

氏名（本籍）	廣實 慶彦		
学位の種類	博士（理学）		
学位記番号	博 甲 第 10031 号		
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査学術院	理工情報生命学術院		
学位論文題目	Development and Application of Biochemical Characterization Methods for Protein Structure Analysis (タンパク質構造解析のための生化学的解析方法の開発と応用)		
主査	筑波大学教授	学術博士	橋本 哲男
副査	筑波大学助教	博士（理学）	石川 香
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	原田 隆平
副査	筑波大学教授（連携大学院）	博士（医学）	永宗 喜三郎

論 文 の 要 旨

Gタンパク質共役受容体 (G protein-coupled receptor, GPCR) およびプロテインキナーゼは生体内におけるシグナル伝達に極めて重要な役割を担うタンパク質ファミリーであり、創薬ターゲットとしても極めて重要である。本論文の著者は、生化学的解析と構造生物学的解析を組み合わせることで、GPCRおよびプロテインキナーゼファミリーから新たな構造学的知見を得ることに成功した。さらにその知見をファミリー内で比較解析することにより、ファミリーの分子進化に関する示唆を与えた。

第1章において著者は、ヒトのGPCRの一種であるGPR40 (Free fatty acid receptor 40) について、熱安定化変異体を探索するアッセイ系を確立し、タンパク質結晶構造解析に供するタンパク質の調製を試みた実験の成果およびGPR40を含むGPCRにおける熱安定性変異の比較解析を行った成果について述べている。著者は、ヒトGPR40のcDNAをクローニングし、1アミノ酸を置換させた変異体を270種類作成し、GPR40を含む細胞膜小胞をウイルス様粒子として調製した。これらのタンパク質に対しAffinity selection mass spectrometry法を用い、GPR40 作動薬であるTAK-875 との親和性を評価した。野生型配列のGPR40タンパク質が熱変性を起こしてリガンドとの親和性が50%低下する反応温度を見出し、その条件下において変異型GPR40のTAK-875 に対する親和性を評価することで熱安定化変異体を取得した。その結果、12種類の変異体において野生型より熱安定性が向上していることが確認された。それらの変異体のうちの4か所の変異を同時に導入することで、著者は、リガンドの親和性を保持した状態で熱安定性がさらに向上した変異体を調製した。さらに、その変異体を大量調製し、GPR40-TAK-875 共結晶構造解析を成功させた。一方、著者は、GPR40を含め熱安定化変異体が報告されている28種類のGPCRのアミノ酸配列をアライメントした後に系統解析を行い、GPCRの安定性に寄与するアミノ酸座位が、進化的に近縁なGPCR同士では保存される傾向にあることを示唆した。

第2章において著者は、ATPという同一の基質を認識する触媒領域を有するため、そのアミノ酸配列およびタンパク質構造が高度に保存されているプロテインキナーゼファミリーにおいて、2つの蛍光プローブを用いた生化学的な手法で触媒領域の微少な構造の差異を検出可能であることを示した実験の成果及び二つのプローブ間で親和性が著しく異なったプロテインキナーゼを抽出して比較解析を行った結果について述べている。著者は、多くのプロテインキナーゼの活性を阻害する化合物であるスタウロスポリンを母核とした蛍光プローブ(8a)と、スタウロスポリンの2級アミンの水素をメチル基に置換することで3級アミンとした化合物を母核とした蛍光プローブ(8b)を合成し、それらの蛍光プローブの280種類へのプロテインキナーゼへの親和性を評価した。さらに著者は、8aと8bで2倍以上の親和性の差が確認されたプロテインキナーゼ28種類のアミノ酸配列をアライメントし、系統解析を行った。その結果、2種のプローブで異なる構造の箇所が結合するアミノ酸残基に関して、8aが強いキナーゼ群と8bが強いキナーゼ群では特徴が異なることが確認された。また、系統的に近縁なプロテインキナーゼ同士がいずれかの群に属す傾向にあることも明らかとなった。これらの結果から、著者は、今回合成した蛍光プローブを用いることにより、結晶構造が解明されていないプロテインキナーゼとリガンドの組合せについて、構造学的特徴を推定することが可能であるとの結論に至った。

General Discussionの章において著者は、今回のGPCRおよびプロテインキナーゼにおいて開発したアッセイ法の例をもとに、タンパク質構造の解明とそれに続く機能推定において、生化学的解析と構造学的解析を組み合わせる解析することの重要性とその創薬研究への有用性について議論した。さらに、今後の課題として、生化学的・構造学的実験データ解析に分子進化学的アプローチを併用することに加え、分子動力学計算などの計算科学的アプローチを駆使することにより、さらなる構造学的知見の発見に繋げる可能性について言及した。

審 査 の 要 旨

本論文の著者が、2つのタンパク質ファミリー、GPCRとプロテインキナーゼ、において新たに開発した生化学的アッセイ法は、それらファミリーにおける新たな構造学的な知見を得て機能の解明に至るうえで重要なものであり、生物学的な意義は大きい。タンパク質ファミリーにより生化学的・構造学的特徴が異なるため、ファミリーごとに適切な戦略を設定する必要があるものの、著者のアプローチは他のファミリーにも適用可能なものであり、今後の展開が期待できる。また、著者が、アライメントや分子系統など配列レベルの比較解析も併用して、GPCRやプロテインキナーゼの分子進化に関する示唆を与えた点も重要である。

令和3年1月25日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士(理学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。