

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22370038

研究課題名（和文） Toll 様受容体を介したシグナル伝達機構の構造生物学的解析

研究課題名（英文） Structural study of the Toll-like receptors signaling

研究代表者

朽尾 豪人（TOCHIO HIDEHITO）

京都大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：70336593

研究成果の概要（和文）：

自然免疫は生体に備わった防御機構で、病原体（細菌、ウイルスなど）が、細胞膜上の Toll 様受容体（以下 TLR: Toll-Like Receptor）によって認識されることによって始まる。これによって TLR が活性化されると、その細胞内領域にアダプター分子 MyD88 等が集積し、シグナル伝達複合体が形成される。本研究ではアダプター間の相互作用を解析したほか、TLR と共通の細胞内シグナル伝達経路を持つインターロイキン(IL)-18 の受容体活性化機構について解明した。

研究成果の概要（英文）：

The innate immune system is the self-defense system of higher eukaryotic organisms. The response of the system begins upon a recognition of pathogens such as bacteria and viruses by Toll-like Receptor(TLR) on the plasma membrane of immune cells. Once TLRs are activated by this recognition step, various cytosolic adaptor proteins such as MyD88 interact with the cytosolic region of TLRs to make a signal transduction complex. In this study, the interaction between adaptor proteins were studied. In addition, the receptor activation mechanism by Interleukin-18, the intracellular signal transduction pathway of which is shared with TLRs, were investigated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2011 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2012 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物科学

キーワード：MyD88 IRAK 自然免疫 Toll 様受容体 NF- $\kappa$ B IL-18

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物には、生まれたときから備わっている自然免疫系と、様々な抗原にさらされることによって獲得されていく獲得免疫系があり、両者が協調して働くことにより、堅牢な生体防御機構が維持される。自然免疫系に

おける病原体認識は、まず TLR によって行われる。10 種類以上の TLR が知られているが、各々特定の病原体由来の分子（グラム陰性菌細胞壁の LPS(Lipopolysaccharide)やウイルス由来 RNA、マイコプラズマ由来リポタンパク等）を認識する。例えば、TLR4 は

LPSに応答するTLRで、LPSが結合すると、その「シグナル」は種々のアダプターと呼ばれる蛋白質群(後述)に仲介され、リン酸化カスケードを経て、最終的には炎症性サイトカインの発現を支配する転写因子NF- $\kappa$ Bの活性化を引き起こす。

上記アダプター分子とは、MyD88、Mal、TRIF、TRAMなどのことで、TLR直下に集積して複合体を形成する。この「シグナル開始複合体」の形成に中心的な役割を果たすのが、TLRの細胞内領域とアダプター分子に共通して保存されているTIR (Toll-IL-1 Receptor) ドメインと呼ばれる蛋白質相互作用モジュールである。TIRはTIR同士で会合し、「開始複合体」形成の核となると考えられている。「開始複合体」の構造・性質によって、下流へのシグナル伝達が調節されるため、その詳細な多量体化機構は極めて重要である。しかし、相互作用機構や、多量体化の詳細については分かっていなかった。

インターロイキン(IL)-1 $\beta$ やIL-18もまたTLRと共通の細胞内伝達経路を使うことが知られ、MyD88を始めとするアダプター蛋白質やIRAKが開始複合体を形成する。IL-18受容体の細胞外領域はイムノグロブリン様ドメインであり、TLRとは異なるが(TLRの細胞外はLRR(Leucine Rich Repeat))、その細胞内領域はTLRと同じくTIRドメインを有している。このTIRを介してMyD88と相互作用する。

## 2. 研究の目的

(1) TLR、IL-1、IL-18のシグナル伝達経路に関与する様々な蛋白質の立体構造解析を行いその作動原理を分子論的に理解する。構造解析のためには、NMR及びX線結晶構造解析法を用いる。また、各種生化学実験も合わせて行う。

(2) 上記シグナル伝達系のアダプターについて、相互作用を解析する。これらのタンパク質はいずれもTIRドメインを含む。TIRの相互作用・多量体化がアダプターの会合の直接の原因であることから、これらTIR間の相互作用を調べる。

## 3. 研究の方法

(1) アダプター分子MyD88とTRAM(TRIF-related adaptor molecule)とMyD88のTIRドメイン同士の相互作用を、GSTプルダウン法を用いて調べる。点変異体を利用して、相互作用する領域を特定する。

(2) 細胞を使ったNF- $\kappa$ Bのレポーターアッセイの系を構築し、各種TIRの野生型及び変異型を発現させて、Dominant Negative効果を調べる。

