

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2005～2009

課題番号：17109002

研究課題名（和文）自然免疫の構造生物学

研究課題名（英文）Structural Biology of Innate Immunity

研究代表者

稲垣 冬彦（INAGAKI FUYUHIKO）

北海道大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：70011757

研究成果の概要（和文）：①NADPH 酸化酵素の活性化に細胞質因子(p47, p67, p40)と膜因子(gp91, p22)の相互作用は必須である。p47 のタンデム SH3 と膜因子 p22 のプロリンに富む配列との相互作用および PX ドメインによる p40 の膜への繋ぎ止めの制御機構を構造に基づいて明らかにした。②リン酸化 IRF-3 を調製し、IRF-3 活性化機構について検討した。③インターフェロン産生に関わる細胞質内レセプター RIG like receptor ファミリーの C 末端ドメインがウィルス特異的な RNA 二重鎖の認識に関わること、二重鎖 RNA の認識様式を明らかにした。④インターフェロン産生に関わる TLR3, TLR4 と相互作用する TRIF, TRAM の TIR ドメインの構造を明らかにし、活性化に必要なオリゴマー形成機構について議論した。⑤カイコβGRP による真菌特有の分子であるβ1-3グルカンの認識機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

①We elucidated the molecular mechanism for tethering p47 and p40 to cyt b558 or membrane on the structural basis.

②We found that IRF-3 is phosphorylated by IKKi at Ser386 and form a homodimer to bind CBP/p300 *in vitro* and produces type I interferons.

③RIG-I like receptor family proteins (RLR) play essential roles to recognize double stranded RNA (dsRNA) in cytosol. We found that the C terminal domain of RLR recognizes viral specific dsRNA. We determined the structure of C-terminal domain of RLR and discussed the specific interaction with viral specific dsRNA.

④dsRNA and LPS bind to TLR3 and TLR4, respectively to activate downstream signaling to produce type I interferons. Here, we determined the structure of TIR domains of TRIF and TRAM and elucidated their oligomerization process which is essential for down stream signaling.

⑤We elucidated the recognition mechanism of β1-3 glucan by βGRP from *Bombyx Mori*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	24,000,000	7,200,000	31,200,000
2006 年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2007 年度	21,300,000	6,390,000	27,690,000
2008 年度	21,300,000	6,390,000	27,690,000
2009 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
総計	87,900,000	26,370,000	114,270,000

研究分野:構造生物

科研費の分科・細目:薬学・生物系薬学

キーワード:自然免疫、好中球活性酸素発生系、NADPH 酸化酵素、SH3 ドメイン、PX ドメイン、インターフェロン産生系、TLR、TIR、IRF-3、リン酸化、 β GRP、 β 1-3 グルカン

1. 研究開始当初の背景

体内に侵入した病原性微生物やウイルスを除去するため、生体は自然免疫という防御システムを生まれながらにして備えている。それらのうちのひとつは、侵入した微生物を貪食し、活性酸素を発生して殺菌するシステムであり、貪食細胞である好中球が代表例である。もうひとつは侵入した微生物やウイルスに特有な分子を認識するシステムであり、侵入を感知すると炎症性のサイトカインやI型インターフェロンを産生し、病原性微生物やウイルスの侵入を阻止する。近年、自然免疫に関わる分子が同定され、外部刺激に対するシグナル応答として理解することが可能となった。

2. 研究の目的

- (1) NADPH 酸化酵素の細胞質サブユニットの相互作用を解明し、活性酸素発生系の分子機作を明らかにする。
- (2) IRF-3 の活性化にはリン酸化による二量体化が必須である。本研究ではインターフェロン産生に必須なリン酸化部位を検討し、活性化機構を議論する。
- (3) RLR はウイルス由来の dsRNA を認識し、インターフェロン産生を促進する。RIG-I, MDA5 および活性化能を欠失した LGP2 の dsRNA 認識を構造を基盤に明らかにする。
- (4) TLR 下流のシグナル伝達をとりあげ、TIRドメインを介するシグナル伝達を解明するとともに、I型インターフェロン産生および炎症反応を誘起する分子機構を蛋白質の相互認識に基づいて解明する。
- (5) 真菌特有の分子である β 1-3 グルカンを認識する β GRP の構造と認識機構を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 大腸菌、バキュロウイルスを用い、タンパク質の発現、精製を行う。
- (2) 精製タンパク質について結晶化条件、あるいは溶液条件の検討を行う。
- (3) 結晶構造解析、NMR法によりタンパク質の構造を決定する。
- (4) 構造を基盤に変異体を作製し、機能解析を行う。
バキュロ発現のための安全キャビネット、無細胞蛋白合成系作製用マルチビーズジョッカー、タンパク質濃縮用冷却遠心器および結晶化プレートを購入した。

