

2012A6703

BL44XU

CD200-CD200R 複合体の結晶構造解析 Crystal Structure of the CD200/CD200R Complex

四郎園 巧^a、崎山 竜人^a、池鯉鮒 麻美^a、小島 利之^b、烏山 一^b、池水 信二^a
Takumi Shirouzono^a, Ryuto Sakiyama^a, Mami Chirifu^a, Toshiyuki Kojima^b, Hajime Karasuyama^b,
Shinji Ikemizu^a

^a熊本大学、^b東京医科歯科大学

^a Kumamoto University, ^b Tokyo Medical and Dental University

CD200 は幅広い種類の細胞上で発現しており、骨髄細胞上の阻害型受容体 CD200R (マウスでは CD200R1) との結合を介して骨髄細胞を抑制的に制御する。この抑制機構の構造生物学的解明を目的として、マウスの CD200-CD200R1 複合体の結晶構造解析を 2.7 Å 分解能で行った。解析の結果、正に荷電した CD200 のドメイン 1 と負に荷電した CD200R1 のドメイン 1 が静電相互作用により複合体を形成することが明らかになった。

キーワード： CD200-CD200R 複合体、分子認識、結晶構造

背景と研究目的：

リガンドである CD200 は様々な細胞上に発現し、骨髄細胞上の CD200 受容体(R)と結合することにより、免疫応答を制御する。マウスにおける CD200R は、阻害型が CD200R1 の 1 種類、活性化型が CD200R2-5 の 4 種類存在する。CD200 および CD200R は細胞表面受容体に分類され、アミノ酸配列から Immunoglobulin (Ig) V-set からなるドメイン (D) 1 と Ig C2-set からなる D2 からなる細胞外領域を持つことが予想されている。CD200R1 は CD200 と結合するが、CD200R2-4 はいずれも CD200 とは結合せず、これらのリガンドは明らかにされていない[1]。ヘルペスウイルスやポックスウイルスの中には宿主の CD200 とアミノ酸配列の相同性の高い CD200 様分子を持ち、これらのウイルス CD200 が宿主の骨髄細胞上の阻害型受容体 CD200R1 と結合し、免疫を抑制的に制御する [2,3]。この免疫抑制機構を構造生物学的に解明することを目的として、CD200-CD200R1 複合体の構造解析を行った。

実験：

α mannosidase 阻害薬 kifunesine の存在下で、CD200 と CD200R1 の両分子の C 末端側に His タグを付加して、HEK293T 細胞を用いた共発現により複合体として発現させた。Ni カラムを用い

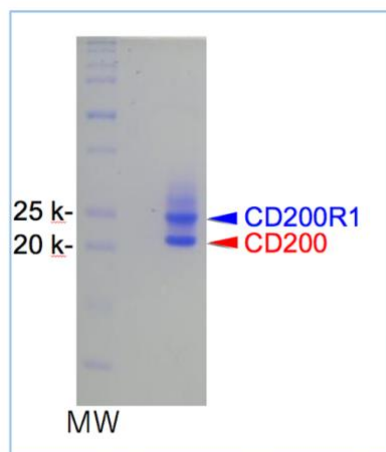


図 1 : CD200-CD200R 複合体の結晶化試料。

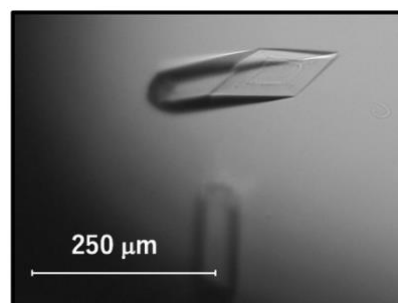


図 2 : CD200-CD200R 複合体結晶。

表 1 : CD200-CD200R 複合体結晶。

	CD200 - CD200R1	CD200 - CD200R1 Pt
Data collection		
Space group	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2
Unit cell parameters		
a=b (Å) / c (Å)	126.97 / 114.98	125.6 / 114.58
Resolution range (Å)	30.0 - 2.70	30.0 - 3.5
Wavelength (Å)	1.100	1.0712
Completeness (%)	98.3 (88.4)	97.4 (92.3)
R _{merge} (%)	13.0 (49.0)	13.3 (45.9)
<I / sigmaI>	18.2 (2.0)	12.1 (1.8)
Refinement		
R _{cryst} / R _{free} (%)	21.7/27.5	
R.m.s.d in bonds (Å)	0.009	
R.m.s.d in angles (°)	1.501	
Ramachandran plot		
Most favored (%)	86.0	
Additional allowed (%)	14.0	

て精製を行なった後、Endo F1 を用いて Asn に結合した N-アセチルグルコサミン 1 残基を残して糖鎖を切除した。その後、イオン交換カラムやゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製を行なった。精製した試料が CD200-CD200R1 複合体であることを SDS-PAGE により確認し (図 1)、結晶化を行なった (図 2)。SPRING-8 BL44XU において得られた結晶の回折実験を行い、結晶がタンパク質の結晶であることを確認したが、分解能が 6-8 Å と低く、解析に至らなかった。結晶化条件の精密化して、0.1 M Imidazole pH 7.5、0.2 M Lithium sulfate、5 % (w/v) PEG3350 の条件下で成長させた結晶を用いて、PF BL-1A において 2.7 Å 分解能までのデータを収集した。HKL2000 を用いてデータ処理を行なった結果、CD200-CD200R1 複合体結晶の空間群は P4₁22 であり、解説強度データの R_{merge} は 13.0% であった (表 1)。さらに、20 mM K₂PtCl₄ の存在下で誘導体結晶を調製し、3.5 Å 分解能までの回折強度データを PF BL-1A において収集した。SAD 法により 3.5 Å 分解能で位相を付けて、2.7 Å 分解能まで位相拡張を行った後、モデルの構築を行なった。Phenix を用いて R_{cryst} が 0.217、R_{free} が 0.275 まで精密化を行った。

結果と考察：

構造解析の結果、CD200 及び CD200R1 は、Ig V-set からなる D1 と Ig C1-set から D2 からなることが明らかになった。一般的に Ig C1-set を持つタンパク質は抗原認識に直接関わる抗体、MHC、T 細胞受容体などであり、細胞表面受容体は Ig C1-set を持たない。細胞表面受容体で Ig C1-set を持つことが初めて明らかにされた分子は補助刺激分子 B7-1 であり [4]、CD200 は限定的ではあるがアミノ酸レベルで B7-1 と相同性がある分子として同定された [5]。CD200 と CD200R1 は、N 末端の Ig V ドメインを介して複合体を形成することが明らかになった (図 3)。これらの分子の結合親和力は $K_d = 0.6 \mu\text{M}$ と非常に強く [6]、正に荷電した CD200 と負に荷電した CD200R1 が静電相互作用により複合体を形成するためであることが分かった (図 4)。我々が構造解析を終えるとほぼ同時に Oxford のグループからこの複合体の構造が報告され、彼らの結晶は我々の結晶と同型であり、その構造は我々のものとほぼ同一であった [6]。

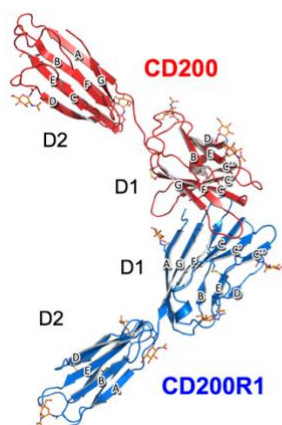


図 3 : CD200-CD200R 複合体の構造。

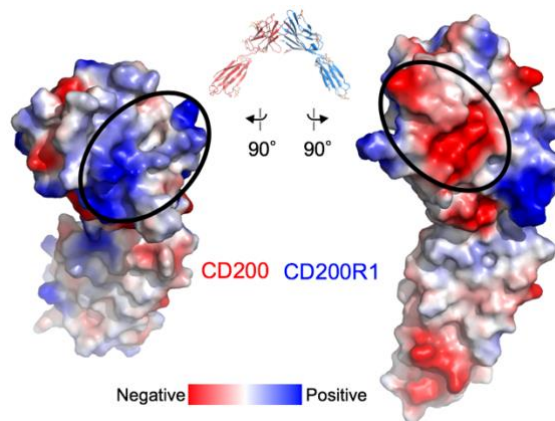


図 4 : 静電ポテンシャル

今後の課題：

CD200-CD200R1 複合体の構造解析に成功し、CD200 と CD200R1 の分子認識機構を構造生物学的に解明した。今後、近年 CD200R1 のリガンドとして同定された iSEC1 [7] と CD200R1 の認識機構の解明を構造生物学的に行いたい。

謝辞：

本研究におけるデータ測定は PF BL-1A 及び PFAR-NW12A (課題番号：12G721)、SPRING-8 BL44XU (課題番号：2012A6703)で行った。これらのビームラインスタッフに感謝致します。

参考文献：

- [1] Wright, G. J. *et al. J. Immunol.* **171**, 3034-3046 (2003).
- [2] Shiratori, I. *et al. J. Immunol.* **175**, 4441-4449 (2005).
- [3] Cameron, C. M., *et al. J. Virol.* **79**, 6052-6067 (2005).
- [4] Ikemizu, S., *et al. Immunity* **12**, 51-60 (2000).
- [5] Borriello, F., *et al. J. Immunol.* **158**, 4548-4554 (1997).
- [6] Hatherley, D., *et al. Structure* **21**, 820-832 (2013).
- [7] Kojima, T., *et al. Sci. Rep.* **6**, 36457 (2016).

©JASRI

(Received: September 28, 2018; Early edition: December 26, 2018;

Accepted: December 17, 2018; Published: January 25, 2019)