

## 自然免疫の構造生物学

### Structural Biology of Innate Immunity

稲垣 冬彦 (Inagaki Fuyuhiko)

北海道大学・大学院薬学研究院・教授



#### 研究の概要

NADPH 酸化酵素の活性化に必須な細胞質因子 p47 のタンデム SH3 と膜因子 p22 のプロリンに富む配列との相互作用および PX ドメインによる p40 の膜への繋ぎ止めの制御機構を構造に基づいて明らかにした。また、I 型 IFN 産生系では、細胞質内ウイルスセンサー RIG-I の C 末端ドメインがウイルス特有の二重鎖 RNA を認識することを明らかにするとともに、NMR 法により構造を決定した。構造に基づき、ウイルス RNA を認識する機構を明らかにした。

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 薬学・生物系薬学

キーワード: 自然免疫、好中球活性酸素発生系、NADPH 酸化酵素、SH3 ドメイン、PX ドメイン、インターフェロン産生系、TLR、TIR、IRF-3、リン酸化、RIG-I

#### 1. 研究開始当初の背景・動機

体内に侵入した病原性微生物やウイルスを除去するため、生体は自然免疫という防御システムを生まれながらにして備えている。それらのうちのひとつは、侵入した微生物を貪食し、活性酸素を発生して殺菌するシステムであり、貪食細胞である好中球が代表例である。もうひとつは侵入した微生物やウイルスに特有な分子を認識するシステムであり、侵入を感知すると炎症性のサイトカインや I 型インターフェロンを産生し、病原性微生物やウイルスの侵入を阻止する。近年、自然免疫に関わる分子が同定され、外部刺激に対するシグナル応答として理解することが可能となった。

#### 2. 研究の目的

[1] NADPH 酸化酵素の細胞質サブユニットの相互作用を解明し、活性酸素発生系の分子機作を明らかにする。

[2] TLR および RIG-I 下流のシグナル伝達をとりあげ、I 型インターフェロン産生および炎症反応を誘起する分子機構を蛋白質の相互認識に基づいて解明する。

#### 3. 研究の方法

(1) 大腸菌、バキュロウィルスを用い、タンパク質の発現、精製を行う。

(2) 精製タンパク質について結晶化条件、あるいは溶液条件の検討を行う。

(3) 結晶構造解析、NMR 法によりタンパク質の構造を決定する。

(4) 構造を基盤に変異体を作製し、機能解析

を行う。

哺乳細胞、バキュロ培養のための安全キャビネット、無細胞蛋白合成系作製用マルチビーズジョッカー、タンパク質濃縮用冷却遠心器および結晶化プレート、安定同位体試薬を購入した。

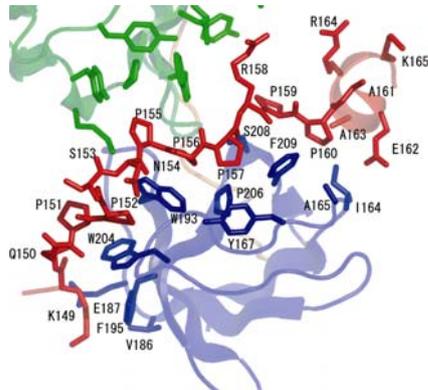
#### 4. これまでの成果

[1] 好中球活性酸素発生を担っている NADPH 酸化酵素は膜タンパク質フラボシクローム  $b_{558}$  および三者複合体を形成している p47、p67、p40 よりなる細胞質因子から構成される。貪食等のシグナルにより細胞質因子は膜へとリクルートされ、フラボシクローム  $b_{558}$  と相互作用を行い、活性酸素発生のスイッチをオンにする。本研究では膜因子へのリクルートを可能とする機構について構造生物学的研究を行った。

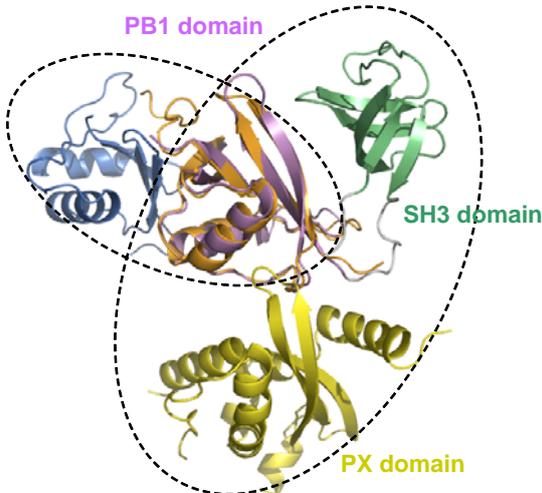
(1) p47 タンデム SH3 ドメインによる p22 のプロリンに富む領域の認識