4. 研究成果

(1) NADPH 酸化酵素の活性化機構

好中球活性酸素発生系の本体は NADPH 酸化酵素であり、活性酸素発生の本体であるフラボシクローム b_{558} および p47、p67、p40 よりなる細胞質因子は三者複合体を形成している。貪食等のシグナルにより細胞質因子は膜へとリクルートされ、フラボシクローム b_{558} と相互作用を行い、活性酸素発生のスイッチをオンにする。細胞質因子の膜因子へのリクルートを行うのが、p47 タンデム SH3 と p22 のプロリンに富む領域の結合と p47、p40 の PX ドメインによるファゴソーム上のイノシトールリン脂質への結合である。本研究では膜、膜因子へのリクルートを可能とするこれらの機構について構造生物学的研究を行った。

① p47 タンデム SH3 ドメインによる p22 のプロリンに富む領域の認識

NMR スペクトル解析より得られた p47 タンデム SH3 ドメインと p22 ペプチド複合体の溶液中での構造を図 1 に示す。ふたつの SH3 ドメインが、それぞれのリガンド認識部位を対向し、p22 結合部位を形成していた。p22 ペプチドは PP II 型ヘリックスを形成し、さらに C 末端側領域では α ヘリックスを形成していた。それぞれの SH3 ドメインは芳香族残基およびプロリンから形成される疎水性ポケットを結合部位として用いた正則な PPII ヘリックスの認識を行っていた。このような認識により p47 は p22 を特異的に認識することが可能となる。Pro156 は、認識のキーとなる残基であり、P156Q の変異は活性酸素発生系に欠陥のある慢性肉芽症患者に多くみられる。今回得た相互作用は生理的に重要な相互作用と考えられる。

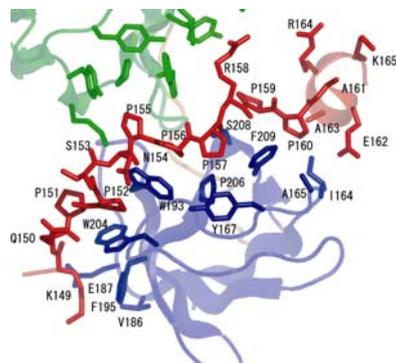


図1 p47 タンデム SH3 による p22 プロリンに富むペプチドの認識

②PB1ドメインによる p40 の膜移行制御

p40 は PX-SH3-PB1 のドメイン構造を持つ。食食シグナルにより活性化され、PX ドメインがファゴソーム膜上の PI(3)P と結合し、膜へリクルートされることが活性酸素発生に必要である。ファゴソームが成熟するまで活性酸素の発生は厳密に抑制されていることが必要であり、休止状態では、p40 の PX ドメインは PI(3)P への結合はできないと考えられる。

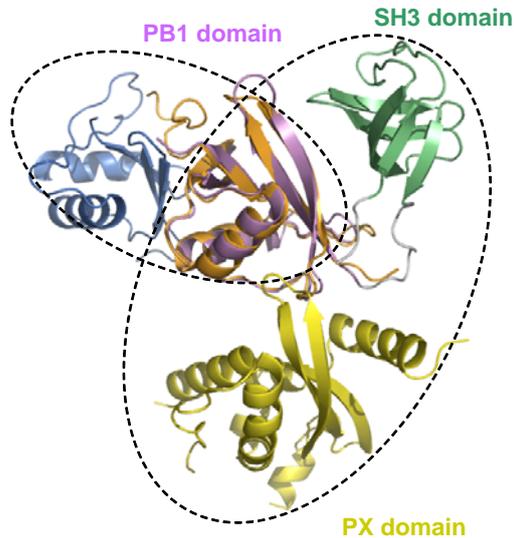


図2 p40 の構造 (p40 と p67 の PB1 ドメイン複合体の構造を重ねて示している。)

