

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26711002

研究課題名（和文）自然免疫を担う病原体センサー蛋白質の構造基盤の解明

研究課題名（英文）Structural basis for innate immune pathogen sensors

研究代表者

大戸 梅治 (Ohto, Umeharu)

東京大学・薬学研究科（研究院）・准教授

研究者番号：90451856

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,000,000円

研究成果の概要（和文）：自然免疫受容体のTLR7、TLR8、TLR9およびNOD2に関して構造生物学的研究を進めた。TLR7およびTLR8については、ssRNAとの複合体の結晶構造を、TLR9に関してはCpG DNAとの複合体の結晶構造を明らかにし、これらのTLR受容体が核酸をリガンドとして活性化する機構を明らかにした。NOD2に関しては、不活性化型のADP結合型の結晶構造を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We conducted structural studies on the innate immune receptors, TLR7, TLR8, TLR9, and NOD2. We determined the crystal structures of TLR7 and TLR8 in complex with ssRNA, and also determined the crystal structure of TLR9 in complex with CpG DNA, which revealed the activation mechanism of these nucleic acid recognizing TLRs. Moreover, we determined the crystal structure of an ADP-bound inactivated form of NOD2.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造生物学 結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

自然免疫は微生物の感染に対する生体の初期防御反応である。微生物の構成成分は Toll-like receptors (TLRs), NOD-like receptors (NLRs), RIG-I-like receptors (RLRs) などの病原体センサーである受容体によって認識され様々な免疫応答を引き起こす。これら受容体は、様々な病気の治療薬のターゲットとして注目されている。

2. 研究の目的

自然免疫は微生物の感染に対する生体の初期防御反応である。微生物の構成成分は Toll-like receptors (TLRs), NOD-like receptors (NLRs), RIG-I-like receptors (RLRs) などの病原体センサーである受容体によって認識されることで様々な免疫応答を引き起こす。これら受容体は、様々な病気の治療薬のターゲットとして注目されている。本課題では、病原体センサーによる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して、主に以下の2つのグループに焦点を当てて研究を進めた。

1. Toll-like receptor (TLRs) (エンドトキシンショック, 抗ウイルス薬, ワクチン)

2. NOD-like receptor (NLRs) (クローン病, アレルギー)

(TLR について) ウイルスや細菌由来などの病原体の構成成分は主に細胞膜上およびエンドソームに存在する TLR によって認識され、最終的に炎症応答, 抗ウイルス応答, 獲得免疫の活性化などを誘導する。病原体由来の核酸は細胞内のエンドソームに存在する TLR3 (dsRNA), TLR7 (ssRNA), TLR8 (ssRNA), TLR9 (非メチル化 CpG DNA) によって認識される。TLR7/8 は RNA の他にも、イミダゾキノリン系低分子化合物により活性化されることが報告されている。これら核酸認識 TLRs を通じた免疫応答は、抗ウイルス薬やそのアジュバント活性を利用したインフルエンザワクチンなどの開発につながるものと期待される。

(NLR について) NLRs は、細胞内で働く自然免疫系の病原体センサー蛋白質である (ヒトでは 23 種類が報告)。いずれも特徴的なマルチドメイン構造を共通に有している。N 末端側のエフェクタードメイン (CARD), 中央のヌクレオチド結合ドメイン (NOD), そして C 末端側のリガンド結合と制御を担うとされている LRR ドメインの 3 つのドメインから構成されている。NOD1, NOD2 は細菌由来のペプチドグリカン認識するとされている。NOD1, NOD2 などの遺伝子多型による機能不全が、クローン病などの自己免疫疾患と関係していることで注目されているが、構造生物学的な解析は全く進んでいなかった。

3. 研究の方法

結晶化に供する蛋白質の調製については、TLR 受容体に関しては、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、糖鎖生合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。NLR 受容体に関してはバキュロウイルス発現系を用いる。

4. 研究成果

(TLR8 受容体)

