

博士論文

ヌクレオチド代謝酵素の立体構造からみる基質特異性,
および, 自然免疫応答の分子基盤

(Molecular basis for substrate specificity of nucleotide-metabolizing
enzymes involved in innate immune response)

平成 26 年 12 月 理学博士申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

加藤 一希

指導教員 濡木 理

要旨

酵素は「鍵と鍵穴」に例えられるように基質を厳密に認識することで、様々な生体反応を適切に触媒している。本研究では以下に示すようなヌクレオチド代謝酵素に着目し、X線結晶構造解析を用いてこれらの立体構造を決定することで、酵素が基質を厳密に認識して生理機能を制御する分子基盤の解明を試みた。

Enpp ファミリータンパク質の基質特異性の構造基盤

Enpp ファミリータンパク質は、高等真核生物に保存された細胞外ホスホジエステラーゼで、様々な生体分子を加水分解して多彩な生理機能に関与する。中でも Enpp1 はヌクレオシド三リン酸を加水分解してピロリン酸を産生し、骨の形成を阻害する役割を持つ。本研究では精製したマウス由来 Enpp1 を用いて生化学的な解析をおこない、Enpp1 が ATP を特異的に加水分解して、ピロリン酸を産生することを明らかにした。この Enpp1 による ATP 特異的な認識機構を理解するために、Enpp1 と様々なヌクレオチドの複合体構造を 2.7-3.2 Å 分解能でそれぞれ決定した。ヌクレオチドは活性部位に存在する挿入ループによって形成されたポケットに収容され、アデニン塩基特異的に認識されていた。さらに Enpp1 と Enpp2 の構造比較において、活性部位の挿入ループは Enpp2 では欠失していた。挿入ループを欠失した Enpp1 変異体は Enpp2 様の LysoPLD の活性を示したことから、挿入ループが Enpp ファミリー間で異なる基質特異性を規定していることを明らかになった。本研究における発見によって、Enpp ファミリータンパク質は各々の基質を加水分解して多彩な生理機能に関わるように構造的に進化してきたことが推察された。

Cyclic GMP-AMP 合成酵素の構造機能解析

Cyclic GMP-AMP (cGAMP) はアデノシンとグアノシンが2つのホスホジエステル結合によって環状につながった分子で、生体のセカンドメッセンジャーとして働く。哺乳類では cGAS と呼ばれる酵素がウイルス由来の DNA を認識して活性化し、2'-5' ホスホジエステル結合を含む cGAMP (2'-5' cGAMP) を産生し、宿主の免疫系を活性化する。本研究では cGAS によるウイルス DNA の認識機構を解明するために、ヒト由来 cGAS の apo 型構造を 1.9 Å 分解能で決定した。結晶構造から cGAS は活性部位の反対側に正電荷の溝、および、ジンクフィンガー構造を持つことがわかった。構造に基づいた変異体解析によって、2つの構造的特徴は cGAS が dsDNA を適切な配向で結合し、STING を介したシグナル伝達に必須であることを明らかにした。さらに cGAS 依存的な STING の活性化は IRF3 のみならず NF- κ B 経路も活性化することを明らかにした。

一方で *Vibrio cholerae* では DncV が両方のホスホジエステル結合が 3'-5' でつながった cGAMP (3'-5' cGAMP) を産生し、病原性の制御に関わる。cGAS と DncV 間で異なる cGAMP の触媒機構を解明するために、*Vibrio cholerae* 由来 DncV-ヌクレオチド複合体の pre-reaction state における結晶構造を高分解能で決定した。DncV-GTP 複合体と 3'-dATP 複合体の構造比較から、DncV は acceptor ポケットに ATP を、donor ポケットに GTP をそれぞれ結合することによって 3'-5' cGAMP を産生することが明らかとなった。さらに DncV と cGAS 間の pre-reaction state における構造比較によって、acceptor ヌクレオチドの配向が cGAS と DncV 間で異なる cGAMP (2'-5' vs 3'-5') の産生を規定していることを明らかにした。

Abstract

Enzymes strictly recognize their own substrate based on “the lock and key model”, and participate in catalyses of various metabolic processes. To understand molecular mechanism for substrate specificity of enzymes, in this study, we focused on nucleotide-metabolizing enzymes, and determined the three-dimensional structures of the enzymes as shown below using X-ray crystallography.

Structural basis for substrate specificities of Enpp family proteins

Enpp family proteins are conserved extracellular pyrophosphatase/phosphodiesterase in vertebrate, and involved in different biological processes by hydrolyzing pyrophosphate or phosphodiester bonds in extracellular compounds. Enpp1 hydrolyzes nucleotide triphosphate to produce pyrophosphate, which inhibits extracellular bone mineralization. In this study, we performed biochemical analyses using the purified mouse Enpp1, and revealed that Enpp1 specifically hydrolyzes ATP to produce pyrophosphate. To understand the preference for ATP, we determined the product-complex structures of Enpp1 with various nucleotides including AMP at 2.7-3.2 Å resolutions. Enpp1 forms a nucleotide-binding pocket formed by the insertion loop, which specifically recognizes the adenine base of ATP bound in the active site. Furthermore, a structural comparison between Enpp1 and Enpp2, a lysophospholipase D enzyme, revealed that the insertion loop, which participates in nucleotide recognition in Enpp1, is lost in Enpp2. The Enpp1 mutant lacking the insertion loop showed the slight lysophospholipase D activity, revealing that the insertion loop is a major determinant of the different substrate specificities among Enpp family. Our findings provide structural explanations for how Enpp evolved to exert their various physiological functions.

Structural and functional analyses of cyclic GMP-AMP synthase

Cyclic GMP-AMP (cGAMP) is a small molecule consisting of adenosine and guanosine linked via two phosphodiester bonds, and act as a second messengers or signal transducer in both bacterial and mammalian cells. In mammals, cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) produces cGAMP containing a 2'-5' phosphodiester bond in the presence of double-stranded viral DNA, and is involved in host innate immunity. To elucidate the mechanism of viral DNA recognition by cGAS, we determined the crystal structure of human cGAS apo-form at 1.9 Å resolutions. The structure revealed that cGAS has a positively charged DNA-binding cleft and a zinc finger. The functional analyses based on the structure revealed that these structural features are crucial for properly orientation in the DNA binding to cGAS, which is critical for DNA-induced cGAS activation and STING-dependent immune activation. Furthermore, the analyses also showed that cGAS-induced activation of STING also activates not only the IRF3 pathway but the NF- κ B pathway.

In *Vibrio cholerae*, DncV produces cGAMP containing two 3'-5' phosphodiester bonds (3'-5' cGAMP), regulating the bacterial infectivity. To understand the different catalytic mechanism of cGAMP production between cGAS and DncV (2'-5' vs 3'-5'), we determined the complex structure of *Vibrio cholerae* DncV with GTP or 3'-dATP in pre-reaction state. A structural comparison revealed that DncV specifically recognizes ATP and GTP as acceptor and donor nucleotides, respectively, in the first nucleotidyl transfer reaction, thus preferably producing 3'-5' cGAMP. Furthermore, a structural comparison with mammalian cGAS revealed that the orientation of the acceptor nucleotide defines the distinct linkage specificities between bacterial DncV and mammalian cGAS.

目次

要旨	4
Abstract	5
略語一覧	9
核酸略称一覧	10
アミノ酸略称一覧	11
序	12
第一章 Enpp1 の結晶構造解析, および, Enpp ファミリータンパク質 の基質特異性の構造基盤	
1.1 序論	13
1.1.1 Enpp1 ファミリータンパク質	13
1.1.2 Enpp1 の生理機能	13
1.1.2.1 骨形成における Enpp1 の役割	
1.1.2.2 インスリンを介したシグナル伝達における Enpp1 の役割	
1.1.3 本研究の目的	15
1.2 材料と方法	16
1.2.1 発現系の構築	16
1.2.1.1 発現コンストラクトの作製	
1.2.1.2 培養細胞と培養条件	
1.2.1.3 HEK293S GnT1 ⁻ 細胞への遺伝子導入, および, Enpp1 安定発現株の作製	
1.2.1.4 Enpp1 発現細胞の大量培養	
1.2.2 Enpp1 タンパク質の精製	16
1.2.3 Enpp1 タンパク質の結晶化	17
1.2.4 Enpp1 の結晶の X 線回折データの収集	17
1.2.5 Enpp1 結晶の回折データ処理と位相決定	17
1.2.6 Enpp1 構造のモデル構築と精密化	17
1.2.7 Enpp1 変異体の調製	17
1.2.8 酵素活性測定	18
1.2.8.1 pNP-TMP を用いたヌクレオチド加水分解活性の測定	
1.2.8.2 リゾホスホリパーゼ D 活性の測定	
1.3 結果と考察	19
1.3.1 Enpp1 の調製	19
1.3.2 Enpp1 の結晶化	20
1.3.3 X線回折実験	20
1.3.4 位相決定, および, 構造精密化	21
1.3.5 Enpp1 の基質特異性	23

1.3.6 Enpp1 の全体構造.....	24
1.3.7 触媒ドメイン	24
1.3.8 ヌクレアーゼ様ドメイン.....	25
1.3.9 SMB 様ドメイン	26
1.3.10 ヌクレオチド認識.....	27
1.3.11 Enpp1 の変異による骨疾患の発症メカニズム.....	29
1.3.12 インスリンシグナルへの関与に対する構造的洞察.....	30
1.3.13 Enpp1 の cGAMP 切断活性に対する構造的洞察.....	30
1.3.14 Enpp2 との構造比較.....	30
1.3.15 他の Enpp ファミリーの基質特異性に対する構造的洞察.....	31
1.4 まとめと展望.....	33

第二章 Cyclic GMP-AMP 合成酵素, cGAS の構造機能解析

2.1 序論.....	35
2.1.1 自然免疫系におけるパターン認識受容体.....	35
2.1.2 細胞質における外来 DNA の認識と STING 経路.....	35
2.1.3 cyclic GMP-AMP 合成酵素の発見.....	35
2.1.4 本研究の目的	36
2.2 材料と方法.....	37
2.2.1 cGAS タンパク質の大量発現.....	37
2.2.2 cGAS タンパク質の精製.....	37
2.2.3 cGAS タンパク質の結晶化.....	37
2.2.4 cGAS の結晶の X 線回折データの収集.....	37
2.2.5 結晶の回折データ処理, cGAS 構造のモデル構築, および, 精密化.....	38
2.2.6 変異体 cGAS の調製.....	38
2.2.7 cGAS と DNA の結合実験.....	38
2.2.8 細胞を用いた変異体解析.....	38
2.2.8.1 STING/293T 細胞の樹立	
2.2.8.2 ルシフェラーゼレポーターアッセイ	
2.2.8.3 定量 Real-Time PCR	
2.3 結果と考察.....	39
2.3.1 cGAS の調製.....	39
2.3.2 cGAS の結晶化, および, X 線回折実験.....	39
2.3.3 位相決定, および, 構造精密化.....	41
2.3.4 cGAS の全体構造.....	41
2.3.5 DNA の結合に関する構造的洞察.....	41
2.3.6 IRF3- インターフェロン β 産生経路に対する変異体解析.....	41
2.3.7 NF- κ B 経路に対する変異体解析.....	42
2.3.8 cGAS 変異体を用いた DNA 結合実験.....	44
2.3.9 他の cGAS ホモログとの構造比較.....	44
2.4 まとめと展望.....	47

第三章 バクテリア由来 cyclic GMP-AMP 合成酵素, DncV の構造解析と cGAMP 産生機構の分子基盤

3.1 序論.....	48
3.1.1 セカンドメッセンジャーとしての環状ジヌクレオチド.....	48
3.1.2 コレラ菌由来 DncV の発見.....	48
3.1.3 cGAS, DncV による cGAMP 産生機構.....	48
3.1.4 本研究の目的.....	49
3.2 材料と方法.....	50
3.2.1 DncV タンパク質の大量調製.....	50
3.2.2 DncV タンパク質の結晶化.....	50
3.2.3 DncV 結晶の X 線回折実験.....	51
3.2.4 結晶の回折データ処理, 位相決定, および, モデル構築と精密化.....	51
3.3 結果と考察.....	52
3.3.1 VcDncV タンパク質 apo 型の構造決定.....	52
3.3.1.1 VcDncV _{FL} , VcDncV _{C-del} の調製と結晶化	
3.3.1.2 VcDncV _{Cryst} の調製と結晶化, および, 回折実験	
3.3.1.3 SeMet 置換体 VcDncV _{Cryst} の調製と結晶化, および, 回折実験	
3.3.1.4 VcDncV _{Cryst} 位相決定と構造精密化	
3.3.2 VcDncV _{Cryst} -ヌクレオチド複合体の構造決定.....	53
3.3.3 EcDncV の調製と結晶化, および, EcDncV _{C-del} -3'-dGTP 複合体の構造決定.....	53
3.3.4 DncV の全体構造.....	57
3.3.5 DncV の恒常的な活性化機構.....	57
3.3.7 DncV が 3'-5' ホスホジエステル結合を触媒することの構造的説明.....	60
3.3.8 DncV による 3'-5' cGAMP 産生の特異性.....	61
3.3.9 DncV と cGAS 間のヌクレオチジルトランスファー反応における結合特異性.....	62
3.4 まとめと展望.....	63
参考文献.....	65
総括.....	69
外部発表.....	70

略語一覽

略語	正式名称
β -Me	β -mercaptoethanol
CBB	coomassie brilliant blue
CCD	charge coupled device
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
cGAS	cyclic GMP-AMP synthase
DAMP	damage-associated molecular pattern
DNA	deoxyribonucleic acid
dsDNA	double stranded deoxyribonucleic acid
Enpp	Ecto-nucleotide pyrophosphate/phosphodiesterase
GACI	Generalized arterial calcification of infancy
HEK	human embryonic kidney
IFN- β	interferon- β
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
LPA	lysophosphatidic acid
LPC	lysophosphatidyl choline
LysoPLD	lysophospholipase D
MWCO	molecular weight cut off
NCS	non-crystallographic symmetry
Ni-NTA	nickel-nitrilotriacetic acid
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylene glycol
PMSF	phenyl-methylsulfonyl fluoride
PRR	pattern recognition receptor
PVDF	PolyVinylidene DiFluoride
RLR	RIG-I-like receptor
r.m.s.d.	root mean square deviation
RNA	ribonucleic acid
SAD	single wavelength anomalous dispersion
Se	selenium
SeMet	selenomethionine
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide electrophoresis
SMB	somatomedin B like domain
STING	stimulator of interferon genes
TEV	tobacco etch virus
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
TLR	toll-like receptor

WT	wild type
ZnF	zinc finger

核酸略称一覧

略語	正式名称
3'-dATP	3'-deoxy adenosine tri-phosphate
3'-dGTP	3'-deoxy guanosine tri-phosphate
ADP	adenosine di-phosphate
AMP	adenosine mono-phosphate
Ap3A	diadenosine tri-phosphate
ATP	adenosine tri-phosphate
CDN	cyclic di-nucleotide
cGAMP	cyclic GMP-AMP
CMP	cytosine mono-phosphate
CTP	cytosine tri-phosphate
GMP	guanosine mono-phosphate
GTP	guanosine tri-phosphate
NMP	nucleotide mono-phosphate
pNP-TMP	p-nitrophenyl thymidine mono-phosphate
TMP	thymidine mono-phosphate
UMP	uridine mono-phosphate
UTP	uridine tri-phosphate

アミノ酸略称一覧

一文字名称	三文字略称	正式名称
A	Ala	alanine
C	Cys	cysteine
D	Asp	aspartic aci
E	Glu	glutamic acid
F	Phe	phenylalanine
G	Gly	glycine
H	His	histidine
I	Ile	isoleucine
K	Lys	lysine
L	Leu	leucine
M	Met	methionine
N	Asn	asparagine
P	Pro	proline
Q	Gln	glutamine
R	Arg	arginine
S	Ser	serine
T	Thr	threonine
V	Val	valine
W	Trp	tryptophan
Y	Tyr	tyrosine

序

酵素は生体内でおこる特定の化学反応に対して、反応に必要な活性化エネルギーを下げる（触媒作用）働きを持つ分子を指す（図 p-1）。酵素によって触媒される反応は一部の核酸酵素（リボザイム）を除いて大部分がタンパク質によっておこなわれ、生命活動に必須なエネルギー代謝を含むあらゆる生理現象に関わる。そのため酵素による触媒反応に対する研究は生命現象を理解する上で重要であり、古くから盛んにおこなわれてきた。1894年 Emil Fischer らは酵素と基質を「鍵穴と鍵」に例え、酵素は自身の鍵穴に形の類似した分子を基質（鍵）として厳密に認識し、触媒反応をおこなうというモデル（鍵と鍵穴モデル）を提唱した。この酵素の特性は現在では「基質特異性」と呼ばれ、特定の反応を触媒する「反応特異性」と併せて、酵素は適切に各々の生理機能を担うことができる。さらに補酵素や他のタンパク質分子によってアロステリックな制御を受ける酵素や2つの異なる反応を触媒する（2つの反応特異性を持つ）酵素などがこれまでに同定されており、酵素の触媒メカニズムは多岐にわたる。酵素の触媒メカニズムを理解する上で、X線結晶構造解析は非常に強力な手法である。X線結晶構造解析によって酵素-基質複合体構造を決定することで、酵素-基質の相互作用を視覚的に捉えることができ、基質特異性や反応特異性を明確に説明できる。1970年代にリゾチーム、リボヌクレアーゼ、キモトリプシンなどの立体構造が、X線結晶構造解析によって相次いで決定され、これらの酵素による触媒メカニズムの一端が解明された¹⁻³。

ヌクレオチドは DNA や RNA の構成成分であり、全て

の生物に存在する。ホスホジエステル結合は炭素原子とリン酸の間に存在する2つのエステル結合を示し、ヌクレオチドの3'末端と別の5'末端をつなぐことでDNA、RNAを構成する。DNA、RNAにおけるヌクレオチドの伸長反応は、ポリメラーゼによっておこなわれる。ポリメラーゼはフリーのヌクレオチド（donorヌクレオチド）のリボース部位の3'-OHを活性化して、DNA鎖側の5'末端のヌクレオチド（acceptorヌクレオチド）のαリン酸へと求核攻撃をおこなうことで、5'→3'の方向で伸長反応をおこなう。またヌクレオチドの中でもATPは生体内にもっとも多量に存在する。ATPの5'末端には3つのリン酸がリン酸無水結合によってつながれており、この結合の切断に伴い放出するエネルギーは、エネルギーの貯蔵や代謝経路において利用される。さらにヌクレオチド、および、ヌクレオチド類似体は細胞内外において、ヌクレオチド受容体やキナーゼに利用され、シグナル伝達を制御するセカンドメッセンジャーとして働く。このようにヌクレオチドは生命現象の根幹を担うとともに、その役割は多岐にわたる。そのため生体が正常に機能するためには、各々の酵素が適切にその酵素反応を触媒し、ヌクレオチドの代謝をおこなわなくてはならない。

本研究ではリン酸無水結合、ホスホジエステル結合の分解酵素 Enpp ファミリー、および、ヌクレオチジルトランスファー反応によってホスホジエステル結合を形成する酵素、cGAS、DncV に着目した。X線結晶構造解析を用いてこれらのヌクレオチド代謝酵素の立体構造を決定し、各々の生理機能を実現する触媒メカニズムを原子分解能レベルで解明することを目的とした。

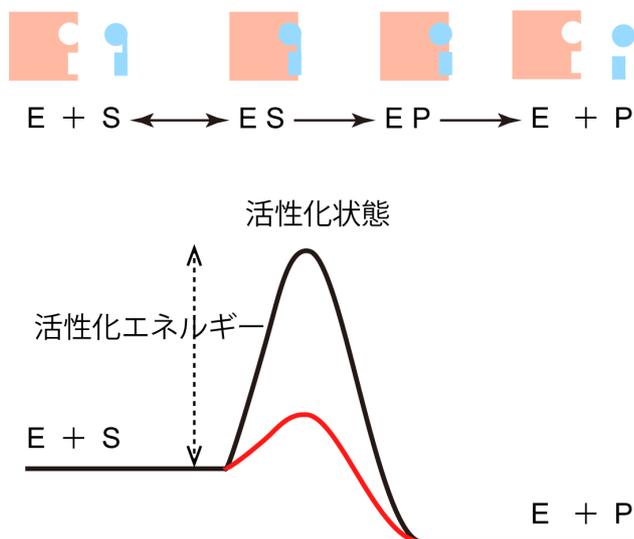


図 p-1 酵素による触媒作用

化学反応は、反応に必要な活性化エネルギーを得ることで活性化状態となることで起こる。酵素(E)は基質(S)を特異的に認識して活性部位に結合することで、反応に必要な活性化エネルギーを下げる役割（触媒作用）を持つ。

第一章 Enpp1の結晶構造解析, および, Enppファミリータンパク質の基質特異性の構造基盤

本章ではATP加水分解酵素であるEnpp1のX線結晶構造解析について述べる。Enpp1の立体構造をもとに、Enpp1の生化学的特性を理解し、Enpp1の関わる骨形成の制御機構、および、遺伝性の骨疾患の発症機構について洞察する。さらにEnpp1と他のEnppとの構造比較から、Enppファミリーがそれぞれ異なる基質特異性を発揮する構造基盤の理解へと拡張した。

1.1 序論

1.1.1 Enpp1ファミリータンパク質

Enpp (Ecto-nucleotide pyrophosphate/phosphodiesterase) ファミリーは高等真核生物で保存された細胞外ホスホジエステラーゼで、細胞外に存在する様々な生体分子の代謝を担う。哺乳類においては7種類のEnpp (Enpp1-Enpp7) が同定されている (図 1-1a)。Enpp1-Enpp3は2つのソマトメジンB (SMB) 様ドメイン、触媒ドメイン、ヌクレアーゼ様ドメインから構成される一方で、Enpp4~Enpp7は触媒ドメインのみから構成される。Enppファミリータンパク質は、アルカリフォスファターゼスーパーファミリーに属する相同な触媒ドメインをもつが、それぞれ異なる基質を加水分解し、多彩な生理機能に関与する⁴。例えばEnpp2 (別名ATX; オートタキシン) は血液中に存在する脂質リゾホスファチジルコリン (LPC) を基質として加水分解し、リゾホスファチジン酸 (LPA) を産生する (LysoPLD 活性) (図 1-1b)⁵。LPAは脂質メディエーターとして、Gタンパク質共役受容体であるLPA受容体 (LPA₁₋₆) を活性化することで様々な細胞応答を引き起こし、血管新生を含む様々な生理現象に関与する⁶。Enpp6もEnpp2と同様にLPCを基質とするが、Enpp2とは異なる部位を*in vitro*において加水分解し、ホスホコリンを産生する (LysoPLC 活性)⁷ ことで、肝臓における脂質代謝や脳神経の発達に関与する (東北大学青木研究室 未発表データ)。Enpp1, Enpp4はともにヌクレオチド骨格を持つ基質を認識するが、Enpp1はヌクレオチド三リン酸を加水分解してピロリン酸を産生する一方で、Enpp4は血液中的ジアデノシン三リン酸 (di-adenosine triphosphate; Ap3A) を加水分解してADPを産生し、血液の凝固を制御している⁸。

1.1.2 Enpp1の生理機能

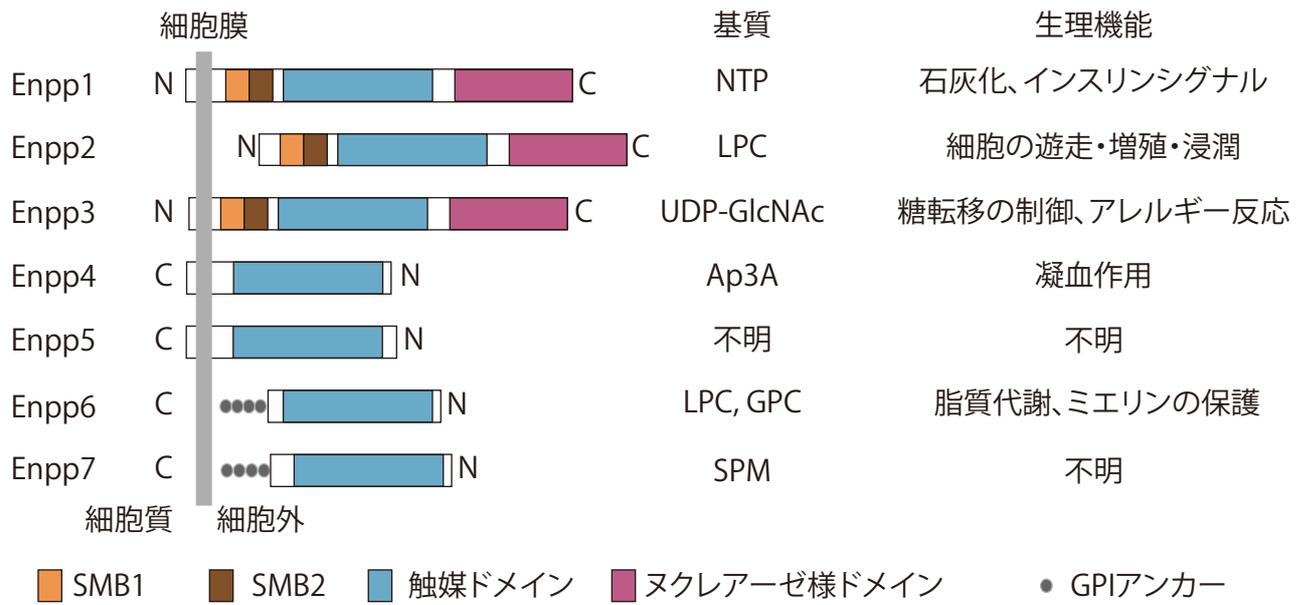
1.1.2.1 骨形成におけるEnpp1の役割

骨形成は細胞外に存在する無機リン酸とピロリン酸の存在量によって制御されている⁹。無機リン酸はカルシウムイオンとともにハイドロキシアパタイトに結合することで骨の石灰化を促すが、一方でピロリン酸はハイドロキシアパタイトに結合することで無機リン酸のハイドロキシアパタイトへの結合を阻害する (図 1-2)。Enpp1は軟骨細胞や骨芽細胞に発現しており、細胞外のヌクレオチド三リン酸を加水分解してピロリン酸を産生することから骨の形成を阻害すると考えられてきた^{10,11}。実際にEnpp1の変異欠損マウスは異所的な石灰化を引き起こし、運動障害の表現型を示す¹²。また、ヒトにおいてEnpp1の変異はGACI (Generalized arterial calcification of infancy) と呼ばれる先天的な骨疾患の発症と関連することが報告されている¹³⁻¹⁵。これらのことからEnpp1が生理的に骨の石灰化を負に制御していることは明らかであるが、Enpp1がピロリン酸を産生する詳細な分子機構についてはよくわかっていなかった。また、GACIに関わるEnpp1の変異は複数報告されているが、いずれも活性残基ではないことから、これらの変異がどのようにEnpp1の機能欠損を引き起こし、GACIの発症に関わるかは明らかでなかった。

1.1.2.2 インスリンを介したシグナル伝達におけるEnpp1の役割

Enpp1はインスリンシグナルにも関与することが報告されている¹⁶⁻²⁵。Enpp1は糖尿病患者由来の線維芽細胞で発現量が亢進するタンパク質として同定された¹⁶。哺乳類ではインスリン感受性細胞と呼ばれる肝細胞、脂肪細胞

(a)



(b)

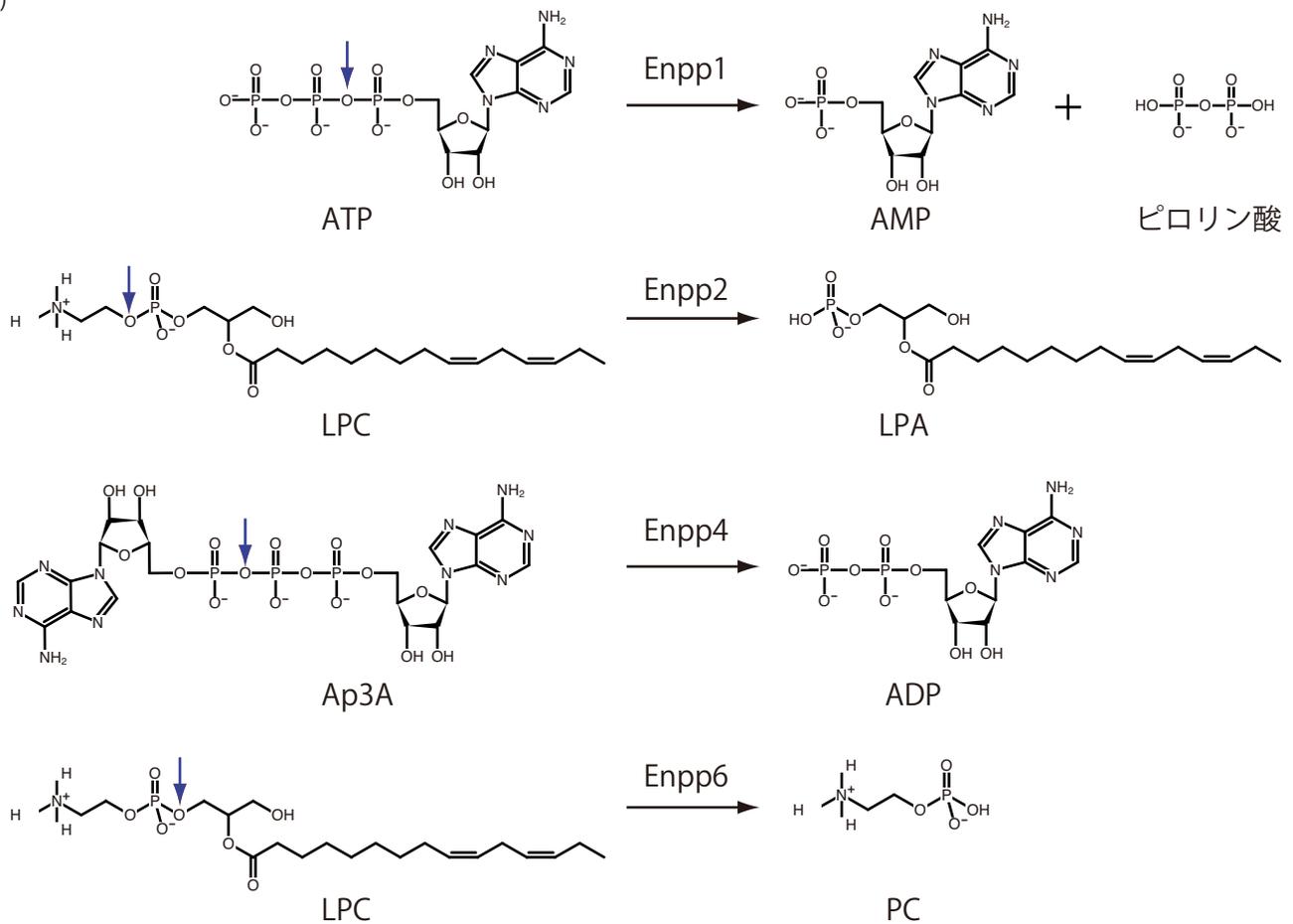


図 1-1 Enpp ファミリータンパク質

(a) Enpp ファミリータンパク質のドメイン模式図

(b) Enpp ファミリータンパク質の加水分解活性。加水分解を受ける部位を青矢印で示した。

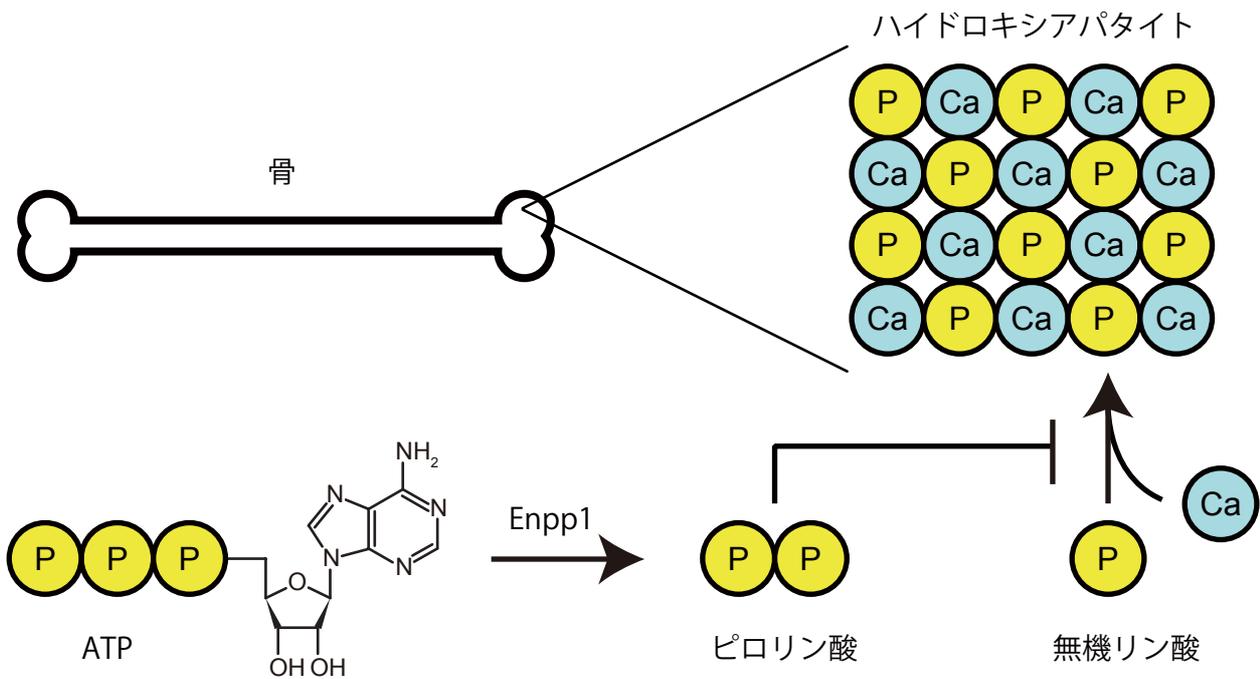


図 1-2 Enpp1 の骨形成における役割

Enpp1 は細胞外に存在するヌクレオチド三リン酸 (ATP) を加水分解して、ピロリン酸を産生する。ピロリン酸はハイドロキシアパタイトに結合して、骨の形成を阻害する。

や筋線維芽細胞にも Enpp1 が発現しており、Enpp1 がインスリンシグナルに関わることが示唆されてきた^{16,20,21}。また、多数の遺伝学的解析によってヒト Enpp1 の変異 (K173Q) と II 型糖尿病の発症リスクとの相関が報告されている^{23,24}。さらに Enpp1 がインスリン受容体と結合してインスリン受容体の介するシグナル伝達を阻害するというモデルが提唱されているが²²、Enpp1 はインスリンシグナルに影響しないという報告もあり²⁶⁻²⁹、Enpp1 のインスリンシグナルへの寄与は未だ議論の余地が残されている。

1.1.3 本研究の目的

1.1 で詳述したように Enpp ファミリータンパク質の生理機能の理解が進む一方で、Enpp による基質認識機構に対する理解は遅れていた。2000 年に Enpp ファミリータンパク質の細菌ホモログに相当する *Xanthomonas axonopodis* 由来 NPP (XaNPP)-AMP 複合体の立体構造が決定さ

れ、2つの亜鉛イオンを補因子としてホスホジエステル結合を加水分解する触媒機構が解明された³⁰。さらに近年 Enpp2-LPA 複合体の結晶構造が決定され、Enpp2 の脂質に対する基質認識機構、および、LPA 産生機構が解明された³¹。しかしながら他の Enpp ファミリータンパク質の構造は未だ決定されておらず、その基質認識機構は不明である。特に Enpp1 は骨形成の制御、および、インスリンシグナルの制御と2つの全く異なる生理機能に関与するが、その詳細な分子機構については分かっていない。これらの状況をふまえて、本研究では X 線結晶構造解析によって Enpp1 の立体構造を決定し、さらに生化学的解析をおこなうことで、Enpp1 によるピロリン酸産生機構の解明、多彩な生理機能の分子メカニズムを解明することを試みた。さらに、既に構造決定された LPA 産生酵素、Enpp2 と構造比較をおこなうことで、Enpp ファミリータンパク質の基質特異性の理解に新たな知見を加えることを目的とした。

1.2 材料と方法

1.2.1 発現系の構築

タンパク質の結晶化には高純度 (SDS-PAGE 解析 CBB 染色で単一バンド), かつ, 大量 (数 mg オーダー) の目的タンパク質が必要である. Enpp1 は一回膜貫通型の細胞外酵素として存在し, 複数のジスルフィド結合を形成して高度な糖鎖修飾を受ける. このようなタンパク質を組み換えタンパク質として発現させる場合, 一般によく用いられる大腸菌発現系では, Enpp1 本来のフォールディングをとることができず, タンパク質の大量調製が困難であると予想された. そこで哺乳類細胞発現系を用いて, Enpp1 を分泌タンパク質として培養上清中に発現することを試みた.

1.2.1.1 発現コンストラクトの作製

Enpp1 は N 末端を細胞質側に向ける一回膜貫通型タンパク質として存在する. マウス由来 Enpp1 の細胞外ドメイン (92-905 アミノ酸残基) を可溶性タンパク質として得るために, Enpp1 の N 末端の細胞質ドメインと膜貫通領域 (1-90 アミノ酸残基) を, マウス由来 Enpp2 の N 末端分泌シグナル配列 (1-58 アミノ酸残基) に置き換えた分泌型 Enpp1 を作製した (図 1-3a). この分泌型 Enpp1 の DNA 断片を制限酵素処理, および, ライゲーション反応によって, pcDNA3.1 (Invitrogen) 改変ベクター (マルチクローニングサイトの C 末端に TEV プロテアーゼ認識配列, および, TARGET タグ³²) に挿入し, Enpp1-TEV 認識配列-TARGET タグ融合タンパク質 (分泌型 Enpp1) として分泌発現させるプラスミドベクターを設計した.

