

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成28年度研究進捗評価用〕

平成25年度採択分
平成28年3月17日現在

蛋白質相互作用におけるパターン認識の
モレキュラーダイナミクス
Dynamics of Molecular Pattern Recognition in
Protein Interaction

課題番号：25220205

浜窪 隆雄 (HAMAKUBO TAKAO)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授



研究の概要 自然免疫における液性パターン認識受容体であるペントラキシン3 (PTX3) と、RNAプロセッシングに関わるWTAP(Wilms' Tumor-1 associating protein)は複数の分子と相互作用をしている。PTX3はヒストンと凝集反応を起こして、血管内皮細胞を守る。WTAPは核スペckルにMALAT-1や複数の蛋白質と局在し、オルタナティブスプライシングに関わる。分子間相互作用を、抗体やMDシミュレーション等により解析し、分子認識機構を解明する。

研究分野：複合領域

キーワード：生物分子化学

1. 研究開始当初の背景

抗体による高感度ターゲットプロテオミクス法を開発し、転写調節におけるタンパク質複合体の同定と細胞機能における役割の解明を行ってきた。WTAPがmRNAの安定性を通して細胞周期を調節していることを報告し、多数の相互作用分子を同定した。また、同手法をPTX3に応用し、敗血症患者血中から複合体を調べ、新規にNETs (Neutrophil Extracellular Traps) 構成タンパク質群を同定し報告した。

2. 研究の目的

PTX3とWTAPの二つの分子について、複合体タンパク質あるいはRNAとの相互作用を解析し、分子認識のメカニズムについて解明する。特に、PTX3とヒストンとの相互作用が凝集反応であることを見出し、反応機構を分子レベルで解析する手法を見出す。WTAPについては、蛋白質およびRNAとの相互作用について解析し、敗血症やがんなど難治性疾患の新しい治療薬の開発につながることを目的とする。

3. 研究の方法

PTX3とヒストンについて、反応部位の同定を行い、相互作用を構造解析およびコンピュータシミュレーションにより動的な解析を試みる。WTAPについても相互作用する分子について、認識抗体の作製や構造解析およびコンピュータシミュレーションにより解析を行う。

4. これまでの成果

1) PTX3の分子認識機構と自然免疫血管内皮細胞保護作用について

敗血症血清から同定したNETs蛋白質のうち、ヒストンは細胞外に放出されて血管内皮細胞を障害し、多臓器不全の原因となることが報告されたことから、PTX3とヒストンの関連について、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)および敗血症モデルマウスを用いて検討を行った。結果、PTX3はin vitroでヒストンのHUVEC障害活性を中和し、in vivoで敗血症モデルマウスおよびヒストン投与マウスの死亡率を著しく低下させることがわかった。マウスモデルでは、PTX3の投与により、血管内皮細胞の変性が抑制され、微細膿瘍の改善が見られ、炎症が抑えられていた。ヒストンとの相互作用を分子レベルで解析したところ、強い凝集反応を起こしていることが判明した。また、同じペントラキシンファミリーのCRPは反応が弱く、PTX3のN端半分の領域に活性が強いことがわかった。これらの結果から、PTX3は敗血症の新規治療薬となると考えられ、サイエンスシグナリング誌に報告するとともにプレスリリースを行った(図1)。ヒストンとの相互作用について

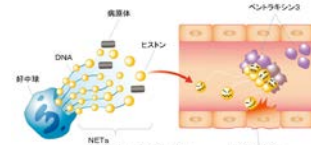


図1: PTX3はヒストンを凝集して、内皮細胞を傷害から守る。

PTX3は特にヒストンH3およびH4とCa⁺⁺存在下で強く凝集を起こすことがわかった。凝集には、ペントラキシンドメインの

ない PTX3 の N 端半分で十分であり、また HUVEC 障害保護活性と一致することがわかった。ヒストン H3 に対する抗体で、HUVEC 障害活性を阻害するものを取得したが、PTX3 との凝集反応は阻害しなかった。これに対して、PTX3 の抗体について、結合を阻害する可能性のある抗体が見つかった。PTX3 の N 端は天然変性部位であり、構造決定が難しく、またシミュレーションも困難である。そこで、これまでに開発した抗体ホモロジーモデリング法と抗原抗体反応シミュレーションを用いて、エピトープ部位の反応過程を解析している (図 2)。

