

[別紙 2]

審査結果の要旨

氏名 吉浦 知絵

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と題する本論文は、ケモカインの一種である CCL3 が 2 種類の受容体 CCR1、CCR5 を認識する機構に関して、NMR にて解析した成果を述べたものである。本論文は、全 4 章から構成されており、第 1 章に序論、第 2 章に実験材料および実験方法が記されている。第 3 章に実験結果がまとめられ、第 4 章では、実験結果に対する考察と今後の展望について述べている。

第 3 章においては、まず、解析対象としたケモカイン CCL3 とケモカイン受容体 CCR1、CCR5 の調製を行っている。次に、調製した CCL3 と CCR1、CCR5 の結合親和性を評価し、最後に、溶液 NMR 法の一種である転移交差飽和法 (TCS 法) を用いて CCL3 分子表面上における受容体 CCR1、CCR5 結合部位の同定を行っている。

ケモカイン受容体 CCR1、CCR5 は、G タンパク質共役型受容体(GPCR) の一種であり、7 回膜貫通型受容体である。一般に、GPCR は界面活性剤にて可溶化した状態における性状が不安定であることから、構造生物学的解析に適した試料の調製が困難であった。これに対し、本論文では reconstituted HDL (rHDL) を用いた脂質二重膜再構成法を導入し、CCR1、CCR5 を安定に保持することに成功した。rHDL を用いて調製した CCR1、CCR5 (CCR1、CCR5-rHDL) を精製し、昆虫細胞 1L 培養から約 30 μg の CCR1、約 10 μg の CCR5 を含む rHDL を約 80 % の純度で得ている。調製した CCR1、CCR5-rHDL に G タンパク質を添加した試料を用いて GDP-GTP 交換アッセイを行い、添加した CCL3 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 タンパク質の GDP-GTP 交換を誘起することを確認していた。次に、解析に用いた CCL3 と、CCR1、CCR5-rHDL 間の結合親和性を決定するため、SPR 解析を行っていた。その結果、算出した解離定数は CCL3—CCR1、CCL3—CCR5 のいずれにおいても約 5 μM であった。次に、CCL3 と CCR1、CCR5-rHDL に対して、TCS 実験を行い、CCL3 分子表面上における受容体結合部位の同定を試みていた。TCS 実験では、観測対象とした CCL3 分子上において、複合体形成時に受容体に近接する領域を、NMR シグナルの強度減少として検出した。50 μM となる均一 ^2H 、 ^{15}N 標識した CCL3 に対し、約 3 μM となる CCR1、CCR5-rHDL、または受容体を含まない空の rHDL を添加したものを NMR 試料として用いた。CCR1、CCR5-rHDL を用いた実験において検出したシグナル強度減少率から、

空 rHDL を用いたコントロール実験にて観測したシグナル強度減少率を差し引いた値(ΔRR)を算出し、 $\Delta RR > 0.1$ となる残基を受容体結合部位として同定していた。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、これらの部位を受容体結合界面に位置することを示していた。

第 4 章においては、CCL3、CCR1、CCR5-rHDL を解析に用いてこれら分子の生体内における機能を評価することの妥当性に関して議論している。次に、TCS 実験から同定した CCL3 の受容体結合部位をもとに、CCR1 と CCR5 に対する認識様式の違いを議論している。CCL3 の 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。これらの領域にはいずれも酸性残基が含まれていた。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 認識に関与することが示唆された。

本研究では、これまで解析が困難であったケモカイン受容体 CCR1、CCR5 と、そのリガンドとなる CCL3 との相互作用に着目し、構造生物学的解析に適した試料調製および NMR 解析の方法を確立した。その結果、CCL3 が 2 種類の受容体を識別する機構を提唱している。

以上、本研究の成果は、ケモカイン-ケモカイン受容体の関与する免疫システムに対して新たな知見を加えるものであり、これ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。