

# TOLL様受容体の溶液構造

松嶋範男<sup>1</sup>、西谷千明<sup>2</sup>、高橋素子<sup>2</sup>、黒木由夫<sup>2</sup>、

神保雄次<sup>3</sup>、和泉義信<sup>3</sup>

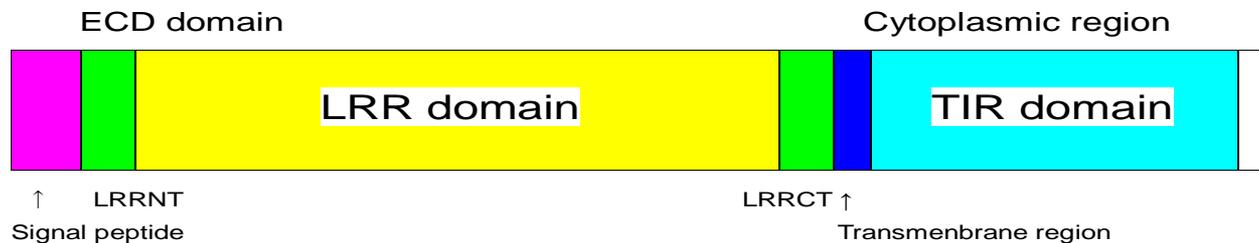
(札幌医大保健医療学部<sup>1</sup>、札幌医大医学部<sup>2</sup>、山形大院理工<sup>3</sup>)

