

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16274

研究課題名（和文）UNC93B1によるTLRの細胞内局在に関する構造生物学的研究

研究課題名（英文）Structural biology of subcellular localization of TLRs by UNC93B1

研究代表者

石田 英子（Ishida, Hanako）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・特任研究員

研究者番号：70563295

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：自然免疫受容体であるTLRの活性化機構を解明するために、UNC93B1と各種TLR（TLR3、TLR5、TLR7、TLR8、TLR9）の複合体を調製し、クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析を行った。TLR3とTLR7に関して、UNC93B1との複合体の構造解析に成功した。TLR3とTLR7は同様の結合様式でUNC93B1と相互作用しており、UNC93B1のTLR活性化機構の一端が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然免疫受容体の一つであるTLRは、微生物の構成成分を認識して免疫反応を引き起こす。TLRは病原体の侵入を防ぐとともに、生体の恒常性の維持にも深く関与していることから、その活性化は時空間的に厳密に制御される必要がある。UNC93B1はTLRのリガンド刺激に応じてこれらTLRをエンドソームへと輸送し、TLRの活性化のバランスを調節するとされているが、その詳細な制御機構は不明であった。本申請課題において、UNC93B1/TLR3およびUNC93B1/TLR7の複合体の構造解析に成功し、UNC93B1によるTLRの活性化制御機構の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the activation mechanism of the TLR, we prepared complex of UNC93B1 and various TLRs (TLR3, TLR5, TLR7, TLR8, TLR9) and conducted the structural analyses by cryo-EM. We succeeded the structural determination of complexes of UNC93B1/TLR3 and UNC93B1/TLR7. This study serves to understanding the UNC93B1-dependent regulation of TLRs.

研究分野：構造生物学

キーワード：TLR受容体 UNC93B1 自然免疫 クライオ電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

TLR (Toll-like receptor) はウイルスや細菌の構成成分を認識し、自然免疫において中心的な役割を果たす。TLR は細胞内のエンドソームに局在する TLR3, 7, 8, 9 と細胞表面に局在する TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 に大別され (図 1)、前者のエンドソームへの局在には、複数回膜貫通型タンパク質の UNC93B1 が必須であることが知られている。UNC93B1 は、エンドソーム局在型の TLR と小胞体膜上で結合し、TLR のリガンド刺激に応答して、これらの TLR をエンドソームへと輸送すると考えられている。さらに、TLR の活性化のバランス調節 (TLR7 と TLR9 の活性化について、UNC93B1 の機能により通常は TLR7 応答性が抑制されており、TLR9 応答性が優勢になっている) に関与することも知られている。

TLR の細胞内局在機構の解明は TLR の活性を人為的に制御する薬剤の開発にもつながると考えられ、自己免疫疾患の治療薬の開発に貢献する可能性がある。そのためには、UNC93B1 による TLR の機能制御機構を正しく理解する必要があり、UNC93B1 と各種 TLR との複合体の構造基盤の構築が必須である。

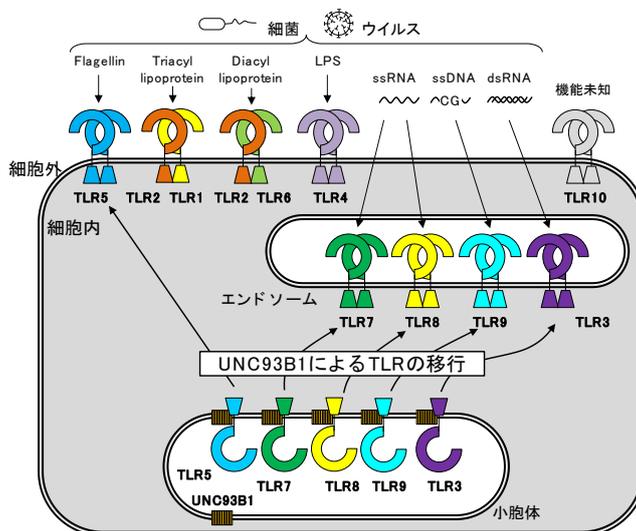


図 1. TLR のリガンドと UNC93B1 による細胞内局在の制御のモデル

2. 研究の目的

本申請課題では、UNC93B1 によって局在が制御されている TLR3, 5, 7, 8, 9 を対象とし、UNC93B1 との複合体の構造生物学的研究を目指す。TLR はいずれも一回膜貫通型のタンパク質であり、申請者の成果を含めてこれまで多くの細胞外 LRR ドメインの結晶構造が報告されているが、膜貫通ドメインおよび TIR ドメインを含む TLR 全長の詳細な構造情報は得られていない。

3. 研究の方法

本申請課題では、クライオ電子顕微鏡による UNC93B1/TLR 全長複合体の構造解析を目指した。ヒトおよびマウス由来の UNC93B1 と、UNC93B1 依存的 TLR (TLR3, 5, 7, 8, 9) との複合体のタンパク質を調製し、クライオ電顕解析に供した。また、構造解析に適した試料調製法の検討 (界面活性剤の選択、化学架橋など) を電顕解析の結果をフィードバックさせつつ行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) タンパク質試料の調製

ヒトおよびマウスの UNC93B1 と各種 TLR (TLR3、TLR5、TLR7、TLR8、TLR9) の哺乳動物細胞での発現系を構築し共発現させたところ、UNC93B1 と結合することが確認された (図 2)。クライオ電顕に適したサンプルを得るために、UNC93B1 と各種 TLR との複合体の精製検討を行った。培養条件や可溶化に用いる界面活性剤などを検討した結果、ジギトニンで可溶化し、TLR に FLAG タグを付加して抗 FLAG 抗体樹脂で精製したときに高純度かつ良好なサンプルが得られることが分かった。

