

論文の内容の要旨

論文題目 MD-2 蛋白質によるリポ多糖認識に関する構造生物学的研究

氏 名 大戸 梅治

【背景と研究目的】 免疫機構は獲得免疫系と自然免疫系に分類される。獲得免疫に関しては、抗原に対する高い親和性と選択性を抗体が担っている。一方、自然免疫に関しては Toll-like receptor (TLR)ファミリーがその役割を担い、様々な病原体に対する感染防御反応を誘起する。

ヒトMD-2は2ヶ所の糖鎖結合可能部位を含むアミノ酸残基160個から成る分泌蛋白質であり、アミノ末端に16残基のシグナルペプチドを有する。MD-2はTLR4と会合し、この複合体がグラム陰性細菌のエンドトキシンであるリポ多糖(LPS)の活性中心本体のlipid Aを認識することによって活性化し、細菌などの感染から生体を防御している。一方、過度のLPSに暴露した際にはエンドトキシンショックによる敗血症を惹起する。

本研究では、ヒトMD-2蛋白質の三次元構造をX線結晶構造解析により解明し、さらにlipid Aのアンタゴニストであるlipid IVaとの複合体の構造から、MD-2によるLPS認識に関する構造生物学的知見を得ることを目的とした。

【MD-2の発現と精製】 アミノ末端にヒスチジンタグとfactor Xa認識配列を付加したヒトMD-2(アミノ酸残基17-160)のcDNAを、メタノール資化酵母*Pichia pastoris*用の発現ベクターの酵母由来のシグナルペプチドである α -mating factor下流に組み込み、組換え体MD-2を発現させた。5ステップのカラムクロマトグラフィー操作、factor Xaによるタグの切断とEndoglycosidase Hfによる糖鎖の短鎖化を経て、SDS-PAGE上で単一のバンドとなるまで精製し、結晶化サンプルとした。この組換え体MD-2はlipid A、lipid IVaとLPSへの結合能を有し、また、MD-2欠損細胞

への添加が LPS 応答を惹起することを確認した。MD-2 に対して当量の lipid IVa を混合した後に陽イオン交換カラムによって lipid IVa 複合体を分取し、結晶化サンプルとした。ゲルろ過カラムの溶出時間は、ネーティブ体、lipid IVa 複合体ともに単量体であることを示す。

【結晶化】 ポリエチレングリコール 8000 を結晶化剤とするハンギングドロップ蒸気拡散平衡法を用いてネーティブ体結晶を析出させた。結晶の空間群は $P4_12_12$ 、格子定数は $a = 53.1 \text{ \AA}$ 、 $c = 111.5 \text{ \AA}$ であり、非対称単位に MD-2 が 1 分子存在する。ポリエチレングリコール 3350 を結晶化剤としてネーティブ体結晶と同型の lipid IVa 複合体結晶 ($a = 52.8 \text{ \AA}$ 、 $c = 110.9 \text{ \AA}$) を析出させた。

【X線結晶構造解析】 回折強度データ測定は、波長 1.0000 \AA の SPring-8 シンクロトロン放射光 X 線を用い、結晶を 100 K の窒素気流中に置いて行った。ネーティブ体結晶 ($25 \mu\text{m} \times 25 \mu\text{m} \times 150 \mu\text{m}$) と、lipid IVa 複合体結晶 ($25 \mu\text{m} \times 25 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$) について、それぞれ 2.0 \AA と 2.2 \AA 分解能までの回折強度データを収集した。

ネーティブ体結晶について、4 種の重原子置換体を調製し、多重重原子同型置換法により初期位相を決定した(表 1)。分解能 2.4 \AA までの平均の figure of merit (m) は m_{centric} が 0.67 で m_{acentric} が 0.61 である。溶媒領域を平均化し、位相を改善した後の電子密度をもとに三次元構造の初期モデルを構築し、結晶構造を最尤推定法により精密化した。さらにネーティブ体の構造を初期モデルとし、lipid IVa 複合体の構造を精密化した(表 2)。

表 1 位相決定の統計値^a

	Native	KI	PCMBS ^b	HgCl ₂	K ₂ PtCl ₄
Data Collection					
Resolution limit (Å)	2.0	2.5	2.4	2.6	3.0
$R_{\text{merge}}(I)^{\text{c}}$	0.105 (0.615)	0.079 (0.571)	0.100 (0.421)	0.097 (0.626)	0.100 (0.451)
Completeness (%)	99.5 (97.8)	98.0 (96.9)	93.6 (62.7)	98.9 (93.0)	97.4 (91.3)
Phasing					
$R_{\text{iso}}^{\text{d}}$		0.171	0.285	0.246	0.225
Number of heavy-atom sites		9	6	6	3
Cullis R (acentric / centric) ^e		0.62 / 0.61	0.63 / 0.59	0.67 / 0.62	0.92 / 0.90
Phasing power (acentric / centric)		1.8 / 1.3	1.7 / 1.3	1.5 / 1.3	0.5 / 0.6

^a The parenthesized values are for the highest resolution shell.

^b *p*-chloro-mercuribenzenesulfonate.