# ABSTRACT

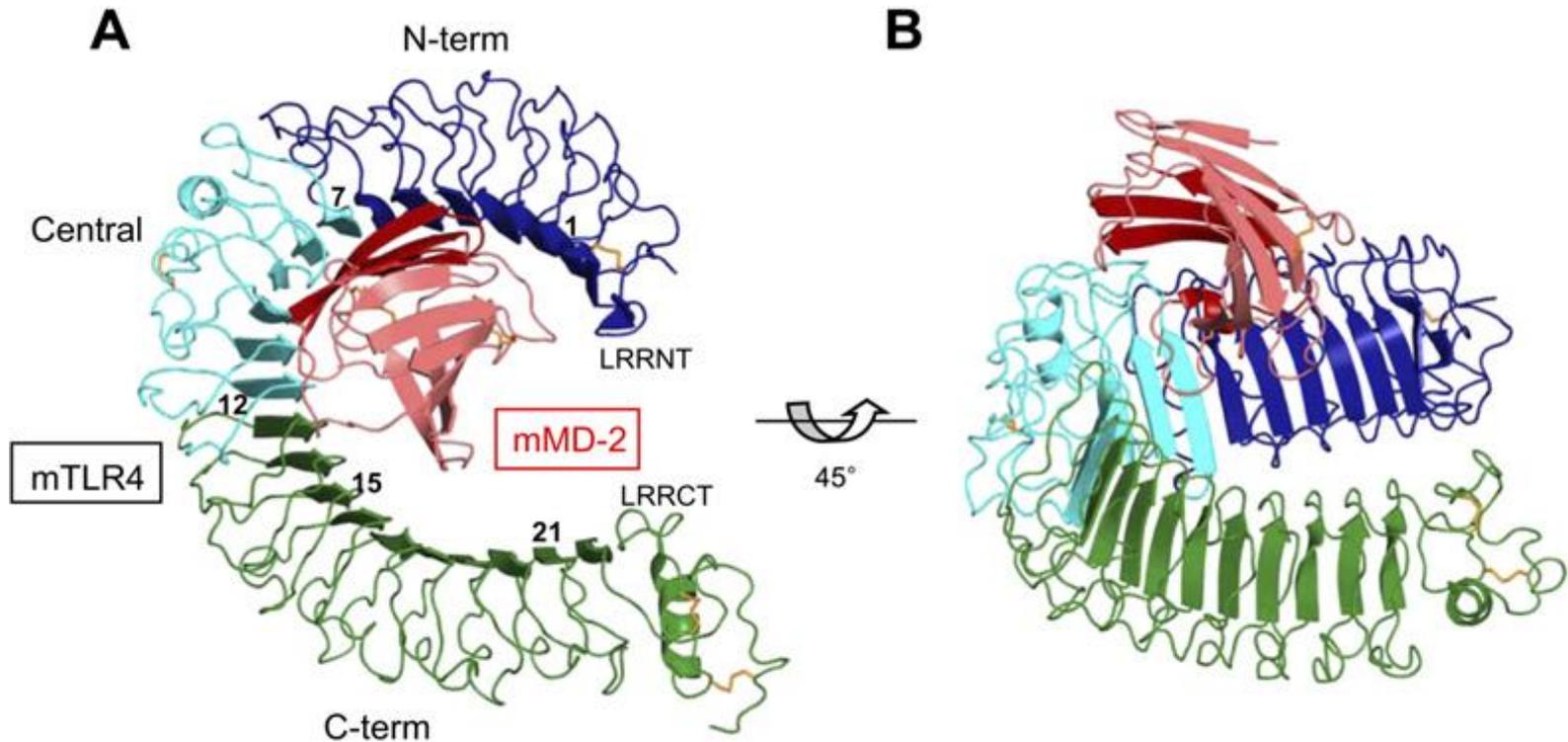
- 生体防御の機構として、獲得免疫の他に自然免疫の重要性も認識されている。自然免疫は、ヒトなどの脊椎動物ばかりではなく、植物においても病原体を防御するために同様な機構が働く。脊椎動物の自然免疫においては、Toll-like receptor (TLR) が中心的な役割を果たしている。ヒトTLRは、TLR1からTLR10からなりファミリーを形成している。TLRはタイプI型の膜蛋白質で、また糖鎖を結合する糖蛋白質である。膜の外側はエクトドメインと呼ばれ、ロイシン・リッチ・リピート(Leucine Rich Repeat, LRR)を含む。このLRRを含むエクトドメインが、リポサッカライド、ペプチドグリカン、フラジエリン、RNAやDNAなどのリガンドと相互作用して、そのシグナルが細胞質側に伝えられ一連の防護機構が発現すると考えられている。これまで、TLR3, TLR1, TLR2およびTLR4のエクトドメインの結晶構造解析に成功している。これらのLRRを含むエクトドメインはすべて、他のRR構造と同様に、分子全体が馬蹄型をしている。本研究の目的は、X線小角散乱測定からTLR4, TLR4とMD2複合体の溶液中の構造情報を得ることである。
- TLR4とMD-2複合体の溶液X線小角散乱測定を行った。タンパク濃度1.78 $\mu$ M、測定時間30分において、TLR4の慣性半径( $R_g$ )は32.8 Åの値を得た。この観測値は、TLR4:MD-2複合体の結晶構造解析の原子座標[2Z64.pdb]を使って計算した $R_g=31.5$  Åと比較できる値であった。また、TLR4-MD-2複合体の溶液小角散乱の測定値 $R_g$ は、タンパク濃度1.78 $\mu$ M、測定時間90分において、52.8 Åであった。このことから、TLR4:MD-2の複合体は、明らかに溶液中において少なくとも1:1の複合体ではない。
- しかしながら、これらの測定をとうして、いくつかの問題点が浮かびあがってきた。測定に用いたタンパク濃度は、普通溶液X線小角散乱測定に用いるタンパク濃度より一桁以上薄い。測定時間を20から30分にしても、分子の形状を反映する高角領域の信頼できる散乱強度をえることができなかった。また、試料調製において、1.78 $\mu$ Mのような非常に希薄なタンパク濃度においても、均一な溶液試料をえることができないケースが多かった。したがって、溶液X線小角散乱の二次元検出器の開発が望まれる。

# Toll-like receptor 4 (TLR4)

- TLR4は糖鎖を結合するタイプI型の膜蛋白質である。膜の外側のエクトドメイン(ECD domain)には、ロイシン・リッチ・リピート(Leucine Rich Repeat, LRR)を23回含む。TLR4とMD-2の複合体が、リポサッカライド(LPS)と相互作用し、そのシグナルが細胞質側に伝えられる。

