

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月18日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570127

研究課題名（和文）

自然免疫に関わる受容体タンパク質 CD14 と膜トリガンドとの相互作用解析

研究課題名（英文）

Interaction between Innate Immune Receptor CD14 and Ligand LPS on Membranes

研究代表者

三浦（野村）薫（ミウラ（ノムラ）カオル）

公益財団法人 サントリー生命科学財団 生物有機科学研究所 研究員

研究者番号：90353515

研究成果の概要（和文）：GPI アンカー型 CD14 の試料調製が難航したため計画を変更し、シンプルなタンパク質を用いて擬似的な GPI アンカー型タンパク質を調整し、脂質二重膜に再構成し、高分解能な固体 NMR 測定を行う手法を構築した。

研究成果の概要（英文）：To complete the methodology, we changed the procedure into using a model membrane. We succeeded in obtaining high resolution solid-state NMR spectra of membrane samples in which pseudo GPI-anchored proteins were inserted.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：

キーワード：GPI アンカー・ 固体 NMR 法・ 脂質二重膜・ 自然免疫・ 酵母培養系

1. 研究開始当初の背景

最近注目を集めている自然免疫システムは、排除すべき病原体が体内に侵入してきたときに、特異性が高く有効な防御機構である獲得免疫に先立って直ちに作動される生体防御システムである。細菌やウイルス等の病原体の存在に必須のそれらの細胞壁構成成分や核酸成分などの分子群（PAMPs: pathogen associated molecular pattern）によって始動される。病原体から遊離したこの PAMPs が数種類の PAMPs 共通の高親和性受容体である CD14 に検知され、さらに Toll 様受容体（TLR）に引き渡され、自然免疫のシグナルが細胞内に伝わっていく。1996 年にホフマンらがショウジョウバエの細胞表面にある Toll というタンパク質を発見し、これが病原菌成分を認識して、その信号を細胞内に伝達することを明らかにした。これをきっかけに自然免疫システムの研究は分子生物学的な手法を中心

に急速に進められた。翌年には、TLR4 が認識する分子がリポ多糖（LPS）であることが明らかとなり、長い間不明であった動物細胞側の病原体認識の機構が解明された。これまでにヒトに 10 種類の TLR（TLR1～TLR10）が同定され、さらにそれぞれの TLR が検知、認識する PAMP も全て同定された。しかし、この領域の研究は、遺伝子の導入やノックアウト等の遺伝子工学的な手法が主体となっており、細胞膜内にシグナルが伝わった後の免疫シグナルカスケードの解明が中心であったために、自然免疫における分子認識の初期過程に当る膜外部分での分子認識機構の解析はあまり行われてこなかった。最近になって、TLR1/TLR2 ヘテロダイマーとこれが認識する PAMP であるリポペプチドとの複合体、TLR3/TLR3 ホモダイマーと二重鎖 RNA の複合体、さらには TLR4/TLR4 ホモダイマーとこのアクセサリー分子である MD2、そして TLR4 の

拮抗剤エリトランの複合体のX線結晶構造が報告され、免疫シグナルカスケードを開始する重要な部分が分子レベルで精密に解析され始めた。

一方、我々はこれまで、自然免疫のシグナル伝達の初期過程に注目して研究を行ってきた。さまざまなPAMPsを受容体タンパク質が認識する際に、その反応の場である動物細胞側の細胞膜がどのように関与しているのかを明らかにすることを目的として、LPSと脂質膜との親和性やLPSが膜に与える影響、膜の流動性変化等を解析し、LPSが膜と高い親和性を持ち、膜中に存在するLPSが膜の性質を大きく変えることで、自己触媒的にシグナル伝達を促進している可能性があることを解明してきた。

2. 研究の目的

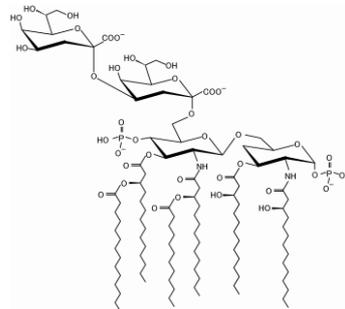
微生物由来のPAMPsの多くは、免疫担当細胞上の共通の高親和性受容体CD14によってまず検知、捕捉され、それがシグナル伝達に関わるToll様受容体に引き渡されて、異物侵入シグナルが細胞内に伝わり自然免疫系が機能すると言われている。そこで、リポ多糖、リポペプチド等の代表的なPAMPsが宿主細胞上で細胞膜成分、受容体CD14とどのように相互作用し、認識され機能するかという自然免疫の初期過程を固体NMRを中心とした手法で分子の相互作用と分子の動きとして理解することを目指した。CD14は、アミノ酸残基約320残基からなるGPIアンカー型の膜タンパク質である。CD14単体での膜外部分のX線結晶構造はすでに明らかになっており、ロイシンリッチリピート型の馬蹄型構造を取ることはわかっているが、これが、膜に対してどのような位置関係で存在しているかは未だわかっていない。C末端にあるGPIアンカーが膜に挿入しているのみならず、LPS認識部位といわれているN末端部分も膜に挿入している可能性がある。我々はLPS、リポペプチド等のPAMPsとその受容体タンパク質CD14との結合部位、PAMPsとCD14と膜との3者の分子間相互作用を解析することで、PAMPの作用機構を分子認識の面から明らかにしたいと考えた。そこで我々は主に固体NMR法を用いて、以下にあげた2つの点を中心にリポ多糖と膜脂質との相互作用を解析し、自然免疫の基本的な機構を解明することを計画した。

1) CD14と膜との位置関係

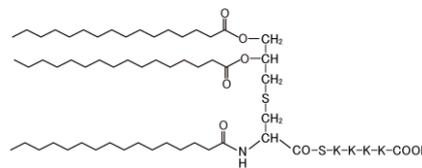
2) CD14とPAMPs(LPSやリポペプチド)との結合部位

これらの、生体膜や受容体を模倣したモデル系を用いた実験により、実際、哺乳動物の体内で起こっている自然免疫反応の開始段階で、CD14-PAMPsがどのようにして膜上で相互作用しているのかが明らかとなる。また、

このように、これまで明らかでなかった生体膜上の現象を研究する手法を提供することを目指している。



LPS (Re-type)



リポペプチド (Pam₃CSK₄)



mouseCD14の膜外部分のX線結晶構造

3. 研究の方法

まずは、CD14の膜外タンパク部分を酵母で発現、精製する。CD14は糖鎖結合部位が4か所ある糖タンパク質である。タンパク質の大量発現には通常大腸菌を用いた発現系が最も使われているが、この系を用いると糖鎖がついたタンパク質を作ることができない。CD14を大腸菌の系で発現した場合でも、糖鎖が付加されないためにCD14は会合体を形成してしまうと報告されている。酵母の発現系を使えば、培養時間は多少長くなるものの、糖鎖を付加したCD14が得られる。CD14の膜外部分である可溶性CD14を酵母の発現系を用いた発現、精製したという報告に従い、CD14の発現、精製を試み、必要量のCD14を準備する。

また、CD14はGPIアンカー型の膜タンパク質であるが、GPIアンカー部分の合成は複雑すぎて、現時点では世界的にも全合成をしたという報告はない。最近、この部分を模倣した分子を合成し、GPIアンカーの代わりとし

て後からタンパク質に連結させるという研究が報告されている。この方法に習い、酵母で発現、精製した CD14 の膜外部分にこの GPI アンカー模倣分子を化学的ライゲーションにより連結させて擬似的な GPI アンカー型の CD14 を調整する。

また、NMR の測定には、タンパク質やリガンド分子を ^{13}C や ^{15}N で安定同位体標識したものがようになる。固体 NMR スペクトルは分子の運動が抑制されているものをターゲットにしているため、分子の構造が均一でない場合に、化学シフトの分布が生じて分解能が著しく低下することが多く、スペクトルの帰属が困難になる。特に CD14 の様に分子量が 320 残基と大きな膜タンパク質を固体 NMR 法で帰属するためには、選択的な安定同位体標識が必須になる。そこで、アミノ酸選択的に安定同位体標識した CD14 を発現させ、上記の方法を用いて擬似 GPI アンカー型 CD14 を調整し、固体 NMR 解析を行う。

この GPI アンカー型 CD14 を脂質二重膜に再構成し、静磁場中で試料を凍結させて、NMR の測定を行う。まずは、 ^{13}C - ^{13}C 、 ^{13}C - ^{15}N 間の 2 次元等方化学シフト相関測定により、シグナルの帰属を行い、さらに、PAMPs や膜との結合による CD14 の化学シフト値の摂動の大きさにより、CD14 と PAMP や膜との結合部位を同定する。LPS と CD14 との結合部位は、さらに ^{13}C - ^{13}C 相関スペクトルによって確認する。

4. 研究成果

(1) GPI アンカー模倣分子の合成

水溶性 CD14 に後ほど結合させて GPI アンカー型のタンパク質にするため、GPI アンカー模倣分子を合成した。その結果、固体 NMR での測定に必要な量の GPI アンカー模倣分子が合成できた。これを DMPC の脂質二重膜に再構成させたところ、GPI 模倣分子が存在していてもミセル化を起こすことなく綺麗なリポソームを形成したので、この合成品を使って目的とするサンプル調整が出来ることが確認できた。

(2) 非標識 CD14 の発現と精製

ピキア株を用いて調整したコンピテントセルに、ピキアを宿主とするプラスミド pHIL-S1 に CD14 の DNA を組み込んだものを混ぜてエレクトロポレーション法により形質転換した。エレクトロポレーションの効率が多少悪そうではあったが、何度か形質転換をやり、出てきたコロニーで発現チェックを行った。この中から、1 番発現量の多い株を選択した。この株をグリセロールストックとして保存したが、ここから立ち上げなおすとうまく発現しない事があった。

(3) 非標識 CD14 の精製

培養後の培地の上清を用いて、ニッケルカラ

ムでヒスタグ精製を行い、SDS ページで確認した結果、精製前には沢山あったバンドが 2 本になり、この方法で粗精製が出来ることを確認した。精製されて残っているものが CD14 であることを、ウエスタンブロッティングで確認した。また、ヒスタグ精製後にはヒスタグ部分は必要がないので、酵素により切断し、さらに陰イオン交換クロマトグラフィーにより不要となった酵素やヒスタグ部分と CD14 を分離した。その後、嵩高い糖鎖が NMR シグナル解析の邪魔になることを防ぐため、糖鎖を根元から 3 糖だけ残し、その先を切断することを試みた。タンパク質が会合しない程度に糖鎖を残すために、3 糖を残した切断が可能な酵素である α -マンノシダーゼを用いて切断を行った。酵素の切断後にゲルろ過精製をしたところ、ゲルろ過のピークが大きな分子量を示し、CD14 が会合していることがわかった。

(4) モデルタンパク質 GB1 を用いた膜に挿入した擬似的な GPI アンカー型タンパク質のし資料調整方法の確立と NMR 測定

CD14 の糖鎖を根こそぎ切断するとタンパク部分が会合することがこれまでに報告されていたが、3 糖を残してもなおタンパク同士の会合が起こってしまったので、糖鎖の切断による会合を防ぐことが難しいと判断し、CD14 よりも簡単なモデル系で GPI アンカー型タンパク質の調整と膜への再構成を検討することに計画を変更した。モデルタンパク質としては、化学シフト値や 3 次元構造が既知の GB1 を選んだ。GB1 の C 末端をアンカーと共有結合するように C 末端にシステインを含む発現ベクターを構築し、このタンパク質の発現、精製を行った。さらに、これを合成した新規 GPI アンカー模倣分子と反応させ、GPI アンカー型 GB1 のみを HPLC により精製した。さらに脂質二重膜に再構成させ、分解能の高い固体 NMR シグナルを観測した。このように、シンプルなタンパク質を用いて、擬似的な GPI アンカー型タンパク質を調整し、脂質二重膜に再構成し、高分解能な固体 NMR 測定を行う手法を構築することに成功した。

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 3 件)

① K. Nomura, M. Lintuluoto, and K. Morigaki, "Hydration and Temperature Dependence of ^{13}C and ^1H NMR Spectra of the DMPC Phospholipid Membrane and Complete Resonance Assignment of Its Crystalline State." *J. Phys. Chem. B*, 査読あり, vol. 115, 2011, p. 14991-15001

② K. Nomura, M. Maeda, K. Sugase and S.

Kusumoto. "Lipopolysaccharide induces raft domain expansion in membrane composed of a phospholipid-cholesterol-sphingomyelin ternary system." *Innate Immun.*, 査読あり, vol. 17, 2011, p. 256-268

③N. Matsumori, H. Okazaki, K. Nomura and M. Murata, "Fluorinated cholesterol retains domain-forming activity in sphingomyelin bilayers." *Chem. Phys. Lipids.*, 査読あり, vol. 164, 2011, p. 401-408

[学会発表] (計3件)

①野村 薫, "自然免疫の鍵物質リポ多糖と脂質膜の相互作用解析 "固体NMR材料フォーラム「一固体NMR研究の最前線」(招待講演) 2010年5月10-11日(神戸製鉄所、神戸市)

②K. Nomura, "Lipopolysaccharide induces raft domain expansion in a phospholipid-cholesterol-sphingomyelin ternary system." SLB (Society of Leukocyte Biology) / IEIIS (International Endotoxin and Innate Immunity Society) 2010 Annual meeting, 2010年10月7-9日 (Vancouver, Canada)

③K. Nomura, "Lipopolysaccharide induces raft domain expansion in a phospholipid-cholesterol-sphingomyelin ternary system." PACIFICHEM 2010 Advances in Solid-State NMR of Biomolecular Molecules. (招待講演) 2010年12月13-18日 (Honolulu, USA)

④K. Nomura, "Hydration and Temperature Dependence of ^{13}C and ^1H NMR Spectra of the DMPC Phospholipid Membrane and Complete Resonance Assignment of Its Crystalline State." International ERATO Symposium on Lipid Structures in and around Proteins (招待講演) 2011年11月11-14日 (ホテル阪急エキスポパーク、吹田市)

⑤K. Nomura, "Hydration and Temperature Dependence of ^{13}C and ^1H NMR Spectra of the DMPC Phospholipid Membrane and Complete Resonance Assignment of Its Crystalline State." The International Symposium on Nuclear Magnetic Resonance 2011 (招待講演) 2011年11月15-18 (大栈橋ホール、横浜市)

[図書] (計1件)

K. Nomura and S. Kusumoto, "Lipopolysaccharide Induces Raft Domain Expansion in a Cholesterol-Containing

Membrane" in "Advances in Biological Solid-State NMR: Proteins and Membrane-Active Peptides" RSC Publishing, In press

[その他]

ホームページ等

<http://www.sunbor.or.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦(野村) 薫 (MIURA (NOMURA) KAORU)
公益財団法人 サントリー生命科学財団
生物有機科学研究所 研究員
研究者番号: 90353515

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

島本 啓子 (SHIMAMOTO KEIKO)

公益財団法人 サントリー生命科学財団
生物有機科学研究所・主幹研究員
研究者番号: 70235638

公益財団法人 サントリー生命科学財団
楠本 正一 (SHOICHI KUSUMOTO)

公益財団法人 サントリー生命科学財団
生物有機科学研究所・所長
研究者番号: 30028253