

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03164

研究課題名（和文）多階層解析による脂質二重膜中でのToll様受容体の活性化機構の全貌解明

研究課題名（英文）Elucidation of a complete picture of the activation mechanism of Toll-like receptors in lipid bilayers by multilevel analysis

研究代表者

大戸 梅治（Ohto, Umeharu）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・准教授

研究者番号：90451856

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：自然免疫受容体のTLR全長に関して構造生物学的研究を進めた。TLR3全長をナノディスクに再構成した試料についてクライオ電子顕微鏡構造解析に成功した。細胞外ドメインの密度は明瞭に観察されたが、膜貫通領域および細胞内のTIRドメインは解像されなかった。核酸認識TLRの局在を制御するUNC93B1とTLR3およびTLR7の複合体の構造解析に成功し、UNC93B1による核酸認識TLRの局在制御機構の構造基盤を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

種々の病気の治療薬開発のターゲットであるTLR受容体に関して構造生物学的な研究を進めた。TLR全長の活性化機構の全貌はいまだ明らかになっておらず、本研究は今後の研究の基盤となることが期待される。一部のTLRの細胞内局在を制御するUNC93B1とTLRの複合体の構造解析に成功し、TLRの細胞内局在を制御する薬剤開発の構造基盤を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Structural biology of the full-length of innate immune receptor TLR was investigated. Cryo-EM structural analysis of full-length TLR3 reconstituted into nanodisc was successfully performed. The density of extracellular domain of TLR3 was clearly observed, but transmembrane regions and intracellular TIR domains were poorly resolved. The structures of TLR3-UNC93B1 and TLR7-UNC93B1 were successfully determined, revealing the structural basis of the regulation mechanism of nucleic acid-sensing TLR localization by UNC93B1.

研究分野：構造生命科学

キーワード：自然免疫 TLR受容体 クライオ電子顕微鏡 タンパク質 構造解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

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。生体に侵入した細菌やウイルスの構成成分は Toll-like receptors (TLRs) を代表とする病原体センサー受容体によって認識され様々な免疫応答を引き起こす。TLR は、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。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。そのため、TLR によるリガンド認識・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てきた。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、「細胞外から細胞内へどのように情報が伝達されるか?」という大きな疑問が残されている。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。

2. 研究の目的

本研究では、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、そ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。また、核酸認識 TLR の細胞内局在を制御する UNC93B1 に着目し、UNC93B1 による TLR の細胞内局在の制御機構を構造生物学的に明らかにすることも目指した。

3. 研究の方法

構造解析対象のタンパク質はショウジョウバエ由来 S2 細胞または哺乳動物細胞 expi293 細胞を用いて発現後、膜タンパク質の場合は界面活性剤による可溶化を経て、高純度に精製した。TLR 全長の構造解析の際には、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 全長を組み込んだ試料も調製した。構造解析にはクライオ電子顕微鏡を用いた。

4. 研究成果

(1) TLR 全長の構造解析

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。これまでの先行研究により、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。

次に 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。また、再構成後の試料の電子顕微鏡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、クライオ電子顕微鏡において分散した hTLR3 分子の観察が可能となった。

クライオ電子顕微鏡構造解析により、ND (MSP1D1) に再構成した二量体 hTLR3 と dsRNA の複合体について、東京大学医学系研究科設置のクライオ電子顕微鏡 Titan Krios を用いて約 4000 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。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。

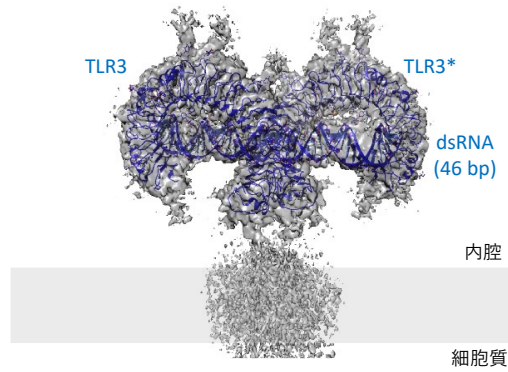


図1. ナノディスクに再構成した TLR3 全長の活性化型二量体のクライオ電子顕微鏡密度マップ

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つた。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。

(2) TLR 全長-UNC93B1 複合体の構造解析

核酸認識 TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 は自己由来の核酸への誤った反応を避けるために、エンドソームなどの細胞内小器官に局在する必要がある。UNC93B1 は 12 回膜貫通型のタンパク質でこの核酸認識 TLR のエンドソームへの移行に必須であることが示されている。UNC93B1 による核酸認識 TLR の細胞内局在の制御を構造科学的に明らかにするために、TLR-UNC93B1 複合体の構造解析に着手した。核酸認識 TLR のうち、TLR3 および TLR7 と UNC93B1 の複合体を expi293 細胞で共発現させ、可溶化後高純度精製した。得られた TLR3-UNC93B1 および TLR7-UNC93B1 複合体試料に関してクライオ電子顕微鏡 Titan Krios を用いてそれぞれ約 4,000 枚および約 9,000 枚の画像を取得し解析を進め、最終的に分解能 3.3 Å および 4.2 Å の三次元密度マップを得ることに成功した。

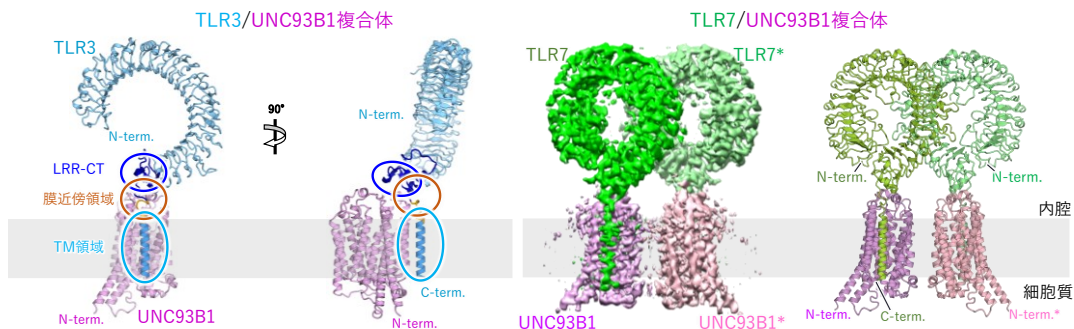


図2. TLR3-UNC93B1 複合体 (左) および TLR7-UNC93B1 複合体 (右) の構造

構造解析の結果、TLR3 と Unc93b1 は 1:1 の複合体を形成していた。密度マップにおいて、TLR3 の細胞外の LRR ドメインと膜貫通ヘリックスの密度はよく解像していたが、細胞内の TIR ドメインの密度は観察できず、TIR ドメインは一定の配向を取っていないことが示唆された。UNC93B1 の 12 本の膜貫通ヘリックスの密度は明瞭に確認された。TLR3 と UNC93B1 は主に TM 領域、内腔側の膜近傍領域、TLR3 の LRR ドメインの C 末端側の 3 つの領域で相互作用していた。相互作用に関与する残基の変異体で TLR3 と UNC93B1 の結合が減弱することを確認した。TLR7 は、UNC93B1 と 2:2 の複合体を形成していた。2:2 複合体中で、TLR7 と UNC93B1 の間の相互作用の様式は TLR3 と共通しており、LRR 部分での TLR7 同士の相互作用が確認された。TLR3 および TLR7 と UNC93B1 の結合領域の配列を他の TLR と比較することで、核酸認識 TLR が特異的に UNC93B1 と結合する構造的特徴に関して考察した。得られた TLR3 または TLR7 と UNC93B1 複合体をすでに構造解析されているリガンドによって誘導された活性化型の TLR の細胞外ドメインの二量体に重ね合わせると二分子の UNC93B1 同士が衝突することから、これらの TLR が活性化するには UNC93B1 が TLR から解離するか大きなコンフォメーション変化が生じることが示唆された。

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 Ishida Hanako, Asami Jinta, Zhang Zhikuan, Nishizawa Tomohiro, Shigematsu Hideki, Ohto Umeharu, Shimizu Toshiyuki	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 Structural & Molecular Biology	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 Tojo Shingo, Zhang Zhikuan, Matsui Hiroyuki, Tahara Masahiro, Ikeguchi Mitsunori, Kochi Mami, Kamada Mami, Shigematsu Hideki, Tsutsumi Akihisa, Adachi Naruhiko, Shibata Takuma, Yamamoto Masaki, Kikkawa Masahide, Senda Toshiya, Isobe Yoshiaki, Ohto Umeharu, Shimizu Toshiyuki	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 Communications	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 Koutsogiannaki Sophia, Bu Weiming, Hou Lifei, Shibamura Fujiogi Miho, Ishida Hanako, Ohto Umeharu, Eckenhoff Roderic G., Yuki Koichi	4. 巻 34
2. 論文標題 The effect of anesthetics on toll like receptor 9	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 14645 ~ 14654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202000791RR	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 Sakurai Shunya, Shimizu Toshiyuki, Ohto Umeharu	4. 巻 76
2. 論文標題 Crystal structure of the FYC01 RUN domain suggests possible interfaces with small GTPases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications	6. 最初と最後の頁 326 ~ 333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2053230X20009012	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 Masutani Mamiko, Sakurai Shunya, Shimizu Toshiyuki, Ohto Umeharu	4. 巻 594
2. 論文標題 Crystal structure of TEX101, a glycoprotein essential for male fertility, reveals the presence of tandemly arranged Ly6/uPAR domains	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 3020 ~ 3031
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13875	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 Shuangshuang, Tanji Hiromi, Yin Kejun, Zhang Shuting, Sakaniwa Kentaro, Huang Jian, Yang Yi, Li Jing, Ohto Umeharu, Shimizu Toshiyuki, Yin Hang	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 Journal of Medicinal Chemistry	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 Ohto Umeharu, Kamitsukasa Yukie, Ishida Hanako, Zhang Zhikuan, Murakami Karin, Hiramachi Chie, Maekawa Sakiko, Shimizu Toshiyuki	4. 巻 119
2. 論文標題 Structural basis for the oligomerization-mediated regulation of NLRP3 inflammasome activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2121353119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2121353119	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 Kamitsukasa Yukie, Nakano Kenji, Murakami Karin, Hirata Kunio, Yamamoto Masaki, Shimizu Toshiyuki, Ohto Umeharu	4. 巻 596
2. 論文標題 The structure of NLRP9 reveals a unique C terminal region with putative regulatory function	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 876 ~ 885
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14302	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 Yi, Csakai Adam, Jiang Shuangshuang, Smith Christina, Tanji Hiromi, Huang Jian, Jones Torey, Sakaniwa Kentaro, Broadwell Lindsey, Shi Chengrui, Soti Subada, Ohto Umeharu, Fang Yaohui, Shen Shu, Deng Fei, Shimizu Toshiyuki, Yin Hang	4. 巻 12
2. 論文標題 Tetrasubstituted imidazoles as incognito Toll-like receptor 8?anta)gonists	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Zhang Zhikuan, Shigematsu Hideki, Shimizu Toshiyuki, Ohto Umeharu	4. 巻 29
2. 論文標題 Improving particle quality in cryo-EM analysis using a PEGylation method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 1192 ~ 1199.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2021.05.004	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6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 石田英子、浅見仁太、大戸梅治、清水敏之
2. 発表標題 UNC93B1による核酸認識TLRの輸送機構の構造基盤
3. 学会等名 日本薬学会第141年会 (広島) オンライン
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大戸梅治
2. 発表標題 一回膜貫通型Toll様受容体のリガンド認識とシグナル伝達機構の構造基盤
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会 第71回日本細胞生物学会 合同年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大戸梅治
2. 発表標題 ZOO systemを用いた自動回折データ収集の実際
3. 学会等名 第11回SPring-8ユーザー共同体 (SPRUC)放射光構造生物学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅見仁太, 木村香菜子, 藤田陽子, 石田英子, 張志寛, 野村弥生, 劉紅, 植村智子, 佐藤有美, 小野真嗣, 山本雅貴, 野田岳志, 重松秀樹, Drew David, 岩田想, 清水敏之, 野村紀通, 大戸梅治
2. 発表標題 B型肝炎ウイルス受容体NTCPの構造解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会 (名古屋) オンライン
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上司ゆき恵, 仲野賢治, 村上果林, 平田邦生, 山本雅貴, 清水敏之, 大戸梅治
2. 発表標題 自然免疫受容体NLRP9の構造生物学的研究
3. 学会等名 日本薬学会第142年会 (名古屋) オンライン
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂庭賢太郎, 柴田琢磨, 重松秀樹, 山本雅貴, 三宅健介, 大戸梅治, 清水敏之
2. 発表標題 TLR3は効率的なシグナル伝達のためにdsRNA上で多量体を形成する
3. 学会等名 日本薬学会第142年会 (名古屋) オンライン
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ
<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~kouzou/index.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			
中国	Tsinghua University			