

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15730

研究課題名（和文）炎症性腸疾患病因蛋白質NOD2の構造解析

研究課題名（英文）Structural analysis of NOD2, a protein involved in inflammatory bowel disease pathogenesis

研究代表者

張 志寛 (ZHANG, ZHIKUAN)

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・助教

研究者番号：60866937

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：炎症性腸疾患の病因タンパク質と言われているNOD2の活性化機構および活性制御機構は解明されておらず、炎症性腸疾患の発症の分子機構の理解およびNOD2を標的とする治療方法の開発が困難とされている。本研究ではNOD2の活性化機構の解明を目指していた。独自のPEG修飾法により、性質不安定なNOD2タンパク質を安定化させ、クライオ電顕による高分解能でのNOD2の構造解析を可能にした (Structure, 2021)。またNOD2と酸性脂質膜および新規リガンドのヘパリンとの相互作用を見出し、NOD2の活性化に必要である可能性が示唆されている。今後はこれらの相互作用相手との複合体構造解析を実施する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患（IBD）は指定難病の一種であり、世界中の患者数が年々増加傾向である。IBDの病因タンパク質NOD2の活性化機能の解明はIBDの分子機構の解明に繋がり、有効な治療方法の開発に重要である。本研究で開発されたPEGylation分子修飾法のクライオ電子顕微鏡への適応はNOD2を始め、様々なタンパク質の高分解能クライオ電顕解析を可能とさせる新たなサンプル調製法を提供している。また、本研究で同定したNOD2の新規相互作用分子（酸性脂質およびヘパリン）は、NOD2の活性制御機構の解明に向けた重要な知見を提供した。

研究成果の概要（英文）：The molecular mechanisms of the activation and regulation of NOD2, a pathogenic protein involved in inflammatory bowel disease, have not been elucidated. This making it difficult to understand the detailed molecular mechanisms of NOD2-related inflammatory bowel disease pathogenesis and to develop therapeutic methods targeting NOD2. This project aimed to elucidate the activation mechanism of NOD2. We established an original PEGylation method for modification of proteins in order to obtain more suitable samples for cryo-EM analysis. As a result, the application of PEGylation method to NOD2 enabled us to analyze the full-length structure of NOD2 at high resolution by cryo-EM (Structure, 2021). Besides, we also identified the interactions of NOD2 with acidic lipid membranes and a novel ligand, heparin, suggesting that they may be required for NOD2 activation. We will now analyze the complex structure of NOD2 with these interaction partners.

研究分野：構造生物学

キーワード：炎症性腸疾患 自然免疫 NOD2 クライオ電顕 NLR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (IBD) は小腸や大腸の組織細胞が患者自身の免疫細胞に攻撃され、腸の粘膜に炎症反応が引き起こされる自己免疫疾患である。主にクローン病 (Crohn's disease, CD) と潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis, UC) に分類され、世界的に年々増加する傾向を示している。日本においては、CD および UC はいずれも指定難病とされている。NOD2 は細胞質で働く NOD-like receptors (NLR) ファミリーに属する自然免疫受容体であり、細菌の細胞壁を形成するペプチドグリカン認識するとされている。NOD2 が病原体分子に活性化された後、RIPK2 などのアダプター蛋白質をリクルートし、免疫反応を引き起こすことが知られている。また、多数の IBD 患者において NOD2 遺伝子に変異を有することが見つかっており、NOD2 の機能不全は IBD の原因として同定され、数十種類の変異型 NOD2 が IBD の遺伝的因子として報告されている。しかし、NOD2 の活性化機構および NOD2 の機能不全による IBD の発症機構の分子基盤は解明されていない。

2. 研究の目的

一般的に NOD2 の活性化リガンドは細菌由来のペプチドグリカンだと報告されている。しかし、NOD2 精製蛋白質を用いてペプチドグリカンとの結合を解析した結果、直接の相互作用は見られず、NOD2 の活性化も確認されなかった。よって、NOD2 の活性化機構は複雑であり、NOD2 とそのリガンドだけの単純な系で説明できるようなエピソードではないと予想される。興味深いことに、NOD2 が細胞膜に会合する現象が近年いくつか報告されている。本研究では、脂質膜に制御される NOD2 を中心とする構造生物学的研究を計画し、NOD2 の活性化機構およびその機能破綻による炎症性腸疾患の発症機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

- 1) Nanodisc を用いた膜脂質と NOD2 との相互作用解析: Nanodisc は脂質二重膜環境を模倣できる有力なツールタンパク質/脂質複合体である。本研究では複数の MSP 骨格タンパク質および脂質を用いて再構成された nanodisc と NOD2 との相互作用を調べていた。
- 2) NLR ファミリータンパク質と膜脂質との相互作用解析: 近年、NOD2 と同じ NLR ファミリーに属する他の NLR に関しても、酸性脂質膜環境の重要性が示唆されている。特に NLRP3 は NOD2 と類似した構造を形成しており、IBD の病理形成にも重要な役割を果たしていることが報告されている。NLRP3 に関しても、上記の同様な方法を用いて膜脂質との結合能を調べていた。
- 3) NOD2 のリガンド探索: ペプチドグリカンは NOD2 のリガンドとして報告されているが、NOD2 精製タンパク質を用いてペプチドグリカンとの直接的な結合が見られていない。また、NOD2 は一本鎖 RNA による活性化も報告されている。NOD2 のリガンドの多様性および活性化機構の複雑性を理解するため、NOD2 のリガンド探索を行っていた。
- 4) クライオ電子顕微鏡解析に向けた NOD2 のサンプル調製: クライオ電顕解析に適した NOD2/nanodisc を調製するため、NOD2 の安定性を向上するための化学修飾法および複合体の解離を防ぐための分子クロスリンク法を検討していた。
- 5) クライオ電子顕微鏡による NOD2 の構造解析: クライオ電顕解析を実施し、NOD2 全長タンパク質の構造解析および NOD2/nanodisc 複合体の構造解析を行っていた。

4. 研究成果

- 1) NOD2 および NLRP3 と酸性脂質膜との相互作用: Nanodisc を用いた膜脂質と NOD2 および NLRP3 との相互作用解析の結果、NOD2 および NLRP3 と酸性脂質で再構成された nanodisc との結合を見出した。特に NLRP3 の場合、この酸性脂質膜と会合する特性は NLRP3 のトランスゴルジ網およびミトコンドリアの脂質膜に局在する特性と相関すると考えられる (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2022)。
- 2) NOD2/nanodisc 複合体の構造解析: *In-vitro* で再構成された NOD2/nanodisc 複合体のクライオ電顕解析を行った結果、凍結による複合体の解離が著しく、NOD2 および nanodisc の個別の二次元平均画像が確認されたが、明確な複合体の像は確認されなかった。凍結による試料のダメージを防ぐために、分子クロスリンク法を検討した結果、わずかな改善しか見られていなかったため、NOD2/nanodisc 複合体の構造解析を可能にするにはさらなる試料調製方法の改善が必要とされる。
- 3) NOD2 とヘパリンとの相互作用: NOD2 のリガンド探索を行った結果、NOD2 は腸管に豊富に存在するヘパリンとの結合をゲルろ過クロマトグラフィーによって確認できた。また、合成低分子ヘパリンの dalteparin sodium との結合およびこれらの酸性ポリマーによる NOD2 の多量体化も確認された。これは NOD2 の活性化機構を理解するための重要な進展と考えられる。今後、NF- κ B レポーターアッセイを用いてヘパリンによる NOD2 の活性の変化を確認する。
- 4) PEGylation 法による NOD2 試料調製およびクライオ電顕解析: NOD2 のクライオ電顕解析では NOD2 の粒子不安定性から高分解能での構造解析が困難であることから、タンパク質の化

学修飾が有効ではないかと考えた。その結果、PEG 化された NOD2 タンパク質のクライオ電顕解析では、修飾されていないタンパク質と比べて、粒子の不安定性が向上され、氷包埋による気液界面での粒子の変性が大きく改善されることを確認できた。この方法を適用し、NOD2 全長タンパク質のクライオ電顕解析が可能となった (*Structure*, 2021)。この方法は NOD2 の構造解析だけでなく、クライオ電子顕微鏡解析のサンプル調製における有用なツールだと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tojo Shingo, Zhang Zhikuan, Matsui Hiroyuki, Tahara Masahiro, Ikeguchi Mitsunori, Kochi Mami, Kamada Mami, Shigematsu Hideki, Tsutsumi Akihisa, Adachi Naruhiko, Shibata Takuma, Yamamoto Masaki, Kikkawa Masahide, Senda Toshiya, Isobe Yoshiaki, Ohto Umeharu, Shimizu Toshiyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Structural analysis reveals TLR7 dynamics underlying antagonism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-19025-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishida Hanako, Asami Jinta, Zhang Zhikuan, Nishizawa Tomohiro, Shigematsu Hideki, Ohto Umeharu, Shimizu Toshiyuki	4. 巻 28
2. 論文標題 Cryo-EM structures of Toll-like receptors in complex with UNC93B1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 173~180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-020-00542-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhang Zhikuan, Shigematsu Hideki, Shimizu Toshiyuki, Ohto Umeharu	4. 巻 29
2. 論文標題 Improving particle quality in cryo-EM analysis using a PEGylation method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 1192~1199.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2021.05.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohto Umeharu, Kamitsukasa Yukie, Ishida Hanako, Zhang Zhikuan, Murakami Karin, Hirama Chie, Maekawa Sakiko, Shimizu Toshiyuki	4. 巻 119
2. 論文標題 Structural basis for the oligomerization-mediated regulation of NLRP3 inflammasome activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2121353119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asami Jinta, Kimura Kanako Terakado, Fujita-Fujiharu Yoko, Ishida Hanako, Zhang Zhikuan, Nomura Yayoi, Liu Kehong, Uemura Tomoko, Sato Yumi, Ono Masatsugu, Yamamoto Masaki, Noda Takeshi, Shigematsu Hideki, Drew David, Iwata So, Shimizu Toshiyuki, Nomura Norimichi, Ohto Umeharu	4. 巻 In press
2. 論文標題 Structure of bile acid transporter Ntcp crucial for hepatitis B virus entry	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-04845-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://www.f.u-tokyo.ac.jp/topics.html?page=2&key=1603192010 https://www.f.u-tokyo.ac.jp/topics.html?key=1646880551
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------