

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4587563号
(P4587563)

(45) 発行日 平成22年11月24日(2010.11.24)

(24) 登録日 平成22年9月17日(2010.9.17)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 C O 7 K 19/00 (2006.01)
 C O 7 K 14/47 (2006.01)
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 C O 7 K 19/00
 C O 7 K 14/47
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 Q 1/02

請求項の数 8 (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2000-511882 (P2000-511882)
 (86) (22) 出願日 平成10年9月11日(1998.9.11)
 (65) 公表番号 特表2001-516587 (P2001-516587A)
 (43) 公表日 平成13年10月2日(2001.10.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB1998/002759
 (87) 国際公開番号 WO1999/014344
 (87) 国際公開日 平成11年3月25日(1999.3.25)
 審査請求日 平成17年9月6日(2005.9.6)
 (31) 優先権主張番号 9719496.3
 (32) 優先日 平成9年9月13日(1997.9.13)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 397009934
 グラクソ グループ リミテッド
 GLAXO GROUP LIMITED
 イギリス ミドルセックス ユービー6
 Oエヌエヌ グリーンフォード パークレ
 ー アベニュー グラクソ ウェルカム
 ハウス (番地なし)
 Glaxo Wellcome Hous
 e, Berkeley Avenue G
 reenford, Middlesex
 UB6 ONN, Great Brita
 in
 (74) 代理人 100064285
 弁理士 佐藤 一雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Gタンパク質キメラ体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

全長の酵母Gα (G p a 1 p) アミノ酸配列において、G p a 1 pのC-末端10アミノ酸内の連続した5個のアミノ酸位置が、哺乳類Gαタンパク質のC-末端10アミノ酸中の相当する連続した5個のアミノ酸で置換されてなる配列からなる、キメラGαタンパク質。

【請求項2】

G p a 1 pのC末端5アミノ酸が、哺乳類Gαタンパク質のC-末端5アミノ酸で置換されてなる、請求項1に記載のキメラGαタンパク質。

【請求項3】

酵母Gα (G p a 1 p) タンパク質のN-末端467アミノ酸と、
 C末端に、哺乳類Gαタンパク質由来のC-末端5アミノ酸と
 を含んでなる、キメラGαタンパク質。

【請求項4】

酵母Gα (G p a 1 p) タンパク質のN-末端467アミノ酸と、
 C末端に、G a q、G a s、G a o、G a i 1、G a i 3、G a z、G a 1 2、G a 1 3、G a 1 4およびG a 1 6から選択される哺乳類Gαタンパク質由来のC-末端5アミノ酸と
 を含んでなる、キメラGαタンパク質。

【請求項5】

10

20

請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載のキメラ G_{α} タンパク質をコードする、ヌクレオチド。

【請求項 6】

哺乳類 G タンパク質結合レセプターをコードするヌクレオチド配列と、請求項 5 に記載の核酸分子とを含んでなる、形質転換酵母細胞。

【請求項 7】

酵母細胞が、Saccharomyces cerevisiaeである、請求項 6 に記載の形質転換酵母細胞。

【請求項 8】

目的とする化合物を請求項 6 に記載の細胞と接触させ、細胞の成長応答を観察することを含んでなる、レセプターと相互作用することができる化合物のスクリーニング法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、キメラ G タンパク質、その発現構築物、このような構築物を発現する酵母細胞、およびそれらの作成および使用法に関する。

【0002】

G タンパク質結合レセプターは、7つの膜貫通ドメインを特徴とする内在性膜タンパク質であり、ホルモンや感覚シグナルを細胞内部に送達する（総説については(1)を参照されたい）。これらのレセプターは、一般に 7 T M レセプターまたは 7 T M R と呼ばれている。これらのレセプターは、 α 、 β および γ サブユニットからなるヘテロトリマー性 G タンパク質を活性化することによってリガンド結合に応答する。 G_{α} サブユニットは、 G タンパク質トリマー中で GDP に結合し、活性化（リガンド結合）したレセプターとの相互作用は、 GDP の GTP での置換を誘発する。付随するコンホメーション変化により G_{α} - GTP および G_{β} / G_{γ} 粒子の解離し、これらはいずれもイオンチャンネルまたは酵素エフェクターを調節して、シグナル伝播を引起すことができる。シグナルは、 GTP アーゼ活性を有する G_{α} が結合した GTP を加水分解して、ヘテロトリマーの再組立するまで持続する。RGS（ G タンパク質シグナル伝達のレギュレーター）タンパク質ファミリーの G_{α} サブユニットについての GAP（ GTP アーゼ活性化タンパク質）として作用することによってシグナル時間を調節する(38)(17)。 G タンパク質シグナル伝達系は、総ての真核生物によく見られると思われる。

【0003】

三量体性 G タンパク質シグナル伝達系の完全に特定された例は、発芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のフェロモン応答経路である(20)。MAT α 接合型の細胞は、STE 2 遺伝子によってコードされるレセプターを発現する。このレセプターは、逆（MAT α ）接合型の細胞によって分泌されるペプチドである α -因子接合フェロモンの結合によって活性化される。酵母 G タンパク質は、GPA1（ G_{α} ）、STE 4（ G_{β} ）および STE 18（ G_{γ} ）遺伝子の生成物から組立てられる。Ste 2 p レセプターの活性化によって放出される G_{β} / G_{γ} （Ste 4 p / Ste 18 p）粒子は、シグナルをマイトジェン活性化タンパク質キナーゼ（MAPK）モジュールに送達する。これによって、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤 Far 1 p が活性化され、FUS 1 などの接合工程に関与している一組の遺伝子の細胞周期の阻止と転写誘導を引起す。この経路は、RGSファミリーの要素である Sst 2 p によって脱感作される。逆接合型（MAT α ）の細胞は、異なるレセプター（Ste 3 p）を発現し、これにより MAT α 細胞によって分泌されたフェロモン（ α -因子）に応答し、そうでなければ、2つの接合型に用いられるシグナル伝達装置は同一である。

【0004】

現在のところ、少なくとも 16 個の G_{α} サブユニット、5 個の G_{β} サブユニットおよび 1 個の G_{γ} サブユニットが哺乳類で同定されており、これらは極めて多様な三量体性 G タンパク質を組立てることができる。配列相同性に基づいて、 G_{α} サブユニットは、 $G_{\alpha 1}$ 、 $G_{\alpha s}$ 、 $G_{\alpha q}$ 、または $G_{\alpha 1 2}$ に関連した少なくとも 4 つのファミリーに分けられる。典型的には、所定の 7 T M レセプターは、 G_{α} サブユニットの単一または小さなサブセ

10

20

30

40

50

ットのみを活性化する。従って、複数の G_{α} サブユニットを発現する細胞でも、シグナル伝達は特定の G タンパク質およびその下流のシグナル伝達経路に特異的であることがある。様々な方法の組合せにより、レセプター/ G タンパク質特異性の重要な決定因子として G_{α} サブユニットの数個の特異的な領域が画定されている。これらには、 N -末端の領域、主として G_{β}/G_{γ} の結合に関与するスイッチII-スイッチIII領域(21)、および特に C -末端の領域が挙げられる。例えば、 G_{α} の C -末端で起こる突然変異のクラスターは、レセプター共役 (receptor coupling) に欠陥を引起すことが分かっている ((29)(13) およびそれらに記載の文献)。また、 $G_{\alpha t}$ (トランスデューシン) および $G_{\alpha i 2}$ の C -末端で作成されたペプチドは、それぞれロドプシンおよび β -アドレナリンレセプターへの結合を競争し(9)(30)(35)、 G_{α} の C -末端に向けられた抗体はレセプターとの相互作用を遮断することもできる(6)(10)(36)。培養哺乳類細胞(例えば、COS細胞)におけるアデノシンの A_1 レセプターのアゴニスト刺激に対する正常な応答は、 $G_{\alpha i}$ ファミリータンパク質の活性化であり、アデニレートシクラーゼを阻害する。 $G_{\alpha q}$ 含有ヘテロ三量体は、対照的に通常は A_1 活性化に応答しない。しかしながら、 $G_{\alpha q}$ の C -末端の4個のアミノ酸を $G_{\alpha i 2}$ の相当するアミノ酸に交換することによって、 $G_{\alpha q}$ サブユニットを誘導して A_1 レセプターと相互作用させることができる(7)。従って、シグナル伝達をキメラ G_{α} サブユニットによって行うときには、ホスホリパーゼC (活性化 $G_{\alpha q}$ のエフェクター) をアデノシン A_1 レセプターアゴニストによって活性化することができる(7)。 $\text{Somatostatin } SST_3$ レセプターは $G_{\alpha s}$ と不和合性であるが、 $G_{\alpha s}$ の5個の C -末端アミノ酸を SST_3 レセプターと相互作用することが知られている $G_{\alpha i 2}$ または $G_{\alpha 16}$ からの相当する残基に置換することによってCOS細胞におけるアデニレートシクラーゼの活性化に共役することができる(18)。 $G_{\alpha 15}$ および $G_{\alpha 16}$ は広範囲の7TMレセプターと相互作用し(26)、これに関して例外的である。 $G_{i 1}$ (41) および G_t (19) 三量体について解明されている結晶構造では、 G_{α} の C -末端の尾は、 G_{α} の N -末端および G_{γ} の C -末端に共有結合した2個の脂質基をも含む G タンパク質三量体の平たい大部分が帯電していない表面上にある。この表面は膜に面しており、7TMレセプターの細胞内ループとの相互作用に関与していると思われる。

【0005】

幾つかの報告は、酵母 G タンパク質シグナル伝達系を、異種発現した哺乳類 G タンパク質共役 (7TM) レセプターに共役することができることを示している。ラットソマトスタチン SST_2 レセプター(33)およびラットアデノシン A_{2a} レセプター(34)など幾つかのレセプターは、酵母 G_{α} タンパク質 $Gpa1p$ と直接相互作用することができるが、ヒト成長ホルモン放出ホルモンレセプター ($GHPRHR$) (12)などの他のレセプターは $Gpa1p$ と不和合性である。これらのレセプターを共役させるために、酵母 G_{α} サブユニットを欠失させ、異種レセプターを完全長の哺乳類 G_{α} サブユニットと同時発現させることができる。あるいは、 $Gpa1p$ の C -末端ドメイン (ペプチド配列の約1/3) が哺乳類 G_{α} サブユニットで置換されているキメラ G_{α} サブユニットが用いられてきた。これらの方法については、WO 95/21925号明細書(American Cyanamid Company)を参照されたい。キメラ体または他の改質または異種 G_{α} サブユニットは、酵母共役系で用いるようにするには、幾つかの基準を満足しなければならない。最も重要なことは、それらは酵母 G_{β}/G_{γ} に効率的に結合して、活性化7TMレセプターの非存在下でシグナル伝達を防止しなければならない、またシグナル増殖を可能とするには、それらはアゴニストに結合した活性化レセプターと効果的に相互作用しなければならない。

【0006】

このような異種またはキメラ G_{α} 成分は、異種7TMレセプターの酵母シグナル伝達系 (フェロモン応答経路) への共役を促進して、レセプター上の潜在的な新規薬剤分子のようなリガンドの効果が酵母細胞の表現型応答で観察できるようにすることができる。例えば、細胞を誘導して成長させ、シグナル伝達経路に下流のレポーター遺伝子をシグナル伝達経路に導入することによってレセプターアゴニストに応答して指示薬染料化合物転換することができる。しかしながら、WO 95/21925号明細書に記載されているようなキ

10

20

30

40

50

メラ構築物は、一般に酵母Gタンパク質 β γ サブユニット対に対するアフィニティーが低く、またバックグラウンドシグナル伝達が増加している。所定のレセプターの1個または少数の既知G $_{\alpha}$ サブユニットに対する特異性により、様々なG $_{\alpha}$ 構築物が試験したレセプターの大半と機能的共役活性を示す必要があった。

【0007】

7TMレセプターを介して作用することができる新規薬剤の発見には、高い有効性としかも高特異性のスクリーンが必要である。現在は、酵母共役系は、レセプター／Gタンパク質特異性が、多種多様なG $_{\alpha}$ 構築物をそれぞれのレセプターを共役について試験するという要件を課することによって制約されている。共役を行うことができないレセプターについては、その失敗がレセプター／Gタンパク質不和合性によるものか、または例えば不適当なレセプターコンホメーションのような他の理由によるものか不確定である。単一のG $_{\alpha}$ 構築物を用いて多数の様々なレセプターを酵母Gタンパク質シグナル伝達経路に共役させることができることが望ましい。これは、レセプター／Gタンパク質特異性について全く知られていないオーファンレセプターの研究に役立つ可能性がある。あるいは、G $_{\alpha}$ 構築物を用いてオーファンレセプターの研究を行うこともできる。

10

【0008】

意外なことには、本発明者らは、「移植体(transplant)」と呼ばれるある種のキメラGタンパク質は、哺乳類の7TMレセプターの酵母接合経路への共役における以前から知られているキメラ体より少なくとも10倍有効であることを見いだした。

【0009】

従って、第一の態様では、本発明は、C-末端10アミノ酸内の少なくとも3アミノ酸位置を別のアミノ酸で置換することによって改質した酵母G $_{\alpha}$ (Gpa1p) アミノ酸配列を有するキメラG $_{\alpha}$ タンパク質を提供する。好ましくは、キメラ体は、少なくとも5個のこれらの置換を含んでいる。

20

【0010】

従って、体に態様では、本発明は、C-末端の10アミノ酸内の少なくとも3アミノ酸位置を異種G $_{\alpha}$ タンパク質由来のアミノ酸で置換することによって改質した酵母G $_{\alpha}$ (Gpa1p) アミノ酸配列を有するキメラG $_{\alpha}$ タンパク質を提供する。好ましくは、キメラ体は、少なくとも5個の置換を含んでいる。本発明のこの様相での好ましい態様では、キメラ体は、異種G $_{\alpha}$ タンパク質のC-末端の10アミノ酸由来のアミノ酸配列に相当する少なくとも3個の、望ましくは少なくとも5個の連続するアミノ酸を含んでいる。例えば、哺乳類G $_{\alpha}$ タンパク質、例えば恐らくは任意のG $_{\alpha}$ を除くG $_{\alpha 16}$ のC-末端は、内在性酵母G $_{\alpha}$ タンパク質のC-末端の5個のアミノ酸に取って代わり、本発明のキメラ体を提供することができる。本発明者らは、これらのキメラ体を「移植体」または「移植キメラ体」と命名した。

30

【0011】

本発明のキメラG $_{\alpha}$ タンパク質は、酵母タンパク質のC-末端ドメインを哺乳類G $_{\alpha}$ タンパク質のC-末端ドメインに替えた以前から知られているキメラ体よりも酵母でのシグナル形質導入と和合性であり（かつ天然酵母のG $_{\alpha}$ コンホメーションにより近いと思われる）コンホメーションを採用していると考えられる。従って、本発明のキメラ体は、Gpa1p配列へごくわずかな変化させることによってレセプターの特異性を変化させかつ様々なレセプターを酵母シグナル伝達経路へ共役させることができるという利点を有する。野生型Gpa1pと極めて類似していることから、これらのキメラG $_{\alpha}$ サブユニットはGpa1pと同様なG $_{\beta}$ ／G $_{\gamma}$ に対するアフィニティーを保持しており、発現はGPA1プロモーターが指示してG $_{\alpha}$ の化学量論を最適にすることができる。他の各種のプロモーターからの発現も、レセプター共役と和合性である。

40

【0012】

第三の態様では、本発明は、本発明によるキメラG $_{\alpha}$ タンパク質をコードするヌクレオチド配列も提供する。また、上記ヌクレオチド配列を含んでなりかつ適当な形質転換の際に宿主細胞に発現させることができる発現ベクターも提供される。適当なプロモーター、転

50

写終結配列およびマーカー遺伝子を含む発現ベクターの構築は、当業者には明らかであろう。宿主細胞は、Saccharomyces cerevisiae種の酵母細胞であるのが望ましいことがあり、本発明のもう一つの態様を表す。

【0013】

従って、本発明は、本発明によるキメラG α タンパク質をコードするヌクレオチド配列、例えばリガンドが知られていないレセプターなどの異種Gタンパク質共役レセプター、および酵母G α (Gpa1p) アミノ酸配列と本発明によるG α タンパク質、例えば哺乳類G α_{16} タンパク質のような異種G α タンパク質のC-末端の10個のアミノ酸のアミノ酸配列から誘導される少なくとも3個のアミノ酸とを含んでなるキメラG α タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでなる形質転換酵母細胞も提供する。異種レセプターは、7TMレセプターでよい。このようなレセプターとしては、アセチルコリン、アドレナリン、ノルアドレナリン、ドパミン、ヒスタミン、メラトニン、アンギオテンシン、プロスタグランジン、カンナビノイド、神経ペプチドY、サブスタンスP、オピオイド、グルカゴン、アンギオテンシン、ブラジキニン、ケモカイン、トロニン、糖タンパク質ホルモン、アデノシン、ヌクレオチドおよびソマトスタチンのレセプターが挙げられる。

10

【0014】

本発明による形質転換酵母細胞は、Gタンパク質シグナル伝達経路に関与しているプロモーターと操作結合したレポーター遺伝子をコードするヌクレオチド配列を含んでなることができる。このようなレポーター遺伝子としては、HIS3または他の栄養要求性マーカー（例えば、URA3、LEU2、またはTRP1）、またはCYH2またはG418^Rのような薬剤選択に対する耐性または感受性を与える遺伝子、または β -ガラクトシダーゼ(LacZ)およびルシフェラーゼのような細胞内酵素または緑色蛍光タンパク質(GFP)、をコードする他の遺伝子、またはPHO5のようなホスファターゼまたはキナーゼのような分泌酵素をコードする遺伝子を挙げることができる。酵母細胞は、FUS1-HIS3およびFUS1-lacZのような複数のレポーター遺伝子の組合せを含むことができるのが望ましい。好ましい態様では、形質転換酵母細胞は、GPA1、SST2またはSTE2遺伝子の少なくとも1個に突然変異も含む。好ましくは、このような突然変異は欠失である。望ましくは、レポーター遺伝子をGタンパク質シグナル伝達経路での活性の監視に用いるときには、FAR1も欠失される。これにより、成長は、フェロモン応答経路を活性化する条件下でも確実に継続することができる。本発明の別態様では、FAR1遺伝子は完全なままであり、シグナル伝達経路を活性化するアゴニスト刺激を、成長抑制を生じるときに監視することができるようにする。

20

30

【0015】

好ましい酵母株は、SST2およびGPA1 (酵母G α) の欠失を有し、前者はGTPアーゼのSst2p活性化によるシグナルのダウンレギュレーションを防止し、後者はG α がG β /G γ に対して化学量論的過剰に存在するとき、活発にシグナル伝達するG β /G γ 残基が速やかに再会合して不活性なヘテロ三量体となることによるシグナルクエンチング(signal quenching)を防止する。

【0016】

本発明者らは、Gpa1pのN-末端の467アミノ酸とG α_{16} の5個のC-末端アミノ酸とのキメラ体をGpa1-G α_{16} 移植体と命名した。同様に、G α_q のC-末端の5個のアミノ酸を含むキメラ体をGpa1-G α_q 移植片と命名し、G α_s のC-末端の5個のアミノ酸を含むキメラ体をGpa1-G α_s 移植体と命名した。また、下記の移植体も構築した。それらは上記のものと同一であり、すなわちGpa1pのN-末端の467アミノ酸とG α タンパク質由来の5個のC-末端アミノ酸とを含んでなり、次のようなものである：Gpa1-G α_{12} 、Gpa1-G α_{13} 、Gpa1-G α_{14} 、Gpa1-G α_{i1} 、Gpa1-G α_{i3} 、Gpa1-G α_0 およびGpa1-G α_z 。

40

【0017】

もう一つの移植体を、G α 、Gpa1p、および酵母Ustilago maydis由来のG α サブユニットであるGpa3とから調製した。この移植体は、Gpa1-Gpa3と命名されて

50

いる。これらの移植体は、G p a 1 の 5 個の C-末端アミノ酸を変えることによって、レセプターに対する G_α サブユニットの特異性を変えることができることを示している。また、これらの結果は、酵母中の異種レセプターへの共役における「移植体」の有効性が、異種 G_α 領域が一層長いキメラサブユニットと比較して予想外に良好であることを示唆している。

【0018】

哺乳類細胞では、プリン作動性ヌクレオチド P₂Y₂ レセプターが、G_{α_q} を介してホスホリパーゼ C β (P L C β) の活性化に共役している。本発明者らは、G p a 1-G_{α_q} 移植体が、野生型 G p a 1 p で見られたアゴニストに対する弱い応答を実質的に改良することを見いだした。同様に、G p a 1-G_{α₁₆} 移植体を用いて得られたソマトスタチン S S T₂ レセプターの共役は、野生型の G p a 1 p または G_{α_i/0} ファミリーのキメラと比較して 10 倍に増強されたが、このことはこのレセプターが哺乳類細胞の G_{α_i/0} タンパク質と相互作用することを考慮すれば注目に値する。また、5 H T_{1A} レセプターは、MMY 9 酵母細胞中の野生型 G p a 1 p を刺激することができなくとも、それは G p a 1-G_{α₁₆} 移植体と相互作用することができる。アミノ酸をごくわずかに置換することにより、酵母 G p a 1 p に、キメラ体構築に対する以前に報告された方法ではできなかった遺伝子 G タンパク質の特性を賦与することができる。従って、本発明は、単一の G_α サブユニットを含んでなりかつ広汎な 7 T M レセプターを共役させることができる系の可能性を初めて示している。

【0019】

更に、本発明者らは、G p a 1 の 5 個の C-末端アミノ酸を置換して移植体を生成する方法が広汎に应用可能であることを見だし、4 種類総ての G_α ファミリーの代表的要素 G_{α_i}、G_{α_s}、G_{α_q} および G_{α₁₂} の移植体を生成した。これは、キメラ体構築に対する以前に報告された方法ではできないことであった。更に、これらの移植体の総ては、G P A 1 遺伝子のプロモーターから発現させて、効率的共役のための最適化学量論を得ることができる。これらのキメラ体の幾つかは、G p a 1/G_α (文献12) の場合のように、より強力なプロモーターからの発現が必要であったので、キメラ体構築に対する以前に報告された方法ではできないことであった。最後に、フェロモン応答経路は、活性化レセプターの非存在下では移植体の組込みバージョン(integrated versions)を発現する細胞では活性化されない。このことは、C-末端アミノ酸に対する操作は G_β/G_γ との相互作用を干渉しないことを示唆しているが、これはキメラ体構築に対する以前に報告された方法では真実ではなかった。総合すれば、本発明者らのデータは、移植体の作成法を、任意の新たに発見された哺乳類 G_α、または本明細書には記載されていない G_α サブユニット (G_{α_t} または G_{α_{olf}})、または任意の他の動物界の種由来の G_α サブユニットに適用可能であることを示している。

【0020】

本発明を、図を用いて下記の実験例によって更に説明するが、実施例および例示のためのものであって、本発明を制限するためのものではない。

【0021】

材料および方法：

プラスミドおよび菌株

核酸操作は、標準的方法に準じて行った(24)。

【0022】

レセプター発現構築体

レセプター発現構築体は、高コピー数のエピソーム酵母-E. coli シャトルベクター p F L 6 1 (27)、Y E p 2 4 および p D T-P G K (図 6 (a) のプラスミドマップ参照) であって Kang et al. (14) によって報告された p P G K と同一であるものに基づいていた。未改質のヒト G タンパク質に共役したレセプターをコードする相補的 DNA (c DNA) 配列を P G K 1 遺伝子のプロモーターとターミネーター領域のこれらのベクター中に導入して、酵母細胞に強力な構成的発現を与えた。ソマトスタチン S S T₂ レセプター (Ge

nbank登録番号M81830)は、pFL61に導入した。メラトニンML_{1B} (Genbank登録番号U25341)、ソマトスタチンSST₅ (Genbank登録番号L14865)、セロトニン5HT_{1A} (Genbank登録番号X13556)、およびセロトニン5HT_{1D} (Genbank登録番号M81589)レセプターは、pDT-PGKに導入した。プリン作動性ヌクレオチドP2Y₁レセプター (Genbank登録番号S81950) およびアデノシンA_{2b}レセプター (Genbank登録番号M97759)は、pDT-PGKに導入した。プリン作動性ヌクレオチドP2Y₂レセプターも、pDT-PGKに導入した。P2Y₂レセプターの配列は、コドン348が恐らくは系統発生的変異の結果としてGAA (Glu)でありGGA (Gly)ではないことを除き、Parr et al. (Genbank登録番号U07225) (32)(31)によって報告されたものに相当した。内在性酵母α-因子レセプターSTE2をコードする遺伝子は、構築体Yep24-STE2を用いてそれ自身のプロモーターから発現させた。

10

【0023】

G_α発現構築体

Gタンパク質αサブユニットをコードする配列を発現する構築体を作成するため、GPA1遺伝子 (GPA1プロモーター) の1Kb上流の領域と、複合クローニング部位およびADH1遺伝子 (ADHt) の転写終結領域とからなるカセットを動原体性プラスミドpRS314 (Stratagene)に挿入して、pJW1を生成させた (図6(b))。GPA1オープンリーディングフレームをpJW1のNruI部位に挿入して、GPA1発現プラスミドpRS314-GPA1を作成した (図6(c))。

20

【0024】

Gpa1/Gα_{i3}キメラ体

キメラG_αサブユニットGpa1/Gα_{i3}をコードする配列を、プラスミドpADC2-SCGi3から誘導した。このプラスミドによってコードされるキメラ体は、Gα_{i2}の代わりにGα_{i3}のC-末端を含むことを除き、Kang et al. (14) (スイッチIIドメインにBamHI部位を有する) によって報告されたものと同一構造のものである。この研究に用いられるGpa1/Gα_{i3}発現構築体は、オリゴデオキシヌクレオチドプライマーを用いるPCR増幅でオープンリーディングフレームに隣接してNcoIおよびNotI制限酵素部位を組込むことによって作成した。

30

【0025】

Gpa1/Gα_{i3}キメラ体をコードする配列をpJW1のNcoIおよびNotI制限酵素部位の間に挿入して、プラスミドpRS314-Gpa1/Gα_{i3} (図6(d))を作成した。Gpa1/Gα₀、Gpa1/Gα_{i1}、Gpa1/Gα_{i2}、Gpa1/Gα_s、Gpa1/Gα_qおよびGpa1/Gα₁₆キメラ体を発現する構築体は、pRS314-Gpa1/Gα_{i3}から (BamHIおよびNotI制限酵素部位の間の) Gα_{i3}由来の配列をGα₀、Gα_{i1}、Gα_{i2}、Gα_s、Gα_qおよびGα₁₆の相当するC-末端領域をコードする配列に変えることによって誘導した。pRS314-Gpa1/Gα₀、pRS314-Gpa1/Gα_{i1}、pRS314-Gpa1/Gα_{i2}、およびpRS314-Gpa1/Gα₁₆のプラスミドマップを、それぞれ図6(e)、6(f)、6(g)および6(h)に示す。

40

【0026】

G_α移植体

アミノ酸改質である一番端のC-末端を有する「移植体」を、3段階で生成した。第一に、pRS314-GPA1のGPA1プロモーターに配置されたAflII部位をKlenowによる平滑末端形成および再連結によって除いた。次いで、GPA1のコドン467を位置指定突然変異誘発によってAAAからAAGへ変更し、これはQuik-changeキット (Stratagene)を用いて行った。このヌクレオチド変化により、コードしたタンパク質配列を変えることなくAflII部位を導入した。最後に、AflII/XhoI断片を、表1に示したオリゴデオキシヌクレオチドの対をアニーリングすることによって作成したオリゴデオキ

50

シヌクレオチドリinkerに替えた。

【0027】

【表1】

表1

オリゴデオキシヌクレオチド	配列 (5' から 3')	移植体
Gqtop Gqbtm	TTAAGGAATACAACCTAGTTTGAATTCCG SEQ ID NO: 1 TCGACGGAATTCAAACCTAGGTTGTATTCC SEQ ID NO: 2	Gpa1/G _{aq}
Gstop Gsbtm	TTAAGCAATACGAACTATTGTGAATTCCG SEQ ID NO: 3 TCGACGGAATTCACAATAGTTCGTATTGC SEQ ID NO: 4	Gpa1/G _{as}
Gotop Gobtm	TTAAGGGTTGTGGCTTGTACTGAATTCCG SEQ ID NO: 5 TCGACGGAATTCAGTACAAGCCACAACCC SEQ ID NO: 6	Gpa1/G _{ao}
Gi1top Gi1btm	TTAAGGATTGTGGTTTGTGTTTGAATTCCG SEQ ID NO: 7 TCGACGGAATTCAAAACAAACCACAATCC SEQ ID NO: 8	Gpa1/G _{ai1}
Gi3top Gi3btm	TTAAGGATGTGGTTTGTACTGAATTCCG SEQ ID NO: 9 TCGACGGAATTCAGTACAAACCACATTCC SEQ ID NO: 10	Gpa1/G _{ai3}
Gztop Gzbtm	TTAAGTATATAGGCTTGTGTTGAATTCCG SEQ ID NO: 11 TCGACGGAATTC AACACAAGCCTATATAC SEQ ID NO: 12	Gpa1/G _{az}
G12top G12btm	TTAAGGATATTATGTTGCAATGAATTCCG SEQ ID NO: 13 TCGACGGAATTCATTGCAACATAATATCC SEQ ID NO: 14	Gpa1/G _{a12}
G13top G13btm	TTAAGCAATTGATGCTACAGTGAATTCCG SEQ ID NO: 15 TCGACGGAATTCAGTGTAGCATCAATTGC SEQ ID NO: 16	Gpa1/G _{a13}
G14top G14btm	TTAAGGAATTTAACTTGGTTTGAATTCCG SEQ ID NO: 17 TCGACGGAATTC AAACCAAGTTAAATTCC SEQ ID NO: 18	Gpa1/G _{a14}
G16top G16btm	TTAAGGAAATTAACCTATTGTGAATTCCG SEQ ID NO: 19 TCGACGGAATTCACAATAGGTTAATTTC SEQ ID NO: 20	Gpa1/G _{a16}
Stoptop Stopbtm	TTAAGTGAGCGGCCGCGAATTCCG SEQ ID NO: 21 TCGACGGAATTCGCGGCCGCTCAC SEQ ID NO: 22	[truncated Gpa1p]

【0028】

生成するプラスミドは、Gpa1のアミノ酸1～467と哺乳類G_aサブユニットの5個のC-末端酸の間のインフレーム融合体をコードした(図5C)。5個のC-末端酸を欠いているGpap1の切断型バージョンを発現するためのプラスミドは、上記と同様に(表1)リンカーの挿入によるコドン位置468における停止コドンの導入によって作成した。

【0029】

酵母株

酵母株MMY9を作成して、7個の膜貫通ヘリックスレセプターとGタンパク質の間の機能的相互作用を研究した。この株は、一般的な実験室株W303-1A(遺伝子型: MATa his3 ade2 leu2 trp1 ura3 can1)から誘導された。フェロモン応答経路の活性化は、それぞれFUS1およびleu2座に組込まれた2個のレポーター遺伝子FUS1-HIS3およびFUS1-lacZによって監視した。FAR1遺伝子をfar1Δ::URA3 DNA構築体を用いる1段階遺伝子置換によって欠失し、フェロモン応答経路を活性化した条件下でも成長が継続するようにした。SST2遺伝子をsst2Δ::URA3 DNA構築体を用いて1段階遺伝子置換によって欠失して、この遺伝子によってコードされたGTPアーゼ活性化機能によりGタンパク質シグナル伝達のダウンレギュレーションを防止した。これらの操作のそれぞれの後、ura3マーカを、内部の243bp(EcoRV~StuI)の欠失を有するURA3遺伝子から

なる $ura3 \Delta$ 断片を用いる形質転換によって回収した後、5-フルオロ-オロチン酸選択を行った。染色体 $GPA1 (G\alpha)$ 遺伝子は、 $gpa1 \Delta::ADE2 DNA$ 構築体を用いる1段階遺伝子置換によって欠失した。

【0030】

酵母株 $MMY11$ は、 $ste2 \Delta::G418^R DNA$ 構築体を用いる1段階遺伝子置換によって誘導し、ジェネティシン耐性コロニーを選択し、この耐性コロニーは $Ste2p$ アゴニストである α -因子に応答できないことを確かめた。

【0031】

レポーター遺伝子発現のアッセイ

アゴニストであるソマトスタチン ($S-14$)、メラトニン、セロトニン、アデノシン5'-ニリン酸 (ADP) およびウリジン5'-三リン酸 (UTP) は、Sigma社から入手した。 α -因子は、Peptide and Protein Research, Exeter, 英国によって合成した。5'-N-エチルカルボキサミドアデノシン ($NECA$) は、Research Biochemicals Internationalから入手した。

【0032】

FUS1-HIS3発現のアッセイ

逆ハロアッセイは、トリプトファンおよびウラシルを欠いている液体 SC -グルコース (2%) 培地中で $MMY9$ 細胞を初期安定相 ($OD_{600} = 4$) まで成長させることによって行った。細胞 (5×10^7) を、 SC -グルコース寒天中 $22.5 \text{ cm} \times 22.5 \text{ cm}$ バイオアッセイ皿 (Nunc) (1%) まで塗布し、 50°C まで平衡にした。この培地はトリプトファン、ウラシルおよびヒスチジンを欠き、 10 mM の3-アミノトリアゾールを補足し、 0.1 M リン酸ナトリウムで緩衝して $pH 7.0$ とした。抗生物質ディスクを固化寒天上に置き、一定量のアゴニスト溶液 ($1 \sim 5 \mu\text{l}$) をそれぞれのディスクに加えた。プレートを 30°C で3日間インキュベーションした。

【0033】

FUS1-lacZ発現のアッセイ

細胞抽出物中の β -ガラクトシダーゼ活性を、2回のアッセイによって測定した。第一のアッセイ ($ONPG$ アッセイ) では、細胞抽出物を、(37)に記載の基質 $ONPG$ を用いてインキュベーションした。単位は、 $(A_{420} \times 1000) / (OD_{600} \times t \times v)$ として定義した(25)。化学発光分析では、細胞を後期対数相まで成長させ、96穴マイクロタイタープレート中で $1 \mu\text{M}$ の α -因子の存在下または非存在下にて $100 \mu\text{l}$ $SC-WH$ 培地で $0.02 OD_{600}$ まで希釈した。インキュベーション (30°C 、6時間) の後、 $20 \mu\text{l}$ を取出し、 $20 \mu\text{l}$ アッセイ混合物 (125 mM リン酸ナトリウム, $pH 7.5$ 、 15 mM $MgSO_4$ 、 $200 \mu\text{M}$ Galacton-Star β -ガラクトシダーゼ基質 (Tropix)、 10% (v/v) Sapphire II (Tropix)、 $1 U/\mu\text{l}$ オキサリチカーゼ (Enzogenetics)) と混合した。インキュベーション (30°C 、1時間) の後、Top-count シンチレーションカウンター (Packard) で化学発光を測定した。

【0034】

組合わせた FUS1-lacZ および FUS1-HIS3 発現のアッセイ

レポーター遺伝子のイン・ビボアッセイでは、細胞をトリプトファン、ウラシルおよびヒスチジンを欠く $200 \mu\text{l}$ SC -グルコース (2%) 中で $0.02 OD_{600}$ まで懸濁することによって誘導 ($CPRG$ アッセイ) を行った。この培地にアゴニストと、更に 10 mM の3-アミノトリアゾールおよび β -ガラクトシダーゼ ($lacZ$) 基質であるクロロフェノールレッド- β -D-ガラクトピラノシド ($CPRG$; Boehringer) を 0.1 mg/ml の濃度まで補足した。色変化反応を可視化するため、培地を 0.1 M リン酸ナトリウムで $pH 7.0$ に緩衝した。アッセイは、96穴マイクロタイタープレートフォーマットで行った。プレートを攪拌せずに24時間インキュベーションし、 570 nm における吸光度をVictorマイクロタイタープレートリーダー (Wallac) を用いて測定した。 EC_{50} 値 (+/- 標準誤差) は、Robosageソフトウェアパッケージを用いて曲線フィッティング (curve-fitting) によって計算した。

10

20

30

40

50

【0035】

本発明の研究で用いた酵母株

株	遺伝子型
W303-1A	MATa his3 ade2 leu2 trp1 ura3 can1
MMY9	W303-1A fus1:FUS1-HIS3 FUS1-lacZ::LEU2 far1Δ::ura3Δ gpa1Δ::ADE2 sst2Δ::ura3Δ
MMY11	MMY9 ste2Δ::G418 ^R

【0036】

実験1：酵母フェロモン経路を活性化するレセプター

この実験では、酵母フェロモン応答経路を活性化することができるレセプターの例として4個のヒトGタンパク質に共役したレセプターを用いた。4個のレセプターは、メラトニンML_{1B}レセプター、セロトニン5HT_{1A}レセプター、ソマトスタチンSST₂レセプター、およびプリン作動性スクレオチドレセプターP2Y₂であった。これらのレセプターを、上記の酵母株MMY9で発現させた。この株は、SST₂、FAT1およびGPA1を欠失していたが、STE2によってコードされる内在性α-因子レセプターは保持していた。フェロモン応答経路の活性化は、2つの組込みレポーター遺伝子、すなわちヒスチジンを欠く培地中で成長読み出しを行うFUS1-HIS1、およびβ-ガラクトシダーゼ読み出しを行うFUS1-lacZを用いて監視した。これらのアッセイは、本明細書に上記している。本発明者らは、最初に内在性酵母ヘテロ三量体Gタンパク質（Gpa1p/Stp4p/Stp18p）を介するこれらのレセプターのシグナル伝達を検討した。レセプターを、高コピー数エピソームベクターを用いて強力なPGKプロモーターから酵母株MMY9で発現させた。図1において、パネルA～Fは、野生型GPA1遺伝子を発現するプラスミドpRS314-GPA1（パネルB～F）および更にレセプター発現構築体またはベクター、例えばpDT-PGK（ベクター；パネルB）；pFL61-SST₂（パネルC）；pDT-PGK-ML_{1B}（パネルD）；pDT-PGK-P2Y₂（パネルE）；pDT-PGK-5-HT_{1A}（パネルF）と同時形質転換したMMY9細胞を用いて行った逆ハロアッセイを示す。FUS1-HIS3のアゴニスト依存活性化は、アゴニストをパネルAに示す配置のフィルターディスクに下記の量を加える逆ハロアッセイによって測定した：3nMソマトスタチン-14（S-14）；40nMメラトニン（Mel）；3nM α-因子；100nM UTP；40nMセロトニン（5-HT）。予想されたように、MMY9を酵母フェロモンであるα-因子で処理したところ、内在性酵母レセプターStp2pを刺激し、FUS1-HIS3の発現を増加させ、ヒスチジンの非存在下でのハロの細胞成長させることができた（図1、パネルB）。同様に、ML_{1B}レセプター（パネルD）を発現するMMY9細胞は、メラトニンにตอบสนองして並びにα-因子にตอบสนองしてFUS1-HIS3を活性化した。SST₂レセプターを発現する細胞（パネルC）はソマトスタチンにตอบสนองし、P2Y₂レセプターを発現する細胞（パネルE）はアゴニストUTPにตอบสนองした。図1における細胞成長のゾーンは大きさが匹敵するものであるが、それぞれのレセプターには異なるモル量のアゴニストが必要であった。従って、ML_{1B}、SST₂およびP2Y₂レセプターは、内在性GαであるGpa1pの活性化によって酵母フェロモン応答経路に共役することができる。5-HT_{1A}レセプター発現構築体で形質転換したMMY9細胞は、アゴニストであるソマトスタチンにตอบสนองしてFUS1-HIS3を活性化せず、このレセプターはGpa1pとほとんど相互作用しないかまたは機能的に相互作用することができないことを示していた。

【0037】

実験2：レセプターへの酵母／哺乳類キメラ体の共役

この実験では、ある種のレセプターに対して、酵母フェロモン応答経路への共役の効率は、酵母と哺乳類Gαサブユニットとの間にキメラ体を作成することによって増強することができることを示す。一連のキメラGαサブユニットであって、Gpa1pのC-末端ドメイン（C-末端の142個のアミノ酸）をラットGα₀、Gα_{i1}、Gα_{i2}、および

10

20

30

40

50

$G_{\alpha i 3}$ の相当する領域に置換した(図5(b))。Gタンパク質サブユニットの適当な化学量論を得るため、キメラ体を動原体プラスミド上でコードし、GPA1遺伝子のプロモーターから発現した。これにより、過剰の G_{α} による G_{β}/G_{γ} によって伝達されたシグナルの消去が回避される(33)。これらの構築体を、実験に用いて、MMY9細胞を、一対のプラスミドであって、一方が G_{α} サブユニットを発現し、第二のものがベクター(pDT-PGK)またはレセプター発現構築体pFL61-SST₂、pDT-PGK-ML_{1B}、pDT-PGK-P2Y₂またはpDT-PGK-5-HT_{1A}の一つであるもので動じ形質転換した。FUS1-lacZのアゴニスト依存性活性化を、発色性の細胞浸透性 β -ガラクトシダーゼ(lacZ)基質であるクロロフェノールレッド- β -D-ガラクトピラノシド(CPRG; Boehringer Mannheim)を補足した培地で細胞をインキュベーションすることによって測定した。30℃で24時間インキュベーションの後のこの基質の転換率を、分光光度法によって測定し、酵母 G_{α} および4個のキメラ体の結果を図2A~Dに示す。2A Ste2pレセプター(pDT-PGK-形質転換細胞); 2B SST₂レセプター(pFL61-SST₂); 2C ML_{1B}レセプター(pDT-PGK-ML_{1B}); 2D 5-HT_{1A}レセプター(pDT-PGK-5-HT_{1A})。

【0038】

予想されたように、 α -因子は内在性Ste2pレセプターを刺激して、FUS1-lacZを誘導し、Gpa1pで最強の応答を誘導した(EC₅₀; 5.2±0.4nM)。この値は、 α -因子ペプチドに対するSte2pの報告された親和性と一致している(K_d; 17nM)(3)。Gpa1/ $G_{\alpha 0}$ およびGpa1/ $G_{\alpha i 2}$ キメラ体を発現するMMY9細胞も、高濃度の α -因子に応答してFUS1-lacZを誘導するが、用量-応答曲線は少なくとも2対数単位だけ上方に移動し、Ste2pレセプターは野生型Gpa1pと比較してこれらのキメラ体とは余り効率的に相互作用しないことを示していた。Gpa1/ $G_{\alpha i 1}$ またはGpa1/ $G_{\alpha i 3}$ を発現するMMY9細胞は、 α -因子に応答してFUS1-lacZを誘導しなかった。対照的に、ソマトスタチンSST₂レセプターは、総ての $G_{\alpha i}$ キメラ体によってフェロモン応答経路に共役した(Gpa1p、Gpa1/ $G_{\alpha 0}$ 、Gpa1/ $G_{\alpha i 1}$ 、Gpa1/ $G_{\alpha i 2}$ 、およびGpa1/ $G_{\alpha i 3}$ に対してそれぞれEC₅₀値; 430±44nM; 300±38nM; 650±65nM; 300±22nM; および630±30nM)。これにより、キメラ G_{α} サブユニットは機能的であることが確かめられ、レセプターがフェロモン応答経路に共役することができないのは $G_{\alpha C}$ -末端領域との不和合性によることを示している。本発明者らは、キメラタンパク質を、これらのタンパク質総てに共通のGpa1pのN-末端に指定されたポリクローン性抗体を用いて定量的ウェスタンブロット法(データは示さず)によって野生型Gpa1pに匹敵する量で産生することを確認した。

【0039】

他のレセプターの中、5-HT_{1A}およびML_{1B}は、いずれもGpa1pを発現するものよりキメラ G_{α} サブユニットを発現する細胞中でのフェロモン応答経路により効率的な共役を示した。5-HT_{1A}レセプターは、Gpa1/ $G_{\alpha 0}$ を活性化することができる酵母中の配座を採用し、このレセプターがGpa1pと不和合性であるかまたはほとんど和合しないという実験1からの仮定を支持している。注目に値することは、これらのレセプターが特定のキメラ体に対して特異的であり、例えばML_{1B}はGpa1/ $G_{\alpha i 2}$ を活性化するが、Gpa1/ $G_{\alpha i 3}$ は活性化せず、これらのキメラ体は調度14個のアミノ酸位置で異なっているが、発現の水準はそれぞれの場合に同様である。シグナル伝達を野生型Gpa1pによって行うときには、FUS1-lacZは他のレセプターと比較してP2Y₂によっては余り誘導されず(データは示さず)、逆ハロアッセイでの同様な成長ゾーンを得るにはアゴニストのモル量を大きくする必要があることと一致している(図1)。P2Y₂アゴニスト応答は、 $G_{\alpha i}$ キメラ体のいずれによっても増強されなかった(データは示さず)。

【0040】

実験3：G_{α16}のC-末端領域を有するキメラ体

G_{α15}/G_{α16}サブユニットは、G_αサブユニットについて典型的であるよりもずっと広範囲のレセプターと相互作用することが報告されており、G_{αi}、G_{αs}またはG_{αq}と通常に相互作用するレセプターと共役する能力を有する(26)。Gpa1/G_{α16}のC-末端キメラ体が完全長のG_{α16}と同様な特性を示すときには、様々なレセプターをフェロモン応答経路に共役させることが期待できる。本発明者らは、上記の機能的キメラ体の発現に用いたのと同じ動原体性ベクターから誘導されるGpa1/G_{α16}のC-末端ドメインキメラ体をコードするプラスミドを構築した(pRS314-Gpa1/G_{α16}; 図5(b); 図6(h))。Gpa1/G_{α16}キメラ体を発現するMMY9細胞でのFUS1-LacZ誘導の水準を、細胞抽出物を調製して、これらをLacZ基質であるオ-ニトロフェニルβ-D-ガラクトピラノシド(ONPG; 材料および方法を参照)と共にインキュベーションすることによって測定した。Gpa1/G_{α16}は、FUS1-LacZ発現を減少させ、β-ガラクトシダーゼ活性は79±8単位となった(表2)。この水準は、G_αが存在しないため経路が構成的に活性化されるベクターで形質転換した対照細胞の活性(239±30単位)と、野生型Gpa1pを産生する細胞での基礎活性(19±4単位)との中間であった。従って、フェロモン応答経路は部分的に活性化され、GPA1プロモーターからのGpa1/G_{α16}の発現を指定するこの構築体は、総ての遊離G_β/G_γを隔絶することができないことを示している。

【0041】

【表2】

表2：Gpa1/G_{α16}は酵母G_β/G_γと結合するが、Ste2pレセプターの共役を支持することはできない。

Gタンパク質	プロモーター	α-因子なし	α-因子添加	n
ベクター		239±30	224±44	5
GPA1	GPA1	19±4	273±49	3
GPA1/G16	GPA1	79±8	79±4	3
GPA1/G16	TEF1	23±5	24±8	5
GPA1/G16	GPD1	16±4	13±4	3

【0042】

本発明者らは、一層強力なTEF1およびGPD1プロモーターからGpa1/G_{α16}を発現するため、構築体を更に作成した。これらは、FUS1-lacZ発現をGpa1p産生細胞に匹敵する水準に減少させた(表1)。図3において、様々なGpa1/G_{α16}発現構築体で形質転換したMMY9細胞または対照プラスミドをヒスチジンを補足した非選択的寒天プレート(パネルA)およびヒスチジンを欠きかつ3-アミノトリアゾールを補足した選択的寒天プレート(パネルB)にストリークした。TEF-Gpa1/G_{α16}およびGPD-Gpa1/G_{α16}発現構築体は、FUS1-HIS3レポーター遺伝子発現を減少させ、野生型GPA1を発現するポジティブコントロールプラスミド(pRS314-GPA1)と同様にヒスチジン選択的培地上での成長を防止した。対照的に、GPA1プロモーターを用いるGpa1/G_{α16}発現構築体(pRS314-Gpa1/G_{α16})は、ベクター形質転換細胞(対照)を用いる場合と同様にヒスチジン選択的条件下で成長を防止するのに十分にはFUS1-HIS3発現を減少させることはできなかった。この結果は、上表にまとめたONPGアッセイの結果と一致し、従って、2個のレポーター遺伝子、FUS1-lacZおよびFUS1-HIS3は同様な挙動を示す。

【0043】

しかしながら、Gpa1/G_{α16}発現構築体のいずれを用いても、Ste2pレセプターは、細胞をα-因子で処理してもFUS1-LacZを誘導しないので、フェロモン応

答経路に共役するとは思われなかった（表1）。G p a 1 / G _{α 1 6} と組合わせて他のレセプター（M L _{1 B}、5 - H T _{1 A}、P 2 Y ₂ または S S T ₂）を発現する M M Y 9 細胞も、F U S 1 - L a c Z のアゴニスト依存性誘導は示さなかった（データは示さず）。従って、G p a 1 / G _{α 1 6} は、酵母 G _β / G _γ 粒子がフェロモン応答経路を活性化するのを、恐らくは G タンパク質三量体に構築することによって防止することができるが、活性化レセプターの存在下では遊離 G _β / G _γ は放出されない。明らかに、G p a 1 p の N - 末端領域に融合した哺乳類 G _α サブユニットから誘導される大きな C - 末端ドメインを含むこの種のキメラ体を構築する方法は、一般的には総ての G _α サブユニットには適用可能ではないが、幾つかの G _α サブユニット（G _{α i} ファミリーおよび G _{α s}）では上手く行くが、他のもの（例えば、G _{α 1 6}）では上手く行かない。G p a 1 / G _{α 1 6} は、完全長 G _{α 1 6} の重要な特性、すなわち他の G _α サブユニットよりずっと広範囲のレセプターと共役する特性を欠いている。この実験では、G p a 1 / G _{α 1 6} の C - 末端ドメインキメラタンパク質が細胞中に産生され、従って G タンパク質と共役したレセプターをフェロモン応答経路に共役することができないのは、レセプターとこの G _α サブユニットとの不適合性によることが確かめられている。

