



Title	Structural Analysis of Ligand-Binding Domains of Mouse and Rat SHPS-1
Author(s)	永田, 明希
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47704
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	なが 永 田 あ 明 き 希
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 2 0 6 7 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 9 月 27 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科高分子科学専攻
学 位 論 文 名	Structural Analysis of Ligand-Binding Domains of Mouse and Rat SHPS-1 (マウスおよびラット由来 SHPS-1 のリガンド結合ドメインの構造解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 中 川 敦 史 (副査) 教 授 青 島 貞 人 教 授 後 藤 祐 児 教 授 岡 田 雅 人 助教授 鈴木 守

論 文 内 容 の 要 旨

膜蛋白質 SHPS-1 (SHP substrate-1) は細胞外領域で膜蛋白質 CD47 と細胞間相互作用をし、細胞運動や食食など免疫系・神経系で重要な役割を果たす。

SHPS-1 は細胞外領域に 3 つの免疫グロブリン様 (Ig) ドメインを持ち、Ig スーパーファミリー (IgSF) に属する。さらに SHPS-1 は SIRP ファミリーに分類されるが、SIRP ファミリーに分類される蛋白質としては SHPS-1 以外に SIRP β 、SIRP γ などが知られている。SIRP ファミリーはメンバー間での CD47 に対する親和性が異なり、SHPS-1/CD47 の親和性に比べ SIRP γ は CD47 と弱く相互作用し、SIRP β は CD47 とは相互作用しないとされている。SHPS-1 と CD47 の相互作用は種間での交差反応に制限が見られるが、マウス-ラット間ではその相互作用領域は保存されていると考えられる。

本研究では SHPS-1 と CD47 の相互作用や SIRP ファミリーメンバー間での CD47 への親和性の差について分子レベルでの知見を得ることを目的とし、マウスおよびラット由来の SHPS-1 の N 末端 Ig ドメイン即ちリガンド (CD47) 結合ドメインについて X 線結晶構造解析を行った。

マウス・ラット SHPS-1 のリガンド結合ドメインは、X 線結晶構造解析により β サンドウィッチ構造をした Ig fold を持つことが明らかになった。マウス・ラット SHPS-1 は一次配列から Ig fold の中で V-set に属すると予測されていたが結晶構造のトポロジーからは I2-set に分類された。一方、立体構造は V-set の Ig ドメインに近いことが分かり I2-/V-set の両方の性質を持つことが示された。

IgSF の中には二量体形成が細胞間相互作用に必須のものもある。マウスおよびラット由来の SHPS-1 はいずれも結晶中で二量体を形成していた。そこでこの二量体構造が生体内で存在する可能性を調べるためにまず溶液中での会合形成について検討した。超遠心沈降平衡法、X 線小角散乱、ゲルろ過によって調べた結果、ゲルろ過によってのみ単量体・二量体の平衡状態が観察され、それ以外の実験では溶液中では優位に単量体で存在することが明らかになった。

SHPS-1 と CD47 の相互作用について表面プラズモン共鳴法によって検討したところ、マウスおよびラット由来の SHPS-1 はマウス CD47 に対して特異的に相互作用するが、マウス SIRP β B-type では特異的な相互作用を示さなかった。またマウスおよびラット由来の SHPS-1 とマウス SIRP β B-type、SIRP β 1 の一次配列を比較すると N 末

と C 末の領域に変異が集中しており、それらの変異は分子表面に存在していた。N 末・C 末変異体をそれぞれ作製し同様の方法でマウス CD47 に対して相互作用を調べた結果、N 末変異体では天然型マウスおよびラット由来の SHPS-1 のレスポンスとの差異がなかったが C 末変異体ではレスポンスが減少した。以上の結果から SHPS-1/CD47 の相互作用や SHPS-1 と SIRP β での CD47 に対する親和性の違いは C 末領域に見出された残基が関与していることが示唆された。

以上をまとめると、本研究ではマウスおよびラット由来 SHPS-1 のリガンド結合ドメインの結晶構造を明らかにした。溶液中ではマウスおよびラット由来 SHPS-1 のリガンド結合ドメインは単量体が優位に存在することを示した。また SHPS-1 と CD47 との細胞間相互作用や SIRP β との CD47 に対する親和性の違いには SHPS-1 の C 末端の領域が関与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

膜タンパク質 SHPS-1 (SHP substrate-1) は細胞外領域で膜タンパク質 CD47 と細胞間相互作用をし、細胞運動や食食など免疫系・神経系で重要な役割を果たすことが知られている。SHPS-1 は細胞外領域に 3 つの免疫グロブリン様 (Ig) ドメインを持ち、Ig スーパーファミリー (IgSF) に属し、さらに SIRP ファミリーに分類される。同じ SIRP ファミリーにタンパク質としては SIRP β 、SIRP γ などが同定されているが、SIRP ファミリーはメンバー間での CD47 に対する親和性が大きく異なることが知られている。

本研究では SHPS-1 と CD47 の相互作用や SIRP ファミリーメンバー間での CD47 への親和性の差について分子レベルでの知見を得ることを目的とし、マウスおよびラット由来の SHPS-1 の N 末端 Ig ドメイン (リガンド (CD47) 結合ドメイン) について X 線結晶構造解析法によりその立体構造を決定した。

マウス由来、ラット由来ともに結晶中に二量体構造が見られたが、超遠心沈降平衡法、X 線小角散乱、ゲルろ過により溶液中での会合状態を調べたところ、溶液中では単量体が優位に存在することを明らかにした。

また、表面プラズモン共鳴法により SHPS-1 と CD47 の相互作用を調べ、SIRP β 、SIRP γ などの一次配列との比較の結果と合わせて、SHPS-1/CD47 の相互作用や SHPS-1 と SIRP β における CD47 に対する親和性の違いに C 末領域のアミノ酸残基が関与していることを示した。さらに、これらの結果に基づいて、SHPS-1 と基質 CD47 の相互作用機構と、SIRP ファミリーにおける基質特異性を構造面から明らかにした。

これらの成果は、SHPS-1 および SIRP ファミリータンパク質が細胞間相互作用に寄与する時の分子間相互作用に関する重要な知見を与えるものであり、よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。