

審査の結果の要旨

氏名 大戸梅治

獲得免疫では、抗原に対する高い親和性と選択性を抗体が担っている。自然免疫では Toll-like receptor (TLR) ファミリーがこのような認識の役割を担い、様々な病原体に対する感染防御応答を誘起する。

グラム陰性細菌のエンドトキシンであるリポ多糖 (LPS) は自然免疫系を活性化する。これは、LPS の活性中心本体である lipid A を、TLR4 と会合する MD-2 蛋白質と TLR4 の複合体が認識することによるものであり、この認識応答が感染防御応答を引き起こす。過度の LPS に暴露された際には、認識応答はエンドトキシンショックによる重篤な敗血症を惹起する。

本論文の研究では、ヒト MD-2 を調製し、MD-2、および、lipid A のアンタゴニストである lipid IVa との複合体の双方の三次元構造を X線結晶構造解析により解明し、MD-2 が LPS の活性中心を認識する実体であることを明らかにしている。

ヒト MD-2 は、アミノ末端側に 16 アミノ酸残基のシグナルペプチドを有する 160 残基の分泌蛋白質であり、2 ヶ所の糖鎖結合可能部位を有する。これらもあつて、MD-2 を発現させ、構造生物学的な研究を行うことは極めて困難であった。研究では、ヒト MD-2 (アミノ酸残基 17-160) の cDNA に、そのアミノ末端部位の上流にヒスチジンタグと factor Xa 認識配列を付加したタグ付き発現配列を、メタノール資化酵母 *Pichia pastoris* 用の発現ベクターに組み込んだ。その際、酵母由来のシグナルペプチドである α -mating factor の下流に発現配列を組み込み、組換え体タグ付き MD-2 を *P. pastoris* に発現させた。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 による糖鎖の均一短鎖化を経て、SDS-PAGE 上で単一のバンドとなるまで精製して MD-2 を得た。

組換え体 MD-2 は lipid A、lipid IVa と LPS への結合能を有すること、また、MD-2 欠損細胞への MD-2 添加が LPS 応答を惹起することも確認している。MD-2 と lipid IVa を混合し、陽イオン交換カラムによって lipid IVa 複合体を分取し、結晶化用サンプルとした。ゲルろ過カラムの溶出時間および動的光散乱法により、MD-2 自体、lipid IVa 複合体ともに単量体であることを示した。

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 MD-2 自体のネイ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イティブ体結晶と同型の lipid

IVa 複合体の結晶を析出させた。

結晶を 100 K の窒素気流中に置き、波長 1.0000 Å のシンクロトン放射光 X 線を用いて、ネーティブ体結晶と複合体結晶について X 線回折強度データを収集した。ネーティブ体結晶について多重重原子同型置換法により初期位相を決定し、最尤推定法により分解能 2 Å で構造を精密化した。さらに、ネーティブ体構造を初期モデルとし、複合体の構造を分解能 2.2 Å で得た (図 1)。

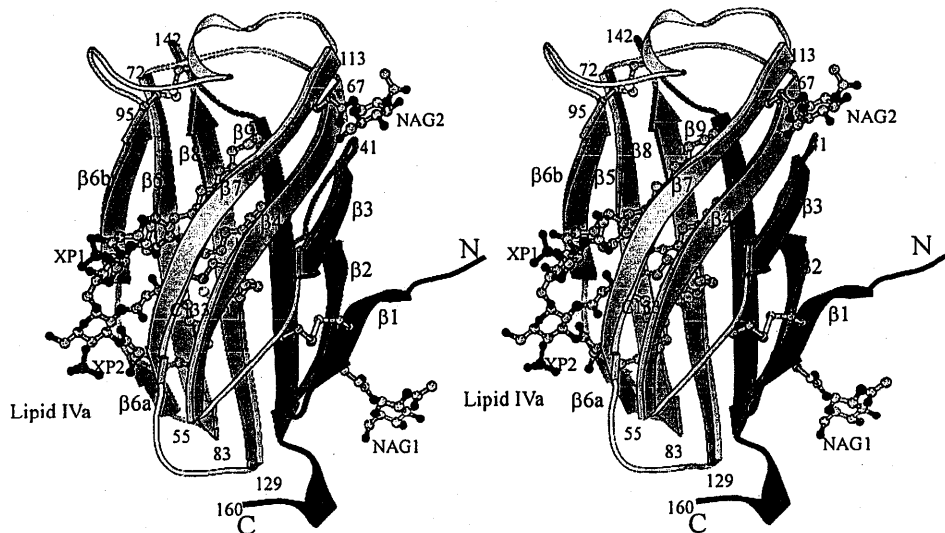


図 1. ヒト MD-2 と lipid IVa 複合体の三次元構造 (ステレオ図)

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 (アミノ末端側からβ1~β9) を含んでいる。これらの逆平行β鎖は、互いに約 45° の角度を成す 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。これらのシートに挟まれて、約 15 Å × 8 Å × 10 Å の大きな疎水的なポケットが存在する。ポケットの入り口にはβ6 とβ7 があり、これらの主鎖は 12 Å 以上も離れている。ポケット内には、ネーティブ体構造では脂肪酸に相当する 3 本鎖の電子密度が、複合体では lipid IVa の電子密度が認められ、これらリガンドの三次元構造も得られた。

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ことを明らかにした。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が認められ、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することから、リガンドの認識には直接関与せず、蛋白質の分泌と安定性に寄与するとしている。ネーティブ体構造と複合体構造の平均 *B*-factor はほぼ等しく、主鎖原子間での根二乗平均差異も 0.3 Å と小さく、アンタゴニスト複合体はネーティブ体との構造の差異が小さい。

Lipid IVa は、2 個の *N*-アセチルグルコサミン (XG1 と XG2) に、2 個のリン酸基 (XP1 と XP2) と 4 本の脂肪酸鎖 (XA1-XA4) が付加された 4-acylated エンド

トキシシン分子である。なお、このものはマウスではアゴニストとして作用する。複合体中では、 $\beta 7$ 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、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。等電点 8.7 の MD-2 の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 の疎水的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っている。XA1, XA2, XA3 と XA4 の原子と 4.5 Å 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、脂肪酸鎖に対応する 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は L1, L2 と L3 部位に脂肪酸鎖 (*P. pastoris* 由来のミリスチン酸に帰着) が存在することから、同様の内在性のリガンドのヒトでの存在を示唆している。

ヒトではアゴニストである大腸菌の lipid A は、糖骨格とリン酸基の部分が lipid IVa と同一で、脂肪酸鎖がさらに 2 分子付加された 6-acylated 分子である。MD-2 のポケットには、4 本を越える脂肪酸鎖を収納する空間が存在しないことから、lipid A の結合の様式が 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を指摘している。

以上のように、本論文では、ヒトの MD-2 蛋白質を発現、精製、結晶化し、その三次元構造の詳細を X 線結晶構造解析により明らかにした。さらに、エンドトキシシンの活性中心本体の lipid IVa と MD-2 の複合体を調製し、その三次元構造も同様に解析した。その結果、エンドトキシシンを認識する実体が MD-2 であり、エンドトキシシン-MD-2 複合体が TLR4 と会合することにより自然免疫系が活性化されることを明らかにした。本論文におけるヒト MD-2, および、アンタゴニストである lipid IVa との複合体の構造研究は、重篤な敗血症の治療薬の開発への新たな指針を与えるものであり、構造生物学、蛋白質工学、免疫学、および薬学に寄与するところが大きい。よって、本論文は博士（薬学）の学位の授与に値する内容を有すると認める。