

【目的】自然免疫は微生物の感染に対する生体の初期防御反応である。微生物の構成成分は Toll-like receptors (TLRs) などの病原体センサーによって認識され様々な自然免疫応答を引き起こす。TLR は、様々な疾患に関わり、それらの治療薬のターゲットとされている。ゆえに、そのリガンド認識・活性化・シグナル伝達機構を正しく理解することが必要である。本研究課題では、全長の TLR 受容体を用いて細胞外ドメインと細胞内ドメインの協働性を構造生物学的に明らかにし、真の意味でのリガンド認識とシグナル伝達機構を明らかにすることを目的とした。具体的には、脂質二重膜上での TLR 全長のリガンド結合に伴う二量体化、2 分子の膜貫通領域の間および特定のリン脂質との間の相互作用、細胞内の TIR ドメイン間および下流にシグナルを伝達するアダプター分子との間の相互作用を構造生物学的な観点から明らかにすることを目的とした。

【方法】本研究では、脂質二重膜環境を人工的に再現した ND に TLR 全長を再構成した試料を調製し、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析を行うことを目指した。精製した hTLR3 全長試料を ND へ再構成する条件の検討を行い、再構成後の試料は、SDS-PAGE、ゲルろ過クロマトグラフィー、および電子顕微鏡により評価した。またクライオ電子顕微鏡で収集したデータを用いて単粒子解析を行った。

【結果】本研究により単量体および二量体 hTLR3 全長を ND に再構成する方法が確立された。これまでに TLR 全長の構造解析例はなかったが、種々の条件検討の結果、二量体 hTLR3 全長を脂質二重膜上に再構成した試料のクライオ電子顕微鏡による構造解析に成功した。細胞外ドメインの二量体構造は明瞭に密度が確認された。一方で、TLR の膜貫通領域を含むナノディスクの部分については密度が非常に弱かった。また、TLR の細胞内の TIR ドメインについては全く密度が確認できなかった。細胞外ドメインの二量体構造および dsRNA の認識の様子は既報の結晶構造とよく一致していた。

二量体 TLR3 全長-dsRNA-ND のクライオ電子顕微鏡による三次元密度マップ

