

# 論文内容の要旨

論文題目 ヒト Interleukin15 受容体のリガンド特異性創出機構に関する研究

氏名 坂本 壮

## 【緒言】

サイトカイン受容体は、細胞間の情報伝達に参与するホルモン様蛋白質因子であるサイトカインと結合することによって、細胞内にシグナル伝達を引き起こす。シグナル伝達によって、細胞の分化、増殖、活性化などを誘導する。サイトカイン受容体とサイトカインの相互作用はこれらの作用を介して、免疫応答、炎症反応及び造血反応などを制御しており、生命の高次機能の維持には不可欠の因子となっている。サイトカインの活性と生命の恒常性維持は密接なつながりがあり、疾病との関連も深い。サイトカイン受容体のうち、インターロイキン (IL) は生体内で免疫系活性化サイトカインとして知られており、IL と対応する受容体と形成する複合体は、解離定数が  $10^{-8}$ ~ $10^{-11}$  [M] と見積もられるほど強固なものとして知られている。しかしながら、IL とその特異的受容体との相互作用に関しては、立体構造に基づく議論が必ずしも十分には行われておらず、厳密な特異性に関する知見は未だ不十分である。受容体複合体のうち共通 $\gamma$ 鎖 ( $\gamma_c$ ) を含むものを $\gamma_c$ 鎖受容体ファミリーと呼ばれている (Fig. 1)。各 $\alpha$ 鎖がそれぞれのリガンドと結合した後、 $\gamma_c$ 鎖と結合することでシグナル伝達が起きる。リガンドであるサイトカインは four- $\alpha$ -helix-bundle 構造に分類された類似構造を持っている。各 $\alpha$ 鎖はどのような機構によってリガンドと特異性を創出しているのかが興味深いことである。特に受容体複合体が $\beta$ 、 $\gamma$ 鎖が共通の IL2 受容体、IL15 受容体に関しては、 $\alpha$ 鎖がリガンドとの結合を制御することによってシグナル伝達を制御している。

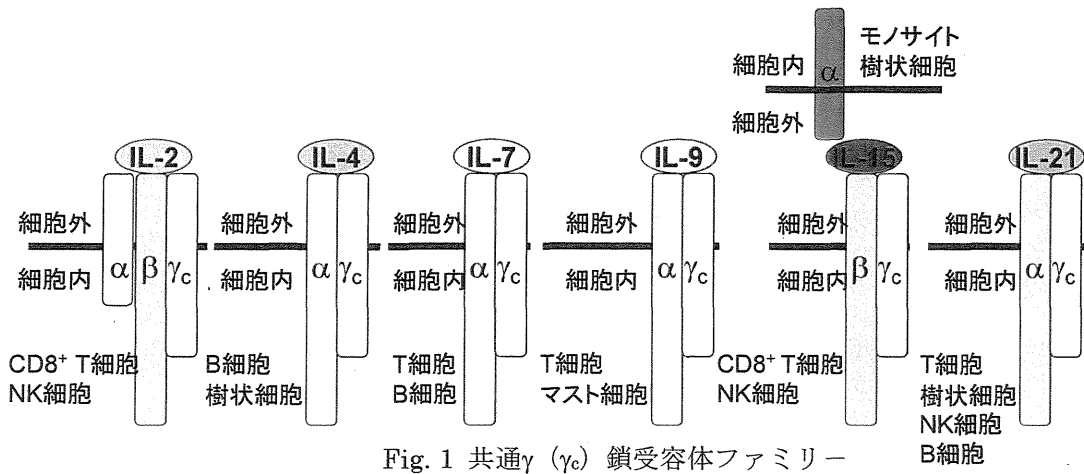


Fig. 1 共通γ (γ<sub>c</sub>) 鎖受容体ファミリー

本研究では初めに、長さの異なる3種類のIL15受容体α鎖 (IL15R full、IL15R sushi+linker、IL15R sushi) を作製し (Fig. 2)、表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いてそれぞれと特異性リガンドを含む four-α-helix-bundle 構造の IL2、IL4、IL15 及び IL21 との相互作用を解析し、受容体のどの部分が特異性創出に関与しているのかを明らかにすることを旨とした。続いて、すでに結晶構造が解明されているヒト IL15-IL15 受容体α鎖複合体 [1] をターゲットとして、その界面に存在するIL15の残基に変異を導入し (Ala scanning) (Fig. 3)、SPRによる速度論解析から熱力学的パラメータを算出することで、親和性への影響を考察し、IL15受容体α鎖の高特異性・親和性獲得の分子機構を明らかにすることを旨とした。

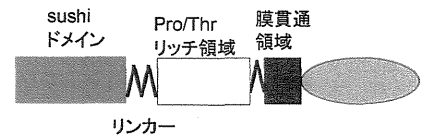


Fig. 2 IL15受容体α鎖の模式図

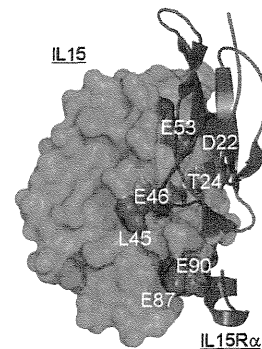


Fig. 3 IL15変異体箇所

### 【実験】

IL2、IL4、IL21 及びヒト IL15 およびその一残基変異体は、大腸菌を宿主とした発現系によって調製した。不溶性画分に存在していたため段階的透析法による巻き戻し [2] により調製した。また、3種類のIL15受容体α鎖についても大腸菌を用いた分泌発現系によって調製した [3]。ヒトIL15に関しては、CTLL-2細胞を用いて細胞活性評価を行い、細胞活性が回復していることを確認した。加えて、ヒトIL15およびその一残基変異体に関しては、遠紫外領域で円二色性 (CD) スペクトルをおこなった。得られたスペクトルは、ヒトIL15および一塩基変異体すべてにおいて208 nmに第一極小点、222 nmに第二極小点を示し、α-helixに特有のスペクトルを示した。一塩基変異体に関しては、スペクトルはヒトIL15のスペクトルと大きな相違は見られず、大きな構造の変化は観察されなかった。速度論解析はSPRを用いて、IL15受容体α鎖をセンサーチップ上に固定化し、センサーチップ上にIL2、IL4、IL21及びヒトIL15及びその一残基変異体を流すことで速度論解析を行った。

### 【結果と考察】

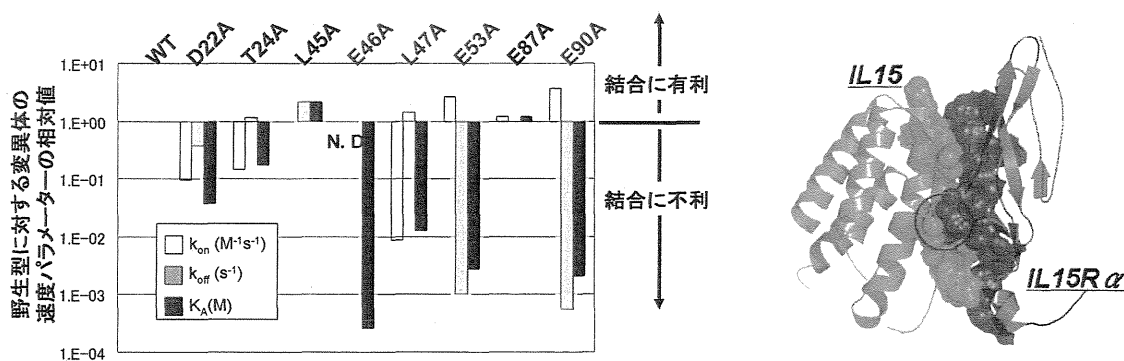
調製したIL15、IL4、IL21は3種のIL15Rαと相互作用を確認し、同程度の結合速度定数を示した。しかしながら、解離段階に相違が確認された。IL15-IL15Rαの相互作用は遅い解離速度に特徴付けられる特異的相互作用であったのに対し、IL4-IL15Rα、IL21-IL15Rαの相互作用は早い解離速度で性格付けられた。調製したIL2はIL15Rαと相互作用しなかった。以上の結果は、IL15Rα

鎖のリガンド特異性が、IL 受容体に共通する sushi ドメインによって創出されるものの、本受容体が示す多重特異性を有する分子であることを示している。

Table IL15R $\alpha$ に対する IL15、IL4 及び IL21 の速度パラメータ

		IL15R $\alpha$ full	IL15R $\alpha$ sushi+linker	IL15R $\alpha$ sushi
IL15	K <sub>D</sub> [M]	2.40×10 <sup>-11</sup>	4.77×10 <sup>-10</sup>	1.17×10 <sup>-9</sup>
	k <sub>on</sub> [1/Ms]	5.84×10 <sup>4</sup>	9.36×10 <sup>4</sup>	1.15×10 <sup>5</sup>
	k <sub>off</sub> [1/s]	1.42×10 <sup>-6</sup>	4.46×10 <sup>-5</sup>	1.35×10 <sup>-4</sup>
IL4	K <sub>D</sub> [M]	1.38×10 <sup>-5</sup>	1.44×10 <sup>-5</sup>	5.17×10 <sup>-5</sup>
	k <sub>on</sub> [1/Ms]	1.02×10 <sup>4</sup>	—	—
	k <sub>off</sub> [1/s]	0.130	—	—
IL21	K <sub>D</sub> [M]	1.81×10 <sup>-5</sup>	1.33×10 <sup>-5</sup>	1.44×10 <sup>-5</sup>
	k <sub>on</sub> [1/Ms]	5.20×10 <sup>4</sup>	—	—
	k <sub>off</sub> [1/s]	0.941	—	—

IL15-IL15 受容体 $\alpha$ 鎖間相互作用においては、WT および変異体ともに同程度の結合速度定数を示しているのに対し、IL15 に一残基変異を入れた E46A、E53A、E90A ではWTと比較して解離速度定数が 2-3 桁大きくなったことから、これらの残基によって親和性が制御されている可能性が示唆された。特に、Glu46 に関しては、Ala 置換体では解離定数は 3 桁増加し、IL15R $\alpha$ とは非常に弱い結合となった。複合体構造から、特に IL15 受容体 $\alpha$ 鎖の Arg35 と IL15 の Glu46 周辺の疎水残基ポケットが高い構造相補性を示している。これらの結果を踏まえると、Glu46 は IL15R $\alpha$  に対する IL15 のホットスポットであるといえる (Fig. 5)。一方で、L47A では、結合速度定数が 2 桁減少した。この原因としては、構造学的知見から Leu47 の周辺には疎水残基が密集しており、Leu47 は周辺の構造を維持する役割を担っている可能性が示唆される。そのため、Ala に置換することにより、周辺の結合界面を変化させ、ホットスポットである Glu46 の配向性を変化させる可能性が示唆される。



(右) Fig. 4 IL15野生型に対する変異体の速度パラメーターの比較

(左) Fig. 5 IL15 WT-IL15受容体 $\alpha$ 鎖の複合体の模式図

続いて、各温度条件で結合速度定数および解離速度定数を測定し、Scatchard plot から定常状態における熱力学的パラメータを、Eyring plot から遷移状態における熱力学的パラメータを算出し、野生型と比較した(Fig. 6)。WT および 多くの変異体と IL15 受容体 $\alpha$ 鎖の結合は、エンタルピー駆動型であったのに対し、E46A、E53A、E90A 変異体と IL15 受容体 $\alpha$ 鎖間相互作用は、好ましいエンタルピー変化量が顕著に減少し、親和性が大

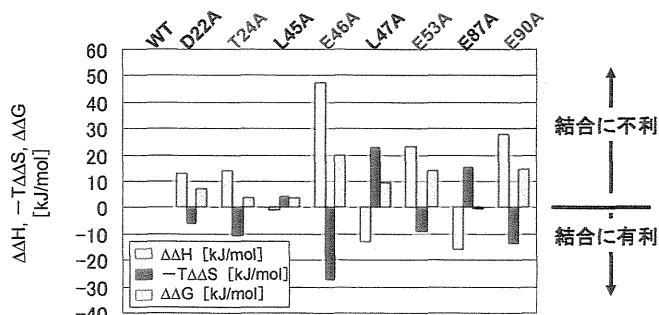


Fig. 6 IL15野生型に対する変異体の熱力学的パラメーターの比較

ルピー変化量が顕著に減少し、親和性が大きく減少していた。

WT-IL15 受容体 $\alpha$ 鎖結晶構造解析から、Glu46 は塩橋を形成しており、この部位が Hot-Spot であることが明らかとなった。Glu53 における変異導入では遷移状態においては、WT と類似している。複合体形成においてエンタルピー損、エントロピー得となり、結果的に親和性が低下した。Glu90 は塩橋を形成していない残基であることから、Glu90 が受容体との相互作用によって脱水和するのに対し、Glu を Ala に置換したことで脱水和の貢献が顕著に減少し、結果として、遷移状態におけるエントロピー損を導き、顕著な親和性の低下につながったことを示している。相互作用において水分子を介した水素結合ネットワークを形成する領域に位置する Thr24 における変異導入では、遷移状態において顕著なエントロピー損を与えるものの、複合体形成におけるエントロピー損・エンタルピー得の低下から顕著な親和性低下は見られなかった。このことは、水分子を介した水素結合形成が遷移状態においては有利に働くものの、安定な複合体形成におけるエントロピー損から親和性には大きく影響しない可能性を強く示唆している。

これらの結果をもとに、IL15 受容体 $\alpha$ 鎖が認識する際に IL15 との結合を解離段階で制御する Glu46、Glu53、Glu90 に注目して構造学的観点から構造類似の IL2 と比較を行った (Fig. 7)。IL2 と IL15 の相違として、立体構造の比較をすると、CD ループに位置する残基、IL15 では Glu90、IL2 では Ala108 に特に配向性に違いが見られた。IL15 では Glu90 が Glu53、Glu90 を同じ方向、IL15 受容体 $\alpha$ 鎖との結合界面を向いていたのに対し、IL2 では Ala108 はヘリックスの内側を向いていた。

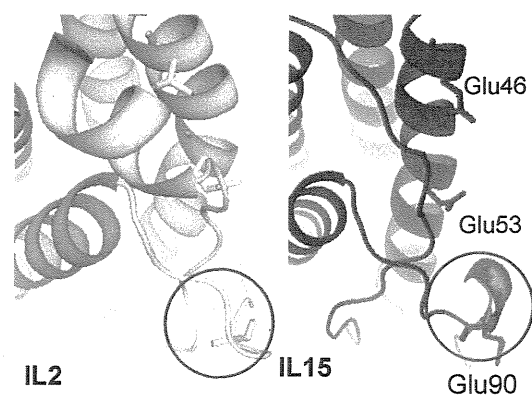


Fig. 7 IL2 と IL15 の結合界面の比較

### 【結言】

IL15 受容体 $\alpha$ 鎖のリガンド特異性創出機構は以下のように考えられる。IL15 と IL15 受容体 $\alpha$ 鎖の相互作用は sushi ドメインによって特異性を創出し、Glu46、Glu53、Glu90 によって解離段階を制御することによって高い親和性を創出される。IL15 と IL15 受容体 $\alpha$ 鎖の結合界面は約  $700 \text{ \AA}^2$  であり、一般的な結合界面に比べて小さいにもかかわらず、親和性は高い。通常、親和性に関与する残基は 2、3 個であるが、今回の結果から親和性に影響を与える残基は結合界面に通常より多い数の残基が存在することを確認した。IL15 受容体 $\alpha$ 鎖は、小さい結合界面だが通常多い数の残基が IL15 との相互作用に強く貢献することで、高い親和性を創出していると結論付けられる。

本研究で標的としたサイトカイン受容体は細胞間の情報伝達の要であり、疾病との関連もきわめて大きい。事実、サイトカイン受容体を標的とした治療薬の開発は、製薬産業で中心的位置を占めつつある。このような状況を鑑みると、受容体鎖様機構の本質的解明はサイトカインの受容体認識は最も初期の事象であり、それに続く細胞内シグナル伝達に必要不可欠である。相互作用解析を通して、その作用機構を詳細に調査することは、試行錯誤を超えた、分子論に基づく医薬品開発を目指す第一歩となる。

### 【参考文献】

- (1) Ikemizu et al. Nature Immunol. (2007)
- (2) Tsumoto et al. J. Immunol. Methods (1998) ; Asano et al. FEBS Lett. (2002)
- (3) Matsumoto et al. Protein Exp. Purif. (2001)