

令和元年6月4日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07276

研究課題名(和文) Th1細胞分化機構の構造生物学的解明

研究課題名(英文) Structural basis of the Th1 cell differentiation.

研究代表者

池水 信二 (Ikemizu, Shinji)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・准教授

研究者番号：60333522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Th1細胞分化に関わるインターロイキン(IL)-27と2つの受容体WSX-1とgp130の三者複合体の結晶構造解析を行い、Th1細胞分化誘導機構の構造生物学的解明を目指した。これらの三種のタンパク質の調製を行い、IL-27/WSX-1複合体の調製を行い、結晶化を試みた。また、IL-27/WSX-1/gp130複合体の調製を試みたが、IL-27/WSX-1複合体に対するgp130の結合能が弱いため、現在gp130のコンストラクトの再設計を行なっているところである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Th1細胞は細胞免疫を調節する重要な細胞である。しかしながら、その分化機構に関しては構造生物学的知見が得られていない。また、IL-27はヘテロ二量体サイトカインであり、このファミリーのシグナル伝達複合体の構造は未知である。我々は、IL-27/WSX-1/gp130複合体の結晶構造解析を行い、Th1分化機構を構造生物学的に明らかにすると共に、ヘテロ二量体サイトカインのシグナル伝達複合体に関する構造生物学的知見を得ることにより、本領域に貢献する。

研究成果の概要(英文)：To understand Th1 cell differentiation mechanism from naive T cell, we study the structural analysis of interleukin (IL)-27 complexed with two receptors WSX-1 and gp130. Preparation of these three proteins was carried out, and then IL-27 / WSX-1 complex was successfully purified. The crystallization trials were attempted using purified IL-27 / WSX-1 complex. And preparation trials of IL-27 / WSX-1 / gp130 complex were failed due to the weak binding ability of gp130 to IL-27 / WSX-1 complex. We are currently redesigning the gp130 construct to obtain crystal of IL-27 / WSX-1 / gp130 complex.

研究分野：構造生物学

キーワード：サイトカイン 分子認識 複合体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

T細胞の活性化には、MHC/TCRの結合の結果起こる抗原特異的なシグナルとB7/CD28の結合の結果起こる抗原非特異的なシグナルの2つが必要である。我々はMHCとTCRの結合の増強に関わるLFA-3 (PNAS, 1999)とCD48 (JBC, 2006)の構造を明らかにした。また、Virus由来ペプチドとクラス2 MHCの複合体の構造解析を行い、ウイルス感染により自己免疫疾患様の症状を発症する機構を解明した(Nature Immunol., 2002)。後者のシグナルに関しては、B7-1 (Immunity, 2000)、B7-1/CTLA-4複合体 (Nature, 2001)、CTLA-4 (JBC, 2011)の構造解析を行った。更にCTLA-4の変異に伴う自己免疫疾患を発症するメカニズムを明らかにした(Nature Med., 2014)。これらのT細胞と抗原提示細胞間の分子の認識機構について総説にまとめた(Nature Immunol., 2003)。免疫が同種抗原の2度目の侵入に対して効率的に応答する為にT細胞が記憶して備える。この記憶T細胞の誘導において重要な働きをするインターロイキン(IL)-15と特異的な受容体IL-15R α の複合体の構造解析を行い、これらの分子認識機構を解明した(Nature Immunol., 2007)。

2. 研究の目的

T細胞は免疫応答を司る主要な細胞であり、抗原の種類に応じて適したT細胞サブセットに分化することにより、抗原に適した免疫応答を誘導する。T細胞の分化にはサイトカイン等が関わっており、1型ヘルパーT (Th1)細胞への分化にはIL-27が重要な役割を担っている。IL-27受容体は、特異的なWSX-1とIL-6などと共有されるgp130からなる。IL-27とこれらの受容体の単体および複合体の結晶構造解析を行うことにより、これらの分子認識機構およびTh1細胞分化機構を構造生物学的に解明することが本研究の目的である。本研究期間内に、IL-27、WSX-1、IL-27/WSX-1複合体およびWSX-1、IL-27/WSX-1/gp130複合体の結晶構造を明らかにする。IL-27とWSX-1の構造は未知であり、これらのタンパク質の分子認識機構に関する知見は得られていない。IL-27と受容体の認識機構およびシグナル伝達機構を構造生物学的に解明することが本研究の特色であり、本研究は独創的である。

