

博士論文

自然免疫受容体 TLR7 の
構造生物学的研究

張 志寬

目次

略語一覧	12
1. 背景	16
1.1. 自然免疫と TLR	16
1.2. TLR のリガンド認識機構および活性化機構	17
図 1. ヒト TLR とそのリガンド	19
図 2. TLR のドメイン構成および活性化機構	20
1.3. TLR7 サブファミリーについて	21
図 3. TLR7,TLR8,TLR9 のアミノ酸配列のアラインメント	23
1.4. TLR7 のアゴニストリガンドについて	24
図 4. TLR7 のアゴニストリガンド	26
図 5. 既報の TLR8 および TLR9 の結晶構造	27
1.6. TLR7 のアンタゴニストリガンドについて	28
図 6. TLR7 のアンタゴニストリガンド	29
1.7. 本研究の目的.....	30
2. 材料および方法.....	31
2.1. アゴニストによる TLR7 の活性化機構.....	31

2.1.1. TLR7 発現ベクターの構築.....	31
図 7. TLR7 の発現に使用した pMT/BiP/V5-His A ベクターおよび TLR7 の発現領域	33
図 8. TLR7 の発現領域の DNA 配列およびアミノ酸配列	35
2.1.2. TLR7 安定発現株の作製.....	35
2.1.3. 生化学実験用 TLR7 タンパク質の調製.....	37
図 9. TLR7 細胞外ドメインの発現および精製のフローチャート	40
図 10. TLR7 (野生型かつ糖鎖非切断体) の精製過程の各チャート	41
図 11. TLR7 (糖鎖結合部位変異体かつ糖鎖非切断体) の精製過程の各チャート	42
2.1.4. 結晶化用 TLR7 タンパク質の調製	43
図 12. TLR7 (糖鎖結合部位変異体かつ糖鎖切断体) の精製過程の各チャート	45
2.1.5. ゲルろ過クロマトグラフィー分析	46
2.1.6. 超遠心分析 (沈降速度法).....	47
2.1.7. ITC 分析	48
2.1.8. 結晶化および X 線結晶構造解析	49
2.1.8.1. TLR7/Guanosine/polyU_19mer 複合体の結晶化	49
図 13. 構造解析に成功した結晶の例.....	51

2.1.8.2. TLR7/Loxoribine/polyU_19mer 複合体の結晶化	52
2.1.8.3. TLR7/R848 複合体の結晶化.....	53
2.1.8.4. その他の TLR7/アゴニスト複合体の結晶化.....	54
2.1.9. 結晶の液体クロマトグラフィー質量分析	56
2.1.9.1. 分析サンプルの準備	56
2.1.9.2. 液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS).....	57
図 14. LC-MS 分析に使用した結晶溶液の SDS-PAGE	58
2.1.10. NF- κ B レポーターアッセイ	58
2.1.11. TLR7 の site 2 変異体の調製.....	60
図 15. TLR7 site 2 変異体のゲルろ過クロマトグラフィー精製のチャート.....	62
2.2. アンタゴニストによる TLR7 の阻害機構.....	63
2.2.1. TLR7 タンパク質の調製.....	63
2.2.2. 結晶化および X 線結晶構造解析	63
2.2.3. ITC 分析	65
2.2.4. クロスリンクアッセイ	65
2.2.5. 電子顕微鏡解析用サンプルの調製.....	66
2.2.5.1. TLR7/リガンド複合体の調製 (負染色電顕および 200-kV クライオ電顕)...	66

2.2.5.2. TLR7/Cpd-7 複合体の調製 (Titan Krios).....	68
2.2.6. 負染色電子顕微鏡測定とデータ解析	69
2.2.7. クライオ電子顕微鏡測定.....	69
2.2.7.1. 200 kV のクライオ電子顕微鏡での測定.....	69
2.2.7.2. 300 kV のクライオ電子顕微鏡での測定.....	71
2.2.8. クライオ電子顕微鏡データ解析および構造モデリング	72
2.2.9. PMBC サイトカイン生産抑制アッセイ	73
3. 結果.....	75
3.1. アゴニストによる TLR7 の活性化機構.....	75
3.1.1. TLR7 は 2 種類のアゴニストリガンドを認識する	75
3.1.1.1. リガンド非結合 TLR7 は単量体である	75
図 16. TLR7 精製サンプルの SDS-PAGE 分析	77
図 17. ゲル濾過クロマトグラフィーによる TLR7 の会合状態の分析 (一).....	78
3.1.1.2. アゴニストリガンドは TLR7 の二量体化を誘導する	79
図 18. ゲル濾過クロマトグラフィーによる TLR7 の会合状態の分析 (二).....	81
図 19. SV-AUC による TLR7 の会合状態の分析 (一)	82
3.1.1.3. ssRNA は低分子アゴニストの結合を促進する.....	82

図 20. ITC 分析の thermograms (一).....	85
図 21. ゲル濾過クロマトグラフィーによる TLR7 の会合状態の分析 (三).....	86
3.1.1.4. ssRNA のみでは TLR7 の二量体化を誘導しない	87
図 22. SV-AUC による TLR7 の会合状態の分析 (二)	89
3.1.1.5. リガンド認識の pH 特異性.....	90
図 23. TLR7 とリガンドとの結合の pH 依存性	92
3.1.2. 天然アゴニストによる TLR7 の活性化機構.....	93
3.1.2.1. TLR7/G/polyU および TLR7/Loxo/polyU 複合体の結晶構造.....	93
図 24. TLR7/リガンド複合体結晶構造 (一).....	97
図 25. TLR7/G/polyU 複合体における TLR7 のプロトマー構造	98
図 26. TLR7/G/polyU 複合体の全体構造.....	99
図 27. TLR7/G/polyU 複合体における TLR7 のプロトマーの表面図	100
図 28. TLR7/G/polyU 複合体におけるリガンド結合部位	101
図 29. TLR7, TLR8 および TLR9 活性化型二量体の比較.....	102
図 30. TLR7, TLR8 および TLR9 の Z-loop の比較.....	103
図 31. 各種 TLR7 およびヒト TLR8 細胞外ドメインのアミノ酸配列のアラインメント	105

3.1.2.2. Site 1 における guanosine の認識機構	105
図 32. TLR7 の site 1 におけるリガンドの電子密度	108
図 33. Site 1 における guanosine および loxoribine の認識機構.....	109
3.1.2.3. TLR7 は guanosine センサーである	110
3.1.2.4. Site 2 における ssRNA の認識機構.....	111
図 34. UUU の電子密度.....	114
図 35. 結晶溶液の LC-MS 分析	115
図 36. Site 2 の形成に重要であるジスルフィド結合	116
図 37. UUU と TLR7 との間の相互作用の模式図.....	117
3.1.2.5. TLR7 は ssRNA センサーである.....	118
図 38. TLR7 と ssDNA との結合の分析.....	119
3.1.2.6. 非末端 uridine 塩基は TLR7 の ssRNA 認識に必須である.....	120
3.1.2.7. Site 1, site 2 および二量体界面残基の機能的な重要性.....	121
図 39. ヒト TLR7 の site 1 および site 2 変異体を用いた NF- κ B レポーターアッセイ	123
図 40. TLR7 の site 2 変異体のゲルろ過クロマトグラフィー分析	124
図 41. ITC 分析の thermograms (二).....	125

図 42. ヒト TLR7 の二量体界面における残基の変異体を用いた NF- κ B レポーターアッセイ	126
3.1.2.8. TLR7 は連続した uridine 塩基を含む ssRNA を優先的に認識する	127
図 43. 13 種類の TLR7/IMDQ/ssRNA 複合体の site 2 に観察された電子密度....	132
図 44. 5 種類の TLR7/IMDQ/ssRNA 複合体結晶構造 (一).....	133
図 45. 5 種類の TLR7/IMDQ/ssRNA 複合体結晶構造 (二).....	135
図 46. ITC 分析の thermograms (三).....	137
図 47. マウスまたはヒト TLR7 を用いた NF- κ B レポーターアッセイ	138
図 48. TLR7 の詳細な ssRNA 認識の配列特異性.....	139
3.1.3. 合成低分子アゴニストによる TLR7 の活性化機構.....	140
3.1.3.1. TLR7/合成低分子アゴニスト複合体の結晶構造	140
図 49. TLR7/合成低分子アゴニスト複合体の結晶構造	141
3.1.3.2. IQD の認識機構	141
図 50. IQD および GS9620 の認識機構	144
図 51. TLR7 と低分子アゴニストとの結合解析	146
3.1.3.3. GS9620 の認識機構	147
図 52. GS9620 と guanosine は IQD と比較して K432 残基の異なるコンフォメー	

シオンを誘導した	149
3.2. アンタゴニストによる TLR7 の阻害機構	150
3.2.1. TLR7/リード化合物 (アゴニスト) 複合体の結晶構造	150
図 53. TLR7/リード化合物 (低分子アゴニスト) 複合体の結晶構造.....	152
3.2.2. Cpd-6 および Cpd-7 は TLR7 による PBMC の免疫反応を抑制する	152
図 54. PMBC サイトカイン生産抑制アッセイ	153
3.2.3. TLR7 と各種リガンドとの結合解析	153
図 55. ITC 分析の thermograms (四).....	155
図 56. クロスリンクアッセイによる TLR7 の会合状態の分析.....	156
3.2.4. TLR7/Cpd-6 複合体の結晶構造.....	156
図 57. TLR7/Cpd-6 複合体の結晶構造.....	158
3.2.5. アンタゴニスト結合による TLR7 のコンフォメーション・ダイナミクス..	159
図 58. TLR7/Cpd-3 複合体の調製.....	161
図 59. TLR7 (リガンドなし)、TLR7/Cpd-6 および TLR7/Cpd-7 複合体の調製..	162
図 60. 負染色電子顕微鏡解析	164
図 61. TLR7/Cpd-3 複合体のクライオ電顕データ解析 (Glacios).....	166
図 62. TLR7/Cpd-6 複合体のクライオ電顕データ解析 (Glacios).....	168

図 63. TLR7/Cpd-7 複合体のクライオ電顕データ解析 (Talos Arctica).....	170
図 64. TLR7/Cpd-3、TLR7/Cpd-6 および TLR7/Cpd-7 複合体の密度マップ	171
3.2.6. TLR7/Cpd7 複合体の高分解能クライオ電顕構造.....	171
図 65. TLR7/Cpd-7 複合体の調製 (Titan Krios)	175
図 66. TLR7/Cpd-7 複合体のクライオ電顕データ解析 (Titan Krios).....	177
図 67. TLR7/Cpd-7 複合体のクライオ電顕構造	178
図 68. Cpd-7 周辺の密度マップ.....	179
図 69. 2 種類のコンフォメーションにおける二量体界面とリガンド結合部位の比較.....	180
図 70. 2 種類のコンフォメーションの比較	181
図 71. Cpd-7 の認識機構.....	182
4. 考察.....	183
4.1 アゴニストによる TLR7 の活性化機構.....	183
4.1.1. TLR7 サブファミリーの Z-loop プロセッシングの意義.....	183
4.1.2. TLR7、TLR8 と TLR9 の比較.....	184
図 72. TLR7 の guanosine の認識様式と TLR8 の uridine の認識様式との比較.	187
4.1.3. TLR7 の ssRNA 認識の配列特異性.....	187

