

令和 6 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02408

研究課題名(和文) JAK-STAT経路不活化の分子基盤を解明し、ウイルス宿主指向性を理解する

研究課題名(英文) Molecular basis of counteraction against the JAK-STAT signaling pathway by virus

研究代表者

尾瀬 農之(Ose, Toyoyuki)

北海道大学・先端生命科学研究院・教授

研究者番号：80380525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本申請では、ヒトに重篤な障害・死をもたらす狂犬病および麻疹の各ウイルスが、ヒトJAK-STAT経路を不活化する戦略を明らかにするため、ヒトSTAT1、STAT2、STAT3のリン酸化体・非リン酸化体を調製し、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルスが保持するアクセサリ-蛋白質との相互作用解析から結合モードを明らかにすると共に、STAT四量体とDNAやウイルス蛋白質との複合体電顕構造解析に成功した。また、麻疹ウイルスの蛋白質は、立体構造を持たない領域が220アミノ酸残基程度あり、STAT1との相互作用の他、細胞内結合競合分子(IRF9)との競合を有利に進める上で重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスがどの生物を宿主として選択するかを考える上で、宿主免疫系を不活化できるかどうかは非常に大きな要因である。多くのウイルスは宿主の免疫分子と結合するための蛋白質を準備し、固有の方法で免疫系を制圧する。本研究では、宿主免疫分子であるSTATとの相互作用解析、複合体構造解析に成功したため、宿主指向性を分子レベルで理解できた。この情報を用いて、将来的なウイルス変異による宿主指向性の遷移(ドリフト)を予測する研究へと展開し、新興ウイルス対策に繋がるほか、宿主免疫系を不活化しない蛋白質を組み込んだ弱毒ウイルス株設計によるワクチン開発に発展する。

研究成果の概要(英文)：The typical activation step of the JAK-STAT pathway is the phosphorylation of a specific tyrosine residue of STAT molecules to induce reciprocal interactions between two STAT molecules, subsequent to ligand recognition by a cell surface receptor and the JAK activation. Activated STAT molecules are translocated to the nucleus to function as transcriptional factors to induce gene expression, such as for antiviral activity. Complexity of the system arises from not only the generation of both homo and hetero STAT dimers but also the presence of interactions via the N-terminal domain (NTD) of STATs. Due to the interactions between two NTDs, STAT function should be considered as an oligomer rather than a simple dimer. We presented the tetrameric form of pY-STAT in complex with DNA by cryo-EM, revealing a compact conformation that can be seamlessly transformed into a tandem DNA binding model. Based on the tetrameric structure, we can further discuss STAT targeting by virus for immune evasion.

研究分野：構造生物学

キーワード：JAK-STAT 相互作用解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

発症後致死率 100%の狂犬病 (年間 6 万人死亡) や、再興が頻発する麻疹 (同 14 万人死亡) には、治療法がない。これらの病原体は、ゲノムに変異が入りやすい RNA ウイルスであり、進化の過程で特定の宿主への感染機構を確立してきた。宿主決定要因は、ウイルスと宿主細胞レセプターとの親和性として解釈されることが多い。しかしそれだけではなく、宿主の免疫機構を阻害する "counteraction" 機構を持つかどうか、感染成立の必須要因である。Counteraction の代表的標的として JAK-STAT 経路が挙げられる。感染防御における JAK-STAT 経路は、主に I 型 interferon (IFN) および II 型 IFN の経路に分けられる。I 型経路は、パターン認識受容体を使った病原体の認識に応答して IFN が分泌される自然免疫経路である。それに対し、II 型経路では NK 細胞、NKT 細胞、活性化 T 細胞から IFN が分泌され、自然・獲得免疫両者に深く関わる。I 型 IFN を認識した細胞は、Tyr リン酸化 STAT1/2 ヘテロ 2 量体が IRF9 と共に三者複合体 (ISGF3) を形成、核移行後に DNA 上の ISRE 配列に結合し、下流の遺伝子発現を活性化。一方、II 型 IFN を認識した細胞はリン酸化された STAT1 がホモ 2 量体を形成、核移行後に DNA 上の GAS 配列に結合し、下流の遺伝子発現を活性化する。