3. 研究の方法

IL-27、WSX-1、IL-27/WSX-1複合体およびIL-27/WSX-1/gp130複合体の結晶を調製して、これらの構造を明らかにする。これらの構造を明らかにすることにより、Th1細胞分化機構を構造生物学的に解明することが本研究の目的である。また、IL-27を含むヘテロ二量体サイトカインはいずれも受容体との複合体の構造が明らかにされておらず、どのようなシグナル伝達複合体を形成するのか明らかにされていない。平成28年度には、IL-27とその特異的な受容体であるWSX-1の発現・精製・結晶化・構造解析を行う。平成29年度以降に、IL-27/WSX-1複合体およびIL-27/WSX-1/gp130複合体の結晶構造解析を行い、Th1細胞分化機構を構造生物学的に解明を目指す。

4. 研究成果

IL-27はp28とEBI3がジスルフィド結合を介した相互作用によりヘテロ二量体を形成している。この二量体形成の相互作用は弱く、精製過程で分離していた。その為、これらのタンパク質のペプチドリンカーで繋いだ一本鎖(s)IL-27を発現させて、精製を行った。精製したsIL-27の結晶化スクリーニングを行ったが、結晶は得られていない。特異的な受容体であるWSX-1については、大腸菌を用いて発現させ、その後精製を行う方法を確立していた。

精製した sIL-27 と WSX-1 を混ぜ、複合体として調製することに成功した。現在、sIL-27 / WSX-1 複合体についても結晶化を進めている。gp130 については、IL-6 と同じ領域で結合すると予想してドメイン(d)1-d3 までを既知の方法で調製して、sIL-27 / WSX-1 複合体と混ぜて、三者複合体としての調製を試みたが結合しなかった。そこで gp130 d1-d4 を調製したところ、sIL-27 / WSX-1 複合体に対して弱い親和性を示した。現在、様々な gp130 の領域を発現させて sIL-27 / WSX-1 複合体に対する結合領域を調べているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Shirouzono, T., Sakiyama, R., Chirifu, M., Kojima, T., Karasuyama, H., Ikemizu, S. "Crystal Structure of the CD200/CD200R Complex." **SPring-8/SACLA Research Report** 7(1), 1-4, 2019
DOI : 10.189567/rr.7.1.1
2. Nakamura, T., Hirata, K., Fujimiya, K., Chirifu, M., Arimori, T., Tamada, T., Ikemizu, S., Yamagata, Y. "X-ray Structure Analysis of Human Oxidized Nucleotide Hydrolase MTH1 using Crystals obtained under Microgravity." **Int. J. Microgravity Sci.** 36(1), 360103, 2019
3. Fessas P, Lee H, Ikemizu S, Janowitz T. "A molecular and preclinical comparison of the PD-1-targeted T-cell checkpoint inhibitors nivolumab and pembrolizumab." **Semin. Oncol.** 44, 136-140, 2017
4. Waz S, Nakamura T, Hirata K, Koga-Ogawa Y, Chirifu M, Arimori T, Tamada T, Ikemizu S, Nakabeppu Y, Yamagata Y. "Structural and Kinetic Studies of the Human Nudix Hydrolase MTH1 Reveal the Mechanism for Its Broad Substrate Specificity." **J. Biol. Chem.** 292, 2785-2794, 2017
5. Kojima T, Tsuchiya K, Ikemizu S, Yoshikawa S, Yamanishi Y, Watanabe M, Karasuyama H. "Novel CD200 homologues iSEC1 and iSEC2 are gastrointestinal secretory cell-specific ligands of inhibitory receptor CD200R." **Sci. Rep.** 6, 36457, 2016

