

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291010

研究課題名(和文) 核酸を認識するToll様受容体の構造科学的解明

研究課題名(英文) Structural studies of nucleic acid sensing Toll-like receptors

研究代表者

清水 敏之 (Shimizu, Toshiyuki)

東京大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30273858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：Toll様受容体(TLR)は細菌やウイルスなど病原体の分子パターンを認識するセンサーとして働く。TLR7/8は一本鎖RNA、TLR9はCpG配列を含む一本鎖DNAによって活性化されるが本研究はこれらのTLRに注目してその構造科学的な研究を行いリガンド認識機構や活性化機構を明らかにすることを目的とする。本研究により、TLR8は一本鎖RNAの分解産物であるウリジンおよび短鎖ssRNAによる協調的な効果により活性化されることを示した。一方TLR9は、CpG-DNAがTLR9の片方のプロトマーのN末側ともう一方のプロトマーのC末側を結び付けて二量体化していることを明らかにした。

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. Toll-like receptors (TLRs) are examples of innate immune receptors, which sense specific molecular patterns from pathogens and activate immune responses. TLR8 recognizes single stranded (ss) RNA derived from bacterial and viral DNA. We solved the crystal structure of TLR8 in complex with ssRNA and revealed that TLR8 is a uridine senso. TLR8 can be synergistically activated by uridine and oligonucleotide degraded from ssRNA. TLR9 recognizes bacterial and viral DNA containing the Cytosine-phosphate-Guanine (CpG) dideoxynucleotide motif. Here we show the crystal structure of TLR9 bound to agonistic CpG-DNA, forming a symmetric TLR9/CpG-DNA complex with 2:2 stoichiometry. CpG-DNA was recognized by both protomers in the dimer, in particular by the N-terminal fragment (LRRNT-LRR10) from one protomer and the C-terminal fragment (LRR20-LRR22) from the other.

研究分野：構造生物学

キーワード：Toll様受容体 自然免疫 X線結晶解析 一本鎖核酸

1. 研究開始当初の背景

自然免疫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おり病原微生物感染に対する重要な生体防御のシステムの一つである。Toll 様受容体(Toll like receptor: TLR)は細菌やウイルスなど病原体の分子パターンを認識するセンサーとして働き、細胞内のシグナル系を活性化させ自然免疫応答を引き起こす。ヒトでは 10 種類あると考えられており、それぞれが異なる分子を認識すると考えられている。

TLR は I 型膜貫通受容体であり、3つのドメインから構成されている。細胞外ドメインはロイシンリッチリピート(LRR)モチーフがタンデムに繰り返された構造をとり、全体として馬蹄形をとる。膜貫通領域は 1 回膜貫通型であり、細胞内ドメインとして Toll/Interleukin-1 receptor homology (TIR) ドメインを有する。LRR の繰り返しの数は TLR によって異なり、最も少ない TLR1, 2, 6 は 20 回、最も多い TLR7, 8, 9 は 26 回の繰り返し構造を持つ。この繰り返し構造の両端は LRRNT, LRRCT と呼ばれているモチーフでキャッピングされている。さらに TLR7, 8, 9 は Z-loop と呼ばれる 40 残基程度のループが LRR14 と LRR15 の間に挿入され、このループの切断が活性化には必要である。

TLR7, 8, 9 はその配列相同性からサブファミリーを構成しいずれもエンドソームに存在する。TLR7 および TLR8 はウイルスや細菌に由来する一本鎖 RNA を認識するが興味深いことに TLR7, 8 は分子量 200~300 程度の化学合成リガンドによっても活性化される。この化学合成リガンドは一本鎖 RNA の塩基部分と類似しているが、RNA 鎖という観点

で考えた場合化学合成リガンドとは化学的性質も構造的にも大きく異なる。このことは大きな謎であり、構造科学的な研究が望まれていた。一方、TLR9 はウイルスや細菌に由来する CpG モチーフをもつ一本鎖 DNA を認識して活性化することが知られている。さらに TLR9 に対し阻害的に働くアンタゴニスト活性をもつ DNA(iDNA)も知られている。これまで TLR9 によるこれらの DNA の認識機構は不明のままであった。

2. 研究の目的

TLR8 が性質の大きく異なるリガンドで同様に活性化されるのか、TLR9 はリガンドである DNA をどのように認識しているかを解明するためには構造科学的な研究が不可欠である。そこで我々は TLR8, TLR9 の構造科学的研究に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) タンパク質の発現・精製・結晶化

