

「補助刺激受容体を介する免疫系シグナル伝達分子の構造基盤の解明」

公益財団法人 高輝度光科学研究センター 利用研究促進部門

稲葉 理美

1 研究の背景と目的

タンパク質は自然界に広く存在する生体高分子の 1 つであり、これらの構造と機能は多岐にわたる。これまでに数多くのタンパク質の立体構造が X 線結晶構造法、核磁気共鳴法、さらにクライオ電子顕微鏡などで詳細に解明されてきた。これらの情報は、機能的分子や医薬品などの様々な方面で利用されている一方で、静的な構造情報からは得られない「タンパク質の動き」に関する知見の重要性が認知されている。例えば、創薬標的タンパク質をはじめとするドラッグデザインでは、原子レベルでの立体構造情報に加え、タンパク質の「動き」を解明する必要がある、その評価が困難であることがドラッグデザイン全般の障壁となることが知られている。本研究では、免疫系シグナル伝達に重要な補助刺激受容体とアダプタータンパク質との複合体について、「タンパク質の動き」を反映する溶液構造に着目して進めた。以下に具体的な背景を示す。

体内に侵入した外来抗原が抗原提示細胞により T 細胞に提示されると、その抗原に特異的な T 細胞の増加、サイトカインの産生、各種機能細胞への分化が引き起こされることが知られている。獲得免疫における T 細胞の活性化には、これらの抗原提示細胞上にある主要組織適合複合体 (MHC) と T 細胞上にある T 細胞受容体 (TCR) 間相互作用による主要シグナルに加え、B7 分子群と補助刺激受容体による補助シグナルが必要不可欠である (図 1)。この補助シグナルが与えられない場合、T 細胞の活性化が誘導されないだけでなく、アナジー (抗原特異的な不応答) が引き起こされることが知られている。すなわち、これらの補助シグナルの機構解明は免疫応答を理解するうえで重要である。特に T 細胞活性化初期においては、補助刺激受容体として CD28 が発現することが知られている。この CD28 自身は酵素活性などを持っていないが、細胞内領域に特徴的なチロシンモチーフ (YMNМ) を有しており、キナーゼ等によりリン酸化されることで、SH2 ドメインをもつタンパク質 (Grb2、Gads、PI3-kinase p85) がリクルートされ結合する。その後、様々な分子の結合カスケードを経てシグナルが伝達される。このことから、アダプター分子の CD28 受容体への結合様式を明らかにすることは、補助シグナル伝達機構を理解するうえで重要である。これまでに、4 つのアダプター分子 SH2 ドメイン (Grb2 SH2、Gads SH2、p85 nSH2 および p85 cSH2) と CD28 細胞内領域リン酸化ペプチドとの高分解能結晶構造解析に成功し、詳細な相互作用様式を明らかにした (Inaba *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 292, 1052, 2017)。また、溶液中での分子間相互作用を等温滴定熱量計 (ITC) で解析し、立体構造と結合熱力学量との相関評価を行った。これらの研究により、類似した立体構造と SH2 ドメインごとに異なる ITC での結合プロファイルが明らかとなり、溶液中での構造形態の違いを示唆する結果となった。そこで本研究では、X 線結晶構造解析法および X 線小角散乱法を利用し、結晶構造情報をもとに溶液構造を評価し、特に細胞内に近い条件下での構造形態を明らかにすることを目的とした。さらに CD28 だけでなく、活性化した T 細胞でも発現する他の補助刺激受容体の分子についても同様に行い、免疫系シグナル伝達機構の構造基盤を解明することを目指した。

