

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06988

研究課題名(和文) トキソプラズマ寄生胞膜の破壊を先導するIRGB6とGBPの分子構造と機能の解析

研究課題名(英文) Structure and function of IRGB6 and GBP, which lead the destruction of Toxoplasma gondii vacuole

研究代表者

西條 由見子(濱野由見子)(Saijo-Hamano, Yumiko)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：00444513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Irgb6はトキソプラズマが形成する寄生胞膜(PVM)の破壊を先導するタンパク質である。Irgb6の結晶構造を明らかにした。得られた分子構造と既知の研究結果からPVM結合部位を予測し、ドッキングシミュレーションと細胞を使った検証実験を行なった結果、Irgb6がPVM特異的リン脂質と結合してPVMに蓄積し、他のPVM破壊に関わるタンパク質を効率よくPVMに導いてトキソプラズマ殺傷に大きく貢献していることを明らかにした。さらに、Irgb6擬似リン酸化変異体の結晶構造を決定し、ドッキングシミュレーションなどから、トキソプラズマがIrgb6からの攻撃を回避するためのIrgb6不活化機構を提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Irgb6がトキソプラズマ寄生胞膜を認識する機構と(おそらくトキソプラズマによって)Irgb6が不活化される機構を共に分子レベルで解明し、免疫系を理解する上で重要な新しい知見を得られた。これらの研究結果は、寄生虫感染症に対して生体に本来備わる防御機構をうまく利用した新たな治療法の開発につながるものと期待する。

研究成果の概要(英文)：Irgb6 is recruited to and disrupts the PVM formed by Toxoplasma gondii. We have determined the crystal structures of the GTP-bound and nucleotide-free forms of mouse Irgb6. The membrane binding interface of Irgb6 has a unique conformation consisting of N- and C-terminal helical regions that form phospholipid binding sites. In silico phospholipid docking revealed the membrane-binding residues, which were validated by mutagenesis and cell-based assays. These data provide a new structural basis for Irgb6 recognition of T. gondii PVM. We found that Thr95 of Irgb6 is phosphorylated in response to type II T. gondii infection and that the mutation disrupts its localisation to PVs. Structural analysis revealed that Irgb6-T95D leads to a conformational change in the G domain that allosterically alters the PV membrane-binding interface. In silico docking supported disruption of the PVM binding site. We provide new insights into the allosteric inactivation of Irgb6 induced by T. gondii.

研究分野：構造生物学

キーワード：トキソプラズマ 寄生包膜 Irgb6 結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

孢子虫類原虫にはトキソプラズマやマラリア原虫など人類にとって重篤な原虫症を引き起こすものが多い。わが国では生活様式の欧米化に伴い、トキソプラズマ感染によるトキソプラズマ症の症例数が年々増加している。免疫不全患者では致命的な脳炎や神経系疾患を発症し、経胎盤感染により胎児に感染すれば流産・死産、または、新生児の先天性重度脳障害などにつながる。特に年間数百件にのぼると試算される胎児・新生児の先天性トキソプラズマ症の増加は深刻な問題であるが、予防のためのワクチンはなく、現存する薬剤の耐性原虫も出現していることから、新たな対策が必要とされている。

原虫症の発症数を減らすことができない理由の一つとして、トキソプラズマやマラリア原虫などは感染後に宿主の免疫を逃れ慢性感染し、長期にわたって潜伏することが挙げられる。トキソプラズマやマラリア原虫などの孢子虫類原虫は感染宿主細胞内で「寄生胞」と呼ばれる膜構造体の中でのみ増殖する(図1)。慢性・潜伏感染するこれらの原虫を感染細胞内から排除するためには、宿主の細胞自律的免疫系がこの寄生胞膜を破壊し、原虫を殺傷する必要がある。