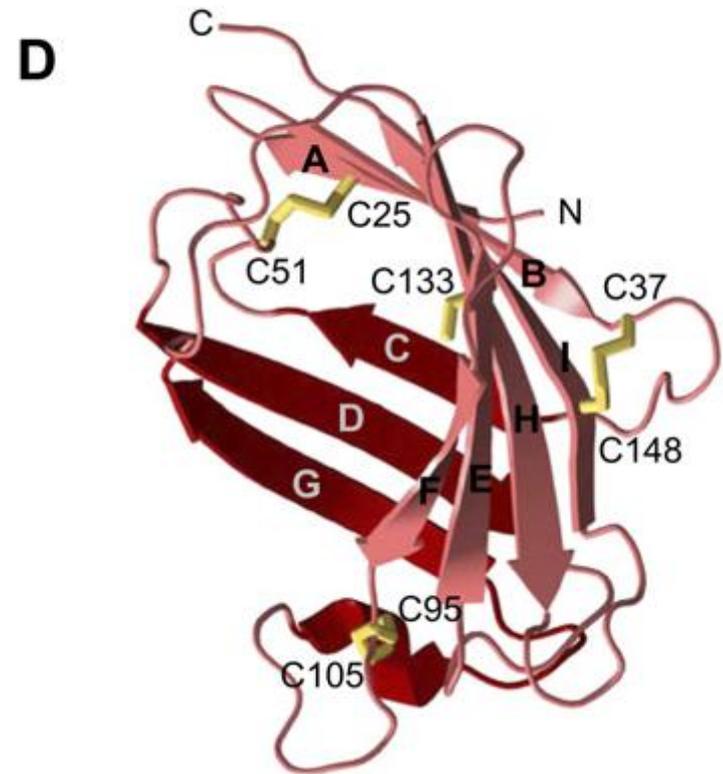
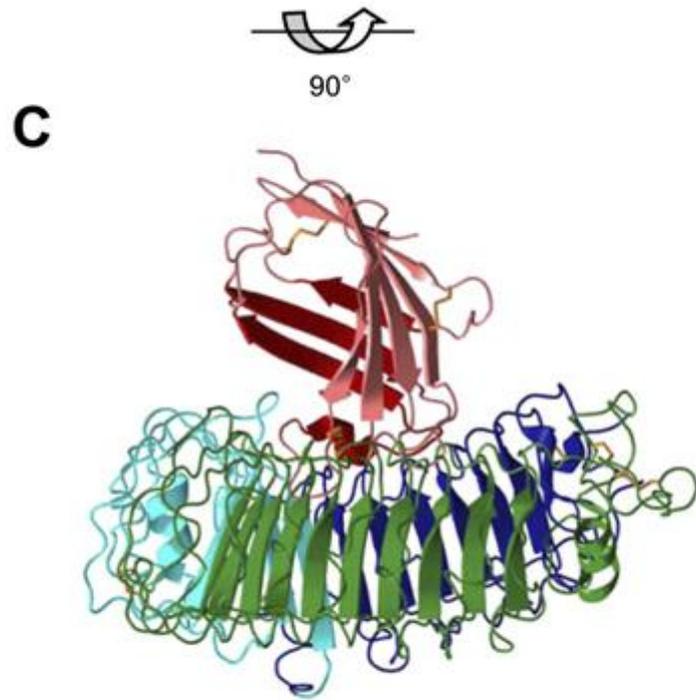


