



## 【方法および結果】

### 1. CXCR4 の発現・精製と性状解析

CXCR4 はバキュロウイルス-昆虫細胞発現系により発現し、ドデシルマルトシド (DDM) による可溶化後、C 末端に付加したエピトープタグを利用した抗体アフィニティー精製により精製した。SDS-PAGE 解析から、得られた CXCR4 の純度は 80 % 以上であると見積もった。表面プラズモン共鳴 (SPR) 法により、CXCR4 に対する構造認識抗体 12G5 との結合活性を解析し、得られた CXCR4 のうち約 50 % が正しくフォールドしていることを明らかとした。CXCR4 に対する 12G5 の結合量から、正しくフォールドした CXCR4 量を見積もったところ、1.5 L 培養あたり約 100  $\mu\text{g}$  であった。得られた CXCR4 が SDF-1 結合活性を有していることは、プルダウンアッセイにより確認した。さらに、SPR 法における 12G5 結合活性の解析から、低温に保持し、かつ glycerol を添加することが CXCR4 の安定性に必須であることが判明した。

### 2. 転移交差飽和法を用いた SDF-1 の CXCR4 相互作用部位同定

SDF-1 の CXCR4 相互作用部位を同定するため、安定同位体標識 SDF-1 (100  $\mu\text{M}$ ) に対し、非標識 CXCR4 (10  $\mu\text{M}$ ) を添加した条件で、転移交差飽和 (TCS) 法による解析をおこなった。低濃度の試料、低温、glycerol 存在下での解析を可能とするため、高感度検出に適したイソロイシン・ロイシン・バリンのメチル基を選択的に  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  標識してプローブとする、methyl-TCS 法を採用した。結合・解離の交換を促進し、解離状態の SDF-1 へ飽和を効率よく伝播させるため、シグナル伝達活性を保持している一方、

野生型よりも CXCR4 に対する親和性が低い SDF-1 R8A/R12A 変異体を利用した。さらに、コントロール実験として、活性のある CXCR4 とほぼ等量の均一  $^2\text{H}$  標識野生型 SDF-1 を加え、特異的な相互作用のみを阻害した条件で TCS をおこなった。得られた結果をもとに、変性した CXCR4・DDM ミセル・不純物に由来する非特異的相互作用の影響を見積もった。

TCS 実験の結果、非特異的相互作用の

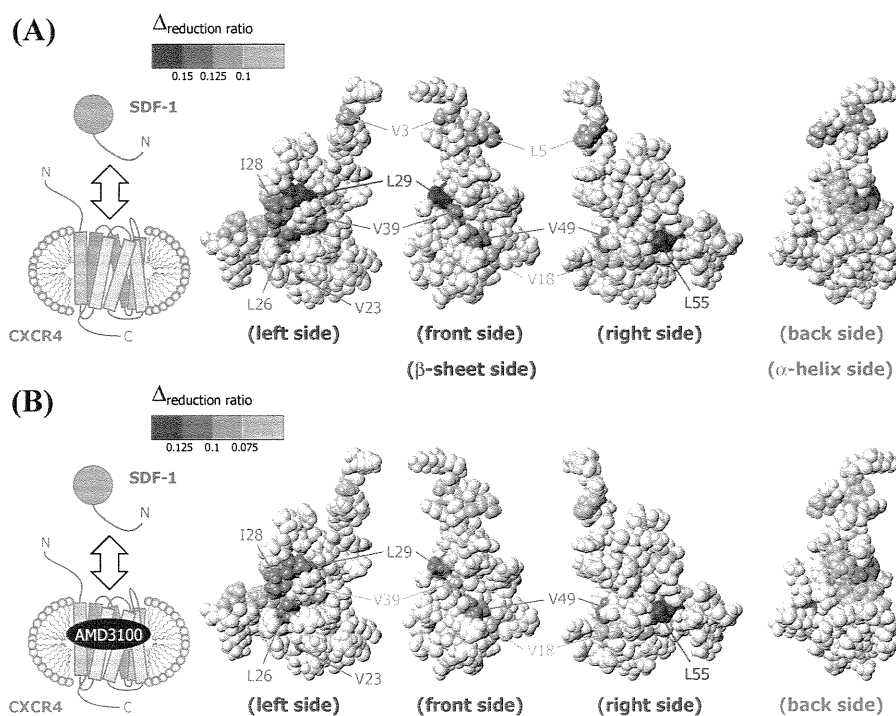


Fig.1 TCS 解析の結果

(A) SDF-1 の CXCR4 結合部位同定を目的としておこなった TCS 解析の結果。SDF-1 の構造を CPK 表示し、シグナル強度減少幅 ( $\Delta\text{reduction ratio}$ ) が大きいものを濃い赤～薄い赤、小さいものを青にて、残基ごとに色付けた。いずれも N 末端を上側に向け、コア領域の  $\beta$ -sheet を手前に向けたものを正面側、それとは逆の C 末端  $\alpha$ -helix を手間に向けたものを背面側とした。正面側から、左右に 90 度ずつ回転したものをそれぞれ、右面側および左面側とした。

(B) 1 mM AMD3100 存在下での TCS 解析の結果。(A) と同様に、SDF-1 の構造上に色付けて表示した。

影響を除いたシグナル強度減少幅 ( $\Delta_{\text{reduction ratio}}$ ) が大きかった残基を SDF-1 構造上にマッピングした (Fig.1A)。シグナル強度減少幅が大きかった残基は、SDF-1 の N 末端 (V3, L5) に加えて、コア領域の半周にもおよぶ帯状の広い範囲 (V18, V23, L26, I28, L29, V39, V49, L55) に分布していた。したがって、この領域が SDF-1 の CXCR4 相互作用部位であると結論した。

### 3. SDF-1 の変異体解析

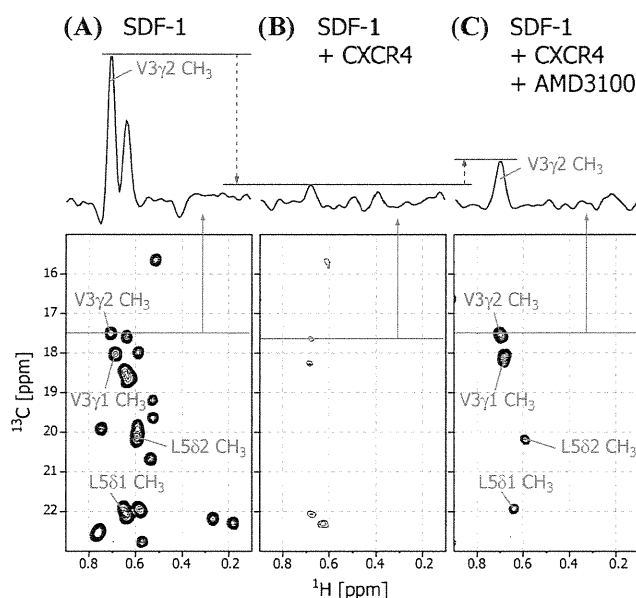
上述の TCS 解析結果は、先行研究における変異体解析から推測された領域に加え、コア領域の L55 を含むより広い範囲が、CXCR4 結合部位を形成することを示している。そこで、あらたに同定された結合部位の 1 つである L55 の近傍に変異導入し、THP-1 細胞を用いたケモタキシスアッセイにより評価した。その結果、L55 の近傍に位置する D52 への変異体 (D52A, D52S) は、受容体に対する親和性が低下していることが示された。

### 4. AMD3100 の SDF-1-CXCR4 相互作用に与える影響

さらに、SDF-1 と CXCR4 との相互作用様式を明らかにするため、CXCR4 の特異的なアンタゴニストである AMD3100 を用いた解析をおこなった。AMD3100 は CXCR4 の TM 領域に結合することが示されており、その SDF-1-CXCR4 相互作用に与える影響を解析することで、CXCR4 TM 領域をブロックした状態でも SDF-1 が結合しうるかを解析することができる。

まず、AMD3100 存在下にて上述と同様の TCS 解析をおこなった (Fig.1B)。その結果、SDF-1 のコア領域では AMD3100 添加前と同等のシグナル強度減少が観測されたものの、N 末端 (L3, V5) のシグナル強度減少はほとんど観測されなくなった。このことは、AMD3100 存在下では SDF-1 N 末端は CXCR4 から解離しているものの、SDF-1 コア領域は依然として CXCR4 に結合しうることを意味する。

さらに、過剰量の CXCR4 存在下で SDF-1 の NMR 測定をおこない、AMD3100 の影響を解析した。ロイシン・バリンのみを選択的に  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  標識した遊離の SDF-1 の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトル上では、13 個のロイシン・バリン残基に由来する 26 個のシグナルが観測された (Fig.2A)。これに過剰量の CXCR4 を添加したところ、すべてのシグナルが著しく強度減少した (Fig.2B)。このスペクトル変化は、SDF-1 が CXCR4 との複合体形成にともない、高分子量化したことを示している。さらに AMD3100 を添加したところ、N 末端 (V3, L5) に由来するシグナルのみ強度が回復して観測された (Fig.2C)。このことは、AMD3100 の添加にともない、SDF-1 の N 末端が CXCR4 から解離し運動性が上昇したことを示している。一方で、SDF-1 の N 末端を除くコア領域の



**Fig.2** 過剰量 CXCR4 存在下での SDF-1 の NMR 解析

単独 (A)、過剰量 CXCR4 (20  $\mu\text{M}$ ) 存在下 (B)、過剰量 CXCR4 および 1 mM AMD3100 存在下 (C) のロイシン・バリン選択的  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  標識 SDF-1 (10  $\mu\text{M}$ ) の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトル。スペクトルの上部には、それぞれのスペクトルの青線にて示した 1 次元の切り出しを示す。

シグナルは十分な強度で観測されず、実際に AMD3100 添加後も SDF-1 のコア領域は CXCR4 と相互作用していることが明らかとなった。

## 【考察】

### 1. SDF-1 上の CXCR4 相互作用部位

TCS 解析の結果から、SDF-1 の CXCR4 相互作用部位として、コア領域の広い範囲が寄与していることが明らかとなった。これらの領域には、塩基性残基 (R12, R47 など)、酸性残基 (E15, D52 など)、疎水性残基 (L29, V39, V49, L55 など) が分子表面に側鎖を向ける形で存在している。SDF-1 は他の多くのケモカインと異なり、受容体選択性が高いことが知られている。CXCR4 は、これら異なる性質をもつ多くの残基を組み合わせることで高い特異性を発揮していると考えた。

### 2. 2段階結合モデル

今回の NMR 解析からは、AMD3100 は、SDF-1 の N 末端を CXCR4 から解離させるものの、SDF-1 コア領域の CXCR4 への結合への影響は小さいことが示された。AMD3100 が CXCR4 の TM 領域に結合することを考慮すると、SDF-1 の N 末端が CXCR4 の TM 領域に、SDF-1 のコア領域が CXCR4 の細胞外領域に、それぞれ独立に結合すると考えることが妥当である。この結果は、先行研究

にて推測された2段階の相互作用が実際に存在していることを、明確に示す知見といえる。

近年、複数の GPCR の X 線結晶構造が報告されており、低分子リガンドは、GPCR の TM 領域に存在する入り口の制限された cavity に結合することが示されている。同様の cavity 構造は、CXCR4 においても存在することが推測できるが、このような構造はケモカインのようなペプチド性リガンドの結合には不利である。上述の2段階の相互作用は、このような性質をもつケモカイン-ケモカイン受容体の相互作用に適しているといえる (Fig.3)。SDF-1 コア領域のみの独立した相互作用は、CXCR4 細胞外領域への迅速な結合とともに、効率よく SDF-1 を CXCR4 上につなぎとめておくことを可能とする。SDF-1 の N 末端は、この状態においても運動性が高く、効率よく結合空間を探索し、比較的狭い TM 領域の cavity への結合を促進する。

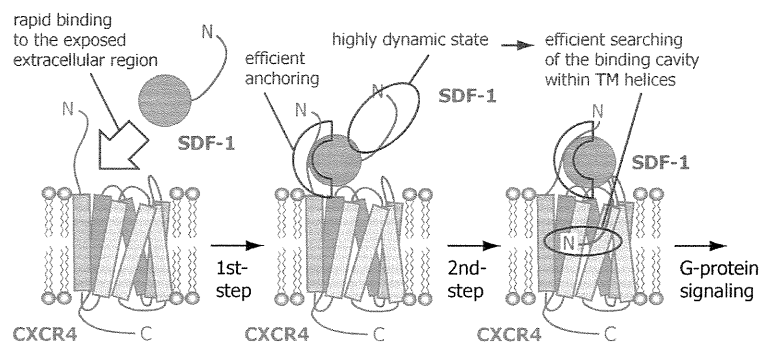


Fig.3 SDF-1 と CXCR4 の 2段階相互作用

2段階相互作用モデルにおいては、まず SDF-1 のコア領域が CXCR4 の細胞外領域に結合する (1段階目)。その後、運動性の高い SDF-1 の N 末端が、CXCR4 TM 領域に存在する cavity へ結合する (2段階目)。さらに、TM 領域に構造変化が起こり、細胞内の G タンパク質へとシグナルが伝達される。