

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860341

研究課題名(和文) 構造生物学的アプローチによるウイスタンパク質の自然免疫阻害機構の解明

研究課題名(英文) Structural basis of the inhibition of STAT1 activity by Sendai virus C protein

研究代表者

小田 康祐(Oda, Kosuke)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：60571255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：センダイウイルスCタンパク質は、転写因子STAT1のN末端ドメイン(STAT1ND)に結合し、インターフェロン(IFN)- α / β およびIFN- γ によるシグナル伝達を阻害する。Cタンパク質のC末(Y3と命名)とSTAT1NDの複合体構造を明らかにしたところ、2分子のY3は、STAT1NDホモ二量体によって形成される2つの溝にそれぞれ結合することが明らかになった。すなわち、STAT1二量体に2分子のCタンパク質が結合すると、脱リン酸化が阻害されるであろう。ただし、Cタンパク質と結合したSTAT1は、高分子量重合体を形成し、DNAとの結合が阻害される。

研究成果の概要(英文)：Sendai virus C protein inhibits the signal transduction pathways of interferon- α / β by binding to the N-terminal domain of STAT1 (STAT1ND). We determined the crystal structure of STAT1ND associated with the C-terminal half of the C protein (Y3). The structure showed that two molecules of Y3 symmetrically bind to each niche created between two molecules of the STAT1ND dimer. Molecular modeling suggested that an anti-parallel form of the full-length STAT1 dimer can bind only one Y3 molecule and that a parallel form can bind two Y3 molecules. Our study suggests that C protein interferes with the domain arrangement of STAT1 dimer, leading to the accumulation of phosphorylated STAT1 and the formation of high molecular weight complex in slower kinetic, which is responsible to complete inhibition of transcription. In addition, we discuss the underlying mechanism that the phosphorylation of STAT2 is inhibited in the presence of the C protein after stimulation by IFN- α / β .

研究分野：ウイルス学

キーワード：構造生物 自然免疫 パラミクソウイルス インターフェロン FRET

1. 研究開始当初の背景

自然免疫に対する障害機構は、様々な病原微生物に備わっており、感染症発症に関わる重要な因子として認識されてきた。本研究でモデルとして用いるセンダイウイルスは、ヒトに病原性をもたないが、げっ歯類に呼吸器疾患を誘起する病原ウイルスである。また、センダイウイルスは、ヒトに病原性をもつ多くの一本鎖 (-) RNA ウイルスと似た性質をもつこと、並びに、自然宿主である実験マウスを用いて、ウイルス病原性の評価及び検討が可能であることから、自然免疫障害機構に関して早期から研究されてきたウイルスのひとつである。

ウイルスが細胞内に侵入し、ウイルス核酸が宿主に認識されると、I 型インターフェロン産生が誘導され、細胞表面に発現している I 型インターフェロン受容体 (IFNAR1, IFNAR2) に結合する。続いて、Signal Transducers and Activator of Transcription 2 (STAT2) 及び STAT1 が、tyrosine kinase 2 (TYK2) により順次リン酸化され、核内にシグナルが伝達される。センダイウイルスは、自身の産生する C タンパク質により STAT2 のリン酸化を阻害することで、自然免疫を回避する (Gotoh *et al.*, *J. Virol.*, 2003)。その機構に関して言えば、C タンパク質は STAT1 を介して STAT2 と結合することから、C タンパク質が STAT1, STAT2 および IFNAR2 と四者複合体を形成することが重要であると考えられている。しかしながら、C タンパク質存在下で、リン酸化STAT2 依存的な STAT1 のリン酸化が促進されること、並びに、STAT1 に対する結合活性が減少した C タンパク質変異体も STAT2 リン酸化を阻害することなどから、C タンパク質の STAT2 リン酸化阻害機構に関して、不明な点が多い (Kato *et al.*, *J. Virol.*, 2004)。

申請者は、大腸菌を用いて調製した C タンパク質が、単量体と二量体間で平衡状態にあるが、STAT1 と結合し、単一の複合体を形成する可能性を見出した。STAT1 が 2 量体化を形成すること (Braunstein *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2003)、および、ゲルろ過分析により算出した複合体の分子量を基にすると、この複合体は、STAT1 ホモ二量体に 2 分子の C タンパク質が結合したものであると推測される。

2. 研究の目的

IFN- α/β 未刺激時において、STAT1 はホモ二量体を形成し、その一部が STAT2 を介して、IFNAR2 に結合している (Braunstein *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2003)。C タンパク質により STAT2 のリン酸化が阻害されることから、C タンパク質は、STAT1 を介して、STAT2 と相互作用している可能性が考えられる。C タンパク質は、STAT1 の N 末端ドメイン (STAT1ND) に結合する。本研究では、C タンパク質と STAT1ND の複合体構造を、X 線結晶構造解析より明ら

かにする。複合体の立体構造を基にして、部位特異的変異導入法により、C タンパク質がもつ STAT1 との結合に重要なアミノ酸残基を同定する。また、STAT1 結合能を欠失した C タンパク質変異体を作製し、C タンパク質と STAT1 との相互作用が、IFN- α/β および IFN- γ によるシグナル伝達阻害能に関与しているのかどうかを明らかにする。一方、これまでの研究成果として、C タンパク質は、オリゴマー形成能をもつ可能性が示唆された。STAT1 ホモ二量体に 2 分子の C タンパク質が結合するのであれば、C タンパク質同士間で相互作用するモデル (A) と相互作用しないモデル (B) が考えられる。C タンパク質のオリゴマー形成能を欠失させると、A のモデルでは複合体の構造が不安定になると予想される。その一方で、B のモデルでは、複合体の安定性にほとんど影響は与えない。本研究では、細胞内で C タンパク質がオリゴマー形成能をもつのかどうかを免疫共沈降法より明らかにする。C タンパク質がオリゴマー形成能をもつのであれば、オリゴマー形成能を欠失させた C タンパク質変異体を作製し、STAT1 と結合するのかどうかを明らかにする。得られた知見を基にして、C タンパク質のオリゴマー形成能と自然免疫障害機構との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

C タンパク質は、開始コドンの異なる 4 つのタンパク質 (C, 1-204 aa; C', -11-204 aa; Y1, 24-204 aa; 30-204 aa) の総称である。本研究では、C タンパク質と STAT1ND の複合体構造を X 線結晶構造解析により明らかにし、結合様式を明らかにする。このため、まず始めに、Y1 と STAT1ND をひとつに混ぜて、ゲルろ過クロマトグラフィーより精製した。しかしながら、調製した複合体は、溶解度が著しく低く、結晶化が困難であった。これまでに、C タンパク質の C 末側は、STAT1 との結合に関与することが明らかにされている。そこで、C タンパク質の N 末側を欠失させたふたつの変異体 (Y3, 99-204 aa; Y4, 124-204 aa) を作製し、これらの変異体が STAT1ND と結合し、IFN- α/β および IFN- γ によるシグナル伝達を阻害するのかどうかを、免疫共沈降法およびレポーターアッセイ法により調査した。これらの結果、Y4 に関しては、STAT1ND との相互作用を検出することは出来なかったが、Y3 は STAT1ND と結合し、IFN- α/β および IFN- γ によるシグナル伝達を阻害した。そこで、Y3 と STAT1ND を用いて、複合体を調製した。複合体を 10mg/ml まで濃縮し、結晶化を試みたところ、複数の条件下でクラスター状結晶の生成が見られた。条件検討を重ね、最終的に沈殿剤として Polyethylene glycol 400 を用いたときに、複合体の単結晶を得ることができた。作製した結晶は、大型放射光施設 SPring-8 に持ち込み、BL38B1 にて、X 線回折実験を実施

した。収集した回折強度を基にして、STAT1ND 二量体の立体構造を初期モデルに用い、分子置換法により Y3/STAT1ND の複合体構造を決定した。

また、Y3 と STAT1ND もしくは STAT1 (1-713) を用いて、親和性解析を行った。具体的に述べると、Enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP) を融合させた Y3 (EYFP-Y3) と、Enhanced Cyan Fluorescent Protein (ECFP) をそれぞれ融合させた STAT1ND (ECFP-STAT1ND) および STAT1 (1-713) (ECFP-STAT1) を精製した。EYFP-Y3 と ECFP-STAT1ND、もしくは、ECFP-STAT1 との結合に伴い、蛍光分子間で Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) が発生する。これにより減少する 475 nm の蛍光強度を基にして、親和性解析を行った。

さらに、Y3 存在下で、核内ホスファターゼである TC45 により、リン酸化 STAT1 (1-713) がどのように脱リン酸化されるのかを *in vitro* で経時的に観察した。Y3 および TC45 は、大腸菌を用いてそれぞれ調製し、リン酸化 STAT1 は、過去の文献に従い調製した (Vinkemeier *et al.*, *EMBO J.*, 1996)。異なる濃度の Y3 存在下において、リン酸化 STAT1 に TC45 を混ぜて、脱リン酸化反応を開始させた。解析は、抗リン酸化 STAT1 抗体を用いて、ウェスタンブロット法により行った。

また、Y3 が結合したリン酸化 STAT1 は、GAS に結合できるのかどうかを Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA) により解析した。ふたつの GAS がタンデムに並ぶ 2 本鎖 DNA (2 x GAS) をビオチン化標識し、プローブとして用いた。ビオチン化プローブの検出は、LightShift Chemiluminescent EMSA kit を用いて行った。

4. 研究成果

Y3 と STAT1ND 複合体の構造を分解能 2.0Å で決定した。その成果として、2 分子の Y3 は、STAT1ND ホモ二量体によって形成される 2 つの溝にそれぞれ結合することが判明した (図 1A)。また、Y3 が結合した STAT1ND と Y3 が結合していない STAT1ND の構造を重ね合わせたところ、両者の単量体構造に大きな違いは見られなかった (図 1B)。他方、STAT1ND の二量体構造に関しては、Y3 結合

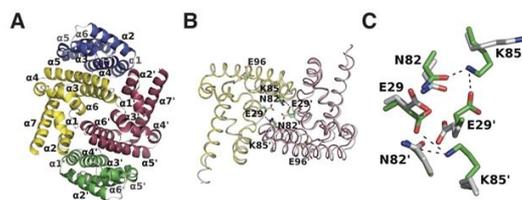


図1. Y3/STAT1ND複合体の結晶構造 (A)とY3結合型およびY3非結合型のSTAT1ND二量体の構造比較 (B,C)。 (A) Y3を青および緑で示す。STAT1NDを黄および赤で示す。 (B,C) Y3結合型STAT1NDの主鎖の炭素原子を黄および赤で示し、側鎖の炭素原子を緑で示す。Y3非結合型STAT1NDの主鎖と側鎖の炭素原子を白で示す。 (B)の拡大図を (C)に示す。

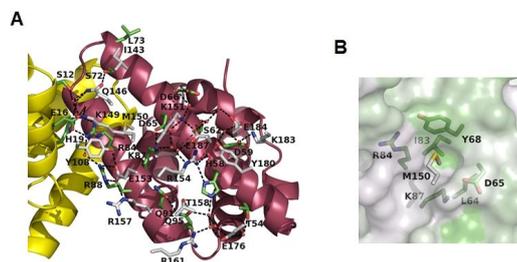


図2. Y3とSTAT1NDの結合面の解析。 (A) STAT1NDのリボン表示を黄および赤で示し、スティック表示の炭素原子を緑で示す。Y3炭素原子のスティック表示を白で示す。点線は水素結合を表す。 (B) STAT1ND分子表面上の疎水性領域を緑で示す。

型とY3非結合型との間で、STAT1NDのサブユニット間の相対的位置の違いが見られた (図 1B)。すなわち、Y3非結合型に比べて、Y3結合型では、STAT1ND 二量体のそれぞれのサブユニットが互いに接近しており、塩橋を形成することで、全体的によりコンパクトな構造をしていた (図 1C)。このため、Cタンパク質存在下において、STAT1ND 単量体は、STAT1ND 二量体から遊離することが困難であると推察される。Y3 と STAT1ND の結合面の解析より、Y3 は、酸性残基や塩基性残基、極性残基そして多くの水分子によって形成された広大な水素結合ネットワークを介して、STAT1ND と相互作用していることが明らかになった (図 2A)。これは、高塩濃度条件下において、Cタンパク質がSTAT1から遊離することを示した過去の知見と一致する。また、Y3のArg¹⁵⁴のω窒素は、STAT1NDのHis⁵⁴主鎖のカルボニル酸素及び側鎖のδ窒素と相互作用していた (図 2A)。一方で、Met¹⁵⁰側鎖は、STAT1ND 二量体の分子表面上に形成された疎水性ポケットに挿入されていた (図 2B)。このArg¹⁵⁴とMet¹⁵⁰がSTAT1との結合にどのように関与しているのかを調べるため、Arg¹⁵⁴およびMet¹⁵⁰をそれぞれAlaに置換した変異体を作製した。培養細胞を用いて免疫共沈降法およびレポーターアッセイを試みたところ、これらの変異をもつCタンパク質は、STAT1と結合することは出来ず、IFN-αによるシグナル伝達を阻害しなかった (図 3ABC)。センダイウイルスを含むレスピロウイルス属間では、Cタンパク質がもつこれらのアミノ酸残基は完全に保存されてい

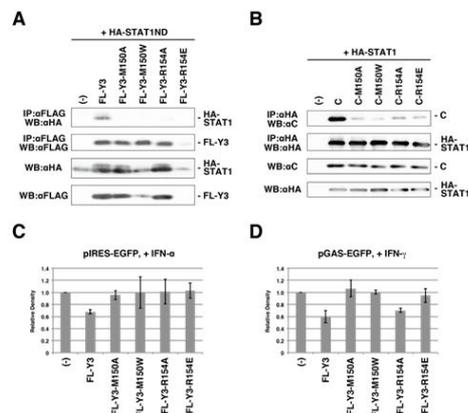


図3. STAT1との結合におけるCタンパク質のMet¹⁵⁰およびArg¹⁵⁴の関与

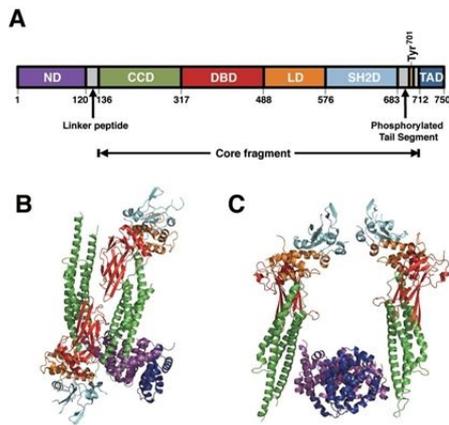


図4. Y3-STAT1複合体のモデル構造。(A) STAT1のドメイン構造。(B) Y3-STAT1複合体のアンチパラレル型のモデル。(C) Y3-STAT1複合体のパラレル型のモデル。STAT1の各ドメインは、(A)の色で示す。Y3を青で示す。

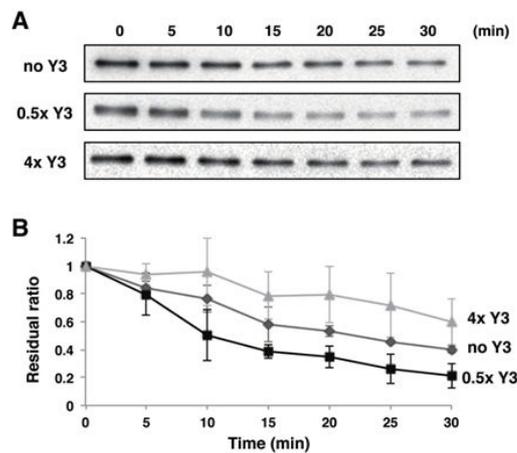


図5. リン酸化STAT1のIn vitro脱リン酸化アッセイ。

る。C タンパク質の機能において、これらアミノ酸残基が重要であることを示唆している。一方、R154A 変異体では、IFN- γ によるシグナル伝達は阻害するが、IFN- α によるシグナル伝達は阻害しなかった (図 3CD)。C タンパク質による阻害機構は、これらシグナル経路間で異なっている可能性が考えられる。次に、全長 STAT1 の結晶構造と比較したところ、STAT1 二量体に 1 分子の Y3 が結合すると、STAT1 は、アンチパラレル型の構造に誘導され、その脱リン酸化が促進することが示唆された (図 4B)。その一方で、2 分子の Y3 が結合すると、パラレル型の構造に誘導され、脱リン酸化が阻害される (図 4C)。ちなみに、STAT1 は、リン酸化されて DNA 結合型の構造に変換し、核内に移行することで、IFN によるシグナルを伝達すると考えられている。転写を活性化させた後、STAT1 は、アンチパラレル型の構造に変換されることで、脱リン酸化し、細胞質に戻る。Y3 と結合することで、STAT1 二量体の構造がモデル構造に誘導されるかを調べるため、Y3 と STAT1ND および STAT1 全長を用いて、親和性解析を試みた。解析の結果、ふたつの Y3 は、STAT1ND に対して、それぞれ協同的に結合することが明らかになった ($K_{d1}=0.68 \mu\text{M}$, $K_{d2}=0.49 \mu\text{M}$)。

