

平成 20 年 4 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18370045

研究課題名（和文） 自然免疫に関与するパターン認識タンパク質の立体構造解析

研究課題名（英文） Structural analysis of pattern-recognition proteins involved in innate immunity

研究代表者

川畑 俊一郎（KAWABATA SHUN-ICHIRO）

九州大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：90183037

研究成果の概要：カプトガニの自然免疫系で働くファクターGのZ2ドメインが、-1,3-グルカンの特異的に認識すること解明するとともに、Z2と蛍光タンパク質（EGFP）との融合タンパク質からなる真菌検出プローブを開発し、特許を出願した。さらに、NMRによる立体構造解析により、ファクターGによる-1,3-グルカン認識に必要な構造モチーフは、土壌細菌のセルロース結合タンパク質の糖鎖認識の構造モチーフと進化的に相同であることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2007年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：自然免疫、非自己認識、パターン認識、生体防御

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の生体防御反応は、自然免疫と獲得免疫から成り立っている。獲得免疫は、リンパ球が作る抗体による特異的な異物認識とその記憶に特徴がある。一方、自然免疫に関わるタンパク質は常に体内に存在しており、感染初期の生体防御に重要な役割を果している。特に、無脊椎動物では、獲得免疫が欠除しているため、自然免疫が感染防御の主役となっている。獲得免疫においては、特異的な抗体が多種多様の抗原を認識するが、自

然免疫においては、感染微生物の表面に保存された分子パターン（Pathogen-associated molecular patterns, PAMP）が異物認識の標的となる。例えば、グラム陰性菌のリポ多糖（LPS）、グラム陽性菌のペプチドグリカンやリポテイコ酸、そして真菌の-1,3-グルカン等のつくりだす分子パターンであり、PAMPを認識するタンパク質は、パターン認識タンパク質と呼ばれている。その後、自然免疫のパターン認識に関わるとされるToll類似受容体のひとつが、ヒトやマウスからクローニングされ、その受容体が種々のサイトカインを

誘導してT細胞やB細胞を活性化することで、獲得免疫とも強く連携していることが発見された。Toll は黄色ショウジョウバエ胚の背腹軸決定に関わる受容体として同定されたものである。ところが、最近の研究により、ショウジョウバエ Toll は自然免疫に関連した生体防御因子の発現誘導に関わってはいるが、PAMP を直接認識しないことが判明した。さらに、哺乳類においても、2005 年になって Toll 様受容体の結晶構造が判明したが、リガンドとの共結晶は得られておらず、パターン認識の構造基盤は、依然として不明のままである。

2 . 研究の目的

本研究では、カプトガニのパターン認識タンパク質の立体構造と機能解析により、パターン認識の構造基盤を解明することが目標である。本申請では、これら自然免疫に関わるパターン認識タンパク質、特にファクターC と LPS 複合体、および外骨格由来のキチン結合タンパク質の立体構造解析を行い、異物認識の構造基盤を解明して今後の自然免疫の分子機構の解明に大きく貢献したいと考えている。自然免疫系は、すべて PAMP を直接認識する真のパターン認識タンパク質で開始されることが判明しており、それらの立体構造と構造機能相関の解析を進めることにより、パターン認識という魅力的な概念に潜む本質の解明に多大な貢献をすることが期待される。

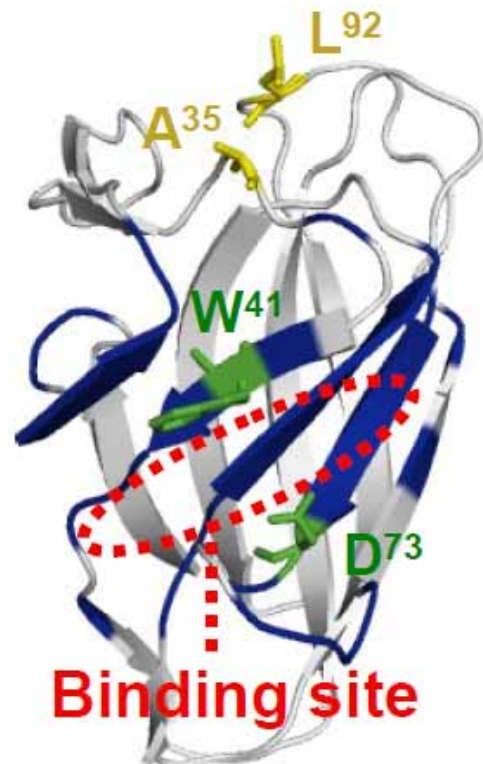
3 . 研究の方法

(1) パターン認識タンパク質の精製、リコンビナントの発現と巻き戻し、結晶解析や NMR 測定のための大量調製を行うとともに、機能ドメインとリガンドとの相互作用を種々の物理科学的手法を用いて定量する。

