

論文の内容の要旨

論文題目 転移交差飽和法を用いたケモカイン受容体 CCR5 とそのリガンドとの相互作用解析

氏名 平井 隆寛

【序】

ケモカインは、低分子量の蛋白質であり、標的細胞上のレセプターを介してシグナル伝達を誘起し、走化性などに関与することが知られている。ケモカインレセプターはいずれも 7 回膜貫通型受容体であり、G 蛋白質共役型受容体に属する (Fig.1)。

近年、ケモカイン受容体の一つ CCR5 が、HIV-1 の標的細胞への感染時に CD4 とともに共受容体として作用することが明らかにされた。HIV の感染は、CCR5 の本来のリガンドである RANTES によって競合的に阻害されることから、CCR5 とそのリガンドとの相互作用メカニズムの解明により CCR5 をターゲットとした HIV 阻害剤の開発に重要な知見が得られると期待されている。

CCR5 は分子量約 42kDa で、7 つの膜貫通ヘリックスをもち、リガンドとの結合には細胞外領域の高次構造が深く関与している。一方、RANTES は 68 残基からなる分子量 7851 のケモカインである。これまでに X 線結晶構造解析・NMR 解析により立体構造の解析がなされ、いずれも dimer 構造として構造が決定されている。

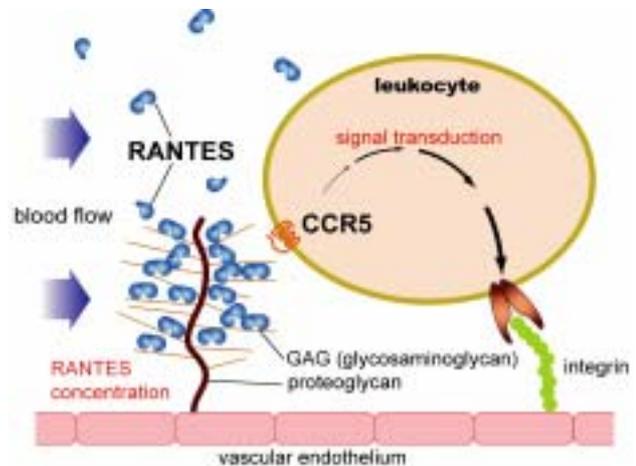


Fig.1 RANTES の CCR5 を介したシグナル伝達
RANTES は細胞表面に存在する糖鎖によって局所的に濃度が増加し、効率よくシグナルを伝達するとされる。

RANTES は血管内皮細胞などの表面に発現している glycosaminoglycan (GAG)と結合し、濃度勾配を形成することが知られている。形成された濃度勾配により、RANTES は中性条件下で非常に強く会合した dimer を形成する。一方で炎症部位では pH が低下しており、RANTES は GAG 上で弱く会合した dimer として存在している。

CCR5 結合時の dimer RANTES の状態を明確にすることは、RANTES と CCR5 の結合メカニズムの解明につながる非常に重要な問題である。しかしながら、これまでに行われた変異実験の結果からは、相反する monomer・dimer 両方の説が提唱されており、明確な結論を得るためには構造生物学的手法による解析が必須である。そこで本研究では、CCR5 と dimer RANTES との相互作用を NMR 法により解析し、RANTES 上の CCR5 結合面およびストイキオメトリーを明らかにすることとした。

【方法】

研究戦略

CCR5 と RANTES との相互作用を構造生物学的手法で解析するには、活性を保持した CCR5 を調製し、生体内に近い状態で NMR 解析を行う必要がある。そのため、NMR 解析に用いるサンプルは可溶化過程を回避して調製し、脂質二重膜に保持された CCR5 を用いて解析することが望ましいと考えられる。

近年、バキュロウイルス発現系において発芽する budded virus (BV) 上に活性を保持した膜蛋白質が移行することが報告された。そこで BV 上に CCR5 を大量発現させ、RANTES との相互作用を NMR 法により観測することとした。

また、BV を試料として用いると、NMR 観測のターゲットは非常に大きな分子量をもった複合体となるため、BV 上に発現した CCR5 と RANTES との複合体を直接観測することはできない。巨大分子との複合体が解析可能な NMR 測定法として、当研究室で確立された転移交差飽和法 TCS 法を用いることとした (Fig.2)。

CCR5 発現 BV の調製

産業技術総合研究所生物情報解析研究センター 清水浩之氏より供与された CCR5 をコードする plasmid を元に、CCR5 の C 末端に 1D4 タグを付加した配列を作成した。CCR5-1D4 をコードした plasmid と Sf9 細胞を用い、相同組み換えにより CCR5-1D4 をコードしたウイルスストックを作成した。ウイルスストックはプラークアッセイにより純化した後、PCR 法により純度を確認した。Sf9 細胞に CCR5-1D4 ウイルスを感染させた後、培養液から細胞を除去した培養上清を遠心することによりウイルス画分を抽出した。ウイルス画分を PBS で懸濁・遠心を繰り返すことにより BV 溶液を精製した。

