

学位論文
Doctor's Thesis

論文名：単球走化因子S19リボソーム蛋白二量体のC5aレセプターに
対するアゴニストおよびアンタゴニスト作用部位の同定
(Identification of agonistic and antagonistic moieties to C5a receptor of
monocyte chemotactic S19 ribosomal protein dimer in leukocyte chemotaxis)

著者名：塩川 徳
Megumi Shiokawa

指導教官名：整形外科学講座教授
高木 克公

分子病理学講座教授
山本 哲郎

審査委員名：病理学第一講座担当教授	吉永 秀
病理学第二講座担当教授	竹屋 元裕
生化学第二講座担当教授	堀内 正公
造血発生分野 担当教授	須田 年生

2002年3月

目 次

①要 旨	4
②発表論文リスト	11
③謝 辞	13
④略語一覧	15
⑤研究の背景と目的	17
⑥実験方法	27
I) 実験材料	28
II) オリゴヌクレオチド	29
III) 実験方法	
III-1) S19 リボゾーム蛋白（野生型および変異型 RPS19）の調製	30
III-2) RPS19 二量体の調製	32
III-3) アナログペプチドの作成	32
III-4) ドデシル硫酸ナトリウム加ポリアクリル アミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）	33
III-5) 走化活性測定法	33
II-5-1) 白血球細胞の調製	
II-5-2) マルチウェルチャンバー法	
⑦結 果	37
1) 単球 C5a レセプターに対する RPS19 二量体の第 1 結合部位の同定	38

1-1) 塩基性クラスター部位を変異させた RPS19 二量体の単球に対する	
走化性	38
1-2) 塩基性クラスター部アナログペプチドによる RPS19 二量体の走化	
活性の抑制	40
1-3) RPS19 二量体塩基性クラスター部アナログペプチドによる C5a 惹起の	
単球走化活性の抑制	42
1-4) 塩基性クラスターアナログペプチド自身の C5a レセプター活性の欠除	42
2) 単球 C5a レセプターに対する RPS19 二量体の第 2 結合部位の同定	
2-1) -Leu131-Asp132-Arg133-部位を変異させた変異型 RPS19 二量体の単球	
走化活性	44
2-2) -Leu131-Asp132-Arg133-部位を含む RPS19 アナログペプチド	
の単球走化性	48
2-3) -Leu131-Asp132-Arg133-部位を含む RPS19 アナログペプチドと	
RPS19 二量体との単球走化性に関する競合阻害	48
2-4) C5a レセプターアンタゴニストによる-Leu131-Asp132-Arg133-部位を含むア	
ナログペプチドの単球走化性の阻害	50
3) RPS19 二量体の多核白血球 C5a レセプターに対するアンタゴニスト作用部位の同定	
3-1) RPS19 二量体第 2 リガンドアナログペプチドの細胞選択的白血球走化性	
(C5a アナログペプチドとの比較)	53
3-2) RPS19 二量体第 2 リガンドアナログペプチドの多核白血球 C5a	
レセプターに対するアンタゴニスト効果	53
3-3) C5a アナログペプチドに RPS19 の C 末端領域を接続したキメラペ	
プチド(YSFKDMQLDRIAGQVAAAKKH)による細胞選択的白血球走化性	56

3-4) キメラペプチドの多核白血球 C5a レセプターに対するアンタゴ ニスト効果	56
3-5) C 末端 2 残基欠損キメラペプチド (YSFKDMLDRIAGQVAAANK) の細胞選択性の喪失	58
3-6) C 末端部位欠損の変異型 RPS19 二量体の細胞選択性の喪失	60
⑧ 考 察	63
⑨ 結 語	70
⑩ 参考文献	72

①要 旨

【背景と目的】

蛋白合成装置リボソームの構成成分である S19 リボソーム蛋白 (RPS19) がトランスグルタミナーゼの作用により架橋二量体化されると、単球特異的な走化活性を呈することがすでに当講座から報告され、更に RPS19 二量体は単球の C5a レセプター (C5aR) に結合して遊走活性を発現させることがすでに報告されている [1,5,6]。RPS19 は 145 アミノ酸残基、C5a は 74 アミノ酸残基であり両者間では分子量も異なり、またアミノ酸配列上の相同性も計算上 4% と低いのだが、今回私は RPS19 二量体の C5aR への結合様式は C5a と C5aR へのそれと同様であるとの仮説を立て、その実験的検証を試みた。

C5a の C5aR への結合様式は 2 段階様式であると報告されており、その 2 段階目において、7 回膜貫通性で G 蛋白依存性である C5aR の活性化が生じ、白血球の遊走が惹起される。そしてこの C5a の C5aR に対する 2 つの結合部位もすでに同定されている。これらの情報に基づき RPS19 二量体分子上の C5aR への 2 箇所の結合部位を推定した。

第 1 結合部位については、C5a の場合は His15、Arg46、Lys49 の 3 残基で立体的に形成される塩基性クラスター部位がそれであるとされている。RPS19 の場合は、ヘパリンカラムへの結合部位の同定の際に 2 つの塩基性クラスター部位が確認されているので、そのどちらかが第 1 結合部であろうと予想した。C5aR の活性化をひき起こす第 2 結合部位は、C5a の場合は C 末端部位-Leu72-Gly73-Arg74-COOH であるが、この部位と RPS19 の C 末端部位のアミノ酸配列-Lys143-Lys144-His145-COOH は全く相違している。そこで私は RPS19 分子の-Leu131-Asp132-Arg133-部分に着眼した。この配列は Leu と Arg の側鎖が C5a の C 末端-Leu72-Gly73-Arg74-と同様の位置関係にある。もし、RPS19 の Asp132 の側鎖の β -カルボキシル基が C5a の C 末端である Arg74 の α -カルボキシル基の代用をするならば、この部位は C5aR の活性化をひき起こす第 2 リガ

ンドとして考えられうる。私は、これらの仮説を実証するために、部位特異的変異 RPS19 二量体および RSP19 の各部のアナログペプチドを用いて実験を行った。

ところで、C5a と比較した時の RPS19 二量体の特徴として、単球の C5aR にはアゴニストとして作用するが多核白血球の C5aR に対してはアンタゴニストとして作用するという細選択性の走化性を持つ [1,5]。幸運なことに、私が想定した C5aR への第 2 結合部位-Leu-Asp-Arg-を含む C 末端近傍のアナログペプチドは、RPS19 二量体と同様に単球特異的な走化活性を示した。そこで、このペプチドの配列の中に多核白血球の C5aR に対してアンタゴニストとして作用する部位が存在すると考え、C5a アナログペプチドと RPS19 二量体の C 末端部位をつないだキメラペプチド、およびそのキメラペプチドの C 末端を順次削除したペプチド、そして部位特異的変異 RPS19 二量体を用いてその部位の同定を行った。

【研究結果】

1. 第 1 結合部位の候補である 2 ケ所の塩基性クラスター、Lys23~Lys29 および Lys38~Lys43 の両者について、塩基性アミノ酸をすべて Ala 残基に変異させた変異 RPS19 二量体は後者だけが単球の走化性を優位に減少させた。また、この 2 種類の塩基性クラスター部と相同な配列を持つアナログペプチド（14 アミノ酸残基からなる）のうち、Lys38~Lys43 に対応する配列を含むペプチドのみが RPS19 二量体による単球走化性を抑制した。しかし、このペプチド自体には走化性を認めなかった。またこのペプチドは、C5a による走化性は抑制したが、C5aR とは異なるレセプターに結合して単球を走化させるフォルミル化ペプチド (f-MLF) の作用は抑制しなかった。
2. C5aR への第 2 結合部位候補である-Leu131-Asp132-Arg133-部位のいずれかを変異させた RPS19 二量体では、単球に対する走化性がいずれの場合にも減少した。

-Leu131-Asp132-Arg133-の配列を含む 18 残基からなる合成アナログペプチドは単球に対して走化活性を示した。また、このペプチドの Asp132 に相当する残基を Gly132 に変異させた場合、このペプチドは単球の走化活性をほぼ喪失した。合成ペプチドの単球に対する走化作用については、合成 C5aR アンタゴニストの共存により濃度依存性に抑制された。単球をあらかじめこの合成ペプチドにて処理しておくこと RPS19 二量体による単球走化は優位に抑制されたが、f-MLF による走化には影響されなかった。

3. C5a の C5aR への第 2 結合部位の配列 (-Leu-Gly-Arg)を含む 10 残基からなる合成ペプチドは単球および多核白血球の双方に走化活性を認めた。しかし、RPS19 二量体の第 2 結合部位を含む合成ペプチドは単球のみに対して走化性を認めた。そこで、後者の-Leu-Asp-Arg-配列より C 末端部を C5a アナログペプチドに接続し Gly9 を Asp9 に置換したキメラペプチドを作成した。このキメラペプチドは単球のみに走化性を示し、C5a ペプチドの多核白血球に対する走化性を濃度依存的に阻害した。さらにキメラペプチドの C 末端のアミノ酸残基を 1 つずつ削除していったところ、2 残基、すなわち-Lys-His を失ったところで多核白血球に対する走化活性が出現した。C 末端の 4 残基を欠損させた RPS19 二量体も単球のみならず多核白血球に対しても走化性を発揮した。

【結 論】

RPS19 二量体は C5a と同様に 2 段階様式によって C5aR に作用し、レセプターの活性化を惹起する。第 1 リガンド部位は-Lys41-His42-Lys43-であり、C5a における His15, Arg46.Lys49 部位と同等の作用、つまり C5aR 活性化は行わず、第 2 結合のアフィニティを高める作用を持つと考えられる。また、C5aR 側の第 1 結合部位は、C5a と RPS19 二量体のいずれも同じ部位であると考えられた。

RPS19 二量体の第 2 リガンド部位は-Leu131-Asp132-Arg133-であった。この第 2 結合によって C5aR が活性化される。C5aR 側の第 2 結合部位も C5a と RPS19 二量体に対して同一部位であると考えられた。また、多核白血球の C5aR に対してアンタゴニスト作用をもたらす RPS19 二量体の部位は、第 2 結合部位の C 末端側に存在する。ただし、C 末端の His は関与していない。

Summary

The S19 ribosomal protein (RP S19) cross-linked homo-dimer attracts monocyte migration by binding to C5a receptor on monocytes . Using site-directed mutants of recombinant RP S19 and synthetic peptides mimicking RP S19 molecular regions, I currently identified the binding sites of the RP S19 dimer to the C5a receptor. The RP S19 dimer activated the receptor by a two-step binding mechanism as in the case of C5a. The first binding site was a basic cluster region containing -Lys41-His42-Lys43- sequence.

The second one was the -Leu131-Asp132-Arg133- moiety, localized 12 residues upstream from the COOH-terminal. The second binding triggered the chemotactic response. The first binding would have a role in achieving a high binding affinity between the ligand and receptor. Although overall homology between the amino acid sequences of these ligands is only 4%, the first and second ligand binding sites of C5a receptor seem to be shared by C5a and the RP S19 dimer.

Furthermore, I determined the moiety responsible for the antagonistic function to the C5a receptor of polymorphonuclear leukocytes (PMN). A C-terminal analogue peptide of RP S19 with 18 residues containing the agonistic ligand moiety reproduced the dual function in the leukocyte chemotaxis. A C5a analogue peptide attracted PMN as well as monocytes.

When C-terminal 12 residues of RPS19 after the agonistic moiety, IAGQVAAANKKH, were connected to the C5a peptide, the chimeric peptide obtained the dual function, indicating that the C-terminal portion of RPS19 functions as a converter from the agonist to the antagonist. C-terminal truncation analysis indicated that the C-terminal His was not essential but the next Lys was necessary for the converter function. The homodimer of a mutant RP S19 that was truncated for the C-terminal 4 residues lost the antagonistic function. These results indicated that the conversion of the RP S19 dimer to the C5a receptor antagonist is attributed to the IAGQVAAANKK moiety between Ile134 and Lys144.

②発表論文リスト

1 . Yoko Shibuya, Megumi Shiokawa, Hiroshi Nishiura, Takumasa Nishimura,

Norikazu Nishino, Hiroaki Okabe, Katsumasa Takagi, and Tetsuro Yamamoto.

Identifiction of receotor-binding sites of monocyte chemotactic S19 ribosomal protein dimer. *American Journal of Pathology* 2001 vol.159. no.6 . 2293~2301.

(Y.S.and M.S. contributed equally to this work)

③謝 辞

本研究は、熊本大学大学院医学研究科分子病理学講座 山本哲郎教授および、同整形外科学講座 高木克公教授の指導のもとに行いました。研究の遂行のみならず、多面にわたり厳しくも温かい御指導を頂き心より感謝申し上げます。

研究実施にあたり、実験手技を初歩から教えて頂きました分子病理学講座 西浦弘志助手、同 斎田和孝助手、アージュン・シュレスタ先生、遺伝子組み換え大腸菌を作成して頂いた熊本大学附属病院中央検査部 渋谷陽子助手、千場梅子助手ならびに、合成ペプチド作成を御指導頂きました九州工業大学教授 西野憲和先生および、分子病理学講座教室員の皆様に深く感謝申し上げます。

④略 語 一 覧

C5aR	: C5a receptor
DTT	: dithiothreitol
FBS	: fetal bovine serum
f-MLF	: formyl-Met-Leu-Phe
HBSS	: Hanks' balanced salt solution
HPLC	: high-performance liquid chromatography
IPTG	: isopropyl β -D-thiogalactosid
MCP-1	: monocyte chemoattractant protein - 1
PBS	: phosphate-buffered saline
PCR	: polymerase chain reaction
PMN	: polymorphonuclear leukocytes
RPS19	: S19 ribosomal protein
SDS-PAGE	: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TFA	: trifluoroacetic acid
ZAP	: zymosan-activated plasma

⑤研究の背景と目的

慢性炎症においては単球／マクロファージ優位の白血球浸潤が認められるが、もちろんその代表的な疾患である慢性関節リウマチの関節滑膜病変部位にも、コラーゲンの増生、血管の新生、リンパ球の集簇、フィブリン形成に加えて、単球／マクロファージの強い浸潤が存在する。この様な滑膜肉芽組織に於ける単球／マクロファージ優位の浸潤を惹起する分子機構を明らかにするために Nishiura ら[1]は、外科的に切除された慢性関節リウマチ患者の膝関節滑膜肉芽組織を採取し、その肉芽巣抽出液中の白血球走化因子の探索を行った。そして、単球に対しては強い走化活性を示すが、多核白血球に対しては走化性を示さない因子を発見することに成功した。この因子は、細胞内蛋白合成装置リボソームの小サブユニット構成蛋白の一つである S19 リボソームタンパク (RPS19) が、トランスグルタミナーゼの作用で架橋化された二量体と同定された。この走化因子は、肉芽巣抽出液中の全単球走化活性の 8 割程度を占めていた。また、RPS19 二量体の走化活性は 10^{-9} M を至適濃度とし、補体 C5 由来の遊走因子 C5a、細菌由来の遊走因子 formyl-Met-Leu-Phe (f-MLF)、あるいはケモカインの一種である monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) と同等の強さを有していた。

アポトーシスは、1972 年に Kerr ら[2] により初めて報告された、ネクローシスとは異なる形態の細胞死である。外的傷害によって細胞が膨化し、細胞融解と細胞内容物の細胞外流出により炎症を惹起するネクローシスと異なり、アポトーシスでは細胞質の縮小、および核クロマチンの断片化と凝集が起こり細胞の小片化ともいえるアポトーシス小体が形成され、明らかな炎症反応を伴うことなく最終的にマクロファージ系の細胞や特殊な隣接細胞による貪食処理によって除去される。従って、アポトーシス細胞から単球／マクロファージの浸潤を惹起する何らかの分子シグナルが遊離され、アポトーシス細胞自らの処理に関与していることが期待される。事実、アポトーシス細胞からも単球特異的走化因子 RPS19 二量体が産生、遊離されることが明かとなった。

Horino ら[3]は、温熱処理によりアポトーシスに陥らせた HL-60 細胞、H₂O₂ 処理によりネクローシス化した同細胞、および、2 分間煮沸固定化した同細胞をモルット皮内に接種する比較実験を行い、アポトーシス細胞から遊離された RPS19 二量体が、血流中の単球を局所に浸潤させ、自らをすみやかに貪食処理させているという知見を得た [3]。さらに、Horino ら [3] は白血球系統の細胞である HL-60 を、Nisimura ら [4] は膵癌由来の細胞株 AsPC-1 細胞を温熱処理にてアポトーシスに誘導させ、その培養上清の解析から、単球特異的走化因子である RPS19 二量体の産生を確認した。これらは温熱未処理群の培養上清中には認められないことから、アポトーシスの過程において産生されるものと考えられている。細胞内蛋白合成装置リボソーム小サブユニット構成蛋白の一つである RPS19 は蛋白合成能力をもつすべての細胞に存在するという見地から考えると、RPS19 二量体の産生機構はアポトーシスの過程に普遍的に組み込まれたものであろうと想像出来る。

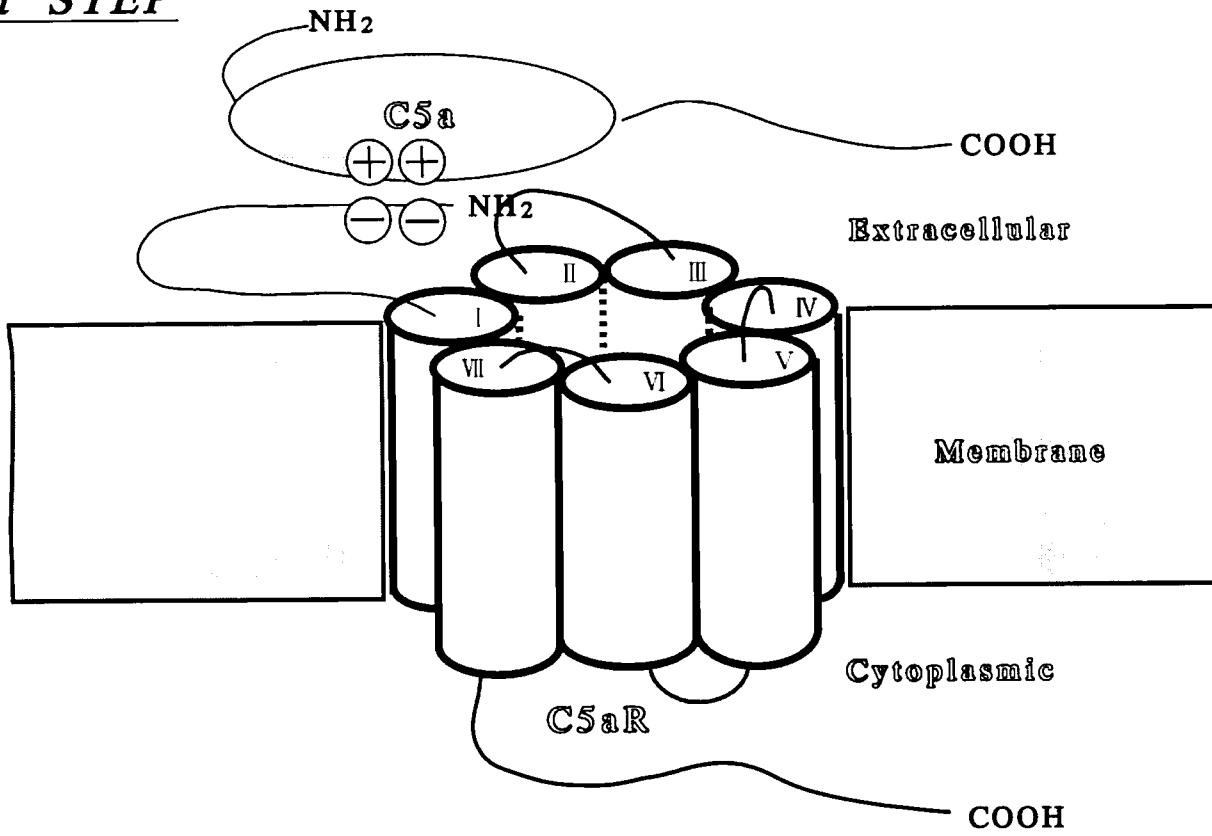
ところで、白血球走化性因子には補体由来の C5a、細菌由来の f-MLF、ロイコトリエン B₄、ケモカイン類、RPS19 二量体など 40 種類程度が知られており、炎症反応の場ではこれら多くの因子が協調して作用しながら多種の白血球が遊走浸潤するものと考えられている。しかしながらリンパ球のホーミング現象などの場合には少数のケモカインによる細胞選択性の高い走化反応が生じていると考えられている。そこで我々の研究グループは白血球走化性因子である RPS19 二量体の単球特異的な走化性のメカニズムに着目し研究を行ってきた [1,5]。RPS19 二量体は単球の C5aR に作用して遊走能を惹起させることが証明されている。単球を抗 C5aR モノクローナル抗体、または合成 C5a アンタゴニストでの処理を行った実験において、RPS19 二量体による単球の走化性は C5a の場合と同様に抑制された。放射標識 C5a を用いた結合競合阻害実験では、C5a と RPS19 二量体は白血球に対して同等の結合親和性を持って競合した [6]。

よって、RPS19 二量体と C5a はともに C5aR に結合し走化活性を得ることが証明されたが、144 アミノ酸残基からなる RPS19 二量体と 74 アミノ酸残基から成る C5a との間の一次構造上の相同性を計算したところ、わずかに 4%であった。この矛盾に直面し、私は、両分子間には C5aR に結合する局所に限局して相同性があるのではないかと考えるに至った。

C5aR は細胞内外の親水性ループで結合した 7 つの膜貫通性疎水性 α ヘリックスという共通構造を持つ、G 蛋白結合レセプターファミリーメンバーの一つである [7,8]。近年、核磁気共鳴分光分析 [9] および C5a と C5aR の双方の部位特異的変異体 [10~14]、あるいは合成アナログペプチドや C5aR のアゴニスト/アンタゴニストを使用した研究により [15,16,17]、C5a と C5aR 間相互作用の解析が進んでいる。これらの報告を集積した結果から C5a と C5a レセプター間には 2 段階反応のレセプターリガンド結合モデルが提唱された [18] (図 1)。

第 1 結合反応は、C5aR の N 末端部分の酸性側鎖領域 (加えてレセプターの細胞外第 2 ループの一部も含む領域の説もある) と C5a の立体中心部分の塩基性側鎖領域との間で生じると考えられている。C5a は 3 次元構造上、His15、Arg46、Lys49 の部位で立体的に塩基性クラスターを形成するとされている [9] (図 2)。この反応は、結合親和性は高いがレセプターの活性化は引き起こさず、C5a の局所濃度を効率的に高めて、次の第 2 結合反応を促進させていると考えられている。第 2 結合反応は、尾状の C5a の C 末端部分 (Leu72-Gly73-Arg74-COOH) が、C5aR の 7 つの膜貫通性ヘリックスが形成する円筒内に侵入して結合し、レセプターを活性化して G 蛋白を介したシグナル伝達を開始させるとするものである [10]。この 2 段階目の結合においては、C5a の Leu72 と Arg74 の側鎖と末端の α -カルボキシル基が必須であるとされている。私は C5a のレセプター結合部位のアミノ酸配列を参照することによって、RPS19 二量体のレセプタ

1st STEP



2nd STEP

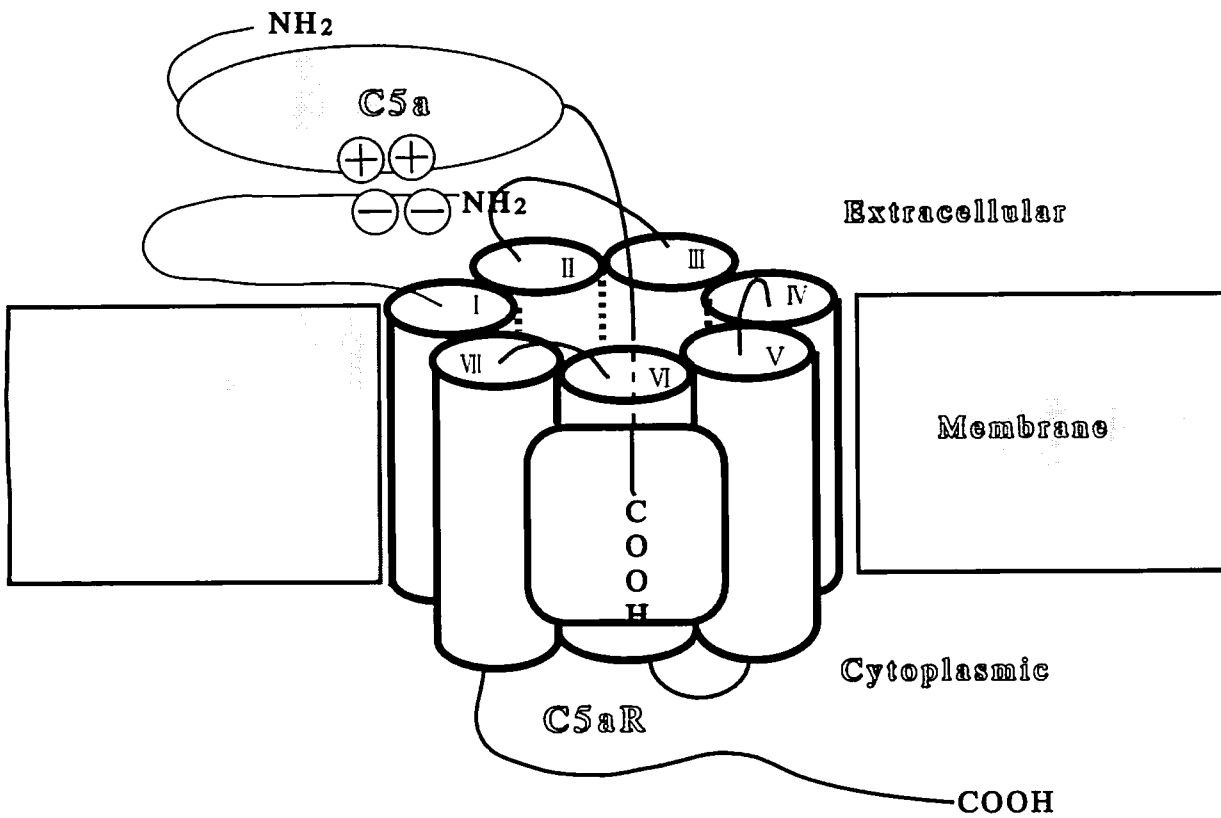


図1 : C5aによるC5aレセプター活性化の二段階反応モデル

C5aのアミノ酸配列

TLQKKIEEIA AKTK¹⁵H¹⁵SVVKK
CCYDGASVNN DETCEQRAAR
ISLGP⁴⁶R⁴⁶C⁴⁹I⁴⁹KA AFEC CVVASQ
LRANISHKDM ^{72 73 74}QLGR

C5aの立体モデル

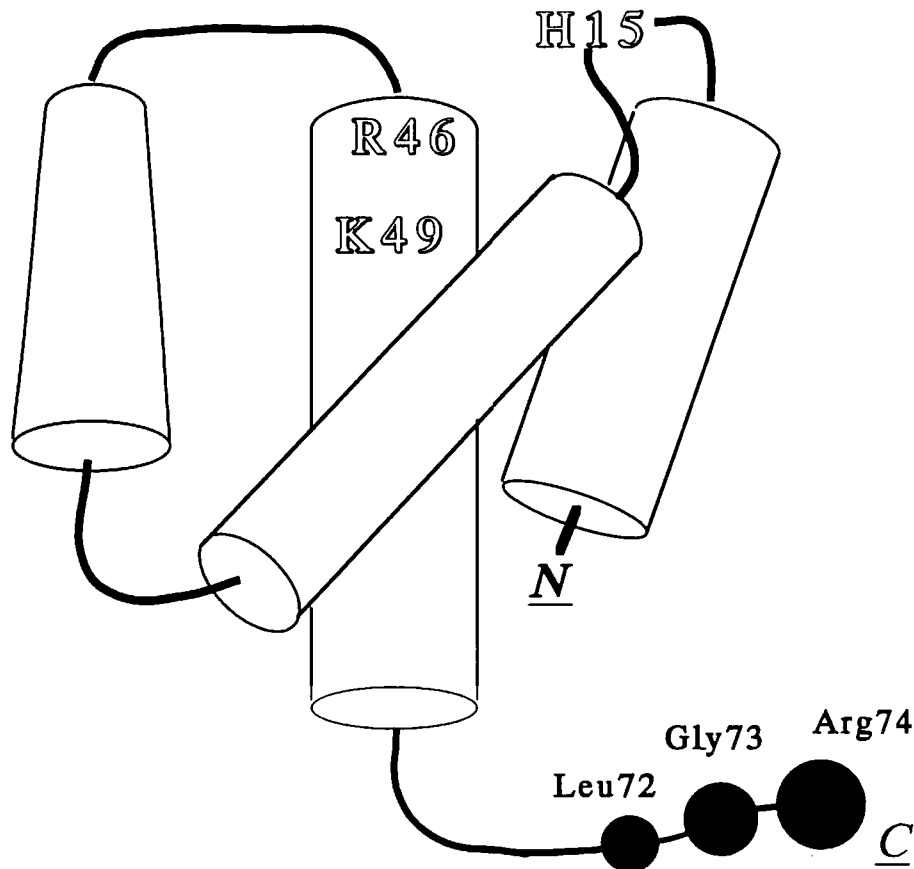


図2 : C5aは立体構造を形成の際、His15、Arg46、Lys49の塩基性アミノ酸残基が第1結合部リガンドを形成すると考えられている。(Matthewら、Protein Science 1994 vol3;1159~1168を参考にした)

ー結合部位を予想した。(図3)(図4)

第1結合部位はRPS19の塩基性クラスター部位の-Lys23-Lys24-Ser25-Gly26-Lys27-Leu28-Lys29-もしくは-Lys38-Lcu39-Ala40-Lys41-His42-Lys43-と予想した。これらの部位はヘパリン結合部位である事を我々は以前に報告している。固定化ヘパリンへの結合実験において-Lys23-Lys24-Ser25-Gly26-Lys27-Leu28-Lys29-は強い、-Lys38-Lcu39-Ala40-Lys41-His42-Lys43-は弱い結合能を示した[5]。私はこれらの部位の塩基性アミノ酸残基をAlaに置換した部位特異的変異RPS19、ならびにこれらの塩基性クラスター部位と同じアミノ酸配列を持つ合成ペプチドを用いた解析により、いずれかが第1結合部位であることを確定しようと考えた。

第2結合部位を考えた場合、RPS19のC末端アミノ酸配列は-Lys143-Lys144-His145-COOHであり、C5aのC末端アミノ酸配列-Leu72-Gly73-Arg74-COOHとは全く相違していた。予備実験において、RPS19のC末端の12アミノ酸残基からなるアナログペプチドを用いて単球に対する走化性実験をおこなったが、広範囲の濃度域で活性を認めなかった。故にRPS19のC末端部分は第2リガンドの候補から除外して推論することとした。

C5aとC5aレセプター間の第2段結合においては、C5aのLeu72、およびArg74の側鎖とC末端Arg74の α -カルボキシル基が必須であるとの考え方が一般的である。Leu72Aspの変異型C5aは野生型C5aに比べて白血球の走化活性能が1%未満に低下していた[10]。またArg74Ala変異型C5aは野生型C5aに比して細胞内カルシウム上昇能が1000倍低かった[11]。そして、C5aのC末端にGly75を付加し延長させた変異型C5aは、野生型のわずか12%の走化活性能しか認められなかった[10]。これらにより、C5aのArg74の α -カルボキシル基が重要であると考えられた。よって私はRPS19分子の-Lcu131-Asp132-Arg133-部分に着目した。この配列はLeuとArgの側鎖がC5a

RPS19のアミノ酸配列

MPGVTVKDVN QQEFVRALAA
^{23 24} ^{27 29} ³⁸
FLKK**SG**KL**KV** **PEWVD**TV**KL**A
 #1
^{41 42 43}
KK**EL****APY****DE** **NWFY****TR****AA****ST**
 #2
 ARHLYLRGGA GVGSMTKIYG
 GRQRNGVMPS HFSRGSKSVA
 RRVLQALEGL KMVEKDQDGG
^{131 132 133}
RKL**TP****Q****G****Q****R**D **LDRI****AGQ****VAA**
 #4 #6
ANKKH

図3 : C5aの2ヶ所のレセプター結合部位を参考にRPS19二量体のレセプター結合部位を想定した。2ヶ所の塩基クラスター部位（白抜き文字）のいずれかが第1結合部位として考えられる。太字は推測した第2結合部位。下線部は実験に使用した合成ペプチド（アナログペプチド）#1、#2、#4、#6部分を示す。

活性型XIII因子またはII型トランスグルタミナーゼにより
架橋化されたS19リボソーム蛋白2量体のイメージ図

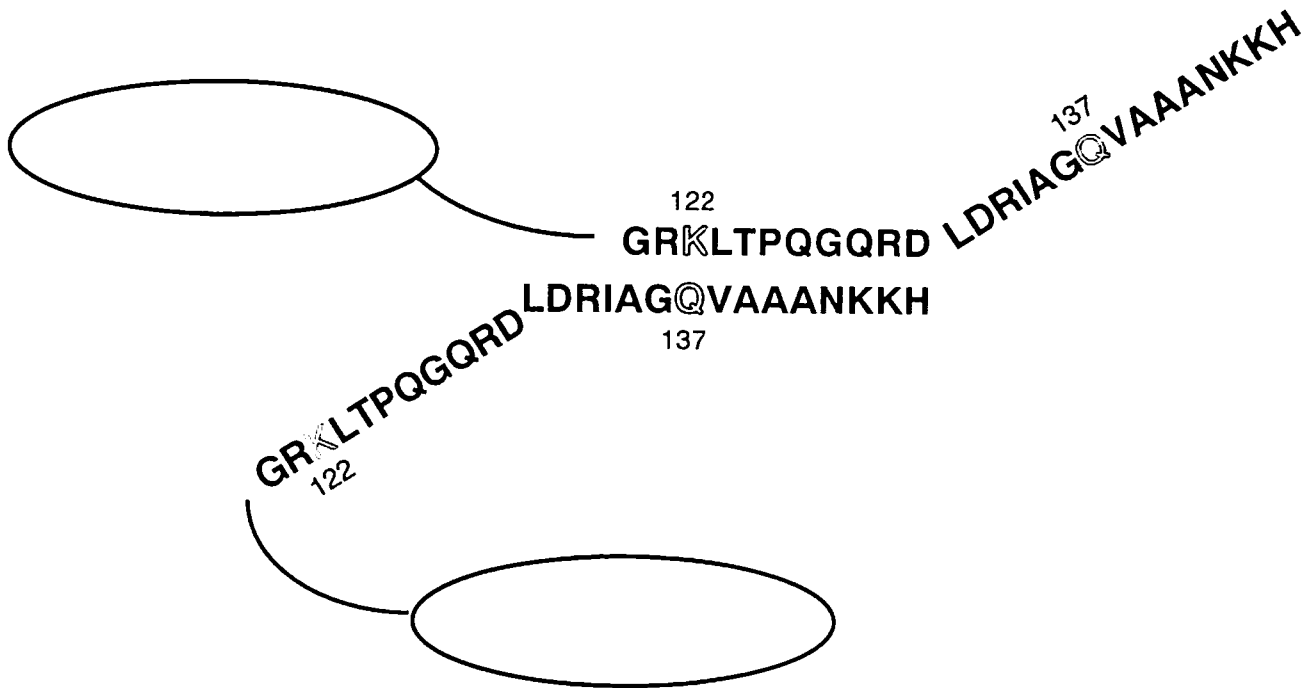


図4：RPS19は糖鎖を持たない単純蛋白であり、ジスフィルド結合は存在していない。XIIIa因子またはII型トランスグルタミナーゼによって二量体化したRPS19についてトリプシン分解ペプチド地図を、C18逆相カラムを用いて作成し、各分画をアミノ酸配列分析することによって、RPS19二量体はLys122 とGln137間の1本の分子間イソペプチド結合によって架橋されていることが明らかになった。 [1]

の C 末端-Leu72-Gly73-Arg74-と同様の位置関係にある (図 10 ; P.46)。もし、RPS19 の Asp132 の側鎖の β -カルボキシル基が C5a の C 末端の Arg74 の α -カルボキシル基の代用をするならば、この部位は C5a レセプターを活性化する第 2 リガンドとして機能し得ることになる。私は、部位特異性変異体 RPS19 と合成ペプチドを用いて、この仮説を実証しようと考えた。

さらに興味あることに、RPS19 二量体は多核白血球の C5a レセプターに対してはアンタゴニストとして作用し、単球のそれにはアゴニストとして作用するという性質を持つ。この対極的作用により *in vivo* において単球優位の浸潤をひき起こしている [19]。私は、この対極的な 2 つの性質を説明するために、アゴニストからアンタゴニストへの変換部位が RPS19 二量体の分子上のどこかに存在するのではないだろうかと考えた。そして単球と多核白血球の双方のレセプターに対してアゴニストとして作用する C5a には、このスイッチのような部位は存在しないはずである。

上記の第 2 結合部位を特定するために作成した RPS19 アナログペプチドを、単球と多核白血球に作用させてみたところ、幸運なことにこのペプチドも RPS19 二量体と同様に単球選択的な走化活性を示した。このペプチドは-Leu131-Asp132-Arg133-を挟んで N 末端側 4 残基と C 末端側 11 残基を含むものであった。そこで私は、この C 末端配列すなわち RPS19 の C 末端部にアゴニストからアンタゴニストに切り換えるスイッチ的機能があるとの仮説を立てた。そして C5a アナログペプチドとのキメラペプチドや RPS19 の C 末端部を欠失した変異体の二量体を用いて、この仮説を検証することにした。

⑥実験方法

I) 実験材料

1. ハンクスの生理食塩水 (Hanks' balanced salt solution, HBSS)、および培養液 RPMI 1640 は、日水製薬株式会社 (東京) より購入した。
2. ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) はシグマ (St.Louis, MO) より購入した。
3. 胎児ウシ血清 (fetal bovine serum, FBS) は、日本 BMA 株式会社 (東京) より購入した。
4. 白血球走化性測定用のマルチウェルチャンバーは、ニューロプローブ社 (Bethesda, MD) の、また、ポリカーボネートフィルターは、ヌクレポア社 (Pleasanton, CA) の製品である。
5. ザイモザン活性化血漿 (zymozan activated plasma, ZAP) は、Fernandez ら[20] の方法によって調製した。
6. 制限酵素 (Nde I, BamH I)、プラスミド・ピュア・プレップ、TaKaRa RNA PCRkit, DNA ライゲーション kit、Microcon & Micropure、大腸菌株 JM109 宿主細胞は、宝生化学 (大津) から購入した。
7. 野生 Pfu DNA ポリメラーゼはストラータジーン社 (La Jolla, CA) から購入した。
8. jet sorb gel extraction kit は Genomed GmbH (Bad Oeynhausen, Germany) から購入した。
9. SeaKem GTC アガロースゲルおよび NuSieve アガロースゲルは FMC 社 (Rockland, ME) から購入した。
10. 大腸菌 BL21(DE3)株と pET 11a プラスミドベクターは Novagen Inc. (Madison, WI)から購入した。
11. モルモットの肝臓由来の II 型トランスグルタミナーゼはオリエンタルイース

ト社（大阪）から購入した。

12. XIII 因子は化学及び血清療法研究所（熊本）から供与していただいた。
13. Kontcatis ら [19] の方法にて合成した C5a アンタゴニスト NMePhe-Lys-Pro-dCha-dCha-dArg ペプチドは名古屋大学の水野先生から供与していただいた。

特殊なものを除いたその他の試薬は、和光純薬（大阪）より購入した。
その他の特殊材料は、実験方法の各頁に記載した。

II) オリゴヌクレオチド

以前の報告 [22] にしたがって RPS19 の cDNA 配列にもとずいてプライマーヌクレオチドを作成した。表 1 にそのリストを示す。

P 1 から P14 までの 7 組みで、奇数が sense primer、偶数が antisense primer である。

これらを以下の野生型および変異型 RPS19 の発現に使用した。

P1 と P2 : 野生型 RPS19

P3 と P4 : Lys23Ala, Lys24Ala, Lys27Ala and Lys29Ala -RPS19

P5 と P6 : Lys38Ala, Lys41Ala, His42Ala and Lys43Ala - RPS19

P7 と P8 : Leu131Asp - RPS19

P9 と P10 : Asp132Gly - RPS19

P11 と P12 : Arg133Ala - RPS19

P13 と P14 : Asn142~His145 -deletion - RPS19

P3 から P14 のプライマーおよびベクター pE11a プライマー（T7 プロモータープライマーと T7 ターミネータープライマー）は宝生化学に依頼し作成した。

表 1：使用したプライマーヌクレオチド

No.	ヌクレオチド配列
P1	5'AGGCCGCCATATGCCTGGAGTTACTGTAAAAGA3'
P2	5'GCATGGATCCTTCTAATGCTTCTTGTGGC3'
P3	5'TCCTCGCAGCGTCCGGGGCGCTGGCAGTCCCCGAAT3'
P4	5'GGACTGCCAGCGCCCCGGACGCTGCGAGGAAGGCTGCC3'
P5	5'CCGTCGCGCTGGCCAGCGGCCGACAGAGCTTGCTCCCTA3'
P6	5'GCTCTGCGGCCGCGGCCAGCGCGACGGTATCCACCCATT3'
P7	5'GAGATGACGACAGAATCGCCGGAC3'
P8	5'CTGTCGTCTCTCTTTGTCCCTGA3'
P9	5'ATCTGGGCAGAATCGCCGGACAGG3'
P10	5'ATTCTGCCAGATCTCTTTGTCCC3'
P11	5'TGGACGCAATCGCCGGACAGGTGGCAGCTGC3'
P12	5'GCGATTGCGTCCAGATCTCTTTGTC3'
P13	5'AGGCCGCCATATGCCTGGAGTTACTGTAAAAGA3'
P14	5'AGCCGGATCCTTCTAGGCAGGCAGCTGCCACCT3'

The odd and even numbers are sense and antisense primers, respectively.

P1 & P2, wild type RPS19; P3 & P4, Lys23Ala, Lys24Ala, Lys27Ala and Lys29Ala RPS19; P5 & P6, Lys38Ala, Lys41Ala, His42Ala and Lys43Ala RPS19; P7 & P8, Leu131Asp RPS19; P9 & P10, Asp132Gly RPS19; P11 & P12, Arg133Ala RPS19, P13 & P14, Asn142~His145 deletion RPS19

Ⅲ) 実験方法

Ⅲ-1) 野生型及び変異型 RPS19 の調製

今回の実験においては野生型、および、以下の6種類の変異型 RPS19 を大腸菌の外来遺伝子発現系を用いて調製した。

Lys23Ala, Lys24Ala, Lys27Ala, Lys29Ala-RPS19

Lys38Ala, Lys41Ala, His42Ala, Lys43Ala-RPS19

Leu131Asp-RPS19

Asp132Gly-RPS19

Arg133Ala-RP 19

Asn142-Lys143-Lys144-His145-deletion-RPS19

RPS19 cDNA は HepG2 細胞 mRNA 分画を用いて調製した[5]。

変異型 RPS19 cDNA は、ポリメラーゼ連鎖法(polymerase chain reaction)を利用した部位特異的変異導入法[13]を用いて調製した。それぞれの cDNA は pET 11a プラスミドベクター (NovagenInc., Madison, WI) をテンプレートとして 1 回目の PCR にて変異 RPS19 cDNA の上流および下流を増幅し、2 回目の PCR では全長を増幅した。クローニングにおいては Nde I と BamH I にて消化した pET 11a プラスミドベクターをクローニング宿主大腸菌 JM109 に導入し、アンピシリン加 LB 培地にて一晚増幅した。そして陽性コロニーを抽出し精製、導入変異の cDNA を ABI DNA シークエンサーを用いたヌクレオチド配列解析により確認した。

そして、これらの変異プラスミドを宿主細胞の大腸菌 BL21(DE3)株(Novagen)に温ショック法を用いて導入した。それぞれの変異化大腸菌を、アンピシリン(100mg/l) 加 LB 培地(10g/l bactotrytone, 5g/l yeast extract, 10g/l NaCl, pH7.5)にて増殖させた後、Isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) を加えて 12~24 時間培養し導入遺伝子を発現させ、5,000g で 10 分間遠心して、沈殿した細菌分画を得て、これを 2mM EDTA を含む 50mM Tris-HCl バッファー (pH8.0) に再懸濁した。次に 1 μ g/ml の lysozyme と 1% Triton X-100 を加え、細胞を破壊した。さらに、高出力設定にて超音波破碎したペリプラスマの蛋白成分を遊離させ、12,000g 15 分間高速遠心して上清を採取した。この RPS19 を含んだ上清を、100mM NaCl を含む 10mM リン酸バッファー (pH6.0) に透析した後、SP トヨパールカラム、HPLC 用 SP-5PW (bed volume 3.5ml トーソー 東京)、および、HiTrap heparin column (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用い、以前の報告[3]に従って RPS19 を精製した。調製した RPS19 は SDS-PAGE にて純度を検定し、純度 95% 以上のものを実験に使用した。蛋白濃度の決定には、280 nm の吸光度を測定し、吸光度単位 1.0 を 1mg/ml の濃度として扱った。

Ⅲ-2) RP S19 2 量体の調製

XIIIa 因子と II 型トランスグルタミナーゼは RS19 の架橋二量体化を触媒し、前者には補助因子としてヘパリンが必要である[4.5]。

数種類の変異型 RPS19 はヘパリン 1 U/ml の存在下で XIIIa 因子 (最終濃度 1U/ml) と反応させて二量体を調製した。その他の RPS19 は II 型トランスグルタミナーゼを用いて二量体化反応を行った。RPS19 (最終濃度 0.5 mg/ml~3.0mg/ml) を 5 mM CaCl₂, 1 mM dithiothreitol (DTT) の存在下で、XIIIa 因子 (1U/ml) または、II 型トランスグルタミナーゼ (0.5U/ml) とともに、37℃ 60 分間処理した。二量体を精製するために、抗イソペプチド結合単クローン抗体カラム (φ10×25 mm bed volume 2ml Coval. Ab.Lyon, France) に展開し、100 mM NaCl を含む 10 mM tris-HCl バッファー (pH 7.5) にてカラムの洗浄をした後、カラムに結合したタンパク質を 1 M NaCl を含む 10 mM tris-HCl バッファー (pH7.5) にて溶出した。この溶出画分に最終濃度でそれぞれ 0.1% と 5% の trifluoroacetic acid (TFA) および acetonitrile を混合させ、acetonitrile を含む 0.1% と 5% の TFA で 平衡化した HPLC 逆相 C4 カラム (Hitachi 5C4-300) に展開した。カラムに結合した二量体の溶出は、5% から 80% までの acetonitrile の濃度勾配法を利用して行った。それぞれの精製分画を真空遠心機にて濃縮し、ドデシル硫酸ナトリウム加ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で確認を行ったところ、純度は 90% 以上であった (混在物のほとんどは単量体であった)。蛋白濃度の決定には、280 nm の吸光度を測定し、吸光度単位 1.0 を 1mg/ml の濃度として換算した。調製試料は 0.1mg/ml ウシ血清アルブミン (BSA) を含む滅菌リン酸緩衝化生理食塩水に溶解して走化活性実験に使用した。

Ⅲ-3) アナログペプチドの作成

ペプチドの合成はアルコールレジン上でフルオニルメソキシカルボニル

(solid-phase fluorenylmethoxycarbonyl:Fmoc) 法の固相合成で作成した。合成物は K 反応薬 (TFA/phenol/H₂O/thioanisole/ethanedithiol=82.5/5/5/5/2.5)による脱保護と脱レジンを行い抽出した。これを YMC C18 調製カラム (山村 京都)を用いた HPLC にて精製し、凍結乾燥した。構造の確認は質量解析 (fast atom bombardment mass spectrometry) により行った。調整試料は 0.1mgBSA を含む滅菌リン酸緩衝化食塩水に溶解して走化活性実験に使用した。使用した合成ペプチドの一覧を表 2 に示す。

Ⅲ-4) ドデシル硫酸ナトリウム加ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

電気泳動は、15%のポリアクリルアミドゲルを用い Laemmli ら[16] の方法に従って行った。泳動サンプルは、SDS 存在下で約 2 分間煮沸後、ゲルに添加した。20mA で 40 分間電気泳動をした後、ゲルを Coomassie Brilliant Blue にて染色した。

Ⅲ-5) 走化活性測定法

Ⅲ-5-1) 白血球細胞の調製

単球および好中球の分離は Fernandez らの方法[25]により、健常人からヘパリンを用いて採血した末梢静脈血より分離した。単球および好中球はそれぞれ細胞密度 1×10^6 / ml に調整した。

Ⅲ-5-2) マルチウェルチャンパー法

手技は Falk ら[25]の方法で行った。実験に用いる細胞密度は単球、好中球共に 1×10^6 個/ml とし、単球は 10% FBS 加 RPMI 1640 (pH 7.4)、好中球は 0.5% BSA 加 HBSS (pH 7.4) に懸濁した。遊走膜は nuclepore filter を使用し、細孔サイズは単球用に $5 \mu\text{m}$ 、多核白血球用には $3 \mu\text{m}$ とした。遊走膜で境された下室にサンプルを、上室に調製

細胞を入れた後、90 分間、37℃の CO₂ インキュベーター内に温置した。次に、遊走膜を外し、メタノールで 1 分間固定し Giemsa 染色を施した。遊走膜の細孔を超えて下面に移動してきた細胞数を 400 倍の顕微鏡で 5 視野計測して、その合計を遊走白血球数 (migrated leukocyte number) とした。

表2：実験に使用した合成ペプチド一覧

RPS19アナログペプチド

アナログペプチド#1：Ac-LKKSGKLVPEWVD
アナログペプチド#2：Ac-VKLAKHKELAPYDEN
アナログペプチド#3：Ac-VKLA~~AAA~~ELAPYDEN
アナログペプチド#4：Ac-GQRDLDR~~I~~AGQVAAANKK
アナログペプチド#5：Ac-GQRDLGRIAGQVAAANKK
アナログペプチド#6：IAGQVAAANKKH

C5aアナログペプチド

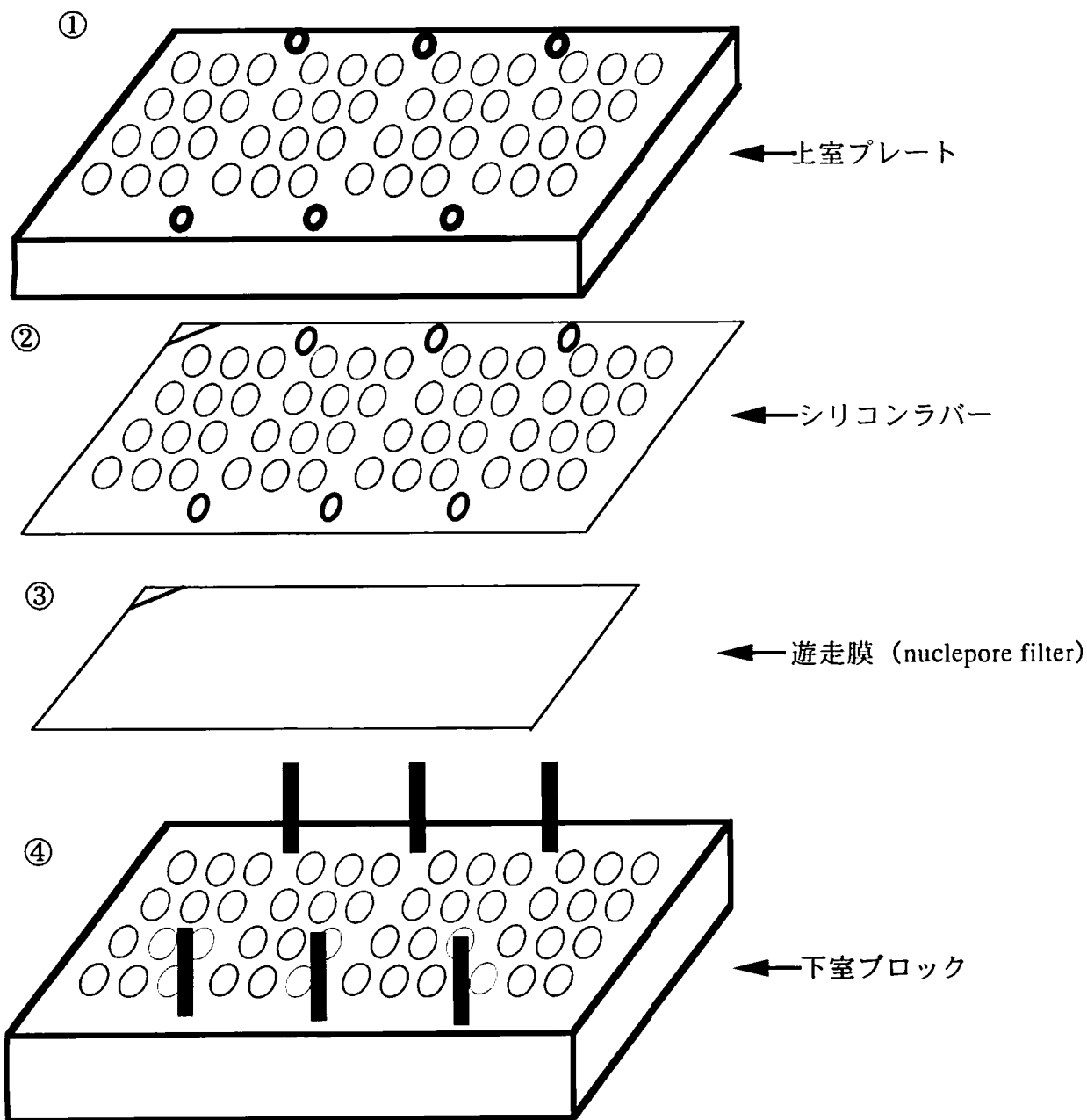
: YSFKDMQLGR

キメラペプチド

キメラペプチド1 : YSFKDMQLDRIAGQVAAANKKH
キメラペプチド2 : YSFKDMQLDRIAGQVAAANKK
キメラペプチド3 : YSFKDMQLDRIAGQVAAANK

C5aレセプターアンタゴニスト

: NMePhe-Lys-Pro-dCha-dCha-dArg



1 チャンバーの模式図

①②③④を重ねてネジで圧着

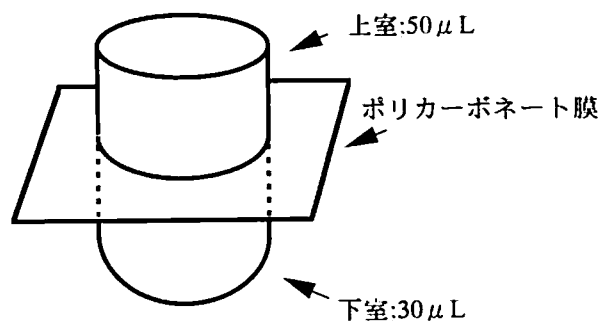
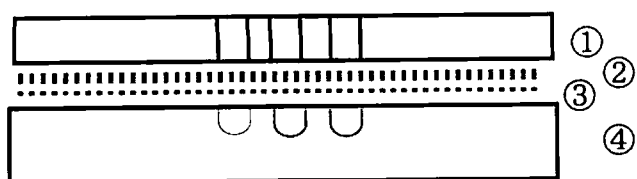


図5：48ウエル・ケモタキ西斯チャンバーの詳細

⑦結果

1) 単球 C5a レセプターに対する RPS19 二量体の第 1 結合部位の同定

RPS19 二量体のヘパリン結合部位を以前に報告しているが [5]、その塩基性クラスター部位 -Lys23-Lys24-Ser25-Gly26-Lys27-Leu28-Lys29- もしくは -Lys38-Leu39-Ala40-Lys41-His42-Lys43-のどちらかが第 1 結合部位であろうという仮説を立てた。

1-1) 塩基性クラスター部位を変異させた RPS19 二量体の単球に対する走化活性

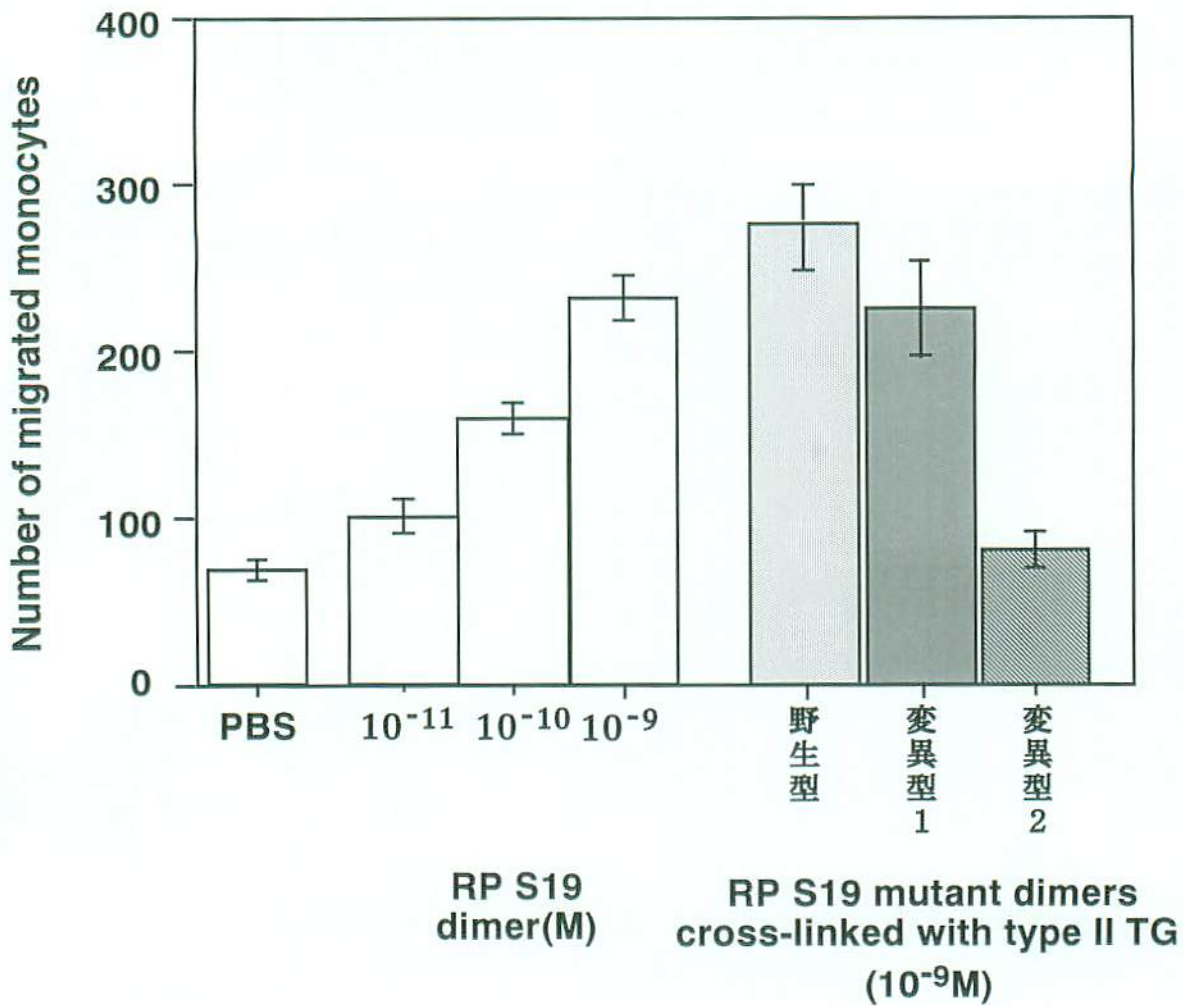
まず塩基性クラスター部位の塩基性アミノ酸を全て Ala に置換した以下の 2 種の変異型 RPS19 を作成した。

変異型 1 : Lys23Ala, Lys24Ala, Lys27Ala, Lys29Ala - RPS19

変異型 2 : Lys38Ala, Lys41Ala, His42Ala, Lys43Ala - RPS19

そして野生型 RPS19 とこれらの変異型 RPS19 を II 型トランスグルタミナーゼにて処理し、それぞれの二量体を作成した。XIIIa 因子を使用しなかった理由は、RPS19 の XIIIa 因子による架橋二量体の形成の際、XIIIa 因子はヘパリンを補助因子として必要とする [4] 一方、II 型トランスグルタミナーゼは必要としない点にある。この変異型 RPS19 はヘパリン結合能の減弱により、ヘパリン存在下においても XIIIa 因子を用いた二量体化は効率よく進行しないと判断した。

変異体 1 および 2、並びに野生型 RPS19 の二量体について、各々の単球に対する走化活性測定の結果を図 6 に示す。正の対照として、ヘパリン存在下に XIIIa 因子を用いて架橋化させた野生型 RPS19 の二量体を使用した。野生型と変異型 1 の二量体は 10^{-9} mol/L の濃度において、正の対照とほぼ同等の活性を示したが、変異型 2 は負の対照である PBS のレベルにまで走化性を消失していた。



変異型 1 : Lys23Ala, Lys24Ala, Lys27Ala, Lys29Ala RP S19
 変異型 2 : Lys38Ala, Lys41Ala, His42Ala, Lys43Ala RP S19

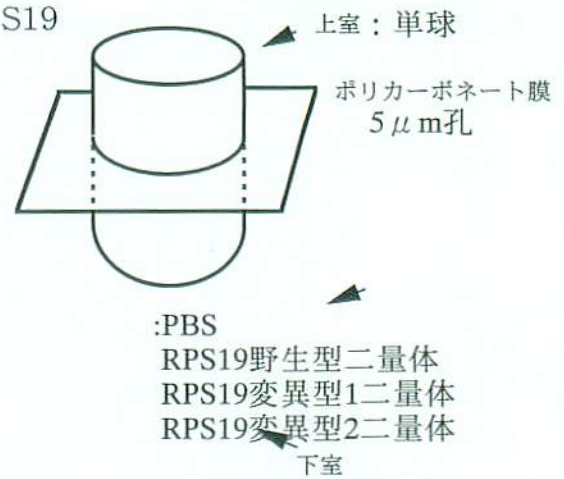


図 6 : アラニンサーベイ法を用いた変異型RPS19二量体による第1リガンド部位の検索

変異型 1 の二量体は野生型RPS19二量体や正の対照であるⅩ因子によるRPS19二量体とほぼ同等の走化性を示すが、変異型 2 の二量体は走化性を認めない。

この結果は、-Lys38-Leu39-Ala40-Lys41-His42-Lys43-が第1結合部位であることを強く示唆するものであった。

1-2) 塩基性クラスター部アナログペプチドによる RPS19 二量体の走化活性の抑制

RPS19 分子の塩基性クラスター部位を含む Leu22~Asp35 および Val37~Asn51 の部位に一致した 14 ないし 15 個のアミノ酸残基を持つ部分ペプチド（アナログペプチド）を用いて、これらが RPS19 二量体による走化活性を抑制するか否かの検討を行った。

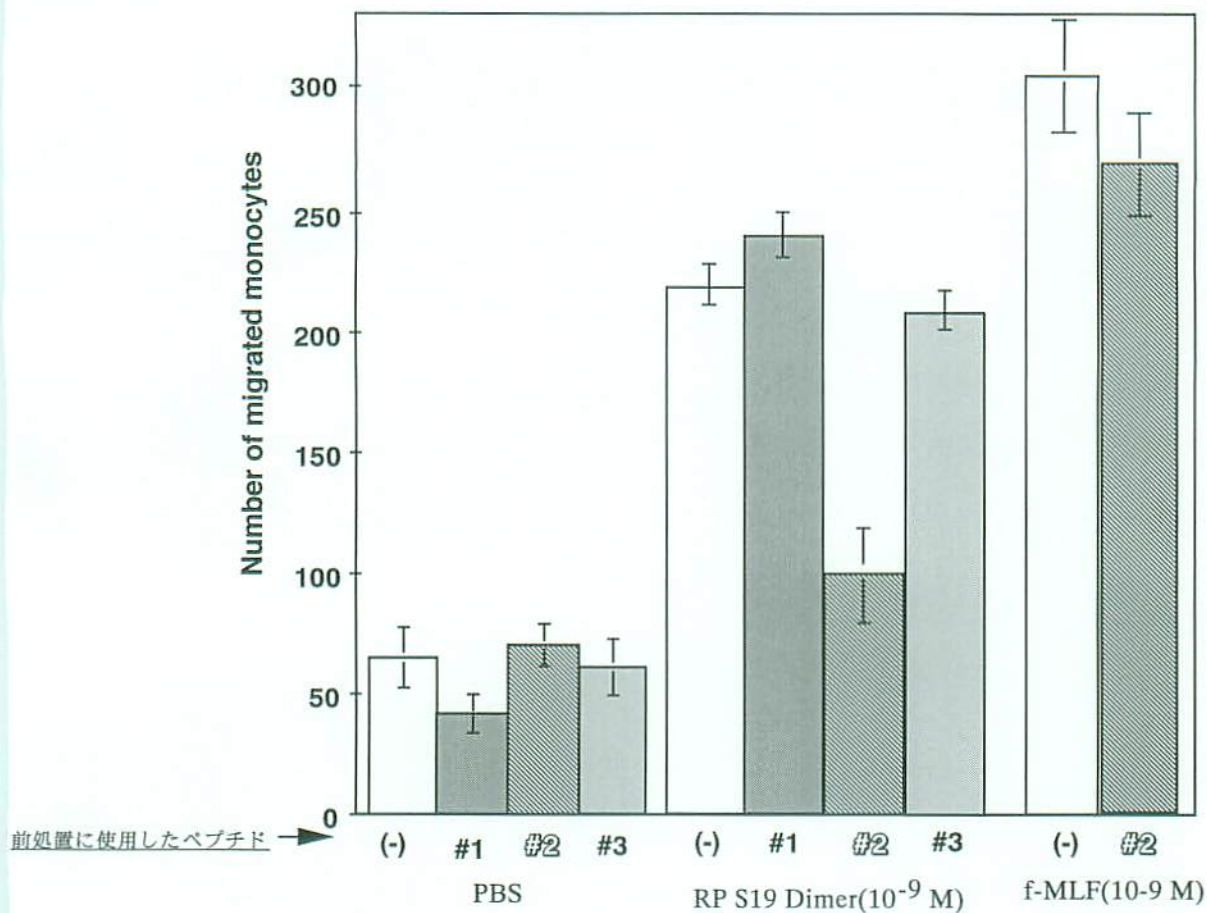
走化性実験に使用する直前に、アナログペプチドで単球を 37℃、10 分間の処理をして走化活性実験を行った（ 10^{-3} mol/L の濃度においても、これらのペプチドは単球の生存率には影響を及ぼさなかった）。図7に、 10^{-4} mol/L を代表とした結果を示す。

(図7)

Val37~Asn51 に類似させたアナログペプチド #2 (Ac-VKLAKHKELAPYDEN) で前処理を行うと、RPS19 二量体による遊走活性は抑制された。これに比して Leu22~Asp35 に類似させたアナログペプチド #1 (Ac-LKKSGKLVPEWVD) には抑制作用を認めなかった。なお、 10^{-3} mol/L の濃度に関しても同様の結果を得ている。

細菌由来の遊走因子である formyl-Met-Leu-Phe (f-MLF) を用いた場合には、アナログペプチド #2 は抑制効果を示さなかった。この場合、単球はフォルミルペプチドレセプターを介して f-MLF を認識しており、C5aR は関与していない。この結果からアナログペプチド #2(Ac-VKLAKHKELAPYDEN)による単球走化抑制は C5aR に対して特異的なものといえる。

第1結合に必須な部位をさらに限定させるために、アナログペプチド #2 (Ac-VKLAKHKELAPYDEN) の Lys-His-Lys 部分をアラニン (Ala) に置換したアナログペ



アナログペプチド#1 : Ac-LKKSGKLVPEWVD
 アナログペプチド#2 : Ac-VKLAKHKELAPYDEN
 アナログペプチド#3 : Ac-VKLAAAELAPYDEN

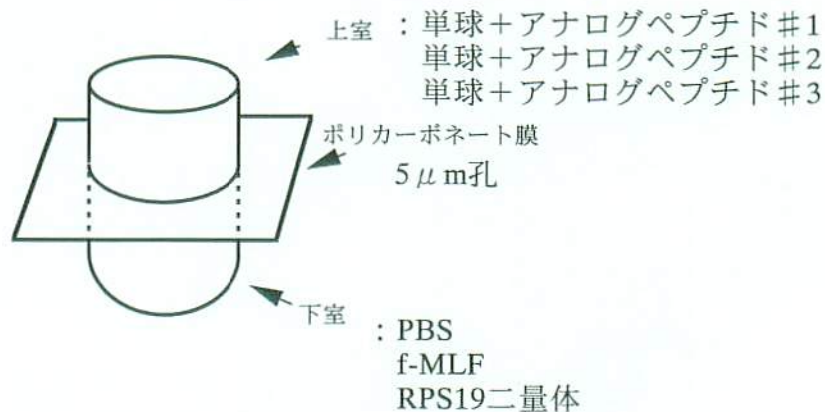


図7 : アナログペプチドを用いた競合的抑制法による第1リガンド部位の検索

アナログペプチド#2 (Ac-VKLAKHKELAPYDEN) で単球を前処理した場合、RPS19二量体による単球走化性は抑制されている。一方、f-MLFによる走化性には影響していない。また#2のKHK配列をAAAに置換したアナログペプチド#3では抑制が見られていない

プチド#3 (Ac-VKLAAAAELAPYDEN) を作成した。このペプチドは 10^3 mol/L では溶解困難であったために 10^4 mol/L 以下の濃度で実験に用いた。図7に示す様に、このアナログペプチド#3 (Ac-VKLAAAAELAPYDEN) は走化活性を抑制することはなかった。

以上の結果より、-Lys-His-Lys-の塩基性クラスター部分が第1結合には必須であると考えられた。

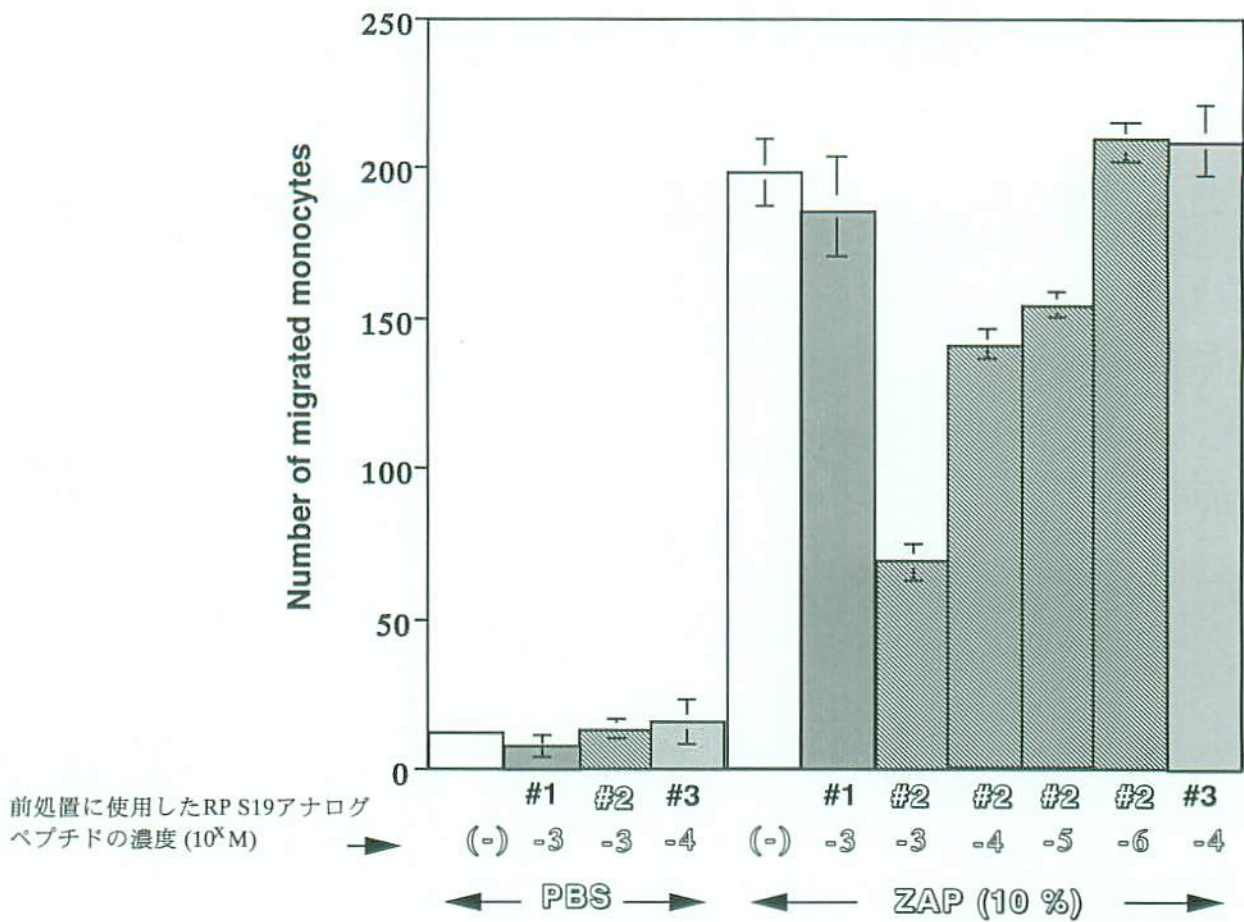
1-3) RPS19 二量体塩基性クラスター部アナログペプチドによる C5a 惹起の単球走化活性の抑制

C5a の第1リガンド部位もまた塩基性クラスターであり、His15,Arg46,Lys45 の3残基によって三次元的に構成されていると考えられている [9]。そこで、RPS19 二量体の第1リガンド部位と C5a の第1リガンド部位は C5aR の同一部位に結合している可能性が出てきた。そこで、RPS19 二量体第1リガンド部位のアナログペプチドが C5a (ZAP で代用) の惹起する単球走化性を阻害するかどうかの実験を行った。

図8に示す様に、RPS19 二量体の第1リガンドアナログペプチド (#2: Ac-VKLAKHKELAPYDEN) のみが濃度依存性に C5a に対する単球走化を抑制した。この実験に於いても、RPS19 二量体の第1リガンドアナログペプチドの Lys-His-Lys 部分を Ala に置換したアナログペプチド#3 (Ac-VKLAAAAELAPYDEN) は 10^4 mol/L の濃度で阻害作用を示さなかった。

1-4) 塩基性クラスターアナログペプチド自身の走化活性の欠除

これらの塩基性クラスター部のアナログペプチド自身の C5aR の活性化能の有無、



アナログペプチド #1 : Ac-LKKSGKLVPEWVD
 アナログペプチド #2 : Ac-VKLAHKELAPYDEN
 アナログペプチド #3 : Ac-VKLAAAELAPYDEN

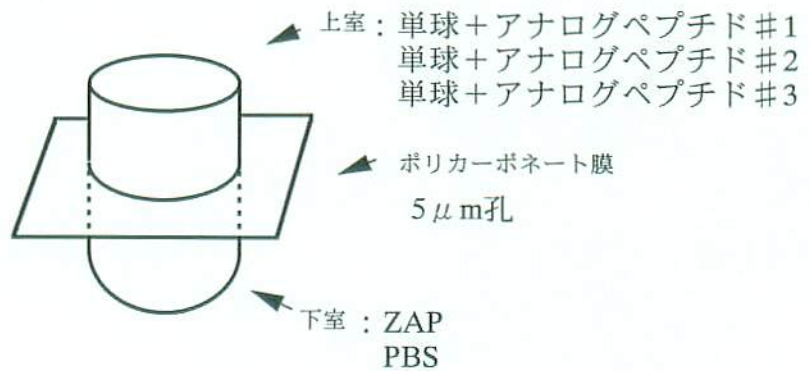


図 8 : RPS19第 1 リガンドアナログペプチドによる C5a(ZAP10%) の単球走化活性の抑制

アナログペプチド #2 (Ac-VKLAHKELAPYDEN) で単球を前処理した場合のみ、C5aによる単球走化は濃度依存的に抑制されている。他のアナログペプチドの場合では抑制を認めない。

つまり走化活性の有無について実験を行った。これらのペプチドには図9に示すように、 10^{-4} mol/Lにおいて、単球に対する走化性は認められなかった（データは示していないが 10^{-7} ~ 10^{-3} mol/Lの濃度範囲においても走化性を認めなかった）。

以上の結果から、RPS19二量体においてVal37~Asn51の部位がC5aRへの第1リガンド部位であると結論した。そしてC5aとC5aR間の第1結合と同様にこの結合はC5aRの細胞内シグナル伝達を惹起するトリガーにはならない。

