

令和元年6月17日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02494

研究課題名(和文) 自然免疫に関わる分子群の構造基盤の構築

研究課題名(英文) Structural basis of proteins related with innate immunity

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) 33,300,000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。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ヶ所あり別々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

キーワード：自然免疫 X線結晶構造解析 Nod様受容体 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。自然免疫システムのもう一つ重要な点は獲得免疫の誘導である。生物学的な重要性故に近年ノーベル生理学賞が自然免疫システムの研究者に授与されたことは記憶に新しい。

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と考えられている。自然免疫における病原体センサーとしては、細胞質局在型の Nod 様受容体(NLR ; Nod-like receptor) と膜結合型の Toll 様受容体 (TLR ; Toll-like receptor)に大別される(他に RLR, CLR など)。NLR は機能ドメイン、重合ドメイン、リガンドを認識するドメイン(Leucine Rich repeat (LRR) ドメイン)から構成される。機能ドメインとしては CARD をもつ NLRC と Pyrin ドメインをもつ NLRP が存在していることが知られており、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。

NLR はヒトでは約 20 種類ほど (TLR は 10 種類) 存在すると考えられている。NOD1, NOD2 は NLR の中で最初に同定されたタンパク質である。両者はペプチドグリカンの構成成分 (iE-DAP や MDP) を認識し、下流の因子である RICK キナーゼを活性化、さらに IKK 複合体の活性化を通して NF- $\kappa$ B を活性化する。炎症は病原体の排除に重要な免疫反応であるが、過剰あるいは慢性化した炎症は自己免疫疾患などさまざまな疾病の原因になる。そのため生体において炎症は厳密に制御されており、制御法の一つが mRNA の安定性や翻訳を制御する転写後制御である。Roquin は mRNA の 3'側非翻訳領域に存在するステムループ構造と結合し、脱アデニル化酵素複合体である CCR4-NOT 複合体をリクルートすることによりこれらを分解する(図 1)。

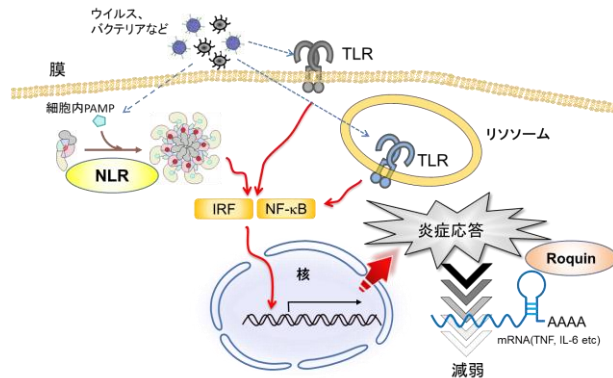


図 1 本研究における自然免疫応答

### 2. 研究の目的

以上の背景をふまえ本研究では NLR を中心に自然免疫に関わる分子に注目し、構造生物学的研究を展開する。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

X線結晶解析による立体構造解析には第一段階として純度の高い(95%以上)タンパク質が 10 mg 以上得ることが必要である。そのため大量発現型の構築と精製法の確立が必要不可欠である。構造科学的な研究を行うには発現領域の検討が重要である。いずれのタンパク質も構造をとらない天然変性領域や比較的長いループ領域を含んでおり、これが結晶の妨げになることが予想される。機能に直接関係しない領域は取り除いて、短縮したコンストラクトも検討する。様々なコンストラクトを作りその性状を考察する。また実験的にも安定なドメインを見出すため、プロテアーゼによる限定分解も行う。

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。このため結晶化ロボットを用いて迅速に条件を検索する。結晶化には単分散である

ことが有利であることが知られているので、溶液状態を SEC-SAXS などの手法を用いて有利な条件を検索する。データ収集に適した単結晶が得られ次第、結晶解析の予備的な実験および X 線回折強度データの収集を行う。SPring8 (播磨)、Photon Factory (つくば) などのシンクロトロン放射光も比較的多く使用できる状況にありこの段階はスムーズに進むことが期待される。

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) NOD2 の構造解析

Nod-like receptor (NLR)は病原体由来分子のパターンを認識し、炎症応答を引き起こす細胞内受容体である。NLR の一員である NOD2 は細菌由来の muramyl dipeptide (MDP)を認識し下流にシグナルを伝え、自然免疫応答を引き起こす。NOD2 は N 末端の CARD ドメイン、中央の nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)ドメイン、C 末端の leucine-rich repeat (LRR)ドメインから構成されており、さらに NOD ドメインは NBD、HD1、WHD、HD2 ドメインで構成される (図 2)。NOD2 は NOD ドメインを介して重合化することで活性化体として働くと考えられているが詳細は明らかでない。NOD2 には多くの一塩基多型 (SNPs)が存在し、クローン病やブ라우症候群などの自己免疫疾患に関係しているといわれている。本研究では NOD2 の結晶構造解析を行い、NOD2 の自己不活性化機構を明らかにした。さらに、得られた立体構造情報に基づいて、NOD2 のリガンド認識機構、SNPs と疾患との関連について考察した。

