR5 の  $\alpha$ -ヘリックス含量が、7回膜貫通 (7TM) タンパク質と一致する 40% および 49.5% であることが示された。

ナノディスクまたはミセルの存在下の PURE system により CX3CR1 を合成し、表面プラズモン共鳴 (SPR) を用いて、2つのアプローチでリガンドとの結合定数を決定した。His タグ化した CX3CR1 を抗 His 抗体で CM5 センサーチップ上への、固定したと

ころ 27.4nM の結合定数を得た。また、PURE system によって strep-II タグを含む CX3CR1 リガンド CX3CL1 を固定化し、結合定数を決定したところ 39.9nM の結合親和定数が得られた。以上の結果から PURE system によって合成された CX3CR1 が十分な生理活性を有することが示された。

CX3CR1 の脂質への挿入を検証するために、sfGFP と融合遺伝子を作製し、巨大リポソーム (GUV: Giant Unilamellar Vesicle) を共存させた PURE system によって合成した。リポソームへの局在を共焦点顕微鏡により分析したところ、CX3CR1 は膜上に局在することが示された。また、サイズ排除クロマトグラフィーによって調製した CX3CR1-ナノディスク複合体を、透過型電子顕微鏡を用いたネガティブ染色法により解析したところ、高い構造的均質性を有していることが示された。

以上の結果から、ケモカイン GPCR の無細胞タンパク質合成系 PURE system での合成法の有効性が示された。PURE system とナノディスク技術との組み合わせることで、リガンド結合活性などの機能が容易に解析できることが示され、さらに Cryo-EM などによる構造解明への可能性を開いた。本研究は、膜タンパク質の無細胞合成という新たな手法を開拓し、創薬において新たな重要な知見を与えるものであり、学位 (科学) を授与できると認める。

以上 1 8 2 0 字