

論文の内容の要旨

論文題目 oligomer 化状態に制御されたケモカイン受容体とケモカインの相互作用の変化についての解析

氏 名 中田 國夫

【序】

ケモカインはサイトカインファミリーに属する、約 10 kDa の低分子量蛋白質である。免疫細胞に発現したケモカイン受容体と結合し、ケモタキシスや細胞接着、細胞分化などを引き起こすシグナル伝達を誘起する。ケモカインは炎症部位への免疫細胞の誘導、恒常性の維持などを司る。HIV(Human Immuno-deficiency Virus)が、免疫細胞に侵襲する際、ケモカイン受容体 CCR5 と CXCR4 を、CD4 と共に共役受容体とすることが報告された。興味深いことに、ケモカイン共存下では、HIV とケモカイン受容体の相互作用が阻害される。よって、ケモカインとケモカイン受容体の相互作用を構造生物学的に解明することは、創薬の観点からも重要である。

ケモカイン受容体 CCR5 は、分子量 40.6 kDa の 7 回膜貫通型の GPCR(G-protein-coupled receptor)である。RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β をリガンドとして、ケモタキシスや細胞接着を誘起するシグナル伝達を誘起する。野生型 CCR5(wtCCR5)が dimer 構造を取ってシグナル伝達活性を持つが、CCR5 dimer の protomer を monomer 化した CCR5 I52V/V150A(mCCR5)がシグナル伝達活性を持たないことを、Mellado ら(M. Mellado *et al*, *Nat. Immunol.*, 2004)は報告した。CCR5 を含む GPCR は、dimer と monomer の平衡状態にあるといわれており、dimer 状態と monomer 状態の変化により、シグナル伝達が制御されると考えられている。しかしながら、dimer 状態と monomer 状態の変化が、シグナル伝達を制御する構造的メカニズムは明らかになっていない。

そこで、本研究では、CCR5 の dimer 状態、monomer 状態の変化に制御された、RANTES との相互作用を構造生物学的に明らかにすることを目的とした。

【方法】

1. 研究の戦略

CCR5 は分子量 40.6 kDa の膜蛋白質であるため、再構成した後 NMR により解析する構造生物学的な研究方法の適用が困難である。GPCR を含む膜蛋白質の再構成は、失活や分解などを伴うことから困難であることが知られている。そこで、宿主細胞に発現した組み換え蛋白質を発芽ウイルス(Budded Virus: BV)に呈示する BV システムを利用して、CCR5 を再構成することにした。また、当研究室では、受容体などの巨大分子と低分子リガンドの相互作用を、リガンド側に転写して解析する転移交差飽和法 (Transferred Cross Saturation : TCS 法)を開発した。本方法では受容体側の分子量を無視できるので、MDa 程度の巨大分子である BV にも応用できる。

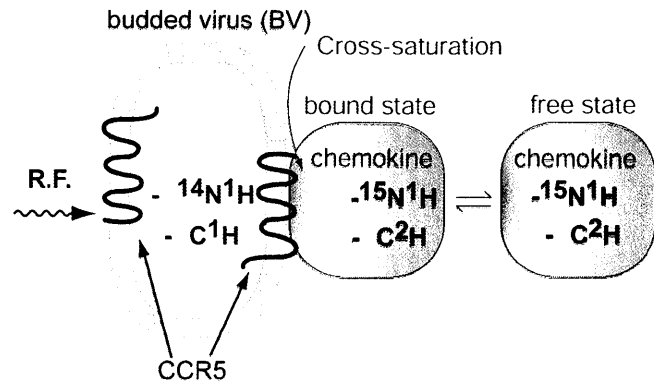


Fig. 1 BV を用いた TCS 実験

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。

2. 試料の調製および NMR 測定

BV システムを利用した wtCCR5 と mCCR5 の調製

当研究室では、独立行政法人産業技術研究所生物情報解析センター 清水浩之研究員に恵与戴いた CCR5 を、昆虫細胞 transfer 用ベクター-pVL1392 にサブクローニングした。Quick Change 法により点変異を二箇所 I52V/V150A 導入して、pVL1392/mCCR5 とした。定法に従って、wtCCR5-BV および mCCR5-BV を調製、精製した。

