

自然免疫に関わる TIFA の X 線結晶構造解析 X-ray crystallographic study of TIFA involved in innate immunity

中村照也^{1,2,*}, 山縣ゆり子²

¹熊本大学大学院先端機構, 〒862-0973 熊本市中央区大江本町 5-1

²熊本大学大学院生命科学研究部, 〒862-0973 熊本市中央区大江本町 5-1

Teruya NAKAMURA^{1,2,*} and Yuriko YAMAGATA²

¹ Priority Organization for Innovation and Excellence, Kumamoto University,
5-1 Oehonmachi, Chuo-ku, Kumamoto, 862-0973, Japan

² Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University,
5-1 Oehonmachi, Chuo-ku, Kumamoto, 862-0973, Japan

1 はじめに

シグナル分子 TIFA は、TNF 受容体のみならず Toll 様/IL-1 受容体の下流でも働くユニークなシグナル分子 TRAF6 の相互作用因子として同定された[1][2]。

その後、細菌代謝産物である ADP-heptose がキナーゼ ALPK1 を活性化して TIFA のリン酸化を引き起こし、リン酸化依存的に TIFA オリゴマーが形成されること、さらに TIFA オリゴマーが TRAF6 と複合体を形成することで、TRAF6 が自身のポリユビキチン化を引き起こして NF- κ B 活性化シグナルを伝えることが新たに報告されて以来[3]、TIFA は細菌感染に対する新規自然免疫の重要なシグナル分子として注目されている。

我々はマウス由来 TIFA の X 線結晶構造を決定したが、結晶中では TIFA 分子同士が自身の Cys 残基を介してジスルフィド結合を形成しており、本結晶構造からはシグナル伝達に重要と考えられる TIFA のオリゴマー化を議論することができなかった。そこで、リン酸化状態を反映した TIFA の会合状態の構造学的知見を得るため、ジスルフィド結合に関与していた Cys を Ser に変異させ、さらにリン酸化を受ける Thr を Asp に変異させたリン酸化ミミック TIFA 変異体 (T9D/C36S) の結晶を調製し、X 線結晶構造解析を行った[4]。

2 実験

マウス由来 TIFA(T9D/C36S)は、C 末端に His タグを付加させた融合タンパク質として発現させ、Ni アフィニティー、陰イオン交換、ゲルろ過カラムを用いて精製した。T9D/C36S の結晶化は、ハンギングドロップ蒸気拡散法により行い、野生型 TIFA とは異なり、PEG400 を沈殿剤として含んだ結晶化条件で X 線回折実験可能な結晶を得た。X 線回折強度データの収集は、PF の BL-1A で波長 1.1 Å の X 線を用いて行い、プログラム XDS で処理した。

T9D/C36S の結晶は空間群 $H3$ に属し、格子定数は $a = b = 114.6$, $c = 167.5$ Å、分解能は 3.05 Å であった。位相の決定は、分子置換法(プログラム

MOLREP)により行った。プログラム PHENIX と COOT を用いて構造精密化を行い、T9D/C36S の最終構造を得た (R_{int}/R_{σ} = 0.223/0.243)。

3 結果および考察

我々が決定していたマウス TIFA (野生型 TIFA) の結晶構造と SAXS 解析によるビーズモデル、さらに先に報告されていたヒト TIFA の結晶構造[5]から TIFA は 2 量体構造をとることがわかっていた。T9D/C36S の結晶構造では、リン酸化をミミックした Asp9 の電子密度は観察されず、結晶構造におけるリン酸化ミミックの効果は見られなかったものの、T9D/C36S 結晶内では、2 量体 TIFA が結晶学的な 3 回軸により会合して 6 量体構造をとっていた。また、別の種の TIFA 変異体 (T9E/C36S) 結晶内でも、6 量体形成における TIFA 2 量体間の相互作用と同様の相互作用が見られた。そこで、この相互作用面にあるアミノ酸残基に変異を導入したところ、野生型 TIFA と比べて TRAF6-C (TRAF6 の TIFA 結合ドメイン) との複合体形成能が低下する結果が得られた。これらの結果から、本研究での TIFA 6 量体構造と先に報告されていたリン酸化 TIFA 同士の相互作用モデルを合わせることで、シグナル伝達における TIFA-TRAF6-C のオリゴマー複合体モデルを提案した[4]。

謝辞

放射光実験を行うにあたり、大変お世話になりました PF のビームラインスタッフの皆様に感謝申し上げます。

参考文献

- [1] H. Takatsuna *et al.*, *J. Biol. Chem.* **278**, 12144 (2003).
- [2] T. Ishida *et al.*, *J. Biol. Chem.* **271**, 28745 (1996).
- [3] P. Zhou *et al.*, *Nature* **561**, 122 (2018).
- [4] T. Nakamura *et al.*, *Sci. Rep.* **10**, 5152 (2020).
- [5] J. H. Weng *et al.*, *Biochemistry* **54**, 6219 (2015)

* tnaka@gpo.kumamoto-u.ac.jp