

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H00976

研究課題名(和文)自然免疫センサーの動作機構と新規制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular motion and new regulation mechanisms in innate immune sensors

研究代表者

清水 敏之(Shimizu, Toshiyuki)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授

研究者番号：30273858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,300,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫は病原体の感染をいち早く察知し炎症反応を引き起こす一方、後に続く獲得免疫を誘導するという極めて重要な役割を果たす。本研究では自然免疫に関わるタンパク質に注目し、リガンド認識機構、活性制御機構を明らかにすることを目的とした。細胞質型の自然免疫センサーとしてADP結合型のNOD2の構造解析に成功し、詳細な構造を明らかにした。またLRRドメインにリガンド結合部位と思われる領域を同定した。また一本鎖核酸を認識する膜結合型の自然免疫センサーであるTLRの構造研究にも取り組みその共通性を見出した。さらにmRNAの安定性を制御するRoquin-2の構造解析にも成功しそのRNA認識機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NLRの構造は数例に限られており、NOD2の構造情報はNLRの活性化機構を解明するうえで重要な情報となる。すでに構造解析されているNLRの一つNLRC4と比べてもドメイン配置が大きく異なることが初めて明らかにされた。一本鎖核酸を認識するTLRが有する共通性「リガンド結合部位が2ヶ所あり別のリガンドが各部位に結合することにより協調的に活性化する」を解明したことは大きなインパクトを与えた。特にTLR7,8は低分子化合物によって活性化されることが知られており、立体構造情報はあらたな化合物開発に多大な貢献を示すと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Innate immunity serves as the first line of defense against invading pathogens such as bacteria and viruses, and active adaptive immunity. We focused on the innate immune proteins, and tried to reveal the ligand recognition and regulation mechanisms by structural studies.

We determined the crystal structure of rabbit NOD2 in an ADP-bound state. The structure reveals an inactive closed conformation. We found a hydrophobic pocket on the concave surface of the LRR domain, suitable for accommodating glycan or peptide moieties of MDP. Structural studies of TLR sensing a single-stranded nucleic acids (TLR7, 8, 9) revealed that these TLRs share common mechanism for activation mechanism. Roquin mediates mRNA degradation by recognizing the constitutive-decay element (CDE) followed by recruitment of the deadenylation machinery. Crystal structure of Roquin-RNA complex revealed that The CDE RNA, forming a stem-loop structure, bound to the positively charged surface of the ROQ domain.

研究分野：構造生物学

キーワード：自然免疫 構造生物学 Toll様受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自然免疫システム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。このシステムはヒトのみならず、昆虫などの無脊椎動物、植物にも備えられている。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 1 回膜貫通型膜タンパク質である Toll 様受容体(TLR; Toll-like receptor)と細胞質局在型の Nod 様受容体(NLR; Nod-like receptor)が知られている(他に RLR, CLR など)。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(DAMP; danger-associated molecular pattern)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 および NLR 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。

TLR は一回膜貫通型の膜タンパク質であり、リガンド認識ドメイン(Leucine Rich repeat (LRR) ドメイン)、膜貫通領域、シグナル伝達に関わる TIR ドメインから構成される。(図 1 左)

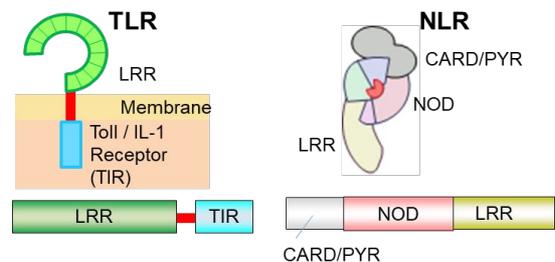


図 1 TLR, NLR のドメイン図

TLR の活性化機構としてはリガンドが結合していない状態では単量体で存在しているが、細胞外ドメインへのリガンド結合により二量体化が引き起こされ、細胞内ドメインである TIR ドメインが会合する(図 2)。そこへアダプター蛋白質が集積しシグナル複合体が形成されることでシグナル伝達が行われるというモデルが提唱されている。一方、NLR は機能ドメイン(CARD/PYR)、重合ドメイン(NOD ドメイン)、リガンド認識ドメイン(LRR ドメイン)から構成される(図 1 右)。活性化機構として、リガンドがない状態では重合ドメインが LRR によって塞がれて自己阻害型になっているがリガンド結合により自己阻害型が解放され多量体構造をとり下流因子と結合するというモデルが提唱されている。

