

機関番号：17401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790082

研究課題名 (和文) 新規細胞内因子へと伝搬される G 蛋白質共役受容体の立体構造変化の解析

研究課題名 (英文) Analysis of conformational changes of a G protein-coupled receptor that are propagated to a novel intracellular factor.

研究代表者

吉永 壮佐 (YOSHINAGA SOSUKE)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：00448515

研究成果の概要 (和文)：

ケモカイン受容体 CCR2b の新規細胞内制御因子 FROUNT について、大腸菌を用いた発現系と精製系を構築し、立体構造解析を行うのに十分な量の組み換えタンパク質を取得した。また、この全長の FROUNT タンパク質が CCR2b 結合活性をもつことを、溶液 NMR 法および表面プラズモン共鳴法を用いて明らかにした。さらに、全長の CCR2b について、昆虫細胞を用いた発現系と精製系を構築した。

研究成果の概要 (英文)：

We succeeded in constructing a protein expression system for a novel intracellular factor FROUNT that regulates a chemokine receptor CCR2b using *Escherichia coli* cells and developing a protocol for the protein purification. Utilizing this system and protocol, we obtained large amounts of purified full-length FROUNT proteins that are enough for structural analyses. We elucidated that the purified FROUNT proteins possess CCR2b-binding activity with solution NMR and surface plasmon resonance. We also succeeded in constructing a protein expression system of full-length CCR2b using insect cells and developing a protocol for the protein purification.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：構造生物学

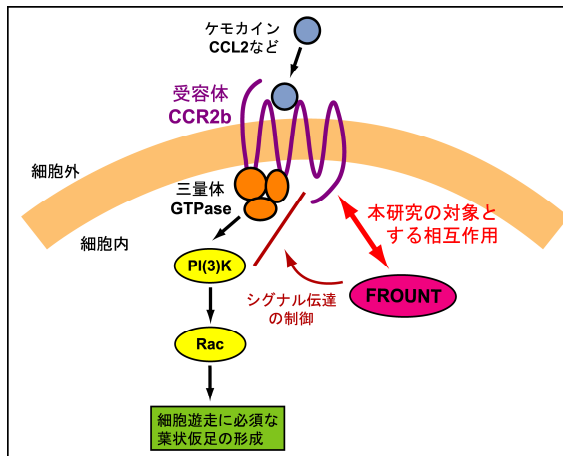
科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：ケモカイン受容体、NMR、構造生物学、炎症性免疫疾患、創薬

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、ケモカイン受容体 CCR2b とその新規細胞内制御因子 FROUNT の相互作用について、核磁気共鳴法 (NMR) を用いた解析を行ってきた。その結果、CCR2b 上の FROUNT 結合部位を同定した (未発表)。既知の G タ

ンパク質共役受容体の立体構造を用いた解析から、CCR2b 上の FROUNT 結合部位は、通常はマスクされた状態であると考えられた。外部からのシグナルにより、CCR2b が立体構造変化を起こして結合部位が露出し、FROUNT が結合すると考えられる (図1)。



(図1) ケモカイン受容体 CCR2b におけるシグナル伝達経路と FROUNT の役割

2. 研究の目的

本研究は、新規細胞内制御因子 FROUNT の結合にともなうケモカイン受容体 CCR2b の立体構造変化を、溶液 NMR 法を用いて明らかにすることを目的とする。また、得られた知見を、CCR2b をはじめとする G タンパク質共役受容体 (GPCR) をターゲットとした創薬に活用する。

3. 研究の方法

研究試料として、結合活性を保持した FROUNT および CCR2b が必要である。全長の FROUNT については、大腸菌を用いた大量発現系と精製系の構築を行う。全長の CCR2b については GPCR であることを考慮し、バキュロウイルス-昆虫細胞を用いた大量発現系と精製系の構築を行う。また、FROUNT の CCR2b 結合ドメイン、および CCR2b の FROUNT 結合領域 (Pro-C) については、大腸菌を用いた大量発現系を既に確立しているため、適宜、試料調製を行い、使用する。

4. 研究成果

(1) 大腸菌を用いた全長 FROUNT タンパク質の大量発現・精製系の構築

大腸菌における発現用のコンストラクトとして、アミノ末端にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) あるいはポリヒスチジンタグ (His_6) を融合させたものを構築した。これらのベクターにて大腸菌を形質転換し、 32°C と 16°C の2つの温度条件でそれぞれ発現を誘導させたが、いずれの条件においても可溶性画分への発現がほとんど見られなかった。

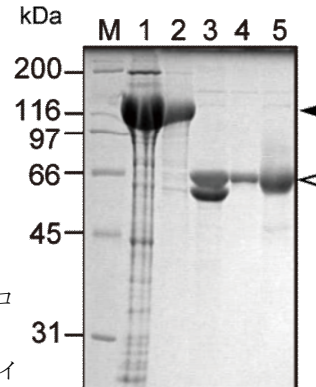
可溶性画分への発現を促進するため、 His_6 と全長 FROUNT の間に、大腸菌のシャペロンであるトリガーファクター (TF) を組み込み、

かつコールドショックベクターを利用して 15°C で発現誘導させたところ、可溶性画分に発現をシフトさせることに成功した (図2, レーン1) (Esaki K. *et al. Protein Expression and Purification* **77**, 86-91)。

(図2)

大腸菌を用いた全長 FROUNT タンパク質の発現と精製 (SDS-PAGE)

1 : 可溶性画分,
2 : ニッケルアフィニティークラム溶出画分, 3 : プロテアーゼ消化後,
4 : ニッケルアフィニティークラムフロースルー画分, 5 : ゲル濾過カラム溶出画分



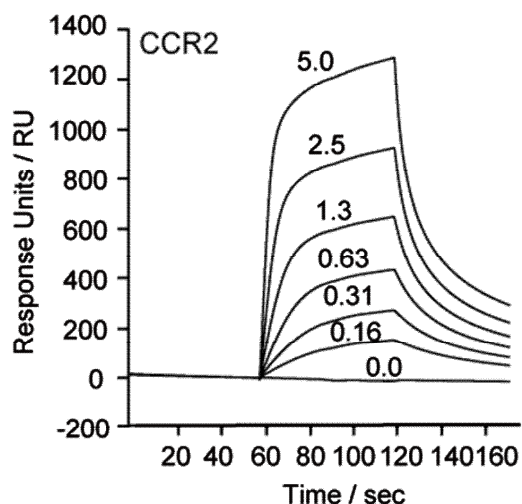
可溶性画分に発現させた His_6 -TF 融合全長 FROUNT タンパク質をニッケルアフィニティークロマトグラフィーにて粗精製後 (レーン2), プロテアーゼにより His_6 -TF と FROUNT の間で切断した (レーン3)。ニッケルアフィニティークロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーを用いて、全長 FROUNT を単離した (レーン4と5)。

立体構造解析を行うのに十分な量の組み換え全長 FROUNT タンパク質を取得することに成功した。

(2) 全長 FROUNT タンパク質と CCR2b の相互作用の解析

調製した全長 FROUNT が CCR2b と結合することを明らかにするため、表面プラズモン共鳴法を用いた。全長 FROUNT をチップ上に固定化し、調製した CCR2b の FROUNT 結合領域 (Pro-C) との結合を検出し、解離定数 K_d が $0.3 \mu\text{M}$ であることを明らかにした (図3) (Esaki K. *et al. Protein Expression and Purification* **77**, 86-91)。

また、溶液 NMR 法を用いた相互作用の解析を進めている。 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ の安定同位体で標識した CCR2b Pro-C を調製して全長 FROUNT と混ぜ合わせ、全長 FROUNT 結合にともなう Pro-C 由来の NMR 信号の変化を検出することに成功した (未発表)。現在、残基レベルで結合部位についての解析を行っているところである。



(図3) 表面プラズモン共鳴法を用いた全長 FROUNT と CCR2b の相互作用の解析
固定化した全長 FROUNT へ CCR2b Pro-C (0, 0.16, 0.31, 0.63, 1.3, 2.5, 5.0 μ Mの各濃度)を流し、表面プラズモン共鳴の変化を検出した。

(3) バキュロウイルス—昆虫細胞を用いた全長 CCR2b タンパク質の大量発現・精製系の構築

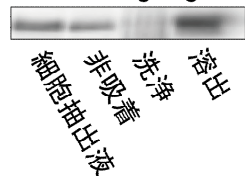
バキュロウイルス—昆虫細胞における発現用のコンストラクトとして、カルボキシル末端に Flag タグ (Flag) を融合させたものを構築した。培地組成、培養温度、培養時間、細胞抽出条件等の種々の検討により、組み換えバキュロウイルスに感染させた Sf9 細胞に全長 CCR2b タンパク質を発現させることに成功した (未発表)。

また、細胞抽出液の Flag アフィニティークロマトグラフィーを行うことで、全長 CCR2b の精製を行うことに成功した (図4)。

全長 FROUNT タンパク質との結合能を確認し、相互作用解析に供する予定である。

(図4) [CCR2b-Flag-tag 精製]

バキュロウイルス—昆虫細胞を用いた全長 CCR2b タンパク質の発現と精製 (SDS-PAGE)



Flag アフィニティークロマトグラフィーにおける各画分に含まれる全長 CCR2b を抗 Flag 抗体にて検出した。

以上、本研究において、全長 FROUNT および全長 CCR2b タンパク質の大量発現・精製系の構築に成功した。

ケモカイン受容体 CCR2b を介したシグナル伝達は、単球やマクロファージの細胞遊走を担うことから、異常なシグナル伝達活性化が動脈硬化症やリウマチ性関節炎などの様々な慢性炎症性免疫疾患の発症原因となることが知られている。FROUNT が選択的にケモカイン受容体を認識する機構の解明が、慢性炎症性免疫疾患の治療のためにも多いに期待されている。

本研究において得られた試料に対して溶液 NMR 法を適用し、CCR2b の立体構造変化を明らかとし、今後、創薬へと展開してゆく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Kaori Esaki, Yuya Terashima, Etsuko Toda, Sosuke Yoshinaga, Norie Araki, Kouji Matsushima, and Hiroaki Terasawa Expression and purification of human FROUNT, a common cytosolic regulator of CCR2 and CCR5. *Protein Expression and Purification* 77, 86-91 (2011), 査読有り

[学会発表] (計12件)

- ① 辻辰一朗、溶液 NMR 法を用いたケモカイン受容体会合分子 FROUNT の構造生物学的研究、第34回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、2010年9月9日、玄海ロイヤルホテル(福岡)
- ② 土屋祐輔、ケモカイン受容体 CCR2 の細胞内制御因子 FROUNT に関する構造生物学的研究、第34回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、2010年9月9日、玄海ロイヤルホテル(福岡)
- ③ 江崎芳、ケモカイン受容体と制御因子 FROUNT との相互作用に関する構造生物学的研究、第10回日本蛋白質科学会年会、2010年6月17日、札幌コンベンションセンター(札幌)
- ④ 遠田悦子、細胞遊走シグナル制御分子 FROUNT とケモカイン受容体間の相互作用様式の解析、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月10日、パシフィコ

横浜（横浜）

- ⑤ 江崎芳、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、第48回 NMR 討論会、2009年11月10日、九州大学医学部百年講堂（福岡）
- ⑥ 藪田晃弘、ケモカインのシグナル伝達を制御する細胞内因子 FROUNT の構造生物学的研究、第48回 NMR 討論会、2009年11月10日、九州大学医学部百年講堂（福岡）
- ⑦ 江崎芳、C 末端膜近傍領域を介した新規 GPCR 活性化機構に関する構造生物学的研究、第82回日本生化学会大会、2009年10月22日、神戸ポートアイランド（神戸）
- ⑧ 藪田晃弘、ケモカイン受容体の細胞内制御因子 FROUNT の構造生物学的研究、第33回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、2009年9月10日、唐津シーサイドホテル（佐賀）
- ⑨ 江崎芳、ケモカイン受容体 CCR2 の立体構造変化と活性制御に関する構造生物学的研究、第33回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、2009年9月10日、唐津シーサイドホテル（佐賀）
- ⑩ 矢野浩太郎、白血球遊走制御タンパク質 FROUNT に関する構造生物学的研究、第33回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、2009年9月10日、唐津シーサイドホテル（佐賀）
- ⑪ 藪田晃弘、ケモカインシグナルを伝達する細胞内因子 FROUNT の構造生物学的研究、第9回日本蛋白質科学会年会、2009年5月21日、熊本全日空ホテルニュースカイ（熊本）
- ⑫ 江崎芳、ケモカイン受容体の細胞内シグナル伝達機構に関する構造生物学的研究、第9回日本蛋白質科学会年会、2009年5月21日、熊本全日空ホテルニュースカイ（熊本）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉永 壮佐 (YOSHINAGA SOSUKE)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：00448515

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

寺島 裕也 (TERASHIMA YUYA)

東京大学・大学院医学系研究科・客員研究員

寺沢 宏明 (TERASAWA HIROAKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：10300956