

学位論文審査の結果の要旨

氏名	石本 直偉士	
学位の種類	博士（理学）	
学位記番号	甲 第1990号	
学位授与の日付	令和6年3月25日	
学位授与の要件	文部科学省令学位規則 第4条第1項 該当	
学位論文題目	Structural basis of CXC chemokine receptor 1 ligand binding and activation	
主研究指導教員	朴 三用	
論文審査委員	(主査) 古久保 哲朗	教授
	(副査) 有田 恭平	教授
	(副査) 西澤 知宏	教授
	(副査) 秋山 泰身	大学院客員教授

論文内容の要旨

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働くことが知られており、薬理作用、嗅覚、味覚、視覚などを感じる場合にも GPCR がセンサーとしての役割を担っている。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。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、ヒトゲノム中には800種類ほど存在する。GPCR は大きく4つのクラス（Class A, B, C, F）に分けられるが、その多くが Class A に属する。本研究対象であるケモカイン受容体も Class A に分類される。また、ケモカイン受容体は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。リガンドであ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。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) を認識し、遊走活性を誘導することが知られている。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かった。これまでの研究から、CXCL8 は生体内において単量体、二量体間で平衡化しており、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が、その認識機構は不明である。一方、近年の研究において CXCR2 の構造が報告され、CXCR2 は CXCL8 の単量体、二量体の双方を等しく認識することが明らかとなった。単一のケモカイン受容体が複数のリガンドを認識することに加え、複数のケモカイン受容体が同一リガンドに対して反応するなど、その選択性の多様性によりケモカイン受容体は薬剤開発が困難な標的である。本研究では CXCR1 複合体の構造ならびに CXCL8 の認識機構の解明を目指した。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手がかりとなることが期待される。

研究手順および結果は以下のとおりである。リガンドである CXCL8 の調製は、大腸菌発現系を用いて行った。単量体／二量体の両フォームを取り得る野生型 CXCL8 (WT)、および置換 or 欠失変異の導入により単量体 (Trapped monomer)、二量体 (Trapped dimer) のみをとる CXCL8 変異体を精製した。これら調製サンプルの状態をサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) とエレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) により解析し、目的の量体であることを確認した。また、昆虫細胞発現系を用いて CXCR1、G タンパク質三量体、および G タンパク質の構造安定化に寄与する抗体 scFv16 を発現させ、精製した。CXCL8 存在下で可溶化した CXCR1 について SEC および SDS-PAGE により複合体化の確認を行い、精製サンプルをクライオ電子顕微鏡単粒子解析に供した。その結果、3.4 Å の解像度で構造が明らかとなった。CXCR1 は GPCR 特有の 7 回膜貫通型の構造を形成しており、N 末端のループ領域と細胞外側のポケットの 2 箇所で CXCL8 を認識していた。CXCL8 の N 末端は CXCR1 の細胞外側のポケットに入り込んでおり、塩橋を形成していた。東北大学・井上飛鳥教授との共同研究により Nano-BiT G タンパク質乖離アッセイを行った結果、CXCR1 のリガンド選択性は WT と比較して Trapped dimer が 100 倍ほど低い活性を示した。また、結合に関与していると考えられた残基に変異を導入し、活性測定を行ったところ、活性に変化が見られ、それらが確かに相互作用していることを明らかにした。

また、単量体／二量体 CXCL8 の双方を認識する CXCR2 との構造の比較から、CXCR1 では第二細胞外ループ (ECL2) が最大 4 Å 外側に動いていることが明らかとなり、CXCR1 の ECL2 を CXCR2 の ECL2 で置き換えたキメラ型 CXCR1^{CXCR2-ECL2} を用いて活性測定を行った。その結果、このキメラ型受容体は二量体 CXCL8 でも活性化されたことから、CXCR1 において ECL2 が CXCL8 認識に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。この結果は、これまでの CXCR1 が単量体優位に結合するという報告を構造学的に強く支持するものである。

CXCL8 はガンの転移とも密接に関わっており、本研究により明らかとなった CXCR1 と CXCL8 の複合体の立体構造情報は、今後、がん疾患の新規薬剤の開発や既存薬剤の改良に役立つことが期待されると共に、これまで困難とされてきたケモカイン受容体特異的な薬剤の開発、G タンパク質を介したシグナル伝達の機構、免疫応答の機構解明などにおいても重要な役割を果たすことが期待される。

論文審査結果の要旨

論文の審査は、提出論文の内容、発表会及び審査会での質疑応答に基づき、4名の審査員（主査：古久保哲朗 教授、副査：有田恭平 教授、西澤知宏 教授、秋山泰身 大学院客員教授）によって令和5年12月18日に行われた。

学位論文では、CXCR1, CXCL8(IL8), Gタンパク質三量体から成る複合体の構造ならびにCXCR1によるCXCL8(IL8)認識機構に関して得られた新たな知見が述べられている。発表会に引き続き審査会を行ったため、審査会ではあらためて内容の要約を発表することはせず、すぐに本研究の専門性、関連科目の知識、外国語（英語）力に関して、各審査員と申請者の間で以下の質疑応答が行われた。

専門分野に関して、古久保主査からは、CXCR1の活性測定において、3種類のリガンド（WT, Trapped dimer, Trapped monomer）が実際にはどの様な濃度で添加されているのか（濃度の標記方法はmonomerベースなのか否か）、ECL2のスワップ後もmonomerに対する結合優位性が若干残るのはなぜか、CXCR1のN末端がmonomer, dimerの選択性に関与するという過去の知見は今回の研究結果においてどのように反映されているのか、CXCR1変異体の活性測定において、変異体の発現が低い場合のバックグラウンドカーブはどのように補正されたのか等についての質疑があり、一部において若干の混乱が見られたものの、概ね適切な回答が得られた。

有田副査からは、今回構造解析に使用したCXCR1複合体の試料について、SDS-PAGEの結果からは夾雑バンドがかなり残っているように見えるがその点をどう考えているかコメントを求められるとともに、CXCR1複合体を調製する際に抗体(scFv16)を加えた理由についても質問され、種々の複合体調製に関する自身の経験を踏まえながら、電子顕微鏡による単粒子解析では、この程度の試料の純度でも解析には問題がないことや、抗体付加の理由がCXCR1複合体の安定化にあることなどを明確に説明した。さらに、CXCR1複合体の構造解析の結果において、CXCL8の電子マップがあまりクリアでは無かった理由について問われ、構造解析の過程でCXCL8は温度因子が高く、非常に不安定であることが説明され、これ以上の改善は難しいとの回答がなされた。また、構造解析の手法に関連し、local 精密化はどの部位について行われたかとの質問がなされ、スライドを用いて解析対象部位を示しながら適切に回答した。その他、CXCR1上でdimerがmonomerに乖離する際にECL2の位置が柔軟性をもたないと考えている理由は何か、CXCR1/2間でECL2のアミノ酸配列は互いによく似ているが、両者の活性の違いを生み出す重要な残基はどれか、CXCR1を標的とした創薬を考えた場合の具体的なデザインは何か、今回のようにmonomer/dimerによりレセプターの種類が異なるケモカインは他にも知られているのか等の質疑が行われ、概ね適切な回答が得られた。

西澤副査からは、CXCR1がmonomer優位に結合する生理的な意義は何か、活性測定においてリガンド間でefficacyの違いは見られたのか、提示したモデルでは活性化ドメインを欠失させたリガンドが受容体に結合できなくなることを合理的に説明できな

いのではないかと、Trapped dimerを用いて電顕試料を調製したことはあるか、SDS-PAGEにおいて観察された受容体自身の二量体は電顕で観察できたか等についての質疑があり、概ね適切な回答が得られた。さらに、CXCR1の3種類のリガンドに対する濃度計算方法が通常用いられている方法とは異なる可能性があるのではないかと、nMレベルの親和性がある以上、立体障害が原因となりdimerからmonomerへの乖離が起こると考えるよりも、最初からmonomerが優先的に選択されると考えた方がよいのではないかと指摘がなされ、申請者との間で活発な議論が行われた。また、CXCR1複合体の構造を決定する際に、対象として選んだ不活性型の構造を問われ、CXCR2の不活性型の構造を使用した旨の明確な回答が得られた。

秋山副査からは、今回の構造決定の意義は何か（CXCR1がmonomer優位に結合する理由が分かるとどういったことがあるのか）、CXCR1, 2の生理的なシグナルの違いはどこまでわかっているのか（例えば各受容体のノックアウトマウスの表現型に違いはあるのか）、CXCR1/2のECL2間の構造の違いはどの様にして分かったのか、ECL2のスワップ実験の結果において比較すべきペアが説明の通りでよいのか（他の比べ方も有り得るのではないかと）、逆方向のスワップ実験も行わないと必要十分とはいえないと思うがどうか等の質疑があり、概ね適切な回答が得られた。また3種類のリガンドの質量分析結果に関連して、ESI-MS測定の方法と得られた結果の解釈方法について詳しい説明を求められ、一部不明瞭な点はあったものの、こちらも概ね適切に回答した。

関連科目の知識について、古久保主査からは、生体内におけるATPの作られ方や使われ方についての説明を求められた。キナーゼの基質になる（リン酸供与体として働く）など断片的な知識を有していることは確認できたが、体系的に説明することは難しいようであった。有田副査からは、GPCR以外の膜タンパク質を介したシグナル伝達系について例を挙げて説明するように求められ、受容体型チロシンキナーゼを例に取り、その作用機序について適切に説明した。西澤副査からは、Gs共役型受容体の例、ならびにGタンパク質を介したシグナル伝達経路を攻撃する毒素の例をそれぞれ挙げるように求められ、前者については適切な回答が得られた。また、秋山副査からは、ケモカインの活性測定実験の具体的な手順、好中球の遊走を直接観察する方法、炎症の特徴などについて説明を求められ、ヒントを与えられながらではあったが、概ね適切に回答した。

外国語（英語）力については、発表に使用したスライド一枚（本人が選択）を英語で説明するように求められ、1～2分程度のプレゼンテーションを行った。また、学位論文に付与された英文報告書の“Background”, “General Discussion and Perspective”に記載された英文が本人自身の手によるものであるか（他人の校閲を受けていないか）についての確認がなされた。口頭・筆記のいずれも問題の無い内容であり、両者を合わせて、各審査委員が英語力の判定を行うこととなった。

最後に審査員全員で討議を行い、研究内容については、質・量ともに申し分無く、学位に十分値するとの評価を受けた。また専門分野のみならず、関連科目に関する質疑応答、英語力等全てを総合的に判断して、申請者は学位を得るにふさわしい十分な資格を有すると判定された。