^c $R_{\text{merge}}(I) = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$, where I is observed diffraction intensity.

^d $R_{\text{iso}} = \sum |F_{\text{PH}} - F_{\text{P}}| / \sum F_{\text{P}}$, where F_{PH} and F_{P} are structure amplitudes of the native and derivative datasets, respectively.

^e Cullis $R = \sum |F_{\text{PH} \pm F_{\text{P}}} - F_{\text{H}}| / \sum |F_{\text{PH} \pm F_{\text{P}}}|$, where F_{PH} and F_{P} are structure amplitudes of the native and derivative datasets, respectively, and F_{H} is calculated heavy-atom structure amplitude.

表 2 データ収集と結晶学的構造精密化の統計値^a

	Native	Lipid IVa complex
Resolution range (Å)	48.4–2.0	27.7–2.2
Number of unique reflections	11,389	7,629
$R_{\text{merge}}(I)^b$	0.105 (0.615)	0.100 (0.423)
Completeness (%)	99.5 (97.8)	90.7 (57.9)
Number of non-hydrogen atoms		
Protein	1162	1162
Water	143	89
NAG	28	28
Ligand	48	95
R^c	19.4	20.6
R_{free}^d	24.9	26.3

^a The parenthesized values are for the highest resolution shell.

^b $R_{\text{merge}}(I) = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$, where I is observed diffraction intensity.

^c $R = \sum |F_o - F_c| / \sum F_o$, where F_o and F_c are observed and calculated structure amplitudes, respectively.

^d R_{free} is an R value for a 5% subset of all the reflections, which was not used in the crystallographic refinement.

【MD-2 の三次元構造】 MD-2 は約 40 Å×25 Å×25 Å の単一のドメインから成り、9本のβ鎖(アミノ末端からβ1, β2, β3, β4, β5, β6, β7, β8, β9)を含む。これらの逆平行β鎖は2つのβシートに分かれ、シート1はβ1, β2, β5, β6, β8とβ9, シート2はβ3, β4とβ7から成る。シート1とシート2は互いに約45°の角度をなしている(図1)。これらのシートの間には約15 Å×8 Å×10

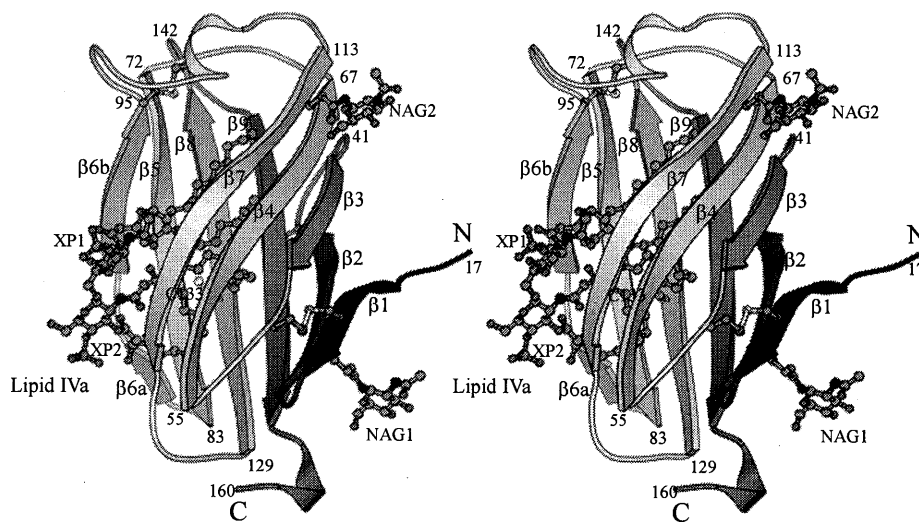


図1. Lipid IVa 複合体構造の全体図(ステレオ図)。MD-2 をリボンモデルで、Lipid IVa 分子、Asn 残基と NAG1 と NAG2, および Cys 残基を ball & stick モデルで示す。

Å の大きな疎水的なポケットが存在する。β6 と β7 の主鎖間は 12 Å 以上の距離があり、このポケットの入り口となっている。このポケット内には、ネーティブ体構造では 3 本の脂肪酸に相当する電子密度が、lipid IVa 複合体では lipid IVa の電子密度が認められた。MD-2 には 7 つのシステイン残基があり、ポケット内にある Cys 133 以外はジスルフィド結合を形成する。糖鎖結合可能部位 Asn 26 と Asn 114 には、結合した *N*-アセチルグルコサミン(NAG1 と NAG2)が認められた。これらの糖鎖はリガンド結合部位からは離れた位置に存在しており、リガンドの認識には直接関与せず、蛋白質の安定性に寄与している。ネーティブ体構造と lipid IVa 複合体構造の平均 *B*-factor はそれぞれ 39 Å² と 37 Å² である。これらの主鎖原子間での根二乗平均差異は 0.3 Å、側鎖原子を含めると 0.7 Å であり、構造の差異は小さい。

【MD-2 による lipid IVa の認識】 図 2 に lipid IVa とその周辺の MD-2 の構造を、図 3 に lipid IVa の化学構造を示す。

