

# 糖鎖修飾型ヒトインターロイキン・23 の 結晶構造解析

分子機能薬学専攻 機能分子構造解析学分野 四郎園 巧

インターロイキン (IL)-12 ファミリーは、ヘテロ二量体を形成するサイトカインであり、T 細胞の分化、増殖、生存に関与している。IL-12 ファミリーに属する IL-23 は、p19 および IL-12 の p40 サブユニットがジスルフィド結合によって架橋された分子量約 60 k の糖タンパク質である。p19 はヒトゲノムデータベースを基にした IL-6 類似タンパク質検索の結果発見された 169 アミノ酸残基から成るタンパク質であり、4 本の  $\alpha$ -ヘリックスから成る four helix bundle 構造を有する。一方 IL-12 と共有されている p40 は、306 アミノ酸残基からなるタンパク質であり、2 箇所の N 型糖鎖修飾部位を持つことが予想される。また、N 末端側から 1 つのイムノグロブリン様ドメイン、および cytokine binding homology region を形成する 2 つのフィブロネクチン III 型ドメインで構成される。IL-23 の受容体は、特異的な IL-23 受容体 (IL-23R) と IL-12 と共有される IL-12R $\beta$ 1 から構成され、IL-23/IL-23R/IL-12R $\beta$ 1 複合体を形成することによりシグナルが伝達される。

IL-23 は当初、ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞から、炎症性サイトカイン IL-17 を産生し、炎症性自己免疫疾患に関与するヘルパー T (Th) 17 細胞への分化に必要なサイトカインであると考えられた。しかしながらその後の研究により、IL-23 は Th17 細胞の分化には影響せず、活性化・増殖・生存に関与することが明らかにされた。また、p19 および p40 ノックアウトマウスを用いた実験より、IL-23 は実験的自己免疫性脳脊髄炎や炎症性腸疾患などの自己免疫疾患を誘導することが明らかにされている。さらに、癌病巣部位では IL-23 の発現が上昇しており、IL-23 の産生亢進は、細胞障害性 T 細胞の腫瘍病巣部位への浸潤および細胞障害活性を阻害する。このように IL-23 は免疫監視能を低下させるため、癌細胞は抗腫瘍免疫から逃れて増殖する。上記の理由から、IL-23 は自己免疫疾患や癌に対する治療薬のターゲットとして注目されている。そこで、IL-23 とその受容体との複合体の立体構造・認識機構を解明し、IL-23 を標的とした薬

の開発を目指して、ヒト (h)IL-23 の構造生物学的知見を得ることを目的として先ず hIL-23 単独の X 線結晶構造解析に着手した。

hIL-23 は、N-acetylglucosaminyltransferase-I を欠損した 293S GnTI<sup>-</sup> 細胞を用いて高マンノース型糖鎖を有する糖タンパク質として発現させた後、精製・結晶化を行った。得られた結晶を用いて放射光実験施設のビームライン NW12A において X 線回折実験を行い、2.6 Å 分解能までのデータを収集した。我々が構造解析に着手した際、酵素により糖鎖を切除した糖鎖除去型 hIL-23 および遺伝子改変により糖鎖付加を抑制した hIL-23 の結晶構造が 2 つの独立したグループにより報告された。そのため、得られたデータを用いて、糖鎖除去型 hIL-23 の構造を用いた分子置換法により糖鎖修飾型 hIL-23 の結晶構造を明らかにした。hIL-23 は、p19 が p40 のドメイン 2 と 3 から形成される領域を介して結合していた。今回明らかにした構造では、p40 は 1 箇所の N 型糖鎖修飾を受けており、2 つの N-アセチルグルコサミン、1 つの β-マンノース、2 つの α-マンノースから成る糖鎖の構造を決定した。この糖鎖は、他の糖鎖除去型 hIL-23 の構造に比べて p40 のドメイン 1 および 2 の残基と、より多くの相互作用を形成しているため、ドメイン 1 の配向の違いに影響を与えていた。IL-12 との構造比較では、p19 と IL-12 のサブユニットである p35 のアミノ酸配列の相同性が約 15% と低いにも関わらず、p19 と p35 は p40 のほぼ同じ領域を介して結合していた。また、IL-12 の p35 において p40 との結合に重要であるアルギニンが p19 においても保存されており、共に結合面の中心に位置していた。さらにこのアルギニンは、同じ IL-12 ファミリーに属する IL-27 のサブユニットである p28 においても保存されており、p40 と類似の EBI3 とのヘテロ二量体形成に重要であることが予想された。従って、結合面の中心に位置するアルギニンは、二量体サイトカインである IL-12 ファミリーにおいて、二量体を形成するための鍵となる残基であることが示唆された。

本研究では hIL-23 の結晶構造解析により、p19 と p40 の結合様式のみならず、IL-12 ファミリーに属するサイトカインの二量体形成様式に関する構造学的基盤を得ることに成功した。また、IL-23 単独の結晶構造から IL-23 シグナル伝達複合体のモデルを提唱した。本研究により得られた知見は、IL-23 を標的とした治療薬開発の足がかりとなる基礎的知見を提供するものであると考えられる。