

## 3-2-5 タンパク質の機能を観る

### -Gタンパク質共役受容体を対象として-

#### 概要

ヒトゲノムには約2万2千種のタンパク質の遺伝子がある。それぞれが色々な生理機能を担っているため、それぞれに特有な機能の観察方法があるはずである。本稿では、我々の研究室の主要なテーマであるGタンパク質共役受容体（G Protein-Coupled Receptors, GPCR）について、昆虫細胞を用いた大量発現法と GPCR-G $\alpha$ 融合タンパク質を用いた機能測定法について述べる。

#### 1. はじめに

Gタンパク質共役受容体(GPCR)は大きなファミリーをなし、ヒトでは 750 種ぐらいの GPCR 遺伝子がある。ヒトゲノム中での最大のスーパーファミリーである。750 種の約半分は匂いを感じる匂い受容体である。残り半分は、他の外来刺激（光、味物質、フェロモン）や内在性情報伝達因子（ホルモン、神経伝達物質など）を認識する受容体（レセプター）である[1]。GPCR が細胞外の刺激因子を認識するとは、非共有結合的に結合することである。細胞外刺激因子と結合した GPCR は、細胞内のGタンパク質と相互作用し、それを活性化させる。GPCR と G タンパク質 $\alpha$ サブユニットとの融合タンパク質を用いて、味物質、ホルモン、神経伝達物質などのセンサーとして使う試みについて述べる。また、代表的な GPCR の一つであるムスカリン性アセチルコリン受容体[2]を昆虫細胞を使って大量発現する方法についても述べる。

#### 2. Gタンパク質共役受容体（GPCR）とGタンパク質の基本的な性質

##### 2. 1 膜タンパク質としての GPCR

GPCR は細胞膜を貫通するタンパク質で、細胞の外側にも内側にも顔を出している。普通の GPCR はアミノ酸が 400-700 個ぐらいつなげた大きさで、分子量が 4 万から 7 万ぐらいである。一方の端（アミノ末端、N 末端）は細胞の外側にあり、他方の端（カルボキシ末端、C 末端）は細胞の内側にある。GPCR は細胞膜を横切る部分が 7 ヶ所あるのが特徴で、細胞膜 7 回貫通タンパク質とも呼ばれる（図 1 上部、淡青色）。

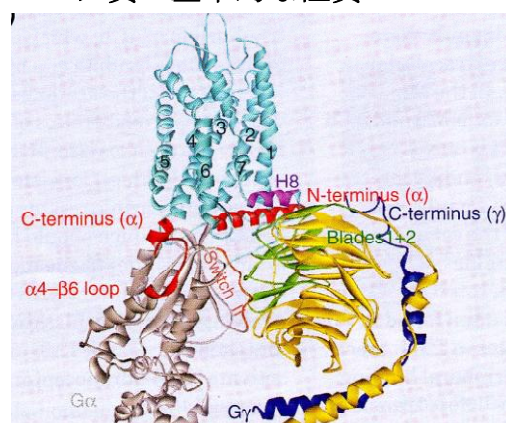


図1:GPCR-G $\alpha\beta\gamma$ の立体構造

細胞の外側にあるホルモン、神経伝達物質は大体小さな分子で、GPCR の外側と細胞膜貫通部分に結合する。いわゆる鍵と鍵穴の関係で、特定のアゴニスト（作動薬：ホルモンや伝

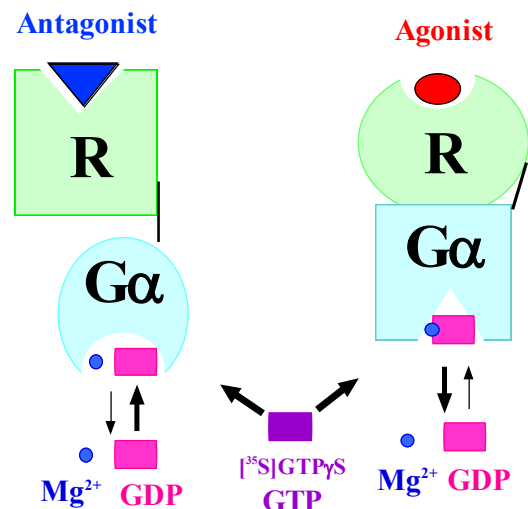
達物質あるいはそれと同じ機能を持つ化合物) と特定の受容体が構造的にピッタリあうようになっている。リガンドが結合した受容体はその立体構造が変化して、細胞の内側にあるGタンパク質に作用して、それを活性化する。

## 2. 2 Gタンパク質 (GTP 結合制御タンパク質)

Gタンパク質は $\alpha\beta\gamma$  3量体からなり、 $\alpha$ サブユニットがGTP結合タンパク質である(図1下部左、茶色)。細胞の内側に存在し、 $\beta\gamma$ サブユニット(図1下部右、黄色と濃い青色)に結合した脂質で細胞膜に繋がっている。通常は $\alpha$ サブユニットにGDPが結合し、 $\alpha_{GDP}\beta\gamma$  3量体として存在する。アゴニストと結合した受容体は $\alpha_{GDP}\beta\gamma$  3量体に作用して、GDPの放出を促進する。GDPが放出されたあとにGTPが結合するが、GTPが結合すると3量体は $\alpha_{GTP}$ と $\beta\gamma$ サブユニットに解離する。解離した $\alpha_{GTP}$ と $\beta\gamma$ サブユニットは、その種類によって細胞内のアデニル酸シクラーゼやホスホリパーゼCなどを活性化し、サイクリックAMP(cAMP)、イノシトール3リン酸(IP3)、ジアシルグリセロール(DG)など細胞内2次メッセンジャーの生成を促進する。以上の過程によって、細胞外にホルモンなどが存在するという情報が細胞内に2次メッセンジャーが存在するという情報に変換される。

## 2. 3 GPCR-G $\alpha$ 融合タンパク質

GPCRの遺伝子とGタンパク質 $\alpha$ サブユニットの遺伝子を繋げたものを培養細胞に感染させると、GPCRのC末端とGタンパク質 $\alpha$ サブユニットのN末端が接続したGPCR-G $\alpha$ 融合タンパク質が培養細胞の細胞膜に発現する。この細胞膜の断片にGPCRアゴニストを加えると、活性化された受容体がG $\alpha$ に作用してGDPへの親和性を低下させる。この時、GTPの代わりに $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ を加えておくと、アゴニストの存在下で $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ の結合の促進が観察される。このような、アゴニスト依存性 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合の測定によって、アゴニストの存在を簡単に検知できる(図2参照)[3,4]。



GPCRの種類を替えれば、色々な化合物のセンサーとして使えることが期待される。基本的な実験は 図2 : GPCR-G $\alpha$ の模式図 スカリン性アセチルコリン受容体 M2 サブタイプとGタンパク質 $\alpha_{i2}$ との融合タンパク質を用いて行なった[5]。

この系はオーファン受容体の内在性リガンドの検索にも使用可能である。オーファン受容体というのはアゴニストが分かっていない受容体で、匂い受容体の多くはリガンド不明であり、匂い受容体以外の受容体でも100種以上の受容体のリガンドが分かっていない。我々は以前にこの融合タンパク質を使う方法で、いくつかの内在性リガンドと代替アゴニスト

(surrogate agonist)を同定した[6-8]。現在は、苦味受容体と苦味の関係を明らかにする試みを行っている。

### 3. Sf9/Baculovirus を用いた M2 受容体の大量発現系

創薬などの目的でリガンドを検索するときには、大量の受容体試料が必要になる。GPCR の大量発現系として多く使われているのは、昆虫細胞 (Sf9 など)・バキュロウイルス系である。GPCR のモデルとしてムスカリン性アセチルコリン受容体 M2 サブタイプ (以下 M2 受容体) の変異体を選び、高発現系を構築した。大量発現した M2 受容体は結晶化・X線構造解析という目的に使用している。M2 受容体で確立された発現系は、GPCR-G $\alpha$  融合タンパク質の発現系としても利用している。実験の詳細を具体的に記述した。

