

インターロイキン23とインターロイキン23受容体の構造生物学的研究

1. はじめに

免疫応答の主要な担い手であるT細胞は、CD8陽性T細胞である細胞傷害性T細胞とCD4陽性T細胞であるヘルパーT(Th)細胞に大別される。Th細胞は、産生するサイトカインの種類により、1型(Th1)と2型(Th2)に分類され、各々細胞性免疫と液性免疫に関わる。免疫応答が適正に誘導されるには、抗原の種類に応じてT細胞が分化・活性化する必要がある。近年になり、IL-23の作用によりナイーブT細胞が炎症性サイトカインIL-17を産生するT細胞に直接分化することが報告され、Th17細胞と名付けられた(Harrington, 2005; Park, 2005)。その後の研究により、IL-23はTh17細胞の初期誘導に関わるのではなく、Th17細胞の成熟および増殖に関わることが明らかにされた。IL-23はp19とIL-12のp40サブユニットがジスルフィド結合したヘテロ二量体のサイトカインであり、樹上細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞から産生される(Oppmann, 2000)。IL-23受容体は、特異的なIL-23RとIL-12と共有されるIL-12Rβ1から構成される(Parham, 2002)。抗IL-23抗体を用いてIL-23と受容体の結合を阻害するとIL-17の産生が抑制され、炎症が鎮静化する。また、ヒトの腫瘍部位においてIL-23の発現が増加し、その結果、細胞傷害性T細胞の浸潤が抑制されることにより、腫瘍細胞が増殖する(Langowski, 2006)。IL-23とIL-23Rの結合阻害は、腫瘍部位において細胞傷害性T細胞の浸潤を促進することにより、免疫監視能力が上がり、腫瘍細胞の増殖を抑制する(Langowski, 2006)。さらにIL-23は、炎症性大腸炎・結腸炎・クローン病(Duerr, 2006; Hue, 2006; Kullberg, 2006)、乾癬(Lee, 2004)、敗血症性ショック(Belladonna, 2006)と深く関わっている。IL-23、IL-23RおよびIL-12Rβ1の構造は未知であり、認識機構も明らかにされていない。そこで、IL-23とIL-23受容体の認識機構を構造生物学的に解明することを計画した。

2. 方法および結果

IL-23の発現、精製、結晶化および結晶データの測定

ヒトIL-23は、p19とp40の2つのサブユニットがジスルフィド結合を介してヘテロ二量体を形成したサイトカインである。p19およびp40サブユニットを各々大腸菌を用いた発現系の構築を試みた。しかしながら、可溶性蛋白質を得ることが出来なかったため、大腸菌を用いてp19とp40の共発現系の構築を試みたが成功しなかった。そのため動物細胞を用いた発現系の構築を計画した伝子の改変を行い、動物細胞を用いた共発現系を構築して、複合体として一過的に分泌蛋白質として発現させた。p19は動物細胞において、単独では分泌されないことが知られており、分泌蛋白質として発現させるにはp40と共発現させ、p19とp40の複

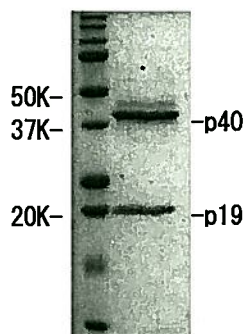


図1. IL-23 の SDS-PAGE



図2. IL-23 の結晶

合体を形成させる必要がある。そこで蛋白質のC末端にHis-tag修飾を行うように遺せた。その後、Niカラム・イオン交換クロマトグラフィー・ゲルろ過クロマトグラフィーなどを用いて精製を行い、1Lの培養液から0.4mgの均一な精製IL-23を得た(図1)。この精製蛋白質を濃縮した後、結晶化スクリーニングキットを用いて結晶化条件のスクリーニングを行った。その後、結晶化条件の精密化を行い、構造解析に適した結晶を得た(図2)。得られた結晶を用いてつくば市の高エネルギー加速器研究機構・放射光実験施設ビームラインNW-12Aに於いて回折実験を行い、2.6Å分解能までのデータを測定した。回折データの処理を行ったところ、データのRmergeは0.068であり、結晶は空間群P6, P61, P62, P63, P64, P65の何れかに属することが分かった。現在、構造解析を進めているところである。

IL-23Rの発現, 精製および結晶化

IL-23Rの細胞外領域のクローニングを行った後、His-tag修飾する様に遺伝子を改変し、大腸菌を用いて発現系の構築を行った。大量培養を行った後、Niカラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーにより粗精製を行った。その後、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーを用いて高純度に精製を行い、1Lあたり約5 mgの精製蛋白質を得た(図3)。この試料を濃縮した後、ハンプトン社やキアゲン社などの結晶化スクリーニングキットを用いて結晶化条件のスクリーニングを行い、微結晶を得た。現在、構造解析に適した結晶を得るために結晶化条件の最適化を行っているところである。

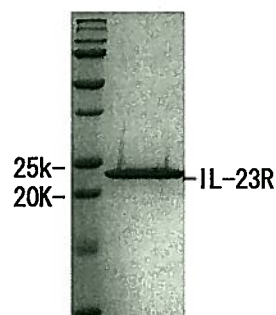


図3. IL-23R の SDS-PAGE

3. まとめ

炎症性疾患に関わるIL-23と特定の受容体であるIL-23Rの認識機構を構造生物学的に解明するために、IL-23とIL-23Rの発現および精製法を確立した。IL-23については、構造解析に適した結晶の調製も終わった。しかし残念ながら、IL-23の構造が2008年秋に2つのグループにより独立に解析され報告された(Beyer, 2008; Lupardus, 2008)。これらの報告されたものと我々が得ている結晶の空間群がことなるため結晶構造解析を行い、報告された構造との違いと明らかにする。また、IL-23Rについては微結晶を得ており、今後構造解析に適した結晶を得るために結晶化条件の精密化をさらに進める予定である。今後、IL-23/IL-23R複合体の調製および結晶化法の確立を行い、複合体の構造を明らかにすることによりIL-23とIL-23Rの認識機構を詳細に原子レベルで解明する予定である。IL-23が炎症性大腸炎・結腸炎・クローン病・乾癬・敗血症性ショックなどに深く関わっていることから、本研究により明らかになる認識機構が、これらの炎症性疾患に対する薬の開発の手掛かりとなることが期待される。

5. 参考文献

1. Harrington, L.E., et al. *Nature Immunology* 6, 1123-1132, 2005
2. Park, H., et al. *Nature Immunology* 6, 1133-1141, 2005
3. Oppmann, B., et al. *Immunity* 13, 75-715-725, 2000
4. Parham, C., J. *Immunol.* 168, 5699-5708, 2002
5. Langowski, J. L., et al. *Nature* 461-465, 2006
6. Duerr, R. H., et al. *Science* 314, 1461-1463, 2006
7. Hue, S., et al. *J. Exp. Med.* 203, 2473-2483, 2006
8. Kullberg, M. C., et al. *J. Exp. Med.* 203, 2485-2493, 2006
9. Lee, E., *J. Exp. Med.* 199, 125-130, 2004
10. Belladonna, M. L., et al. *Cytokine* 34, 161-169, 2006
11. Beyer, B. M., et al. *J. Mol. Biol.* 382, 942-955, 2008
12. Lupardus, P. J. & Garci, K. C. *J. Mol. Biol.* 382, 931-941, 2008