

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19570114

研究課題名（和文） アレルギー発症に関わるサイトカイン受容体活性化機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of Activation Mechanism of Cytokine Receptor Related to Allergosis

研究代表者

玉田 太郎（TAMADA TARO）

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究副主幹

研究者番号：50391248

研究成果の概要： アレルギー疾患に関わるサイトカインであるヒトインターロイキン 13 (IL-13)とその受容体であるヒト IL-13 受容体・鎖 1 (IL-13R・1)およびヒト IL-4 受容体・鎖 (IL-4R・)との活性状態における相互作用様式を明らかにするために、電気泳動、ゲル濾過および表面プラズモン共鳴測定法による相互作用解析を実施した。その結果、IL-13 と IL-13R・1 および IL-4R・ (いずれも細胞外領域)は 1:1:1 で結合していることを、その結合力と共に確認した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野： 構造生物学

科研費の分科・細目： 生物化学・構造生物化学

キーワード：インターロイキン13、アレルギー疾患、受容体活性化機構、相互作用解析

1. 研究開始当初の背景

インターロイキン13 (IL-13)は主に活性化Th2細胞で産生されるサイトカインであり、種々のアレルギー疾患、特に気道過敏性亢進や粘液産生といった気管支喘息の病態形成に重要な役割を果たしている。近年、特に若年層の喘息患者が増加傾向にあ

り年間3000人以上が喘息で死亡している。このような背景から、IL-13やその受容体は創薬の標的として注目されており、それらに対するアンタゴニストの開発が待たれている。その開発の鍵を握るのは、IL-13をリガンドとするシグナル伝達機構の解明である。本申請研究から得られる知見は、アレ

ルギー発症機構を基礎科学的に理解するだけでなく、その臨床応用に対しても重要な知見を与える。

IL-13をリガンドとするシグナルは、IL-13受容体の $\cdot 1$ 鎖 (IL-13R $\cdot 1$) およびIL-4受容体の \cdot 鎖 (IL-4R \cdot) がIL-13と高親和性複合体を形成することにより伝達すると考えられている。IL-13R $\cdot 1$ の細胞外領域は、免疫グロブリン様ドメイン (D1)とサイトカイン受容体ファミリーを特徴づける領域 (CRH領域: D2, D3)から成る。一方、IL-4R \cdot の細胞外領域にはD1ドメインは存在しない。連携研究者らが実施したIL-13R $\cdot 1$ への変異導入および部分欠損体を用いた生化学的実験により、IL-13との結合に重要なアミノ酸残基がIL-13R $\cdot 1$ のD2-D3間に存在していることが明らかになった一方で、D1ドメインもまたリガンド結合に関与していることを示唆する知見も得られている。しかしながら、IL-13とIL-13R $\cdot 1$ 、およびIL-4R \cdot との活性状態における結合比、親和性、さらに立体構造は不明なままである。

2. 研究の目的

リガンドであるヒト IL-13 とその受容体であるヒト IL-13R $\cdot 1$ およびヒト IL-4R \cdot のリガンド結合に関与している細胞外領域との活性状態における相互作用様式を決定すると共に、活性状態のリガンド-受容体複合体の立体構造を明らかにし、連携研究者の有する生化学的知見を統合して、ヒト IL-13 受容体の活性化機構を原子レベルで解明する。

3. 研究の方法

(1) 相互作用解析

大量調製系が確立された IL-13、IL-13R $\cdot 1$ (細胞外領域)、IL-4R \cdot (細胞外領域)をそれぞれ 10 mg を目標に調製し、取得した蛋白質試料を用いてリガンド-受容体相互作用解析を実施する。リガンド-受容体結合比については、ゲル濾過および SDS-PAGE 分析により正確に見積もる。さらに表面プラズモン共鳴測定法を用いて、リガンド-受容体結合の結合パラメータを精緻に決定し、IL-13 リガンドによる受容体活性化機構をより詳細に解析する

(2) 立体構造解析

IL-13/IL-13 $\cdot 1$ /IL-4R \cdot (1:1:1) 複合体をゲル濾過により調製し、結晶化スクリーニングを実施する。さらに、連携研究者のグループが保有している抗ヒト IL-13 $\cdot 1$ 抗体 (マウス IgG) の Fab 断片化を実施し、取得し

た Fab をヒト IL-13/ヒト IL-13 $\cdot 1$ (1:1) 複合体と混合し、ヒト IL-13/ヒト IL-13 $\cdot 1$ /マウス Fab (1:1:1) 複合体を調製した後に、結晶化スクリーニングを実施する。

上記の IL-13/IL-13 $\cdot 1$ /IL-4R \cdot (1:1:1) 複合体および IL-13/IL-13 $\cdot 1$ /Fab (1:1:1) 複合体の結晶を取得した後に、その回折データ収集および構造解析を実施する。

4. 研究成果

(1) 相互作用解析

蛋白質の発現、調製

ヒト IL-13 はシグナル配列を含む全長 132 アミノ酸から構成される。シグナル配列を除く 112 残基部分について、pET28a ベクターを用いて大腸菌による大量発現系を構築した。発現後の IL-13 は不溶性画分として取得されたため、変性状態の IL-13 を変性剤により可溶化した後に、N 末端側に付加した His-tag を利用したアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、巻き戻し実験に供した。巻き戻しは、ジスルフィド結合形成に留意しチオール基の酸化・還元試薬を適度に組み合わせ、変性剤濃度を希釈法により下げることにより実施した。希釈後の溶液を 2 段階の陽イオン交換クロマトグラフィーにより、精製 IL-13 を得た。取得した IL-13 は活性測定により、十分な生物活性を有していることを確認した。最終的に、大腸菌 1 L 培養液あたり、活性状態の精製 IL-13 を約 6 mg 取得できた。

ヒト IL-13R $\cdot 1$ は全長 427 アミノ酸のうち、シグナル配列を除く細胞外領域 319 残基部分 (D1, D2 および D3 ドメイン) を、抗体 (マウス IgG2a) の Fc 領域との融合体として遺伝子構築した。発現はバキュロウイルス-カイコ発現系を用いて行い、蛹摩碎液および体液から IL-13R $\cdot 1$ -Fc 融合体の発現を Fc 領域を利用したウエスタンブロットティングにより確認した。大量発現のために、より発現量の多かった体液からの蛋白質回収を選択し、体液上清から IL-13R $\cdot 1$ -Fc 融合体を Fc 領域を利用したプロテイン A セファロースによるアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。IL-13R $\cdot 1$ と Fc は消化酵素 (トロンピン) 切断部位を含むリンカーでつないであり、Fc 融合体からの IL-13R $\cdot 1$ 領域の切り出しをトロンピン消化により実施し、消化後に陰イオン交換クロマトグラフィーにより IL-13R $\cdot 1$ を精製した (図 1 A)。最終的に、カイコ体液 1 ml あたり、精製 IL-13R $\cdot 1$ (細胞外領域) を 0.19 mg 取得できた。

ヒト IL-4R \cdot は全長 825 アミノ酸のうち、シグナル配列を除く細胞外領域 199 残基部分 (D2 および D3 ドメイン) を、IL-13R \cdot 1 と同様に抗体 (マウス IgG2a) の Fc 領域との融合体として、バキュロウイルス-カイコ発現系を用いて発現した。さらに同様に、カイコ体液から IL-4R \cdot -Fc 融合体をプロテイン A セファロースにより精製し、トロンピン消化により IL-4R \cdot 領域を切り出し、陰イオン交換クロマトグラフィーにより IL-4R \cdot を精製した (図 1 B)。最終的に、カイコ体液 1 ml あたり、精製 IL-4R \cdot (細胞外領域) を 0.014 mg 取得できた。

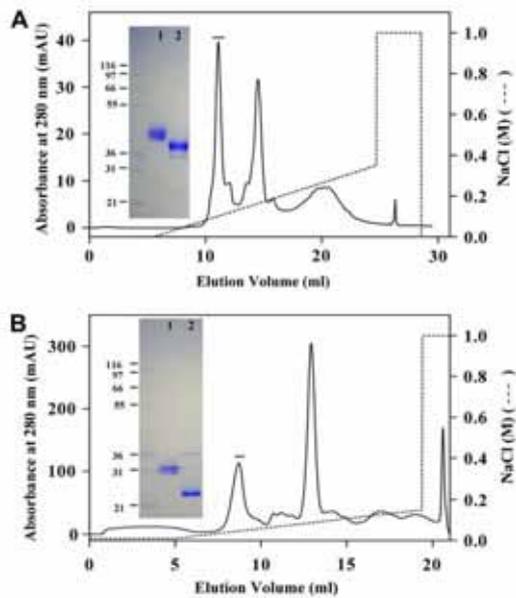


図 1 ヒト IL-13 受容体の陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製

(A)ヒト IL-13R α 1(A)、(B)ヒト IL-4R α (B)。精製条件は、カラム：resource Q、緩衝液：20 mM Tris-HCl (pH8.0)、流速：1 ml/min、勾配：0-0.3 (A)、0-0.2 (B) M NaCl、である。下線のピークが受容体 (13 ml の溶出ピークは Fc) 由来で、溶出画分を糖鎖切断酵素で処理し、SDS-PAGE 分析した (1:切断前、2:切断後)。

