

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2013～2014
課題番号：25650029
研究課題名(和文)ダイオキシン受容体の構造生物学的研究

研究課題名(英文)Structural biology of dioxin receptor

研究代表者
大戸 梅治(Ohto, Umeharu)

東京大学・薬学研究科(研究院)・講師

研究者番号：90451856
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)：ダイオキシン受容体(AhR)のX線結晶構造解析を目指して、AhRとその共受容体であるARNTの発現系を構築した。AhRとARNTに関して、複数の種由来の遺伝子、発現のホスト、発現領域の検討を行った。また、発現させたAhR/ARNT複合体を高純度に精製する方法を確立した。さらにDNAとの結合も確認して様々な条件で結晶化のスクリーニングを行った。

研究成果の概要(英文)：For crystallographic analysis of dioxin receptor, we constructed expression system of AhR and its coreceptor ARNT. We examined various sources of AhR/ARNT genes, expression hosts, and optimum regions for expression. We established purification protocol for AhR/ARNT. We conducted DNA binding experiments and crystallization screening using purified AhR/ARNT.

研究分野：構造生物学

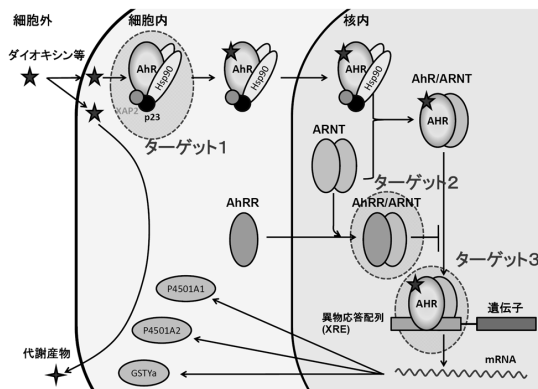
キーワード：ダイオキシン 環境汚染

1. 研究開始当初の背景

環境中に広く存在するダイオキシンなどの芳香族炭化水素は、生体中では Aryl hydrocarbon receptor (AhR) (ダイオキシン受容体) により認識されている。AhR は転写調節因子であり、ダイオキシンに応答して薬物代謝酵素の誘導を促進させる。リガンド非結合状態の AhR は核外に存在しており、各種シャペロン蛋白質と複合体を形成し安定化されている。細胞内に取り込まれたダイオキシンなどの芳香族炭化水素が結合することで、AhR は核内へ移行して、核内で AhR nuclear translocator (ARNT)蛋白質とヘテロ2量体を形成する。AhR/ARNT 複合体は、DNA 上の Xenobiotic responsive elements (XRE; 異物応答配列) と呼ばれる特定の配列に結合し、XRE 下流の遺伝子の転写が活性化されることが知られている。上記のように関与する分子自体は比較的明らかになっている。しかし、三次元構造をベースにした詳細な分子認識機構は全く明らかになっていない。

2. 研究の目的

本申請課題では、AhR によるダイオキシンの認識と転写活性化機構を X 線結晶構造解析により原子分解能で明らかにする。AhR は、発がんや催奇形性、自己免疫疾患、メタボリックシンドロームなど種々の病態に関与しており、これらの治療薬のターゲットとなることが期待されており、本研究はその構造基盤を与えるものである。本申請課題では、ターゲット1. AhR/Hsp90/XAP2/p23 複合体 (核移行前複合体)、ターゲット2. AhRR/ARNT 複合体 (AhR 抑制複合体)、ターゲット3. AhR/ARNT/リガンド/DNA 複合体 (転写活性化複合体) の構造解析を目指した。これより、AhR によるリガンドの認識、AhR と ARNT との相互作用、AhR/ARNT による DNA 認識機構を原子レベルで明らかにする。本研究により、AhR によりダイオキシンの認識機構とその転写活性化機構、またそこから生じる AhR の機能制御の可能性などを示すことができれば、その成果は社会的にも大きな波及効果を持つことが期待される。