(2) 発現した機能ドメインの結晶化条件を検討するとともに、結晶化タンパク質の X 線結晶構造解析を行う。また、分子量 1 万以下のキチン結合タンパク質やそのドメインについては、NMR による構造解析も行う。

(3) カプトガニの補体系のパターン認識タンパク質の構造と機能解析を行う。

4 . 研究成果



Z2 ドメインの NMR 構造モデル (未発表)

(1) ファクター G は真菌の表層成分である -1,3-グルカンを認識し、体液凝固を引き起こす。ファクター G は、二つのサブユニットから成るセリンプロテアーゼ前駆体であり、サブユニットのキシラナーゼ Z 様ドメインの二回繰り返し部分 (Z1、Z2) によって、-1,3-グルカンを認識することが判明している。本研究では、Z 様ドメインの繰り返し構造が、-1,3-グルカンへの認識にどう関わっているのかを調べるため、Z2 ドメイン単独 (Z2)、二回繰り返し (2R-Z2) 組み換えタンパク質を作製し、-1,3-グルカンへの親和性を解析した。

2R-Z2 は、不溶性の -1,3-グルカン (カードラン) に対して、Z2 よりも強い親和性を示した。しかし、可溶性の -1,3-グルカン (ラミナリン) に対しては、Z2 は 2R-Z2 および精製したファクター G と同等の親和性を示した。これは、ラミナリンに対しては、Z2 ドメインは単独でしか結合できないことを示唆している。一方では、Z1、Z2 ドメインは土壌細菌 (*Cellvibrio mixtus*) のエンドグルカナーゼ 5 A のセルロース結合モ

ジュール (CmCBM6) と相同性を示すことが判明した。CmCBM6 は結晶構造が解かれており、その糖との結合部位も決定されている。今回、NMRを用いてZ2ドメインのラミナリペントオースとの結合部位の解析を行ったところ、CmCBM6の糖結合部位であるクレフトBと対応する部位で結合していることが示された。この結果から、ファクターGによる-1,3-グルカン認識には、土壌細菌で糖鎖認識に使われている構造モチーフが用いられていることが明らかになった。

(2) カプトガニから、C3のホモログTtC3を同定するとともに、血漿中からTtC3を精製した。血漿と各種細菌を混合すると補体系の活性化に伴い、TtC3bがチオエステル依存的に菌体の表面に結合することがフローサイトメトリーにより判明した。また、補体系の活性化は、微生物の細胞壁成分のうちグラム陰性菌表面成分であるリポ多糖(LPS)により最も顕著に誘導された。一方、血漿中にはLPSにより活性化するセリンプロテアーゼ前駆体であるfactor Cの存在がウエスタンブロットにより確認された。これまで、factor CはLPSを認識し、カプトガニ体液凝固反応の開始因子として機能することが知られている。事実、factor Cに対する抗体は、血漿中におけるLPSによる補体系の活性化を阻害した。また、活性化したfactor Cが直接TtC3を切断し、グラム陰性菌表面へのTtC3の結合を促進した。さらに、TtC3とfactor CはLPS非存在下で相互作用しており、その解離定数は、QCMにより $K_d = 4.9 \times 10^{-8} \text{M}$ と算出された。血漿中ではTtC3とfactor Cが複合体を形成しており、菌体表面での補体活性化を促進し、効率の良いグラム陰性菌表面へのTtC3bの結合を引き起こしていると考えられた。

(3) 節足動物の外皮は、感染微生物に対する第一線の生体防御の場として機能している。哺乳類の皮膚の角質化においては、トランスグルタミナーゼ(TGase)によるタンパク質間の架橋(GlnとLys側鎖間でのイソペプチド結合)が必須であるが、今回、節足動物においても外皮形成の初期過程にTGaseが関与していることを示す結果を得た。そこで、カプトガニ外皮のキチン結合タンパク質の中からTGase基質の一つを同定し、caraxin-1

と命名した。caraxin-1(135アミノ酸残基)には、N末端側にGln-richドメイン、中央領域にペントペプチドの9回繰り返し配列があって、ウエスタンブロットにより上皮での特異的発現が確認された。caraxin-1は、水溶液中では、約20量体として存在することが超遠心分析から推定された。また、N末端、及びC末端領域にはheptad repeat配列が含まれ、興味深いことに、この領域にProを導入したミュータントでは、ヘリックス含量が減少した。さらに、caraxin-1の特定のGln残基をAsn残基に置換したミュータントに対しては、TGaseによる架橋反応が抑制された。TGaseによって架橋されたcaraxin-1を走査型電子顕微鏡で観察したところ、ハチの巣状の編み目状繊維を形成していた。また、興味深いことに、架橋されたcaraxin-1においてもキチンとの結合が確認できた。キチンとの結合には、中央領域のペントペプチドが重要な役割を果たしていることが判明した。したがって、caraxin-1はコイルドコイル構造を介して多量体として存在し、TGaseの架橋反応により安定化された編み目状繊維を形成すると考えられる。さらに、外皮の損傷部位を塞ぐことで、体液の流出及び感染菌の侵入を防いでいると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

- 1) Ariki, S., Takahara, S., Shibata, T., Fukuoka, T., Ozaki, A., Endo, Y., Fujita, T., Koshihara, T., and Kawabata, S.: Factor C acts as a lipopolysaccharide-responsive C3 convertase in horseshoe crab complement activation. *J. Immunology* 181, 7794-8001 (2008). (査読有)
- 2) Kouno, T., Fujitani, N., Mizuguchi, M., Osaki, T., Nishimura, S., Kawabata, S., Aizawa, T., Demura, M., Nitta, K., and Kawano, K.: A novel beta-defensin structure: a potential strategy of big defensin to overcome resistance by Gram-positive bacteria. *Biochemistry* 47, 10611-10619 (2008). (査読有)
- 3) Koshihara, T., Hashii, T., and Kawabata, S.: A structural perspective on the interaction between lipopolysaccharide and Factor C, a receptor involved in

recognition of Gram-negative bacteria. *J. Biol. Chem.* **282**, 3962-3967 (2007). (査読有)

4) Matsuda, Y., Osaki, T., Hashii, T., Koshiba, T., and Kawabata, S.: A cysteine-rich protein from an arthropod stabilizes clotting mesh and immobilizes bacteria at injured sites. *J. Biol. Chem.* **282**, 33545-33552 (2007). (査読有)

5) Matusda, Y., Koshiba, T., Osaki, T., Suyama, H., Arisaka, F., Toh, Y., and Kawabata, S.: An arthropod cuticular chitin-binding protein endows injured sites with transglutaminase-dependent mesh. *J. Biol. Chem.* **282**, 37316-37324 (2007). (査読有)

6) Fujitani, N., Kouno, T., Nakahara, T., Takaya, K., Osaki, T., Kawabata, S., Mizuguchi, M., Aizawa, T., Demura, M., Nishimura, S., and Kawano, K.: The solution structure of horseshoe crab antimicrobial peptide tachystatin B with an inhibitory cysteine-knot motif. *J. Pept. Sci.* **13**, 269-279 (2007). (査読有)

7) 川畑俊一郎: ディフェンシン: 自然免疫で活躍する抗菌ペプチド. ペプチドと創薬、遺伝子医学 MOOK 8、200-205 頁、メディカルドゥ (2007) (総説、査読無)

8) 有木茂、川畑俊一郎: SPR によるタンパク質-脂質相互作用解析法. 分子間相互作用解析ハンドブック、278-281 頁、羊土社(2007). (総説、査読無)

9) 川畑俊一郎: カプトガニの異物認識と排除に関わるタンパク質の構造と機能. 生体防御医学事典、235-239 頁、朝倉書店(2007). (総説、査読無)

[学会発表](計 22 件)

国際学会招待講演

1) Kawabata, S.: Factor C acts as an LPS-responsive C3 convertase in horseshoe crab complement activation. Swedish-Japan STINT-meeting on Innate Immunity. Fukuoka, October 16-17, 2008.

2) Kawabata, S.: Amplification of the horseshoe crab innate immune reaction by an antimicrobial peptide. 5th World Fisheries Congress. Yokohama, October

20-25, 2008.

3) Kawabata, S.: A structural perspective on the interaction between lipopolysaccharide and horseshoe crab factor C. Regulation in Innate Immunity. Sapporo, Hokkaido University, October 28-29, 2008.

4) Koshiba, T., Shibata, T., and Kawabata, S.: A structural perspective on the interaction between lipopolysaccharide and horseshoe crab factor C. The 20th Naito Conference on Innate Immunity in Medicine and Biology [III]. Shonan Village Center, October 9-12, 2007.

5) Ariki, S. Fukuoka, T., Takahara, S., Ozaki, A., Endo, Y., Fujita, T., and Kawabata, S.: Identification and characterization of complement factors in horseshoe crab. The 20th Naito Conference on Innate Immunity in Medicine and Biology [III]. Shonan Village Center, October 9-12, 2007.

国内学会一般公演

6) 小柴琢己、川畑俊一郎: リポ多糖受容体として働く膜局在型プロテアーゼ前駆体. 第 7 回日本蛋白質科学会年会、仙台市、2007 年 5 月 24~26 日.

