九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

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 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）
論文調査委員	主　査　九州大学　教授　日下部　宜宏 副　査　九州大学　教授　飯田　弘 副　査　九州大学　准教授　伴野　豊

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、組換えタンパク質発現の難易度が高いとされる高等真核生物由来の膜タンパク質、特に、Gタンパク質共役型受容体（GPCR）に着目し、カイコ-バキュロウイルス発現系を用いて大量生産を試みたものであり、宿主であるカイコ由来のGタンパク質と共発現することにより、GPCRが効率的に組換え出芽ウイルス（BV）の外皮膜に効率よく提示・生産可能であることを示したものである。

本研究では、まず、カイコ由来の３種のGPCR とヒト由来の１種のGPCRをクローニングし、カイコ-バキュロウイルス発現系を用いて生産した。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については、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、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目的に、カイコゲノム中に存在するGタンパク質遺伝子を解析した。Gタンパク質は、αβγのヘテロ３量体から構成されることが知られているが、BNGR-A1と共役するGタンパク質は不明であった。そこで、カイコ由来のGα４種、Gβ３種、Gγ１種をクローニングし、同タンパク質を発現する組換えウイルスを作製した。総当たりの組み合わせでBNGR-A1との共発現を行ったところ、$G\alpha_4\beta_3\gamma$ を共発現した場合、BNGR-A1のBVでの発現が向上することを見出した。

次に、ショウジョウバエの神経ペプチドCCHamide受容体のカイコホモログであるBNGR-A15をクローニングし、カイコ-バキュロウイルス発現系による生産を試みた。GFPとの融合タンパク質を用いた細胞内局在解析の結果、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。カイコ-バキュロウイルス発現系においても、細胞内画分に大量に蓄積し、BVに提示される分子は少ないことが明らかとなった。また、G12β2γ、Gfβ2γ、Gfβ3γとの共発現が、BNGR-A15の細胞内生産効率の向上に有効であることを明らかにした。

最後に、ヒトホルモン受容体であるβ2アドレナリン受容体（β2-AR）とそのカイコホモログであるオクトパミン受容体（BmOAR2）をクローニングし、カイコ-バキュロウイルス発現系を用いて生産した。両GPCR型受容体は、細胞膜局在型受容体であったが、比較的多量のタンパク質が細胞質内に蓄積していた。しかし、β2-ARのBVへの提示の場合、Goβ3γ、Goβ5γ、Gsβ5γ、G12βγ、Gfβγなどの多様な組み合わせのGタンパク質共発現が有効であった。一方、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することを明らかにした

以上要するに、本論文は、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が非常に有望であること、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を示したもので、昆虫ゲノム科学、特に昆虫を用いた有用膜タンパク質生産システムの改変とその基盤となる分子機構の理解に寄与する優れた業績である。よって、本論文は博士（農学）の学位に値すると認める。