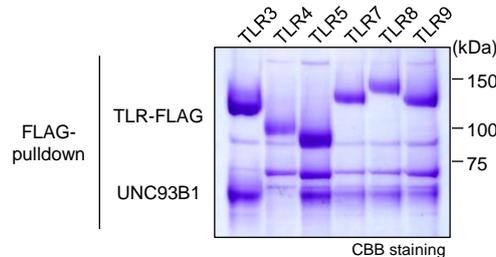


図 2. UNC93B1 と各種 TLR との共発現 (哺乳動物細胞)

##### (2) クライオ電顕による構造解析

得られた精製試料を用いてクライオ電顕解析を行った。UNC93B1 と TLR3、TLR5、TLR7、TLR8、TLR9 との複合体について、クライオ電顕解析を行った結果、UNC93B1/TLR3 複合体および UNC93B1/TLR7 複合体について、それぞれ 3.4 Å および 4.2 Å の分解能で構造解析に成功した。構造解析の結果、UNC93B1 と TLR3 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明らかになった (図 3)。TLR7 においては、ゲルろ過クロマトグラフィーの結果と一致して、UNC93B1 と TLR7 は 2 : 2 の複合体を形成していた。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 (図 4)。

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ことが知られている。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ると、TLR3 に結合した UNC93B1 同士が衝突することが分かった。したがって、今回得られた構造から、TLR3 が活性化する際には UNC93B1 が解離するという機構が考えられる。

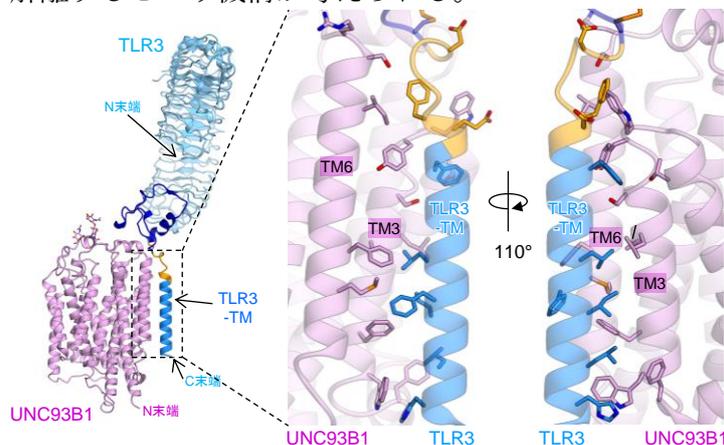


図 3. TLR3 と UNC93B1 との複合体構造

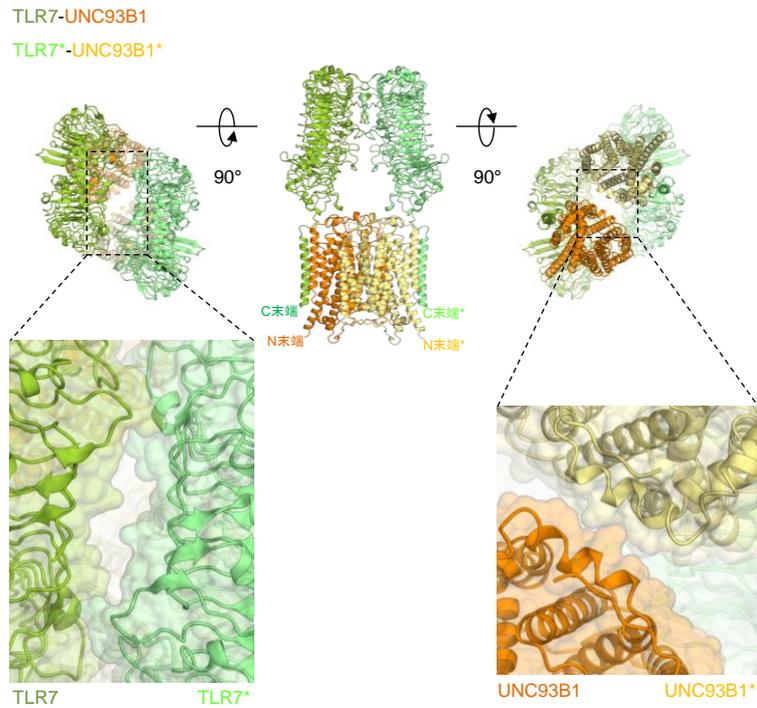


図4. TLR7とUNC93B1の複合体構造

(中央図)TLR7- UNC93B1 複合体の全体構造。二量体を構成している2つのTLR7とUNC93B1分子の一方を無印で、他方を\*を付して表記する。(左図)中央図を上から見たところ。TLR7-TLR7間の相互作用。タンパク質を半透明の表面図で表す。(右図)中央図を下から見たところ。UNC93B1-UNC93B1間の相互作用。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Ishida Hanako, Asami Jinta, Zhang Zhikuan, Nishizawa Tomohiro, Shigematsu Hideki, Ohto Umeharu, Shimizu Toshiyuki | 4. 巻<br>28              |
| 2. 論文標題<br>Cryo-EM structures of Toll-like receptors in complex with UNC93B1  | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Nature Structural & Molecular Biology   | 6. 最初と最後の頁<br>173 ~ 180 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41594-020-00542-w   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|