

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 生体防御におけるたんぱく質間相互作用と機能発現機構の解析

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者： 藤田 禎三(福島県立医科大学医学部 教授)

主たる共同研究者：

若宮 伸隆(旭川医科大学大学院医学系研究科 教授) (平成15年11月～)

黒木 由夫(札幌医科大学医学部 教授) (平成15年11月～)

住本 英樹(九州大学大学院医学研究院 教授) (平成15年11月～)

神田 大輔(九州大学生体防御医学研究所 教授) (平成15年11月～)

伊藤 隆司(東京大学大学院新領域創成科学研究科 教授) (平成15年11月～)

3. 研究内容及び成果：

＜藤田G分＞

生体防御反応は自然免疫と獲得免疫から成り立っており、獲得免疫が抗体による認識とその記憶を特徴とするのに対し、自然免疫は感染微生物などの表面に保存された分子パターンを認識することに基づいている。このパターン認識による免疫監視機構の一つとして、コラーゲン様構造を内部に有するレクチンであるコレクチンが存在する。コレクチンは、微生物表層成分を直接認識する真のパターン認識分子であり、肺表面活性物質アポタンパク A (SP-A)、SP-D などの分泌型レクチンや膜型コレクチンを含む。これらレクチンの構造と非自己認識機構と引き続き起こる非自己排除までの応答反応は、タンパク質間の一連の相互作用によって進行すると考えられ、その機構と生理的意義の解明は本研究の中心課題である。最終的には、その低下や破綻によって生じる疾患、たとえば感染症や自己免疫疾患などの予防と治療に役立てることが目標である。

本研究には、補体レクチン経路を発見した研究者代表者の藤田、新規膜型コレクチンを発見した若宮、コレクチンと Toll 様受容体との関連を研究する黒木の3人が参画し、生体防御に関するたんぱく質の相互作用に関して、独創性の高い研究成果を得ることができた。

藤田グループは、補体レクチン経路を研究対象として、その分子構成、作用機序および役割を解明してきた。この経路は、認識分子である MBL と Ficolin、三種類のセリンプロテアーゼ MASP (MASP-1, MASP-2, MASP-3) および sMAP (MASP-2 短縮型タンパク) からなる複合体を中心とする経路である。認識分子による非自己の認識に伴って MASP が活性化され、活性型 MASP が補体 C4, C2, C3 を限定加水分解して補体系を活性化する。本研究ではレクチン経路のキー酵素である MASP を欠損させ、補体レクチン経路を遮断した時に生じる表現型を解析することによって、この経路の役割を明らかにしてきた。三種類の MASP 欠損マウス (MASP-1/3 欠損、MASP-2/sMAP 欠損および MASP-null マウス) を作成してその表現型を解析した結果、MASP-2/sMAP 欠損＜MASP-1/3 欠損＜MASP-null マウスの順で補体レクチン経路が低下しており、MASP-null では活性がほぼ消失していること、リコンビナント MASP の補充によって回復することが判明した。細菌やウイルス感染に対しては、MASP-null マウスで明確な易感染性が認められ、補体レクチン経路が感染防御に深く関与することが明らかになった。ま

た、MASP-1 は MASP-2 の活性化に関与するとともに、補体第二経路の活性化にも大きく関与していることが判明した。MASP-1/3 欠損マウスでは補体第二経路の因子である D 因子が未活性型であり、リコンビナント MASP-1 が D 因子を活性型に転換することが *in vitro* で明らかになった。これまで、補体第二経路は細菌などの異物表面上で自然に活性化され、古典的経路やレクチン経路の増幅経路と考えられてきたが、その概念を根本から見直す結果となった。さらに、sMAP は、MBL との結合において MASP と競合し、結果として補体レクチン経路を阻害することが判明し、この経路の制御因子である可能性が示された。

更に、レクチン経路の第二の認識分子として見いだした **Ficolin** については、血清型 **Ficolin A** と非血清型 **Ficolin B** の両者について欠損マウスを作製し、その生理的役割を明らかにした。血清型 **Ficolin** は、MBL 同様、補体レクチン経路を介して生体防御に働くことが示された。**Ficolin** の異物認識機構については、共同研究により、ヒト **Ficolin** のフィブリノーゲン様ドメインのリコンビナント蛋白と糖リガンドとの複合体を作製し X 線結晶回析を行ない、三種類のヒト **Ficolin** の立体構造とリガンド認識部位を明らかにした。

若宮グループは、膜型コレクチン **CL-P1** の機能を明らかにした。まず、**CL-P1** の細胞内領域に結合するタンパク質を発見し、それらの異物取り込みに関わる機構を明らかにするとともに、異物認識、結合に関わる **CL-P1** 各ドメイン機能を明らかにした。ついで、血管内皮細胞に発現する **CL-P1** は酵母ファゴサイトーシスに関与し、虚血、再灌流刺激により、その発現が亢進することを明らかにした。ゼブラフィッシュ **CL-P1** 遺伝子 (**zCL-P1**) を同定し、遺伝子ノックダウン実験により **zCL-P1** が、発生初期の血管新生形成や形態形成に関与することを明らかにした。

黒木グループは、生体防御に関わる蛋白質として、分泌型コレクチンの肺サーファクタント蛋白質 **A(SP-A)** および **D(SP-D)** とマンノース結合レクチン(**MBL**)、および、**Toll** 様受容体(**TLR**)とその関連蛋白質について、その構造と機能発現の機構を明らかにした。特に、肺コレクチンの **SP-A** と **SP-D** は、マクロファージ貪食受容体の細胞膜局在を増加させて細菌貪食を促進することによって、感染防御に機能している。また、肺コレクチンは、*Leginella pneumophila* の細胞内増殖を抑制する。更に、**TLR4** の構造と機能発現の機構の解明を行った結果、**TLR4** の N 端側 **Glu²⁴-Lys⁴⁷** 領域が **MD-2** との結合に必須であることを明らかにし、**TLR4** は、単独では **LPS** に結合しないが、**MD-2** と複合体を形成してはじめて **LPS** 結合性を獲得し、**LPS** 惹起シグナルを伝達できることを示した。このような可溶性の複合体は、**LPS** 結合性に対して野生型 **TLR4-MD-2** 複合体と競合するので、**LPS** 惹起炎症反応の抑制効果を有することが示され、臨床応用の可能性が示された。

<住本G分>

好中球などの食細胞は、病原性の微生物に対する防御において第1線で働く細胞であり、微生物を貪食(食作用;ファゴサイトーシス)し、その時形成される食胞(ファゴゾーム)中で殺菌を行う。この過程で活性酸素が重要な役割を果たす。活性酸素生成は食細胞 **NADPH** オキシダーゼが担うが、この酵素は **gp91^{phox}**(別名 **Nox2**)と呼ばれている。本研究は、「食細胞 **NADPH** オキシダーゼの活性化機構」について、特に『オキシダーゼの活性化とファゴサイトーシスをカップリングさせる機構、およびその調節機構』を細胞レベル・分子レベルで、更には原子レベルで明ら

かにしようというものである。また、本研究のもう1つの課題は、「食細胞以外の活性酸素生成型 NADPH オキシダーゼ (Nox1, Nox3, Nox4 等) の調節機構」を解明することである。

膜結合型の酵素である食細胞 NADPH オキシダーゼ (gp91^{phox}/Nox2:p22^{phox}と膜上でヘテロ2量体を形成している)は、細胞休止時には不活性型であるが、微生物等の食食時にファゴゾーム膜上で活性化されスーパーオキシド(O₂[•])を生成するようになる。O₂[•]それ自身の殺菌能は余り強くないが、O₂[•]に由来する種々の活性酸素(特に OH[•]や HOCl 等)が強力な殺菌剤として働くことになる。一方、不適切な活性酸素生成は組織傷害の原因となるので、オキシダーゼの活性化は厳密に制御されなければならない。実際にオキシダーゼは細胞休止時には不活性型で全く O₂[•]を生成しない。食細胞 NADPH オキシダーゼが活性化されるためには、細胞休止時には細胞質に存在する種々のオキシダーゼ活性化タンパク質 (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}, および低分子量タンパク質 Rac)が必要である。そこで、これらの活性化タンパク質はどのようにして膜に移行して膜結合型の酵素本体と相互作用するのかについて、本研究では、特に、『食細胞 NADPH オキシダーゼの活性化とファゴサイトーシスをカップリングさせる機構』に注目し、細胞質に存在するオキシダーゼ活性化タンパク質の食胞膜への移行におけるメカニズムの解明を、細胞レベル・分子レベルで、更には原子レベルで目指した。

