

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08504

研究課題名 (和文) KSHV免疫回避膜タンパク質MIRによる標的認識機構の分子基盤解明

研究課題名 (英文) Substrate recognition mechanism of KSHV immune evasion molecule MIR

研究代表者

梶川 瑞穂 (KAJIKAWA, Mizuho)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00464389

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,700,000 円

研究成果の概要 (和文) : カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスは、免疫回避を担う膜結合型E3ユビキチンリガーゼMIRを発現し、宿主細胞表面の免疫タンパク質を分解する。我々は以前、MIRが膜貫通領域と細胞外領域で基質を認識することを見出した。本研究では、MIRによる基質認識の分子基盤を解明するため、膜貫通領域と細胞外領域からなる組換えMIRを作製した。得られたMIRを人工脂質二重膜であるナノディスクに再構成し、溶液NMRによるHSQCを測定したが、シグナルが低く構造決定には至らなかった。MIRの分子安定性を改善するため、MIRの変異体解析を行い、MIRの細胞質尾部がMIR構造を安定化するために必須であることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : Kaposi's sarcoma associated herpesvirus expresses immune evasion molecule family MIR, which is membrane-bound E3 ubiquitin ligases to downregulate several immune proteins on host cell surface. Our previous study revealed that MIR recognizes substrates through transmembrane and extracellular region. In this study, to reveal molecular basis of substrate recognition by MIR, recombinant MIR protein containing two transmembrane regions and extracellular region was prepared and reconstructed in nanodisc, which is artificial lipid bilayer. MIR-nanodisc was subjected to solution NMR analysis; however, HSQC signal was too low to determine structure of MIR. In order to improve molecular stability of MIR, we performed mutational analysis of MIR and revealed that cytoplasmic tail of MIR is essential to stabilize MIR structure.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：ウイルス 免疫回避 免疫受容体 膜タンパク質 ユビキチンリガーゼ ナノディスク

1. 研究開始当初の背景

(1) カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (Kaposi's sarcoma associated herpesvirus: KSHV) は後天性免疫不全症候群 (Acquired immune deficiency syndrome: AIDS) などに起因する免疫減退時に発症する潜伏感染性ウイルスであり、溶解感染時には重篤な腫瘍の原因となる。代表的な抗ヘルペス薬は KSHV に対して有効ではないため、効果的な治療薬の開発が求められる。

(2) 研究代表者の所属する研究グループは KSHV の溶解感染期遺伝子産物 Modulator of immune recognition (MIR)1 および MIR2 が、宿主の抗原提示を阻害する免疫回避分子であることを見出した (Ishido et al., J Virol, 74, 5300-5009, 2000)。MIR1 および MIR2 は宿主の抗原提示を担う免疫受容体 MHC-I を細胞表面より消失させ、さらに MIR2 は抗原提示の補助刺激を担う B7-2、およびキラー T 細胞との接着に関与する ICAM1 をも細胞表面より消失させる。KSHV 感染細胞では、通常のウイルス感染時に抗原提示を行うこれらの免疫受容体が消失するために抗原提示が成立しないことから、キラー T 細胞が感染細胞を駆除できないと考えられている。そのため、MIR による免疫回避を制御することができれば、全く新しい KSHV 治療法 (薬) の開発につなげることが期待できる。

(3) MIR1 および MIR2 は、どちらも膜貫通領域を 2 本持つ膜タンパク質型の E3 ユビキチンリガーゼである。二本の膜貫通領域と、これらを細胞外で繋ぐ短い細胞外領域、そして細胞質領域は N 末側の亜型 RING ドメインおよび C 末側の tail で構成される。MIR が標的となる免疫受容体を認識しユビキチン化することで、免疫受容体がユビキチン依存的エンドサイトーシスを起こして細胞表面より消失することがわかっている。MIR1 は MHC-I を、一方 MIR2 は MHC-I に加えて B7-2 および ICAM1 を標的とするように、MIR ファミリーには標的特異性があることから、研究代表者は標的認識を特異的に阻害する方法 (薬) を開発することで、MIR による免疫回避を制御できるとの考えに至った。しかしながら、MIR1 および MIR2 がそれぞれ特定の免疫受容体を標的とする分子機構の解明はこれまで不十分であった。