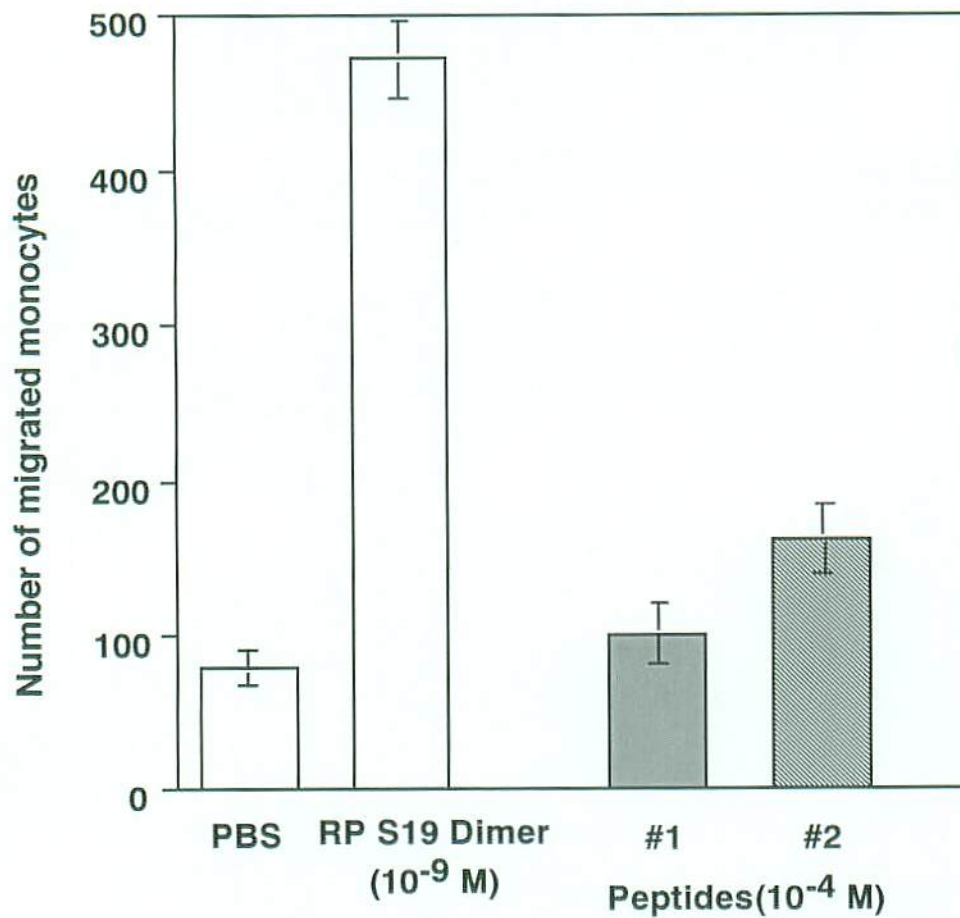
2) 単球 C5a レセプターに対する RPS19 二体の第2結合部位の同定

図10の模式図のように、RPS19二量体のAsp132側鎖の β カルボキシル基がC5aC末端のArg74の α カルボキシル基と同等の機能を持つことを前提に、RPS19二量体のC5aRへの活性部位である第2結合部位を-Leu131-Asp132-Arg133-であるとの仮説を立てた。

2-1) -Leu131-Asp132-Arg133-部位を変異させた変異型 RPS19 二量体の単球走化活性

この仮説を実証すべく、Leu131をAspに、Asp132をGlyに、Arg133をAlaにそれぞれ置換した変異型RPS19を作成し、それらの架橋二量体を調製した（データは示さないがXIIIa因子による二量体化の効率は野生型との間に差は認められなかった）。

図11に 10^{-9} mol/Lにおける単球の走化活性を示す。野生型二量体と比べ変異型二量体はいずれも活性が有意に低かった。データは示していないが、変異型二量体は 10^{-13} ~ 10^{-7} mol/Lの濃度範囲で実験したが、いずれの場合も減弱した活性しか認めなかった。これらの結果から、RPS19二量体の-Leu131-Asp132-Arg133-部位が、C5aのC末端部-Leu72-Gly73-Arg74-COOHと同様に機能し、第2結合部位としてC5aRの活性化を引き起こすことが強く示唆された。つまり、RPS19二量体Asp132の側鎖の β カルボキシル



アナログペプチド #1 : Ac-LKKSGKLVPEWVD
 アナログペプチド #2 : Ac-VKLAHKELAPYDEN

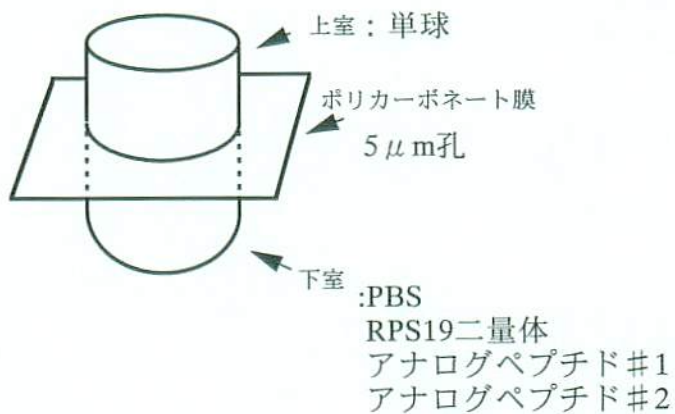
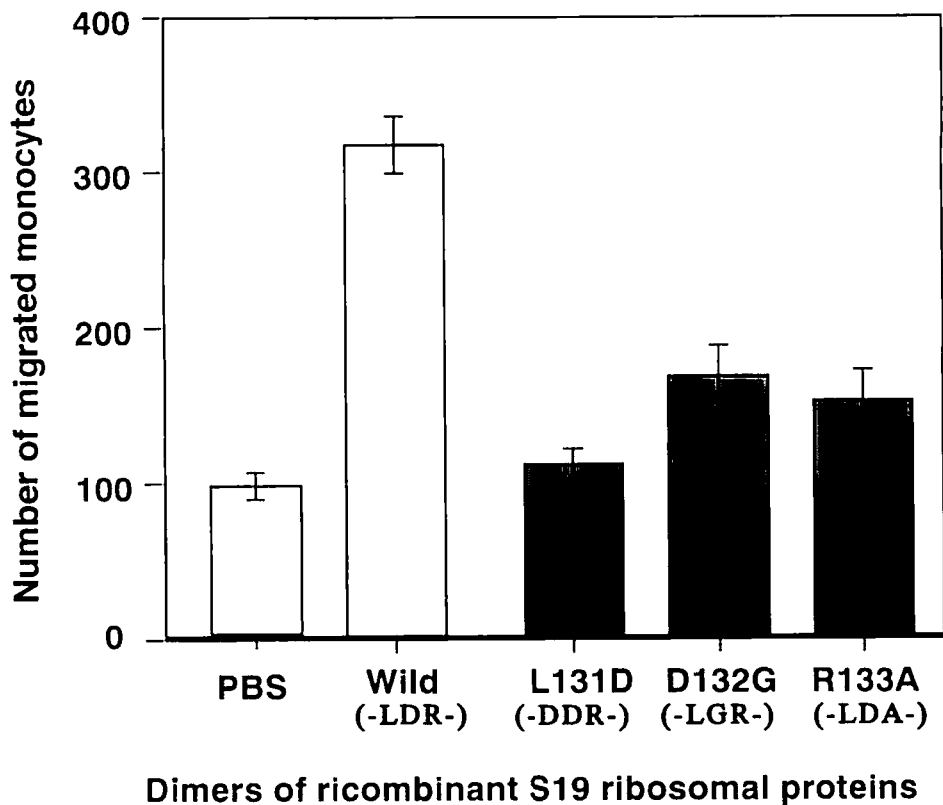


図 9 : RPS19第1リガンドアナログペプチド #1、#2の単球の走化性の欠除
 アナログペプチド #1およびアナログペプチド #2自身には単球走化活性を認めない。



変異型3(-DDR-) : Leu131Asp-RP S19

変異型4(-LGR-) : Asp132Gly-RP S19

変異型5(-LDA-) : Arg133Ala-RP S19

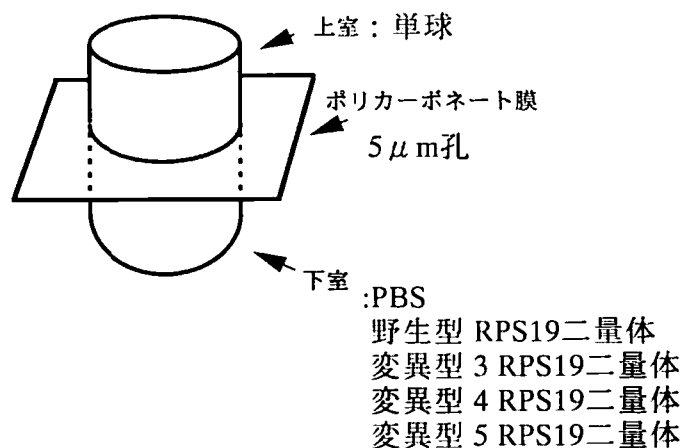


図 1 1 : 第2リガンド候補部位のアミノ酸を置換した変異型RPS19二量体の単球走化活性

3種類の変異型 RPS19二量体の単球に対する走化活性は野生型型に比べて有意にいずれも低い。

基は C5aArg74 の α カルボキシル基と同等に機能すると考えられる。

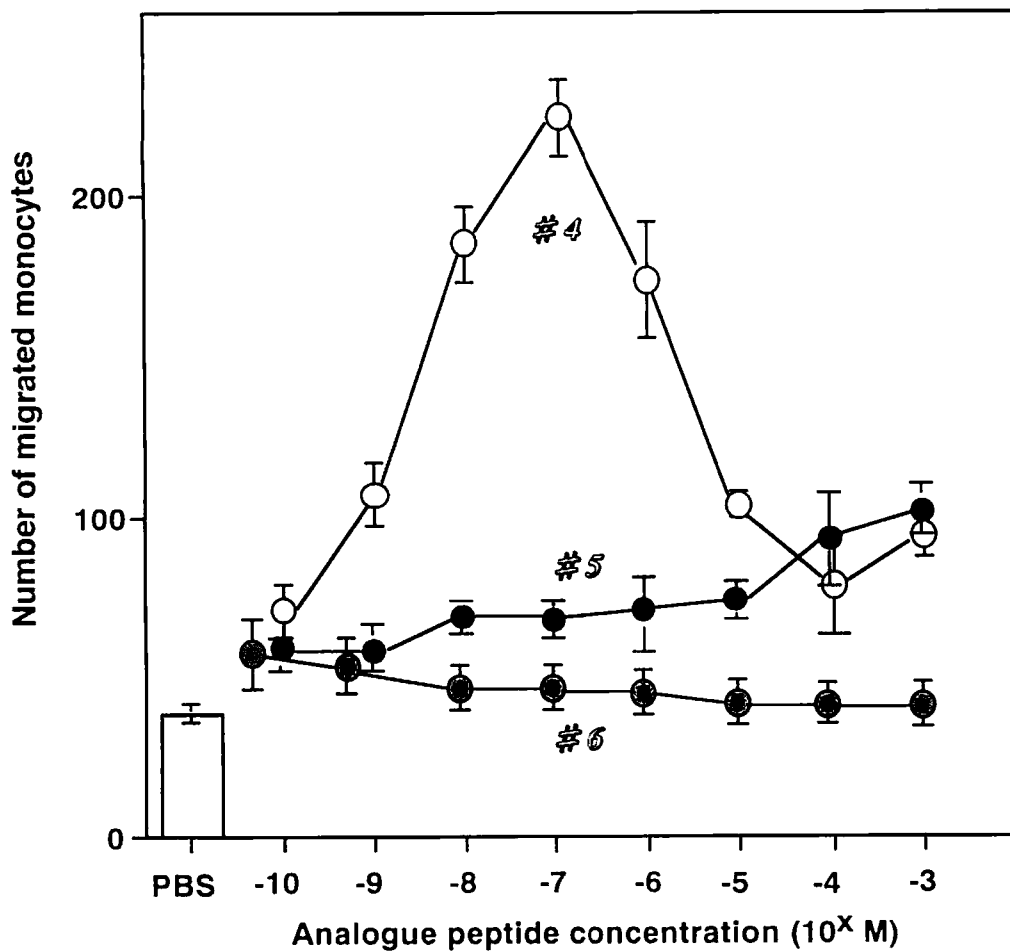
2-2) -Leu131-Asp132-Arg133-部位を含む RPS19 アナログペプチドの単球走化性

上記の結論をさらに確実にするために、RPS19 の Gly127 から Lys144 までの 18 アミノ酸残基部分のアナログペプチド #4(Ac-GQRDLDRAGQVAAANKK)と C 末端部分のアナログペプチド #6 (IAGQVAAANKKH) を作成した。#4 は C 末端部が走化性に関与していないことを確認するためにアナログペプチドの C 末端の His を削除した。

図 1 2 にこのペプチド #4 と #6 の単球に対する走化性を示す。予想通り、C 末端部のアナログペプチド #6 は全く走化性を示さなかった。一方、アナログペプチド #4 には、白血球走化因子に典型的なつり鐘形パターンの濃度・機能相関を呈する単球走化性を認めた。ただし、最大活性を示す濃度は 10^{-7} mol/L であり、これは RPS19 二量体の 100 倍高い濃度である。さらに RPS19 二量体の Asp132 の β カルボキシル基が必須であることを確認するために Asp132 に相等する #4 の Asp を Gly に置換したアナログペプチド #5 (Ac-GQRDLGRIAGQVAAANKK) を作成した。このアナログペプチド #5 は単球走化性を明らかに喪失していた(これら 3 種のアナログペプチドは 10^{-3} mol/L の濃度において細胞毒性は認めていない)。

2-3) -Leu131-Asp132-Arg133-部位を含む RPS19 アナログペプチドの RPS19 二量体の単球走化性に対する競合阻害

単球に対して走化活性を示したアナログペプチド #4 (Ac-GQRDLDRAGQVAAANK-K)と Asp6 を Gly6 に置換して走化性を喪失させたアナログペプチド #5 (Ac-GQRDLGRIAGQVAAANKK) をそれぞれ用いて (濃度は 10^{-4} mol/L)、単球をあらかじめ 37°C , 10 分間の処置をした後、RPS19 二量体による走化活性実験を行った。



- アナログペプチド #4 (Ac-GQRDLDRIGQVAAANKK)
- アナログペプチド #5 (Ac-GQRDLGRIAGQVAAANKK)
- アナログペプチド #6 (IAGQVAAANKKH)

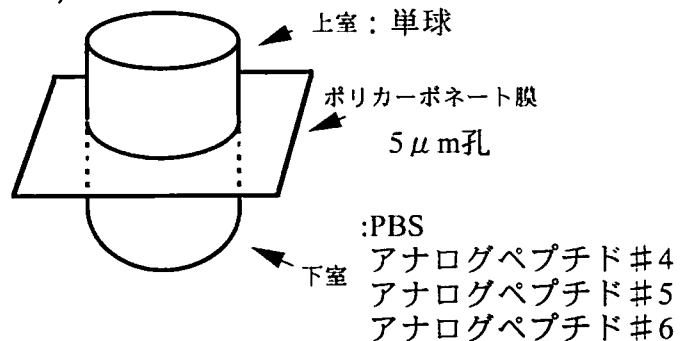


図 1 2 : RPS19アナログペプチドを用いた第 2 リガンド部位の検索

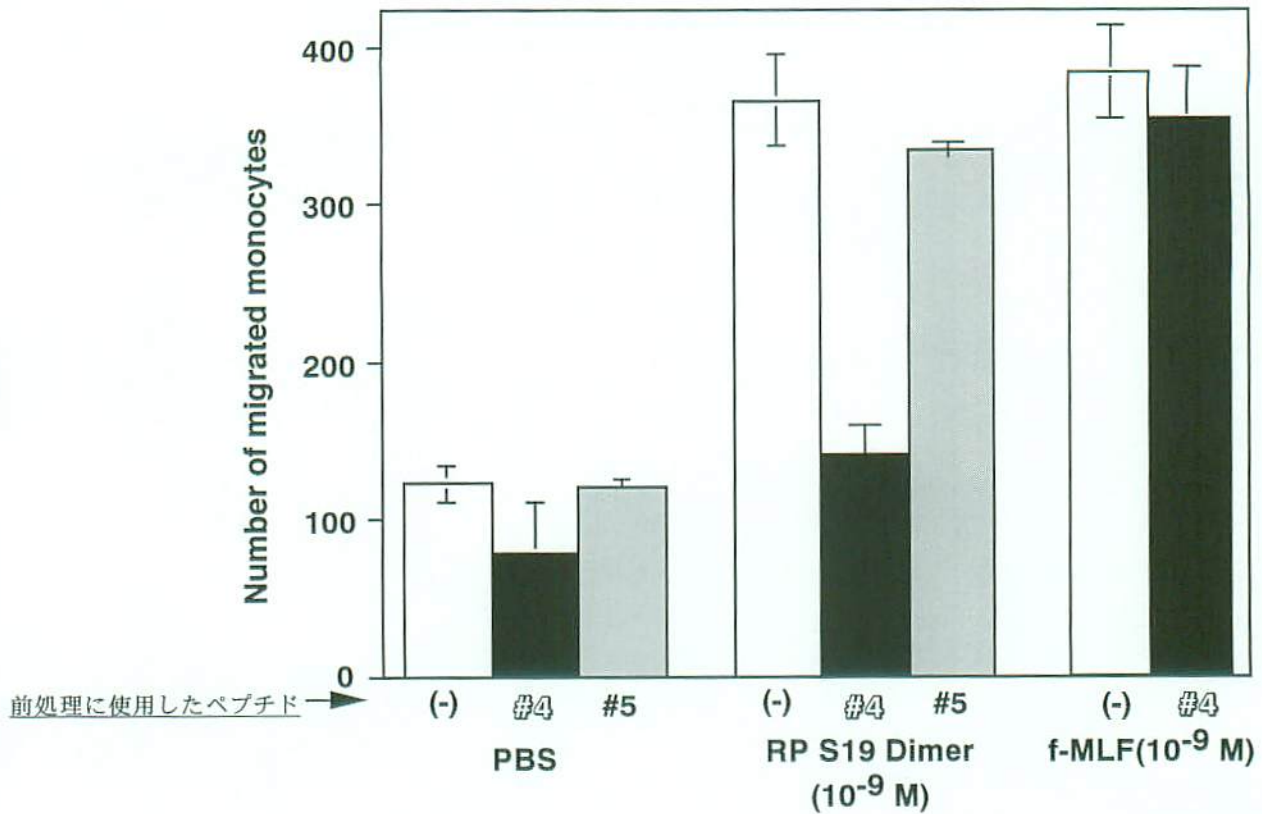
RPS19のGly127からLys144までの18アミノ酸残基部分のアナログペプチド #4(Ac-GQRDLDRIGQVAAANKK)は単球に対する走化性を認める。このアナログペプチドの濃度機能相関曲線は白血球走化因子に典型的な釣り鐘形パターンを示す。#4のAspをGlyに置換したアナログペプチド#5、およびRPS19のC末端部分のペプチド#6は走化活性を認めない。

図 1 3 に示すように、機能的アナログペプチド #4 (Ac-GQRDLDRAGQVAAANKK) で前処理を行うと、RPS19 二量体による単球の走化活性が阻害された。一方、機能を失ったアナログペプチド #5 (Ac-GQRDLGRIAGQVAAANKK) には阻害効果は認められなかった。この抑制効果の C5aR 特異性を確認するために、細菌由来の遊走因子 f-MLF による走化活性を阻害するか否を見たところ、両ペプチドともに阻害効果を認めなかった。以上の結果は、C5aR の活性を高める RPS19 二量体の第 2 リガンド部位は RPS19 二量体の C 末端部位ではなく、-Leu131-Asp132-Arg133-部位であるという我々の仮説をさらに確実にしたと言える。

2-4) C5a レセプターアンタゴニストによる、-Leu131-Asp132-Arg133-部位を含むアナログペプチドの単球走化性の阻害

アナログペプチド #4 (Ac-GQRDLDRAGQVAAANKK) が C5aR を介して単球を走化させている事を確認するために、C5aR のアンタゴニストである NMcPhe-Lys-Pro-dCha-dCha-dArg ペプチドを用意した (このアンタゴニストの C5a に対する効果に関しては Konteatis ら [19]、RPS19 二量体に対しては Nshiura ら [6] によってすでに報告されている)。RPS19 二量体の第 2 リガンドアナログペプチドであると証明したペプチド #4 による単球走化性を、NMcPhe-Lys-Pro-dCha-dCha-dArg ペプチドが阻害できるか否かを検討した。

図 1 4 に示すように C5aR アンタゴニスト (NMcPhe-Lys-Pro-dCha-dCha-dArg) は、C5a に対する抑制の場合と同様の濃度依存性のもとに、ペプチド #4 による単球走化性を抑制した。この結果から、RPS19 二量体の第 2 結合リガンドアナログペプチドは確かに C5aR を介して単球に作用していることが確認されると同時に、第 2 リガンドに対する C5aR の結合部位が C5a と RPS19 二量体間で共通であることが示された。



アナログペプチド #4 (Ac-GQRDLDR^IAGQVAAANKK)

アナログペプチド #5 (Ac-GQRDLGR^IAGQVAAANKK)

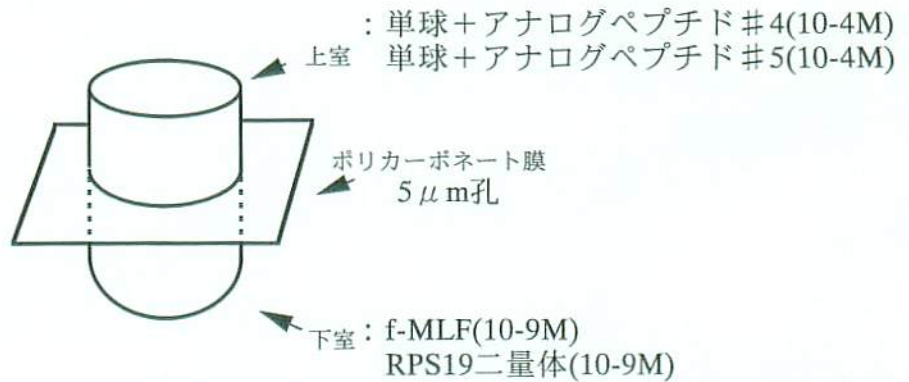
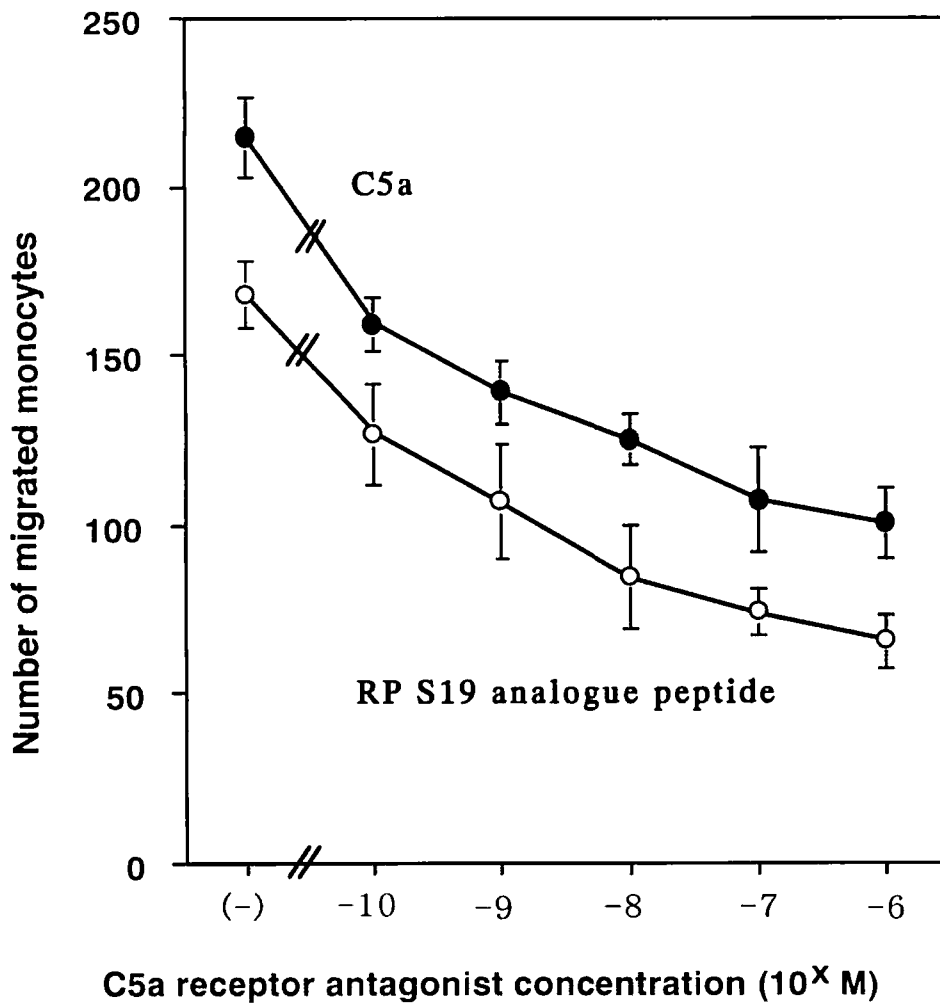


図 1 3 : 第 2 リガンド 候補 部位 の アナログ ペプチド を 用い た 単球 走化 性 の 競合 阻害

機能的アナログペプチド #4 (Ac-GQRDLDR^IAGQVAAANKK) で前処理を行うと、RPS19二量体による単球走化性が抑制されている。一方、f-MLFによる走化性には影響していない。また、走化活性を失ったアナログペプチド #5は抑制能も喪失している。



C5aRアンタゴニスト (NMePhe-Lys-Pro-dCha-dCha-dArg)

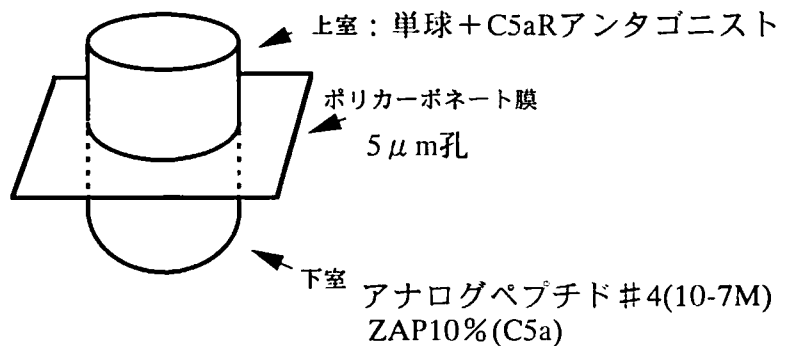


図 14 : C5aRアンタゴニストによるRPS19二量体第2リガンドアナログペプチドの単球走化性の抑制

C5aRアンタゴニストはC5aに対する抑制の場合と同様、濃度依存性のもとにペプチド#4 (RPS19二量体の第2リガンドペプチド) による単球走化を抑制している。

3) RPS19 二量体の多核白血球 C5a レセプターに対するアンタゴニスト部位の同定

3-1) RPS19 二量体第 2 リガンドアナログペプチドの細胞選択的白血球走化活性 (C5a アナログペプチドとの比較)

C5a のアナログペプチドであるデカペプチド(YSFKDMQLGR) の白血球に対する走化活性については、Finchi らにより C5a のそれをよく再現することが報告されている [16]。このペプチドと RPS19 二量体の第 2 リガンドアナログペプチド (#4: Ac-GQRDLDR-AGQVAAANKK) の両者について、単球および多核白血球についての走化活性を比較した。図 15 にその結果を示す。

C5a アナログペプチドは単球と多核白血球の両者に対して走化性を認めるが、RPS19 二量体の第 2 リガンドアナログペプチドは、RPS19 二量体の場合と同様に [6] 単球に対しては走化性を示すが多核白血球に対しては示さなかった。RPS19 二量体の第 2 リガンドアナログペプチド #4 にも 10^{-3} mol/L までの濃度において多核白血球に対する細胞毒性は認めなかった。

3-2) RPS19 二量体第 2 リガンドアナログペプチドの多核白血球 C5a レセプターに対するアンタゴニスト効果

調製した多核白血球を、走化性実験に使用する直前に RPS19 二量体の第 2 リガンドアナログペプチドで 4℃、10 分間処置して実験に用いた。図 16 にその結果を示す。

RPS19 二量体の第 2 リガンドアナログペプチドは C5a アナログペプチドによる多核白血球の走化を濃度依存的に抑制した。すなわち、RPS19 二量体第 2 リガンドアナログペプチドは多核白血球の C5aR に対して RPS19 二量体と同様にアンタゴニスト効果を持つことが明らかとなった。一方、f-MLF の多核白血球走化性に対しては影響を及ぼさなかった。

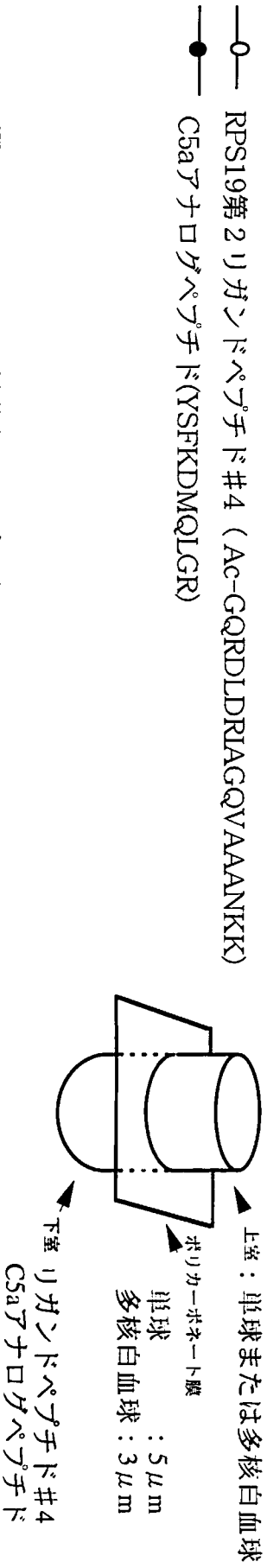
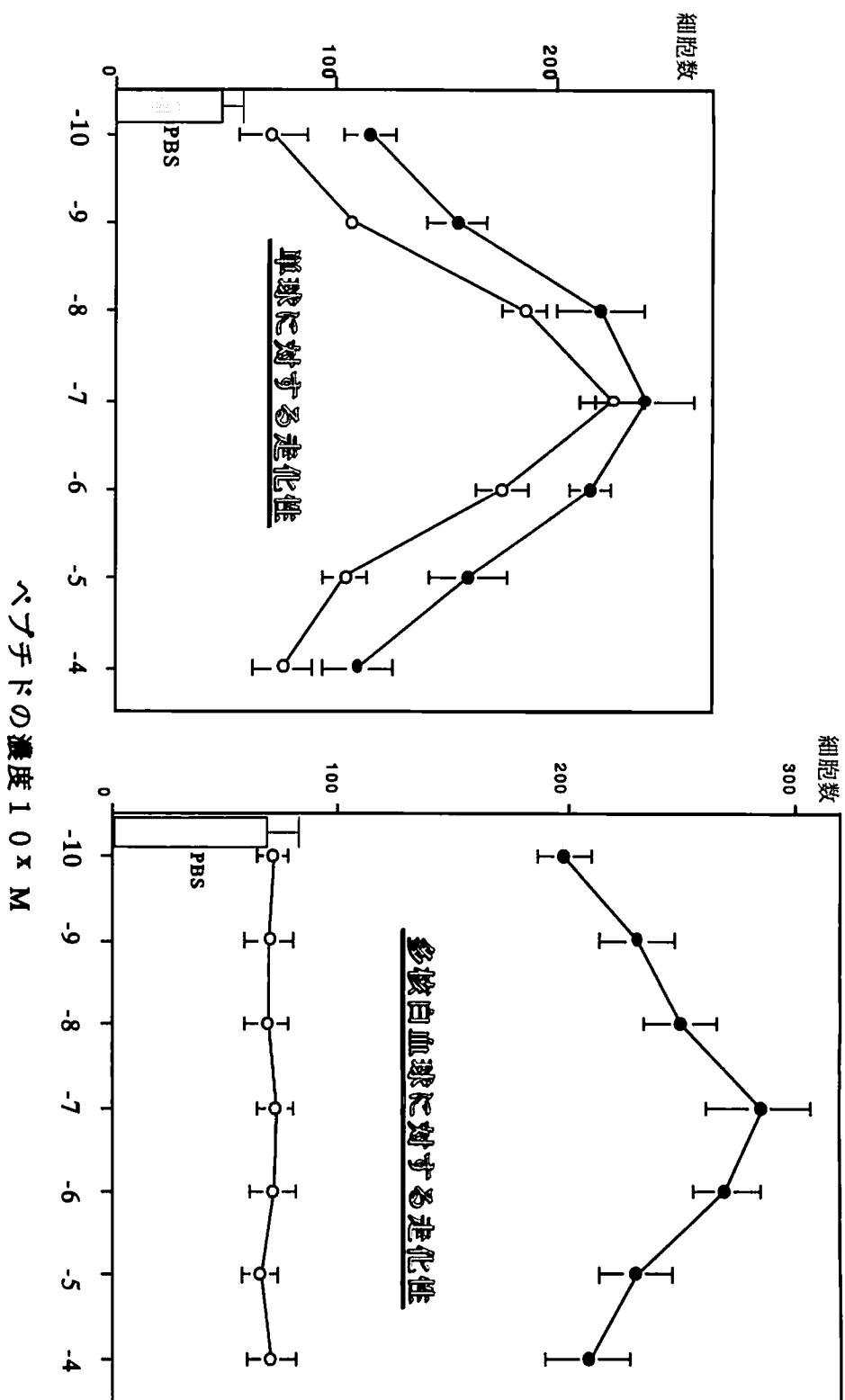
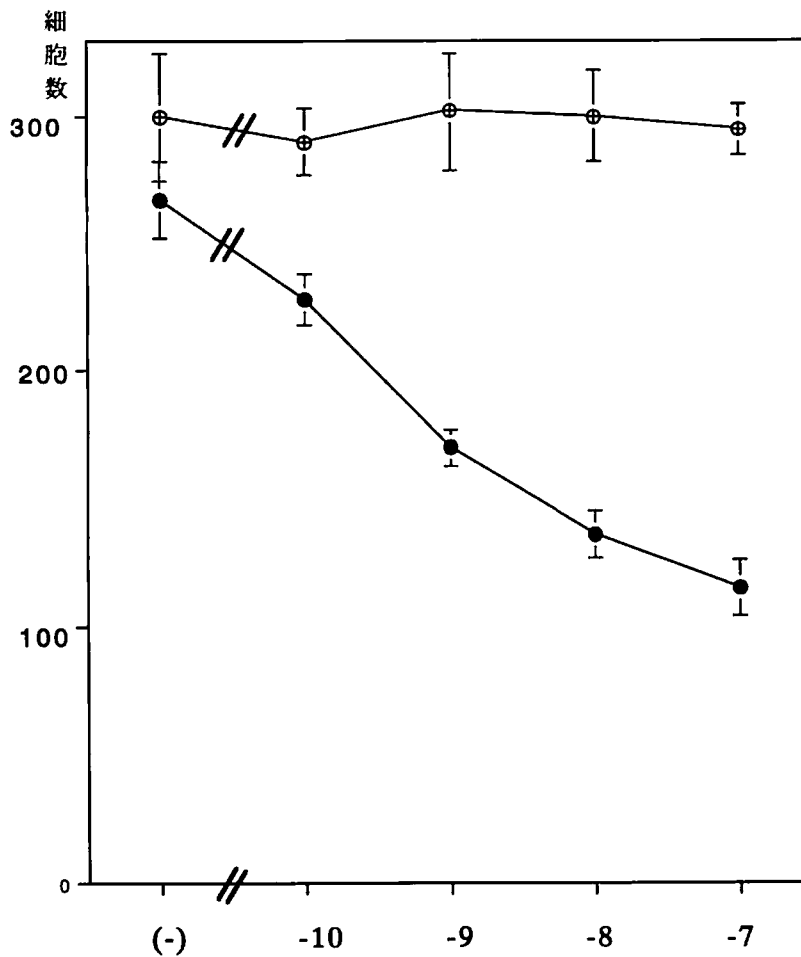


図 15 : RPS19二量体第2リガンドアナログペプチドの単球選択的な走化活性 (C5aアナログペプチドとの比較)



RPS19第2リガンドペプチド#4;Ac-GQRDLRIAGQVAAANKK
の濃度 10^X M

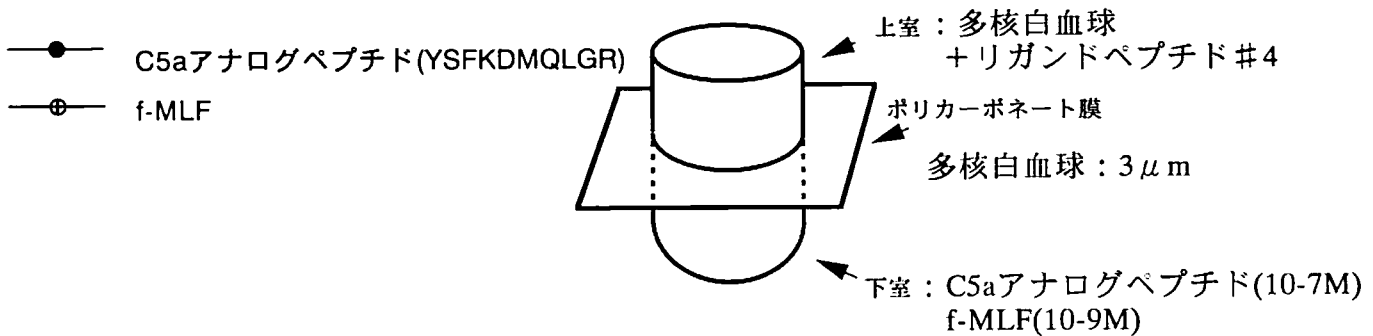


図16：RPS19第2リガンドペプチドによるC5aアナログペプチドの多核球走化活性の抑制

第2結合リガンドペプチド#4は多核白血球のC5aアナログペプチドによる走化性を阻害しているが、f-MLFには影響していない。すなわちペプチド#4は多核白血球のC5aRに対してアンタゴニスト効果を示している。

これらの結果は、RPS19 二量体の第 2 リガンドアナログペプチド分子中には多核白血球の C5aR に対してアゴニスト作用をアンタゴニスト作用に変化させる部位が含まれていることを示している。その部位は第 2 リガンド部位である-Leu-Asp-Arg-配列の N 末端側 4 残基か、C 末端側の 11 残基中に存在することになるが、私は C 末端領域にこの変換機構が存在する可能性が高いと考えた。

3-3) C5a アナログペプチドに RPS19 の C 末端領域を接続したキメラペプチド(YSFKDMQLDRIAGQVAAANKKH) による細胞選択的白血球走化性

