

令和元年6月7日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04752

研究課題名(和文) 炎症誘導に関わるシグナル伝達経路の構造生物学的解明

研究課題名(英文) Structural biology of inflammatory response

研究代表者

朽尾 豪人 (Tochio, Hidehito)

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：70336593

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)：AFM観察とNMR分光法によって、MyD88の分子内のドメイン間相互作用を発見し、相互作用部位を同定した。また、IL-18の前駆体のプロペプチド配列部分がIL-18本体と相互作用していることを見出した。また、前駆体の熱力学的安定性が成熟型IL-18よりも高いことをCDスペクトルとNMR測定によって明らかにした。また、プロペプチド配列を含むペプチドも同様にIL-18に結合することを見出した。さらに、IL-37の結晶構造を決定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MyD88はIL-1ファミリーやToll様受容体のシグナル伝達にとって重要なアダプタータンパク質である。今回、MyD88がOpenとCloseの2つの状態をとることを初めて明らかにした。このスイッチングが、MyD88下流のシグナル伝達制御に利用されている可能性があり、MyD88に関わる多様なシグナル伝達の研究にとって極めて意義深いものだと考えられる。IL-18や他のIL-1ファミリーの前駆体に関する構造情報はほとんどなかったため、本研究で得られた情報は貴重である。特に、IL-1ファミリーのプロペプチドと本体の相互作用を明らかにした例は初めてであり、今後の研究を促すものである。

研究成果の概要(英文)：The interdomain interaction within the molecule of MyD88 was revealed by AFM observation and NMR spectroscopy. The interaction sites were also identified by mutagenesis. In addition, it was found by using NMR that the propeptide portion of the precursor of IL-18 extensively interacted with the main body of IL-18. CD spectra and NMR measurements revealed that the thermodynamic stability of the precursor was higher than that of mature IL-18. A peptide containing the propeptide sequence was found to bind to IL-18, reproducing the interaction seen in the precursor of IL-18. In addition, the crystal structure of IL-37 was determined.

研究分野：構造生物学

キーワード：IL-18 MyD88

1. 研究開始当初の背景

炎症は、様々な侵襲物に対する重要な生体防御反応である。その一方で、炎症の長期化・慢性化は生体に害を及ぼし、多様な難治性疾患を引き起こす。このような炎症性疾患に対処するためには、炎症の発生機序を分子論的に理解することが必要である。しかし、炎症を引き起こす分子過程は極めて複雑であり、その詳細は十分には解明されていなかった。近年、自然免疫や炎症に関わるシグナル伝達経路の解明が急速に進みつつあり、鍵となる種々の受容体や機能性タンパク質が同定されてきている。例えば、炎症を惹起することが既に知られていた感染(細菌、ウイルス)、アスベスト・シリカ、重金属曝露、紫外線・放射線などに加えて、代謝産物の異常蓄積(尿酸結晶、過酸化脂質)や高血糖、肥満によっても炎症が惹起され、痛風、動脈硬化や2型糖尿病などの生活習慣病を引き起こすことなども報告され、過剰な炎症が引き起こす疾患が極めて多岐に渡ることが分かってきた。

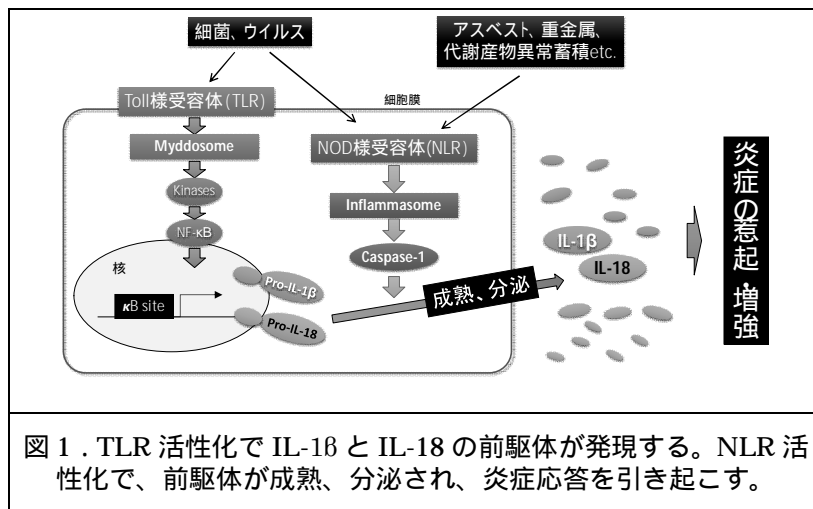


図1. TLR 活性化で IL-18 と IL-18 の前駆体が発現する。NLR 活性化で、前駆体が成熟、分泌され、炎症応答を引き起こす。

炎症は、マクロファージなどの免疫細胞が外部刺激に応じて炎症誘導性サイトカイン(インターロイキン(IL)-18 や IL-18)を発現・分泌することで惹起される。IL-18 や IL-18 はケモカインやさらなる炎症性サイトカインの誘導を促して免疫細胞を活性化し、炎症が増強・確立される。IL-18・IL-18 の分泌は、Toll 様受容体から NF-κB や AP-1 の活性化を経て合成された L-18 や IL-18 の前駆体が、NOD 様受容体によって活性化された Caspase-1 によって成熟化(部位特異的切断)を受ける二段階の過程である(図1)。このように、炎症誘導に至る大筋は明らかにされたが、分子論的理解のためには、まだ構造学的に取り組むべき課題が多く残されている。例えば、IL-18・IL-18 は IL-1 ファミリーメンバーだが、他に IL-33、-36、-37 など同ファミリーに属する。これらは IL-18 の受容体の一部に結合するが、シグナルへの影響や炎症における役割など、詳細な理解には至っていない。また、L-18・IL-18 の前駆体は細胞質に留まる一方、成熟化を受けると分泌されるが、その機構も十分には解明されていない(*Immunity* 42,p991(2015))。また、Toll 様受容体の下流に目を向けると(図1)、アダプタータンパク質 MyD88 と下流のキナーゼ群の会合については結晶構造が解かれたものの(*Nature* 465,p885(2010))、上流側の受容体との結合様式や、10 以上ある TLR ファミリーのシグナル分岐を司る機構についての理解は進んでいない。

2. 研究の目的

本課題では、炎症誘導性サイトカインである IL-1 ファミリーと受容体との相互作用やその前駆体、及び、関連する細胞内シグナル伝達経路の核となるアダプタータンパク質を対象とした構造研究を行なう。

具体的には、以下の三項目の研究を行った。

- 1) IL-37 の構造解析と受容体との相互作用
- 2) IL-18 前駆体の構造解析
- 3) MyD88 全長の構造動態の解析

3. 研究の方法

【項目1】IL-37 の構造解析と受容体との相互作用

IL-37 は IL-1 ・ IL-18 の受容体の一部に結合して炎症を抑制するとされるが、その機構は

全く不明である。IL-37 の X 線結晶構造解析、受容体との相互作用解析を行った。

【項目 2】IL-18 前駆体の構造解析

興味深いことに、IL-1 と IL-18 前駆体の成熟化反応では、単にペプチド鎖が切断除去されるだけでなく、立体構造も大きく変化することが示唆されている (*JBC* **284**,p26137(2009))。つまり、両者の構造の違いが、分泌されるか否かを決定付けている可能性がある。成熟型の IL-18 の構造は既に解かれているが、前駆体の構造はわかっていない。そこで、NMR や CD スペクトルを用いて IL-18 前駆体の構造解析を行った。

【項目 3】MyD88 全長の構造動態の解析

IL-18 や IL-18 がその受容体に結合しこれを活性化すると、そのシグナルは MyD88 と呼ばれるアダプター蛋白質が作る Myddosome を介してキナーゼ群に伝達される(図 1)。興味深いことに、この MyD88 とその下流のシグナル伝達経路は自然免疫の中心的受容体である Toll 様受容体(TLR)のシグナル伝達と共通している。MyD88 は TIR(Toll/IL-1 receptor)ドメインと Death ドメイン(DD)からなり、TIR が受容体と、DD が下流のキナーゼ(IRAKs)と、それぞれ会合することで、活性化受容体とキナーゼを繋ぐ。MyD88 の DD と TIR に関しては個別に構造が決定されているが、全長でのドメイン間相互作用などは全くわかっていなかった。そこで、MyD88 全長を高速 AFM(原子間力顕微鏡)を用いて観察し、ドメイン間の相互作用を調べた。また、NMR を用いてもドメイン間の相互作用の有無や相互作用残基を調べた。

4 . 研究成果

【項目 1】IL-37 の構造解析と受容体との相互作用

IL-37 の結晶構造の決定に成功した。IL-37 は二量体を形成していることがゲル濾過等でわかっていたが、結晶中でも二量体を形成していた。また、IL-37 と相互作用すると報告されている幾つかのタンパク質との相互作用を NMR 滴定実験や GST プルダウン実験で検証した。しかしながら、相互作用は極めて弱いものであった。これまでの報告は、細胞を使った実験に基づいていたことから、生体内・細胞内では他の要因によって相互作用が強められている可能性があり、一層の検討が必要である。

【項目 2】IL-18 前駆体の構造解析

IL-18 の前駆体 (Pro-IL-18) と成熟型では NMR スペクトルが全く異なる事を発見した。このことから、Pro-IL-18 に含まれる 36 アミノ酸残基のプロペプチド配列部分が残りの部分 (=成熟型に対応) と接触し、その構造に影響を与えていることが示唆された。このプロペプチド配列部分の削除変異体を作成し NMR スペクトルを測定することで、IL-18 との結合に必須な領域を絞り込む事ができた。

また、CD スペクトルや NMR スペクトルを利用して IL-18 の前駆体である Pro-IL-18 と、成熟型 IL-18 の熱安定性を調べたところ、Pro-IL-18 のほうが安定であることがわかった。IL-18 の類縁体である IL-1 の場合は前駆体のほうが不安定であったことから、両者で大きく物理化学的性質が異なることが明らかとなった。

また、IL-18 のプロペプチド配列部分のみからなるペプチドを合成したところ、これが IL-18 に結合することがわかった。また、培養細胞を用いた実験により、当該ペプチドが IL-18 の生理活性を阻害することを発見した。現時点での阻害活性は強くはないものの、アミノ酸配列や化学修飾を検討することでより強い阻害活性を示すペプチドが得られると期待され、炎症性疾患の治療薬開発に繋がる可能性がある。

【項目 3】MyD88 全長の構造動態の解析

高速 AFM を用いて、MyD88 の TIR ドメインと Death ドメイン (DD) の分子内相互作用を調べた。AFM 画像において、MyD88 分子の多くは、二つの極大部位を持った一つの塊として観察された。これらは、TIR と DD が分子内で強く結合した像だと考えられた。また、TIR と DD が解離した状態と思われる画像も得られた。次いで、分子毎、フレーム毎の MyD88 の分子内 TIR-DD 間距離を計測した。得られた距離情報から得られたヒストグラムを解析したところ、TIR-DD 間距離が長い集団 (Open 型) および短い集団 (Close 型) が存在することが明らかになった。つまり、MyD88 は、Open-Close 間の平衡状態として存在することがわかった。但し、通常の状態では、平衡は Close に偏っていると考えられ、そのままではキナーゼとの相互作用ができない。受容体側の相互作用が MyD88 を Open 型への変換を促進し、キナーゼとの相互作用、Myddosome 形成が始まると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Naotaka Tsutsumi, Ayumi Yokota, Takeshi Kimura, Zenichiro Kato, Toshiyuki Fukao, Masahiro Shirakawa, Hidenori Ohnishi, Hidehito Tochio, "An innate interaction between IL-18 and the propeptide that inactivates its precursor form", Scientific Reports, 9 巻、2019、6160 - 6168
DOI: 10.1038/s41598-019-42661-5.

Uno Masatoshi, Watanabe-Nakayama Takahiro, Konno Hiroki, Akagi Ken-ichi, Tsutsumi Naotaka, Fukao Toshiyuki, Shirakawa Masahiro, Ohnishi Hidenori, Tochio Hidehito, "Intramolecular interaction suggests an autosuppression mechanism for the innate immune adaptor protein MyD88", Chemical Communications, 54 巻、2018、12318 - 12321
DOI: 10.1039/c8cc06480f

Fujita Hiroaki, Tokunaga Akira, Shimizu Satoshi, Whiting Amanda L., Aguilar-Alonso Francisco, Takagi Kenji, Walinda Erik, Sasaki Yoshiteru, Shimokawa Taketo, Mizushima Tsunehiro, Ohki Izuru, Ariyoshi Mariko, Tochio Hidehito, Bernal Federico, Shirakawa Masahiro, Iwai Kazuhiro, "Cooperative Domain Formation by Homologous Motifs in HOIL-1L and SHARPIN Plays A Crucial Role in LUBAC Stabilization", Cell Reports, 23 巻、2018、1192 - 1204
DOI: 10.1016/j.celrep.2018.03.112

〔学会発表〕(計 6 件)

朽尾 豪人、Interaction between IL-18 and the propeptide that suppresses its proinflammatory activity, XXVIII International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2018 年

宇野 雅俊、免疫シグナルハブタンパク質 MyD88 の分子内相互作用解析、2017 年度生命科学系学会合同年次大会(Conbio2017)、2017 年

朽尾 豪人、Analysis of proteins in living mammalian cells with NMR spectroscopy, The 2nd International Symposium on Biofunctional Chemistry(ISBC2017)、2017 年

今村香代、抗炎症性サイトカイン IL-37 の構造解析、第 6 回岐阜構造生物学・医学・論理的創薬研究会シンポジウム、2017 年

朽尾 豪人、Structural study of proinflammatory cytokine Interleukin-18、第 42 回内藤コンファレンス "In the Vanguard of Structural Biology: Revolutionizing Life Sciences"、2016 年

今村香代、Functional study of an unique member of the IL-1 family cytokines、第 42 回内藤コンファレンス "In the Vanguard of Structural Biology: Revolutionizing Life Sciences"、2016 年

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：インターロイキン - 18 活性阻害剤

発明者：朽尾 豪人、堤尚孝、横田歩、大西秀典、木村豪、加藤善一郎

権利者：国立大学法人京都大学、国立大学法人岐阜大学

種類：特許

番号：PCT/JP2016/086731

出願年：2016 年

国内外の別：外国

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：大西秀典

ローマ字氏名：Ohnishi Hidenori

研究協力者氏名：紺野宏記

ローマ字氏名：Konno Hiroki

研究協力者氏名：真柳浩太

ローマ字氏名：Mayanagi Kouta

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。