1.2.1.2 培養細胞と培養条件

本研究では, 発現細胞株としてヒト胎児腎細胞株 HEK293T 細胞, および, GnT1 (N-Acetylglucosaminyl transferase-1) 欠損株である HEK293S GnT1⁻細胞³³を用いた. 細胞は 37°C, 5%CO₂ 存在下で培養をおこない, 培地は DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, SIGMA) に終濃度 10% (v/v) Fetal bovine serum (Euro Clone), 1% (v/v) Non essential amino acid solution (SIGMA), 1% (v/v) Sodium pyruvate solution (GIBCO), 0.5% (v/v) Penicillin streptomycin solution (SIGMA) を加えたものを用いた.

1.2.1.3 HEK293S GnT1⁻細胞への遺伝子導入, および, Enpp1 安定発現株の作製

HEK293 細胞への遺伝子導入には, Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いたリポフェクション法によっておこなった. 6 well plate 1 well あたり, 5 μ l の Lipofectamine2000 と

100 μ l の Opti-MEM (Invitrogen), および, 1 μ g の発現プラスミドベクターを混合した後, 室温にて 20 分間静置した. 約 70% コンフルエントの細胞に対して, Lipofectamine2000- プラスミド DNA 複合体を滴下した後に, 37°C で 4 時間培養した. Enpp1 安定発現株の樹立は抗生物質によるスクリーニング, および, 限界希釈法によっておこなった. 発現ベクターにはネオマイシン耐性遺伝子がコードされているため, ネオマイシン類縁体の G418 で選択することによって, 発現ベクターが宿主細胞のゲノム DNA に安定的に組み込まれた細胞を選択することができる. 遺伝子導入後の細胞を 1 mg/ml G418 (nacaltesque) を含む DMEM 培地で懸濁し, 96 well plate (Corning) に 2000 cells/well となるように播種した. このプレートを 2 週間にわたって 37°C で培養し, 1 細胞由来の G418 耐性コロニーを複数の well から得た. これらのウェルから培養上清を回収し, 下記に示すような pNP-TMP を用いた酵素活性測定をおこない, Enpp1 高発現株を選択した.

1.2.1.4 Enpp1 発現細胞の大量培養

結晶化に十分量の Enpp1 を得るために, 1.4.1.3 で樹立した Enpp1 高発現 HEK293S GnT1⁻細胞株 (Enpp1/293S) の大量培養をおこなった. 以下の大量培養は, 大阪大学高木研究室との共同研究によっておこなった. 高密度培養システム, Bello Cell (CESCO) を用いて Enpp1/293S の大量培養をおこない, 7.5 L の培養上清を得た. 回収した培養上清は -20°C で凍結保存した.

1.2.2 Enpp1 タンパク質の精製

1.2.1.4 で得られた培養上清 1 L を一回の精製に用いた. この培養上清に 1 M Tris-HCl pH7.5 を 1/50 量 (v/v) 加えた後に, 遠心分離操作, および, フィルター濾過をおこなった. 培養上清からの Enpp1 の精製には, TARGET タグを特異的に認識する P20.1 抗体カラム³², および, ゲル濾過カラムを通すことでおこなった. まず, 培養上清を TBS バッファー (20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl) で平衡化した P20.1 抗体カラムと混ぜ, バッチ法により Enpp1 を抗体カラムに吸着させた. カラムを回収した後, TBS バッファー 5 CV を用いてカラムの洗浄をおこない, 続いて C8 ペプチド (PRGYPGQV 配列) を用いて目的タンパク質を溶出した. SDS-PAGE によって目的タンパク質の存在する溶出画分を確認し, 回収した. 回収した溶出画分を Vivaspin MWCO 30 kDa (sartorius stedim) を用いて約 4 ml となるように濃縮した後, TEV プロテアーゼを 1/10 量 (w/w) 添加し, 20°C, 一晩かけて TARGET

タグの切断をおこなった. TARGET タグの切断を SDS-PAGE によって確認した後に, Superdex200 16/60 HiLoad (GE Healthcare) を用いてゲルろ過クロマトグラフィーをおこない最終精製とした.

SeMet 置換体 Enpp1 は, Enpp1/293S を 50 mg/ml L-セレノメチオニン (Wako) を加えたメチオニン不含の DMEM を用いて Bello Cell で培養することで調製した. 培養上清からの SeMet 置換体 Enpp1 の精製は, Native Enpp1 と同様におこなった.

1.2.3 Enpp1 タンパク質の結晶化

精製 Enpp1 を Vivaspin MWCO 30 kDa (sartorius stedim) を用いて濃縮した後, 0.22 μm PVDF (polyvinylidene difluoride) フィルター (Millipore) を通すことで不純物を除去した. この Enpp1 を終濃度 5 mg/ml となるように, AMP (SIGMA, 終濃度 10 mM), ZnSO_4 (Hampton, 終濃度 0.2 mM) と混合し, 結晶化ロボット mosquito (TTP Labtech) を用いたシッティングドロップ蒸気拡散法により, 以下のスクリーニングキットを用いて結晶化条件の初期スクリーニングをおこなった.

結晶化スクリーニングに用いたスクリーニングキット

Crystal Screen 1/2, PEG/Ion, Index, Natrix and SaltRX (Hampton Research)
PACT, JCSG (Qiagen)
MemGold (Molecular Dimensions)

初期スクリーニングで結晶が得られた条件について, 沈殿剤の濃度, および, pH を変化させ, さらに Additive Screen (Hampton Research) をおこなうことで結晶化条件の最適化を行った. より良質な結晶を得るために, 最適化した条件について 1 μl の Enpp1 と 1 μl のリザーバー溶液を混合し, ハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて結晶化をおこなった. Native 結晶で最適化した結晶化条件をもとに, SeMet 置換体 Enpp1 の結晶化も同様の方法でおこなった.

1.2.4 Enpp1 の結晶の X 線回折データの収集

結晶化条件に 30% Glycerol を含む溶液に Enpp1 結晶を浸潤し, 窒素ガスクライオストリームによって瞬間凍結した. Enpp1 結晶の回折データの測定は, 大型放射光施設 SPring-8 BL32XU でおこなった. 回折データの収集には MX225HE CCD 検出器 (Rayonix) を用いた. また X 線損傷による結晶回折能の低下を最小限に抑えるため, 全てのデータ収集は $1 \times 15 \mu\text{m}$ の微小ビームを用いて, フレー

ム間でビームの間隔を 1.4 μm 以上あけ, 窒素ガスクライオストリーム条件下にて 100 K でおこなった. Native 結晶からのデータ収集は, 波長 1.00 \AA , カメラ長 300-311 mm, 振動角 1° の条件でおこない, 180 枚の回折データを収集した. SeMet 置換体結晶からのデータ収集は, peak 波長 0.9790 \AA , カメラ長 300 mm, 振動角 1° の条件でおこない, 360 枚の回折データを収集した.

1.2.5 Enpp1 結晶の回折データ処理と位相決定

回折データの処理はプログラム HKL2000 (HKL Research, Inc.) を用いておこなった. 結晶のブラベ格子と格子定数を決定後, 回折データの各反射スポットに対して指数付けと強度測定をおこない, その後スケールリングをおこない, 空間群の決定, および, 各指数に対する回折強度の算出をおこなった. SeMet 置換体 Enpp1-AMP 複合体の 2.7 \AA までの SAD (single-wavelength anomalous dispersion) データをもとに, Enpp2 の構造情報 (PDB ID: 3NKM) をサーチモデルとしてプログラム MOLREP³⁴ による分子置換をおこない初期位相を決定した. この初期位相を用いてプログラム PHENIX³⁵ によって異常分散差フーリエマップを表示し, SeMet 置換体 Enpp1 に含まれるセレン原子の位置を特定した. 特定したセレン原子の位置からプログラム SHARP を用いて実験的位相の再計算をおこなった. 他の Enpp1 複合体 (CMP, GMP, TMP 複合体) については, 1.2.6 で精密化した Enpp1-AMP 複合体構造のうち, Enpp1 単体の構造情報をサーチモデルとしてプログラム Phaser³⁶ を用いた分子置換法によって位相を決定した.

1.2.6 Enpp1 構造のモデル構築と精密化

プログラム RESOLVE³⁷ を用いて溶媒平滑化, および, NCS 平均による位相の改良をおこなった. プログラム PHENIX³⁵ により構造精密化を行い, プログラム Coot³⁸ を用いて手動でモデルを修正する, というサイクルを数回繰り返した.

1.2.7 Enpp1 変異体の調製

1.2.1.1 で作製した野生型の Enpp1 発現ベクターを鋳型として PCR 法によって, Enpp1 変異体発現ベクターを作製した. この発現ベクターを HEK293T 細胞に Lipofectamine2000 によって遺伝子導入し, 一過性に Enpp1 を分泌発現させた. 72 h 後, Enpp1 変異体を含む培養上清を回収し, 1.4.2 同様 P20.1 抗体カラムに通すことで Enpp1 変異体を精製した.

1.2.8 酵素活性測定

1.2.8.1 pNP-TMP を用いたヌクレオチド加水分解活性の測定

Enpp1 のヌクレオチドに対する加水分解活性の測定はヌクレオチド類似体, pNP-TMP (p-nitrophenyl thymidine 5'-monophosphate) を用いておこなった. pNP-TMP は TMP の 5' 側に p-nitrophenol 基を有しており, 加水分解を受けて p-nitrophenol が遊離すると, 呈色を示す. 精製した Enpp1 を以下の組成からなる反応バッファーと混合し, 37°C で加水分解反応を進行させた. pNP-TMP の加水分解によって遊離した p-ニトロフェノールを, 405 nm における吸光度を測定することで定量した.

pNP-TMP の加水分解反応バッファー組成

4 mM pNP-TMP
100 mM Tris-HCl pH9.0
5 mM MgCl₂
500 mM NaCl
0.05% Triton X-100

1.2.8.2 リゾホスホリパーゼ D 活性の測定

以下の実験は東北大学 青木研究室との共同研究にておこなった. 精製した Enpp1 を以下の組成からなる反応バッファーと混合し, 37°C で 3 h 加水分解反応を進行させた. LPC の加水分解によって遊離したコリンをコリンオキシダーゼで酸化し, 生じた過酸化水素をペルオキシダーゼ, および, TOOS reagent (Dojindo) を用いた比色法によって定量した.

LysoPLD 活性の加水分解反応バッファー組成

2 mM 14:0 LPC
100 mM Tris-HCl (pH9.0)
5 mM MgCl₂
500 mM NaCl
0.05% Triton X-100

1.3 結果と考察

1.3.1 Enpp1 の調製

Enpp1 は II 型一回膜貫通タンパク質として存在する。Enpp1 の細胞外領域を分泌タンパク質として得るために、Enpp1 の N 末端に存在する細胞質領域、および、膜貫通領域を Enpp2 の分泌シグナルと置き換えたコンストラクトを作製した (図 1-3a)。また Enpp1 は 9 つの N 結合型糖鎖修飾部位を持つことが一次配列から予想され、Enpp1 分子間で異なる糖鎖修飾を受けることは、結晶化における均一なパッキングを妨げると予想された。そこで均一な高マンノース型の糖鎖修飾を受けた Enpp1 を調製するため、HEK293S GnT1⁻ 細胞³³ を用いて、Enpp1 を発現させた。Enpp1 を含む培養上清には血清由来のアル

ブミンを含む、大量の夾雑タンパク質が存在する。そこで培養上清から目的の Enpp1 タンパク質のみを得るために、P20.1 抗体カラムを用いた精製をおこない、SDS-PAGE で単一バンドと高純度の Enpp1 を得ることに成功した (図 1-3b)。さらに、TEV プロテアーゼによって C 末端の TARGET タグを切断した後に、ゲル濾過クロマトグラフィーにかけたところ、Enpp1 は 85 kDa に相当する溶出位置に単分散性のピークとして溶出した (図 1-3c)。このことから Enpp1 は溶液中で単量体として存在することが示唆された。最終的に 1 L の培養上清から約 1.4 mg の Enpp1 が得られた。

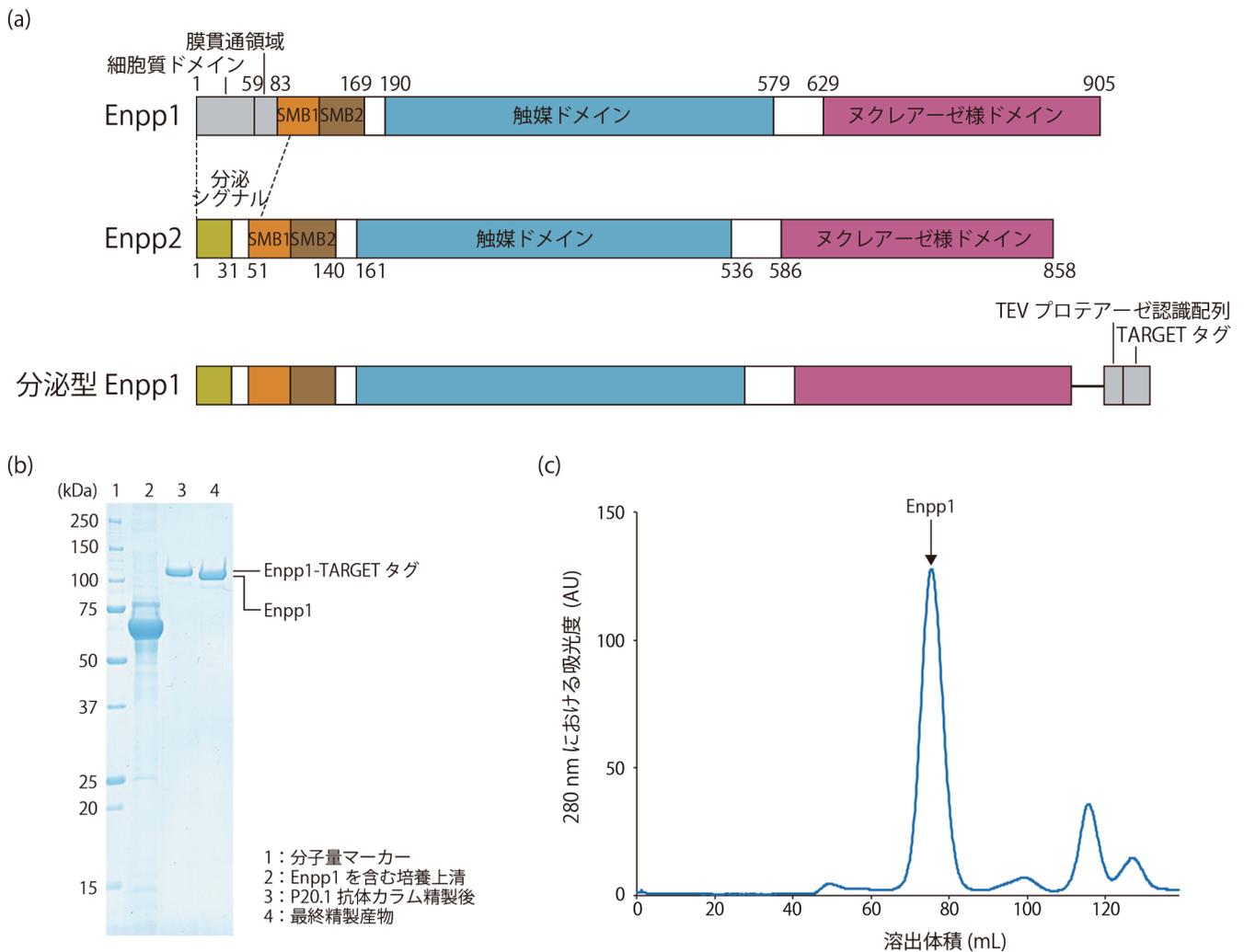


図 1-3 Enpp1 の調製

(a) 分泌型 Enpp1 のコンストラクト。Enpp1 の N 末端の細胞質ドメイン、および、膜貫通領域を Enpp2 の分泌シグナルに置き換えた。

(b) 各精製段階における SDS-PAGE

(c) 最終精製産物のゲル濾過クロマトグラフィーにおけるピーク。TEV プロテアーゼ処理後の Enpp1 を Superdex 200 HiLoad カラムに通した。Enpp1 は単量体として溶出する。

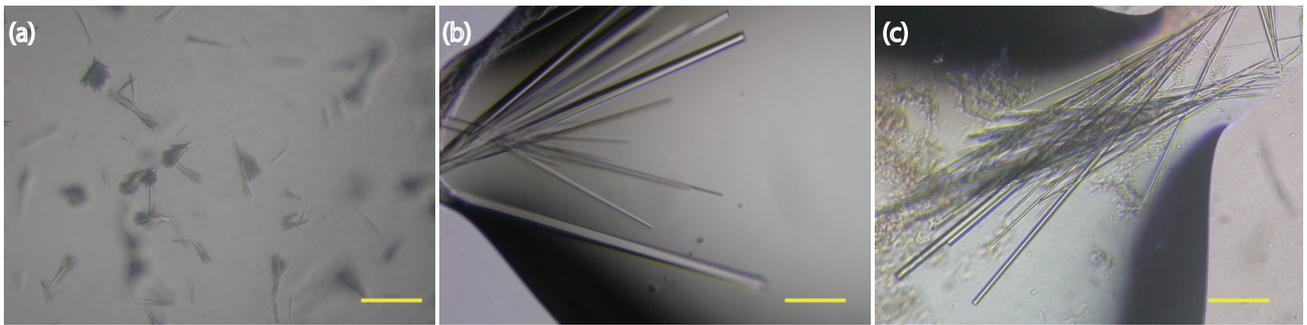


図 1-4 Enpp1 の結晶

- (a) 初期スクリーニングによって得られた Native Enpp1 の結晶
 (b) 結晶化条件の最適化によって得られた Native Enpp1 の結晶
 (c) SeMet 置換体 Enpp1-AMP 複合体の結晶. スケールバーは 100 μm を示している.

1.3.2 Enpp1 の結晶化

精製 Enpp1 を用いて結晶化スクリーニングをおこなったところ, MemGold No.38 の条件 (28%(v/v) PEG 400, 50 mM sodium acetate pH 5.0, 50mM magnesium acetate) において, 針状のクラスター結晶が得られた (図 1-4a). 結晶化条件の最適化をおこない, さらにハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて結晶化をおこなうことで, 最終的に 18% (v/v) PEG 600, 50 mM sodium acetate (pH 4.5), 50 mM magnesium acetate, 0.5% (w/v) polyvinyl pyrrolidone の条件において, 長さ約 500 μm の大きさのロッド状の結晶を得た (図 1-4b). SeMet 置換体 Enpp1 の結晶も最終的に同様の結晶化条件において得た (図 1-4c).

1.3.3 X線回折実験

得られた結晶について, SPring-8 BL32XU において X 線回折実験をおこなったところ, Native 結晶 (GMP, TMP, および, CMP 複合体) については 3.2 \AA 分解能 (図 1-5a), SeMet 置換体 Enpp1 (AMP 複合体) については 2.7 \AA 分解能 (図 1-5b) のデータセットを収集することに成功した. SeMet 置換体 Enpp1-AMP 複合体の結晶は空間群 $P3_1$ に属し, 格子定数は $a = b = 105.3 \text{\AA}$, $c = 173.7 \text{\AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$ であった. 他の複合体結晶についても, 同様の空間群, および, 類似した格子長であった. データセットの統計値を表 1-1 に示した.

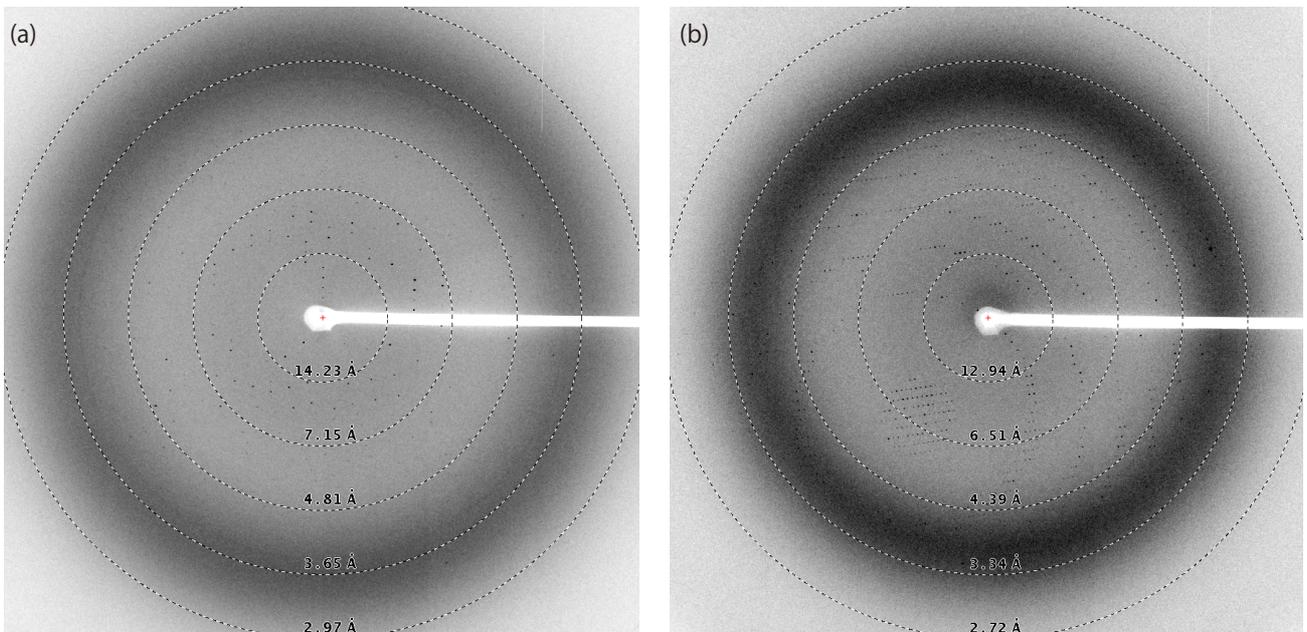


図 1-5 Enpp1 結晶の回折像

- (a) Native Enpp1-GMP 複合体結晶の回折像 (最大 3.0 \AA)
 (b) SeMet 置換体 Enpp1-AMP 複合体結晶の回折像 (最大 2.7 \AA)

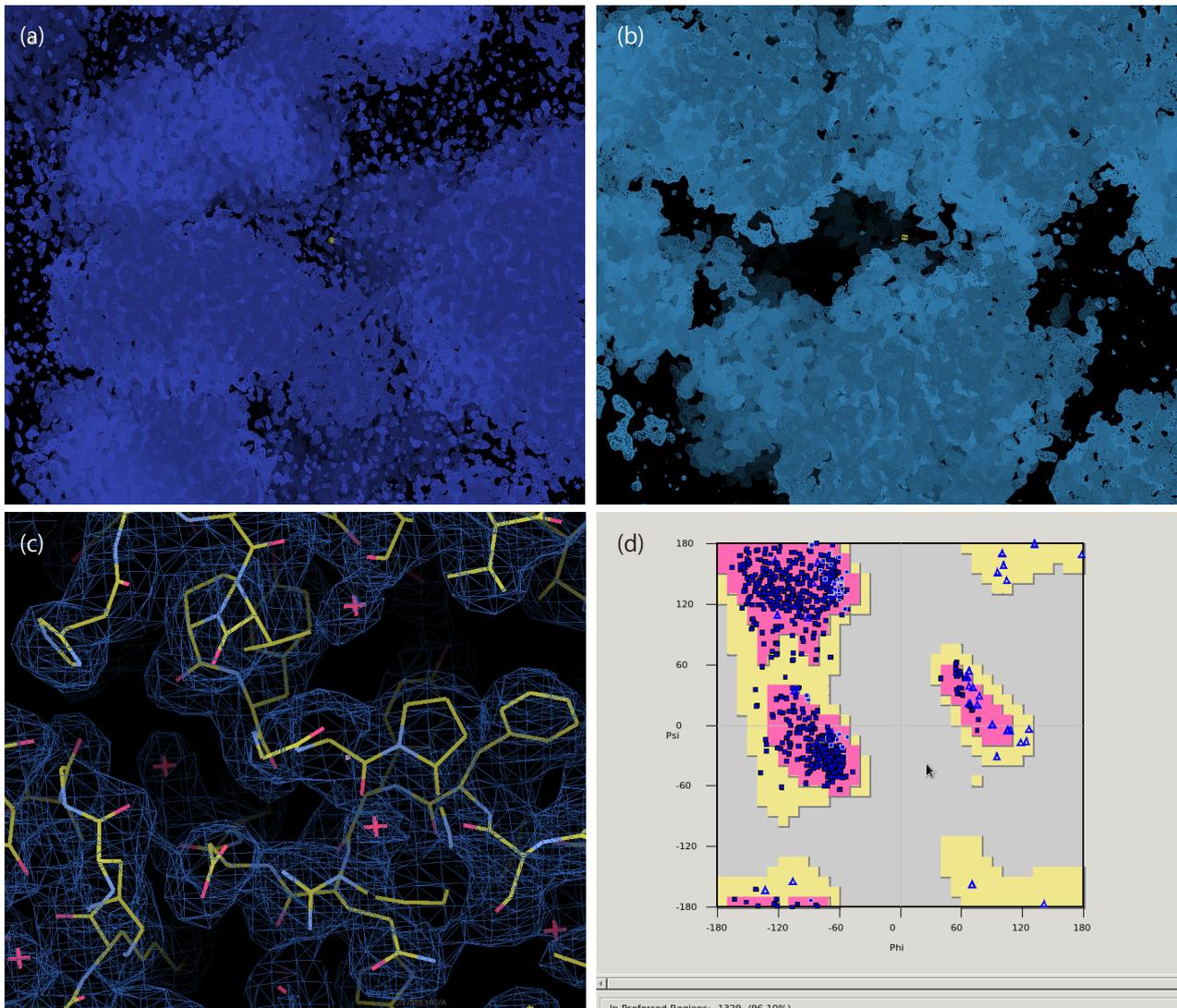


図 1-6 Enpp1 の構造決定

- (a) Enpp2 をサーチモデルとした分子置換法によって得られた 2Fo-Fc 電子密度マップ
- (b) Se 原子の異常分散を用いて実験的に決定した初期位相マップ
- (c) モデルビルディング後の最終的な 2Fo-Fc 電子密度マップ。Enpp1 分子を黄色で示した。それぞれのマップを青色のメッシュ、Contour level = 1.0 s で示した。
- (d) 最終的な Enpp1 のラマチャンドランプロット

1.3.4 位相決定, および, 構造精密化

2.7 Å 分解能の SeMet 置換体 Enpp1 の SAD データをもとに, Enpp2 の構造情報 (PDB ID: 3NKM) をサーチモデルとして分子置換をおこない, 回転・並進操作において有意な解を得た. 溶媒平滑化, および, NCS averaging をおこなったところ, タンパク質と溶媒領域が明確に区切られた電子密度マップを得た (図 1-6a). この電子密度マップをもとに, Coot によるモデルビルディング, および, PHENIX による構造精密化を繰り返したが, モデルバイアスの影響から電子密度マップが Enpp1 本来の正しい構造を反映せず, モデル構造と実験値との一致度を

示す R 値も下がらなかった ($R_{\text{free}} > 35\%$). そこで分子置換によって得た初期位相から, 異常分散差フーリエマップを計算し, 非対称単位当たり 22 の Se 原子の位置を特定した. この Se 原子の位置情報から SHARP によって実験的に位相を決定し, 溶媒平滑化をおこなったところ図 1-6b に示す電子密度マップを得た. この電子密度マップに対してモデルビルディングと構造精密化を繰り返したところ, 最終的に $R_{\text{free}} = 27\%$, $R_{\text{work}} = 24\%$ まで R 値を低下させることができた (図 1-6c). 最終的なモデルのラマチャンドランプロットを図 1-6d に, 構造精密化の統計値を表 1-1 にそれぞれ示した.

表 1-1 Enpp1 の回折データ, および, 構造精密化後の統計値

	Enpp1-AMP (SeMet)	Enpp1-TMP	Enpp1-GMP	Enpp1-CMP
Data collection				
Space group	$P3_1$	$P3_1$	$P3_1$	$P3_1$
Cell dimensions				
a, b, c (Å)	105.3, 105.3, 173.7	105.7, 105.7, 174.4	104.9, 104.9, 174.8	105.2, 105.2, 174.7
α, β, γ (°)	90, 90, 120	90, 90, 120	90, 90, 120	90, 90, 120
Resolution (Å)	50.00–2.70 (2.75–2.70)	50–3.20 (3.2–3.20)	50.0–3.20 (3.26–3.20)	50.00–3.20 (3.26–3.20)
R_{sym}	0.206 (0.533)	0.123 (0.360)	0.169 (0.521)	0.103 (0.384)
$I / \sigma I$	8.0 (1.9)	8.9 (1.9)	8.7 (2.0)	10.9 (1.8)
Completeness (%)	99.7 (97.5)	97.0 (92.0)	99.0 (98.4)	97.6 (92.9)
Redundancy	7.6 (4.7)	3.7 (2.4)	6.5 (4.1)	3.9 (2.6)
Refinement				
Resolution (Å)	48.88–2.70	49.01–3.20	49.04–3.20	49.06–3.20
No. reflections	58,176	34,864	35,399	34,877
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0.24 / 0.27	0.24 / 0.28	0.26 / 0.30	0.23 / 0.28
No. atoms	11,283	11,178	11,283	11,107
Protein	11,223	11,130	11,229	11,059
Ligand/ion	52	48	54	48
Water	8	0	0	0
B -factors (Å ²)				
Protein	49.9	81.4	92.9	94.3
Ligand/ion	49.3	73.5	88.3	82.1
Water	19.9	–	–	–
R.m.s. deviations				
Bond lengths (Å)	0.003	0.002	0.002	0.004
Bond angles (°)	0.773	0.642	0.735	0.973
Ramachandran plot				
Most favored (%)	96.91	97.04	96.96	97.04
Allowed (%)	3.09	2.96	3.04	2.96
Disallowed (%)	0.00	0.00	0.00	0.00

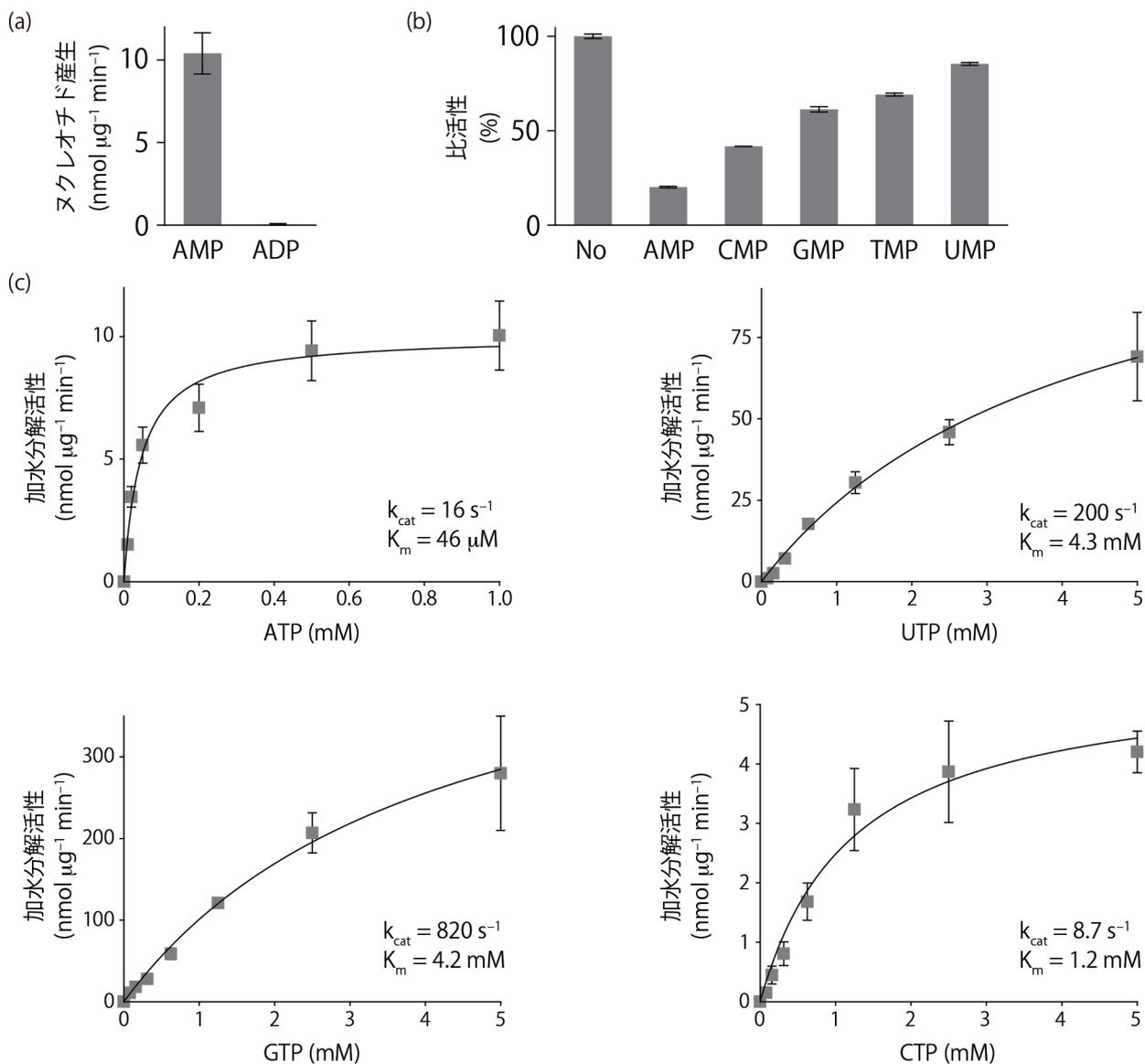


図 1-7 Enpp1 の生化学的解析

(a) Enpp1 は AMP とピロリン酸を特異的に産生する。ATP と Enpp1 を反応させた後に、反応産物に対して MS 解析をおこなった。

(b) 各 NMP による Enpp1 の活性阻害。NMP 存在下で Enpp1 による pNP-TMP に対する活性を測定した。

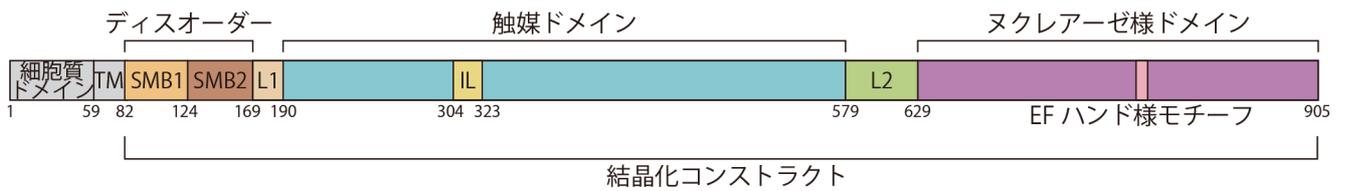
(c) Enpp1 の NTP に対する酵素反応速度論的解析。データは、平均 \pm 標準偏差 ($n = 3$) で示した。

1.3.5 Enpp1 の基質特異性

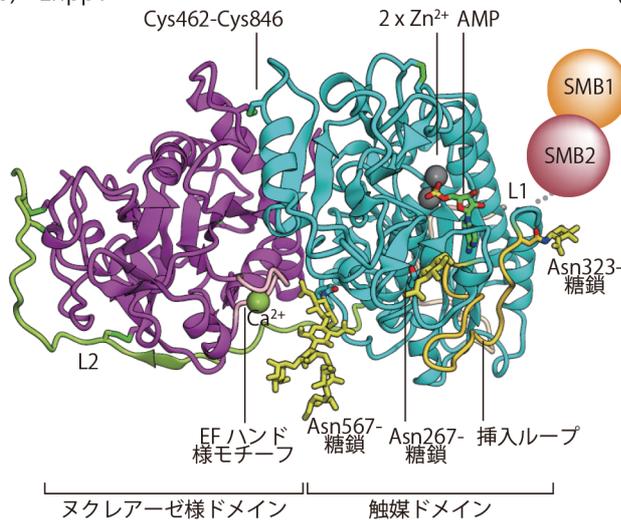
精製したマウス由来 Enpp1 を用いて、まず Enpp1 の基質特異性を詳細に調べた。Enpp1 と ATP を混合すると、AMP が主に産生され、ADP はほとんど産生されなかった (図 1-7a)。このことは、Enpp1 がヌクレオシド三リン酸の α リン酸と β リン酸の間のリン酸無水結合を加水分解することを示している。さらに Enpp1 がどのヌクレオチドを特異的に加水分解するか調べるために、NMP 存在下において pNP-TMP に対する加水分解活性を調べた。その結果、Enpp1 の pNP-TMP に対する加水分解活性は、AMP 存在下において最も阻害された (図 1-7b)。さらに

ATP, GTP, CTP, および、UTP について酵素反応速度論的解析をおこない、ミカエリス定数 (K_m), K_{cat} をそれぞれ算出した。その結果、基質との親和性を示すミカエリス定数は ATP に対して最も低く ($K_m = 46 \mu\text{M}$)、pNP-TMP アッセイの結果と一致して Enpp1 はアデニン塩基を含むヌクレオチドに対して最も特異的に認識している (図 1-7c)。また k_{cat}/K_m は ATP において最も高かった。以上の結果から、Enpp1 は ATP を最も効率良く加水分解して、AMP とピロリン酸を産生することが明らかとなった。

(a) マウス由来 Enpp1



(b) Enpp1



(c) Enpp2

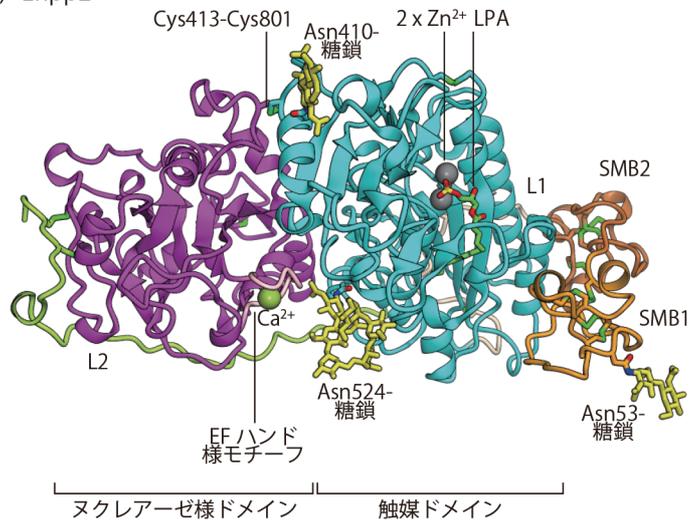


図 1-8 Enpp1 の全体構造

(a) Enpp1 のドメイン模式図

(b) Enpp1-AMP 複合体の結晶構造. 各ドメインを (a) にならって色分けした. ディスオーダーしていた SMB 様ドメインを模式的に円で示した. 糖鎖は黄色のスティックモデルで示した. 亜鉛イオン, および, カルシウムイオンは灰色, および, 黄緑色の球でそれぞれ示した.