10

【0044】

G p a 1 / G _{α s} キメラ体は、酵母ホスホグリセレートキナーゼ（P G K 1）遺伝子の強力な構成的プロモーターから発現されるときには、成長ホルモン放出ホルモンレセプター（12）と共役することが報告されている。本発明者らは、上記と同様な G p a 1 / G _{α s} および G p a 1 / G _{α q} キメラ体を構築し（図5B）、それらを G P A 1 遺伝子のプロモーターから M M Y 9 細胞中で発現させた。本発明者らは、上記の O N P G アッセイの代わりに化学発光アッセイを用いてこれらの細胞中の F U S 1 - L a c Z 活性をアッセイした。結果を、表3に示す。前の実験から予想されるように、G P A 1 プロモーターからの G p a 1 / G _{α 1 6} を発現する細胞は、G p a 1 p を発現する対照細胞より著しく高い活性を示した。G p a 1 / G _{α s} および G p a 1 / G _{α q} キメラ体は、これらが G p a 1 p を発現する対照細胞より著しく高い活性を示す点で G p a 1 / G _{α 1 6} と同様である。対照的に、G P A 1 プロモーターからの G p a 1 / G _{α 0}、G p a 1 / G _{α i 1}、G p a 1 / G _{α i 2}、または G p a 1 / G _{α i 3} を発現する細胞は、予想されたように、G p a 1 p を発現する対照細胞に匹敵する活性を含んでいた。この実験では、野生型 G p a 1 p および G p a 1 / G _{α 0} キメラ体だけが、1 μ M の α - 因子と共にインキュベーションした細胞中の F U S 1 - L a c Z 水準を増加させることによって S t e 2 p レセプターと共役した。これは、上記の C P R G アッセイの結果と一致している。この実験では、更に、G p a 1 / G _{α 0}、G p a 1 / G _{α i 1}、G p a 1 / G _{α i 2}、または G p a 1 / G _{α i 3} キメラ体を G P A 1 プロモーターから発現させることができ、活性化レセプターの非存在下ではフェロモン応答経路の活性化を十分低くして、共役を検出することができるが、G p a 1 / G _{α s}、G p a 1 / G _{α q} および G p a 1 / G _{α 1 6} キメラ体は発現されないことが確かめられている。

20

30

【表3】

表3：キメラG_αサブユニットを発現するMMY9細胞でのフェロモン
応答経路の活性

G _α サブユニット	FUS1-LacZ活性	
	α-因子なし	1 μM α-因子
[ベクター]	8.7 ± 2.0	7.4 ± 1.6
Gpa1p	0.73 ± 0.25	27.2 ± 1.7
Gpa1/Gαi1	0.71 ± 0.2	0.68 ± 0.15
Gpa1/Gαi2	0.66 ± 0.33	0.67 ± 0.34
Gpa1/Gαi3	0.50 ± 0.22	0.76 ± 0.23
Gpa1/Gα0	0.44 ± 0.12	0.75 ± 0.069
Gpa1/Gα16	3.6 ± 1.9	3.6 ± 1.5
Gpa1/Gαs	3.1 ± 2.0	5.0 ± 3.0
Gpa1/Gαq	8.2 ± 3.9	9.6 ± 4.1

値は、化学発光β-ガラクトシダーゼアッセイにおける平均値±SD光単位
(light units) (×10⁶ cps) である。n≥5。

【0045】

実験4：移植体法

哺乳類G_αサブユニットのC-末端に対する小さな改質によってレセプター特異性を変化させることができると仮定すれば、上記のキメラ体よりも長いGpa1pのN-末端領域および短い哺乳類G_αサブユニットの領域を用いる融合は、レセプターの特異性を更に変化させることができる(7)(40)(23)(18)。これにより、キメラ体がG_β/G_γに対するアフィニティーを減少させるという問題を回避することができる。本発明者らは、「移植体」と命名される精製した組のGpa1-G_α融合体を作成し、それらを哺乳類G_αのより長い領域を有するキメラ体と識別した(図5(B))。これらの融合体は、G_{α16}(EINLL^{C O O H})、G_{αq}(EYNLV^{C O O H})またはG_{αs}(QYELL^{C O O H})の5個のC-末端残基によって置換されたGpa1pの5個のC-末端残基(⁴⁶⁸KIGII^{C O O H})を有していた(図5(C))。MMY9細胞を、移植構築体と、および更にpDT-PGK(異種レセプターを持たないベクター)またはレセプター発現構築体pDT-PGK-5-HT_{1A}、pFL61-SST₂またはpDT-PGK-P2Y₂と同時形質転換した。実験2と同様に、FUS1-LacZのアゴニスト依存活性化を、CPRGを補足した培地で細胞をインキュベーションすることによって測定し、30℃で24時間インキュベーション後の生成物への転換率を分光光度法によって測定した。結果を、図4A~Dに示す。この実験は、移植体が、MMY9細胞でのFUS1-LacZ発現をGPA1プロモーターから発現するときに基底水準にまで減少させるので、G_β/G_γと効率的に相互作用することができたことを示している。実験2および3のC-末端ドメインキメラ体とは対照的に、Gpa1-G_{α16}、Gpa1-G_{αq}およびGpa1-G_{αs}移植体は総て、活性化Ste2pレセプターをフェロモン応答経路に共役させる能力を保持していたが、用量-応答曲線は、Gpa1pと比較して、移植体はSte2pと余り効率的に相互作用しなかった(Gpa1-G_{αs}、Gpa1-G_{α16}およびGpa1-G_{αq}に対して、それぞれEC₅₀=257±13nM; 75±2nM; 102±5nM)(図4A)。酵母レセプターとは反対にヒトレセプターを用いると、移植体はG_αサブユニット/レセプター相互作用を改良した。Gpa1-G_{αq}移植体は、Gpa1pに比較してP2Y₂レセプターの共役を著しく増強し、P2Y₂は哺乳類細胞中のG_{αq}を介してそのエフェクターホスホリパーゼC_βにシグナルを伝達するという知見と一致している。対照的に、Gpa1-G_{αs}移植体がP2Y₂をフェロモン経路に共役させる能力は、Gpa1pの能力と識別できなかった。

【0046】

Gpa1-G_{α16}は、4個のヒトレセプターの中3個を発現する（SST₂、5-HT_{1A}、およびP2Y₂を発現するが、ML_{1B}は発現しない）細胞のアゴニスト応答を増強した。SST₂レセプターと共にGpa1-G_{α16}移植体を動じ発現するMMY9細胞は、Gpa1pを産生する対照細胞に対して同様な応答を誘導するのに凡そ10分の1のソマトスタチンを必要とする（Gpa1-G_{α16}に対して、EC₅₀ = 27 ± 0.8 nM；Gpa1pに対してEC₅₀ = 430 ± 44 nM）。5-HT_{1A}レセプターは、野生型Gpa1pを介してMMY9細胞にシグナル伝達を行うことはできなかったが、Gpa1-G_{α16}移植体を介してかなり良好にシグナル伝達を行うことができた。SST₂レセプターについては、Gpa1-G_{α16}移植体が最も効率的なG_αであり、5-HT_{1A}およびP2Y₂レセプターについては、Gpa1-G_{α16}移植体は共役を支持することができたが、それぞれGpa1/G_{α0}キメラ体およびGpa1-G_{αq}移植体ほど効率的ではなかった。

10

【0047】

Ste2pα-因子レセプターをコードするSTE2遺伝子が欠失すると、異種発現レセプターの共役効率を増強することができることが報告されている(34)。これは、G-タンパク質三量体についてのレセプター間の競争によるものである可能性がある。本明細書に記載のレセプターとG_αサブユニットの機能についてのレセプター競争の効果を検討するため、本発明者らはMMY9の誘導体であって、STE2遺伝子をG418^R耐性マーカーを用いる組込み分断によって欠失したものを構築した。新規な株を、MMY11と命名した。この株を、MMY9およびMMY11細胞をGpa1p発現構築体pRS314-GPA1（図6(c)）で形質転換する実験に用いて、CPRGアッセイにおいて様々な濃度のα-因子と共にインキュベーションした（図7）。予想されたように、MMY11はα-因子へ応答することはできない。

20

【0048】

MMY11を、上記と同様に、細胞をプラスミドの対であって、一方がG_αサブユニットを発現し、他方がレセプター発現構築体を発現するもので形質転換する実験に用いた。この実験は、本明細書で上記した4個のレセプター発現構築体（pFL61-SST₂、pDT-PGK-ML_{1B}、pDT-PGK-P2Y₂、およびpDT-PGK-5-HT_{1A}）、および4個の他のレセプター発現構築体pDT-PGK-SST₅、pDT-PGK-A_{2b}、pDT-PGK-P2Y₁およびpDT-PGK-5-HT_{1D}を含んでいた。本発明者らは、他の移植構築体を構築して、C-末端の5個のアミノ酸がG_{α0}（GCGLY^{COOH}）、G_{αi1}（DCGLF^{COOH}）、G_{αi3}（ECGLY^{COOH}）、およびG_{α14}（EFNLV^{COOH}）のアミノ酸で置換したGpa1pの改質バージョンを発現させた。これらを、本明細書で上記したG_αサブユニット発現構築体と共にこの実験で用いた。細胞にCPRGアッセイを施し、レセプターとG_αサブユニットとのそれぞれの組合せについてアゴニストに対する濃度応答曲線を決定した。フェロモン応答経路活性化が検出される場合には、半最大応答(half-maximal response)を得るのに要するアゴニスト濃度（EC₅₀ ± 標準誤差；特に断らない限り総ての値はnMで示す）を曲線フィッティング(curve-fitting)によって決定し、表4Aに示す。曲線フィッティングを行うには不十分な弱い活性化が検出される場合には、これを表4Aに示す（弱(weak)）。共役が見られないときには、これもまた示しておく（NC）。

30

40

【0049】

比較のため、表4Bに、MMY9で得られた同様なデータを示す。従って表4Aと4Bの値の差は、異種発現レセプターによるシグナル伝達に対するSte2pの効果によるものと思われる。

【表4】

表 4 A (M M Y 1 1) :

	キメラ体					移植体						
	Gpa1 p	Gpa1/ G α_0	Gpa1/ G α_{11}	Gpa1/ G α_{12}	Gpa1/ G α_{13}	Gpa1/ G α_q	Gpa1/ G α_0	Gpa1/ G α_{11}	Gpa1/ G α_{13}	Gpa1/ G α_s	Gpa1/ G α_{14}	Gpa1/ G α_{16}
SST2	69±2	46±2	91±6	30±2	47±1	weak	65±4	5.6±0.6	1.8±0.1	NC	49±0.5	7.0±0.6
SST5	26±0.8	115±4	137±8	56±3	97±4	66±3	11±0.5	4.9±0.2	3.6±0.2	weak	19±0.5	3.8±0.1
5-HT _{1A}	weak	390±14	11±0.5 μ M	2.5±0.2 μ M	7±0.5 μ M	weak	1.0±0.1 μ M	1.3±0.1 μ M	1.1±0.05 μ M	weak	1.7±0.1 μ M	1.7±0.1 μ M
5-HT _{1D}	NC	2.0±1.1 μ M	3.4±1.6 μ M	355±82	1.8±0.5 μ M	NC	weak	227±20	135±12	NC	NC	weak
ML1B	912±300	weak	weak	407±200	NC	NC	500±200	14±5	26±5	NC	NC	1.4±0.15 μ M
P2Y ₁	NC	NC	NC	NC	NC	27±14 μ M	NC	weak	weak	NC	12±2.5 μ M	NC
P2Y ₂	weak	NC	NC	NC	NC	3.8±0.1 μ M	18±2 μ M	5.2±0.5 μ M	2.0±0.2 μ M	weak	3.3±0.08 μ M	4.64±0.0 μ M
A2B	43±2	NC	NC	NC	NC	197±8	51±2.5	16±0.8	87±8	30±2.3	58±1.9	40±3

他に示さない限り値は、n Mを示す。

表 4 B (M M Y 9) :

	キメラ体						移植体					
	Gpa1 p	Gpa1/ G α_0	Gpa1/ G α_{i1}	Gpa1/ G α_{i2}	Gpa1/ G α_{i3}	Gpa1/ G α_q	Gpa1/ G α_0	Gpa1/ G α_{i1}	Gpa1/ G α_{i3}	Gpa1/ G α_s	Gpa1/ G α_{14}	Gpa1/ G α_{16}
Ste2p	5.2±0.4	2±0.1 μ M	weak	21±2 μ M	NC	102±5	31±4	87±1.5	14±2	257±13	288±50	75±2
SST2	430±44	300±38	650±65	300±22	630±30	weak	ND	ND	ND	NC	ND	27±0.8
5-HT _{1A}	NC	2.6±0.4 μ M	weak	weak	weak	weak	ND	ND	ND	weak	ND	weak
ML-1B	5.3±0.3 μ M	weak	weak	1.4±0.2 μ M	NC	NC	ND	ND	ND	NC	ND	weak
P2Y ₂	weak	NC	NC	NC	NC	3.6±0.4 μ M	ND	ND	ND	weak	ND	16±0.6 μ M