7) 松田泰幸、小柴琢己、尾崎 司、有坂文雄、川畑俊一郎: カプトガニ外皮タンパク質は、トランスグルタミナーゼにより架橋され網目状繊維を形成する. 第 7 回日本蛋白質科学会年会、仙台市、2007 年 5 月 24~26 日.

8) 飯島 学、吉光由希子、中田宗宏、川畑俊一郎: -1,3-グルカン認識に関わるタンパク質の構造機能解明と応用. 第 27 回日本糖質学会年会、福岡市、2007 年 8 月 1~3 日.

9) 松田泰幸、小柴琢己、尾崎 司、陶山晴香、有坂文雄、藤 義博、川畑俊一郎: カプトガニ外皮タンパク質カラキシンは、創傷部位においてトランスグルタミナーゼによって架橋され、網目状繊維を形成する. 第 19 回日本比較免疫学会学術集会、浜松市、2007 年 8 月 21~23 日.

10) 有木 茂、福岡貴彰、高原修作、尾崎 彩、遠藤雄一、藤田禎三、*川畑俊一郎: カプトガニにおける補体活性化機構の解析. 第 44 回補体シンポジウム、東海大学 平塚市、2007 年 8 月 24~25 日.

11) 福岡貴彰、有木茂、高原修作、尾崎彩、遠藤雄一、藤田禎三、川畑俊一郎：カプトガニ補体系の活性化機構。第80回日本生化学会大会、横浜市、2007年12月11～15日。

12) 飯島学、吉光由希子、小柴琢己、中田宗宏、川畑俊一郎： β -1,3-グルカン認識ドメインの改変体を応用した真菌検出法。第80回日本生化学会大会、横浜市、2007年12月11～15日。

13) 松田泰幸、小柴琢己、尾崎 司、陶山晴香、有坂文雄、川畑俊一郎：An arthropod cuticular chitin-binding protein endows injured sites with transglutaminase-dependent mesh。第80回日本生化学会大会、横浜市、2007年12月11～15日。

14) 柴田俊生、小柴琢己、川畑俊一郎：カプトガニのLPS受容体Factor Cの異物認識ドメインの構造機能解析。第80回日本生化学会大会、横浜市、2007年12月11～15日。

15) 高原修作、有木 茂、福岡貴彰、尾崎 彩、小柴琢己、川畑俊一郎：カプトガニ補体系活性化の分子機構。平成20年度日本生化学会九州支部例会。福岡市、2008年5月17～18日。

16) 川畑俊一郎：カプトガニにおける補体活性化カスケードの分子機構。日本生体防御学会 / 補体シンポジウム / 日本インターフェロン・サイトカイン学会合同シンポジウム。札幌市、2008年7月10～12日。

17) 小柴琢己、川畑俊一郎：リポ多糖受容体として機能するカプトガニ Factor C の構造機能解明。日本比較免疫学会第20回学術集会。東京、2008年8月25～27日。

18) 川畑俊一郎：カプトガニに学ぶ自然免疫の分子機構。日本比較免疫学会第20回学術集会（日本比較免疫学会古田賞受賞講演）。東京、2008年8月25～27日。

19) 川畑俊一郎：無脊椎動物の生体防御におけるトランスグルタミナーゼの役割。蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム。阿蘇、2008年9月11～13日。

20) 川畑俊一郎：生体防御タンパク質とターゲット分子との相互作用。QCM研究会セミナー。東京、2008年10月3日。

21) 川畑俊一郎：Characterization of a beta-1,3-D-glucan-recognition unit of horseshoe crab pattern-recognition

protein factor G. 日本生物物理学会第46回年会（シンポジウム招待講演）。福岡、2008年12月3～5日。

22) 高原修作、有木 茂、福岡貴彰、尾崎 彩、柴田俊生、遠藤雄一、藤田禎三、小柴琢己、川畑俊一郎：カプトガニ補体系の活性化機構。第81回日本生化学会大会。神戸市、2008年12月9～12日。

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：カプトガニ β -1,3-グルカン認識タンパク質の認識ドメインを使用した真菌検出法、および当該認識ドメインを含む組み換えタンパク質の精製法

発明者：川畑俊一郎、飯島 学

権利者：九州大学

種類：特許権

番号：特願 2007-214778

出願年月日：平成 19 年 8 月 21 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~biopoly/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川畑 俊一郎 (KAWABATA SHUN-ICHIRO)
九州大学・大学院理学研究院・教授
研究者番号：90183037

(2) 研究分担者

小柴 琢己 (KOSHIBA TAKUMI)
九州大学・大学院理学研究院・准教授
研究者番号：70403970