(4) そこで研究代表者は詳細なキメラ分子解析を行い、MIR1 は膜貫通領域で標的を認識し、一方の MIR2 は、膜貫通領域のみならず短い細胞外領域をも併用して標的を認識することを発見した (Kajikawa et al., J Virol, 86, 5288-5296, 2012)。これは、MIR2 が細胞外領域による認識を発達させることで、MIR1 よりも多様な免疫受容体 (MHC-I、B7-2、ICAM1 など) を標的とすることが可能

になったことを示唆するものである。この知見に基づき、研究代表者は MIR2 の細胞外領域による標的認識を阻害することができれば、KSHV の免疫回避に対する大幅な抑制効果を期待できると考えるに至ったが、この認識の分子基盤は不明であった。

2. 研究の目的

研究代表者は MIR による免疫受容体認識について詳細な変異体解析を行い、MIR は 2 本の膜貫通領域に加えて、膜貫通領域を繋ぐ短い細胞外領域が、免疫受容体の認識に重要な役割を担っているのではないかとこの着想に至った。そこで本研究では MIR の膜貫通領域および細胞外領域の構造決定を行い、その免疫受容体認識の分子基盤を詳細に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

膜タンパク質である MIR は、そのままでは結晶構造解析や NMR による構造解析に供することは困難である。しかし、基質の認識に関わると考えられる 2 本の膜貫通領域およびそれらをつなぐ短い細胞外領域に限定すれば、脂質二重膜を模した環境中での構造決定は可能であると考えられた。そこで研究代表者はすでに KSHV MIR の 2 本の膜貫通領域およびそれらをつなぐ細胞外領域のみからなる発現ベクターを構築し、大腸菌を用いた組換えタンパク質の大量発現、および逆相クロマトグラフィーを用いた高純度精製に成功している。しかしこの精製品を界面活性剤ミセル中に再構成し、溶液 NMR を用いて ^1H - ^{15}N HSQC を測定したところ、構造解析に十分な安定したシグナルを得ることはできないことも確認していた。そこで本研究では膜タンパク質のより安定な再構成系として知られる微小な脂質二重膜構造体である「ナノディスク」に組換え MIR を再構成し、溶液 NMR による構造解析を行った。

4. 研究成果

(1) 研究代表者は本研究実施前に、すでに組換え MIR とリン脂質とを混合し、それらを膜骨格タンパク質 MSP1D1 で束ねることで、MIR をナノディスク中に再構成できることを確認済みであった。そこで本研究においてはまず MIR を再構成したナノディスクを用いて実際に溶液 NMR による ^1H - ^{15}N HSQC を測定したところ、MIR に由来するシグナルを得ることに成功した。しかしながら、そのシグナル強度は MIR を界面活性剤ミセル中に再構成したものをを用いた ^1H - ^{15}N HSQC により得られたシグナルに比較して、非常に低いものであった。

研究代表者は以前の研究において、界面活性剤ミセル中での MIR は 1H-15N HSQC シグナルを十分な強度で得ることに成功しているものの、ミセル中での MIR 構造は非常に不安定であり、最終的に構造決定に至らなかった。したがってナノディスクへの MIR 再構成は、MIR が界面活性剤ミセルよりも正しい構造で再構成されることを期待したものであるが、そのシグナル強度が低いことによって、このままではその後の構造解析に用いることはできないと判断した。

(2) 研究代表者はナノディスク化によるシグナル強度の著しい低下の原因を、ナノディスク構成要素（膜骨格タンパク質およびリン脂質）による分子量の大幅な増大にあると考え、本研究においてナノディスクの直径を小さくして分子量を低下させる方法を試みた。ナノディスクの直径は用いる膜骨格タンパク質の長さに依存することから (Hagn et al., J Am Chem Soc, 135, 1919-1925, 2013)、もとの MSP1D1 よりも短い膜骨格タンパク質の発現ベクターを設計し、これにより得られた変異型膜骨格タンパク質を用いて、小型ナノディスクの作製を試みた。しかし、ゲル濾過クロマトグラフィーなどの分析の結果から、変異型ナノディスクのサイズがもとの MSP1D1 とほぼ変わらないことが明らかになった。膜骨格タンパク質のポリペプチドとしての小型化の達成は、SDS-PAGE によって確認されていたことから、おそらくこの膜骨格タンパク質は脂質を束ねる際に正しい会合を行うことができず、もとの MSP1D1 よりも不安定なナノディスクとして重合などが生じているものと考えられた。

