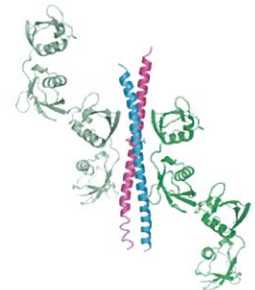


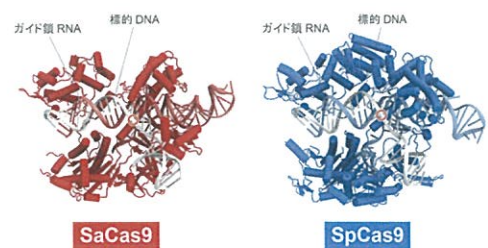
平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 研究開発領域：炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出
2. 研究開発課題名：慢性炎症による疾患発症機構の構造基盤
3. 研究開発代表者： 濡木 理
4. 研究開発の成果

本チームは、構造生物学グループ、脂質炎症グループ、自然炎症グループから構成される。炎症応答では、脂質メディエーターとともに炎症性サイトカインなどタンパク質メディエーターが重要な制御機能を司る。脂質炎症グループは、新規リゾリン脂質性のメディエーターであるリゾホスファチジルセリン (LysoPS) をリガンドとする GPCR を同定し、LPS₁/GPR34、LPS₂/P2Y10、LPS₃/GPR174、LPS_{2L} と命名した。解析の結果、(1) LysoPS は通常の状態では個体中でほとんど検出されないが、炎症反応でそのレベルが急激に上昇すること、(2) LysoPS 受容体はミクログリア・単球系 (LPS₁) と T・B リンパ球 (LPS₂、LPS₃、LPS_{2L}) に限局して発現し、G $\alpha_{12/13}$ と共役することを見いだした。T 細胞特異的な G $\alpha_{12/13}$ ダブル KO マウスの解析から、LysoPS および LPS₂、LPS₃、LPS_{2L} は、G $\alpha_{12/13}$ を介して T 細胞の接着性、増殖性を抑制する、すなわち免疫機能を抑制することが示唆された。さらに、LPS₂、LPS₃、LPS_{2L} ダブル・トリプル KO マウスを作製し解析することで、LPS₂、LPS_{2L} が抗体産生に抑制的に寄与していることを見出した。構造生物学グループは、これと呼応して、ヒト LPS₂ に関して、HEK293 細胞を用いた大量調製系を確立し、結晶化を進めている。小野薬品との共同研究で、アンタゴニストのスクリーニングを推進しており、複合体の構造解析を進める。また、脂質メディエーターである LPA を産生するオートタキシン (ATX) の阻害剤を立体構造に基づき設計・改良を行い、大手製薬会社と共同開発を進める一方で、肺線維症に著効を示すアプタマーと ATX の複合体構造に基づき、その阻害機構を解明し、核酸医薬を創出した。また LPA₆ 受容体に関しては、3.3 Å 分解能での構造解析に成功し、LPA の取り込みに関する新規の機構を明らかにした。自然炎症グループは、TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインや病原体に特徴的な分子パターンにより活性化される、炎症シグナルに中心的な役割を果たす NF- κ B タンパク質に着目した研究を推進した。NF- κ B 経路活性化には、時空間特異的かつ多様なポリユビキチン鎖生成が関わる。徳永グループは、濡木グループとともに、直鎖状ユビキチン結合性 UBAN ドメインを含有する多機能性タンパク質 optineurin (OPTN) の結晶構造を 1.5 Å 分解能で決定し、構造に基づいて、直鎖状ユビキチン鎖との結合の分子基盤を解明するとともに、CRISPR/Cas9 法によって作製したノックアウト細胞を用いて NF- κ B 活性や細胞死への影響を解析し、OPTN 遺伝子を欠損した細胞では NF- κ B 活性やアポトーシスが亢進すること、ALS 患者由来の運動ニューロンでは TDP43 陽性の細胞質凝集体に直鎖状ユビキチンや活性型 NF- κ B が蓄積し、アポトーシスが亢進することを見いだした。また、濡木グループは、DNA および cyclic dinucleotides (CDNs) を認識して ER 上に存在する受容体 STING 依存的な経路を活性化し、I 型インターフェロンの産生に関与する、DDX41 の結晶構造を、分解能 1.5 Å で決定した。生化学的解析の結果、DDX41 は同じ部位で DNA と CND に結合し、この結合部位は ATP 結合部位とは異なることを明らかにした。さらに、複数の DDX41 の構造を解明し、ATP 結合部位が変化することで、ATP の解離を早め、シグナル伝達の回転を早めていることを示唆した。徳永グループの細胞生物学解析により、DNA、CND 感知に重要な残基とインターフェロン産生経路や NF- κ B 活性化との相関を明らかにした。近年、多くの慢性炎症の原因が遺伝子の変異であることが明らかになって来ているが、これを根本から治療するために、構造生物学グループはゲノム編集ツール開発のプロジェクトを開始した。そして、次世代ゲノム編集ツールとして脚光を浴びている CRISPR の 1 つである Cas9 に関して、PAM 認識の異なる 2 種類の異なる生物種由来の Cas9 とガイド RNA、2 本鎖ターゲット DNA の 4 者複合体の高分解能構造解析にも成功し、PAM 認識機構の共通原理を解明し、PAM 認識改変体の作成に成功した。今後、立体構造に基づいてゲノム編集ツールを改善して行くことで、慢性炎症疾患遺伝子を含む、遺伝子疾患の治療に大きく貢献することが期待される。



OPTN とテトラユビキチンの複合体の結晶構造



Cas9 複合体の構造