

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 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790979

研究課題名（和文） アレルギー・自己免疫疾患治療開発を目指した IL-18 レセプター複合体構造解析

研究課題名（英文） Structural studies on IL-18 ligand receptor complex for designing new drugs of allergy and autoimmune diseases.

研究代表者

木村 豪 (KIMURA TAKESHI)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60422705

研究成果の概要（和文）：Interleukin-18(IL-18)は炎症性サイトカインとして知られ生体防御因子として働く一方、自己炎症性疾患の悪化にも関与が指摘されている。IL-18 関連疾患の病態解明、治療薬開発を目的としリガンドレセプター複合体の構造解析を目指して研究を行った。

大腸菌発現系、バキュロ-昆虫細胞発現系を用いてリガンドとレセプター蛋白を発現させ、リガンド/レセプター複合体として精製した。レセプター蛋白について精製方法を改善したところリガンドレセプター複合体としての蛋白結晶から回折像を得ることができた。セレノメチオン含有蛋白複合体での解析を現在進めている。

研究成果の概要（英文）：Interleukin-18 (IL-18), found as interferon- γ inducing factor, plays a critical role in innate and acquired immune response against microbes. IL-18 would also contribute to the pathogenesis of inflammatory diseases. To elucidate the pathogenesis and structure of IL-18 ligand-receptor complex, we have expressed recombinant IL-18R α and IL-18R β with baculo-Insect cell systems and crystallized it as IL-18/IL18R α /IL-18R β heterotrimeric complex and obtained X-ray diffraction data from the crystal.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：IL-18、構造解析

1. 研究開始当初の背景
炎症性サイトカインであるインターロイキン 18 (IL-18)は IL-1 ファミリーに属し、IL-1 の受容体と同様に受容体 α 鎖 (R α) と受容体 β 鎖 (R β) の2種類の受容体が存在する。炎症応答により活性化された IL-18 が、IL-18R α に結合し、さらに IL-18R β と複合体

を形成することで、細胞内へとシグナルが伝達され炎症反応が誘導される。IL-18 表面にはレセプターとの結合に必要な3つのサイトがあり、site1、site2 が IL-18R α と結合し、IL-18 の反体側に存在する site3 が IL-18R β と結合すると報告されているが、リガンドレセプター複合体の結合様式、分子構

造等は未だ不明である。
このシグナル伝達の異常は自己免疫・アレルギー疾患等の一つの要因とされており、IL-18によるシグナルを制御することでIL-18が要因となる疾患群(クローン病、関節リウマチ、アトピー性皮膚炎等)の治療に応用できる可能性がある。すでに先行薬剤として国内で認可されたサイトカインを標的とした生物学的製剤にはTNF- α デコイ受容体(レミケード)やIL-6受容体抗体(アクテムラ)が存在し、関節リウマチ等で有効性が評価されてきているが、同様にIL-18阻害薬も炎症抑制作用を持つ事が予測され、有益性が期待されている。IL-18の阻害により自己炎症性疾患の治療法確立が期待できる。IL-18シグナル伝達の分子生物学的基礎データを得ること、それを標的とした新規治療薬の開発が望まれる。

2. 研究の目的

IL-18の阻害剤の開発を最終目的とする。現時点においてリガンドレセプター複合体(IL-18/IL-18R α /IL-18R β)は結合様式、分子構造は未知であり、分子生物学的にも興味を持たれる。これを明らかにするとともにその分子構造を基にIL-18阻害剤の開発を目指す。また副産物として大量培養精製にて得られたレセプター細胞外ドメインを生物学的製剤としてIL-18シグナル抑制薬に用いることが可能か検討を行う。アレルギー、関節リウマチ、炎症性腸疾患等の自己免疫疾患を対象として治療薬開発を試みる。

3. 研究の方法

IL-18の発現精製は大腸菌により、またIL-18R α 、IL-18R β はバキュロ昆虫細胞発現系を用いた精製方法を確立している。またIL-18、IL-18レセプター蛋白を複合体として発現精製し、結晶化スクリーニングにて結晶化条件を特定している。またセレノメチオン含有蛋白も同様に発現、精製、結晶化を行ったが、セレノメチオン含有IL-18蛋白は複合体とすると結晶化しにくい性質を持っていたため結晶化に向けて、蛋白発現条件の調整、レセプター蛋白の発現コンストラクト改変、糖鎖除去、精製方法について検討を加えた。その結果複合体を結晶化させることができ、X線回折実験が行えた。

回折像の分解能は構造解析を行うには不十分であったが、サイズの大きな結晶が得られており、今後さらに結晶化条件の精密化を進める方針である。

今後は得られた分子構造を基に阻害剤の開発に向けモデルマウスでの動物実験を経て臨床応用へつなげる計画である。

具体的に本研究期間では以下項目について

研究を行った。実験方法を示す。

- 蛋白発現条件検討
- 結晶化条件スクリーニング
- 糖鎖切断酵素による糖鎖処理、変異導入による糖鎖除去
- クロマトフォーカシングによる蛋白精製方法の条件検討
- レセプター蛋白のセレノメチオン導入
- 回折実験
- レセプター蛋白のIL-18活性阻害作用の検討。

結晶化スクリーニングにおいては大量の蛋白が必要となる。蛋白を効率よく大量に得るため培養条件について扁平フラスコのサイズ変更、培地溶液量、震盪回数の条件を検討した。

通常の発現蛋白においては解析に十分な蛋白結晶が得られていたことから、本期間はセレノメチオン導入IL-18蛋白による複合体を作成し結晶化スクリーニングを試みた。

結晶化スクリーニングは蛋白溶液を約10mg/mlへ濃縮し、HEPES 5mM, NaCl 10mM, pH7.0 bufferに透析を行ってサンプルとした。sitting drop法により結晶化を行った。蛋白溶液、結晶化用bufferの分注には結晶化装置(mosquito)を用い約200 μ lのサンプル溶液と200 μ lの結晶化bufferを混合し、分注後は20 $^{\circ}$ C恒温槽に静置し、実体顕微鏡により定期的に結晶形成の観察を行った。結晶化用bufferはpHを7.0~8.0、crystal screen添加剤キット、PEG濃度は16~20%で変えた物を用いた。

セレノメチオン導入後の蛋白では微結晶が得られるものの解析に十分な結晶が得にくく、デタージェントの添加、結晶化用pH調整、恒温槽温度の条件を変え結晶化条件の精密化を行った。

バキュロ昆虫細胞発現系で得られたレセプター蛋白には糖鎖の付加がなされているが、結晶化には蛋白の不均一性を改善するため糖鎖の除去が望ましい。細菌の*Flavobacterium meningosepticum* genom DNAよりクローニングしたリコンビナントGST-PNGaseF、GST-EndoF1、GST-EndoF3を大腸菌を用いて発現・精製しレセプター蛋白の糖鎖処理を行った。糖鎖処理後は酵素を除去するためGSH樹脂を通過させ、ゲル濾過にて目的蛋白のみを精製した。

発現された蛋白は等電点電気泳動にて泳動すると複数のバンドが確認された。そこで蛋白の不均一性を改善する目的でイオン交換精製の後、クロマトフォーカシングによりレセプター蛋白を精製した。GEヘルスケア

monoP カラムに蛋白を吸着させた後、pH9.0 に調整した polybuffer94 にて溶出した。蛋白は数個のピークに分離され、それぞれのピーク毎に蛋白を回収し、結晶化スクリーニングに用いた。

結晶構造解析のためには位相を決定する必要があり、セレノメチオン導入蛋白が必要である。IL-18 については大腸菌発現系にて通常のプロトコルにて導入を行った。レセプターについてはバキュロ昆虫細胞発現系でセレノメチオン導入を試みた。

バキュロ昆虫細胞発現系ではメチオニンフリー培地にて昆虫細胞を培養し、2回のセレノメチオン（終濃度 100 μ g/ml）添加を行い1回目を16時間、2回目を48~72時間に変更し、se-Met 導入蛋白発現が最大となる条件を検討した。

得られたセレノメチオン含有蛋白結晶で筑波 PF ビームライン BL-17 にて回折実験を行った。結晶を液体窒素ガスで冷却しながらエックス線を照射し回折像を撮影した。

蛋白結晶化の副産物として得られたレセプター蛋白での IL-18 抑制作用を測定した。HEK293 細胞に NF κ B 反応性のルシフェラーゼレポーター gene と IL-18R β をトランスフェクトした。24 時間後に IL-18 と濃度を変えた IL-18R α または IL-18R β を添加し6時間後の蛍光を測定した。

4. 研究成果

まとめ：本研究期間で se-MetIL-18/IL-18R α /IL-18R β 複合体を精製し、結晶化スクリーニングにより結晶化条件を特定した。

通常の蛋白で得られた結晶の回折実験では 3.5Å の回折像を得ることに成功し、セレノメチオン含有蛋白においても、4Å 程の回折像まで得ることができた。

解析に十分な回折像が得られるよう引き続きセレノメチオン含有蛋白において結晶化と回折実験を進めている。

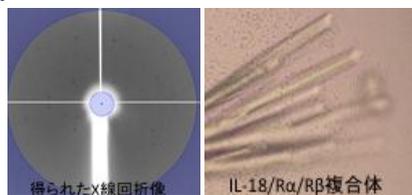
本研究期間では構造解析には至っていないがセレノメチオン含有蛋白結晶での回折実験を近く予定しており、構造解析が可能となると考えている。

本研究期間では構造解析に向けて大きく進むことができ、シグナル伝達メカニズムの解明、阻害剤開発に向けて有意義な成果を得られたと考えている。

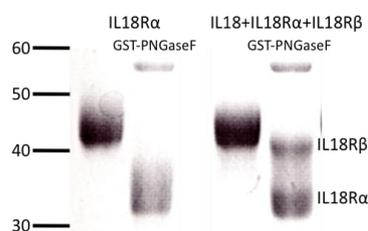
本研究期間内での各実験の結果

蛋白発現は sf9 昆虫細胞を用いた。扁平フラスコのサイズを 250ml、1 L、4L で比較した。1L サイズ 60rpm での発現で安定的に結晶化に十分な収量を得られた。

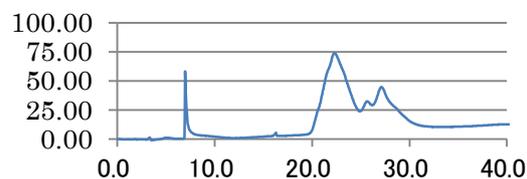
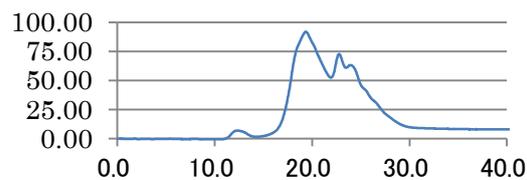
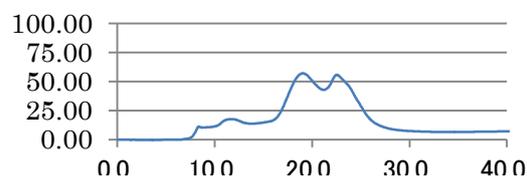
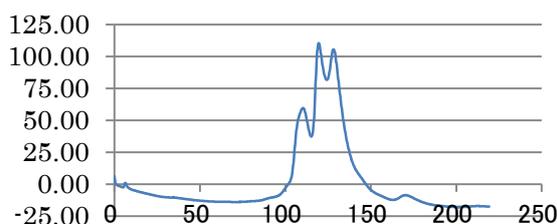
通常の蛋白での結晶が得られた条件近くの pH、温度、沈殿剤濃度でセレノメチオン導入蛋白の結晶化条件検討を行った。またデタージェント等の添加剤の条件も追加して行ったところ約 30 \times 30 \times 300 μ m の針状の結晶が得られ回折実験に用いることができた。



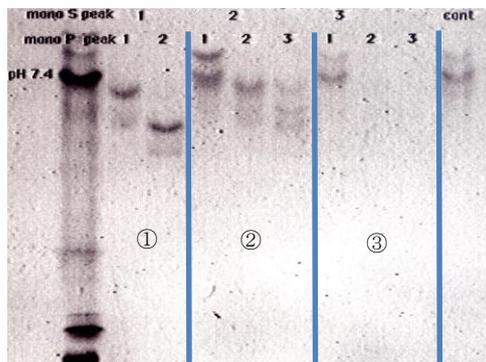
糖鎖除去用に3種類の糖鎖切断酵素を作成し糖鎖の切断を試みた。GST-PNGaseF、を加えると糖鎖が切断されて分子量の低下が確認された。しかし GSH 樹脂、ゲル濾過を行って酵素を除去したところ沈殿を形成したため結晶化スクリーニングには用いることができなかった。他酵素も同様であった。



クロマトフォーカシングでは最終精製収量は大幅に減少したが、等電点泳動で不均一性の改善を認めた。結晶性が向上し、約 4Å の分解能を得ることができた。(図：上からイオン交換精製。イオン交換精製での3つの各ピーク毎にクロマトフォーカシング)



下図； monoP 精製各ピークの IEF

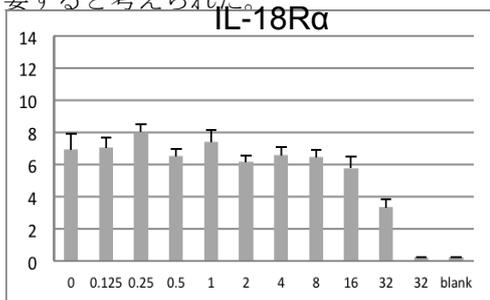


Iso electric focusing pH3-10
CBB

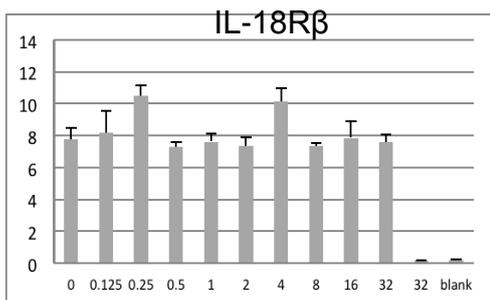
昆虫細胞はメチオニンフリー培地で培養を開始し、ウイルス感染後の 16 時間後と 48 時間後にセノメチオニンを添加した条件で最大であった。通常の発現時に比べ収量は 1/2 に低下していたが精製も可能であった。

放射光施設において通常蛋白での複合体結晶、セノメチオニン含有複合体結晶への照射を行いそれぞれ 3.5 Å、4.0 Å の分解能を得た。回折像を基に分子置換法による解析を試みたが、解析には至っていない。

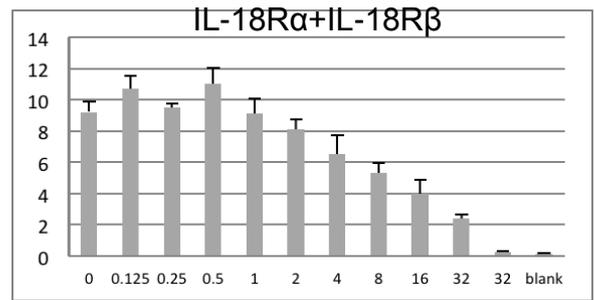
HEK293 細胞の IL-18 刺激に対してレセプター蛋白を添加し、NF κ B から誘導されるルシフェラーゼ発現量を測定した。IL-18R α 、IL-18R β ともに IL-18 に対して 32 倍量を添加しても阻害活性はほとんど確認されなかった。同時に 32 倍を混合すると僅かに活性が抑制されたがこの結果からはレセプターを蛋白製剤として用いるためにはさらに工夫を要すると考えられた。



IL-18(2ng/ml) + + + + + + + + + + - -



IL-18(2ng/ml) + + + + + + + + + + - -



IL-18(2ng/ml) + + + + + + + + + + - -

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

① Structural basis for receptor recognition of interleukin 18

Naotaka Tutsumi, Takeshi Kimura, Hidenori Ohnishi, Zen-ichiro Kato, Hidehito Tochio, nomi Kondo, Masahiro Shirakawa.

2011 年 12 月 16 日日本分子生物学学会 横浜

② 昆虫細胞培養系由来可溶性 ST2 による IL-33 活性阻害の検討

木村豪、大西秀典、松井永子、加藤善一郎、近藤直実 2011 年 11 月 12 日秋期アレルギー学会 仙台

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 豪 (KIMURA TAKESHI)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60422705