TLR8 受容体に関しては、TLR8 の細胞外ドメインと ssRNA との複合体の結晶構造解析に成功した。驚くべきことに TLR8 は合成低分子リガンドやウリジンなどの低分子が結合する第一結合部位と ssRNA が結合する第二結合部位が存在した。第二結合部位には UG のジヌクレオチドが結合していた。両者にリガンドが結合することで効率的に活性化されることが明らかになった。

Z-loop 切断の意義に関して構造生物学的観点から研究を進めた。TLR7-9 ファミリーには共通して Z-loop と呼ばれる挿入配列が LRR14 と LRR15 の間に存在して、その切断が活性化に重要であることが示されていた。我々はこの Z-loop が切断されていない状態の TLR8 の結晶構造を明らかにした。これまで Z-loop が切断された TLR8 は不活性化型の 2 量体を形成することが明らかになっていたが、Z-loop の未切断体は、溶液中及び結晶中で単量体として存在していた。また、結晶構造解析の結果、未切断の Z-loop は TLR8 の活性化型 2 量体形成の 2 量体界面側に存在することが明らかとなった。つまり、未切断の Z-loop が 2 量体形成を阻害していた。

(TLR7 受容体)

TLR7 の細胞外ドメインと ssRNA およびグアノシンまたは合成低分子リガンドとの複合体の結晶構造解析に成功した。TLR8 と同様に TLR7 には 2 か所のリガンド結合部位が存在し、第一結合部位は TLR8 と共通しており、合成低分子リガンドやグアノシンを結合することが明らかとなった。一方で、ssRNA 結合部位である第二結合部位は TLR8 とは異なる部位に存在し、UUU のトリヌクレオチドを認識していた。TLR8 と同様に第二結合部位に ssRNA が結合することで第一結合部位への低分子リガンドの結合の親和性が上昇することを見出した。

(TLR9 受容体)

TLR9の細胞外ドメインとCpGモチーフを含むssDNAの複合体の結晶構造を明らかにした。TLR9は、CpG DNAと結合することで2:2の複合体を形成し、TLR7、TLR8と共通した活性化型2量体構造を形成することが明らかになった。CpGモチーフの塩基部分は2量体の一方の分子のN末端側部分に存在する溝に結合し、TLR9と複数の特異的に相互作用を形成していた。また、CpGモチーフのリン酸骨格部分は他方の分子のC末端側と相互作用していた。これらのCpG DNAと2分子のTLR9との相互作用の結果、TLR9の2量体化が誘導されることを明らかにした。

(NOD2 受容体)

細菌の細胞壁の構成成分である村ミルジペプチドを認識するとされているNOD2受容体に関して、N末端側のドメイン(CARD)を欠損させたNOD2不活性化型(ADP結合型)の結晶構造を明らかにした。構造解析の結果、ADPはNOD2のドメイン間の相互作用を媒介するように結合しており、類似タンパク質との構造比較から、NOD2は不活性化型のコンフォメーションであると結論づけた。また、リガンド認識に関連するとされているLRRドメインの凹面にポケットが存在していた。このポケットの構成残基の変異体実験から、このポケットがムラミルジペプチドの認識に関与していることが示唆された。NOD2の恒常活性化型の変異がブラウ症候群や若年性サルコイドーシスの原因となることが確認されており、これらの変異残基は不活性化型NOD2のドメイン間の相互作用界面に集中しており、変異導入で不活性化型NOD2の構造を不安定化し、NOD2の恒常活性化を引き起こすものと考えられた。一方で、クローン病や潰瘍性大腸炎に関連があると報告される変異の一部はNOD2の機能欠損型の変異体であることが分かっており、これらの変異残基はNOD2全体に分布していた。

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21件)

1. Zhang, Z., Ohto, U., Shibata, T., Krayukhina, E., Taoka, M., Yamauchi, Y., Tanji, H., Isobe, T., Uchiyama, S., Miyake, K., & Shimizu, T. Structural Analysis Reveals that Toll-like Receptor 7 Is a Dual Receptor for Guanosine and Single-Stranded RNA. *Immunity* **45**, 1-12. (2016)
2. Miyake, K., Shibata, T., Ohto, U., &

Shimizu, T. Emerging roles of the processing of nucleic acids and Toll-like receptors in innate immune responses to nucleic acids. *J Leukoc Biol.* **101**, 135-142.

3. Ohto, U., Ishida, H., Krayukhina, H., Uchiyama, S., Inoue, N., & Shimizu, T. Structure of IZUMO1-JUNO reveals sperm-oocyte recognition during mammalian fertilization. *Nature* **534**, 566-569. (2016)
4. Maekawa, S., Ohto, U., Shibata, T., Miyake, K., & Shimizu, T. Crystal structure of NOD2 and its implications in human disease. *Nature Commun.* **7**, 11813. (2016)
5. Tanji, H., Ohto, U., Motoi, Y., Shibata, T., Miyake, K., & Shimizu, T. Autoinhibition and relief mechanism by the proteolytic processing of Toll-like receptor 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 3012-3017. (2016)
6. Ohto, U., & Shimizu, T. Structural aspects of nucleic acid-sensing Toll-like receptors. *Biophys. Rev.* **8**, 33-43. (2016)
7. Beesu, M., Caruso, G., Salyer, A. C., Shukla, N. M., Khetani, K. K., Smith, L. J., Fox, L. M., Tanji, H., Ohto, U., Shimizu, T., & David, S. A. Identification of a Human Toll-Like Receptor (TLR) 8-Specific Agonist and a Functional Pan-TLR Inhibitor in 2-Aminoimidazoles. *J Med Chem.* **59**, 3311-3330. (2016)
8. 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. Guanosine and its modified derivatives are endogenous ligands for TLR7. *Int. Immunol.* **28**, 211-222. (2016).
9. Deguchi, A., Tomita, T., Ohto, U., Takemura, K., Kitao, A., Akashi-Takamura, S., Miyake, K., & Maru, Y. Eritoran inhibits S100A8-mediated TLR4/MD-2

