

学 位 論 文 題 名

X-ray crystal structure of IRF-3  
and its functional implications

(IRF-3 175C の構造解析と構造解析とその機能解明)

学位論文内容の要旨

1. 序論

バクテリア由来の LPS、ウイルス由来の 2 重鎖 RNA 等の病原は TLR (Toll-like-receptor) を介して I 型インターフェロンを始めとする様々なサイトカインを産生し、初期の自然免疫を誘導する。I 型インターフェロンは抗ウイルス作用を始めとする様々な細胞防御に関わる機能を持つタンパク質として同定されている。

この TLR から I 型インターフェロンの産生までのシグナルが IRF-3 (Interferon regulatory factor 3) と呼ばれる因子によって担われている事が最近の研究によって明らかになってきた。IRF-3 は N 末端側の DBD (DNA binding Domain) と C 末端側の RD (Regulatory Domain) から構成されており様々な細胞に恒常的に発現している。一旦シグナルが伝わると IRF-3 は未知の IRF-3 キナーゼと呼ばれる因子により RD (Regulatory domain) の C 末端に存在する SRR (Serine rich region) がリン酸化を受ける。その結果 IRF-3 は RD を用いて二量体化し、核へと移行、転写補助因子 CBP/p300 と結合し I 型インターフェロンの転写を開始させる。IRF-3 においてシグナル伝達の全てが RD によって担われている。よって、RD の立体構造は IRF-3 の機能解析において重要な知見を与えると考え、SRR を含む IRF-3 175C (175-427) の結晶構造解析を行った。

2. 実験

IRF-3 175C は His タグ融合タンパク質として、Gro-ELS との共発現により大腸菌で発現した。精製はアフィニティークロマトグラフィー、TEV プロテアーゼによる His タグの切断、陰イオン交換、ゲルろ過の順で行った。IRF-3 175C は Magnesium Formate をリザーバとし、シッティングドロップ法を用いて 4℃により結晶化した。IRF-3 175C の結晶構造は MIR 法により決定した。

3. 結果

・ IRF-3 175C の全体構造

IRF-3 175C は溶液中では単量体で存在するにも関わらず結晶中では二量体で存在していた。IRF-3 175C の構造は  $\beta$  サンドイッチ構造をコアに持つ。コアの一端には 4 本のヘリックスと 2 つの  $\beta$  シートからなる 4HB (4-helix bundle) 構造を持ち、もう一端には複数のヘリックスとループからなる HLR (helix loop region) を持っていた。本来独立したドメインとして考えられる事の多かった SRR は 4HB の一部として存在している事が判

った。

#### ・ IRF-3 の二量体化機構

結晶中の二量体構造は、一方のサブユニットの SRR に存在するリン酸化モチーフである Ser385, Ser386, Leu387 の内 Leu387 を、もう一方のサブユニットの HLR に存在する 4 つの疎水性アミノ酸残基、Phe209, Gly211, Leu299, Trp345 から成るポケットに差し込む形で存在していた。SSL モチーフは種間の IRF-3 と IRF-7 において完全に保存されており、4 つの疎水性残基もまたよく保存されている。この疎水性のポケットの縁には Arg211, Arg213, Lys360, Arg361 の 4 つの塩基性残基が存在しており、SRR-loop の Ser385, Ser386 がリン酸化を受ければ静電相互作用可能となる配置をとっていた。このことから、IRF-3 175C が非リン酸化体の非活性化体であるにも関わらず、部分的にリン酸化後の活性化二量体を模している事が判った。又、4 つの塩基性残基に変異を入れ、二量体形成能が無くなる事を確認し、この仮定が正しい事を証明した。

#### ・ IRF-3 の酸性表面

IRF-3 の二量体構造の中心には、巨大な酸性のポケットが形成されている事が判った。この酸性ポケットはタンパク間相互作用に必要であると考えられ、その相手側のタンパク質としては CBP/p300 が考えられる。既に CBP の IBiD (IRF-3 binding domain) の構造が NMR により求められており、全体的に塩基性の表面を持つ事が明らかにされている為、この酸性ポケットとの相互作用を連想させる。本研究では、ポケットを構成する E200, E201, E203, E205, E224, E377, D392 の 8 つの酸性残基の内 E200, E201, E203, E205 に変異を入れ、CBP/p300 との結合能を見た。この結果、変異体は結合能を失っており、仮定が正しい事が証明された。

