

「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

平成 13 年度採択研究代表者

三宅 健介

(東京大学医科学研究所 教授)

「病原体糖脂質認識シグナル伝達機構の解明」

1. 研究実施の概要

エンドトキシン (LPS, Lipopolysaccharide) はグラム陰性菌の膜を構成する糖脂質である。その認識分子は長い間謎であったが、Toll-like receptor 4 (TLR4)と、TLR4 に会合する分子 MD-2 からなることを我々はこれまで明らかにしてきた。本研究においては、TLR4/MD-2 による LPS 認識機構を明らかにし、その知見を利用して、TLR4/MD-2 を標的とした新たな、LPS 応答の制御法を開発し、エンドトキシンショックなどの新規治療法の基盤技術開発を目指す。そのために、TLR4/MD-2 の機能解析ばかりでなく、MD-2 の構造解析、さらにはリガンドである LPS の構造活性相関についても検討を進めている。

昨年度までに、TLR4/MD-2 と LPS との結合、結合後の TLR4 の多量体形成において、MD-2 のそれぞれ異なるアミノ酸が重要であることを示した。TLR4 の多量体形成に重要なアミノ酸は、これまで報告されているリガンド結合に重要な領域に含まれており、この領域がリガンド結合、TLR4 多量体形成の両方を制御していることが明らかとなった。この知見は、この領域を標的とする薬剤の開発の可能性を示唆するものであり、MD-2 の構造生物学的解析の結果によって、さらにこの領域の重要性が明らかとなると期待される。MD-2 の構造解析については、十分なX線回折能を有する単結晶を得ることができた。重原子同型置換結晶の調製・探索を経て、結晶のX線回折強度データを高分解能で収集し、構造解析の見通しを得た。また、MD-2 とリガンドとの共結晶を試みるための lipid A の作成、活性の検討も進めている。

2. 研究実施内容

I. 三宅グループ

エンドトキシン (LPS, Lipopolysaccharide) はグラム陰性菌の外膜を構成する糖脂質で、さまざまな病原体成分の中でも最も強く免疫機構を活性化する。その認識分子は Toll-like receptor 4 (TLR4) と、TLR4 の細胞外ドメインに会合する分子 MD-2 からなる。本年度は、TLR4/MD-2 による LPS 認識について、以下のことが明らかとなった。

- (1) リガンド刺激後の TLR4 の多量体形成において、MD-2 が制御に関わっているか否か、関わっているとすればどの部位のアミノ酸が重要であるか検討するために、MD-2 のそれぞれのアミノ酸をアラニンに置換したミュータントを作成し、細胞株に発現させて、LPS との結合、多量体形成について検討した。その結果、LPS との結合には 59 番目のグリシンが、刺激後の多量体形成には 126 番目にフェニルアラニン、129 番目にグリシンがそれぞれ特異的に重要であることが明らかとなった。この結果は MD-2 がリガンド刺激における多量体形成に関与していること、また LPS 結合とは異なるアミノ酸が関与していることを示している。また、ほかのグループからの報告で、119-132 番目のアミノ酸からなる領域が、リガンド結合に重要であることが報告されている。多量体形成に重要な 126 番目、129 番目のアミノ酸はともにこの領域に入ることから、この領域がリガンド結合と多量体系性の両方の関与していることが明らかとなった。この知見は、MD-2 の構造が明らかとなったときに、構造と機能の連関を検討する上で重要な事実となると予想される。
- (2) TLR4 に会合する新たな分子 PRAT4A (PRotein Associated with Tlr4 A) と PRAT4B をクローニングした。これらの分子は TLR4 に会合するが、構造の類似した TLR2 や RP105、あるいは MD-2 には会合しない。現在これらの分子の LPS 認識における役割を検討している。

II. 佐藤グループ

ヒトの MD-2 の X 線結晶構造解析のため、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いたタンパク質の大量発現、精製と結晶化のシステムを確立し、十分な X 線回折能を有する単結晶を得ることができた。重原子同型置換結晶の調製・探索を経て、結晶の X 線回折強度データを高分解能で収集し、構造解析の見通しを得た。また、ヒトおよびマウスの TLR4 の X 線結晶構造解析に向けて、これらタンパク質の細胞外ドメインの大量発現系の構築を進めた。MD-2 と相互作用すると考えられるアミノ末端側の領域を発現させ、アミノ末端側 54 番目の残基までと 203 番目までの残基までのポリペプチド鎖を発現させることができた。

III. 深瀬グループ

TLR4-MD-2 との相互作用解析や、活性発現のための構造要因を明らかにし、さらには新規アゴニストならびにアンタゴニストの創成を目的として以下の合成実験を行った。

- (1) リポ多糖部分構造の合成と生物活性に関する研究として、ペスト菌やヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) の LPS を合成し、その活性を検討したところ、どちらも拮抗作用を示した。
- (2) リピド A ならびにその類縁体の合成として、リピド A の 2 本のアシル鎖を架橋すると、架橋していない類縁体よりも環状構造をもつ類縁体の方が強い誘導活性を示した。

(3) リピド A 標識体の合成

3. 研究実施体制

「三宅健介」グループ

- ①研究分担グループ長：三宅 健介（東京大学、教授）
- ②研究項目：病原体糖脂質認識シグナル伝達機構の解明、TLR coreceptor の検索、エンドトキシンショックの新たな治療法の開発

「佐藤能雅」グループ

- ①研究分担グループ長：佐藤 能雅（東京大学、教授）
- ②研究項目：X線解析に向けた MD-2 タンパク質などの発現精製と結晶化

「深瀬浩一」グループ

- ①研究分担グループ長：深瀬 浩一（大阪大学、教授）
- ②研究項目：リピド A ならびに類縁体、標識体の合成

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Nagai Y, Kobayashi T, Motoi Y, Ishiguro K, Akashi S, Saitoh S, Kusumoto Y, Kaisho T, Akira S, Matsumoto M, Takatsu K, Miyake K. The Radioprotective 105/MD-1 Complex Links Toll-like Receptor 2 (TLR2) and TLR4/MD-2 in Antibody Response to Microbial Membranes. *J. Immunol.* 174: 7043-7049. 2005.
- Inamine A, Takahashi Y, Baba N, Miyake K, Tokuhisa T, Takemori T, Abe R. Two waves of memory B-cell generation in the primary immune response. *Int Immunol.* 17:581-589. 2005.
- Nagaoka K, Takahara K, Tanaka K, Yoshida H, Steinman RM, Saitoh S, Akashi-Takamura S, Miyake K, Kang YS, Park CG, Inaba K. Association of SIGNR1 with TLR4-MD-2 enhances signal transduction by recognition of LPS in gram-negative bacteria. *Int Immunol.* 17:827-836. 2005.
- Konno K, Wakabayashi Y, Akashi-Takamura S, Ishii T, Kobayashi M, Takahashi K, Kusumoto Y, Saitoh S, Yoshizawa Y, Miyake K. A molecule that is associated with Toll-like receptor 4 and regulates its cell surface expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 339:1076-1082. 2006.
- Akashi-Takamura S, Furuta T, Takahashi K, Tanimura N, Kusumoto Y, Kobayashi T, Saitoh SI, Adachi Y, Doi T, Miyake K. Agonistic Antibody to Toll-like receptor 4/MD-2 Protects

- Mice from Acute Lethal Hepatitis Induced by Tumor Necrosis Factor- α J. Immunol., 2006, 176: 4244 - 4251
- Kobayashi M, Saitoh S. -I, Tanimura N, Takahashi K, Kawasaki K, Nishijima M, Fujimoto Y, Fukase K, Akashi-Takamura S, Miyake K. Regulatory Roles for MD-2 and Toll-like receptor 4 (TLR4) in Ligand-induced Receptor Clustering. J. Immunol., 2006, in press.
 - Y. Fujimoto, E. Kimura, S. Murata, S. Kusumoto, and K. Fukase. Synthesis and bioactivity of fluorescence- and biotin-labeled lipid A analogues for investigation of recognition mechanism in innate immunity. Tetrahedron Lett., 47 (4), 539-543. 2006.
 - S. C. Gangloff, G. Ladam, V. Dupray, K. Fukase, K. Brandenburg, M. Guenounou, P. Schaaf, J.-C. Voegel, N. Jessel. Biologically active lipid A antagonist embedded in a multilayered polyelectrolyte architecture. Biomaterials 27, 1771-1777. 2006.
 - Y. Fujimoto, Y. Adachi, M. Akamatsu, Y. Fukase, M. Kataoka, Y. Suda, K. Fukase, and S. Kusumoto. Synthesis of lipid A and its analogues for investigation of the structural basis for their bioactivity. J. Endotoxin Res., 11 (5), 341-347. 2005.
 - K. Tanaka, T. Goi, and K. Fukase. Highly efficient sialylation towards a(2-3)- and a(2-6)-Neu5Ac-Gal synthesis: significant 'fixed dipole effect' of *N*-Phthalyl group on a -selectivity. Synlett, (19), 2958-2962. 2005.
 - U. Seydel, A. B. Schromm, L. Brade, S. Gronow, J. Andra, M. Muller, M. H. J. Koch, K. Fukase, M. Kataoka, M. Hashimoto, S. Kusumoto, and K. Brandenburg. Physicochemical characterization of carboxymethyl lipid A derivatives in relation to biological activity. FEBS J., 272., 327-340. 2005.
 - K. Fukase, M. Takashina, Y. Hori, D. Tanaka, K. Tanaka, and S. Kusumoto. Oligosaccharide synthesis by affinity separation based on molecular recognition between podand ether and ammonium ion. Synlett, (15), 2342-2346. 2005.
 - H. Tokimoto, and K. Fukase. New deprotection method of the 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl (Troc) group with (Bu₃Sn)₂. Tetrahedron Lett., 46 (40), 6831-6832. 2005.

(2) 特許出願

H17 年度出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 3 件)