NOD2 は典型的な NOD ドメインと、LRR ドメインで構成されたフック型構造をとっており、NOD ドメインの中央に ADP が結合した不活性化型構造をとっていた (図 2)。ADP は NBD、HD1、WHD ドメインと相互作用しており、NOD ドメイン内の相互作用を媒介する役割を果たしていた (図 3 左)。NOD ドメインの内の相互作用

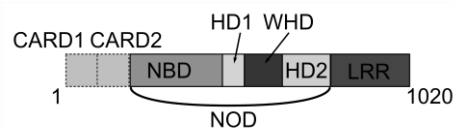


図 2 *Oc*NOD2 のドメイン構成

では、NBD と WHD ドメインや、NBD と HD2 ドメインが NOD2 の不活性化維持に重要な特徴的な相互作用をしていた (図 3 右)。実際に先行研究や、NF- $\kappa$ B レポーターアッセイの結果からこれらの相互作用に関わる残基の重要性が示されている。LRR ドメインは HD1、HD2 ドメインにおいて NOD ドメインと相互作用していた (図 3 中央)。

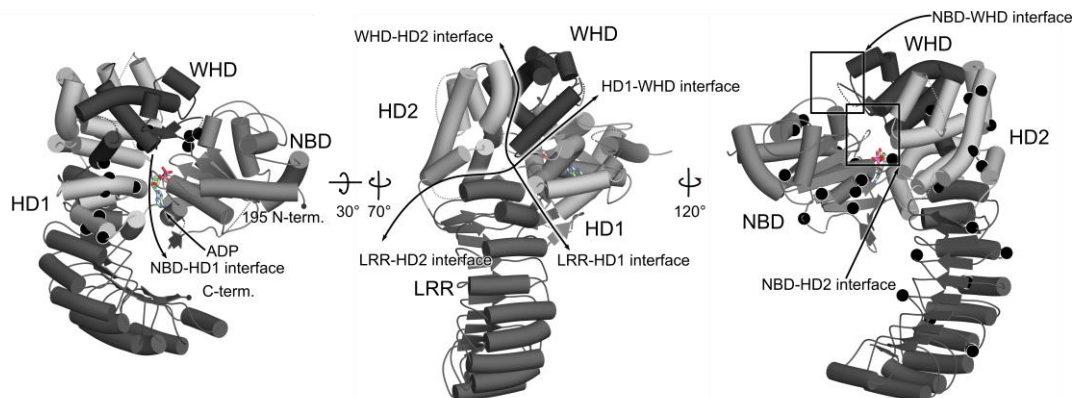


図 3 NOD2 の全体構造

(左) BS、EOS の関連変異残基を黒の球でマッピングした。(右) CD、UC 関連変異残基を黒の球でマッピングした。

NOD2 の LRR ドメインは、リガンドセンサーといわれている。構造解析の結果、LRR ドメインの凹面に疎水性のポケットが存在した (図 4)。このポケットの構成残基には、リガンド認識に関与すると報告された残基も含まれていた。また、NF- $\kappa$ B レポーターアッセイの結果、ポケット構成残基の変異体の多くが、MDP による刺激に対して応答しなくなった。このことは、このポケットが MDP の結合ポケットであることを強く示唆している。ブラウ症候群 (BS) や若年性サルコイドーシス (EOS) の原因となる NOD2 の恒常活性化を引き起こす SNPs の多くが、ADP 結合部位や NOD ドメイン内の相互作用面に集中していた (図 3 左)。これらの変異が NOD ドメイン内の相互作用を阻害し、不活性化型の構造を不安定にしていると予想できる。

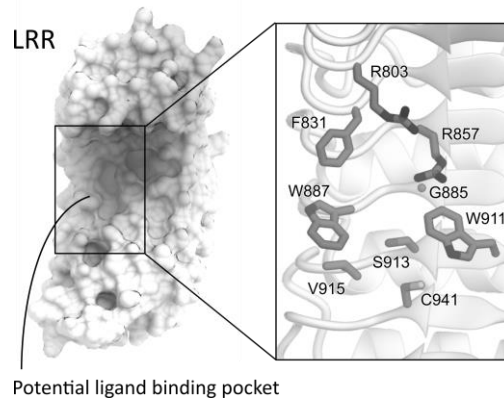


図 4 推定リガンド結合ポケット

### (2) TLR7 ファミリーの構造科学的研究

TLR7 ファミリー (TLR7, TLR8, TLR9) すべての細胞外ドメインと各リガンドとの複合体構造解析に成功し、リガンド結合部位を同定するとともに原子レベルでのリガンド認識機構を解明した。TLR7 ファミリーはアミノ酸相同性が高いことを反映して立体構造も類似しており、さらにリガンド認識および活性化機構に関しても共通性が見られた (図 5)。いずれも 2 つのリガンド結合部位を有し、片方の部位へのリガンド結合が 2 量体形成に必須であるが、単独でのリガンド結合はそれほど強くない。もう片方の部位に別のリガンド (TLR7/8 の場合は ssRNA, TLR9 の場合は 5'-xCx DNA) が結合することによりリガンド結合能が増強され、協調的に TLR が活性化されるという機構である。興味深いことに TLR7/8 におけるヌクレオシド結合部位と TLR9 の 5'-xCx DNA 結合部位は同一であり、リガンド認識機構も共通性がある。一方、TLR7/8 における ssRNA 結合部位と TLR9 における CpG-DNA 結合部位は三者三様であり、異なる機構で認識されていた。

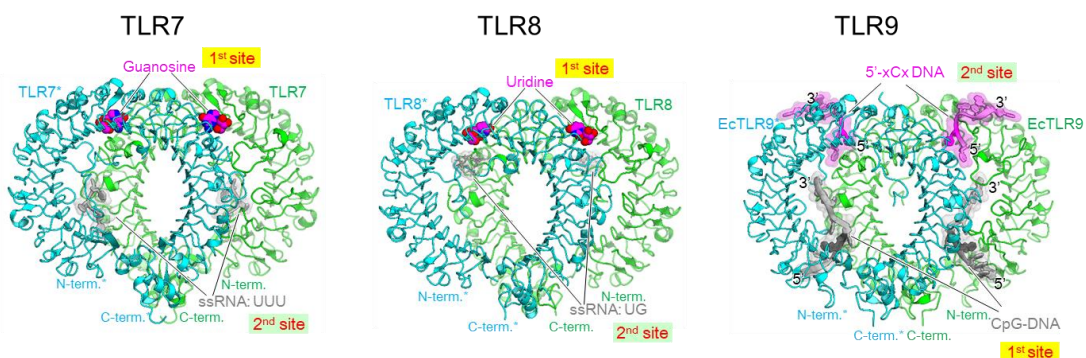


図 5 TLR7 ファミリーのリガンド結合部位の共通性、相違点

### (3) mRNA 安定性制御に関わる Roquin-2 の構造科学的研究

mRNA の細胞内レベルは多くの異なるメカニズムを通して制御され、それらは mRNA の合成や安定性、分解を制御している。転写や炎症、免疫の制御に重要なタンパク質をコードする mRNA の多くが 3' UTR (untranslated region) に CDE (constitutive decay element) と呼ばれる



ステムループモチーフを持つ。

Roquin の ROQ ドメインは CDE 中の保存されたステムループモチーフを認識し、標的 RNA に脱アデニル化酵素を含む CCR4-NOT 複合体をリクルートすることで mRNA の分解を促進し、不適切な T 細胞活性化を抑制しているが知られている。我々は Roquin 自体の構造および Roquin によるステムループモチーフの認識機構を明らかにするために構造科学的研究に取り組んだ。ヒト Roquin-2 は Ring フィンガードメイン等を含む 1191 アミノ酸からなるタンパク質であるが、今回我々は ROQ ドメインを含む領域を結晶化しその構造を決定した。興味深いことにこのドメインは DNA 結合モチーフの一つである wHTH(winged Helix-turn-Helix)をとっていた。さらに RNA との複合体構造も決定し、片側のステム領域が認識されていることや wHTH の wing 領域が RNA のループ領域を認識しているなど、詳細な認識機構を明らかにした (図 6)。

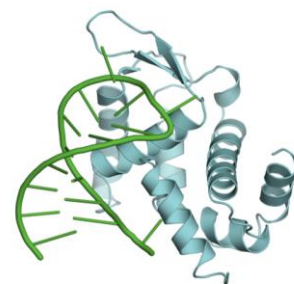


図 6 Roquin-2 と RNA との複合体構造

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

1. Structural Analyses of Toll-like Receptor 7 Reveal Detailed RNA Sequence Specificity and Recognition Mechanism of Agonistic Ligands. (2018)  
Zhang Z, Ohto U, Shibata T, Taoka M, Yamauchi Y, Sato R, Shukla NM, David SA, Isobe T, Miyake K, Shimizu T. *Cell Reports* **25**, 3371-3381.e5.
2. Small-molecule TLR8 antagonists based on structure-based rational design (2018)  
Hu, Z., Tanji, H., Jiang, S. Zhang, S., Koo, K., Chan, J., Sakaniwa, K., Ohto U, Candia, A., Shimizu T, Yin H *Cell Chem. Biol.* **25**, 1286-1291
3. Structural basis for species-specific activation of mouse Toll-like receptor 9 (2018).  
Ishida H, Ohto U, Shibata T, Miyake K, Shimizu T. *FEBS Lett.* **592**, 2636-2646
4. Toll-like Receptor 9 Contains Two DNA Binding Sites that Function Cooperatively to Promote Receptor Dimerization and Activation. (2018)  
Ohto U, Ishida H, Shibata T, Sato R, Miyake K, Shimizu T. *Immunity* **48**, 649-658
5. Mechanisms controlling nucleic acid-sensing Toll-like receptors (2018)  
Miyake K, Shibata T, Ohto U, Shimizu T, Saitoh SI, Fukui R, Murakami Y. *Int Immunol.* **30**, 43-51
6. Small-molecule inhibition of TLR8 through stabilization of its resting state (2018)  
Zhang S, Hu Z, Hiromi Tanji H, Jiang S, Das N, Jing Li, Sakaniwa K, Jin J, Bian Y, Ohto U, Shimizu T, Yin H *Nature Chem. Biol.* **14**, 58-64
7. Towards a structural understanding of nucleic acid-sensing Toll-like receptors in the innate immune system (2017) Zhang Z, Ohto U, Shimizu T *FEBS letters* **591**, 3167-3181
8. Structural insights into ligand recognition and regulation of nucleic acid-sensing Toll-like receptors (2017) Shimizu T *Curr. Opi. Struc. Biol.* **47**, 52-59
9. Emerging roles of the processing of nucleic acids and Toll-like receptors in innate immune responses to nucleic acids (2017)  
Miyake K, Shibata T, Ohto U, Shimizu T *J. Leukocyte Biol* **101**, 135-142
10. Crystal structure of human DEAH-box RNA helicase 15 reveals a domain organization of the mammalian DEAH/RHA family (2017)

Murakami K, Nakano K, Shimizu T and Ohto U *Acta Crystallogr.* **F73**, 347-355.

11. Structural basis for activation of Toll-like receptor 7, a dual receptor for guanosine and single-stranded RNA (2016)

Zhang, Z., Ohto, U., Shibata, T., Krayukhina, E., Taoka, M., Yamauchi, Y., Tanji, H., Isobe, T., Uchiyama, S., Miyake, K., and Shimizu, T. *Immunity* **45**, 737-748

12. Crystal structure of NOD2 and its implications in human disease (2016)

Maekawa S, Ohto U, Shibata, T, Miyake, K, Shimizu T *Nature comm.* **7**, 11813

13. Identification of a Human Toll-Like Receptor (TLR) 8-Specific Agonist and a Functional Pan-TLR Inhibitor in 2-Aminoimidazoles (2016)

Beesu M, Caruso G, Salyer AC, Shukla NM, Khetani KK, Smith LJ, Fox LM, Tanji H, Ohto U, Shimizu T, David SA. *J. Med. Chem.* **59**, 3311-3330

14. Structural aspects of nucleic acid-sensing Toll-like receptors (2016)

Ohto, U. and Shimizu, T. *Biophysical Reviews* **8**, 33-43

15. Autoinhibition and relief mechanism by the proteolytic processing of Toll-like receptor 8 (2016)

Tanji, H., Ohto, U., Motoi, Y., Shibata, T., Miyake, K., Shimizu, T.

*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **113**, 3012-3017

16. Guanosine and its modified derivatives are endogenous ligands for TLR7 (2016)

Shibata T, Ohto U, Nomura S, Kibata K, Motoi Y, Zhang Y, Murakami Y, Fukui R, Ishimoto T, Sano S, Ito T, Shimizu T, Miyake K. *Int Immunol.* **28**, 211-222

[学会発表] (計 8 件)

1. Toshiyuki Shimizu, Structural study of ssRNA sensing TLRs in innate immune system, 24th Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, 2017

2. Toshiyuki Shimizu, Structural studies of TLRs sensing single stranded RNA in innate immune system, Keystone symposium (Viral immunity), 2017

3. Toshiyuki Shimizu, Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9, 14th Conference of the Asian Crystallographic Association, 2016

4. Toshiyuki Shimizu, Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9 12th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, 2016

5. 清水敏之、病原体感染を感知する Toll 様受容体の構造基盤  
日本薬学会 第 138 年会 (金沢), 2018

6. 清水敏之、構造解析から見た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、ゲノム創薬・医療フォーラム 2018

7. 清水敏之、一本鎖 RNA を認識する Toll 様受容体の 構造生物学的研究、DSSB シンポジウム、2017

8. 清水敏之、Structural study of TLRs sensing single stranded RNA in innate immune system, 第 4 2 回内藤カンファレンス, 2016

[その他]

ホームページ等 <http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~kouzou/>

## 6. 研究組織

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。