

機関番号：17401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20370040

研究課題名 (和文) T細胞分化機構の構造生物学的研究

研究課題名 (英文) Structural basis of the molecular recognitions involve T 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・准教授

研究者番号：60333522

研究成果の概要 (和文) : T細胞は抗原の刺激に応じて抗原に適したサブセットに分化することにより、適正な免疫応答を誘導する。T細胞分化・制御に関わる IL-23 および IL-27 とこれらの受容体の認識機構の解明を構造生物学的に行うため、IL-23, IL-27 およびこれらの受容体を大腸菌または HEK293T 細胞を用いて発現させた後、精製・結晶化を行った。IL-23 については、X線を用いた解説実験を行い、その結晶構造を解析した。

研究成果の概要 (英文) : According to antigen signal, T cell differentiates into a suitable T cell subset, and produces immune response against the antigen. Cytokines IL-23 and IL-27 involve such kind of T cell differentiation and regulation. To understand molecular recognitions of IL-23/IL-23R and IL-27/WSX-1, we established expression system of IL-23, IL-23R, IL-27 and WSX-1, then purified these proteins. We have succeeded to crystallize and solve the crystal structure of glycosylated form of human IL-23.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	15,900,000	4,770,000	20,670,000

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：X線結晶解析, サイトカイン/サイトカイン受容体複合体, 分子認識機構

## 1. 研究開始当初の背景

生体防御機構である免疫応答が適正に誘導されるには、抗原の種類に応じてT細胞が分化する必要がある。T細胞は、CD8陽性T細胞である細胞傷害性T細胞とCD4陽性T細胞であるヘルパーT(Th)細胞に大別される。Th細胞は、産生するサイトカインの種類により、1型(Th1)と2型(Th2)に分類され、各々細胞性免疫または液性免疫に関わる。ナイーブTh(Th0)細胞にIL-27が作用するとTh1細胞を誘導することが知られている。ま

た近年になり、Th1およびTh2への分化を抑制した環境にIL-23を加えてTh0細胞を培養すると、炎症性サイトカインIL-17を産生するT(Th17)細胞に直接分化することが報告されたそこで、T細胞の分化誘導機構を構造生物学的に解明することを思い立った。

## 2. 研究の目的

IL-23は、炎症性サイトカインIL-17を産生するT(Th17)細胞の成熟や増殖において

重要なはたらきをする。抗 IL-23 抗体を用いて IL-23 と受容体の結合を阻害すると Th17 細胞の増殖を阻害し、実験的自己免疫性脳脊髄炎などの自己免疫疾患の発症を抑制する。このことから自己免疫疾患の創薬のターゲットとして IL-23 は注目されている。IL-23 は p19 と IL-12 の p40 サブユニットがジスルフィド結合したヘテロ二量体のサイトカインである。IL-23 受容体は、特異的な IL-23R と IL-12 と共有される IL-12R  $\beta$  1 から構成されている。IL-23, IL-23R および IL-12R  $\beta$  1 の構造は未知であり、これらの認識機構も明らかにされていない。Th17 細胞において重要なはたらきをする IL-23 とその受容体の認識機構およびシグナル伝達複合体形成機構を解明するため、IL-23, IL-23R, IL-12R  $\beta$  1, IL-23/IL-23R 複合体, IL-23/IL-23R/IL-12R  $\beta$  1 複合体の構造解析を計画した。

また、IL-27 は、Th1 細胞分化の初期において重要なはたらきをする。IL-27 は、p28 と EBI3 の 2 つのサブユニットからなるヘテロ二量体である。IL-27 受容体は、WSX-1 と gp130 から構成されている。gp130 は多くのサイトカインの受容体として共有されており、単独および IL-6 との複合体の構造が解析された。しかしながら、IL-27 および WSX-1 の構造は未知であり、これらの分子認識機構も明らかにされていない。Th1 細胞の分化機構を構造生物学的に解明するため、IL-27, WSX-1, IL-27/WSX-1 複合体および IL-27/WSX-1/gp130 複合体の構造解析を計画した。

上記の様に Th1 細胞の分化に関わる IL-27, Th17 細胞において重要なはたらきをする IL-23 とこれらの受容体の認識機構およびシグナル伝達複合体の形成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。

### 3. 研究の方法

IL-23, IL-27, IL-23R および WSX-1 のクローニングを行った。IL-23, IL-27 および IL-23R については HEK293T 細胞を用いて、WSX-1 については大腸菌を用いて発現させた後、精製を行った。これらの蛋白質の結晶化条件の探索を行い、IL-23 の結晶、および WSX-1 の微結晶を得た。WSX-1 については、結晶化条件の精密化を進めている。IL-23 については糖修飾を受けた状態で結晶化に成功した。この

結晶を用いてつくば市の放射光実験施設 PFAR のビームライン NW12A に於いて 2.6 Å 分解能までのデータを収集して、構造解析を行った。

### 4. 研究成果

IL-23, IL-27, IL-23R および WSX-1 のクローニングに成功した。その後、IL-23, IL-27 および IL-23R については HEK293T 細胞を用いた発現系の構築を行った後、精製を行った。また、WSX-1 については大腸菌を用いた発現系の構築に成功して、大量培養を行った後、リフォールディングにより可溶化して、精製を行った。その結果、WSX-1 については微結晶を得ることに成功した。また、IL-23 については糖修飾型の試料について構造解析可能な大きさの結晶を得ることに成功した(図 1)。

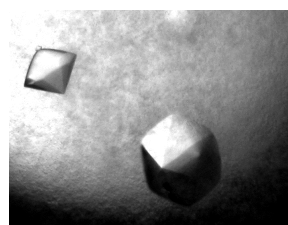


図 1. IL-23 の結晶

得られた結晶を用いてつくば市にある高エネルギー加速器研究機構・放射光実験施設 PFAR のビームライン NW12A に於いてデータ収集を行った。その後、回折強度データ処理プログラム HKL2000 でデータ処理およびスケリングを行った。得られたデータの統計値は、2.6 Å 分解能までで Rmerge が 6.8%であった(表 1)。

表 1. データ処理の統計値

Resolution (Å)	30.0-2.6 (2.69-2.60)
Cell contacts (Å)	108.94, 108.94, 83.79
Space group	P6 <sub>5</sub>
Number of measured reflections	16,298
Number of unique reflections	15,506
Completeness (%)	93.5 (70.0)
R <sub>merge</sub> (%)	6.8 (45.3)
I / $\sigma(I)$	15.6 (17.5)

得られたデータを用いて糖鎖を切除した IL-23 の構造を用いて分子置換法により構造解析を行った(図 2)。その結果、p28 サブユニット(紫)と p40 サブユニット(青)の相互作用の様式が詳細に分かった。

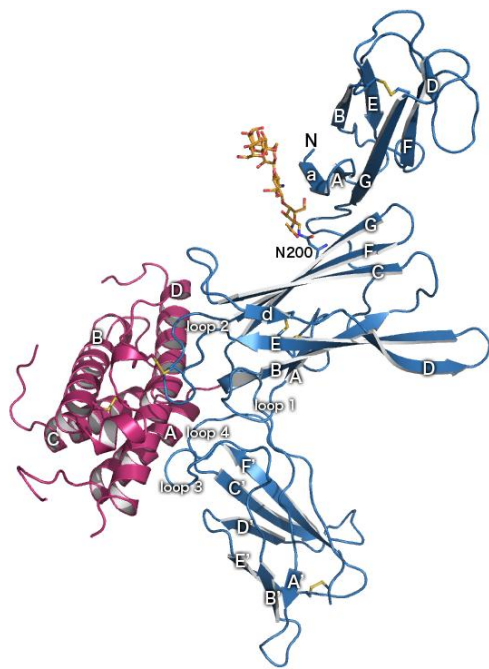


図2. ヒト IL-23 の構造

また、得られた構造と糖鎖をもたない形状の IL-23 (緑) と endo H を用いて末端の N-アセチルグルコサミンだけを残した形状の IL-23 (ピンク) の構造比較を行ったところ、糖の付加の程度に応じてドメイン 1 の相対的な位置がシフトすることが分かった (図 3)。

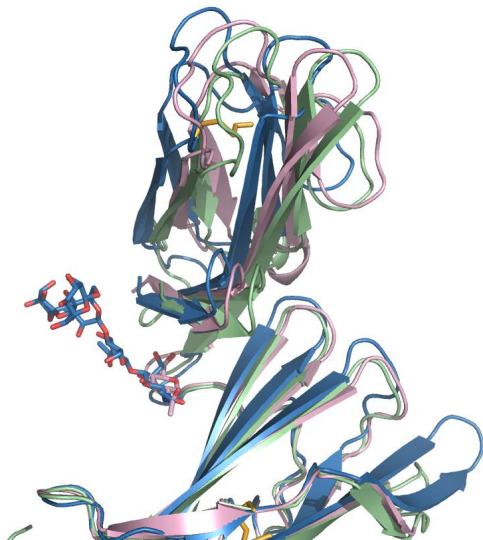


図3. IL-23 p40 サブユニットの構造比較。糖修飾を受けた IL-23 (青), 糖鎖を 1 残基だけでもつ IL-23 (ピンク), 変異をいれて糖鎖を除去した IL-23 (緑)。

## 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 7 件)

- ① Yu, C., Sonnen, A. F.-P., George, R., Dessailly, B. H., Stagg, L. J., Evans, E. J., Orenco, C. A., Stuart, D. I., Ladbury, J. E., Ikemizu, S., Gilbert, R. J. C., and Davis, S. J. (2011) "Rigid-body ligand recognition drives cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) receptor triggering." **J. Biol. Chem.** 286, 6685-6696, 査読有
- ② Miyata, M., Sato, T., Kugimiya, M., Sho, M., Nakamura, T., Ikemizu, S., Chirifu, M., Mizuguchi, M., Nabeshima, Y., Suwa, Y., Morioka, H., Arimori, T., Suico, M. A., Shuto, T., Sako, Y., Momohara, M., Koga, T., Morino-Koga, S., Yamagata, Y., Kai, H., (2010) "The crystal structure of green tea polyphenol(-) -epigallocatechingallate (EGCG)-transthyretin complex reveals novel binding site distinct from thyroxine binding site" **Biochemistry** 49, 6104-6114, 査読有
- ③ Miyata M, Sato T, Mizuguchi M, Nakamura T, Ikemizu S, Nabeshima Y, Susuki S, Suwa Y, Morioka H, Ando Y, Suico MA, Shuto T, Koga T, Yamagata Y, Kai H. (2010) "Role of the Glutamic Acid 54 Residue in Transthyretin Stability and Thyroxine Binding" **Biochemistry** 49, 114-123, 査読有
- ④ Yoshioka, Y., Watanabe, H., Morishige, T., Yao, X., Ikemizu, S., Nagao, C., Ahmad, S., Mizuguchi, K., Tsunoda, S., Tsutsumi, Y., Mukai, Y., Okada, N., Nakagawa, S. (2010) "Creation of lysine-deficient mutant lymphotoxin-alpha with receptor selectivity by using a phage display system" **Biomaterials** 31, 1935-1943, 査読有
- ⑤ Mukai, Y., Shibata, H., Nakamura, T., Yoshioka, Y., Abe, Y., Nomura, T., Tani, M., Ohta, T., Ikemizu, S., Nakagawa, S., Tsunoda, S., Kamada, H., Yamagata, Y., Tsutsumi, Y. (2009) "Structure-Function Relationship of Tumor Necrosis Factor (TNF) and Its Receptor Interaction Based on 3D Structural Analysis of a Fully Active TNFR1-Selective TNF Mutant." **J. Mol. Biol.** 285, 1221-1229, 査読有
- ⑥ Kim, J., Motomiya, Y., Ueda, M, Nakamura, M., Misumi, Y., Saito, S., Ikemizu, S., Misumi, S., Ota, K., Shinriki, S., Kai, H., & Ando, Y. (2008) "Role of the conformational change in the C-terminus of

b2-microglobulin in dialysis-related amyloidosis” *Ann. Clin. Biochem.* 45, 489-495, 査読有

