

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790030  
 研究課題名（和文） 自然免疫系における TLR4 のリガンド認識機構の構造生物学的研究  
 研究課題名（英文） Structural basis for ligand recognition of TLR4  
 研究代表者  
 藤間 祥子（TOMA SACHIKO）  
 東京大学・大学院薬学研究科・助教  
 研究者番号：40363535

## 研究成果の概要：

本申請課題では自然免疫応答において病原体認識分子として働く Toll 様受容体〔TLR〕の 1 種である TLR4 細胞外ドメイン・MD-2 複合体の結晶構造解明を目的に研究を行った。昆虫細胞を用い、結晶化を可能な純度の量の複合体を調製し、結晶化を試みたが回折実験を行えるような良質の結晶は得られなかった。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	0	2,400,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：結晶構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

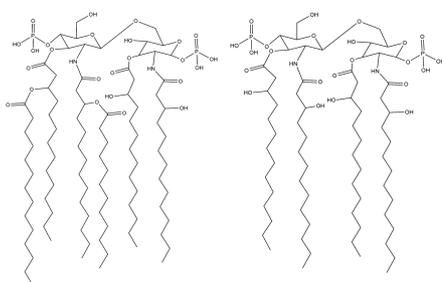
Toll 様受容体(TLR)ファミリーは、自己には存在せず病原体特有の構成成分を特異的に認識する受容体であり、自然免疫系において外来の病原体侵入感知に必要不可欠な役割を担っている。現在までに 10 種類以上の TLR が発見されている。TLR4 はグラム陰性菌の細胞外膜主要構成分子であるリポ多糖を認識する。グラム陰性菌やグラム陽性菌の生体への感染は、時に重症感染症に陥らせ、最悪の場合エンドトキシンショックと呼ばれる多臓器不全を生じさせる。エンドトキシン

ショックは致死率が高いことから、感染症治療において臨床的に大きな問題となっている。

TLR4 はリガンドである LPS を単体で直接認識することが出来ず、アクセサリ蛋白質である MD-2 を必要とする。MD-2 と TLR4 は細胞外で複合体を形成し存在し、LPS がこの複合体の MD-2 に結合することで、TLR4 の細胞膜上での多量体化が促進され、細胞内へシグナルを伝えるというモデルが提唱されている。抗エンドトキシンショック分子標的薬開発に向け、所属研究室では TLR4 の立体構造決定に向けた研究を勢力的に行っており、既に

ヒト MD-2 の立体構造決定に成功した。次段階として TLR4 細胞外ドメイン立体構造、TLR4 細胞外ドメイン・MD-2 複合体立体構造の解明へ研究を進展していた。

TLR4・MD-2 複合体が認識する LPS はコア領域、O 抗原からなる親水性多糖部分と Lipid A と呼ばれる疎水性の糖脂質からなっている。MD-2 は LPS の Lipid A と相互作用する。アンタゴニストである Lipid IVa はヒト TLR4・MD-2 複合体に結合するが TLR4 の多量体化を起さず、細胞内へシグナルが伝達されないと報告されている。Lipid A, Lipid IVa の化学構造を考えると(図), TLR4 を中心とした免疫応答では, TLR4・MD-2 複合体によるリガンド認識から TLR4 の多量体化, 細胞内へのシグナル伝達の過程におけるまで, 化学構造の厳密な区別がなされていると推測される。



Lipid A

Lipid IVa

図

TLR はその自然免疫系における役割の重要性, 医療への応用の可能性を含め, 3次元立体構造の決定が切望されていた。しかしながら, 研究開始当時には, その立体構造は 2005 年にウイルス由来 2 本鎖 RNA をリガンドとする TLR3 において決定されたのみであった。TLR3 は細胞外ドメイン単体の構造が得られたのみであり, リガンド結合部位, 結合様式については大きな謎として残っていた。TLR ファミリーの細胞外ドメインは共通してロイシンリッチリピートを持っている。そのため, 現在推測されている立体構造モデルはいずれも似たような馬蹄型の構造をとると考えられている。しかしながら, 多様なリガンド(グラム陰性菌のリポ多糖, 微生物の DNA, リポ蛋白質, ウイルス由来の二本鎖 RNA など)をいかにして識別しているかはまったく不明であった。これらの解明にはそれぞれの TLR ファミリーの立体構造の決定は必要不可欠である。

