

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*, 丹治裕美, 清水敏之
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

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。

TLR8 (および TLR7) 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。これまで、TLR7/8 がどのようにして RNA またはこれらの低分子化合物により活性化され細胞内へ情報を伝えるのかについての詳細な機構は不明であった。我々は昨年度、リガンド非結合型 TLR8 と合成低分子リガンド結合型 TLR8 の結晶構造を分解能 2.0~2.7 Å で明らかにし、TLR8 による低分子化合物の認識機構とシグナル伝達機構を明らかにした (参考文献 1)。本年度は、TLR8 の本来のリガンドである RNA の認識機構を結晶構造から明らかにすることを目指した。また、TLR7 および TLR9 についても結晶構造解析を進めた。

2 実験

ヒト TLR8 細胞外ドメイン全長の C 末端にプロテイン A タグを付け、キフネンシン存在下でショウジョウバエ S2 細胞を用いて分泌発現を行った。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、イオン交換カラム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。精製サンプルと TLR8 を活性化すると報告のある一本鎖 RNA を混合して蒸気拡散平衡法で結晶化を行い TLR8/RNA 複合体の結晶を得た。また、TLR8 とモノヌクレオシド複合体の結晶も得た。さらに、TLR8 の細胞外ドメインに存在する Z-loop と呼ばれる長い挿入ループの構造学的機能を明らかにするために、Z-loop を切れないように変異を入れた Z-loop 変異体についても同様に発現、精製、結晶化を行った。TLR7 および TLR9 に関しても、TLR8 と同様に発現、精製を行い結晶化した。

3 結果および考察

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 (参考文献 1)。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。TLR8 の Z-loop を切れなくした変異体 (Z-loop 変異体) の構造解析を行ったところ、TLR8 (Z-loop 変異体) は結晶中でモノマーとして存在していた。ゲル濾過クロマトグラフィーにおいても TLR8 (Z-loop 変異体) はモノマーとして溶出した。また、未切断の Z-loop は、TLR8 が本来形成する 2 量体界面側に存在していた。つまり、TLR8 の未切断の Z-loop は TLR8 の 2 量体形成を阻害していることが示唆された。これは、TLR7, TLR8, TLR9 いずれも Z-loop を有しており、Z-loop の切断が機能発現に重要であるとの複数の報告と対応している。

TLR8 の細胞外ドメインと一本鎖 RNA のとの共結晶化を行い、構造決定に成功した。いずれの RNA 複合体構造もすでに報告した低分子リガンド複合体の 2 量体構造と類似しており、細胞外ドメインの C 末端側が向かい合う形の活性化型の 2 量体を形成していた。意外なことに、RNA 複合体構造中で 20-mer の一本鎖 RNA の電子密度は確認できなかった。その代わりに RNA の分解産物と思われる電子密度が確認された。また、TLR8 とモノヌクレオシドとの複合体の構造解析を行い、モノヌクレオシドが活性化型の 2 量体構造を誘起することを確認した。

謝辞 (オプショナル)

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。

参考文献

[1] Tanji, H., Ohto, U., Shibata, T., Miyake, K., and Shimizu, T. (2013). Structural reorganization of the dimer of Toll like receptor 8 induced by agonistic ligands. *Science* 339, 1426-1469.

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