

「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」  
平成 23 年度採択研究代表者

H25 年度  
実績報告

濡木 理

東京大学大学院理学系研究科  
教授

慢性炎症による疾患発症機構の構造基盤

## § 1. 研究実施体制

### (1) 「構造生物学」グループ

① 研究代表者: 濡木 理 (東京大学大学院理学系研究科 教授)

② 研究項目

- ・ 慢性炎症による疾患発症機構の構造基盤の解明

### (2) 「脂質炎症」グループ

① 主たる共同研究者: 青木 淳賢 (東北大学大学院薬学研究科 教授)

② 研究項目

- ・ 脂質メディエーターによる慢性炎症惹起機構の解明

### (3) 「自然炎症」グループ

① 主たる共同研究者: 徳永 文稔 (群馬大学生体調節研究所 教授)

② 研究項目

- ・ 脱ユビキチン化酵素による NF- $\kappa$ B 制御の分子基盤

## § 2. 研究実施の概要

### (1) 脂質メディエーターによる慢性炎症惹起機構の解明

本年度は慢性炎症でそのレベルが上昇することが知られているリゾホスファチジン酸(LPA)の受容体を介した機能解析を行った。LPA 受容体の一つ LPA<sub>6</sub> のノックアウトマウスでは、数少なく堅牢な血管が形成されており、結果として LPA<sub>6</sub> ノックアウトマウスではがんの増殖や虚血後の血液の再還流が促進されていたことを明らかにした。

### (2) 脂質代謝物による慢性炎症の制御

ホスファチジルコリンの代謝物であり、脂肪肝やアルツハイマー病の進行を抑制することが想定されているグリセロホスホコリン( $\alpha$  GPC)は細胞外のエクト型酵素 NPP6 により分解されることで、コリンが NPP6 発現細胞に取り込まれることを明らかにした。また、NPP6 ノックアウトマウスにおける GPC の代謝を解析し、新たな GPC,  $\alpha$  GPC を同定した。 $\alpha$  GPC は従来の  $\alpha$  GPC と比較し顕著に安定であることがわかり、コリンを脳内に運ぶための有用なコリン供与体となりうることが示された。

自然炎症グループは、NF- $\kappa$ B(エヌエフ-カッパー-ビー)という、炎症応答や免疫制御において中枢的な役割を果たすタンパク質を中心に研究を行っている。NF- $\kappa$ B は、炎症や免疫に関与する 500 種を超える遺伝子の発現を指揮する重要なタンパク質で、このタンパク質が正常に働かない場合は、癌、関節リウマチなどの自己免疫疾患、糖尿病などの生活習慣病を引き起こす。NF- $\kappa$ B は外界からの刺激に応答して、いくつかのステップを経て遺伝子の発現を可能にしている。この NF- $\kappa$ B の活性化経路には、ユビキチンという小さなタンパク質が一時的に結合することが必要である。私たちは、「直鎖状ユビキチン鎖」という特殊な連結様式で数珠状に繋がったユビキチンが NF- $\kappa$ B 制御を司ることを明らかにした。平成 25 年度の研究では直鎖状ユビキチン鎖を標的として、これを分解することで NF- $\kappa$ B 活性化に阻害的に働く酵素(脱ユビキチン化酵素)の探索を行い、ヒトでは 93 種存在する脱ユビキチン化酵素から NF- $\kappa$ B 制御に関わる酵素のスクリーニングを行った。また、直鎖状ユビキチン鎖を対象として新たな抗炎症薬、抗がん剤を目指した化合物探索にも着手している。さらに、直鎖状ユビキチンを生成する酵素(LUBAC ユビキチンリガーゼ)の詳細な性状解析を進めている。

構造生物学グループでは、上記脂質炎症グループ、自然炎症グループと共同研究し、炎症シグナル因子の分子機構を構造・機能の両面から検証・解明している。脂質炎症シグナルに関しては、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、また LPA<sub>6</sub> に関しては、3.4 Å 分解能の反射を示す結晶の作成に成功した。また、GPC を分解し、フォスホコリンを合成し、脳や肝臓や腎臓にコリンを供給する Enpp6 とフォスホコリンの複合体の結晶構造を解明し、酵素反応機構を明らかにした。また自然炎症シグナルに関しては、ウイルスや細菌由来の二本鎖 DNA をパターン認識して cyclic dinucleotides(CDNs)を合成し、NF- $\kappa$ B シグナルを活性化するヒト由来 cGAS の立体構造を解明し、DNA 結合に依存した CDN の合成機構を解明するとともに、cGAS が NF- $\kappa$ B シグナルにも影響を及ぼすことを初めて明らかにした。さらに、CND 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

インターフェロンの産生に関与する, DDX41 の結晶化に成功し, 3 Å を超える回折像を得ている. さらに, NEMO と競合することで NF- $\kappa$ B 活性化経路を負に制御し, 筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因遺伝子でもあるオプチニューリン(OPTN)とテトラユビキチンの複合体の構造解析に成功し, OPTN によるユビキチン結合機構を明らかにした. さらに, 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 とガイド RNA, ターゲット DNA の複合体装置の結晶構造を 2.5 Å 分解能で決定し, Cas9 がいかにガイド RNA を特異的に認識し, ターゲット DNA を受け入れ, これを切断するかといった分子機構を, 世界に先駆けて解明した. 今後, 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.

### § 3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### 論文詳細情報(国際)

- A-1. “Screening and X-ray Crystal Structure-based Optimization of Autotaxin (ENPP2) Inhibitors, Using a Newly Developed Fluorescence Probe” M. Kawaguchi, T. Okabe, S. Okudaira, H. Nishimasu, R. Ishitani, H. Kojima, O. Nureki, J. Aoki, T. Nagano *ACS Chem Biol.* **8**, 1713-1721 (2013). (doi: 10.1021/cb400150c)
- A-2. “Structural and Functional Analyses of DNA-Sensing and Immune Activation by Human cGAS” K. Kato, R. Ishii, E. Goto, R. Ishitani, F. Tokunaga and O. Nureki. *PLoS One* **8**, e76983 (2013). (doi: 10.1371/journal.pone.0076983)
- A-3. “Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA” H. Nishimasu, F. A. Ran, P. D. Hsu, S. Konermann, S. I. Shehata, N. Dohmae, R. Ishitani, F. Zhang F and O. Nureki. *Cell* **156**, 935-949 (2014). (doi: 10.1016/j.cell.2014.02.001)
- B-1. Autotaxin-lysophosphatidic acid signaling attenuates sphingosine-1-phosphate signaling leading to cardia bifida in zebrafish embryos  
Nakanaga K, Hama K, Kano K, Sato T, Yukiura H, Inoue A, Saigusa D, Tokuyama H, Tomioka Y, Nishina H, Kawahara A and Aoki J.  
*J Biochem.* in press
- B-2. Screening and X-Ray Crystal Structure-based Optimization of Autotaxin (ENPP2) Inhibitors, Using a Newly Developed Fluorescence Probe.  
Kawaguchi M, Okabe T, Okudaira S, Nishimasu H, Ishitani R, Kojima H, Nureki O,

Aoki J, Nagano T.  
ACS Chem Biol. 8, 1713-1721 (2013)

B-3. Kumiko Makide and Junken Aoki  
J. Biochem, (commentary) 153, 327-329

C-1. Naonobu Fujita, Eiji Morita, Takashi Itoh, Atsushi Tanaka, Megumi Nakaoka, Yuki Osada, Tetsuo Umemoto, Tatsuya Saitoh, Hitoshi Nakatogawa, Shouhei Kobayashi, Tokuko Hataguchi, Jun-Lin Guan, Kazuhiro Iwai, Fuminori Tokunaga, Kazunobu Saito, Koutaro Ishibashi, Shizuo Akira, Mitsunori Fukuda, Takeshi Noda, and Tamotsu Yoshimori, "Recruitment of the autophagic machinery to endosomes during infection is mediated by ubiquitin" **J. Cell Biol.** vol. 203, No. 1, pp. 115-128, 2013 (doi:10.1083/jcb.201304188)

### (3-2) 知財出願

- ① 平成 25 年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 2 件)