これまで BV 上に呈示した CCR5 についての報告がないため、CCR5 が BV 上で正しい立体構造を保持しているか明らかになっていない。抗 CCR5 抗体 2D7 は、CCR5 の ECL2 の構造認識抗体である。CCR5 と RANTES の結合は、CCR5 の N 末端および ECL2 が重要であることが知られている。よって、CCR5 の ECL2 が正しい立体構造を保持することは、RANTES と CCR5 の相互作用を解析する上で必須である。そこで、BV 上に呈示した wtCCR5、mCCR5 の立体構造を、抗体 2D7 による ELISA 法で確認した。

BV 上に呈示した wtCCR5、mCCR5 の oligomer 化状態の解析

BV 上に呈示した wtCCR5、mCCR5 が、dimer を形成しているか否か確認するため、FRET(Fluorescent Resonance Energy Transfer)実験を行なった。

GFP(AcGFP)遺伝子、RFP(DsRed monomer)遺伝子をそれぞれ pAcGFP-N1、pAcDsRed monomer-N1(いずれも Clontech 社)から PCR 法を利用して増幅し、pVL1392 にコードした CCR5 N 末端の上流に挿入した。定法に従って、(GFP-CCR5)-BV および(RFP-CCR5)-BV を調製した。発現は、抗 GFP 血清、抗 RFP polyclonal 抗体(いずれも Clontech 社)を用いた western blotting により確認した。

エバネッセント蛍光顕微鏡を用いて、FRET 実験を行なった。なお、実験は共同研究先の東京大

学大学院薬学系研究科生体分析化学教室 船津高志教授、上野太郎助手の指導の下、行なった。

GFP-CCR5 と RFP-CCR5 がヘテロダイマーを形成しているとする、GFP から RFP へのエネルギー遷移が起こる。ここで RFP を選択的に消光し、再び GFP を励起すると、GFP から RFP へのエネルギー移動がなくなるため、GFP の蛍光強度は回復して観測される。RFP 退色前後における GFP の蛍光強度の回復率を計算することにより、FRET シグナルを検出できる。

TCS 実験による RANTES と wtCCR5, mCCR5 の複合体構造情報の解析

RANTES-wtCCR5-BV、mCCR5-BV、Mock-BV の計 3 種の相互作用系に TCS 法を適用した。

RANTES と wtCCR5, mCCR5 が異なる相互作用様式で結合する構造的要因

RANTES と wtCCR5, mCCR5 が異なる相互作用様式で結合する構造的要因を調べた。静止状態において、wtCCR5 と mCCR5 が異なる構造を取っている可能性を考えた。そこで、CCR5 の N 末端を認識する抗体 CTC8、同じく ECL2 の構造を認識する抗体 2D7 および 45531 を用いて、ELISA 法により、各抗体の wtCCR5, mCCR5 への結合量を比較した。その結果、wtCCR5 と mCCR5 の間で、抗体の結合量に有意差が観測されなかった。よって、静止状態における wtCCR5 と mCCR5 の N 末端および ECL2 に、構造上差がないことと結論した。次に、RANTES 結合時の wtCCR5, mCCR5 に対して同様の実験を試みた。しかしながら、RANTES と抗体の立体障害により明確な差がえられなかった。

一方、RANTES と競合する低分子有機化合物 TAK779 は、CCR5 の TM 領域に結合することが知られている。よって、TAK779 が抗体と CCR5 の結合を直接阻害する可能性は低いと考えられる。そこで、TAK779 の添加前後における、CCR5 への抗体結合量の変化を検討した。

【結果】

wtCCR5 および mCCR5 の BV 上への呈示、CCR5 の立体構造の保持の検討

得られた wtCCR5-BV と mCCR5-BV を用いて、western blotting を行なった。抗体は、抗 C9 タグ抗体 1D4 を用いた。その結果、37 kDa 付近に CCR5 ポリペプチドに対応するバンドが検出された。wtCCR5 と mCCR5 のバンドを比色定量し、同程度発現していると結論した。

ELISA 法の結果、CCR5 を呈示していない Mock-BV と比べ、wtCCR5-BV および mCCR5-BV に有意に 2D7 が結合することが明らかになった。よって、BV 上に呈示した wtCCR5 および mCCR5 の ECL2 領域は、正しい立体構造を保持していると結論した。

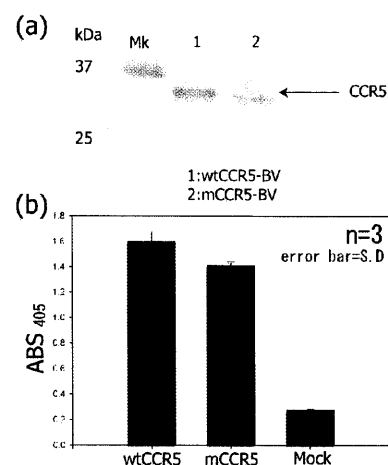


Fig.2 BV 上における wtCCR5, mCCR5 の発現、構造確認 (a)10 % SDS-PAGE で展開後、CCR5 C 末端に融合した C9 タグを、抗 C9 タグ抗体 1D4 で染色した。(b)wtCCR5-BV および mCCR5-BV を構造認識抗体 2D7 で染色した。その後、AP 標識した抗マウス抗体を二次抗体として染色し、発色反応を行なった。縦軸は、HRP に産生された蛍光物質の吸光度を示した。

FRET 実験

そこで、(GFP-CCR5)/(RFP-CCR5)-BV をエバネッセント蛍光顕微鏡で、GFP を励起して観測したところ、輝点が観測された。蛍光色素一分子に特徴的なブリンキングや消光が観測されなかったことから、各輝点が BV 粒子に対応すると考えた。GFP-wtCCR5 と RFP-wtCCR5 を共発現した (GFP-wtCCR5)/(RFP-wtCCR5)-BV の FRET 実験を行なったところ、GFP 蛍光強度回復率は正規分布を示した。同様に、(GFP-mCCR5)/(RFP-mCCR5)-BV でも、GFP 蛍光強度回復率は正規分布を示した。単独発現した (GFP-CCR5)-BV を FRET 実験を行ない、GFP の蛍光強度回復率を 1.0 として、wtCCR5、mCCR5 で得た GFP 蛍光強度回復率を規格化した。その結果、wtCCR5 では 1.03、mCCR5 では

0.96 であった。よって、wtCCR5 は mCCR5 と比べて有意に FRET シグナルが検出されたと考えた。このことは、wtCCR5 が mCCR5 よりも多くの分子で dimer を形成していることを示す。GFP 一分子および RFP 一分子のイメージングを行なったところ、GFP の蛍光強度よりも RFP の蛍光強度が顕著に低かった。よって、GFP から RFP へのエネルギー遷移の効率が悪い可能性があるので、7% の GFP 蛍光強度の回復は、有意差であると考えられる。

TCS 実験

RANTES-wtCCR5-BV 相互作用系において、TCS 実験を行なった。その結果、V40 や F41、V49 などプロトンの強いシグナル強度減少が観測された。これらの残基を、RANTES の立体構造上にマッピングしたところ、連続した面が形成された。RANTES-wtCCR5 相互作用系における TCS 実験の結果が、

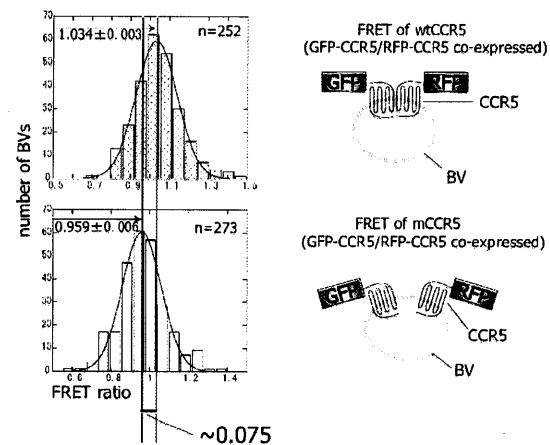


Fig.3 FRET 実験の結果

単独発現系の(GFP-CCR5)-BVを用いたときの GFP 蛍光強度回復率を 1.0 とした。上に wt-CCR5、下に mCCR5 の結果を示した。

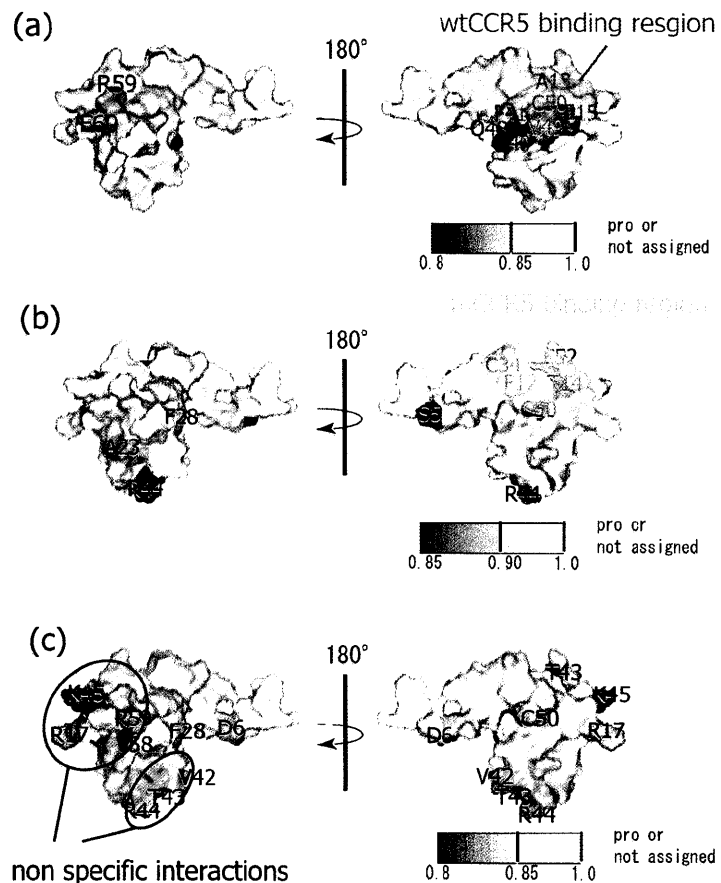


Fig.4 CCR5-BV を用いた TCS 実験結果

(a) wtCCR5-BV との TCS 実験結果、(b) mCCR5-BV との TCS 実験結果、(c) Mock-BV との TCS 実験結果を示した。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した。コントロール実験と比較することにより、wtCCR5、mCCR5 との異なる相互作用部位を同定した。

RANTES と wtCCR5 の特異的な相互作用を観測していることを確認するため、RANTES-Mock-BV 相互作用系における TCS 実験を行ない、非特異的な相互作用を観測することにした。その結果、C10、R44 などシグナル強度減少が観測された。これらの残基を、RANTES の立体構造上にマッピングしたところ、連続した面は形成しなかった。以上から、RANTES と wtCCR5 は V40、F41 など形成される界面で相互作用していると結論した。

次に、RANTES-mCCR5-BV 相互作用系において、TCS 実験を行なった。その結果、T14、E52 など強いシグナル強度減少が観測された。これらを RANTES の立体構造上にマッピングしたところ、RANTES-wtCCR5-BV 相互作用系における TCS 実験の結果とは異なる領域であることが明らかになった。以上から、RANTES と wtCCR5、mCCR5 の複合体は、それぞれ異なる構造を取っていることが明らかになった。

RANTES と wtCCR5、mCCR5 が異なる相互作用様式で結合する構造的要因

2D7 と 45531 を用いた実験では、wtCCR5 と mCCR5 の間で抗体親和性の変化に差が観測されなかった。一方、CTC8 を用いた実験では、TAK779 添加前後で wtCCR5 への抗体結合量に変化は観測されなかったが、mCCR5 では 15%程度結合量が低下した。よって、TAK779 添加前後で、wtCCR5 と mCCR5 の N 末端が異なる構造を取っていることが明らかになった。

【考察】

RANTES-wtCCR5、mCCR5 の複合体構造の違いと構造変化

本研究では、TCS 実験により RANTES-wtCCR5、mCCR5 の複合体構造が異なることを示した。RANTES 上の TCS 実験で観測された領域は β シートやジスルフィド結合のある領域で構造的に固い。一方、CCR5 は TM 領域にジスルフィド結合もなく、構造的自由度が高い。よって、TCS 実験で観測した複合体構造の違いは、RANTES 結合後の wtCCR5 と mCCR5 の構造の違いを反映している可能性がある。

また、本研究で、TAK779 添加前後で、wtCCR5 と mCCR5 が異なる構造を取ることを示唆した。TAK779 と RANTES は、CCR5 との結合部位が一部競合する。よって、TAK779 が結合したことにより起こる CCR5 の構造変化が、RANTES と結合した際に起こる可能性がある。

RANTES 結合により誘起される構造変化とシグナル伝達の相関

GPCR のシグナル伝達には dimer 状態を取ることが必要であると考えられてきたが、構造的なメカニズムは明らかになっていなかった。本研究では、RANTES 結合後の CCR5 dimer と CCR5 monomer が異なる構造変化を起こすことを、構造生物学的に示唆した。

【謝辞】

FRET 実験を行なうにあたり、多大なご指導、ご鞭撻を賜りました、東京大学大学院薬学系研究科生体分析化学教室 船津高志教授、上野太郎助手に心から御礼申し上げます。