

29【P1】 I -076

血小板コラーゲンレセプターGlycoprotein VI のリガンド認識機構の解明

○赤澤 大輔¹, 高橋 栄夫², 嶋田 一夫^{2,3}(JBIC・生物情報解析研セ,²産総研・生物情報解析研セ,³東大院薬)

【目的】 Glycoprotein VI (GPVI) は 1 回膜貫通型の血小板コラーゲンレセプターである。GPVI は血管内皮損傷部位に露出したコラーゲンと結合すると Fc レセプター γ 鎖と相互作用して血小板の活性化に関与する。近年、この分子をターゲットとした創薬の可能性も示唆されている。GPVI-コラーゲン相互作用を立体構造の観点から解析することは、アンタゴニスト探索においても重要な情報となり得る。本研究では、NMR の手法を用いた GPVI-リガンド相互作用部位の立体構造解析を目指し、まずリコンビナントヒト GPVI の大量発現系の構築と、リガンドである collagen-like peptides を作製し、相互作用解析を行った。【方法】 CMK cells よりクローニングしたヒト GPVI cDNA をもとにコンストラクトを作製し、2つの細胞外 Ig-like domain を含むタンパク質を E. coli で発現させて、不溶性画分より refolding を行った。精製したタンパク質 (rhHisD1D2) と GPVI 特異的リガンド crosslinked CRP (CRP-XL) との affinity は SPR にて確認した。また、既報に従い collagen type III の Cys-rich domain を C 末端に繋いだポリペプチド (GPP)_{10Cys₂} および (GPO)_{10Cys₂} (O は hydroxyproline) の homo trimer を作製した。【結果・考察】 rhHisD1D2 の E. coli での発現精製系を確立した。作製した (GPP)_{10Cys₂} および (GPO)_{10Cys₂} は均一な homo trimer であり、安定な collagenous triple helical 構造を有した。rhHisD1D2 は CRP-XL および (GPO)_{10Cys₂} には affinity を示すが、(GPP)_{10Cys₂} では認められなかった。また、rhHisD1D2 の CRP-XL への結合は (GPO)_{10Cys₂} の添加で阻害傾向を示した。このことから、GPVI は GPO の繰り返し配列を認識し、結合にはコラーゲンの架橋構造は必ずしも必要ないことが示唆された。現在、これらを用い、NMR による構造解析・相互作用解析を進めている。