活性型Gタンパク質共役受容体の機能発現法： ケモカイン受容体をモデルとして

キリンビール株式会社医薬カンパニー医薬フロンティア研究所 前田宜丈

GPCRs (G-protein-coupled receptors) are the largest class of cell-surface receptors. They are the targets of many bio-active molecules and thus could be promising targets for drugs. However, our understanding of GPCR is restricted mainly due to the difficulties of their expression and/or purification as recombinant proteins. In this paper, our studies about chemokine receptor (CXCR1) are shown as a model case of the investigation of GPCR, and the prospects of this field of research are discussed.

G-protein-coupled receptors / CXCR1 / chemokine receptor / high-affinity binding / baculovirus expression system

1. はじめに

Gタンパク質共役受容体 (G protein-coupled receptor; GPCR) は細胞膜上で細胞外からの情報を認識する受容体として働き、神経伝達物質、ホルモン、におい、味、光などの多様な情報ネットワークに関与する。GPCRは7回膜貫通部位という特徴的な構造をもち、ヒト遺伝子の中でも最も大きなスーパーファミリーの1つを形成している。リガンドが結合したGPCRは細胞膜の内側にある3量体Gタンパク質 ($G_{\alpha_{GDP}\beta\gamma}$) に作用し、GDPの遊離を促進する。GDPが解離した後、 α サブユニットにはGTPが結合し、3量体Gタンパク質は α_{GTP} と $\beta\gamma$ に解離し、 α_{GTP} と $\beta\gamma$ はそれぞれ酵素やイオンチャンネルに作用する。現在臨床的に用いられている薬の約半分がGPCRに働くと考えられており、GPCRは創薬の重要なターゲットである。しかしながら、GPCRのタンパク質としての理解 (機能解析、構造解析) は、発現・調製が難しいためにあまり進んでいない。ここでは、我々が取り組んでいるGPCRの1種であるケモカイン受容体CXCR1の昆虫細胞による発現、機能解析を中心に、この分野の現状と今後の展望について紹介させていただく。

2. ケモカイン受容体

ケモカインは分子量8-10 kDaの分泌タンパク質であり、各種免疫反応に関与しているのみならず、発生における細胞移動、がんの転移などにも重要な役割をあたしている¹⁾⁻³⁾。ケモカインは構造的、機能的に4つの

サブファミリー、CXCケモカイン、CCケモカイン、Cケモカイン、CX₃Cケモカインに分類され、ケモカイン受容体に作用して細胞内にシグナルを伝達する。このケモカイン受容体はGPCRファミリーに属する。

CXCL8 (IL-8) はCXCケモカインの中で一番研究されているもので、呼吸窮迫症候群や慢性型特発性間質性肺炎、リウマチや喘息などの免疫反応をもたらす要因として機能している³⁾。CXCL8の受容体はCXCR1、CXCR2の2種存在する。CXCR1はCXCL8と強い結合を示し、CXCR2はCXCL8以外にもCXCL1、CXCL2、CXCL7などと結合する⁴⁾。これらの受容体はアゴニストと結合すると百日咳毒素感受性の3量体Gタンパク質 (G_i タンパク質) を活性化し、細胞内へのシグナル伝達を行う。また、他のGPCRと同様に、アゴニスト刺激の後、リン酸化と脱感作をうける⁵⁾。

3. 組換えGPCRの発現、調製

GPCRをタンパク質として理解するためには、GPCRの機能解析や構造解析を進めていく必要がある。そのためには組換えGPCRの発現、調製を行わなくてはならない。しかし、7回膜貫通領域をもつGPCRを組換え体として発現、調製するのは困難な場合が多い。組換えGPCRを発現する系として動物細胞、昆虫細胞、酵母、大腸菌などが用いられる⁶⁾。動物細胞を用いた場合、一過性の発現系ではスケールアップが、安定的発現系では高発現細胞株の取得が困難である。大腸菌や酵母の発現系では、大量発現に成功したとしても、アゴニストとの相互作用を確認できないものが多数存在する。

The Functional Expression Methods of Activated G Protein-Coupled Receptor on the Model of Chemokine Receptor
Yoshitake MAEDA

KIRIN BREWERY CO., LTD., Pharmaceutical Division, Pharmaceutical Frontier Laboratory

Fig. 1 Schematic representation of the various recombinant baculovirus transfer vectors for heterologous production of the human CXCR1 in insect cells. *polhP*, polyhedrin promoter; *Mel*, coding sequence for the prepro-melittin signal sequence; *myc*, coding region for the c-myc epitope; *Flag*, coding region for the FLAG-epitope; *Bio*, coding region for the biotinylation domain of the *Propionibacterium shermanii* transcarboxylase; $G_{12}\alpha$, coding region for the α -subunit of G_{12} -protein¹⁹.

これに対して、バキュロウイルスを用いた昆虫細胞での発現系ではいくつかのGPCRを高発現させることに成功しており、GPCRのリガンド結合やシグナル伝達の解析に用いられている。しかし、組換えGPCRを昆虫細胞に発現させ、機能を解析するためにはGPCRとGタンパク質との相互作用を考慮する必要がある。昆虫細胞ではGタンパク質の種類によっては発現量が少ないものがあり、リガンドとGPCRとの親和性はGタンパク質がGPCRと相互作用している時としていない時とで異なるからである。例えば、ドーパミン D_{2s} 受容体を昆虫細胞に発現させた場合、低親和性のリガンド結合しか確認できない。これは内在性のGタンパク質より組換えGPCRの発現量が過剰になり、GPCRがGタンパク質と十分相互作用できなくなるからである。

不足するGタンパク質を補う方法として、GPCRとGタンパク質を昆虫細胞で共発現させ、両者のバランスをとり、細胞内でGPCRとGタンパク質の相互作用を再構築させる方法がある^{7), 8)}。ドーパミン D_{2s} 受容体とGタンパク質を昆虫細胞で共発現させた場合、低親和性の結合と、GPCR単独発現では確認できていない高親和性の結合が観察されている⁸⁾。低親和性と高親和性の2つの結合が観察されるのは、GPCRとGタンパク質の相互作用の再構築が不十分な細胞もあるためである。GPCRとGタンパク質を共発現させるためには4種の組換えバキュロウイルス(GPCR, $G\alpha$ サブユニット, $G\beta$ サブユニット, $G\gamma$ サブユニット)を共感染させる必要がある。4種のウイルスが1つの細胞に感染し、GPCRとGタンパク質の再構築がうまくいったものは高親和性のリガンド結合を示す。しかし、すべての細胞で4種のウイルスが感染しているわけではない。3種以下のウイルスしか感染しなかった細胞はGPCRとGタンパク質の相互作用の再構築が十分でなく、低親和性のリガンド結合を示すものがある。不足するGタンパク質を補うもう1つの方法として、GPCR- $G\alpha$ 融合タンパク質を用いた試みがある^{9), 10)}。利点はGPCRと $G\alpha$ サブユニットが1:1の割合で近接して存在していることである。

4. CXCR1受容体の昆虫細胞による発現、および薬理的解析

我々は、ケモカイン受容体CXCR1の機能および構造を解析する目的で、4種のCXCR1組換えタンパク質を昆虫細胞(Sf9細胞)で発現させた。このために用いた4種のバキュロウイルスベクター(pVL; バキュロウイルスにしたものはVLと表記している)をFig. 1に示す。発現後の検出のためpVLMelMycCXCR1のCXCR1のN末端にはc-mycタグを付加した。GPCRの検出、精製を容易にするために、pVLMelFlagCXCR1Bio、pVLMelFlagCXCR1 $G_{12}\alpha$ のN末端側にはFLAGタグの配列を、さらにpVLMelFlagCXCR1BioのC末端には*Propionibacterium shermanii* transcarboxylaseのピオチン化ドメイン¹¹⁾を付加した。Gタンパク質との相互作用を改善するためにpVLMelFlagCXCR1 $G_{12}\alpha$ のC末端にはラット $G_{12}\alpha$ 遺伝子を付加した。これらの組換えバキュロウイルスを昆虫細胞に感染させると、感染3日後から目的のタンパク質の発現が検出され、リガンド(CXCL8)との特異的な結合が見られるようになった。感染4-5日後には発現量は最大になったが、感染4日後には一部分解されたものも観察されはじめた。そこで、昆虫細胞発現CXCR1受容体の機能(薬理的)解析には、組換えウイルス感染4日後に回収した細胞を用いた。

これら4種の発現CXCR1受容体のうちFlagCXCR1 $G_{12}\alpha$ はCXCR1と3量体Gタンパク質の $G_{12}\alpha$ サブユニットとが共有結合でつながっており、相互作用するGタンパク質の不足を補えるようになっている。このタンパク質(FlagCXCR1 $G_{12}\alpha$)を発現した昆虫細胞膜画分を用いて、リガンドである $[^{125}I]$ -CXCL8がFlagCXCR1 $G_{12}\alpha$ に結合するときの濃度依存性を測定した。その結果、 $[^{125}I]$ -CXCL8が高い親和性($K_D = 100$ pM)でFlagCXCR1 $G_{12}\alpha$ と結合することが確認でき、スキャッチャードプロット(リガンドと受容体の相互作用における結合定数および結合部位の数の値を与えるために行うプロット)で解析すると見かけ上単一な結合サイトの存在が示された(Fig. 2a)。N末端、C末端にタグの付加がな

Fig. 2 Radioligand binding to membranes of infected Sf9 cells producing different CXCR1 constructs. Infection, membrane preparation, and binding assays were performed as outlined. (a) Saturation isotherm of [125 I]-CXCL8 binding to membranes prepared from VLMelFlagCXCR1G $_{2\alpha}$ -infected cells. (b) Saturation isotherm of [125 I]-CXCL8 binding to membranes prepared from VLCXCR1-infected cells. (c) Competition of [125 I]-CXCL8 binding to membranes from VLCXCR1-(▲), VLMelMycCXCR1-(◆), VLMelFlagCXCR1Bio-(▼) or VLMelFlagCXCR1G $_{2\alpha}$ -infected cells (■). (d) Competition of [125 I]-CXCL8 binding to membranes prepared from VLMelFlagCXCR1G $_{2\alpha}$ -infected cells using the unlabeled ligands CXCL8 (■) and CXCL1 (▲)¹⁹.

いCXCR1を発現させた膜画分を用いた場合にも、高い親和性 ($K_D = 32$ pM) が見られた (Fig. 2b). このときのリガンド結合より求めたCXCR1受容体の発現量は684 fmol/mg (FlagCXCR1G $_{2\alpha}$), 163 fmol/mg (CXCR1) と他の昆虫細胞発現GPCRと比べて高いものではなかった (Table 1). [125 I]-CXCL8と末標識CXCL8を用いた競合結合実験より求めた K_i 値は4種の発現CXCR1受

容体でほぼ一致しており、FlagCXCR1G $_{2\alpha}$ 発現膜画分を用いた場合は83 pM, CXCR1発現膜画分を用いた場合は123 pMとほぼ同等のリガンド結合親和性を示した (Fig. 2c, Table 1). ここで求めた FlagCXCR1G $_{2\alpha}$, CXCR1の K_D 値は100 pM (FlagCXCR1G $_{2\alpha}$), 32 pM (CXCR1) と約3倍異なるが、 K_i 値は各々のCXCR1受容体でほぼ同様な値であった。 K_D 値は発現細胞の種類などでばらつくことがあるため、両者は同程度の親和性であると考えている。

さらに、FlagCXCR1G $_{2\alpha}$ 発現膜画分を用いた解析で、CXCR1に対する弱い結合活性があるケモカインリガンドCXCL1との相互作用も確認できた (Fig. 2d). FlagCXCR1G $_{2\alpha}$ に対するCXCL1の見かけの K_i 値 (2888 pM) はCXCL8の K_i 値 (83 pM) より約35倍弱く、他の細胞での結果と一致している¹²⁾. ここで求めた昆虫細胞発現組換えCXCR1受容体のリガンドとの親和性は、ヒト好中球¹³⁾ (CXCL8受容体であるCXCR1が発現している) やCXCR1を発現させたHEK293細胞¹²⁾ で求めたリガンドとの親和性と同等であった。これは、昆虫細胞に発現させたCXCR1受容体がヒトの細胞に発現しているCXCR1とかわらないリガンド結合能を保持していること、さらにCXCR1受容体のN末端やC末端にタグや融合タンパク質(ビオチン化ドメイン, Gaiタンパク質)を付加してもリガンド結合には影響しないことを示している。

組換えGPCRの精製は確立された方法がなく、試行錯誤が必要である。GPCRの機能に影響なくN末端やC末端にアフィニティタグを付加することができれば、精製や機能解析を行う際に非常に有用である。CXCR1受容体のN末端タグやC末端タグの付加がリガンドとの相互作用に影響しないことは、今後のCXCR1受容体の機能解析や精製に非常に重要である。FLAGタグは市

Table 1 Ligand binding affinity of the CXCR1 produced in Sf9 cells by infection with either VLCXCR1, VLMelMycCXCR1, VLMelFlagCXCR1Bio or VLMelFlagCXCR1G $_{2\alpha}$ ¹⁹⁾

Receptor construct	Membrane ^a			Whole cell ^b	
	K_D (pM)	B_{max} (fmol/mg membrane protein)	K_i (pM)	K_i (pM) receptor ^c	K_i (pM) co-production with G $_{12}$ ^d
CXCR1	32 $\pm$ 17	163	123 $\pm$ 25 (n = 3)	44 $\pm$ 10 (n = 2)	31 $\pm$ 8 (n = 2)
MycCXCR1		86	194 $\pm$ 14 (n = 2)	35 $\pm$ 3 (n = 2)	27 $\pm$ 2 (n = 2)
FlagCXCR1Bio		205	80 $\pm$ 16 (n = 3)	68 $\pm$ 8 (n = 3)	67 $\pm$ 7 (n = 3)
FlagCXCR1G $_{2\alpha}$	100 $\pm$ 5	684	83 $\pm$ 16 (n = 6)	64 $\pm$ 4 (n = 3)	62 $\pm$ 7 (n = 4)

^aMembranes prepared from Sf9 cells producing the CXCR1 four days after infection with appropriate recombinant baculovirus. ^bThe competition binding assay was performed on whole Sf9 cells producing the different constructs four days after infection with appropriate recombinant baculoviruses. ^cSf9 cells were infected with baculovirus encoding the receptor construct only. ^dSf9 cells were infected with baculoviruses encoding the receptor construct as well as with baculoviruses encoding the G $_{12}$ protein. Membranes or cells were incubated with varying concentrations of CXCL8 in the presence of about 12 pM [125 I]-CXCL8. Values were determined from at least two experiments performed in duplicate. K_i values were calculated from IC $_{50}$ by the Cheng-Prusoff relation $K_i = IC_{50}/(1 + L/K_D)$, where L is the concentration and K_D is the dissociation constant of [125 I]-CXCL8 (100 pM)²⁰⁾.

Fig. 3 Flow chart of co-production of CXCR1 and G protein in Sf9 cells.

販の抗FLAG抗体アガロールを用いた精製が可能であり、ビオチン化ドメイン融合体はストレプトアビジンを利用した機能解析や精製にも使用できる。

5. CXCR1受容体とGタンパク質との共発現

CXCR1受容体の細胞内シグナル伝達には3量体Gタンパク質の一種であるGiタンパク質が関与している。リガンドが結合したCXCR1受容体はGiタンパク質を活性化することで細胞内へのシグナル伝達を行うが、昆虫細胞ではGiタンパク質は非常に少量しか発現していない¹⁴⁾。また、検出できていないという報告もある^{8), 15), 16)}。そこで、前述したGPCRとGタンパク質の共発現が効果を示すかどうかを調べた^{7), 8)}。

Fig. 3に示すようにディッシュに同数のSf9昆虫細胞をまき、それぞれCXCR1受容体のみを発現、CXCR1受容体とG α iサブユニットを共発現、CXCR1受容体とGタンパク質(G α i, G β , G γ)を共発現させる条件で培養を行い、4日間後 [125 I]-CXCL8と未標識CXCL8との競合結合実験、および [125 I]-CXCL8を用いた標識リガンド結合量の測定を行った。いずれの条件でも高親和性のリガンド結合しか観察されず、低親和性のリガンド結合は確認されなかった(Table 1)。GPCRを昆虫細胞に発現させた場合、先に示したドーパミンD $_2$ 受容体のように発現条件によってリガンドとの親和性が異なることが一般的に知られている。ドーパミンD $_2$ 受容体を単独発現させた場合では低親和性のリガンド結合しか観察されず、ドーパミンD $_2$ 受容体とGタンパク質を共発現させた場合には低親和性と高親和性のリガ

ンド結合が確認されている。CXCR1受容体のように低親和性のリガンド結合が観察されず、高親和性リガンド結合のみが観察されることはあまりないことである。

上述のようにGiタンパク質との共発現にかかわらずCXCR1受容体ではリガンドへの親和性(K_D 値, K_i 値)は変わらないが、リガンドの結合量にはGiタンパク質が大きな影響をおよぼす。CXCR1受容体をGタンパク質と共発現した場合では、すべてのCXCR1受容体でリガンド結合量の増加が観察された(Fig. 4a)。CXCR1(タグなし)ではGiタンパク質と共発現するとリガンド結合量が約10倍増加した。FlagCXCR1BioでもG α iサブユニットと共発現するとリガンド結合量は約6倍、3量体Giタンパク質と共発現すると約10倍増加した。しかし、FlagCXCR1BioとG β , G γ サブユニットとの共発現ではFlagCXCR1Bio単独発現と同等のリガンド結合量であった。このことから、CXCR1受容体のリガンド結合量の増加にはG α iサブユニットが大きな影響をおよぼすことがわかる。つまり、CXCR1受容体はGiタンパク質と相互作用するとリガンドとの親和性(高親和性)は変化しないが、リガンド結合量が増加する。

では、なぜCXCR1受容体はGiタンパク質と共発現すると K_D 値や K_i 値が変化しないあまりリガンド結合量が増加したのであろうか？可能性として2つ考えられる。1つは受容体そのものの発現量が増加した場合であり、もう1つはGiタンパク質と相互作用したCXCR1受容体のみがリガンドと結合できる場合である。これらの仮説を確かめるために、CXCR1受容体だけを発現

Fig. 4 Co-production of G protein and CXCR1 in Sf9 cells. (a) Specific binding of [¹²⁵I]-CXCL8 to VLMelCXCR1-, VLMelMycCXCR1-, VLMelFlagCXCR1Bio- or VLMel-FlagCXCR1G_{12α}-infected Sf9 cells with or without co-infection of either VLG_{12α} and/or VLGβ₁ and VLGγ₂. % [¹²⁵I]-CXCL8 bound is the amount of radioactive agonist [¹²⁵I]-CXCL8 binding, assuming that the value of FlagCXCR1Bio co-expressed with Gi proteins is 100%. All assays were performed in duplicate and data represent the mean ± SD of several independent determinations. (b) The monoclonal anti-FLAG antibody M2 was used for immunological analysis of the FlagCXCR1Bio and the FlagCXCR1G_{12α} constructions produced in Sf9 cells with or without co-production of the G_{12α}- or Gβ₁γ₂ subunits. lane 1, the FlagCXCR1Bio produced in Sf9 cells; lane 2, the FlagCXCR1Bio produced in Sf9 cells with G_{12α}-subunits; lane 3, the FlagCXCR1Bio produced in Sf9 cells with G_{12α}-protein; lane 4, the FlagCXCR1G_{12α} produced in Sf9 cells; lane 5, the FlagCXCR1G_{12α} produced in Sf9 cells with Gβ₁γ₂ subunits; lane 6, wild-type baculovirus infected Sf9 cells¹⁹.

させた場合と CXCR1 受容体と Gi タンパク質を共発現させた場合の CXCR1 受容体の発現量をウエスタンブロットングで比較した (Fig. 4b). FlagCXCR1Bio の単独発現と Gi タンパク質との共発現ではリガンド結合量は約 10 倍異なるが (Fig. 4a), FlagCXCR1Bio の発現量は両条件でほぼ同じであった (Fig. 4b). 同様に FlagCXCR1G_{12α} でも発現量は両条件でほぼ同じであった. 電子顕微鏡による免疫染色による観察においても, 単独発現, 共発現で FlagCXCR1Bio および FlagCXCR1G_{12α} の発現量, 局在に変化はなかった. これらの結果より

Fig. 5 Gpp(NH)p sensitivity of [¹²⁵I]-CXCL8 binding to the CXCR1 co-produced with G protein subunits. Specific binding of [¹²⁵I]-CXCL8 to VLMelFlagCXCR1Bio- or VLMelFlagCXCR1G_{12α}-infected Sf9 cells with or without co-infection of either VLG_{12α} and/or VLGβ₁ and VLGγ₂. % [¹²⁵I]-CXCL8 bound is the amount of radioactive agonist [¹²⁵I]-CXCL8 binding, assuming that the value of FlagCXCR1Bio co-expressed with Gi proteins is 100%. For testing of Gpp(NH)p sensitivity, Gpp(NH)p was added to the assay to a final concentration of 150 μM. All assays were performed in duplicate and data represent the mean ± SD of several independent determinations¹⁹.

リガンド結合量の増加は受容体の発現量の上昇によるものではないことがわかる.

次に, CXCR1 受容体は Gi タンパク質と相互作用している状態でのみリガンドと結合できるというもう 1 つの仮説を検証した. この仮説が正しいのであれば, リガンド結合実験の際に受容体と G タンパク質の相互作用を阻害すればリガンド結合量の減少が観察されるはずである. そこで, リガンド結合実験時に GTP アナログ (GPCR と G タンパク質の相互作用阻害剤) である Gpp(NH)p を添加し, リガンド結合量の変化を調べた. リガンド結合実験の際に Gpp(NH)p を添加すると FlagCXCR1Bio のリガンド結合量は約 25% に, FlagCXCR1G_{12α} のリガンド結合量は約 10% に減少した. このように Gpp(NH)p を添加したすべての条件で有意にリガンド結合量の減少が確認された (Fig. 5). CXCR1 受容体単独発現時でも, Gpp(NH)p を添加するとリガンド結合量が減少した. これは昆虫細胞にわずかに発現している G タンパク質と相互作用しているのではないかと考えている. GPCR の発現量が低いとき (1 pmol/mg 以下), 内性 G タンパク質と相互作用した GPCR が存在し, 高親和性リガンド結合が確認できているという報告もある¹⁷⁾. このとき GPCR の発現量が上昇する (1 pmol/mg 以上に) と高親和性結合は観察されていない. CXCR1 受容体のリガンド結合より求めた発現量は 1 pmol/mg 以

Fig. 6 Schematic representation of interaction between chemokine receptor and ligand. (カラー図は電子ジャーナル参照)

下であるので、Gpp(NH)p添加により減少するリガンド結合は内在性Gタンパク質とCXCR1受容体が相互作用しているものだと考えられる。

これらの結果は我々の仮説である「CXCR1受容体はGタンパク質と相互作用しているときにはリガンドと高親和性で結合でき (Fig. 6b), Gタンパク質と相互作用していないときにはリガンドと結合できない (Fig. 6a)」ということをサポートしている。

6. GPCRの活性化メカニズムを考える

以上の結果をもとに、ここでGPCRの活性化のメカニズムについて考えていきたい。GPCRの活性化にはアゴニスト (リガンド) の結合が必要であり、アゴニスト結合が受容体のコンホメーション変化を引き起こす。受容体はこの状態のみGタンパク質を活性化し、下流へシグナルを伝達できるという考え方が広く受け入れられてきた。しかし、アゴニストがなくてもGPCRが活性化され、下流へシグナルを流すことが最近の研究でわかってきた。例えば、昆虫細胞は $\beta 2$ アドレナリン受容体をもたず、通常はこの受容体のアゴニスト (カテコールアミン) に反応しない。 $\beta 2$ アドレナリン受容体を強制発現させると、リガンドが存在しないときでも受容体の発現レベルに依存してcAMPを生産する¹⁸⁾。この現象は、活性型GPCR (アゴニスト結合でシグナルを流す) と不活性型GPCR (シグナルを流さない) が通常から平衡状態で存在するという考え方でうまく説明できる (Fig. 7)。この平衡状態はGタンパク質、リガンドの有無にかかわらず存在する。活性化を引き起こすリガンド (アゴニスト) は活性型GPCRに結合し、全

活性型GPCR (活性型GPCR + リガンド・活性型GPCR) の割合を増加させる。反対に、不活性型GPCRに選択的に結合するリガンドはシグナルを伝達できない全不活性型GPCR (不活性型GPCR + リガンド・不活性型GPCR) の割合を増加させる。こう考えると、 $\beta 2$ アドレナリン受容体を昆虫細胞に大量に発現させた場合は、活性型GPCR、不活性型GPCRの平衡は変わらないが、GPCRの総数が増えたので、活性型GPCR量も増え、その結果シグナルが流れたものと理解できる。同様の理解で、動物細胞でGPCRの高発現株が取得できないのは、GPCRが高発現になるとリガンドがなくてもシグナルが流れるようになり、このために細胞が正常に増殖できなくなるためと考えられる。

昆虫細胞に発現させたいいくつかのGPCRでは、受容体単独発現ではリガンドとの低親和性結合が確認され、Gタンパク質との共発現では低親和性、高親和性の2種類のアゴニスト結合サイトが確認される⁸⁾。この高親和性リガンド結合サイトはGpp(NH)pの添加によるGPCRとGタンパク質の相互作用の阻害で消滅するが、低親和性結合サイトはGpp(NH)p添加では変化しない。昆虫細胞に発現させたCXCR1受容体については低親和性のリガンド結合は検出されず、高親和性のリガンド結合のみが観察された。この高親和性のリガンド結合は、CXCR1受容体とGiタンパク質との共発現で増加し、Gpp(NH)pの添加によりCXCR1受容体とGタンパク質の相互作用を阻害すると減少した。つまり、高親和性のリガンド結合にはCXCR1受容体とGタンパク質の相互作用が関与している。先に述べたように、GPCRの細胞内へのシグナルはGタンパク質を介して行われる。

Fig. 7 The model of constitutional diagram of GPCR.

よって、Gタンパク質との相互作用が関与しているこの高親和性リガンド結合はシグナルに関連した活性型GPCRとの相互作用であり、Gタンパク質との相互作用が関与していない低親和性のリガンド結合はシグナルとリンクしない不活性型GPCRとの相互作用であると考え、これらの結果もFig. 7で説明できる。

我々が行ったCXCR1受容体のリガンド結合実験では低親和性リガンド相互作用は検出できていない(Fig. 6a)。おそらく非常に弱い相互作用であるため、用いたリガンド結合測定系では検出できていないと思われる。つまり、CXCR1受容体は活性型GPCRと不活性型GPCRの平衡が大きく不活性型GPCRの方へ偏っており、Gタンパク質の量が増えると平衡は活性型GPCRの方へシフトし、リガンドが結合できるCXCR1受容体量が増加すると考えられる。また、リガンド結合量により求めたCXCR1受容体の発現量はこの平衡における「リガンド・活性型GPCR」の量を示しており、構造をもつ全CXCR1受容体(活性型CXCR1と不活性型CXCR1)の量を示しているわけではない。

このように考えると、Gタンパク質をもたず、GPCRとGタンパク質の相互作用が構築されない大腸菌や酵母で発現したGPCRでリガンド結合が確認できるものは、Gタンパク質が存在しない状態でも活性型GPCRが十分存在する平衡をもっているものであると考えられる。GPCRの機能解析、構造解析を進めていくには、この平衡をコントロールすることが重要となってくる。

7. おわりに

GPCRの機能解析、構造解析を行うには、どのような状態(不活性型GPCR、活性型GPCR)のものをターゲットにするかが重要である。GPCRをただ単に精製しただけでは、Fig. 7のようなさまざまな平衡状態のものが存在している。また、精製の過程でGタンパク質が除かれていくと活性型GPCRの量が減少し、不活性型GPCRの量が増加する。今後は、精製過程の、または精製したGPCR中の不活性型GPCR、活性型GPCRの量を確認する方法の開発が重要となる。また、活性型GPCRの構造をとるような変異体、活性型GPCRの構造を維持する方法の開発が重要となる。そのためにはGPCRと相互作用するリガンド、Gタンパク質、その他抗体な

どのツールが必要であり、今後のこの分野の研究の発展に期待したい。

謝 辞

ここで示した著者の研究成果は、マックスプランク生物物理学研究所のHartmut Michel教授、Helmut Reiländer博士、キリンビール株式会社黒木良太博士(現原子力研究所)の協力のもとに出されたものであり、ここに感謝の意を表したい。

文 献

- 1) Baggiolini, M., Dewald, B. and Moser, B. (1997) *Ann. Rev. Immunol.* **15**, 675-705.
- 2) Mennicken, F., Maki, R., de Souza, E. B. and Quirion, R. (1999) *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 73-78.
- 3) Baggiolini, M. and Dahinden, C. A. (1994) *Immunol. Today* **15**, 127-133.
- 4) Horuk, R. (1994) *Immunol. Today* **15**, 169-174.
- 5) Richardson, R. M., DuBose, R., Ali, H., Thmhav, E., Haribabu, B. and Snyderman, R. (1995) *Biochemistry* **34**, 14193-14201.
- 6) Grissammer, R. and Tate, C. G. (1995) *Quarterly Reviews of Biophysics* **28**, 315-422.
- 7) Bouvier, M., Menard, L., Dennis, M. and Marullo, S. (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 522-527.
- 8) Grünewald, S., Reiländer, H. and Michel, H. (1996) *Biochemistry* **35**, 15162-15173.
- 9) Bertin, B., Freissmuth, M., Jockers, R., Strosberg, A. D. and Marullo, S. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8827-8831.
- 10) Molinari, P., Ambrosio, C., Riitano, D., Sbraccia, M., Gro, M. C. and Costa, T. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 15778-15788.
- 11) Cronan, J. E. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 10327-10333.
- 12) Lee, J., Horuk, R., Rice, G. C., Bennett, G. L., Camerato, T. and Wood, W. I. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 16283-16287.
- 13) Moser, B., Schumacher, C., Tschärner, V. V., Carl-Lewis, I. and Baggiolini, M. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 10666-10671.
- 14) Leopoldt, D., Harteneck, C. and Nurnberg, B. (1997) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **356**, 216-224.
- 15) Kleymann, G., Boege, F., Hahn, M., Hampe, W., Vasudevan, S. and Reiländer, H. (1993) *Eur. J. Biochem.* **213**, 797-804.
- 16) Mulheron, J. G., Casanas, S. J., Arthur, J. M., Garnovskaya, M. N., Gettys, T. W. and Raymond, J. R. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 12954-12962.
- 17) Boundy, V. A., Lu, L. and Molinoff, P. B. (1996) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **276**, 784-794.
- 18) Chidiac, P., Hebert, T. E., Valiquette, M., Dennis, M. and Bouvier, M. (1994) *Mol. Pharm.* **45**, 490-499.
- 19) Maeda, Y., Kuroki, R., Hasse, W., Michel, H. and Reiländer, H. (2004) *Eur. J. Biochem.* **271**, 1677-1689.
- 20) Cheng, Y. and Prusoff, W. H. (1973) *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099-3108.

前田宜丈

前田宜丈（まえだ よしたけ）

キリンビール株式会社医薬カンパニー医薬フロンティア研究所研究員

1996年九州大学大学院薬学研究科博士課程修了，博士（薬学）。同年キリンビール株式会社基盤技術研究所研究員，97-99年マックスプランク生物物理学研究所（ドイツ）特別研究員，00年キリンビール株式会社医薬カンパニー医薬探索研究所研究員，04年医薬フロンティア研究所研究員。

研究内容：タンパク質科学をベースとし，細胞の制御を試みています。

連絡先：〒370-1295 高崎市宮原町3

E-mail: ymaeda@kirin.co.jp