(c) Enpp2-LPA 14:0 複合体 (PDB ID 3NKN) の結晶構造

1.3.6 Enpp1 の全体構造

1.3.5 で調べた Enpp1 の基質特異性の構造基盤を理解するために, マウス由来 Enpp1-NMP (AMP, GMP, CMP, TMP) 複合体の構造を 2.7-3.2 Å 分解能で決定した. これら 4 つの構造はほとんど同一であった (rmsd 値 < 0.2 Å). そのため, 以降特に記述がない限りは, 最も分解能の高かった Enpp1-AMP 複合体の構造について記述する. Enpp1 の構造は触媒ドメイン (190-578 残基), ヌクレアーゼ様ドメイン (629-902 残基), および 2 つのリンカー, L1 (170-189 残基), L2 (579-628 残基) から構成されていた (図 1-8a, b). 触媒ドメインはヌクレアーゼ様ドメインと相互作用し, L2 によって 2 つのドメインはつながれていた. 結晶構造中で Asn267, Asn323, および, Asn567 において N 結合型糖鎖に相当する電子密度が観察され, ドメイン間の相互作用は Asn323 結合型糖鎖, および, Cys462-Cys846 間のジスルフィド結合によって固定されていた. これらの構造は過去に決定されたマウス由来 Enpp2 の構造と類似していた (図 1-8c)^{31,39}.

1.3.7 触媒ドメイン

触媒ドメインは中央でツイストした β シートが α ヘリックスに囲まれた α/β フォールドをとる (図 1-9a). Enpp1 の触媒ドメインは, Enpp2 の触媒ドメイン (rmsd = 1.1 Å), および, Enpp の細菌ホモログである XaNPP (rmsd = 1.6 Å) に構造的に類似していた (図 1-9b,c)^{30,31,39}. Enpp2 や XaNPP は 2 つの亜鉛イオンを補酵素として活性部位に結合するが^{30,31}, Enpp1 においても 2 つの亜鉛イオンが活性部位に結合していた (図 1-9a). 2 つの亜鉛イオンは, 保存された Asp358, His362, His517, および, Asp200, Thr238, Asp405, His406 によってそれぞれ配位されていた. 加水分解産物である AMP の α リン酸は 2 つの亜鉛イオンの間に位置しており, 活性残基の Thr238 の近傍に位置していた. このことは, Enpp1 が α リン酸と β リン酸の間を加水分解することを構造的に示しており, 1.3.5 において得られた「Enpp1 が AMP とピロリン酸を特異的に産生する」という生化学的解析の結果と一致する (図 1-7).

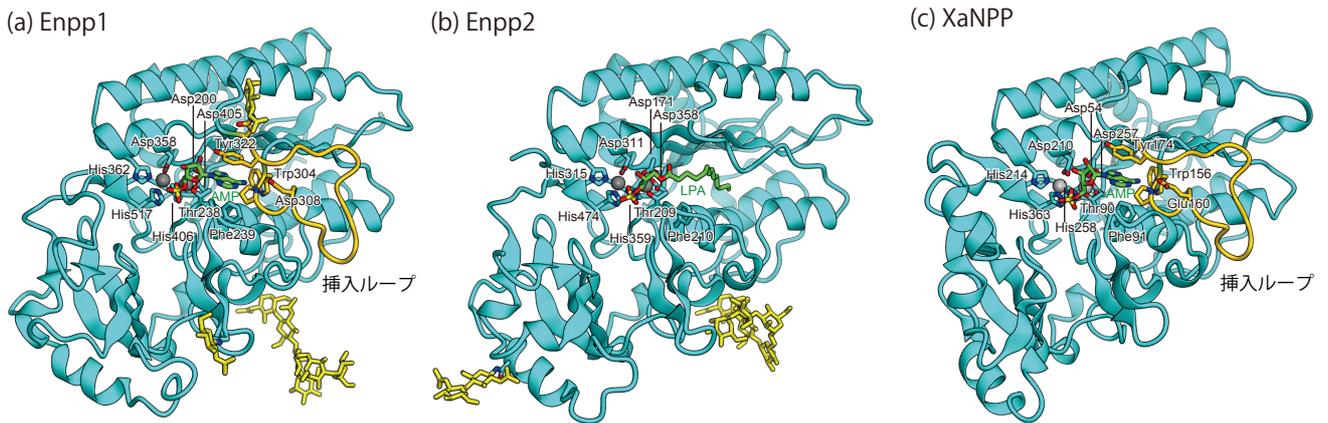


図 1-9 触媒ドメインの構造比較

- (a) Enpp1-AMP 複合体の触媒ドメインの結晶構造
- (b) Enpp2-14:0 LPA 複合体 (PDB ID 3NKN) の触媒ドメインの結晶構造
- (c) XaNPP-AMP 複合体 (PDB ID 2GSU) の結晶構造

亜鉛イオンは灰色の球で、挿入ループは金色でそれぞれ示した。N 結合型糖鎖は黄色のスティックモデルで示した。

1.3.8 ヌクレアーゼ様ドメイン

ヌクレアーゼ様ドメインは、非特異的なエンドヌクレアーゼ、NucA に類似した α/β フォールドをとっていた (図 1-10a, b)⁴⁰。Anabaena 由来の NucA における活性残基の Arg93, Asn155 は、Enpp1 において欠失、または、Gln750 に置き換わっていたことから、Enpp1 のヌクレアーゼ様ドメインはヌクレアーゼ活性を持たないことが構造から示唆された。また Enpp1 のヌクレアーゼ様ドメインは Enpp2 のヌクレアーゼ様ドメインに構造的に類似して

いた (rmsd = 1.4 Å)^{31,39}。触媒ドメインとの境界において、カルシウムイオンが Asp780, Asp782, Asp784, および、Arg786 と配位して、Enpp2 と同様に EF ハンド様の構造 (EF ハンド様モチーフ) を形成していた。EF ハンド様モチーフは、Enpp2 の両方において、機能発現に重要であることが報告されている³⁹。これらのことから Enpp1 のヌクレアーゼ様ドメインはヌクレアーゼ活性を失って、触媒ドメインを構造的に支持する役割を持つことが示唆された。

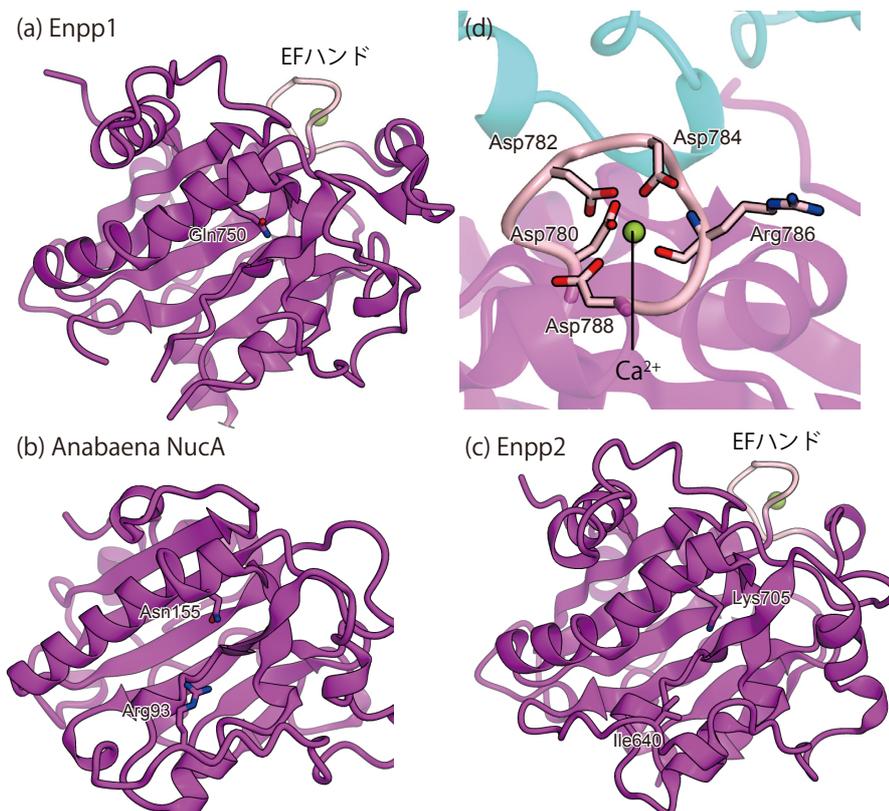


図 1-10 Enpp1, Enpp2 のヌクレアーゼ様ドメイン、および、Anabaena NucA の構造比較

- (a) Enpp1-AMP 複合体のヌクレアーゼ様ドメインの結晶構造
- (b) Enpp2-14:0 LPA 複合体 (PDB ID 3NKN) のヌクレアーゼ様ドメインの結晶構造
- (c) Anabaena NucA (PDB ID 1ZM8) の結晶構造
- (d) Enpp1 の EF ハンド様モチーフの拡大図

カルシウムイオンは黄緑色の球で、EF ハンド様モチーフはピンクでそれぞれ示した。Anabaena NucA の活性残基、および、Enpp において相当する残基は紫色のスティックモデルで示した。

1.3.9 SMB 様ドメイン

過去に決定された Enpp2 の構造中では N 末端の 2 つの SMB 様ドメイン (SMB1, SMB2) が触媒ドメインと相互作用して、基質 LPC を認識する疎水性ポケットの形成に関与していた³¹。一方で、今回決定した Enpp1 の結晶構造では 2 つの SMB 様ドメインに相当する電子密度は観察されなかった。Enpp1 の結晶を SDS-PAGE によって展開したところ精製 Enpp1 と同じ分子量にバンドとしてあらわれた (図 1-11a) ことから、結晶化中に SMB 様ドメインが切断されていないことを確認した。以前報告された Enpp1 の SMB1 の溶液構造 (PDB ID 2YS0) は、Enpp2 の SMB1 の構造に類似していた (rmsd = 1.2 Å)³¹。また Enpp1 の SMB2 は、Enpp2 の SMB2 と 48% と高い配列相同性を持ち、Enpp1 の SMB2 も Enpp2 の SMB と類似した構造をとることが示唆される。Enpp2 で触媒ドメイン上の Arg283, Gln290, Gln344 は SMB2 と相互作用していたが、Enpp1 では Glu330, Glu337, Asp391 にそれぞれ置き換えら

れていた (図 1-11c)。さらに Enpp1 には活性部位の近傍にループ構造 (挿入ループとして後述) が存在することで、立体障害のために、Enpp2 と同じ様式で SMB 様ドメインと結合できないことが示唆された。これらのことから Enpp1 の SMB 様ドメインは単一のドメインとしてはリジッドな構造をとるが、触媒ドメインとは相互作用せずに構造的にフレキシブルであることが示唆された。さらに SMB 様ドメインの触媒活性への影響を調べるために、SMB 様ドメインを欠失した Enpp1 を用いて pNP-TMP アッセイをおこなったところ、SMB 様ドメインを欠失した Enpp1 は、野生型 Enpp1 と同等のヌクレオチド加水分解活性を示した (図 1-11d)。このことから Enpp1 の SMB 様ドメインはヌクレオチドの加水分解性には関与しないことが示された。Enpp1 が II 型膜貫通タンパク質であることを考えると、Enpp2 とは異なり Enpp1 の SMB 様ドメインは、膜貫通領域と触媒ドメインをつなぐ膜アンカーとして働くと考えられる。

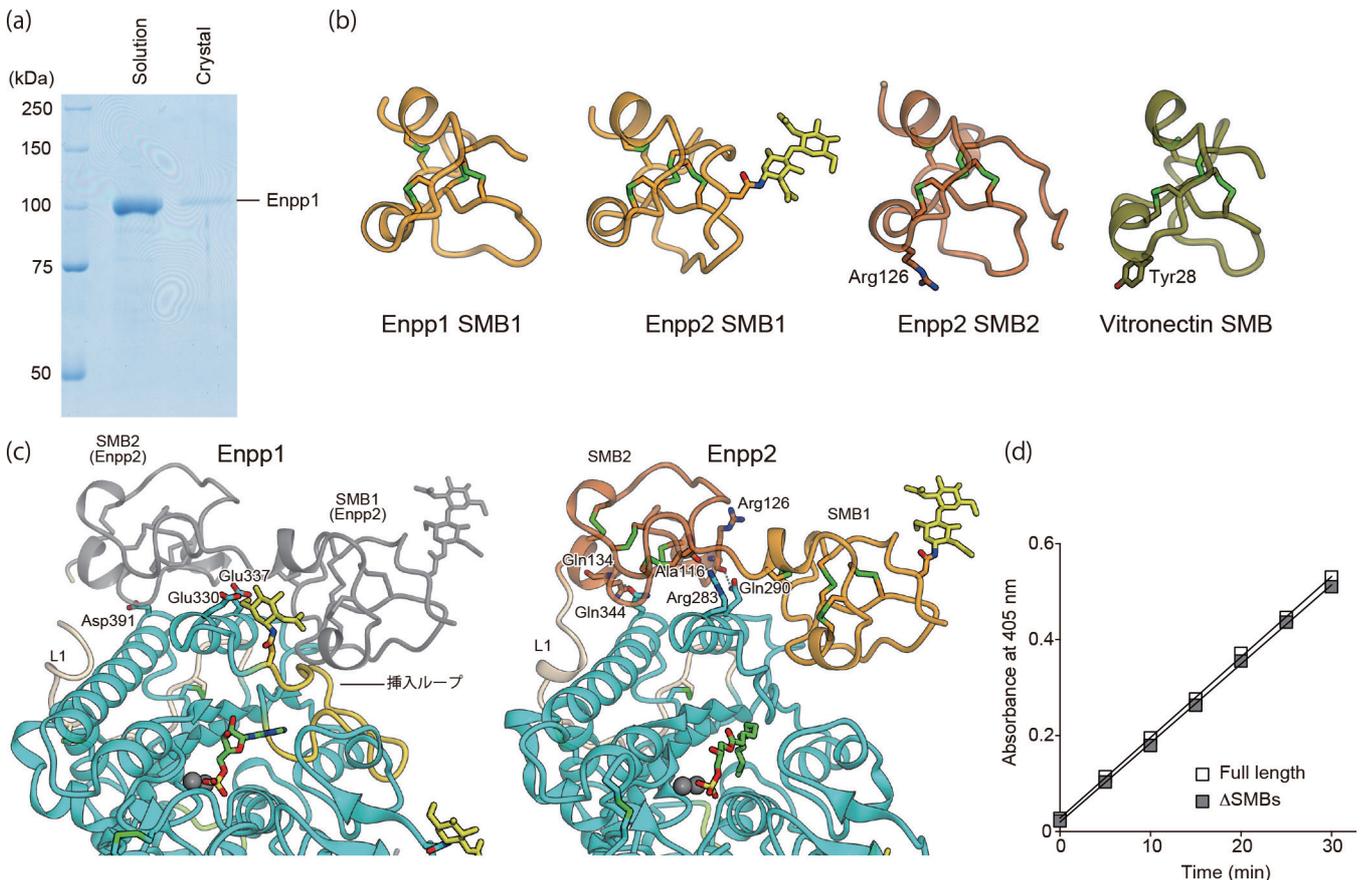


図 1-11 Enpp1 の SMB 様ドメイン

- (a) Enpp1 結晶は SMB 様ドメインを含む。精製 Enpp1 と Enpp1 結晶を SDS-PAGE で展開した。
- (b) Enpp1 の SMB1 の溶液構造 (PDB ID 2YS0), Enpp2 の SMB1 と SMB2 の結晶構造 (PDB ID 3NKM), ビトロネクチンの SMB の結晶構造 (PDB ID 1OC0)。
- (c) Enpp1 (左) と Enpp2 (右) の構造比較。Enpp2 の SMB 様ドメイン (PDB ID 3NKM, 灰色) と Enpp1 の重ね合わせ。Enpp1 の触媒ドメインと Enpp2 の SMB1 が立体障害を起こしている。
- (d) SMB 様ドメインは Enpp1 の触媒活性には影響を与えない。全長、および、SMB1, SMB2 を欠損した Enpp1 (DSMBs) を用いて pNP-TMP に対する加水分解活性を測定した。

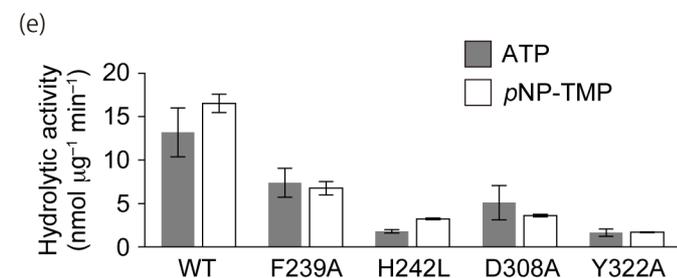
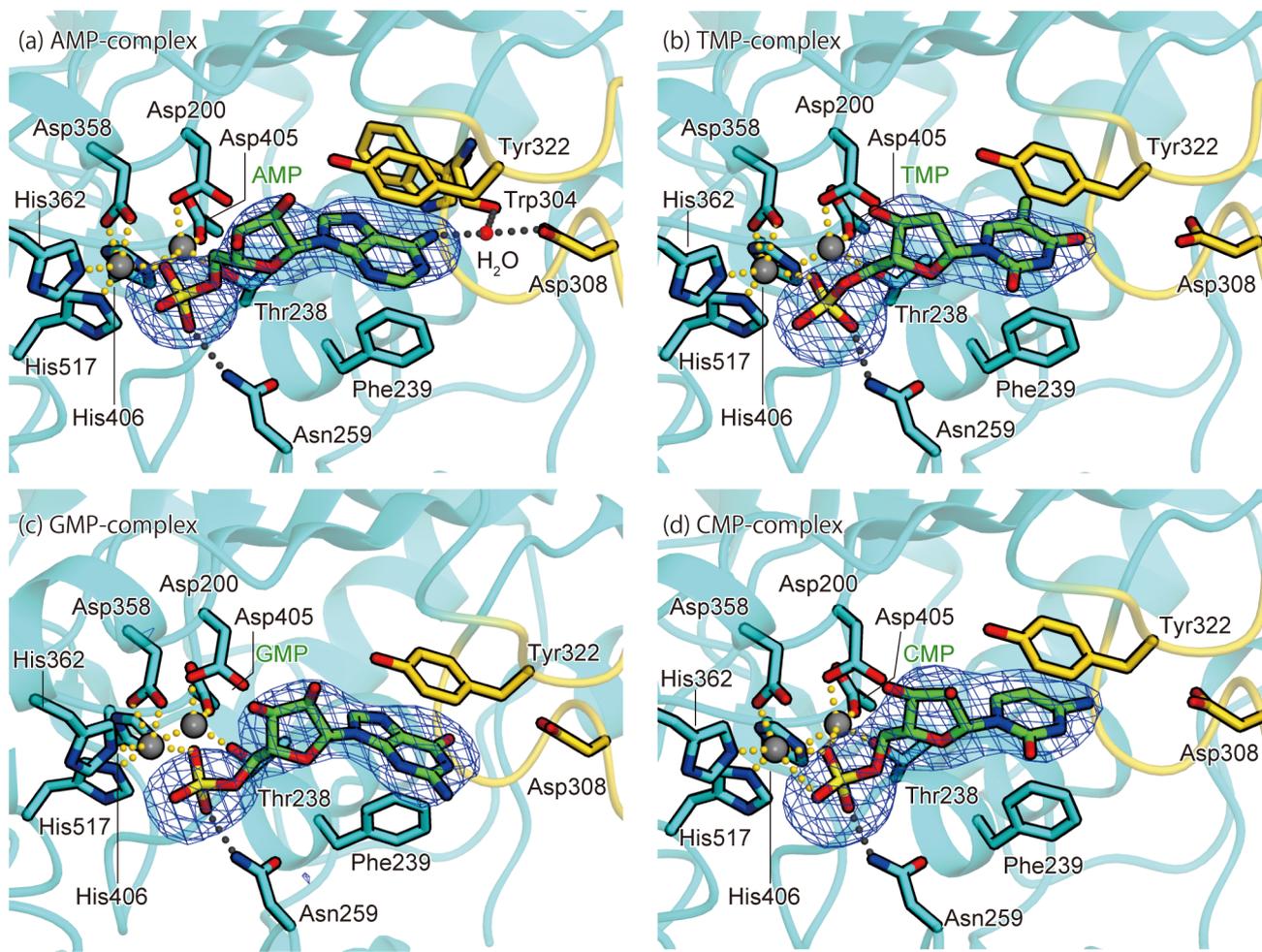


図 1-12 Enpp1 によるヌクレオチド認識

AMP (a), TMP (b), GMP (c), および, CMP (d) 複合体における Enpp1 の活性部位の拡大図。結合した各 NMP を緑色のスティックモデルで示した。ヌクレオチドの F_0 - F_c オミット電子密度マップ (3.5 Å) を青色のメッシュで表示した。亜鉛イオンと水分子は灰色と赤色の球でそれぞれ

示した。水素結合, および, 配位結合は灰色と黄色の点線でそれぞれ示した。

(e) 各 Enpp1 変異体の ATP, および, pNP-TMP に対する加水分解活性。データは, 平均 \pm 標準偏差 ($n = 3$) で示した。

1.3.10 ヌクレオチド認識

Enpp1 のアデニン塩基に対する嗜好性を構造的に理解するために, Enpp1-NMP 複合体の活性部位の拡大図を (図 1-12a-d) に示した。NMP のリン酸部位, および, リボース部位は, 各ヌクレオチド間で同じように認識されていた。ベース部位は, Phe239, Tyr322 に挟まれており, ベース部位とそれぞれ face-to-edge, face-to-face で相互作用を形成していた。この認識様式においてはシトシンやチミンなどのピリミジン塩基に比べて, アデニンやグアニンなどのプリン塩基の方が, より強く認識されると考えられる。さらに AMP の N6 原子は Trp304 の主鎖, およ

び, Asp308 の側鎖と水を介した水素結合を形成していた (図 1-12a)。その一方で他のヌクレオチド (GMP, CMP, TMP) のベース部位は Enpp1 と水素結合を形成していなかった。このことから, 1.3.5 で見られた Enpp1 のアデニン環に対する嗜好性を構造的に説明することができた。Phe239, Asp308, Tyr322 はヒト由来 Enpp1 においても保存されている (図 1-13)。さらに F239A, D308A, Y322A 変異体は WT の Enpp1 に比べて, ATP, pNP-TMP に対する加水分解活性が著しく低下した (図 1-12e) ことから, これらのアミノ酸残基のヌクレオチド認識に対する重要性が確かめられた。

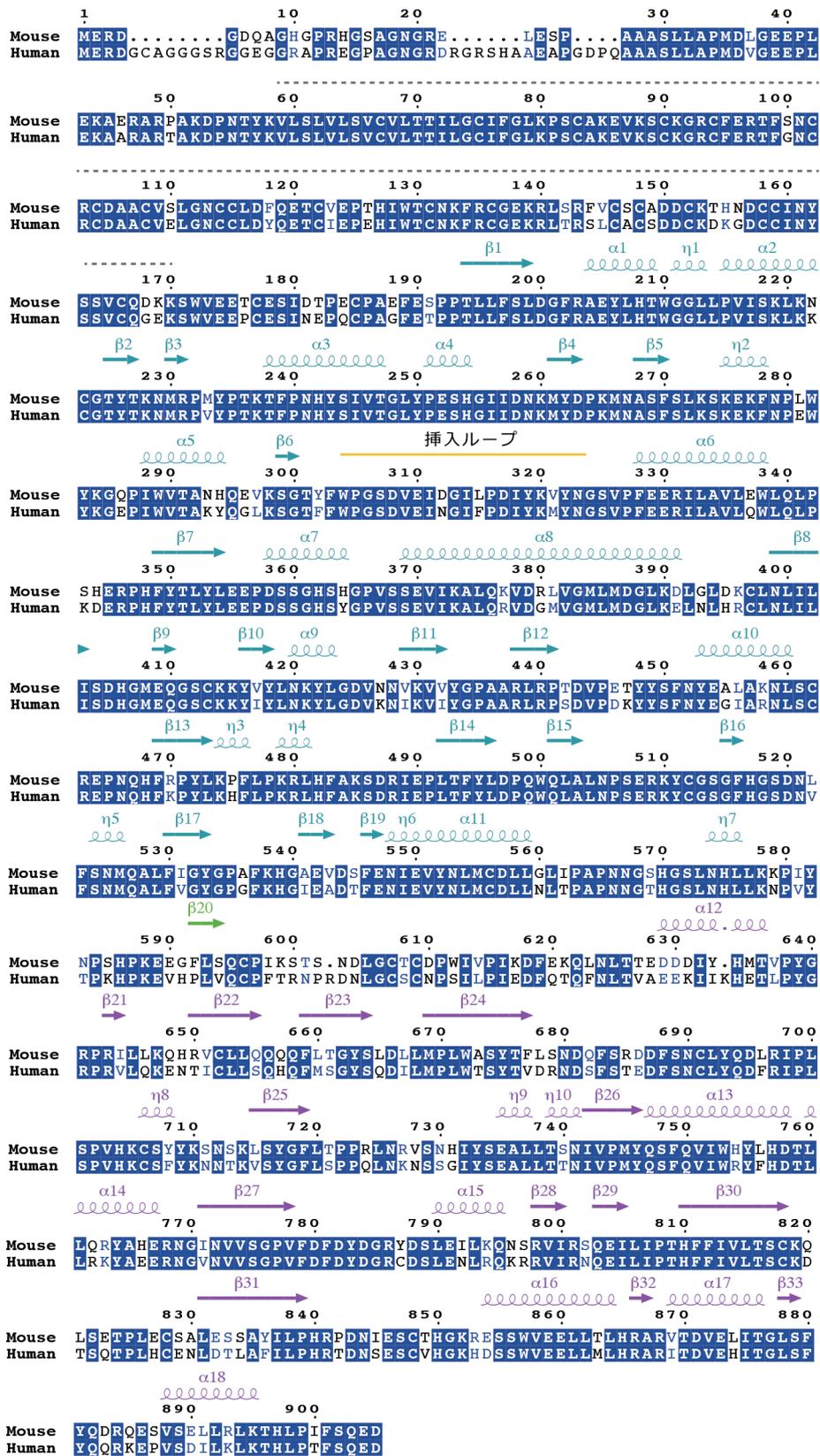


図 1-13 マウス由来 Enpp1 とヒト由来 Enpp1 の配列アライメント

マウス由来 Enpp1 の二次構造をアライメントの上に示した。点線で示した領域は結晶構造中でディスオーダーしていた。

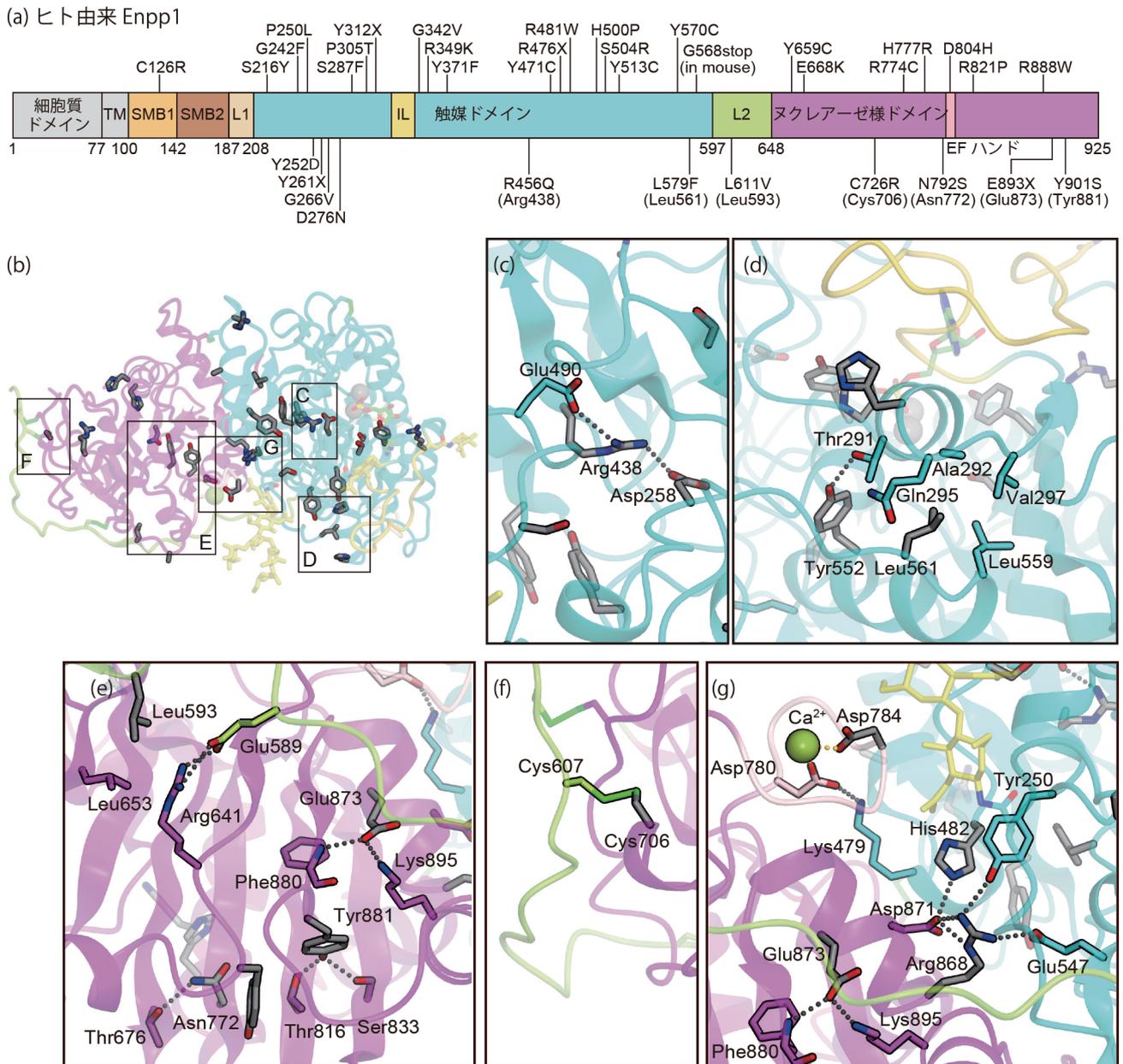


図 1-14 骨疾患に関わる変異の構造的マッピング

- (a) ヒト由来 Enpp1 の一次配列における GACI に関わる変異のマッピング
- (b) マウス由来 Enpp1 の結晶構造における骨疾患に関わる変異のマッピング
- (c-g) 相互作用の拡大図

1.3.11 Enpp1 の変異による骨疾患の発症メカニズム

ヒトにおいて Enpp1 遺伝子の変異は、GACI とよばれる異所的な石灰化をとまなう致死性の疾患を引き起こすことが知られている (図 1-14a)¹³⁻¹⁵。これらの Enpp1 遺伝子の変異がどのように骨疾患に関わるのか理解するために、報告されている遺伝子変異を今回得られた構造にマッピングした (図 1-14b)。これらの変異のほとんどは触媒ドメイン、またはヌクレアーゼ様ドメインに位置していた。R456Q, L579F, L611V, C726R, N792S, E893X, および、Y901S の変異は、Enpp1 の酵素活性を低下させることが知られている。マウス由来 Enpp1 の結晶構造中で

これらのアミノ酸残基はドメイン内もしくはドメイン間で相互作用を形成していた。触媒ドメイン中で、Arg456 (ヒト由来 Enpp1 で Arg456 に相当) は Asp258, Glu490 と水素結合を形成していた (図 1-14c)。Leu561 (Leu579) は Thr291, Ala292, Gln295, Val297, Leu559 と疎水性コアを形成して、触媒ドメインを安定化していた (図 1-14d)。ヌクレアーゼ様ドメイン中では、Glu873 (Glu893) は Lys895 と Phe880 と相互作用していた (図 1-14e)。Asn772 (Asn792) は Thr676 と、Tyr881 (Tyr901) は Thr816, Ser833 とそれぞれ水素結合を形成していた (図 1-14e)。これらのことから、これらの変異はドメイン内において相互作用の欠失、

もしくは、周辺のアミノ酸残基との立体障害を引き起こすことが示唆された。さらに骨疾患を引き起こす変異は、ドメイン間の境界領域にも存在していた。L2 リンカー上の Leu593 (Leu611) はヌクレアーゼ様ドメインの Arg641, Leu653 と相互作用しており, Arg641 はさらに L2 リンカー上の Glu589 と相互作用している (図 1-14e)。ヌクレアーゼ様ドメイン上の Cys706 (Cys726) は L2 リンカー上の Cys607 とジスルフィド結合を形成していた (図 1-14f)。His482 (His500) は Asp871 と, Arg868 (Arg888) は Tyr250, Glu547 とそれぞれ水素結合を形成していた (図 1-14g)。Asp784 (Asp804) は EF ハンド様モチーフに位置し, このモチーフ内の Asp780 は触媒ドメインの Lys479 と相互作用していた (図 1-14g)。これらの結果はドメイン間の相互作用が Enpp1 の機能発現において重要であることを示している。以上のことから, 骨疾患を引き起こす変異は Enpp1 の構造を不安定化させることによって, Enpp1 のピロリン酸産生活性を低下させることが明らかとなった。

1.3.12 インスリンシグナルへの関与に対する構造的洞察

Enpp1 は直接インスリン受容体に結合して, インスリンの結合に伴う構造変化を妨げることで, インスリンシグナルを阻害することが報告されている²²。Enpp1 遺伝子の K173Q の多型は肥満や II 型糖尿病の発症リスクに関連し²³, さらに K173Q 変異体タンパク質は野生型よりもより強くインスリン受容体に結合して, インスリンシグナルを阻害する²⁵。Lys173 はマウス由来 Enpp1 ではヒスチジン残基に置き換えられていることから, この多型はヒトに特異的であると考えられる。ヒト由来 Enpp1 の Lys173 は SMB2 に位置しており, 今回決定したマウス由来 Enpp1 の結晶構造中では SMB2 はディスオーダーしていた (図 1-8a)。SMB 様ドメインは, しばしば細胞外において他のタンパク質との相互作用を担う足場ドメインとして用いられる。例えば Enpp2 は SMB2 を介してインテグリンと結合し³⁹, またビトロネクチンは SMB を介して uPAR や PAI-I といった細胞外因子と相互作用する^{41,42}。ヒト由来 Enpp1 の Lys173 は, マウス由来 Enpp2 の Arg126, ビトロネクチンの Tyr28 にそれぞれ相当する (図 1-11a)。マウス由来 Enpp2 の Arg126 は結晶構造中で溶媒に露出し³⁹, ビトロネクチンの Tyr28 は PAI-I や uPAR との結合に関わる^{41,42}。これらのことから, ヒト由来 Enpp1 においても Lys173 は溶媒に露出していることが示唆され, インスリン受容体との結合に関与するという過去の知見を支持することができた。

1.3.13 Enpp1 の cGAMP 切断活性に対する構造的洞察

近年, Enpp1 は ATP を含むヌクレオシド三リン酸だけでなく, AMP と GMP が環状にリン酸ジエステル結合によってつながった cGAMP を加水分解し, cGAS-STING 経路と呼ばれる自然免疫経路を負に制御することが明らかとなった (cGAS-STING 経路については第二章で詳述する)。本研究で決定した Enpp1-AMP 複合体では, 触媒ポケットに結合した AMP の 5'- α リン酸周辺には cGAMP のグアノシンを収容できるスペースが存在している (図 1-12a)。生化学的な解析によって, Enpp1 は cGAMP の G(2'-5')pA のリン酸ジエステル結合をまず加水分解し, 次に A(3'-5')pG のリン酸ジエステル結合を加水分解する。このことは Enpp1 が一回目の加水分解ではアデノシン部位を, 一回目の加水分解ではグアノシン部位をヌクレオチド結合ポケットにそれぞれ収容することを示している。このことは, 本研究で明らかにした「Enpp1 がアデニン塩基特異的に認識する」という事実と一致する (図 1-7, 図 1-12a-d)。さらに, Enpp1 は 3'-5' cGAMP は加水分解せず, 2'-5' cGAMP を特異的に加水分解することが報告されている (cGAMP の結合特異性については第三章で詳述する)。このことから, Enpp1 は G(2'-5')pA と G(3'-5')pA のリン酸結合を見分ける機構を持つと考えられるが, その詳細は不明である。Enpp1 による 2'-5' cGAMP 認識機構の解明のためにも, Enpp1-2'-5' cGAMP 複合体の構造決定が期待される。

1.3.14 Enpp2 との構造比較

Enpp1 はヌクレオチドを基質とする一方で, Enpp2 は脂質 LPC を基質として加水分解する (図 1-1b)。Enpp1 と Enpp2 で異なる基質特異性を規定する構造基盤を理解するために, 過去に決定された Enpp2-LPA14:0 複合体 (3NKN) と Enpp1-AMP 複合体の構造を比較した。Enpp2 では触媒ドメインに存在する疎水性のポケットが LPA のアシル基を認識していた (図 1-15c)³¹。一方で Enpp1 では疎水性ポケットは特徴的なループ構造中の WPG モチーフ (Trp304, Pro305, Gly306) によって塞がれていた (図 1-15a)。このことから Enpp1 が Enpp2 のように LPC を分解できないことが構造的に説明できる。Enpp1 のループ構造に相当するアミノ酸残基は Enpp2 では欠失していることから (図 1-15e), このループを挿入ループ (Insertion Loop: IL) と名付けた。挿入ループ上の Trp304 は Leu196, Ser198, His242, Ile245, Val246, Trp289, および, Thr351 と疎水性のコアを形成してヌクレオチド結合ポケットの形成に寄与していた (図 1-15b)。さらにヌクレオチドのベース部位の認識に重要な Tyr322 や Asp308 もこの挿入ループ

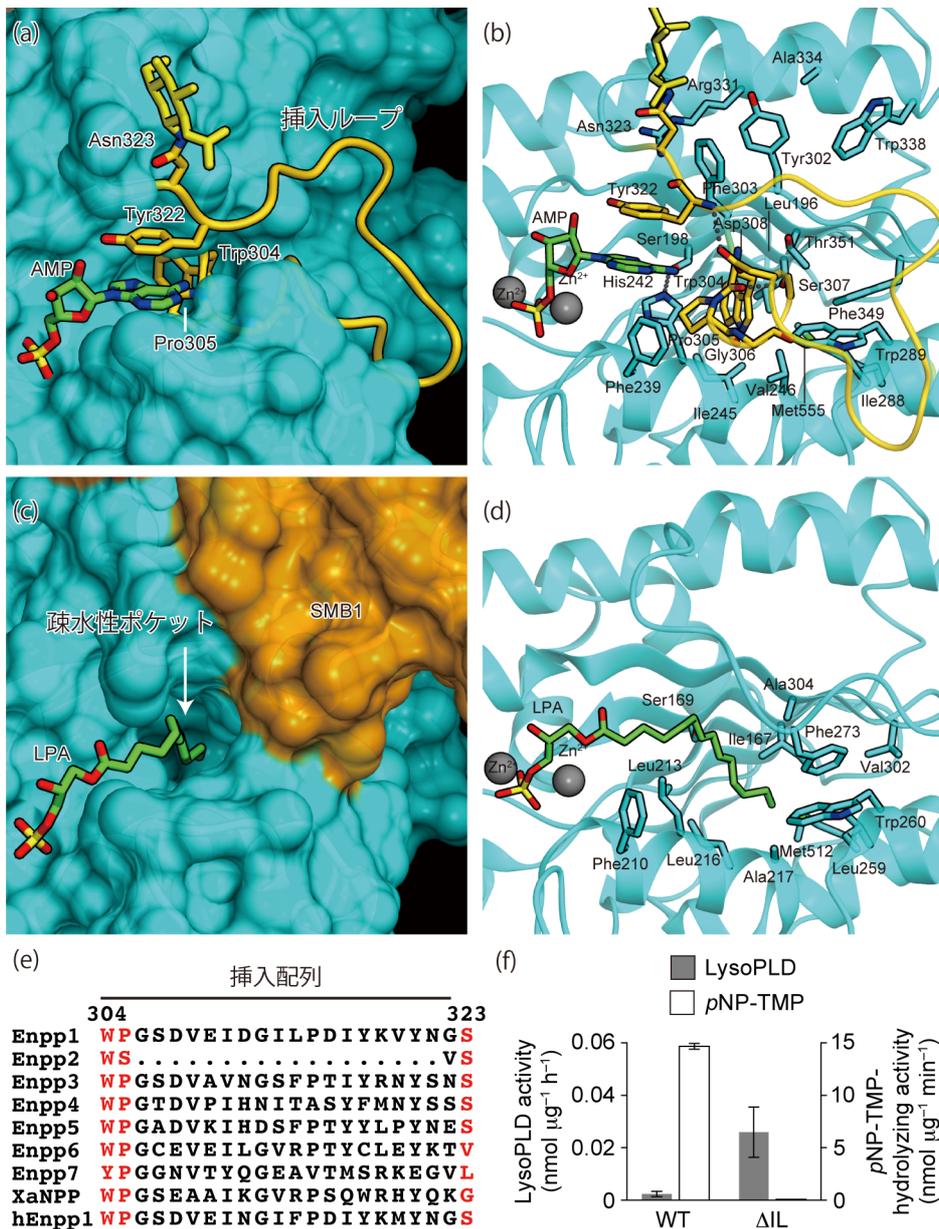


図 1-15 Enpp1 と Enpp2 の基質特異性

(a) Enpp1 の分子表面. 挿入ループが疎水性のポケットを塞いでヌクレオチド結合ポケットを形成している.

(b) Enpp1 のヌクレオチド結合ポケット. ニュクレオチド結合ポケットの形成に関与するアミノ酸残基をスティックモデルで、挿入ループを金色のチューブでそれぞれ示した.

(c) Enpp2 (PDB ID 3NKN) の分子表面. 疎水性のポケットが LPA のアシル基を収容している.

(d) Enpp2 の疎水性ポケット. 疎水性ポケットに関与するアミノ酸残基をスティックモデルで示した.

(e) Enpp ファミリー間における挿入配列のアライメント

(f) 野生型, および, Δ IL 変異体 Enpp1 の LPC, ニュクレオチドに対する加水分解活性. データは, 平均 \pm 標準偏差 ($n = 3$) で示した.

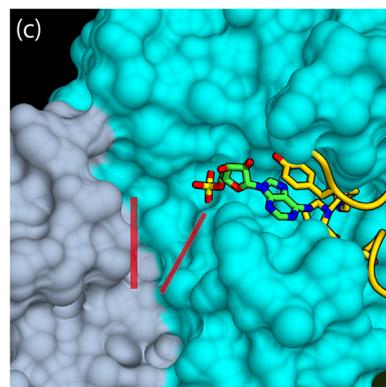
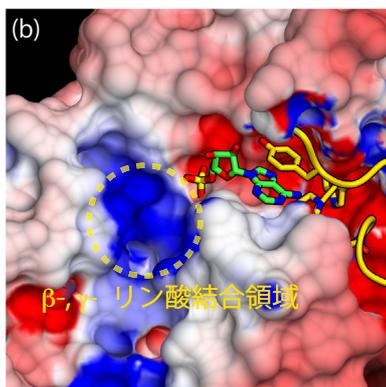
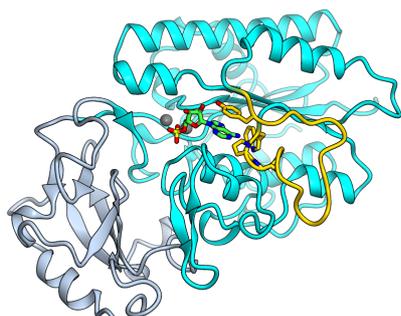
上に位置している. そこで, この挿入ループが, Enpp1 と Enpp2 で異なる基質特異性を決定づけているのではないかと考え, 挿入ループを欠失した Enpp1 変異体 (Δ IL) を作製し, pNP-TMP, および, LPC に対する加水分解活性をそれぞれ測定した. その結果, Δ IL 変異体は WT の Enpp1 に比べて pNP-TMP 加水分解活性を著しく低下させた (図 1-14f). このことから Enpp1 の挿入ループがヌクレオチドの認識に重要であることが確かめられた. さらに Δ IL 変異体 Enpp1 は LysoPLD 活性を示して LPC を加水分解した (図 1-15f) ことから, Δ IL 変異体では挿入ループの欠損によって疎水性ポケットがオープンになったと考えられる. 但し, Δ IL Enpp1 変異体の LysoPLD 活性 ($0.025 \text{ nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) は Enpp2 の LysoPLD 活性 $38 \text{ nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ に比べて著しく低い. Enpp2 で疎水性ポケットを形成していたアミノ酸残基 (Ile167, Leu213, Leu216, Ala217,

Leu259, Trp260, Phe273, Val302, Ala304, Met512) は Enpp1 の Leu196, His242, Ile245, Val246, Ile288, Trp289, Tyr302, Phe349, Thr351, Met555 に相当する (図 1-15b,d). そのため Enpp1 の His242, Val246, Phe349, Thr351 をより小さいアミノ酸に変えることで, LysoPLD 活性のさらなる上昇につながると考えられる. 以上をまとめると Enpp1 の挿入ループを欠損させることで, Enpp2 様の LysoPLD 活性を持たせることに成功したことから (図 1-15f), 挿入ループが Enpp1 と Enpp2 の異なる基質特異性を主に規定していることが明らかとなった.

1.3.15 他の Enpp ファミリーの基質特異性に対する構造的洞察

1.3.13 において挿入ループが Enpp1 と Enpp2 の異なる基質特異性を主に規定していることが明らかとなった. 興

(a) Enpp1-AMP 複合体



Enpp4-AMP 複合体

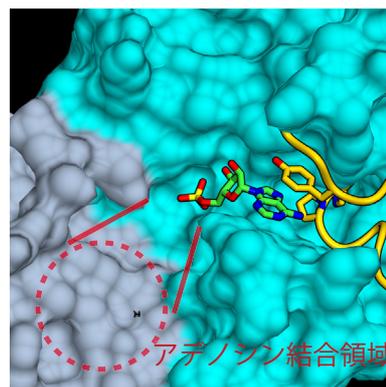
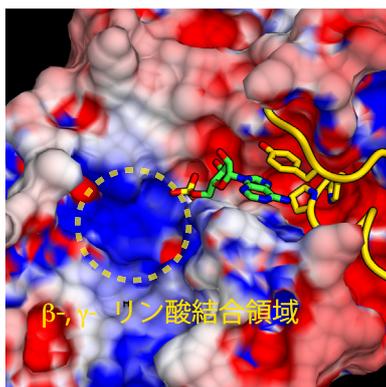
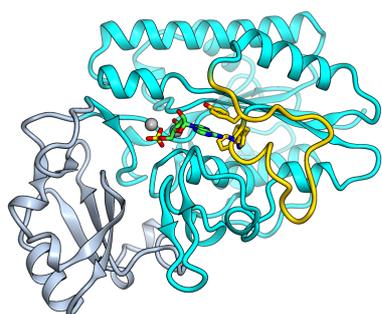


図 1-16 Enpp1, Enpp4 の構造比較、および、基質特異性に関する洞察

(a) Enpp1 (上), Enpp4 (PDB ID 4LQY, 下) のリボンモデル

(b) Enpp1, および, Enpp4 の表面電荷。b-,g- リン酸の結合すると予想される部位を黄色の点線で示した。

(c) Enpp1, および, Enpp4 の分子表面。

味深いことに、Enpp1 の挿入ループに相当する配列は Enpp2 を除く全ての Enpp ファミリータンパク質において見られ、その配列はファミリー間で多様である (図 1-15e)。このことから挿入配列は他の Enpp ファミリータンパク質においても基質特異性を決定づけていると考えた。Enpp6 は Enpp2 と同様に LPC を基質として加水分解するが、Enpp2 が LPA を産生するのに対して、Enpp6 はホスホコリンを産生する (図 1-1b) ⁷。Enpp6 は挿入配列内に WPG モチーフを持つことから、Enpp1 と同様、アシル基を認識する疎水性ポケットは塞がれていることが予想される。そのため Enpp6 は、LPC のアシル基ではなくコリン部位を挿入ループの方に向けることで、Enpp2 とは逆の配向で LPC を認識すると予想される。実際に Enpp6 の挿入配列、および、活性部位周辺の残基には芳香族 Tyr 残基や負電荷の Glu 残基が存在し、これらのアミノ酸残基によって形成される負電荷を帯びた環境によってコリンの正電荷を静電的に認識するのかもしれない。Enpp1 は ATP を加水分解して AMP とピロリン酸を産生するのに対し、Enpp4 は Ap3A を加水分解して AMP と ADP を産生する (図 1-1b) ⁸。Enpp1 でヌクレオチドのベース部位を認識していた Phe239、および、挿入

ループ上の Tyr322 は Enpp4 においても保存されており、Enpp4 においてもこれらのアミノ酸残基がヌクレオチドのベース部位を認識すると考えられる。ごく最近ヒト由来 Enpp4-AMP 複合体の結晶構造が報告され、加水分解産物の AMP は挿入配列によって形成されたヌクレオチド結合ポケットによって Enpp1 と同様に認識されていた (図 1-16a) ⁴⁵。このことから本研究において提唱された「Enpp ファミリーの挿入ループがファミリー間で多様な基質特異性の決定因子である」という基質認識モデルが Enpp4 においても成り立つことが確かめられた。Enpp1 と Enpp4 の触媒ドメインの表面電荷を計算すると、β-, γ- リン酸が結合すると予想される領域は正電荷を帯びていた (図 1-16b)。ヌクレオチドリン酸基は負電荷を帯びていることから、Enpp1、および、Enpp4 はこの正電荷の領域を介して、β-, γ- リン酸を認識していることが示唆された。さらに Enpp1 のこの領域は狭く閉じているのに対して、Enpp4 では広がっていた (図 1-16c)。このことは Enpp1 が ATP を加水分解するのに対して Enpp4 が Ap4A という嵩高い基質を加水分解することを反映している。以上のことから Enpp1 と Enpp4 との異なる基質認識には、この領域が重要である可能性が示唆された。

1.4 まとめと展望

本研究では Enpp1 と様々なヌクレオチド複合体の結晶構造を決定し、Enpp1 が ATP を特異的に認識してピロリン酸を産生する機構を原子分解能レベルで解明することに成功した。細胞外にはヌクレオチド三リン酸の中でも ATP が最も多量に存在することを考えると、Enpp1 は ATP を特異的に加水分解することで効率良く骨の形成を制御していると考えられる。また今回決定した Enpp1 の立体構造から、骨疾患に関わる Enpp1 の変異は Enpp1 タンパク質の不安定化を引き起こすことで疾患発症に関わることを明らかにした。さらに Enpp1 の SMB 様ドメインは、結晶構造中においてディスオーダーしており、生化学的解析によって SMB 様ドメインは Enpp1 の酵素活性に影響しないことを明らかにした。本研究結果が論文に掲載されるのとはほぼ同時期に、Jansen らがマウス由来 Enpp1 の結晶構造を報告した⁴⁴。彼らの結晶中では SMB

様ドメインは、クリスタルパッキングによってオーダーしており、触媒ドメインと相互作用していなかった。このことから我々の機能解析の結果と一致して、Enpp1 の SMB 様ドメインは Enpp1 の酵素活性には関係せず、細胞膜に局在するためのフレキシブルな膜アンカーとして働くことが確かめられた。さらに肥満や糖尿病の発症リスクに關与する K173Q の Enpp1 変異は、この SMB 様ドメインに位置していることから、SMB 様ドメインは膜アンカーとして働くとともに、Enpp1 とインスリン受容体との相互作用の足場ドメインとして働く可能性が示唆された。以上のことから Enpp1 は触媒ドメインとヌクレアーゼ様ドメインを介した骨形成の制御、SMB 様ドメインを介したインスリンシグナルの制御というように、2 つの全く異なる生理機能をそれぞれ別々のドメインを使い分けることで達成していると考えられる (図 1-17)。

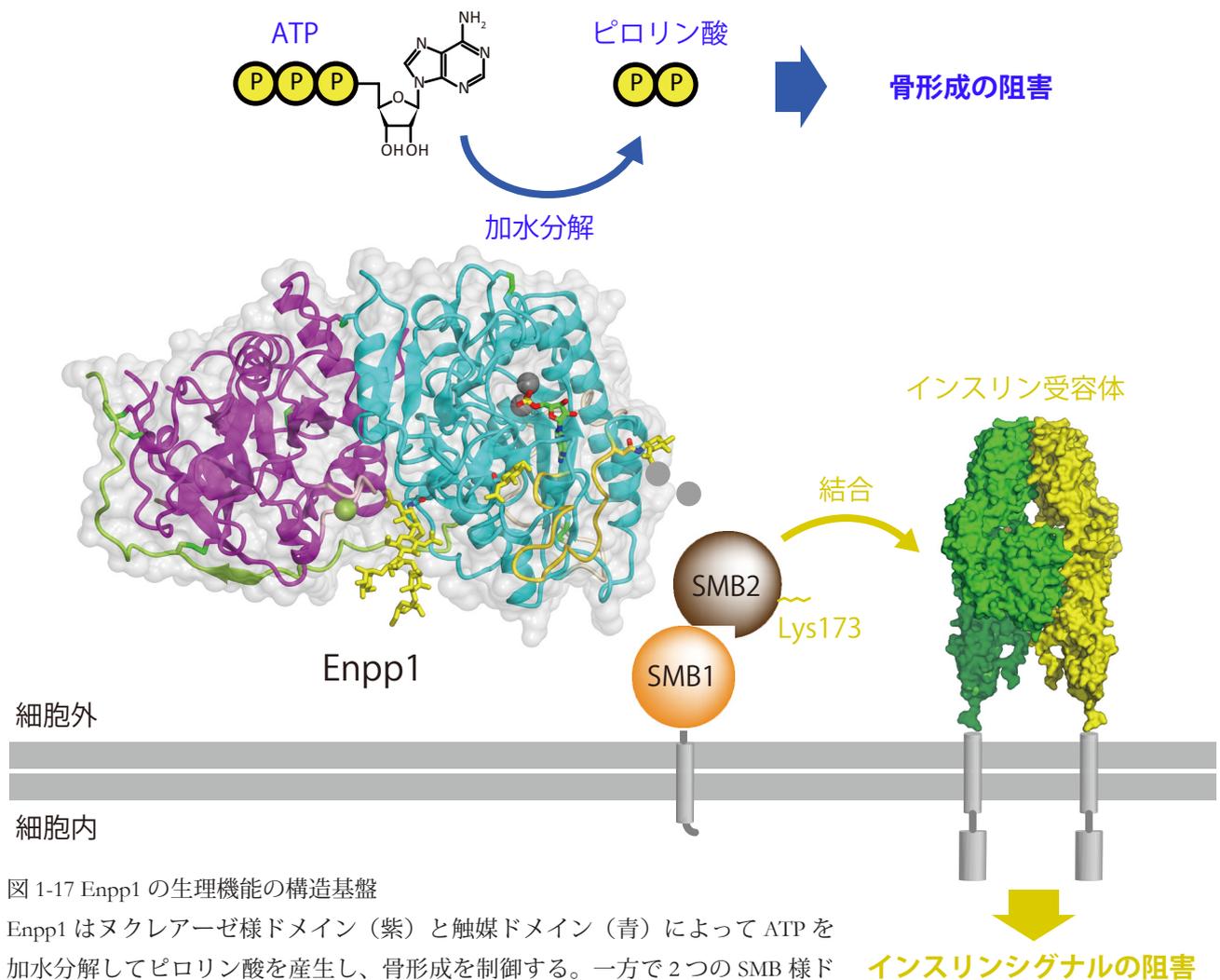


図 1-17 Enpp1 の生理機能の構造基盤

Enpp1 はヌクレアーゼ様ドメイン (紫) と触媒ドメイン (青) によって ATP を加水分解してピロリン酸を産生し、骨形成を制御する。一方で2つの SMB 様ドメイン (SMB1, SMB2) はフレキシブルな膜アンカーとして働き、インスリン受容体に結合してインスリンシグナルを阻害する。

Enpp1 と Enpp2 の構造比較に基づいた変異体解析をおこない、挿入ループが Enpp1 と Enpp2 で異なる基質特異性を規定していることを明らかにした。さらに挿入ループに相当する配列がファミリー間で多様であることを見出し、「Enpp ファミリーの挿入ループがファミリー間で多様な基質特異性の決定因子である」というファミリー間の基質認識のモデルを提唱した。このモデルに従えば Enpp6 は基質である LPC のホスホコリン部位を挿入ループによって認識すると考えられるが、実際に Enpp6 が

どのようにホスホコリン部位を認識しているかは興味深く、Enpp6-ホスホコリン複合体の構造決定が待たれる。まとめると Enpp ファミリータンパク質はファミリー間で相同的な触媒ドメインを持つが、活性部位の形を巧妙に変化させることで、ファミリー間で異なる基質を加水分解することができる。このように様々な基質を加水分解する Enpp が適切な細胞、組織特異的に発現することによって、多彩な生理機能を発揮すると考えられた。

第二章 Cyclic GMP-AMP 合成酵素, cGAS の構造機能解析

本章ではウイルス DNA に応答する cyclic GMP-AMP 合成酵素の X 線結晶構造解析について述べる。cGAS の立体構造から、cGAS による DNA の認識機構を理解し、触媒活性化機構について洞察する。また構造に基づいた変異体解析によって cGAS-STING 経路が NF- κ B 経路の活性化にクロストークしていることも明らかにした。

2.1 序論

2.1.1 自然免疫系におけるパターン認識受容体

脊椎動物は、外来のウイルスや細菌などの微生物が体内に侵入した際に、それらに対する一次的な防御反応として自然免疫系を有している⁴⁵。自然免疫系ではパターン認識受容体 (Pattern recognition receptor; PRR) と呼ばれる受容体が、病原体の持つ特徴的な分子構造 (Pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) を「異物」として特異的に認識することで適切に下流へとシグナルを伝達し、炎症性サイトカインの産生、抗ウイルスタンパク質の発現、アポトーシスなどの細胞応答を誘起する。Toll 様受容体 (Toll-like receptor; TLR) は、細胞外に存在する PAMPs を認識することで二量体を形成し、MyD88-IRAK-TRAF6 によるシグナロソーム、または TRIF と呼ばれているタンパク質を介して NF- κ B 経路の活性化や I 型インターフェロンの産生を促す。哺乳類においては、TLR1-13 までが同定されており、それぞれの基質特異性、あるいは、組織・細胞局在に従って各々の病原体を認識する^{46,47}。例えば、TLR4 は細菌の膜の構成成分であるリポポリサッカライド (LPS) を、TLR5 は細菌の鞭毛由来のタンパク質、flagellin を、細胞表面においてそれぞれ認識する。また TLR8 は、ウイルス由来の一本鎖 RNA を、TLR3 はウイルス由来の二本鎖 RNA をエンドソームにおいてそれぞれ認識する。また PRR は細胞膜上のみならず細胞質にも存在しており、自然免疫系の惹起に関与することが知られている。RIG-I 様受容体 (Rig-I like receptor; RLR)、NOD 様受容体 (NOD like receptor; NLR) はウイルス由来 RNA、および、細菌由来のペプチドグリカンそれぞれを認識し、CARD ドメインを介したシグナロソームを形成することで、下流へとシグナルを伝達する^{48,49}。

2.1.2 細胞質における外来 DNA の認識と STING 経路

多くのウイルスは宿主細胞に感染した際、自身の持つゲ

ノム DNA、もしくは、RNA から逆転写された DNA を宿主の細胞内に放出して、宿主のゲノム DNA に組み込む。通常 DNA は細胞質に存在せず、細胞質に存在する DNA は自然免疫系を活性化するための強力な MAMPs として働くことが知られている⁵⁰。DNA を認識する細胞質 PRR として、DAI, AIM-2, IFI16, DDX41 などが同定されている⁵¹⁻⁵⁶。中でも STING と呼ばれる小胞体の膜上に局在するタンパク質が、細胞質の DNA 応答において中心的な役割を担うことが、近年明らかとなった^{57,58}。STING はウイルス感染の際に細胞質に存在するウイルス由来 DNA に応答して、下流のキナーゼ TBK1 をリン酸化する (図 2-1)⁵⁹。TBK1 は転写因子 IRF3 をリン酸化し、リン酸化された IRF3 は二量体を形成して核移行し、I 型インターフェロンの産生を促す。また STING は細菌のセカンドメッセンジャーである cyclic di-GMP に直接結合して、同様に I 型インターフェロン産生を促す⁶⁰。しかしながら STING は cyclic di-GMP には直接結合するが DNA に対する結合親和性は低い⁶¹。さらに STING, TBK1, IRF3 のみの発現では DNA に応答した I 型インターフェロンの産生が見られないことから、STING の上流に DNA を認識する PRR が存在すると考えられていた。

2.1.3 cyclic GMP-AMP 合成酵素の発見

そのような状況の中 Zhijian J. Chen らのグループによって、cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) が細胞質に存在する DNA を認識して cGAMP を産生すること⁶²、そして cGAMP は STING に結合して I 型インターフェロンの産生を誘起することが明らかにされた⁶³。cGAS は dsDNA 存在下において活性化状態となり、cGAMP を産生して、I 型インターフェロンの産生を誘導できる。dsRNA では、cGAS の活性化、および、下流のシグナル伝達は誘導されないことから、cGAS は dsDNA 特異的な PRR として

働くことが当時示唆されていた。しかしながら cGAS による dsDNA 特異的な認識機構, dsDNA による cGAS の活性化機構, および, cGAS による cGAMP 触媒機構については, よくわかっていなかった。

2.1.4 本研究の目的

以上の背景をふまえて, 本研究では X 線結晶構造解析を用いてヒト由来 cGAS の結晶構造を決定し, cGAS による dsDNA 特異的な認識機構, dsDNA による cGAS の活性化機構について構造的な知見を得ることを目的とした。(cGAS による cGAMP 触媒機構については, 3 章において詳述する)

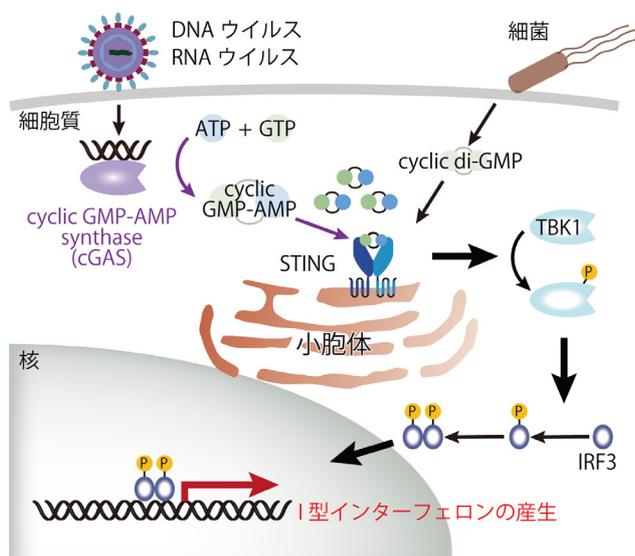


図 2-1 cGAS-STING 経路

cGAS はウイルス由来の dsDNA を認識して, cGAMP を産生する. cGAMP は STING に結合して, TBK1, そして IRF3 をリン酸化する. リン酸化された IRF3 は二量体を形成して核移行し, IFN- β の産生を誘起する.

2.2 材料と方法

2.2.1 cGAS タンパク質の大量発現

結晶化に十分量のヒト由来 cGAS タンパク質を得るために、ヒト由来 cGAS を大腸菌発現系によって過剰発現させた。ヒト由来 cGAS をコードする DNA 断片 (161-522 残基) を pE-SUMO ベクター (LifeSensors) に In fusion 反応 (Clontech) を用いて挿入した (図 2-2a)。このプラスミドベクターを用いて、*Escherichia coli* Rosetta2 (DE3) (Novagen) を形質転換し、カナマイシンとクロラムフェニコールを含む LB 培地プレートに播種して選択をおこなった。得られたコロニーを 50 µg/ml カナマイシンと 50 µg/ml クロラムフェニコールを含む LB 培地に植菌し、37°C、4-5 時間、前培養をおこなった。その後、前培養した培養液を 50 µg/ml カナマイシンを含む LB 培地に植え継ぎ 37°C で培養した。OD₆₀₀ = 0.5-0.7 の時点で、終濃度 0.5 mM となるように IPTG を添加し、20°C で一晩培養した。培養液に対して 5,000 g、1 分間、遠心分離操作をおこない、菌体を回収した。

2.2.2 cGAS タンパク質の精製

精製操作は全て氷上、もしくは、4°C でおこなった。菌体を破碎バッファーに懸濁後、超音波破碎装置を用いて菌体の破碎をおこなった。破碎液を 40,000 g、30 分間の遠心分離操作によって上清を回収した。得られた上清を破碎バッファーで平衡化済みの Ni-NTA Superflow (Qiagen) に通し、その後洗浄バッファー 9 CV を用いてカラムを洗浄した後、溶出バッファーを用いてカラムに結合したタンパク質を溶出した。目的タンパク質を含む溶出画分を回収し、TEV プロテアーゼ (当研究室で調整) を 1/20 (w/w) 量加え、透析バッファーに対して一晩透析をおこなった。透析後のサンプルを透析バッファーで平衡化済みの Ni-NTA Superflow に再び通し、素通り画分を回収した。この素通り画分を終濃度 20 mM HEPES-OH pH7.5, 0.4 M NaCl, 3 mM β-Me となるようにバッファー A を用いて希釈し、HitrapHeparin (GE healthcare) にかけた。カラムからのタンパク質の溶出は、NaCl の濃度を 0.4 M から 1.2 M まで直線的に上げることでおこなった。その後、ピークとして溶出した画分を回収し、ゲルろ過バッファーを用いて Superdex75 16/60 Hiload (GE healthcare) にかけることで最終精製産物とした。精製に用いたバッファーを以下に示す。

• 破碎バッファー

500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH8.0, 3 mM β-Me, 20 mM Imidazole, 2 mM MgCl₂,

5% Glycerol, 1mM PMSF, Benzonase (Merck)

• 洗浄バッファー

500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH8.0, 3 mM β-Me, 20 mM Imidazole

• 溶出バッファー

500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH8.0, 3 mM β-Me, 300 mM Imidazole

• 透析バッファー

500 mM NaCl, 50 mM HEPES-OH pH7.5, 3 mM β-Me, 20 mM Imidazole

• HitrapHeparin バッファー A

20 mM HEPES-OH pH7.5, 3 mM β-Me

• HitrapHeparin バッファー B

20 mM HEPES-OH pH7.5, 3 mM β-Me, 2 M NaCl

• ゲルろ過バッファー

10 mM HEPES-OH pH7.5, 500 mM NaCl, 3 mM β-Me

2.2.3 cGAS タンパク質の結晶化

精製した cGAS タンパク質を Amicon 30 kDa MWCO を用いて終濃度 5 mg/ml まで濃縮し、0.22 µm PVDF フィルター (Millipore) を通すことで不純物を除去した。結晶化ロボット mosquito (TTP Labtech) を用いてシッティングドロップ蒸気拡散法により以下のスクリーニングキットを用いて結晶化条件の初期スクリーニングをおこなった。

結晶化スクリーニングに用いた市販のスクリーニングキット

Crystal Screen 1/2, PEG/Ion, Natrix (Hampton Research)

PACT, JCSG (Qiagen)

JBScreen Classic 1, 2, 4, 5 (Jena Bioscience)

MemGold (Molecular Dimensions)

初期スクリーニングで結晶が得られた条件について、塩の種類、沈殿剤の濃度、pH を変化させ、さらに Additive Screen (Hampton Research) をおこなうことで結晶化条件の最適化をおこなった。最終的に結晶化ロボット mosquito (TTP Labtech) を用いてタンパク質 100 nl とリザーバー溶液 (0.18 M Ammonium nitrate, 18% PEG3,350, 0.5 M NaCl, 0.015 mM CYMAL-7) 100 nl を混合することで結晶化をおこなった。

2.2.4 cGAS の結晶の X 線回折データの収集

結晶化条件に 30% Glycerol を含む溶液を用いて、cGAS

結晶を窒素ガスクライオストリームによって瞬間凍結した。回折データの測定は、SPring-8 BL41XU でおこない、MX225HE CCD 検出器 (Rayonix) を用いた。データセットの収集は波長 1.00 Å, 10×10 μm の円状のビームを用いて、カメラ長 170 mm, 露光時間 1 秒, 振動角 1° の条件でおこない、180 枚の回折データを収集した。

2.2.5 結晶の回折データ処理, cGAS 構造のモデル構築, および, 精密化

回折データの処理はプログラム HKL2000 (HKL Research Inc.) を用いておこなった。結晶のブラベ格子と格子定数を決定後, 回折データの各反射スポットに対して指数付けと強度測定をおこない, その後スケールリングをおこない, 空間群の決定, および, 各指数に対する回折強度の算出をおこなった。このデータをもとに, マウス由来 cGAS-DNA 複合体の構造情報 (PDB ID: 4K96)⁶⁴ をサーチモデルとしてプログラム MOLREP³⁴ による分子置換をおこない初期位相を決定した。その後, プログラム PHENIX³⁵ により構造精密化を行い, プログラム Coot³⁸ を用いて手動でモデルを修正する, というサイクルを数回繰り返した。

2.2.6 変異体 cGAS の調製

野生型のヒト由来 cGAS 発現ベクターを鋳型とした PCR 法によって, 変異体 cGAS 発現ベクターを作製した。この発現ベクターを用いて, 野生型 cGAS と同様に大腸菌発現系による過剰発現, および, Ni-NTA カラム, HitrapHeparin カラムによる精製をおこなった。但し N 末端の His₆-SUMO タグの切断は, TEV プロテアーゼではなく, SUMO プロテアーゼ (Ulp1, 研究室で調製) をサンプルに対して 1/500 (w/w) で加えることでおこなった。

2.2.7 cGAS と DNA の結合実験

cGAS と DNA の結合は, ビオチン化 DNA を用いたプルダウンアッセイによって確認した。2.2.6 で精製した cGAS (3 μg) と二本鎖 ISD (1 μg) を結合バッファー (50 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 0.5% NP40) 中で混合し, Dynabeads M-280 Streptavidin (Life Technologies) 10 ml を加えて 4°C で 30 分間インキュベートした。回収したビーズに対して結合バッファー 200 ml で 3 回洗浄した後, SDS サンプルバッファーを用いて変性条件で

溶出し SDS-PAGE で展開することで, DNA に結合した cGAS タンパク質を検出した。

2.2.8 細胞を用いた変異体解析

以下の実験は群馬大学 徳永研究室との共同研究によっておこなった。

2.2.8.1 STING/293T 細胞の樹立

ヒト由来 STING を安定的に発現する HEK293T 細胞を樹立するために, Lipofectamine2000 を用いて pcDNA3.1-STING-FLAG-His₆, および, pXS-Puro プラスミドベクターを共遺伝子導入し, ピューロマイシンによるスクリーニングをおこなった。

2.2.8.2 ルシフェラーゼレポーターアッセイ

pcDNA3.1-mys-cGAS プラスミドベクターを, レポーター遺伝子をコードする pGL3-IFNβ-promoter-Luc, あるいは, pGL3-IFNβ-promoter-Luc プラスミドベクターと, STING/293T 細胞に共遺伝子導入した。24 時間後細胞を溶解し, Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて, GloMax 20/20 luminometer (Promega) によってルシフェラーゼの活性を測定した。

2.2.8.3 定量 Real-Time PCR

トランスフェクション後の細胞から, RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出し, SuperScript First-Strand Synthesis System (Life Technologies) を用いて RNA から cDNA を調製した。リアルタイム定量 PCR は, StepOnePlus Real-time PCR System (Applied Biosystems), および, Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いておこなった。各々の mRNA の発現レベルは, β-actin の発現に対して, ΔΔCT 法を用いて算出した。それぞれの遺伝子の PCR に用いたプライマーを下記に示す。

β-actin: 5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3', 5'-CCAGAGGC-GTACAGGGATAG-3'

IFN-β: 5'-AGGACAGGATGAACTTTGAC-3', 5'-TGA-TAGACATTAGCCAGGAG-3'

A20: 5'-CATGCATGCCACTTCTCAGT-3', 5'-CATGGGTGT-GTCTGTGGAAG-3'

2.3 結果と考察

2.3.1 cGAS の調製

ヒト由来 cGAS タンパク質は全長 522 アミノ酸残基からなる。cGAS の一次配列をもとに、二次構造予測 (Psipred) とディスオーダー予測 (Disopred) をおこなった結果、N 末端の 1-160 アミノ酸残基は、決まった構造をとらずディスオーダーしていることが予測された (図 2-2a)。さらにヒト由来 cGAS (161-522) のコンストラクトは DNA 結合能を有し、かつ下流にシグナルを伝達して IFN- β を産生することができることが報告されている⁶²。以上の知見をもとに N 末端のディスオーダー領域を除いたヒト由来 cGAS (161-522) を発現コンストラクトとして用いた。ヒト由来 cGAS (161-522) を SUMO 融合タンパク質として発現させ、ニッケルカラム、ヘパリンカラム、ゲルろ過カラムを通すことによって、cGAS を高純度に精製した (図 2-2b)。ゲルろ過カラムからの溶出ピークは単分散ではなく、低分子量側にテーリングしていた (図 2-2b)。最終的に大腸菌培養液 1 L から約 2.5 mg のヒト由来 cGAS タンパク質を得た。

2.3.2 cGAS の結晶化、および、X 線回折実験

精製 cGAS タンパク質を用いて結晶化初期スクリーニングをおこなったところ、下記に示す複数条件で結晶を得た (図 2-3a)。いずれも PEG 3,350 が沈殿剤として含まれていたため、これらの条件をもとに塩の種類、pH、およ

び、PEG 3,350 の濃度の最適化をおこなった。その結果条件 A において得られた結晶 (図 2-3b) について、2.3 Å 分解能の回折スナップショットを得ることに成功した (図 2-3c)。更なる分解能の向上のため、この条件 A をもとに Additive screen をおこなった。その結果終濃度 0.015 mM CYMAL-7 を含む条件 B で視覚的に良質な結晶が得られた (図 2-3d)。一連の結晶化条件を以下に示す。

初期スクリーニングで得られた条件

PEG/Ion 3: 0.2 M Ammonium fluoride, 20% PEG3,350, 0.5 M NaCl

PEG/Ion 27: 0.2 M sodium acetate trihydrate, 20% PEG 3,350, 0.5 M NaCl

PEG/Ion 35: 0.2 M Ammonium sulfate, 20% PEG 3,350, 0.5 M NaCl

最適化した条件

A: 0.18 M Ammonium nitrate, 18% PEG3,350, 0.5 M NaCl

B: 0.18 M Ammonium nitrate, 18% PEG3,350, 0.5 M NaCl, 0.015 mM CYMAL-7

最終的に B の条件によって得られた結晶から、1.95 Å 分解能の回折データセットを収集することに成功した (図 2-3e)。結晶は空間群 $P2_12_12$ に属し、格子定数は $a = 123.5 \text{ \AA}$ 、

