

最近の研究から

ハエ由来ペプチドグリカン認識蛋白質 LCa の細胞外ドメインの結晶構造； パターン認識の分子基盤

張崇毅¹, 伊原健太郎², Yogarany Chelliah¹, Dominique Mengin-Lecreulx³, 若槻壮市², Johann Deisenhofer¹

¹Howard Hughes Medical Institute and Department of Biochemistry, University of Texas Southwestern Medical Center,
²KEK・物質構造科学研究所・PF・構造生物学研究センター,³Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire,
Unité Mixte de Recherche 8619 Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Paris-Sud

Crystal structure of the ectodomain of *Drosophila* peptidoglycan-recognition protein LCa; a molecular basis of pattern recognition

Chung-I Chang¹, Kentaro Ihara², Yogarany Chelliah¹, Dominique Mengin-Lecreulx³, Soichi Wakatsuki²,
and Johann Deisenhofer¹

¹Howard Hughes Medical Institute and Department of Biochemistry, University of Texas Southwestern Medical Center;

²Structural Biology Research Center, Photon Factory, Institute of Materials Structure Science, KEK

³Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire, Unité Mixte de Recherche 8619 Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Paris-Sud

1. 自然免疫について

自然免疫 (innate immunity) は遺伝子の再編成を伴う獲得免疫 (acquired immunity) とは異なり, 生来の遺伝子セットだけから構成される感染防御系であり, 細菌やウイルスなど古来より高頻度で遭遇する微生物群の生体内への侵入を感知して排除する役割を担う。遺伝子の再編成を経て異物認識の多様性を実現する獲得免疫に比べて自然免疫では認識できる異物が少ないものの, 系が複雑で時間のかかる遺伝子の再編成を行わないため, 微生物の侵入に迅速に対処できる利点がある。進化的には自然免疫の方が獲得免疫よりもはるかに古くから存在しており, 獲得免疫はごく一部の脊椎動物のみが有する特殊な免疫であるのに対し, 自然免疫は全ての脊椎動物を始め, 無脊椎動物から植物まで多細胞生物全般に見られるより普遍的な感染防御系である。

2. 自然免疫では何を感知するのか

多くの多細胞生物は自然免疫のみで感染防御を行っているが, 限られた遺伝子数でどのように自然界に存在する多くの感染源の認識を可能にしているのであろうか。その答えの一つは, 細菌やウイルスが一般的に有する限られた分子を認識することである。例えば細菌はペプチドグリカンやリポ多糖, リポテイコ酸, リポ蛋白質から構成される細胞壁に囲まれている。ウイルスは一本鎖または二本鎖 RNA やメチル化されていない CpG 配列 DNA を有することが多い。これらの構成成分を認識する機構が実際に自然免疫に存在する [1]。もう一つは厳密性を上げる手法として, これらの認識を組み合わせることが考えられる。例えば, ペプチドグリカンとリポ多糖が異なる受容体で認識されると細菌の認識がより確かなものとなり抗菌作用が増強される, といった機構の存在が予測される。

3. Toll 様受容体の発見がもたらしたもの

Toll は自然免疫しか持たないショウジョウバエの抗菌ペプチド産生を制御する膜蛋白質として研究されていたが [2], 人などの哺乳類においても, 細菌やウイルスを認識する受容体として, Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) が発見され [3], 哺乳類における自然免疫の研究が大きく進展した。今では, 哺乳類においても, 自然免疫が迅速な対応が必要となる初期感染で大きな役割を果たし, 獲得免疫との協調作業により効果的な免疫系を構成していると考えられている。最近, ウイルスの二本鎖 RNA を認識するヒトの Toll 様受容体である TLR3 の細胞外ドメインの結晶構造解析が報告され [4], Toll 様受容体による異物認識を立体構造をもとに議論できる下地が築かれた。

4. ペプチドグリカンとペプチドグリカン認識蛋白質について

哺乳類においては Toll 様受容体が直接微生物の構成成分を認識し, 獲得免疫系の活性化も含め, 抗菌・抗ウイルス活性を亢進させるが, ショウジョウバエにおいては, ペプチドグリカン認識蛋白質 (Peptidoglycan recognition protein: PGRP) が微生物の構成成分を認識し, Toll 受容体, または細胞質因子 Imd (Immune deficiency of *Drosophila*) が関わる Imd 経路を経由して抗菌ペプチド産生を活性化する。PGRP は哺乳類においても見つかっており, やはりペプチドグリカンを認識することが分かっているが, 抗菌シグナルを伝達するパスウェイの詳細は不明である。

細菌は細胞壁の構成成分の違いからグラム陽性菌とグラム陰性菌に分けることができるが, 細胞壁を構成する主成分であるペプチドグリカンはその構成アミノ酸の違いから多くのグラム陽性菌で見られるリシン型と多くのグラム陰性菌で見られる DAP (ジアミノピメリン酸) 型に分けら

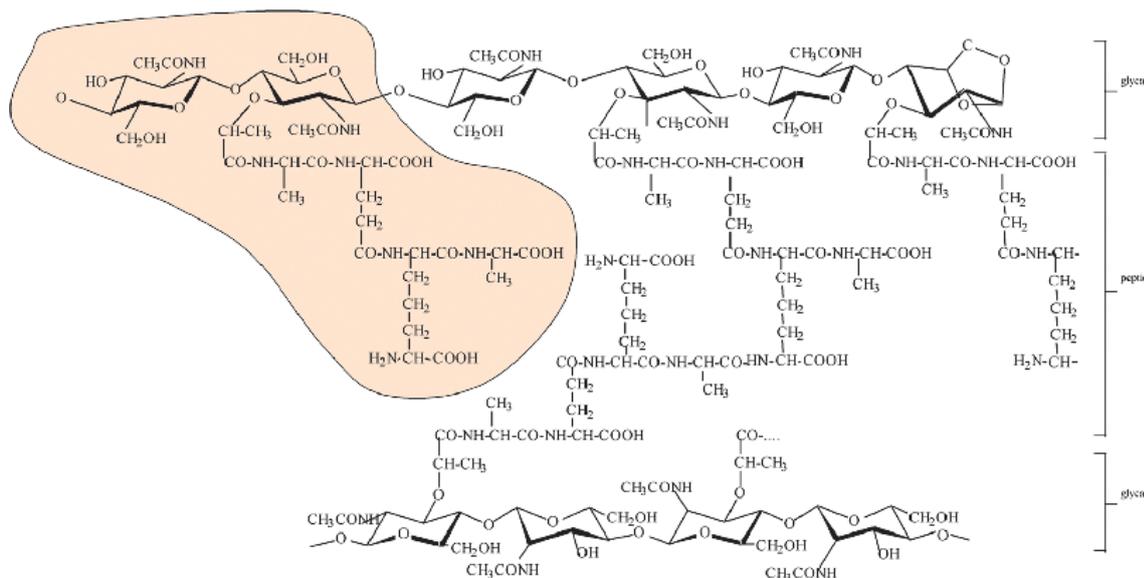


Figure 1
 Chemical structure of diaminopimelic acid (DAP)-typed peptidoglycan in *Escherichia coli*. Highlighted murepeptide is GlcNAc-MurNAc-L-Ala-gamma-D-Glu-meso-DAP-D-Ala. Upper right side of the scheme shows the glycan strands ended naturally with a 1,6-anhydro MurNAc residue. Structures of peptidoglycan varies from one bacterial species to another, mainly by substituting the peptide moiety.

れる。Fig. 1にはグラム陰性菌である大腸菌の細胞壁に見られるDAP型ペプチドグリカンを示してあり、その構成単位であるN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) とN-アセチルムラミン酸 (MurNAc) の二つのβ-1,4重合した糖と4つのアミノ酸からなる糖ペプチド (GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-mesoDAP-D-Ala) が色分けされている。mesoDAPとD-Alaは鎖間で架橋される。先に述べたPGRPはペプチドグリカンのグリカン部位、及びペプチド部位双方を認識する。

PGRPは細胞外へ分泌されるS (short) タイプのPGRP-Sと膜貫通ドメインを有することの多いL (long) タイプのPGRP-Lに大別される。哺乳類ではこの中間の長さを有するI (intermediate) タイプのPGRP-Iが存在する。テキサス大学のChung-I Chang (張崇毅) とYogarany ChelliahとJohann Deisenhofer, Université de Paris-SudのDominique Mengin-Lecreulx, 及びKEKの伊原健太郎と若槻壮市は、グラム陰性細菌のペプチドグリカン認識するショウジョウバエの蛋白質であるPGRP-LCaの結晶構造解析を行い、以下に述べるような結果を得た [5]。