#### 3. 1 M2 受容体変異体

M2 受容体の N 末糖鎖結合部位の Asn を Asp へ変換し、細胞内第三ループの大部分を欠失した変異体を Sf9 (夜盗蛾卵巣組織由来細胞)/バキュロウイルス系で大量発現させた。糖鎖は不均一性の原因になるため削除したが、ムスカリン受容体の機能に影響がないことが分かっている。ムスカリン受容体の細胞内第 3 ループは長く、フレキシブルで固定した構造を取らず[9]、G タンパク質共役受容体キナーゼによりリン酸化される部位で、受容体の制御機構の一つである細胞内移行やリサイクリングに関わっている[10]。プロテアーゼ処理を受けやすいため削除したが、リガンド結合や G タンパク質の活性化には関係ないことが分かっている。

#### 3. 2 実験材料及び機器

Sf9 細胞使用培地

- ・ IPL41 粉末 (JRH biosciences) ・ 4.2mM NaHCO<sub>3</sub> ・ 4.5mM CaCl<sub>2</sub> 無水 ・ 2.6g/L Tryptose
- ・ Phosphate Broth ・ 2.6g/L TC-yeastolate ・ Fetal Calf Serum ・ 0.5g/L pluronic F-68
- ・ ペニシリン G カリウム 5 万単位/L ・ 硫酸ストレプトマイシン 50mg/L
- ・ Sf900 II (Gibco)

細胞回収用 Buffer

- ・ Phosphate Buffered Saline (PBS) + Protease Inhibitors (2.5  $\mu$ g/ml Pepstatin, 0.5mM PMSF, 5  $\mu$ g/ml Leupeptin, 5mM Benzamidin)

培養装置

セルマスター (容量 7L 及び容量 8L) : 温度、溶存酸素 (DO) を自動制御

### 3. 3 培養方法

#### 3. 3. 1 凍結 Sf9 細胞の融解

- 1) Sf9 の凍結保存チューブを液体窒素のタンクから出す。
- 2) 細胞溶液が溶けたら素早く 25cm<sup>2</sup> Dish (IPL41 3.2 ml 入り) に移す。
- 3) よく攪拌して 27°C で 30 分保温。

- 4) 25cm<sup>2</sup> Dish から培地を全部吸い取り、IPL41 5ml を入れて優しく揺する。
- 5) 再び培地を吸い取り、IPL41 を 5ml 入れる。
- 6) 27°C で 2-3 日インキュベート。

### 3. 3. 2 25cm<sup>2</sup> dish からセルマスターへの培養

- 1) Frozen Cells 由来の 25cm<sup>2</sup> dish (80-100% confluent, 全量 5ml) の細胞をはがす。
- 2) 25cm<sup>2</sup> dish 4 枚に移し、各々全量 5ml にする。培養温度 27°C、4 日間培養する。
- 3) 25cm<sup>2</sup> dish 1 枚を 25cm<sup>2</sup> dish 継代ラインへ、他の 1 枚を 150ml 継代ラインへ移す。残り 2 枚を 75cm<sup>2</sup> dish 4 枚に移し (各々全量 12ml)、4 日間培養する。
- 4) 75cm<sup>2</sup> dish (80-100% confluent, 全量 12ml) 4 枚の細胞を 250ml スピナーフラスコ 2 個に移し、Sf900 II を 30% 加えた培地で各々 100ml にする。培養温度 27°C、攪拌速度 70rpm で 4 日間培養する。
- 5) 糖濃度 (およそ 200 mg/dl)、細胞数 (およそ 2-3 × 10<sup>6</sup> cells/ml) を確認し、1L スピナーフラスコ 2 個に移す。Sf900 II を 30% 加えた培地で全量 400ml にする。培養温度 27°C、攪拌速度 60rpm で、2 日間培養する。
- 6) 糖濃度、細胞数 (およそ 2-3 × 10<sup>6</sup> cells/ml) を確認し、セルマスターへ移す。  
7L (8L) 容量のセルマスターの場合：Sf900 II を 30% 加えた培地を 6L (7L)、1L スピナーフラスコ 2 個の細胞溶液 800ml (1L) を加え、全量約 7L (8L) にして培養を開始。
- 7) 培養条件は温度 28°C、攪拌速度 40rpm とする。酸素供給バルブ (セルマスターの目盛で 200) と空気供給バルブ (セルマスターの目盛で 0.3) を開け、溶存酸素値 (DO) が 7.5-8.0 になるように調節する。
- 8) 攪拌 5 分後にサンプリングを行う。
- 9) 培養開始 2~3 日後に DO が下がり始めるので酸素供給量を上げ (酸素富化装置の目盛で 0.5 にする)、空気供給量を下げる (セルマスターの目盛で 0.2 にする)。
- 10) 4 日間培養後、酸素供給量を下げ (セルマスターの目盛で 200)、空気供給量を上げる (セルマスターの目盛で 0.3)。以下に供給量の例を示す。

