

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890048

研究課題名（和文）敗血症ショック治療薬に向けた MD-2 と TLR4 受容体の構造生物学的研究

研究課題名（英文）Structural biology of MD-2 and TLR4 protein toward a therapeutic drug for sepsis

研究代表者

大戸 梅治（OHTO UMEHARU）

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：90451856

研究成果の概要:エンドトキシンである LPS の細胞外受容体を構成する蛋白質ヒト MD-2 単体の三次元構造とアンタゴニストである lipid IVa の複合体の三次元構造を解析した。MD-2 には大きな疎水的ポケットが存在すること, lipid IVa はその疎水的ポケットに結合することから, MD-2 が LPS 認識において中心的な役割を担うことを明らかとした。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	1,370,000	0	1,370,000
平成 20 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：結晶構造解析, 自然免疫, エンドトキシン

1. 研究開始当初の背景

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) を代表とする種々の病原体認識分子によって認識される。TLRs を活性化する種々の病原体物質の中で, グラム陰性細菌の外膜構成成分である LPS はエンドトキシンとも呼ばれ, 最も強力に免疫応答を惹起する。過度の LPS 応答は, 全身性の炎症反応とショック症状を伴う致死率 29% に及ぶ重度のエンドトキシンショックを引き起こし, 米国においては毎年 22 万人以上

のエンドトキシンショックによる死亡が報告されている。しかし, 効果的なエンドトキシンショックの治療薬は開発されていない。この LPS の細胞外受容体として TLR4 と MD-2 の 2 つの蛋白質が見出された。

2. 研究の目的

TLR4/MD-2 複合体は本来, LPS の受容体として働き免疫系を活性化させグラム陰性細菌の感染から生体を防御しているが, グラム陰性細菌感染症やそれに起因する敗血症性シ

ヨックの原因分子となっている。これらは生命を脅かす重篤な病気であり、その治療薬の開発が待望されている。これらの症状の治療薬の開発のためにも LPS 認識機構の分子レベルでの解明は必須であり、認識分子である TLR4/MD-2 受容体の構造解析を行なう必要がある。本研究は TLR4/MD-2 による LPS の認識機構を X 線結晶構造解析の手法を用いて解明することを目的とし、これらの蛋白質の大量発現系の構築、精製、性状解析、結晶化と結晶構造解析を進めた。

3. 研究の方法

アミノ末端にヒスチジンタグと factor Xa 認識配列を付加したヒト MD-2 (アミノ酸残基 17-160) の cDNA を、メタノール産化酵母 *Pichia pastoris* 用の発現ベクターの酵母由来のシグナルペプチドである α -mating factor 下流に組み込み 組換え体 MD-2 を発現させた。5 ステップのカラムクロマトグラフィー操作、factor Xa によるタグの切断と Endoglycosidase Hf による糖鎖の短鎖化を経て、SDS-PAGE 上で単一のバンドとなるまで精製し、結晶化サンプルとした。この組換え体 MD-2 は lipid A, lipid IVa と LPS への結合能を有し、また、MD-2 欠損細胞への添加が LPS 応答を惹起することを確認した。MD-2 に対して当量の lipid IVa を混合した後に陽イオン交換カラムによって lipid IVa 複合体を分取し、結晶化サンプルとした。ポリエチレングリコール 8000 を結晶化剤とするハンギングドロップ蒸気拡散平衡法を用いてネーティブ体結晶を析出させた。ポリエチレングリコール 3350 を結晶化剤としてネーティブ体結晶と同型の lipid IVa 複合体結晶 ($a = 52.8 \text{ \AA}$, $c = 110.9 \text{ \AA}$) を析出させた。回折強度データ測定は、波長 1.0000 \AA の SPring-8 シンクロトロン放射光 X 線を用い、結晶を 100 K の窒素気流中に置いて行った。

4. 研究成果

(1) 当初、得られた結晶についての回折強度の統計値は双晶の可能性を示した。その際の測定には、安定化母液 (25% PEG8000, 0.1 M Na-cacodylate pH 6.3, 0.2 M NaCl, 0.2 M Na-acetate) に 10% のグリセロールを加え抗凍結剤としていた。この抗凍結剤で測定した全てのデータはこの傾向を示し、構造解析は困難であった。

抗凍結剤を検討した結果、この結晶では大きな格子から小さな格子への変換が起こることが明らかとなった。変換後の空間群は $P4_12_12$ であり、 a 軸と b 軸が元の格子の a 軸と b 軸の対角線方向に対応する。双晶のデータでは、 c 軸を共有するこれら 2 つの異なる

格子由来の回折強度が観測されていたと考えられる。抗凍結剤を最適化 (25% PEG8000, 0.2 M Na-acetate, 0.1 M NaCl, 0.1 M Na-cacodylate pH 6.3, and 20% 2,3-butanediol) することにより、小さな格子だけの回折強度を得ることができた。格子変換後の小さい格子についての回折強度の統計値には、双晶の兆候は見られない。

ネーティブ体結晶について、4 種の重原子置換体を調製し、多重重原子同型置換法により初期位相を決定した。分解能 2.4 \AA までの平均の figure of merit (m) は m_{centric} が 0.67 で m_{acentric} が 0.61 である。溶媒領域を平均化し、位相を改善した後の電子密度をもとに三次元構造の初期モデルを構築し、結晶構造を最尤推定法により精密化した。さらにネーティブ体の構造を初期モデルとし、lipid IVa 複合体の構造を精密化した。

(2) MD-2 は約 $40 \text{ \AA} \times 25 \text{ \AA} \times 25 \text{ \AA}$ の単一のドメインから成り、9 本の β 鎖 (アミノ末端から $\beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 4, \beta 5, \beta 6, \beta 7, \beta 8, \beta 9$) を含む。これらの逆平行 β 鎖は 2 つの β シートに分かれ、シート 1 は $\beta 1, \beta 2, \beta 5, \beta 6, \beta 8$ と $\beta 9$, シート 2 は $\beta 3, \beta 4$ と $\beta 7$ から成る。シート 1 とシート 2 は互いに約 45° の角度をなしている。これらのシートの間には約 $15 \text{ \AA} \times 8 \text{ \AA} \times 10 \text{ \AA}$ の大きな疎水的なポケットが存在する。 $\beta 6$ と $\beta 7$ の主鎖間は 12 \AA 以上の距離があり、このポケットの入り口となっている。このポケット内には、ネーティブ体構造では 3 本の脂肪酸に相当する電子密度が、lipid IVa 複合体では lipid IVa の電子密度が認められた。MD-2 には 7 つのシステイン残基があり、ポケット内にある Cys 133 以外はジスルフィド結合を形成する。糖鎖結合可能部位 Asn 26 と Asn 114 には、結合した *N*-アセチルグルコサミン (NAG1 と NAG2) が認められた。これらの糖鎖はリガンド結合部位からは離れた位置に存在しており、リガンドの認識には直接関与せず、蛋白質の安定性に寄与している。ネーティブ体構造と lipid IVa 複合体構造の平均 B -factor はそれぞれ 39 \AA^2 と 37 \AA^2 である。これらの主鎖原子間での根二乗平均差異は 0.3 \AA 、側鎖原子を含めると 0.7 \AA であり、構造の差異は小さい。

$\beta 7$ に沿うように lipid IVa の XP1, XG1, XG2 と XP2 が配置し、XP1 と XP2 のリン原子間の距離は 12.5 \AA である。脂肪酸鎖 XA1 と XA3 のカルボニル酸素が Ser 120 と Lys 122 の主鎖の窒素原子とそれぞれ水素結合を形成している。また XA3 の 3-ヒドロキシ酸素が Ser 120 の主鎖のカルボニル酸素と水素結合を形成している。一方、 $\beta 6$ の Arg 90 と Glu 92 の側鎖と lipid IVa の XG2, XP2 の間

には 5 個の水分子が存在し、これら側鎖と lipid IVa の間に直接の相互作用は存在しない。MD-2 は等電点 8.7 の塩基性蛋白質であり、分子表面に存在する 18 個のリジンとアルギニンの側鎖が、負電荷を帯びた lipid IVa を静電相互作用によって引きつける役割を果たしている。

Lipid IVa 分子の脂肪酸鎖は、いずれも MD-2 の疎水的なポケットに入り込んでいる。XA1 は 3 方向を疎水性残基に囲まれ最も深くポケットに入り込んでいる。XA1 と XA2 は比較的直鎖状であるのに対し、XA3 と XA4 は曲がった構造をとる。Lipid IVa 分子の平均 B-factor は 46 \AA^2 であり、XA1, XA2, XA3 と XA4 ではそれぞれ 33 , 46 , 41 と 53 \AA^2 である。XA1, XA2, XA3 と XA4 の原子と 4.5 \AA 以内にある MD-2 のアミノ酸残基数はそれぞれ 14, 9, 9 と 9 個である。

(3) TLR4 と MD-2 の複合体構造を明らかにするために、C 末端を欠損させたヒト TLR4 の細胞外ドメインの酵母で発現させ、N 末端側 100 残基程度の発現が確認できた。発現させた TLR4 欠損体は糖鎖が付加されていた。今後は MD-2 との結合の確認や、より長い断片を得るために他の蛋白質との融合蛋白質として発現させる予定である。

(4) ヒト MD-2 とアゴニストである Re-LPS の複合体を陽イオン交換カラムにより精製し結晶化試料を得た。得られた試料を用いて三方晶系の結晶を得て、放射光 X 線を用い 4.5 \AA までの回折強度データを収集した。分子置換法により位相を決定し、分子のバックグ情報を得ることができたが、アゴニストと MD-2 の詳細な構造情報は得られていない。今後はさらに良質の結晶を得る条件を探索し、高分解能での MD-2 とアゴニストとの複合体の構造解析を目指す。

(5) 昆虫細胞を用いた TLR4 と MD-2 の発現系を構築した。TLR4 の細胞外ドメインの C 末端側にトロンピン切断配列と Fc タグを付加させて発現させた。Protein A 樹脂による精製後、トロンピンにより Fc タグを切断しさらにゲルろ過クロマトグラフィーに供することで SDS-PAGE においてほぼ単一のバンドの TLR4 の細胞外ドメインを得た。培養液 1 L あたりおよそ 0.1 mg の粗精製 TLR4 細胞外ドメインが得られた。得られた標品が酵母で発現させた単量体 MD-2 と結合することをゲルろ過クロマトグラフィーにより確認した。また、昆虫細胞において TLR4 細胞外ドメインを MD-2 と共発現することにより発現量が上

昇し、培養液 1 L あたりおよそ 0.3 mg の TLR4 細胞外ドメインが得られた。現在 Re-LPS や LPS Ra などのアゴニストとの複合体の結晶化条件を探索中である。

ヒト MD-2 単体に関しては、Native-PAGE によりリガンド候補である diC14-amidine や diC16-amidine との相互作用を示唆する結果を得た。これについても現在結晶化条件を探索中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Ohto, U. and Satow, Y. (2008). Crystal twinning of human MD-2 protein recognizing endotoxin cores of lipopolysaccharide. *J. Synchrotron. Radiat.* **15**, 262-265. (査読あり)

Ohto, U., Fukase, K., Miyake, K., and Satow, Y. (2007). Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVa. *Science* **316**, 1632-1634. (査読あり)

[学会発表](計 2 件)

発表者 Ohto, U. and Satow, Y.

演題 Crystal structures of human MD-2 recognizing bacterial endotoxin

学会名 Biochemistry and molecular Biology 2007

発表年月日 2007 年 12 月 12 日

発表場所 横浜

発表者 Ohto, U. and Satow, Y.

演題 Crystal twinning of human MD-2 protein recognizing endotoxin cores of lipopolysaccharide

学会名 International symposium on diffraction structural biology 2007

発表年月日 2007 年 9 月 12 日

発表場所 東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

大戸 梅治 (OHTO UMEHARU)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：90451856

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし