

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770104

研究課題名(和文) TLR4・MD-2によるリガンド認識, シグナル伝達機構の構造生物学的研究

研究課題名(英文) Structure basis for ligand recognition and signal inducing mechanism involved in TLR4-MD-2 complex.

研究代表者

藤間 祥子 (TOMA-FUKAI SACHIKO)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：40363535

研究成果の概要(和文)：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 全長体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、細胞膜上での結晶化を可能な発現量の複合体を得、簡易精製までは行えたが、結晶構造解析を行うにたる高純度の複合体を調製することはできなかった。

研究成果の概要(英文)： In this project, I tried to determine the crystal structure of TLR4-MD-2 complex. TLR4, which is a membrane protein, is a member of pattern recognition proteins. TLR4-MD-2 complex recognizes LPS known as endotoxin. TLR4-MD-2 complex could be expressed on plasma membrane in sf-9 insect cell. The total expression level on the membrane was sufficient for using crystallization. However, almost all expressed TLR4-MD-2 could not be extracted from the membrane. From small scale purification experiment, 60% purity TLR4-MD-2 complex solution was obtained.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物学

キーワード：X線結晶解析

## 1. 研究開始当初の背景

動物は、自身を病原体から守るために様々なしかけを持っている。病原体特有の形(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)を認識し、病原体感染という情報を細胞内に伝え、炎症反応など免疫応答誘導や、獲得免疫の活性化を誘導する蛋白質の発現を誘導す

る。このような自然免疫応答を作動させる働きを担うのがTLRである。ヒトで10種類存在するTLRは、細胞外に馬蹄型をしたロイシンリッチリピート(LRR)ドメインを持ち、細胞内にTIRドメインを持つ1回膜貫通型の膜蛋白質である。TLRは細胞外のLRRドメインにより驚くほど多様な化学構造を持つリガンド(病原体パターン)を認識する。

リガンドに結合した TLR は、細胞外、細胞内のドメインが二量体化したシグナル誘導型構造をとると推測されている。リガンドを認識すると TLR はサイトカインやケモカイン産生誘導経路と、IFN- $\beta$  産生や IFN 誘導遺伝子の発現させる経路、のいずれか、または両方を活性化させる。活性化の経路は、アゴニスト結合型 TLR の TIR ドメインに結合するアダプター蛋白質により決定される(図1)。TLR4 については、2007 年、マウス TLR4 細胞外ドメイン・MD-2・アタゴニスト三者複合体の結晶構造が報告された。しかし、アゴニスト結合、それに伴う 2 つの TLR4・MD-2 複合体が二量体化し、細胞内へ情報を誘導する機構は未解明であり、この理解には全長の TLR4・MD-2・アゴニスト三者複合体の構造決定が必要と考え研究を行った。

TLR は 1 回膜貫通型膜蛋白質である。近年、膜蛋白質の結晶構造が次々と報告されているが、1 回膜貫通型膜蛋白質について、細胞外、細胞内を含めた全長の立体構造はこれまで世界的に 1 例の報告もない。TLR ファミリーの構造決定は国内外で精力的に行われており、2007 年、2008 年と相次いで、アゴニスト結合型の立体構造が 2 種類決定された(4,5)。これらは細胞外ドメインのみの構造である。上述したように、TLR4 は TLR ファミリーが担う 2 つの細胞情報伝達経路の両方を活性化する唯一の受容体である。本申請課題で得られる構造により、ヒト TLR4・MD-2 複合体のリガンド認識に伴う受容体活性化(2 量体化)機構、2 つの経路活性化機構の原子レベルでの理解が可能になる。これは TLR ファミリーが持つシグナル活性化機構についての理解を大きく進展させるものである。さらに、1 回膜貫通型膜蛋白質においても世界初の構造決定となり、多大な知見を与えると考えられる。

## 2. 研究の目的

本申請研究では、自然免疫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・MD-2 複合体のリガンド認識、シグナル誘導機構解明に向け以下の 3 つの構造を X 線結晶構造解析法により原子レベルでの分解能

で決定こととした。

[I] ヒト TLR4 細胞外ドメイン・MD-2・アゴニスト複合体の立体構造

[II] ヒト TLR4 全長体・MD-2 複合体の立体構造

[III] ヒト TLR4 全長体・MD-2・アゴニスト複合体の立体構造

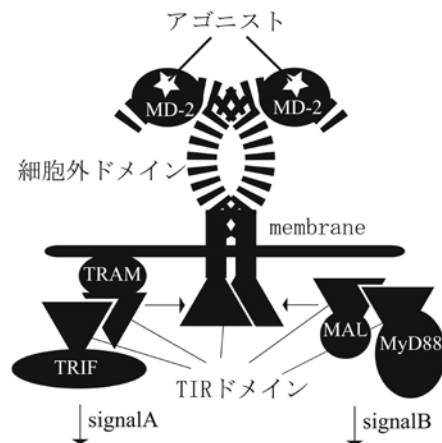


図1. TLR4・MD-2によるシグナル伝達機構

## 3. 研究の方法

### (1) 発現昆虫細胞の検討

本研究では立体構造を X 線結晶構造解析法により決定する。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。

TLR4・MD-2 複合体ではそれぞれの蛋白質が細胞外領域で分子内ジスルフィド結合を形成し、かつ N 型糖鎖修飾を受ける。そのため、糖鎖修飾可能なバキュロウイルスを用いた昆虫細胞発現系を用い、細胞膜上に分泌発現させることとした。発現昆虫細胞として、Sf-9, Sf-21, mimic Sf-9, Hi-5, 4 種類の宿主細胞を検討した。細胞膜上への効果的な発現は GFP を付加した TLR4 の細胞局在を共焦点顕微鏡像により確認した。

### (2) 精製条件の検討

昆虫細胞膜上に発現させた蛋白質を可溶化し、結晶化サンプルを調製した。

細胞膜からの効率的な可溶化条件の検討に種々界面活性剤や添加剤を加え、効率的な可溶化条件の検討を行った。

結晶構造解析では、結晶を析出させるために高純度精製を行う必要がある。粗精製には MD-2, TLR4 に付加した His-tag を用いた Ni-アフィニティーカラムクロマトグラフィーを用い行い、次にイオン交換、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行い、純度の向上を

目指した。

#### 4. 研究成果

研究開始 21 年度に昆虫細胞を用いた発現系で、TLR4 の発現を確認した。Sf-9, Sf-21, mimic Sf-9, Hi-5 細胞を用い結晶化に最適な発現量を与える宿主昆虫細胞株の検討を行った。先行研究で行っていた、細胞外ドメインのみの発現の場合は、細胞内小器官への蛋白質が留まり分泌発現が効率よく行えていないという結果を得ていたが、全長体 TLR4・MD-2 複合体の共焦点顕微鏡からは、発現蛋白質のほぼすべてが、効率よく細胞膜上に発現していることを確認できた。

また、Westernblotting を用いた発現の確認より、細胞当たりの発現量は少ないながらも結晶化を行うには足る量であった(図 2)。

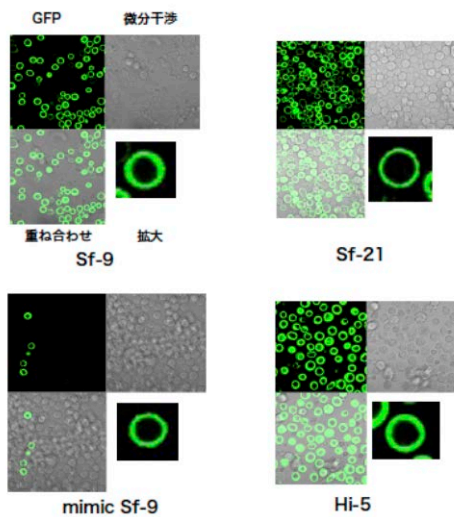


図 2 共焦点顕微鏡像による発現の確認

Sf-9: Sf-9 細胞, Sf-21: Sf-21 細胞, mimic

Sf-9: mimic Sf-9 細胞, Hi-5: Hi-5 細胞

細胞膜上からの抽出を試みたところ、そのほとんどが膜から抽出されないという問題が明らかとなった。そこで、界面活性剤や添加剤を加え、種々条件を検討したが、有効な方法を見いだせていなかった。

可溶化してきた少量の複合体画分を用い精製を行った。発現系を数々検討した His タグを用いた アフィニティー精製やイオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを行い、精製可能なことを確認した(図 3)。

しかし、これらの精製方法だけでは、60% 程度の純度でしか精製できなかった。また、発現蛋白質の多くが昆虫細胞膜上にとどまり、可溶化が効率よく行えないという問題が明らかとなった(図 4)

それをふまえ、22 年度には可溶化方法の検

討を主に研究に重点をおいて結晶化を行った。

さらに多くの可溶性界面活性剤や、可溶性条件を数々試みたが、有効な可溶性方法を見出せず、結晶化を行えていない。現在は発現領域をかえるなどの改良を行い、精製方法の確立および結晶化を目指している。

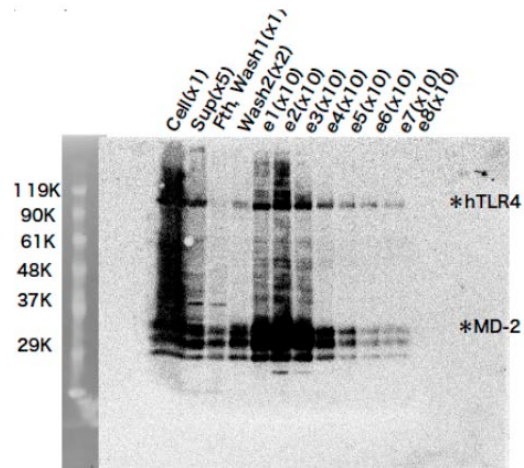


図 3 Ni カラムによる精製。

(Western blot による確認)

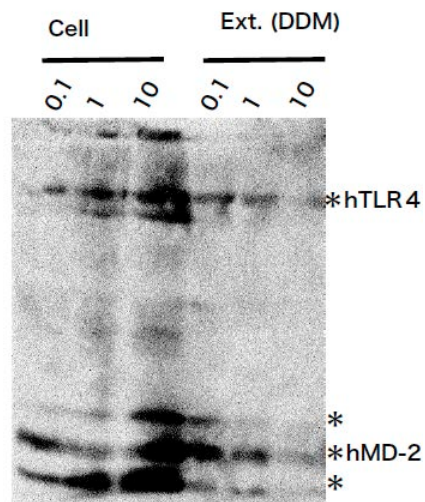


図 4. TLR4・MD-2 の細胞膜からの可溶化実験

Cell: 細胞上に発現した TLR4・MD-2, Ext.(DDM)DDM で膜から可溶化できた TLR4・MD-2 複合体

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし