

NMRに基づくケモカイン受容体 CCR2 と 制御因子フロントとの相互作用解析

分子機能薬学専攻 創薬化学講座 構造機能物理化学分野 江崎 芳

Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) は、細胞外の刺激を受容して、細胞内のシグナル伝達機構を活性化する分子スイッチである。GPCR は、免疫、神経応答、感覚受容など、様々な生命活動を制御し、細胞の外から内への情報伝達において中心的な役割を果たしている。創薬の主要な標的として注目され、実際、現在販売されている医薬品の約 40% が GPCR を標的とすることが知られている。そのため、GPCR の制御機構を理解することは、生命活動全体における情報伝達機構の解明だけでなく、医薬品の作用機序や副作用発症機構の理解、さらに、新たな創薬標的の創出につながることを期待される。

すべての GPCR は、7 つの膜貫通領域を挿んで、N 末端を細胞外に、C 末端を細胞内に露出した共通の構造をもつ。細胞質に露出した C 末端の膜近傍部位 (Pro-C) が、GPCR の活性制御に関与していることが報告されているが、その分子機構については明らかとなっていない。

ケモカイン受容体は、これまでに 19 種類が報告されており、すべてが GPCR クラス A に属している。細胞内の C 末端領域、特に、Pro-C がケモタキシスに重要であることが知られている。CCR2 および CCR5 においても、Pro-C の欠損によって、ケモカイン依存の細胞遊走が阻害されることが報告されている。共同研究者である寺島らは、近年、CCR2 および CCR5 の Pro-C に結合する 75 kDa の可溶性タンパク質、フロントを見いだした (1)。本研究は、CCR2—フロント間相互作用を介した白血球の遊走応答シグナル伝達機構を構造生物学的に解明することを目的とする。本研究によって、ケモカイン受容体が関与する白血球の遊走機構が明らかとなるだけでなく、GPCR に共通する新規の制御機構が明らかになることが期待される。

フロントの構造生物学的解析には、精製タンパク質を mg オーダーで取得する必要がある。各種発現プラスミドと培養条件について検討を行い、コールドショック発現システムを利用し、またフォールディングシャペロンであるトリガーファクターを N 末端に融合することで十分量のフロントを可溶性画分に得

ることができた。また、各種クロマトグラフィーを用いて、フロントタンパク質を高純度に精製することに成功した。表面プラズモン共鳴法 (SPR 法) による解析から、フロントが、単独で CCR2 Pro-C 結合活性を持ち、その解離定数が約 $3 \mu\text{M}$ であることを明らかにした。また、ゲル濾過及び動的光散乱による分析により、フロントは7量体程度のホモオリゴマーとして存在することが明らかとなった。

次に、CCR2 Pro-C の溶液構造を明らかにするため、CCR2 Pro-C を16アミノ酸残基からなるペプチドとして調製した。各種 NMR スペクトルを解析した結果、CCR2 Pro-C は、単独では特定の構造を形成しないが、フロントもしくは DPC ミセルと結合することで α -ヘリックス構造が誘起されることが明らかとなった。

次に、CCR2 Pro-C がどのアミノ酸残基で膜と相互作用しているかを調べるため、NMR 交差飽和法 (2) による解析を行った。その結果、 α -ヘリックスの片側に位置する疎水性アミノ酸残基が、膜との相互作用界面に存在することがわかった。さらに、CCR2 Pro-C と全長フロントとの相互作用について、結合状態の相互作用を解離状態で観測する転移交差飽和法 (2) を用いて解析した。その結果、フロントとの相互作用に重要なアミノ酸残基は、 α -ヘリックスの片側に位置できる疎水性アミノ酸であり、膜との相互作用部位と重なっていることがわかった。同定したフロント相互作用部位にあるアミノ酸残基に変異を導入し、表面プラズモン共鳴法によりフロント結合活性を解析したところ、野生体と比較して結合活性が大きく低下することがわかった。

CCR2 Pro-C は、一次構造上、膜貫通ドメインの直下に存在する。DPC ミセル存在下で α -ヘリックス構造を形成したことから、CCR2 Pro-C は生体内で、膜と相互作用して α -ヘリックス構造をとると考えられた。また、CCR2 Pro-C 上のフロント結合部位と膜結合部位が共通していることが明らかとなり、CCR2 Pro-C が両者と同時に結合できないことが示唆された。以上のことから、CCR2 がケモカインを認識することで、Pro-C の膜への配向が変化し、フロントとの結合および下流のシグナルの活性化がおこるといったケモカインシグナルの制御仮説が考えられた。

【参考文献】

- (1) Terashima, Y. *et al.*, *Nat Immunol* 6 (8), 827-835 (2005).
- (2) Shimada, I., *Methods Enzymol* 394, 483-506 (2005).