

論文の内容の要旨

論文題目 ケモカイン—ケモカイン受容体間相互作用に関する
構造生物学的解析

氏名 吉浦 知絵

【背景】

ケモカイン受容体 CCR1 および CCR5 は、G タンパク質共役型受容体(GPCR) に属する膜タンパク質である。分子量約 8 kDa の可溶性タンパク質であるケモカインとの結合により活性化した CCR1、CCR5 は、G_i タンパク質へのシグナル伝達を介し、白血球の遊走反応を誘起する。生体内では自己免疫疾患など多くの疾病に関与することが報告されている。また、CCR5 に関しては HIV-1 の共受容体としての機能が報告されており、CCR5 のリガンドは HIV 感染に競合する。

CCR1・CCR5 は複数のリガンドにより活性化されるが、それぞれのリガンド選択性は異なる。この性質は、生体内において多様な免疫応答を発揮する一因と考えられている。したがって、CCR1・CCR5 とリガンド間相互作用における特異性に関して原子レベルでの解析を行い、これらのリガンド選択性が生じる機構を解明することにより、CCR1・CCR5 を選択的に阻害する分子設計において有用な知見を得ることが期待できる。

しかしながら、CCR1・CCR5 に関する構造生物学的解析を行う上では、試料の不安定性が問題となっていた。これに対し、修士課程までの研究において、CCR5 を reconstituted HDL (rHDL) に再構成することにより CCR5 の安定性を向上することに成功した。そこで、CCR1・CCR5 に共通するリガンドの一つである CCL3 を対象とし、CCR1・CCR5 との相互作用に関して NMR 法による構造生物学的解析を行った。これにより、CCL3 と CCR1・CCR5 間相互作用において特異性が生じる機構の解明を目的とした。

【結果】

1. ケモカイン CCL3 monomeric 変異体の作成

CCL3 は、高濃度条件においてダイマー化し、中性条件においては凝集する性質がある。一方で、受容体への直接の相互作用はモノマー状態において起こると考えられている。CCL3 の受容体相互作用機構を解析するにあたり、受容体シグナル伝達には影響せず、ダイマー化・凝集を抑制する CCL3 monomeric 変異体(P8A/F13Y/E67Q) を作成した(以下、CCL3 変異体とする)。CCL3 変異体は大腸菌 *Origami B* (DE3) を用いて大量発現し、超音波破碎後可溶性画分より His タグ、逆相 HPLC により精製した。 $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ HSQC スペクトルから、作成した CCL3 変異体は野生型と同等の構造を保持していることがわかった。また、1D TRACT 解析より、CCL3 変異体は中性条件において凝集せず、 $50\ \mu\text{M}$ においてモノマー状態由来の NMR シグナルを与えることがわかった。以上にて作成した CCL3 変異体を用いて、以降の解析を行った。

2. ケモカイン受容体 CCR1 および CCR5 の調製

NMR 法による構造生物学的解析に用いるため、CCR1 および CCR5 を大量調製した。昆虫細胞発現系により CCR1 または CCR5 を大量発現した細胞から膜面分を調製し、1% *n*-dodecyl- β -D-maltopyranoside (DDM) により可溶化した。可溶化した受容体を、reconstituted HDL (rHDL) を用いて脂質二重膜中へ再構成し、His タグ、1D4 抗体アフィニティータグを用いて精製した(CCR1/CCR5-rHDL)。昆虫細胞 1 L 培養から、約 $30\ \mu\text{g}$ の CCR1、約 $10\ \mu\text{g}$ の CCR5 を含む rHDL を約 80% の純度にて調製できた。調製した CCR1/CCR5-rHDL に G タンパク質を添加した試料を用い、GDP-GTP 交換アッセイを行った。添加した CCL3 変異体濃度依存的に蛍光標識 GTP 結合量の増大を観測したことから、CCR1/CCR5-rHDL が G タンパク質を介した GDP-GTP 交換活性を保持することを確認した(Fig.1)。

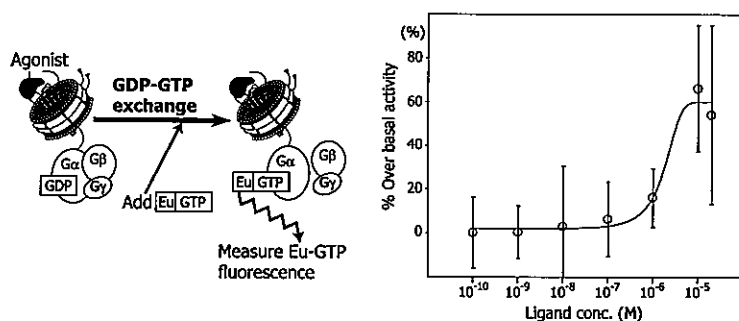


Fig.1 CCR1/CCR5-rHDL を介した GDP-GTP 交換活性の確認
左) 実験の模式図
右) CCR5-rHDL と CCL3 変異体を用いた実験結果

3. SPR 法による CCL3 変異体と CCR1/CCR5-rHDL 間結合親和性の解析

CCL3 変異体と、CCR1/CCR5-rHDL 間の結合親和性を決定するため、SPR 解析を行った。センサーチップ上に CCR1/CCR5-rHDL を固定化し、アナライトとして CCL3 変異体を用いた。その結果、CCL3 変異体濃度依存的にレスポンスの上昇が検出でき、算出された解離定数は CCR1、CCR5 いずれも約 $5\ \mu\text{M}$ であった(Fig.2)。

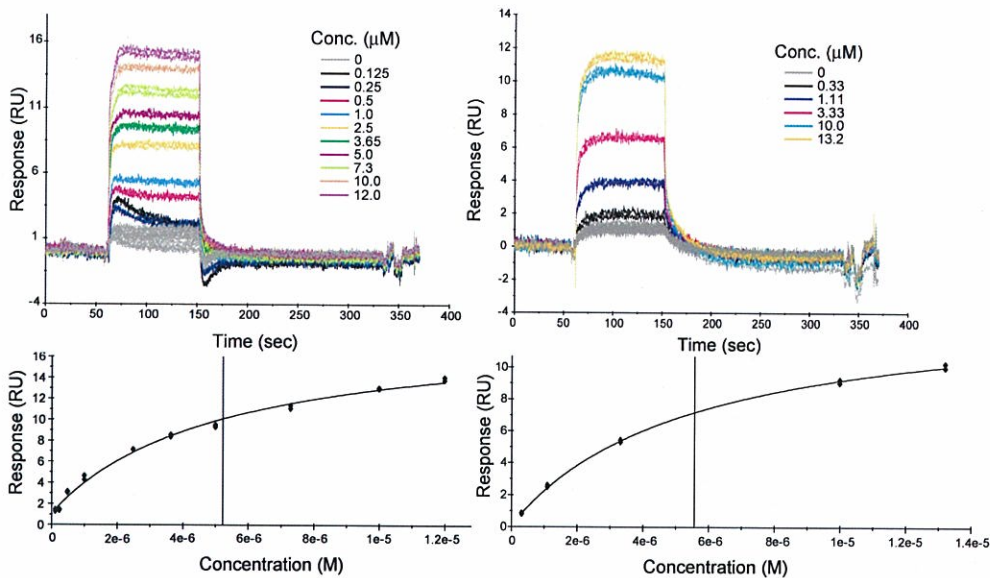


Fig.2 SPR 法による、
CCR1/CCR5-rHDL に対する
CCL3 変異体の親和性測定

上) アナライトとして CCL3 変異体を用いた際のセンサーグラム
下) 用いたアナライト濃度に対するレスポンスのプロット

左) CCR1-rHDL
右) CCR5-rHDL

4. 転移交差飽和法 (TCS 法) による CCL3 変異体上の CCR1/CCR5-rHDL 結合部位決定

TCS 実験を行うことにより、CCL3 変異体における CCR1/CCR5-rHDL 結合部位を決定した。CCL3 変異体のアミドプロトンを解析対象とし、コントロール実験としては受容体を含まない空 rHDL を用いた。観測されたシグナル強度減少率について、CCR1/CCR5-rHDL を用いた実験結果からコントロール実験の結果を差し引いた値(ΔRR) を算出した。

その結果、CCR1-rHDL を用いた実験では Leu3、Ala10、Cys11、Cys12、Thr16、Phe24、Tyr28、Ser32、Gln34、Ile41、Phe42、Ser47、Gln49、Val50、Cys51、CCR5-rHDL を用いた実験では Ala10、Cys11、Thr16、Phe24、Tyr28、Phe29、Thr31、Thr44、Lys45、Gln49、Val50、Cys51、Val59、Lys61、Tyr62 において有意な ΔRR を観測し、これらの部位が結合界面に位置することが示された(Fig.3)。これらの残基を CCL3 分子上へマッピングした結果、Gln49 を中心とする領域は、CCR1・CCR5 結合部位に共通する一方、Gln34 を中心とする領域は CCR1、Val63 を中心とする領域は、CCR5 結合に特異的であった(Fig.4)。

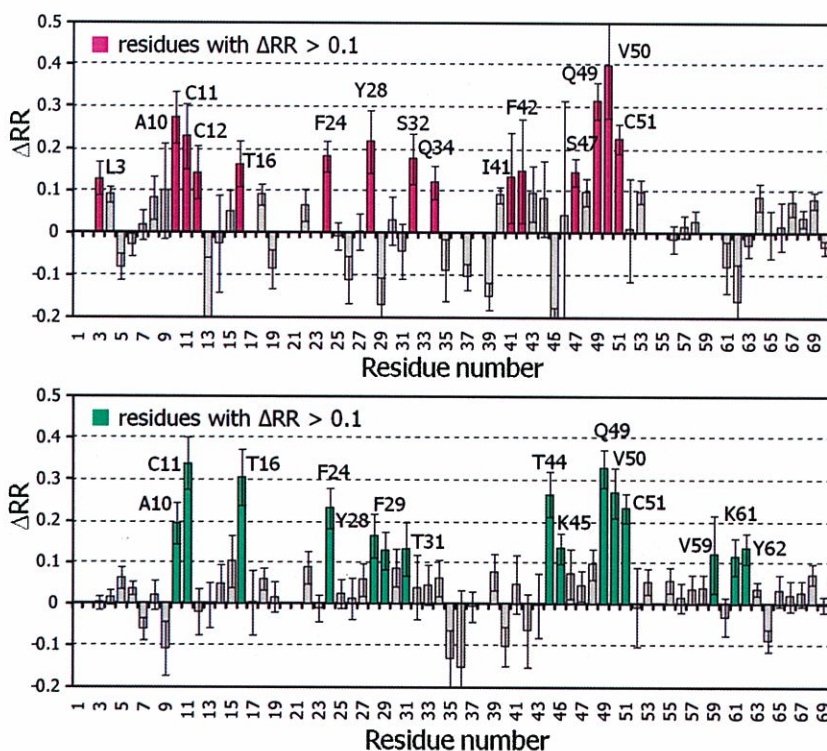


Fig.3 TCS 実験結果
CCR1/CCR5-rHDL を用いた実験におけるシグナル強度減少率(ΔRR) を観測したプロトンに対してプロットした。黒色で示すプロトンについて、顕著なシグナル強度減少を観測した。
(上) CCR1-rHDL を用いた実験結果
(下) CCR5-rHDL を用いた実験結果

【考察】

TCS 実験により、CCL3 の Gln34 または Val63 近傍の領域は、CCR1・CCR5 に対する特異的な結合部位であることがわかった。これらの領域にはいずれも酸性残基が含まれていた(Fig.4)。これらの酸性残基は、CCR1 または CCR5 のリガンドとなる他のケモカインにおいて保存されていたことから、他のケモカインにおいても CCR1 および CCR5 認識に重要であることが示唆された。

さらに、Val63 近傍の領域の相互作用様式の違いから、CCL3 とアミノ酸 3 残基 (P2S/G39S/S47G) のみが異なる natural variant である CCL3L1 と CCR1・CCR5 相互作用に関して以下の考察を行った。CCL3 と CCL3L1 は、CCR1 に対して同程度のアゴニスト活性を持つ。一方、CCR5 に対するアゴニスト活性は CCL3L1 の方が 10 倍程度高く、CCR5 を介した HIV 阻害活性についても 10-50 倍高い。このことから、CCL3L1 は CCL3 に比べ高い CCR5 選択性を持つと考えられる。これまでの知見から、ケモカイン-ケモカイン受容体間の認識特異性は、ケモカインの N 末端の配列の違いが担っていると考えられていた。しかしながら、CCL3 と CCL3L1 の N 末端配列の違いは 1 残基のみであり、これらの受容体認識様式にどのような特徴があるかについては不明であった。

CCL3 において、CCL3L1 で異なるアミノ酸残基 Gly39, Ser47 は、疎水性残基が多く変異体解析などの報告が得られていない領域に位置する。このうち Gly39 は、TCS 実験により同定した CCR5 に特異的な結合部位に近接していた。したがって、CCL3L1 は、この領域において CCL3 と異なる立体構造を持つことにより、CCR5 に対してより高い選択性を有すると考えた。

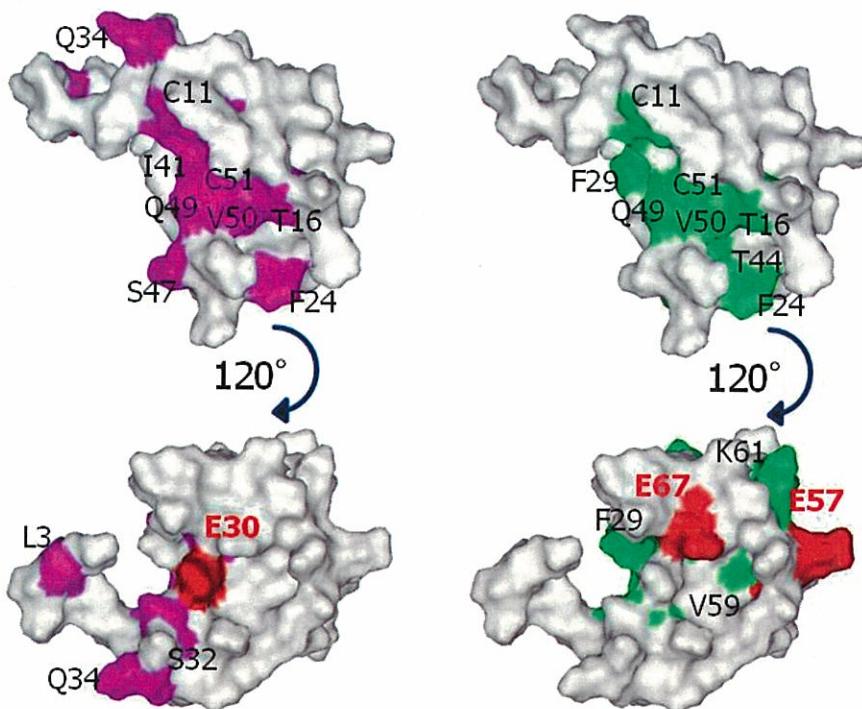


Fig.4 TCS 実験結果の CCL3 分子構造上へのマッピング

(左、マゼンタ)

CCR1-rHDL を用いた TCS 実験結果

(右、緑)

CCR5-rHDL を用いた TCS 実験結果

CCR1 または CCR5 のリガンドとなるケモカインにそれぞれ保存されていた酸性残基を赤色にて示す。