

## 審査の結果の要旨

氏名 中 田 國 夫

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界面の変化についての解析と題する本論文は、ケモカイン受容体 CCR5 の monomer と dimer が、リガンドである RANTES と異なる相互作用様式で結合することを構造生物学的に明らかにした研究成果を述べた論文である。本論文は全 4 章からなり、第 1 章で序論および研究戦略、第 2 章で実験方法および本研究で用いた試薬、第 3 章で実験結果、第 4 章で実験結果に対する考察を述べている。

第 1 章では、CCR5 は budded virus(BV)システムを利用して調製し、RANTES と CCR5 の相互作用解析は転移交差飽和法(TCS)を応用する戦略について述べている。また、CCR5 の monomer として、CCR5 I52V/V150A (mCCR5)を用いたとしている。

第 3 章では、エバネッセント蛍光顕微鏡を用いた FRET 実験により、BV 上に呈示した wtCCR5 および mCCR5 の oligomer 化状態を解析している。FRET シグナルに有意差を検出したことから、wtCCR5 と mCCR5 はそれぞれ dimer、monomer を形成していると結論している。大腸菌から発現・精製した RANTES と wtCCR5、mCCR5 を呈示した BV(wtCCR5-BV、mCCR5-BV)を用いて TCS 実験を行なっている。また、非特異的な相互作用を観測するため、CCR5 を呈示していない BV(Mock)と RANTES の TCS 実験を行っている。(wtCCR5-BV)-RANTES 相互作用系における TCS 実験の結果と(Mock-BV)-RANTES 相互作用系における TCS 実験を比較し、RANTES と wtCCR5 の特異的な相互作用界面を同定している。更に、(wtCCR5-BV)-RANTES 相互作用系における TCS 実験の結果と(mCCR5-BV)-RANTES 相互作用系における TCS 実験の結果を比較し、RANTES と wtCCR5、mCCR5 は RANTES 上の異なる界面で相互作用していることを見出している。TCS 実験の結果は、RANTES と wtCCR5、mCCR5 が異なる複合体を形成していると考え、構造認識抗体を利用した ELISA 法により、その構造的要因を解析している。RANTES 非存在下では wtCCR5、mCCR5 の間で抗体結合量に差が観測されなかったことから、静止状態においては wtCCR5 と mCCR5 の構造に差がないとしている。一方、CCR5 上のエピトープが RANTES と一部重複する有機低分子化合物 TAK779 を用いて、TAK779 結合前後における結合量の変化を評価している。その結果、wtCCR5 と mCCR5 の N 末端領域で抗体結合量に差が観測されたことから、wtCCR5 と mCCR5 は TAK779 結合前後で異なる構造を取る可能性を示唆している。このような構造変化が RANTES 存在下でも起こりうる可能性を指摘している。

第 4 章では、RANTES と CCR5 の構造上の自由度について議論し、TCS 実験の結果について考察している。RANTES は CCR5 よりも構造的自由度が低いことから、TCS 実験は CCR5 の構造変化を反映しているとしている。GPCR は、リガンドが結合することにより構造変化が誘起され、下流にシグナル伝達が流れると考えられている。RANTES が誘起する CCR5 dimer、CCR5 monomer の構造変化の違いがシグナル伝達と関連している可能性を指摘している。

以上、本研究の成果は、CCR5 を初めとする GPCR(G protein-coupled receptor) の oligomer 化とシグナル伝達の相関の解明に大きく貢献するものであり、本研究を行った学位申請者は博士(薬学)の学位を得るにふさわしいと判断した。