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 池水信二, 佐賀大学シンクロトロン光応用研究センター講演会「免疫タンパク質-受容体の分子認識機構の解明」, (2018年12月13日), 鳥栖
2. Teruya Nakamura, Shaimaa Waz, Keisuke Hirata, Mami Chirifu, Shinji Ikemizu, Yuriko Yamagata "High resolution and time-resolved X-ray crystallographic study on enzymatic reaction of human MTH1" (招待

講演) 第 55 回日本生物物理学会年会、2017.9.19-21、熊本

3. 中村照也、Shaimaa Waz、平田啓介、池鯉鮒麻美、池水信二、山縣ゆり子、「カルボン酸の結合距離解析による hMTH1 の基質認識部位のプロトネーション状態の同定」、第 17 回日本蛋白質科学会年会、2017.6.20-22、仙台
4. 平田啓介、中村照也、Shaimaa Waz、池鯉鮒麻美、池水信二、山縣ゆり子、「幅広い基質特異性を持つ酸化ヌクレオチド加水分解酵素の反応過程の観察」、第 17 回日本蛋白質科学会年会、2017.6.20-22、仙台
5. Teruya Nakamura, Shaimaa Waz, Keisuke Hirata, Mami Chirifu, Shinji Ikemizu, Yuriko Yamagata " Role of protonation at Asp residues in the broad substrate specificity of human oxidative nucleotide hydrolase " 2017 West Coast Protein Crystallography Workshop, 2017.3.19-22, Asilomar, USA
6. David Sansom, Alan Kennedy, Tie Zheng Hou, Shinji Ikemizu, Lucy Walker "Understanding the impact of CTLA-4 mutations identified in patients with immune dysregulation" BSI/NVVI Annual Congress 2016, 2016.12.6-9, Liverpool
7. Shaimaa Ali, Teruya Nakamura, Keisuke Hirata, Mami Chirifu, Shinji Ikemizu, Yuriko Yamagata " Unique mechanism for broad substrate specificity of human MTH1 " 第 54 回日本生物物理学会年会、2016.11.25-27、つくば
8. Shaimaa Ali, Teruya Nakamura, Keisuke Hirata, Mami Chirifu, Shinji Ikemizu, Yuriko Yamagata, " Structural and mutational analysis of human MTH1 provides insight into the broad substrate specificity " Japan-Turkey International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 2016.10.2-3, Kumamoto
9. 平田啓介、中村照也、池鯉鮒麻美、池水信二、山縣ゆり子、「低温トラップ法を用いた酸化ヌクレオチド加水分解酵素の時分割 X 線結晶構造解析」、第 14 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム、2016.8.27-28、大阪
10. Kennedy, A., Hou, T. Z., Grimbacher, B., Ikemizu, S., Walker, L., Sansom, D., "Understanding the impact of patient-derived mutations on CTLA-4 expression and function" International Congress of Immunology 2016, 2016.8.21-26, Melbourne
11. Shaimaa Ali、中村 照也、平田 啓介、池鯉鮒 麻美、池水 信二、山縣 ゆり子、

「Structural and kinetic analysis of the broad substrate specificity of human oxidative nucleotide hydrolase」, 第16回日本蛋白質科学会年会、2016.6.7-9、福岡

〔図書〕(計 1 件)

1. Shinji Ikemizu, Simon J. Davis. (2018) "Principles of Protein Recognition by Small T-Cell Adhesion Proteins and Costimulatory Receptors" Structural Biology in Immunology(Eds, Chaim Putterman, David Cowburn and Steven Almo) ELSEVIER, pp 39-80
eBook ISBN: 9780128033708

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔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：

ローマ字氏名：