4.1.4. TLR7 の低分子アゴニスト認識機構	189
4.1.5. TLR7 の活性化機構	191
図 73. シナジー効果の構造的要因に関する考察	193
図 74. TLR7 の活性化機構	194
4.2 アンタゴニストによる TLR7 の阻害機構	195
4.2.1. アゴニストからアンタゴニストに変換する構造基盤	195
4.2.2. TLR7 の阻害機構	196
図 75. TLR7/Cpd-7 複合体構造と TLR8 非活性化型構造との比較	197
図 76. TLR7 の阻害機構	198
4.3 総論	199
5. 付表	201
表 1. TLR7 site 2 変異体を作成した際のプライマー	201
表 2. X 線結晶構造解析のデータセット収集および構造精密化の統計値 (一)	202
表 3. ITC 分析のまとめ (一)	203
表 4. TLR7/IMDQ/ssRNA 複合体結晶構造および各 ssRNA の ITC 分析のまとめ	204
表 5. X 線結晶構造解析のデータセット収集および構造精密化の統計値 (二)	205
表 6. ITC 分析のまとめ (二)	206

表 7. X線結晶構造解析のデータセット収集および構造精密化の統計値 (三)	207
表 8. クライオ電子顕微鏡データ収集、データ解析および構造精密化の統計値	208
6 参考文献.....	209
7. 謝辞.....	228

略語一覽

8-OA	8-Oxoadenine
A	Adenosine
A ₂₆₀	Absorbance at 260 nm
A ₂₈₀	Absorbance at 280 nm
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CCD	Charge-coupled device
Cryo-EM	Cryogenic electron microscopy
CTF	Contrast transfer function
CV	Column volume
C	Cytidine
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
dsRNA	Double-stranded RNA
FSC	Fourier shell correlation
G	Guanosine
HCQ	Hydroxychloroquine
HCV	Hepatitis C virus

HEK293T	Human embryonic kidney 293T
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IFN- α	Interferon alpha
IQD	Imidazoquinoline derivative
IRF	Interferon regulatory factor
ITC	Isothermal titration calorimetry
K_d	Dissociation constant
LC-MS	Liquid-chromatography mass-spectrometry
Loxo	Loxoribine
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucine-rich repeat
MES	2-(N-mopholino) ethanesulfonic acid
<i>Mm</i>	<i>Macaca mulatta</i>
mRNA	Messenger RNA
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns

PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylene glycol
PolydA	Polydeoxyadenosine
PolydC	Polydeoxycytidine
PolydG	Polydeoxyguanosine
PolydT	Polythymidine
PolydU	Polydeoxyuridine
PolyU	Polyuridine
PRRs	Pattern-recognition receptors
RLU	Relative light units
R.M.S.D	Root mean square deviation
S2	Schneider 2
SAR	Structure activity relationship
SAXS	Small-angle X-ray scattering
SD	Standard deviation
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis

siRNA	Small interfering RNA
SLE	Systemic lupus erythematosus
ssDNA	Single-stranded DNA
ssRNA	Single-stranded RNA
SV-AUC	Sedimentation velocity analytical ultracentrifugation
T	Thymidine
TIR	Toll/Interleucine-1 receptor homology
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
U	Uridine
WT	Wildtype

1. 背景

1.1. 自然免疫と TLR

Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) は病原体センサーの役割を担っている I 型膜貫通タンパク質である (Takeuchi and Akira, 2010)。1980 年代に、ショウジョウバエにおいて Toll 遺伝子が同定され、この遺伝子はショウジョウバエの背腹軸の決定に必要であることが解明された (Anderson et al., 1985; Hashimoto et al., 1988)。その後、この Toll 遺伝子がショウジョウバエの成虫において、真菌に対する免疫反応を制御することがさらに解明された (Lemaitre et al., 1996)。1997 年ヒトにおける Toll 遺伝子と相同性の高い遺伝子 (Toll 様受容体) がクローニングされ (後に TLR4 と改名)、Toll 様受容体が自然免疫に関与することを示した (Medzhitov et al., 1997)。さらに、1998 年 TLR4 はグラム陰性細菌の外膜の構成成分であるリポ多糖 (Lipopolysaccharide: LPS) のシグナル伝達受容体として同定された (Poltorak et al., 1998)。その後、広範な脊椎動物において様々な TLR が同定された。脊椎動物の TLR は高度に保存されている (Roach et al., 2005)。哺乳類動物において、約十数個の TLR が発見され、ヒトには TLR1 から TLR10 まで 10 種類の TLR がある (O'Neill et al., 2013)。

現在、TLR はパターン認識受容体 (Pattern-recognition receptors: PRRs) の一種として、病原体関連分子パターン (Pathogen-associated molecular patterns: PAMPs) および傷害関連

分子パターン (Damage-associated molecular patterns: DAMPs) を認識し、自然免疫を活性化させる受容体としてよく知られている (図 1) (Aderem and Ulevitch, 2000; Janeway Jr and Medzhitov, 2002; Takeuchi and Akira, 2010)。この十数年、各 TLR を活性化させる PAMPs が次々と報告され、さらに、TLR とリガンドとの複合体の結晶構造も数多く報告されてきた。例えば、TLR1/TLR2/リポペプチドの 1:1:1 複合体構造 (Jin et al., 2007)、TLR2/TLR6/リポペプチドの 1:1:1 複合体構造 (Kang et al., 2009)、TLR3/dsRNA の 2:1 複合体構造 (Alexopoulou et al., 2001; Liu et al., 2008)、TLR4/MD2/LPS の 2:2:2 複合体構造 (Hoshino et al., 1999; Nagai et al., 2002; Ohto et al., 2012; Park et al., 2009; Poltorak et al., 1998)、TLR5/フラジェリンの 2:2 複合体構造 (Yoon et al., 2012)、マウス特有の TLR13/ssRNA の 2:2 複合体構造 (Oldenburg et al., 2012; Song et al., 2015) などが報告されてきた。

1.2. TLR のリガンド認識機構および活性化機構

TLR は I 型膜貫通タンパク質である。TLR 分子は、細胞外のロイシンリッチリピート (Leucine-rich repeat: LRR) ドメイン、一回膜貫通ヘリックスドメインおよび細胞内の Toll-interleukin-1 受容体 (TIR) ドメインからなる (図 2) (Takeuchi and Akira, 2010)。LRR は、ロイシンを規則的に含む 20~29 残基の長さを一単位として連続し繰り返すリピートである。

その一単位の配列は高度に保存されており、一般的に LxxLxLxxN/CxL (x は任意のアミノ酸) からなる β シート、ループ領域と α ヘリックスによって構成されている (Kobe and Kajava, 2001)。LRR の繰り返しの回数は TLR によって異なり、ヒトの TLR は 22~26 回のリピート構造を持つ (O'Neill et al., 2013)。TLR は細胞外 LRR ドメインにおいて PAMPs および DAMPs を認識し、細胞質にある TIR ドメインにおいてシグナル伝達を行うとされている (Song and Lee, 2012)。

一般的に、リガンド非結合型の TLR は単量体であり、リガンドを介して LRR ドメインがホモ二量体またはヘテロ二量体を形成する (図 2) (Takeuchi and Akira, 2010)。これまでに、3 次元構造が解明された活性化型の TLR 細胞外ドメインは、いずれも C 末端で向かい合った m 字型の二量体構造を形成していた。細胞外 LRR ドメインの二量体化に伴い、C 末端の TIR ドメイン同士も接近し二量体となると考えられている。TIR 二量体を足場として、下流の TIR ドメインを持つアダプタータンパク質 (TIRAP, MyD88, MAL, TRIF, TRAM) が会合することでシグナル伝達を行うと考えられている。この際、TLR 分子により異なるアダプタータンパク質を使用する (Takeuchi and Akira, 2010)。アダプタータンパク質は最終的に interferon regulatory factors (IRFs)、nuclear factor κ B (NF- κ B) などの転写因子を活性化する。IRF3 や IRF7 は I 型インターフェロンの、NF- κ B は炎症性サイトカインの発現を亢進することにより、生体に種々の免疫反応を引き起こす (Takeuchi and Akira, 2010)。

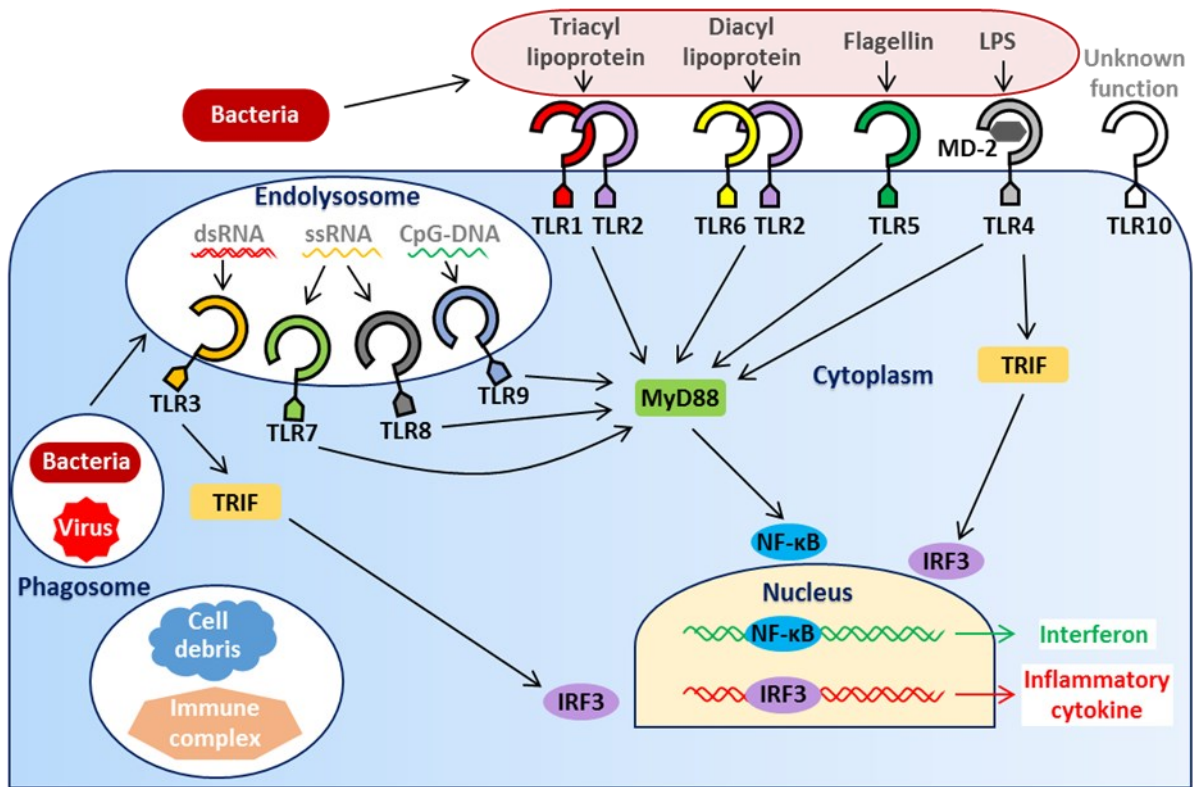


図1. ヒト TLR とそのリガンド

ヒト TLR の種類とそれぞれのアゴニストリガンドを示すモデル図; TLR は細胞膜またはエンドソームに局在し、病原体分子の認識および自然免疫の活性化に関与する。

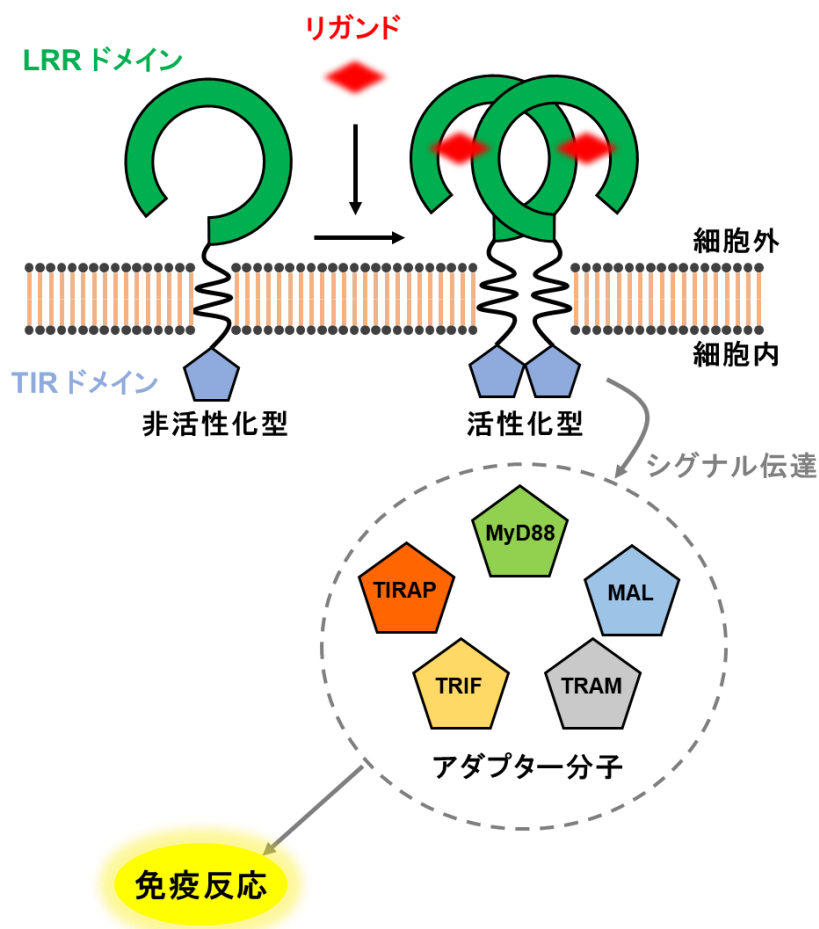


図 2. TLR のドメイン構成および活性化機構

TLR のドメイン構成および活性化機構のモデル図; 一般的に、リガンド非結合型の TLR は単量体であり、リガンドを介して LRR ドメインがホモ二量体またはヘテロ二量体を形成する。LRR ドメインの二量体化に伴い、細胞内の C 末端の TIR ドメイン同士も接近し二量体となる。TIR 二量体を足場として、下流の TIR ドメインを持つアダプター分子が会合することでシグナル伝達を行う。

1.3. TLR7 サブファミリーについて

核酸を認識する TLR としてヒトでは TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 が報告されている (Alexopoulou et al., 2001; Bauer et al., 2001; Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004)。これらの TLR は内因性の核酸による自己免疫反応を回避するため、いずれもエンドソームに局在している (Blasius and Beutler, 2010)。これらのエンドソームへの局在化は Unc93B1 と呼ばれる 12 回膜貫通タンパク質によって行われると報告されている (Kim et al., 2008)。核酸を認識する TLR のうち、TLR7、TLR8 および TLR9 は相同性が高く (アミノ酸配列の一致度がヒトにおいて TLR7-TLR8: 43%; TLR7-TLR9: 36%; TLR8-TLR9: 35%となる)、TLR7 ファミリーと呼ばれるサブファミリーを構成する (図 3)。TLR7 サブファミリーの LRR ドメインは TLR のうちで最も長く、N 末端の LRRNT、LRR1~26 および C 末端の LRRCT によって構成されている。さらに特徴的なことに、LRR14 と LRR15 の間に 30~40 残基程度の Z-loop と呼ばれる長いループ領域が挿入されている (図 3)。このループの切断がリガンド認識および活性化に必要であると多数報告されている (Ewald et al., 2011; Ewald et al., 2008; Hipp et al., 2013; Ishii et al., 2014; Park et al., 2008; Sepulveda et al., 2009)。TLR7 および TLR8 は一本鎖 RNA (single-stranded RNA: ssRNA) の受容体 (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004)、TLR9 は CpG モチーフを含む一本鎖 DNA (single-stranded DNA: ssDNA) の受容体 (Hemmi et al., 2000) として同定された。これらの TLR の細胞分布は異なってお

り、TLR7 および TLR9 は主に形質細胞様樹状細胞や B 細胞に、TLR8 は単球や骨髄系樹状細胞に発現している (Hornung et al., 2002; Marques and Williams, 2005)。

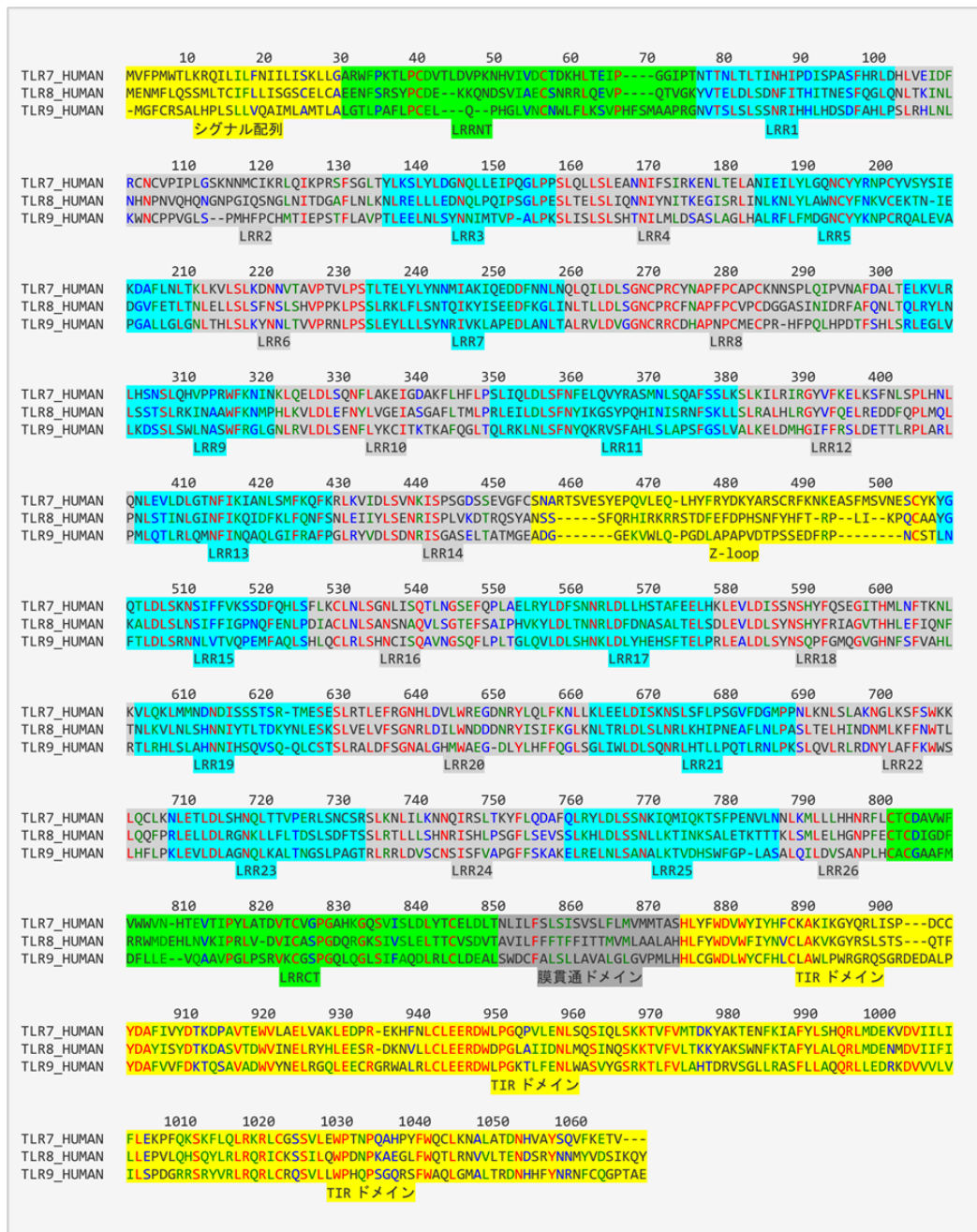


図 3. TLR7,TLR8,TLR9 のアミノ酸配列のアラインメント

ヒト TLR7 (Uniprot entry code: Q9NYK1)、ヒト TLR8 (Uniprot entry code: Q9NR97) およびヒト TLR9 のアミノ酸配列 (Uniprot entry code: Q9NR96) のアラインメントは CLUSTALW ソフトウェア (EMBL-European Bioinformatics Institute) を用いて行った。

1.4. TLR7 のアゴニストリガンドについて

TLR7 は最初にイミダゾキノリン誘導体 (IQD) や guanosine の類似物などの低分子アゴニストにより活性化されると報告され、その後、インフルエンザウィルス、ヒト免疫不全ウィルス 1 (Human Immunodeficiency Virus 1: HIV-1) 由来の ssRNA および polyuridine ssRNA (polyU) によっても活性化されることが明らかになった (図 4) (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2003; Heil et al., 2004; Hemmi et al., 2002; Jurk et al., 2002; Lee et al., 2003; Shibata et al., 2016)。さらに、ウィルス由来の ssRNA のみならず、低分子干渉 RNA (small interfering RNA: siRNA)、自己由来の microRNA let-7 (中枢神経系にある遺伝子発現調節因子) および壊死した細胞から放出された ssRNA も TLR7 を活性化すると報告されている (図 4) (Hornung et al., 2005; Lehmann et al., 2012; Savarese et al., 2006)。また近年、TLR7 をターゲットとした創薬研究が活発的に行われており、例えばギリアド・サイエンシズ社が開発した新規化学骨格を有する TLR7 特異的なアゴニストの GS9620 は、HIV-1 感染症および B 型肝炎ウイルス感染症の治療を目的とした臨床試験が行われている (図 4C) (Gane et al., 2015; Sloan et al., 2015)。

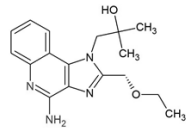
TLR8 は TLR7 と最も相同性が高い TLR である (アミノ酸配列の一致度は 43%)。実際に、TLR7 と TLR8 のアゴニストリガンドの多くが共通している。イミダゾキノリン誘導体 (IQD) を代表する R848 および guanosine (G) と uridine (U) 塩基に富んだ ssRNA は TLR7

および TLR8 を活性化する。しかし、これらの受容体の細胞分布は異なっており、TLR7 は主に形質細胞様樹状細胞や B 細胞に、TLR8 は単球や骨髄系樹状細胞に発現している。また、マウスの TLR8 は機能しないと報告されている (Heil et al., 2004; Hemmi et al., 2002)。

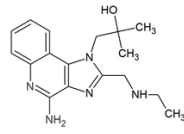
結晶構造解析に基づいてヒト TLR8 のアゴニスト認識機構が解明された (Tanji et al., 2013)。

TLR8 の非活性化型はリガンド非結合型二量体を構成する (図 5A)。アゴニストリガンドが存在すると、リガンド結合によって活性化型二量体構造を再構成する (図 5C)。TLR8 は 2ヶ所のリガンド結合部位 (site 1 および site 2) を有する。R848 などの合成低分子アゴニストは site 1 に結合し、TLR8 の活性化型二量体を誘導する (Tanji et al., 2013)。一方、ssRNA を認識する際、site 1 にて ssRNA の分解物 uridine が認識され、site 2 にて UG を含む ssRNA が認識される。Site 2 は site 1 へのリガンドの結合を増強する作用機構がある (Tanji et al., 2015)。しかし、TLR7 のアゴニストリガンド認識機構および活性化機構は未だに不明だった。

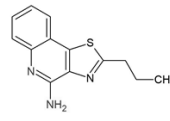
A



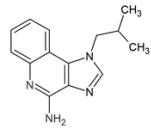
R848 (Resiquimod)



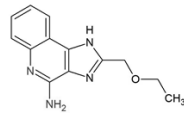
Gardiquimod



Imiquimod

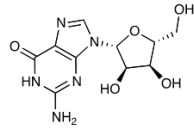


CL075

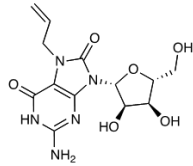


CL097

B

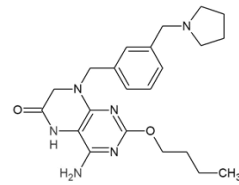


Guanosine



Loxoribine

C



GS9620

D

5'-GCCCGUCUGUUGUGUGACUC-3'

RNA40 (HIV-1 U5 region nt 108-127)

5'-UUUUUUUUUUUUUUUUUUUU-3'

polyU_19mer

5'-AGCUUAACCUGUCCUUCAA-3'

RNA9.2s

5'-UGAGGUAGUAGGUUGUGUGUU-3'

Let-7b ssRNA

図 4. TLR7 のアゴニストリガンド

(A) イミダゾキノリン誘導体の構造式

(B) Guanosine とその類似物の構造式

(C) GS9620 の構造式

(D) ssRNA リガンドの配列

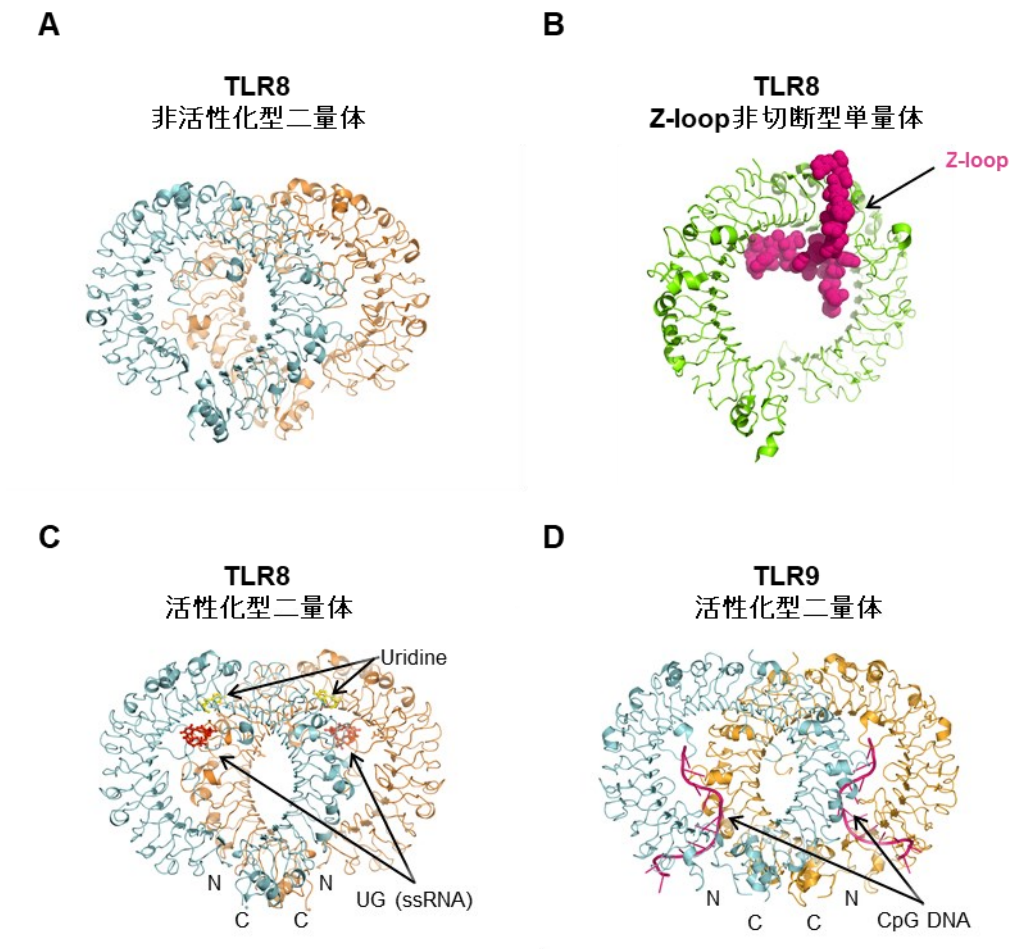


図 5. 既報の TLR8 および TLR9 の結晶構造

(A) TLR8 リガンド非結合型結晶構造 (非活性化型二量体) (PDB: 3W3G)

(B) TLR8 の Z-loop 非切断型結晶構造 (自己阻害型単量体) (PDB: 5HDH)

(C) TLR8/ssRNA 複合体構造 (活性化型二量体) (PDB: 4R07)

(D) TLR9/CpG DNA 複合体構造 (活性化型二量体) (PDB: 3WPC)

1.6. TLR7 のアンタゴニストリガンドについて

TLR7 は内因性 RNA を介した活性化を避けるため、エンドソームに厳密に局在している (Kim et al., 2008; Lee and Barton, 2014)。実際、TLR7 の過剰な活性化は、全身性エリテマトーデス (SLE) のようないくつかの自己免疫疾患の病因に関与していると考えられている (Deane et al., 2007; Fairhurst et al., 2008; Pisitkun et al., 2006; Souyris et al., 2018)。一方、TLR7 ファミリーの他のメンバーである TLR8 および TLR9 の SLE への関与については、いまだ不明なところが多い (Desnues et al., 2014; Santiago-Raber et al., 2009)。以上のことから、TLR7 を選択的に阻害することが SLE の治療に有用であると考えられる。TLR7 を阻害する分子としては、オリゴヌクレオチドや抗マラリア剤などが報告されている (Robbins et al., 2007; Wallace et al., 2012)。ヒドロキシクロロキン (HCQ) に代表される抗マラリア薬は、TLR に直接結合せず間接的なメカニズムで TLR7 および TLR9 を阻害することが知られている (Wallace et al., 2012)。一方、Cpd-1、Cpd-2 および Cpd-3 のような TLR7 特異的な低分子アゴニストが報告されている (図 6) (Hirota et al., 2002; Koga-Yamakawa et al., 2013; Kurimoto et al., 2010; Nakamura et al., 2013)。これらのアゴニストリガンドをリード化合物として誘導体化し、TLR7 特異的なアンタゴニストリガンドの Cpd-6 および Cpd-7 が開発されていた (図 6) (Tojo and Zhang et al., 2020)。Cpd-7 は自己免疫疾患モデルマウスに対して有望な治療効果が示されている。しかし、Cpd-6 および Cpd-7 の

ような低分子アンタゴニストによる TLR7 の阻害機構は未だに不明だった。

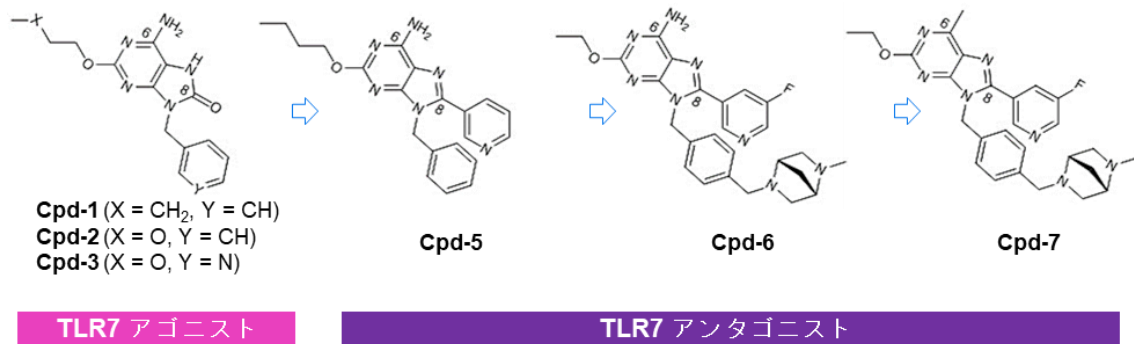


図 6. TLR7 のアンタゴニストリガンド

Cpd-1、Cpd-2 および Cpd-3 は TLR7 の合成低分子アゴニストである。これらのリード化合物に基づき、TLR7 のアンタゴニスト活性を持つ化合物の Cpd-5、Cpd-6 および Cpd-7 が開発されていた。

1.7. 本研究の目的

近年、私たちの研究グループにより、複数の TLR8 および TLR9 の結晶構造が報告された (図 5) (Ohto et al., 2015; Tanji et al., 2013; Tanji et al., 2015)。TLR8-低分子アゴニスト、TLR8-ssRNA 分解物および TLR9-ssDNA などの複合体構造により TLR8 および TLR9 のリガンド認識機構および活性化機構が解明された。しかし、このサブファミリーを代表する TLR7 の立体構造は不明であった。そこで、本研究では、TLR7 の立体構造の解明およびそれに基づく活性化機構の解明を目指した。また、TLR7 のアンタゴニストリガンドも開発されていたが、これらの化合物による TLR7 の阻害機構は明らかにされていなかった。本研究では、TLR7 と低分子アンタゴニストとの複合体構造を解明することで、TLR7 の阻害機構の解明も目指した。

TLR7 のリガンドは免疫調節剤として作用し、ウイルス感染症の治療薬、ワクチンのアジュバントおよび自己免疫性疾患の治療薬として注目されている。実際に、TLR7 のリガンドである imiquimod はウイルスによる性感染症の尖圭コンジローマおよび日光角化症の治療薬としてすでに臨床応用されている (Wagstaff and Perry, 2007)。TLR7 のリガンド認識機構を解明することで、TLR7 を標的にした創薬の進展が期待される。

2. 材料および方法

2.1. アゴニストによる TLR7 の活性化機構

2.1.1. TLR7 発現ベクターの構築

Macaca mulatta TLR7 (*Mm*TLR7, サル TLR7, Uniport ID: B3Y653) 細胞外ドメインの発現ベクター (野生型および糖鎖結合部位変異体) は、当研究室にて大戸梅治博士および丹治裕美博士の先行研究によって確立したプロトコルを用いた。当研究室にて *Drosophila* Expression System (Invitrogen) の pMT/BiP/V5-His C ベクター (図 7A) を用いて TLR7 細胞外ドメインの発現系が構築されていた。pMT/BiP/V5-His C ベクター中の制限酵素サイト *Nco* I から *Age* I までの配列を、*Nco* I–*Mm*TLR7 細胞外ドメイン全長遺伝子 (アミノ酸残基 26~838、残基 439~444 を LVPRGS の遺伝子に置換)–*Eco* RI–トロンビン認識配列–*protein A* タグ遺伝子–終止コドン–*Age* I で置換したプラスミドが大戸梅治博士および丹治裕美博士により作成された (図 7B)。*Mm*TLR7 の細胞外ドメイン遺伝子は、GenScript 社に依頼して *Drosophila melanogaster* 用にコドンを最適化して合成したものを使用した (図 8A)。TLR7 サブファミリータンパク質の Z-loop の切断はタンパク質の活性化に重要であると報告されている (4.1.1 項参照)。そのため、Z-loop で切断された TLR7 タンパク質を得るために、上記ベクターにおいて Z-loop の一部をトロンビン認識配列に置換した。上記ベクターを用いて TLR7 を発現させると、RSPW (*Bgl*II および *Nco*I 由来の配列)–*Mm*TLR7 (ア

ミノ酸残基 26~838、残基 439~444 を LVPRGS に置換)–EF (Eco RI 由来の配列)–LVPRGS (トロンビン認識配列)–protein A タグとして発現することが予想される (ベクターA) (図 8B)。なお、トロンビン認識配列の切断は LVPRGS 中の R と G の間でおこる。

MmTLR7 の細胞外ドメイン遺伝子には 16 ヶ所の N 型糖鎖結合可能部位が存在する。当研究室における先行研究により、S2 細胞により付加された糖鎖が付加した野生型 *MmTLR7* では、結晶は析出するが良好な反射が得られないことがわかっていた。そこで、N-結合型糖鎖結合部位 (オリゴ糖鎖が Asn-X-Ser または Asn-X-Thr トリペプチド配列の Asn 残基に結合される) を減らすため、*MmTLR7* 細胞外ドメインの発現ベクターを基づいて、4 ヶ所糖鎖結合部位変異体 (N167Q, N389Q, N488Q, N799Q) が作成された (ベクターB) (図 8C)。本論文での実験に用いたリコンビナント *MmTLR7* タンパク質 (2.1.11.項以外) はすべて本節で述べた 2 種類の発現ベクター (ベクターA およびベクターB) から生産されたため、以降ではこれらのベクターを用いて産生したリコンビナント *MmTLR7* タンパク質を TLR7 と略称する。

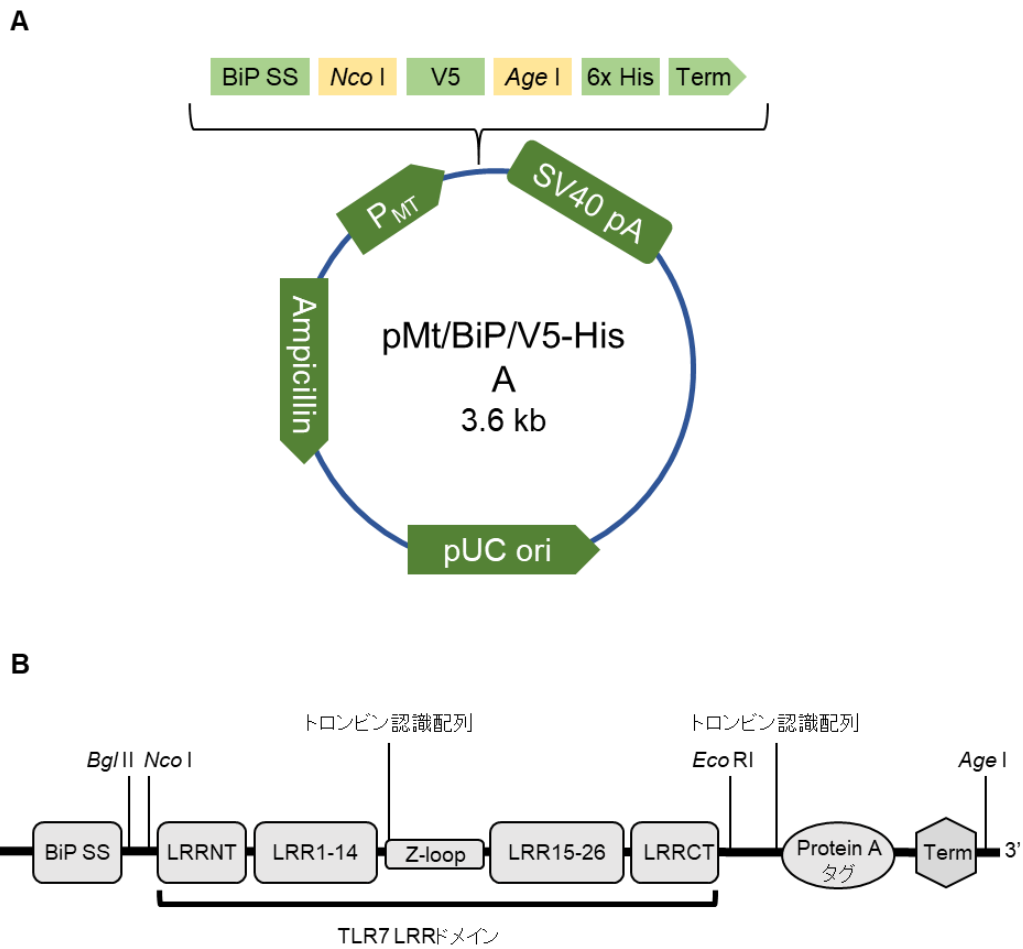


図 7. TLR7 の発現に使用した pMT/BiP/V5-His A ベクターおよび TLR7 の発現領域

(A) pMT/BiP/V5-His A ベクターの模式図

(B) TLR7 の発現領域; BiP SS は BiP シグナル配列を意味する。Bgl II、Nco I、Eco RI および Age I はそれぞれ制限酵素サイトである。Term は休止コドンの意味する。

A GenScript社が合成したMacaca mulatta TLR7のDNA配列

CCATGGGCCCGCTGGTTTCCCAAGACCCTGCCCTGCGATGTGACGCTGGATGTGAGCAAGAATCATGTGA
TTGTGGACTGCACCGATAAGCATCTGACCGAGATTCCAGCGGAATCCCCACGAACACCACGAATCTGAC
CCTGACGATCAACCACATTCCGGATATCTCCCCAGCCTCGTTCACCCGCTGGTGCATCTGGTGGAGATTG
ACTTTCGCTGCAACTGCGTGCCAATCCGCCTGGGCTCCAAGTCAATATGTCCCGCGCCGCTGCAGAT
TAAGCCACGCAGTTTCAGCGGACTGACCTACCTGAAGTCCCTGTATCTGGATGGCAACCAGCTGCTGGAG
ATCCCACAGGGACTGCCACCATCCCTGCAGCTGCTGTCGCTGGAGGCCAACAATATTTTCAGCATCCGCA
AGGAGAACCTGACCGAGCTGGCCAATATCGAGATTCTGTACCTGGGCCAGAAGCTGCTACTATCGCAATCCC
TGCTACGTGTCTATTTCGATCGAGAAGGATGCCCTTCTGAACTGACGAAGCTGAAAGGTGCTGAGCCTGA
AGGACAACATGTGACAACCGTGCCACAGTGCCTGCCCTCCACACTGACCGAGCTGTACCTGTATAACAAT
ATGATTGCCGAGATCCAGGAGGATGACTTCAACAATCTGAACCAGCTGCAGATTCTGGATCTGAGCGGCAA
CTGCCACAGCTGCTACAATGCCCTTCCCGTGCACCCCTGCAAGAACAATTCGCCACTGCAGATCCCC
GTGAACGCCTTTGACGCCCTGACGGAGCTGAAGGTGCTGCGCCTGCACAGTAACAGCCTGCAGCATGTG
CCACCCCGCTGGTTCAAGAATATCAACAATCTGCAGGAGCTGGATCTGTCCCAGAAGCTTTCTGGCCAAGGA
GATTGGAGACGCCAAGTTCTGCACTTTCTGCCGAACCTGATCCAGCTGGATCTGCTGTTCAATTTTGAGC
TGCAGGTGTACCGCGCCTCCATGAACCTGTGCGAGGCCTTCAGCTCCCTGAAGAGCCTGAAGATTCTGCG
CATCCGCGCTATGTGTTCAAGGAGCTGAAGAGTTTAACTGAGCCCACTGCATAACCTGCAGAATCTGG
AGGTGCTGGACCTGGGAACCAACTTTCATCAAGATTGCCAATCTGAGCATGTTCAAGCAGTTTAAAGCGCTG
AAGTGCATCGATCTGTCGGTGAACAAGATCAGCCCATCGGGCGACAGCCTGGTGCACGCGGATCGAGTA
ATGCCCGCACCAGTGTGGAGAGCTACGAGCCCGAGGTGCTGGAGCAGCTGACTATTTCGCTACGATAA
GTATGCCCGCTCGTCCGCTTCAAGAACAAGGAGCCTCCTTTACATCGGTGAATGAGAGCTGTACAAG
TATGGCCAGACCCCTGGATCTGAGTAAGAACAGCATTTTCTTTATCAAGAGCTCCGACTTCCAGCACCTGTC
CTTTCTGAAGTGCCTGAACCTGAGTGGCAATCTGATCAGCCAGACCTGAATGGATCGGAGTTCCAGCCA
CTGGCCGAGCTGCGCTACCTGGATTTCCTCAACAATCGCCTGGACCTGCTGCATTGACCGCCTCGAGG
AGCTGCGCAAGCTGGAGGTGCTGGATATTTGAGTAACCTCCACTATTTCCAGTCCGAGGGCATCACGCAT
ATGCTGAACTTTACAAGAATCTGAAGGTGCTGCAGAAGCTGATGATGAACGATAATGACATCAGCTCCTCG
ACGTCCCGCACAATGGAGAGTGAGAGCCTGCGCACCTGGAGTTCGCGGAAACCACTGAGACCTGCTG
TGGCGCGATGGAGACAACCGCTACCTGCAGCTGTTAAGAATCTGCTGAAGCTGGAGGAGCTGGATATTA
GTAAGAATCCCTGTCGTTCTGCCATCCGGCGTGTTCGACGGAATGCCGCCAAACCTGAAGAATCTGAG
TCTGGCCAGAATGGCCTGAAGAGCTCATCTGGGAGAAGCTGCGCTACCTGAAGAACCTGAGAGCCTG
GACCTGTCCCATAATCAGCTGACGACAGTGCAGGAGCCTGTCGAAGTGCAGTGCAGCCTGAAGAATC
TGATTCTGAAGAACAATCAGATCCGCTCCCTGACGAAGTACTTCCCTGCAGGATGCTTTTCAGCTGCGCT
CTGGACCTGATGAGCAATAAGATTGATGATCCAGAAGACATCGTTCGCGGAGAACCTGCTGAACAATC
TAAGATGCTGCTAGTGCACCATAATCGCTTCTGTCAGCTGCGATGCCGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
AACCACACCGAGGTGACGATCCCGTACCTGGCCACAGACCTGACCTGCGTGGGACCAGGAGCCACAAG
GGACAGAGCGTGATTAGCCTGGACCTGTATACCTGCGAGCTGGACCTGACCAATGAATTC

