

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790064
 研究課題名（和文） ケモカイン受容体 CCR2 の細胞内シグナル伝達因子 FROUNT の構造生物学的研究
 研究課題名（英文） Structural studies of FROUNT, an intracellular signalling factor of the chemokine receptor CCR2.
 研究代表者
 吉永 壮佐（YOSHINAGA SOSUKE）
 熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教
 研究者番号：00448515

研究成果の概要：ケモカイン受容体 CCR2 に結合し、シグナル伝達を制御する新規の細胞内因子 FROUNT について、構造生物学的研究を行なった。FROUNT の CCR2 結合ドメイン FNT-C、および、CCR2 の FROUNT 結合領域を同定し、大量発現・精製系を確立した。溶液 NMR 解析により、相互作用部位を双方側において特定した。また、相互作用をブロックする化合物を複数見出した。これらは、慢性炎症性免疫疾患治療薬の創出に向け、不可欠な知見・材料である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	510,000	3,810,000

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、炎症性免疫疾患、構造生物学、創薬、NMR

1. 研究開始当初の背景

白血球は、ケモカインの濃度勾配によって導かれる走化性によって目標箇所に速やかに集積する。白血球の走化性は、重要な免疫生体防御反応の1つであることから、アレルギー性炎症、自己免疫性炎症などとの関連で注目されている。ケモカインは、現在までに約50種類見つかり、ケモカイン受容体も20種類同定されている。ケモカイン受容体は、7回膜貫通Gタンパク質共役型受容体（GPCR）であり、フォスファチジルイノシトール3キナーゼ（PI(3)K）やRhoファミリーの低分子量G

タンパク質を介してシグナルを伝達することによって細胞骨格を再編成し、細胞遊走を引き起こすと考えられている（Maghazachi A.A. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 931-943 (2000)）。しかしながら、個々の受容体が固有の細胞内シグナル伝達制御機構を有することが近年分かりつつあり、その詳細を明らかにすることは医学的見地から重要である。

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 (Murphy P.M. *et al. Pharmacol. Rev.* **52**, 145-176 (2000))。一方, 研究協力者である寺島ら (東京大学大学院医学系研究科・松島綱治研究室) は, 昨年, CCR2b の C 末端領域に結合する新規の細胞内因子 FROUNT を見出した (Terashima Y. *et al. Nature Immunol.* **6**, 827-835 (2005))。FROUNT のノックダウンあるいは FROUNT の優性阻害体を用いると, PI(3)K と低分子量 G タンパク質 Rac の活性化および細胞遊走に必須な葉状仮足の形成能が減弱するため, FROUNT が CCR2b を介したシグナル伝達を制御することが示唆された。また, マウス腹膜炎モデルにおいて, FROUNT のノックダウンにより, マクロファージの腹腔への浸潤活性が顕著に低下することが示された。

FROUNT は, ケモカイン受容体 CCR1, CCR2a, CXCR4 の C 末端領域には結合しないため, 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る。

研究代表者は, これまで細胞内シグナル伝達因子を標的に, タンパク質の立体構造情報に基づいて分子機能の解明を行ってきた (Yoshinaga S. *et al. EMBO J.* **22**, 4888-4897 (2003) など)。特に, 細胞遊走をはじめとする細胞極性の形成は生命現象の重要な基盤であるため, 細胞極性形成シグナルを伝達するタンパク質に多く含まれる PB1 ドメイン, 細胞遊走時のインテグリンによる細胞接着過程において機能するフィラミンの構造生物学的研究を行ってきた。研究代表者は, タンパク質の立体構造情報に基づいて様々な疾患の治療法を見出すことを将来の目標にしていることから, 疾患に密接に関連した細胞遊走過程を制御すると示唆されている FROUNT-CCR2b 相互作用に着目した。

2. 研究の目的

FROUNT は, ケモカイン受容体特有の細胞内シグナル伝達因子として初めて見出されたタンパク質であり, この因子に着目して研究を行うことは, ケモカインによる白血球遊走を制御する機構の詳細な理解, 関連する疾病の治療法の確立へ向け, 大きな進展が期待できる。

また, FROUNT は, 2005 年に寺島が見出したばかりであり, 寺島と密接な共同研究体制を組むことにより, 世界に先駆けて FROUNT の分子機能の理解, そして, これをターゲットとした創薬を行うことができる。

現在, ケモカインシグナリングをターゲットとした創薬は, ケモカイン受容体の細胞外領域をターゲットとして行われているが, 受容体のシグナル伝達下流の細胞内因子 FROUNT をターゲットとすることで, 特異性の

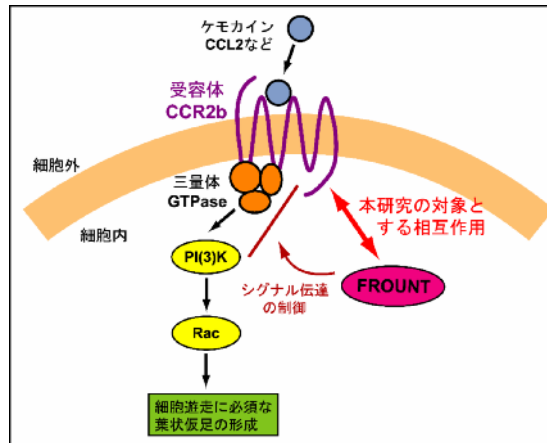
高い, 副作用のより少ない薬を作ることができる。新規の慢性炎症性免疫疾患の薬を作ることができれば, 治療面においてその波及効果は非常に大きい。

本研究において, 下記の 2 点を目的とする。

(1) 構造生物学的手法に基づく FROUNT の CCR2 認識機構の解明

(2) 立体構造情報を利用した, FROUNT CCR2 相互作用をターゲットとする慢性炎症性免疫疾患治療薬の創出

3. 研究の方法



(1) 構造生物学的手法に基づく FROUNT の CCR2 認識機構の解明

研究協力者の寺島は, CCR2b の C 末端領域 (309-328) と FROUNT の C 末端領域 (500-656) が相互作用することを酵母ツーハイブリッド法によって見出している。研究代表者は, まず, FROUNT (500-656) から立体構造の単位である構造ドメインを見出し (FNT-C と命名), 大量発現および精製系を確立する。そして, 溶液 NMR 法または X 線結晶回折法により FNT-C の立体構造を決定する。また, 溶液 NMR 法により, CCR2b 結合部位を同定する。

なお, FROUNT (500-656) に結合活性のある CCR2b (309-328) に関しては, 結合活性を念頭に置きつつ, 発現量・溶解度を指標にして構造解析に適した領域を同定し (CCR2-ProC と命名), 大量発現および精製系を確立する。また, 溶液 NMR 法により, CCR2-ProC の FROUNT 結合部位を同定する。

(2) 立体構造情報を利用した, FROUNT CCR2 相互作用をターゲットとする慢性炎症性免疫疾患治療薬の創出

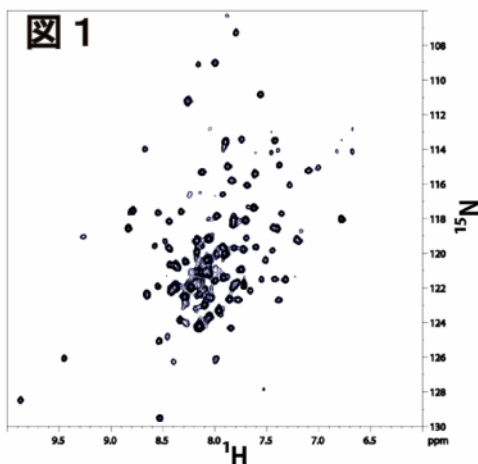
寺島は, FNT-C CCR2-ProC 相互作用を阻害する化合物を, 低分子化合物ライブラリーのスクリーニングにて見出す。そして, その化

化合物を、立体構造情報をもとに最適化する。その際、弱い相互作用を原子レベルで観測することのできる溶液 NMR 法を積極的に活用する。寺島は、また、慢性炎症性免疫疾患の薬としての適性を細胞および個体レベルで検討する。

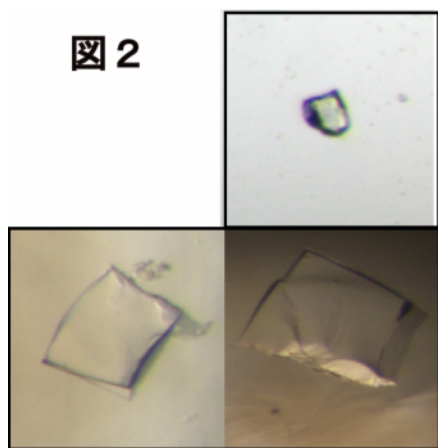
4. 研究成果

(1) 構造生物学的手法に基づく FROUNT の CCR2 認識機構の解明

FNT-C について、長さが異なる 11 種類の安定同位体標識タンパク質の発現・精製系を確立し、溶液 NMR 測定・解析を行なった。その結果、良好なスペクトルが得られる構造ドメインを同定することができた(図 1)。



また、最適化した FNT-C について結晶化を行い、3 種類の条件で結晶を得た(図 2)。



X 線回折実験を行なったところ、塩ではなく、タンパク質結晶であることを確認した。現在、溶液 NMR 解析および X 線結晶構造解析を進めている。

CCR2-ProC については、FNT-C と強固な複合体を形成するが、沈澱を生じやすいことが分かった。可溶化のため、ユビキチン融合タンパク質として発現・精製系を確立し、FNT-C

と複合体を形成したところ、沈澱を抑制することができた。

安定同位体標識 FNT-C に対する非標識の CCR2-ProC の結合を溶液 NMR で観測することで、FNT-C 上の結合に関与する残基を同定することができた。

また、安定同位体標識 CCR2-ProC の溶液 NMR 測定・解析を行い、NMR 信号の帰属を完了した。非標識の FNT-C を滴定し、信号強度の変化から結合部位を同定した(図 3)。CCR2-ProC は α -ヘリックス構造をとり、疎水性面で FNT-C と結合すると考えられる(図 4, 5)。今後、複合体の立体構造解析を進め、薬剤設計・最適化に活用する。

図 3



図 4

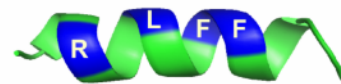
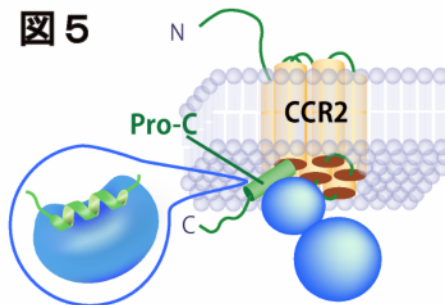


図 5



(2) 立体構造情報を利用した、FROUNT CCR2 相互作用をターゲットとする慢性炎症性免疫疾患治療薬の創出

寺島は、FROUNT CCR2 相互作用を阻害する化合物を、低分子化合物ライブラリーからスクリーニングすることで見出した。ホモジニアス時間分解蛍光 (HTRF) 法によってハイスループットスクリーニングし、3200 の化合物ライブラリーから 92 の阻害化合物を得た。このうち、ヒト単球細胞の細胞遊走を阻害する活性をもつものは 15 化合物であった。細胞毒性試験において毒性を示さなかったものは 10 化合物であった。

これらの化合物について、現在、溶液 NMR 法および X 線結晶回折法にて各化合物の相互作用部位の同定を進めている。立体構造情報をもとに、薬剤設計・最適化を行なう予定で

ある。

以上の結果は、FROUNT CCR2 相互認識機構の解明、および、相互作用をターゲットとする慢性炎症性免疫疾患治療薬の創出に向けて、不可欠な知見・材料である。

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)

[学会発表](計8件)

藺田晃弘、白血球走化性因子 FROUNT の構造生物学的研究、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 26 日、国立京都国際会館(京都)

江崎芳、白血球遊走制御タンパク質 FROUNT の構造生物学的研究、BMB2008(第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会)、2008 年 12 月 12 日、神戸ポートアイランド(神戸)

Honda, M., Structural analyses of the binding interface in CCR2b-FROUNT complex, mediators of Leukocytes chemotaxis.、The 6th Kumamoto University Forum, 2008.11.5、Institut Teknologi Sepuluh Nopember (Surabaya, Indonesia)

江崎芳、炎症性疾患治療薬ターゲットタンパク質 FROUNT の構造生物学的研究、第 32 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、2008 年 9 月 11 日、阿蘇リゾートグランヴィリオホテル(熊本)

藺田晃弘、ケモカイン受容体 CCR2b の細胞内結合蛋白質 FROUNT に関する構造生物学的研究、第 32 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、2008 年 9 月 11 日、阿蘇リゾートグランヴィリオホテル(熊本)

本多美由紀、NMR 法を用いた CCR2b にお

ける FROUNT 結合領域の解析、第 32 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、2008 年 9 月 11 日、阿蘇リゾートグランヴィリオホテル(熊本)

長野良平、構造生物学に基づく CCR2b と細胞内結合蛋白質 FROUNT との相互作用解析、第 32 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、2008 年 9 月 11 日、阿蘇リゾートグランヴィリオホテル(熊本)

藺田晃弘、GPCR の細胞内結合蛋白質に関する構造生物学的研究、第 31 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、2007 年 9 月 20 日、ゆふいん七色の風(大分)

[図書](計1件)

吉永壮佐、朝倉書店、生物物理学ハンドブック(分担: 溶液の NMR)、2007 年、455-458

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉永 壮佐 (YOSHINAGA SOSUKE)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・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・大学院医学薬学研究部・教授
研究者番号: 10300956