5. PGRP-LCaの結晶構造解析

PGRP-LCには選択的スプライシングによって生じる3つのアイソフォームPGRP-LCa, PGRP-LCx, PGRP-LCyが存在し、共通の細胞質ドメインと膜貫通部位を有するが (Fig. 2b), ペプチドグリカン認識する細胞外ドメインの同一性は約40%と中程度の保存が見られ、PGRP-LCaにおいては細胞外ドメインの二箇所に4アミノ酸の挿入が見られる (Fig. 2a)[6]。

これまでに、重合した多量体ペプチドグリカンの認識にはPGRP-LCxのみが必要であるが、単量体ペプチドグ

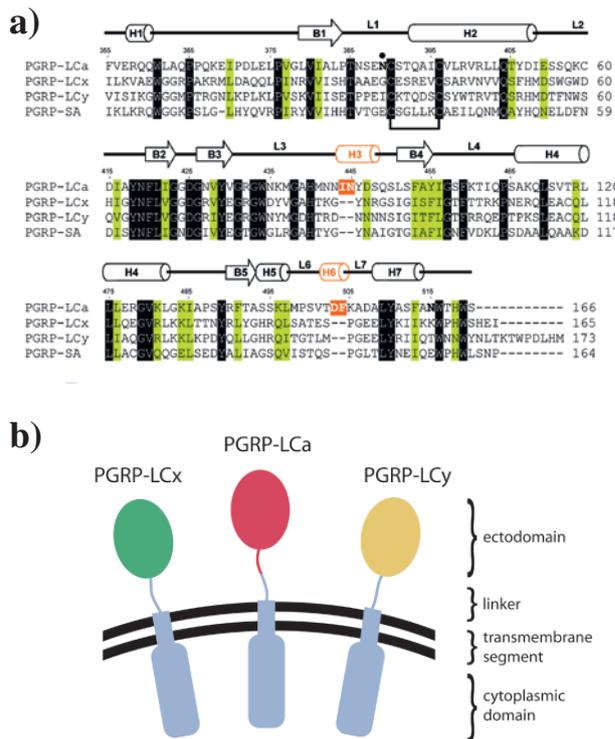


Figure 2
 Sequences and domain topology of the ectodomains of peptidoglycan-recognition proteins (PGRPs). (a) Sequence alignment of the ectodomains of three PGRP-LC isoforms (LCa, LCx, and LCy) and PGRP-SA. Secondary structures of the LCa ectodomain are shown above the alignment. Inserted residues of the LCa ectodomain are highlighted and colored in white (helices H3 and H6). Invariant residues are boxed in black and colored in white; conserved residues are shaded and colored in black. Cys residues forming a disulfide bond are connected with a line. N-linked glycosylation sites in PGRP-LCa are in bold letters and a glycosylated site in this study is marked with a circle. (b) Unique N-terminal domains of the LCa, LCx, and LCy have identical transmembrane and intracellular domains connected with linkers.

リカン (Fig. 1 の色付けした最小単位に相当) の認識には PGRP-LCa と PGRP-LCx の両方が必要であることが知られている [7]。この違いがいかなる分子機構に基づいているのかを知るために、我々は PGRP-LCa の結晶構造解析を行うこととした。PGRP-LCa が単量体ペプチドグリカンの認識に必要であることから、単量体ペプチドグリカン (GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-mesoDAP-D-Ala) の存在下で PGRP-LCa の結晶化を行い、PF の BL-5A において 2.5 Å 分解能、 R_{merge} が 6.2% の回折データを収集することができた。PGRP-IαC の結晶構造 (PDB ID: 1TWQ) を初期モデルとした、プログラム PHASER [8] を使用した分子置換法により初期位相を決定することができ、構造の精密化の結果、分解能 2.5 Å、 $R_{\text{work}}/R_{\text{free}} = 21.3\%/24.1\%$ のモデルが得られた (PDB ID: 1Z6I)。この構造は今までに解析報告されている PGRP と同様に T7 リゾチーム様の立体構造を取っており、一箇所のアスパラギン残基には糖鎖 (N-アセチルグルコサミン) が共有結合していた (Fig. 3)。

当初、得られた結晶にはペプチドグリカンが結合していることが期待されたが、ペプチドグリカンに相当する電子密度はまったく得られなかった。その原因を探るため、PGRP-LCa と 28% の同一性を示すヒト由来 PGRP-Iα

C とグラム陽性菌に多く見られるムラミルトリペプチド (MurNAc-L-Ala-D-isoGln-L-Lys: MTP) の複合体結晶構造と今回得られた PGRP-LCa 単独の結晶構造を比較した。その結果、ペプチドグリカン結合サイトが、PGRP-LCa に見られた 2 つの挿入アミノ酸などにより塞がれていることが明らかとなった (Fig. 4)。

PGRP-LCa にペプチドグリカン結合能があるかどうかを調べるためにさらに Fig. 5a に示すようなプルダウン実験を行った結果、単量体ペプチドグリカン (GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-mesoDAP-D-Ala) は LCx には結合するが、LCa には結合しないことが明らかとなった。ちなみに、LCx と IαC の間のアミノ酸の同一性はおよそ 45% であり、LCx は LCa と比べてより IαC に近い構造を有し、LCx のペプチドグリカン認識も Fig. 4a に近いものと推測される。さらに、LCx と LCa の間に相互作用があるかを調べるため、Fig. 5b に示すプルダウン実験を行ったところ、LCa と LCx 間には直接の相互作用がない一方、単量体ペプチドグリカンの結合した LCx には LCa が結合できるという大変興味深い結果が示された。この事実は、LCx に結合した状態の単量体ペプチドグリカンでは何らかの構造変化が生じ、LCa との結合能が誘起される可能性を示している。その候



Figure 3
Overall structure of the PGRP-LCa ectodomain in ribbon model. Left side shows the front face and a side view in the right. A disulfide bond and an N-linked sugar on Asn-389 are shown as stick models. A linker which connects the N terminus of the structure to the transmembrane segment (not included in the construct) is modeled by dashed coils.

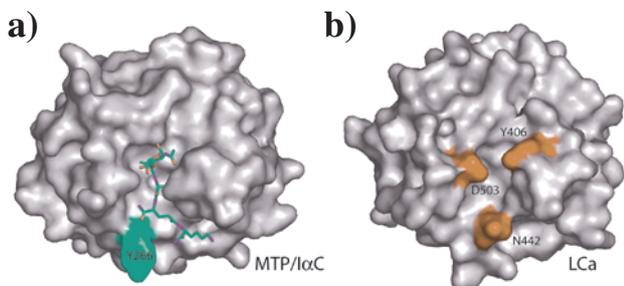


Figure 4
Molecular surfaces of PGRP-IαC/MTP complex and PGRP-LCa ectodomain. (a) Surface of PGRP-IαC complexed to MTP (MurNAc-L-Ala-D-isoGln-L-Lys). (b) Surface of PGRP-LCa ectodomain. Highlighted residues (Asn-442, Asp-503, and Tyr-406) occupy a putative muropeptide binding cavity.

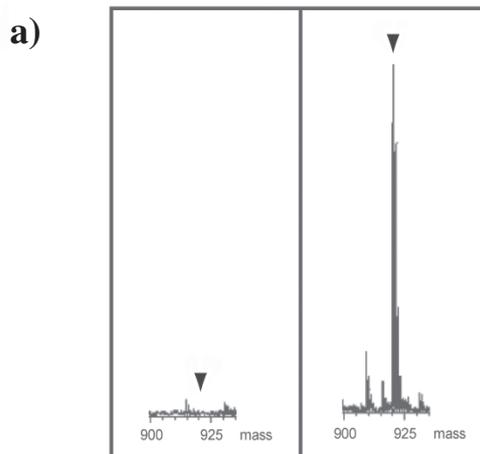


Figure 5
Interaction of monomeric peptidoglycan with the ectodomains of PGRP-LCx and -LCa. (a) His-tagged LCa and LCx ectodomains were incubated with Talon metal-affinity resin and GM(anh)-tetra_{DAP} (GlcNAc-MurNAc(1,6-anhydro)-L-Ala-D-Glu-mesoDAP-D-Ala). Mass spectra of the pull-down fractions (left is LCa and right is LCx) indicate only LCx can bind to GM(anh)-tetra_{DAP}. (b) His₆-LCa ectodomain was mixed with 2-fold molar excess of the untagged LCx ectodomain with or without GM(anh)-tetra_{DAP} and pulled down by metal-affinity resin. Coomassie blue stained gel of SDS-PAGE shows that LCa ectodomain can bind to LCx ectodomain via GM(anh)-tetra_{DAP}.

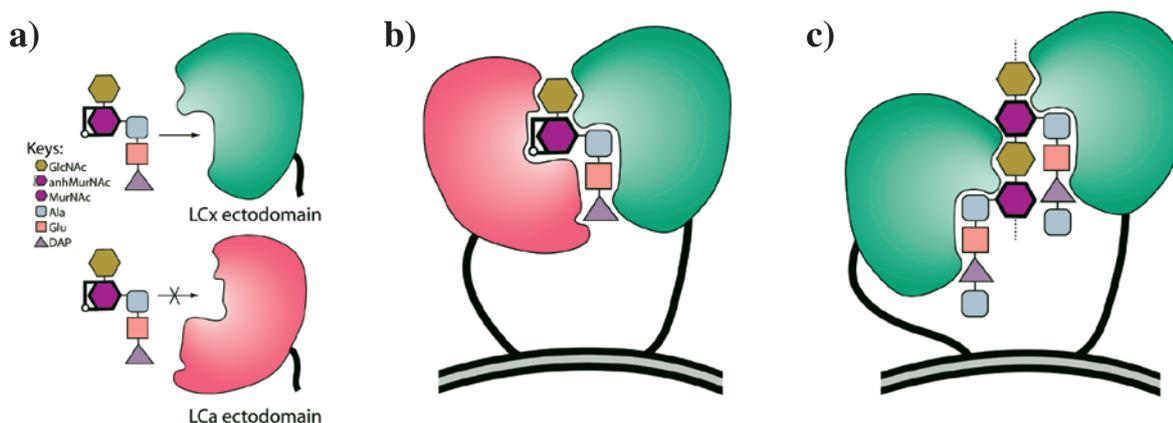


Figure 6

Proposed model of peptidoglycan recognition by PGRP-LCa and -LCx receptors. (a) The LCx ectodomain is able to bind to a typical muropeptide in a way such that the anhydro bond of MurNAc is exposed after docking to the LCx ectodomain. LCa ectodomain can not achieve this interaction, because LCa does not contain a canonical docking groove. (b) However, the LCa ectodomain would recognize the exposed atoms of glycan, and perhaps the DAP, of the monomeric muropeptide if the ligand is presented by the LCx ectodomain. In (b), GM(anh)-tri_{DAP} brings PGRP-LCa and -LCx receptors in close vicinity, allowing their cytoplasmic domains (not shown) to dimerize for receptor activation. (c) Two LCx ectodomains are engaged in direct docking interactions with two muropeptide subunits of polymeric peptidoglycan, which brings two receptors in close proximity. Note the 1,6-anhydro bond of MurNAc present in the GM(anh)-tri_{DAP} molecule does not occur in the polymeric form of peptidoglycan except at the terminal MurNAc residue of the glycan chain, which is not shown.

補としては *N*-アセチルムラミン酸の糖骨格のコンフォメーション変化が考えられるが、このストーリーとは逆に、LCx に単量体ペプチドグリカンが結合すると LCx に構造変化が生じ、それを LCa が認識する可能性もある。

6. PGRP-LCa/PGRP-LCx 複合体による単量体ペプチドグリカンの認識モデル

以上の結果を用い、重合した多量体ペプチドグリカンの認識には PGRP-LCx のみが必要であるが、単量体ペプチドグリカン (Fig. 1 の最小単位に相当) の認識には PGRP-LCa と PGRP-LCx の両方が必要であるという報告をうまく説明できる Fig. 6 に示すモデルを作ることができた。このモデルが魅力的な点は、複数のペプチドグリカン受容体が細菌の侵入を感知したときにのみ細胞内に強い抗菌シグナルが伝わるような、偽シグナル抑制機構が考えやすいところにある。細胞外ドメインが集まると、シグナル伝達に必要な細胞内ドメインも集合し、より強いシグナルを発することができるのかもしれない。すなわち、細菌固有のパターンが一つだけ認識されるだけでは証拠が少なく感染は怪しいが、狭い領域で複数の証拠が得られれば、細菌侵入を断定する根拠が増え、的確に対応できるのかもしれない。