ヒト由来の TLR8 およびウサギ由来の TLR9 を研究対象に選び S2 細胞を用いた大量発現系、精製系を検討した。両者とも細胞外ドメインの全長を発現させた。大量発現に成功し複数のカラムクロマトグラフィーを用いて精製を行った。

結晶化を行うには溶液の温度、pH、沈殿剤の濃度や種類など広範囲に渡る条件を検討する必要がある。このため研究科にすでに設置してある結晶化ロボットを用いて迅速に条件を検索した。

(2) 構造決定

TLR8

我々は、一本鎖 RNA 結合型 TLR8 (3 種)、

およびウリジン結合型 TLR8 の結晶構造を明らかにすることに成功した。結晶からの回折像の測定には、大型放射光施設 SPring-8 および高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory の強力な X 線を使用し、1.9~2.6 Å という高い分解能での構造決定に成功した。

TLR9

得られたタンパク質を結晶化し、最終的に、DNA 配列が結合していない TLR9、CpG モチーフを有する DNA 配列が結合した TLR9、その機能を阻害する DNA 配列（アンタゴニスト DNA 配列）が結合した TLR9、の 3 つの状態の結晶構造を明らかにした。結晶からの回折データの取得には、大型放射光施設 SPring-8 および高エネルギー加速器研究機構 フォトンファクトリーの強力な X 線を使用して、1.6~2.8 Å という高い分解能での構造決定を実現した。

4. 研究成果

(1) TLR8 と一本鎖 RNA との複合体構造

TLR8 はどのように天然基質である一本鎖 RNA を認識しているのでしょうか？このことは TLR8 と低分子化合物との複合体を解析しても大きな謎として残った。両者は塩基部分は類似しているが、全体としては化学的にも構造的にも大きく異なる。しかも化学合成リガンドが結合していた基質ポケットは RNA の塩基部分を収容するほどの大きさしかない。我々はこれらの謎を解明するため、TLR8/一本鎖 RNA 複合体の結晶構造を明らかにした。

結晶化にはアゴニスト活性をもつ 20 塩基の一本鎖 RNA を用いたが、構造中にはこれに相当する電子密度は観測されなかった。その代り、その分解産物であるウリジン（モノヌクレオシド）と オリゴヌクレオチドがそれぞれ別々の部位（第一結合部位、第二結合部位）に結合していた（図 1）。第一結合部位は化学合成リガンドの結合部位に相当し、2 量体界面に存在していた。第

二結合部位は今回の研究で新たに見つかった結合部位で TLR8 の LRR 構造の内側と Z-loop とにはさまれた部位であり、2 量体界面から離れた場所に存在していた。ウリジンの認識に関しては化学合成リガンドの認識機構と共通するところが多い。しかしながらウリジンには短鎖の疎水性置換基は存在しないため、第一結合部位の疎水性ポケットは空いたままである。一方、第二結合部位はジヌクレオチド UG が結合しておりいくつかの特徴的な相互作用が観察されたが、その認識は厳密ではないことが考えられた。

一本鎖 RNA 結合型 TLR8

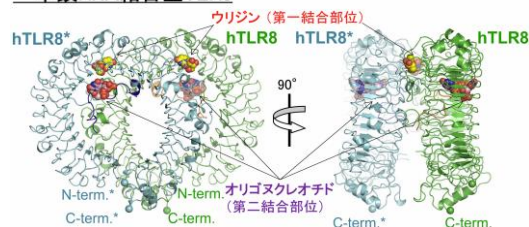


図1: 一本鎖 RNA 結合型 TLR8 の全体構造

2 量体を構成している TLR8 分子の一方を緑色、他方を青色で示している。リガンド結合部位は赤文字で示した第一結合部位、および紫文字で示した第二結合部位の二箇所であり、それぞれウリジンおよびオリゴヌクレオチドが結合していた。

(2) TLR8 はウリジンセンサーである

今回得られた結果は TLR8 がウリジンの特異的に認識することを強く示唆する。そこで我々は TLR8 と各種のリガンドとのあいだの親和性を等温滴定カロリーメトリーにより直接的に測定した。モノヌクレオシド（ウリジン、シチジン、チミジン、グアノシン、アデノシン）および UMP (5'-UMP, 3'-UMP) を用いたところ、ウリジンがもっとも強く TLR8 と結合し他の化合物は結合力が弱く解離定数を求めることができなかった。しかしウリジンの解離定数も 55 μM であり、化学合成リガンドとの結合

(0.2 μ M) と比べると弱かった。しかしながら、一本鎖 RNA の存在のもとでは解離定数は 1.0 μ M まで上昇し、合成低分子リガンドとほぼ同等の親和性がみられた。これは、ウリジンと一本鎖 RNA とのあいだに協調的な効果の存在することを意味する。NF- κ B レポーター遺伝子アッセイによる結果もこの結果と一致した。つまり、ウリジンと一本鎖 RNA との共刺激でのみ、TLR8 は活性化されたのである。以上のことから、TLR8 は一本鎖 RNA の助けは必要であるがウリジンセンサーであるといえた。

以上の結果は最初に述べた謎を解くものである。TLR8 の天然リガンドは一本鎖 RNA ではなく、一本鎖 RNA およびその分解産物であるウリジンであったのである。ウリジンであれば化学合成リガンドと化学的性質も構造も類似しており、両者が同様に TLR8 を活性化できるのは不思議ではない。またウリジンは RNA にしか含まれていない。化学合成リガンドは結合力が強いために単独で TLR8 を活性化できるのに対し、ウリジンは第二結合部位に結合する一本鎖 RNA の助けを必要とするのである。

一般的に TLR の活性化機構は次のように考えられている。①リガンド非結合型では単量体で存在している②細胞外ドメインにリガンドが結合し二量体化する③これに伴い細胞内ドメインの TIR も二量体化することによって関連した細胞内因子がリクルートされ、シグナルが伝えられる(図2)。一方、TLR7-9 は Z-loop 切断前は単量体であるが、切断された後はリガンドが結合していない状態でも二量体を形成していると考えられている。リガンド結合によって二量体が再構成され TIR ドメインが接近できるようになり活性型となる。ただし一本鎖 RNA の場合は RNA が分解されてウリジンが産生されることが必要である(図2)。

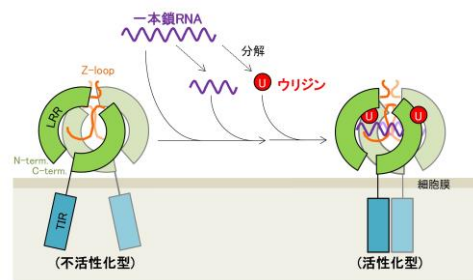


図2：一本鎖 RNA による TLR8 の活性化機構

一本鎖 RNA による TLR8 の活性化機構のモデル図。一本鎖 RNA の分解産物であるウリジンは第一結合部位に、一本鎖 RNA やその分解産物であるオリゴヌクレオチドは第二結合部位にそれぞれ結合し、協調的に TLR8 を活性化する。

(3) TLR9 と一本鎖 DNA との複合体構造

TLR9 は CpG 配列を含む一本鎖 DNA を天然基質とする TLR であるがその立体構造解析にも成功した。CpG 配列の塩基の部分は、構造解析の結果、TLR9 と微生物由来の CpG モチーフは 2 対 2 の比率で複合体を形成しており、TLR9 は 2 分子が結合して (2 量体構造) 活性化型の m 字型の構造を形成していた (図3上)。また、CpG モチーフは TLR9 の N 末端側の LRRNT, LRR1, LRR2 により構成される溝にはまり込んでその周辺のアミノ酸残基と特徴的な相互作用を形成していた。さらに CpG モチーフは伸びた形で 2 分子の TLR9 に挟まれることで TLR9 の 2 量体を安定化させていた。その結果、TLR9 の 2 量体の C 末端側同士が接近することで、細胞外から細胞内へと微生物が侵入してきたという情報を伝えていることが分かった。一方で、TLR9 とアンタゴニスト DNA は 1 対 1 の比率で複合体を形成していた (図3下)。アンタゴニスト DNA は CpGDNA とは異なる場所で、TLR9 の馬蹄型構造の内側にコンパクトなループ構造を作って結合していた。結合定数を求めたところ、アンタゴニ

スト DNA は微生物由来の CpG モチーフよりも強く結合していることがわかった。アンタゴニスト DNA と CpG-DNA の TLR9 上における結合部位は一部重なっていることから、アンタゴニスト DNA は微生物由来の CpG モチーフの結合を物理的に阻害することによって、TLR9 の機能を阻害していることが分かりました。一本鎖 RNA を認識する TLR8 とは非常に構造が類似しているが認識部位・認識様式は全く異なっていた。

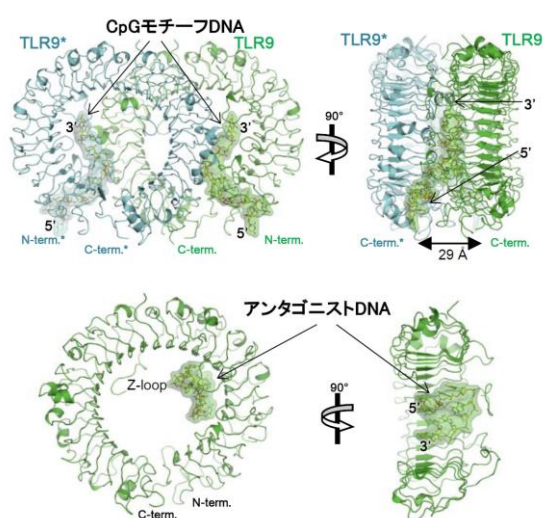


図 3 : TLR9 の結合様式

(上図) CpG モチーフを有する DNA 配列と TLR9 との結合様式。

(下図) アンタゴニスト DNA 配列と TLR9 との結合様式。

2 量体を形成する TLR9 分子の一方を緑色で、他方を青色で示している。CpG モチーフは伸びた構造で、TLR9 の 2 量体に 2 ヶ所で結合している (2 対 2 複合体)。アンタゴニスト DNA は TLR9 の馬蹄型構造の内側にループ構造を作り結合している (1 対 1 複合体)

(4) 構造情報の医薬への応用

自然免疫の中で重要な位置を占める TLR をターゲットにした創薬は活発に行われ、特に化学合成リガンドの一つであるイミキモド (TLR7 作働薬) は既に認可さ

れ臨床で使用されている。ここで得られた構造情報は医薬にどのように生かすことができるだろうか? 構造情報は化合物設計に有用であり、一度基本となる構造が解析されるとその後の合成展開の見通しが格段に良くなる。その一例を示す。フラン環をもつ三環性のフロキノリン系の化合物も TLR8 を活性化することができるが、複合体解析をしたところフラン環部分は認識されていないことがわかった。そこでフラン環を除いた二環性化合物を合成したところほぼ同等の活性を示したのである。もちろんこの化合物がすぐに医薬へ応用されるわけではないが、合成展開研究の幅が広がったと言える。今回の構造研究ではじめて明らかにされた TLR8 の第二結合部位を応用した化合物の設計も十分に考えられる。

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 5 件)

1. Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9 (2015)
Ohto, U., Shibata, T., Tanji, H., Ishida, H., Krayukhina, E., Uchiyama, S., Miyake, K., and Shimizu, T.
Nature **520**, 702-705
2. Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA (2015)
Tanji, H., Ohto, U., Shibata, T., Taoka, M., Yamauchi, Y., Isobe, T., Miyake, K., and Shimizu, T.
Nature Struc. Mol. Biol. **22**, 109-115
3. DNase II-dependent DNA digestion is required for DNA sensing by TLR9 (2015)
Chan, M.P., Onji, M., Fukui, R., Kawane, K., Shibata, T., Saitoh, S., Ohto, U., Shimizu, T., Barber, G. and Miyake, K.

Nature comm. **6**, 5853

4. Structure-Based Design of Human

TLR8-Specific Agonists with Augmented

Potency and Adjuvanticity (2015).

Beesu M, Caruso G, Salyer AC, Khetani KK,

Sil D, Weerasinghe M, Tanji H, Ohto U,

Shimizu T, David SA.

J Med Chem. **58**, 7833-7849

5. Structure-Based Design of Novel Human

Toll-like Receptor 8 Agonists (2014)

Kokatla HP, Sil D, Tanji H, Ohto U, Malladi

SS, Fox LM, Shimizu T, David SA.

ChemMedChem. **9**, 719-723

[学会発表] (計 5 件)

1. 自然免疫における一本鎖核酸認識受容体の構造解明およびその応用

日本薬学会第 135 年会 (2015)

清水敏之

2. Structural study of TLR8 sensing single stranded RNA in innate immune system

JST CREST-PRESTO 合同国際シンポジウム (2015) Toshiyuki Shimizu

3. Structural studies of single-stranded RNA receptor TLR8

Toll meeting 2015

Hiromi Tanji, Umeharu Ohto, Takuma Shibaga,

Kensuke Miyake, Toshiyuki Shimizu

4. Structural study of TLR8 sensing single stranded RNA in innate immune system

The Cold Spring Harbor Asia conference (2014)

Toshiyuki Shimizu

5. Structural study of TLR8 sensing single stranded RNA in innate immune system

APPA Conference (2014)

Toshiyuki Shimizu

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~kouzou/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 敏之 (SHIMIZU, Toshiyuki)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号 : 30273858

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :