

福井 宣規

九州大学生体防御医学研究所・教授

細胞骨格制御シグナルを標的とした免疫難病治療の新戦略

§1. 研究実施体制

(1)「機能・シグナル解析」グループ

① 研究代表者：福井 宣規（九州大学生体防御医学研究所、教授）

② 研究項目

- ・CDM ファミリー分子の機能とシグナル伝達機構の解明

(2)「構造解析」グループ

① 主たる共同研究者：横山 茂之（理化学研究所生命分子システム基盤研究領域、領域長）

② 研究項目

- ・CDM ファミリー分子群の構造解析

(3)「創薬研究」グループ

① 主たる共同研究者：俵 修一（アステラス製薬(株) 研究本部、海外研究担当）

② 研究項目

- ・CDM ファミリー分子のシグナル伝達を阻害する低分子化合物の探索

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

1. DOCK2は、リンパ球や形質細胞様樹状細胞の遊走・活性化に重要な Rac 活性化分子である。DOCK2 の発現は免疫細胞に限局しており、その欠損によりアロ移植心臓の長期生着が可能になり、自己免疫性モデルマウスの疾患発症を完全にブロックできる。それ故、DOCK2 は免疫難病を治療あるいは予防するための分子標的になると期待される。DOCK2 は、DOCK ファミリータンパク質に特有の DHR-2 ドメイン (DOCK homology region 2 domain) を持ち、このドメインを介して Rac と会合し、GTP-GDP 交換反応を触媒する。このため、DOCK2 シグナルをブロックする上で、DHR-2 と Rac の相互作用は最も重要なターゲットであると考えられる。「機能・シグナル解析」グループでは、この相互作用を対象にした化合物スクリーニングの結果、DHR-2 ドメインに特異的且つ可逆的に結合し、Rac に対する GEF 活性を IC₅₀ 値 20-25 μM で抑制する化合物として、CPYPP を同定した。HEK293T 細胞を CPYPP で処理すると、DOCK2 による Rac 活性化が抑制されるが、Tiam1 や TRIO といった古典的 GEF による Rac の活性化には影響を与えなかった。このことから、CPYPP は選択性のある、cell-active な化合物であることが示された。CPYPP をリンパ球に加えても、細胞の viability には影響を与えない。しかしながら、リンパ球を CPYPP で処理することで、ケモカイン受容体や抗原受容体を介した Rac 活性化がブロックされ、その結果遊走応答や増殖応答が顕著に抑制された。また、DOCK2 欠損の場合と同様に、形質細胞様樹状細胞を CPYPP で処理することで、TLR9 を介した I 型インターフェロンの産生が選択的に抑制された。以上より、DOCK2 を介した炎症応答を化合物を使って抑制できることを初めて実証した¹⁾。
2. 樹状細胞は、抗原に暴露されると輸入リンパ管を介してリンパ節に移動し、T 細胞に抗原を提示することで免疫応答を惹起する。樹状細胞は、三次元微小環境下では、二次元環境と異なり、インテグリン非依存的に細胞外マトリックスの隙間を形を変えながら進んでいくが、このアメーバ様運動を制御するシグナル伝達機構やスペースを感知するメカニズムは明らかではない。「機能・シグナル解析」グループでは、ヒト免疫不全症の責任分子として近年注目を集めている DOCK8 の機能を、ノックアウトマウスを作製することで解析した。その結果、DOCK8 欠損樹状細胞ではリンパ節へのホーミングが障害されており、T 細胞を効率よく活性化できないことを見いだした。DOCK8 欠損樹状細胞は二次元環境では正常に運動できるにも関わらず、三次元微小環境下での運動が顕著に障害されていた。DOCK8 は Cdc42 特異的な GEF として機能しており、「構造解析グループ」と連携して、その複合体の構造決定にも成功した。さらに、FRET を用いた解析から、DOCK8 の動作原理の一端を解明することに成功した²⁾。
3. DOCK2 は、DHR-2 ドメインを介して Rac を活性化するが、細胞内で効率よく Rac を活性化

するには ELMO1 が必要である。しかしながら、なぜ ELMO1 がないと DOCK2 が細胞の中で働くことができないかは不明であった。「構造解析グループ」では、DOCK2 の N 末端と ELMO1 の C 末端の複合体の構造決定に成功し、DOCK2 が SH3ドメインとアルファヘリックスを介して、ELMO とタイトに結合していることを見いだした。この構造情報に基づき、「機能・シグナル解析」グループで変異体を用いた機能解析を行い、DOCK2 と ELMO1 は単体ではそれぞれ折り畳まれた状態で機能を自己抑制しているが、複合体を形成することで折り畳み状態を解いて互いの自己抑制を解除していることを示唆する結果を得た。以上より、構造解析と機能解析の連携により、ELMO1 の動作原理の一端を解明することに成功した³⁾。

4. インフラマソームの構成分子である ASC の欠損によりリンパ球の遊走や活性化が障害されることが知られている。「機能・シグナル解析」グループでは、米国の研究者と連携して、ASC が DOCK2 の発現を制御することで、リンパ球機能に影響を与えている可能性を示した⁴⁾。
5. 「構造解析グループ」では、DOCK180/ELMO1/Rac1 三者複合体の結晶構造解析に向けて、試料調製条件の改良を行なった。その結果、ELMO1 および Rac1 を含んだ三者複合体の結晶化、さらにはX線回折データの取得が可能となり、DOCK180 の各機能ドメイン (ELMO1 結合領域、ARMドメイン、DHR2ドメイン)の空間的配置を決定した。
6. 「創薬研究グループ」では、ハイスループットスクリーニング (HTS) 及びネガティブスクリーニング (DOCK2 非依存的な Rac 活性化に対する阻害活性評価)により得られた初期段階のヒット化合物 (322 個)を元に、2種類の骨格の異なる化合物群を見い出している。そこで、それらの骨格をベースにした新規類縁化合物の合成展開と、in vitro 評価 (GEFアッセイ及び免疫細胞機能に対する各種アッセイ)を開始した。また最近得られた「DOCK2 DHR-2 と Rac1」及び「DOCK2 N 端領域と ELMO1」の共結晶構造の情報を基に、in silico で相互作用をブロックする化合物の探索を開始した。また、構造情報を基にタンパク質—タンパク質結合阻害を志向した化合物ライブラリー (初期セット約 600 個)を作製し、それら化合物の in vitro スクリーニング (GEF アッセイ)を進めている。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Hanawa-Suetsugu K, Kukimoto-Niino M, Mishima-Tsumagari C, Akasaka R, Ohsawa N, Sekine S, Ito T, Tochio N, Koshiba S, Kigawa T, Terada T, Shirouzu M,

- Nishikimi A, Uruno T, Katakai T, Kinashi T, Kohda D, Fukui Y, Yokoyama S: Structural basis for mutual relief of the Rac guanine nucleotide exchange factor DOCK2 and its partner ELMO1 from their autoinhibited forms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 109:3305-3310, 2012 (DOI: 10.1073/pnas.113512109)
2. Ippagunta SK, Subbarao Malireddi RK, Shaw PJ, Neal GA, Walle LV, Green DR, Fukui Y, Lamkanfi M, Kanneganti T-D: The inflammasome adaptor ASC regulates the function of adaptive immune cells by controlling Dock2-mediated Rac activation and actin polymerization. **Nature Immunol.**, 12:1010-1018, 2011 (DOI: 10.1038/ni.2095)
3. Nishikimi A, Uruno T, Duan X, Cao Q, Okamura Y, Saitoh T, Saito N, Sakaoka S, Du Y, Suenaga A, Kukimoto-Niino M, Miyano K, Gotoh K, Okabe T, Sanematsu F, Tanaka Y, Sumimoto H, Honma T, Yokoyama S, Nagano T, Kohda D, Kanai M, Fukui Y: Blockade of inflammatory responses by a small-molecule inhibitor of the Rac activator DOCK2. **Chem. Biol.** 2012 (in press) (doi:10.1016/j.chembiol.2012.03.008)
4. Harada Y, Tanaka Y, Terasawa M, Pieczyk M, Habiro K, Katakai T, Hanawa-Suetsugu K, Kukimoto-Niino M, Nishizaki T, Shirouzu M, Duan X, Uruno T, Nishikimi A, Sanematsu F, Yokoyama S, Stein JV, Kinashi T, Fukui Y: DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses. **Blood**, 2012 (in press) (doi:10.1182/blood-2012-01-407098)

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)