3. 研究の方法

本申請課題では、AhR によるダイオキシン認識と転写活性化の中核である AhR (リガンド) /ARNT ヘテロ2量体と DNA の4者複合体の構造解析を目指す。結晶化試料は、昆虫細胞を用いて、AhR と ARNT を共発現して調製する。AhR と ARNT の発現領域、また、様々なリガンドや DNA 配列を検討することで、構造解析可能な良質の結晶を得られるようにする。結晶が得られたら、放射光を用いて高分解能の回折データを収集し、既存の構造解析手法を駆使して迅速に構造決定を行う。

4. 研究成果

(1) 発現のホスト、発現系

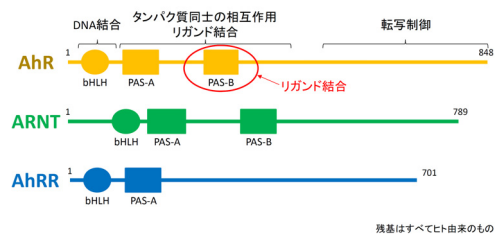
バキュロウイルス発現系を用いて昆虫細胞 sf9、high five 細胞を用いて AhR、ARNT の発現を確認した。high five 細胞よりも sf9 細胞の方が発現量が高かったため sf9 細胞を採用することにした。AhR は単独では不溶性画分に発現するのに対して、ARNT と共発現させることで効率的に可溶性画分に得られることが判明した。また、共発現の方法として、1つのベクターに AhR と ARNT の2つの遺伝子を組み込んで発現させる、それぞれのバキュロウイルスを作成して共感染させる方法を検討した。

(2) 発現領域の検討

AhR、ARNT の発現領域を検討した。いずれも bHLH、PAS-A、PAS-B を含むようなコンストラクト(下図)を複数種作成して、また、精製に使用するタグの位置も検討した。両者の N 末端側に His タグを付加させたコンストラクトで良好な発現が確認できた。また、ヒト由来の AhR/ARNT に加えて、マウス、牛由来の AhR/ARNT についても発現を確認した。

bHLH-PASファミリーのドメイン構成

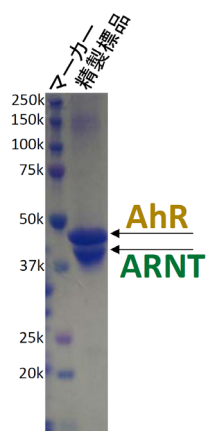
- N末端側にDNA結合部位である塩基性のbasic-helix loop helix (bHLH)ドメイン
- タンパク質同士の相互作用やリガンド認識に関わるPASドメイン
- C末端側に転写を制御する領域



(3) AhR/ARNT の精製

結晶化を目指して培養条件、精製に使用するカラムやバッファの条件を検討した。Sf9 細胞に AhR と ARNT のウイルスを共感染させ3日間培養後、細胞を回収して、破碎バッファーに懸濁、超音波破碎した。破碎液上清から Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーにより AhR/ARNT 複合体を精製した。再度 Ni アフィニティー精製、陽イオン交換カラム、

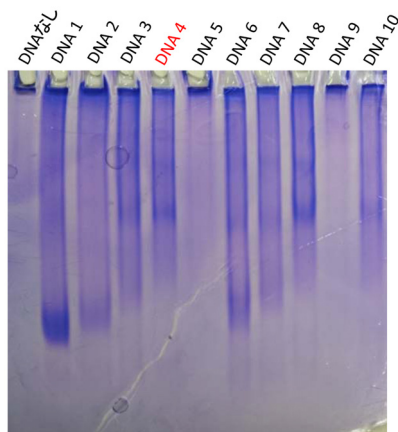
ゲル濾過カラムにより精製した。最終的に SDS-PAGE でほぼ単一のバンドとなるまで精製することができた。また、AhR/ARNT は沈殿や凝集をしやすい傾向があったが、高塩濃度、グリセロールの添加である程度抑えられることがわかった。



(4) DNA との結合

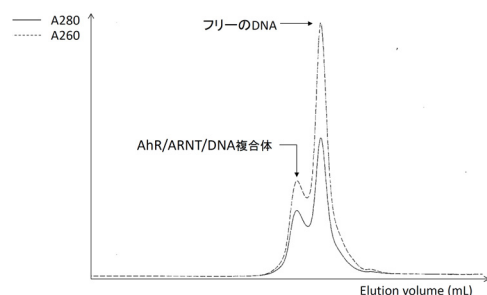
得られた AhR/ARNT 複合体と DNA との結合をゲル濾過クロマトグラフィーまたはネーティブ PAGE により確認した。様々な長さの DNA と AhR/ARNT を混合してネーティブ PAGE により結合を確認した(下図)。