RANTES の調製

ヒト Th1 細胞 cDNA ライブラリから PCR 法を用いて RANTES をコードする DNA 配列をクローニングし、

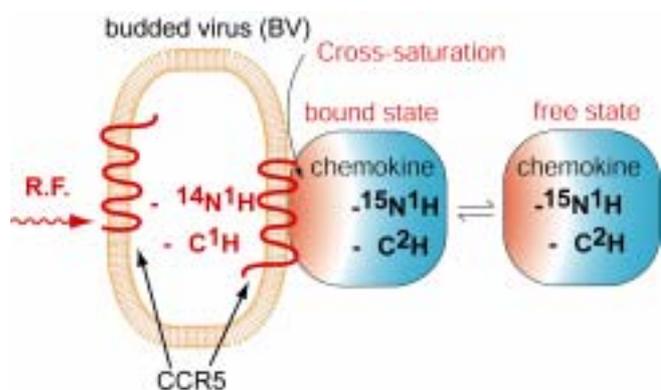


Fig.2 BVを用いたTCS実験

BV との複合体状態で伝播した交差飽和現象を解離状態の RANTES のシグナル強度減少として観測する。

大腸菌を用いた大量発現系を構築した。RANTES は不溶性画分に発現するため、可溶化・リフォールディングの後、陽イオン交換クロマトグラフィー・逆相 HPLC により精製した。RANTES は機能発現する部位で dimer として存在するため、TCS 実験条件として RANTES が dimer で存在する溶液条件を検討した。

TCS 実験

TCS 実験は $100 \mu\text{M}$ ^2H - ^{15}N RANTES / CCR5-BV (500 mL culture) / PBS (pH 3.2) / 80 % $^2\text{H}_2\text{O}$, 313 K の条件下 800 MHz の測定周波数で行った。

【結果】

BV 上に発現した CCR5 の定量

抗 1D4 抗体を用いたウェスタンブロットングにより精製した BV を分析したところ、BV 上への CCR5-1D4 の発現と、精製により均一な CCR5 が得られていることが確認された (Fig.3)。また、デンストメトリーによる定量から、500 mL の昆虫細胞培養液から少なくとも $5 \mu\text{g}$ 程度の CCR5 が得られることが明らかとなった。

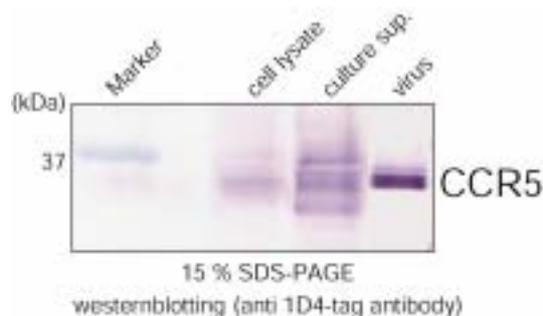


Fig.3 CCR5-BV の発現

抗 1D4 抗体を用いたウェスタンブロットングにより CCR5 の BV 上への発現を確認した。

RANTES の構造情報取得

精製した RANTES は逆相 HPLC による分析で単一ピークを与える純度であることを確認した。TCS 実験に用いるサンプルとして重水素標識された RANTES を調製し、1L の大腸菌培養液あたり約 3mg を調製することができた。 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを観測し、調製した RANTES が正しい立体構造を保持していることを確認した。RANTES の HSQC スペクトルを測定する条件を検討した結果、RANTES が pH と濃度に依存して会合状態を変化させることが確認され、monomer - dimer 平衡の調節が可能となった。炎症部位では RANTES は GAG 上で dimer となっていることが考えられるため、RANTES が dimer で存在する条件を検討した。その結果、 $100 \mu\text{M}$, pH3.2 の条件で TCS 実験を行うこととした。

TCS 実験結果

RANTES の dimer シグナルのみが観測される条件で RANTES と CCR5 発現 BV (CCR5-BV) に対して TCS 法を適用し、I15・V49 など一部の残基がシグナル強度減少を示すことが明らかとなった。シグナル強度減少率を各残基に対して算出し、RANTES dimer の立体構造上にマッピングした。その結果、溶媒から遮蔽されていると考えられる領域にもシグナル強度減少が観測されていることが明らかとなった。そこで、RANTES dimer 中の monomer コンポーネントに同様のマッピングを行った。

