

氏 名 丹治 裕美

Toll 様受容体 (TLR) は、病原体の分子パターンを認識して自然免疫を活性化させる I 型膜蛋白質である。TLR はリガンド認識を行う細胞外ロイシンリッチリピート (LRR) ドメイン、膜貫通ヘリックス、シグナル伝達を行う細胞内 TIR ドメインから構成されている。

TLR7/8/9 は一本鎖核酸を認識するサブファミリーを構成しており、そのうち TLR7/8 はウィルス由来の一本鎖 RNA を認識しウィルス感染に関わっている。一方で自己由来の RNA も認識し、自己免疫性疾患に関係することが指摘されている。

TLR8 に関する近年の構造生物学的研究によってアゴニストによる活性化機構が解明され、TLR8 はリガンド非結合状態では不活性化型の 2 量体であり、アゴニスト結合によって活性化型の 2 量体へ再構成されてシグナルを伝達すると明らかになった。その一方で、TLR8 の活性抑制機構は未知であった。例えば TLR7/8/9 の活性化には LRR ドメイン中のループ領域 (Z-loop) の切断が必要であるが、これまで構造解析に用いられている野生型 TLR8 は既に Z-loop で切断されており、Z-loop による活性制御に対する構造生物学的知見は得られていなかった。また、TLR8 の活性化を抑制するアンタゴニストは免疫抑制剤として働くと考えられ、自己免疫疾患治療薬の候補として期待されているが、これまでその結合部位および作用機序に関しては不明であった。

本論文は、TLR8 について、Z-loop による内因性の活性制御機構と、アンタゴニストによる外因性の活性制御機構の解明を目的とした構造生物学的な研究成果を述べたものである。

まず Z-loop による活性制御機構の解明について記す。野生型ヒト TLR8 細胞外ドメイン (TLR8<sup>wt</sup>) をショウジョウバエ S2 細胞で発現させると、精製時に既に Z-loop 中の R455 と S456 の間で切断されることが先行研究で示されている。そこで Z-loop で切断されることを防ぐため切断部位直前の RKRR に 2～4 残基の変異を導入したコンストラクトを検討した結果、4 残基すべてを NQSN に置換した変異体 (TLR8<sup>Z-loop</sup>) で Z-loop の切断が抑制できることを見出した。ゲル濾過クロマトグラフィーと等温滴定カロリーメトリー (ITC) の結果から、TLR8<sup>Z-loop</sup> は単量体であり、ssRNA は結合するが、低分子アゴニストは結合しないことが明らかになった。

TLR8<sup>Z-loop</sup> を糖鎖生合成阻害剤キフネンシン存在下にて発現させ高純度精製し、結晶化を行った。分解能 2.5 Å で構造決定した結果、TLR8<sup>Z-loop</sup> は単量体であり、その構造は TLR8<sup>wt</sup> のプロトマーと類似していた。さらに Z-loop 中の 443～451 残基目の電子密度が TLR8<sup>wt</sup> において 2 量

体を形成する界面側に新たに観察された。新規に見出されたこの Z-loop の一部は 2 量体を形成する相手となる TLR8 分子と衝突し、TLR8 の 2 量体化を阻害することが示された。

また、これまでの構造生物学的研究から、TLR8 のリガンド結合部位は 2 種類存在することが明らかになっている。1 つ目は低分子アゴニストやウリジンを結合し、活性化型 2 量体への構造変化を引き起こす 1<sup>st</sup> site であり、2 つ目は ssRNA を結合し 1<sup>st</sup> site へのリガンド結合を促進する 2<sup>nd</sup> site である。低分子アゴニストが TLR8<sup>Z-loop</sup> に結合しなかった理由として、1<sup>st</sup> site は 2 分子の TLR8 によって構成され、単量体である TLR8<sup>Z-loop</sup> では存在しないためだと考察している。一方で ssRNA は TLR8<sup>Z-loop</sup> に対して TLR8<sup>wt</sup> と同様に結合したが、その理由は 2<sup>nd</sup> site は 1 分子の TLR8 によって構成され TLR8<sup>Z-loop</sup> でも存在するためだと述べている。

次に、アンタゴニストによる TLR8 の活性制御機構の解明について記す。本論文では、アンタゴニストとして、University of Colorado Boulder の Hang Yin 教授から供与された CU-CPT8m および CU-CPT9b (まとめて CU-CPT 化合物と記す) を用いた。まず、TLR8<sup>wt</sup> と CU-CPT 化合物の間の親和性を ITC により測定した結果、結合解離定数は 224 nM (CU-CPT8m) と 21 nM (CU-CPT9b) と算出され、両者とも TLR8<sup>wt</sup> に直接結合することが示された。さらに、CU-CPT 化合物存在下の TLR8<sup>wt</sup> に対して低分子アゴニストを滴定すると熱の出入りはほとんど観測されず、低分子アゴニストの TLR8<sup>wt</sup> に対する親和性が低下することが示された。

TLR8<sup>wt</sup> と CU-CPT 化合物を共結晶化し、分解能 2.4 Å (CU-CPT8m) と 2.3 Å (CU-CPT9b) で構造決定した結果、CU-CPT 化合物結合型 TLR8<sup>wt</sup> はリガンド非結合型 2 量体構造と類似した不活性化型 2 量体を形成していた。アンタゴニストは 2 量体界面の 2 箇所の疎水性ポケットに結合していた。この結合ポケットは LRR11-13 と LRR15\*-16\* (2 量体を構成する 2 分子の TLR8 の一方を無印で、他方をアスタリスクをつけて表記する) で形成され、不活性化型 2 量体のみに存在していた。アンタゴニストは、Y348 および F425\* とのスタッキング相互作用、F405 や F494\* などとの疎水性相互作用、G351 および V520\* との水素結合によって認識されていた。

本研究により、TLR8 の Z-loop は 2 量体形成を抑制する自己阻害ループであり、プロテアーゼによる切断によりその阻害が解除され 2 量体形成が可能となるという活性制御機構が明らかになった。Z-loop によるこの活性制御機構は TLR7/8/9 に共通する構造基盤である可能性がある。また、TLR8 の不活性化型 2 量体構造中に存在するアンタゴニスト結合ポケットに CU-CPT 化合物が結合し、不活性化型 2 量体を安定化することで活性を抑制するという TLR8 の活性制御が明らかになった。本知見は構造解析によってはじめて得られたものであり、TLR8 を標的とした自己免疫性疾患治療薬の開発に寄与するだろう。本論文はこれまで不明だった TLR8 の活性抑制機構を解明したものであり、博士 (薬科学) の学位請求論文として合格と認められる。