他方、STAT1 全長に対しては、ふたつの Y3 は、それぞれ非協同的に結合した ($K_{d1}=0.022 \mu\text{M}$, $K_{d2}=0.51 \mu\text{M}$)。このことは、ひとつめの Y3 は、アンチパラレル型とパラレル型のそれぞれの STAT1 に対して結合できるが、ふたつめの Y3 は、パラレル型の STAT1 とのみ結合することを示唆している。次に、Y3 とリン酸化 STAT1 および核内フォスファターゼである TC45 を用いて、*in vitro* 脱リン酸化アッセイを試みた。その結果、低濃度の Y3 は、TC45 によるリン酸化 STAT1 の脱リン酸化を促進させるが、高濃度の Y3 は、TC45 による脱リン酸化を阻害させることが明らかになった (図 5)。SeV を培養細胞に感染させると、STAT1 のリン酸化は阻害されるが、感染後期では、リン酸化 STAT1 の蓄積が観察される。感染後期では、C タンパク質の細胞内濃度は高いと予測されることから、STAT1 は、パラレル型の構造に誘導され、脱リン酸化が阻害されているのかもしれない。また、EMSA の結果より、Y3 は、リン酸化 STAT1 と γ -activated sequence (GAS) との結合を阻害しないことが明らかになった。ゲルろ過分析より、リン酸化 STAT1 は、Y3 存在下において、高分子量重合体を形成し、DNA に結合していると推測される。レポーターアッセイを試みたところ、C タンパク質に比べて、Y3 では、IFN- γ によるシグナル伝達を部分的にしか阻害しなかった。その理由については、不明であるが、ひとつの可能性として、Y3 の結合により重合化したリン酸化 STAT1 は、転写活性化能が減少していることが考えられる。もうひとつの可能性は、高分子量重合体の形成により、活性をもつリン酸化 STAT1 の量が減少したことが考えられる。一方、C タンパク質は、STAT1 と結合し、より重合度の高い重合体を形成する。この重合体形成によって、C タンパク質は、STAT1 と DNA との結合を阻害する (Gotoh *et al.*, *Virology*, 2003)。これらの知見は、C タンパク質の N 末領域が STAT1 重合化に関与することを強く示唆する。

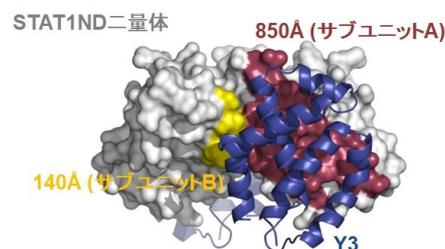


図6. STAT1NDサブユニット間のY3に対する接触面積の違い

他方、C タンパク質による IFN- α/β シグナル伝達阻害機構については明らかにされていないが、C タンパク質と STAT1 との相互作用を介して STAT2 のリン酸化が阻害されるためであると考えられている。これに関して、Y3 と STAT1ND 二量体との結合では、Y3 と STAT1ND 二量体中の片方のサブユニットに対する相互作用が重要である (図 6)。仮に

STAT1ND/STAT2ND 複合体が形成可能であるとすると、STAT1ND/STAT2ND 複合体の分子表面上において、STAT1ND と広く接触することが可能な領域に 1 分子の Y3 が結合する。これは、C タンパク質の結合により、STAT1/STAT2 ヘテロ二量体の構造がアンチパラレル型の構造に誘導され、その脱リン酸化が促進される可能性を示唆する。本研究では、R154A 変異体が、IFN- γ によるシグナル伝達は阻害するが、IFN- α によるシグナル伝達は阻害しないことは見出した。上述の仮説を基にすると、R154 変異体は、STAT1ND 二量体とは結合するが、STAT1ND/STAT2ND 二量体とは結合しないのであろう。今後は、これら仮説を検証するため、まずはじめに、STAT1ND が STAT2ND と相互作用できるのかどうかを明らかにし、これに Y3 が結合するのかどうかを明らかにしていく予定である。

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)

1. Matoba Y, Miyasako M, Matsuo K, Oda K, Noda M, Higashikawa F, Kumagai T, Sugiyama M. An alternative allosteric regulation mechanism of an acidophilic L-lactate dehydrogenase from *Enterococcus mundtii* 15-1A. *FEBS Open Bio*. **4**: 834-847, 2014, doi: 10.1016/j.fob.2014.08.006., 査読有り
2. Uda N, Matoba Y, Kumagai T, Oda K, Noda M, Sugiyama M. Establishment of an in vitro D-cycloserine-synthesizing system by using O-ureido-L-serine synthase and D-cycloserine synthetase found in the biosynthetic pathway. *Antimicrob Agents Chemother*. **57**: 2603-2612. 2013, doi: 10.1128/AAC.02291-12., 査読有り
3. Oda K, Matoba Y, Kumagai T, Noda M, Sugiyama M. Crystallographic study to determine the substrate specificity of an L-serine-acetylating enzyme found in the d-cycloserine biosynthetic pathway. *J. Bacteriol*. **195**: 1741-1749, 2013, doi: 10.1128/JB.02085-12., 査読有り

[学会発表](計 13 件)

1. 小田康祐, センダイウイルス C 蛋白質と ESCRT 関連因子 Alix の結合面の解析. 4th Negative Strand Virus-Japan Symposium, 2015 年 1 月 19-21 日, 沖縄ラグナガーデンホテル (沖縄県・宜野湾市)
2. 小田康祐, 大竹里奈, 的場康幸, 入江崇, 福士雅也, 坂口剛正. センダイウイルス

C 蛋白質と ESCRT 関連因子 Alix の結合様式の解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月 10-12 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

3. 坂口剛正, 川端涼子, 福士雅也, 小田康祐, 入江崇. B 型肝炎ウイルス蛋白質の性状解析. 第 29 回中国四国ウイルス研究会, 2014 年 6 月 28-29 日, 山口大学吉田キャンパス大学会館 (山口県・山口市)
4. 小田康祐, 大竹里奈, 的場康幸, 入江崇, 福士雅也, 坂口剛正. ウイルス様粒子の出芽促進に関わるセンダイウイルス C タンパク質の構造生物学的解析. 第 29 回中国四国ウイルス研究会, 2014 年 6 月 28-29 日, 山口大学吉田キャンパス大学会館 (山口県・山口市)
5. 坂口剛正, 小田康祐, 入江崇. ウイルスによる自然免疫抑制の構造学的解析. 平成 26 年度中四国乳酸菌研究会総会および研究発表会, 2014 年 5 月 16 日, ホテルグランヴィア岡山 (岡山県・岡山市)
6. 小田康祐. インターフェロン応答を阻害するセンダイウイルス C タンパク質の構造生物学的解析. 3rd Negative Strand Virus-Japan Symposium, 2014 年 1 月 13-15 日, 沖縄ラグナガーデンホテル (沖縄, 宜野湾市)
7. 小田康祐, 的場康幸, 江田優子, 川端涼子, 入江崇, 福士雅也, 坂口剛正. センダイウイルス C タンパク質と宿主転写因子 STAT1 の複合体構造. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3-6 日, 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
8. 星野羊一, 入江崇, 小田康祐, 福士雅也, 坂口剛正. センダイウイルス Cantell 株の増殖動態と IFN β 誘導の定量的解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
9. 小田康祐, 的場康幸, 川端涼子, 入江崇, 福士雅也, 坂口剛正. 自然免疫の抑制に関わるセンダイウイルス C タンパク質と宿主転写因子 STAT1 の構造生物学的解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
10. 桑田祥, 的場康幸, 小田康祐, 野田正文, 熊谷孝則, 杉山政則. ロイシルラストサイジン S を脱アミノアシル化する酵素の同定. 第 65 回日本生物工学会大会, 2013 年 9 月 18-20 日, ANA クラウンプラザホテル広島 (広島県・広島市)
11. 宇田成利, 的場康幸, 小田康祐, 熊谷孝則, 野田正文, 杉山政則. O-ウレイド-L-セリン合成酵素 DcsD の活性発現に重要なアミノ酸残基の特定. 第 65 回日本生物工学会大会, 2013 年 9 月 18-20 日, ANA クラウンプラザホテル広島 (広島県・広島市)
12. 宇田成利, 的場康幸, 小田康祐, 熊谷孝

則, 野田正文, 杉山政則. X線結晶構造に基づいた D-サイクロセリン合成酵素 DcsG の触媒機構の解明. 2013 年放線菌学会年会, 2013 年 9 月 5-6 日, メルパルク広島 (広島県・広島市)

13. 小田康祐, 川端涼子, 入江崇, 福土雅也, 坂口剛正. センダイウイルス C タンパク質と転写因子 STAT1 の相互作用の構造学的解析. 第 28 回中国四国ウイルス研究会, 2013 年 6 月 22-23 日, 広島大学医学部同窓会館「広仁会館」(広島県・広島市)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小田 康祐 (ODA KOSUKE)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
助教
研究者番号 : 60571255