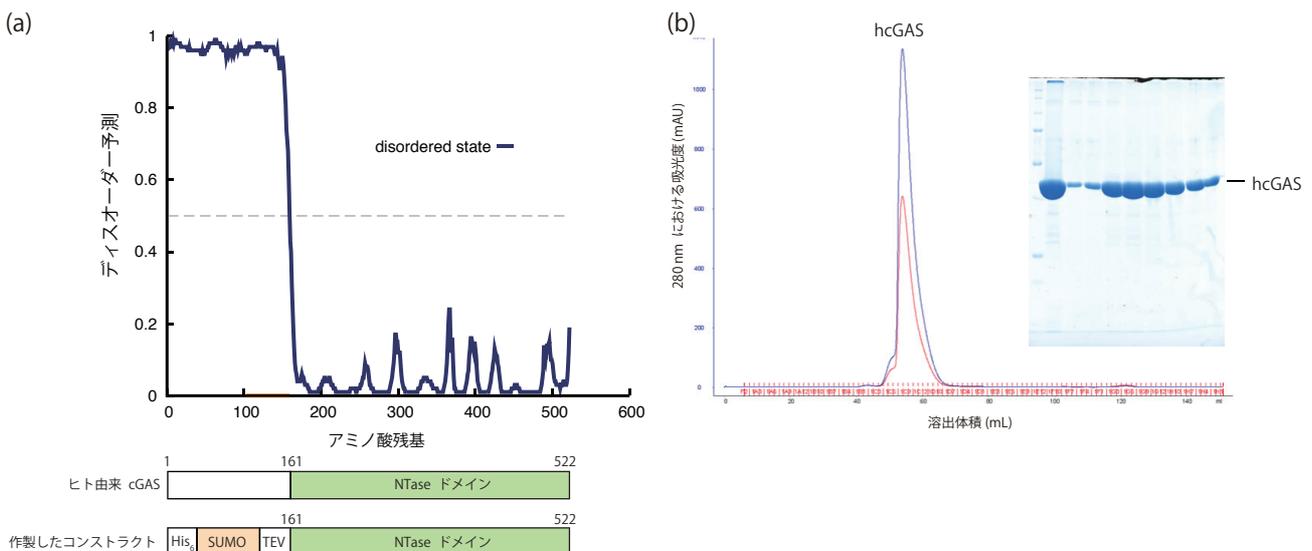


図 2-2 cGAS タンパク質の調製

(a) cGAS のディスオーダー予測 (上)、および、作製したコンストラクト (下)

(b) 最終精製産物のゲルろ過クロマトグラフィーにおける溶出ピーク (左)、および、SDS-PAGE による精製純度の確認 (右)

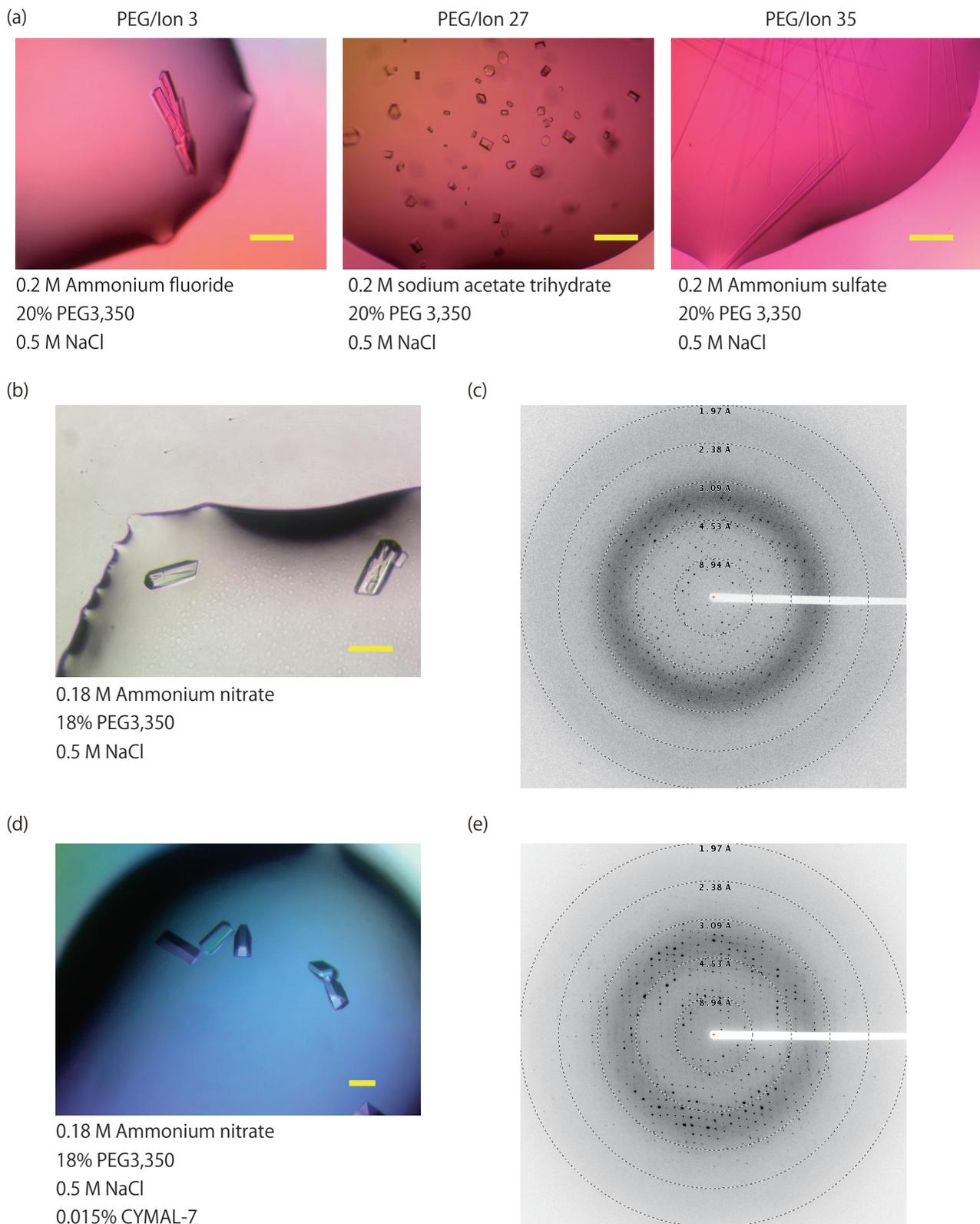


図 2-3 ヒト由来 hcGAS の結晶化、および、X線回折実験

- (a) 初期スクリーニングによって得られた hcGAS の結晶。スケールバーは 100 μm を示す。
- (b), (d) 条件の最適化によって得られた hcGAS の結晶。それぞれ結晶化条件を示した。
- (c) (b) の結晶から得られた回折像（最大 2.3 Å 分解能）
- (e) (d) の結晶から得られた回折像（最大 1.95 Å 分解能）

$b = 48.31 \text{ \AA}$, $c = 59.57 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ であった。データセットの統計値を表 2-1 に示した。

2.3.3 位相決定, および, 構造精密化

本研究の開始時点ではヒト由来 cGAS を含め cGAS ホモログの立体構造は報告されていなかったが, 1.95 \AA 分解能の Native 回折データを得た時点で, マウス由来 cGAS-DNA 複合体, ブタ由来 cGAS-DNA 複合体の結晶構造が複数のグループから報告された。そのため位相決定は, 1.95 \AA 分解能の Native 回折データをもとに, マウス由来 cGAS-DNA 複合体における cGAS 単体の構造情報 (PDB ID: 4K96) をサーチモデルとして分子置換をおこなうことで決定した。COOT によるモデルビルディング, および, PHENIX による構造精密化を繰り返し, 最終的に $R_{\text{free}} = 25\%$, $R_{\text{work}} = 21\%$ まで R 値を低下させることができた。最終的な構造精密化の統計値を表 2-1 に示した。

表 2-1 の回折データ, および, 構造精密化後の統計値

Human cGAS	
Data collection	
Space group	$P2_12_12$
Cell dimensions	
a, b, c (Å)	123.5, 48.31, 59.57
α, β, γ (°)	90, 90, 90
Resolution (Å)	50.00-1.95 (1.98-1.95)
R_{sym}	0.086 (0.790)
$I / \sigma I$	34.2 (2.2)
Completeness (%)	97.7 (94.8)
Redundancy	6.8 (6.6)
Refinement	
Resolution (Å)	42.9-1.95
No. reflections	25,996
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0.206 / 0.252
No. atoms	2,671
Protein	2,556
Ligand/ion	1
Water	114
B-factors	
Protein	51.3
Ligand/ion	26.0
Water	46.1
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.010
Bond angles (°)	1.197
Ramachandran plot (%)	
Favored	96.5
Allowed	3.16
Outlier	0.32

2.6.4 cGAS の全体構造

ヒト由来 cGAS の全体構造 (hcGAS) を図 2-4a に示した。hcGAS は N 末端の α/β 触媒コア, および, C 末端のヘリックスバンドルから構成される典型的なヌクレオチジトランスフェラーゼフォールドをとる。 α/β 触媒コアは, 10 つの β シートが 4 つの α ヘリックスによって囲まれた構造をとり, C 末端のヘリックスバンドルは 5 つの α ヘリックスから構成される。N 末端の長い α ヘリックスは α/β 触媒コアとヘリックスバンドルを貫くように存在しており, このヘリックスを "Spine" と名付けた。 α/β 触媒コアとヘリックスバンドルの間の窪みには活性部位が存在し, 保存された触媒残基 (Glu225, Asp227, Asp319) が α/β 触媒コアの β シートに位置している (図 2-4b)。

さらに活性部位の反対側には, α/β 触媒コアとヘリックスバンドル間に HCCC-type のジンクフィンガー (ZnF) が存在している (図 2-4c)。亜鉛イオンは His390, Cys396, Cys397, および, Cys404 の側鎖によって配位されており, ZnF は突き出るようなループ構造を形成していた。亜鉛イオンを配位するこれらのアミノ酸残基は cGAS の種間で高度に保存されており, ZnF の機能的な重要性を示唆している。

2.3.5 DNA の結合に関する構造的洞察

DNA 結合タンパク質はしばしば静電相互作用を介して負に帯電した DNA を認識することが知られている。そこで cGAS における DNA 結合部位を推察するために, 本研究で決定した hcGAS の表面電荷を計算した。その結果, 活性部位の反対側に正に帯電した領域が存在することを見出した (図 2-4a)。この領域では, 主に Spine と ZnF によって溝が形成されており, 多数の塩基性残基 (Lys, Arg 残基) が存在している。このことからこの正電荷の溝が cGAS におけるウイルス由来 DNA 結合に重要であることが示唆された。

2.3.6 IRF3- インターフェロン β 産生経路に対する変異体解析

dsDNA の存在下で cGAS は ATP と GTP から cGAMP を産生し, cGAMP はセカンドメッセンジャーとして STING を活性化する⁶²。活性化した STING は TBK1 依存的に IRF3 をリン酸化して, I 型インターフェロンの産生を誘起する⁶³。結晶構造から見出された cGAS の正電荷の溝が STING 依存的な免疫活性化に重要であるか確かめるために, この溝に存在する塩基性アミノ酸残基 (図 2-5a) に変異を導入した cGAS を STING/293 細胞に遺伝子導入し, 下流の TBK1, および, IRF3 のリン酸

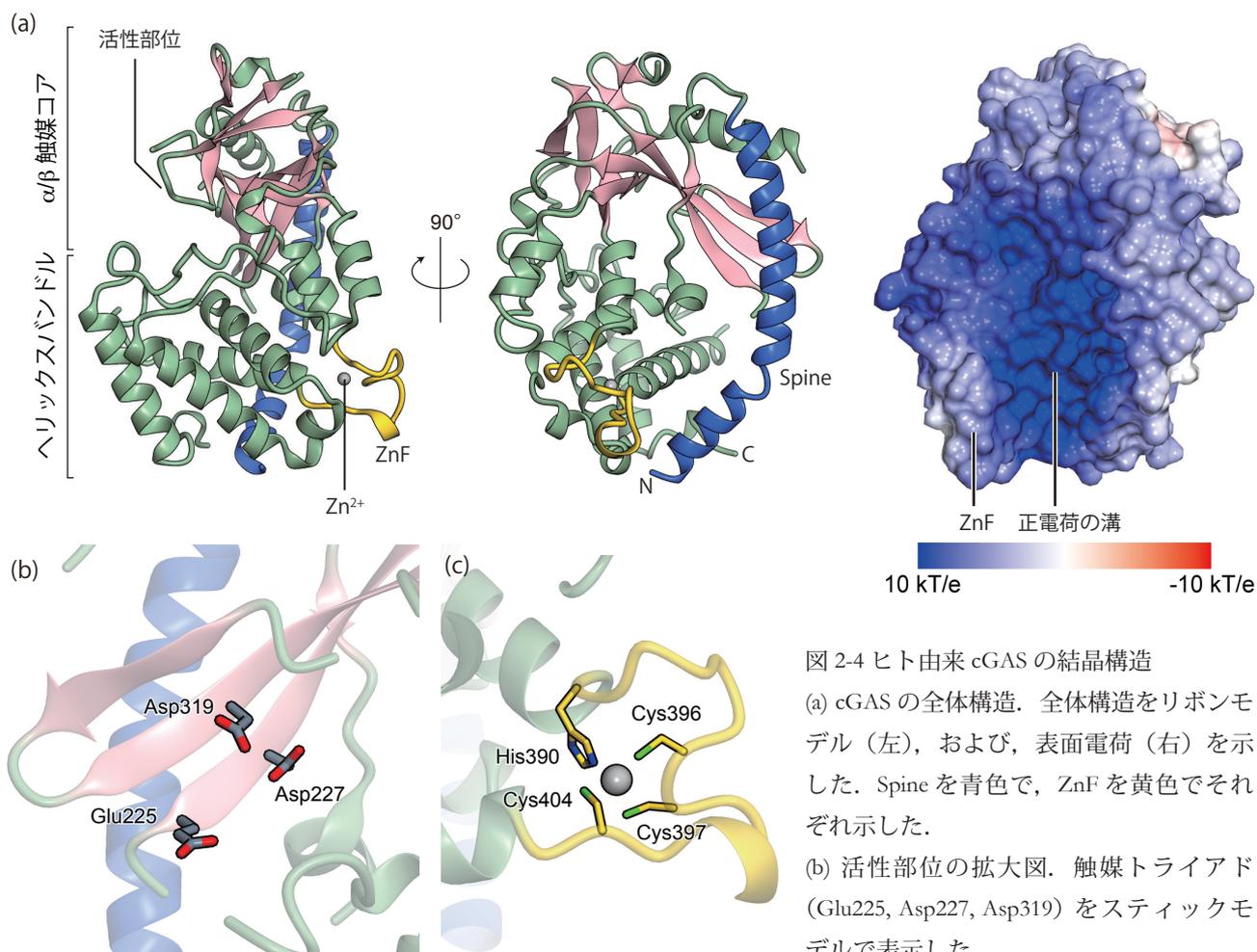


図 2-4 ヒト由来 cGAS の結晶構造

(a) cGAS の全体構造. 全体構造をリボンモデル (左), および, 表面電荷 (右) を示した. Spine を青色で, ZnF を黄色でそれぞれ示した.

(b) 活性部位の拡大図. 触媒トライアド (Glu225, Asp227, Asp319) をスティックモデルで表示した.

(c) ZnF の拡大図. 亜鉛イオンを灰色の球で示した. 亜鉛イオンを配位しているアミノ酸残基をスティックモデルで表示した.

化状態をウェスタンブロッティングにより解析した. その結果, cGAS WT は STING 依存的に TBK-1, IRF3 のリン酸化を促進した (図 2-5b). 一方で, K384A, K407A, K411A, K400E/K403E cGAS 変異体においては, TBK-1, IRF3 のリン酸化バンドは消失した. さらに下流のインターフェロン β の産生を, レポーターアッセイ, qRT-PCR で調べたところ, これらの変異体 (K384A, K407A, K411A, K400E/K403E cGAS 変異体) では, IFN- β の産生が誘導されなかった (図 2-5c,d). このことから, cGAS の正電荷の溝は STING 依存的な免疫活性化に重要であることが示された. さらに ZnF モチーフについても, 亜鉛イオンを配位していた Cys404 を Ala に置換した変異体 (C404A), および, ZnF モチーフそのものを欠失した変異体 (Δ ZnF) を作製し, 同様に下流のシグナル伝達を調べた. C404A や Δ ZnF は下流の STING 依存的なシグナルを活性化しなかったことから, ZnF も STING 依存的な免疫活性化に重要であることが示された (図 2-5b, c). 以上のことから cGAS は ZnF と Spine によって形成される

正電荷の溝を介して DNA と結合することが示唆された.

2.3.7 NF- κ B 経路に対する変異体解析

STING は元来, 細胞質の DNA に応答して IRF3 と NF- κ B を活性化するタンパク質として同定された⁵⁷. ここで cGAS が STING 依存的に NF- κ B 経路を活性化するかどうか, 2.3.6 で用いた cGAS 変異体について, NF- κ B 経路の活性化をレポーターアッセイによって調べた. その結果 cGAS WT を過剰発現させた STING/293 細胞ではコントロールに対して 3 倍程度 NF- κ B の活性化が誘導されたのに対し, 2.3.6 で TBK1-IRF3-IFN- β 産生経路を活性化しなかった cGAS 変異体 (K384A, K407A, K411A, K400E/K403E, C404A, Δ ZnF) では, NF- κ B 経路を活性化しなかった (図 2-5c). さらに NF- κ B 経路のネガティブフィードバック制御因子として働く A20 の発現レベルを qRT-PCR を用いて定量したところ, cGAS WT の過剰発現に伴って A20 の発現レベルも上昇したが, cGAS 変異体では発現レベルの上昇は見られなかった (図 2-5d). こ

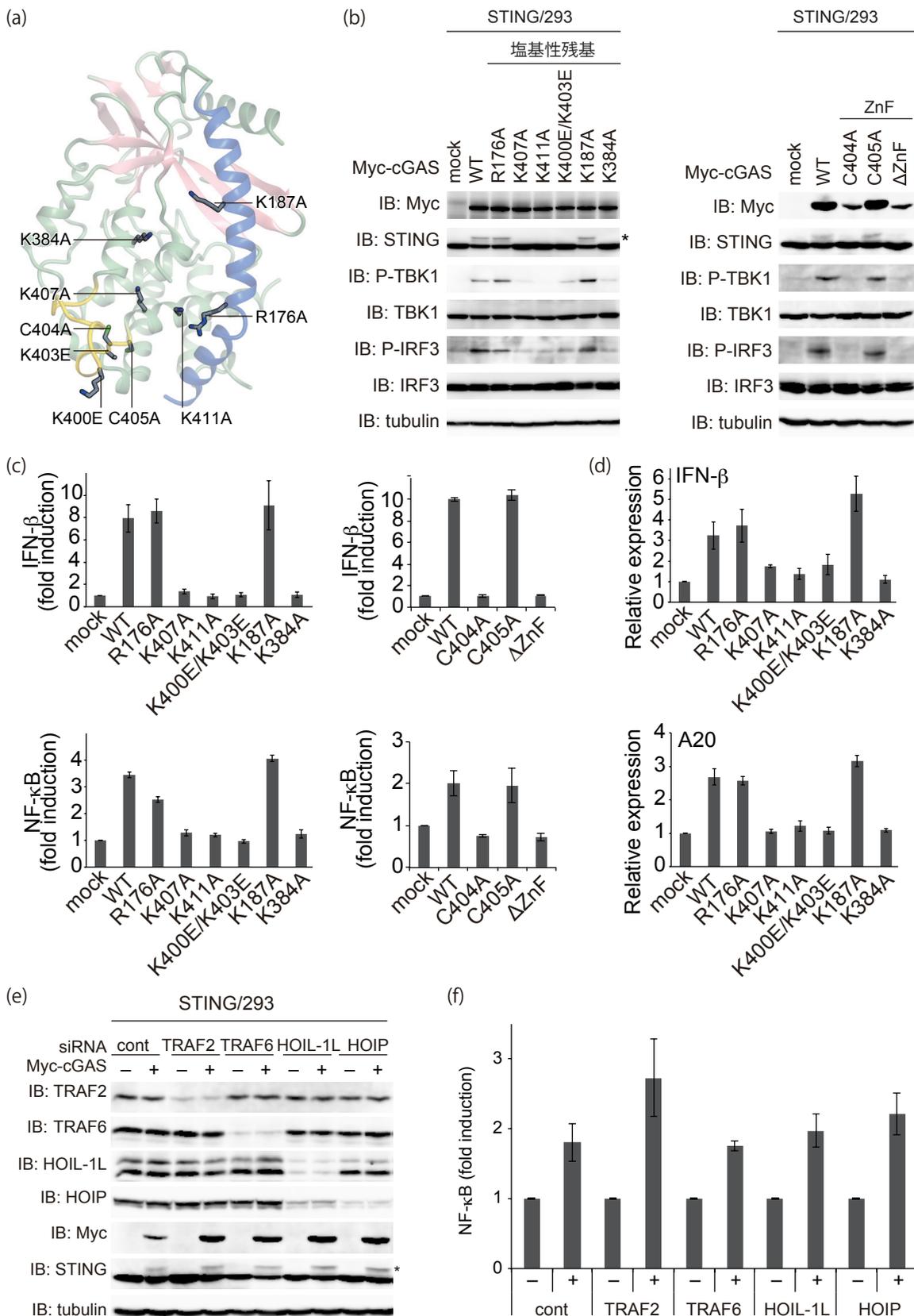


図 2-5 cGAS ヒト由来 cGAS の IRF3, NF-κB の活性化に重要なアミノ酸残基の同定

(a) 変異体解析に用いた cGAS 変異体. 変異を導入したアミノ酸残基を灰色のスティックで示した.

(b) cGAS によって誘起される TBK1, IRF3, STING のリン酸化. cGAS WT, あるいは, 変異体を STING/293 細胞に過剰発現させた. 細胞ライセートを図に示した抗体を用いて, ウェスタンブロッティングにより解析した. * はリン酸化した STING を示している.

- (c) IFN- β (上), および, NF- κ B (下) に対するレポーターアッセイ. (b) で用いた細胞にレポーター遺伝子を共発現させた細胞ライセートのルシフェラーゼ活性を測定した. ルシフェラーゼ活性は平均 \pm 標準偏差 (n = 3) で示した.
- (d) ヒト由来 cGAS, あるいは, 変異体による IFN- β , A20 の産生誘導. IFN- β (上), A20 (下) の mRNA の発現レベルを (b) で用いた細胞の total RNA に対して Real-Time PCR によって解析した. Relative expression level を平均 \pm 標準偏差 (n = 3) で示した.
- (e) E3 リガーゼ, cGAS, STING に対するウェスタンブロット解析. (b) で用いた細胞に図に示した siRNA をトランスフェクションした. 細胞ライセートをウェスタンブロット解析した. * はリン酸化した STING を示している.
- (f) 各 E3 リガーゼをノックダウンした細胞における IFN- β のレポーターアッセイ. (c) の細胞ライセートに対して, ルシフェラーゼ活性を測定した. ルシフェラーゼ活性は, 平均 \pm 標準偏差 (n = 3) で示した.

これらの結果から, cGAS は STING を介して NF- κ B 経路の活性化にも関与することが明らかとなった.

TRAF タンパク質や LUBAC といった E3 ユビキチンリガーゼによる K63 型, 直鎖型ポリユビキチン化は, 古典的 NF- κ B 経路の活性化に必須であることが知られている. そこでこれらの E3 リガーゼによるユビキチン化が cGAS-STING による NF- κ B 経路の活性化に関与するか確かめるために, cGAS を過剰発現させた STING/293T 細胞について, TRAF タンパク質 (TRAF2, TRAF6), あるいは, LUBAC (HOIL-1L, HOIP) をそれぞれ siRNA によりノックダウンして, IFN- β の産生への影響をレポーターアッセイによって調べた. いずれの E3 リガーゼをノックダウンした細胞においても cGAS の過剰発現にともない NF- κ B の活性化が誘導されたことから, E3 リガーゼによるユビキチン化は, cGAS による STING 依存的な NF- κ B 経路の活性化に影響しない可能性が示唆された (図 2-5e, f). しかしながらこれらの E3 リガーゼは RIG-I-MAVS 経路という別の免疫経路を重複的に活性化することが最近報告されており⁶⁵, これらの E3 リガーゼが重複的に cGAS-STING 経路で働いている可能性も排除できない. また Ishikawa らの 293T 細胞における NF- κ B レポーターアッセイにおいては, コントロールに比べて, 数十倍の NF- κ B の活性化が誘導されているが⁵⁷, 本研究の実験系ではいずれも数倍の活性化しか誘導されなかった. さらに最近, TRAF3, TRAF6 タンパク質は STING 依存的な NF- κ B 経路の活性化に関与するという本研究とは異なる結果が報告された. 本研究で観察された cGAS-STING に

よる NF- κ B 経路の活性化機構を理解するためには, 今後更なる研究が必要となるだろう.

2.3.8 cGAS 変異体を用いた DNA 結合実験

cGAS-DNA 間の結合と cGAS による免疫活性化の関係を調べるために, 精製した cGAS 変異体を用いて, ビオチン化 DNA とのプルダウンアッセイをおこなった. cGAS WT, C405A 変異体はビオチン化 ISD によく結合した一方で, C404A, Δ ZnF 変異体ではわずかにビオチン化 ISD への結合が低下した (図 2-6). この結果から, cGAS の ZnF は dsDNA への結合に寄与することが示された. しかしながら, 細胞内で免疫を活性化しなかった塩基性アミノ酸残基の cGAS 変異体 (K384A, K407A, K411A, K400E/K403E) については, WT と同程度に cGAS に結合した (図 2-6). このことから cGAS と DNA の結合は cGAS による免疫系の活性化に必要なが, 十分ではないことが示された.

2.4 において記述するように, cGAS は ZnF の存在する正電荷の溝 (A 領域) の他に DNA 結合領域 (B 領域) を持ち, cGAS-dsDNA ヘテロ 4 量体を形成する. すなわち, 1 分子の DNA に対して A 領域, および, B 領域の両方が結合に関与することから, A 領域の塩基性残基の変異のみでは DNA 結合に影響がなかったものと推察される.

2.3.9 他の cGAS ホモログとの構造比較

本研究の進行中にマウス由来 cGAS-16 bp dsDNA 複合体と apo 型構造, ブタ由来 cGAS-14 bp dsDNA 複合体

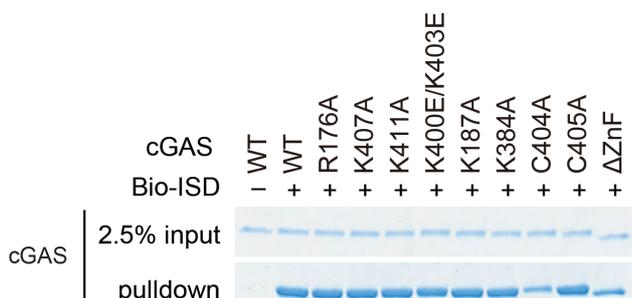


図 2-6 cGAS 変異体とビオチン化 ISD 間のプルダウンアッセイ. 精製した cGAS 変異体をビオチン化 ISD, ストレプトアビジンビーズと混合した. ビーズに結合したタンパク質を SDS サンプルバッファーで溶出し, SDS-PAGE で展開した.

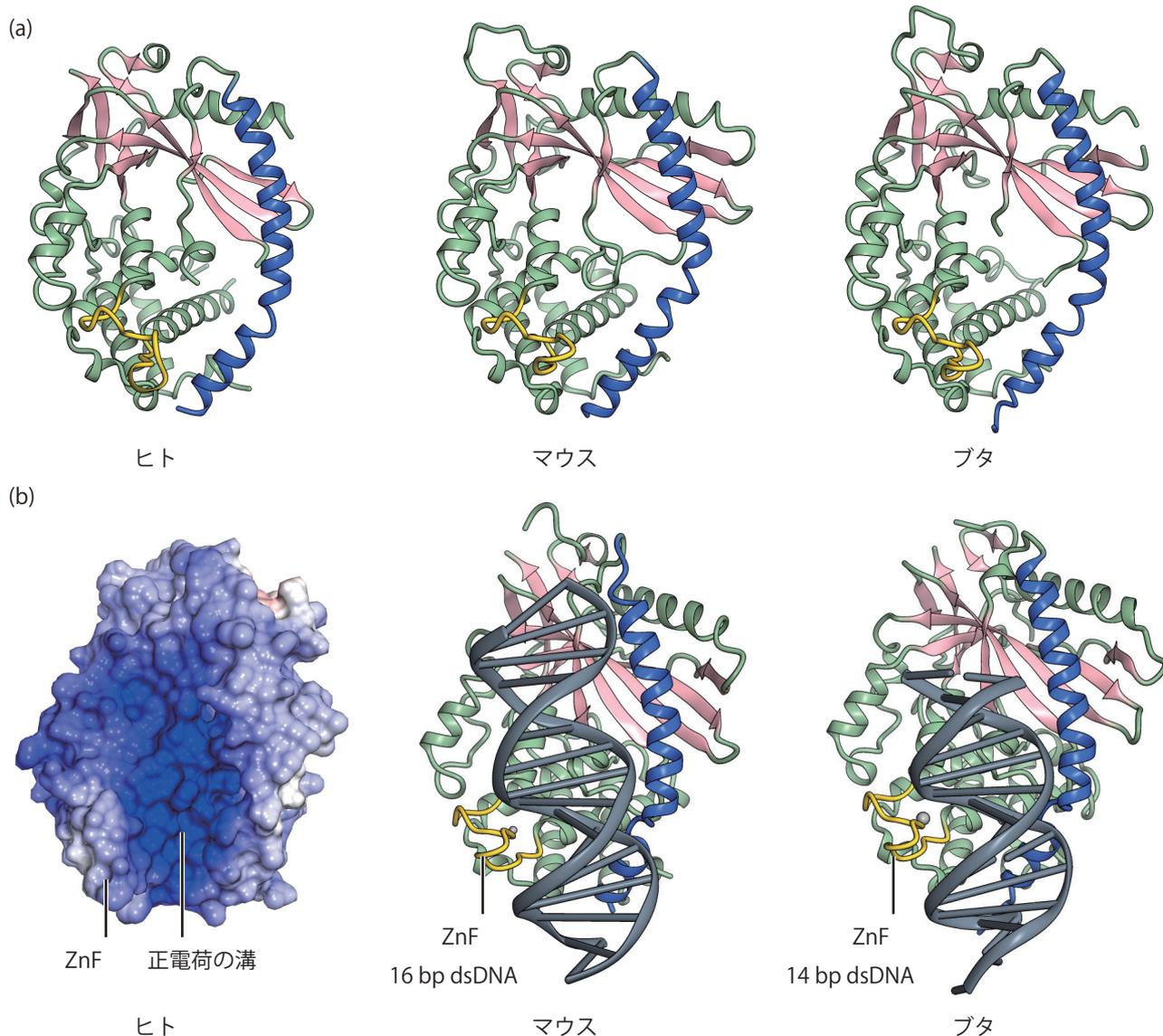


図 2-7 過去に決定された cGAS ホモログとの構造比較

(a) ヒト (左), マウス (中央; PDB 4K8V), ブタ (右; PDB 4JLX) 由来 cGAS apo 型構造. 図 2-4 (a) と同様に全体構造をリボンモデルで示した.

(b) ヒト由来 cGAS の表面電荷 (左), および, マウス由来 cGAS-16 bp dsDNA 複合体 (中央; PDB 4K96), ブタ由来 cGAS-14bp dsDNA 複合体 (右; PDB 4KB6) のリボンモデル. dsDNA を灰色のリボンモデルで示した.

と apo 型構造がそれぞれ報告されたため^{64,66}, 本研究で決定したヒト由来 cGAS の apo 型構造をこれらの構造と比較した. 本研究で決定したヒト由来 cGAS の apo 型構造は, マウス由来 cGAS apo 型 (rmsd = 1.40 Å), および, ブタ由来 cGAS の apo 型構造とよく重なる (rmsd = 1.11 Å) (図 2-7a). さらに DNA 結合に伴う cGAS の活性化機構を詳細に議論するために, ヒト由来 cGAS とマウス由来 cGAS-16 bp dsDNA 複合体, ブタ由来 cGAS-14 bp dsDNA 複合体の構造比較をおこなった. 本研究の構造機能解析から活性部位の反対側に存在する正電荷の溝が dsDNA との結合面であることが示唆されたが, マウス, ブタ由来 cGAS-dsDNA 複合体では, 実際に正電荷の

溝に dsDNA が結合していた (図 2-7b). dsDNA が正電荷の溝に結合することで, dsDNA のリン酸バックボーンが Spine の構造変化を引き起こしていた (図 2-8). マウス由来 cGAS の Leu159, ブタ由来 cGAS の Leu148 (ヒト由来 cGAS の Leu174 に相当) は Spine 上に位置しており apo 型構造では溶媒領域に側鎖を向けるが, dsDNA の結合に伴い α/β 触媒コアの方へと構造変化を起こす. この構造変化によって α/β 触媒コア付近で新たなファンデルワールス相互作用が形成され, 結果として活性部位を安定化させる. ヒト由来 cGAS の apo 型構造では Leu174 は, マウス由来, および, ブタ由来 cGAS apo 型構造同様に溶媒領域に向いている (図 2-8). Leu174 は, ヒト由来

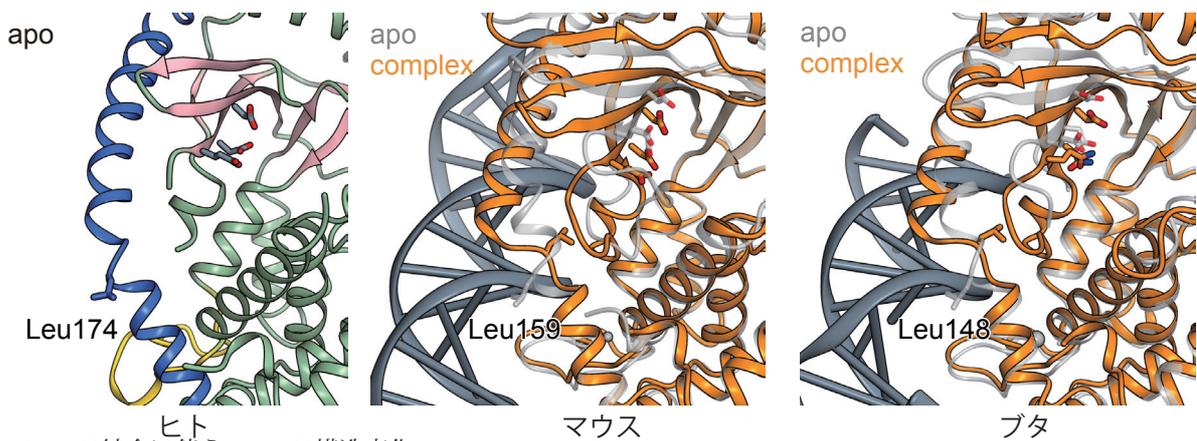


図 2-8 dsDNA の結合に伴う Spine の構造変化

ヒト (左), マウス (中央), ブタ (右) 由来 cGAS の Spine の拡大図。ヒトの apo 型構造は図 2-4(a) と同じように、マウス, ブタについては apo 型構造を灰色のリボンモデルでそれぞれ示した。

複合体構造において dsDNA を灰色, cGAS をオレンジのリボンモデルでそれぞれ示した。

cGAS による cGAMP の産生と IFN- β の産生に必須であることが過去に報告されている。これらのことからこの保存されたロイシン残基は dsDNA の結合に応じて cGAMP の産生を厳密に制御する構造的なスイッチとして働くことが示された。

過去に報告された cGAS-dsDNA 複合体において、マウスとブタ由来 cGAS 間でそれぞれ異なる長さ・配列の dsDNA を用いて結晶化されているにも関わらず、dsDNA は cGAS に同じような様式で結合していた^{64,66}。重要なことに、双方の複合体構造において ZnF は dsDNA の主溝に入り込むことで dsDNA を認識していた (図 2-7b)。

この結果リン酸バックボーンが Spine 上の Leu 残基の近傍に位置することで、Leu 残基は dsDNA との立体障害を避けるように、 α/β 触媒コアの方へと構造変化を起こす (図 2-8)。2.3.8 でおこなったビオチン化プルダウン実験の結果から、dsDNA の結合は cGAS の触媒活性化に十分ではないことを示した (図 2-6)。また cGAS は ssDNA や dsRNA にも結合するが、これらの核酸存在化では cGAMP を産生しないことが報告されている^{64,66}。これらのことから cGAS は保存された Leu 残基の構造変化を起こすのに適切な配向で dsDNA と結合することで、触媒活性化し cGAMP 産生することが示唆された (図 2-9)。

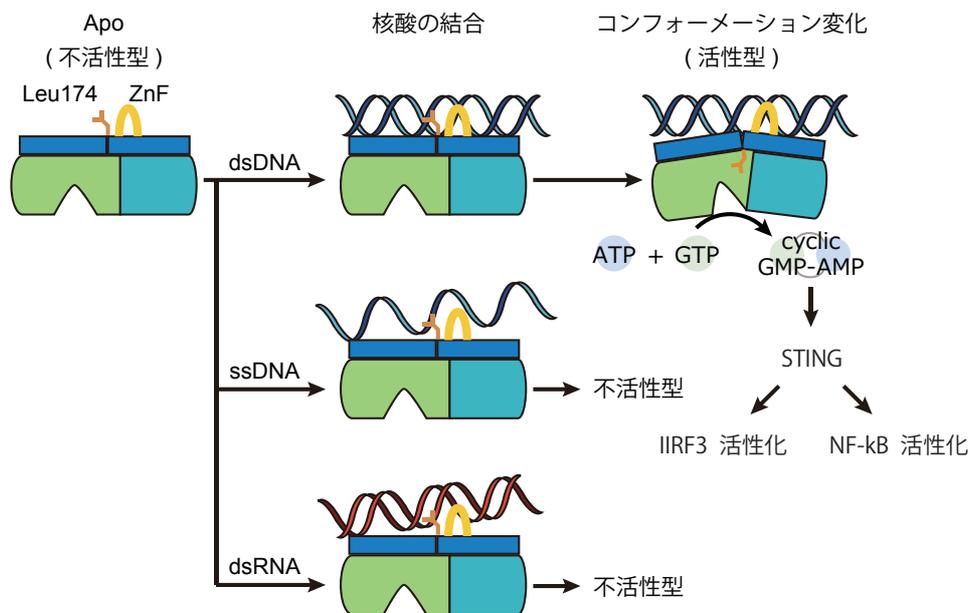


図 2-9 本研究, および, 複合体構造との構造比較から得られたヒト由来 cGAS の活性化モデル

cGAS は dsDNA, ssDNA, dsRNA を含む様々な核酸と正電荷の溝を介して結合するが、ZnF モチーフが dsDNA を適切な配向に結合させることによって、Spine 上の Leu 残基の構造変化を引き起こす。その結果活性部位が安定化され、cGAMP 産生活性を持つ。

2.4 まとめと展望

本研究ではヒト由来 cGAS apo 型の立体構造を決定し、その構造から cGAS の DNA 結合に重要であると推測される 2 つの構造的特徴（正電荷の溝、および、ZnF）を見出した。cGAS 変異体を用いた細胞解析をおこなうことで、実際にこれらの構造的特徴が cGAS-STING 経路の活性化による I 型インターフェロン産生に必須であることを示した。また STING は以前から NF- κ B 経路の活性化に関わることが知られていたが、本研究での cGAS 変異体を用いた解析によって、cGAS は STING を介して NF- κ B 経路の活性化を引き起こすことを示した。さらに cGAS 変異体タンパク質と dsDNA との *in vitro* 結合実験をおこなうことで、cGAS と DNA の結合は cGAS の活性化に十分ではないことを示唆した。本研究の進行中に他の研究グループによって cGAS ホモログ-dsDNA 複合体の構造が報告された。本研究で得られた知見とあわせることによって、cGAS は正電荷の溝を介して核酸に対して親和性を発揮し、さらに ZnF を用いて dsDNA 特異的に cGAS の活性化に適切な配向で結合することが明らかとなった。その後更なる構造研究によって、マウス由来 cGAS-dsDNA ヘテロ 4 量体の結晶構造が報告された（図 2-10）⁶⁷。結晶構造中で cGAS は 2 量体構造をとり、各々の cGAS プロトマーに dsDNA 2 分子が結合していた。この 4 量体構造はマウスのみならずブタ由来 cGAS においても保存されていたことから、ヒト由来 cGAS においても 4 量体構造を保持していると考えられる。すなわち本研究で dsDNA 結合領域であると示された正電荷の溝（A 領域）の他に、cGAS は別の dsDNA 結合領域（B 領域）を持つ。さらに cGAS は溶液中においても 4 量体構造をとり、この B 領域を介した 4 量体構造は cGAS の活性化による cGAMP の産生、および、I 型インターフェロンの産生に必須であることが示された⁶⁷。TLR や RLR を含む

PRR はリガンドの結合依存的に二量体、もしくは、多量体構造をとることによって効率良く免疫応答のシグナルを伝達する⁶⁸⁻⁷¹。cGAS もこのような多量体による活性化機構を保持していたことは興味深く、PRR に普遍的に存在する活性化機構であると考えられる。しかしながら、cGAS の 4 量体構造がどのように cGAS の活性化に寄与するのか、その詳細な機構は既存の構造情報からは明らかにされていない。さらに cGAS が最大の cGAMP 産生活性を持つには、18 bp 以上の長さの DNA が必要であることが知られている⁶⁷。しかしながら、これまでに決定されたマウス由来 cGAS-16 bp, 18 bp DNA、および、ブタ由来 cGAS-14 bp DNA の複合体構造はいずれも同様の 4 量体構造をとっており、DNA の長さがどのように cGAS の cGAMP 産生活性に寄与しているかは既存の構造からは説明できない。過去におこなわれた生化学的解析と構造生物学的解析から cGAS はウイルス DNA に特徴的な構造や DNA 配列を特異的に認識しないことが明らかにされている^{62,64,66}。すなわち cGAS は自己・非自己の DNA を認識する機構を持たず、細胞障害によって産生される DAMPs にも応答して免疫経路を活性化する可能性を示唆している。このことは STING 経路の過剰な活性化がエカルディ-グティエール症候群や多発性関節炎といった自己免疫疾患を引き起こすことと一致する^{72,73}。さらにごく最近、樹状細胞に発現した cGAS はがん細胞由来の DNA を認識して IFN- β を産生し、細胞傷害性 T 細胞を活性化するという結果が複数のグループから報告された⁷⁴。これらのことから cGAS-STING 経路は細胞質 DNA 認識において中心的な役割を果たしており、魅力的な薬剤のターゲット経路であるといえる。本研究で決定されたヒト由来 cGAS の構造情報は、cGAS-STING 経路をターゲットとした薬剤の開発に有用であるといえよう。

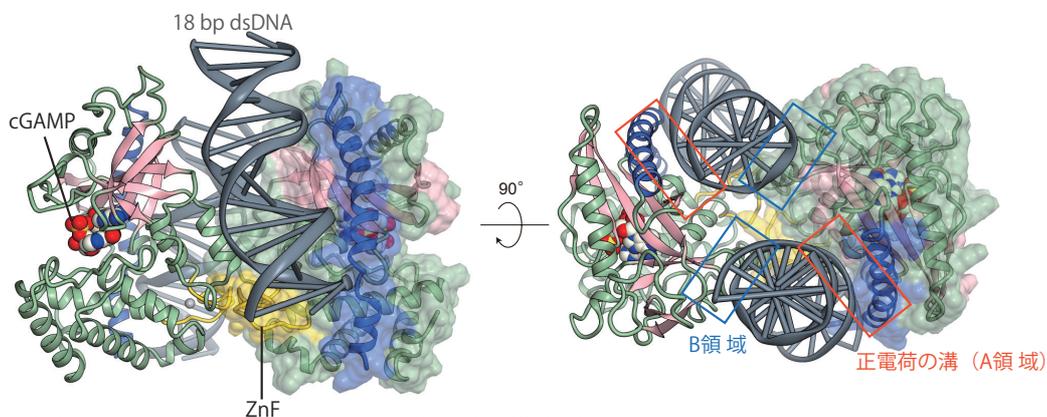


図 2-10 マウス由来 cGAS-18 bp dsDNA (2:2) 4 量体の結晶構造 (PDB 4LEZ)

cGAS のプロトマー分子をリボンモデルと分子表面モデルでそれぞれ示した。dsDNA は灰色のリボンモデルで示した。活性部位に結合した cGAMP を CPK モデルで示した。

第三章 バクテリア由来 cyclic GMP-AMP 合成酵素, DncV の構造解析と cGAMP 産生機構の分子基盤

本章では cGAS のバクテリアホモログである DncV の X 線結晶構造解析について述べる。DncV の立体構造をもとに、DncV の生化学的特性を理解し、cGAMP の産生機構について原子分解能レベルで洞察する。さらに DncV と cGAS の構造比較から、バクテリアと哺乳類で異なる cGAMP を産生する構造基盤の理解へと拡張した。

3.1 序論

3.1.1 セカンドメッセンジャーとしての環状ジヌクレオチド

環状ジヌクレオチド (cyclic di-nucleotide; CDN) は 2 つのヌクレオチドが 2 つのホスホジエステル結合によってつながれた低分子で、バクテリア、および、哺乳類においてセカンドメッセンジャーとして働く (図 3-1a)。グラム陰性菌では、cyclic di-GMP がストレス応答、バイオフィーム形成、鞭毛形成、遊走活性を制御して病原性や感染力の向上に関わる⁷⁵。細胞質に存在する cyclic di-GMP の量は、GGDEF ドメインを持つジグアニル酸シクラーゼ (diguanylate cyclases; DGC) による合成と EAL、もしくは、HD-GYP ドメインに特徴付けられるホスホジエステラーゼ (PDE) による分解によって厳密に制御されている。グラム陽性菌では、cyclic di-AMP は孢子形成、細胞壁の合成、形態形成などの生育に必須な生理機能に関わる⁷⁶。cyclic di-AMP の合成酵素として、ジアデニル酸シクラーゼ (diadenylate cyclases; DAC, DUF147) ドメインを持つ DisA や CdaS などが *Bacillus subtilis* において同定されている。

一方で哺乳類においては、GMP と AMP 分子が環状につながったハイブリッドな CDN, cyclic GMP-AMP (cGAMP) が自然免疫経路のシグナル伝達因子として働く (図 3-1b)⁶³。cGAMP は細胞質に存在するヌクレオチジルトランスフェラーゼスーパーファミリーに属する酵素、cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) によって産生され、STING-TBK1-IRF3 を介して I 型インターフェロンの産生を誘導する⁶²。

3.1.2 コレラ菌由来 DncV の発見

近年 cGAMP が *Vibrio cholera* において病原性に関わるセカ

ンドメッセンジャーとして同定された⁷⁷。cGAMP は、*V. cholera* の遊走性を抑制することで感染力の向上に関わる。cGAMP は DncV と呼ばれる酵素によって産生され、2 つのホスホジエステル結合が 3'-5' でつながった cGAMP (3'-5' cGAMP) であることが報告されている (図 3-1b)。

3.1.3 cGAS, DncV による cGAMP 産生機構

DncV と cGAS は配列相同性が低いにも関わらず、共にヌクレオチジルトランスフェラーゼスーパーファミリーに属することがアミノ酸配列から予想されている。一連の構造生物学的解析、および、生化学的解析によって、cGAS によって産生される cGAMP は、片方のホスホジエステル結合が 2'-5' でつながった cGAMP (2'-5' cGAMP) であることが明らかになった^{64,78-80}。特にマウス由来 cGAS と様々なヌクレオチド複合体の構造が決定されたことで、cGAS は 1 つの触媒ポケットに 2 つの基質ヌクレオチドを収容し、2'-5' ホスホジエステル結合の触媒、次いで 3'-5' ホスホジエステル結合の触媒をおこなうことで、すなわち 2 回の異なるヌクレオチジルトランスファー反応を連続的に触媒することで、2'-5' cGAMP を産生することが明らかとなっている (図 3-1b)⁶⁴。しかしながら、何が cGAS の 2'-5' ホスホジエステル結合の触媒を規定しているのか、その詳細な機構については明らかにされていなかった。

また DncV は cGAS とは異なる生化学的特性を持つことが報告されている⁷⁷。cGAS は dsDNA 存在下でのみ触媒活性を持つのに対し、DncV は恒常的に触媒活性を持つ。また cGAS はハイブリッドな 2'-5' cGAMP のみを産生するが、DncV は 3'-5' cGAMP のみならず cyclic di-GMP, cyclic di-AMP を *in vitro* で産生することができる (図

3-1b). しかしながら, ATP, GTP の両方が存在すると 3'-5' cGAMP のみが特異的に産生され, *in vivo* では 3'-5' cGAMP が主な DncV の産物であることが示されている. しかしながら, これらの生化学的特性を説明付ける詳細な機構はよくわかっていない.

3.1.4 本研究の目的

以上の背景をふまえて, 本研究では X 線結晶構造解析を用いて DncV の立体構造を決定することで, DncV による CDN 産生機構の詳細な構造基盤を解明することを試みた. さらに, 3'-5' cGAMP を産生する DncV の構造と 2'-5' cGAMP を産生する cGAS の構造を比較することで, バクテリアと哺乳類で異なる生化学的特性を発揮する構造基盤の解明も期待された.

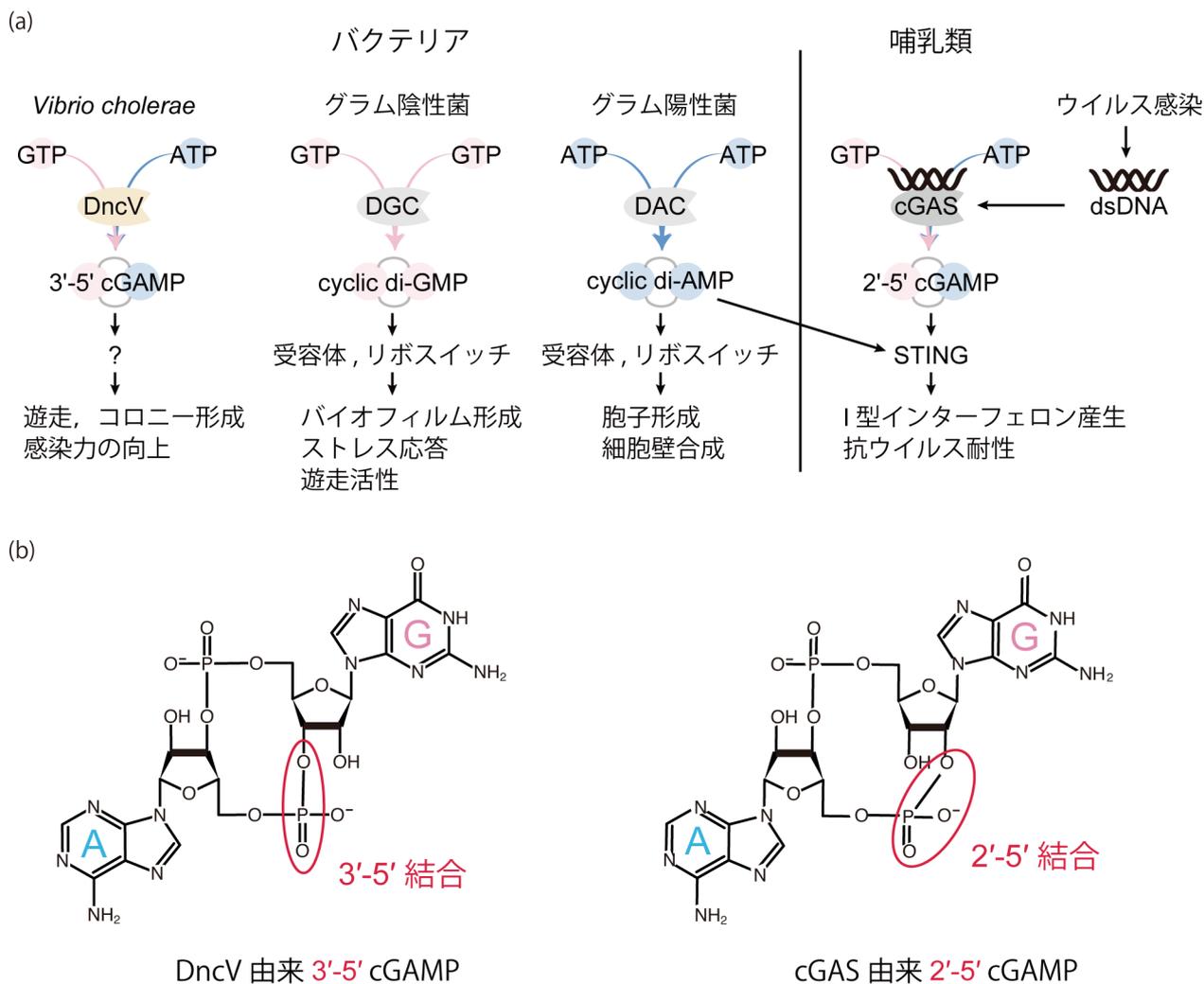


図 3-1 セカンドメッセンジャーとしての環状ジヌクレオチド (CDN)

(a) CDN はバクテリアや哺乳類の細胞内でセカンドメッセンジャーやシグナル伝達因子として働く。

(b) 3'-5' cGAMP (左)、2'-5' cGAMP (右) の構造式

3.2 材料と方法

3.2.1 DncV タンパク質の大量調製

結晶化に十分量の DncV タンパク質を得るために、*V.cholerae* 由来 DncV (VcDncV), および、*E.coli* 由来 DncV (EcDncV) を大腸菌発現系によって過剰発現させた。VcDncV (VcDncV_{HL}: 1-436 残基), および、EcDncV (EcDncV_{HL}: 1-432 残基) 遺伝子を GenScript 社において大腸菌のコドン使用頻度に最適化するように遺伝子合成した。これらの DNA 断片 pE-SUMO ベクター (LifeSensors) に In fusion 反応 (Clontech) を用いて、SUMO 遺伝子の直下に挿入した。さらにこれらのプラスミド遺伝子を鋳型とした PCR 法によって、C 末端のディスオーダー領域を削除したコンストラクトを作製した (VcDncV_{C-del}: 1-412 残基, EcDncV_{C-del}: 1-407 残基)。さらに VcDncV の内部のディスオーダー領域 (216-241 残基) を Gly-Ser-Gly アミノ酸残基に置き換えたコンストラクト (VcDncV_{cryst}: 1-412, D216-241 残基) を作製した。

これらのプラスミドベクターを用いて、*Escherichia coli* Rosetta2 (DE3) (Novagen) を形質転換し、カナマイシンとクロラムフェニコールを含む LB 培地プレートに播種して選択をおこなった。得られたコロニーを 50 µg/ml カナマイシンと 50 µg/ml クロラムフェニコールを含む LB 培地に植菌し、37°C, 4-5 時間、前培養をおこなった。その後、前培養した培養液を 50 µg/ml カナマイシンを含む LB 培地に植え継ぎ 37°C で培養した。OD₆₀₀ = 0.5-0.7 の時点で、終濃度 0.5 mM となるように IPTG を添加し、20°C で一晩培養した。培養液に対して 5,000 g, 10 分間、遠心分離操作をおこない、菌体を回収した。

精製操作は全て氷上、もしくは、4°C でおこなった。菌体を破碎バッファーに懸濁後、超音波破碎装置を用いて菌体の破碎をおこなった。破碎液を 40,000 g, 30 分間の遠心分離操作によって上清を回収した。得られた上清を破碎バッファーで平衡化済みの Ni-NTA Superflow (Qiagen) に通し、その後洗浄バッファー 20 CV を用いてカラムを洗浄した後、溶出バッファーを用いてカラムに結合したタンパク質を溶出した。目的タンパク質を含む溶出画分を回収し、SUMO プロテアーゼ (当研究室で調整) を 1/200 (w/w) 量加え、透析バッファーに対して一晩透析をおこなった。透析後のサンプルを透析バッファーで平衡化済みの Ni-NTA Superflow に再び通し、素通り画分を回収した。この素通り画分を終濃度 20 mM Tris-HCl pH7.5, 70 mM NaCl, 3 mM β-Me となるようにバッファー A を用いて希釈し、HitrapHeparin (GE healthcare) にかけた。カラムからのタンパク質の溶出は、NaCl の濃度を 70 mM

から 1.2 M まで直線的に上げることでおこなった。その後、ピークとして溶出した画分を回収し、ゲルろ過バッファーを用いて Superdex200 16/60 Hiload (GE healthcare) にかけることで最終精製産物とした。

SeMet 置換体 DncV は、pE-SUMO-VcDncV_{cryst} を 50 mg/ml L-セレノメチオニン (Wako) を加えたメチオニン不含の DMEM を用いて Bello Cell で培養することで調製した。菌体からの SeMet 置換体 VcDncV_{cryst} の精製は、Native VcDncV_{cryst} と同様におこなった。精製に用いたバッファーを以下に示す。

- 破碎バッファー
300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH8.0, 20 mM Imidazole, 2 mM MgCl₂, 5% Glycerol, 1mM PMSF, 3 mM β-Me
- 洗浄バッファー
300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH8.0, 3 mM β-Me, 20 mM Imidazole
- 溶出バッファー
300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH8.0, 3 mM β-Me, 300 mM Imidazole
- 透析バッファー
150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH8.0, 3 mM β-Me, 20 mM Imidazole
- HitrapHeparin バッファー A
20 mM Tris-HCl pH8.0, 3 mM β-Me
- HitrapHeparin バッファー B
20 mM Tris-HCl pH8.0, 3 mM β-Me, 2 M NaCl
- ゲルろ過バッファー
20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl, 3 mM β-Me

3.2.2 DncV タンパク質の結晶化

精製した DncV タンパク質を Amicon 30 kDa MWCO を用いて濃縮した。以下の組成のタンパク質溶液を結晶化条件の初期スクリーニングに用いた。

- 5 mg/ml VcDncV (20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 3 mM β-Me)
- 5 mg/ml EcDncV (20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 3 mM β-Me, 10 mM MgCl₂)
- 5 mg/ml EcDncV (20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 3 mM β-Me, 10 mM MgCl₂, 2.5 mM 3'-dGTP, 2.5 mM ATP)

これらのタンパク質溶液を 0.22 µm PVDF フィルター (Millipore) を通すことで不純物を除去した。結晶化ロボット mosquito (TTP Labtech) を用いてシッティングドロップ蒸気拡散法により以下のスクリーニングキットを用い

て結晶化条件の初期スクリーニングをおこなった。
結晶化スクリーニングに用いた市販のスクリーニング
キット

Crystal Screen 1/2 (Hampton Research)

PACT, JCSG (Qiagen)

JBScreen Classic 1, 2, 4, 5 (Jena Bioscience)

MemGold2 (Molecular Dimensions)

初期スクリーニングで結晶が得られた条件について、タンパク質濃度、塩の種類、沈殿剤の濃度、pHを変化させることで結晶化条件の最適化をおこなった。さらに結晶の再現性をあげるために、SeMet 置換 VcDncV、および、VcDncV-3'-dATP 複合体の結晶化の際には Native 結晶を種結晶としたストリークシーディングをおこなった。VcDncV-GTP 複合体の結晶を得るために Native VcDncV 結晶に対して、10 mM GTP, 10 mM MgCl₂ を含むリザーバー溶液を用いて、室温で 5 分間浸潤をおこなうソーキング法を用いた。各 DncV タンパク質の結晶について最終的な結晶化条件を下記にまとめた。

• Native VcDncV_{cryst} apo 型

タンパク質溶液：5 mg/ml Native VcDnc V_{cryst}

リザーバー溶液：0.2 M sodium fluoride, 0.1 M Bis-tris propane pH6.5, 20% PEG3,350

結晶化ロボット mosquito を用いたシッティングドロップ蒸気拡散法

• SeMet VcDncV_{cryst} apo 型

タンパク質溶液：10 mg/ml SeMet VcDnc V_{cryst}

リザーバー溶液：0.2 M sodium fluoride, 0.1 M Bis-tris propane pH6.3, 17-22% PEG3,350

結晶化ロボット mosquito を用いたシッティングドロップ蒸気拡散法, ストリークシーディング

• Native EcDncV_{C-del}-3'-dGTP 複合体

タンパク質溶液：5 mg/ml Native EcDncV_{C-del}, 10 mM MgCl₂, 2.5 mM 3'-dGTP, 2.5 mM ATP

リザーバー溶液：0.2 M sodium chloride, 0.1 M Bis-tris propane pH5.5, 25% PEG3,350

結晶化ロボット mosquito を用いたシッティングドロップ蒸気拡散法

• Native VcDncV_{cryst}-GTP 複合体

タンパク質溶液：10 mg/ml Native VcDnc V_{cryst}

リザーバー溶液：0.2 M sodium fluoride, 0.1 M Bis-tris propane pH6.5, 20% PEG3,350

結晶化ロボット mosquito を用いたシッティングドロップ蒸気拡散法, ソーキング法

• Native VcDncV_{cryst}-3'-dATP 複合体

タンパク質溶液：10 mg/ml Native VcDnc V_{cryst}

リザーバー溶液：0.2 M sodium fluoride, 0.1 M Bis-tris propane pH6.5, 20% PEG3,350

結晶化ロボット mosquito を用いたシッティングドロップ蒸気拡散法, ストリークシーディング

3.2.3 DncV 結晶の X 線回折実験

結晶化条件のリザーバー溶液に 20% Ethylene glycol (VcDncV), 20% Glycerol (EcDncV) を含む溶液を用いて、DncV 結晶を窒素ガスクライオストリームによって瞬間凍結した。回折データの測定は、Photon Factory BL-5A, および、SPring-8 BL41XU でおこない、ADSC Quantum 315r, および、MX225HE CCD 検出器をそれぞれ用いた。Native 結晶からのデータ収集は、180 枚の回折データをそれぞれ収集した。また SeMet 置換体結晶からのデータ収集は、SPring-8 BL41XU において peak 波長 0.9790 Å, カメラ長 179 mm, 露光時間 1 秒, 振動角 1° の条件でおこない、720 枚の回折データを収集した。

3.2.4 結晶の回折データ処理, 位相決定, および, モデル構築と精密化

回折データの処理はプログラム HKL2000, および, XDS⁸¹ を用いておこなった。結晶のブラベ格子と格子定数を決定後, 回折データの各反射スポットに対して指数付けと強度測定をおこない, その後スケールリングをおこない, 空間群の決定, および, 各指数に対する回折強度の算出をおこなった。SeMet 置換体 VcDncV 複合体の 1.77 Å までの SAD (single-wavelength anomalous dispersion) データをもとに, プログラム SHELX C/D⁸² を用いて結晶中に含まれる Se 原子の位置を特定した。特定したセレン原子の位置からプログラム autoSHARP⁸³ を用いて初期位相を決定した。その後 Autobuild⁸⁴ による自動モデル構築をおこない, プログラム Coot³⁸ によるモデル構築とプログラム PHENIX³⁵ により構造精密化というサイクルを数回繰り返した。EcDncV, および, VcDncV-ヌクレオチド複合体については, VcDncV apo 型の構造情報をサーチモデルとしてプログラム Molrep³⁴ を用いた分子置換法によって位相を決定した。その後 SeMet 置換体 DncV と同様に, プログラム Coot³⁸ によるモデル構築とプログラム PHENIX³⁵ により構造精密化を繰り返した。

3.3 結果と考察

3.3.1 VcDncV タンパク質 apo 型の構造決定

3.3.1.1 VcDncV_{FL}, VcDncV_{C-del} の調製と結晶化

VcDncV タンパク質は全長 436 アミノ酸残基からなる。VcDncV の一次配列をもとに、二次構造予測 (Psipred) とディスオーダー予測 (Disopred) をおこなった結果、C 末端の 413-436 アミノ酸残基は決まった構造をとらずディスオーダーしていることが予測された (図 3-2)。全長の VcDncV_{FL} (1-436 残基)、および、C 末端を欠損した VcDncV_{C-del} (1-412 残基) を大腸菌発現系によって SUMO 融合タンパク質として発現させ、ニッケルカラム、ヘパリンカラム、ゲルろ過カラムを通すことによって、VcDncV を高純度に精製した (図 3-3a,b)。VcDncV_{FL} (1-436 残基)、VcDncV_{C-del} (1-412 残基) は共にゲルろ過クロマトグラフィーにおいて単分散性のピークを示し、収量は 1 L 培養液あたりそれぞれ約 1 mg であった。これらの精製 VcDncV を用いて結晶化スクリーニングをおこなったが結晶は得られなかった。

3.3.1.2 VcDncV_{Cryst} の調製と結晶化、および、回折実験

更なるコンストラクト改良のために VcDncV のディスオーダー予測 (図 3-2)、および、DncV ホモログとの配列比較 (図 3-4) から、種間で配列保存性の低い内部ループを見出した。このループが結晶化におけるパッキングを阻害していると考え、VcDncV_{C-del} の内部ループに相当する領域 (216-241 残基) を Gly-Ser-Gly からなるリンカー配列に置換した VcDncV_{Cryst} を作製し (図 3-2)、VcDncV_{FL} と同様の方法を用いて精製した。VcDncV_{Cryst} はゲルろ過クロマトグラフィーにおいて単分散性のピークを示し (図 3-3c)、収量は 1 L 培養液あたりそれぞれ約 7 mg であった。精製した VcDncV_{Cryst} を用いて結晶化スクリーニングをおこなったところ、PACT F1 の条件 (0.2 M sodium fluoride, 0.1 M Bis-tris propane pH6.5, 20% PEG3,350) において、大きさ約 100 μm の結晶を得た (図 3-5a)。この結晶に対して X 線回折実験をおこなったところ、最大 1.8 Å 分解能の回折スナップショットを得た (図 3-6a)。

3.3.1.3 SeMet 置換体 VcDncV_{Cryst} の調製と結晶化、および、回折実験

重原子による異常分散を用いて実験的に位相を決定するために SeMet 置換体 VcDncV_{Cryst} を調製した。Native VcDncV_{Cryst} 同様に SeMet 置換体 VcDncV_{Cryst} もゲルろ過クロマトグラフィーにおいて単分散性のピークを示し、収量は 1 L 培養液あたり約 5 mg であった。精製した SeMet

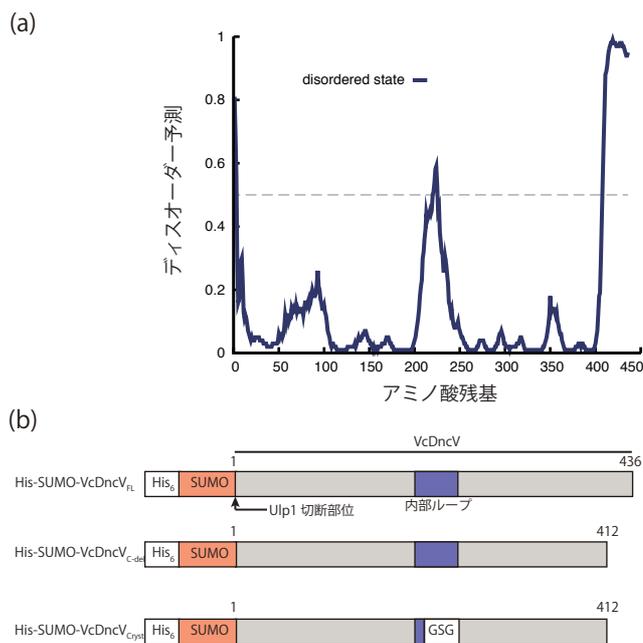


図 3-2 DncV の発現コンストラクトの設計

- (a) VcDncV のディスオーダー予測。内部ループ、および、C 末端でディスオーダーしていることが予想される。
(b) 作製した VcDncV の発現コンストラクト。それぞれ Ulp1 によって His-SUMO タグを切断したものを結晶化に用いた。

置換体 VcDncV_{Cryst} を用いて Native 結晶と類似の結晶化条件において結晶化をおこなったが、結晶は得られなかった。そこで Native 結晶を結晶核としたストリークシーディングをおこなうことで 100-200 μm の SeMet 置換体 VcDncV_{Cryst} の結晶を得た (図 3-5b)。この結晶に対して、X 線回折実験をおこなったところ 1.77 Å 分解能で 720 枚の SAD 回折データを収集した (図 3-6b)。結晶の空間群は C2 に属し、格子定数は $a = 119.0$, $b = 50.74$, $c = 73.07$ Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 93.1^\circ$ であった。データセットの統計値を表 3-1 に示した。

3.3.1.4 VcDncV_{Cryst} 位相決定と構造精密化

SeMet 置換体 VcDncV_{Cryst} の 1.77 Å までの SAD データをもとに、非対称単位当たり 14 個のセレン原子の位置を特定した。特定したセレン原子の位置をもとにプログラム autoSHARP⁸³ を用いて実験的位相を決定し、溶媒平滑化をおこなうことで、タンパク質分子と溶媒領域が明確に区切られた電子密度マップを得た (図 3-7a)。この電子密度マップをもとに、Autobuild⁸⁴ による自動モデルビルディング、その後手動でモデルビルディングと構造精密化を

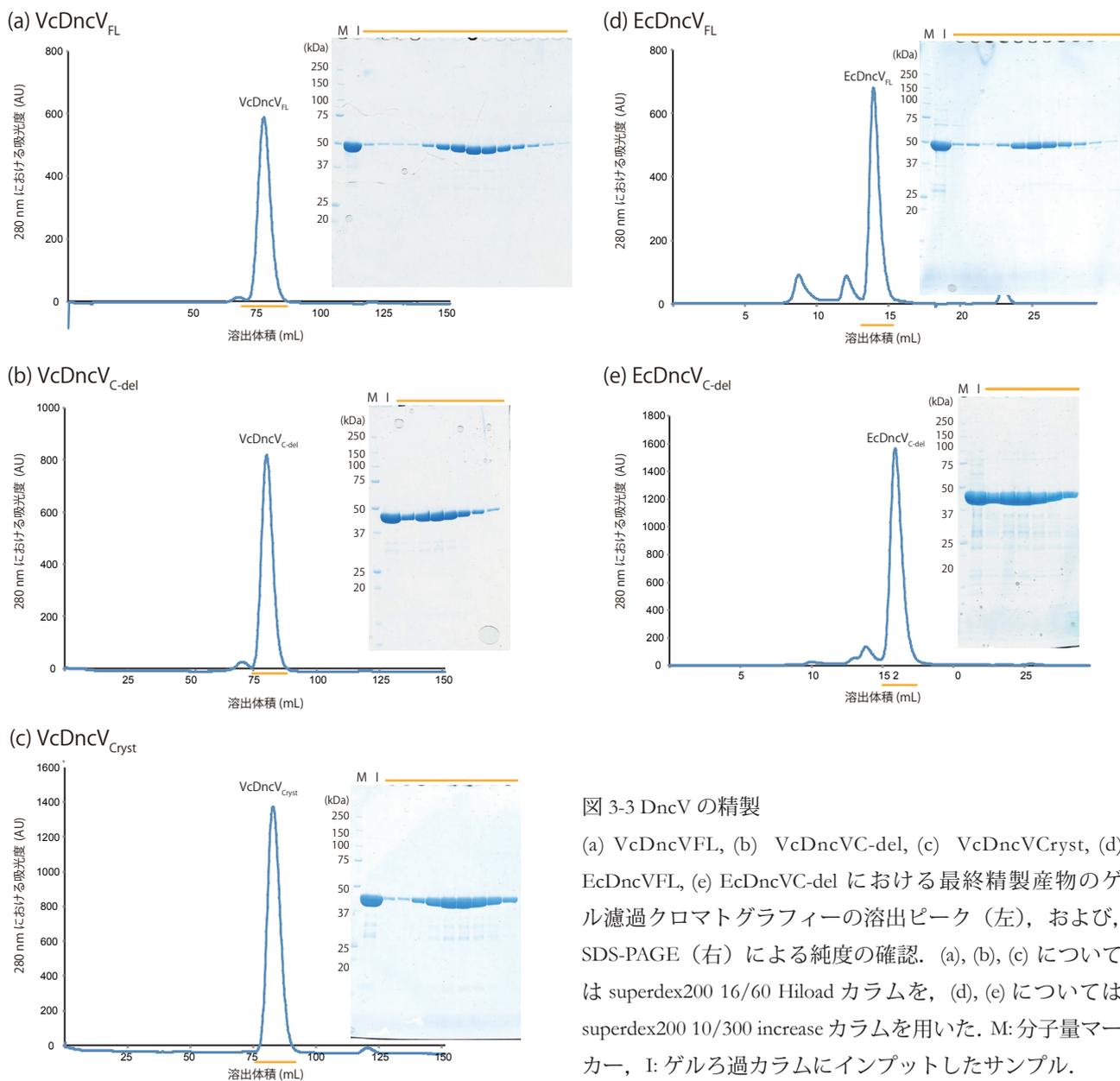


図 3-3 DncV の精製

(a) VcDncV_{FL}, (b) VcDncV_{C-del}, (c) VcDncV_{Cryst}, (d) EcDncV_{FL}, (e) EcDncV_{C-del} における最終精製産物のゲル濾過クロマトグラフィーの溶出ピーク (左), および, SDS-PAGE (右) による純度の確認. (a), (b), (c) については superdex200 16/60 Hiload カラムを, (d), (e) については superdex200 10/300 increase カラムを用いた. M: 分子量マーカー, I: ゲルろ過カラムにインプットしたサンプル.

繰り返した. 最終的に $R_{\text{free}} = 20\%$, $R_{\text{work}} = 17\%$ まで R 値を低下させることができた. 最終的な電子密度マップとラマチャンドラプロットを図 3-7b,c に、構造精密化の統計値を表 3-1 に示した.

3.3.2 VcDncV_{Cryst}-ヌクレオチド複合体の構造決定

VcDncV_{Cryst}-GTP 複合体構造は, VcDncV_{Cryst} の結晶に対して GTP をソーキングすることで 1.65 Å 分解能 (図 3-6c) で決定した. VcDncV_{Cryst}-ATP 複合体構造を決定するために, VcDncV_{Cryst}-ATP の共結晶化をおこなったものの, 結晶構造中で ATP に相当する電子密度は観察されず, ピロリン酸に相当する電子密度が観察された. このことから ATP 存在化では VcDncV による触媒反応が進んでしまったと考え, 触媒反応が進まない ATP 類似体, 3'-dATP を

用いて共結晶化をおこなった (図 3-5c). 得られた結晶から 1.65 Å 分解能の回折データセットを収集することに成功し (図 3-6d), 結晶構造中で 3'-dATP に相当する電子密度が観察された. 最終的な構造精密化の統計値を表 3-1 に示した.

3.3.3 EcDncV の調製と結晶化, および, EcDncV_{C-del}-3'-dGTP 複合体の構造決定

EcDncV_{FL} (1-432), EcDncV_{C-del} (1-407) を VcDncV と同様の方法で発現・精製したところ, ゲルろ過クロマトグラフィーにおいて単分散性のピークを示し (図 3-3d, e), 収量は 1 L 培養液あたりそれぞれ約 0.35 mg, および, 1 mg であった. 精製した EcDncV を用いて結晶化スクリーニングをおこなったところ, 5 mg/ml EcDncV_{C-del} (10 mM

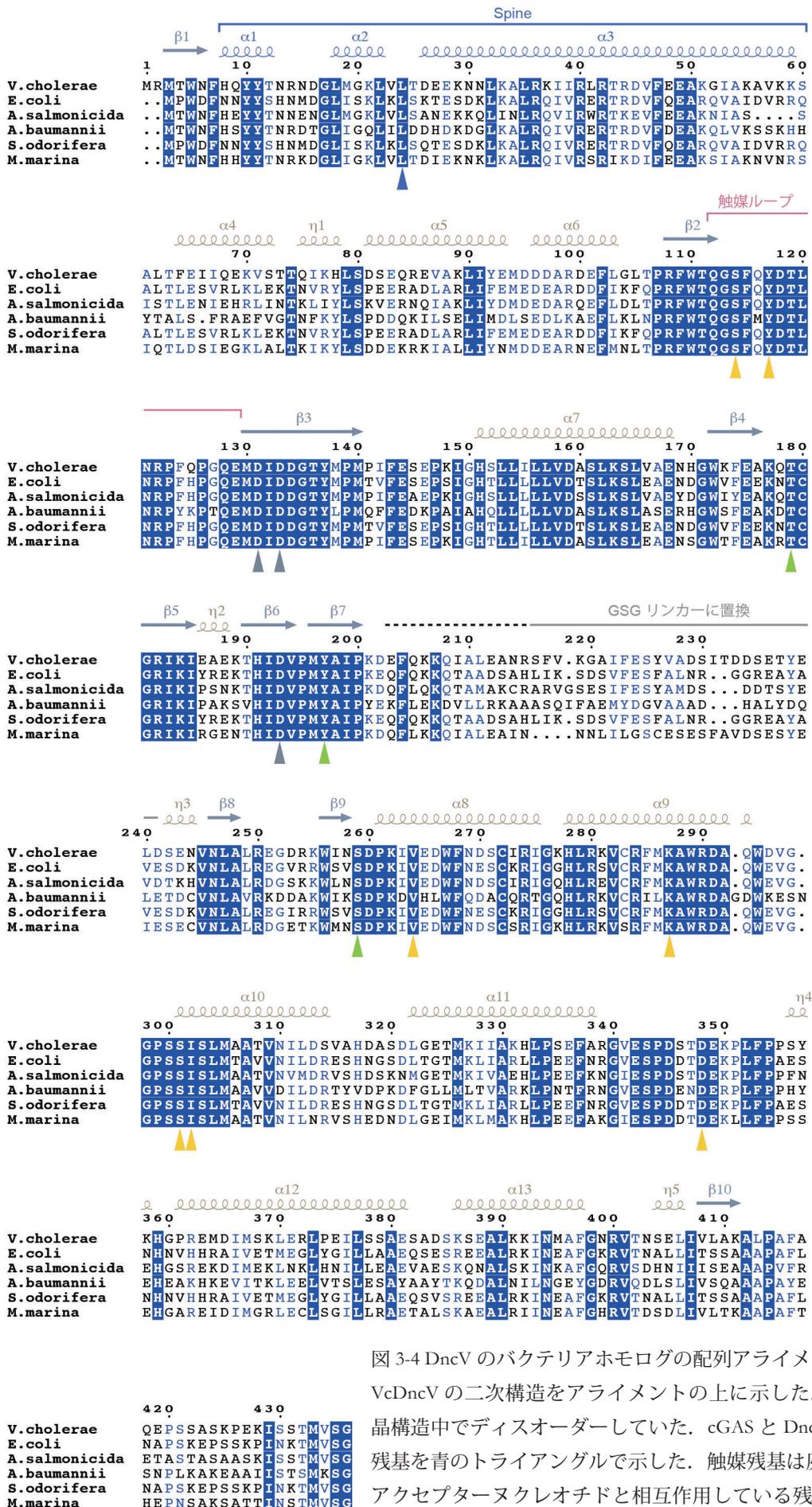


図 3-4 DncV のバクテリアホモログの配列アライメント

VcDncV の二次構造をアライメントの上に示した。点線で示した領域は結晶構造中でディスオーダーしていた。cGAS と DncV で保存されたロイシン残基を青のトライアングルで示した。触媒残基は灰色のトライアングルで、アクセプターヌクレオチドと相互作用している残基を緑、ドナーヌクレオチドと相互作用している残基を黄色のトライアングルでそれぞれ示した。

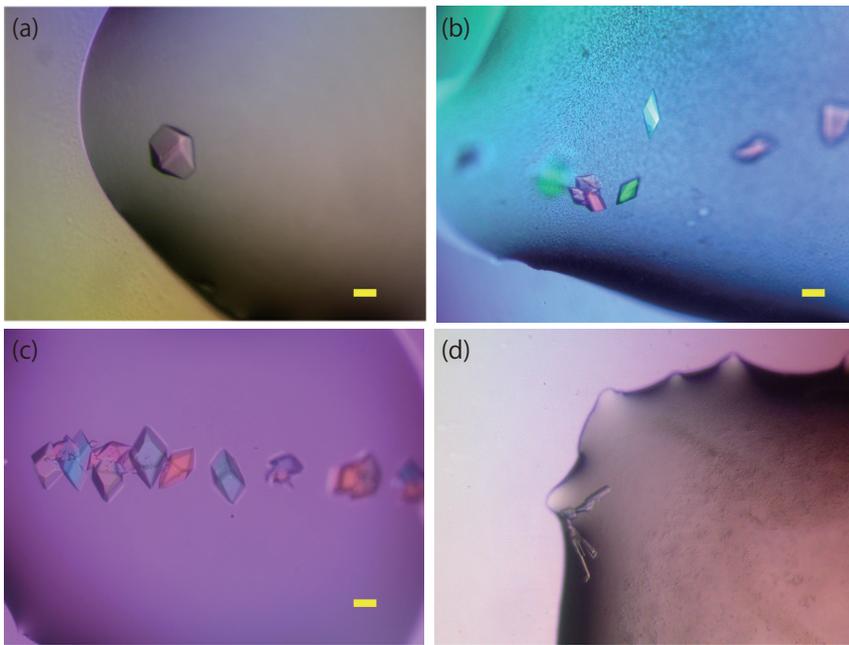


図 3-5 DncV の結晶

(a) Native VcDncVcryst, (b) Semet 置換体 VcDncVcryst, (c) Native VcDncVcryst-3'-dATP 複合体, (d) EcDncVC-del-3'-dGTP 複合体の結晶. スケールバーは 100 μm を示す.

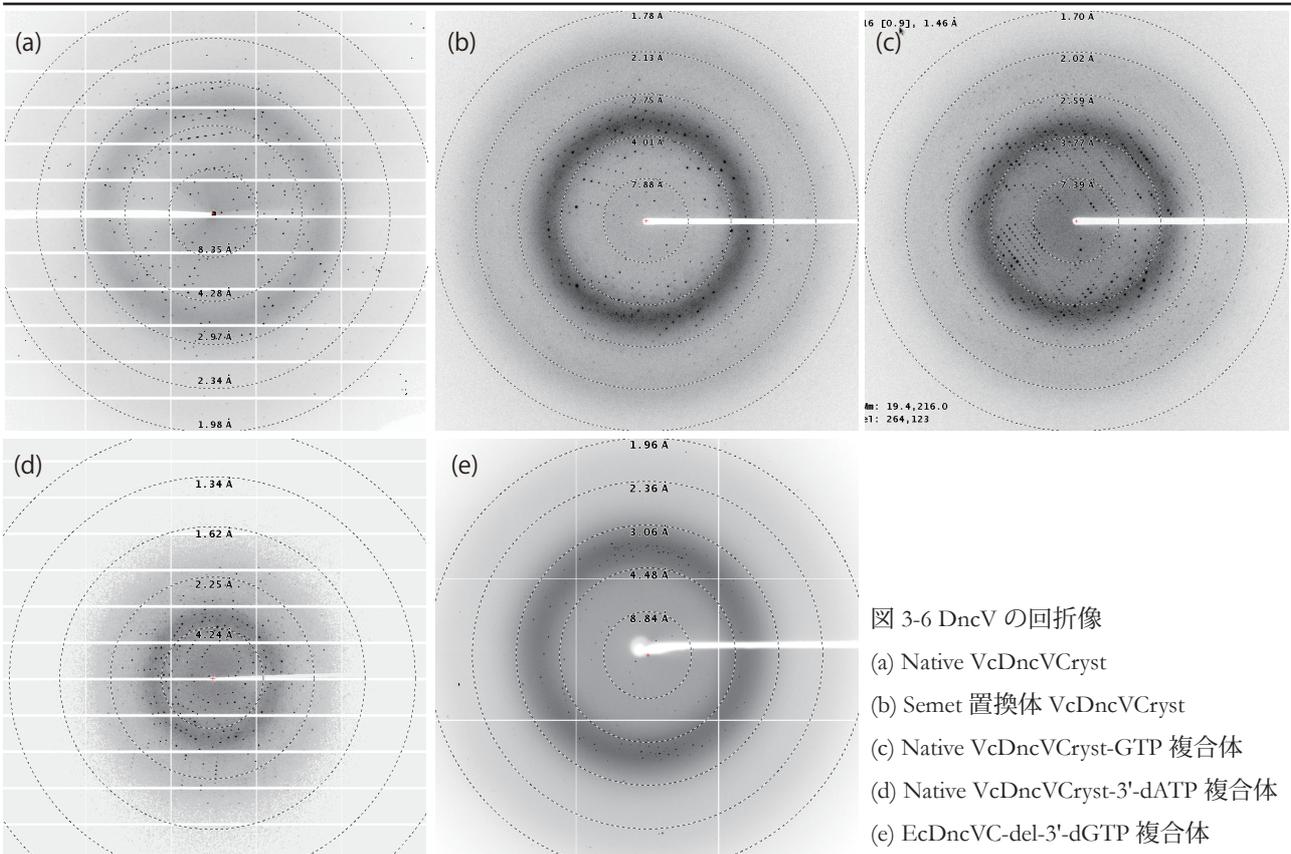


図 3-6 DncV の回折像

(a) Native VcDncVcryst
 (b) Semet 置換体 VcDncVcryst
 (c) Native VcDncVcryst-GTP 複合体
 (d) Native VcDncVcryst-3'-dATP 複合体
 (e) EcDncVC-del-3'-dGTP 複合体

MgCl₂, 2.5 mM 3'-dGTP, 2.5 mM ATP), リザーバー条件 JCSG+ H8 (0.2 M sodium chloride, 0.1 M Bis-tris pH5.5, 25% PEG 3,350) において約 80 μm の結晶を得た (図 3-5d). この結晶化条件をもとに結晶化条件の最適化をおこなったが, より良質な結晶を再現よく得ることはできなかった. そこで初期スクリーニングにおいて得られた結晶について, X 線回折実験をおこなったところ 2.31 \AA 分解能で 180 枚の回折データを収集した (図 3-6e). 結晶の空間群は C2 に属し, 格子定数は $a = 136.1 \text{\AA}$, $b = 46.30$, $c = 62.57 \text{\AA}$,

$\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 111^\circ$ であった. データセットの統計値を表 3-1 に示した. この回折データをもとに, 3.6.1.4 で決定した VcDncV_{cryst} の構造情報をサーチモデルとして分子置換をおこなうことで決定した. Coot によるモデルビルディング, および, PHENIX による構造精密化を繰り返し, 最終的に $R_{\text{free}} = 23\%$, $R_{\text{work}} = 19\%$ まで R 値を低下させることができた. 最終的な構造精密化の統計値を表 3-1 に示した.

表 3-1 DncV の回折データ, および, 構造精密化後の統計値

	VcDncV apo (SeMet)	VcDncV-GTP	VcDncV-3'-dATP	EcDncV-3'-dGTP
Data collection				
Space group	C2	C2	C2	C2
Cell dimensions				
<i>a, b, c</i> (Å)	119.0, 50.74, 73.07	118.8, 49.85, 72.86	118.0, 51.30, 71.54	136.1, 46.30, 62.57
α, β, γ (°)	90.0, 93.1, 90.0	90.0, 93.5, 90.0	90.0, 93.9, 90.0	90.0, 111, 90.0
Resolution (Å)	50.0–1.77	50.0–1.65	50.0–1.60	50.0–2.31
	(1.80–1.77)	(1.75–1.65)	(1.69–1.60)	(2.45–2.31)
R_{sym}	0.114 (0.630)	0.084 (0.495)	0.033 (0.302)	0.126 (0.597)
$I / \sigma I$	60.0 (5.28)	10.2 (2.67)	18.8 (3.29)	11.6 (2.48)
Completeness (%)	99.3 (98.4)	97.2 (89.3)	97.5 (92.1)	99.5 (98.9)
Redundancy	15.3 (14.8)	3.8 (3.6)	3.4 (3.2)	3.7 (3.7)
Refinement				
Resolution (Å)	47.3–1.77 (1.83–1.77)	46.0–1.65 (1.71–1.65)	47.0–1.60 (1.65–1.60)	37.1–2.31 (2.39–2.31)
No. reflections	82,529	49,988	55,529	16,217
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0.173 / 0.199	0.174 / 0.206	0.169 / 0.195	0.189 / 0.234
No. atoms				
Protein	2,923	2,938	2,987	3,003
Ligand/ion	0	56	53	56
Water	235	263	280	100
<i>B</i> -factors				
Protein	33.6	25.9	30.8	32.5
Ligand/ion	0	30.0	51.3	28.7
Water	35.4	32.3	37.8	33.7
R.m.s. deviations				
Bond lengths (Å)	0.018	0.009	0.006	0.003
Bond angles (°)	1.565	1.224	1.074	0.669
Ramachandran plot				
Most favored (%)	98.37	99.18	98.13	98.93
Allowed (%)	1.63	0.82	1.87	1.07
Disallowed (%)	0.00	0.00	0.00	0.00

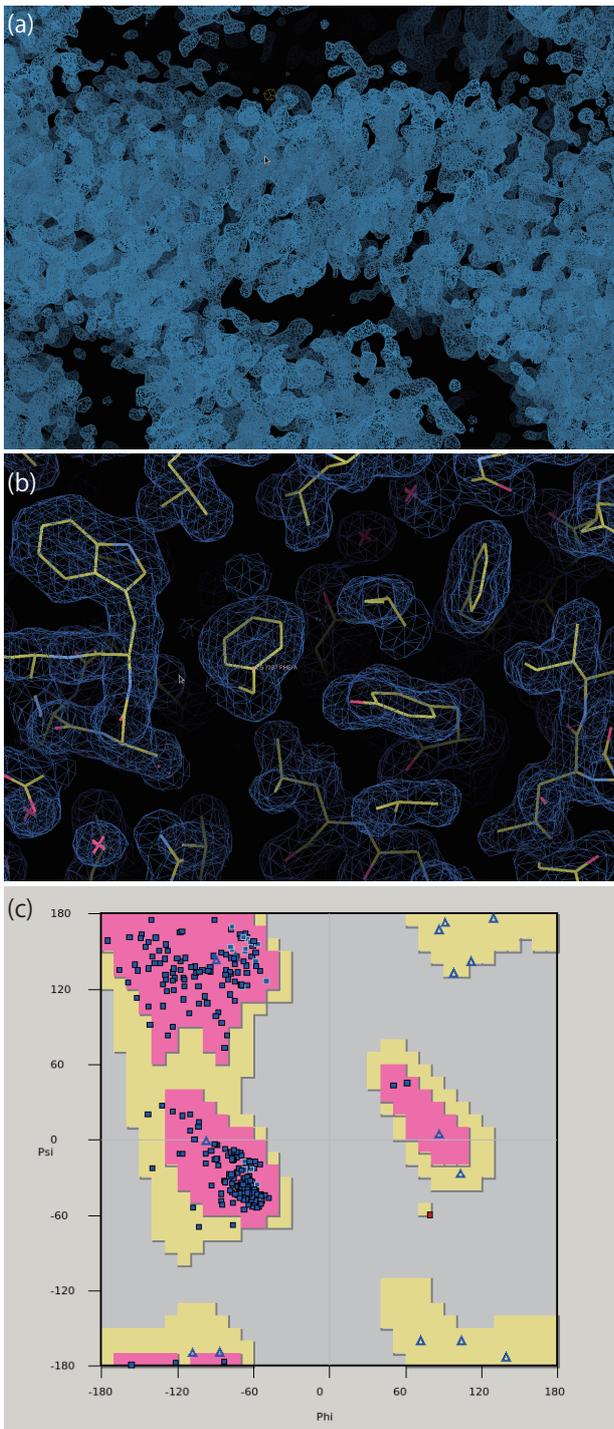


図 3-7 DncV の構造決定

- (a) Se 原子の異常分散を用いて実験的に決定した VcDncV の初期位相マップ
- (b) モデルビルディング後の最終的な VcDncV の 2Fo-Fc 電子密度マップ. DncV 分子を黄色で示した. それぞれのマップを青色のメッシュ, Contour level = 1.0 σ で示した.
- (d) 最終的な VcDncV のラマチャンドラプロット

3.3.4 DncV の全体構造

VcDncV_{Cryst}-GTP 複合体, および, EcDncV_{C-del}-3'-dGTP 複合体の結晶構造を図 3-8 に示した. VcDncV_{Cryst}-GTP 複合体の構造は, VcDncV_{Cryst} apo 型, VcDncV_{Cryst}-3'-dATP 複合体の構造とほとんど同一であった (r.m.s.d. < 0.57 Å) ため, 以降特に記述がない限りは VcDncV_{Cryst}-GTP 複合体の結晶構造について詳述する. 保存性の低い内部ループ領域 (VcDncV_{Cryst} の 203-215 残基, EcDncV_{C-del} の 201-235 残基) に相当する電子密度は観察されなかった (図 3-8a). VcDncV と EcDncV は異なる結晶のパッキングであったにもかかわらず, これらの構造は類似していた (r.m.s.d. = 1.4 Å). このことから内部ループは構造的にフレキシブルであり, 全体構造に影響をあたえないことを示している.

DncV は N 末端の α/β 触媒コア, および, C 末端のヘリックスバンドルの 2 つのドメインから構成される伸びた構造をとる (図 3-8a). このフォールド構造は, ヌクレオチジルトランスフェラーゼスーパーファミリーによく見られ, Spine が 2 つのドメインを構造的に支持する. 深い触媒ポケットが α/β 触媒コアとヘリックスバンドルの間に存在しており, 触媒ループ (112-129 残基) が触媒ポケットの底に位置している. ヌクレオチジルトランスフェラーゼスーパーファミリーに保存された触媒残基 (Asp131, Asp133, Asp193) が α/β 触媒コアの b シート上に存在し, 2 つの Mg イオンと 2 つのヌクレオチドが活性部位に結合している. VcDncV で観察されたこれらの構造的な特徴は, EcDncV においても保存されていることから (図 3-8b), この構造の機能的な重要性を示している. また配列の相同性が低いにもかかわらず (< 10%), DncV はヒト由来, マウス由来, ブタ由来 cGAS と構造的に似ていた (r.m.s.d. = 2.9-3.2 Å) (図 3-9a) ^{64,66,85}.

3.3.5 DncV の恒常的な活性化機構

哺乳類 cGAS は dsDNA 存在下でのみ 2'-5' cGAMP の産生を触媒する ⁶². 一方で DncV は恒常的な活性を持ち, dsDNA 非存在下においても 3'-5' cGAMP を産生できる ⁷⁷. これらの触媒的な活性化機構の違いを説明するために, VcDncV とマウス由来 cGAS の構造を比較した. 哺乳類 cGAS は dsDNA の結合に伴い, Spine 上のロイシン残基 (マウスでは Leu159) が触媒コアの方へと構造変化を起こすことで, 触媒ポケットが安定化され活性化される (図 3-9b,c) ^{64,66}. 相当するロイシン残基は DncV でも保存されており (VcDncV における Leu24), Leu24 は既に触媒コアの方へ向いており, Leu32, Leu120 と Met130 と疎水性相互作用を形成して触媒ループを安定化している (図

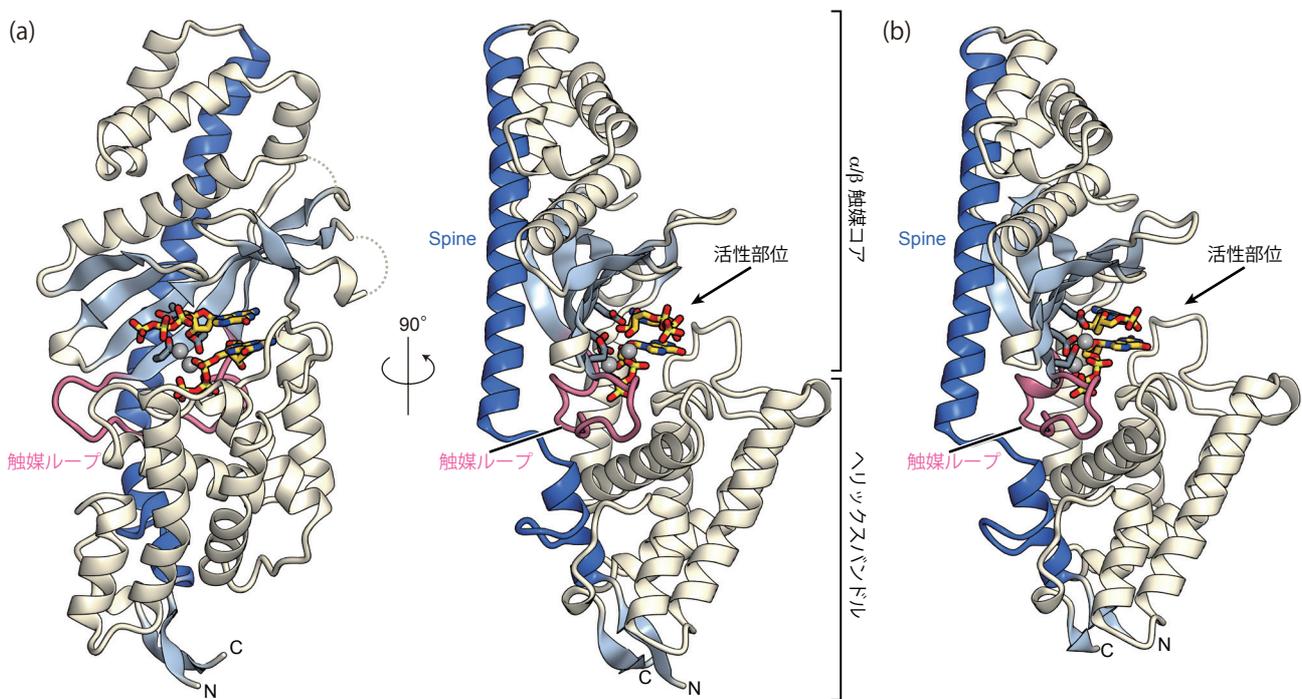


図 3-8 DncV の全体構造

(a) VcDncV-GTP 複合体の結晶構造をリボンモデルで示した。αヘリックスとβシートをベージュ色と水色でそれぞれ色わけした。Spineと触媒ループは青色とピンク色でそれぞれ色わけした。触媒残基は灰色のスティックモデルで示した。活性部位に結合したMgイオンとヌクレオチドは灰色の球と黄色のスティックモデルでそれぞれ示した。

(b) EcDncV-3'-dGTP 複合体の結晶構造。(a)と同じように示した。

3-9d). さらに DncV の Spine 上の Glu28 は触媒ループ上の Arg122 とソルトブリッジを形成して安定化している。その結果 VcDncV の Spine の構造は cGAS の不活性型の構造よりも活性型の構造に類似している。これらのことから DncV の触媒ループはリジッドな構造をとっており dsDNA 非存在下でも触媒ポケットの安定化に寄与し、恒常的な DncV の触媒活性を反映している。

3.3.6 Donor と Acceptor ポケットによるヌクレオチド認識

VcDncV の GTP 複合体、および、3'-dATP 複合体構造において、Donor と Acceptor ポケットの両方においてヌクレオチドに相当する電子密度が観察された (図 3-10a, 11a)。GTP 複合体では、2つの Mg イオンが活性部位に結合している (図 3-10b)。Mg イオン (M1) は Asp131, Asp133, donor ヌクレオチドのリン酸基、および、水分子によって配位されている。Mg イオン (M2) は、acceptor ヌクレオチドの 3'-OH, Asp131, donor ヌクレオチドの α リン酸、および、3つの水分子によって配位されている。3'-dATP 複合体では、M1 は GTP 複合体と同様に配位していたが、M2 に相当する電子密度は観察されなかった (図 3-10b)。VcDncV の GTP 複合体において、M1 の

B-factor は 21.7 \AA^2 だったのに対して、M2 の B-factor は 32.4 \AA^2 であったことから、M2 は反応性に富んだ原子であると考えられる。また GTP 複合体、3'-dATP 複合体の両方において、acceptor ヌクレオチドと donor ヌクレオチドはホスホジエステル結合によってつながれていなかった (図 3-10a, 11a)。このことは、本研究で決定した構造が、一回目のヌクレオチジルトランスファー反応が起きる前の状態 (pre-reaction state) であることを示している。

Pre-reaction state において、DncV の donor ポケットは GTP と 3'-dATP を同じように認識していた (図 3-11b, 左と中央)。GTP 複合体では donor ポケットに結合した GTP は syn コンフォメーションをとり、ベース部位の N1, N2 原子は Asp348 と 2 本の水素結合を形成している (図 3-11b, 左)。加えてベース部位は Val264, Ile302 の側鎖とファンデルワールス相互作用を形成している。リボース部位の 3'-OH は Tyr117 の側鎖と水素結合している。リン酸部位は触媒ループ上の Ser114, Tyr117、および、ヘリックスバンドル上の Lys287, Ser301 とそれぞれ水素結合を形成している。3'-dATP 複合体においても、donor ポケットに結合した 3'-dATP は GTP と同様に anti コンフォメーションをとり、リン酸基とリボース部位は GTP と同じように認識されていた (図 3-11b, 中央)。しかしながら、

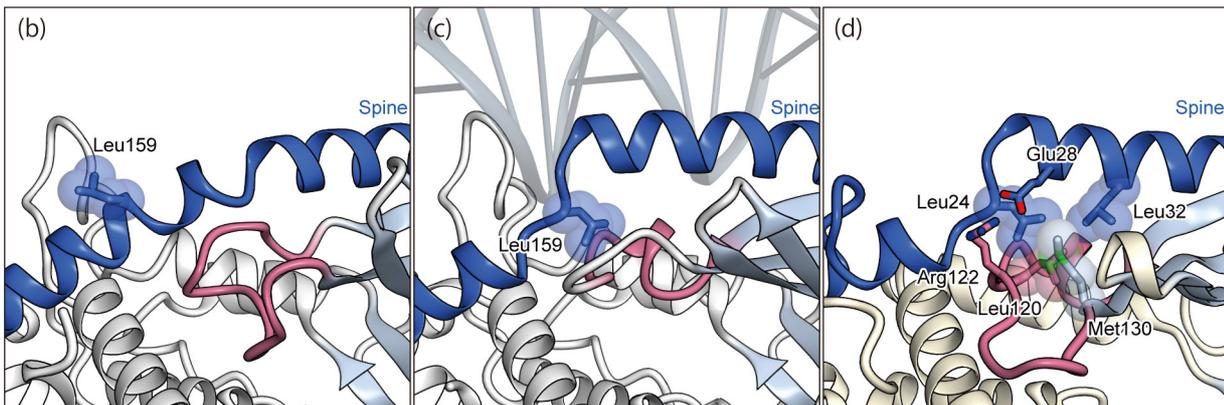
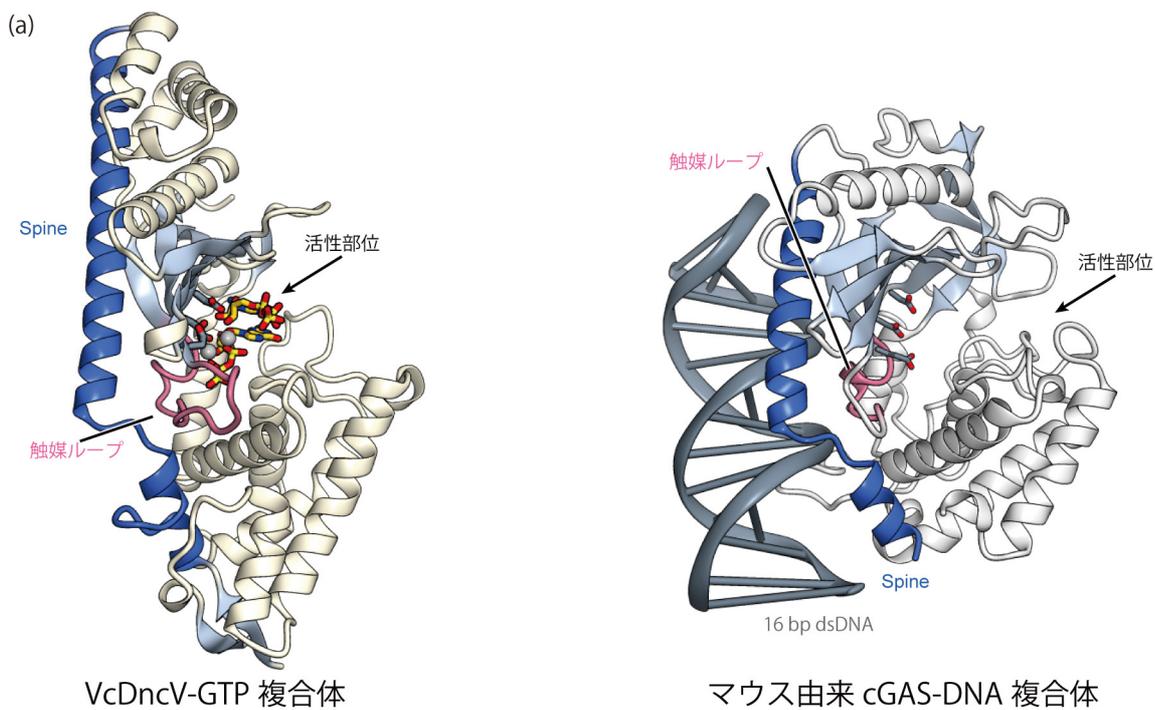


図 3-9 DncV と cGAS の構造比較, および, DncV における Spine と触媒ループの構造的な剛性

(a) VcDncV-GTP 複合 (左), マウス由来 cGAS-18 bp dsDNA 複合体 (PDB 4K96 右) の全体構造. マウス由来 cGAS の α -ヘリックスは灰色で, 結合した dsDNA は灰色のリボンモデルで示した.

(b) マウス由来 cGAS apo 型 (PDB 4K8B), (c) マウス由来 cGAS-18 bp dsDNA 複合体 (PDB 4K96), (d) VcDncV における Spine と触媒ループの拡大図. アミノ酸残基スティックと CPK モデルで示した.

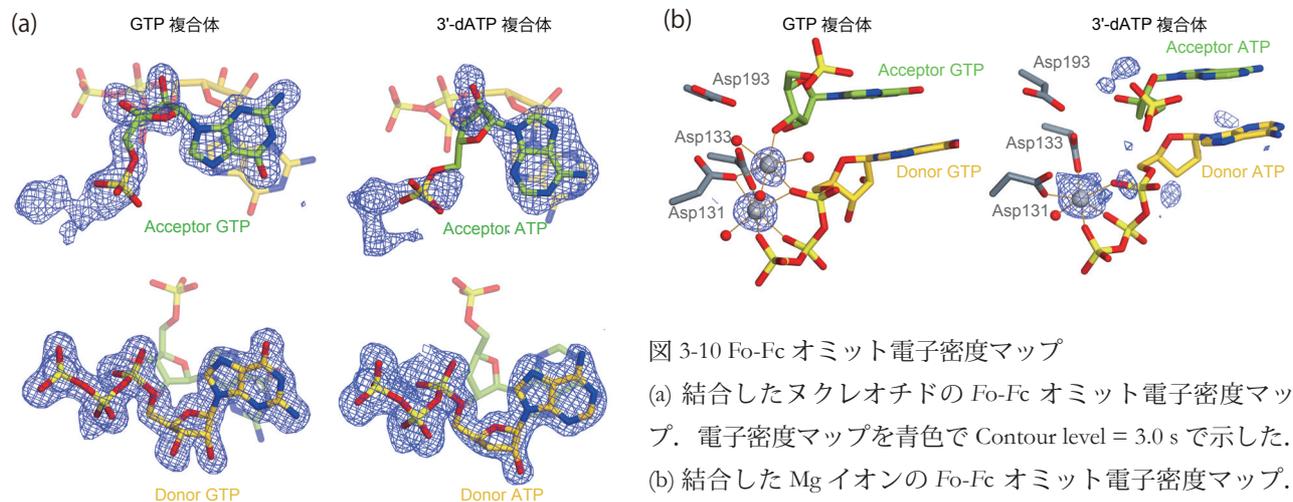


図 3-10 Fo-Fc オミット電子密度マップ

(a) 結合したヌクレオチドの Fo-Fc オミット電子密度マップ. 電子密度マップを青色で Contour level = 3.0 σ で示した.

(b) 結合した Mg イオンの Fo-Fc オミット電子密度マップ. 電子密度マップを青色で Contour level = 4.0 σ で示した.

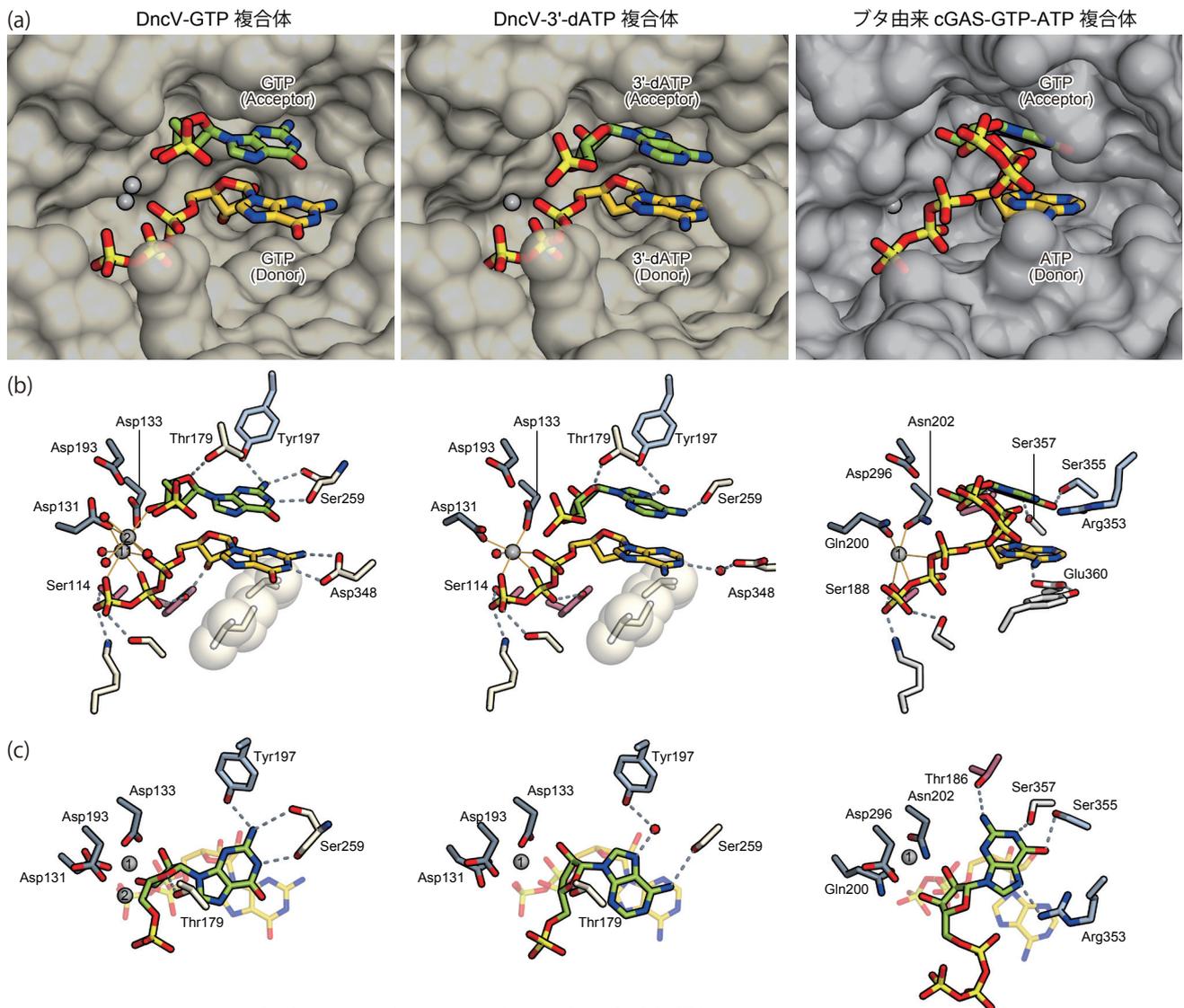


図 3-11 Pre-reaction state における DncV と cGAS によるヌクレオチド認識

(a) VcDncV-GTP 複合体 (左)、VcDncV-3'-dATP 複合体 (中央)、ブタ由来 cGAS-GTP-ATP 複合体 (PDB 4KB6, 右) の分子表面. 結合した acceptor ヌクレオチド, および, donor ヌクレオチドを緑と黄色のスティックモデルで示した. 結合した Mg イオンは灰色の球で示した.

(b, c) VcDncV-GTP 複合体 (左), VcDncV-3'-dATP 複合体 (中央), ブタ由来 cGAS-GTP-ATP 複合体 (PDB 4KB6, 右) のヌクレオチドと触媒部位の相互作用. 相互作用に関係するアミノ酸残基をスティック、CPK モデルで示した.

アデニンベースは Asp348 と N1 原子間の 1 つの水素結合のみによって認識されていた. これらのことは DncV の donor ポケットは ATP よりも GTP を特異的に認識することを示している.

一方で, DncV の acceptor ポケットは GTP と 3'-dATP を異なる様式で認識している (図 3-11c, 左と中央). Acceptor GTP は anti コンフォメーションをとるが, acceptor ポケットに結合した 3'-dATP は syn コンフォメーションをとっている. GTP の N1 原子は Ser259 の側鎖と直接水素結合を形成しており, N2 原子は Ser259 の主鎖, および, Tyr197 の側鎖と水素結合している (図 3-11c, 左). 一方で 3'-dATP の N6 原子は Ser259 の側鎖と直接水素結合を

形成しており, N7 原子は Ser259 の主鎖, および, Tyr197 の側鎖と水を介した水素結合を形成して, acceptor 3'-dATP の syn コンフォメーションを安定化している (図 3-11c, 中央). これらのことから, DncV の acceptor ポケットは ATP よりも GTP に対して親和性を持つことが示唆された.

3.3.7 DncV が 3'-5' ホスホジエステル結合を触媒することの構造的説明

ヌクレオチジルトランスファー反応は acceptor ヌクレオチドのリボース部位の OH 基が, 触媒残基 (Asp193) と Mg イオン (M2) によって活性化され, Donor ヌクレオ

チドの α リン酸に求核攻撃をおこなうことで、ホスホジエステル結合が形成される⁸⁶。VcDncV-GTP 複合体において、acceptor GTP の 3'-OH は触媒残基の Asp193、および、donor ヌクレオチドの α リン酸の近傍に位置している (図 3-11b, c, 左)。acceptor GTP の 3'-OH と Asp193 の側鎖の酸素原子間の距離は 2.8 Å であり、2'-OH と Asp193 の側鎖の酸素原子間の 4.6 Å よりも近い。また acceptor GTP の 3'-OH と donor ヌクレオチドの α リン酸基との距離は 4.4 Å であり、2'-OH と α リン酸基との距離の 5.0 Å よりも近い (図 3-11b, c, 左)。これらのことは、acceptor ヌクレオチドの 2'-OH よりも、3'-OH の方が、donor ヌクレオチドの α リン酸基への求核攻撃に適した位置にあることを示している。ゆえに、DncV は 3'-5' ホスホジエステル結合を最初の反応において触媒することを構造的に説明できる。

3.3.8 DncV による 3'-5' cGAMP 産生の特異性

過去の生化学的解析によって、DncV は 3 つの異なる CDN (cyclic di-GMP, cyclic di-AMP, 3'-5' cGAMP) を産生できることが示されていた⁷⁷。本研究で決定した VcDncV-GTP 複合体、VcDncV-3'-ATP 複合体構造中で、GTP と 3'-dATP の両方のリボース部位、リン酸基は acceptor ポケットと donor ポケットによって同じように認識されている (図 3-11b, c, 左, 中央)。このことから、DncV がなぜ 3 つの CDN を産生できるかを構造的に説明できる。しかしながら、DncV は、ATP と GTP の両方が存在下するときには、3'-5' cGAMP を優先的に産生することが報告されている⁷⁷。この事実は、本研究の DncV の構造から示唆された「donor ポケットと acceptor ポケットはともに、GTP を特異的に認識する」と一致しない。そのため何が acceptor ポケットの ATP に対する特異性を規定しているのかという、疑問が依然として残っている。

GTP 複合体では、acceptor ポケット donor ポケットはともに、GTP が結合している。Acceptor GTP の 3'-OH は donor GTP の α リン酸に近くに位置しているが、求核攻撃には適していない (図 3-12)。このことは反応遷移状態へのエネルギー障壁が高いことを示しており、そのために DncV は pre-reaction state という状態の結晶構造としてトラップされたと考えられる。一方で DncV を ATP と共結晶化すると、結晶構造中でピロリン酸に相当する電子密度が観察され ATP は結合していなかった。さらに Acceptor GTP の B-factor は 30.7 Å² なのに対して、Acceptor 3'-dATP の B-factor は 86.7 Å² であることから、Acceptor ATP の反応性の高さを示唆している。これらのことから ATP 複合体においては反応のエネルギー障壁

が低いことが推察され、そのため結晶化中にヌクレオチジルトランスファー反応がおきたと考えられる。ゆえに DncV は acceptor ポケットに ATP が結合した際に、効率良くホスホジエステル結合の形成を触媒し、pppA(3'-5')pG を反応中間体として特異的に産生する。Acceptor ポケットにおける GTP と ATP 間の触媒効率の違いをさらに詳しく理解するために、VcDncV-3'-dATP 複合体の結晶構造をもとに ATP の acceptor ポケットへの結合モデルを作製した (図 3-12)。このモデルは ATP のリボース部位が acceptor ポケットに GTP 複合体とは異なる様式で結合することを示唆しており、ATP の 3'-OH は donor ヌクレオチドの α リン酸の近傍 (3.6 Å) に、 α リン酸への "Inline attack" に適切な配向で位置している。この ATP と GTP 間のリボース部位の配向の違いは syn と anti コンフォメーションというアデニンとグアニン塩基間で異なる結合様式に起因している (図 3-11c, 左と中央)。まとめると、DncV の acceptor ポケットは ATP と GTP の両方を認識できるが、ヌクレオチド間で異なる結合様式をとることによって、ATP に対してより高い触媒効率が達成される。Donor ポケットは、GTP に対して高い特異性を持つことと合わせて、DncV は Donor ポケットに GTP を acceptor ポケットに ATP をそれぞれ結合し、ホスホジエステル結合を触媒することで、pppA(3'-5')pG を特異的に中間産物として産生し、最終的には 3'-5' cGAMP を産生する。

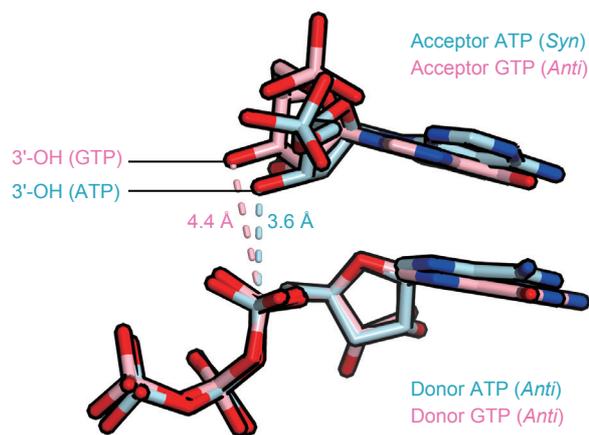


図 3-12 VcDncV-GTP 複合体と VcDncV-ATP 複合体モデル間のヌクレオチドの重ね合わせ

ATP と GTP は青とピンクのスティックモデルでしめした。このモデル中では ATP の 3'-OH は donor ヌクレオチドの α リン酸の近傍に、Inline attack に適切な配向で位置している。

3.3.9 DncV と cGAS 間のヌクレオチジルトランスファー反応における結合特異性

一回目のヌクレオチジルトランスファー反応において cGAS は 2'-5' ホスホジエステル結合を触媒するが、DncV は 3'-5' ホスホジエステル結合を触媒する。本研究の進行中に、他の研究グループによって VcDncV と pppA(3'-5') pG 複合体の中間体構造が報告された⁸⁷。DncV と cGAS の反応中間体の構造比較に基づいて、ヒト由来 cGAS の Arg376 (ブタ由来 cGAS の Arg353, および、VcDncV の Ile257 に相当) が 2'-5' ホスホジエステル結合特異的な触媒に重要であることが示唆されている。さらに cGAS の R376I 変異体は 2'-5' cGAMP ではなく 3'-5' cGAMP を産生することからも、Arg376 の重要性が確かめられている。しかしながら DncV と cGAS 間で異なる結合特異性は pre-reaction state において規定されているため、本研究で決定した DncV の pre-reaction state における構造比較は、結合特異性を規定する詳細なメカニズムに対する直接的な説明を提供する。ブタ由来 cGAS-GTP-ATP 複合体の pre-reaction state における構造では、Arg353 (ヒト由来 cGAS の Arg376 に相当) の側鎖の Guanidinium 基が acceptor GTP の Guanine 塩基の N7 原子と相互作用している (図 3-11c, 右)⁶⁶。本研究で決定した VcDncV-GTP 複合体の結晶構造をブタ由来 cGAS の構造に重ね合わせると、Arg353 の Guanidinium 基は DncV における acceptor GTP の Guanine 塩基の O6 原子と立体障害をおこす (図 3-13)。ゆえに cGAS では Arg353 の側鎖と塩基との相互作用によって、acceptor GTP の塩基部位が acceptor ポケッ

トの奥へと押し込まれる (図 3-13)。その結果 acceptor ヌクレオチド全体の配向が変わり、リボース部位の 2'-OH が求核攻撃に適した位置になる。一方でヒト由来 cGAS の R376I 変異体では、acceptor ヌクレオチドは小さい側鎖の Ile376 によって DncV と同じような配向で結合することで、R376I 変異体が 3'-5' cGAMP を産生する活性を示したと考えられる⁷⁷。以上のことから acceptor ヌクレオチドの塩基部位の配向が、cGAS と DncV の間で異なる結合特異性を規定していることが示唆された。

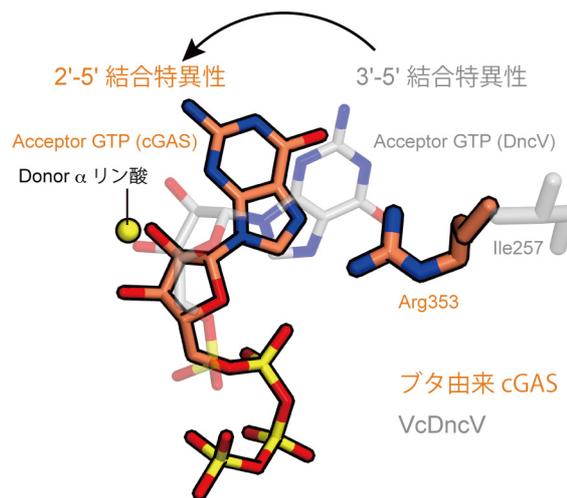


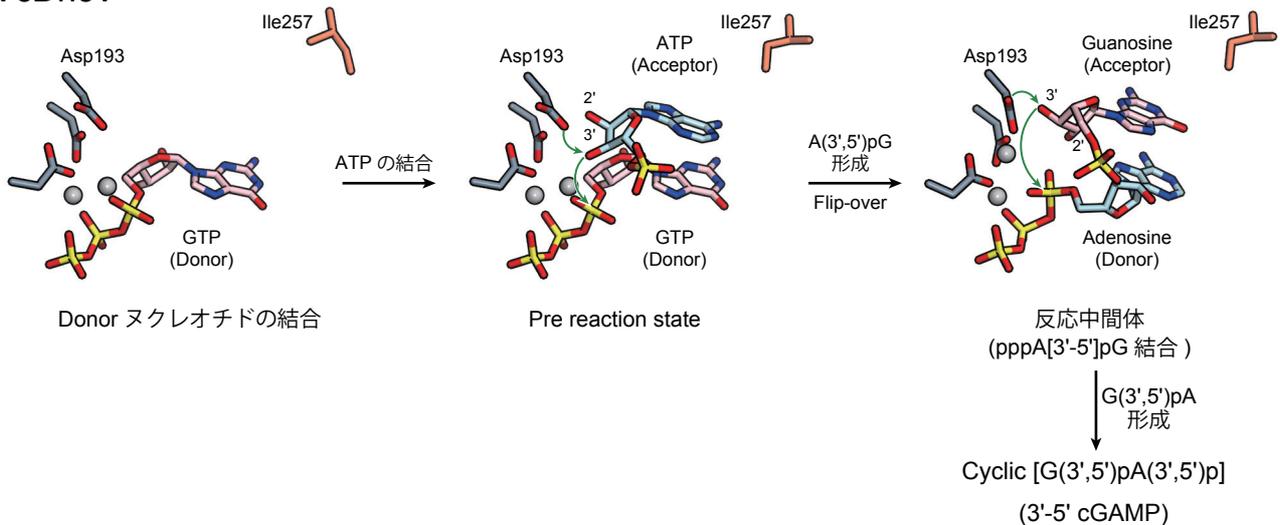
図 3-13 VcDncV とブタ由来 cGAS 間の pre-reaction state における acceptor GTP の重ね合わせ
ブタ由来 cGAS の acceptor GTP と Arg353 をオレンジ色のスティックモデルで示した。VcDncV の acceptor GTP と Ile257 を灰色のスティックモデルで示した。

3.4 まとめと展望

本研究では VcDncV apo 型, VcDncV-GTP 複合体, VcDncV-3'-dATP 複合体, および, EcDncV-3'-dGTP 複合体の pre-reaction state における結晶構造をそれぞれ高分解能で決定し, その構造から DncV による 3'-5' cGAMP 特異的な産生機構を明らかにした. Pre-reaction state において DncV は ATP を acceptor ポケットに, GTP を donor ポケットにそれぞれ収容し, acceptor ATP の 3'-OH を donor GTP

の α リン酸に向けることで 3'-5' ホスホジエステル結合を触媒する. 他のグループから報告された VcDncV-pppA(3'-5')pG 複合体の反応中間体構造では, pppA(3'-5')pG のアデニン塩基が donor ポケットに, グアニン塩基が acceptor ポケットにそれぞれ収容されており⁸⁷, 本研究で決定した pre-reaction state の構造と併せて, VcDncV による一連の 3'-5' cGAMP 産生機構を解明することに成功

VcDncV



ヒト由来 cGAS

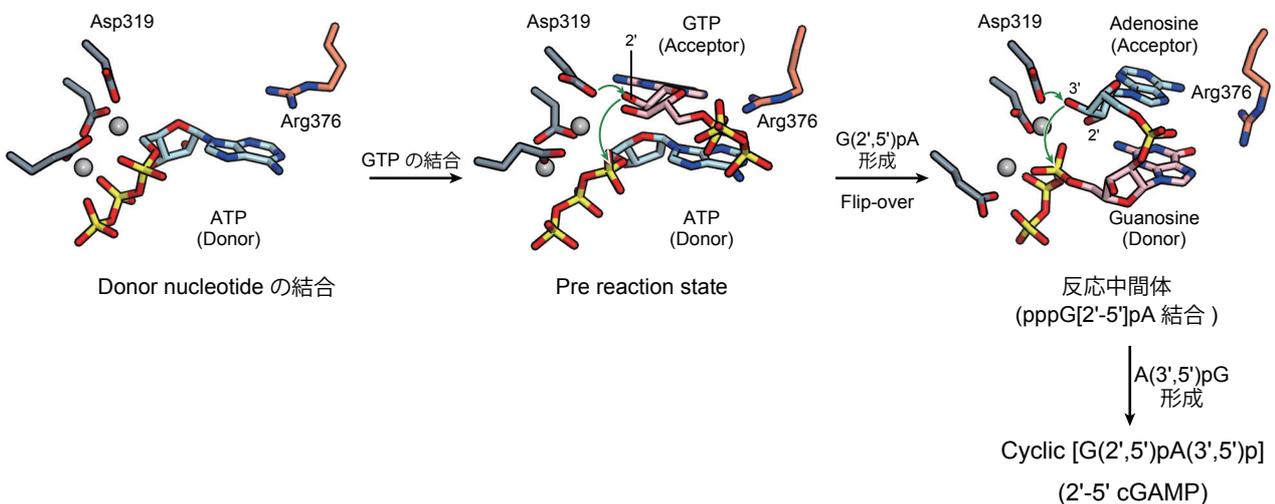


図 3-14 DncV と cGAS における触媒反応スキーム

DncV はまず GTP を donor ヌクレオチドとして, ATP を acceptor ヌクレオチドとしてそれぞれ活性部位に結合する. DncV は acceptor ATP の 3'-OH から donor GTP の α リン酸へのヌクレオチジルトランスファー反応を触媒し, pppA[3'-5']pG を産生する. その後 pppA[3'-5']pG は再び活性部位に結合し, アデノシンを acceptor ポケットにグアノシンを donor ポケットに収容する. 再びヌクレオチジルトランスファー反応を触媒し, 最終的に 3'-5' cGAMP を産生する. cGAS は ATP を donor ヌクレオチドとして, GTP を acceptor ヌクレオチドとしてそれぞれ活性部位に結合する. DncV は acceptor GTP の 2'-OH から donor ATP の α リン酸へのヌクレオチジルトランスファー反応を触媒し, pppG[2'-5']pA を産生する. その後 pppG[2'-5']pA は再び活性部位に結合し, グアノシンを acceptor ポケットにアデノシンを donor ポケットに収容する. 再びヌクレオチジルトランスファー反応を触媒し, 最終的に 2'-5' cGAMP を産生する.

した (図 3-14). さらに別のグループは VcDncV-葉酸アナログの複合体構造を決定し, 葉酸によって VcDncV の cGAMP 産生活性が抑制される機構を見出した⁸⁸. このことから *V.cholerae* は細胞内の葉酸濃度によって, cGAMP の産生を制御している可能性が示唆された. DncV ホモログは様々なグラム陰性, グラム陽性バクテリアにも存在し, 実際に本研究で決定した EcDncV-3'-dGTP 複合体の結晶構造中においても, 3'-5' cGAMP 産生, および, 葉酸の結合に重要な構造は保存されていた. これらのことから, 葉酸に依存的な 3'-5' cGAMP 濃度の調整機構は *V.cholerae* だけでなく *E.coli* を含むバクテリアにも存在することが示唆された.

さらに本研究で決定した pre-reaction state の VcDncV-GTP 複合体を, 過去に決定された pre-reaction state のブタ由来 cGAS-ATP-GTP 複合体と構造比較をおこない,

acceptor ヌクレオチドにおける配向が DncV と cGAS で異なる結合特異性を規定していることを明らかにした. DncV と cGAS は配列相同性が低いにも関わらず, 類似した構造を共有し, ともに cGAMP 産生を触媒することから DncV は cGAS の進化的な祖先にあたると思われる. cGAS は, DncV の葉酸に対する結合能を失って dsDNA に対する結合能を獲得し, さらに DncV の 3'-5' cGAMP から 2'-5' cGAMP へと結合特異性を変化させることで, ウイルス感染に対する PRR として進化したと考えられる. 2'-5' cGAMP はその受容体である STING に 3'-5' cGAMP に比べて強く結合し, 免疫応答を強く惹起する⁷⁹. この経路において, 細胞内の 2'-5' cGAMP がどのように代謝されるかは興味深く, 2'-5' 結合特異的なホスホジエステラーゼ, もしくは, 2'-5' cGAMP 特異的な加水分解酵素の同定が待たれている.

参考文献

1. Blake, C. C. et al. Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution. *Nature* 206, 757–761 (1965).
2. Kartha, G., Bello, J. & Harker, D. Tertiary structure of ribonuclease. *Nature* 213, 862–865 (1967).
3. Matthews, B. W., Sigler, P. B., Henderson, R. & Blow, D. M. Three-dimensional structure of tosyl-alpha-chymotrypsin. *Nature* 214, 652–656 (1967).
4. Stefan, C., Jansen, S. & Bollen, M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem. Sci.* 30, 542–550 (2005).
5. Umezū-Goto, M. et al. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J. Cell Biol.* 158, 227–233 (2002).
6. Van Meeteren, L. A. et al. Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol. Cell Biol.* 26, 5015–5022 (2006).
7. Sakagami, H. et al. Biochemical and molecular characterization of a novel choline-specific glycerophosphodiester phosphodiesterase belonging to the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *J. Biol. Chem.* 280, 23084–23093 (2005).
8. Albright, R. A. et al. NPP4 is a procoagulant enzyme on the surface of vascular endothelium. *Blood* 120, 4432–4440 (2012).
9. Hesse, L. et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9445–9449 (2002).
10. Johnson, K. et al. Matrix vesicle plasma cell membrane glycoprotein-1 regulates mineralization by murine osteoblastic MC3T3 cells. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 14, 883–892 (1999).
11. Johnson, K. et al. Linked deficiencies in extracellular PP(i) and osteopontin mediate pathologic calcification associated with defective PC-1 and ANK expression. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 18, 994–1004 (2003).
12. Okawa, A. et al. Mutation in Npps in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nat. Genet.* 19, 271–273 (1998).
13. Rutsch, F. et al. Mutations in ENPP1 are associated with ‘idiopathic’ infantile arterial calcification. *Nat. Genet.* 34, 379–381 (2003).
14. Ruf, N., Uhlenberg, B., Terkeltaub, R., Nürnberg, P. & Rutsch, F. The mutational spectrum of ENPP1 as arising after the analysis of 23 unrelated patients with generalized arterial calcification of infancy (GACI). *Hum. Mutat.* 25, 98 (2005).
15. Rutsch, F. et al. Hypophosphatemia, hyperphosphaturia, and bisphosphonate treatment are associated with survival beyond infancy in generalized arterial calcification of infancy. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 1, 133–140 (2008).
16. Maddux, B. A. et al. Membrane glycoprotein PC-1 and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 373, 448–451 (1995).
17. Grupe, A., Alleman, J., Goldfine, I. D., Sadick, M. & Stewart, T. A. Inhibition of insulin receptor phosphorylation by PC-1 is not mediated by the hydrolysis of adenosine triphosphate or the generation of adenosine. *J. Biol. Chem.* 270, 22085–22088 (1995).
18. Frittitta, L. et al. Elevated PC-1 content in cultured skin fibroblasts correlates with decreased in vivo and in vitro insulin action in nondiabetic subjects: evidence that PC-1 may be an intrinsic factor in impaired insulin receptor signaling. *Diabetes* 47, 1095–1100 (1998).
19. Abate, N. et al. Mechanisms of disease: Ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 as a ‘gatekeeper’ of insulin receptors. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 2, 694–701 (2006).
20. Dong, H. et al. Increased hepatic levels of the insulin receptor inhibitor, PC-1/NPP1, induce insulin resistance and glucose intolerance. *Diabetes* 54, 367–372 (2005).
21. Goldfine, I. D., Maddux, B. A., Youngren, J. F., Trischitta, V. & Frittitta, L. Role of PC-1 in the etiology of insulin resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 892, 204–222 (1999).
22. Maddux, B. A. & Goldfine, I. D. Membrane glycoprotein PC-1 inhibition of insulin receptor function occurs via direct interaction with the receptor alpha-subunit. *Diabetes* 49, 13–19 (2000).
23. Meyre, D. et al. Variants of ENPP1 are associated with childhood and adult obesity and increase the risk of glucose intolerance and type 2 diabetes. *Nat. Genet.* 37, 863–867 (2005).
24. Frittitta, L. et al. A cluster of three single nucleotide polymorphisms in the 3'-untranslated region of human glyco-

- protein PC-1 gene stabilizes PC-1 mRNA and is associated with increased PC-1 protein content and insulin resistance-related abnormalities. *Diabetes* 50, 1952–1955 (2001).
25. Costanzo, B. V. et al. The Q allele variant (GLN121) of membrane glycoprotein PC-1 interacts with the insulin receptor and inhibits insulin signaling more effectively than the common K allele variant (LYS121). *Diabetes* 50, 831–836 (2001).
 26. Gijssbers, R., Ceulemans, H. & Bollen, M. Functional characterization of the non-catalytic ectodomains of the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase NPP1. *Biochem. J.* 371, 321–330 (2003).
 27. Sakoda, H. et al. No correlation of plasma cell 1 overexpression with insulin resistance in diabetic rats and 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 48, 1365–1371 (1999).
 28. Weedon, M. N. et al. No evidence of association of ENPP1 variants with type 2 diabetes or obesity in a study of 8,089 U.K. Caucasians. *Diabetes* 55, 3175–3179 (2006).
 29. Lyon, H. N. et al. Common variants in the ENPP1 gene are not reproducibly associated with diabetes or obesity. *Diabetes* 55, 3180–3184 (2006).
 30. Zalatan, J. G., Fenn, T. D., Brunger, A. T. & Herschlag, D. Structural and functional comparisons of nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase and alkaline phosphatase: implications for mechanism and evolution. *Biochemistry (Mosc.)* 45, 9788–9803 (2006).
 31. Nishimasu, H. et al. Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 205–212 (2011).
 32. Tabata, S. et al. A rapid screening method for cell lines producing singly-tagged recombinant proteins using the ‘TARGET tag’ system. *J. Proteomics* 73, 1777–1785 (2010).
 33. Reeves, P. J., Callewaert, N., Contreras, R. & Khorana, H. G. Structure and function in rhodopsin: high-level expression of rhodopsin with restricted and homogeneous N-glycosylation by a tetracycline-inducible N-acetylglucosaminyltransferase I-negative HEK293S stable mammalian cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13419–13424 (2002).
 34. Vagin, A. & Teplyakov, A. Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 22–25 (2010).
 35. Adams, P. D. et al. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58, 1948–1954 (2002).
 36. McCoy, A. J. et al. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* 40, 658–674 (2007).
 37. Terwilliger, T. C. & Berendzen, J. Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 55, 849–861 (1999).
 38. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60, 2126–2132 (2004).
 39. Hausmann, J. et al. Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 198–204 (2011).
 40. Ghosh, M., Meiss, G., Pingoud, A., London, R. E. & Pedersen, L. C. Structural insights into the mechanism of nuclease A, a betabeta alpha metal nuclease from *Anabaena*. *J. Biol. Chem.* 280, 27990–27997 (2005).
 41. Zhou, A., Huntington, J. A., Pannu, N. S., Carrell, R. W. & Read, R. J. How vitronectin binds PAI-1 to modulate fibrinolysis and cell migration. *Nat. Struct. Biol.* 10, 541–544 (2003).
 42. Huai, Q. et al. Crystal structures of two human vitronectin, urokinase and urokinase receptor complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 422–423 (2008).
 43. Albright, R. A. et al. Molecular basis of purinergic signal metabolism by ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases 4 and 1 and implications in stroke. *J. Biol. Chem.* 289, 3294–3306 (2014).
 44. Jansen, S. et al. Structure of NPP1, an ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase involved in tissue calcification. *Struct. Lond. Engl.* 1993 20, 1948–1959 (2012).
 45. Janeway, C. A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54 Pt 1, 1–13 (1989).
 46. Kawai, T. & Akira, S. TLR signaling. *Cell Death Differ.* 13, 816–825 (2006).
 47. Leulier, F. & Lemaitre, B. Toll-like receptors--taking an evolutionary approach. *Nat. Rev. Genet.* 9, 165–178 (2008).
 48. Reikine, S., Nguyen, J. B. & Modis, Y. Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5. *Front. Immunol.* 5, 342 (2014).
 49. Strober, W., Murray, P. J., Kitani, A. & Watanabe, T. Signaling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 9–20 (2006).
 50. O’Neill, L. A. J. Immunology. Sensing the dark side of DNA. *Science* 339, 763–764 (2013).
 51. Takaoka, A. et al. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature*

- 448, 501–505 (2007).
52. Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.-W., Datta, P., Wu, J. & Alnemri, E. S. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 458, 509–513 (2009).
 53. Hornung, V. et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458, 514–518 (2009).
 54. Bürckstümmer, T. et al. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat. Immunol.* 10, 266–272 (2009).
 55. Unterholzner, L. et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat. Immunol.* 11, 997–1004 (2010).
 56. Zhang, Z. et al. The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nat. Immunol.* 12, 959–965 (2011).
 57. Ishikawa, H. & Barber, G. N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 455, 674–8 (2008).
 58. Ishikawa, H., Ma, Z. & Barber, G. N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 461, 788–92 (2009).
 59. Tanaka, Y. & Chen, Z. J. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Sci Signal* 5, ra20 (2012).
 60. Burdette, D. L. et al. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* 478, 515–8 (2011).
 61. Abe, T. et al. STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense. *Mol Cell* 50, 5–15 (2013).
 62. Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X. & Chen, Z. J. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* 339, 786–91 (2013).
 63. Wu, J. et al. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* 339, 826–30 (2013).
 64. Gao, P. et al. Cyclic [G(2',5')pA(3',5')p] Is the Metazoan Second Messenger Produced by DNA-Activated Cyclic GMP-AMP Synthase. *Cell* 153, 1094–107 (2013).
 65. Liu, S. et al. MAVS recruits multiple ubiquitin E3 ligases to activate antiviral signaling cascades. *Elife* 2, e00785 (2013).
 66. Civril, F. et al. Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS. *Nature* 498, 332–7 (2013).
 67. Li, S., Yi, C., Shelton, D., Zuo, K. & Herr, L. Cyclic GMP-AMP synthase is activated by double-stranded DNA-induced oligomerization. *Immunity* 39, 1019–31 (2013).
 68. Botos, I., Segal, D. M. & Davies, D. R. The structural biology of Toll-like receptors. *Struct. Lond. Engl.* 19, 447–459 (2011).
 69. Wu, B. et al. Structural basis for dsRNA recognition, filament formation, and antiviral signal activation by MDA5. *Cell* 152, 276–289 (2013).
 70. Tanji, H., Ohto, U., Shibata, T., Miyake, K. & Shimizu, T. Structural reorganization of the Toll-like receptor 8 dimer induced by agonistic ligands. *Science* 339, 1426–1429 (2013).
 71. Peisley, A., Wu, B., Xu, H., Chen, Z. J. & Hur, S. Structural basis for ubiquitin-mediated antiviral signal activation by RIG-I. *Nature* 509, 110–114 (2014).
 72. Gall, A. et al. Autoimmunity initiates in nonhematopoietic cells and progresses via lymphocytes in an interferon-dependent autoimmune disease. *Immunity* 36, 120–31 (2012).
 73. Ahn, J., Gutman, D., Saijo, S. & Barber, G. N. STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 19386–91 (2012).
 74. Ahn, J. et al. Inflammation-driven carcinogenesis is mediated through STING. *Nat. Commun.* 5, 5166 (2014).
 75. Römling, U., Galperin, M. Y. & Gomelsky, M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 77, 1–52 (2013).
 76. Corrigan, R. M. & Gründling, A. Cyclic di-AMP: another second messenger enters the fray. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 513–524 (2013).
 77. Davies, B. W., Bogard, R. W., Young, T. S. & Mekalanos, J. J. Coordinated regulation of accessory genetic elements produces cyclic di-nucleotides for *V. cholerae* virulence. *Cell* 149, 358–70 (2012).
 78. Diner, E. J. et al. The Innate Immune DNA Sensor cGAS Produces a Noncanonical Cyclic Dinucleotide that Activates Human STING. *Cell Rep* 3, 1355–61 (2013).
 79. Zhang, X. et al. Cyclic GMP-AMP Containing Mixed Phosphodiester Linkages Is An Endogenous High-Affinity Ligand for STING. *Mol Cell* (2013).
 80. Ablasser, A. et al. cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature* 498, 380–4 (2013).
 81. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 125–132 (2010).
 82. Sheldrick, G. M. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr. A* 64, 112–122 (2008).
 83. Vonrhein, C., Blanc, E., Roversi, P. & Bricogne, G. Automated structure solution with autoSHARP. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 364, 215–230 (2007).

84. Terwilliger, T. C. et al. Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 64, 61–69 (2008).
85. Kranzusch, P. J., Lee, A. S., Berger, J. M. & Doudna, J. A. Structure of Human cGAS Reveals a Conserved Family of Second-Messenger Enzymes in Innate Immunity. *Cell Rep* 3, 1362–8 (2013).
86. Steitz, T. A. DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274, 17395–17398 (1999).
87. Kranzusch, P. J. et al. Structure-Guided Reprogramming of Human cGAS Dinucleotide Linkage Specificity. *Cell* 158, 1011–1021 (2014).
88. Zhu, D. et al. Structural Biochemistry of a *Vibrio cholerae* Dinucleotide Cyclase Reveals Cyclase Activity Regulation by Folates. *Mol. Cell* 55, 931–937 (2014).

総括

本研究ではヌクレオチドを代謝する酵素に注目して、その基質特異性と触媒メカニズムを解明するために、その X 線結晶構造解析をおこなった。近年の研究によってヌクレオチドは DNA の構成成分や「生体のエネルギー通貨」としての役割のみならず、様々な生理機能に関与することが報告されている。そのためこれらの酵素の生化学的特性について理解を深めることは、各々の酵素が独自の生理機能に関与する構造基盤の提供につながることを期待された。

第 1 章では、骨形成やインスリンシグナルに関わる細胞外酵素、Enpp1 について、その立体構造を 2.7 Å 分解能で決定した。構造解析と生化学的解析から Enpp1 は ATP を特異的に加水分解してピロリン酸を産生し、骨形成を阻害していることを明らかにした。また Enpp1 の立体構造から、Enpp1 の遺伝性変異が Enpp1 の構造を不安定化させることで先天性の骨疾患の発症を引き起こすことを明らかにした。さらに Enpp2 との構造比較から Enpp ファミリー間で配列多様性のある挿入領域を見出し、この挿入領域が Enpp ファミリー間で異なる基質特異性を規定しているというモデルを提唱した。

第 2 章、および、第 3 章では、ウイルス DNA に応答して cGAMP を産生する酵素 cGAS、および、その細菌ホモログである DncV の構造決定をおこなった。cGAS の 1.9 Å 分解能の結晶構造と変異体解析から、cGAS は正電荷の溝とジンクフィンガー構造によってウイルス DNA を認識して cGAMP を産生することを明らかにした。さらに cGAMP による STING の活性化は、IRF3 経路のみならず、NF- κ B 経路も活性化することを明らかにした。現在では cGAS は 2'-5' cGAMP を産生することが知られており、細菌ホモログである DncV は 3'-5' cGAMP を産生する。本研究で決定した DncV の立体構造から DncV による 3'-5' cGAMP 産生機構が解明された。さらに cGAS と DncV の構造比較から、触媒ポケットに結合した acceptor ヌクレオチドの配向が cGAS と DncV で異なる結合特異性を規定していることを説明した。

本研究で決定した Enpp1 の構造は同じファミリーに属している Enpp2 や Enpp4 の構造に類似しているにもかかわらず、Enpp はファミリー間で活性部位の構造を巧妙に変化させることで異なる基質を加水分解し、別々の生理機能に関わる。さらに DncV は 3'-5' cGAMP を産生してバクテリアの病原性を制御する一方で、cGAS はウイルス DNA に応答して 2'-5' cGAMP を特異的に産生して哺乳類における免疫応答に関わる。このことは、形の類似した酵素が各々の生理機能を実現するように適応した証であり、本研究で決定したヌクレオチド代謝酵素の立体構造は酵素の分子進化に対する構造的な洞察を提供しているといえよう。

外部発表

発表論文

- 1) Kazuki Kato, Hiroshi Nishimasu, Emiko Mihara, Ryuichiro Ishitani, Junichi Takagi, Junken Aoki, Osamu Nureki“Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Enpp1” Acta Crystallographica Section F, 68; 778-782 (2012)
- 2) Kazuki Kato, Hiroshi Nishimasu, Shinichi Okudaira, Emiko Mihara, Ryuichiro Ishitani, Junichi Takagi, Junken Aoki, and Osamu Nureki,“Crystal structure of Enpp1, an extracellular glycoprotein involved in bone mineralization and insulin signaling” Proc Natl Acad Sci U S A., 109; 16876-16881 (2012)
- 3) Kazuki Kato, Ryohei Ishii, Eiji Goto, Ryuichiro Ishitani, Fuminori Tokunaga, Osamu Nureki
“Structural and functional analyses of DNA-Sensing and immune activation by Human cGAS” PLoS ONE, 8(10):e76983 (2013)
- 4) Junko Morita, Kazuki Kato, Emiko Mihara, Ryuichiro Ishitani, Junichi Takagi, Hiroshi Nishimasu, Junken Aoki, Osamu Nureki“Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Enpp6” Acta Crystallographica Section F, 70; 794-799 (2014)
- 3) Kazuki Kato, Ryohei Ishii, Seiichi Hirano, Ryuichiro Ishitani, Osamu Nureki
“Structural basis for the catalytic mechanism of DncV, bacterial homologue of cyclic GMP-AMP synthase” Structure, in press

学会発表

- 1) 第 34 回日本分子生物学会年会, 口頭発表, ポスター発表
Kazuki Kato, “Crystal structure of ENPP1 reveals basis for its substrate specificity.”
横浜, 2011 年 12 月 14 日
- 2) アジア結晶学会, ポスター発表 (ポスター賞受賞)
Asian Crystallographic Association meeting
Kazuki Kato, “Crystal structure of Enpp1, an extracellular glycoprotein involved in bone mineralization and insulin signaling”
Adelaide, Australia, December 2, 2012
- 3) 第 13 回蛋白質科学会年会, ポスター発表 (査読無し)
加藤一希, 「骨石灰化やインスリンシグナルに関わる細胞外酵素, Enpp1 の結晶構造」
鳥取, 2013 年 6 月 12 日
- 4) 第 36 回日本分子生物学会年会, ポスター発表
加藤一希, 「DNA 応答免疫センサー, cyclic GMP-AMP 合成酵素の構造と機能」
神戸, 2013 年 12 月 3 日
- 5) 第 87 回日本生化学会年会, ポスター発表
加藤一希, 石井 亮平, 後藤 栄治, 石谷 隆一郎, 徳永 文稔, 濡木 理, 「免疫応答に関わる cyclic GMP-AMP synthase の結晶構造」
京都, 2014 年 10 月 16 日
- 6) 平成 26 年度日本結晶学会年会, ポスター発表
加藤一希, 石井 亮平, 石谷 隆一郎, 濡木 理, 「cyclic GMP-AMP 産生酵素の結晶構造」
東京, 2014 年 11 月 1 日

謝辞

本研究は指導教官である濡木理博士の御指導，ならびに，御支援のもとでおこなわれました。濡木博士は当時まだ研究面で若輩者であった私を研究室に迎え入れて頂き，「構造生物学」という研究分野に挑戦するチャンスを私に与えてくださったこと，そして競争の激しいタンパク質の構造解析に取り組む私に対して常に励ましの言葉をかけて温かく見守っていただいたことに深く心より感謝致します。西増弘志博士には，結晶構造解析をはじめとする様々な研究スキルやノウハウを学びました。研究室にやってきた当時まだ右も左も分からない状態の私に対して，西増博士の丁寧かつ本質的な指導のおかげで本研究成果につなげることができたと感じており，心から感謝しております。石谷隆一郎博士には厳しい指導ながらも，現実的かつ本質的な助言をこれまで幾度となく頂くことで私の研究の窮地から救っていただきました，感謝致しております。石井亮平博士には物事にとらわれず自由奔放な私に対して，研究面において厳しく，粘り強く指導していただき感謝しております。また第一章において，Enpp1 の大量調製の際に多大なご協力を頂いた大阪大学の高木淳一博士，Enpp1 の生化学的な解析をしてくださった東北大学の青木淳賢博士，さらに第二章において，cGAS の細胞機能解析をおこなって頂いた群馬大学の徳永文稔博士，ならびに各研究室の皆様方に感謝致します。

X線回折実験は SPring-8，および，Photon Factory にておこなわれたものです。私を含むビームラインユーザーのことを常々考え，日々ビームラインの整備と改良を重ねて頂いたビームラインスタッフには，感謝の意を申し上げます。特に SPring-8 BL32XU の平田邦夫博士には，Enpp1 の回折データセット収集の際に多大な助言を頂き深く感謝しております。

井上純一郎博士を領域代表とする新学術領域「修飾シグナル病」には，本研究の遂行に必要な研究費等御支援して頂いたとともに，異分野の研究者と切磋琢磨する機会や共同研究のチャンスを与えてくださいました。特に第二章における研究成果はまさに新学術領域を発端とした共同研究から創出されたものであり，深く感謝しております。

そして本研究を遂行するにあたり，濡木研究室の皆様には数多くの御協力，ならびに，御支援を頂きました。学術支援専門職員の倉林亜理沙さんには私の実験面において，秘書の山崎利枝子さんには事務面において多大なご支援を頂き，感謝しております。また私の研究指導についてきてくださった森田純子さん，大村洋記くん，平野清一くんには感謝の意を述べるとともに今後の御活躍御検討を期待致します。学部からの同期である道喜慎太郎くんには，研究のライバルとして切磋琢磨し，また良き友人として励ましあうことで，ここまで達することができたと感じております。感謝致します。

最後に，私の6年間というこれまでの研究生生活を生活面でサポートし，常に温かく見守っていただいた家族に深く，心から感謝致します。