例 1

Date/Time	DO (ppm)	Air (ml/min)	O <sub>2</sub>
061211/pm1:30	1.41	100	300 (1.0)
070219/pm1:10	3.82	100	300 (0.8)

表中の O<sub>2</sub> の見方は左側の数値がセルマスターの値。右側の括弧内の数値が酸素富化装置の目盛。

### 3. 3. 3 ウイルス感染と Harvest

- 1) セルマスターで 4 日間培養後、溶存酸素 (DO)、糖濃度、細胞数を測定する。細胞数が 4-6 × 10<sup>6</sup> cells/ml であれば、virus の infection をおこなう。4 × 10<sup>6</sup> cells/ml 未満では翌日以降も同測定を繰り返し、目的の細胞数に達するまで培養を続ける。7 × 10<sup>6</sup>

cells/ml 以上の増殖が認められた場合は、細胞溶液を適宜廃棄し、目的の細胞数になるよう調整する。これはウイルス感染の M.O.I (multiplicity of infection) を 5-10 にするためである。

- 2) Infection: 7L(8L)容量のセルマスターの場合は virus 培養液 600ml(800 ML)を使用する。ウイルス感染時の急激な酸素の消費に対応できるように酸素供給量を上げる(酸素供給バルブ全開・最高値は 1.4、空気供給バルブ 0.1 とする)。
- 3) infection 翌日、酸素富化装置の Air、O<sub>2</sub>を調整する。

例 1(細胞回収日 4/16)

Date/Time	DO(ppm)	Air(ml/min)	O <sub>2</sub>
030415/am11:05	7.82	150	300(1.0)
030415/pm1:10	7.73	200	300(0.8)
030415/pm3:15	7.66	200	300(0.75)
030415/pm6:12	7.60	200	300(0.6)

- 4) Harvest
  - (1) Infection43 時間後、サンプリング。日付け、時間、糖濃度(そのまま測定)、細胞数(1/5 希釈で測定)以外に DO、O<sub>2</sub>供給量、air 供給量を記録する。細胞数は生存しているものだけを数える。
  - (2) 遠心管 6 本で遠心。5000rpm, 18 分, 4°C。ペレットの入った遠心管は cold room に置いておく。
  - (3) ペレットを、冷えた PBS+プロテアーゼ・インヒビターで良く懸濁。遠心管を逆さまにして、良くまぜてから遠心 5000rpm, 18 分, 4°C。上清を捨てる。
  - (4) 冷えた PBS 350 ml + protease inhibitor cocktail 1ml で沈殿を懸濁。全量をメスシリンダーで計測後、50ml Falcon tube に分注後液体窒素で瞬間凍結し、-80°C freezer に保存。一部 0.5-1 ml をミニバイアルに保存し、収量測定用とする。