その結果、図に示した主に 3 箇所領域にシグナル強度減少を示した残基が分布した。コントロール実験として、CCR5 を発現していない BV (mock-BV) および CXCR4-BV との TCS 実験を行ったところ、CCR5-BV との TCS 実験でシグナル強度減少を示した領域のうち、2 箇所については mock-BV・CXCR4-BV においてもシグナル強度減少を示した。このことから、この領域が非特異的な BV 表面への結合に関与しており、CCR5 に対する特異的な結合には I15・V49 などで形成される領域が関与していることが明らかとなった。

TCS 実験の結果 CCR5 結合面であると特定された領域を RANTES の dimer 界面と比較したところ、dimer 界面の残基が CCR5 との結合に関与していることが明らかとなった(Fig.4)。

以上の結果から、RANTES が CCR5 と結合する際、RANTES は dimer 界面近傍の残基で CCR5 と相互作用し、dimer から monomer に解離した状態で結合していると結論した。

【考察】

RANTES の CCR5 結合メカニズム

近年、蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET)法の開発などにより、CCR5 が dimer として細胞上に存在し、dimer CCR5 が細胞内にシグナル伝達を誘起することが明らかにされた。また、dimer 受容体の一方のみにリガンドが結合しただけではシグナル伝達が起こらず、シグナル伝達を誘起するためには、2分子のリガンドが同時に dimer を形成する受容体に結合する必要があることが明らかにされた。

以上の報告から、CCR5 は dimer で存在し、dimer に同時にリガンドが結合することによってシグナル伝達誘起されるというメカニズムを考えた。CCR5-RANTES の系では、RANTES が機能発現する細胞表面上で dimer を形成しているため、CCR5 dimer の同時刺激に有利であると考えられる。

RANTES の dimerization による炎症部位特異的な活性発現

CCR5 は炎症部位のみならず、非炎症部位にも広く発現している。炎症部位は非炎症部位と比較して低い pH を示し、低い pH においては RANTES の dimer 形成能が低下する。中性条件では強く会合した dimer が形成され、CCR5 結合面がマスクされて CCR5 と結合できないのに対し、酸性条件では dimer が緩み、CCR5 近傍で monomer に解離して dimer CCR5 を同時に刺激する。このように、dimer RANTES の dimer 界面を用いた受容体刺激では、炎症部位選択的シグナル伝達が可能となる。

【総括】

本研究において、BV システムと TCS 実験を組み合わせることで、RANTES-CCR5 の相互作用解析に成功した。ここで開発した両手法の組み合わせは、本実験系に限らず、他のリガンド・受容体膜蛋白質に応用することが可能であると考えられる。

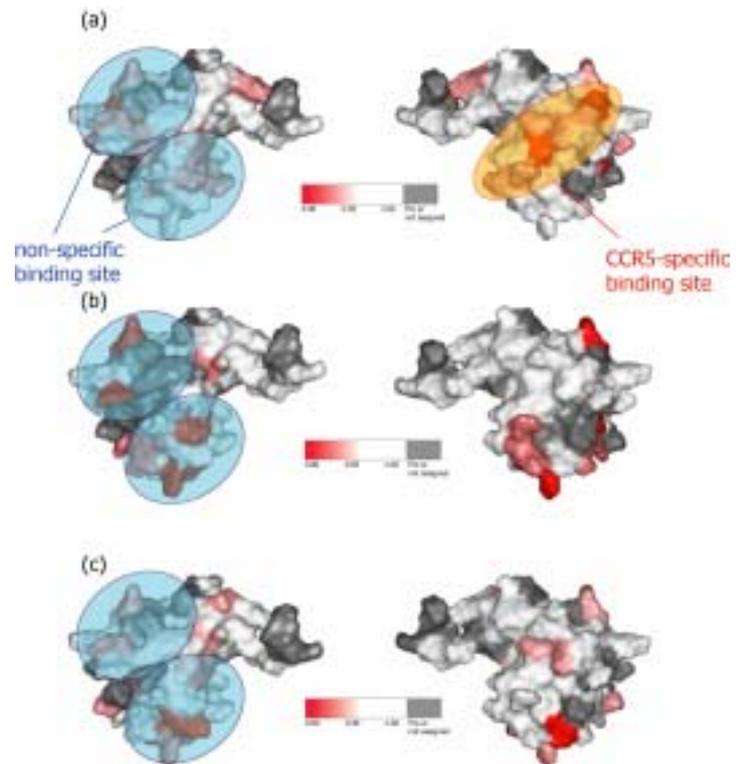


Fig.4 CCR5-BV を用いた TCS 実験結果

(a) CCR5-BV との TCS 実験結果

(b) CXCR4-BV との TCS 実験結果

(c) mock-BV との TCS 実験結果

シグナル強度減少の大きさに応じて RANTES の分子表面上に色付けた。コントロール実験と比較することにより、CCR5 との特異的な相互作用部位を特定した。