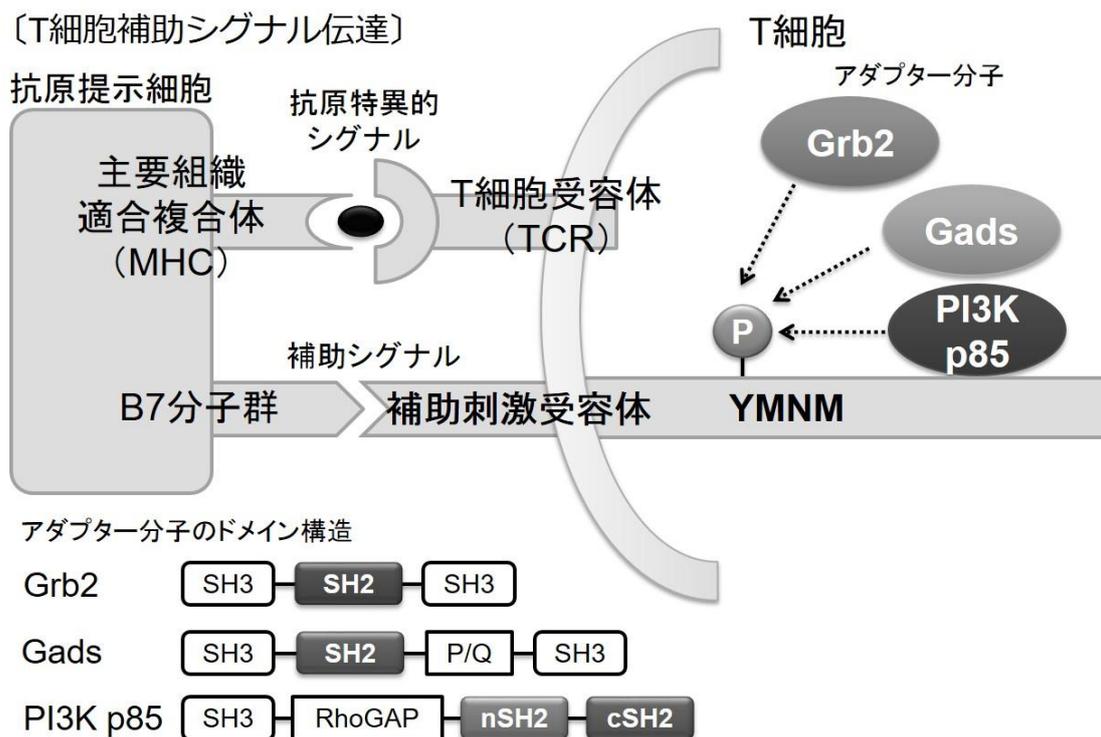


図1 T細胞活性化機構の概要とシグナル伝達分子のドメイン構造

2 研究方法・研究内容

研究対象のシグナル伝達タンパク質として、Grb2 SH2、Gads SH2、p85 nSH2 および p85 cSH2 を調製したいずれも GST 融合型の組換えタンパク質として発現させ、各種クロマトグラフィーおよびプロテアーゼによるタグ切断・除去することによって高純度で精製したものを用いた。一方、SH2 ドメインと結合する CD28 ファミリー細胞内領域のリン酸化ペプチド（以下、リガンドペプチド）については、リン酸化チロシンを含む 10-12 アミノ酸をデザインし、受託合成・精製により高純度試料を準備した。

まず初めに、高精度な立体構造を明らかにするためにタンパク質の X 線結晶構造解析を行った。高純度に精製した4種類のSH2タンパク質とリガンドペプチドを適量混合し、共結晶化のスクリーニングを実施した。得られた複合体結晶の品質を X 線回折実験により評価し、更なる結晶化条件の最適化を進めた。なお、タンパク質複合体結晶化の一部については、国立研究開発法人宇宙航空研究開発機構（JAXA）が提供する「国際宇宙ステーションきぼう日本実験棟」での「高品質タンパク質結晶成長実験プロジェクト（PCG）」の一環として実施した。

次に、X 線小角散乱（SAXS）測定を行った。SAXS では、タンパク質溶液に X 線を照射し、そこから得られる散乱プロファイルを解析することで、溶液中における分子形状や構造形態を明らかにすることが可能である。今回は、タンパク質およびリガンドペプチド存在下・非存在下で測定し、複合体形成における溶液構造の変化に着目した。なお、複合体測定を実施するにあたり、オンラインでゲル濾過クロマトグラフィー（SEC）を連結し

た SEC-SAXS 法を適用した。この方法では SEC により分子形状ごとに溶出した試料に対して、短時間の X 線照射を繰り返すことで、単分散状態での SAXS 測定が可能となり、主に凝集・多量化しやすい試料や複合体解析に有用な手法である (図 2)。SEC-SAXS 測定は SPring-8 の BL45XU にて実施し、エネルギーは 12.4 keV (アンジュレーター光源)、検出器は PILATUS 3X 2M、カメラ長は約 2 m とした。なお、測定に先立ち試料濃度、溶液条件、X 線強度や照射時間などを検討し、ダメージによる影響を精査して測定条件を決定した。得られたクロマトグラムおよび散乱プロファイルから、相対分子量、慣性半径 (R_g)、最大半径 (D_{max}) および 2 点間距離分布 ($P(r)$) を求めた。また、 $P(r)$ に基づくモデル (DAMMIN atom model) も構築し、既に決定した立体構造と比較した (図 2)。さらに高分解能結晶構造情報に基づく予測散乱プロファイルと、実際の測定で得たプロファイルと比較し、溶液中での存在形態 (構造) を評価した。

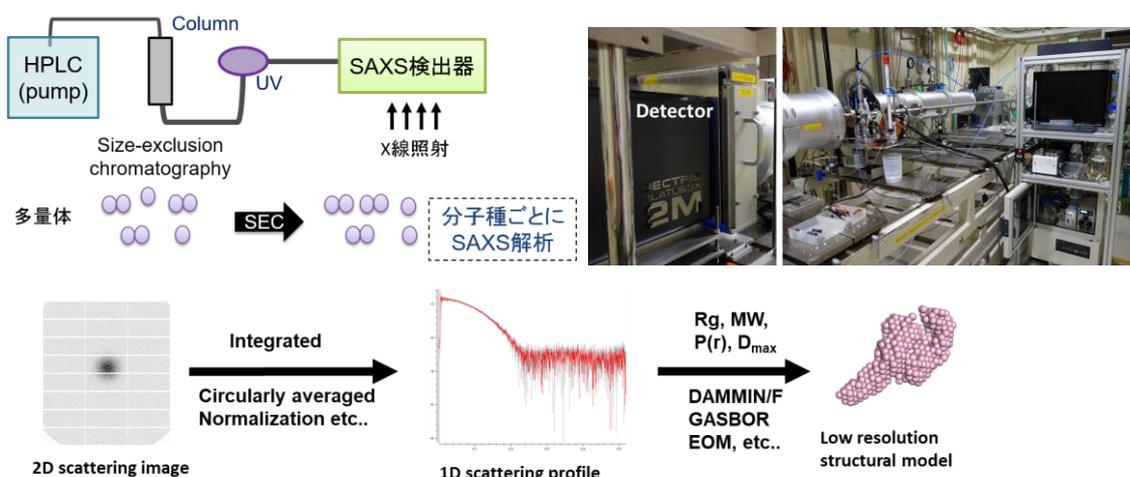


図 2 SEC-SAXS の概要およびビームライン (上) と SAXS 解析方法の概要 (下)

3 研究成果

シグナル伝達タンパク質の SH2 ドメインとリガンドペプチドとの共結晶構造解析では、一部の条件で良好な複合体結晶が得られ、X 線回折測定および位相回復、精密化により詳細な構造を明らかにすることに成功した。既に報告した CD28 ペプチドと類似した結合様式を示した。現在、更なる高分解結晶構造決定を目指して、引き続き高品質な結晶作成を進めている。

SEC-SAXS による解析では、タンパク質よりも多くのリガンドを添加した状態で測定を行った。その結果、リガンドペプチド存在下・非存在下において SEC の保持時間に差異が見られ、前者は複合体構造として捉えられていることを確認した。クロマトグラムはいずれの SH2 ドメインおよび複合体においても単一のピークを示し、ピーク前後で得られた SAXS の散乱プロファイルを積算して解析に用いた。なお、移動相の溶液条件を検討したところ、Tris-HCl および一定濃度以上の塩が存在することで、X 線ダメージの影響を少なく出来ることも分かった。

ギニエ領域のプロットより算出した慣性半径 R_g は、全ての SH2 について複合体状態で大きくなった。また、最大半径 D_{max} も同様に複合体において大きな値を示した。一方、

二点間距離関数 $P(r)$ においては、リガンドペプチド存在下・非存在下において分布の広がりに違いが見られた。興味深いことに、 R_g と D_{max} が大きな複合体状態において、分布のピークが小さい方へシフトしていた。これらの結果は、複合体形成に伴ってタンパク質の大きさは増大しているが、全体としてはコンパクトな構造を取る可能性があることを示している。複合体において R_g と D_{max} が増加した理由としては、リガンドペプチドの C 末端側に存在する、SH2 と直接相互作用しない領域の影響であると考えている。

最後に、高分解能結晶構造との相互評価を行った。PDB の座標情報に基づき、SAXS 散乱プロファイルを予測し、実際の測定 SAXS 散乱プロファイルと比較した。いずれの SH2 ドメイン、およびリガンドペプチド複合体においても、結晶構造化や予測した曲線と良い一致を示した。これらの結果は、分子の全体的な溶液構造は結晶構造と得られたものとよく類似していることを意味している。しかし、少なからず違いが見られた領域もあり、今後はさらに分子モデルを再構築・精密化しながらより近い溶液構造を突き止めたいと考えている。

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究対象タンパク質は免疫系シグナル伝達に深く関与することから、「タンパク質の動き」を含めた、受容体とタンパク質の詳細な相互作用様式を解明することで創薬方面に展開しうる系である。一例ではあるが、既存の生物製剤は薬価が高いことに加え、細胞外受容体間相互作用阻害剤であるため、以降の下流シグナルが全て止まり副作用も問題となっている。今回着目したように、受容体の細胞内を標的とすることで、必要なシグナル伝達のみを標的とし、将来的には低価格な非生物製剤の阻害剤創製に繋げることが期待できる。

またタンパク質科学全体として捉えると、高分解能結晶構造解析に基づく溶液構造の評価方法としても利用できる系である。今後は、シミュレーションや他の物理化学手法も組み合わせながら、統合的な視点から「タンパク質の動き」を解明する一つのツールとしても有用であると考えている。

末筆になりましたが、本研究の放射光 X 線を用いた実験を遂行するにあたり、測定・解析について様々な支援・ご助言いただきました SPring-8 ならびに Diamond Light Source のビームラインスタッフの方々に心より感謝申し上げます。