

11. 自然免疫における Toll 様受容体の活性制御機構の解明

清水 敏之

東京大学 大学院薬学系研究科 蛋白構造生物学教室

Key words : Toll 様受容体, 自然免疫, 一本鎖核酸, アンタゴニスト, ナノディスク

緒言

自然免疫は病原微生物感染に対する重要な生体防御のシステムである。病原微生物に対しいち早くその侵入を察知し、炎症反応を引き起こす。微生物表面には PAMP (Pathogen-associated molecular pattern) と名付けられた微生物に特徴的な構造の繰り返し (分子パターン) が存在し、それを宿主のセンサーが認識する。自然免疫における代表的な病原体センサーとして膜結合型の Toll 様受容体 (TLR : Toll-like receptor) が知られている。病原体由来の PAMP だけでなく、壊死した細胞などから放出された自己由来の分子パターンによっても活性化される場合があり、これが自己免疫疾患の一因ともされる。そのため、TLR は抗ウイルス薬、免疫賦活剤、アジュバント、自己免疫疾患治療薬など様々な疾患・症状の創薬ターゲットである。本研究では TLR の活性制御機構の解明を目的として以下の 2 つの課題に取り組む。

1. 一本鎖核酸を認識する TLR8 に働くアンタゴニストの作用機序の解明

TLR8 が低分子化合物でも活性化されることから、これをターゲットするアゴニスト (作動薬) は盛んに研究されている。一方、TLR8 の活性化を抑制するアンタゴニストは自己免疫疾患治療薬 (全身性エリテマトーデスなど) として期待されているものの、まだ上市されたものはない。本研究では TLR8 に対するアンタゴニストの阻害活性作用機序を構造科学的な見地から直接的に証明し、物理化学的な測定手法を用いて結合定数を求めるなど定量的に評価する。

2. 全体構造を通した TLR の活性制御機構の解明

これまでの TLR の構造情報は細胞外ドメインあるいは細胞内ドメインに限られており、全体構造を通した構造解析は成功していない。しかし細胞外ドメインと細胞内ドメインの間で細胞膜を介してどのような協働性が存在してシグナルが伝達されるのかに関する実験的証拠は乏しく、現状では両者間の情報伝達機構はほとんど憶測の域を出ない。本研究では全長 TLR の構造解析を通して、より生体内環境を反映した活性制御機構の解明を目指す。一回膜貫通型タンパク質の構造解析はその柔軟性の故、結晶化が困難であることが十分予想される。我々は電子顕微鏡を用いた低分解能構造解析に取り組む。

本研究ではアンタゴニストがリガンド非結合型の二量体構造で形成されているポケットに結合し構造を安定化することによって活性型二量体への再構成を防ぐことで阻害効果を発揮することを構造科学的に明らかにした [1, 2]。さらに TLR 全長の構造解析に向け試料調製を行った。

方法

1. TLR8 の細胞外ドメインとアンタゴニストとの複合体の結晶化、物理化学的測定

TLR8 特異的なアンタゴニストが共同研究者である Yin 教授のグループ (コロラド大学、現 清華大学) で合成されていたため、まずは TLR8 をターゲットにして研究を進めることにした。TLR8 の細胞外ドメインに関しては既報 [3] に従って発現・精製を行った。

純化したタンパク質を用いてアンタゴニストとの結合定数を等温滴定カロリーメトリー (ITC) 法により求めた。さらにタンパク質-アンタゴニストとの結晶化を行い高エネルギー加速器研究機構にて X 線回折データの収集を行い、分子置換法によって構造決定した。

