

【目的】 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。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 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。本研究では全長 TLR の極低温電子顕微鏡による単粒子解析構造解析を目指す。

【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 に対するアンタゴニストと純化した TLR8 の細胞外ドメイン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熱量法 (ITC) 法により求めた。さらにはタンパク質-アンタゴニストとの結晶化を行い X 線結晶構造解析により阻害活性機構を原子レベルで解明することに成功した。2. TLR 全長のサンプル調製、構造決定 : 比較的良好な性状を示した TLR3 を対象に、種々の界面活性剤を試し可溶性が高くかつ、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】 TLR8 と阻害剤との複合体の X 線結晶構造解析により、阻害剤による TLR8 の応答阻害機構を明らかにした。今回解析した阻害剤は、TLR8 のリガンド非結合型の二量体構造で形成されたポケットに結合して構造を安定化し、アンタゴニストによる活性型二量体への再構成を防いで阻害効果を発揮することが判明した。全長の構造解析では比較的良好な性状を示した TLR3 を選択した。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、ナノディスクに取り込まれた TLR3 を確認した。

TLR シグナリング