5年の期間に、p40^{phox}の全長型の結晶構造、p47^{phox}の2つの SH3ドメインと p22^{phox} ペプチドの複合体の NMR 構造、休止型 p47^{phox}の結晶構造、などの3次構造の決定に成功するとともに、「細胞質オキシダーゼ活性化タンパク質のダイナミックなコンフォメーション変化」および「膜リン脂質のダイナミックな組成変化」に伴い、種々のタンパク質-タンパク質相互作用およびタンパク質-脂質相互作用のスイッチが ON/OFF されるメカニズムについて、分子レベルおよび原子レベルでの理解を深めた。

p47^{phox}に関して言えば、「プロリン・リッチ領域 (PRR) を介した p67^{phox}との『恒常的な』相互作用」に加えて、「PX ドメインを介した膜リン脂質 (PIPs, ホスホイノシチド; PS, ホスファチジルセリン; など)との相互作用」と「2つの SH3ドメイン (bis-SH3ドメイン) を介した p22^{phox}との相互作用」がファゴサイトーシス時に誘導されるが、その詳細な調節機構を明らかにした。bis-SH3ドメインは、標的である p22^{phox}をサンドイッチして協同的に結合するという「全く新しい認識機構」によることを示した。ここでの詳細な結合実験には、多数の変異体タンパク質を作製し、種々の機器分析を駆使して行ったが、これは主として神田グループにより行われた。また、ファゴゾーム膜に移行した p47^{phox}は、bis-SH3 より N 末にある進化的に保存された領域によって gp91^{phox}を活性化することを示した。

また、p67^{phox}については、2つの恒常的な相互作用、すなわち、「C 末 SH3ドメインを介した p47^{phox}との相互作用」と「PB1ドメインを介した p40^{phox}との相互作用」に加えて、ファゴサイトーシス時には「GTP 結合型の Rac との相互作用」が誘導される。そして最終的には activation domain (AD) が働いて gp91^{phox}を活性化することを明らかにした。一方、p40^{phox}は、PXドメインを用いてホスファチジルイノシトール-3-リン酸 (PI(3)P: ファゴゾーム膜に豊富に存在)と相互作用し、それがファゴゾームへの移行に必須であることを示した。さらに、この PI(3)P との相互作用が、p40^{phox}の PB1ドメインとの分子内結合により制御されていることを明らかにした。p67^{phox}と p40^{phox}のファゴゾーム膜への targeting において「p67^{phox}と p40^{phox}の相互作用」の役割を明らかにする際、部分的あるいは完全に抑制されているが、protein integrity は損なわれていない種々の変異型タンパク質の作製が決定的であり、これは伊藤グループにより行われた。

本研究のもう1つの課題である「食細胞以外に存在する活性酸素生成型 NADPH オキシダーゼの調節機構の解明」については、まず、Nox1、Nox3、および Nox4 の細胞レベルでの再構成系を確立することに成功した。この再構成系を用いて、(1) Nox1 の活性化には、Noxo1 (p47^{phox} のホモログ) や Noxa1 (p67^{phox} のホモログ) に加えて、Rac が重要な役割を果たすこと、(2) Nox3 も p22^{phox} と複合体を形成しており、その活性化には p47^{phox}、p67^{phox}、Noxo1 や Rac などが関与しうること、一方、(3) Nox4 は細胞内にのみ存在し(細胞膜には target されない)、やはり p22^{phox} と複合体を形成するが、Nox1~Nox3 の活性化に関与する細胞質タンパク質によっては調節されないこと、等々を明らかにした。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況
＜藤田G分＞

74 編(国際 71、国内 3)の論文発表、16 回の国際学会での口頭発表、29 回の国内学会での口頭発表があり、成果発表は申し分がない。論文の多くは、国際的な一流学術誌に発表されている。また、6 件の特許申請がなされている。(平成 21 年 1 月 1 日現在)

＜住本G分＞

英文原著論文101編および英文総説論文11編を発表し、また学会・シンポジウムにおいて58回の口頭発表(29回の招待講演を含む)を行なった。

1) Sumimoto, H., Kamakura, S., and Ito, T. Structure and function of the PB1 domain, a protein interaction module conserved in animals, fungi, amoebas, and plants. **Science STKE** 2007, re6, 2007. PB1ドメインは、私達が見いだした新規なタンパク質-タンパク質相互作用を担うmodular domainである。最初にp67^{phox}や出芽酵母の極性タンパク質 Bem1 に認めたので、phoxとBemの頭文字をとってPB1ドメインと命名した。本研究の過程で、p40^{phox}の分子内相互作用にも働くことが明らかとなり、PB1ドメインの世界も広がった。Science誌電子版のSTKE欄に総説を書くように依頼を受け、PB1ドメインについて総括を行った。

2) Takeya, R., Taniguchi, K., Narumiya, S., Sumimoto, H. The mammalian formin FHOD1 is activated through phosphorylation by ROCK and mediates thrombin-induced stress fibre formation in endothelial cells. **EMBO J.** 27, 618-628. 2008. p67^{phox} の N 末側 SH3 ドメインの標的タンパク質の候補として、two-hybrid による cDNA screening により得られたタンパク質が FHOD1 である。FHOD1 は、p67^{phox} の標的タンパク質ではなかったが、分子内結合により負に制御されており、タンパク質キナーゼ ROCK によりリン酸化されると分子内結合が切断され「活性型」になることを示した。さらに、血管内皮細胞をトロンビンで刺激した時に形成されるストレスファイバー形成に「ROCK→FHOD1→アクチン重合」という経路が働くことを明らかにした。

3) Sumimoto, H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. **FEBS J.** 275, 3249-3277. 2008. 本研究の成果をふんだんに盛り込み、3次構造、調節機構、さらには進化の観点からみたNADPHオキシダーゼについて英文総説を発表した。

4) Hideki Sumimoto. Molecular composition and regulation of Nox1-3. **Gordon**

Research Conferences on Nox-Family NADPH Oxidases, Les Diablerets, the Switzerland. 10/16–10/20, 2006. Gordon カンファレンスの招待講演者として、住本が、本研究の成果を発表した。

このように杉本グループから、多くの質の高い論文が発表され、成果の発信に関しては申し分ない。基礎研究であり、特許の取得は難しく致しかたないが、今後に期待できる成果が出ている。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

<藤田G分>

本研究は、自然免疫に関与する生体防御レクチンの機能に関して実施された。上述のように、レクチンは異物表面の糖鎖を特異的な分子基盤に基づいて認識し、その後 MBL と Ficolin はプロテアーゼ MASP との複合体形成により、肺コレクチンは Toll 様受容体・MD-2 との結合により、また膜型レクチン CL-P1 はアダプチン分子との相互作用により、それぞれの機能を発揮することが判明した。本研究は、自然免疫においてレクチンが特異的で多様な分子基盤の上で働いていることを明らかにするとともに、生体防御をはじめとする生体反応に重要な役割を担っていることを示した。特に補体レクチン経路の役割に関しては、独自性に富み、免疫学の教科書の書き換えを迫るインパクトの高いものである。また、膜型コレクチンの機能と構造の解明に関しても、きっちりと成果が出されており、今後、動脈硬化症等の臨床課題との関連性を解明する基礎的研究として期待される。更に、肺コレクチンの機能に関しては、最も臨床応用が期待される部分である。これらの研究成果は、今後ますます重要になる自然免疫の分野であり、地味な基礎研究の分野ではあるが、発展の余地が十分ある。更に、疾患の治療・予防への応用に向けた進展も期待される。

<住本G分>

細胞質中の NADP オキシダーゼ活性化タンパク質 (p47、p67、p40) のそれぞれについて、それら同士および食胞膜タンパク質 (gp91、p22、PIPs/PS、PI(3)P) との相互作用が解析された。質・量とも研究成果は、高く評価ができる。食胞膜上で形成される活性型の NADPH オキシダーゼ複合体の形成機構については、素晴らしい成果でありインパクトの高い研究である。機能研究と構造研究の連携によって深まりのある研究がなされている点も高く評価される。

食細胞 NADPH オキシダーゼの活性化メカニズムの詳細が明らかになれば、ファゴサイトーシスの機構さらには感染防御の機構の理解が大きく進むと考えられる。また、炎症（炎症では食細胞 NADPH オキシダーゼが不必要に活性化されていると考えられている）あるいはアルツハイマー病やパーキンソン病などの種々の神経変性疾患（食細胞 NADPH オキシダーゼによって生成される活性酸素が、種々の神経変性疾患の増悪に関与することが知られている）など、活性酸素が関与する多様な病態を理解する上で、重要な貢献をすることが期待される。また、NADPH オキシダーゼに関する研究の1つのネックは、特異的な阻害剤が存在しないことである。本研究でなされた3次構造の解析（原子レベルの解析）は、NADPH オキシダーゼ阻害剤の開発などにも役立つであろう。それは、引いては、創薬にもつながると考えられる。

4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

藤田グループおよび住本グループともに、特になし。

以上