

合成二価型リガンドを用いた CXCR4 二量体構造の解析研究

(¹東京医歯大・生材研、²東京医歯大・疾患生命研) 田中 智博¹、野村 渉¹、鳴海 哲夫¹、
玉村 啓和^{1,2}

【背景】

CXCR4 は G 蛋白質共役型受容体(GPCR)ファミリーに属するケモカイン受容体である。CXCR4 はエイズやがん転移、関節リウマチなど多くの難治性疾患に関わっていることが知られており、魅力的な創薬標的の一つである。近年、多くの研究から CXCR4 の多様な生理活性はホモ-及びヘテロ-二量体化により制御されていることが示唆されている。しかしながら、生細胞中における天然の CXCR4 二量体の構造や生理学的意義に関しては未だに解明されていない部分が多い。そこで、本研究では CXCR4 二量体を標的とした新規二価型リガンドを合成し、CXCR4 二量体の構造の解析研究を行った。

【方法】

以前、我々は強力な CXCR4 アンタゴニスト FC131 を開発している。そこで、この FC131 を種々の長さのリンカーで架橋した二価型 FC131 誘導体を合成・設計した。リンカーには一定の長さを有する安定なロッド構造を有するポリプロリン(PP)リンカーを選択し、また、PEG 修飾型ポリプロリン(PEG-PP)リンカーも併せて合成することで、リンカー構造の柔軟性が CXCR4 との結合に与える影響も同時に検討した(Figure 1)。合成した種々の鎖長を有する二価型 FC131 誘導体の結合活性を CXCR4 の内因性リガンドである [¹²⁵I]-SDF-1 α との競合阻害実験により評価した。

【結果・考察】

これらの合成した 15 種の二価型 FC131 誘導体はリンカーの性質に関わらず、リンカー長がある範囲の時に高い CXCR4 結合活性を示した。これらの結果は CXCR4 二量体における FC131 結合サイトの距離を示していると考えられ (Figure 2) 今後の CXCR4 二量体構造解明や二価型リガンドの創製に有用な知見を与えるものである。

【参考文献】

1. Babcock, G. J.; Farzan, M and Sodroski, J. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 3378–3385.
2. Handl, H. L.; Sankaranarayanan, R.; Josan, J. S.; Vagner, J.; Mash, E.; Gillies, R. J and Hruby, V. J. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1101–1109.
3. Daniels, D. J.; Lenard, N. R.; Etienne, C. L.; Law, P.; Roerig, S. C. and Portoghese, P. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 19208–19213.

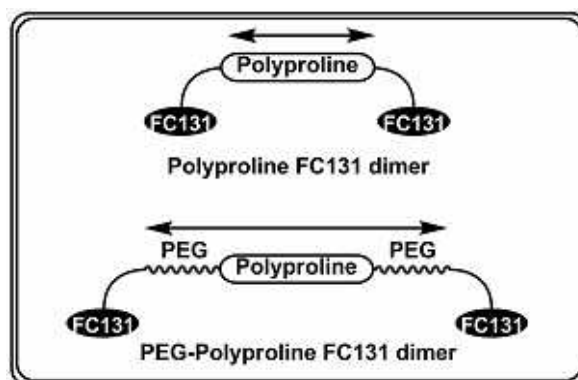


Figure 1. ポリプロリン及び PEG 修飾型ポリプロリン FC131 二量体の構造

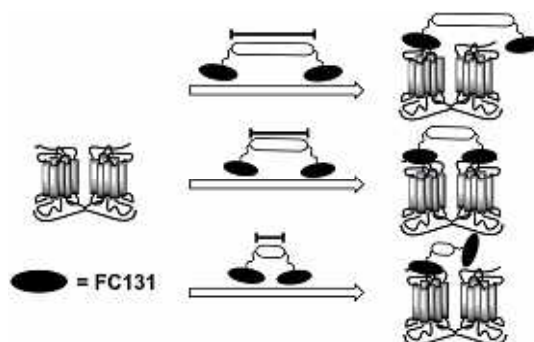


Figure 2. CXCR4 二量体と二価型リガンドとの結合の模式図

Chemical biology approach utilizing novel bivalent ligands for GPCR CXCR4 leads to the elucidation of a dimeric structure

Tomohiro Tanaka^{1*}, Wataru Nomura¹, Tetsuo Narumi¹, Hirokazu Tamamura^{1,2}

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, ²School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University

The chemokine receptor CXCR4 is a membrane protein, which belongs to the G-protein coupled receptor (GPCR) family. Interaction of CXCR4 with its endogenous ligand, stromal-cell derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12, induces various physiological functions: chemotaxis, angiogenesis, neurogenesis, *etc.* in an embryonic stage. On the other hand, CXCR4 is relevant to multiple diseases: AIDS, cancer metastasis, progression of leukemia, rheumatoid arthritis, *etc.* in adulthood. Recent studies have indicated a pivotal role of homo- and hetero-oligomerization of CXCR4 in cancer metastasis.

These studies were mostly performed with BRET analysis. The results indicated the limitation of this method in the elucidation of the native state of receptors in living cells because of the conformational or functional changes due to the mutations.

Estimation of the precise distance between receptors in a dimer form will bring us the efficient development of bivalent ligands of GPCRs, which have advantages in binding affinity and specificity. However, challenges in design of bivalent ligands have showed its difficulty because of the unclearness in dimeric forms of GPCRs. Therefore, there is an increasing demand for a novel strategy for this analysis.

In this study, we designed and synthesized novel CXCR4 bivalent ligands with two FC131 analogues [*cyclo*-(D-Tyr-Arg-Arg-Nal-D-Cys-)] (Nal = L-3-(2-naphthyl)alanine) connected by a polyproline or a PEGylated polyproline linker. A cyclic pentapeptide FC131 [*cyclo*-(D-Tyr-Arg-Arg-Nal-Gly-)] was previously found as a potent CXCR4 antagonist. The linkers were expected to sustain a certain constant distance between the ligands. Our bivalent ligands with various linkers were applied to measure the distance between two binding sites of ligands in CXCR4 dimers.

Here, we present experimental results concerning the native state of CXCR4 dimer utilizing our bivalent ligands, leading to a clear comprehension of the precise structure. This approach could be utilized to other GPCRs as a molecular measure in design of bivalent ligands. Furthermore, an application of fluorescent-labeled bivalent ligands to cancer diagnosis will be discussed.