NMR スペクトル解析より得られた p47 タンデム SH3 ドメインと p22 ペプチド複合体の溶液中での構造を下図に示す。ふたつの SH3 ドメインが、それぞれのリガンド認識部位を対向し、p22 結合部位を形成していた。p22 ペプチドは PP II 型ヘリックスを形成し、さらに C 末端側領域では  $\alpha$  ヘリックスを形成していた。それぞれの SH3 ドメインは芳香族残基およびプロリンから形成される疎水性ポケットを結合部位として用いた正則な PP II ヘリックスの認識を行っていた。このような認識により p47 は p22 を特異的に認識することが可能となる。Pro156 は、認

識のキーとなる残基であり、P156Q の変異は活性酸素発生源に欠陥のある慢性肉芽症患者に多くみられる。今回明らかにした相互作用は生理的に重要な相互作用と考えられる。



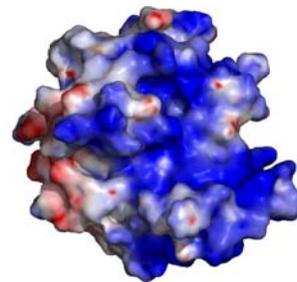
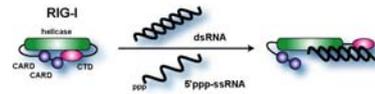
(2) PB1ドメインによるp40の膜移行制御  
p40はPX-SH3-PB1のドメイン構造を持つ。食糧シグナルにより活性化され、PXドメインがファゴソーム膜上のPI(3)Pと結合し、膜へリクルートされることが活性酸素発生に必要である。ファゴソームが成熟するまで活性酸素の発生は厳密に抑制されていることが必要であり、休止状態では、p40のPXドメインはPI(3)Pへの結合はできないと考えられる。今回、我々は



p40 全長の構造を X 線結晶構造解析により決定した。PX ドメインの PI(3)P 結合領域は PB1 ドメインとの相互作用により部分的に覆われていた。このため、膜に埋め込まれた PI(3)P とは結合できないが、食糧シグナルにより p40 が開構造を取ると初めて PI(3)P と結合が可能となることを明らかにした。また p67 と p40 の PB1 ドメイン同士の相互作用面は PB1-PX 相互作用面とは反対側に存在し、p47-p67-p40 三者複合体が細胞内で恒常的に構成されていることと対応する。

[2] インターフェロン産生系はウイルス感染に対する生体防御システムである。細胞内に侵

入したウイルス由来の二重鎖 RNA は RIG-I を介して認識される。RIG-I は N 末端側よりタンデム CARD およびヘリケースを有し、通常は閉構造を取っているが、RNA をヘリケースが認識することにより開構造をとり、下流の因子を活性化し、インターフェロン産生を亢進するといわれてきた。今回われわれは、ヘリケースよりさらに C 末端側に存在するドメインがウイルス由来の二重鎖 RNA の認識部位であることを明らかにし、NMR 法により構造を決定するとともに、RNA との相互作用面を同定した。これらの知見は抗ウイルス薬の開発に役立つものである。



5. これまでの進捗状況と今後の計画

- (1) gp91 細胞質領域と p67 との相互作用
- (2) p47(1-340)の溶液構造決定
- (3) TIR ドメインの構造決定
- (4) IRF-3 の活性化機構の解明

6. これまでの発表論文等

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

- 1) Takahasi K., Yoneyama M., Nishihori T., Hirai R., Kumeta H., Narita R., Gale M., **Inagaki F.**, Fujita T.: Nonself RNA-sensing Mechanism of RIG-I Helicase and Activation of Antiviral Immune Response. *Mol. Cell*, 29, 428-440, 2008.
- 2) Honbou K., Minakami R., Yuzawa S., Takeya R., Suzuki N.N., Kamakura S., Sumimoto H., **Inagaki F.**: Full-length p40phox structure suggests a basis for regulation mechanism of its membrane binding. *EMBO J.*, 26(4), 1176-86, 2007.
- 3) Ogura K., Nobuhisa I., Yuzawa S., Takeya R., Torikai S., Saikawa K., Sumimoto H., **Inagaki F.**: NMR Solution Structure of the Tandem Src Homology 3 Domains of p47phox Complexed with a p22phox-derived Proline-rich Peptide. *J. Biol. Chem.*, 281(6), 3660-3668, 2006.

ホームページ等

<http://protein.pharm.hokudai.ac.jp/>