最近の研究動向

アンタゴニストによる TLR7 の阻害機構の構造基盤

東京大学大学院薬学系研究科 張 志寛

Zhikuan ZHANG: Structural Basis for the Inhibition Mechanism of TLR7

自然免疫システムは原始的な生物を始め、高等生物まで備われる生体防御機構である。¹⁾ Toll様受容体 (Toll-like receptor, TLR) は多くの脊椎動物に存在する自然免疫受容体の一種であり、自然免疫システムの第一線で重要な役割を果たしている。²⁾ ヒトでは TLR1~TLR10 の十種類の TLR が同定されており、それぞれが異なる病原体分子パターンを認識する。³⁾ すべての TLR は 1 型膜タンパク質であり、細胞外ロイシンリッチリピート (LRR) ドメイン、一回膜貫通ドメインおよび細胞内トール/インターロイキン-1 受容体 (TIR) ドメインにより構成されている。一般的に、TLR はリガンド非存在下では単量体として存在しており、LRR ドメインがリガンドを認識することによって、TLR の活性化型二量体の形成が誘導され、免疫反応が引き起こされる。³⁾

Toll-like receptor 7 (TLR7) は、ヒト免疫不全ウイルスなどの RNA ウイルスを認識する受容体である。⁴⁾ 現在世界的に流行している SARS コロナウイルス 2 にも活性化されると知られている。⁵⁾ TLR7 は、一本鎖 RNA、グアノシンおよび特定の合成低分子リガンドによって活性化される。筆者らはこれまでに、アゴニストによる TLR7 の活性化機構を一連の TLR7/リガンド複合体の結晶構造を通じて解明した。^{6,7)} TLR7 は 2 つのリガンド結合部位を有し、サイト 1 はグアノシンおよび合成低分子リガンドを認識し、直接的に TLR7 の二量体化を誘導する。アロステリック結合部位のサイト 2 はウリジン塩基を含む短鎖一本鎖 RNA を認識し、TLR7 のサイト 1 に結合するリガンドに対する結合親和性を増加させる。TLR7 はウイルスの感染を排除するための重要な受容体であるが、ウイルスによる TLR7 の過剰な活性化は感染症の重症化の起因になる場合もある。また、通常では TLR7 はエンドリソソームに局在しているため、内因性の RNA 分子との接触が遮断されている。⁸⁾ しかし、内在性の RNA による TLR7 の好ましくない活性化は特定の自己免疫疾患の病因となっている。よって、TLR7 をターゲットするアンタゴニストは TLR7 の過剰な活性化に起因する疾患の治療薬として開発されている。⁹⁾

筆者らの共同研究者は TLR7 のアゴニスト (Cpd-3) を誘導体化することで、2 種類の TLR7 特異的なアンタゴニストを開発していた (図 1a)。¹⁰⁾ 本研究では、これらのアンタゴニストによる TLR7 の阻害機構を原子レベルで

可視化するため、X 線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡解析を併用して、TLR7/アンタゴニスト複合体の立体構造および阻害機構を明らかにした。¹⁰⁾

構造解析に適した高純度の TLR7 タンパク質を調製するため、プロテイン A タグをつけたサル TLR7 の LRR ドメインを安定に発現するショウジョウバエ S2 細胞を大量培養し、分泌された TLR7 タンパク質を精製した。さらに、TLR7 の Z-loop 領域 (TLR7 ファミリーで保存された自己阻害構造モチーフ) を酵素切断し、自己阻害が解除された TLR7 タンパク質を調製した。本研究の初期段階では、アゴニストの Cpd-3 およびアンタゴニストの Cpd-6 と Cpd-7 を添加しながら (図 1a), TLR7 の結晶化実験を実施した。さまざまな結晶化条件の最適化および複数の結晶の X 線回折実験を行った結果、TLR7/Cpd-3 複合体および TLR7/Cpd-6 複合体の結晶構造を決定したが、TLR7/Cpd-7 複合体に関しては良質の結晶が得られず、構造決定に至らなかった。TLR7/Cpd-3 複合体の結晶構造は活性型二量体構造を形成しており、Cpd-3 はアゴニストとして TLR7 の

