

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「ライフサイエンスの革新を目指した構造
生命科学と先端的基盤技術」

研究課題「自然免疫における一本鎖核酸認識受容
体の構造解明およびその応用」

研究終了報告書

研究期間 2013年10月～2020年3月

研究代表者：清水敏之
(東京大学大学院薬学系研究科、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

一本鎖核酸をリガンドとするすべての TLR7 ファミリー分子(TLR7, TLR8, TLR9)において細胞外ドメインと各リガンドの複合体構造解析に成功し、リガンド結合部位を同定するとともに原子レベルでのリガンド認識機構を解明することが出来た。さらには構造情報に基づいた機能解析も行った。

TLR7/8 はともに一本鎖 RNA(ssRNA)によって活性化されるが、TLR8-ssRNA 複合体、および、TLR7-グアノシン-ssRNA 複合体の解析を通して以下のことを明らかにした。

- ① TLR7, TLR8 ともに2つのリガンド結合サイト(第1結合部位と第2結合部位)を有する
- ② 2量体界面に存在する第1結合部位には ssRNA の分解産物であるモノヌクレオシドが結合する。化学合成リガンドも同一部位に結合する。
- ③ 第2結合部位にはオリゴヌクレオチドが結合する。TLR7 では非末端 U が必須である。
- ④ モノヌクレオシド単独では第1結合部位への結合力や活性化能は弱い。しかし、第2結合部位へのオリゴヌクレオチドの結合により相乗効果が生じ、モノヌクレオシドの結合力や活性化能は飛躍的に高まる。

以上の結果より、TLR7/8 は ssRNA によって直接活性化されるのではなく、オリゴヌクレオチド存在下においてその分解産物であるモノヌクレオシドが結合することにより活性化されることが判った。また本研究により、化学的にも構造的にも全く異なる RNA と化学合成リガンドにより TLR7/8 が同様に活性化する理由が解明された。モノヌクレオシドであればアゴニスト活性をもつ化学合成リガンドと構造的にも化学的にも極めて類似しているため、両者が同様に活性化できることは合理的に説明できる。

TLR9 は CpG 配列を含む一本鎖 DNA(CpG-DNA)によって活性化される。我々は DNA 非結合状態、CpG-DNA との複合体、アンタゴニスト DNA との複合体の結晶構造解析を通して以下のことを明らかにした。

- ⑤ TLR9 も TLR7/8 と同様に2つのリガンド結合サイトをもつ。5'-xCx モチーフをもつ DNA と CpG-DNA がそれぞれ異なる部位に結合し、両者が相乗的に働くことで結合力や活性化能を飛躍的に高める。
- ⑥ アンタゴニスト DNA は CpG-DNA よりも結合力が強く、CpG-DNA 結合部位と一部重なる部位に結合することで TLR9 の活性化を阻止する。

以上のすべての研究において清水グループは構造解析を、柴田グループは分子細胞生物・免疫学的な実験を担当し、緊密な情報交換のもとに共著論文を発表している。

一連の研究を通じて当初計画において想定されなかった新知見は、TLR7 ファミリーが核酸の分解産物を認識する自然免疫センサーであったということである。TLR7 ファミリーはエンドリソソームで機能するが、エンドリソソームに到達した一本鎖核酸はそこに豊富に存在するヌクレアーゼやホスファターゼなどの分解酵素によって分解されることは容易に想像できる。同様に、TLR9 による一本鎖 DNA 認識において CpG-DNA に加え 5'-xCx が TLR9 の活性化に必要であるという構造科学的発見は TLR9 応答における DNA プロセシングの重要性を示唆している。実際に柴田のグループにより CpG-A クラスと呼ばれる TLR9 リガンドによる TLR9 の活性化は DNA 分解酵素 DNaseII による切断が必須であることが報告されている。一方で Z-loop の切断という TLR7 ファミリー自身のプロセシングがなぜ活性発現に必要であるかも構造科学的に明らかとなった。このように TLR7 ファミリーの活性化には、受容体側およびリガンド側の両者のプロセシングが必要であることがわかった。

エンドリソソーム内において外来病原体由来の RNA が実際にヌクレオシドレベルまで分解されるのか否かに関しては今後の検証が待たれるが、自己免疫疾患の発症が感染を伴わないことから

内在性の RNA やヌクレオシドが TLR7/8 の活性化に関与する可能性も否定できない。非常に興味深いことにリソソームに存在するヌクレオシドトランスポーター SLC29A3 の機能低下変異では、非感染時にもエンドリソソーム内 G/dG が蓄積し、自己炎症性疾患の一つである H 症候群を発症する。この結果はエンドリソソームには常時 RNA や DNA が供給されることを示唆しており、柴田グループでは同疾患の発症における TLR7 の関与を見出している。

(2) 顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

1.

概要:

TLR8 と ssRNA 複合体の詳細な三次元構造明らかにした。その結果、TLR8 は ssRNA だけを認識しているのではなく、ssRNA および ssRNA が分解されて生じるウリジンの両者を同時に異なる部位で認識し、両者の協調的な作用によって活性化されることが明らかとなった。この発見は、TLR8 は ssRNA そのもののセンサーであるというこれまでの常識を覆す発見である。本成果は *Nature Struc Mol Biol* (2015) に掲載され、同じ号の News&Views でも取り上げられた。

2.

概要:

CpG 配列を含む一本鎖 DNA によって活性化される TLR9 のリガンド非結合型、アンタゴニスト DNA 結合型、アゴニスト活性をもつ CpG-DNA 結合型の構造解明に世界で初めて成功した。前者 2 つは単量体として存在する一方、CpG-DNA 結合型は活性型の 2:2 複合体を形成していた。本研究により TLR9 を活性化または不活性化する DNA と TLR9 との結合様式が原子レベルで解明された。本成果は *Nature* (2015) に掲載された。

3.

概要:

TLR7 と一本鎖 RNA (polyU) と 2 種類の低分子リガンド (グアノシン、loxoribine) との複合体構造を決定し、TLR7 はそれぞれのリガンドと 2 : 2 : 2 の複合体を形成することで活性化型 2 量体となることが明らかにした。低分子リガンドは 2 量体の界面に位置する第 1 結合部位に、polyU は TLR7 のリング型構造の凹面の第 2 結合部位に位置していた。構造解析と生化学的実験の結果、TLR7 はこれらの 2 種類のリガンドによって協調的に活性化されることが明らかになった。本成果は *Immunity* (2016) に掲載された。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1.

概要:

TLR7/8 は有機合成展開可能な低分子化合物をリガンドとすることが可能であるため、これまで様々な医薬化学的な研究が行われてきた。今回、アゴニスト活性をもつリガンド認識機構が原子レベルで明らかになったことに伴いさらに分子設計が容易になる。また、協調効果を示す結合サイトも明らかになり、このサイトを狙った分子設計も可能になる。

2.

概要:

TLR8 と阻害剤との複合体の X 線結晶構造解析により、阻害剤による TLR8 の応答阻害機構を明らかにした。今回解析した阻害剤は、TLR8 のリガンド非結合型の二量体構造で形成されたポケットに結合して構造を安定化し、アゴニストによる活性型二量体への再構成を防いで阻害効果を発揮することが判明した。アンタゴニスト結合ポケットの存在を明らかにしたことでこのサイトを狙った分子設計が可能になる。

3.

概要:

TLR7/8 の過剰応答が自己免疫疾患や自己炎症性疾患の原因となり得ることはマウスモデルの解析から示唆されてきた。しかしながら、ヒトにおける同様の疾患において TLR7/8 が関与するかは未だ曖昧である。TLR7/8 がヌクレオシドを認識するセンサーであったことはヌクレオシド代謝異常が関係するヒト疾患に TLR7/8 が関与することを強く示唆しており、実際に H 症候群は TLR7 依存症であった。同様の観点から、TLR7/8 の関与する様々なヒト疾患が明らかになることが期待される。

< 代表的な論文 >

Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA (2015)

Tanji, H., Ohto, U., Shibata, T., Taoka, M., Yamauchi, Y., Isobe, T., Miyake, K., and Shimizu, T.
Nature Struct. Mol. Biol. **22**, 109-115

Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9 (2015)

Ohto, U., Shibata, T., Tanji, H., Ishida, H., Krayukhina, E., Uchiyama, S., Miyake, K., and Shimizu, T.
Nature **520**, 702-705

Structural basis for activation of Toll-like receptor 7, a dual receptor for guanosine and single-stranded RNA (2016)

Zhang, Z., Ohto, U., Shibata, T., Krayukhina, E., Taoka, M., Yamauchi, Y., Tanji, H., Isobe, T., Uchiyama, S., Miyake, K., and Shimizu, T.
Immunity **45**, 737-748

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「清水」グループ

研究代表者: 清水 敏之 (東京大学大学院薬学系研究科、教授)

研究項目

一本鎖核酸認識 TLR の構造生物学的研究

- ・ 構造解析用組換えタンパク質の大量発現、精製、結晶化
- ・ 核酸および各種合成リガンドとの X 線結晶構造解析
- ・ 物理化学手法に基づく相互作用解析 (ITC, 超遠心分析など)

② 「柴田」グループ

主たる共同研究者: 柴田 琢磨 (東京大学医科学研究所、助教)

研究項目

一本鎖核酸認識 TLR の分子細胞生物学的研究

- ・ 構造情報に基づく変異体 TLR の生物活性測定
- ・ トランスジェニックマウスの作製および解析

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

結晶中の ssRNA 分析および細胞内に蓄積するヌクレオシドの解析は同 CREST 研究領域の首都大学東京理学研究科、磯辺教授のグループとの共同研究により質量分析法を用いて行っている。超遠心分析では大阪大学工学部の内山教授のグループ、TLR7/8 のアゴニスト、アンタゴニストではミネソタ大学の Sunil 教授のグループ、コロラド大学の Yin 教授（現所属：精華大学）のグループと共同研究を行っている。

また、SLC29A3 異常症（H 症候群）患者由来の血液サンプルなどは自治医科大学医学部の大槻マミ太郎先生および小宮根真弓先生との共同研究により解析を行っている。