

## IL-23 と受容体の構造生物学的認識機構の解明

熊本大学大学院 生命科学研究部 機能分子構造解析分野  
池水 信二

### 1. はじめに

サイトカインは、免疫応答を司る主要な担い手であるT細胞を調節する重要な因子である。インターロイキン(IL)-12, IL-23およびIL-27は、4つのヘリックスからなるサブユニットとサイトカイン受容体様のドメインからなるヘテロ二量体サイトカインであり、IL-12ファミリーに分類される。IL-27は1型ヘルパーT(Th1)細胞の分化初期に関与して、IL-12はTh1細胞の維持・活性化に関わる。2005年になり、IL-23の作用によりナイーブヘルパー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-12R $\beta$ 1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-12R $\beta$ 1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。また、IL-12ファミリーのサイトカインと受容体の複合体の構造は明らかにされておらず、ヘテロ二量体サイトカインと受容体の結合様式を明らかにすることも目的の一つである。

### 2. 方法および結果

#### IL-23Rの発現、精製、および結合実験

IL-23Rはドメイン(D)1にイムノグロブリン(Ig)様ドメイン、D2およびD3に3型のフィブロネクチンドメインをもつ。IL-23Rのどの領域を介してIL-23と結合するのか明らかにされていなかったため、IL-23RのD1およびD2-D3の領域の調製を行った。IL-23R D1はGST融合タンパク質として大腸菌を用いて発現させた後、精製を行った。また、IL-23R D2-D3をチオレドキシシン融合タンパク質として大腸菌を用いて発現させた後、精製を行った。これらの精製したIL-23R D1またはD2-D3と既に調

製法を確立済みのIL-23を用いて結合実験を行い、IL-23RはD1の領域を介してIL-23Rと結合することを明らかにした。

#### WSX-1の発現、精製

IL-27の特異的受容体であるWSX-1のサイトカイン受容体ホモロジー領域であるD1-D2にHisタグを付加したコンストラクトを作成して大腸菌を用いて発現させた後、精製を行った。その結果、12Lの培養から約1.5mgのタンパク質を得た。精製したWSX-1を用いて現在結晶化条件の検索を行ったが結晶の成長が見られなかったため、現在はWSX-1 D1-D2を精製した後、メチル化修飾を行った試料を用いて結晶化条件の検索を行っているところである。

#### IL-27の発現、精製

IL-27はp28およびEBI3と呼ばれる2つのドメインからなり、IL-23同様、IL-12ファミリーに属するヘテロ二量体サイトカインである。IL-12およびIL-23は2つのドメインがジスルフィド結合を介して結合しているが、IL-27はジスルフィド結合を介さずに二量体を形成している。IL-27のp28は単独では発現できず、またEBI3は発現量が低かったため、大腸菌や動物細胞を用いた共発現を試みたが安定な状態の試料を得ることが出来なかった。そこで、p28とEBI3をリンカーで繋いだIL-27の発現コンストラクトを作成して、動物細胞で発現させた。タンパク質の構造生物学的研究にはミリグラムオーダーの試料をようするが、1Lの培養あたり数十マイクログラムオーダーの試料しか得ることが出来なかった。そこで、現在昆虫細胞の発現系を構築しているところである。

#### IL-27とWSX-1の結合実験

上記の方法により精製したIL-27（動物細胞で発現）とWSX-1を用いNative pageにより結合実験を行った（図）。その結果、WSX-1:IL-27が、1:0.5, 1:1, 1:1.5と変化するのに伴い、WSX-1のバンドが消失し、複合体のバンドが増加していた。この実験により、現在得られているIL-27とWSX-1が正常な構造を保ち、結合可能な試料であることが確認できた。

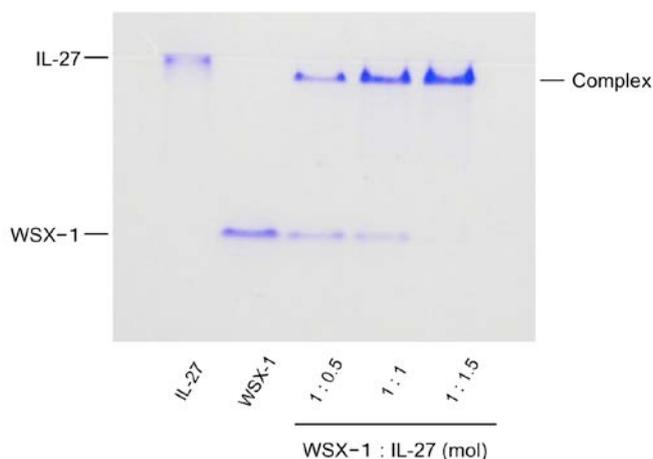


図. IL-27 と WSX-1 の結合実験

## 4. 考察 まとめ

炎症性疾患に関わるIL-23と特異的な受容体であるIL-23Rの認識機構を構造生物学的に解明するために、IL-23RがD1を介してIL-23と結合することを明らかにした。今後、IL-23/IL-23R D1複

合体の調製および結晶化を行い、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したい。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。

また、Th1細胞の分化初期に関わるIL-27と特異的受容体WSX-1の調製を行い、現在得られている試料が結合可能であることを確認した。現在のIL-27は収量が少ないため昆虫細胞を用いた発現系に移行して、より高収量の発現系を構築した後、IL-27とWSX-1の複合体の構造解析を行うことにより、これらのタンパク質の認識機構を原子レベルで解明していきたい。

## 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