今回、我々は p40 全長の構造を X 線結晶構造解析により決定した。PXドメインの PI(3)P 結合領域は PB1ドメインとの相互作用により部分的に覆われていた。このため、膜に埋め込まれた PI(3)P と結合できないが、食食シグナルにより p40 が開構造を取り、初めて PI(3)P と結合が可能となる。p40 の PB1ドメインは構造的に p67 の PB1ドメインと結合し、複合体を形成する。実際 p40 の PB1ドメイン結合領域は PXドメインとの相互作用領域とは反対側に位置し、p67 との複合体形成を阻害しない。PXドメインは、PB1ドメインとの分子内の相互作用を介して PI(3)P への結合が抑制されていると考えられる。

(2)リン酸化による IRF-3 の活性化機構

転写因子 IRF-3 はウイルスの侵入を契機にリン酸化を受け、二量体形成、核移行、CBP/p300 との複合体形成によりインターフェロン産生遺伝子を活性化し、インターフェロンを産生し、細胞を抗ウイルス状態に保つ。IRF-3 の活性化には IKKi/TBK により、C 末端領域に存在する Ser/Thr に富む領域の Ser/Thr がリン酸化されることが必要である。しかしこれまでリン酸化ミミック体を用いた機能研究により、必須なリン酸化部位が推定されていたに過ぎない。本研究では大腸菌内で、IRF-3 と IKKi を共発現することにより、

大腸菌内でリン酸化体を調製することに成功した。IKKi と共発現した IRF-3 をイオン交換クロマトグラフィーにかけたところ、5本のピークが観測された。これらのピークをゲルろ過を用いて精製を行なった。このうち 3本のピークがリン酸化を受けていることを LC/MS 解析により確認するとともに、トリプシン分解と LC/MS/MS を用いたペプチドマッピングを行い、それぞれ Ser402, Ser386/Ser402, Ser396/Ser402 がリン酸化されていることを明らかにした。このうち、Ser386/Ser402 のみが二量体を形成すること、CBP/p300 と複合体を形成することをゲルろ過上で確認した。実際、Ser386 と Ser402 がリン酸化を受けていることを結晶構造解析により確認した。ついで、二量体形成に必要な Ser 残基を確認するため、S386A, S402A 変異体を作成し、二量体形成能、CBP/p300 ペプチド結合能を見た。S402A 変異体では二量体形成能、ペプチド結合能は保持されていたが、S386A 変異体ではいずれも失った。これより、Ser386 のリン酸化が IRF-3 の活性化に必須であることを明らかにした。ついで、それぞれの変異体について細胞を用いてインターフェロン産生能を比較した。S396A, S402A 変異体ではウイルス刺激による DNA 結合能、p300 結合能、インターフェロン産生能は野生体と同程度であったが、S386A 変異体ではすべて消失していた。これより、S386 のリン酸化が IRF-3 の活性化に必須であることを明らかにした。

(3)RLR ファミリータンパク質の C 末端ドメインによる dsRNA の認識

細胞内におけるインターフェロンの産生は二つの経路で行われる。ひとつは RIG-I を介する系である。細胞質内に侵入したウイルス固有の分子である dsRNA は細胞質タンパク質である RIG-I により検知される。RIG-I は N 末端側にタンデム CARD、C 末端側にヘリケース領域を持つ。dsRNA の結合によりタンデム CARD は開構造をとり、ミトコンドリア上の IPS-1 の CARDドメインと相互作用することにより IKKi/TBK を活性化、IRF-3 をリン酸化する。リン酸化された IRF-3 は二量体形成、核移行、CBP/p300 と複合体を形成し、インターフェロン産生遺伝子を活性化する。RIG-I はこの点で、細胞内に侵入したウイルスのセンサータンパク質としての役割を果たしている。我々は全長の RIG-I をバキュロウイルスを用いて発現し、dsRNA と複合体を形成させたうえで限定分解を行った結果、C 末端領域のみが安定に得られた。そこで、この領域のみを大腸菌にて発現し、dsRNA との結合能を計るとともに、NMR により構造を決定した。興味深いことに、このドメインのみで dsRNA に対する結合特異性を有することが分かった。すなわち、C 末端ドメインがウイルスに対する特異性を決定していることが推察された。NMR 法により決定した構造には広範な塩基性の溝が存在すること、dsRNA を用いて