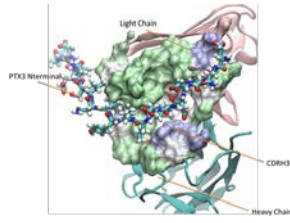


図2 PTX3天然変性部位ペプチドと抗体の結合MDシミュレーションの一例

2) RNA プロセッシングと細胞周期および細胞分化とのかかわり

WTAP と相互作用する分子の解析同定

WTAP および同定された複合体蛋白質に対するモノクローナル抗体を多数作製して、細胞周期に対する役割を解析し、non-coding RNA の MALAT-1 と核スペックルに局在してオルタナティブスプライシングに関与していることを JBC (2013 年) に報告した。

JBC に m⁶アデノシン RNA メチル化酵素との結合も報告したが、すぐ後に mRNA の安定性への関与が Nature (X Wang et al, 2014) に報告された。

また、WTAP が関与するオルタナティブスプライシングターゲット遺伝子についても、複数個を同定し、WTAP4 複合体と相互作用するマイクロ RNA も多数同定しており、これらの結果を現在論文投稿準備中である。

WTAP 阻害剤の探索

精製時の多量体形成などから、構造解析によるパターン認識解析に困難が予想されたため、まず大腸菌の部分長精製物等を用いて、相互作用解析により、阻害剤をスクリーニングすることとした。既存薬剤を付着させたプレートにて SPR を用いて結合をみたところ、数個の化合物がヒットし、その中から可能性の高い候補を選び、さらに合成や市販のライブラリーから候補をひろった。その結果、数個の化合物がマイクロモルオーダーの結合定数を示したため、これらのヒット化合物について、細胞での効果をスプライシングおよび細胞周期を指標として評価を行っている。

5. 今後の計画

1) PTX3 の分子認識機構と自然免疫

PTX3 関連の疾患について、複合体探索を行うとともに、ヒストンとの凝集反応について、さらに相互作用部位を絞り込み、MD シミュレーションを行い、反応面の解析を行う。ヒストン抗体の取得、抗体による反応解析法の開発も引き続き行い、低分子化合物による、細胞外ヒストン傷害の阻害剤のスクリーニング法を開発する。

2) RNA プロセッシングと細胞周期および細胞分化とのかかわり

結合アッセイでヒット化合物を取得している阻害剤の探索に集中して、タンパクレベル、細胞レベルでのアッセイ系のたちあげを行う。有効な阻害剤について、結合阻害のサイトを特定し、相手分子との結合様式の解析を行う。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Daigo K, Nakakido M, Ohashi R, Fukuda R, Matsubara K, Minami T, Yamaguchi N, Inoue K, Jiang S, Naito M, Tsumoto K, Hamakubo T. Protective effect of the long pentraxin PTX3 against histone-mediated endothelial cell cytotoxicity in sepsis. *Sci Signal*. 7(343):ra88., 2014.
2. Hamakubo T, Kusano-Arai O, Iwanari H. Generation of antibodies against membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1844(11):1920-1924, 2014.
3. Horiuchi K, Kawamura T, Iwanari H, Ohashi R, Naito M, Kodama T, Hamakubo T. Identification of Wilms' tumor 1-associated protein complex and its role in alternative splicing and the cell cycle. *J Biol Chem*. 288(46):33292-302, 2013.
4. Nakayama T, Mizohata E, Yamashita T, Nagatoishi S, Nakakido M, Iwanari H, Mochizuki Y, Kado Y, Yokota Y, Satoh R, Tsumoto K, Fujitani H, Kodama T, Hamakubo T, Inoue T. Structural features of interfacial tyrosine residue in ROBO1 fibronectin domain-antibody complex: Crystallographic, thermodynamic, and molecular dynamic analyses. *Protein Science*. 24(3):328-40, 2015.
5. 敗血症におけるパターン認識受容体 PTX3 の役割 太期健二・浜窪隆雄 「炎症と免疫」 vol. 23, no. 5, 66(444)~71(449), 2015 年

ホームページ等

<http://qbm.rcast.u-tokyo.ac.jp>

hamakubo@qbm.rcast.u-tokyo.ac.jp