AhR/ARNTヘテロダイマーと DNA配列のネーティブPAGE



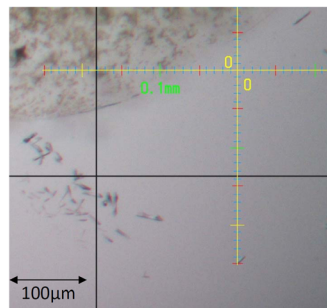
CBB染色

また、結晶化に向けて、AhR/ARNT/DNA 複合体をゲル濾過カラムで精製した(下図)。



(5) 結晶化スクリーニング

得られた精製試料を用いて結晶化スクリーニングを行った。牛 AhR/ARNT、ヒト AhR/ARNT についてそれぞれ DNA なしと DNA ありでスクリーニングを行った。現在写真のような微小結晶が得られており、結晶の再現性を確認している。



(6) 安定性の確認

得られた精製試料には安定性の問題があった。そこでコンストラクトを再検討した結果、C 末端側にタグを付加させた状態ではタグがない状態に比べて安定に存在することが分かった。さらに安定性を向上させるため、また、より結晶化しやすいサンプルを得るために、フレキシブルなループを形成すると予測された領域を削るなどの検討を行っ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 9 件)

1. Kannno, A., Tanimura, N., Ishizaki, M., Ohko, K., Motoi, Y., Onji, M., Fukui, R., Shimozato, T., Yamamoto, K., Shibata, T., Sano, S., Sugahara-Tobinai, A., Takai, T., Ohto, U., Shimizu, T., Saitoh, S., & Miyake, K. (2015) Targeting cell surface TLR7 for therapeutic intervention in autoimmune diseases. *Nat. Commun.* **6**, 6119. doi: 10.1038/ncomms7119. (査読有)
2. Chan, M. P., Onji, M., Fukui, R., Kawane, K., Shibata, T., Saitoh, S., Ohto, U., Shimizu, T., Barber, G. N., & Miyake, K. (2015) DNase II-dependent DNA digestion is required for DNA sensing by TLR9. *Nat. Commun.* **6**, 5853. doi: 10.1038/ncomms6853. (査読有)
3. Ohto, U., Shibata, T., Tanji, H., Ishida, H., Krayukhina, E., Uchiyama, S., Miyake, K., & Shimizu, T. (2015) Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9. *Nature* **520**, 702-705. doi: 10.1038/nature14138. (査読有)
4. Tanji, H., Ohto, U., Shibata, T., Taoka, M.,

- Yamauchi, Y., Isobe, T., Miyake, K., & Shimizu, T. (2015) Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA. *Nat Struct Mol Biol* **22**, 109-15.
doi: 10.1038/nsmb.2943. (査読有)
5. Yoo, E., Salunke, D. B., Sil, D., Guo, X., Salyer, A. C., Hermanson, A. R., Kumar, M., Malladi, S. S., Balakrishna, R., Thompson, W. H., Tanji, H., **Ohto, U.**, Shimizu, T. & David, S. A. (2014). Determinants of Activity at Human Toll-like Receptors 7 and 8: Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) of Diverse Heterocyclic Scaffolds. *J Med Chem* **57**, 7955-7970.
doi: 10.1021/jm500744f. (査読有)
 6. Tanimura, N., Saitoh, S., **Ohto, U.**, Akashi-Takamura, S., Fujimoto, Y., Fukase, K., Shimizu, T. & Miyake, K. (2014). The attenuated inflammation of MPL is due to the lack of CD14-dependent tight dimerization of the TLR4/MD2 complex at the plasma membrane. *Int Immunol* **26**, 307-14.
doi: 10.1093/intimm/dxt071. (査読有)
 7. Suzuki, H., **Ohto, U.**, Higaki, K., Mena-Barragan, T., Aguilar-Moncayo, M., Ortiz Mellet, C., Nanba, E., Garcia Fernandez, J. M., Suzuki, Y. & Shimizu, T. (2014). Structural basis of pharmacological chaperoning for human beta-galactosidase. *J Biol Chem* **289**, 14560-8.
doi: 10.1074/jbc.M113.529529. (査読有)
 8. **Ohto, U.**, Tanji, H. & Shimizu, T. (2014). Structure and function of toll-like receptor 8. *Microbes Infect* **16**, 273-82.
doi: 10.1016/j.micinf.2014.01.007. (査読有)
 9. Kokatla, H. P., Sil, D., Tanji, H., **Ohto, U.**, Malladi, S. S., Fox, L. M., Shimizu, T. & David, S. A. (2014). Structure-based design of novel human Toll-like receptor 8 agonists. *ChemMedChem* **9**, 719-23.
doi: 10.1002/cmde.201300573. (査読有)
- [学会発表] (計 13 件)
1. **U. Ohto**, H. Tanji, T. Shibata, K. Miyake, and T. Shimizu.
Crystal structures of human Toll-like receptor. 84th International Symposium on Diffraction Structural Biology 2013
May, 2013, Nagoya
 2. 丹治裕美, **大戸梅治**, 柴田琢磨, 三宅健介, 清水敏之
自然免疫系 RNA 受容体ヒト TLR8 の結晶構造解析/Crystal structural analysis of innate immune RNA receptor human TLR8
東京大学生命科学シンポジウム
2013 年 6 月、東京
 3. 丹治裕美, **大戸梅治**, 柴田琢磨, 三宅健介, 清水敏之
自然免疫系 RNA 受容体 TLR8 の結晶構造解析/Crystal structural analysis of innate immune RNA receptor TLR8
第 13 回日本蛋白質科学会年回
2013 年 6 月、鳥取
 4. H. Tanji, **U. Ohto**, T. Shibata, T. Shimizu
Structural basis of innate immune RNA receptor TLR8
International Conference on Structural Genomics 2013
July, 2013, Sapporo.
 5. **U. Ohto**, K. Fukase, K. Miyake, and T. Shimizu.
Structural basis for species-specific endotoxin recognition by TLR4/MD-2.
International Conference on Structural Genomics 2013
July, 2013, Sapporo.
 6. 丹治裕美, **大戸梅治**, 柴田琢磨, 三宅健介, 清水敏之
自然免疫系 RNA 受容体ヒト TLR8 の構造基盤
日本結晶学会 2013 年会
2013 年 10 月、熊本
 7. 丹治裕美, **大戸梅治**, 柴田琢磨, 三宅健介, 清水敏之
TLR8/モノヌクレオシド複合体の結晶構造
日本薬学会第 134 年会
2014 年 3 月、熊本
 8. **U. Ohto**, H. Tanji, T. Shibata, K. Miyake, and T. Shimizu.
Structural studies of nucleic acid sensing Toll-like receptor.
23rd Congress and General Assembly of The International Union of Crystallography (IUCr 2014).
August, 2014, Montreal, Canada.
 9. **大戸梅治**, 清水敏之.
自然免疫系 Toll 様受容体の構造生物学研究. 第 87 回日本生化学会年会.
2014 年 10 月、京都
 10. U. Ohto

Structural study of Toll-like receptor 8
recognizing viral single stranded RNA
The International Symposium 'Molecular
basis of host cell competency in virus
infection' 2014
November, 2014, Yokohama

11. 丹治裕美、大戸梅治、柴田琢磨、三宅健介、清水敏之
TLR8 と一本鎖 RNA との複合体の結晶構造
第 14 回日本蛋白質科学会年会
2014 年 6 月、横浜
12. 丹治裕美、大戸梅治、柴田琢磨、田岡万悟、山内芳雄、磯邊俊明、三宅健介、清水敏之
Toll 様受容体 8(TLR8) と一本鎖 RNA 複合体の結晶構造
日本薬学会第 135 年会
2015 年 3 月、神戸
13. 前川早貴子、大戸梅治、清水敏之
自然免疫受容体 NOD2 の結晶構造解析
日本薬学会第 135 年会
2015 年 3 月、神戸

〔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

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~kouzou/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大戸 梅治 (OHTO UMEHARU)

東京大学大学院薬学系研究科・講師

研究者番号：90451856