

機関番号：13701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20790723

研究課題名（和文） 構造生物学的手法による自然免疫及びIL-18機能制御と新規免疫調節薬の開発

研究課題名（英文） The structure based drug design for controlling the innate immune response and interleukin-18 signaling.

研究代表者

大西 秀典 (OHNISHI HIDENORI)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60381620

研究成果の概要（和文）：

MyD88は、Toll様受容体及びIL-1/IL-18シグナルを細胞内で中継する重要なアダプター分子である。本研究では、MyD88のタンパク立体構造解析及びタンパク間相互作用の検討を通じて、自然免疫系及び特にIL-18シグナルを制御する分子の作成を目的とした研究を進めた。本研究期間中に、TIRドメイン分子同士の相互作用の計測に有効な手法を確立し、MyD88と結合するとされるTIRドメイン含有分子群の直接結合の特異性を決定した。またアミノ酸残基レベルで相互作用様式を決定した。MyD88に相互作用する薬剤をスクリーニングするためのツールとして、1H-15N HSQC 2次元スペクトルの情報を、BMRB データベース(No. 11078)に登録した。MyD88 ドミナントネガティブ変異分子(DN)に細胞内タンパク導入ドメイン(PTD)を付加したPTD-MyD88-DNの構築を行った。今後、ヘテロTIRドメイン複合体構造の決定、及びMyD88を標的とした薬剤の開発を進める予定である。

研究成果の概要（英文）：

MyD88 is the important adaptor molecule in the Toll like receptors and IL-1/18 signaling pathways. In this study, we tried to create the molecule, which regulate these immune signaling response, based on the results of our decided protein structure of MyD88 and protein interaction studies. In the duration of this research aid, we could develop the several methods of direct protein-protein interaction studies with the TIR domain containing molecules. Furthermore, we created the new molecule, protein transduction domain containing dominant negative formed MyD88 (PTD-MyD88-DN). We will continue the drug development that assumed MyD88 a target.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：ライフサイエンス(共通基礎研究)

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：自然免疫、IL-18、Toll-like receptor、MyD88、タンパク立体構造

1. 研究開始当初の背景

アレルギー・中枢神経異常を含む自己免疫疾患などの発症には遺伝的素因・環境要因が絡み合っている。これら疾患群のうち難治のものは種々の細胞やサイトカインの複雑な相互作用によって引き起こされているため、効果的な治療手段を提供するためには、発症メカニズムを分子生物学的に解明する必要がある。

近年、免疫調節の鍵を握る分子のひとつとしてIL-18が注目されている。IL-18はインターフェロン(IFN)- γ を誘導する物質(Interferon γ -inducing factor: IGIF)として発見され、当初、免疫担当細胞であるヘルパーT細胞のTh1/Th2バランスをTh1に誘導すると考えられてきた。しかしその後、IL-4やIL-13の誘導を介してアレルギーに関係が深いTh2へも誘導することも報告され、その役割はより広範囲にわたることが明らかになった。このようにIL-18は条件の違いで二律背反の反応を促進するような挙動をみせるため(Cytokine and Growth Factor Reviews 12, 53-72 (2001))、IL-18の分子メカニズムを解明することは免疫機能の調節機構の解明のために非常に重要である。実際にIL-18の関与する疾患は、関節リウマチやクローン病等の慢性炎症性疾患(以上はTh1系異常疾患)、気管支喘息やアトピー性皮膚炎(以上、Th2系異常疾患)など多岐に亘ることが報告されており、その制御が新たなアレルギー疾患の治療につながる可能性がある(International Immunology 18, 847-855 (2006))。

当研究室ですでに明らかにしているようにIL-18のタンパク立体構造は、IL-1 β と非常に相同性が高く(Nat Struct Biol 10, 966-71 (2003))、またその細胞内シグナル伝達経路も受容体以降のコンポーネントは共通であり、共にNF- κ Bを活性化し炎症性サイトカイン等を誘導するとされている。またIL-18は、受容体との相互作用の段階で拮抗的にIL18結合タンパク(BP)によってその作用が阻害されることが知られている。さらに、このIL-18シグナルの伝達経路のほとんどは、自然免疫を惹起するための病原体構成成分特異的認識受容体であるToll様受容体(Toll like receptor: TLR)とオーバーラップしている。TLRはその細胞内ドメインに炎症性サイトカインであるIL-1受容体ファミリー(IL-18も共通)と共通のドメインをもつToll Interleukin-1R homology domain (TIRドメイン)。TLRの細胞内シグナル伝達経路は、全てのTLRファミリーとIL-1Rファミリーが共通の細胞内アダプター分子MyD88を介して、IRAKを活性化 \rightarrow TRAF6をリン酸化 \rightarrow IKK複合体のリン酸化 \rightarrow I κ Bを分解し核内転写活性因子NF κ Bを活性化した結果、種々の炎症性サイトカインを産生すると考えられている。興味深い事に、MyD88を欠損させた細胞はTh2型に分化し、ア