JAK-STAT 経路は、IFN を含め 50 以上ものサイトカイン信号を捌くことができる。多様性に対応できるのは、7 種存在する STAT が、リン酸化の後にホモもしくはヘテロ 2 量体化により多様な形態を取りうるからである。STAT に対する構造研究は、1998 年のリン酸化 STAT ホモ 2 量体 (コア領域のみ, Cell 93, Nature 394) の結晶解析がマイルストーンである。しかし、以降は飛躍的な発展が無く、構造学的な着眼もドメインごとに終始している。例えば、STAT の N 末端および C 末端領域 (NTD, CTD) の機能が説明されていない。リン酸化によるホモ/ヘテロ 2 量体化と、NTD を使用したホモ/ヘテロ 2 量体化の相関関係が明らかにされなければならない。私達は対象とする狂犬病や麻疹のウイルス蛋白質が STAT の複数箇所と相互作用することを明らかにした。そのため、これまでセグメントとして個別に理解されていた STAT の個々のドメインが、ウイルス蛋白質によって繋留され同時に観測できる。従って、本研究は未解明課題の多いヒト JAK-STAT 経路研究に対する「ウイルス蛋白質をプローブにしたアプローチ」とも捉えられる。例えば、狂犬病 RVPC は STAT1 コアだけでなく、STAT1 の NTD, CTD をも結合ターゲットとすることを解明した。これは、リン酸化 STAT1 全長/RVPC の複合体 (DNA を含む三者複合体) 構造解析をすれば、未解明の NTD/CTD の相対位置・機能が解析できることを意味する。本研究開始前には、私達のクライオ電顕解析は分解能 15Å であった。高分解能解析によりウイルス学的な意義だけでなく、JAK-STAT 研究の膠着状態からも、大きな一歩が踏み出せる。

### 2. 研究の目的

リン酸化 STAT/DNA 四量体およびリン酸化 STAT/ウイルス蛋白質複合体の構造解析をおこない、細胞質、核における STAT1 機能阻害機構を明らかにすることである。狂犬病ウイルス RVPC 分子の構造内部に核移行および排出配列 (NLS, NES) が存在するが、pY-STAT との結合によってこれらの配列が露出するかどうか、STAT/RVP 複合体の局在に影響し、不活化機構と深く関わる可能性があるため、複合体構造が決定打となる。また、麻疹ウイルス V 蛋白質に関する研究では、これまで STAT2 と IRF9 の結合を阻害することがわかっていたが、V の性質を NMR で精査し、STAT との結合部位を残基レベルで明らかにすることが目標である。

### 3. 研究の方法

#### (1) リン酸化 STAT 四量体構造解析 (DNA 複合体)

クライオ電顕解析および結晶化試行を同時に進めた。また、多角度光散乱 (SEC-MALS) や、X線溶液小角散乱 (SAXS) を使用して、溶液中の構造を検証した。リン酸化 STAT は TKB1 によるチロシンリン酸化を経て作成した。

#### (2) リン酸化 STAT 四量体と RVPCTD 複合体構造解析

クライオ電顕解析および結晶化試行を同時に進めた。SEC-MALS や、SAXS を使用して、溶液状態の構造を評価すると共に、蛍光偏光消光法により両者の相互作用を比較した。STAT1 のバリエーションとして、(U)-STAT1, U- $\Delta$ N STAT1, pY-STAT1,  $\Delta$ N-pY-STAT1, pY-STAT1- $\Delta$ C, pY-STAT1 core ( $\Delta$ N,  $\Delta$ C), pY-STAT1 Y77A/L77A を使用した。