⑦ Suwa, Y., Nakamura, T., Toma, S., Ikemizu, S., Kai, H., and Yamagata, Y. (2008) “Preparation, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the DNA-binding domain of the Ets transcription factor in complex with target DNA” *Acta Crystallogr.* F64, 171-174, 査読有

〔学会発表〕(計16件)

①池水信二、第34回阿蘇シンポジウム「補助刺激分子の構造生物学的研究」, 阿蘇リゾートグランヴィリオホテル 2010.7.30-31

②Chirifu, M., “Crystal Structure of the Glycosylated Form of Interleukin-23” **3<sup>rd</sup> International Symposium on Diffraction Structural Biology**, University Paris-Sud Orsay-France, 2010.5.25-28

③ Arimori, T., “Structural and NMR analyses revealed unexpected mechanisms of substrate recognition and catalysis by house-cleaning enzymes” **The BSR and MASR meetings**, Melbourne Convention & Exhibition Centre, Melbourne, Australia, 2010.2.15-18

④池水信二、第32回日本分子生物学会ワークショップ「サイトカイン制御因子による多様な生体調節」, 「IL15およびIL-23の構造生物学的研究」, パシフィコ横浜 2009.12.09-2009.12.12

⑤宮田将徳, “トランスサイレチン Glu54 変異体の結晶構造解析” 日本薬学会第129回年会 2009.3.26-28 国立京都国際会館

⑥稲里みゆき, “hMTH1による8-oxo-dGTPの基質認識と加水分解反応機構の構造学的基盤” 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 (PPF2009)、2009.3.24-25、高槻市、大阪薬科大学

⑦池水信二、BMB2008 シンポジウム「シグナル伝達タンパク質の分子認識機構研究の新展開」, 「IL15とIL-15Raの分子認識機構の構造生物学の基盤」, 神戸市、神戸国際会議場, 2008.12.9-12

⑧池鯉鮒麻美, IL-15/IL-15R $\alpha$  複合体の構造生物学的研究” 日本バイオイメージング学会 平成20年度年会, 千葉市、千葉大学けやき会館, 2008.10.31-11.1

⑨池水信二、平成20年度日本インターフェロン・サイトカイン学会 奨励賞受賞講演, 「IL15-IL-15Ra 複合体の構造生物学的研究」, 札幌市、北海道大学百年記念会館, 2008.7.10-2008.7.12

⑩Chirifu, M., “Structural basis for the molecular recognition between IL-15 and

its private receptor IL-15R $\cdot$ ” **ISICR 2008**, Fairmont Queen Elizabeth Hote, Montreal, 2008.10.12-16

⑪Chirifu, M., “Structural studies of IL-15/IL-15R $\alpha$  complex” **International Conference On Structural Genomics Oxford 2008**, the University of Oxford Examination School, Oxford, 2008.9.20-24

⑫Chirifu, M., “Structural studies of IL-15/IL-15R $\cdot$  complex” **The XXI Congress and Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2008)**, Grand Cube Osaka, Osaka, 2008.8.23-31

⑬ Suwa, Y., “Structural basis for transcriptional regulation mechanisms by the transcription factor Ets2” **The XXI Congress and Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2008)**, Grand Cube Osaka, Osaka, 2008.8.23-31

⑭Nakamura, T., “High resolution X-ray diffraction study of the hMTH1 mutant” **The XXI Congress and Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2008)**, Grand Cube Osaka, Osaka, 2008.8.23-31

⑮ Ishida, C., “Purification and crystallization of C-terminal domain of a human single-pass transmembrane protein” **The XXI Congress and Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2008)**, Grand Cube Osaka, Osaka, 2008.8.23-31

⑯Arimori, T., “Structural insights into the substrate recognition and hydrolysis reaction mechanisms of 8-oxo-dGDPase” **The XXI Congress and Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2008)**, Grand Cube Osaka, Osaka, 2008.8.23-31

〔図書〕(計2件)

①池水信二、他、臨床薬理研究振興財団、臨床薬理の進歩、2008、28、p1-p8

②池鯉鮒麻美、池水信二、日本臨牀社、日本臨牀 関節リウマチ (第2版)、2010、p145-p148

## 6. 研究組織

### (1) 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・准教授  
研究者番号：60333522