図1 TLR7のリガンドとTLR7の結晶構造。(Ligands of TLR7 and the crystal structures of TLR7.) (a) TLR7のアゴニストおよびアンタゴニストの化学構造式。(b) TLR7/Cpd-3およびTLR7/Cpd-6複合体の結晶構造。

サイト1に結合していた(図1b)。これは既報のTLR7/アゴニスト複合体構造とよく一致している。驚くべきことに、Cpd-6がアンタゴニストであるにもかかわらず、TLR7/Cpd-6複合体の結晶構造はCpd-6がサイト1に結合し活性化型二量体構造を形成していた(図1b)。また、Cpd-6の結合様式もCpd-3の結合様式と類似している。そのため、TLR7/Cpd-6複合体の結晶構造情報だけではCpd-6によるTLR7の阻害機構を解釈することは困難である。

単一の結晶構造は静的なものであり、アンタゴニストによりTLR7二量体構造のゆらぎが誘導される可能性が考えられる。そこで、アンタゴニスト存在下でのTLR7の構造ダイナミクスを可視化するため、クライオ電顕単粒子解析に移行した。より安定な複合体を得るため、グルタルアルデヒドで架橋されたTLR7/Cpd-3、TLR7/Cpd-6、TLR7/Cpd-7複合体を調製し、クライオ電顕で観察した。興味深いことに、これら三種類の複合体はそれぞれ異なるコンフォメーションを形成していた(図2)。TLR7/Cpd-3複合体の電顕マップはクローズ型構造をとっており、活性化型二量体である結晶構造と一致していた。TLR7/Cpd-6複合体は、結晶構造で示したクローズ型構造と、本研究で初めて解明されたオープン型構造の両方が観察された。TLR7/Cpd-7複合体は、主にオープン型構造を形成していた。オープン型構造における2つのTLR7プロトマーのC末端は、クローズ型構造と比べて互いに離れている。そのため、オープン型構造は、シグナル伝達に不可欠な細胞内TIRドメインの接近を妨げることになり、TLR7の活性化を阻害するという、不活性化型二量体構造と言える。Cpd-3、Cpd-7はそれぞれ1つの構造を誘導するが、Cpd-6は、TLR7の構造ダイナミクスを誘導することで、安定したTLR7活性化型二量体構造が形成できなくなることにより、結果的にTLR7の活性化を阻害することを明らかにした。

図2で示した電顕マップは粒子の向きの偏りが原因で、全体的なコンフォメーションは同定できたが、詳細構造を可視化することはできなかった。この問題はクライオ電顕単粒子解析ではしばしば遭遇する。そこで、粒子の向きの偏りを改善するため、部分的にプロテインAタグの非切断のTLR7タンパク質(ゲルろ過クロマトグラフィー精製時にプロテインAタグの切残りを~50%含んだ画分)を電顕解析に用いた。その結果、粒子の向きのバリエーションが増え、TLR7/Cpd-7複合体のオープン型構造を2.8 Å分解能で解明できた(図3)。TLR7の二量体化界面の内側に、新規アンタゴニスト結合部位が観察された(図3)。興味深いことに、このアンタゴニスト結合部位は、アゴニストと比べて、アンタゴニストの結合様式が大きく変化しているものの、クローズ型構造のサイト1と空間的に近い。Cpd-7はTLR7プロトマーの両方と相互作用し、疎水性相互作用と水素結合を介して認識されていた。

図2 三種類のTLR7/リガンド複合体のクライオ電顕マップの側面図。(Cryo-EM reconstructions of three different TLR7/ligand complexes.)