レルギー疾患の発症に関与するとの報告や、いくつかのTLRは、その遺伝子多型がアレルギー疾患の発症と関連するとの報告も相次いでいる。また、このシグナル伝達系の異常による免疫不全例の報告も散見される(IRAK-4欠損症、NEMO異常症等)。

近年リガンド-受容体の組み合わせに対応し、細胞内ではMyD88とそれ以外の異なるアダプター分子(TIRAP、TRAM、TRIF)の組み合わせにより、異なるシグナル伝達経路が活性化され、最終的に異なる遺伝子発現を誘導することがあきらかになりつつある。また、新しい概念としてはTIR-TIRドメイン間の相互作用様式自体の構造的な相違によって、そのシグナルの分岐が決まるのではないかという報告もある(J Biol Chem 278, 41443-51 (2003))。

現在の創薬科学において、新規薬剤の開発には構造生物学的な検討が必須になりつつあるが、この分野においては2000年にTLR1、2の細胞内TIRドメインの結晶構造がLiang Tongらによってはじめて明らかにされている(Nature 408, 111-5 (2000))。また彼らによって2004年IL-1RAcPの細胞内TIRドメインのホモ二量体結晶構造が解明されている(J Biol Chem 279, 31664-70 (2004))。しかし、これまでアダプター分子のTIRドメインの構造及び、受容体アダプター分子の複合体構造は決定されておらず、我々は最近アダプター分子MyD88の溶液構造決定を世界に先駆けて行った(PDB code 2z5v, Ohnishi et al. PNAS, 2009)。一方、巨大分子の相互作用シミュレーション方法の発展により、様々な組み合わせのTIRドメイン複合体構造の予測がなされているが(J Biol Chem 280, 26152-9 (2005)、Proc Natl Acad Sci U S A 103, 10961-6 (2006)、J Biol Chem 281, 30132-42 (2006)、PLoS ONE 8, e788 (2007))、実際の受容体-アダプターTIR分子のヘテロ複合体構造は決定されていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、免疫学上重要とされるサイトカインIL-18のシグナル伝達系を対象とした構造及び機能解析を通じて、アレルギー・免疫異常疾患に対する効果的な治療法開発への道を開くことを目指す。またIL-18によって活性化される細胞内シグナル伝達経路にある因子の殆どは、自然免疫を司るToll like receptor(TLR)のシグナル伝達を担っているため、その異常は両シグナル経路の破綻に起因する免疫不全やアレルギー疾患等を引き起こすとされる。本研究課題ではTLRシグナル系も視野に入れ、両者間のクロストークの分子機構を含めた包括的な理解も目指す。具体的にはNMRによる溶液タンパク立体構造の決定を完了したMyD88と、MyD88と相互作用する受容体及びアダプター分子群の相互作

用の詳細をNMR法または結晶化蛋白のX線解析によって構造生物学的に明らかにすることで、IL-1/IL-18/TLRシグナルの流れを遮断・調節するような薬剤候補物質を、構造情報を基に論理的にデザイン・探索し、将来的には臨床医療へのフィードバックを視野に入れアレルギー・炎症性疾患の効果的な治療法を提供することを旨とするものである。

3. 研究の方法

1. TLRやIL-18Rを含むIL-1R familyは、各受容体に対応するリガンド刺激によってMyD88を途中に含むほぼ共通のシグナル伝達経路を介して、最終的にNF- κ Bを活性化し、その機能を発現させる。HEK293系統の細胞にMyD88とTIR domain containing receptor群を発現させ、NF- κ Bの活性をLuciferase reporter assayで検出する。これらにDominant negative inhibitor作用を有するMyD88 TIRドメインあるいはMyD88 TIRドメイン変異体をtransfectし、そのNF- κ B活性の抑制機能を比較することで、各リガンド-受容体ごとのMyD88側の機能的残基をスクリーニング的に決定する。
2. MyD88と相互作用する分子群のうちIL-18R α / β 鎖、TLR4等、TIR含有アダプター分子群の各TIRドメインの大量精製の条件検討を行う。精製されたTIRドメインタンパク群の相互作用をNMRやプルダウン法等で検討する。
3. TIRAP-TIRタンパクの結晶化条件のスクリーニングを行い、構造解析を進める。
4. MyD88-TIRドメイン構造及び1.で得られた機能的残基情報に基づいた機能的低分子の候補を選定する。
5. 2.で得られたTIRドメイン結合特異性情報と精製条件から、MyD88とTIRAPの組み合わせ等のヘテロTIRドメインタンパク複合体構造解析に向けたタンパク精製条件の検討及び、結晶化条件のスクリーニングを行う。

4. 研究成果

1. MyD88-TIRドメインは、TIRAP-TIRドメインと直接相互作用するが、TLR4-TIRドメインとは直接相互作用しないことが判明した(Ohnishi et al. PNAS2009)。また、TLR1、TLR2はMal-TIRと結合するが、TLR1はMyD88と結合せず、TLR2のみMyD88と結合する。MyD88-TIRドメインとTIRAP-TIRドメインの相互作用は、GSTプルダウン法及び溶液NMR法にて検出可能である(Ohnishi et al. PNAS2009)。
2. TLR1/TLR2シグナル及びTLR4シグナル下流でMyD88の機能的残基は、TIRドメイン構造上のBB loopと α Eの2箇所に限局している。一方、IL-18シグナル下流では、上記2箇所以外に α C'も重要である。
3. IL-18受容体R α 及びR β 鎖の細胞内TIRド

メインは、アダプター分子TRAM-TIRドメインと結合し、TRAM-TIRドメインは、MyD88-TIRドメインと結合した。

4. TIRAP-TIRドメインの結晶化スクリーニングを進めている。TIRAP-TIRは溶液中で自己多量体化する性質があるためか、現在のところ結晶化には至っていない。自己多量体化の抑制を目的とし、複数のアミノ酸置換体を構築した。
5. MyD88-TIRドメインの溶液構造解析の過程で得られる¹H-¹⁵N HSQC 2次元スペクトルの情報をリファインし、BMRBデータベース(No. 11078)に登録した。このデータを利用して、MyD88-TIRに直接相互作用する分子のスクリーニングが可能となった(Ohnishi et al. Biomol NMR Assign 2010)。
6. 有力な薬剤候補分子としてMyD88シグナル阻害作用を有するとされるMyD88-BB loopミミックペプチドとMyD88-TIRとの直接相互作用を検討するための国際共同研究が開始された。本研究には5.のデータを活用して溶液NMR法で検討予定である。
7. MyD88を介するシグナル抑制作用が期待できるMyD88ドミナントネガティブ変異分子(DN)に細胞内タンパク導入ドメイン(PTD)を付加したPTD-MyD88-DNの構築を行った。本タンパクを用いて、*in vitro*の実験系でLPS/TLR4シグナルを抑制することができることを確認した。
8. 1.の情報を元に、ヘテロTIRドメイン複合体タンパクの精製条件の検討を進めている。

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11件)

- 1: An Y, Ohnishi H, Matsui E, Funato M, Kato Z, Teramoto T, Kaneko H, Kimura T, Kubota K, Kasahara K, Kondo N. Genetic variations in MyD88 adaptor-like are associated with atopic dermatitis. *Int J Mol Med*. 2011 Jun;27(6):795-801. 査読あり
- 2: Morita H, Kaneko H, Ohnishi H, Kato Z, Kondo N. Antigen-specific immune response to endotoxin-free recombinant P34. *Allergy*. 2011 Mar 1. 査読あり
- 3: Kaneko H, Teramoto T, Kondo M, Morita H, Ohnishi H, Orii K, Matsui E, Kondo N. Efficacy of the slow dose-up method for specific oral tolerance induction in children with cow's milk allergy: comparison with reported protocols. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010;20(6):538-9. 査読あり
- 4: Aoki Y, Fukao T, Zhang G, Ohnishi H, Kondo N. Mutation in the Q28SDD31SD site, but not in the two SQ sites of the survival of motor neuron

protein, affects its foci formation. *Int J Mol Med.* 2010 Nov;26(5):667-71. 査読あり

5: Yamauchi A, Iwata H, Ohnishi H, Teramoto T, Kondo N, Seishima M. Interleukin-17 expression in the urticarial rash of familial cold autoinflammatory syndrome: a case report. *Br J Dermatol.* 2010 Dec;163(6):1351-3. 査読あり

6: Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kimura T, Hiroaki H, Kondo N, Shirakawa M. 1H, 13C, and 15N resonance assignment of the TIR domain of human MyD88. *Biomol NMR Assign.* 2010 Oct;4(2):123-5. 査読あり

7: Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Orii KE, Li A, Kimura T, Hiroaki H, Kondo N, Shirakawa M. Structural basis for the multiple interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jun 23;106(25):10260-5. 査読あり

8: Kato Z, Ohnishi H, Kimura T, Kondo N. Prediction of the pathogenesis of the mutation in MeCP2 C-terminal domain. *Brain Dev.* 2010 Feb;32(2):169. 査読あり

9: Kimura T, Kato Z, Ohnishi H, Tochio H, Shirakawa M, Kondo N. Expression, purification and structural analysis of human IL-18 binding protein: a potent therapeutic molecule for allergy. *Allergol Int.* 2008 Dec;57(4):367-76. 査読あり

10: Arai T, Kaneko H, Ohnishi H, Matsui E, Fukao T, Kawamoto N, Kasahara K, Kondo N. Hypothermia augments NF-kappaB activity and the production of IL-12 and IFN-gamma. *Allergol Int.* 2008 Dec;57(4):331-8. 査読あり

11: Bai C, Matsui E, Ohnishi H, Kimata K, Kasahara K, Kaneko H, Kato Z, Fukao T, Kondo N. A novel polymorphism, E254K, in the 5-lipoxygenase gene associated with bronchial asthma. *Int J Mol Med.* 2008 Feb;21(2):139-44. 査読あり

〔学会発表〕 (計 8 件)

1. Hidenori Ohnishi, Yang An, Eiko Matsui, Zenichiro Kato, Hideo Kaneko, Naomi Kondo. The genetic variations of the MyD88 adaptor protein like (Mal) are associated with allergic diseases in Japanese population. The 20th Interasma Japan/North Asia. 2010.7.2-3. Tokyo.

2. Hidenori Ohnishi, Hidehito Tochio, Zenichiro Kato, Takeshi Kimura, Naomi Kondo, and Masahiro Shirakawa. Structural basis for the interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling. World wide magnetic resonance conference 2010. 2010.7.4-9. Florence, Italy.

3. H. Ohnishi, H. Tochio, Z. Kato, T. Kimura, T. Funasaka, R. W. Wong, M. Shirakawa, N. Kondo. A conserved interaction mode between MyD88

and distinct membrane-sorting adaptors in TLR4 and IL-18 signaling. 14th International Congress of Immunology. 2010.8.22-27. Kobe.

4. Hidenori Ohnishi, Takahide Teramoto, Zenichiro Kato, Hideo Kaneko, Ryuta Nishikomori, Naomi Kondo. The LPS induced enhancement of IL-1 β and IL-18 production is a useful tool for diagnosis of familial cold inflammatory syndrome (FCAS). *Autoinflammation* 2010. 2010.9.2-6. Amsterdam, Netherlands.

5. Hidenori Ohnishi, Hidehito Tochio, Zenichiro Kato, Takeshi Kimura, Masatoshi Nada, Kazuo Kubota, Masahiro Shirakawa, Naomi Kondo. Structural basis for the innate immune deficiency syndrome. The 8th Asia Pacific Congress of Allergy, Asthma and Clinical Immunology 2010. 2010.11.6-9. Singapore.

6. 大西秀典、金子英雄、森田秀行、川本美奈子、松井永子、加藤善一郎、近藤直実. 乳児栄養の役割:母乳・人工乳. 第 113 回日本小児科学会学術集会. 平成 22 年 4 月 23-26 日. 盛岡.

7. 大西秀典、加藤善一郎、木村豪、安陽、久保田一生、松井永子、金子英雄、近藤直実. 自然免疫異常症、アレルギー疾患病態解明に向けたプロテオミクス的手法の応用. 第 47 回日本小児アレルギー学会. 平成 22 年 12 月 4-5 日. 横浜.

8. 大西秀典、加藤善一郎、木村豪、徳見哲史、福富悌、近藤直実. アレルギー発症にかかわる分子の構造学的解明と臨床応用. 第 45 回日本小児アレルギー学会. 平成 20 年 12 月 14 日. 横浜.

〔図書〕 (計 1 件)

1. Kondo N, Matsui E, Kaneko H, Fukao T, Teramoto T, Kato Z, Ohnishi H, Nishimura A: Genetics of Pediatric Asthma. In: Pawankar R, Holgate ST, Rosenwasser LJ eds. *Allergy Frontiers* (volume1 Allergy Frontiers: Epigenetics, Allergens and Risk Factors), 2009, 総ページ数 442

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 変異導入 MyD88 蛋白による To11 様受容体/インターロイキン 18 シグナルの特異的制御法
発明者: 近藤直実、加藤善一郎、大西秀典、白川昌宏、朽尾豪人
権利者: 岐阜大学、京都大学
種類: PCT/JP
番号: 2008/064170
出願年月日: 平成 20 年 7 月 31 日

国内外の別：外国

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 秀典 (OHNISHI HIDENORI)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60381620

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：