

自然免疫系受容体の結晶構造解析 Crystallographic studies of innate immune receptors

大戸梅治*

東京大学大学院薬学系研究科

〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

Umeharu Ohto*

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo,
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033, Japan

1 はじめに

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。

TLR7 および TLR8 は、ウイルス由来の一本鎖 RNA を認識する受容体であり、炎症、抗ウイルス応答を引き起こす。また、TLR7/8 は、合成低分子化合物によっても活性化されることが知られており、これらの TLR7/8 を活性化または阻害する化合物は、抗ウイルス薬、がん、アレルギーに対する治療薬として働くことが期待されている。我々はこれまでに、TLR7 および TLR8 に関して低分子化合物および一本鎖 RNA の認識機構とシグナル伝達機構を明らかにしてきた[1]。TLR7 ファミリー (TLR7, TLR8, TLR9) には細胞外ドメインのロイシンリッチリピート(LRR)の LRR14 と LRR15 の間に約 40 残基程度の挿入ループが存在する (Z-loop と呼ぶ)。TLR7 ファミリーの活性化にはこの Z-loop の切断が必須であることが示されているが、その構造基盤は明らかになっていなかった。そこで我々は、Z-loop 未切断の TLR8 に関して結晶構造解析を目指した。

2 実験

ヒト TLR8 細胞外ドメインをショウジョウバエ S2 細胞に発現させると、発現した時点で既に Z-loop が切断されていた。そこで、Z-loop の切断ヶ所に変異を導入した TLR8 細胞外ドメインを調製した。ショウジョウバエ S2 細胞を用いて分泌発現を行い、培養上清から IgG アフィニティー精製、ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製を行った。また、付加された糖鎖は糖鎖切断酵素 endo Hf により短鎖化した。精製サンプルを用いて結晶化を行い TLR8 の Z-loop 未切断体の結晶を得た。この結晶について PF-AR NE3A において回折強度データを収集した。

3 結果および考察

TLR8 の Z-loop 未切断体の結晶構造を分解能 2.6 Å で明らかにした[2]。これまでの結果では、Z-loop 切

断体の TLR8 のリガンド非結合型は溶液中および結晶中で不活性化型の 2 量体として存在することが明らかになっている。一方で、Z-loop 未切断体の TLR8 は溶液中でも結晶中でも単量体として存在していた。Z-loop 未切断体の TLR8 の単量体構造は、Z-loop 切断体の TLR8 の 2 量体のプロトマーとよく一致した。Z-loop 未切断体の TLR8 の結晶構造中には未切断の Z-loop の一部の電子密度が観察され、これは TLR8 が形成する 2 量体界面側に存在していた。このことから、未切断の Z-loop は 2 量体界面側に存在することで、2 量体形成を阻害することで TLR の活性化を抑制する役割があると結論した。Z-loop が切断されることでこの抑制が解除され、不活性化型の 2 量体およびリガンド依存的な活性化型の 2 量体を形成することが可能となる。実際、ゲルろ過クロマトグラフィー及び恒温滴定カロリメトリーを用いたリガンド結合実験により、Z-loop 未切断体の TLR8 は一本鎖 RNA には結合するが、低分子リガンドには結合しないことが明らかになった。この結果は、低分子リガンドは 2 量体の界面に存在するため、その結合には TLR8 の 2 量体化が必要であること、一方、RNA は 2 量体の界面とは離れた位置に存在するため、単量体でも結合できるというこれまでの構造解析結果ともよく一致していた。

本研究によりこれまで具体的な制御機構が不明であった Z-loop による TLR の活性制御機構が明らかになった。

謝辞

PF のビームラインスタッフの方々にはいつも大変お世話になっております。感謝いたします。

文献

- [1] Zhang et al., *Immunity* **45**, 1-12. (2016)
- [2] Tanji et al., *PNAS* **113**, 3012-3017. (2016)

* umeji@mol.f.u-tokyo.ac.jp