

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890263

研究課題名(和文)炎症性疾患を重篤化させるHMGB1-IL-1 複合体の形成様式と立体構造の解明

研究課題名(英文)Structural analyses of inflammatory HMGB1-IL1beta complex

研究代表者

杉木 俊彦(Sugiki, Toshihiko)

大阪大学・たんぱく質研究所・助教

研究者番号：70635698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：HMGB1は転写補助因子として核内で機能するが、ネクロシスなどによって細胞外に漏出すると周囲の細胞に炎症性応答を惹起する。この炎症性応答は、HMGB1が炎症性サイトカインIL-1と結合するとさらに増悪し、自己免疫疾患などの重篤化の一因となる。本課題はHMGB1とIL-1の相互作用様式を分子レベルで解明することを目的とした。

組換えHMGB1タンパク質と組換えIL-1タンパク質の大腸菌発現系での大量発現に成功した。各種クロマトグラフィーにより両タンパク質を高純度に精製することに成功した。精製したHMGB1およびIL-1組換えタンパク質の結合親和性を蛍光偏光解消度測定法により解析した。

研究成果の概要(英文)：Basically HMGB1 plays a role in gene transcription in nucleus. However, leaked HMGB1 out of the cells induce inflammation around the cell. The inflammatory reaction can be augmented by interacting with IL-1beta, which is one of the potent inflammatory cytokines.

Recombinant HMGB1 and IL-1beta proteins could be successfully over-expressed by using Escherichia coli expression system. Then, we could highly purified the recombinant HMGB1 and IL-1beta proteins by performing several types of chromatographic experiments. Furthermore, binding affinity between the recombinant HMGB1 and IL-1beta proteins were investigated by measuring fluorescence depolarization.

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：物理系薬学

キーワード：構造生物学 HMGB

### 1. 研究開始当初の背景

好中球やマクロファージなどの炎症応答細胞は、外来からの異物の侵入などの刺激を受けて、IL-1 等の炎症性サイトカインを分泌する。それらは周囲の炎症応答細胞や免疫細胞の表面に存在するサイトカイン受容体を介して炎症・免疫反応を活性化させることで、生体防御反応の拡大に重要な役割を果たす。しかし、炎症性サイトカインの過剰な分泌は、自らの生体組織を障害する慢性炎症性疾患を引き起こす原因となる。

HMGB1 は、本来は核内に局在し、DNA の修復や正常な遺伝子翻訳、クロマチンの構造形成等に関与する転写補助因子であるが、種々の炎症性刺激によって炎症応答細胞から分泌されることも知られている。また近年、細胞外に分泌した HMGB1 が IL-1 と複合体を形成し、それが IL-1 受容体に対して作用し、IL-1 単独の場合よりも強い炎症応答を惹起することが報告され(Sha et al. J. Immunol. 2008)、慢性炎症性疾患の発症およびその重篤化において HMGB1 が重要な関与をすることが知られ始めている。

しかし、HMGB1 と IL-1 の複合体が、IL-1 単独の時よりも重篤な炎症反応増悪を引き起こすメカニズムは未知である。

### 2. 研究の目的

IL-1 が HMGB1 と複合体を形成することによってそのサイトカインとしての活性が増強されるメカニズムを、分子レベルで解明することを目的とする。具体的には、HMGB1 - IL-1 複合体の立体構造、およびその複合体と IL-1 受容体の相互作用様式を構造生命科学的手法により解明することを主な目的とする。IL-1 と HMGB1 はどのようなメカニズムで互いを認識するのか、HMGB1 と結合した IL-1 と IL-1 単独では IL-1 受容体に対する相互作用はどのように異なるのか、を分子レベルで明らかにして比較する。

また、その知見を基にして、IL-1 と HMGB1 の結合、もしくは HMGB1 - IL-1 複合体と IL-1 受容体の相互作用を特異的に阻害する新規薬剤の開発に繋がる基盤情報を得ることを目的とする。IL-1 と HMGB1 の結合、もしくは HMGB1 - IL-1 複合体と IL-1 受容体の相互作用を薬剤のターゲットとすることにより、HMGB1 の細胞内での本来の機能を損なうことなく炎症のみを特異的に抑えて副作用の少ない新規薬剤が創製できると考えている。

### 3. 研究の方法

(1) HMGB1 および IL-1 の遺伝子組換えタンパク質の大量発現・精製法の構築

HMGB1 - IL-1 複合体を対象とした構造生命科学解析を行うにあたり、活性を保持した両タンパク質を、高純度かつ大量に取得することが不可欠である。一般的な方法である大腸菌を宿主とした遺伝子組換えタンパク

質発現系を用いて、HMGB1 および IL-1 タンパク質の大量発現および精製法を確立する。HMGB1 は主に 2 つの機能ドメイン (Box-A および Box-B) で構成されているため、HMGB1 全長に加えて Box-A および Box-B それぞれ単独で大量発現および精製する実験条件を確立する。

(2) HMGB1 - IL-1 間の結合親和性の定量的解析

HMGB1 と IL-1 が複合体を形成することは報告があるが、両者間の affinity については報告が無く、未知である。結合の強さを明らかにすることは、HMGB1 と IL-1 の複合体の形成の分子メカニズムやその機能発現の本質を解明するうえで不可欠である。そこで、HMGB1 および IL-1 の遺伝子組換えタンパク質を混和して蛍光偏光解消度測定や溶液 NMR 測定などにより、両者の解離定数を決定する。

(3) HMGB1 - IL-1 複合体の立体構造決定

HMGB1 と IL-1 の遺伝子組換えタンパク質を混和し、結晶化による結晶構造解析、もしくは溶液状態での NMR 測定によって、HMGB1 と IL-1 の複合体の立体構造を決定する。どちらの方法を進めるかは、HMGB1 - IL-1 間の結合親和性を明らかにしたうえで決定する。すなわち、両者の解離定数がサブナノモルレベルの強いものであることが判明した場合は、両タンパク質が結合した状態で共結晶化することを試みる。しかし、両者の結合親和性がそれほど高くなく、複合体を形成した状態での共結晶化が難しい場合は、溶液状態でタンパク質間相互作用界面などを決定できる溶液 NMR 法によって複合体の立体構造決定を試みる。溶液 NMR 法で複合体の立体構造を決定する場合の具体的な手順としては、まず、<sup>13</sup>C や <sup>15</sup>N などの安定同位体元素で標識した HMGB1 タンパク質と IL-1 タンパク質を精製し、それぞれの多次元 NMR スペクトルを測定して、良好なスペクトルが得られる溶媒条件を決定する。その後、両タンパク質を混和 (ただし、どちらか一方のみ安定同位体標識しておく) し、多次元 NMR 測定により、原子間結合の角度や距離を見積もる。それらの情報を制限として分子力学的計算を行い、HMGB1 - IL-1 複合体の立体構造を計算する。HMGB1 と IL-1 の結合親和性が、それよりもさらに低く、過渡的な複合体形成でしかないことが判明した場合は、HMGB1 - IL-1 間の距離を示す NMR シグナルが検出できず、複合体の立体構造を直接決定することが困難である。その場合は、化学シフト値の変化や交差飽和現象などを指標にして HMGB1 - IL-1 間の結合界面を溶液 NMR 法で決定し、さらに両タンパク質の結合時の分子間配向状態を溶液 NMR 法で明らかにし、それらの情報を制限情報として分子力学的計算を行い、ある程度は仮想的ではあるが高精度のドッキングモデルを構築することとする。

前述したように HMGB1 は 2 つの機能ドメイン Box-A および Box-B からなるが、両ドメイン中には、類縁タンパク質間で高度に保存されている特徴的なシステイン残基が存在する。そのシステイン残基の側鎖チオール基は、細胞のストレス応答に伴う細胞内酸化還元状態の変動を感知し、HMGB1 の立体構造と機能を動的に制御している可能性が報告されている (Tang et al. Autophagy 2010)。また、Box-A と Box-B のシステイン残基はそれぞれ機能的に異なる役割を担っており、それぞれのシステイン残基の酸化還元状態の違いによって、発症する慢性炎症性疾患の種類も異なる可能性が報告されている (Tang et al. Antioxidants and Redox Signaling 2011)。HMGB1 の Box-A と Box-B のどちらが HMGB1 との相互作用を担っているのか、その際にシステイン残基の化学状態はどのような寄与を果たすのか (細胞内レドックスストレスのセンサーおよび細胞の炎症性応答の分子スイッチとして機能する可能性) も含めて、本課題は HMGB1 - IL-1 複合体の炎症性応答への関与の本質を解明できる戦略であると考えている。

#### (4) IL-1 受容体の発現・精製条件の検討

HMGB1 - IL-1 複合体の形成様式を解明した後に、IL-1 単独もしくは HMGB1 - IL-1 複合体と IL-1 受容体の認識のメカニズムを解明する必要がある。そのために、IL-1 受容体の細胞外領域 (IL-1 が結合する領域) の遺伝子組換えタンパク質を大量発現・高純度に精製する実験条件を探索・確立する。

#### (5) IL-1 受容体と HMGB1 - IL-1 複合体の結合親和性の定量的解析

HMGB1 と IL-1 間の結合親和性を調べた際と同様の手法を用いて、IL-1 受容体と HMGB1 - IL-1 複合体の解離定数を定量的に明らかにする。それを IL-1 単独の場合の結果と比較する。

#### (6) IL-1 受容体と HMGB1 - IL-1 複合体の立体構造解析

HMGB1 - IL-1 複合体の立体構造を決定した際と同様の構造生命科学的戦・手法により、HMGB1 - IL-1 - IL-1 受容体の三者複合体の立体構造を決定し、IL-1 単独 - IL-1 受容体の認識機構との違いを分子レベルで解明する。

### 4. 研究成果

#### (1) HMGB1 および IL-1 の遺伝子組換えタンパク質の大量発現・精製法の構築

HMGB1 および IL-1 について、大腸菌を宿主とする遺伝子組換えタンパク質発現系を構築し、HMGB1 全長、HMGB1 Box-A、HMGB1 Box-B、および IL-1 の遺伝子組換えタンパク質を宿主大腸菌に大量発現させる培養条件を確立した。大量発現後の宿主大腸菌を集菌し、

超音波による菌体破碎の後、破碎液から Ni-NTA クロマトグラフィーおよび陽イオンクロマトグラフィーを行うことにより、HMGB1 全長、HMGB1 Box-A、HMGB1 Box-B を高純度 (純度 95%以上) に精製することができた。IL-1 についても、破碎液を一定時間熱処理して夾雑分子を除去した後に陽イオン交換クロマトグラフィーを行う事により、高純度 (純度 95%以上) に精製することができた。

#### (2) HMGB1 - IL-1 間の結合親和性の定量的解析

精製した IL-1 タンパク質を蛍光色素で標識したものを調製し、これに精製した HMGB1 タンパク質を滴定して、各滴定段階で蛍光偏光解消度測定を行うことにより IL-1 と HMGB1 間の解離定数の測定を行った。その結果、IL-1 と HMGB1 間の有意な結合は検出できず、IL-1 と HMGB1 間の結合親和性はかなり低い (信頼性の高い定量は不可能) ことがわかった。

この実験に用いた HMGB1 は、Box-A、Box-B のシステイン残基の側鎖チオール基は還元された状態 (プロトン化状態) で、レドックスストレスに伴って当該チオール基が酸化された状態になると IL-1 との結合が可能になる可能性がある。現在、当該チオール基が酸化された状態の HMGB1 タンパク質を高純度に精製する実験条件を検討中であり、今後、酸化型 HMGB1 と IL-1 の結合親和性を上記と同様の手法により調べる。

#### (3) HMGB1 - IL-1 複合体の立体構造決定

HMGB1 と IL-1 が in vitro で複合体を形成する条件をまだ確立できていないため、細胞内レドックスの変化に応じて HMGB1 に酸化修飾が施される可能性を含め、複合体を形成する条件を探索中である。それは実験条件の探索にとどまらず、その結果は HMGB1 - IL-1 複合体の形成がどのような細胞内シグナルによって制御されているかを解明することに繋がるため、生化学的な機能解析としても重要である。

### 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 3件)

Mayumi Miyazawa-Onami, Koh Takeuchi, Toshiaki Takano, Toshihiko Sugiki, Ichio Shimada, Hideo Takahashi. Perdeuteration and methyl-selective (1)H, (13)C-labeling by using a Kluyveromyces lactis expression system. *J. Biomol. NMR* 査読有り 57:297-304 (2013)

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10858-013-9789-8>

Toshihiko Sugiki, Naoki Utsunomiya-Tate. Site-specific aspartic acid isomerization regulates self-assembly and neurotoxicity of amyloid- $\beta$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有り 441:493-498 (2013)

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X13017658>

Toshihiko Sugiki, Koh Takeuchi, Toshiyuki Yamaji, et al. Structural basis for the Golgi association by the pleckstrin homology domain of the ceramide trafficking protein (CERT). *J. Biol. Chem.* 査読有り 287:33706-33718 (2012)

<http://www.jbc.org/content/287/40/33706.long>

〔学会発表〕(計 2件)

杉木俊彦、HMGB タンパク質の立体構造形成の分子基盤に関する構造化学的解析、第85回日本生化学会大会、2012.12.15、福岡

杉木俊彦、HMGB タンパク質の立体構造形成とDNA結合機構に関する研究、日本薬学会第133年会、2013.3.29、横浜

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類: 2 2 2 2 2 2

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

杉木 俊彦 (SUGIKI, Toshihiko)

大阪大学・蛋白質研究所・先端計測研究室・助教

研究者番号: 7 0 6 3 5 6 9 8

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: