



Structural basis of Irgb6 inactivation by *Toxoplasma gondii* through the phosphorylation of switch I

大隈, 宏通

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8967号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100492476>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Structural basis of Irgb6 inactivation by *Toxoplasma gondii* through the phosphorylation of switch I

リン酸化を介したトキソプラズマ原虫による Irgb6 不活性化の構造基盤

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科医科学専攻呼吸器外科学 眞庭 謙昌教授)

大隈 宏通

【目的】

トキソプラズマ原虫は、ヒトを含む温血動物にとって重要な病原体で、宿主細胞に侵入し、寄生体虫胞膜（PVM）と呼ばれる構造を形成する。感染をきたすと、宿主細胞はサイトカインであるインターフェロン γ を産生し、寄生虫に対抗するために免疫関連 GTPase (IRG) の発現を誘導する。IRG の自己集合は、G-ドメインをインターフェースとして起こり、各分子は GTPase 活性タンパク質として働く。この過程は、G-ドメインのスイッチ I 領域と II 領域の構造変化によって、G-ドメインの自己組織化界面に影響を与え、その情報を N-ドメインと膜結合境界面を有する C-ドメインに伝達している事が知られている。一方、トキソプラズマ原虫は IRG の G-ドメインのスイッチ I 領域のトレオニン残基をリン酸化して、PVM への IRG の動員を阻害する事が知られている。しかし、この PVM への動員の阻害の構造的なプロセスは不明であるため、今回リン酸化を模倣した Irgb6 の原子構造を調査する事で、Irgb6 の GTPase 活性が不活性化される原子機構を解明する事を目的とした。

【方法と結果】

リン酸化模倣変異体 Irgb6-T95D の作成

これまでの研究で、IRG の G-ドメインのスイッチ I 領域のトレオニン残基のリン酸化が PVM への動員を阻害することが知られている。そこで、トレオニン残基のリン酸化が Irgb6 に与える影響を評価するため、リン酸化模倣変異としてトレオニンをアスパラギン酸に置換した Irgb6(Irgb6-T95D)を作成し、間接免疫蛍光法で Irgb6-T95D が PVM 上で検出されなかったことを確認した。

Irgb6-T95D 変異と GTPase 活性との関連性

続いて、陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した Irgb6-T95D の GTPase 活性を調べ、その結果を野生型 Irgb6(Irgb6-WT)の結果と比較した。GTPase 活性は、Irgb6 と GTP を 30 分間共インキュベートした後、GTP が GDP に加水分解される程度で判断した。Irgb6-WT は GTP の 3 分の 2 を GDP に加水分解したが、Irgb6-T95D は GTP の約 10% しか GDP に加水分解しなかった。このことから、Irgb6 のスイッチ I 領域のトレオニン 95 のリン酸化変異は、Irgb6 の GTPase 活性を著しく低下させることがわかった。

続いて、GTP 結合に伴うポリマー形成を電子顕微鏡で観察した。Irgb6-WT では、ヌクレオチドの添加前にポリマー形成は観察されなかった。GTP アナログである GMP-PNP を添加すると、不規則なポリマー形成が誘導された。一方、Irgb6-T95D は、GMP-PNP を添加しても、ポリマー形成はほとんど見られなかった。T95D 変異では GTP 結合能に影響がないことを考慮すると、この結果は、ポリマー形成には GTP 結合後の構造変化が必要であり、この変化がトレオニン 95 のリン酸化変異によって阻害されることを示唆した。

