

審査結果の要旨

氏名 幸福 裕

転移交差飽和法を用いたケモカイン SDF-1 とその受容体 CXCR4 との相互作用解析と題する本論文は、NMR 法の 1 つである転移交差飽和 (TCS) 法を主に用い、SDF-1 とその G タンパク質共役型受容体である CXCR4 の相互作用を解析した成果を述べたものである。本論文は 4 つの章からなり、第 1 章において序論を、第 2 章においては実験の材料および方法を記述している。第 3 章においては各実験の結果をまとめ、第 4 章において実験結果をもとにした考察を加えている。

第 3 章においては、SDF-1 と CXCR4 との相互作用を解析した研究成果を述べている。まず、解析に用いる試料、特に膜タンパク質である CXCR4 の調製と性状解析について、詳細な記述がなされている。CXCR4 の試料調製には、昆虫細胞による発現系が用いられ、発現条件、可溶化剤の選択、精製方法について検討が加えられていた。調製した CXCR4 の性状解析では、SDS-PAGE で十分な精製度となっていること、構造認識抗体 12G5 結合活性を指標とした SPR 解析から、50 % 程度が正しくフォールドしていること、正しくフォールドした CXCR4 の収量が 1.5 L 培養あたり約 100 μg であることが述べられている。CXCR4 が SDF-1 結合活性を持っていることも、プルダウンアッセイにより確認している。さらに、CXCR4 の経時的安定性についても解析がおこなわれ、低温に保持し、glycerol を添加することで、安定性が向上し、48 時間以内の NMR 解析が可能となると結論している。

つづいて、SDF-1 と CXCR4 との相互作用解析においては、まず、TCS 法を用いた SDF-1 の CXCR4 結合部位同定がおこなわれている。低温、glycerol 存在下において、低濃度での解析に対応するため、SDF-1 のイソロイシン・ロイシン・バリンの側鎖メチル基をプローブとして用いた、methyl-TCS 法の適用が重要であったことが述べられている。また、SDF-1 の CXCR4 からの解離速度を上昇させ、TCS 法による原子レベルでの解析を可能とするために、受容体親和性の低い R8A/R12A 変異体を用いたことが述べられている。実際の解析においては、変成した CXCR4 などに由来する非特異的相互作用の影響を排除するため、重水素標識した野生型 SDF-1 を加え、特異的相互作用のみを阻害した条件でのコントロール実験もおこなわれている。TCS 法による解析の結果では、SDF-1 の N 末端とコア領域の β シート側を中心とした広い範囲にてシグナル強度減少が認められ、この領域が CXCR4 結合部位を形成すると結論している。このことを支持する知見として、結合部位に含まれる D52 への変異が、SDF-1 の CXCR4 に対する親和性を下げることが示している。

さらに、SDF-1 と CXCR4 との相互作用様式を調べるため、CXCR4 の膜貫通領域を阻害剤 AMD3100 によりブロックした状態での相互作用解析をおこなっている。AMD3100 存在下での TCS 法による解析では、SDF-1 N 末端が CXCR4 と相互作用しなくなったこと、その一方で、SDF-1 コア領域の CXCR4 との相互作用様式は変わらないことを示している。また、過剰量の CXCR4 および AMD3100 存在下の、SDF-1 の NMR 測定から、SDF-1 のコア領域のみが CXCR4 に結合し、SDF-1 の N 末端が高い運動性をもった状態が実際に存在することを示している。

第 4 章においては、NMR 解析の結果をもとにして、SDF-1 と CXCR4 との相互作用様式に関する考察をおこなっている。まず、TCS 解析により求められた SDF-1 の CXCR4 結合部位に関して、従来の生化学的知見との比較をおこない、結果の妥当性を示すとともに、TCS 解析の結果から、SDF-1 のより広い範囲が CXCR4 結合部位を形成することを新たな知見として示している。

また、AMD3100 存在下での NMR 解析の結果から、SDF-1 のコア領域は CXCR4 の細胞外領域と、SDF-1 の N 末端は CXCR4 の膜貫通領域と、それぞれ独立に相互作用することを結論している。CXCR4 の構造においては、膜貫通領域に入口が制限された cavity 構造をとると推測しており、このような構造は、ケモカインのような分子量の大きいペプチドリガンドには不利であると述べている。以上のことから、2 つの独立した相互作用の生物学的意義として、SDF-1 のコア領域は、CXCR4 の細胞外領域に効率よくつなぎとめておくために重要であること、運動性の高い SDF-1 の N 末端により効率のよいリガンド結合空間の探索が可能となり、比較的狭い cavity への結合が促進されることを推測している。

以上、本研究の成果は、創薬の重要なターゲットであるものの未解明な部分が多いケモカイン受容体に関して、構造および機能の解明に大きく貢献するものであり、これを行った学位申請者は博士（薬学）の称号を得るにふさわしいと判断した。