(3) 再構成環境の最適化と並行して、MIR 自身の安定化を図る目的で、MIR タンパク質の膜貫通領域と、細胞外領域、そして細胞膜側の尾部領域について各種変異解析、欠損解析を行った。その結果、ミセルおよびナノディスク中での溶液 NMR 測定のために本研究にて使用した組換えポリペプチド、すなわち 2 本の膜貫通領域とそれらをつなぐループ（ヘリックス-ヘアピン-ヘリックス）のみでは細胞膜上で安定発現できないことが明らかになった。検討の結果、それぞれの膜貫通領域の細胞質側の領域について十分な長さを有することが、細胞膜上における MIR の安定発現に必要であることが明らかになった。

(4) ユビキチン化活性を担う細胞質 N 末端の亜型 RING ドメインと、基質膜タンパク質の認識を担うヘリックス-ヘアピン-ヘリックス領域、さらに安定発現のために十分な長さの C 末端側細胞質領域を確保し、それ以降の細胞質領域を欠損させた変異体においても、細胞における MIR のユビキチン化活性は保たれていなかった。これらのことから、安定発現のみならず活性の面においても、ヘリックス-

ヘアピン-ヘリックスのみでは不十分であることが示唆された。

(5) 細胞質領域の、特に C 末端側が膜貫通領域を始めとするその他の領域について影響を与えることについて、詳細な検討を行った。その結果、MIR ファミリーのうち MIR2 においては、MIR1 に比較してより長い細胞質 C 末端側の天然変性領域を、安定発現と活性保持に必要とすることが判明した。

(6) 本研究はウイルスユビキチンリガーゼ MIR による宿主タンパク質の認識機構を構造生物学的に解明するために始まったが、その目的の達成には至らなかった。しかし、原因を検討する過程において、構造を有しないと予測されている MIR の細胞質尾部が、細胞膜で区切られた膜貫通領域を含む全体構造の安定性を制御する可能性があるという、新しい知見を得ることができた。これらの成果は、KSHV MIR の分子性質の詳細な理解につながるとともに、膜タンパク質の細胞質尾部の存在意義の解明にも応用できると考えられる。

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）

〔学会発表〕（計 6 件）

- (1) Satoshi Ishido、Mizuho Kajikawa、Pai-Chi Li、Yuji Sugita、Recognition mode of viral MIR E3 ubiquitin ligase-mediated targeting、第 44 回日本免疫学会学術総会、2015 年 11 月 18 日～20 日、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）
- (2) 梶川瑞穂、加藤功也、木村美奈子、嶋秀明、井上能博、石戸聡、KSHV 免疫回避分子 MIR2 の膜貫通領域間ループは CD86 膜貫通領域を認識する、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月 22 日～24 日、福岡国際会議場（福岡県・福岡市）
- (3) 梶川瑞穂、加藤功也、木村美奈子、嶋秀明、井上能博、石戸聡、ウイルスユビキチンリガーゼ MIR2 による免疫受容体膜貫通領域の新たな認識機構、BMB2015、2015 年 12 月 1 日～4 日、神戸ポートアイランド（兵庫県・神戸市）
- (4) 藏本彩、梶川瑞穂、木村美奈子、嶋秀明、井上能博、石戸聡、KSHV ユビキチンリガーゼ MIR による膜貫通ヘリックス間相互作用を介した免疫受容体認識の分子基盤、BMB2015、2015 年 12 月 1 日～4 日、神戸ポートアイランド（兵庫県・神戸市）

- (5) 小泉龍士、嶋秀明、梶川瑞穂、井上能博、石戸聡、MHC class II 恒常的ユビキチン化モデルマウスの解析、第 17 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム、2016 年 9 月 3 日～4 日、帝京大学板橋キャンパス（東京都・板橋区）
- (6) 梶川瑞穂、高橋勇人、楠陽輔、加藤功也、嶋秀明、井上能博、石戸聡、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス免疫回避膜タンパク質 MIR2 の細胞質尾部は機能的発現に必須である、第 28 回日本生体防御学会学術総会、2017 年 6 月 29 日～7 月 1 日、相模女子大学グリーンホール（神奈川県・相模原市）

6. 研究組織

(1)研究代表者

梶川 瑞穂 (KAJIKAWA, Mizuho)
昭和薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：00464389