

自然免疫シグナルの抑制に関わる TIFA/TIFAB 複合体の X 線結晶構造解析 X-ray crystallographic study on the TIFA/TIFAB complex involved in the suppression of innate immune signaling

大山千晶¹, 中村照也^{2*}

¹熊本大学薬学部, 〒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 (薬学系), 〒862-0973 熊本市中央区大江本町 5-1

Chiaki Ohyama¹ and Teruya NAKAMURA^{2*}

¹School of Pharmacy, Kumamoto University,

5-1 Oehonmachi, Chuo-ku, Kumamoto, 862-0973, Japan

²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University,

5-1 Oehonmachi, Chuo-ku, Kumamoto, 862-0973, Japan

1 はじめに

NF- κ B は、免疫応答を担う重要な転写因子であり、細菌感染などの刺激によって活性化されることで免疫反応を引き起こす。ユビキチンリガーゼの TRAF6 とその相互作用分子 TIFA は、NF- κ B 活性化に関わるシグナル分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 のポリユビキチン化を引き起こして NF- κ B が活性化されることが新たに報告された³⁾。また、TIFA のホモログとして TIFAB が同定され^{4,5)}、TIFAB は TIFA と結合することで TIFA-TRAF6 シグナルを抑制することが報告された。本研究では、TIFAB による TIFA-TRAF6 シグナルの抑制機構の構造学的基盤を解明するために、TIFAB の X 線結晶構造解析を行った。

2 実験

TIFAB 単独での X 線結晶構造解析を試みたが、TIFAB の熱安定性は非常に低く、結晶を得ることはできなかった。これまでに我々は TIFA の X 線結晶構造を決定し、TIFA はホモ二量体構造を形成することを明らかにしている⁶⁾。TIFA はリン酸化を受けると、この二量体をもとにオリゴマー構造を形成することで NF- κ B シグナルを活性化する。TIFAB は TIFA と結合するという報告から^{4,5)}、精製した TIFAB と TIFA 二量体を混合してゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行ったが、TIFAB と TIFA 二量体の複合体形成は見られなかった。そこで、TIFAB は TIFA 二量体に結合するのではなく、TIFA 単量体と結合して TIFA/TIFAB ヘテロ二量体を形成すると仮説を立て、大腸菌を用いて TIFA と TIFAB を共発現させたところ、TIFA/TIFAB ヘテロ二量体を調製することができた。TIFA/TIFAB の結晶は、0.1 M HEPES (pH 7.0)、17% PEG2000、5% 2,5-hexanediol の結晶化溶液を用

いることで得た。X 線回折強度データは BL-5A、BL17A、AR-NE3A で収集した。TIFA/TIFAB の結晶は、空間群 $P6_122$ に属し、格子定数は $a = b = 88.8 \text{ \AA}$, $c = 297.4 \text{ \AA}$ であった。TIFA 二量体の構造 (PDB ID: 6L9U) をサーチモデルとして用いた分子置換法により位相を決定した。構造の精密化はプログラム PHENIX と COOT を用いて行い、最終的に $1.79 \text{ \AA}$ 分解能の TIFA/TIFAB の結晶構造を得た ($R_{\text{work}}/R_{\text{free}} = 0.181/0.225$)。

3 結果および考察

TIFA の X 線結晶構造解析、X 線小角散乱により、TIFA はリン酸化されていない状態ではホモ二量体構造を形成することを明らかにしている (図 1 の左)⁶⁾。今回の TIFA/TIFAB の構造から、TIFAB は、TIFA のホモ二量体化に関わる分子表面を介して TIFA と結合して TIFA/TIFAB ヘテロ二量体構造を形成することが明らかになった (図 1 の右)。TIFAB の全体構造は TIFA と類似しており、TIFAB と TIFA のアミノ酸配列相同性の低い領域を除いた 105 のアミノ酸残基の $\text{C}\alpha$ 間における r.m.s.d. は $0.97 \text{ \AA}$ であった。

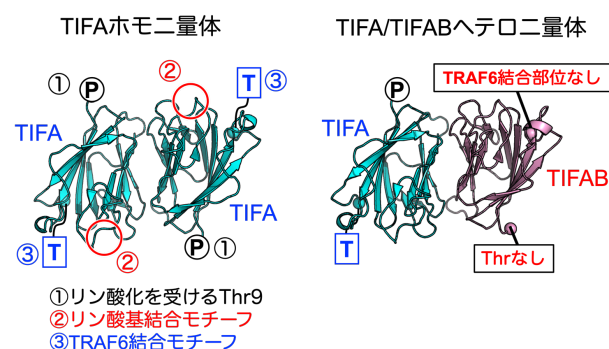


図 1 : TIFA ホモ二量体と TIFA/TIFAB ヘテロ二量体の構造。

TIFA/TIFAB ヘテロ二量体の全体構造は TIFA のホモ二量体のものと類似しているが、TIFAB は TIFA 二量体の相互作用面に対して約 10° の傾きを持って

TIFA と結合していた (図 2)。TIFA-TIFAB 間と TIFA-TIFA 間の相互作用様式を比較すると、TIFA と TIFAB で保存されていないアミノ酸残基の相互作用様式に違いが見られ (図 3)、その結果、TIFAB は TIFA 二量体の相互作用面に対して傾きをもって結合していることがわかった。

青と赤: TIFA/TIFAB
白: TIFA二量体

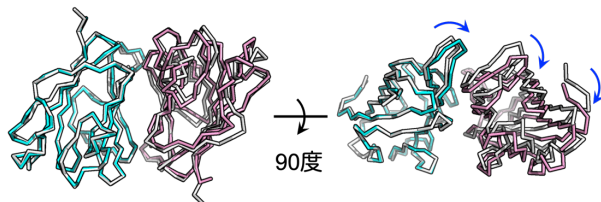


図 2 : TIFA/TIFAB と TIFA 二量体の重ね合わせ図。

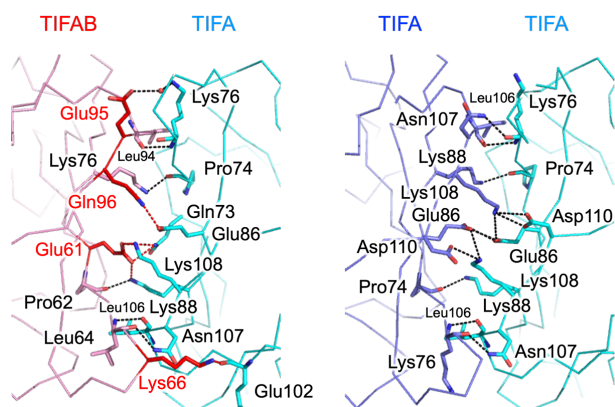


図 3 : TIFA/TIFAB と TIFA 二量体の相互作用面の比較。TIFA と TIFAB 間で保存されていない TIFAB のアミノ酸残基を赤で表示している。

シグナル活性化に関わる TIFA は、①リン酸化を受ける Thr9、②リン酸基結合モチーフ、③TRAF6 結合モチーフを有している (図 1 の左)。TIFA はリン酸化されていない状態ではホモ二量体を形成しており、リン酸化を受けると TIFA 二量体同士が、それぞれのリン酸基とリン酸基結合モチーフとを相互作用させることでオリゴマー構造を形成する^{6,7)}。一方、TIFA/TIFAB の全体構造は、TIFA ホモ二量体のものと類似しているが、TIFAB は TIFA とは異なりリン酸化を受ける Thr と TRAF6 結合モチーフを有していないため (図 1 の右)、TIFA/TIFAB は、リン酸化 TIFA のようなオリゴマー構造を形成できず、シグナル伝達に重要な TRAF6 とも結合することができない。このように TIFA/TIFAB ヘテロ二量体は、リン酸化を受ける Thr と TRAF6 結合モチーフを部分的に失った“擬似の TIFA ホモ二量体”といえ、TIFA 二量体のようにシグナルを活性化できないことが示された。そこで TIFA/TIFAB のヘテロ二量体形成に重要なアミノ酸残基に変異を導入したところ、これら変

異型 TIFAB は TIFA とヘテロ二量体を形成できず、TIFAB が持つシグナル抑制能も失うことを確認した。

4 まとめ

本研究で決定した TIFA/TIFAB の結晶構造から、TIFAB は TIFA と結合してヘテロ二量体を形成することで、シグナル活性化に必須の TIFA のホモ二量体化を阻害して TIFA-TRAF6 シグナルを抑制することを明らかにした⁸⁾。

謝辞

本研究の X 線回折実験にご協力いただきました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] T. Ishida *et al.*, *J. Biol. Chem.* **271**, 28745 (1996).
- [2] H. Takatsuna *et al.*, *J. Biol. Chem.* **278**, 12144 (2003).
- [3] P. Zhou *et al.*, *Nature* **561**, 122 (2018).
- [4] T. Matsumura, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**, 230 (2004).
- [5] T. Matsumura, *et al.*, *J. Biochem.* **146**, 375 (2009).
- [6] T. Nakamura *et al.*, *Sci. Rep.* **10**, 5152 (2020).
- [7] J. H. Weng, *et al.*, *Biochemistry* **54**, 6219 (2015).
- [8] T. Nakamura *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **121**, e2318794121 (2024)

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