上記のモデルの正当性を評価するには、単量体ペプチドグリカンと PGRP-LCa と PGRP-LCx の三者複合体の結晶構造を得るなど、今後の更なる検証実験が必要である。

7. 自然免疫の分子機構を探る意義

今回の研究成果は、ショウジョウバエの免疫レセプターが分子レベルでどのように細菌由来のリガンドを認識するかを理解するうえで有用であると思われる。ハエの免

疫シグナル伝達経路は哺乳類の自然免疫系の活性化に必要なシグナル伝達経路と多くの類似点があり、ショウジョウバエの強力な遺伝的解析手法を踏まえた構造的、免疫学的研究により、哺乳類の自然免疫反応を惹起する病原性のリガンドとそのレセプターに関する新たな知見が得られつつある。さらに哺乳類では、微生物と自然免疫系の相互作用が、獲得免疫系における病原体特異的なエフェクター細胞の生成段階へと進むシグナルを発生させることが知られており、自然免疫系と獲得免疫系は独立に動いているわけではないらしい。自然免疫の分子機構をより深く知ることは、最適化された免疫反応を引き出すことのできる合理的なワクチンデザインにも役立つはずである。

謝辞

バキュロウイルスを用意した Maya Palnitkar, 英語版 [5] の校正を行った Kirsten Fischer Lindahl, PGRP-LCa の cDNA と重要なコメントを供与した Bruno Lemaitre, PF BL-5A でのデータ収集と米日間の結晶空輸で貴重な助言を与えた Naohiro Matsugaki に感謝します (敬称略)。

引用文献

- [1] Medzhitov, R. (2001) *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 135-145.
- [2] Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann J.A. (1996) *Cell* **86**, 973-983.
- [3] Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A. (1997) *Nature* **388**, 394-397.
- [4] Choe, J., Kelker, M.S., and Wilson, I.A. (2005) *Science* **309**, 581-585.
- [5] Chang, C.I., Ihara, K., Chelliah, Y., Mengin-Lecreulx, D., Wakatsuki, S., and Deisenhofer, J. (2005) *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA **102**, 10279-10284.

- [6] Werner, T., Liu, G., Kang, D., Ekengren, S., Steiner, H., and Hultmark, D. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13772-13777.
- [7] Kaneko, T., Goldman, W.E., Mellroth, P., Steiner, H., Fukase, K., Kusumoto, S., Harley, W., Fox, A., Golenbock, D., and Silverman, N. (2004) *Immunity* **20**, 637-649.
- [8] Storoni, L.C., McCoy, A.J., and Read, R.J. (2004) *Acta Crystallogr. D* **60**, 432-438.

(原稿受付：2005年9月26日)

著者紹介

Chung-I Chang, Ph.D.



Associate, Howard Hughes Medical Institute, The University of Texas Southwestern Medical Center
6001 Forest Park Road, Rm ND10.136EB,
Dallas, Texas 75390-9050, USA
Tel: +1 214-645-5943
Fax: +1 214-645-5945

E-mail: Chung-i.Chang@UTSouthwestern.edu

Research history and position: PhD work on MAP kinase docking complexes by X-ray crystallography, supervised by Prof. Elizabeth Goldsmith at UT Southwestern.

Interests in research: insect innate immunity, malaria parasite killing in mosquitoes.

Kentaro Ihara

Research Fellow, Structural Biology Research Center,
Institute of Material Structure Science,
High Energy Accelerator Research Organization
1-1 Oho, Tsukuba, Ibaraki 305-0801, JAPAN

Yogarany Chelliah

Howard Hughes Medical Institute,
University of Texas Southwestern Medical Center
6001 Forest Park Road, Rm ND10.136EB,
Dallas, Texas 75390-9050, USA

Dominique Mengin-Lecreux

Research Director, Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire,
Unité Mixte de Recherche 8619 Centre National de la Recherche Scientifique,
Université de Paris-Sud
91405 Orsay, France

Soichi Wakatsuki, Professor

Structural Biology Research Center,

Photon Factory,
Institute of Material Structure Science,
High Energy Accelerator Research Organization
1-1 Oho, Tsukuba, Ibaraki 305-0801, JAPAN

Johann Deisenhofer, Professor



Howard Hughes Medical Institute and
Department of Biochemistry
University of Texas Southwestern
Medical Center
6001 Forest Park Road,
Dallas, Texas 75390-9050, USA