## 2. 研究の目的

本研究では X 線結晶構造解析法により TLR4 のリガンド認識機構, 免疫応答活性化機構を以下に記載した 3 つの構造から明らかにすることを目的としている。

- (1) ヒト TLR4 細胞外ドメインの立体構造決定
- (2) ヒト TLR4 細胞外ドメイン・ヒト MD-2 の複合体の立体構造決定
- (3) ヒト TLR4 細胞外ドメイン・ヒト MD-2・Lipid A アゴニスト複合体, TLR4 細胞外ドメイン・MD-2・Lipid IVa アンタゴニスト複合体の立体構造決定

本研究により得られた構造は TLR4 のリガンド認識, シグナル伝達機構の解明に多大な影響を与えると伴に, 広く TLR ファミリーにおけるリガンド認識機構の解明にも重要な知見を与えるものと考えられる。さらに, TLR4 をターゲットとした分子標的薬のさらなる開発を促進すると考える。

## 3. 研究の方法

結晶構造解析においては結晶を作成するために数 mg/ml から数十 mg/ml の濃度の解析対象蛋白質溶液を必要とする。そこで, 1 回の培養で 1mg の結晶化蛋白質を得ることを目的に蛋白質発現条件, 精製条件を検討した。

### (1) TLR4 細胞外ドメインの発現, 精製条件の検討

TLR4 細胞外ドメインは分子内でジスルフィド結合を形成し, かつ N 型糖鎖修飾を 10 箇所受ける。そのため, 昆虫細胞を用い, 細胞外に分泌発現させることとした。申請者の先行研究により Hi5 細胞を用いて, 目的蛋白質の発現を確認していた。しかしながら, 再現性良く蛋白質が分泌発現しないという問題があった。

そこで, 分泌シグナル, 分泌領域, 付加タグを検討し, 再現性の良い発現条件を検討した。

### (2) TLR4 細胞外ドメイン・MD-2 の複合体の調製

以下の 2 つの方法により結晶化サンプルを調製することとした。

酵母で発現させた MD-2 を高純度精製度, 結合させ結晶化サンプルとする。

TLR4 細胞外ドメイン・MD-2 を昆虫細胞内で共発現させ, 複合体を得る。複合体として精製し, 結晶化サンプルとする。

(3) ヒト TLR4 細胞外ドメイン・ヒト MD-2・LipidA アゴニスト複合体、TLR4 細胞外ドメイン・MD-2・LipidIVa アンタゴニスト複合体の調製

(2)の方法により調製した結晶化試料に対して、リガンドを混合し、結合させ結晶化サンプルとした。

本研究を開始約半年後、海外の研究者グループにより、マウス TLR4 細胞外ドメイン・マウス MD-2・エリトランアンタゴニスト複合体の構造が決定された。そこで、それ以降は(3)のヒト TLR4 細胞外ドメイン・ヒト MD-2・アゴニスト複合体の構造解析を第一として研究を展開した。

#### 4. 研究成果

(1) TLR4 細胞外ドメインの発現、精製条件の検討

分泌シグナルとして gp67 分泌シグナル、ヒト TLR4 由来の分泌シグナルの 2 つについて検討した。gp67 分泌シグナルを用いた場合において発現量の大幅な改善がみられた。また、C 末端に Fc タグを付加することにより、一度のカラム精製により結晶化可能な純度の目的蛋白質を融合蛋白質の状態で調製することが可能となった。その後、タグを除去しゲルろ過クロマトグラフィーを行うことにより図 2 に示すサンプルを得た。

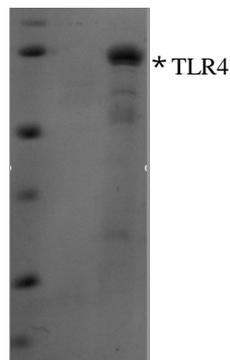


図 2

発現細胞として、Hi5, Sf-9 細胞の両方を試み常に安定な発現量を与える Sf-9 細胞が適しているという結果を得た。

(2) TLR4 細胞外ドメイン・MD-2 複合体の調製

酵母で発現させた MD-2 を高純度精製後、結合させ結晶化サンプルとする方法  
既に所属研究室において X 線結晶構造を解

析したヒト MD-2 と研究成果(1)で記した方法で得た TLR4 細胞外ドメインをモル比 2:1 で結合し、イオン交換カラムクロマトグラフィーにより非結合 MD-2 と TLR4 細胞外ドメイン・MD-2 複合体を分離した。

TLR4 細胞外ドメイン・MD-2 を昆虫細胞内で共発現させ、複合体を得る。複合体として精製し、結晶化サンプルとする。pFastBac Dual ベクターを用いて、P<sub>p10</sub>, P<sub>PH</sub> プロモーターの下流に TLR4 細胞外ドメイン、MD-2 遺伝子をそれぞれ挿入した。これを用い、共発現ウイルス液を作成した。共発現を行うことにより、約 2 倍の発現量の向上が見られた。

の方法により 1 L の培養液から 0.1 ~ 0.3 mg の複合体蛋白質を得ることができた。

(3)ヒト TLR4 細胞外ドメイン・ヒト MD-2 アゴニスト複合体の調製

アゴニストとして RaLPS, ReLPS, LipidA を用いて、調製した TLR4 細胞外ドメイン・MD-2 複合体への結合を確認した。Native PAGE 法により移動度が変化することで結合の有無を確認した。

(4)結晶化

酵母より調製した MD-2 を用いた TLR4 細胞外ドメイン・MD-2 のアゴニスト複合体の結晶化

ヒト TLR4 細胞外ドメインは N 型糖鎖修飾を 10 箇所受けるが、ヒト MD-2 もまた N 型糖鎖修飾を 2 箇所受ける。酵母で調製した糖蛋白質は糖鎖切断酵素により糖鎖の短鎖化ができる。糖鎖の短鎖化により分子間の相互作用が起こりやすくなり結晶化に好影響を与えると期待された。

市販のスクリーニングキットを用いて結晶化を試みたが、複合体結晶らしき結晶は得られなかった。

共発現により調製した TLR4 細胞外ドメイン・MD-2 を用いたアゴニスト複合体の結晶化

共発現による調製では糖鎖の短鎖化は行えないが、精製ステップが軽減でき、最終的に 2 倍以上の結晶化サンプルが調製できる。昆虫細胞での発現により付加される糖鎖は多くなく、結晶化に影響を及ぼさない可能性もまた考えられたので、共発現で調製したサンプルについても同様にスクリーニングキットを用い結晶化を行った。

数種類の条件で針状の結晶様のものが得られたが、複合体の結晶である確認はできていない。

本課題研究期間において大量発現系の改良,精製条件の検討,結晶化を行ったが,回折実験可能な良質な結晶を得るには至らなかった。

本研究期間終了2ヶ月前に海外のグループによりヒト TLR4 細胞外ドメイン・ヒト MD-2・RaLPS アンタゴニスト結合型構造が決定された。

本研究により確立した発現精製条件は,既に報告があるヒト TLR4 細胞外ドメイン・ヒト MD-2 複合体調製方法の中でも最も収量が良いという結果を得ている。今後は細胞内領域を含めた全長体の構造決定を行ってゆくことにしている。現在得られた結果から更なる改良を加え,全長体ヒト TLR4 の結晶化へ向けた発現精製法確立へ研究を進展してゆきたい。

#### 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)

なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

藤間 祥子 (TOMA SACHIKO)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号:40363535