#### (3) 麻疹 V による、ISGF 形成阻害機構の解明

研究開始前に、表面プラズモン共鳴法により、STAT2 と IRF9 との相互作用を、MeV-V が阻害することが判明していた。この現象をさらに観測し、阻害機構をになっている実体を知るため、ゲル濾過クロマトグラフィや超遠心分析法、等温滴定型熱量計を使った競合阻害測定をおこなった。使用した MeV-V は、全長の他、111, 150, 221, 230 番目のアミノ酸から翻訳したものを使用した。

#### (4) 麻疹 V の性状・構造解析

$^{13}\text{C}$  および  $^{15}\text{N}$  ラベル化した MeV-V を用いて、溶液 NMR 各種測定により、V の性状を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) リン酸化 STAT 四量体構造解析 (DNA 複合体)

Titan Krios (300kV)を用いて、リン酸化 STAT1 四量体と M67 DNA 配列の複合体構造解析に成功した。二量体として refine したものと、および四量体として refine したものの分解能は、FSC=0.143 の基準を用いて、それぞれ 3.07 Å および 3.76 Å である。これは、世界初の四量体 STAT の構造解析であり、核内に存在するタンデムプロモーターに対して STAT 四量体がどのような認識をおこなうかのモデルを立てることができた (論文投稿中)。

#### (2) リン酸化 STAT 四量体と RVPCTD 複合体構造解析

まず、各コンストラクトと RVPCTD との相互作用を精査した結果、RVPCTD は STAT1 がリン酸化された状態であること、および、四量体を形成することを認識していることが明らかになり、3 箇所程度の相互作用部位を持っていることが予測された。(1)で解析した STAT と DNA 複合体構造に対して、RVPCTD が結合して大きな構造変化があるかどうかを、X線小角散乱法で検証したところ、構造変化が無いことが判明した。Titan Krios (300kV)を用いた複合体の構造解析はほぼ終わっている。予測されたように、RVPCTD は多点で STAT 分子と相互作用しており、翻訳を阻害するために DNA 結合と競合していることが判明した。

#### (3) 麻疹 V による、ISGF 形成阻害機構の解明

相互作用定量結果 (等温滴定型熱量計 (ITC), 表面プラズモン共鳴 (SPR), 超遠心分析) からは、STAT2/V 間 (KD = 250 nM) と STAT2/IRF9 間 (KD = 240 nM) に殆ど差が無い。しかしながら、SEC において三者存在下における複合体形成を観測したところ、STAT2/V の複合体のほうが圧倒的優位に形成された。この結果は ITC および超遠心分析による三者結合競合実験の結果とは一致していないことから、ゲル濾過中では非平衡系の競合が起こることを提唱することができた。カイネティクス ( $k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$ ) の違いに由来すると考え、SPR 法による検証が

ら、両結合反応において結合/解離速度定数に大きな相違はなかった( $k_{on}$  は STAT/V 間が  $1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , STAT2/ IRF9 間が  $1.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )。また、VCTD 領域を刈り込んでいくことで、VCTD と STAT2 の相互作用は 230 番目以降のアミノ酸が必要充分であることがわかった。

#### (4) 麻疹 V の性状・構造解析

VNTD (1-230), VCTD (110 - 300), VCTD (221 - 300)をそれぞれ 15N ラベル化し、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC または  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMQC 測定をおこなった結果、VNTD (1-230)は構造非形成領域に特有のスペクトルを示し、VCTD (110 - 300)は分散したシグナルがあるものの、各種 NMR 実験に不向きであることがわかったが、VCTD (221 - 300)はジオール存在下において分散の良いスペクトルが得られ、本コンストラクトを用いて種々の研究を進めた。STAT2 を滴定すると、顕著に強度の低下するシグナルが複数存在し、STAT2 との相互作用を確認することができた。構造解析のため、VCTD (221 - 300)を  $^{13}\text{C}$  および  $^{15}\text{N}$  ラベル化し、3次元測定により HNCQ, HN(CO)CA, HNCA, CBCA(CO)NH を収集した。引き続き、HNCACB, C(CO)NH, HBHA(CO)NH 等を測定する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sasaki Yuto, Saitoh Kodai, Kagohashi Kota, Ose Toyoyuki, Kawahara Shoya, Kitai Yuichi, Muromoto Ryuta, Sekine Yuichi, Ichii Michiko, Yoshimura Akihiko, Oritani Kenji, Kashiwakura Jun-ichi, Matsuda Tadashi	4. 巻 211
2. 論文標題 STAP-2-Derived Peptide Suppresses TCR-Mediated Signals to Initiate Immune Responses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 755 ~ 766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2200942	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wakui Hajime, Yokoi Yasuhiro, Horidome Chieko, Ose Toyoyuki, Yao Min, Tanaka Yoshikazu, Hinou Hiroshi, Nishimura Shin-Ichiro	4. 巻 4
2. 論文標題 Structural and molecular insight into antibody recognition of dynamic neopeptides in membrane tethered MUC1 of pancreatic cancer cells and secreted exosomes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 RSC Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 564 ~ 572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d3cb00036b	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maemoto Taiga, Kitai Yuichi, Takahashi Runa, Shoji Haruka, Yamada Shunsuke, Takei Shiho, Ito Daiki, Muromoto Ryuta, Kashiwakura Jun-ichi, Handa Haruka, Hashimoto Ari, Hashimoto Shigeru, Ose Toyoyuki, Oritani Kenji, Matsuda Tadashi	4. 巻 299
2. 論文標題 A peptide derived from adaptor protein STAP-2 inhibits tumor progression by downregulating epidermal growth factor receptor signaling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102724 ~ 102724
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102724	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kajikawa Mizuho, Hata Mizuki, Ishimura Maho, Imaizumi Nanae, Kimura Minako, Miyano Kei, Ose Toyoyuki, Asai Daisuke, Ishido Satoshi, Kanamoto Taisei	4. 巻 479
2. 論文標題 Importance of accessibility to the extracellular juxtamembrane stalk region of membrane protein for substrate recognition by viral ubiquitin ligase K5	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 2261 ~ 2278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20220288	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yumoto Kohei, Arisaka Tomoaki, Okada Kazuma, Aoki Kyosuke, Ose Toyoyuki, Masatani Tatsunori, Sugiyama Makoto, Ito Naoto, Fukuhara Hideo, Maenaka Katsumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Characterization of Single-Chain Fv Fragments of Neutralizing Antibodies to Rabies Virus Glycoprotein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 2311 ~ 2311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13112311	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Daiki Ito, Madoka Kimoto, Hirohata Kiichi, Maruno Takahiro, Uchiyama Susumu, Min Yao, Toyoyuki Ose
2. 発表標題 Mechanistic analysis of type I interferon pathway inhibition by Measles virus V protein
3. 学会等名 生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Goda Nanaka, Kimoto Madoka, Ito Daiki, Morita Kaho, Kumeta Hiroyuki, Yao Min, Ose Toyoyuki
2. 発表標題 Characterization of the minimum region of measles virus V protein for the interaction with STAT2
3. 学会等名 生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木本円花・永野悠馬・杉山葵・姚閔・田所高志・前仲勝実・尾瀬農之
2. 発表標題 麻疹ウイルスVタンパク質によるType I IFN経路阻害機構の解明
3. 学会等名 日本結晶学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉山葵, 南未来, 野間井智, 蒋欣欣, Paul R. Gooley, Gregory W. Moseley, 前仲勝実, 姚閔, 尾瀬農之
2. 発表標題 狂犬病ウイルスP蛋白質によるJAK-STATシグナル阻害機構の解明
3. 学会等名 日本生化学会北海道支部会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miku Minami, Aoi Sugiyama, Tomo Nomai, Xinxin Jiang, Katsumi Maenaka, Min Yao, Toyoyuki Ose
2. 発表標題 Elucidation of host immune pathway inhibition mechanism by rabies virus P-protein
3. 学会等名 日本蛋白質科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Aoi Sugiyama, Miku Minami, Yukihiro Sugita, Mika Hirose, Shunsuke Kita, Katsumi Maenaka, Min Yao, Toyoyuki Ose
2. 発表標題 Studying the mechanism of rabies virus P-protein inhibition JAK-STAT pathway of host
3. 学会等名 生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武井梓穂, 松尾友樹, 神田諒, 中迫純希, 前仲勝実, 松田正, 姚閔, 尾瀬農之
2. 発表標題 アダプター分子介在によるBreast tumor kinaseのリン酸化能亢進機構の解明
3. 学会等名 生物物理学会北海道東北支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南未来, 杉山葵, 姚閔, 尾瀬農之
2. 発表標題 狂犬病ウイルス P 蛋白質とSTAT分子間相互作用の特異性解析
3. 学会等名 日本蛋白質科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toyoyuki Ose
2. 発表標題 Introduction of viral protein study in Hokkaido
3. 学会等名 Structural study on viral immune evasion (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 尾瀬農之
2. 発表標題 第三の因子によるJAK-STAT経路亢進および阻害の分子機構
3. 学会等名 日本薬学会第143年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kaho Morita, Nanaka Goda, Madoka Kimoto, Daiki Ito, Min Yao, Hiroyuki Kumeta, Toyoyuki Ose
2. 発表標題 Characterization of measles virus V protein by NMR spectroscopy
3. 学会等名 日本蛋白質科学会
4. 発表年 2023年



1. 発表者名 南 未来, 杉山 葵, 武川 祐一郎, 姚 関, 廣瀬 未果, 杉田 征彦, 尾瀬 農之
2. 発表標題 狂犬病ウイルスPタンパク質によるSTAT阻害機構の解明
3. 学会等名 日本蛋白質科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 武井 梓穂, 宇賀神 魁, 中迫 純希, 松尾 友樹, 神田 諒, 松田 正, 前仲 勝実, 姚 関, 尾瀬 農之
2. 発表標題 アダプター蛋白質介在に伴う、乳がん特異的キナーゼの活性亢進評価
3. 学会等名 日本蛋白質科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 合田菜々花, 森田香歩, 木本円花, 伊東大輝, 孫暁梅, 久米田博之, 尾瀬農之
2. 発表標題 麻疹ウイルスV蛋白質がtype I IFN経路を阻害するメカニズムの考察
3. 学会等名 生物物理学会北海道東北支部会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 森田香歩, 合田菜々花, 木本円花, 伊東大輝, 姚関, 久米田博之, 尾瀬農之
2. 発表標題 NMRを用いた麻疹ウイルスVタンパク質の性状・構造解析
3. 学会等名 日本蛋白質科学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 M. Minami, A. Sugiyama, Y. Takekawa, M. Yao, S. Inaba, M. Hirose, Y. Sugita, T. Ose
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡を用いた、狂犬病ウイルスによるヒトSTAT1経路阻害の構造基盤
3. 学会等名 日本蛋白質科学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 武井梓穂、宇賀神魁、前仲勝実、松田正、川越先生、齋尾智英、姚関、尾瀬農之
2. 発表標題 乳がん特異的キナーゼとアダプター蛋白質が形成する分子集合と酵素活性の相関を検証する
3. 学会等名 日本蛋白質科学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 飯塚祐太、武川祐一郎、南未来、尾瀬農之
2. 発表標題 STAT1/2ヘテロダイマーの作製と評価
3. 学会等名 日本蛋白質科学会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	久米田 博之  (Kumeta Hiroyuki)  (00399966)	北海道大学・先端生命科学研究院・学術専門職    (10101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	杉田 征彦  (Sugita Yukihiro)  (00734469)	京都大学・医生物学研究所・准教授    (14301)	
研究分担者	于 健  (Yu Jian)  (20587860)	大阪大学・蛋白質研究所・特任准教授（常勤）    (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関