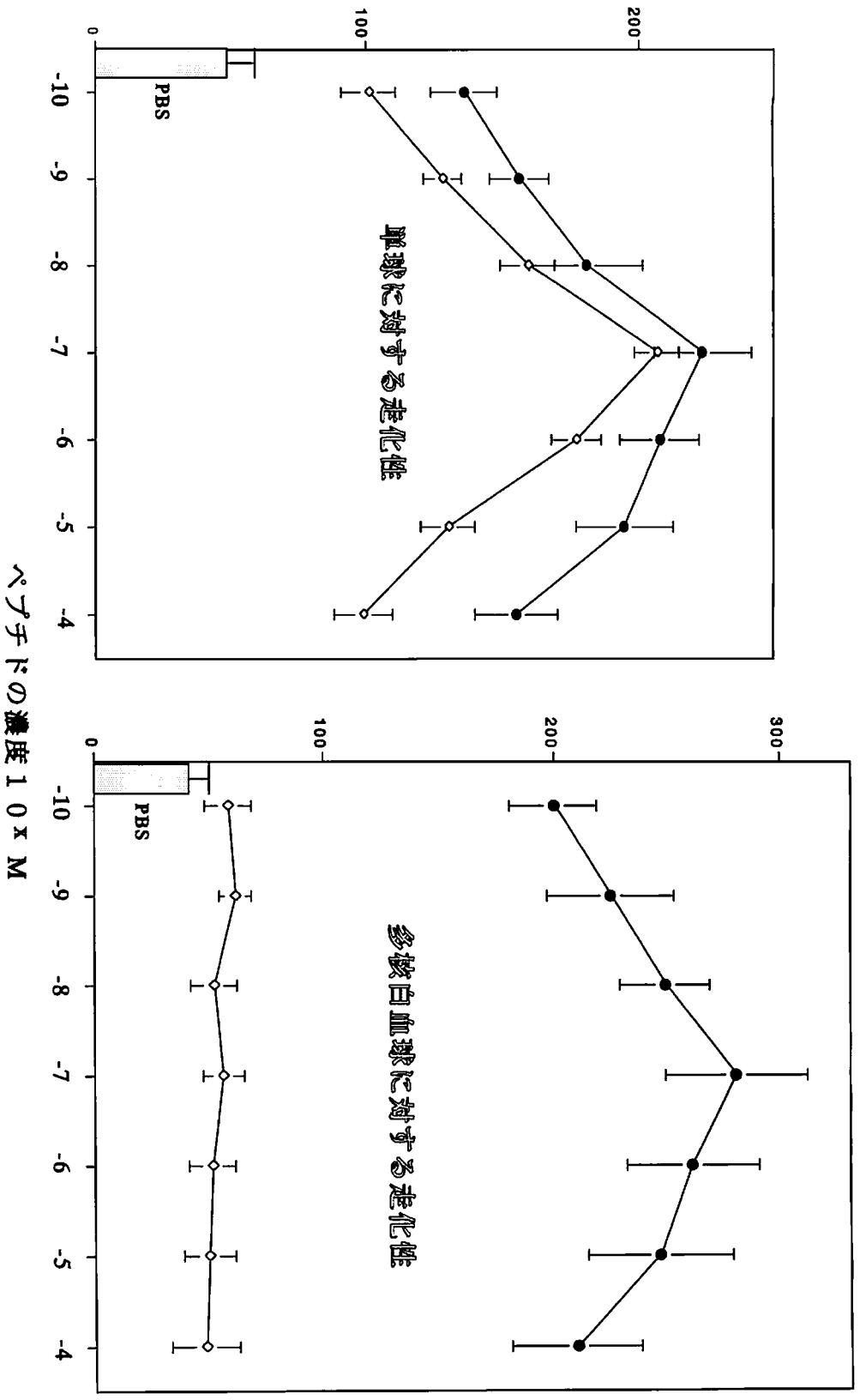
上記の可能性を検討するために、C5a アナログペプチドの C 末端に、RPS19 の C 末端の 12 アミノ酸残基を切り取った部位を連結させたアナログペプチドを考案した。この際、C5a アナログペプチド-Leu-Gly-Arg-の部位の Gly9 を Asp9 に置換してリガンド活性を保持させる必要があると考えた。そして、このキメラペプチド 1 (YSFKDMQLDRIAGQVAAANKKH) を用いて実験を行った。

まず、キメラペプチド 1 と C5a アナログペプチドについて単球および多核白血球の走化活性を比較検討した。

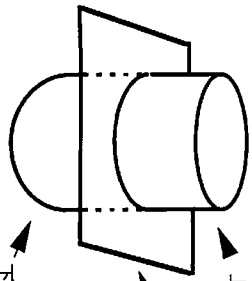
図 17 の結果のように、キメラペプチド 1 (YSFKDMQLDRIAGQVAAANKKH) の単球に対する走化活性は C5a アナログペプチドと同程度認めるものの、多核白血球への走化活性は消失していた。

3-4) キメラペプチドの多核白血球 C5a レセプターに対するアンタゴニスト効果

次に、キメラペプチド 1 (YSFKDMQLDRIAGQVAAANKKH) の C5aR に対するアンタゴニスト効果の確認実験を行った。同時に RPS19 の C 末端部のみで抑制効果が発揮



● C5aアナログペプチド(YSFKDMQLGR)
 ◇ キメラペプチド 1 (YSFKDMQLDRLAGQVVAANKKH)



上室：単球または多核白血球
 ポリカアクリルアミド膜
 単球 : 5 μ m
 多核白血球 : 3 μ m
 下室 : C5aアナログペプチド
 キメラペプチド 1

図 17 : RPS19C末端部連結による単球選択的走化性の出現

できるか否かも検討した。調製した多核白血球を、キメラペプチド 1 あるいは RPS19C 末端部アナログペプチド #6 (IAGQVAAANKKH) にて 4℃,10 分間の処置 (ペプチドの濃度は 10^{-10} ~ 10^{-6} mol/L) を行い、続いて C5a アナログペプチドによる走化性実験を行った。図 18 にその結果を示す。

キメラペプチド 1 は C5a アナログペプチドの多核白血球に対する走化活性を濃度依存的に抑制することが確認された。しかし、RPS19C 末端部アナログペプチド #6 は、 10^{-10} ~ 10^{-6} mol/L の濃度においても多核白血球の C5a アナログペプチドによる走化活性を阻害できなかった。

これらの結果、RPS19 の C 末端部分には、多核白血球の C5aR に対する作用をアゴニストからアンタゴニストに変換させる部位が存在することが明らかになった。ただし、この機能発現にはアゴニスト分子と連結している必要があることが示唆された。

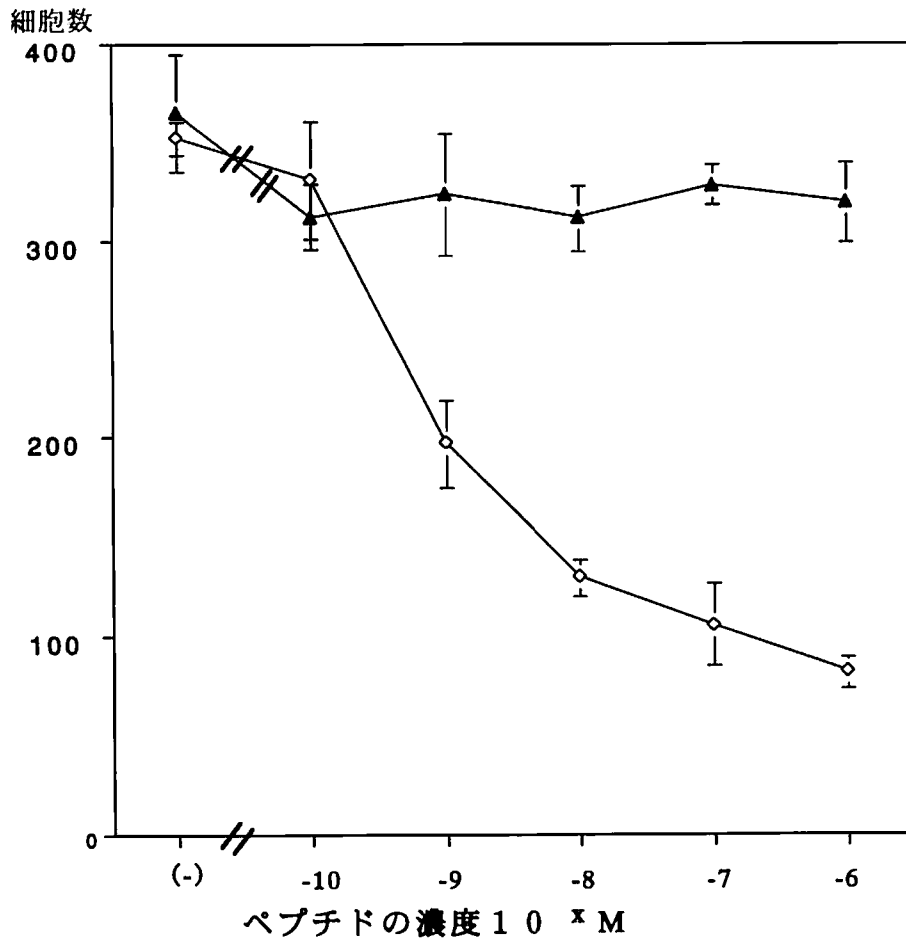
3-5) C 末端 2 残基欠損キメラペプチド(YSFKDMQLDRIAGQ-VAAANK)の細胞選択的走化性の喪失

多核白血球の C5aR を介した走化作用において、アゴニスト作用からアンタゴニスト作用に変換する RPS19 の C 末端部分のどこが機能上必要不可欠なのかを決定するために、キメラペプチド 1 の C 末端部分を 1 残基ずつ切り詰めた配列を持つペプチドを用意し、走化性実験を行った。

キメラペプチド 1 (YSFKDMQLDRIAGQVAAANKKH)

キメラペプチド 2 (YSFKDMQLDRIAGQVAAANKK)

キメラペプチド 3 (YSFKDMQLDRIAGQVAAANK)



- ▲— RPS19C末端部アナログペプチド #6 (IAGQVAAANKKH)
- キメラペプチド 1 (YSFKDMQLDRIAGQVAAANKKH)

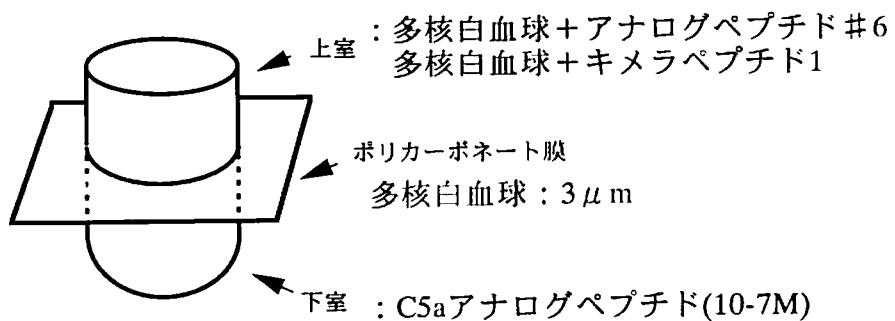


図 18 : キメラペプチドによる多核球走化の抑制

キメラペプチド 1 は C5a アナログペプチド による多核白血球の走化性を阻害している。RPS19C 末端部配列を持つアナログペプチド #6 には阻害作用は認められない。

キメラペプチド1のC末端のHis22を削除したものがキメラペプチド2、Lys21-His22を削除したものがキメラペプチド3である。図19にその結果を示す。

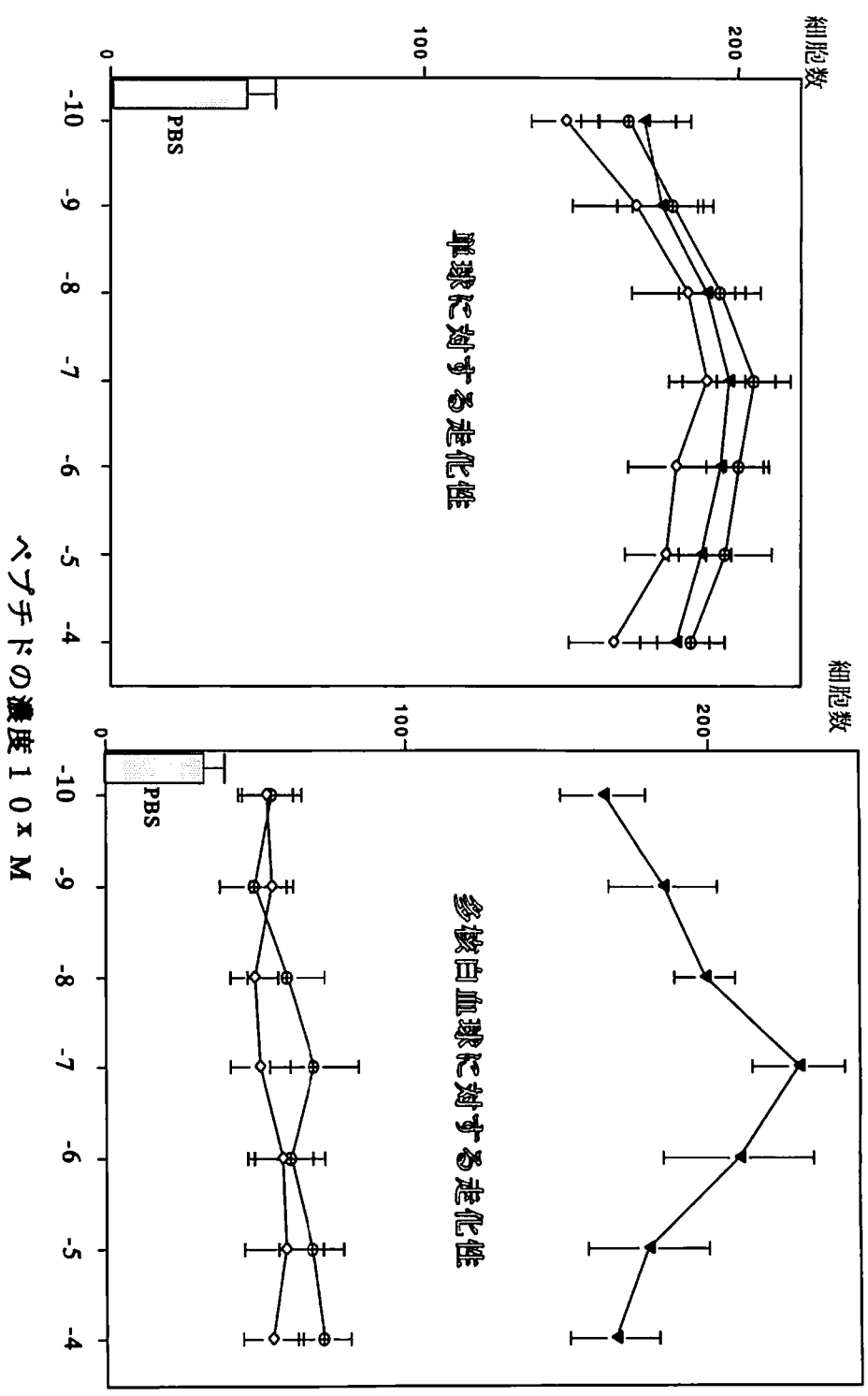
C末端の-Hを欠失させてもキメラペプチドの単球特異性は維持されているが、-KHが欠失すると細胞選択性がなくなり、多核白血球に対しても走化活性作用が出現した。この結果から、多核白血球のC5aRへのアンタゴニスト効果については-IAGQVAAANK-KH部位の-IAGQVAAANKKが重要であり、C末端部の-Hisは必要ないことが明らかになった。

3-6) C末端部位欠損の変異型RPS19二量体の細胞選択性の喪失

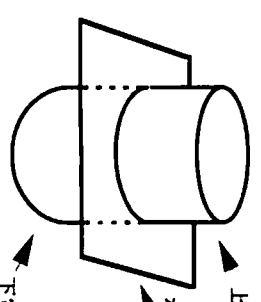
多核白血球C5aRに対するアゴニスト・アンタゴニスト切り換え機能がRPS19二量体のC末端部に存在することを確かめるために、RPS19のC末端部のAsn142-Lys143-Lys144-His145の4残基を欠失させた変異型RPS19（変異型6；Asn142-Lys143-Lys144-His145-deletion-RPS19）の架橋二量体を調製し、単球と多核白血球に対する走化性について実験した。その結果を図20に示す。

この変異体RPS19の二量体は単球のみならず多核白血球に対しても走化活性を示した。一方、正の対照としての野生型のRPS19二量体は単球に対してのみ走化活性を示した。

以上の結果より、C5aRを介したRPS19二量体の多核白血球走化性においてRPS19のC末端部分がアゴニストからアンタゴニストへの切り換えに参与している事が証明された。



- キメラペプチド1 (YSFKDMQLDRAGQVAAANKKH)
- キメラペプチド2 (YSFKDMQLDRAGQVAAANKK)
- ▲ キメラペプチド3 (YSFKDMQLDRAGQVAAANK)



上室：単球または多核白血球
 ポリアセチレン膜
 単球 : 5 μ m
 多核白血球 : 3 μ m

下室：
 キメラペプチド1
 キメラペプチド2
 キメラペプチド3

図 19：キメラペプチドのC末端2残基目の欠損による単球選択性の喪失

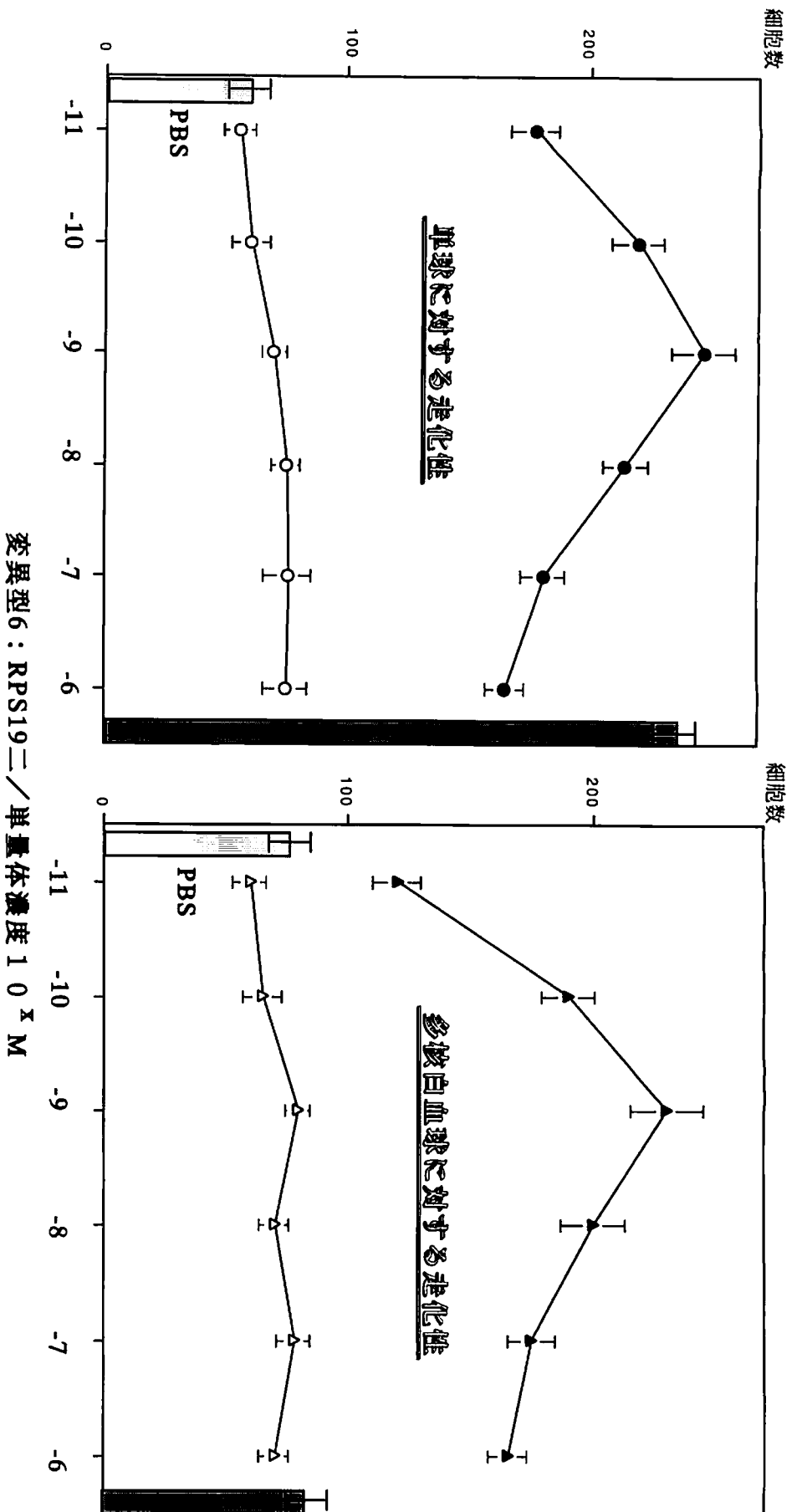


図 20: RPS19二量体のC末端4残基の欠失による多核白血球走化性の出現

⑧ 考 察

この研究結果によって RPS19 二量体が C5a と同様に、2 段階反応様式によって C5a レセプターに作用することが証明された。RPS19 二量体分子上の第 1 結合部位は塩基性側鎖群を持つ-Lys38~Lys43-（特に-Lys41-His42-Lys43-配列）であり、第 1 結合そのものは G 蛋白結合シグナルのトリガーにはなっておらず、恐らく RPS19 二量体と C5a レセプター間の第 2 結合のアフィニティーを高める働きを担っているのだろう。これは、単球を最大に走化させる至適濃度が RPS19 二量体では 10^9 mol/L であるのに対し、第 2 リガンドアナログペプチド（Ac-GQRDLDRAGQVAAANKK）では、その 100 倍の濃度の 10^7 mol/L（図 8）が必要であったことから推察できる。