# TLR4エクストドメイン-MD-2 complex (1)

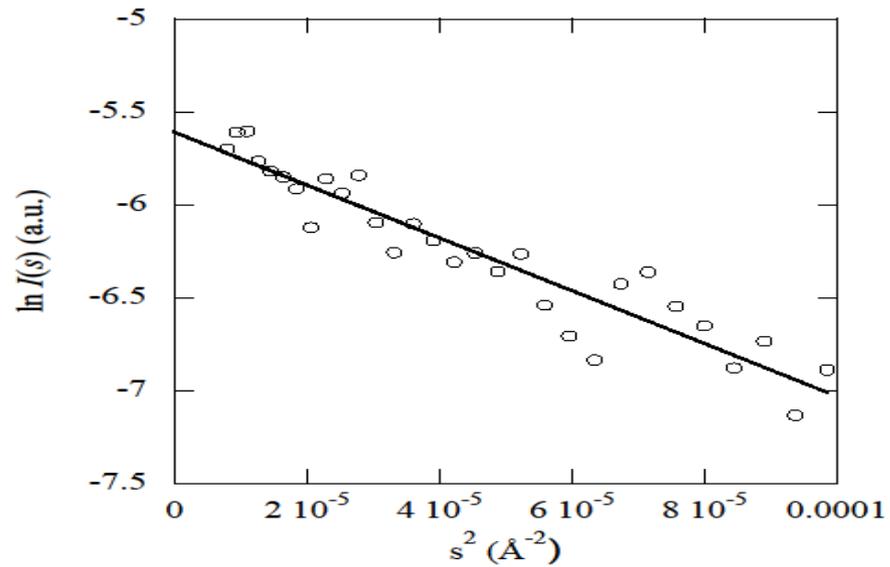


Kim HM, Park BS, Kim JI, Kim SE, Lee J, Oh SC, Enkhbayar P, Matsushima N, Lee H, Yoo OJ, Lee JO. Cell. (2007)130:906-917

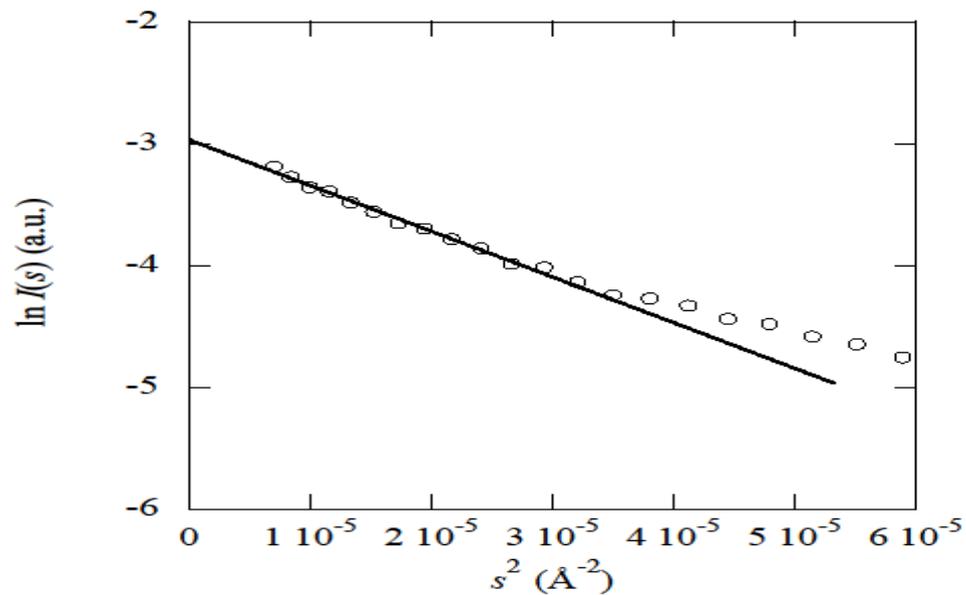
# TLR4エクストドメイン-MD-2 complex (2)



# TLR4エクストドメインのGuinier Plot



# TLR4エクストドメインーMD-2複合体の Guinier Plot

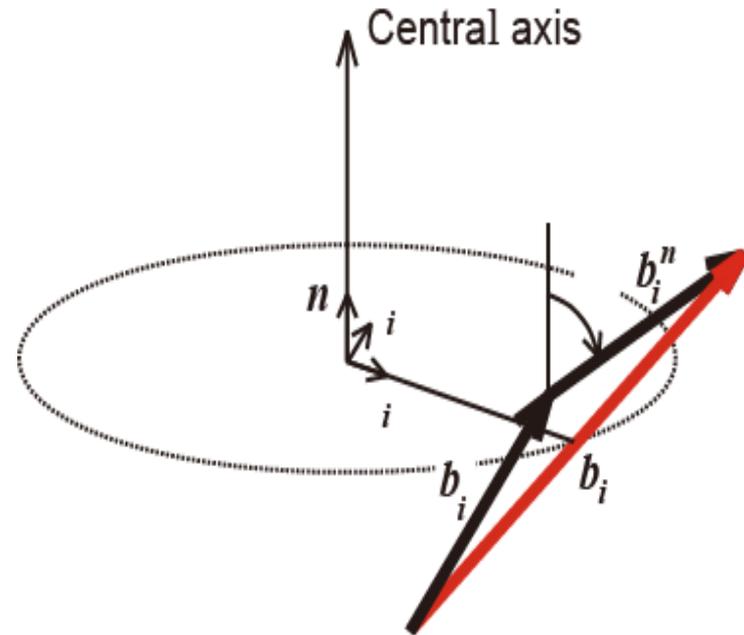
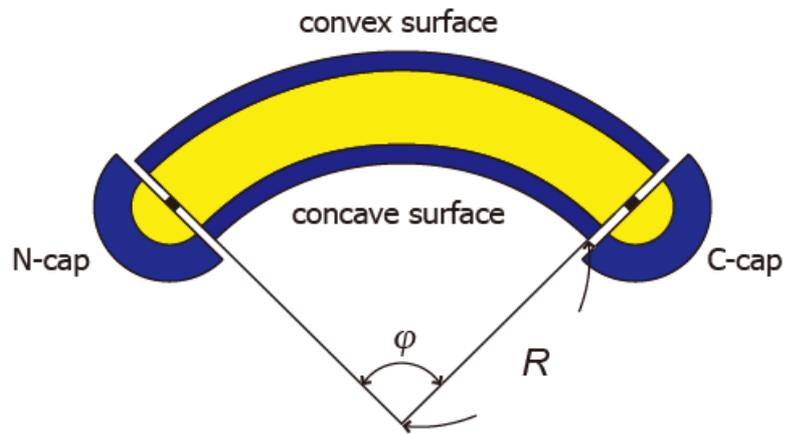


# TLR4エクトドメイン及び複合体の慣性半径

TLR4 エクトドメイン	32.8 Å (測定値)
TLR4 エクトドメイン-MD-2 Complex	52.8 Å (測定値)
TLR4 エクトドメイン-MD-2 1:1 Complex の結晶構造	31.2 Å (計算値)
TLR4 エクトドメイン-MD-2 1:1 Complex の結晶構造の TLR4 エクトドメイン単独	31.5 Å (計算値)

# Geometrical analysis of LRR arc shape

A



Enkhbayar P, Kamiya M, Osaki M, Matsumoto T, Matsushima N.  
Proteins (2004) 54:394-403.

# Geometric parameters of TLR4 LRR domain

Protein	N	R (Å)	$\varphi$ (°)	$\varphi$ (°)	D (Å)	$N_t$	$ \tau $ (°)	$\theta_t$ (°)
TLR4	23	23.24	270.7	12.30	5.01	29.3	5.21	-35.7
N-terminal (LRR1-LRR7)	7	25.63	69.5	11.58	5.18	31.1	2.38	13.5
Hinge (LRR8-LRR13)	6	17.27	86.6	17.33	5.22	20.8	9.02	-161.9
C-terminal (LRR14-LRR23)	10	32.09	81.2	9.02	5.05	39.9	3.91	132.3
TLR3 [1zlw.pdb]	25	26.58	261.0	10.87	5.07	33.1	3.05	24.5
RNase Inhibitor [2nbh.pdb]	17	17.68	269.9	16.87	5.19	21.3	4.27	19.3

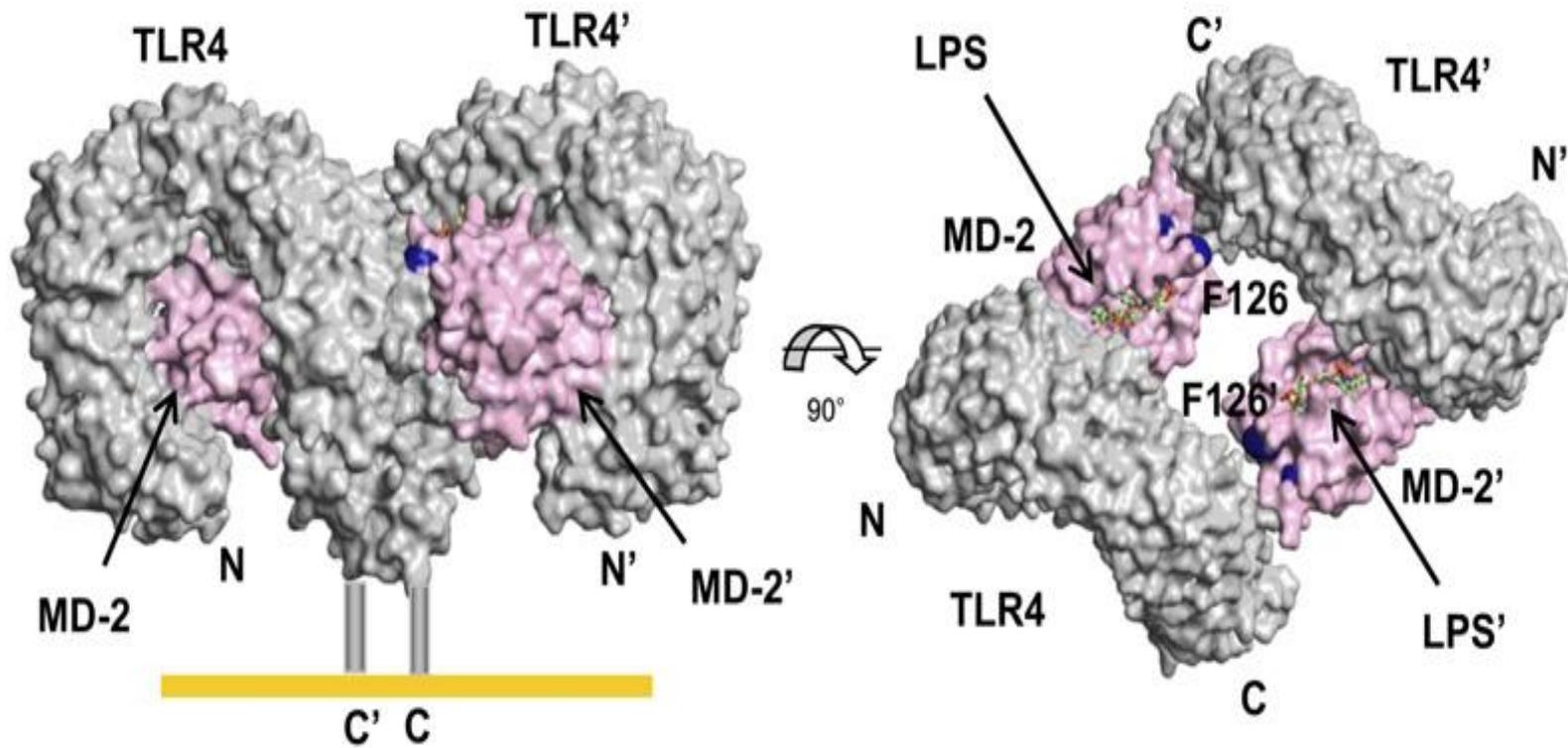
N, number of the  $\beta$ -strands (repeat number); R, radius of the  $\beta$ -sheet, " $\varphi$ ", rotation

angle of the LRR arc with the repeat number  $N$ ;  $\varphi$ , average rotation angle ( $\varphi$ ),

$\varphi = \varphi / (N-1)$ ; D, interstrand distance,  $D=2R\sin(\varphi/2)$ ;  $N_t = 360/\varphi$ ,  $|\tau|$ , average twist angle of

the  $\beta$ -strands;  $\theta_t$ , change in per turn.

## Model of the 2:2 TLR4-MD-2 Complex



Kim HM, Park BS, Kim JI, Kim SE, Lee J, Oh SC, Enkhbayar P, Matsushima N, Lee H, Yoo OJ, Lee JO. Cell. (2007)130:906-917

# Conclusion

- 溶液X線小角散乱から、ヒトTLR4エクトドメインの慣性半径 ( $R_g$ ) = 32.8 Å の観測値を得た。また、TR4-MD-2複合体の慣性半径 ( $R_g$ ) = 52.8 Å の観測値を得た。
- マウスTLR4エクトドメインとMD-2の1:1複合体の結晶構造解析の原子座標を使って計算したTLR4エクトドメインの慣性半径の計算値は、 $R_g = 31.5$  Åであった。
- LRRドメインの幾何解析は、LRRドメインは3つの異なる領域からなることを示した。このこととX線小角散乱の慣性半径の結果から、ヒトTLR4エクトドメインの構造は、マウスTLR4エクトドメインの構造と異なるかも知れない。
- 溶液中のTLR4エクトドメイン-MD-2複合体の慣性半径 ( $R_g$ ) = 52.8 Å は、1:1のマウスTLR4エクトドメインとMD-2複合体の慣性半径より大きい。このことから、明らかに溶液中においては2:2以上の複合体である。