

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770106

研究課題名（和文）核酸認識TLR受容体の構造生物学的研究

研究課題名（英文）Structural analyses of nucleic acid sensing TLR receptors

研究代表者

大戸 梅治（OHTO UMEHARU）

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：90451856

研究成果の概要（和文）：

本申請課題において、核酸認識TLR受容体（TLR7, TLR8, TLR9）についての蛋白質調製、結晶化、構造解析を進めた。TLR8に関しては、リガンド非結合状態と低分子リガンドとの複合体の状態での構造解析に成功した。TLR7とTLR9に関しては、結晶化可能な量の蛋白質を得ることに成功し、複数の状態での結晶を得ている。

研究成果の概要（英文）：

We conducted the protein preparation, crystallization, and crystal structural analyses on the nucleic acid sensing TLR receptor (TLR7, TLR8, TLR9). We succeeded the structural determination of the unliganded and liganded forms of TLR8. We obtained the sufficient amount of purified TLR7 and TLR9 for crystallization and obtained the crystal in several forms.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|-----------|-----------|
| 交付決定額 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：タンパク質、X線結晶構造解析、構造生物学、自然免疫

1. 研究開始当初の背景

自然免疫は微生物やウイルスの感染に対する生体の初期防御反応であり、微生物の構成成分は主に Toll-like receptor (TLRs) などの受容体により認識され、様々な免疫応答を引き起こす。研究開始時には、核酸を認識する TLR 受容体 (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) の構造は唯一 TLR3 だけが明らかにされていた。

2. 研究の目的

本申請課題では、細胞内に存在して、細菌やウイルス由来の核酸の認識に関与する TLR 受容体 (TLR7, TLR8, TLR9) に焦点を当て、そのリガンド認識機構やシグナル伝達機構を主に X線結晶構造解析により明ら

かにすることを目的とする。これら受容体は抗ウイルス薬やワクチンのターゲットとなることが期待されており、本研究はその構造基盤を与えるものと考えられる。

3. 研究の方法

結晶化に供する蛋白質の調製については、ショウジョウバエ由来の S2 細胞発現系を採用し、発現と精製方法を確立する。蛋白質に付加される糖鎖の取り扱いについては、糖鎖生成阻害剤存在下で培養し、EndoH 感受性の糖鎖を付加後、切断して結晶化する。精製蛋白質が得られたら単独での結晶化と並行して、リガンドとの複合体についても結晶化条件の探索を行う。結晶が得られたら放射光を用いて高分解能の回折デー

タを収集し、既存の構造解析手法を駆使して迅速に構造決定を行う。

4. 研究成果

(1) TLR7, TLR8, TLR9 に関して、結晶化可能な量の精製蛋白質を得ることに成功した。得られた試料を用いて、種々の条件で結晶化を進めた。TLR7, TLR8, TLR9 いずれについても結晶が得られている。

(2) TLR8 の結晶に関して、まず TLR8/R848 複合体結晶を用いて、重原子同型置換法により位相を決定し、構造決定を行った。次に、それを用いて、リガンド非結合状態、低分子リガンド CL095, CL075 との複合体の構造を分子置換法により決定した。最終的に、リガンド非結合状態 TLR8 を分解能 2.3 Å で、低分子リガンドとの複合体の TLR8 を分解能 2.0~2.7 Å で構造精密化を行った。

TLR8 は発現させた時点でロイシンリッチリピート (LRR) 14 と LRR 15 の間の長い挿入ループ (Z-loop) の部分で切断されていた。しかし、その N 末端側と C 末端側は精製の過程で解離することはなかった。TLR8 の単量体構造では、Z-loop で切断を受けているにも関わらず、N 末端側と C 末端側が会合した一連の馬蹄形の LRR 構造を保持していた (図 1)。TLR8 の N 末端と C 末端は直接相互作用しており、リング状構造を形成していた。切断を受けた Z-loop の後半部分は TLR8 の N 末端側のリングの内側に収納されていた。

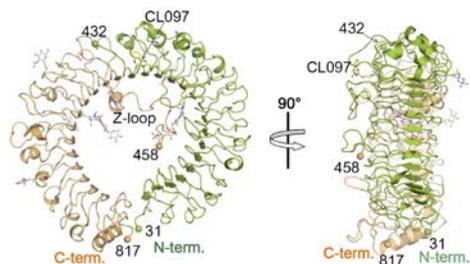


図 1. TLR8 の単量体構造

ゲル濾過クロマトグラフィーおよび X 線小角散乱の結果より、TLR8 はリガンド非結合状態、リガンド結合状態、ともに 2 量体で存在することが明らかになった。また、X 線小角散乱の結果より、リガンド依存的に構造変化することが分かった。これに対応して、結晶構造では、リガンド非結合状態、リガンド結合状態、ともに 2 量体であった (図 2)。いずれも 2 分子の C 末端同士が近接した m 字型の 2 量体を形成していた。C 末端同士の距離はリガンド非結合状態が約 50 Å であるのに対して、リガンド結合状態では約 30 Å と接近していた。リガンドは

2 量体中の、2 回軸で関係づけられる 2 ヶ所に結合していた。計 5 種類の結晶を用いてリガンド複合体構造を解析したところ、いずれの構造もよく一致したことから、リガンド結合型の 2 量体構造が結晶のパッキングによるものではないことが分かった。

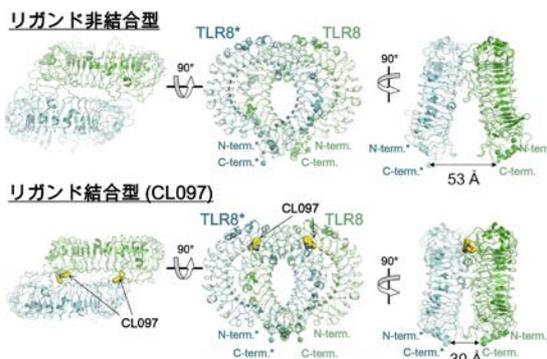


図 2. TLR8 の 2 量体構造

低分子リガンドの CL097, CL075, R848 いずれの電子密度も明瞭に観測することができた。いずれのリガンドもベンゼン環部分が TLR8 の Phe405 とスタッキング相互作用を形成していた (図 3)。リガンドのアミノ基の部分は TLR8 の Asp543 と水素結合を形成していた。また、各リガンドが有する炭素鎖の部分は TLR8 のリガンド結合部に形成された小さな疎水ポケットにはまり込んでいた。

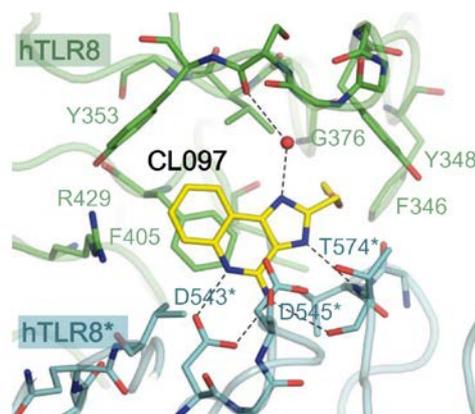


図 3. TLR8 によるリガンド認識

TLR8 は、リガンドが結合することでその 2 量体が再構成されることが明らかになった (図 4)。リガンド非結合状態では、2 量体界面は 1,290 Å² であるのに対して、リガンド結合状態では 2,150 Å² と顕著に増大していた。リガンドが結合することでより安定な 2 量体へと構造変化して、それに伴い、2 分子の C 末端同士が近接する。さらに、細胞内のシグナル伝達ドメインである TIR

ドメインが近接しシグナルが伝わることが予想される。

上記の2量体の再構成によるシグナル伝達機構は、これまで考えられてきたリガンド依存的にTLRが2量体化するという機構とは異なるものである。この機構はTLR8に特異的なのか、それとも、TLR7, TLR8, TLR9のサブファミリーに共通していることなのか、今後の研究で明らかにしていく予定である。

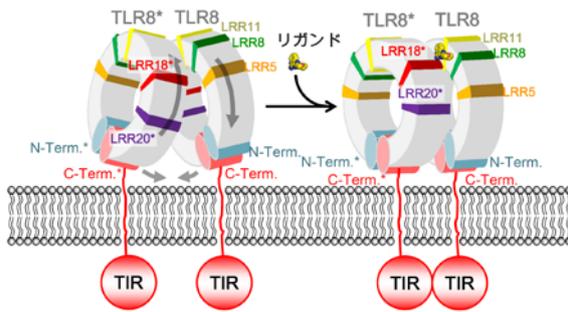


図4. TLR8の2量体の再構成

(3) TLR8と一本鎖RNAとの複合体に関しても結晶が得られており、低分子リガンドとの類似点、相違などを明らかにする予定である。また、TLR7とTLR9についても、複数の条件で結晶が得られており、TLR7によるRNAや低分子リガンドの認識機構、TLR9によるDNAの認識機構、TLR7, TLR8, TLR9サブファミリー間での構造と機能との関連などを明らかにしていく予定である。

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11件) 全て査読有

1. Kono, N.*, Ohto, U.*, Hiramatsu, T., Urabe, M., Uchida, Y., Satow, Y., and Arai, H. (2013). Impaired α -TTP-PIPs Interaction Underlies Familial Vitamin E Deficiency. *Science* 340, 1106-1110. (* equally contributed)
2. Tanji H.*, Ohto U.*, Shibata T., Miyake M., and Shimizu T. (2013). Structural reorganization of the Toll-like receptor8 dimer induced by agonistic ligands. *Science* 339, 1426-1429. (* equally contributed)
3. Kondo, Y., Ikeda, K., Tokuda, N., Nishitani, C., Ohto, U., Akashi-Takamura, S., Ito, Y., Uchikawa, M., Kuroki, Y., Taguchi, R., Miyake, K., Zhang, Q., Furukawa, K., and Furukawa, K. (2013). TLR4-MD-2 complex is negatively regulated by an endogenous ligand, globotetraosylceramide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110, 4714-4719.
4. Yamakawa N.*, Ohto U.*, Akashi-Takamura S., Takahashi K., Saitoh S., Tanimura N., Suganami T., Ogawa Y., Shibata T., Shimizu T., and Miyake K. (2013). Human TLR4 polymorphism D299G/T399I alters TLR4/MD-2 conformation and response to a weak ligand monophosphoryl lipid A. *Int. Immunol.* 25, 45-52. (* equally contributed)
5. Ohto, U., Yamakawa, N., Akashi-Takamura, S., Miyake, K., & Shimizu, T. (2012). Structural analyses of human TLR4 polymorphism D299G and T399I. *J. Biol. Chem.* 287, 40611-40617.
6. Doronin, K., Flatt, J. W., Di Paolo, N. C., Khare, R., Kalyuzhniy, O., Acchione, M., Sumida, J. P., Ohto, U., Shimizu, T., Akashi-Takamura, S., Miyake, K., MacDonald, J. W., Mammier, T. K., Beyer, R. P., Farin, F. M., Stewart, P. L., Shayakhmetov, D. M. (2012). Coagulation factor X activates innate immunity to human species C adenovirus. *Science* 338, 795-798.
7. Ohto, U., Fukase, K., Miyake, K., & Shimizu, T. (2012). Structural basis of species-specific endotoxin sensing by TLR4/MD-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 7421-7426.
8. Eguchi, K., Manabe, I., Oishi-Tanaka, Y., Ohsugi, M., Kono, N., Ogata, F., Yagi, N., Ohto, U., Kimoto, M., Miyake, K., Tobe, K., Arai, H., Kadowaki, T., & Nagai, R. (2012). Saturated Fatty Acid and TLR Signaling Link β Cell Dysfunction and Islet Inflammation. *Cell Metab.* 15, 1-16.
9. Usui, K., Ohto, U., Ochi, T., Shimizu, T., & Satow, Y. (2012). Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of human β -galactosidase. *Acta Crystallogr. Sect. F68*, 73-77.
10. Ohto, U., Usui, K., Ochi, T., Yuki, K., Satow, Y., & Shimizu, T. (2012). Crystal Structure of Human β -Galactosidase: STRUCTURAL BASIS OF GM1 GANGLIOSIDOSIS AND MORQUIO B DISEASES. *J. Biol. Chem.* 287, 1801-1812.
11. Ohto, U., Miyake, K., & Shimizu, T.

(2011). Crystal structures of mouse and human RP105/MD-1 complexes reveal unique dimer organization of the toll-like receptor family. *J. Mol. Biol.* 413, 815-825.

[学会発表] (計6件)

①大戸梅治, 丹治裕美, 柴田琢磨, 三宅健介, 清水敏之, 病原体由来 RNA を認識する自然免疫系 TLR8 の結晶構造, 日本薬学会第133年会, 2013年3月28-30日, 横浜

②大戸梅治, 丹治裕美, 柴田琢磨, 三宅健介, 清水敏之, 自然免疫系 RNA 認識受容体 TLR8 の結晶構造, 第22回東京免疫フォーラム, 2013年3月14日, 東京

③大戸梅治, 深瀬浩一, 三宅健介, 清水敏之, 4本鎖 lipid A による種特異的 TLR4/MD-2 活性化機構の構造基盤, 第85回日本生化学会大会, 2012年12月14-16日, 博多

④ Umeharu Ohto, Structural basis of species-specific endotoxin sensing by TLR4/MD-2, Program for Young Researcher Symposium in Europe, Jun. 7, 2012, Cambridge, UK

⑤大戸梅治, 三宅健介, 清水敏之, 自然免疫系 RP105/MD-1 複合体の構造解析, 日本薬学会132年会, 2012年3月29日, 札幌

⑥ Umeharu Ohto, Hitomi Harada, and Yoshinori Satow, Structural analyses of mouse MD-1 protein complexed with endogenous phospholipid. International Union of Crystallography 2011, Aug. 24-25, 2011, Madrid, Spain

[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

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大戸 梅治 (OHTO UMEHARU)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号: 90451856