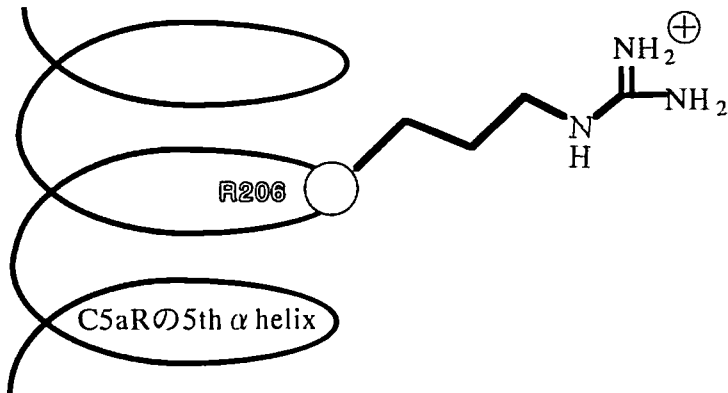
RPS19 二量体の第 1 リガンドアナログペプチドは RPS19 二量体のみならず、C5a の惹起する単球走化性を抑制した（図 4）。この第 1 リガンド-Lys41-His42-Lys43-は C5a の His15、Arg46、Lys49 の塩基性クラスター部分と直接競合していることになる。つまり、C5a と RPS19 二量体は C5aR 分子上の第 1 リガンド受容部位を共有していると言える。

C5aR の第 1 リガンド受容部位は図 21 に示した NH₂ 末端部分の Asp 残基を多数含む酸性残基部分と言われている [26]。更に最近、Tyr11 と Tyr14 の側鎖が硫酸化されており、その硫酸化がレセプター機能に極めて重要であることが報告された [27]。だが、Asp 残基や硫酸化 Tyr 残基の酸性部位が直接的に C5a の第 1 リガンド部位の塩基性側鎖と塩結合しているのかどうかは未だ証明されていない。これらの酸性側鎖は第 1 リガンドに対する高親和性ポケットを形成するのに必要だとの考えも残る。[26]。しかし、今回の研究結果からすると、RPS19 二量体の第 1 リガンド部位が 1 次構造上の塩基性アミノ酸の 3 連続によって構成されている故、前者である可能性が高いと思われる。

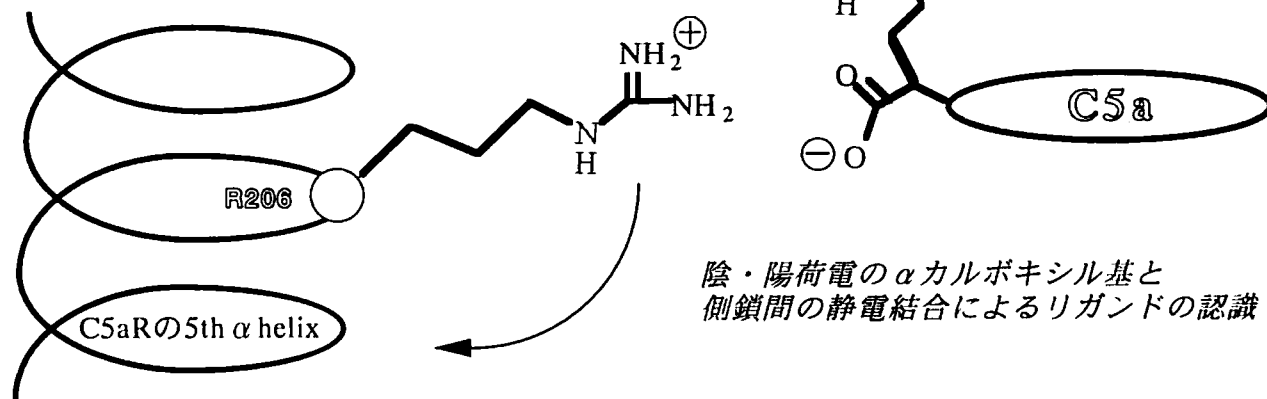
第2結合リガンドに関しては、RPS19二量体の-Leu131-Asp132-Arg133-部分には、C5aがC5aRを活性化する部位である-Leu72-Gly73-Arg74-COOHと同様の機能があることが証明された。Asp132特異的変異RPS19二量体や、C5aのGly73相当部をAspに変換してC末端Arg74にペプチドを連結させたキメラペプチドを用いた実験から、RPS19二量体のAsp132側鎖の β カルボキシル基は、C5aC末端Arg74の α カルボキシル基と同じ機能を持つことになる。これを逆から証明する方法は、RPS19のAsp132をGlyに置換しArg133の後のIle134以降のC末端を切り詰めたダブルミュータントのRPS19を作成し、二量体化して走化性を持つ事を示すことであろう。が、この場合、RPS19が架橋二量体化するのに必要であるGln137部位を欠除してしまうため、この実験は不可能である。しかし、その実験を待つまでもなくC5aとRPS19二量体のそれぞれの第2リガンド部位とC5aRの相互作用ならびに引き続くレセプター活性は共通であることが強く示唆される。現在提唱されているC5aによるC5aレセプターの活性化機構モデル[13]を図22に示す。

C5aレセプターはG蛋白結合レセプターファミリーの一員であり、細胞内外の親水性ループで結合した7つの膜貫通性疎水性 α ヘリックスという共通構造を持つ。C5aRの活性化は、膜貫通性の7つの α ヘリックスにより構成された円筒の内腔に、C5aのC末端部位が入り込むことによって生じるとされている。その際、C5aRの第5 α ヘリックスの上方から3番目に位置しているArg206の側鎖がレセプター活性化に重要であると言われている[13]。C5aRのArg206のグアニジノグループの側鎖(陽性電荷部)が、まずC5aC末端の α カルボキシグループの陰性電荷部位との相互作用によって認識され、その後引き続いてC5aC末端部のArg74の側鎖のグアニジノグループの陽性電荷部がその静電結合を妨げ、C5aRのArg206の側鎖は大きく位置を変化させる。この側鎖の位置変化によるレセプターの構造変化がG蛋白結合変換機構の活性化シグナ

Resting State



Ligand Binding and Activation



Active State

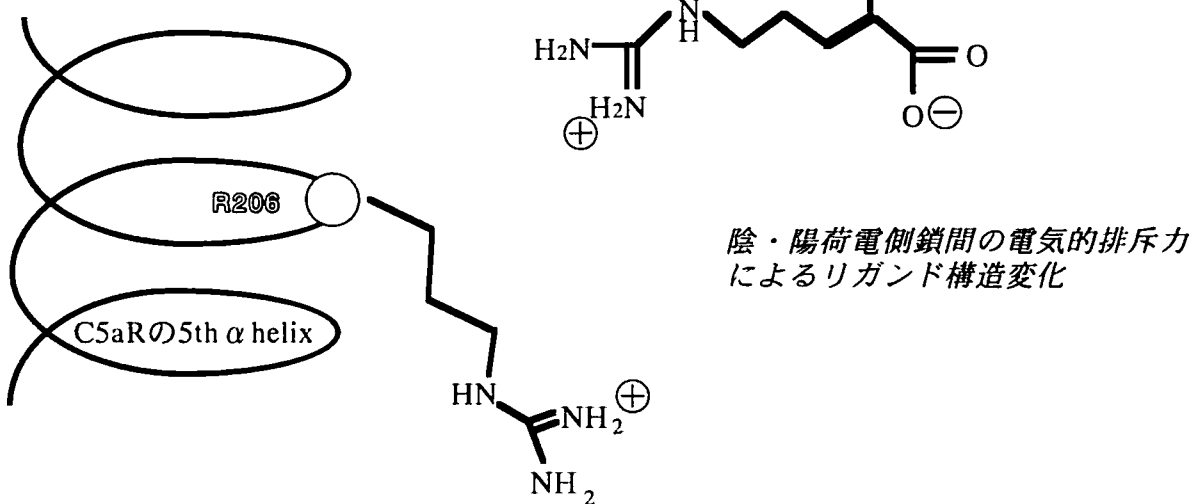


図 2 2 : C5aレセプターのArg206とC5aC末端Arg74の相互作用

C5aRのArg206の側鎖の大きな位置移動がレセプター活性化を引き起こすとされる。
Julie A.ら [14] の報告を参考にした。

ルとなるというものである [12]。この相互作用については C5aArg74 の α カルボキシル基と側鎖グアニジノ基との位置関係はそれほどの厳密さを要求されていない。というのも C5a の Arg74 (L-Arg74) を D-Arg に置き換えた場合でも、アゴニスト作用は保持されていたからである [13]。このようにグアニジノグループとカルボキシグループが厳密な位置関係を必要としない分子機構のために、RPS19 二量体の場合では、Asp132 の β カルボキシグループと Arg133 のグアニジノグループが同じ機能を発揮しているのだろう。

RPS19 二量体の第 1 結合部位や第 2 結合部位に類似させて作成した合成ペプチドは各々単量体で作用した。しかしながら RPS19 が活性を持つには、XIIIa 因子または II 型トランスグルタミナーゼによる Gln137 部位での架橋二量体化が必要である [4,5]。

同様に、RPS19 単量体は放射標識 C5a の C5aR への結合を競合阻害することはなかった。これらのことから RPS19 は単量体の場合、機能的な部位（第 1、第 2 リガンド部位）が立体構造において隠れた状態であることが推測される。Gln137 部位での架橋二量体化すると、構造変化を生じ、両機能部位が表面に現れ活性を示すものと思われる。

今後、RPS19 の単量体と二量体の立体構造解析が待たれるところである。

今回の研究は、RPS19 二量体の C 末端部位が、多核白血球の C5aR を介する走化性発現において、リガンドの機能をアゴニスト作用からアンタゴニスト作用に変換していることを明らかにした。現在までのところ、C5aR 遺伝子は単一とされ、複数の mRNA スプライシングを示唆する知見は cDNA クローニングの報告には含まれていない。従って現在のところ、単球と多核白血球には全くおなじ C5aR 蛋白が発現していると考えざるを得ないだろう。この前提に立てば、多核白血球には RPS19 二量体の C 末端部位に反応する、ある種の装置が存在すると考えざるを得ない。この装置は活性化した C5aR による走化活性シグナルを打ち消す様な細胞内伝達をしていると考える。しかも、

その抑制装置はRPS19のC末端部位を直接的に受容する分子構造を持つ可能性が高い。
そして、その装置は単球表面には存在しないはずである。実際のところ RPS19 の C 末端部位は第2リガンド部位と直接連結した状態においてのみ多核白血球の C5aR を介した走化性を抑制した。よって、この抑制装置は多核白の C5a レセプターの近傍に存在する可能性が高い。それは co-receptor の様なものかもしれない。

⑨ 結 語

RPS19 二量体は C5a と同様に 2 段階結合によって C5aR に作用し、活性化することを証明した。塩基性クラスターである第 1 リガンド-Lys41-His42-Lys43-の作用は、C5a における His15,Arg46,Lys49 部位と同等であり、C5aR の活性化は行わず、第 2 結合のアフニティーを高めていると考えられる。

C5aR を活性化する第 2 リガンド部位は、C5a の場合は C 末端部-Leu72-Gly73-Arg74 であるが、RPS19 二量体の場合は-Leu131-Asp132-Arg133-であった。RPS19 二量体の Asp132 側鎖の β カルボキシル基は C5aArg74 の α カルボキシル基と同等に作用し、C5aR の活性化における Arg206 側鎖のグアニジノグループの位置の特異的な変異と、それに引き続いて生じる構造変化機構は、C5a と RPS19 二量体の作用に共通であると考えられる。

また、RPS19 二量体の第 2 リガンド部位の C 末端側には 12 アミノ酸残基が存在しているが、この部が多核白血球 C5aR に対する作用をアンタゴニスト作用に切り換えることにより、RPS19 二量体は細胞選択的走化性を発揮していた。RPS19 の C 末端部の-Lys-His-COOH を切り詰めた変異型 RPS19 の二量体は、細胞選択性を失い、単球および多核白血球の両者に対し C5aR を介した走化を惹起した。

⑩参考文献

1. Nishiura H, Shibuya Y, Matsubara S, Tanase S, Kambara T, Yamamoto T:
Monocyte chemotactic factor in rheumatoid arthritis synovial tissue: Probably a cross-linked derivative of S19 ribosomal protein. *J Biol Chem* 1996, 271:878-882
2. Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. Apoptosis; a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics.. *Br. J. Cancer* 1972, 26 : 239-245
3. Horino K, Nishiura H, Ohsako T, Shibuya Y, Hiraoka T, Kitamura N, Yamamoto T:
A monocyte chemotactic factor, S19 ribosomal protein dimer, in phagocytic clearance of apoptotic cells. *Lab Invest* 1998, 78:603-617
4. Nishimura, T., Horino, K., Nishiura, H., Shibuya, Y., Hiraoka, T., Tanase, S., Yamamoto, T: Apoptotic cells of an epithelial cell line, AsPC-1, release monocyte chemotactic S19 ribosomal protein dimer. *J Biochem* 2001, 129:445-454
5. Nishiura H, Tanase S, Shibuya Y, Nishimura T, Yamamoto T: Determination of the cross-linked residues in homo-dimerization of S19 ribosomal protein concomitant with exhibition of monocyte chemotactic activity. *Lab Invest* 1999, 79: 915-923
6. Nishiura H, Shibuya Y, Yamamoto T: S19 ribosomal protein cross-linked dimer causes monocyte-predominant infiltration by means of molecular mimicry to complement C5a. *Lab Invest* 1998, 78:1615-1623
7. Gerard NP, Gerard C: The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. *Nature* 1991, 349:614-617
8. Boulay F, Mery L, Tardif M, Brouchon L, Vignais P: Expression cloning of a receptor for C5a anaphylatoxin on differentiated HL-60 cells. *Biochemistry* 1991, 30:2993-2999

9. Zhang X, Boyer W, Toth MJ, Wennogle L, Gonnella NC: Structural definition of the C5a C terminus by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Proteins* 1997, 28:261-267
10. Mollison KW, Mandrecki W, Zuiderweg ERP, Fayer L, Fey TA, Krause RA, Conway RG, Miller L, Edalji RP, Shallcross MA, Lane, B, Fox, JL, Greer, J, Carter GW: Identification of receptor-binding residues in the inflammatory complement protein C5a by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:292-296
11. Toth MJ, Huwyer L, Boyar WC, Braunwalder AF, Yarwood D, Hadala J, Haston WO, Sills MA, Seligmann B, Galakatos N: The pharmacophore of the human C5a anaphylatoxin. *Protein Sci* 1994, 3:1159-1168
12. Kolakowski LF, Lu B, Gerard C, Gerard NP: Probing the "Message:address" sites for chemoattractant binding to the C5a receptor. Mutagenesis of hydrophilic and proline residues within the transmembrane segments. *J Biol Chem* 1995, 270:18077-18082
13. Raffetseder, U., Roper, D., Merry, L., Gietz, C., Klos, A., Grotzinger, J., Wollmer, A., Boulay, F., Kohl, and Bautsch, W: Site-directed mutagenesis of conserved charged residues in the helical region of the human C5a receptor Arg206 determines high-affinity binding sites of C5a receptor 1996 *Eur. J Biochem.* 235:82-90
14. Julie A., DeMartino, Zenon D. Konteatis, Siciliano J.S, Van Riper G, Underwood DJ., Fisher PA, Springer MS: Arginine 206 of the C5a receptor is critical for ligand recognition and receptor activation by C-terminal hexapeptide analogs. *J Biol Chem* 1995, 270:15966- 15969

15. Ember JA, Sanderson SD, Taylor SM, Kawahara M, Hugli TE: Biological activity of synthetic analogues of C5a anaphylatoxin. *J Immunol* 1992, 148:3165-3173
16. Finchi AM, Vogan SM, Sherman SA, Kirnarsky L, Taylor SM, Sanderson SD: Biologically active conformer of the effector region of human C5a and modulator effects of N-terminal receptor binding determinants on activity. *J Med Chem* 1997, 40:877-884
16. Finchi AM, Vogan SM, Sherman SA, Kirnarsky L, Taylor SM, Sanderson SD: Biologically active conformer of the effector region of human C5a and modulator effects of N-terminal receptor binding determinants on activity. *J Med Chem* 1997, 40:877-884
17. Zhang X, Boyar W, Galakatos N, Gonnella NC: Solution structure of a unique C5a semi-synthetic antagonist: implications in receptor binding. *Protein Sci* 1997, 6:65-72
18. Siciliano SJ, Rollins TE, DeMartino J, Konteatis Z, Malkowitz L, Van Riper G, Bondy S, Rosen H, Springer MS: Two-site binding of C5a by its receptor: An alternative binding paradigm for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:1214-1218
19. Konteatis ZD., Siciliano SJ., Van Riper G, Molineaux CJ, Pandya S, Fischer P, Rosen H, Mumford RA, Springer MS: Development of C5a receptor antagonists: Differential loss of functional responses. *J Immunol* 1994, 153: 4200-4205
20. Fernandez HN, Henson PM, Otani A, Hugli TE: Primary structural analysis of the polypeptide portion of human C5a anaphylatoxin: Polypeptide sequence determination and assignment of the oligosaccharide attachment site in C5a. *J*

Immunol 1978, 120:109-117

21. Matsubara S, Yamamoto T, Tsuruta T, Takagi K, Kambara T: Complement C4 derived monocyte-directed chemotaxis-inhibitory factor. *Am J Pathol* 1991, 138: 1279-1291
22. Kondoh N, Schweinfest CW, Henderson KW, Papas TS: Differential expression of S19 ribosomal protein, laminin-binding protein, and human lymphocyte antigen class 1 messenger RNAs associated with colon carcinoma progression and differentiation. *Cancer Res* 1992, 52:791-796
23. Brendan C: Mutagenesis by the polymerase chain reaction. In: Frederick MA, Roger B, Robert EK, David DM, Seidman JG, John AS, and Kevin S, editors. *Current Protocols in Molecular Biology*: John Wilry & Sons, Inc, 1997, 8.5.1-8.5.10
24. Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zangursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA, Baumeister K: A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 1987, 238:336- 341
25. Falk W, Goldwin RH, Leonard EJ: A 48 well micro-chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *J Immunol Method* 1980, 33: 239- 247
26. Mery L, Bouly F: The NH₂-terminal region of C5aR but not that of FPR is critical for both protein transport and ligand binding. *J Biol Chem* 1994, 269: 3457-3463
27. Michael Farzan,Christine E.Schnitzler,Natalya Vasilieva,Doris Leung,Jens Kuhn, Craig Gerard,Norma P.Gerard,and Hyeryun Choe:Sulfated tyrosines contribute to the Formation of the C5a docking site of the human C5a anaphylatoxin Receptor. *J.Exp. Med* 2001,193:1059-1065