ゲル濾過および SDS-PAGE 分析によるリガンド-受容体結合比確認

精製後の IL-13 と IL-13R \cdot 1 および IL-4R \cdot の細胞外領域を用いて、ゲル濾過および SDS-PAGE 分析により、リガンド-受容体結合比を確認した (図 2)。まず、IL-13 (2 nmol)、IL-4R \cdot (2 nmol)、IL-13R \cdot 1 (1 nmol) が、各々 14.9、16.1、17.8 ml で溶出することを確認した (図 2 A-1, 2, 3 に相当)。次に、IL-13 と IL-4R \cdot および IL-13R \cdot 1 の結合状態の確認を試みた。IL-13 (2 nmol) と

IL-4R \cdot (2 nmol) を混合した場合 (図 2 A-4) は、複合体形成に伴う溶出位置のずれは見られず、IL-13 および IL-4R \cdot のピークの高さも各々単独の場合 (図 2 A-1 および 2) と比べて違いは見られなかった。一方、IL-13 (2 nmol) と IL-13R \cdot 1 (1 nmol) を混合した場合 (図 2 A-5) は、わずかながら複合体形成に伴う溶出位置の高分子量側へのずれが確認された。また、過剰の IL-13 由来のピーク (図 2 A-1 に比べ減少) も確認されたことから、その結合比は 1:1 であると推測された。さらに、IL-13 (2 nmol) と IL-4R \cdot (2 nmol) および IL-13R \cdot 1 (1 nmol) を混合した場合 (図 2 A-6) は、明らかに高分子量側へのずれ (14.1 ml) が確認された。図 2 A-6 では、過剰の IL-4R \cdot (図 2 A-2 に比べ減少) および IL-13 由来のピーク (図 2 A-1 に比べ減少、図 2 A-5 と同等) も確認されており、IL-13 と IL-4R \cdot と IL-13R \cdot 1 の結合比は 1:1:1 と見積もられた。図 2 A-6 の各溶出画分を SDS-PAGE 分析した結果、14.1 ml の画分 a に IL-13、IL-4R \cdot 、IL-13R \cdot 1 のいずれも含まれていることを確認した。

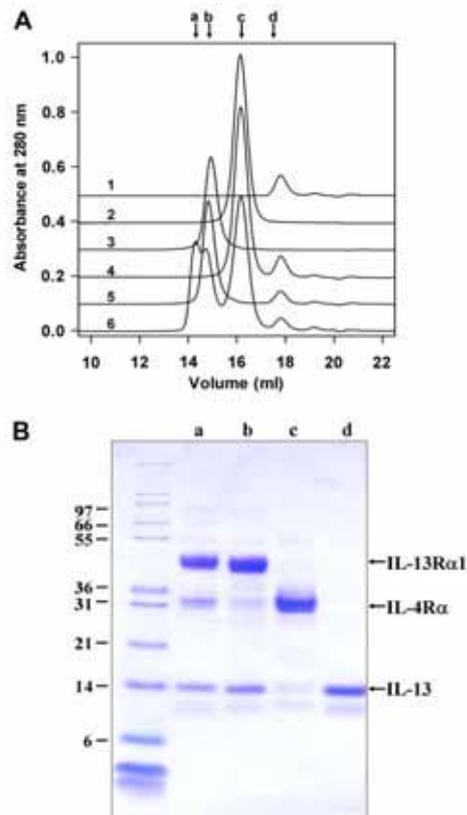


図 2 ヒト IL-13 とヒト IL-13R α 1 およびヒト IL-4R α の結合確認

(A)ゲル濾過クロマトグラフィー、(B) A-6 の溶出画分の SDS-PAGE 分析。ゲル濾過の溶出条件は、カラム：superdex 200HR 10/30、緩衝液：20 mM Na-phosphate (pH7.0)、0.2 M NaCl、流速：0.3 ml/min、注入量：本文に記載 (液量は全て 200 μ l に統一)

表面プラズモン共鳴測定法による リガンド-受容体結合力測定

精製後の IL-13 と IL-13R \cdot -Fc および IL-4R \cdot -Fc の結合力を BIAcore2000 を用いた表面プラズモン共鳴法により測定した。IL-13R \cdot -Fc を固定したセンサーチップに IL-13 を流した結果、 $K_D = 2.9 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1}$ の親和力で、IL-13 と IL-13R \cdot -Fc の結合が確認された。一方、IL-4R \cdot -Fc を固定したセンサーチップに IL-13 を流した場合はリガンド-受容体の結合を確認するには至らず、IL-13R \cdot を流した場合も同様であった。しかしながら、IL-13/IL-13R \cdot (1:1) 複合体を流した場合は、IL-4R \cdot -Fc との間に顕著な結合が確認できた。この結果から、IL-13/IL-13 \cdot 1/IL-4R \cdot 複合体が形成する際には、まず IL-13/IL-13R \cdot (1:1) 複合体が形成し、その後 1:1 複合体化により強められた IL-4R \cdot への親和性により、IL-13/IL-13 \cdot 1/IL-4R \cdot (1:1:1) 複合体が形成する機構が推察された。この推察は Stanford 大学の Garcia 教授らが実施した等温滴定型カロリメトリーを用いた結合力測定の結果 (LaPorte *et al.*, *Cell* **132**, 259-272, 2008) と一致している。

IL-13 と IL-13R \cdot および IL-4R \cdot の発現、調製および相互作用測定の結果は、5-[雑誌論文] として受理、掲載された。

(2) 立体構造解析

ゲル濾過クロマトグラフィーにより調製した IL-13/IL-13 \cdot 1/IL-4R \cdot (1:1:1) 複合体を用いて結晶化スクリーニングを実施した。市販のスクリーニングキットを用いて約 500 条件を検索したが、結晶の析出を確認するには至らなかった。また、連携研究者のグループが保有する IL-13R \cdot 1 に対するマウス抗体を用いて、IL-13/IL-13 \cdot 1/Fab (1:1:1) 複合体の構造解析も試みた。マウス抗体を消化酵素パインを用いて Fab 断片化した後に、陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。精製後の Fab と IL-13 および IL-13 \cdot 1 との結合をリガンド-受容体結合と同様にゲル濾過クロマトグラフィーにより確認した結果、IL-13 \cdot 1 との結合は確認できたが、IL-13/IL-13 \cdot 1/Fab 複合体の形成を確認するには至らなかった。

(3) 構造 機能活性相関

IL-13/IL-13 \cdot 1/IL-4R \cdot (1:1:1) 複合体立体構造は Stanford 大学の Garcia 教授らのグループにより決定された (LaPorte *et al.*, *Cell* **132**, 259-272, 2008)。この構造情報に

基づき、連携研究者のグループと共同で、IL-13 によるシグナル伝達における IL-13R \cdot 1 の D1 ドメインの役割について詳細に検討した。種々の D1 ドメイン変異体を作製し、リガンドに対する結合および生物活性を確認した結果、D1 ドメイン中の Val35, Lue38, Val42 に対する Ala 変異体は、変異導入箇所が IL-13 への結合部位に存在していなくてもかわらず、結合および生物活性が顕著に減少していた。この結果は、これらの疎水性残基が IL-13R \cdot の立体構造形成に必須であることと考えられた。一方、Lys76, Lys77, Ile78 に対する Ala 変異体で確認された活性の減少は、IL-13 と IL-13 \cdot 1 間の結合が直接的に失われたことに起因することが、立体構造から確認された。この結果は、連携研究者のグループおよび Stanford 大学の Garcia 教授との共著論文として、現在投稿中である。

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)

Eijiro Honjo, Yoshinari Shoyama, Taro Tamada, Hideki Shigematsu, Takaaki Hatanaka, Sachiko Kanaji, Kazuhiko Arima, Yuji Ito, Kenji Izuhara, Ryota Kuroki, "Expression of the extracellular region of the human interleukin-4 receptor \cdot chain and interleukin-13 receptor \cdot 1 chain by a silkworm- vaculovirus system", *Protein Expression and Purification*, **60**, 25-30, 2008. 査読有

[学会発表](計5件)

玉田 太郎, 「抗体を用いた分泌蛋白質の構造解析」、大阪大学蛋白質研究所セミナー・蛋白質を創る、知る、使う～蛋白質科学と産業応用～、2008年9月30日、大阪大学

Taro Tamada, "Structure Determination of Human Cytokines and Extracellular Domains of Receptors", The 21st General Assembly of the International Union of Crystallography, 2008年8月25日、グランキューブ大阪

玉田 太郎, 「創薬標的蛋白質の構造解析」、京都大学大学院理学研究科セミナー、2008年6月30日、京都大学

本庄 栄二郎, 「インターロイキン-13 受容体 1鎖およびインターロイキン-4 受容体 鎖細胞外ドメインの調製と性質」、

第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回
日本生化学会大会合同年会、2007 年 12
月 14 日、パシフィコ横浜
玉田 太郎、「抗体を用いた分泌性タンパ
ク蛋白質の機能及び構造解析」、第 30 回
日本分子生物学会年会・第 80 回日本生
化学会大会合同年会、2007 年 12 月 11 日、
パシフィコ横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉田 太郎 (TAMADA TARO)
原子力機構・量子ビーム・研究副主幹
研究者番号: 5 0 3 9 1 2 4 8

(2) 研究分担者

本庄 栄二郎 (HONJO EIJIRO)
原子力機構・量子ビーム・研究職
研究者番号: 5 0 4 1 4 5 9 5

正山 祥生 (SHOYAMA YOSHINARI)
原子力機構・量子ビーム・研究職
研究者番号: 2 0 4 5 5 2 2 9

(3) 連携研究者

出原 賢治 (IZUHARA KENJI)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号: 0 0 2 7 0 4 6 3