この分野の第一人者である大阪大学山本雅裕教授のグループは、これまでに細胞生物学的手法を駆使して、インターフェロン γ (IFN γ) 誘導性 p65GTPase である GBP と、GBP と共に寄生胞膜に蓄積する IFN γ 誘導性 p47GTPase である Irgb6 についても研究を進めてきた。そして、Irgb6 は GBP よりもさらに上流で寄生胞膜を認識し破壊する分子であり、Irgb6 がトキソプラズマ感染細胞で最初に寄生胞を破壊して原虫を殺傷し、個体レベルで生体防御応答を担う重要な宿主因子であることを突き止めた[Lee *et al. Life Science Alliance*. 2020 年]。しかし、Irgb6 や GBP が寄生胞膜を認識し膜破壊を起こす分子機序については不明であった。

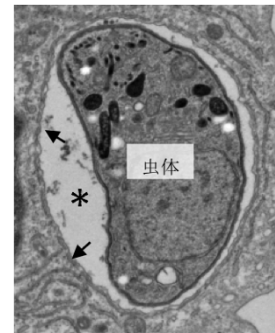


図1 感染細胞内で「寄生胞」(*)の中にあるトキソプラズマ原虫の電子顕微鏡写真。矢印が寄生胞膜。

2. 研究の目的

「Irgb6 はどのように寄生胞膜を認識し、また、GBP とどのように協働して寄生胞膜を破壊するのか？」を構造生物学的に解明する。

3. 研究の方法

主に X 線結晶構造解析法によって Irgb6 と GBP の高分解能分子構造を解明する。具体的には 1) 大腸菌タンパク質発現系の作製、2) タンパク質の精製、3) 結晶条件のスクリーニング、4) 大型放射光施設 SPring-8 でのタンパク質結晶回折データ収集、5) 回折データ解析、モデル構築、精密化 の工程を経る。得られた分子構造と既発表の研究結果から、構造の持つ機能を推測し、分子シミュレーションや細胞を使った実験を行い、推測を検証していく。

4. 研究成果

大腸菌発現系から Irgb6 を精製し、GTPase 活性があることを確認した。精製した Irgb6 の結晶化に成功し、SPring-8 にて結晶の X 線回折データを収集した。回折データから

構造解析を行い、GTP 結合型 (1.5 Å 分解能、PDB ID: 7VEX) とヌクレオチドフリー型 (2.0 Å 分解能、PDB ID: 7VES) の二状態の立体構造を解明した。これらの結晶構造と既発表の研究結果から、Irgb6 の G ドメインの反対側の部位が寄生胞膜との結合部位ではないかと推測し、大阪大学 Daron M Standley 教授グループに依頼して Irgb6 とリン脂質とのドッキングシミュレーションを行った。結果、予測した結合部位に寄生胞膜特有の構成成分であるホスファチジルイノシトール 5-リン酸 (PI5P) が強く結合することがわかった。さらに、結合部位の構造維持に関わる 3W に変異を入れた Irgb6_W3A 変異体で同様のシミュレーションを行なったところ、PI5P との結合力が著しく弱まることもわかった。大阪大学山本雅裕教授グループに依頼し、マウス胎児繊維芽細胞を使った検証実験を行なった。結果 Irgb6_W3A 変異体は寄生胞膜へ動員されず、同時に他の IRG タンパク質も蓄積されず、トキソプラズマの殺傷に至らないことが確認された。

以上の研究結果から、Irgb6 の立体構造そのものに寄生胞膜の PI5P を適切に認識する機能があり、Irgb6 が PI5P と結合して寄生胞膜に蓄積し、他の寄生胞膜破壊に関わるタンパク質を効率よく寄生胞膜に導くことで、トキソプラズマの殺傷に大きく貢献していることが明らかとなった。これらの研究成果をまとめ、査読付き英文論文を発表した (図 2)。

。

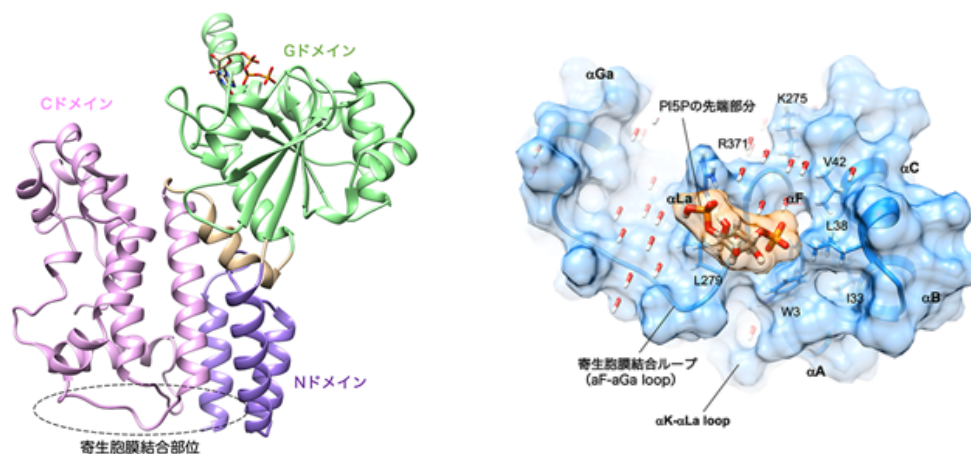


図 2 左図 : Irgb6 (GTP 結合型) の結晶構造。
右図 : Irgb6 と PI5P (先端部分) の結合の様子。左図を下から見る。
PI5P はその中央部に結合する。

先述の Irgb6 の構造解析を進める中、大阪大学山本雅裕教授らのグループによって、II 型トキソプラズマ (弱毒性トキソプラズマ) に感染すると Irgb6 の Thr95 が顕著にリン酸化されることが見出された。さらに、I 型トキソプラズマ (強毒性トキソプラズマ) 感染による Irgb6 不活化機構とは異なり、リン酸化擬似変異体 Irgb6_T95D (以下、変異型) が寄生胞膜と相互作用することができず寄生胞膜上に局在できないことも見出された。I 型トキソプラズマによる Irgb6 の不活化機構については生化学的にも細胞学的にも研究が進み詳細が解明されていたが、II 型トキソプラズマによる Irgb6 の不活化機構については不明な点が多い。Irgb6 が 95Thr のリン酸によってどのように構造変化して不活化しているのかを知るために、大腸菌大量発現系から変異型を精製し、様々なヌクレオチド存在下での変異型の結晶化と結晶構造解析を試みた。結果、野生型と同様、GTP 結合型 (1.7 Å 分解能、PDB ID: 8H4M) とヌクレオチドフリー型 (2.0 Å 分解能、PDB ID: 8H4O) の分子構造を解明することができた。驚いたことに Irgb6 分子内でリン酸化する Thr95 と PVM 結合ループは 50 Å も離れているのに、PVM 結合ループの構造が大きく変化していた。HDX-MS による分析結果と詳細な分子内構造変化の追跡により、このループの構造変化は結晶化によるアーティファクトなものではなく実際に溶液中で起こっている変化であることが強く示唆された。また、ドッキングシミュレーションにより、変異型は PVM 特有リン脂質 PI5P と正常に相

相互作用しないこともわかった (図 3)。以上の結果からこれらの研究結果をまとめて、査読付き英文論文を公表し、Irgb6 不活化機構を提唱した (図 3)。

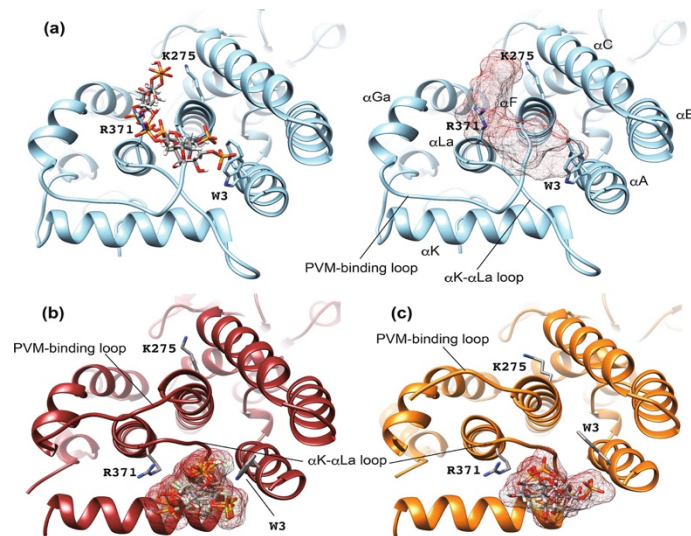


図 3 Irgb6-WT-GTP と Irgb6-T95D-NF に対する PI5P のドッキングシミュレーション (a) PI5P ヘッドと Irgb6-WT-GTP との in-silico docking。PI5P head の代表的なポーズをスティックモデル (左) と分子クラウド (右) で示す。(b) PI5P 頭部と Irgb6-T95D-NF-molA とのインシリコドッキング。(c) PI5P head と Irgb6-T95D-NF-molB との in-silico docking。

Irgb6 がトキソプラズマ寄生胞膜を認識する機構と (おそらくトキソプラズマによって) Irgb6 が不活化される機構を共に分子レベルで解明し、免疫系を理解する上で重要な新しい知見を得られた。これらの研究結果は、寄生虫感染症に対して生体に本来備わる防御機構をうまく利用した新たな治療法の開発につながるものと期待する。

現在、Irgb6 については、GDP 結合型 Irgb6 結晶構造を得るための結晶化条件のスクリーニング、二量体 Irgb6 形成条件の検討と電子顕微鏡観察を進めている。GBP1 についても、精製、結晶化、SPRING-8 での回折データ収集に成功し、分子モデルの精密化作業を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Saijo-Hamano Yumiko, Sherif Aalaa Alrahman, Pradipta Ariel, Sasai Miwa, Sakai Naoki, Sakihama Yoshiaki, Yamamoto Masahiro, Standley Daron M, Nitta Ryo	4. 巻 5
2. 論文標題 Structural basis of membrane recognition of <i>Toxoplasma gondii</i> vacuole by Irgb6	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202101149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lsa.202101149	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 Okuma Hiromichi, Saijo Hamano Yumiko, Yamada Hiroshi, Sherif Aalaa Alrahman, Hashizaki Emi, Sakai Naoki, Kato Takaaki, Imasaki Tsuyoshi, Kikkawa Satoshi, Nitta Eriko, Sasai Miwa, Abe Tadashi, Sugihara Fuminori, Maniwa Yoshimasa, Kosako Hidetaka, Takei Kohji, Standley Daron M., Yamamoto Masahiro, Nitta Ryo	4. 巻 29
2. 論文標題 Structural basis of Irgb6 inactivation by Toxoplasma gondii through the phosphorylation of switch I	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 17 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13080	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 Imasaki Tsuyoshi, Kikkawa Satoshi, Niwa Shinsuke, Saijo-Hamano Yumiko, et al	4. 巻 11
2. 論文標題 CAMSAP2 organizes a γ -tubulin-independent microtubule nucleation centre through phase separation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.77365	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 Taguchi Shinya, Nakano Juri, Imasaki Tsuyoshi, Kita Tomoki, Saijo-Hamano Yumiko, Sakai Naoki, Shigematsu Hideki, Okuma Hiromichi, Shimizu Takahiro, Nitta Eriko, Kikkawa Satoshi, Mizobuchi Satoshi, Niwa Shinsuke, Nitta Ryo	4. 巻 11
2. 論文標題 Structural model of microtubule dynamics inhibition by kinesin-4 from the crystal structure of KLP-12 γ -tubulin complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.77877	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------