

論文の内容の要旨

論文題目 G タンパク質共役受容体のペプチドアゴニスト創出システムの開発

氏 名 櫻井 貴志

【背景および目的】

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持つことから、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、同定されうる組み合わせは出尽くしたと言われている。そこで本研究では、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と、出芽酵母を利用したアッセイ系を組み合わせ、GPCR に作用するペプチドアゴニストの効率的な創生システム開発を目的とした。

【ペプチドアゴニスト創出システムの概要】

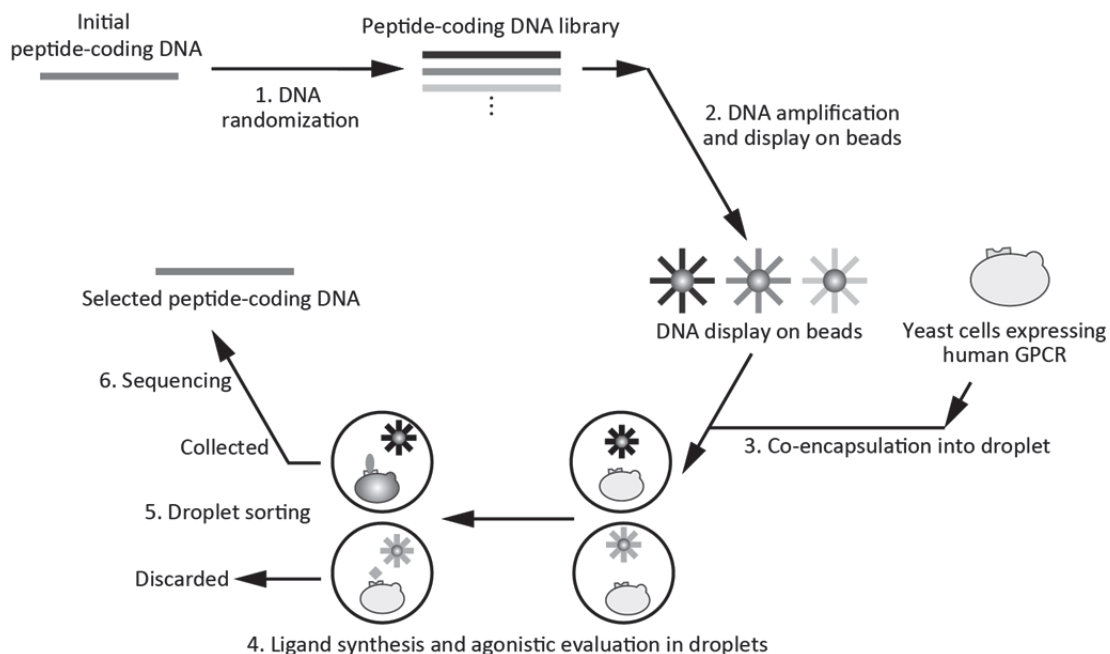


Fig. 1 ペプチドアゴニスト創生システム

本システムの概要を Fig. 1 に示す。まず、既存のペプチドリガンドをコードする DNA にランダムな変異を導入した DNA ライブラリーを作製する (1)。続いて、無細胞転写翻訳系によってペプ

チドリガンドに転写翻訳される際、十分な分子数を確保するため、マイクロ流体デバイスを用いて作製した液滴内でポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行い、ライブラリー各分子を別々に増幅する (2)。この際、一方のプライマーをビーズ表面に結合することで、同一種類の DNA を多数同一ビーズ表面に提示する。次に、標的とするヒト GPCR を発現する酵母細胞と DNA 提示ビーズ、及び再構成型無細胞転写翻訳系を、マイクロ流体デバイスを用いて同一液滴内に封入する (3)。この酵母は、唯一の内在性 GPCR である Ste2 下流のシグナル伝達系を遺伝子工学的に改変しており、リガンド添加に応じて細胞内情報伝達を経て蛍光タンパク質 (ZsGreen) を発現する。従って、他の GPCR へ結合することによって生じる偽陽性の問題を生じない。液滴内で無細胞転写翻訳され合成されたペプチドが標的 GPCR を作動させると、酵母が ZsGreen を発現し蛍光を放つ (4)。蛍光を放つ酵母細胞と DNA 提示ビーズが共封入される液滴を回収した後 (5)、PCR で増幅し、配列を決定することでリガンドの同定を行う (6)。

【要素技術の確立】

1. 高速かつ均一な Water-in-Oil (W/O) 液滴の作製

液滴内 PCR 及び液滴内リガンド合成・リガンドアッセイにおいて必要となる、均一な W/O 液滴を作製する系を構築した。液滴作製には十字状の流路を持つマイクロ流体デバイスを用いた (Fig. 2A)。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

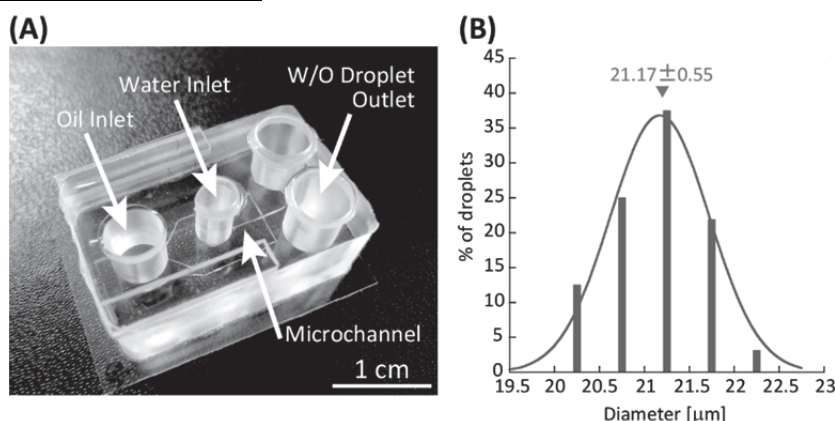


Fig. 2 マイクロ流体デバイスによる液滴作製系の評価

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、均一な液滴を作製できた (Fig. 2B, 変動係数 $\leq 2\%$)。また、送液圧力を制御することによって 1 秒あたり、 10^3 – 10^4 個の液滴が作製可能になった。

2. 液滴 PCR による DNA 増幅系の評価

リガンド合成・リガンドアッセイを同一液滴内で行うために必要十分な量の DNA を、液滴 PCR によって提示できることを、以下の方法で確認した。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 (Fig. 3, L)。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 (Fig. 3, A)。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 (Fig. 3, B)。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。このビーズを直径 40 μm の液滴に封入すると、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

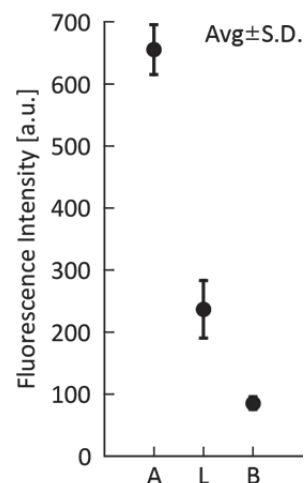


Fig. 3 液滴 PCR による DNA 増幅系の評価

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る。従って本システムでは、EC₅₀ が 100 nM 程度以下の比較的強いペプチドリガンドの取得が可能となる。

3. W/O 液滴内でのリガンド合成・リガンドアッセイ

溶液組成を検討することで、リガンド合成とリガンドアッセイを同一液滴内で実現した。W/O 液滴内にヒト Somatostatin receptor (SSTR) を発現した酵母と、そのリガンドである Somatostatin (SST) をコードする DNA (Fig. 4A) あるいは内在性 GPCR (Ste2) のリガンドである α -factor (AF) をコードする DNA (Fig. 4B) を提示したビーズをそれぞれ共封入し、それぞれの酵母細胞の応答を調べることで、リガンドアッセイ系の評価を行った。その結果、(B) の条件では、ビーズを含まない液滴内での酵母細胞と同程度の低い蛍光強度であったのに対し、(A) の条件では、その 10 倍以上の蛍光強度が観測された (Fig. 4C, 平均 \pm 標準偏差)。

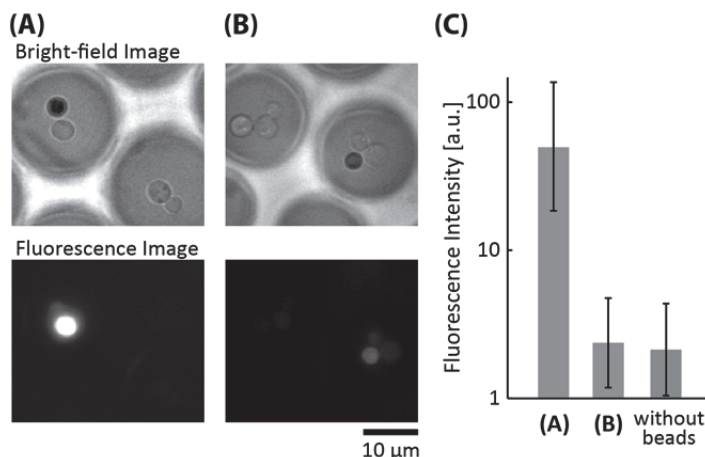


Fig. 4 W/O 液滴内でのリガンド合成・アッセイ系の評価

4. 液滴ソーティングデバイス及びマイクロマニピュレータを用いた標的となる液滴の回収

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。1 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。もう 1 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できた。

【構築したシステムの概念実証実験】

上記で構築した各要素技術を組み合わせて、構築したシステムの概念実証実験を試みた。この実験ではヒト SSTR2 を発現した酵母細胞を用いた。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に変異を入れた DNA と、SST をコードする DNA を物質質量比 1000 : 1 の割合になるように混合したものをライブラリーとした。その結果、SST をコードする DNA 配列のみを検出することができた。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。

【結論】

液滴内で 1 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生システムを開発し、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。今後は、本システムを用いることで、より大規模化されたライブラリーに対しても適用可能であることを示す。また、ペプチドアゴニストに対して構築した本システムを、ペプチドアンタゴニストに対しても適用可能である系に拡張することで、アゴニスト・アンタゴニスト両方のペプチドリガンド創出に貢献したい。