

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14471

研究課題名（和文）芳香族炭化水素受容体によるダイオキシン認識の構造基盤の解明

研究課題名（英文）Structural elucidation of dioxin recognition by aryl hydrocarbon receptor

研究代表者

大戸 梅治（Ohto, Umeharu）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・准教授

研究者番号：90451856

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：ダイオキシン受容体として知られる芳香族炭化水素受容体（AhR）の構造生物学的研究を進めた。核移行前複合体の調製を試みたが成功しなかった。AhR抑制複合体であるAhRR/ARNT複合体の結晶化を進め、その結晶構造を明らかにした。転写活性化複合体であるAhR/ARNT複合体の構造解析に向けて、種々の生物種由来のAhR/ARNT複合体の調製や、様々な変異体の発現と精製を試みた。

研究成果の概要（英文）：We conducted the structural biology of aryl hydrocarbon receptor (AhR), known as dioxin receptor. We tried to prepare the pre-nuclear translocation complex of AhR but it was not successful. We conducted the crystallization of the AhR inhibitory complex, AhRR/ARNT complex, and determined its crystal structure. To obtain the structural information of the AhR transcriptional activation complex, AhR/ARNT complex, we tried to prepare AhR/ARNT complex derived from various organism species, and expressed and purified various mutants of AhR/ARNT.

研究分野：構造生物学

キーワード：ダイオキシン 環境ホルモン

1. 研究開始当初の背景

環境中に広く存在するダイオキシンなどの芳香族炭化水素は、生体中では Aryl hydrocarbon receptor (AhR) (ダイオキシン受容体) により認識されている。AhR は転写調節因子であり、ダイオキシンに応答して薬物代謝酵素の誘導を促進させる。リガンド非結合状態の AhR は核外に存在しており、各種シャペロン蛋白質と複合体を形成し安定化されている。細胞内に取り込まれたダイオキシンなどの芳香族炭化水素が結合することで、AhR は核内へ移行して、核内で AhR nuclear translocator (ARNT) 蛋白質とヘテロ 2 量体を形成する。AhR/ARNT 複合体は、DNA 上の Xenobiotic responsive elements (XRE; 異物応答配列) と呼ばれる特定の配列に結合し、XRE 下流の遺伝子の転写が活性化されることが知られている。上記のように関与する分子自体は比較的明らかになっている。しかし、三次元構造をベースにした詳細な分子認識機構はほとんど不明である。

2. 研究の目的

本課題では、AhR によるダイオキシン認識と転写活性化を明らかにするために

1. AhR/Hsp90/XAP2/p23 複合体 (核移行前複合体)
 2. AhRR/ARNT 複合体 (AhR 抑制複合体)
 3. AhR/ARNT/リガンド/DNA 複合体 (転写活性化複合体)
- の構造解析を目指す。

AhR は bHLH-PAS (Basic-Helix-loop-Helix - Per-Arnt-Sim) ファミリーに属する転写因子である。N 末端側に bHLH ドメインが存在し、塩基性モチーフ (DNA 結合に関与するとされている) と 2 量体形成に関与する HLH モチーフが存在している。その後ろに 2 つの PAS ドメイン (PAS-A と PAS-B) を有しており、PAS-B ドメインがリガンド結合に関与するとされている。AhR の後半 300 残基程度は、転写活性化に関与しているとされている。

これまでに、この bHLH-PAS ファミリーに属する転写活性化因子による転写活性化機構は三次元構造的には明らかにされていない。本課題の目標である AhR/リガンド/ARNT/DNA の 4 者複合体構造を明らかにすることは、AhR によるリガンドの認識、AhR と ARNT との相互作用、AhR/ARNT による DNA 認識機構を原子レベルで明らかにすることに加え、これら bHLH-PAS ファミリーに属する蛋白質一般の転写活性化に対して重要な知見を与えるものとなる。

3. 研究の方法

結晶化試料は、昆虫細胞を用いて、AhR と ARNT を共発現して調製する。AhR と ARNT の発現領域、また、様々なリガンドや DNA 配列を検討することで、構造解析可能な良質の結晶を得られるようにする。結晶が得られ

たら、放射光を用いて高分解能の回折データを収集し、既存の構造解析手法を駆使して迅速に構造決定を行う。

4. 研究成果

(AhR/Hsp90/XAP2/p23 複合体)
核移行前複体の構造解析を目指してまずサンプルの調製を試みた。複体の構成タンパク質のそれぞれの発現ベクターを作成し、sf9 細胞を用いた共発現を試みた。しかし、全長 AhR は発現量が非常に低く、また発現したタンパク質はゲルろ過カラムで排除限界に溶出したことから、正しくフォールドされていないと判断した。また、ゲルろ過カラムで、共発現した他のタンパク質とも異なる位置に溶出しており、複体の発現はできていないと判断した。今後は、HEK293 細胞を用いて複体の発現と調製を試みる予定である。

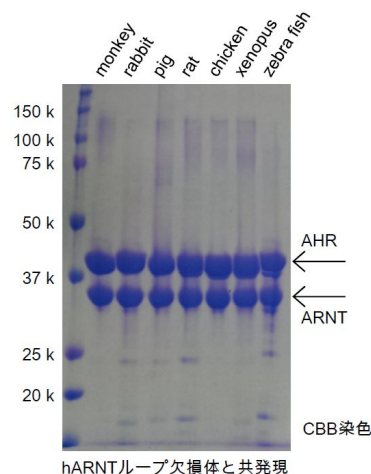
(AhRR/ARNT 複合体)

AhR 抑制複合体である AhRR/ARNT 複体の構造解析を目指して、まず試料調製法の検討を行った。AhRR、および ARNT のそれぞれの発現領域を変えて共発現を行い、最適な発現領域を決定した。得られた AhRR/ARNT 複体の精製方法を確立し、DNA との結合確認、結晶化を行った。精製した AhRR/ARNT 複体は DNA との結合活性を保持していた。結晶化スクリーニングの結果得られた結晶化条件を最適化し、構造解析に十分な大きさの単結晶を得ることに成功した。放射光 X 線を用いて、分解能 2.5 Å の回折強度データを得て、分子置換法により位相を決定し AhRR/ARNT 複体の結晶構造を明らかにした。得られた AhRR/ARNT 複体の中の ARNT のドメイン間の配置は、報告されている HIF/ARNT 複合体中の ARNT のドメイン配置と異なっていた。

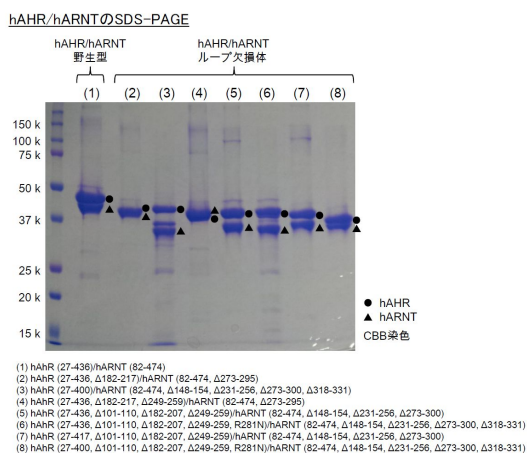
(AhR/ARNT/リガンド/DNA 複合体)

AhR/ARNT/リガンド複合体、さらにはそれと

種々の生物種由来の AHR の SDS-PAGE



DNA との複合体の構造解析を目指して、種々の細胞種由来の AhR/ARNT 複合体の発現系の構築を行った。さらに、プロテアーゼによる限定分解、2 次構造予測、類似構造との比較から、フレキシブルだと考えられる領域を欠損させた発現領域の精製試料を複数調製した。これらの変異を導入した AhR/ARNT 複合体は、野生型と同等の DNA 結合活性を保持しており、また野生型 AhR/ARNT に比べてプロテアーゼによる分解を受けにくく安定性が向上した。現在これらの精製試料を用いて結晶化のスクリーニングを行っている。



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16件)

- Zhang, Z., Ohto, U., Shibata, T., Krayukhina, E., Taoka, M., Yamauchi, Y., Tanji, H., Isobe, T., Uchiyama, S., Miyake, K., & Shimizu, T. Structural Analysis Reveals that Toll-like Receptor 7 Is a Dual Receptor for Guanosine and Single-Stranded RNA. *Immunity* **45**, 1-12. (2016)
- Miyake, K., Shibata, T., Ohto, U., & Shimizu, T. Emerging roles of the processing of nucleic acids and Toll-like receptors in innate immune responses to nucleic acids. *J Leukoc Biol.* **101**, 135-142.
- Ohto, U., Ishida, H., Krayukhina, H., Uchiyama, S., Inoue, N., & Shimizu, T. Structure of IZUMO1-JUNO reveals sperm-oocyte recognition during mammalian fertilization. *Nature* **534**, 566-569. (2016)
- Maekawa, S., Ohto, U., Shibata, T., Miyake, K., & Shimizu, T. Crystal structure of NOD2 and its implications in human disease. *Nature Commun.* **7**, 11813. (2016)
- Tanji, H., Ohto, U., Motoi, Y., Shibata, T., Miyake, K., & Shimizu, T. Autoinhibition and relief mechanism by the proteolytic processing of Toll-like receptor 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 3012-3017. (2016)
- Ohto, U., & Shimizu, T. Structural aspects of nucleic acid-sensing Toll-like receptors. *Biophys. Rev.* **8**, 33-43. (2016)
- Beesu, M., Caruso, G., Salyer, A. C., Shukla, N. M., Khetani, K. K., Smith, L. J., Fox, L. M., Tanji, H., Ohto, U., Shimizu, T., & David, S. A. Identification of a Human Toll-Like Receptor (TLR) 8-Specific Agonist and a Functional Pan-TLR Inhibitor in 2-Aminoimidazoles. *J Med Chem.* **59**, 3311-3330. (2016)
- Shibata, T., Ohto, U., Nomura, S., Kibata, K., Motoi, Y., Zhang, Y., Murakami, Y., Fukui, R., Ishimoto, T., Sano, S., Ito, T., Shimizu, T., & Miyake, K. Guanosine and its modified derivatives are endogenous ligands for TLR7. *Int. Immunol.* **28**, 211-222. (2016).
- Deguchi, A., Tomita, T., Ohto, U., Takemura, K., Kitao, A., Akashi-Takamura, S., Miyake, K., & Maru Y. Eritoran inhibits S100A8-mediated TLR4/MD-2 activation and tumor growth by changing the immune microenvironment. *Oncogene* **35**, 1445-1456. (2016).
- Beesu, M., Caruso, G., Salyer, A., Khetani, K., Sil, D., Weerasinghe, M., Tanji, H., Ohto, U., Shimizu, T., & David, S. A. Structure-based Design of Human TLR8-specific Agonists with Augmented Potency and Adjuvanticity. *J. Med. Chem.* **58**, 7833-7849. (2015)
- Ganapathi, L., Van Haren, S., Dowling, D. J., Bergelson, I., Shukla, N. M.,

- Malladi, S. S., Balakrishna, R., Tanji, H., **Ohto, U.**, Shimizu, T., David, S. A., & Levy, O. The Imidazoquinoline Toll-Like Receptor-7/8 Agonist Hybrid-2 Potently Induces Cytokine Production by Human Newborn and Adult Leukocytes. *PLoS One*. Aug 14;10(8):e0134640. (2015)
12. Sakurai, S., **Ohto, U.**, & Shimizu, T. Structure of human Roquin-2 and its complex with constitutive-decay element RNA. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. **71**, 1048-54. (2015)
 13. Kannno, A., Tanimura, N., Ishizaki, M., Ohko, K., Motoi, Y., Onji, M., Fukui, R., Shimozato, T., Yamamoto, K., Shibata, T., Sano, S., Sugahara-Tobinai, A., Takai, T., **Ohto, U.**, Shimizu, T., Saitoh, S., & Miyake, K. (2015) Targeting cell surface TLR7 for therapeutic intervention in autoimmune diseases. *Nat. Commun.* **6**, 6119.
 14. Chan, M. P., Onji, M., Fukui, R., Kawane, K., Shibata, T., Saitoh, S., **Ohto, U.**, Shimizu, T., Barber, G. N., & Miyake, K. (2015) DNase II-dependent DNA digestion is required for DNA sensing by TLR9. *Nat. Commun.* **6**, 5853.
 15. **Ohto, U.**, Shibata, T., Tanji, H., Ishida, H., Krayukhina, E., Uchiyama, S., Miyake, K., & Shimizu, T. (2015) Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9. *Nature* **520**, 702-705.
 16. Tanji, H., **Ohto, U.**, Shibata, T., Taoka, M., Yamauchi, Y., Isobe, T., Miyake, K., & Shimizu, T. (2015) Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA. *Nat Struct Mol Biol*. **22**, 109-15.
- [学会発表](計10件)
1. 丹治裕美、大戸梅治、柴田琢磨、田岡万悟、山内芳雄、磯邊俊明、三宅健介、清水敏之. 自然免疫系一本鎖RNA受容体TLR8の構造基盤 /Structural basis for innate immune single-stranded RNA receptor TLR8. 第15回日本蛋白質科学会年会. 2015年6月24-26日. 徳島.
 2. 前川早貴子、大戸梅治、清水敏之. 自然免疫受容体NOD2の構造学的研究. 第15回日本蛋白質科学会年会. 2015年6月24-26日. 徳島.
 3. 櫻井駿也、大戸梅治、清水敏之. mRNA分解に関するタンパク質Roquin-2とRNA複合体のX線結晶構造解析. 平成27年度日本結晶学会. 2015年10月17-18日. 大阪.
 4. Umeharu Ohto. Ligand recognition and signal transduction by Toll-like receptor. 第53回日本生物物理学学会. 2015年9月13-15日. 金沢.
 5. U. Ohto, T. Shibata, H. Tanji, H. Ishida, E. Krayukhina, S. Uchiyama, K. Miyake, and T. Shimizu. Crystallographic analyses of Toll-like receptor 9 recognizing CpG DNA. Toll meeting 2015. Sep. 30-Oct. 3, 2015. Marbella, Spain.
 6. 張志寛、大戸梅治、清水敏之. 自然免疫受容体TLR7の構造学的研究 (Structural study of Toll-like receptor 7 in innate immune system). 第16回日本蛋白質科学会年会. 2016年6月7-9日. 博多.
 7. 大戸梅治、清水敏之. 核酸認識 Toll様受容体によるリガンド認識とシグナル伝達の構造基盤. BMB2015 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会. 2015年12月1-4日. 神戸.
 8. Umeharu Ohto. Crystal structure of NOD2 reveals its implications in human diseases. 第42回内藤コンファレンス. 2016年10月4-7日. 札幌.
 9. Umeharu Ohto and Toshiyuki Shimizu. Structures of nucleic acids sensing Toll-like receptors. The 45th annual meeting of the Japanese Society for Immunology (JSI). 2016年12月5-7日. 沖縄.
 10. Hiromi Tanji, Umeharu Ohto, Toshiyuki Shimizu. Structural studies of innate

immune RNA receptor human TLR8.
14th Conference of the Asian
Crystallographic Association. Dec. 5-7,
2016. Hanoi, Vietnam.

〔図書〕(計0件)

〔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://www.f.u-tokyo.ac.jp/~kouzou/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大戸 梅治 (OHTO UMEHARU)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授

研究者番号：90451856