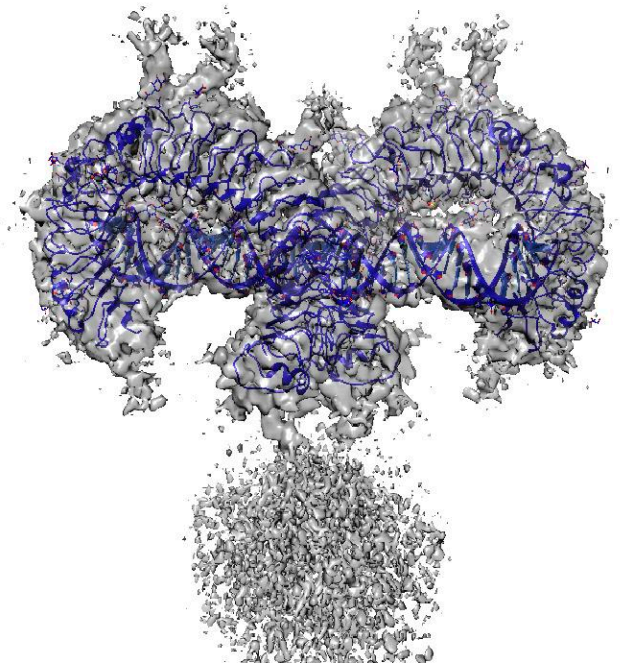
26　Toll様受容体のシグナル伝達の構造基盤解明	大戸　梅治

【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 分子の膜貫通領域間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



26. Toll 様受容体のシグナル伝達の構造基盤解明

大戸　梅治

東京大学 大学院薬学系研究科 蛋白構造生物学教室

Key words：TLR 受容体，自然免疫，一回膜貫通型受容体，ナノディスク，クライオ電子顕微鏡

緒　言

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免疫応答を引き起こす。TLR は、微生物の構成成分を認識し自然免疫を活性化する一回膜貫通型の受容体であり、自然免疫において中心的な役割を果たしている。TLR は、ヒトでは TLR1～TLR10 の 10 種類が存在する（図 1）。細胞外ドメインはロイシンリッチリピート（LRR）で構成されており、それぞれの TLR は異なる病原体由来のリガンドを認識する。細胞内には TIR ドメインが存在し、下流へのシグナル伝達を担うと考えられている。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。

研究代表者らおよび他のグループの研究により、TLR1～TLR9 に関して、特異的にリガンドを認識する機構、細胞外ドメインが二量体化する機構およびそれを通して 2 分子の TLR の細胞外ドメインの C 末端側が接近することが明らかになった［1］。しかし、これまでの研究のほとんどは細胞外ドメインだけを対象にしたものであり、依然として大きな疑問が残されている。「細胞外から細胞内へどのように情報が伝達されるか？」「何が最終的なシグナルの質と量を規定しているのか？」TLR の細胞外ドメインと細胞内の TIR ドメインは一本の膜貫通領域によって連結され、それらの間の協働性がシグナル伝達に重要な役割を果たすことが想像されるが、それに関しての直接的な実験データは皆無である。TLR の活性化機構の全貌を理解するためには、TLR 全長の脂質二重膜上での挙動とその構造を解析する必要がある。

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 分子の膜貫通領域間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。

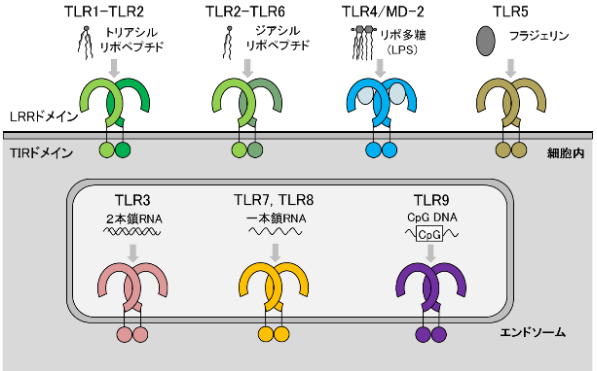


図 1. Toll 様受容体（TLR）

ヒトでリガンドが明らかにされている TLR1～TLR9 について模式的に示した。TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6 が細胞表面に局在するのに対して、TLR3、TLR7、TLR8、TLR9 はエンドソームに局在する。

方　法

1.　TLR 全長の調製

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、膜上での TLR 全長のリガンド結合に伴う二量体化、2 分子の膜貫通領域間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。

上記の目的を達成するため、TLR 全長の構造を脂質二重膜環境中で調べる必要があった。本研究課題では、リン脂質とその周りを取り囲む膜足場タンパク質（Membrane scaffold protein, MSP）から構成されるナノディスク（ND）中に TLR 全長を組み込んでその構造を調べるという手法を採用した。ナノディスクは生体の細胞膜に近い膜環境を再現しており、目的タンパク質を組み込んだ後は界面活性剤を必要とせず、溶液中での安定性、単分散性、均一性に優れている。また、ナノディスクを構成するリン脂質の組成を任意に調製することが可能であるため、特定のリン脂質との間の相互作用を調べる、また脂質修飾を受けたアダプター分子との間の相互作用を調べることも可能である。

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（TLR-ND）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（図 2）。これまでの研究により、ヒト（h）由来の TLR 全長の中で発現が良好である hTLR3 に関して、構造解析のために十分な収量の精製試料の調製が可能となっていた。そこで、本研究では、TLR3 全長に関して重点的に研究を進めた。hTLR3 全長を昆虫細胞 S2 細胞にて発現させ、界面活性剤による可溶化、抗 FLAG 抗体樹脂によるアフィニティー精製、ゲルろ過カラム精製を経て高純度の可溶化 TLR3 全長の試料を得た。

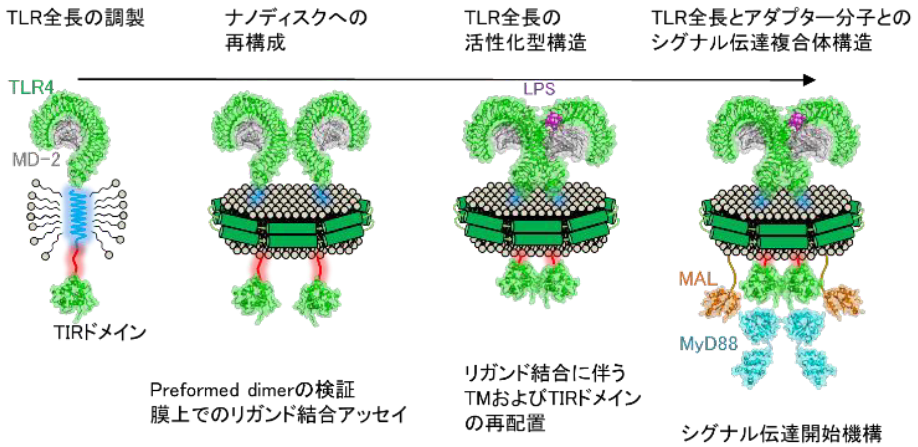


図 2.　ND に再構成した TLR 全長の構造解析
界面活性剤で可溶化した TLR 全長試料をナノディスクに再構成し、ナノディスク上でリガンド結合や下流のアダプター因子との相互作用を観察する。

2.　ND への再構成条件の検討

まず、精製した hTLR3 全長試料を ND へ再構成する条件の検討を行った。まず 1 つの ND に対して単量体の hTLR3 全長の再構成を目指して、ND を構成する膜足場タンパク質 MSP の発現領域、ND の脂質組成、hTLR3 濃度などを検討した。また、1 つの ND に対して、リガンド（dsRNA）を介して二量体化させた hTLR3 全長を再構成することを目指して、ND の脂質組成、リガンドの修飾、hTLR3 間のクロスリンクなどを検討した。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。また電子顕微鏡 Talos Arctica および Titan Krios で収集したデータを用いて単粒子解析を行った。

結　果

1. 単量体の hTLR3 全長の ND への再構成

単量体の hTLR3 全長を ND に再構成する条件を検討した。膜足場タンパク質 MSP1D1 の両親媒性ヘリックス欠損体 MSP1D1ΔH5H6 で調製した ND（直径約 7 nm）には、従来の ND（MSP1D1、直径約 10 nm）に比べ単量体 hTLR3 が効率的に再構成されることを示唆する結果を得た（図 3）。さらに、再構成後の試料のネガティブ染色電顕観察により、1 つの ND に 1 分子の hTLR3 全長が再構成されていることが明らかになった（図 4）。

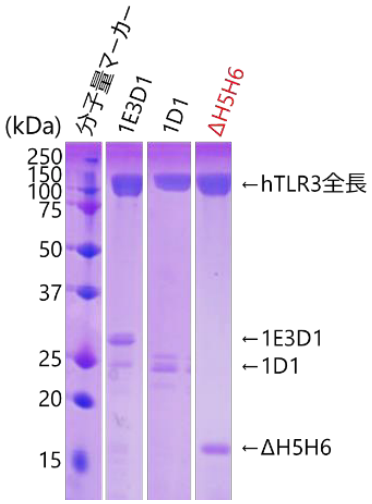


図 3.　単量体 TLR3 全長の ND への再構成
単量体 TLR3 全長を ND に再構成した後、抗 FLAG 抗体樹脂で精製したものの SDS-PAGE。
MSPΔH5H6 を用いた場合に、MSP のバンドが濃いことが分かる。

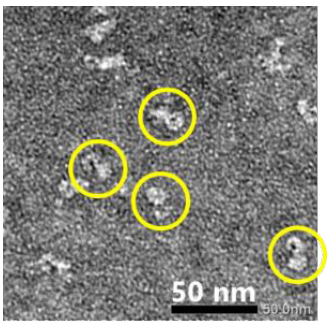


図 4.　単量体 TLR3 全長-ND 再構成試料のネガティブ染色電顕像
黄色で囲んだ粒子において、TLR の細胞外ドメインの特徴的なリング型構造が確認できる。

2. 二量体の hTLR3 全長の ND への再構成

リガンド（dsRNA）を介して二量体化させた hTLR3 全長を ND に再構成する条件を検討した。研究開始当初はほとんどの TLR3 全長と ND の複合体が凝集したものとして得られていた。そこで脂質組成やリガンドの条件の検討を行ったところ、DMPC：DMPG＝1：1 の脂質組成をもつ ND（MSP1D1）を用いると収量が最も多く、凝集体の割合が減少していた（図 5）。また、再構成後の試料の電顕観察で凝集体が多く見られたため、二量体 hTLR3 間の会合を制限する目的でリガンドの修飾を検討した。その結果、一部の塩基対を 2’-O-Me 化した dsRNA を用いることで、凝集体の割合が減少し、クライオ電顕において分散した hTLR3 分子の観察が可能となった（図 6，7）。

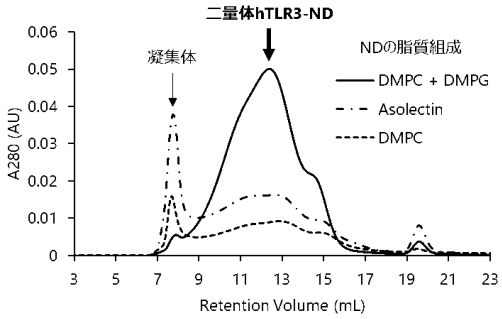


図 5. 二量体 TLR3 全長を ND へ再構成する際の脂質組成の検討
dsRNA を介して二量体化させた TLR3 全長を ND に再構成する際の脂質組成の影響を検討した。再構成後のゲルろ過クロマトグラフィーの結果を示す。Asolectin および DMPC の ND に比べ、DMPC+DMPG の ND の場合凝集体が少ないことが分かる。

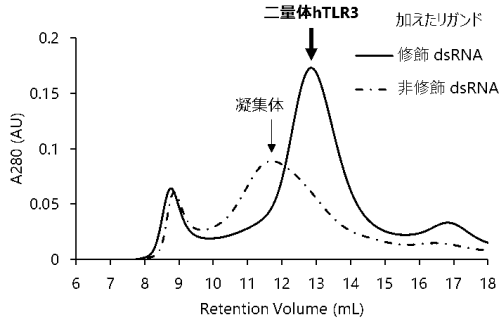


図 6. 二量体 TLR3 全長を ND へ再構成する際のリガンドの検討
dsRNA を介して二量体化させた TLR3 全長を ND に再構成する際のリガンドについて検討した。再構成後のゲルろ過クロマトグラフィーの結果を示す。未修飾の dsRNA に比べ、修飾 dsRNA では低分子両側に溶出しており、高次の会合が抑制されていることが分かる。

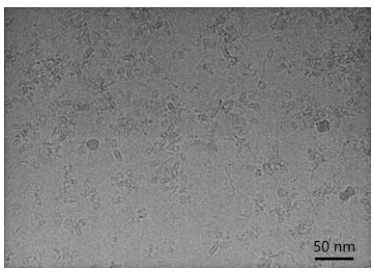


図 7. 二量体 TLR3 全長-dsRNA-ND 試料のクライオ電子顕微鏡画像
Titan Krios で撮影した画像。粒子が比較的分散していた。ナノディスクの側面の特徴的な像が確認できる。

3. ND に再構成した hTLR3 全長と dsRNA 複合体のクライオ電子顕微鏡構造解析

クライオ電顕構造解析により、ND（MSP1D1）に再構成した二量体 hTLR3 と dsRNA の複合体について、クライオ電子顕微鏡 Titan Krios を用いて約 4,000 枚の電子顕微鏡画像を取得した。プログラム Relion により構造解析を行い、最終的に分解能 3.3 Åの三次元密度マップを取得した（図 8）。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［2］とよく一致していた。

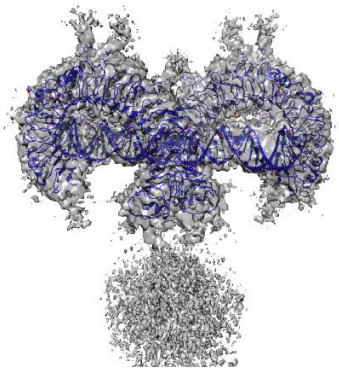


図 8. 二量体 TLR3 全長-dsRNA-ND のクライオ電子顕微鏡による三次元密度マップ
クライオ電子顕微鏡による三次元密度マップを灰色で示す。TLR3 の細胞外ドメインと dsRNA の複合体の結晶構造をリボン図で重ね合わせた。

考　察

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 を脂質二重膜上に再構成した試料の構造解析に成功した。今回の構造解析の結果では、柔軟性の高い膜貫通領域と細胞内領域の密度を十分に観測できなかった。今後、更なる試料調製法の検討によりこれらの領域を解像し、脂質二重膜を隔てた hTLR3 全長のシグナル伝達機構の解明を目指す。

共同研究者・謝辞

本研究は、東京大学大学院薬学系研究科蛋白構造生物学研究室の清水敏之教授のもとで行われたものである。TLR3 の発現、精製条件の検討、ND への再構成条件の検討は、主に丹治裕美博士、坂庭賢太郎修士（博士課程在学中）、浅見仁太修士（博士課程在学中）によって行われた。これらの方々に、心より御礼申し上げます。

文　献

1） Ohto, U. Conservation and Divergence of Ligand Recognition and Signal Transduction Mechanisms in Toll-Like Receptors. Chem Pharm. Bull (Tokyo). 2017; ;65(8):697-705. PMID: 28768923 DOI: 10.1248/cpb.c17-00323

2） Liu, L, Botos, I, Wang, Y, Leonard, J N, Shiloach, J, Segal, D M & Davies, D R. 1. Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. Science. 2008 Apr 18;320(5874):379-81. PMID: 18420935 DOI: 10.1126/science.1155406