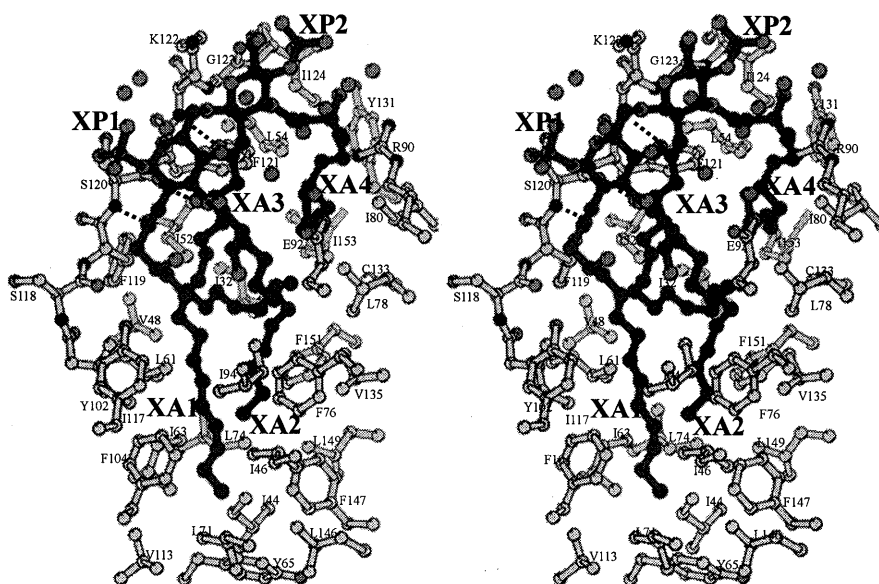


図 2. Lipid IVa の認識の詳細(ステレオ図)。Lipid IVa 分子を濃い灰色で、MD-2 分子を薄い灰色で示す。図は、図 1 を紙面垂直方向に 180° 回転した方向から見たものに相当する。

β7 に沿うように lipid IVa の XP1, XG1, XG2 と XP2 が配置し、XP1 と XP2 のリン原子間の距離は 12.5 Å である。脂肪酸鎖 XA1 と XA3 のカルボニル酸素が Ser 120 と Lys 122 の主鎖の窒素原子とそれぞれ水素結合を形成している。また XA3 の 3-ヒドロキシ酸素が Ser 120 の主鎖のカルボニル酸素と水素結合を形成している。一方、β6 の Arg 90 と Glu 92 の側鎖と lipid IVa の XG2, XP2 の間には 5 個の水分子が存在し、これら側鎖と lipid IVa の間に直接の相互作用は存在しない。MD-2 は等電点 8.7 の塩基性蛋白質であり、分子表面に存在する 18 個のリジンとアルギ

ニンの側鎖が、負電荷を帯びた lipid IVa を静電相互作用によって引きつける役割を果たしている。

Lipid IVa 分子の脂肪酸鎖は、いずれも MD-2 の疎水性なポケットに入り込んでいる。XA1 は 3 方向を疎水性残基に囲まれ最も深くポケットに入り込んでいる。XA1 と XA2 は比較的直鎖状であるのに対し、XA3 と XA4 は曲がった構造をとる。Lipid IVa 分子の平均 *B*-factor は 46 \AA^2 であり、XA1, XA2, XA3 と XA4 ではそれぞれ 33, 46, 41 と 53 \AA^2 である。XA1, XA2, XA3 と XA4 の原子と 4.5 \AA 以内にある MD-2 のアミノ酸残基数はそれぞれ 14, 9, 9 と 9 個である。

これら XA1, XA2, XA3 と XA4 が結合する MD-2 の位置をそれぞれ L1, L2, L3 と L4 部位とすると、ネーティブ体構造においても L1, L2 と L3 部位に脂肪酸鎖が存在する。ネーティブ体のこれら部位に、酵母由来の脂肪酸鎖が充填する形ではまり込んでおり、内在性のリガンドの存在が示唆される。

アゴニストである大腸菌の lipid A では、XA3' と XA4' がさらに余分に付加されている(図 3)。しかし、MD-2 のポケットにさらに脂肪酸鎖を収納する空間は存在しない。結合の様式が lipid IVa と同じならば、lipid A が結合する際には余分な脂肪酸鎖がポケットの外に出る可能性がある。

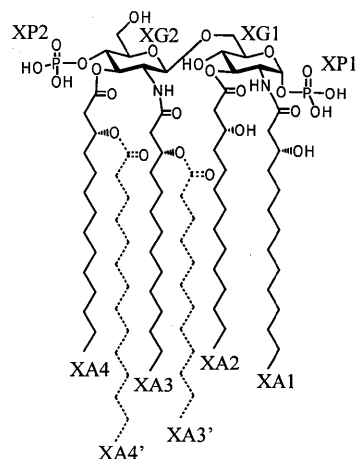


図 3. Lipid IVa の化学構造。実線で示す Lipid IVa 部分に加え、Lipid A では、破線で示す XA3' と XA4' が余分に付加されている。