NMR 滴定実験を行った結果、この塩基性の溝に dsRNA が結合することが分かった(図3)。RIG-I の他に異なる dsRNA 認識を行う MDA5、CARD ドメインを持たないため、負の制御因子として働いていると考えられる LGP2 が存在する。いずれも RIG-I と類似した配列をもつ C 末端領域を有していることから、これらの領域がウイルス由来の dsRNA を特異的に認識していると考えられる。実際 MDA5 の C 末端ドメインは polyIC を結合する等 RIG-I と異なる特異性を持つ。MDA5、LGP2 の C 末端ドメインについても NMR により構造を決定した。3者の構造はいずれもよく似た塩基性面を持ち、dsRNA 滴定の結果はこれらの塩基性面が dsRNA 結合面であることが分かる(図 4, 5)。しかし、結合親和性では LGP2 が最も高く次いで、RIG-I、最も弱いのが MDA5 であった。これらの親和性の差異は、塩基性の溝の堤(図点線で囲まれた部分)を形成する RNA 結合ループの構造の差異によるものと考えられる。実際 LGP2、RIG-I では双方の溝で dsRNA を認識するのに対し、MDA5 では RNA 結合ループが開くため、dsRNA への親和性が著しく低下することが分かった。MDA5 は polyIC を認識しインターフェロンを産生することが知られているが、これは LGP2 が MDA5 に dsRNA を提示し、その結果 MDA5 がより強く dsRNA を認識すると考えられる。LGP2 は従来考えられていた負の制御因子ではなく、むしろ RIG-I、MDA5 と協調的に働き、dsRNA に対する親和性を高めていると考えられる。

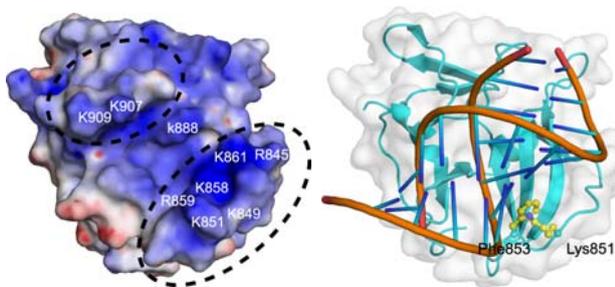


図 3(左)RIG-I の塩基性の溝、(右)リボン図と塩基性の溝にはまりこんだ dsRNA

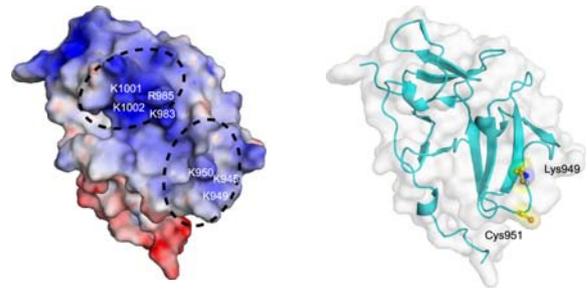


図 4(左)MDA5 の塩基性面、RNA 結合ループが開構造をとる(右)MDA5 のリボン図

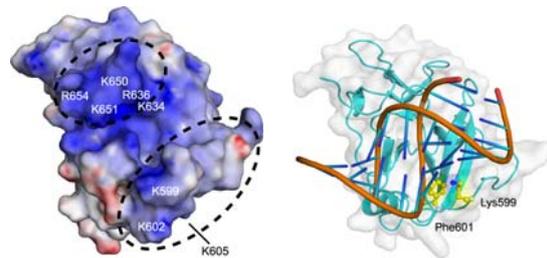


図 5(左)LGP2 の塩基性の溝、(右)リボン図と塩基性の溝にはまりこんだ dsRNA

(4) TRIF、TRAM の TIR ドメインを介するインターフェロン産生機構

細胞内におけるインターフェロン産生経路のもうひとつは TLR3、TLR4 を介する系である。細胞外に存在する dsRNA を TLR3 が検知すると TLR3 は二量体化する。二量体化した TLR3 の細胞質側に位置する TIR ドメインと TRIF の TIR ドメインが相互作用することによりシグナル複合体が形成され、下流の IKKi/TBK を活性化し、最終的にインターフェロン産生系を活性化する。同様に TLR4 は LPS を検知すると二量体化し、細胞質内の TIR ドメインを介して TRAM、TRIF へと外部からのシグナルを伝え、同様にインターフェロン産生系を活性化する。いずれも TIR ドメインを介した複合体形成が下流へのシグナル伝達に必須な役割を果たしている。

我々は TRAM と TRIF の TIR ドメインの複合体形成機構を明らかにするため、NMR 法により構造を決定した。TRAM の TIR ドメインは凝集性が高く、たんぱく質発現は難航したが、BB ループに C117H 変異を加えることにより溶解性は高まり、構造決定を行うことが可能となった。図6に TRAM の TIR ドメインのリボン図と静電ポテンシャルを示す。既に報告されている MyD88 や TLR1 の TIR ドメインと類似している。BB ループを介したオリゴマー形成はシグナルに必須である。興味深いことに TRAM の TIR には AA ルー