GTP 結合状態およびヌクレオチドフリー状態の Irgb6-T95D の結晶構造

Irgb6-T95D は Irgb6-WT と同様に GTP および GDP への結合を示したが、GTPase 活性を著し

く低下させた。このことは、Irgb6-T95D では GTP 結合後の構造変化、すなわち異性化が起こりにくく、その結果、膜結合と GTPase のサイクルが切り離されることを示唆している。しかし、膜結合界面は 95 残基から 50Å 以上離れた C ドメインにあるため、トレオニン 95 のリン酸化が膜結合界面のコンフォメーションにどのように影響するかという難しい問題が生じる。そこで、Irgb6-T95D の X 線結晶構造解析を行った。Irgb6-T95D の結晶構造は、GTP 結合後の構造変化を観察するため、GTP あり (Irgb6-T95D-GTP) とヌクレオチドなし (Irgb6-T95D-NF) で、それぞれ 1.68 と 2.05Å 分解能で解かれた。Irgb6-T95D-GTP は Irgb6-WT-GTP と同じコンフォメーションをとり、Irgb6-WT-GTP との全体の平均平方根偏差 (RMSD) は 0.259 Å だった。GTP 結合型とは対照的に、Irgb6-T95D-NF 型は WT とは異なるコンフォメーションを示した。ドメインごとの比較では、Irgb6-T95D-NF の N-ドメインは Irgb6-WT-NF と比較的似ていたが、C-ドメインは異なるコンフォメーションになっていた。

トレオニン 95 リン酸化による PVM 結合領域の構造の変化

次に、トレオニン 95 が所属している G-ドメインの活性部位の構造変化が N-ドメインと膜結合界面である C-ドメインにどのように伝播するかを調べるために、Irgb6-T95D-NF と Irgb6-WT-NF を G-ドメインを基準としてアライメントした。その結果、トレオニン 95 付近の水素結合ネットワークの消失による構造変化がリンカーヘリックス αE に伝わり、リンカーヘリックス αE が右方向へ移動する事で、N ドメインと C ドメインが時計回りに回転している事が判明した。G-ドメインを中心に N-ドメインと C-ドメインが時計回りに回転している事が判明した。この C-ドメインの回転により、これまでの報告で、PVM の結合に必須であると示されていたトリプトファン 3、リシン 275、アルギニン 371 の 3 つのアミノ酸が形成する三角形のうち、Irgb6-T95D-NF のトリプトファン 3 とアルギニン 371 が反転し、Irgb6-WT-NF と比較して構造が大きく変化していることが明らかになった。

【考察】

今回の構造解析により、Irgb6 のトレオニン 95 リン酸化が、50Å 以上離れた C-ドメインの PVM の結合に必須であるトリプトファン 3、リシン 275、アルギニン 371 の 3 つのアミノ酸が形成する三角形の構造を大きく変化させた事がわかった。この結果は、Irgb6 の膜結合界面の構造が、50Å 以上離れたトレオニン 95 変異によって大きく変化していることを示唆している。

さらに構造研究により、リン酸化変異は GTP 衝突複合体ではなく、ヌクレオチドを含まない状態での構造変化を誘導することがわかった。また、生化学的および構造生物学的解析の結果、Irgb6-T95D は GTP 結合能を保持することがわかった。

しかし、Irgb6-T95D では、その後の加水分解反応はほとんど起こらない。また、Irgb6-WT と比較して多量体形成能が低下している事から、Irgb6-T95D は、異性化反応が起こらず、GTP に結合した活性型 Irgb6 に進めないと考えられる。この仮説を元にすると、Irgb6-T95D は、GTP と

の衝突複合体と非定型ヌクレオチドフリー型の間で平衡状態にある中で、衝突複合体から活性型 **Irgb6** へと確率的に進行することは稀なはずである。したがって、**Irgb6-T95D** における加水分解反応は高度に阻害されていると考えられる。

【結論】

今回の構造解析により、トキソプラズマ原虫によって **Irgb6** がリン酸化され、**Irgb6** の GTPase 活性が不活性化される原子機構が解明された。さらに、リン酸化によって **Irgb6** の膜結合ドメインがリン酸化されたタンパク質の反対側で構造変化を起こし、PVM への結合が阻害される仕組みが、構造解析によって示唆された。

神戸大学大学院医学(系)研究科(博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲第 3394 号	氏 名	大隈 宏道
論 文 題 目 Title of Dissertation	Structural basis of Irgb6 inactivation by <i>Toxoplasma gondii</i> through the phosphorylation of switch I リン酸化を介したトキソプラズマ原虫による Irgb6 不活性化の 構造基盤		
審 査 委 員 Examiner	主 査 伊藤 良平 Chief Examiner 副 査 福 本 巧 Vice-examiner 副 査 伊藤 省雄 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【目的】

トキソプラズマ原虫は、ヒトを含む温血動物にとって重要な病原体で、宿主細胞に侵入し、寄生体虫胞膜（PVM）と呼ばれる構造を形成する。感染をきたすと、宿主細胞はサイトカインであるインターフェロン γ を産生し、寄生虫に対抗するために免疫関連 GTPase（IRG）の発現を誘導する。IRG の自己集合は、G-ドメインをインターフェースとして起こり、各分子は GTPase 活性タンパク質として働く。この過程は、G-ドメインのスイッチ I 領域と II 領域の構造変化によって、G-ドメインの自己組織化界面に影響を与え、その情報を N-ドメインと膜結合境界面を有する C-ドメインに伝達している事が知られている。一方、トキソプラズマ原虫は IRG の G-ドメインのスイッチ I 領域のトレオニン残基をリン酸化して、PVM への IRG の動員を阻害する事が知られている。しかし、この PVM への動員の阻害の構造的なプロセスは不明であるため、今回リン酸化を模倣した Irgb6 の原子構造を調査する事で、Irgb6 の GTPase 活性が不活性化される原子機構を解明する事を目的とした。

【方法と結果】

リン酸化模倣変異体 Irgb6-T95D の作成

これまでの研究で、IRG の G-ドメインのスイッチ I 領域のトレオニン残基のリン酸化が PVM への動員を阻害することが知られている。そこで、トレオニン残基のリン酸化が Irgb6 に与える影響を評価するため、リン酸化模倣変異としてトレオニンをアスパラギン酸に置換した Irgb6(Irgb6-T95D)を作成し、間接免疫蛍光法で Irgb6-T95D が PVM 上で検出されなかったことを確認した。

Irgb6-T95D 変異と GTPase 活性との関連性

続いて、陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した Irgb6-T95D の GTPase 活性を調べ、その結果を野生型 Orgb6(Irgb6-WT)の結果と比較した。GTPase 活性は、Irgb6 と GTP を 30 分間共インキュベートした後、GTP が GDP に加水分解される程度で判断した。Irgb6-WT は GTP の 3 分の 2 を GDP に加水分解したが、Irgb6-T95D は GTP の約 10%しか GDP に加水分解しなかった。このことから、Irgb6 のスイッチ I 領域のトレオニン 95 のリン酸化変異は、Irgb6 の GTPase 活性を著しく低下させることがわかった。

続いて、GTP 結合に伴うポリマー形成を電子顕微鏡で観察した。Irgb6-WT では、ヌクレオチドの添加前にポリマー形成は観察されなかった。GTP アナログである GMP-PNP を添加すると、不規則なポリマー形成が誘導された。一方、Irgb6-T95D は、GMP-PNP を添加しても、ポリマー形成はほとんど見られなかった。T95D 変異では GTP 結合能に影響がないことを考慮すると、この結果は、ポリマー形成には GTP 結合後の構造変化が必要であり、この変化がトレオニン 95 のリン酸化変異によって阻害されることを示唆した。

GTP 結合状態およびヌクレオチドフリー状態の Irgb6-T95D の結晶構造

Irgb6-T95D は Irgb6-WT と同様に GTP および GDP への結合を示したが、GTPase 活性を著しく低下させた。このことは、Irgb6-T95D では GTP 結合後の構造変化、すなわち異性化が起こりにくく、その

結果、膜結合と GTPase のサイクルが切り離されることを示唆している。しかし、膜結合界面は 95 残基から 50Å 以上離れた C ドメインにあるため、トレオニン 95 のリン酸化が膜結合界面のコンフォメーションにどのように影響するかという難しい問題が生じる。そこで、Irgb6-T95D の X 線結晶構造解析を行った。Irgb6-T95D の結晶構造は、GTP 結合後の構造変化を観察するため、GTP あり (Irgb6-T95D-GTP) とヌクレオチドなし (Irgb6-T95D-NF) で、それぞれ 1.68 と 2.05Å 分解能で解かれた。Irgb6-T95D-GTP は Irgb6-WT-GTP と同じコンフォメーションをとり、Irgb6-WT-GTP との全体の平均平方根偏差 (RMSD) は 0.259 Å だった。GTP 結合型とは対照的に、Irgb6-T95D-NF 型は WT とは異なるコンフォメーションを示した。ドメインごとの比較では、Irgb6-T95D-NF の N-ドメインは Irgb6-WT-NF と比較的似ていたが、C-ドメインは異なるコンフォメーションになっていた。

トレオニン 95 リン酸化による PVM 結合領域の構造の変化

次に、トレオニン 95 が所属している G-ドメインの活性部位の構造変化が N-ドメインと膜結合界面である C-ドメインにどのように伝播するかを調べるために、Irgb6-T95D-NF と Irgb6-WT-NF を G-ドメインを基準としてアライメントした。その結果、トレオニン 95 付近の水素結合ネットワークの消失による構造変化がリンカーヘリックス αE に伝わり、リンカーヘリックス αE が右方向へ移動する事で、N ドメインと C ドメインが時計回りに回転している事が判明した。G-ドメインを中心に N-ドメインと C-ドメインが時計回りに回転している事が判明した。この C-ドメインの回転により、これまでの報告で、PVM の結合に必須であると示されていたトリプトファン 3、リシン 275、アルギニン 371 の 3 つのアミノ酸が形成する三角形のうち、Irgb6-T95D-NF のトリプトファン 3 とアルギニン 371 が反転し、Irgb6-WT-NF と比較して構造が大きく変化していることが明らかになった。

【考察】

今回の構造解析により、Irgb6 のトレオニン 95 リン酸化が、50Å 以上離れた C-ドメインの PVM の結合に必須であるトリプトファン 3、リシン 275、アルギニン 371 の 3 つのアミノ酸が形成する三角形の構造を大きく変化させた事がわかった。この結果は、Irgb6 の膜結合界面の構造が、50Å 以上離れたトレオニン 95 変異によって大きく変化していることを示唆している。

さらに構造研究により、リン酸化変異は GTP 衝突複合体ではなく、ヌクレオチドを含まない状態での構造変化を誘導することがわかった。また、生化学的および構造生物学的解析の結果、Irgb6-T95D は GTP 結合能を保持することがわかった。

しかし、Irgb6-T95D では、その後の加水分解反応はほとんど起こらない。また、Irgb6-WT と比較して多量体形成能が低下していることから、Irgb6-T95D は、異性化反応が起こらず、GTP に結合した活性型 Irgb6 に進めないと考えられる。この仮説を元にとすると、Irgb6-T95D は、GTP との衝突複合体と非定型ヌクレオチドフリー型の間で平衡状態にある中で、衝突複合体から活性型 Irgb6 へと確率的に進行することは稀なはずである。したがって、Irgb6-T95D における加水分解反応は高度に阻害されていると考えられる。

【結論】

今回の構造解析により、トキソプラズマ原虫によって Irgb6 がリン酸化され、Irgb6 の GTPase 活性が不活性化される原子機構が解明された。さらに、リン酸化によって Irgb6 の膜結合ドメインがリン酸化されたタンパク質の反対側で構造変化を起こし、PVM への結合が阻害される仕組みが、構造解析によって示唆された。

本研究は、Irgb6 の GTPase 活性が不活性化される原子機構に関する論文であり、価値のある業績であることを認める。本研究、及び、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。