図3 TLR7/Cpd-7複合体のクライオ電顕構造。(Cryo-EM structure of TLR7/Cpd-7 complex.) 左の図: TLR7/Cpd-7複合体のクライオ電顕マップ(2.8 Å分解能)。右の図: TLR7/Cpd-7複合体のクライオ電顕構造。

TLR7/アンタゴニスト複合体の結晶構造およびクライオ電顕構造に基づいて、アンタゴニストによるTLR7の阻害機構を解明した: Cpd-6およびCpd-7は、TLR7の構造ダイナミクスまたはTLR7のオープン型構造を誘導し、安定したTLR7活性化型二量体の形成を阻害する。本研究で得られた構造的知見は、TLR7をターゲットするアンタゴニストの設計の構造基盤となる。

謝 辞

本研究は大日本住友製薬株式会社、横浜市立大学、理化学研究所、高エネルギー加速器研究機構および東京大学医科学研究所、東京大学大学院医学系研究科との共同研究です。記してここに感謝申し上げます。

文 献

- 1) C. A. Janeway Jr, et al.: *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197 (2002).
- 2) O. Takeuchi and S. Akira: *Cell* **140**, 805 (2010).
- 3) L. A. O'Neill, et al.: *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 453 (2013).
- 4) F. Heil, et al.: *Science* **303**, 1526 (2004).
- 5) M. A. Moreno-Eutimio, et al.: *Microbes Infect.* **22**, 226 (2020).
- 6) Z. Zhang, et al.: *Immunity* **45**, 737 (2016).
- 7) Z. Zhang, et al.: *Cell Rep.* **25**, 3371 (2018).
- 8) O. Majer, et al.: *Curr. Opin. Immunol.* **44**, 26 (2017).
- 9) R. Patra, et al.: *J Med. Virol.* **94**, 615 (2020).
- 10) S. Tojo, et al.: *Nat. Commun.* **11**, 1 (2020).

最近の研究動向 プロフィール

応力に対し変形する分子結晶：明確な結晶構造変化が鍵

関 朋宏 Tomohiro SEKI
静岡大学 理学部 化学科
Department of Chemistry, Faculty of Science,
Shizuoka University
〒422-8529 静岡市駿河区大谷836 理学部B313
836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka 422-8529, Japan
e-mail: seki.tomohiro@shizuoka.ac.jp
最終学歴：千葉大学大学院
専門分野：有機化学，機能性材料化学
現在の研究テーマ：刺激応答性発光材料の研究

氷XIXの発見—複数通りの配向秩序化

山根 峻 Ryo YAMANE
東北大学 金属材料研究所
Institute for Materials Research Tohoku University
〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平2-1-1
2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai, 980-8577 Japan
e-mail: ryo.yamane.c2@tohoku.ac.jp
最終学歴：東京大学大学院理学研究科博士課程
修了
専門分野：固体化学物理 高圧力科学
現在の研究テーマ：含水固体の構造・物性
趣味：自然に触れること（山登りなど）

化学置換なしで高い伝導度を示すプロトン伝導体

村上泰斗 Taito MURAKAMI
東北大学工学研究科
Department of Electronic Engineering, Tohoku
University
〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-05
6-6-05 Aza-Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai, Miyagi
980-8579, Japan
e-mail: taito.murakami.b7@tohoku.ac.jp
最終学歴：京都大学大学院工学研究科博士課程
修了
専門分野：無機固体化学，磁性材料
現在の研究テーマ：高周波領域での使用に資する
磁性材料の開発

アンタゴニストによるTLR7の阻害機構の構造基盤

張 志寛 Zhikuan ZHANG
東京大学大学院薬学系研究科
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the
University of Tokyo
〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan
e-mail: zhang@mol.f.u-tokyo.ac.jp
専門分野：構造生物学
現在の研究テーマ：自然免疫系タンパク質の構造
趣味：料理

八島正知 Masatomo YASHIMA
東京工業大学理学院化学系
School of Chemistry, Tokyo Institute of Technology
〒152-8551 東京都目黒区大岡山2-12-1 西4号館
410号室
W4-410, 2-12-1 Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152-
8551, Japan
e-mail: yashima@cms.titech.ac.jp
最終学歴：東京工業大学大学院博士課程修了
専門分野：無機固体化学
現在の研究テーマ：イオン伝導体等新構造型機
能性材料の探索，結晶構造解析と構造物性