- activation and tumor growth by changing the immune microenvironment. *Oncogene* **35**, 1445-1456. (2016).
10. Beesu, M., Caruso, G., Salyer, A., Khetani, K., Sil, D., Weerasinghe, M., Tanji, H., Ohto, U., Shimizu, T., & David, S. A. Structure-based Design of Human TLR8-specific Agonists with Augmented Potency and Adjuvanticity. *J. Med. Chem.* **58**, 7833-7849. (2015)
 11. Ganapathi, L., Van Haren, S., Dowling, D. J., Bergelson, I., Shukla, N. M., Malladi, S. S., Balakrishna, R., Tanji, H., Ohto, U., Shimizu, T., David, S. A., & Levy, O. The Imidazoquinoline Toll-Like Receptor-7/8 Agonist Hybrid-2 Potently Induces Cytokine Production by Human Newborn and Adult Leukocytes. *PLoS One*. Aug 14;10(8):e0134640. (2015)
 12. Sakurai, S., Ohto, U., & Shimizu, T. Structure of human Roquin-2 and its complex with constitutive-decay element RNA. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* **71**, 1048-54. (2015)
 13. Kannno, A., Tanimura, N., Ishizaki, M., Ohko, K., Motoi, Y., Onji, M., Fukui, R., Shimozato, T., Yamamoto, K., Shibata, T., Sano, S., Sugahara-Tobinai, A., Takai, T., Ohto, U., Shimizu, T., Saitoh, S., & Miyake, K. (2015) Targeting cell surface TLR7 for therapeutic intervention in autoimmune diseases. *Nat. Commun.* **6**, 6119.
 14. Chan, M. P., Onji, M., Fukui, R., Kawane, K., Shibata, T., Saitoh, S., Ohto, U., Shimizu, T., Barber, G. N., & Miyake, K. (2015) DNase II-dependent DNA digestion is required for DNA sensing by TLR9. *Nat. Commun.* **6**, 5853.
 15. Ohto, U., Shibata, T., Tanji, H., Ishida, H., Krayukhina, E., Uchiyama, S., Miyake, K., & Shimizu, T. (2015) Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9. *Nature* **520**, 702-705.
 16. Tanji, H., Ohto, U., Shibata, T., Taoka, M., Yamauchi, Y., Isobe, T., Miyake, K., & Shimizu, T. (2015) Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA. *Nat Struct Mol Biol.* **22**, 109-15.
 17. Yoo, E., Salunke, D. B., Sil, D., Guo, X., Salyer, A. C., Hermanson, A. R., Kumar, M., Malladi, S. S., Balakrishna, R., Thompson, W. H., Tanji, H., Ohto, U., Shimizu, T. & David, S. A. (2014). Determinants of Activity at Human Toll-like Receptors 7 and 8: Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) of Diverse Heterocyclic Scaffolds. *J Med Chem.* **57**, 7955-7970.
 18. Tanimura, N., Saitoh, S., Ohto, U., Akashi-Takamura, S., Fujimoto, Y., Fukase, K., Shimizu, T. & Miyake, K. (2014). The attenuated inflammation of MPL is due to the lack of CD14-dependent tight dimerization of the TLR4/MD2 complex at the plasma membrane. *Int Immunol* **26**, 307-14.
 19. Suzuki, H., Ohto, U., Higaki, K., Mena-Barragan, T., Aguilar-Moncayo, M., Ortiz Mellet, C., Nanba, E., Garcia Fernandez, J. M., Suzuki, Y. & Shimizu, T. (2014). Structural basis of pharmacological chaperoning for human beta-galactosidase. *J Biol Chem* **289**, 14560-8.
 20. Ohto, U., Tanji, H. & Shimizu, T. (2014). Structure and function of toll-like receptor 8. *Microbes Infect* **16**, 273-82.
 21. Kokatla, H. P., Sil, D., Tanji, H., Ohto, U., Malladi, S. S., Fox, L. M., Shimizu, T. & David, S. A. (2014). Structure-based design of novel human Toll-like receptor 8 agonists. *ChemMedChem* **9**, 719-23.
- [学会発表](計8件)
1. U. Ohto, H. Tanji, T. Shibata, K. Miyake, and T. Shimizu. Structural studies of nucleic acid sensing Toll-like

- receptor. 23rd Congress and General Assembly of The International Union of Crystallography (IUCr 2014) Aug. 5-12, 2014, Montreal, Canada.
2. Umeharu Ohto. Structural study of Toll-like receptor 8 recognizing viral single stranded RNA. The International Symposium 'Molecular basis of host cell competency in virus infection' 2014. Nov. 8-9, 2014, Yokohama, Japan.
 3. 大戸梅治、清水敏之. 自然免疫系 Toll 様受容体の構造生物学研究. 第 87 回日本生化学会. 2014 年 10 月 15-18 日. 京都.
 4. Umeharu Ohto. Ligand recognition and signal transduction by Toll-like receptor. 第 53 回日本生物物理学会. 2015 年 9 月 13-15 日. 金沢.
 5. U. Ohto, T. Shibata, H. Tanji, H. Ishida, E. Krayukhina, S. Uchiyama, K. Miyake, and T. Shimizu. Crystallographic analyses of Toll-like receptor 9 recognizing CpG DNA. Toll meeting 2015. Sep. 30-Oct. 3, 2015. Marbella, Spain.
 6. 大戸梅治、清水敏之. 核酸認識 Toll 様受容体によるリガンド認識とシグナル伝達の構造基盤. BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会. 2015 年 12 月 1-4 日. 神戸.
 7. Umeharu Ohto. Crystal structure of NOD2 reveals its implications in human diseases. 第 42 回内藤コンファレンス. 2016 年 10 月 4-7 日. 札幌.
 8. Umeharu Ohto and Toshiyuki Shimizu. Structures of nucleic acids sensing Toll-like receptors. The 45th annual meeting of the Japanese Society for Immunology (JSI). 2016 年 12 月 5-7 日. 沖縄.

〔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・准教授

研究者番号：90451856