2. TLR 全長のサンプル調製、構造決定

1) 構造解析に適した TLR の選択

ショウジョウバエ由来の S2 細胞を用いて様々な種類の全長 TLR を発現させ、発現量の多い TLR を研究対象として選んだ。

2) 可溶性およびナノディスクへの組み込み、電子顕微鏡を用いた観察

種々の界面活性剤を試し可溶化率が高くかつ、リガンドへの応答性を指標に最も適した界面活性剤を選択した。さらにナノディスクに組み込み、電子顕微鏡による観察を行った。

結果および考察

1. 一本鎖核酸を認識する TLR7,8 に働くアンタゴニストの作用機序の解明

我々のグループの研究により TLR8 の活性化機構が原子レベルで明らかになった [3] 一方で、低分子阻害剤による TLR8 の阻害機構は全く不明だった。近年、コロラド大学ボルダー校の Hang Hubert Yin 教授 (当時、現清華大学) らによって、CU-CPT8m および CU-CPT9b と呼ばれる 2 種類の新規 TLR8 阻害剤 (これ以降ではまとめて CU-CPT 化合物と表記する) が開発された。CU-CPT 化合物の IC₅₀ は、CU-CPT8m は 67 nM、CU-CPT9b が 0.7 nM であり、十分な阻害活性が認められる。さらに CU-CPT8m は TLR8 を選択的に阻害することが示されている。また直接的な解離定数を求めたところ CU-CPT8m は 220 nM、CU-CPT9b は 21 nM となった (図 1)。

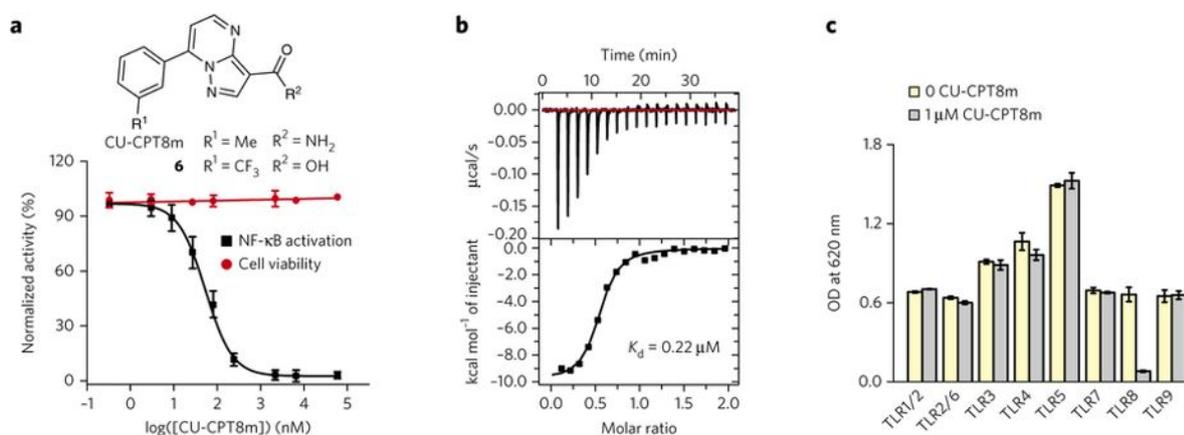


図 1. CU-CPT 化合物の阻害効果および結合定数

- CU-CPT8m の構造式および阻害活性
- CU-CPT8m の ITC サーモグラム
- CU-CPT8m の種々の TLR に対する阻害活性。TLR8 特異的であることがわかる。

我々は、TLR8 細胞外ドメインと CU-CPT 化合物の共結晶化を行い、原子レベルの分解能で複合体の構造決定に成功した (図 2)。その結果、阻害剤化合物結合型 TLR8 の立体構造は、2 分子の TLR8 の界面の 2 箇所に阻害剤が結合した 2 量体構造だった。C 末端付近の S816 同士の距離を 2 量体間で比較すると、CU-CPT8m 結合型では 49 Å、リガンド非結合型 (PDB ID : 3W3G) では 51 Å、低分子刺激剤結合型 (PDB ID : 3W3L) では 34 Å であり、阻害剤結合型はリガンド非結合型と同様に C 末端同士が離れた不活性化型 2 量体構造だった。この阻害剤結合部位は刺激剤結合部位と同じ部位に見えるが、実際には阻害剤結合型と刺激剤結合型は異なった 2 量体構造であり、それらの結合部位も全く異なっていた。阻害剤は、主に LRR11-13 および LRR17*-18*、LRR11*-13* および LRR17-18 で構成される 2 量体界面の等価な 2 箇所のポケットに結合していた。

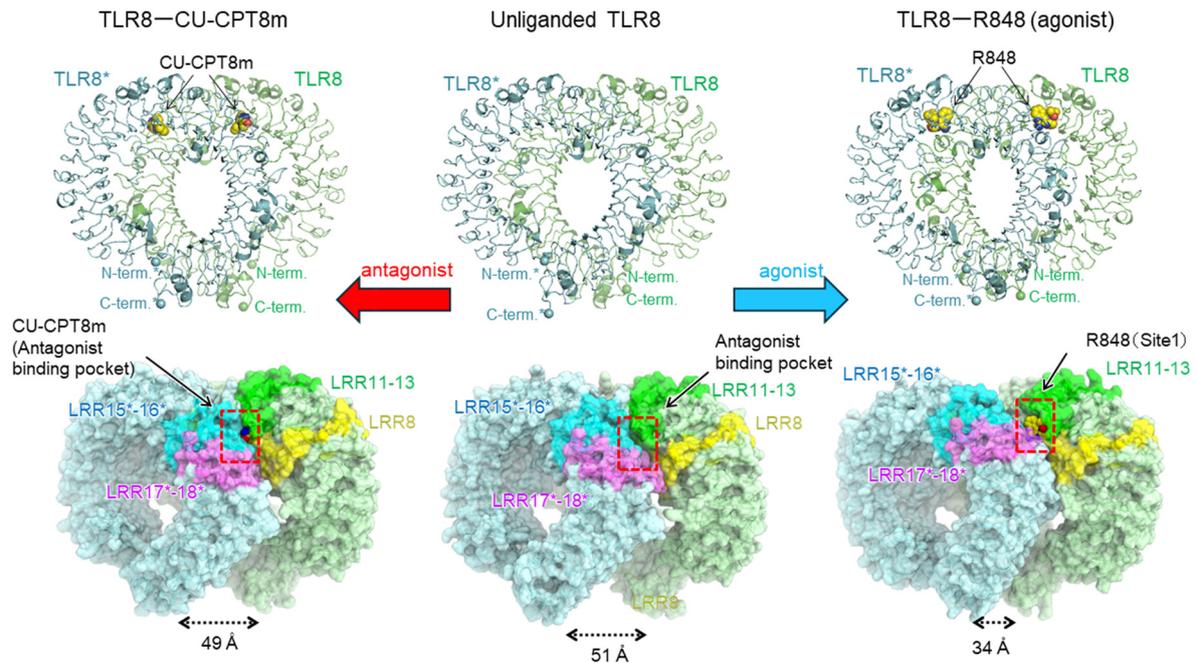


図2. TLR8 の各二量体構造

TLR8-CU-CPT8m (左)、リガンド非結合型二量体構造 (中)、TLR8-R848 複合体二量体構造 (右)。

タンパク質はリボン図および分子表面図で表し、リガンド結合サイトを構成している LRR を表示した。

C 末端間の距離を表示。LRR11-13 (緑)、LRR8 (黄)、LRR15*-16* (青)、LRR17*-18* (ピンク) で表示した。

2 種類の CU-CPT 化合物に共通する TLR8 との相互作用として、主に下記の 3 種類が観察された (図 3)。① Y348 および F495* とのスタッキング相互作用。② F261、V378、I403、F405、F494*、V520*、Y567* などが構成するポケットとの疎水性相互作用。③ G351 の主鎖 N 原子および V520* 主鎖 N 原子との水素結合。

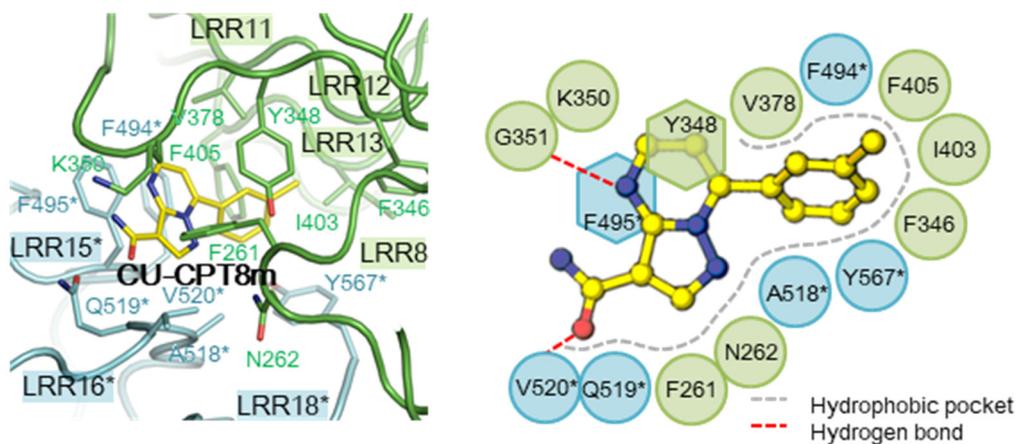


図3. アンタゴニスト結合部位

アンタゴニスト結合部位に結合したアンタゴニスト (左) および相互作用 (右)

阻害剤結合型およびリガンド非結合型 2 量体が類似した不活性化型であるのに対して、刺激剤結合型 2 量体は活性化型であり、不活性化型とは全く異なる 2 量体構造である。刺激剤結合型構造には阻害剤結合ポケットは存在せず、そのかわり TLR8 の活性化を引き起こす刺激剤結合部位が存在する。阻害剤結合部位と刺激剤結合部位は異なる結合部位であるものの、F346 (LRR11)、V378 (LRR12)、I403 (LRR13)、F405 (LRR13) などの LRR11~13 にある疎水性残基は両者のいずれの結合部位にも共通して関わっている。つまり、刺激剤結合型構造ではこれらの残基は刺激剤

結合部位を構成し、阻害剤結合型構造では阻害剤結合部位を構成するため、刺激剤と阻害剤は同時に TLR8 に結合することはできない。実際に、等温熱滴定カロリメトリーを用いた解析により、CU-CPT 化合物存在下では TLR8 に対して刺激剤が結合しなくなることが示された。

CU-CPT 化合物などの阻害剤は、リガンド非結合型構造中の阻害剤結合部位に結合することで不活性化型 2 量体構造を安定化する。つまり阻害剤の結合によって TLR8 への刺激剤の結合およびそれによる活性化型 2 量体への構造変化は阻害される。その結果、生体ではシグナル伝達が阻害されると考えられる。

2. TLR 全長のサンプル調製、構造決定

1 回膜貫通型膜タンパク質 TLR の脂質膜を隔てた活性制御機構の解明を目指し、より生体内環境を反映した状態での全長 TLR の構造解析に取り組んだ。S2 細胞を用いたとき TLR3 が比較的良好な発現を示した。種々の界面活性剤を試し可溶化率が高くかつ、リガンドへの応答性を指標に最も適した界面活性剤を探索したところ、長鎖の fos-choline 系の界面活性剤のみ、良好な可溶化を示した。ナノディスクを取り囲むタンパク質である MSP の調製は既報に従って行った。精製した全長 TLR3、MSP と、リン脂質である DMPC を混合し、全長 TLR3 を含むナノディスクを形成させ負染色した後電子顕微鏡観察を行い、性状をチェックした。現在のところ図 4 のような画像が得られているが、まだ取り込み効率が低くより効率を上げたサンプル調製法を検討中である。

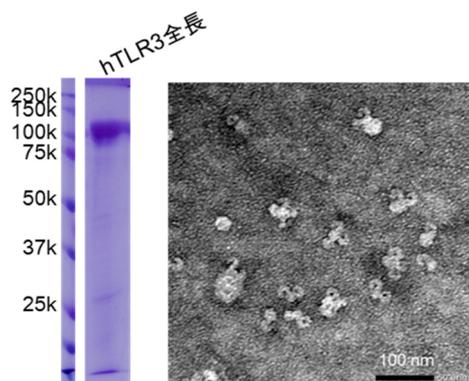


図4. TLR3全長の調製と電子顕微鏡写真（負染色）

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者はコロラド大学 Hang Hubert Yin 博士（現清華大学）である。

文献

- 1) Zhang S, Hu Z, Tanji H, Jiang S, Das N, Jing Li, Sakaniwa K, Jin J, Bian Y, Ohto U, Shimizu T & Yin H Small-molecule inhibition of TLR8 through stabilization of its resting state. *Nature Chem. Biol.* 2018 14:58-64 doi: 10.1038/nchembio.2518
- 2) Hu, Z., Tanji, H., Jiang, S. Zhang, S., Koo, K., Chan, J., Sakaniwa, K., Ohto U, Candia, A., Shimizu T & Yin H Small-molecule TLR8 antagonists based on structure-based rational design. *Cell Chem. Biol.* 2018 25:1286-1291 doi: 10.1016/j.chembiol.2018.07.004.
- 3) Tanji H, Ohto U, Shibata T, Miyake K, Shimizu T. Structural reorganization of the Toll-like receptor 8 dimer induced by agonistic ligands. *Science.* 2013 339(6126) :1426-9. doi: 10.1126/science.1229159.