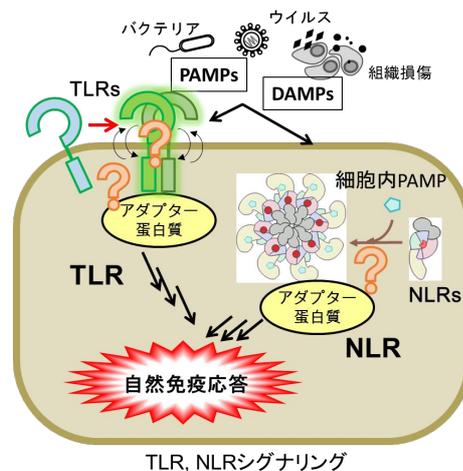


図 2 本研究における自然免疫応答

TLR の構造研究は精力的に行われ、我々のグループも世界に先駆けて一本鎖核酸を認識する TLR7 ファミリー(TLR7, 8, 9)の構造解析に成功し、詳細なリガンド認識機構を解明した(*Science* 2013; *Nature* 2015; *Immunity* 2016; *Immunity* 2018)。これらの構造科学的研究は貴重な情報を与えたことは数々のレビューなどを見ても明白である。一方 NLR の構造科学的研究は遅れており、我々のグループが報告した不活性型 NOD2(*Nature comm.*, 2016)を含め数例にとどまっている。ここで大きな問題はこれまでの TLR の構造情報は細胞外ドメイン、細胞内ドメイン、一部のドメインを用いた構造に限られており、断片的な構造情報しか報告されていないということである。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ため全体構造の報告例はほとんどない。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機構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。さらに NLR に関しては解析例が少なく、一般化できる状況にないことである。

2. 研究の目的

以上の背景をふまえ本申請では構造科学的側面および機能解析側面から TLR および NLR の構造機能研究を展開するリガンド認識機構、活性化機構、制御機構を“目に見える形で”表し、自然免疫に関わる分子の動作原理を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) TLR の選択、界面活性剤による可溶化、アダプター蛋白質のサンプル調製

現在のところ S2 細胞を用いたとき TLR3 の発現が良好であり、長鎖の fos-choline 系の界面活性剤でのみ良好な可溶化を示す、という初期的な結果を得ている。アダプター蛋白質 (MyD88) はまずは TIR ドメインを調製する。すでに構造解析は行われているので、この調製はスムーズに行われる。

(2) NLR の試料調製

(3) クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析

可溶化した及びナノディスクへ再構成したサンプルは結晶化およびクライオ電子顕微鏡による解析を目指す。現在 TLR3 全長の精製およびナノディスク再構成は成功しているが、成功率が低く様々な条件検討を行う予定である。単粒子解析に持っていけるサンプルであれば、確立されつつある方法にて解析を行う。

得られた構造をもとにリガンド認識に重要なアミノ酸に変異を入れ、活性がどうなるかを評価する。スクリーニング系はすでに共同研究者によって立ち上げられている。

4. 研究成果

(1) 動的平衡状態誘起による自然免疫受容体 TLR7 の阻害機構

TLR7 は一本鎖 RNA、グアノシンおよび特定の合成低分子リガンドによって活性化され、ヒト免疫不全ウイルスやインフルエンザウイルスなどの RNA ウイルスを認識することが報告されている。このように TLR7 は自然免疫応答で重要な役割を果たすが、その一方で TLR7 の過剰応答は自己免疫疾患との関連が指摘されているこのため、TLR7 は自己免疫疾患における重要な創薬ターゲットであり、阻害剤は自己免疫疾患治療薬の候補になると考えられる。我々はアンタゴニストによる TLR7 の阻害機構を原子レベルで明らかにするため構造解析に着手した。

共同研究者は二環性のプリン環を骨格母体とした化合物に対し、様々な置換基を検討し TLR7 をターゲットにしたアゴニスト、アンタゴニストの合成に成功している。これらのリガンドと TLR7 (細胞外ドメイン) との複合体構造を X 線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡解析により明らかにした。

TLR7 とアゴニストとの複合体は、これまで報告されていた活性型二量体構造 (クローズ型) であったが、アンタゴニストとの複合体は本研究で初めて解明されたオープン型の不活性型二量体構造であった。また生物活性では阻害活性を示す化合物 Cpd-6 との複合体をクライオ電子顕微鏡による単粒子解析で決定したところ、オープン型とクローズ型の両者が観測された。即ち、この化合物は両者の構造を誘起し動的な平衡状態を誘導することができるが、安定したクローズ型を形成することができず結果として TLR7 の活性化を阻害

すると考えられる (図 3)

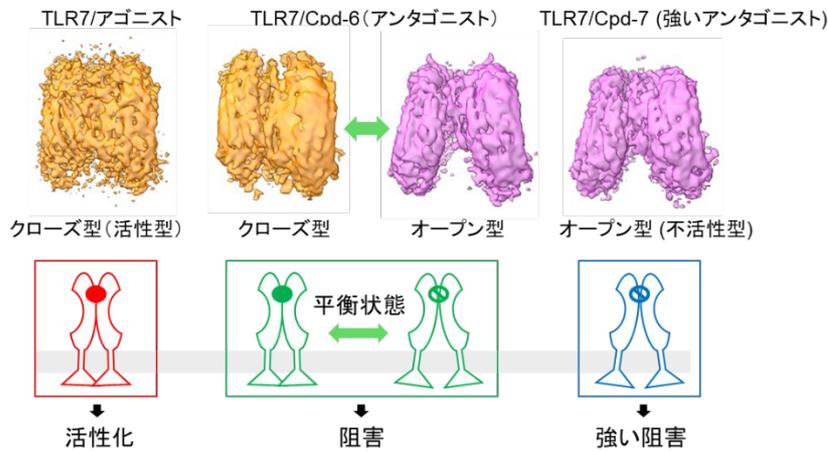


図 3 動的な平衡状態による阻害機構

(2) ウイルスの RNA を感知する Toll 様受容体と輸送に關与する UNC93B1 との複合体構造の解明

自然免疫系は、私たちの身体に先天的に備わる防御システムであり、体内に侵入してきたウイルスや細菌などの病原体を感知し排除する役割を持つ。Toll 様受容体 (TLR) は、これら病原体に特徴的な構造 (分子パターン) を見つけるセンサーとして働く。TLR3、7、8、9 は病原体由来の核酸 (DNA や RNA) を認識する TLR として一群のファミリーを形成する。核酸分子は微生物からヒトに至るまで普遍的な構造であるため、これら核酸認識 TLR は、エンドソームとよばれる細胞外の物質を取り込んだ小区内にのみ存在し、核や細胞質に存在する自己由来の核酸からは隔離される必要がある。UNC93B1 はこれら TLR の小胞体からエンドソームへの移行に関わっていることが知られていたが、TLR と UNC93B1 の結合様式はこれまで明らかになっていなかった。

我々は、TLR と UNC93B1 の相互作用様式を明らかにするために、TLR と UNC93B1 を共発現させた培養細胞から、TLR3-UNC93B1 および TLR7-UNC93B1 の安定な複合体を得ることに成功した。得られた複合体は東京大学のクライオ電子顕微鏡を用いて、それぞれ 3.4 Å および 4.2 Å の分解能で構造解析した。構造解析の結果、TLR3 と UNC93B1 は 1 : 1 の複合体を形成しており、UNC93B1 の 12 本の膜貫通ヘリックスのうち、主に 3 本目と 6 本目のヘリックスが TLR3 の膜貫通ヘリックスと相互作用していることが分かった (図 4)。一方で、TLR7 は UNC93B1 と 2 : 2 の複合体を形成していました。TLR7 も TLR3 と同様の膜貫通ヘリックスを介した相互作用により UNC93B1 と結合していました。これに加えて TLR7-TLR7 および UNC93B1-UNC93B1 の間の相互作用も確認され、これにより 2 : 2 複合体を形成していると考えられた。今回の結果により、TLR と UNC93B1 の相互作用が明らかになり、一部の TLR が UNC93B1 により輸送される機構の一端が明らかとなった。

UNC93B1 の構造はこれまで明らかになっていなかったが、興味深いことに、MFS 型輸送体とよばれるさまざまな分子の輸送に関わるトランスポーターファミリーと非常によく似た構造であった。

TLR はリガンドの結合に伴って活性化型の二量体を形成し免疫応答を促進する。今回得られた TLR3-UNC93B1 複合体の構造を TLR3 の細胞外ドメインの活性化型二量体の構造と重ね合わせてみると、TLR3 に結合した UNC93B1 同士が衝突することが示された。し

たがって、今回得られた構造から、TLR3 が活性化するには UNC93B1 が解離するという機構が考えられる。

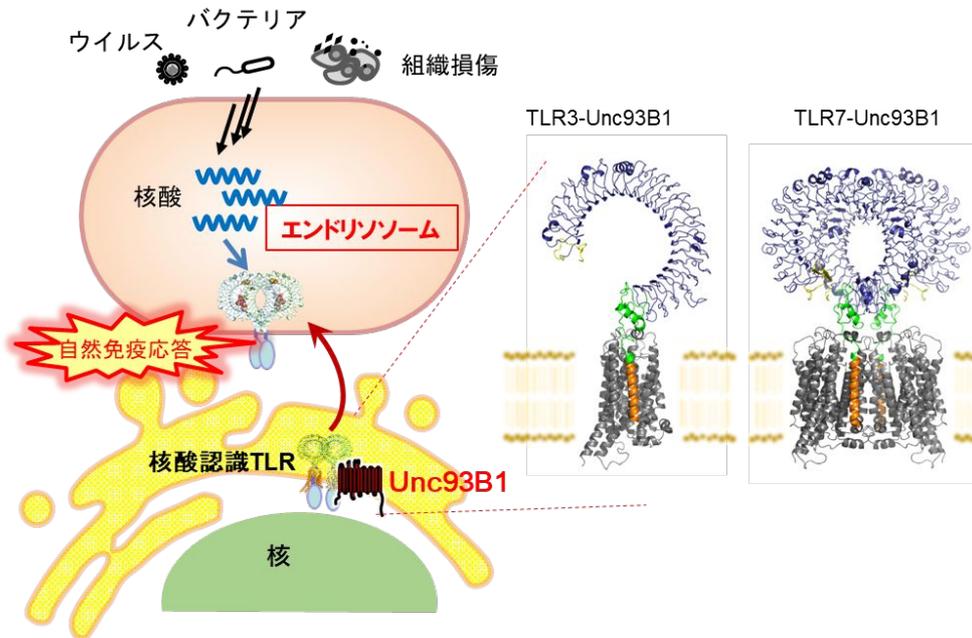


図4. TLR3 と UNC93B1 との複合体構造

(左図) UNC93B1 による核酸認識 TLR のエンドリソソームへの輸送機構。

(右図) UNC93B1-TLR3 および UNC93B1-TLR7 の複合体構造

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tojo S, Zhang Z, Matsui H, Tahara M, Ikeguchi M, Kochi M, Kamada M, Shigematsu H, Tsutsumi A, Adachi N, Shibata T, Yamamoto M, Kikkawa M, Senda T, Isobe Y, Ohto U and Shimizu T	4. 巻 11
2. 論文標題 Structural analysis reveals TLR7 dynamics underlying antagonism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature commun.	6. 最初と最後の頁 5204, 5204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-19025-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Padilla-Salinas, R., Anderson, R., Sakaniwa, K., Zhang, S., Nordeen, P., Lu, C., Shimizu, T., Yin, H.	4. 巻 62
2. 論文標題 Discovery of Novel Small Molecule Dual Inhibitors Targeting Toll-like Receptor 7 and 8	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Med. Chem.	6. 最初と最後の頁 10221, 20244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jmedchem.9b01201	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Toma-Fukai S, Shimizu T	4. 巻 24
2. 論文標題 Structural Insights into the Regulation Mechanism of Small GTPases by GEFs.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 3308, 3308
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules24183308	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Furusho K, Shibata T, Sato R, Fukui R, Motoi Y, Zhang Y, Saitoh SI, Ichinohe T, Moriyama M, Nakamura S, Miyake K.	4. 巻 31
2. 論文標題 Cytidine deaminase enables Toll-like receptor 8 activation by cytidine or its analogs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int Immunol.	6. 最初と最後の頁 167, 173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxy075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kano H, et al Fukase K, Ohto U, Shimizu T, Watanabe T, Shindo H, Aoki S, Sato K, Mika Nagasaki M, Yatomi Y, Komura N, Ando H, Ishida H, Kiso M, Natori Y, Yoshimura Y, Zonca A, Cattaneo A, Letizia M, Ciampa M, Mauri L, Prinetti A, Sonnino S, Suzuki A, and Inokuchi J	4. 巻 39
2. 論文標題 Homeostatic and pathogenic roles of GM3 ganglioside molecular species in TLR4 signaling in obesity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO J.	6. 最初と最後の頁 e101732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2019101732	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jiang S, Tanji H, Yin K, Zhang S, Sakaniwa K, Huang J, Yang Y, Li J, Ohto U, Shimizu T, Yin H.	4. 巻 63
2. 論文標題 Rationally designed small-molecule inhibitors targeting an unconventional pocket on the TLR8 protein-protein interface	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Med. Chem.	6. 最初と最後の頁 4117, 4132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.9b02128	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakaniwa K and Shimizu T	4. 巻 D76
2. 論文標題 Targeting the innate immune receptor TLR8 using small-molecule agents	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Cryst	6. 最初と最後の頁 621, 629
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2059798320006518	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hanako Ishida, Jinta Asami, Zhikuan Zhang, Tomohiro Nishizawa, Hideki Shigematsu, Umeharu Ohto and Toshiyuki Shimizu	4. 巻 28
2. 論文標題 Cryo-EM structures of Toll-like receptors in complex with UNC93B1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Struc Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 173, 180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-020-00542-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yang Y, Csakai A, Jiang S, Smith C, Tanji H, Huang J, Jones T, Sakaniwa K, Broadwell L, Shi C, Soti S, Ohto U, Fang Y, Shen S, Deng F, Shimizu T, Yin H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Tetrasubstituted imidazoles as incognito Toll-like receptor 8 a(anta)gonists.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 4351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-24536-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Jinta Asami and Toshiyuki Shimizu	4. 巻 30
2. 論文標題 Structural and functional understanding of the toll-like receptors.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 761, 772
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.4043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 柴田 琢磨
2. 発表標題 SLC29A3異常症における発症メカニズムの解明
3. 学会等名 第43回 日本小児皮膚科学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水敏之
2. 発表標題 自然免疫における一本鎖核酸認識Toll様受容体の共通性およびその創薬への展開
3. 学会等名 日本核酸医薬学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水敏之
2. 発表標題 動的平衡状態誘起による自然免疫受容体TLR7の阻害機構
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	柴田 琢磨 (Shibata Takuma) (30554505)	東京大学・医科学研究所・助教 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------