他に示さない限り値は、n Mを示す。 N Dは未測定を示す。

【 0 0 5 0 】

この実験は、実験 2 および 3 に記載のキメラ G p a 1 / G α サブユニットと比較しても、共役効率はこの「移植体」型の改質によって実質的に増強することができることも示している。S t e 2 p レセプターの共役は、総ての移植体によって支持されたが、半最大応答を誘導するには更に高濃度の α - 因子が必要であることによって示されるように、いずれも野生型 G p a 1 p ほど有効ではなかった (表 4 B)。しかしながら、移植体は、一般に半最大応答を誘導するのに要したアゴニストの濃度が低いことによって示されるように、野生型 G p a 1 p (表 4 A) と比較してヒトレセプターの共役を増強した。移植体は、野生型 G p a 1 p と余り変わらない G p a 1 - G α_s を除き、いずれも P 2 Y ₂ シグナル伝

10

20

30

40

50

達を増強した。最も有効なものは、G p a 1-G_{α i 3} 移植体であった。同様に、移植体は、G p a 1 p または G_{α i 1} / o の長い C-末端ドメインを有するキメラ体と比較して、S S T₂、S S T₅、M L_{1 B}、5 H T_{1 D} および A_{2 b} レセプターの共役効率を増強し、E C_{5 0} が 10 分の 1 以下になることも多かった。P 2 Y₁ レセプターは、移植体によってのみフェロモン応答経路に共役することができ、G p a 1-G_{α 1 4} 移植体が最も効率的であった。(G_{α i 1} および G_{α i 2} の C-末端の 5 個のアミノ酸は同一であるので) 哺乳類 G_α 由来の配列の長さのみが異なる G p a 1 / G_{α i 2} キメラ体と G p a 1-G_{α i 1} 移植体とを比較することは有益である。M L_{1 B} および S S T₂ についての E C_{5 0} 値は、G p a 1-G_{α i 1} 移植体では G p a 1 / G_{α i 2} キメラ体でよりも 10 倍以上大きかった。同じ比較は、G p a 1 / G_{α i 3} キメラ体と G p a 1-G_{α i 3} 移植体について行うことができる。明らかに、哺乳類 G_α サブユニットの長さが短いキメラ体の方が、幾つかのレセプターの共役をより効率的に行うことができる。移植体が最適共役効率を示さなかった本研究における唯一のレセプターは、5 H T_{1 A} であり、最も効率的な移植体は G p a 1-G_{α 0} (M M Y 1 1 での E C_{5 0}; 1.0 ± 0.1 μM) であったが、最も効率的共役は G p a 1 / G_{α 0} キメラ体で得られた (M M Y 1 1 での E C_{5 0}; 390 ± 14 nM)。これは、哺乳類レセプターの大半に対して、酵母での最も効率的共役は G_α サブユニットの移植体型で得られることを示している。

【0051】

レセプターと G_α サブユニットとの同一の組合せについて M M Y 9 および M M Y 1 1 で得られた E C_{5 0} を比較すると、S t e 2 p が含まれていないと、共役効率を約 10 倍だけ増強することができることを示している。更に、ある種の和合性に乏しいレセプター / G-タンパク質の組合せに対しては、共役は M M Y 1 1 で見られたが、M M Y 9 では見られず、例えば 5 H T_{1 A} と G p a 1 p であった。これは、Price et al. (34) によって報告された S T E 2 遺伝子の欠失の以前観察された効果と完全に一致しており、上記の結論に影響を与えない。

【0052】

本発明者らは、5 個の C-末端アミノ酸を欠いている切断型 G p a 1 p 分子を発現させるためもう一つの構築体を作成した(図 8 D)。この切断突然変異体は、G_β / G_γ と結合するが、S t e 2 p をフェロモン応答経路に共役させることはできないことが報告されている(11)。予想されたように、この切断型 G p a 1 p 突然変異体の M M Y 9 または M M Y 1 1 細胞での発現により、低水準の F U S 1-L a c Z 活性を生じ、切断型突然変異体が G_β / G_γ と結合できることを示唆している(データは示さない)。C P R G β-ガラクトシダーゼアッセイでは、この突然変異体は S t e 2 p または他のレセプターをフェロモン応答経路に共役させることはできない(データは示さない)。これは、Hirsh et al. (11) の報告と完全に一致しており、G-タンパク質と共役したレセプターとの相互作用における G_α サブユニットの 5 個の C-末端アミノ酸の重要性が確かめられる。

【0053】

本発明者らは、5 個の C-末端アミノ酸が G_{α z} (Y I G L G^{C O O H})、G_{α 1 2} (D I M L Q^{C O O H})、および G_{α 1 3} (Q L M L Q^{C O O H}) のもので置換された G p a 1 p の改質バージョンを発現させるためもう一つの構築体を作成した。p R S 3 1 4-G p a 1-G p a 1-G_{α z}、p R S 3 1 4-G p a 1-G_{α 1 3}、および p R S 3 1 4-G p a 1-G_{α 1 2} 構築体から発現した G p a 1-G_{α z}、G p a 1-G_{α 1 3}、および余り多くはないが G p a 1-G_{α 1 2} 移植体は移植体は、S e t 2 p レセプターと共役することができたが、レセプター活性化の非存在下でも F U S 1-L a c Z の基礎水準の増加と関連しているので、G_β / G_γ を完全に隔絶することはできなかった(図 8)。おそらく、これは G_β / G_γ との相互作用の中断、または内在性酵母タンパク質またはプラスミド安定性の減少(下記参照)による活性化によるものと思われる。定量的免疫ブロッキングは、総ての移植体タンパク質が同様な水準にまで産生されることを示していた。本発明者らは、G p a 1-G_{α z}、G p a 1-G_{α 1 3} および G p a 1-G_{α 1 2} 発現カセットが p R S 3 0 4 に含まれているプラスミドも作成した。プラスミド p R S 3 0 4 は組

10

20

30

40

50

込みベクターであり、一方 pRS314 はエピソーム性の動原体ベクターである。pRS304-Gpa1-G_{αz}、pRS304-Gpa1-G_{α13} および pRS304-Gpa1-G_{α12} 構築体を、MMY11 株の trp1 座への組込みを標的としてこの株へ形質転換した。生成する株は、遊離のエピソーム性プラスミド上に位置している遺伝子ではなく染色体上に位置した遺伝子から Gpa1-G_{αz}、Gpa1-G_{α13} および Gpa1-G_{α12} 移植体を発現した。図 8 に示した実験では、MMY11 細胞を pRS304 または p314 を基礎とした（それぞれ組込みおよびエピソーム性）プラスミドで形質転換して、Gpa1-G_{αz}（図 8A）、Gpa1-G_{α13}（図 8B）および Gpa1-G_{α12} 移植体（図 8C）を発現した。更に、細胞を Yep24-STE2 で形質転換して、STE2 遺伝子を発現したが、これは MMY11 株から欠失されたものであった。様々な濃度の α-因子に応答する Fus1-LacZ の活性化は、CPRG アッセイで測定した。この実験は、移植体発現構築物を染色体へ組込むことにより、レセプター活性化の非存在下で Fus1-LacZ 活性化の基礎水準を減少させることを示している。これにより、ヒトレセプター発現構築物を用いる実験において Gpa1-G_{αz}、Gpa1-G_{α13} および Gpa1-G_{α12} 移植体が異種発現レセプターを共役させる能力について試験することができる（データは示さない）。

10

【0054】

本発明者らは、移植体発現カセットを pRS304 プラスミドへ移し、MMY11 のゲノムへ組込む同じ方法を他の移植体について行った。これにより、Gpa1-G_{α0}、Gpa1-G_{αi1}、Gpa1-G_{αi3}、Gpa1-G_{α14}、Gpa1-G_{αs}、Gpa1-G_{αq}、Gpa1-G_{α16}、Gpa1-G_{αz}、Gpa1-G_{α13}、および Gpa1-G_{α12} 移植体の染色体コピーを発現する一連の株を得た。いずれの場合にも、本発明者らは、EC₅₀ には影響を与えることなくレセプター活性化の非存在下で Fus1-LacZ 活性化の基礎水準を減少させる上記の現象を観察した。本発明者らは、この結果から、エピソーム性 G_α サブユニット構築体は不安定であると結論する。本発明者らは、エピソーム性 G_α プラスミドを含む細胞の個体群において、少数の細胞がこのプラスミドを喪失することがあると仮定している。これらの細胞は、URA3 遺伝子を欠いているので、増殖しない。しかしながら、それらは総ての G_α サブユニットを欠いているので、フェロモン応答経路は構成的に活性化され、LacZ 酵素を蓄積する。従って、基礎 Fus1-LacZ 水準の上昇は全個体群で明らかであり、明らかなタンパク質水準の変化は見られない。G_α をコードする遺伝子の組込みコピーでは、これは起こらない。

20

30

【0055】

全範囲の組込み移植体を含む株の組は、薬剤発見に関連すると思われるあらゆる種類の既知哺乳類 G_α サブユニットを表している（G_{αt} および G_{αolif} 移植体は試験しなかった）。同じ移植体の構築法を、将来発見されるあらゆる G_α サブユニットを用いて行うことができる。

【0056】

結論として、この方法は、i) 広範囲の G_α サブユニットに適用可能であり、ii) 特に、G_{α16} に適用可能であり、iii) Gpa1-G_{α16} 移植体は、少なくともある程度まで広範囲のレセプターと相互作用する G_{α16} の特性を有しており、従って、生理学的に関連のある G タンパク質標的が知られていないオーファンレセプターの共役を選択される G_α サブユニットであることができるので、以前に報告された手法に比較して著しい改良法である。

40

【0057】

参考文献一覧

1. Baldwin, J.M. 1994. Current Opinion in Cell Biology 6: 180-190.
2. Beritn, B., et al. 1992. Journal of Biological Chemistry 267: 8200-8206.
3. Blumer, K.J. and J. Thorner, 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 4763-4367.
4. Bourne, H.R. 1997. Current Opinion in Cell Biology 9: 134-142.

50

5. Butkerait, P., et al. 1995. Journal of Biological Chemistry 270: 18691-18699.
6. Cerione, R.A., et al. 1988. J. Biol. Chem. 263: 9345-9352.
7. Conklin, B.R., et al. 1993. Nature 363: 274-276.
8. Fargin, A., et al. 1991. Cellular Signalling 3: 547-557.
9. Hamm, H.E., et al. 1988. Science 241: 832-835.
10. Hamm, H.E., et al. 1987. J. Biol. Chem. 262: 10831-10838.
11. Hirsch, J.P., et al. 1991. Genes & Development 5: 467-474.
12. Kajkowski, E.M., et al. 1997. Journal of Receptor & Signal Transduction Research 17: 293-303. 10
13. Kallal, L. and J. Kurjan. 1997. Molecular & Cellular Biology 17: 2897-2907.
14. Kang, Y.S., et al. 1990. Molecular & Cellular Biology 10: 2582-2590.
15. Kleuss, C., et al. 1993. Science 259: 832-834.

【0058】

16. Kleuss, C., et al. 1992. Science 358: 424-426.
17. Koelle, M.R. 1997. Current Opinion in Cell Biology 9: 143-147.
18. Komatsuzaki, K., et al. 1997. FEBS Letters 406: 165-170.
19. Lambright, D.G., et al. 1996. Nature 379: 311-319.
20. Leberer, E., et al. 1997. Current Opinion in Genetics & Development 7: 59-66. 20
21. Lee, C.H., et al. 1995. Molecular Pharmacology 47: 218-223.
22. Lichtarge, O., et al. 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 7507-7511.
23. Liu, J., et al. 1995. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 11642-11646.
24. Maniatis, T., et al. 1982 「分子クローニング、実験室便覧(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)」, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
25. Miller, J.H. 1972. 「分子遺伝学の実験(Experiments in Molecular Genetics)」, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
26. Milligan, G., et al. 1996. Trends in Pharmacological Sciences 17: 235-237. 30
27. Minet, M., et al. 1992. Plant Journal 2: 417-422.
28. Oliner, J.D., et al. 1993. Nucleic Acids Res. 21: 5192-5197.
29. Onrust, R., et al. 1997. Science 275: 381-384.
30. Palm, D., et al. 1990. FEBS Lett. 261: 294-298.

【0059】

31. Parr, C.E., et al. 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 3275-3279.
32. Parr, C.E., et al. 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 13067.
33. Price, L.A., et al. 1995. Molecular & Cellular Biology 15: 6188-6195.
34. Price, L.A., et al. 1995. Molecular Pharmacology 50: 829-837. 40
35. Rasenick, M.M., et al. 1994. J. Biol. Chem. 269: 21519-21525.
36. Simonds, W.F., et al. 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 7809-7813.
37. Slater, M.R. and E.A. Craig. 1987. Molecular & Cellular Biology 7: 1906-1916.
38. Tesmer, J.J., et al. 1997. Cell 89: 251-261.
39. Van Cop, C., G. et al. 1984. J. Biol. Chem. 259: 23-26.
40. Voyno-Yasenetskaya, T., et al. 1994. J. Biol. Chem. 269: 4721-4724.
41. Wall, M.A., et al. 1995. Cell 83: 1047-1058.

【図1】 改質酵母(*S. cerevisiae*)MMY 9株のアゴニスト依存性成長。4種類のヒトGタンパク質に共役したレセプターの一つを発現する細胞は、これらのレセプターが内因性酵母G α サブユニット(Gpa1p)と相互作用して、これを活性化することができることを示している。

【図2a】 レセプターを発現する細胞と別種の改質G α サブユニットを用いるレセプターアゴニストに応答するFUS1-lacZレセプター遺伝子の誘導。

【図2b】 レセプターを発現する細胞と別種の改質G α サブユニットを用いるレセプターアゴニストに応答するFUS1-lacZレセプター遺伝子の誘導。

【図2c】 レセプターを発現する細胞と別種の改質G α サブユニットを用いるレセプターアゴニストに応答するFUS1-lacZレセプター遺伝子の誘導。

10

【図2d】 レセプターを発現する細胞と別種の改質G α サブユニットを用いるレセプターアゴニストに応答するFUS1-lacZレセプター遺伝子の誘導。

【図3】 Gpa1/G α_{16} キメラ体(G α_{16} 由来の大きなC-末端ドメインを含む)を発現する構築体は、FUS1-HIS3レポーター遺伝子発現を基底水準まで減少させることを示す。

【図4a】 C-末端の5個の残基が改質されたGpa1p(移植体)によって伝達されるレセプターアゴニストによるFUS1-lacZレポーター遺伝子のアゴニスト依存性活性化を示す。

【図4b】 C-末端の5個の残基が改質されたGpa1p(移植体)によって伝達されるレセプターアゴニストによるFUS1-lacZレポーター遺伝子のアゴニスト依存性活性化を示す。

20

【図4c】 C-末端の5個の残基が改質されたGpa1p(移植体)によって伝達されるレセプターアゴニストによるFUS1-lacZレポーター遺伝子のアゴニスト依存性活性化を示す。

【図4d】 C-末端の5個の残基が改質されたGpa1p(移植体)によって伝達されるレセプターアゴニストによるFUS1-lacZレポーター遺伝子のアゴニスト依存性活性化を示す。

【図5】 本発明の研究に用いたG α サブユニット構築体の模式的表現。スイッチドメインには、陰影を付けている。括弧内の数字は、野生型G α サブユニットのアミノ酸数を表す。B)のGpa1/G α キメラ体は、下記のようなC-末端領域(区画を設けた)を含んでいた: G α_{i1} (212~354), G α_{i2} (213~355), G α_{i3} (212~354), G α_0 (213~354), G α_{16} (221~374), G α_s (235~394), G α_q (211~353)。

30

【図6a】 本発明の研究に用いたある種のプラスミド構築体の模式的表現(プラスミドマップ)。

【図6b】 本発明の研究に用いたある種のプラスミド構築体の模式的表現(プラスミドマップ)。

【図6c】 本発明の研究に用いたある種のプラスミド構築体の模式的表現(プラスミドマップ)。

【図6d】 本発明の研究に用いたある種のプラスミド構築体の模式的表現(プラスミドマップ)。

40

【図6e】 本発明の研究に用いたある種のプラスミド構築体の模式的表現(プラスミドマップ)。

【図6f】 本発明の研究に用いたある種のプラスミド構築体の模式的表現(プラスミドマップ)。

【図6g】 本発明の研究に用いたある種のプラスミド構築体の模式的表現(プラスミドマップ)。

【図6h】 本発明の研究に用いたある種のプラスミド構築体の模式的表現(プラスミドマップ)。

【図7】 アゴニストである α -因子を用いるインキュベーションに応答してpRS31

50

4-Gpa1で形質転換したMMY9 (STE2) およびMMY11 (Δ STE2) 細胞におけるFUS1-lacZレポーター遺伝子の活性を示す。

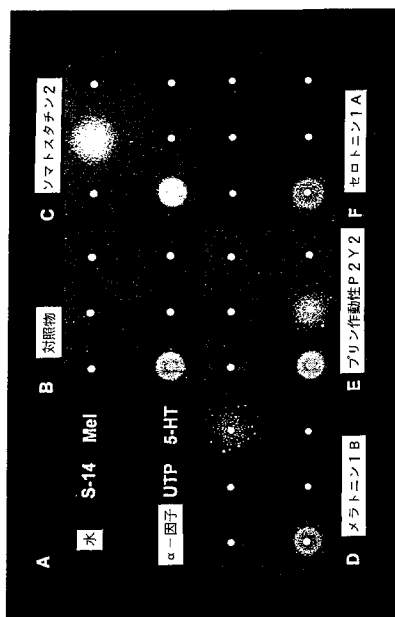
【図8a】 移植体Gpa1-G_{αz} (図8a)、Gpa1-G_{α13} (図8b)、およびGpa1-G_{α12} (図8c)を発現するエピソーム性または組込み構築体を含む同質遺伝子の酵母株の比較を示す。細胞は、プラスミド (Yep24-STE2) で形質転換してSte2pを発現して、α-因子にตอบสนองしてFUS1-lacZレポーター遺伝子の活性化を欠失することができるようにすること以外は内在性STE2遺伝子を欠失した。

【図8b】 移植体Gpa1-G_{αz} (図8a)、Gpa1-G_{α13} (図8b)、およびGpa1-G_{α12} (図8c)を発現するエピソーム性または組込み構築体を含む同質遺伝子の酵母株の比較を示す。細胞は、プラスミド (Yep24-STE2) で形質転換してSte2pを発現して、α-因子にตอบสนองしてFUS1-lacZレポーター遺伝子の活性化を欠失することができるようにすること以外は内在性STE2遺伝子を欠失した。

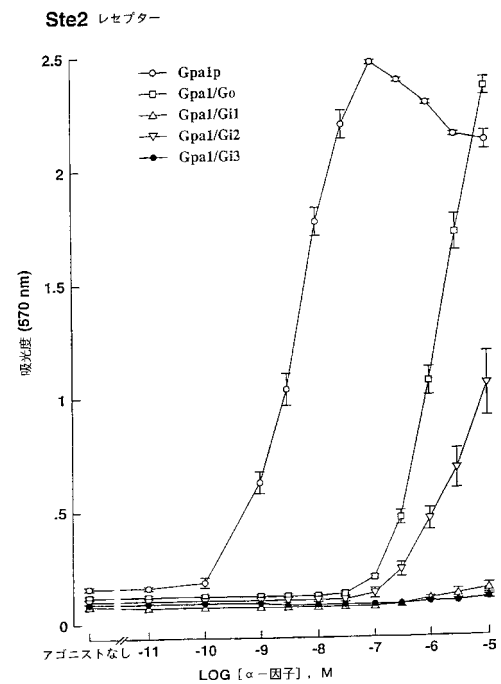
【図8c】 移植体Gpa1-G_{αz} (図8a)、Gpa1-G_{α13} (図8b)、およびGpa1-G_{α12} (図8c)を発現するエピソーム性または組込み構築体を含む同質遺伝子の酵母株の比較を示す。細胞は、プラスミド (Yep24-STE2) で形質転換してSte2pを発現して、α-因子にตอบสนองしてFUS1-lacZレポーター遺伝子の活性化を欠失することができるようにすること以外は内在性STE2遺伝子を欠失した。

10

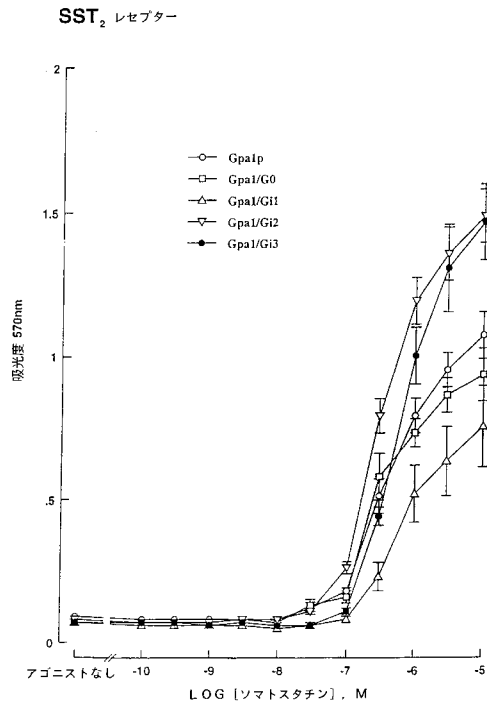
【図1】



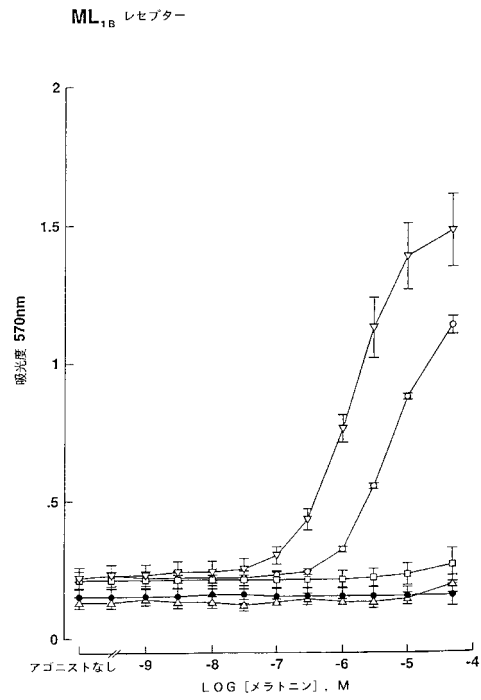
【図2a】



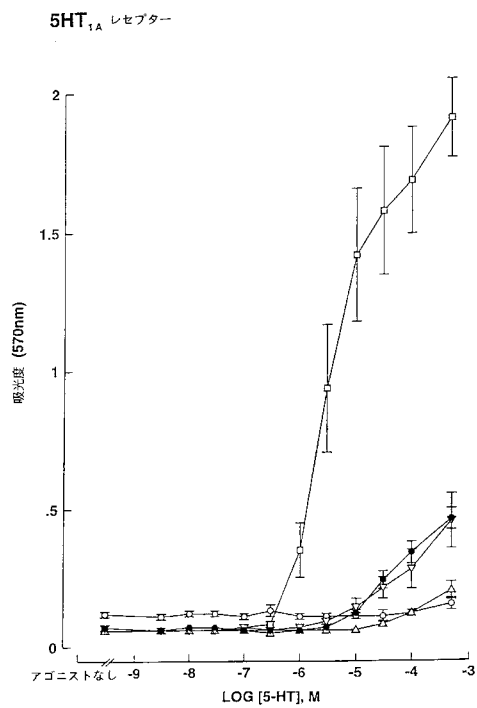
【図 2 b】



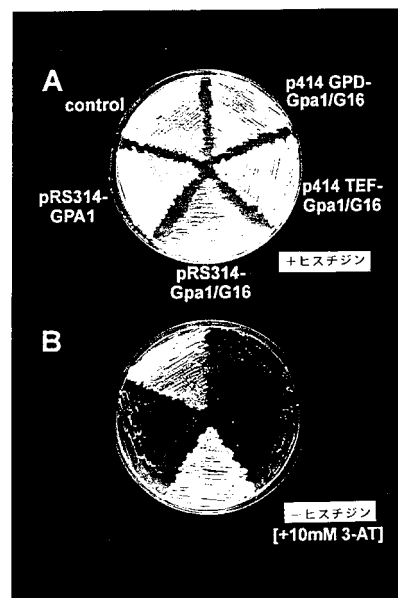
【図 2 c】



【図 2 d】

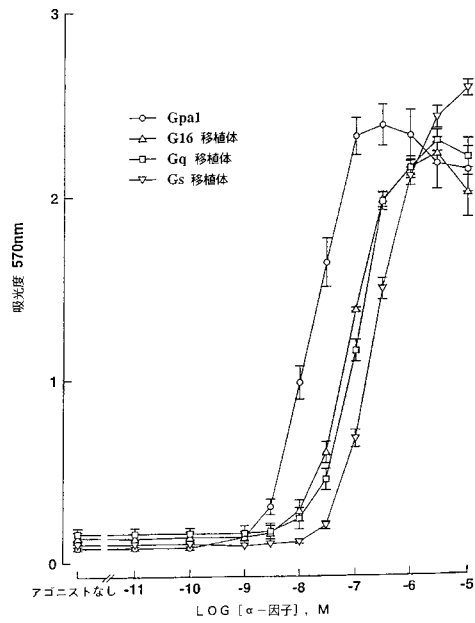


【図 3】

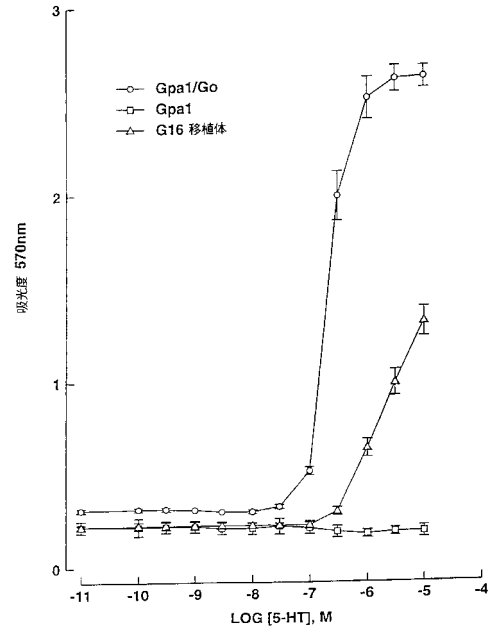


【図 4 a】

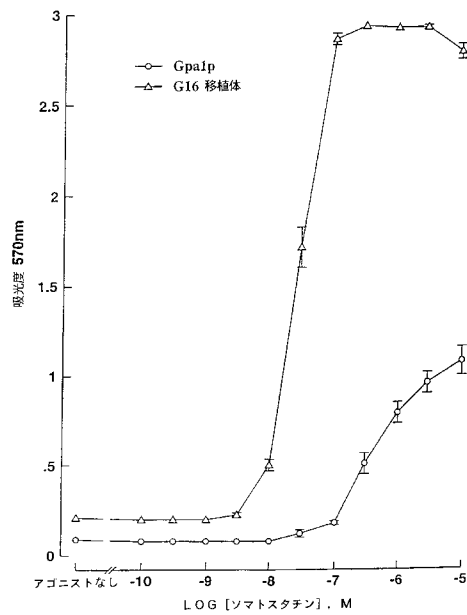
Ste2 レセプター



【図 4 b】

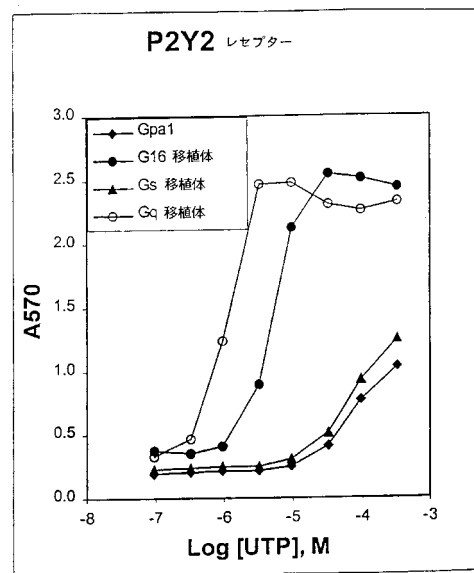
5HT_{1A} および G16 移植体

【図 4 c】

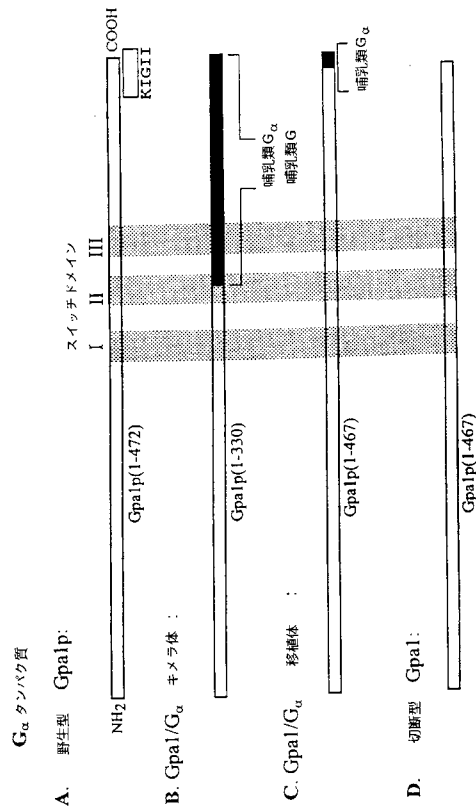
SST₂ レセプター

【図 4 d】

P2Y2 レセプター



【図 5】



【図 6 a】

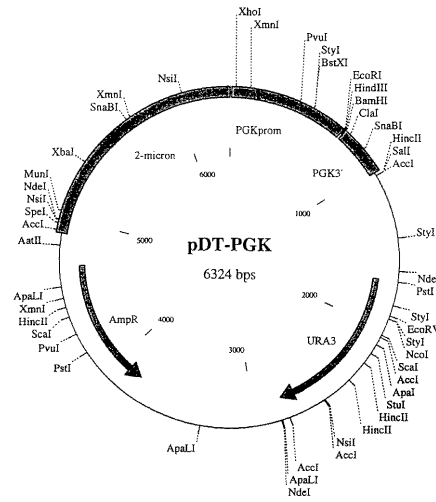


FIG. 6(a)

【図 6 c】

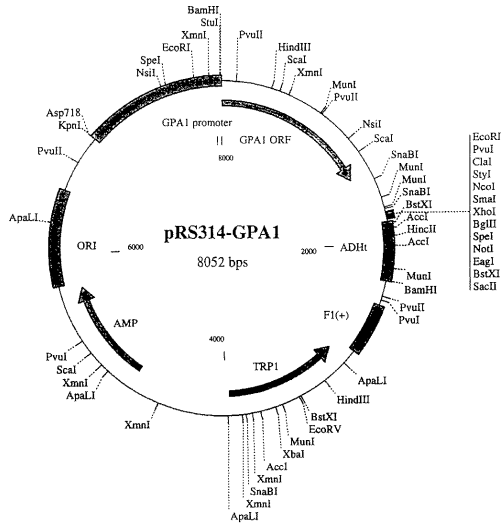


FIG. 6(c)

【図 6 d】

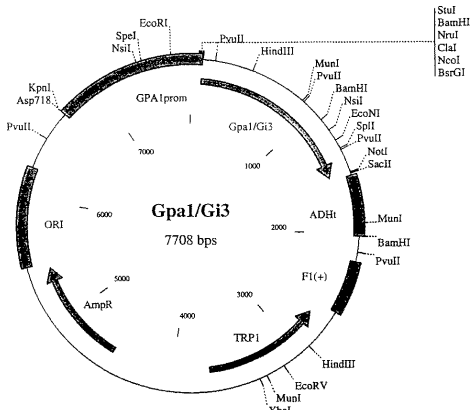


FIG. 6(d)

【図 6 e】

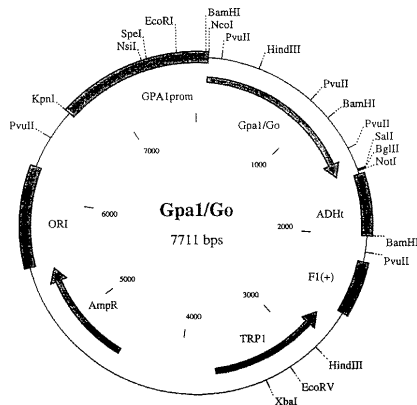


FIG.6(e)

【図 6 f】

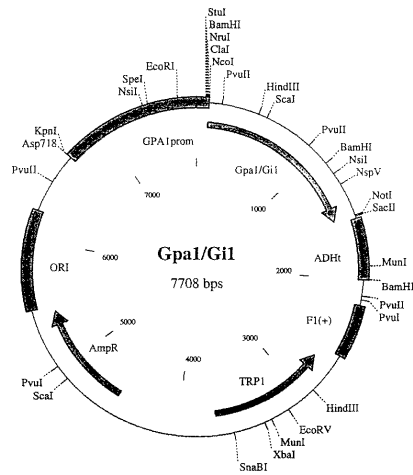


FIG.6(f)

【図 6 g】

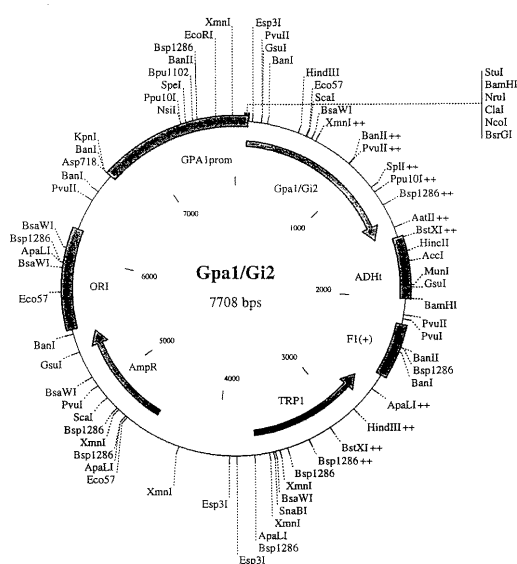


FIG.6(g)

【図 6 h】

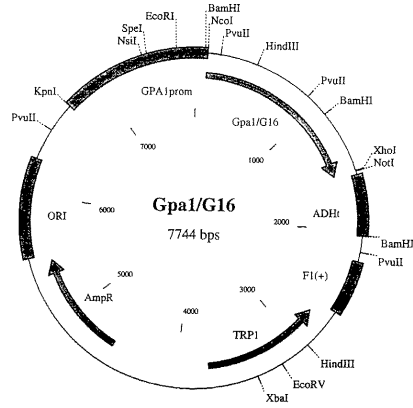
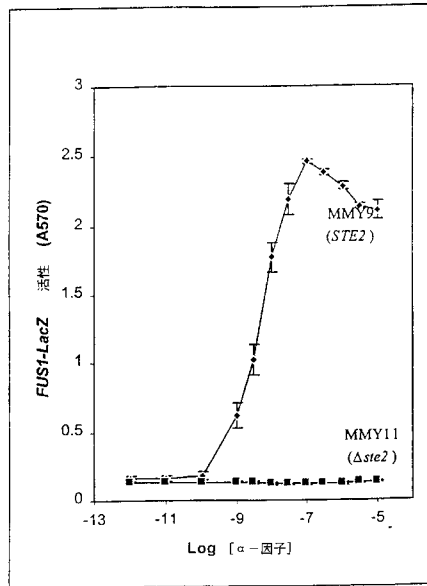
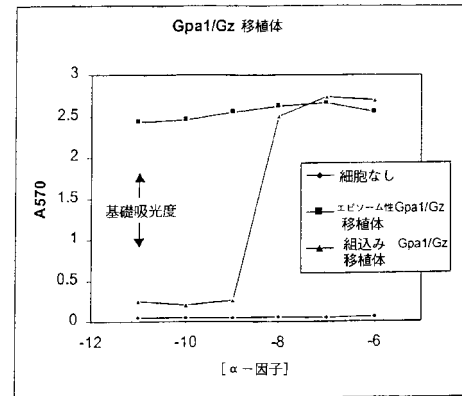


FIG.6(h)

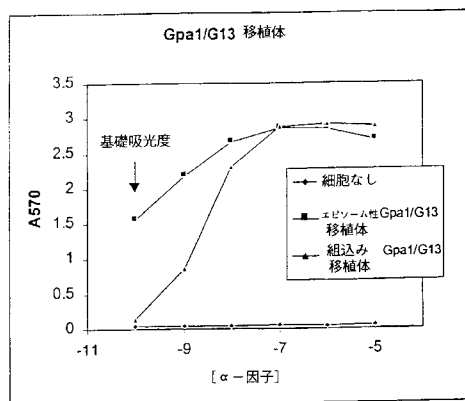
【図 7】



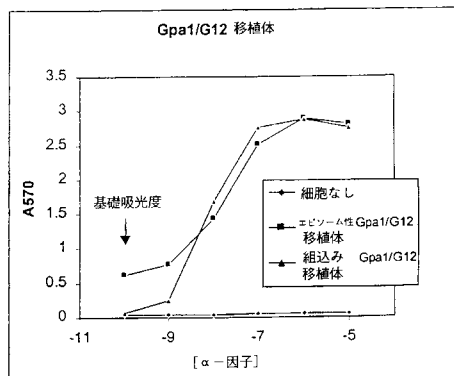
【図 8 a】



【図 8 b】



【図 8 c】



フロントページの続き

(74)代理人 100067079

弁理士 小野寺 捷洋

(74)代理人 100091487

弁理士 中村 行孝

(74)代理人 100111730

弁理士 伊藤 武泰

(72)発明者 アンドリュー、ジェイムズ、ブラウン

イギリス国ハートフォードシャー、スティブネージ、ガンネルズ、ウッド、ロード、グラクソ、ウエルカム、ピーエルシー内

(72)発明者 サイモン、ジェレミー、ダウエル

イギリス国ハートフォードシャー、スティブネージ、ガンネルズ、ウッド、ロード、グラクソ、ウエルカム、ピーエルシー内

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 国際公開第9 5／0 2 1 9 2 5 (WO, A 1)

FEBS Lett., 1 9 9 7年 4月, vol.406, no.1-2, p.165-170

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00-15/90

C07K 14/47

C07K 19/00

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed