

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440031

研究課題名(和文)免疫応答制御機構の構造生物学的研究

研究課題名(英文)Structural studies of immune responses.

研究代表者

池水 信二(Ikemizu, Shinji)

熊本大学・生命科学研究部・准教授

研究者番号：60333522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：免疫応答制御機構を構造生物学的に解明するため、IL-23とIL-27について、受容体との複合体の認識機構の解明を目指して、IL-23受容体、IL-27およびIL-27受容体の発現系の構築および精製を行った。IL-12Rb1の調製法を確立して、IL-23と結合することを確認した。現在、複合体の結晶化を試みているところである。IL-27およびWSX-1についても調製法を確立し、結合することを確認した。

研究成果の概要(英文)：Both of interleukin (IL) -27 and IL-23 are heterodimeric cytokines belong to IL-12 family. IL-27 consists of two subunits, p28 and Epstein-Barr virus-induced gene 3 (EBI3), binds two receptors, specific WSX-1 and gp130, a common receptor subunit shared by IL-6 family. IL-27 promotes the differentiation of type 1 T helper (Th1) cells from naive helper T cell cells. IL-27 was expressed on mammalian cells, then purified. Purified IL-27 was able to bind to specific receptor WSX-1. IL-23 receptors consist of two subunits, specific IL-23R and IL-12R β 1 which shares with IL-12. IL-12R β 1 was expressed on insect cells. The purified IL-12R β 1 was mixed with IL-23, then purified as complexes with gel chromatography. Crystallization trials of the complex have been carried out. IL-23R expression trials was carried out using E. coli, insect cells and mammalian cells. We obtained IL-23R only using mammalian cells with very low yield. IL-23R might need to coexpress with the ligand and IL-12R β 1.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造生物学

1. 研究開始当初の背景

T 細胞の活性化には、MHC/TCR の結合の結果起こる抗原特異的なシグナルと B7/CD28 の結合の結果起こる抗原非特異的なシグナルの 2 つが必要である。我々は MHC と TCR の結合の増強に関わる LFA-3(PNAS, 1999) と CD48 (JBC, 2006) の構造を明らかにした。また、Virus 由来ペプチドとクラス 2 MHC の複合体の構造解析を行い、自己免疫疾患様の症状を発症する機構を解明した(Nature Immunol., 2002)。後者のシグナルに関しては、B7-1 (Immunity, 2000)、B7-1/CTLA-4 複合体 (Nature, 2001)、CTLA-4 (JBC, in press) の構造解析を行った。更にこれらの T 細胞と抗原提示細胞間の分子の認識機構について総説にまとめた(Nature Immunol., 2003)。免疫が同種抗原の 2 度目の侵入に対して効率的に応答する為に T 細胞が記憶して備える。この記憶 T 細胞の誘導において重要な働きをするインターロイキン(IL)-15 と特異的な受容体 IL-15R α の複合体の構造解析を行い、これらの分子の認識機構を解明した (Nature Immunol., 2007)。これらの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 細胞が適したサブセットに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。近年になり、Th1 および Th2 への分化を抑制して、更に IL-23 が存在する環境下で 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 Th17 細胞に分化することが報告された (Harrington, 2005; Park, 2005)。しかしながら、T 細胞分化に関わるこれらのサイトカインと受容体の認識機構に関しては、構造生物学的な知見が得られていない。そこで、これらの免疫タンパク質と受容体の複合体の構造解析を行い、T 細胞制御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

Chen 等はサイトカイン受容体 WSX-1 を発見して、WSX-1 が Th1 細胞分化に関わることを明らかにした (Chen, 2000)。WSX-1 のリガンドである 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として存在し (Pflanz, 2002)、IL-27 受容体は WSX-1 と gp130 から構成される。IL-27 は活性化された抗原提示細胞から分泌され、Th0 細胞上の WSX-1 と gp130 と結合することにより、Th0 細胞内にシグナルを伝達して

Th1 細胞への分化を誘導する。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。そこで 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。

また、近年になり明らかにされた Th17 細胞は、TGF- β と IL-6 により分化が誘導される。分化直後の Th17 細胞は、炎症性サイトカイン IL-17 と炎症抑制サイトカイン IL-10 の両分子を発現している。この Th17 細胞に IL-23 が作用すると IL-10 の発現が抑制され、Th17 細胞が炎症を誘導することにより様々な炎症性自己免疫疾患を誘導することが分かった。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 細胞の増殖が阻害され、実験的自己免疫性脳脊髄炎などの自己免疫疾患の発症が抑制される。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 (Oppmann, 2000)。IL-23 受容体は、特異的な IL-23R と IL-12 と共有される IL-12R β 1 から構成されている。修飾糖を切除した IL-23 の構造は 2 つのグループから報告され (Beyer, 2008; Lupardus, 2008)、また我々は糖修飾を受けた IL-23 の構造を明らかにした。IL-23R および IL-12R β 1 の構造は未知であり、IL-23 とこれらの受容体の認識機構も明らかにされていない。そこで Th17 細胞において重要なはたらきをする IL-23 と受容体の認識機構およびシグナル伝達機構を構造生物学的に解明するため、IL-23R、IL-12R β 1、IL-23/IL-23R 複合体、IL-23/IL-23R/IL-12R β 1 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 細胞の制御において重要なはたらきをする IL-23、更にこれらの受容体と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/受容体複合体と IL-27/受容体複合体の結晶構造を明らかにして、T 細胞分化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。IL-23 の特異的な受容体である IL-23R を大腸菌・昆虫細胞・動物細胞などを用いて発現系を構築し、精製を行う。精製した IL-23R を単独で結晶化するとともに、調製法が既知の IL-23 との複合体として精

製を行い、複合体の結晶化・構造解析を行う。IL-12Rβ1 についても同様に発現・精製・構造解析を行いながら、IL-23/IL-12Rβ1 複合体の結晶の調製を行う。さらに、IL-23/IL-23R/IL-12Rβ1 複合体の精製・結晶化構造解析を行う。

また、IL-27 とその特異的受容体である WSX-1 の発現・精製・結晶化・構造解析を行う。IL-27/WSX-1 複合体および IL-27/WSX-1/gp130 複合体の結晶構造解析を行い、T 細胞分化機構を構造生物学的に解明する

4. 研究成果

(1) IL-27 は p28 と EB13 からなるヘテロ二量体であるが、ジスルフィド結合を介さない二量体であるため不安定であり、精製中に分離していた。そのため、p28 と EB13 をリンカーでつないだ一本鎖(s)IL-27 のコンストラクトを作成して、動物細胞を用いて一過的に発現させる系を構築した。精製を行い少量の sIL-27 を得た。精製した sIL-27 と WSX-1 D1-D2 が結合することを確認した。しかしながら、発現量が低いため安定発現株を構築することにした。現在、安定発現株の構築中である。

gp130 は D1-D3 の構造が IL-6 との複合体として明らかにされている。その報告に従って昆虫細胞を用いた発現系の構築を行った。また、この領域には 7ヶ所の糖修飾部位がある 5ヶ所は報告に従って修飾受けない様に変異を加えた。このコンストラクトを昆虫細胞を用いて発現させ、精製を行った。この試料は sIL-27/WSX-1 D1-D2 複合体とは結合しなかった。そこで糖修飾を受けた野生型(wt)を調製したが、sIL-27/WSX-1 D1-D2 複合体と結合しなかった。

特異的受容体である WSX-1 は、D1-D2 を大腸菌で発現させて巻き戻しを行った後、精製を行う系を確立していた。この WSX-1 D1-D2 は sIL-27 と結合することを確認した。しかしながら、gp130 D1-D3 の野生型(wt)および糖修飾を欠損した試料の両方とも結合しなかった。そこで、WSX-1 D1-D3 を調製して、sIL-27 および gp130 D1-D3 と結合することを確認することにした。現在、WSX-1 D1-D3 の調製しているところである。

(2) IL-23 は構造既知であり、IL-23 受容体は、特異的な IL-23R と IL-12 と共有の IL-12R 1 からなる。IL-12R 1 の D1-D2 を昆虫細胞を用いて発現させ、精製する方法を確立した。この精製 IL-12R 1 D1-D2 が IL-23 と結合することを確認した。現在、複合体結晶の調製を試みているところである。

精製した IL-23R D2-D3 は IL-23 と結合しなかったため、IL-23R D1-D3 の調製を行うことにした。まず、IL-23R D1-D3 を大腸菌で発現させたが上手く発現しなかった。そこで昆虫細胞を用いた発現を試みたが、これも上手

くいかなかった。そこで動物細胞を用いた発現を試みたところ少量のタンパク質を得た。しかしながら、発現量が少なかったため IL-23R D1-D3 を IL-23 および IL-12R 1 と共発現させることを計画した。現在、これらの三者の共発現系の安定発現株の構築を進めているところである。

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 5 件)

Schubert, D., Bode, C., Kenefeck, R., Hou, T. Z., Wing, J. B., Kennedy, A., Bulashevskaya, A., Petersen, B. S., Schäffer, A. A., Grüning, B. A., Unger, S., Frede, N., Baumann, U., Witte, T., Schmidt, R. E., Dueckers, G., Niehues, T., Seneviratne, S., Kanariou, M., Speckmann, C., Ehl, S., Rensing-Ehl, A., Warnatz, K., Rakhmanov, M., Thimme, R., Hasselblatt, P., Emmerich, F., Cathomen, T., Backofen, R., Fisch, P., Seidl, M., May, A., Schmitt-Graeff, A., Ikemizu, S., Salzer, U., Franke, A., Sakaguchi, S., Walker, L. S., Sansom, D. M., Gribmacher, B. "Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations." **Nature Med.** 20, 1410-1416, 2014、査読有

DOI: 10.1038/nm.3746

Cheng, X., Veverka, V., Radhakrishnan, A., Waters, L.C., Muskett, F.W., Morgan, S., Huo, J., Yu, C., Evans, E.J., Leslie, A.J., Griffiths, M., Stubberfield, C., Griffin, R., Henry, A.J., Jansson, A., Ladbury, J.E., Ikemizu, S., Carr, M.D., Davis, S.J. "Structure and interactions of the human programmed cell death 1 receptor." **J. Biol. Chem.** 288, 11771-11785, 2013、査読有

DOI: 10.1074/jbc.M112.448126

Obayashi, K., Tasaki, M., Jono, H., Ueda, M., Shinriki, S., Misumi, Y., Yamashita, T., Oshima, T., Nakamura, T., Ikemizu, S., Anan, I., Suhr, O.,

& Ando, Y. "Impact of antibodies against amyloidogenic transthyretin (ATTR) on phenotypes of patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) ATTR Valine30Methionine." **Clin. Chim. Acta** 419, 127-131, 2013、査読有
DOI: 10.1016/j.cca.2013.02.002

Koga, Y., Inazato, M., Nakamura, T., Hashikawa, C., Chirifu, M., Michi, A., Yamashita, T., Toma, S., Kuniyasu, A., Ikemizu, S., Nakabeppu, Y., & Yamagata, Y. "Crystallization and preliminary X-ray analysis of human MTH1 with a homogeneous N-terminus." **Acta Crystallogr.** F69, 45-48, 2013、査読有
DOI: 10.1107/S1744309112048002

Morishige, T., Narimatsu, S., Ikemizu, S., Tsunoda, S., Tsutsumi Y., Mukai, Y., Okada, N., Nakagawa, S. "Mutants of lymphotoxin- α with augmented cytotoxic activity via TNFR1 for use in cancer therapy." **Cytokine** 61, 578-584, 2013、査読有
DOI: 10.1016/j.cyto.2012.11.005

〔学会発表〕(計 3 件)

池水 信二 “IL-23 と受容体の構造生物学的認識機構の解明” アステラス病態代謝研究会、2014.10.18、東京

池水 信二 “寺田寅彦博士の軌跡” 第134回日本薬学会年会、2014.3.27-30、熊本

四郎園 巧・池鯉鮒 麻美・崎山竜人・中村照也・山縣ゆり子・小島利之・烏山一・池水信二 “CD200R1 および CD200-CD200R1 複合体の X 線結晶構造解析” 平成 25 年度日本結晶学会、2013.10.12-23、熊本

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

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