

# Engineering of silkworm-baculovirus expression system for efficient production of G protein-coupled receptors

陳, 建平

<https://hdl.handle.net/2324/1785439>

---

出版情報：九州大学, 2016, 博士（農学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）

氏 名 : 陳 建平

論文題名 : Engineering of silkworm-baculovirus expression system for efficient production of G protein-coupled receptors

(効率的な G タンパク質共役型受容体生産のためのバキュロウイルスタンパク質発現系の改良)

区 分 : 甲

## 論 文 内 容 の 要 旨

カイコ個体を用いたバキュロウイルス発現系は、高等真核生物由来の膜タンパク質の生産において最も優れた手法の1つとして知られている。特に、哺乳類細胞と同等の翻訳後修飾が起ることから膜結合型の糖タンパク質の生産等においても優位性があるとされている。現在、*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) とヨトウガ *Spodoptera frugiperda* の培養細胞を組み合わせた発現系と *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) とカイコガ個体及び培養細胞を組み合わせた系の2つが使用されているが、それでも十分な生産量が得られている膜タンパク質は少ない。

本研究では、膜タンパク質の中でも特に G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に着目し、カイコ由来の3種の GPCR とヒト由来の1種の GPCR の発現をカイコ-バキュロウイルス発現系を用いて行った。まず、神経ペプチドであるアラトスタチン C の受容体として知られるカイコ BNGR-A1 を単離し、同タンパク質を発現する組換えウイルスを作製したところ、出芽ウイルス (BV) の外皮膜に BNGR-A1 を産生することができた。そこで、同受容体と共役する G タンパク質の共発現による生産性の向上を試みた。G タンパク質は、 $\alpha\beta\gamma$  のヘテロ3量体から構成されるが、BNGR-A1 と共役する G タンパク質は同定されていない、そこで、カイコ  $G\alpha$  4種、 $G\beta$  3種、 $G\gamma$  1種を発現する組換えウイルスを作製し、総当たりの組み合わせで BNGR-A1 との共発現を行った。その結果、 $G\alpha_4\beta_3\gamma$  を共発現した場合、BNGR-A1 の BV での発現が向上することを明らかにした。

次いで、ショウジョウバエにおいて神経ペプチド CCHamide の受容体とされる GPCR のカイコホモログである BNGR-A15 の生産を行った。BNGR-A15 は、細胞膜局在型の BNGR-A1 と異なり、核膜や ER 膜に存在していた。そのため、細胞内画分に蓄積し、BV に提示される分子は少なかった。また、 $G12\beta_2\gamma$ 、 $Gf\beta_2\gamma$  and  $Gf\beta_3\gamma$  の共発現が、BNGR-A15 の細胞内生産効率の向上に有効であることを見出した。

最後に、ヒトホルモン受容体である  $\beta_2$  アドレナリン受容体 ( $\beta_2$ -AR) とそのカイコホモログであるオクトパミン受容体 (BmOAR2) の生産を行った。両 GPCR 型受容体は、細胞膜局在型受容体であったが、かなりの量のタンパク質が、細胞質内に蓄積していた。 $\beta_2$ -AR の場合、 $G\alpha\beta_3\gamma$ 、 $G\alpha\beta_5\gamma$ 、 $G\alpha\beta_5\gamma$ 、 $G12\beta\gamma$ 、 $Gf\beta\gamma$  など多様な組み合わせの G タンパク質の共発現が、 $\beta_2$ -AR の BV での発現に効果的であったが、BmOAR2 では、ほとんどの G タンパク質の共発現により生産量が減少した。

以上の結果より、高等真核生物由来の膜タンパク質 GPCR の生産にカイコ-バキュロウイルス発現系は有用であること、また、ヘテロな組み合わせであっても、G タンパク質の共発現が生産効率の向上に有効であることが明らかになった。