#### ・ SMAD ファミリーとの類似性

IRF-3 の構造は一次配列の相同性がほとんど無いにも関わらず SMAD ファミリーの MH2 ドメインの構造とよく似た構造を持つ事が判った。特に  $\beta$  サンドイッチ領域がよく重なるが、4HB, HLR においても全体のトポロジーはよく保存されている。又、4HB 内の SRR は IRF-3 のみに見られる。SMAD のホモログは線虫やショウジョウバエにも見付かっているが、IRF のホモログは脊椎動物にしか見付かっていない。このことから、IRF-3 は SMAD ファミリーから進化して、TLR の下流に入ったと言う仮定が立てられた。

## 4. 考察

IRF-3 175C の構造解析により、IRF ファミリーの活性化機構と SMAD ファミリーとの類似性についての知見が得られた。ウイルスには IRF-3 を直接阻害し、インターフェロンの発現を抑制するタンパク質を持つ物が多く存在する。本構造はこの阻害機構の解明においても重要な知見であると考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 稲 垣 冬 彦

副 査 教 授 加 茂 直 樹

副 査 教 授 横 沢 英 良

副 査 助 教 授 森 岡 弘 志

## 学 位 論 文 題 名

### X-ray crystal structure of IRF-3 and its functional implications

(IRF-3 175C の構造解析と構造解析とその機能解明)

IRF-3 は IFN $\alpha/\beta$  産生のトリガーとして機能する。ウィルス侵入により、細胞質内に恒常的に存在する IRF-3 はリン酸化され二量体を形成し、核移行を行う。核内において IRF-3 二量体は CBP/p300 と結合するとともに、DNA 結合部位を介して ISRE に結合し、ISRE の転写活性を促進し、IFN $\alpha/\beta$  産生をおこなう。この様にして産生された IFN $\alpha/\beta$  は細胞を抗ウィルス状態に保つ。近年、IRF-3 を介するシグナル伝達系の解析が行われ、TOLR3/4 の関与も示されている。高橋清大君は IFN $\alpha/\beta$  の産生のキーと成る IRF-3 活性化のプロセスを構造生物学的に解明することを目的として、IRF-3 活性制御ドメインの構造決定と制御機構の解明を目的として研究を行った。

高橋清大君の業績は X 線結晶構造解析による IRF-3 の活性制御ドメインの構造決定である。IRF-3 活性制御ドメインとして 175 より C 端側の領域を発現し構造解析に用いた (IRF-3 175C)。IRF-3 175C は制御ドメインとリン酸化サイトの二つより構成されており、リン酸化サイトのセリンのリン酸化が二量体形成に必須である。今回、IRF3 175C の結晶構造解析を行ったが、結晶構造はリン酸化をうけていないにも関わらず、二量体を形成していた。リン酸化サイトは従来考えられていたような独立した領域ではなく、制御ドメインに組み込まれていた。構造解析の結果、リン酸化サイトに隣接した Leu387 が他の IRF-3 上の疎水性部位に結合する事により二量体形成が行われていることを示した。疎水性部位の周りには 4 個の塩基性残基が存在すること、これらの塩基性残基に変異を加える事により二量体形成が起きない事より、リン酸化される Ser は Leu387 に隣接した Ser385, Ser386 であることがわかった。リン酸化サイトとしては C 末端領域 394-427 の領域に複数存在する Ser, Thr 残基が示唆されていたが、今回の構造解析の結果は、この論争に決着をつけるものであった。さらに、二量体が形成される結果、境界面に酸性残基の富んだポケットが作られることがわかった。CBP/p300 の IRF-3 結合部位の構造が決定されたが、この部位は塩基性残基に富む表面を持ち、IRF-3 の酸性ポケットに適合することがわかった。実際、ポケットを形成する酸性残基のいくつかを中性残基に置換した変異体ではウィルス刺激によるリン酸化と二量体形成を行うものの、IFN $\alpha/\beta$  産生能は持たないことが明らかと成った。これより、変異体は CBP/p300 を結合できないことは明らかである。

以上の構造解析の結果より、高橋清大君は IRF-3 のリン酸化機構、活性化の機構、CBP/p300 結合の機構を明らかにすることができた。さらに構造解析の結果は、IRF-3 の制御ドメインは SMAD の MH2 ドメインと構造の類似性が極めて高いことを見出した。SMAD

は線虫より、IRF-3 は脊椎動物になって初めて同定される蛋白質であること、リン酸化による活性化機構およびオリゴマー形成による核内移行、CBP/p300 との結合による転写活性化促進と類似した機能を有している。配列的な相同性は低いものの、IRF-3 が SMAD より進化して、TOLR の下流に位置することにより、原始的な免疫機構を担うようになったという仮説を提案している。

以上、高橋清大君の業績は、創意にあふれており、薬学博士に値するものとかがえる。