#### 5) 収量

1L の培養で 1-2mg の受容体が発現する。一週間に一度 7L また 8L の培養を行うと、一ヶ月で 30-60mg の受容体が発現する。収率 50%程度で可溶化・精製すると、一ヶ月に 15-30mg の受容体が得られる。

### 3. 3. 4 ウイルスの調製

#### 1) プラークアッセイ

- (1) 60mm dish に  $2 \times 10^6$  cells/dish になるように細胞をまく。Total volume は 2-4ml にする。incubate, 27°C
- (2) 小さめのビンに水 12ml と SeaPlaque (低融点アガロース) 0.45g を入れて Autoclave。Autoclave が終わったら乾燥機の中に入れて固まらないようにしておく。
- (3) 別の tube に IPL41(30% Sf900II 含む)を 18ml とる。

- (4) Virus の希釈系列を滅菌済みのエッペン tube に作成する。Virus は  $10^{-4}$ - $10^{-8}$  までの希釈系列をそれぞれ、1ml 以上作る。IPL41 を使って希釈する。
  - (5) 60mm dish にまいた細胞がはり付いたのを確認したら、パスツールピペットで培地をきれいに抜き、希釈した virus を 1ml ゆっくりと流し込んで infection する。
  - (6) incubate, 27°C, 1 hour。15 分おきに dish をゆする。
  - (7) その間に、autoclave した SeaPlaque と IPL41 (30% Sf900II 含む) 18ml を water bath で 37°C に incubate しておく。
  - (8) infection 終了後、パスツールピペットで virus をきれいに抜く。すぐに autoclave した SeaPlaque と IPL41 (30% Sf900II 含む) をクリーンベンチで混ぜる。このときのゲルの最終濃度は 1.5% である。
  - (9) オートピペッターを使い、ゲルを 4ml ずつ流し込む。この時、ゲルが熱すぎると細胞の調子が悪くなったり、死んだりしてしまうので注意。かといって冷ましすぎるとゲルが固まる。
  - (10) 15-20 min クリーンベンチ内でゲルを固まらせる。ゲルが固まったら、IPL41 を 500  $\mu$ l のせる。incubate, 27°C, 3-7 日
  - (11) plaque が 10~100 個あるプレートを選び、plaque を数える。例えば  $10^{-6}$  のプレートに 30 個の plaque があつたらその virus の titer 効率は  $30 \times 10^6 = 3 \times 10^7$  pfu/ml ということになる (pfu= plaque forming unit)。
- 2) ウイルス DNA の確認
- (1) 25cm dish (confluent) を作成しておく。プラークをパスツールピペットでつつき、dish 内の培地で洗う (infection)。27°C、96hr インキュベート後上清を回収する。ウイルスはおよそ 5ml 回収できるが、その内の 20  $\mu$ l を無血清の培地 100  $\mu$ l に加えて 1hr、4°C で攪拌する。
  - (2) 各チューブ用に 350  $\mu$ l の水および 50  $\mu$ l の 10 x Proteinase K バッファー (100mM トリス、50mM EDTA、5% SDS) のミックスを準備する。
  - (3) ウィルス溶液 120  $\mu$ l に 400  $\mu$ l の 10 x Proteinase K バッファーと 50  $\mu$ g Proteinase K を加えてよく混合して、56°C で 1h 温める。
  - (4) 反応後に、等量のクロロホルムとフェノールを混ぜたものを等量加えて攪拌し、1600G  $\times$  3min の遠心後、水溶液の上清を抽出する。次に等量のクロロホルムを加えて攪拌し、1600G  $\times$  3min の遠心後、水溶液の上清を各チューブに抽出する。
  - (5) 3M の酢酸ナトリウム (pH 5.2) の各チューブ 50  $\mu$ l およびエタノール 1ml を加え、よく混合し、-20°C で 20 分エタ沈を行う。
  - (6) その後 15000G  $\times$  10min で遠心分離を行い、表面に浮かぶものを廃棄する。70% のエタノール 500  $\mu$ l によってペレットを 1 度洗い、15000G  $\times$  3min 遠心後、乾燥する。100  $\mu$ l TE 中のペレットで溶かし、この溶液 5  $\mu$ l を PCR に使用する。

(7) PCR 溶液準備を行う。

MasterMixSol	
10×Buffer	55 $\mu$ l
2mM dNTPs	55 $\mu$ l
2.5mM MgSO <sub>4</sub>	22 $\mu$ l
F Primer(100pmol/ $\mu$ l)	1.65 $\mu$ l
R Primer(100pmol/ $\mu$ l)	1.65 $\mu$ l
KOD-Plus	11 $\mu$ l
d dH <sub>2</sub> O	403.7 $\mu$ l
合計	550 $\mu$ l

(8) この MasterMixSol を 45  $\mu$  l ずつ 10 本の PCR チューブに分注する。ここに (7) で回収した DNA 溶液をそれぞれ 5  $\mu$  l ずつ加え、穏やかに攪拌する。

(9) 以下の条件で PCR を行う。94°C 5min, (94°C 20sec/55°C 5sec/68°C 1min) x 30 cycle, 4°C

(10) PCR 反応後、溶液を回収し、10  $\mu$  l を 2×Loading buffer 10  $\mu$  l と混ぜる。1% アガロースゲルを用意して 100V でアガロース電気泳動を行う。分子量標準は  $\lambda$  HindIII マーカーを使用。

### 3) ウイルス DNA の調製

(1) 25cm<sup>2</sup>dish に 3×10<sup>6</sup>cells/ml の細胞をまき、27°C で約 30 分インキュベートする。培地全量 5ml 準備しておく。

(2) 4-5 日経過したプラークを 20  $\mu$  l 吸い上げ、dish に入れ懸濁する。27°C で 96 時間インキュベートする。

(3) 上清を回収し、4°C で冷暗保存する。ウイルスはおよそ 5ml 回収できる。

### 4) ウイルスの増殖(1)

(1) 75cm<sup>2</sup> dish x 5 枚に 1 x 10<sup>7</sup> cells/ml の細胞をまき、27°C で 30 分 incubate する。培地全量(IPL 4l)をおのおの 2ml 用意しておく。

(2) 3) -(3) で保存したウイルスを 500  $\mu$  l ずつ infection し、27°C で 96 時間 incubate する。

(3) 上清を回収し、4°C で冷暗所保存する。ウイルスはおよそ 60ml (12ml x5)回収できる。

### 5) ウイルスの増殖(2) (1 L 培養)

(1) あらかじめ 1L の細胞溶液を準備しておく。

(2) 増幅させたウイルスを 30ml infection し、27°C で 96 時間インキュベートする。この時、窒素と酸素の混合気体を細胞溶液に吹き付ける。

(3) 窒素ボンベを open にして窒素を出す。目盛 30 になるように。

(4) ④のスイッチを入れる。④のメーターを見ながら⑤を調節 0.5 になるように。

(5) virus 用インキュベーター内で、スピナーと青いテープの貼ってあるコードを接続。コ

ードのバルブは全開にする。スピナーの液面に Air が出てくることを確認する。スピナーの回転速度は 60-65rpm。

(6) 96hr 後糖濃度を測定し、上清を回収し、濾過滅菌しながらウイルス専用瓶につめる。ウイルスはおよそ 1L 回収できる。これを「元ウイルス」として使用していく。

6) ウイルスの増殖 (3) (セルマスターでの培養)

(1) セルマスターの infection 時に「元ウイルス」より 300-400ml infection する。

(2) 48 時間後の Harvest で、遠心後の上清を濾過滅菌しながらウイルス専用瓶に回収し、4°C で冷暗保存する。この時は Harvest で細胞とウイルスも同時に回収することになる。

(3) 以後の infection 時には、セルマスターより回収したウイルスから使用していく。使い切った時は、同様のステップを踏んでセルマスターから回収する。

## 4. GPCR-G $\alpha$ 融合タンパク質の調製と活性測定

### 4. 1 GPCR-G $\alpha$ 発現膜タンパク質の調製

GPCR の C 末端と G タンパク質  $\alpha$  サブユニットの N 末端が直接結合するような遺伝子を作る。具体的には、GPCR の PCR、G $\alpha$  の PCR、GPCR-G $\alpha$  の PCR という 3 段階の PCR を行う。この際、GPCR の C 末と G $\alpha$  の N 末に対応する塩基配列を繋げたプライマーを使うことで、GPCR と G $\alpha$  を接続させる。

3 で述べた M2 受容体の場合と同様に、Sf9/バキュロウイルス系を使って融合タンパク質を発現させる。

### 4. 2 GPCR-G $\alpha$ の活性測定

GPCR-G $\alpha$  を発現する Sf9 粗細胞膜標品を調製する。アゴニスト有無の条件で、種々の濃度の GDP 存在下に一定濃度の [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S (1-50 nM) と GPCR-G $\alpha$  を発現する Sf9 粗細胞膜標品 (タンパク質量として 0.02 mg 程度) を反応させる (通常は 30°C で 10-60 分、反応液 0.1ml)。反応液をガラス繊維濾紙に通すと、細胞膜上の GPCR-G $\alpha$  に結合した [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S が濾紙に回収される。濾紙を液体シンチレーションカウンターにかけて、結合 [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S 量を測定する。横軸に GDP 濃度、縦軸に結合 [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S 量をプロットすると、右下がりの曲線となる (図 3) からである。この阻害曲線をアゴニスト有無で比べると、アゴニストがある時に阻害曲線が右側にずれるのが観察される。アゴニスト存在下で受容体が G $\alpha$  に作用して GDP への親和性を低下させるからである。図 3 は M2 受容体と G タンパク質 Gi1 $\alpha$  の融合タンパク

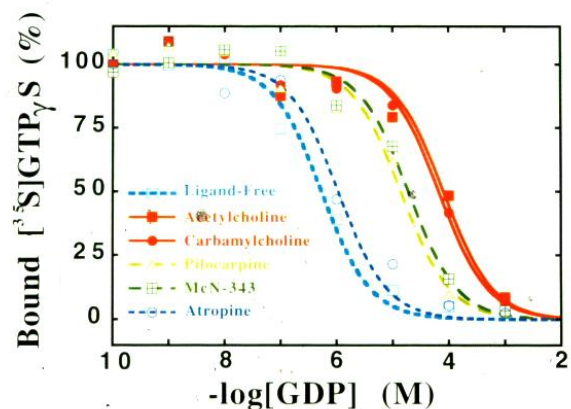


図 3 : M2-Gi 融合タンパク質の [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S 結合



質への [<sup>35</sup>S]GTPγS の結合をフルアゴニスト (Acetylcholine, Carbamylcholine)、部分アゴニスト (Pilocarpine, McN-343)、アンタゴニスト (Atropine) 存在下で調べたものである [5]。フルアゴニスト存在下で GDP への親和性が最も低く、アンタゴニスト存在下またはリガンドフリーで GDP への親和性が最も高く、部分アゴニスト存在下で中間の親和性を示すことが分かる ([<sup>35</sup>S]GTPγS への親和性はリガンドの有無で変わらない)。一定濃度の GDP 存在下にアゴニスト濃度を変えて実験を行えば、アゴニストの用量・作用曲線を得ることができる。

#### 4. 3 GPCR-Gα の応用可能性と限界

GPCR-Gα の活性測定は簡便なので、種々の応用が期待される。

一つは薬剤の探索である。SF9 膜を使えば受容体の発現量が多いので、何万種という化合物検索も簡便に行うことが可能である。GPCR は現在の臨床薬 30-60% の標的と言われている。親和性の高いリガンドが見つければ、薬物として利用できる可能性がある。

GPCR のうち 100 種ぐらいはオーファン受容体にとどまっている。匂い受容体や苦味受容体などもリガンドが分かっていないものが多い。GPCR-Gα 融合タンパク質はオーファン受容体のリガンド同定に利用できる。我々は、ゲノム検索から見いだされた hGPCR48 の融合タンパク質を利用して、そのリガンドを走化性因子 5-oxo-Eicosatetraenoic acid と同定した [7]。また、内在性リガンドではないが、アゴニスト活性を持つ化合物を数種の GPCR-Gα 融合タンパク質について同定した [6]。

3 番目の利用可能性は、ホルモンや匂いなどのセンサーとして利用する方法である。タンパク質は室温では安定とはいえないので、利用条件に制約があるが、これからの進展が期待される分野である。

一方、GPCR-Gα の限界もある。この方法は、最初 G<sub>s</sub> 型の G タンパク質と共役する受容体で報告された。G<sub>i</sub> 型の G タンパク質と共役するムスカリン性アセチルコリン受容体 M2 サブタイプや M4 サブタイプ、ノシセプチン受容体などでもうまく測定される。しかし、G<sub>q</sub> 型の G タンパク質と共役する受容体ではうまく測定できない。また、匂い受容体などは通常の培養細胞に発現しにくいという問題がある。これらの理由は現在明らかではなく、GPCR の基本的な性質についても解明すべきことが多いことを示している。

#### 5. 参考文献

1. Takeda, S., Kadowaki, S., Haga, T., Takaesu, H., and Mitaku, S. Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett.* 520: 97-101 (2002)
2. Ichiyama, S., and Haga, T., Muscarinic acetylcholine receptor. In: *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, ed. by Mikoshiba, K., Springer Publishers, New York, 2008, p417-439.
3. Haga, T., Suga, H., and Takeda, S. Screening of ligand for human GPCRs by the use of receptor-Galpa fusion proteins. In: *G protein-coupled receptors: structure, function, and ligand screening*, ed. by Haga, T., and Takeda, S. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2006, p37-66.

4. Suga, H., and Haga, T., Ligand screening system using fusion proteins of G protein-coupled receptors with G protein  $\alpha$  subunits, *Neurochemistry International*, 51: 140-164 (2007)
5. Zhang, Q., Okamura, M., Guo, Z-D., Niwa, S., and Haga, T. Effects of partial agonists and  $Mg^{2+}$  ions on the interaction of M2 muscarinic acetylcholine receptors and G protein Galpha-i1 subunit in the M2-Galphi-i1 fusion protein. *J. Biochem.* 135: 589-596 (2004)
6. Takeda, S., Okada, T., Okamura, N., Haga, T., Isoyama-Tanaka, J., Kuwahara, H., Minamino, N. The receptor-G  $\alpha$  fusion protein as a tool for ligand screening: a model study using nociceptin receptor-G  $\alpha_{12}$  fusion protein. *J. Biochem.*, 135: 597-604 (2004)
7. Takeda, S., Yamamoto, A., Okada, T., Matsumura, E., Nose, E., Kogre, K., Kojima, S., and Haga, T. *Life Sci.*, Identification of surrogate ligands for orphan G protein-coupled receptors. *Life Sci.* 74: 367-377 (2003)
8. Takeda, S., Yamamoto, A., and Haga, T. Identification of a G protein-coupled receptor for 5-oxo-eicosatetraenoic acid. *Biomed. Res.*, 23, 101-108 (2002)
9. Ichiyama, S., Oka, Y., Haga, K., Kojima, S., Tateichi, Y., Shirakawa, M., and Haga, T. The structure of the third intracellular loop of the muscarinic acetylcholine receptor M<sub>2</sub> subtype, *FEBS Letters*, 580: 23-26 (2006)
10. Hashimoto, Y., Morisawa, K., Saito, H., Jojima, E., Yoshida, N., and Haga, T. Muscarinic M4 receptor recycling requires a motif in the third intracellular loop. *J. Pharmacol. Exp. Therapeu.*, 325:947-953 (2008)