プを中心として広い酸性面が存在するが、塩基性面は点在しているに過ぎなかった。以上より、TRAM は BB ループを介して二量体を形成するとともに、酸性面を提示して TRIF の塩基性面と相互作用すると推定された。

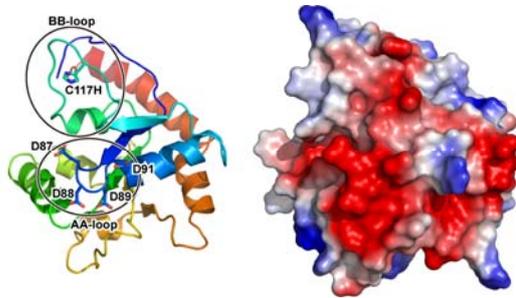


図 6(左)NMR により決定した TRAM TIRドメインの構造(右)静電ポテンシャル表示

TRIF の TIRドメインも TRAM 同様凝集性が高く、試料調製は難航したが、TRAM 同様 BB ループに P434H 変異を加えることにより、溶解性の高い試料を得、NMR 測定を行った。図7に TRIF TIRドメインの NMR 構造と静電ポテンシャルを示す。

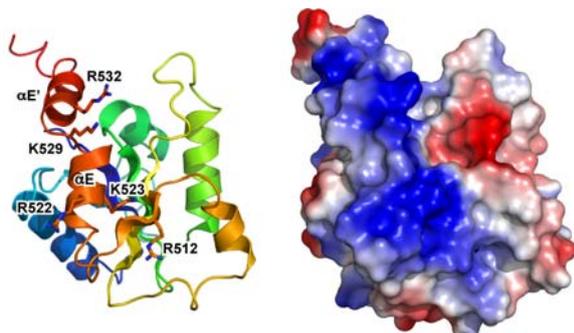


図 7(左)NMR により決定した TRIF TIRドメインの構造(右)静電ポテンシャル表示

TRAM, TRIF の TIRドメインの構造はよく似ている。BB ループはいずれも飛び出しており、ホモ二量体形成に関わっていると考えられる。興味深いことに、EE ループから・E、・E'を含む領域に TRIF は広い塩基性面を持つ。TRAM の酸性面、TRIF の塩基性面が相互作用に必須であることを確かめるため、それぞれ野生体および変異体を用い、yeast two hybrid法を用いて相互作用を検討した。この結果、TRAM の酸性残基、あるいは TRIF の塩基性残基に変異を加えると相互作用ができないことが明らかとなった。今後、TLR4 の TIRドメインの変異体を作製し、yeast two hybrid法により相互作用残基を特定し、TLR4 下流のシグナル伝達機構を解明する。

(5) カイコβGRP による真菌特有の分子 β1-3 グルカンの認識機構

β1-3 グルカンは真菌特有の分子である。体内に侵入したβ1-3 グルカンを認識すると、カイコの体液に存在するフェノール酸化酵素が活性化され、メラニン化を促進し、真菌を体内に閉じ込める。これにより真菌感染を防いでいる。β1-3 グルカン認識タンパク質(βGRP)がβ1-3 グルカンのセンサータンパク質として働いている。我々はβGRP によるβ1-3 グルカンの認識機構を明らかにするため、NMR によりβGRP の構造を明らかにし、β1-3 グルカンの認識を解明した。βGRP はβ1-3 グルカンの三重鎖ヘリックス部分を認識していた。βGRP はそれぞれ4本のβ鎖がシートを形成し、サンドウィッチ構造をとっていた。このような構造は多くの糖認識タンパク質に見られる構造であるが、興味深いことに、糖認識タンパク質に保存されている芳香族アミノ酸は存在せず、新しい認識の存在が推定された。そこで、β1-3 グルカンで滴定し、βGRP のシグナルのシフトを観測した。その結果、βGRP の特定表面残基のみがシフトし、この面が相互作用面であることが推測された。次いで、シフトした残基を中心に変異体を作製し、β1-3 グルカンとの結合についてピアコアを用いて検討した。実際、これらの変異体の結合活性は落ちていた。この中で特に結合活性の落ちた変異体を作製しβGRP を欠失したカイコ体液を用い、β1-3 グルカンの存在下でメラニン化反応の有無を解析した。その結果、野生体を加えた場合には顕著なメラニン化反応は起きるが、変異体ではほとんどメラニン化は起きなかった。以上より、メラニン化反応のスイッチはβGRP が担っていることが分かる。以上の結果より、βGRP によるβ1-3 グルカン認識のモデルを提出した。

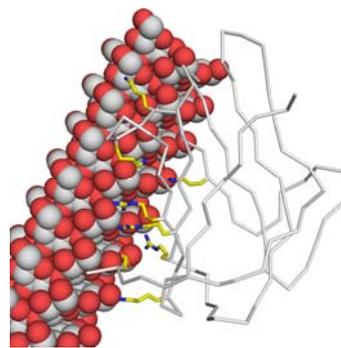


図 8 βGRP によるβ1-3 グルカン認識のモデル

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 21 件)

- ① Takahasi K., Ochiai M., Horiuchi M., Kumeta H., Ogura K., Ashida M., Inagaki E.: Solution structure of the silkworm β GRP/GNBP3 N-terminal domain reveals the mechanism for β -1,3-glucan-specific recognition. Proc Natl Acad Sci U S A, 査読有, 106, 2009, 11679-11684.
- ② Takahasi K., Kumeta H., Tsuduki N., Narita R., Shigemoto T., Hirai R., Yoneyama M., Horiuchi M., Ogura K., Fujita T., Inagaki E.: Solution structures of cytosolic RNA sensor MDA5 and LGP2 C-terminal domains: identification of the RNA recognition loop in RIG-I-like receptors. J Biol Chem, 査読有, 84, 2009, 17465-17474.
- ③ Yuzawa S., Miyano K., Honbou K., Inagaki E., Sumimoto H.: The Domain Organization of p67phox, a Protein Required for Activation of the Superoxide-Producing NADPH Oxidase in Phagocytes. J Innate Immun., 査読有, 1, 2009, 543-555.
- ④ Takahasi K., Yoneyama M., Nishihori T., Hirai R., Kumeta H., Narita R., Gale M. Jr., Inagaki E., Fujita T.: Nonself RNA-Sensing Mechanism of RIG-I Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. Mol. Cell, 査読有, 29, 2008, 428-440.
- ⑤ Honbou K., Minakami R., Yuzawa S., Takeya R., Suzuki N.N., Kamakura S., Sumimoto H., Inagaki E.: Full-length p40phox structure suggests a basis for regulation mechanism of its membrane binding. EMBO J, 査読有, 26, 2007, 1176-1186.
- ⑥ Ogura K., Nobuhisa I., Yuzawa S., Takeya R., Torikai S., Saikawa K., Sumimoto H., Inagaki E.: NMR Solution Structure of the Tandem Src Homology 3 Domains of p47phox Complexed with a p22phox-derived Proline-rich Peptide. J. Biol. Chem, 査読有, 281, 2006, 3660-3668.

- ⑦ Nobuhisa I., Takeya R., Ogura K., Ueno N., Kohda D., Inagaki E., Sumimoto H.: Activation of the superoxide-producing phagocyte NADPH oxidase requires co-operation between the tandem SH3 domains of p47phox in recognition of a polyproline type II helix and an adjacent alpha-helix of p22phox. Biochem. J, 査読有, 396, 2006, 183-192.

[学会発表] (計 41 件)

- ① 久米田博之, TICAM-1 および TICAM-2 TIR ドメインの溶液構造, 第 48 回 NMR 討論会, 2009.11.10-12, 九州大学馬出病院キャンパス医学部百年講堂
- ② 稲垣冬彦: Soft interaction in phagocyte oxidation system, International Symposium on Molecular Soft Interactions in Biological Systems, 2009.1.22-23, 千里ライフサイエンスセンター
- ③ Fuyuhiko Inagaki, Structural Basis for the regulation of Phagocyte NADPH Oxidase Activity, The 16th ISMAR conference, 2007.10.14-19, Kenting, Taiwan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 冬彦 (INAGAKI FUYUHIKO)
北海道大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号: 70011757

(2) 研究分担者

野田 展生 (NODA NOBUO)
北海道大学・大学院薬学研究院・講師
研究者番号: 40396297

小椋 賢治 (OGURA KENJI)
北海道大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号: 50270682

堀内 正隆 (HORIUCHI MASATAKA)
北海道大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号: 90322825

(3) 連携研究者

なし