(3) IL-18と受容体 $\alpha$ 複合体の構造解析のために、IL-18は大腸菌を用いて、IL-18受

容体 $\alpha$  (以下、IL-18R $\alpha$ とする)の細胞外ドメインは昆虫細胞Sf9を用いて発現させ、それぞれ精製した。これら試料を混合しゲル濾過を行うことによって複合体試料を得た。このようにして調製したIL-18/IL-18R $\alpha$ 複合体を結晶化スクリーニングに供した。得られた結晶の回折実験には放射光施設を利用した。

## 4. 研究成果

(1) 精製タンパク質レベルでMyD88-TIRとTRAM-TIRの間に直接相互作用があることを見いだした。さらに、点変異実験から、MyD88-TIRの、TRAMと相互作用する領域を特定した。また、レポーターアッセイより、MyD88-TRAMの相互作用は、IL-18に対する細胞応答に関与することが示唆された。

これまでの知見では、TRAMはMyD88非依存的なTLR4シグナル伝達経路において、TRIF(TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ )と相互作用するとされている。本研究の成果より、TRAMがIL-18シグナルにも関与することがわかった。

(2) IL-18とIL-18R $\alpha$ の複合体を調製し、蒸気拡散法(ハンギングドロップ)を用い、9mg/mLの蛋白質溶液、リザーバーバッファー、界面活性剤溶液(LysoFos Choline 10)を1:1:0.5( $\mu$ L)で混合し20 $^{\circ}$ C、3日間静置で150

$\mu$ m x 500  $\mu$ m程度

の柱状結晶を得た。

放射光実験施設

(Spring-8の

BL44XU)にてX線回

折実験を行ったところ、

解析可能なデータを得ることが

できた。このデータに基づき、

既に公開されて

いる

IL-18/IL-18BPの結

晶構造をテンプレ

ートとして分子置換

法を行い、立体構造を

決定することができ

た(図1)。

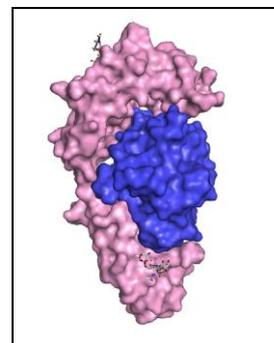


図1. IL-18 (青)とIL-18R $\alpha$  (ピンク)複合体の結晶構造

(3) IL-18とIL-18R $\alpha$ の相互作用に関しては、過去に、IL-18の各種誘導体を用いて相互作用実験や活性試験が行われており、IL-18の相互作用面が推測されている(Kato Z. et al., *Nat Struct Biol*, vol. 10, 996(2003)). 今回得られたIL-18/IL-18R $\alpha$ 複合体の構造に見られる分子界面は、この相互作用実験の結果と一致していた。

(4) 今回得られた構造を、IL-18 の類縁体である IL-1 $\beta$  とその受容体の複合体の結晶構造 (PDB code:3040) と比較すると、IL-18 の結合様式は、IL-1 $\beta$  のそれとよく似ていた。しかしながら、IL-18R $\alpha$  に付加した糖鎖と IL-18 が近位に存在しており、糖鎖が相互作用に影響している可能性が示唆された。これは、既報の IL-1 $\beta$  と受容体の複合体構造には見られない特徴である。

#### 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 8 件)

- ① Muraoka, T., Adachi, K., Ui, M., Kawasaki, S., Sadhukhan, N., Obara, H., Tochio, H., Shirakawa, M., and Kinbara, K. A Structuralized Monodisperse PEG Effectively Suppresses Protein Aggregation. *Angewandte Chemie International Edition*, 52, 2430-4 (2013), doi: 10.1002/anie.201206563.
- ② Igarashi, R., Yoshinari, Y., Yokota, H., Sugi, T., Sugihara, F., Ikeda, K., Sumiya, H., Tsuji, S., Mori, I., Tochio, H., Harada, Y., Shirakawa, M. Real-time background-free selective imaging of fluorescent nanodiamonds in vivo. *Nano Lett.* **12**, 5726-32 (2012), doi: 10.1021/nl302979d.
- ③ Arita, K., Isogai, S., Oda, T., Unoki, M., Sugita, K., Sekiyama, N., Kuwata, K., Hamamoto, R., Tochio, H., Sato, M., Ariyoshi, M., Shirakawa, M. Recognition of modification status on a histone H3 tail by linked histone reader modules of the epigenetic regulator UHRF1. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 12950-12955 (2012), doi: 10.1073/pnas.1203701109.
- ④ Ohnishi, H., Tochio, H., Kato, Z., Kawamoto, N., Kimura, T., Kubota, K., Yamamoto, T., Funasaka, T., Nakano, H., Wong, R. W., Shirakawa, M., Kondo, N. TRAM is involved in IL-18 signaling and functions as a sorting adaptor for MyD88. *PLoS One* **7**, e38423 (2012), doi: 10.1371/journal.pone.0038423.
- ⑤ Nada, M., Ohnishi, H., Tochio, H., Kato, Z., Kimura, T., Kubota, K., Yamamoto, T., Kamatari, Y. O.,

