

様式第 1 号

論文内容要旨

Structural basis of CXC chemokine receptor 1
ligand binding and activation

学位申請者氏名：石本 直偉士

研究指導教員：朴 三用

1. 序

Gタンパク質共役受容体 (G protein-coupled receptor, GPCR) は細胞膜上で神経伝達物質やホルモンなどを認識する生体センサー膜タンパク質として知られており、薬理作用、嗅覚、味覚、視覚などを感じるのも GPCR がその役割を担っている (Fig. 1)。そのため、GPCR の構造学的知見は新規薬剤の開発において重要な役割を果たすことが期待されている。近年、さまざまな GPCR の多くの構造がクライオ電子顕微鏡単粒子解析^{*1}により明らかになっている。

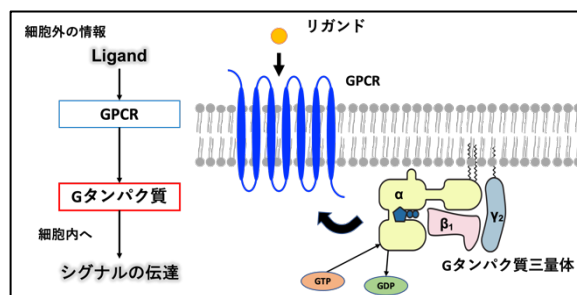


Figure 1. GPCR のシグナル伝達機構

GPCR の構造学的知見は新規薬剤の開発において重要な役割を果たすことが期待されている。近年、さまざまな GPCR の多くの構造がクライオ電子顕微鏡単粒子解析^{*1}により明らかになっている。

GPCR は 7 回膜貫通部位を持っており、膜タンパク質の中で最大のスーパーファミリーを形成し、その数は 800 種類ほどとされている。GPCR は大きく 4 つのクラス (Class A,B,C,F) から構成されており、その多くが Class A に分類される。その中、本研究対象であるケモカイン受容体は Class A と分類され、タンパク質リガンドの受容体として最大のファミリーを形成している。ケモカインは炎症部で大量に産生されることで、免疫細胞の遊走活性を引き起こすタンパク質の 1 つである。これらをリガンドとするケモカイン受容体は白血球表面に発現しており、50 種類を超えるケモカインのリガンドを 20 種類のケモカイン受容体が選択的に認識している^[1]。本研究では好中球表面に発現している CXCR1 に着目した。CXCR1 はリガンドとしてインターロイキン 8 (CXCL8/IL8) ^{*2}を認識し、遊走^{*3}活性を引き起こすことが知られている^[2]。好中球にはホモログである CXCR2 も同時に発現しており、同様に CXCL8 を認識するものの、好中球におけるこれらのリガンド反応機構の違いはこれまで明らかとなっていない。これまでの研究で、CXCL8 は生体内で単量体、二量体で平衡化しており、中でも CXCR1 は単量体優位に結合することが示唆されている^[3]が、その認識機構は不明である。一方、近年の研究で CXCR2 の構造^[4]が報告され、CXCL8 の単量体、二量体の双方を等しく認識する事が明らかになった。

ケモカイン受容体は複数のリガンドを認識可能である点や、同一リガンドに対して複数の受容体が反応するなど、その選択性の多様性により薬剤開発が困難な標的である。本研究では CXCR1 複合体の構造解明や CXCL8 の認識機構の解明を目指す。それらの情報は、ケモカイン受容体の受容体特異的な薬剤開発への重要な知見となることが期待される。

2. 実験方法

【CXCL8 の発現・精製】

pET32a vector に CXCL8 の遺伝子を挿入したプラスミドを BL21(DE3)へ形質転換した。LB 培地中で 37°C, 200 rpm の条件下で OD₆₀₀=0.6~0.8 となるまで培養し、IPTG を終濃度 0.5 mM となるように添加後、20°C, 200 rpm で終夜培養、集菌を行った。菌体は Lysis Buffer (20mM HEPES pH7.0, 150 mM NaCl, 0.2% Triton-X100, 0.25 μM PMSF) により懸濁、超音波破碎、遠心後、上清を回収した。上清は Ni アフィニティークロマトグラフィーにより精製し、目的溶出画分を回収した。Tag 切断のために、TEV プロテアーゼを添加し、透析後、再度 Ni アフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。最後にサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) による精製を行い、20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl 中で保存した。

【CXCR1-CXCL8 の複合体精製と構造解析】

1) CXCR1 の発現と精製

pFastBac HT-B ベクターに対し、*Spodoptera frugiperda* (Sf9) 発現用にコドンオプティマイズした全長の Human CXCR1 を挿入した。N 末端には Hemagglutinin (HA) シグナル, thermostabilized apocytochrome b256RIL (BLIR) , Flag-tag, HRV 3C protease site を付加し、C 末端に 8xHis-tag をデザインした。CXCR1 は Bac-to-Bac システムを用いて Sf9 昆虫細胞へ感染、発現させた。Sf9 の培養は 4.0×10⁶ cells/mL に調製した細胞に対してウイルスを感染させ、27°C で 60-72 時間培養した後回収した。回収した cell 内の膜画分から CXCR1 を精製するために、まず、低浸透圧緩衝液 (Low salt buffer: 10 mM HEPES pH7.5, 10 mM MgCl₂, 20 mM KCl) と高浸透圧緩衝液 (High salt buffer: 10 mM HEPES pH7.5, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM KCl) でホモジナイズした。これらの操作中はプロテアーゼ阻害剤カクテルの存在下で行った。破碎溶液を超遠心し、膜画分に対して CXCL8 を含む可溶化緩衝液 (50 mM HEPES pH7.5, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 1% (w/v) n-dodecyl-beta-D-maltopyranoside (DDM) , 0.2% (w/v) cholesterol hemisuccinate (CHS) , 2 μM CXCL8) を用い可溶化を行った。可溶化は 4°C でゆっくりと攪拌させながら 2 時間行った。その後、264,902g, 4°C, 1 時間で遠心し不溶性画分を取り除いた後、上清を TALON レジンに吸着させるため 4°C で一晩攪拌した。レジンは 3 種類の洗浄 Buffer (I: 25 mM HEPES pH7.5, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 20 mM Imidazole, 0.05% DDM, 0.01% CHS, 2 μM CXCL8 ・ II: 25 mM HEPES pH7.5, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 20 mM Imidazole, 0.05% LMNG, 0.005% CHS, 0.05% DDM, 0.001% CHS, 2 μM CXCL8 ・ III: 25 mM HEPES pH7.5, 500 mM NaCl, 10% glycerol,

20 mM Imidazole, 0.05% LMNG, 0.005% CHS, 2 μ M CXCL8) をレジジン量の 10 倍ずつ流し、最後に溶出 Buffer (25 mM HEPES pH7.5, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 350 mM Imidazole, 0.05% LMNG, 0.005% CHS, 2 μ M CXCL8) により溶出した。その後、PD-10 を用いて脱塩処理を行い、HCV3C プロテアーゼを添加し、Tag を切断、Ni アフィニティー精製により Tag の除去を行った。最後に SEC により精製し、CXCR1 を含む目的溶出域を回収し保存した。

2) G タンパク質ヘテロ三量体 (G $\alpha\beta\gamma$) と scFv16 の発現/精製

Gai/G β 1 γ 2 ヘテロ三量体のコンストラクトは既報と同じ方法で設計、精製を行った^[5]。scFv16 の遺伝子に関しては N 末端に GP67 シグナル配列と C 末端に TEV プロテアーゼ切断サイトを含む 6xHis-tag を付加した改変 pFastBac ベクターにクローニングを行った。精製方法はこれまでに報告されている方法を利用した^[5]。

3) CXCR1-G タンパク質ヘテロ三量体複合体の調製

CXCR1 と G タンパク質ヘテロ三量体を 1:1.2 のモル比で混合し、2.5 μ L の Apyrase を加えて、25°C で 30 分間インキュベーションした。さらに scFv16 を G タンパク質ヘテロ三量体に対してモル比で 1:1.3 となるように加え、1 時間氷上で静置した。その後、サンプルを SEC により精製した。この際、カラムは 25 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM TCEP, 0.001% LMNG, 0.0001% CHS により平衡化した。複合体のピーク領域を回収し、2.5 mg/mL まで濃縮し、保存した。

4) Cryo-EM 測定に向けたグリッド作製と測定条件

親水化処理を施したホーリーカーボングリッド (Quantifoil R1.2/1.3, Cu, 300 mesh) に対して、湿度 100%, 温度 4°C の環境下でグリッド作製を行った。これらの操作は Vitrobot Mark IV により行った。グリッド作製後は、液体窒素内に保管し、理化学研究所横浜キャンパスにおいて 300 kV Titan Krios G4 を用いてデータコレクションを行った。粒子画像は 15 eV スリット付きの K3-summit カメラにより収集し、CDS モードで 48 フレーム、4175 枚の粒子像を収集した。その際に当てた電子の数は 51.16 e/ \AA^2 であり、露光時間 4.7 秒、カメラ上の線量は 7.5 e⁻/px/s であった。ピクセルサイズは 0.83 \AA /pixel でデフォーカス範囲は -0.8 ~ -1.6 μ m に設定した。データは EPU ソフトウェアにより自動収集された。

5) Cryo-EM データの解析

データ解析は cryoSPARC 及び Relion を利用した。4,175 枚の粒子像から、

2,530,947 particles を抽出して解析を行った。最終的に 120,631 particles から 3 次元再構成を行い、deepEMhancer を用いて、map の改善を計った。

6) モデリングとリファインメント

CXCR1 の初期モデルは AlphaFold Protein Structure Database から利用した。G タンパク質三量体の構造及び scFv16 は CXCR2/CXCL8 (単量体) の複合体構造を利用した (PDBID: 6LFO) [4]。モデルは ChmeraX で重ね合わせた後に coot でモデル構築を行った。リファインメントは Phenix の Real-space Refine を用いて行った。

【NanoBiT-G タンパク質乖離アッセイを用いた活性評価】

活性測定は東北大学井上飛鳥教授との共同研究により行った。CXCR1 における Gαi1 活性化は Gα サブユニットと Gβγ サブユニット間の相互作用を NanoBiT アッセイにより (NanoBiT-G-protein dissociation assay) 計測している[6]。具体的には Gαi1 のタンパク質の 91-92 番目の残基間に LgBit と呼ばれるルシフェラーゼの断片と Gγ2 サブユニット断片の N 末端に対して LgBit と相互作用することで発光する SmBit と呼ばれる断片を融合する。この断片を含む、G タンパク質ヘテロ三量体と受容体を HEK293A 細胞に発現させ、リガンドを加えながら G タンパク質の乖離度について発光量を基準に観察する手法である (Fig.2)。量体の異なる CXCL8 や CXCR1 の変異体を用い、CXCR1 に対する活性測定を行った。

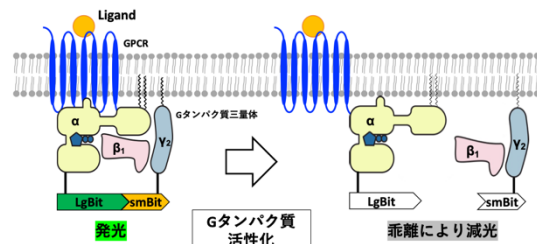


Figure 2. NanoBiT G タンパク質乖離アッセイの原理

3. 研究結果

1) CXCL8 の精製と質量分析

最終精製の SEC のグラフを示す。SEC の結果、WT, Trapped dimer のピークは二量体を示しており、Tapped Monomer では単量体であることを示している (Fig. 3)。2つの状態は精製前に想定された構造をとっていることが示唆された。また、ESI-MS によりそれぞれのサンプルの質量が理論値と一致していることを確認した。WT は約 20%が monomer の質量を示した。これらのサンプルをもとに複合体精製、活性測定含め行った。

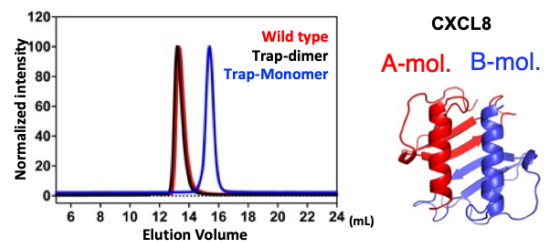


Figure 3. SEC による CXCL8 の精製結果

2) CXCR1-G-Protein-scFv16-CXCL8 複合体の構造解析

クライオ電子顕微鏡単粒子解析により、全体分解能 3.4 Å で構造を明らかにした (Fig. 4 上)。興味深いことに CXCL8 は SEC および ESI-MS の結果からも二量体であったにもかかわらず、構造解析の結果は単量体として観測され、1-69 番目 (全長 72 残基) の残基の map が確認された。この結果はこれまでの“CXCL8 が CXCR1 に対し単量体優位に結合する”という報告^[3]を構造学的に示唆する結果となった。CXCR1 は他の Class A GPCR と同様に 7 回膜貫通型のヘリックスを持ち、細胞膜と並行に存在するヘリックス 8 までのマップが観測された。モデリングの結果、CXCL8 と CXCR1 の間には静電相互作用が形成され結合が安定化していた (Fig. 4 下)。また、CXCR1 の活性化による全体構造の変化は非活性化状態の CXCR2 (PDB:6LFL) の立体構造との比較で行い、これまで報告された GPCR の活性化に特徴的の動きを観測した。また、CXCR2-CXCL8-G-protein 複合体の構造 (PDB:6LFM/6LFO) と比較したところ、CXCR1 の細胞外ループ 2 (ECL2) は 4Å ほど外側にシフトしていた (Fig. 4 下)。

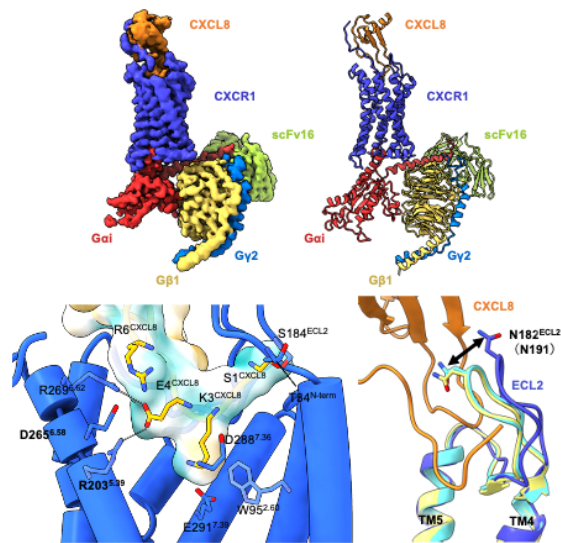


Figure 4. CXCR1 の全体構造 (上)
CXCR1-CXCL8 の相互作用部位 (左下)
CXCR2 との ECL2 の比較 (下右)

3) NanoBiT システムを用いた CXCR1 の活性化測定

CXCR1 に対して Wild type, Trapped-monomer, Trapped dimer の 3 種類の CXCL8 を利用してそれぞれの活性を測定した。興味深いことに WT に対して Trapped dimer は約 100 倍の活性の低さを示した。一方で、WT と Trapped monomer の活性の差は 2-4 倍であった。構造をもとに CXCR1 の ECL2 を CXCR2 の ECL2 と置き換えたところ、Trapped dimer の活性は WT や Trapped monomer と同程度の活性を示すようになり、CXCR1 の ECL2 は CXCL8 の選択性に重要な役割を示していることが示された (Fig. 5)。さらに、CXCL8 と CXCR1 の相互作用部位に関する変異体も作成し、活性測定を行い、結合に重要な残基を明らかにした。

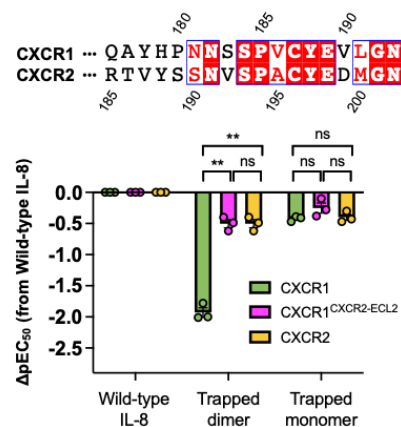


Figure 5. 活性測定の結果
ECL2 を置き換えた CXCR1 は二量体
CXCL8 に対しても活性が向上した

4. 討論

これまでの研究から CXCR1 は単量体 CXCL8 により活性化されることが示唆されていたが、今回、構造学的知見から、CXCR1 が単量体 CXCL8 を優位に認識していることを示した。単量体、二量体を双方で活性化される CXCR2 と比較して CXCR1 は ECL2 の位置が 4 Å ほど異なり、それらが CXCL8 の二量体境界面に対して立体障害を起こしていることから、ECL2 が CXCR1 の CXCL8 単量体認識に対して重要な役割を果たしていることが推測された。そこで ECL2 を CXCR2 の配列に置き換えた ECL2 swapped を用いた NanoBiT 活性測定の実験はその推測を裏付ける結果となった。

以上より、CXCR1 における CXCL8 の選択性を構造学、活性測定の観点から明らかにした。また、好中球に発現している CXCR1 と CXCR2 は生理的に同様の機能を担うものの、リガンドの選択性により働きが調節されていると推測され、それらが生体内における炎症反応の制御にも繋がっていると考えられる。

5. まとめ

- 1) CXCR1-G-Protein-CXCL8 の複合体構造をクライオ電子顕微鏡単粒子解析から 3.4 Å で明らかとした。
- 2) CXCR1 は CXCL8 単量体と結合した状態であり、量体の異なる CXCL8 を用いた活性測定の結果より、CXCR1 が単量体 CXCL8 を優位に認識していることが示された。
- 3) CXCL8 の選択性には CXCR1 の ECL2 が大きく関わっており、CXCR1 における CXCL8 の認識の機構を構造生物学的に証明することに成功した。

6. 論文リスト

【主論文】

Naito Ishimoto, Jae-Hyun Park, Kouki Kawakami, Michiko Tajiri, Kenji Mizutani, Satoko Akashi, Jeremy R.H. Tame, Asuka Inoue, Sam-Yong Park. Structural basis of CXC chemokine receptor 1 ligand binding and activation. *Nature Communications*. **14**, 4107. (2023)

【参考論文】

1) Ji-Hye Yun, Mio Ohki, Jae-Hyun Park, **Naito Ishimoto**, Ayana Sato-Tomita, Wonbin Lee, Zeyu Jin, Jeremy R.H. Tame, Naoya Shibayama, Sam-Yong Park, Weontae Lee, Pumping mechanism of NM-R3, a light-driven bacterial chloride importer in the rhodopsin family. *Science Advances*. **6**, eaay2042 (2020).

- 2) Yunseok Heo, Eojin Yoon, Ye-Eun Jeon, Ji-Hye Yun, **Naito Ishimoto**, Hyeonuk Woo, Sam-Yong Park, Ju-Joon Song, Weontae Lee; Cryo-EM structure of the human somatostatin receptor 2 complex with its agonist somatostatin delineates the ligand-binding specificity. *eLife*. 11, e76823 (2022).
- 3) Jae-Hyun Park, Masashi Iwamoto, Ji-Hye. Yun, Tomomi Uchikubo-Kamo, Donghwan Son, Zeyu Jin, Hisashi Yoshida, Mio Ohki, **Naito Ishimoto**, Kenji Mizutani, Mizuki Oshima, Masamichi Muramatsu, Takaji Wakita, Mikako Shirouzu, Kehong Liu, Tomoko Uemura, Norimichi Nomura, So Iwata, Koichi Watashi, Jeremy R.H. Tame, Tomohiro Nishizawa, Weontae Lee, Sam-Yong Park; Structural insights into the HBV receptor and bile acid transporter NTCP. *Nature*. 606, 1027–1031 (2022).
- 4) Yunseok Heo*, **Naito Ishimoto***, Ye-Eun Jeon, Ji-Hye Yun, Mio Ohki, Yuki Anraku, Mina Sasaki, Shunsuke Kita, Hideo Fukuhara, Tatsuya Ikuta, Koki Kawakami, Asuka Inoue, Katsumi Maenaka, Jeremy R.H. Tame, Weontae Lee, Sam-Yong Park (*These authors contributed equally); Structure of the human galanin receptor 2 bound to galanin and Gq reveals the basis of ligand specificity and how binding affects the G-protein interface. *PLoS Biology*. 20, e3001714 (2022).
- 5) Jae-Hyun Park, Kouki Kawakami, **Naito Ishimoto**, Tatsuya Ikuta, Mio Ohki, Toru Ekimoto, Mitsunori Ikeguchi, Dong-Sun Lee, Young-Ho Lee, Jeremy R. H. Tame, Asuka Inoue, Sam-Yong Park; Structural basis for ligand recognition and signaling of hydroxy-carboxylic acid receptor 2. *Nature Communications*. 14, 7150 (2023).
- 6) Jinta Asami, Jae-Hyun Park, Yayoi Nomura, Chisa Kobayashi, Junki Mifune, **Naito Ishimoto**, Tomoko Uemura, Kehong Liu, Yumi Sato, Zhikuan Zhang, Masamichi Muramatsu, Takaji Wakita, David Drew, So Iwata, Toshiyuki Shimizu, Koichi Watashi, Sam-Yong Park, Norimichi Nomura, Umeharu Ohto; Structural basis of hepatitis B virus receptor binding. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2023 (in press).

7. 参考文献

- [1] Le, Yingying, Ye Zhou, Pablo Iribarren, and Ji Ming Wang, Chemokines and Chemokine Receptors: Their Manifold Roles in Homeostasis and Disease, *Molecular Immunology*, 1, 2, 10, (2004)
- [2] Park, Sang Ho, Bibhuti B. Das, Fabio Casagrande, Ye Tian, Henry J. Nothnagel, Mignon Chu, and others, Structure of the Chemokine Receptor CXCR1 in Phospholipid Bilayers, *Nature*, 491, 7426, 779–83, (2012)
- [3] Nasser, Mohd W., Sandeep K. Raghuwanshi, Delores J. Grant, Venkatakrishna R. Jala, Krishna Rajarathnam, and Ricardo M. Richardson, Differential Activation and Regulation of CXCR1 and

- CXCR2 by CXCL8 Monomer and Dimer, *The Journal of Immunology*, 183, 5, 3425–32, (2009)
- [4] Liu, Kaiwen, Lijie Wu, Shuguang Yuan, Meng Wu, Yueming Xu, Qianqian Sun, and others, Structural Basis of CXC Chemokine Receptor 2 Activation and Signalling, *Nature*, 585, 7823, 135–40, (2020)
- [5] Kim, Kuglae, Tao Che, Ouliana Panova, Jeffrey F. DiBerto, Jiankun Lyu, Brian E. Krumm, and others, Structure of a Hallucinogen-Activated Gq-Coupled 5-HT_{2A} Serotonin Receptor, *Cell*, 182, 6, 1574-1588.e19, (2020)
- [6] Inoue, Asuka, Francesco Raimondi, Francois Marie Ngako Kadji, Gurdeep Singh, Takayuki Kishi, Akiharu Uwamizu, and others, Illuminating G-Protein-Coupling Selectivity of GPCRs, *Cell*, 177, 7, 1933-1947.e25, (2019)
- [7] コスモ・バイオ株式会社 HP 記事 ID 13474 特集：細胞遊走アッセイ
https://www.cosmobio.co.jp/product/detail/cell-migration-assay.asp?entry_id=13474

8. 用語集

*1 クライオ電子顕微鏡単粒子解析

極低温状態の水中に包埋したサンプルに対して電子線を照射し、粒子像を撮影。得られた粒子像にはさまざまな方向性を持ったタンパク質の情報が含まれており、これらを画像処理等により、1つずつの粒子を切り出し3次元再構成の行うことでタンパク質の立体構造を明らかにする手法。

*2 インターロイキン8 (CXCL8/IL8)

生体内で72個のアミノ酸で働くタンパク質。細胞から分泌されるタンパク質であるサイトカインの1つであり、インターロイキンはヘルパーT細胞により分泌される。中でもCXCL8はマクロファージや血管内皮細胞を中心に産生されている。受容体としてCXCR1/2が知られており、好中球の走行性因子や血管新生プロモーターとしても知られている。

*3 遊走

細胞が元々存在した位置から他の場所に移動することを表す。細胞の移動はケモカインのようなタンパク質を走行性因子として認識し濃度勾配により移動するケモタキシス（走化性）、細胞接着面や細胞外マトリクスに対して結合した走行性因子を認識して移動するハプトタキシス（走触性）、細胞が創傷の間を移動する創傷治癒、細胞外マトリクスの分解や、タンパク質の分解により、細胞外マトリクスを通過して別の組織に移動する細胞浸潤の4つが挙げられる^[7]。