Tsutsumi, N., Shirakawa, M., Kondo, N. Molecular analysis of the binding mode of Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain proteins during TLR2 signaling. *Mol Immunol* **52**, 108-116 (2012), doi: 10.1016/j.molimm.2012.05.003.

- ⑥ Sekiyama, N., Jee, J., Isogai, S., Akagi, K., Huang, T. H., Ariyoshi, M., Tochio, H., Shirakawa, M. NMR analysis of Lys63-linked polyubiquitin recognition by the tandem ubiquitin-interacting motifs of Rap80. *J Biomol NMR* **52**, 339-350 (2012), doi:10.1007/s10858-012-9614-9.
- ⑦ Isogai S., Morimoto D., Arita K., Unzai S., Tenno T., Hasegawa J., Sou YS., Komatsu M., Tanaka K., Shirakawa M., Tochio H. Crystal structure of the ubiquitin-associated (UBA) domain of p62 and its interaction with ubiquitin. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 31864-31874 (2011), doi:10.1074/jbc.M111.259630.
- ⑧ Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kimura T, Hiroaki H, Kondo N, Shirakawa M. H-1, C-13, and N-15 resonance assignment of the TIR domain of human MyD88. *Biomolecular NMR Assignments* **4**, 123-125 (2010), doi: 10.1007/s12104-010-9222-0

[学会発表] (計 7 件)

- ① 白井 隆弘, 猪股 晃介, 枋尾 豪人, 白川 昌宏: ヘムタンパク質 cytochrome c を用いた in-cell NMR 解析 (口頭発表) 第 35 回分子生物学会年会 2012 年 12 月 11 日~14 日 福岡
- ② 村上 晃満, 有田 恭平, 有吉 眞理子, 枋尾 豪人, 白川 昌宏: UHRF2 の SRA ドメインによるメチル化 DNA 認識機構の解明 (ポスター発表) 第 35 回分子生物学会年会 2012 年 12 月 11 日~14 日 福岡
- ③ 小宮 源之介, 大谷 淳二, 森本 大智, 星野 可奈子, 枋尾 豪人, 白川 昌宏, 有吉 眞理子: HP1 $\alpha$  のフレキシブル N 末端領域によるヒストン H3 結合の調節機構 (ポスター発表) 第 35 回分子生物学会年会 2012 年 12 月 11 日~14 日 福岡

- ④ 森 重之, 吉成 洋祐, 五十嵐 龍治, 外間 進悟, 横田 浩章, 枋尾 豪人, 白川 昌宏, 原田 慶恵, 池田 和寛, 角谷 均: ナノダイヤモンドを用いた光検出磁気共鳴顕微鏡装置の開発と生物試料への応用 (口頭発表) 第 51 回 NMR 討論会 2012 年 11 月 8 日~10 日 名古屋
- ⑤ Naotaka Tsutsumi, Takeshi Kimura, Hidenori Ohnishi, Zen-ichiro Kato, Hidehito Tochio, Naomi Kondo, Masahiro Shirakawa: Recognition of interleukin-18 by the receptors studied by NMR spectroscopy (Poster presentation) XXVth ICMRBS August 19-24, 2012, Lyon, France.
- ⑥ Hidehito Tochio: Magnetic resonance methods for analyses of structure and dynamics of intracellular proteins and cells. 第 49 回日本生物物理学会年会 2011 年 9 月 16 日~18 日 姫路
- ⑦ Hidehito Tochio: Analysis of proteins inside human cultured cells by NMR, The 4th Asia Pacific NMR symposium, October 16-18, Beijing, China.

[図書] (計 1 件)

磯貝信, 枋尾豪人「ユビキチン鎖の多様性と認識機構」実験医学 (羊土社) 29 卷 (増刊号『タンパク質分解系による生体制御』) 1915-1920 頁 2011 年

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://researchmap.jp/tochio/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

枋尾 豪人 (TOCHIO HIDEHITO)  
京都大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号: 70336593