B

MKLCILLAWAFVGLSLGRSPWARWFPKTLPCDVTLDVSKNHVIVDCTDKHLTEIPGGIPTNTNLTLTINHIPDI
SPASFHRLVHLVEIDFRNCVPIRLGSKSNMCPRRLLQIKPRFSGLTYLKSPLYLDGNQLLEIPQGLPSPQLLSL
EANNIFSIRKENLTELANIEIYLGQNCYRNPYVSYIEKDAFLNLTCLKVLSLKDNNVTTVPTVLPSTLTLEYL
YNNMIAEIQEDDFNNLNQLQILDLSGNCPCRYNAPFPCTPCKNNSPLQIPVNAFDALTELKVLRLHSNSLQHPV
PRWFKNINNLQELDLSONFLAKEIGDAKFLHFLPNLIQLDLSFNLFELQVYRASMNLSQAFSSLSLKLIRIRGYV
FKELKSFNLSPHLNLQNLVLDLGTNFIKIANLSMFQKFKRLKVIDLSVNIKISPSGDSLVPRGSSNARTSVESYE
PQVLEQLYYFRYDKYARSCRFKNKEASFVSVNKEQYQTLDLKSNISFFIKSSDFQHLFLKCLNLSGNLIS
QTLNGSEFQPLAELRYLDFSNRDLHLHSTAFEELRKLEVLDISSNSHYFQSEGITHMLNFTKNLKVQLKLMNN
DNDISSSTSRTESESLRTEFRGNHLDVLRWDGDNRYLQLFKNLLKLEELDISKNLSLFLPSGVDFGMPNLL
KNLSLAKNGLKFSIWEKLYLKNLETLDLSHNQLTTPPERLSNCSRSLKNLILKNNQIRSLTKYFLQDAFQLRYL
DLSSNKIQMIQKTSFPENVLNLLKMLLLHNRFLCTCDAWVFWWWWNHTTEVTIPYLATDVTCVGPAGHKGQS
VISLDLTYCELDTNLEFLVPRGSSAAQHDEAVDNKFNKEQQNAFYIHLPLNLEEQRNAFIQSLKDDPSQSANL
LAEAKKLNDQAQPKVDNKFNKEQQNAFYIHLPLNLEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPKV
DANSSVVP

C

MKLCILLAWAFVGLSLGRSPWARWFPKTLPCDVTLDVSKNHVIVDCTDKHLTEIPGGIPTNTNLTLTINHIPDI
SPASFHRLVHLVEIDFRNCVPIRLGSKSNMCPRRLLQIKPRFSGLTYLKSPLYLDGNQLLEIPQGLPSPQLLSL
EANNIFSIRKEQLTELANIEIYLGQNCYRNPYVSYIEKDAFLNLTCLKVLSLKDNNVTTVPTVLPSTLTLEYL
YNNMIAEIQEDDFNNLNQLQILDLSGNCPCRYNAPFPCTPCKNNSPLQIPVNAFDALTELKVLRLHSNSLQHPV
PRWFKNINNLQELDLSONFLAKEIGDAKFLHFLPNLIQLDLSFNLFELQVYRASMNLSQAFSSLSLKLIRIRGYV
FKELKSFQLSPLHLNLQNLVLDLGTNFIKIANLSMFQKFKRLKVIDLSVNIKISPSGDSLVPRGSSNARTSVESYE
PQVLEQLYYFRYDKYARSCRFKNKEASFVSVNKEQYQTLDLKSNISFFIKSSDFQHLFLKCLNLSGNLIS
QTLNGSEFQPLAELRYLDFSNRDLHLHSTAFEELRKLEVLDISSNSHYFQSEGITHMLNFTKNLKVQLKLMNN
DNDISSSTSRTESESLRTEFRGNHLDVLRWDGDNRYLQLFKNLLKLEELDISKNLSLFLPSGVDFGMPNLL
KNLSLAKNGLKFSIWEKLYLKNLETLDLSHNQLTTPPERLSNCSRSLKNLILKNNQIRSLTKYFLQDAFQLRYL
DLSSNKIQMIQKTSFPENVLNLLKMLLLHNRFLCTCDAWVFWWWWNHTTEVTIPYLATDVTCVGPAGHKGQS
VISLDLTYCELDTNLEFLVPRGSSAAQHDEAVDNKFNKEQQNAFYIHLPLNLEEQRNAFIQSLKDDPSQSANL
LAEAKKLNDQAQPKVDNKFNKEQQNAFYIHLPLNLEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPKV
DANSSVVP

図 8. TLR7 の発現領域の DNA 配列およびアミノ酸配列

(A) 黒文字はショウジョウバエ用にコドンを最適化した *Mm*TLR7 細胞外ドメイン (アミノ酸配列 26~838) の遺伝子を、赤文字は制限酵素認識配列 *Nco*I (先頭) および *Eco*RI (末尾) を示した。

(B, C) Vector A (TLR7 野生型) および Vector B (TLR7 糖鎖結合部位変異体) が発現するリコンビナントタンパク質のアミノ酸の配列を示した。緑のハイライト: BiP シグナル配列; シアンのハイライト: TLR7 細胞外ドメインの配列; 紫のハイライト: Protein A タグの配列; 下線: トロンビン認識配列; 赤文字: N-型結合部位変異体 (N167Q, N389Q, N488Q, N799Q)

2.1.2. TLR7 安定発現株の作製

前述の 2 種類の TLR7 ベクター (ベクターA およびベクターB) を大腸菌 Jet Competent Cell DH5 α (Biodynamics Laboratory Inc.) にトランスフォーメーションし、LB 培地 (25 g/L, Nacalai Tesque) およびアンピシリン (100 μ g/mL, Nacalai Tesque) を含む 1.5%寒天培地に撒いた。37°Cで一晩培養し、コロニーをピックアップして 5 mL の Plusgrow II (40 g/L, Nacalai Tesque) およびアンピシリン (100 μ g/mL, Nacalai Tesque) を含む液体培地に移して 10~12 時間程度 37°Cで振とう培養した。この培養液から PureLink HQ Mini Plasmid Purification Kit (Invitrogen) または PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega) を用いてプロトコルに従ってプラスミド DNA を精製した。精製した DNA の濃度は約 100~500 ng/ μ L であった。共トランスフェクションする pCoHygro ベクター (*Drosophila* Expression

System に同梱) についても、同様に DNA を精製した。

調製した DNA を *Drosophila* S2 細胞 (Invitrogen) にトランスフェクションした。*Drosophila*

S2 細胞は、 $0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cells/mL 程度の濃度で培養液量 10 mL にて、125 mL フラスコ

を用いて 27°C にて旋回培養 (100~110 rpm) にて継代していたものを使用した。使用した

培地は Sf900II SFM (Life Technologies) であり、1 L 当たり Penicillin-Streptomycin Mixed

Solution (Nacalai Tesque) を 1% (v/v) で添加して使用した。この培地は以降では PS 培地

と呼ぶ。

まず、24 ウェルプレート (Falcon) に 1×10^6 cells/mL の S2 細胞を 0.5 mL 撒いて 20 分程

度静置し、底面に接着させた。精製した TLR7 ベクター 1.6~2.0 μ g と pCoHygro ベクター

80 ng を 50 μ L の Sf-900II SFM 培地に混合した。また、3 μ L の Cellfectin II Reagent

(Invitrogen) を 50 μ L の Sf-900II SFM 培地に混合した。これら 2 種の溶液を混合してよく

振って混ぜ、室温にて 20 分静置し、DNA を含むリポソームキャリアを形成させた。これを

トランスフェクション溶液とする。先の 24 ウェルプレートから培地を除き、トランスフェ

クション溶液を全量 (約 100 μ L) 添加し、27°C で 3~5 時間インキュベーションした。その

後、PS 培地を 1 mL/ウェルで添加した。翌日、細胞をピペッティングしてウェルの底面か

ら剥がして 1 mL 分取し、(300 μ g/mL Hygromycin, 10% FBS, 10 mL/L Penicillin-Streptomycin

Mixed Solution) を添加した Sf-900II SFM 培地を 2 mL 入れた 6 ウェルプレートに植え継

いだ。上記培地には、Hygromycin B Solution (50 mg/mL, Nacalai Tesque) と、65°Cで1時間加熱し非働化を行った FBS Performance (Gibco) を用いた。さらに、27°Cにて約3週間培養し、Hygromycin による安定発現株の選択を行った。約3週間後、Hygromycin 存在下で増殖することを確認し、ピペッティングして細胞を剥離して、全量を125 mL 三角フラスコに入れて27°Cにて浮遊培養した(旋回培養)。以後、(300 µg/mL Hygromycin, 1 mg/L Gentamicin Sulfate Solution, 1 mL/L Fungizone Antimycotic, 10 mL/L Penicillin-Streptomycin Mixed Solution) を添加した Sf-900II SFM 培地(継代用培地とする)を用いて、 0.5×10^6 から 1×10^7 cells/mL 程度の濃度で液量10 mLにて細胞を継代培養した。これを安定発現株とする。上記培地には、Gentamicin Sulfate Solution (10 mg/mL, Nacalai Tesque) と、Fungizone Antimycotic Liquid (Gibco) を用いた。

2.1.3. 生化学実験用 TLR7 タンパク質の調製

TLR7 の糖鎖非切断体(野生型または糖鎖結合部位変異体)を生化学実験に用い、糖鎖切断体(糖鎖結合部位変異体)を結晶化に用いた。生化学実験用の TLR7 サンプルを得るために、2.1.2 項で作成した TLR7 の安定発現株の大量培養を行った(図9)。安定発現株を250 mL 三角フラスコで60 mL程度の継代用培地を用い、27°Cにて旋回培養をした。細胞の密度が 5×10^6 から 1×10^7 cells/mL 程度まで増殖させた後、培養液をスケールアップした。スケール

ルアップに使用した培地は Express Five SFM (Gibco) 培地であり、1L あたり 5 mL の Penicillin-Streptomycin および 100 mL の 200 mM L-Glutamine Stock Solution (Nacalai Tesque) を添加して使用した。この培地を分泌発現用培地と呼ぶ。スケールアップの際、TLR7 安定発現株細胞を分泌発現用培地を用いて 30~40 mL から 450~500 mL まで希釈し、1 L 三角フラスコ (フィルターキャップ) にて 27°C で旋回培養した。希釈後 1 日から 3 日後、細胞が 1×10^6 から 2×10^6 cells/mL 程度になった時点で、0.5 mM となるようにフィルター滅菌した CuSO_4 の水溶液を加えて誘導を開始した。誘導開始から、25~27°C にてさらに一週間程度の旋回培養を行い、TLR7 を分泌発現させた。

一週間程度の誘導後、培養液を 9,000 rpm で 8 分間遠心して上清を回収し、これを 4°C にて Phosphate-buffered saline (PBS) で平衡化した 10 mL の IgG Sepharose 6 Fast Flow (GE healthcare) を充填したカラムに自然落下により流して、Protein A タグを融合させた TLR7 を IgG 樹脂に吸着させた。その後、約 500 mL の PBS を流してカラムの洗浄を行った。100~120 mL の酸性溶出バッファー (10 mM glycine, pH 3.5, 150 mM NaCl) にて目的タンパク質を溶出させた。この際、5~10 mL の 1 M Tris-HCl pH 8.0 をあらかじめ入れておいたビーカーに受け、ただちに pH が中性になるようにした。

前述の IgG 樹脂からの溶出液を Amicon Ultra devices (Merck) を用いて限外濾過により濃縮し、(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) にバッファー置換して最終的に A_{280} が 10~40

程度になるまで濃縮した。濃縮したサンプル 1 mg に対し 1 U のトロンビン (Nacalai

Tesque) を加え、4°Cにて一晩静置して protein A タグおよび Z-loop の切断を行った。

トロンビンで処理したサンプルをゲル濾過クロマトグラフィー (カラム: HiLoad® 26/600

Superdex® 200 pg; バッファー: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) で精製し、TLR7

の単量体の分子量に相当する溶出時間のピークを分取した (図 10A および図 11A)。分取し

た液を Amicon Ultra devices (Merck) を用いて濃縮し、最終的に、10~15 mg/mL の濃度の

性状解析用 TLR7 サンプル (野生型または糖鎖結合部位変異体) を得た。

各精製段階の TLR7 サンプルを、10% SDS-PAGE を用いて確認した (図 10B および図 11B)。

各段階のサンプル約 2~5 µg をゲルにアプライし、200 V で 50 分電気泳動した。泳動後、

ラピッドステイン CBB (Nacalai Tesque) を用いて約 10 分間ゲルを染色したのち、水道水

にて約 30 分間脱色して、バンドを確認した。

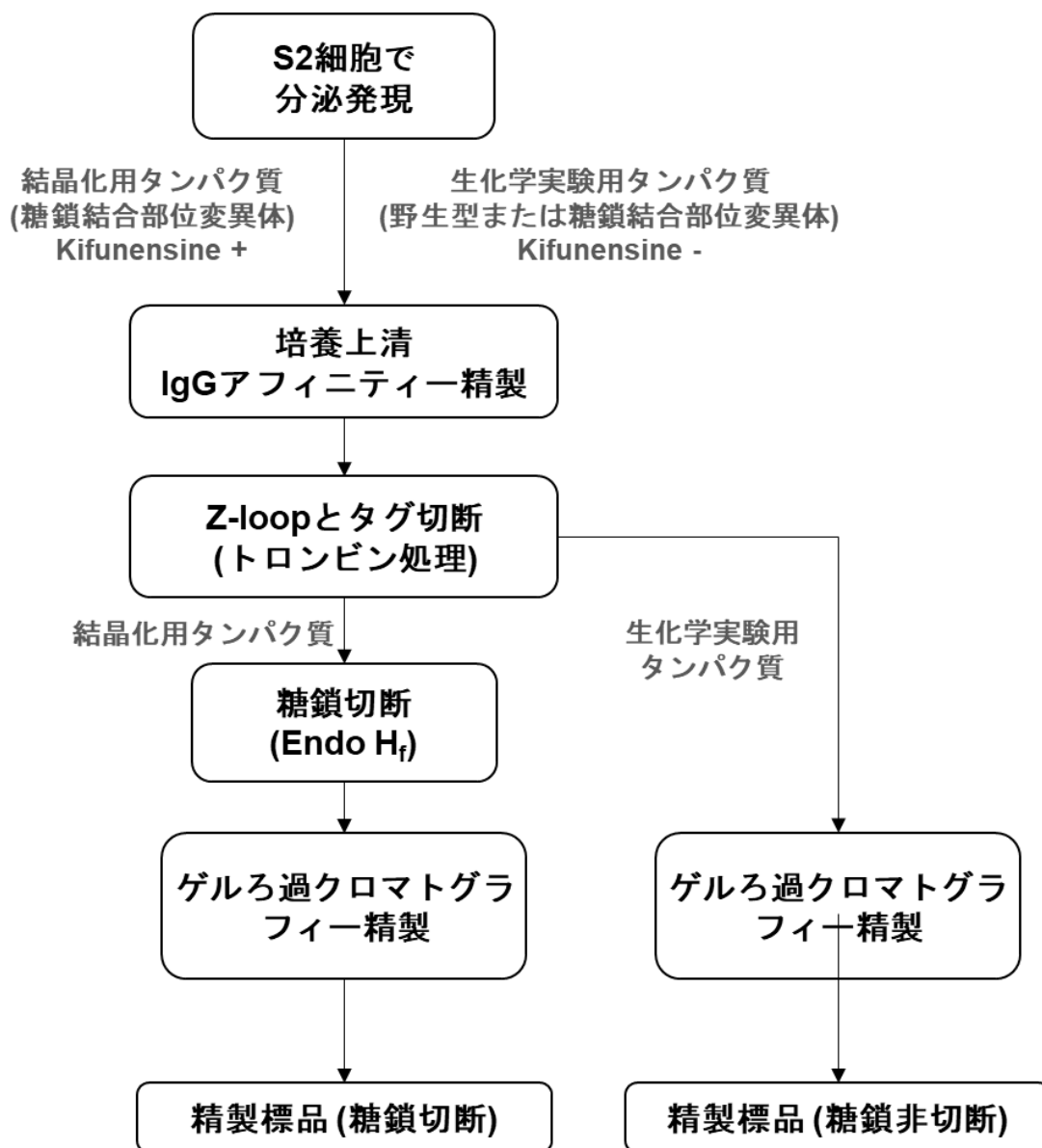


図 9. TLR7 細胞外ドメインの発現および精製のフローチャート

2.1.3 および 2.1.4 項で述べた 3 種類 TLR7 精製タンパク質の発現および精製のフローチャート

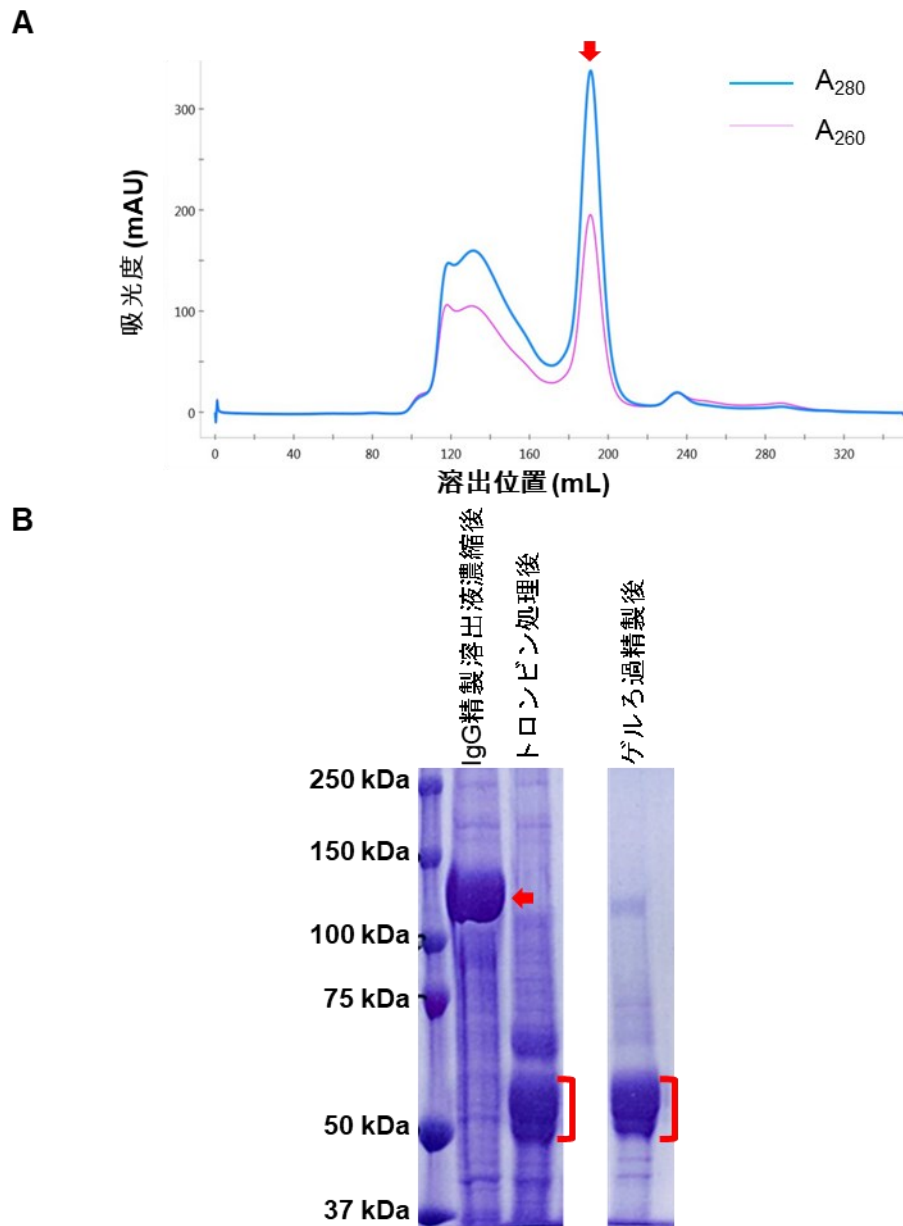


図 10. TLR7 (野生型かつ糖鎖非切断体) の精製過程の各チャート

(A) トロンビンで処理した TLR7 (野生型かつ糖鎖非切断体) タンパク質のゲル濾過クロマトグラフィー精製のチャート

(B) 各精製段階の SDS-PAGE 分析; 目的タンパク質のピークまたはバンドを赤い矢印または赤い角括弧で強調した。

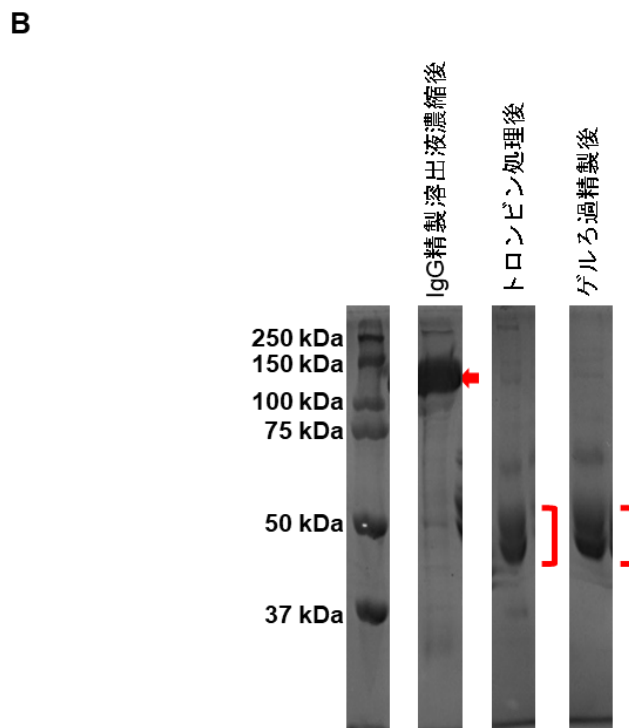
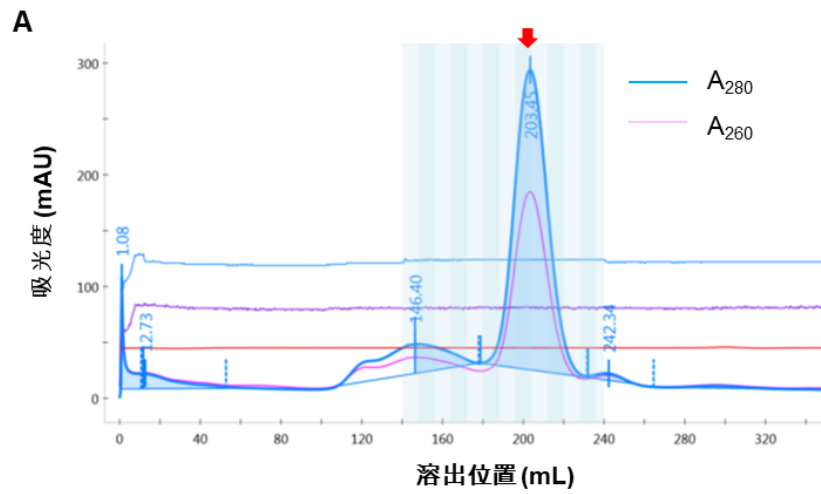


図 11. TLR7 (糖鎖結合部位変異体かつ糖鎖非切断体) の精製過程の各チャート

(A) トロンビンで処理した TLR7 (糖鎖結合部位変異体かつ糖鎖非切断体) タンパク質のゲル濾過クロマトグラフィー精製のチャート

(B) 各精製段階の SDS-PAGE 分析; 目的タンパク質のピークまたはバンドを赤い矢印または赤い角括弧で強調した。

2.1.4. 結晶化用 TLR7 タンパク質の調製

結晶化用 TLR7 サンプルを得るために、TLR7 糖鎖結合部位変異体 (N167Q, N389Q, N488Q, N799Q) の安定発現株の大量培養を行った (図 9)。大量培養は 2.1.3 項で記述されている手順と同様に行った。ただし、結晶化用に糖鎖を短縮したサンプルを得るため、Endo H_f(N 型糖鎖を切断し、アスパラギン残基の側鎖に N-アセチルグルコサミンが一つ結合した状態にする) 感受性の糖鎖を付加させる目的で、誘導と同時に糖鎖生合成経路を阻害する化合物キフネンシン (Kifunensine) を終濃度 1.5 mg/L になるように添加した (図 9)。

培養液の精製手順は 2.1.3 項で記述されている手順に加えて、トロンビンで処理したサンプルに対し 10% (v/v) の 1 M 酢酸バッファー (pH 5.0) または 1 M MES-NaOH バッファー (pH 6.0) を加え、1 mg のタンパク質に対して 1,000 U の Endo H_f (New England Biolabs) を加えて室温で一晩静置することで、糖鎖の切断を行った。その後、15,000 rpm で約 5 分遠心を行い、沈殿を除去した上清をゲル濾過クロマトグラフィー (カラム: HiLoad® 26/600 Superdex® 200 pg; バッファー: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) で精製し、TLR7 の単量体の分子量に相当する溶出時間のピークを分取した (図 12A)。分取した画分を Amicon Ultra devices (Merck) を用いて濃縮し、最終的に、10~15 mg/mL の濃度の結晶化用 TLR7 サンプルを得た。各精製段階の TLR7 サンプルを、10% SDS-PAGE を用いて確認した (図 12B)。

これ以降 TLR7 野生型または糖鎖結合部位変異体 (N167Q, N389Q, N488Q, N799Q) の Z-loop 切断体 (糖鎖非切断体かつ生化学実験用) および TLR7 糖鎖結合部位変異体 (N167Q, N389Q, N488Q, N799Q) の Z-loop 切断体 (糖鎖切断体かつ結晶化用) のいずれも TLR7 と呼ぶ。

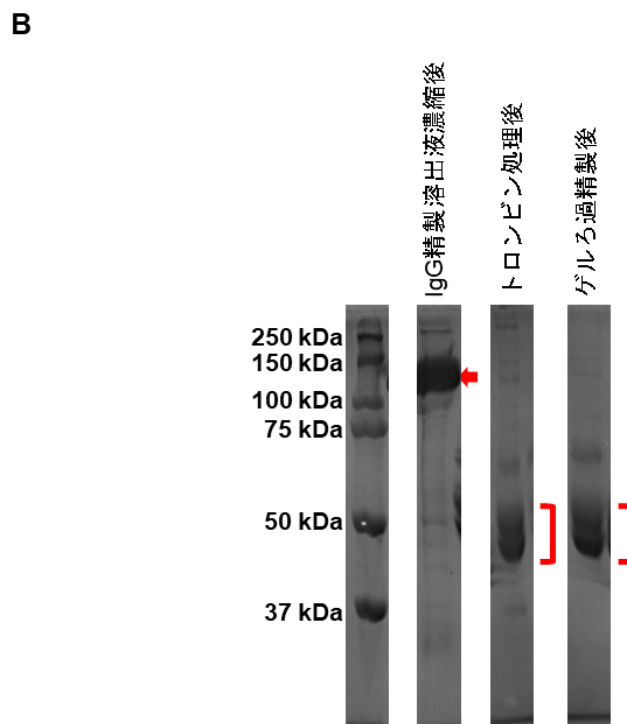
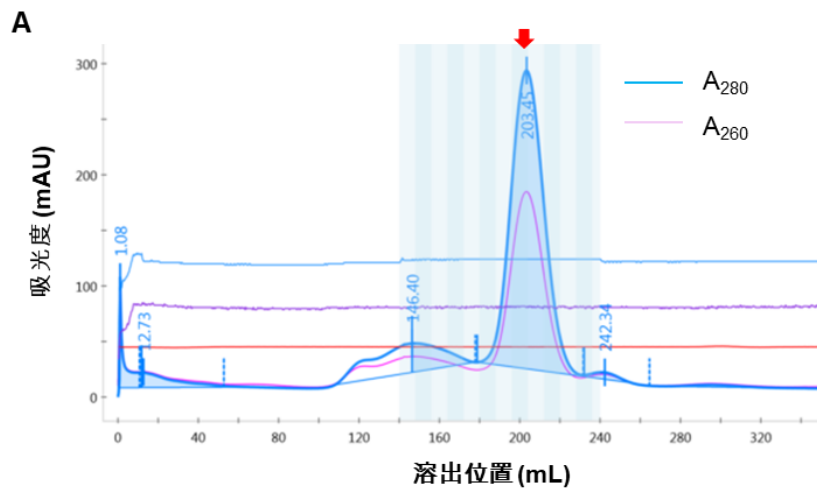


図 12. TLR7 (糖鎖結合部位変異体かつ糖鎖切断体) の精製過程の各チャート

(A) トロンビンで処理した TLR7 (糖鎖結合部位変異体かつ糖鎖切断体) タンパク質のゲル濾過クロマトグラフィー精製のチャート

(B) 各精製段階の SDS-PAGE 分析; 目的タンパク質のピークまたはバンドを赤い矢印または赤い角括弧で強調した。

2.1.5. ゲルろ過クロマトグラフィー分析

TLR7 の会合状態、リガンド結合能およびリガンド結合の pH 依存性を調べることを目的として、ゲルろ過クロマトグラフィーを行った。ゲルろ過クロマトグラフィーカラムは Superdex 200 Increase 5/150 GL (CV = 3 mL, GE Healthcare) を用いた。バッファーは、pH 5.5 での分析には (10 mM MES-NaOH, pH 5.5, 150 mM NaCl) を、pH 7.5 での分析には (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) を用い、流速は 0.5 mL/min とし、分析時間は 10 分とした。

図 17、図 18、図 21、図 23 および図 38 では、分析サンプルは 100 μg (総体積 = 50 μL) 性状解析用 TLR7 (野生型かつ糖鎖非切断) を用い、核酸リガンドの濃度は 25 μM とし、低分子アゴニストの濃度は 250 μM とした。標準サンプルとして、apoferritin (440 kDa)、 β -amylase (200 kDa)、bovine serum albumin (BSA, 67 kDa)、carbonic anhydrase (29 kDa) を分析し検量線を引き、溶出時間から各 TLR7 サンプルの分子量を算出した (図 17)。図 40 では、分析サンプルは 50 μg (総体積 = 50 μL) TLR7 野生型 (WT) および変異体 (R97A, C98S, L105A, C112S, S154A) (すべて糖鎖非切断) を用い、polyU_12mer の濃度は 12.5 μM とし、R848 の濃度は 125 μM とした。図 51A では、分析サンプルは 50 μg (総体積 = 50 μL) 性状解析用 TLR7 (糖鎖結合部位変異体かつ糖鎖非切断) を用い、低分子アゴニストの濃度は 100 μM とし、polyU_9mer の濃度は 20 μM とした。

2.1.5 項のすべてのゲルろ過クロマトグラフィーでは UV 検出器を用いて、 A_{280} および A_{260} を検出した。

2.1.6. 超遠心分析 (沈降速度法)

TLR7 の会合状態およびリガンド結合能を調べることを目的として、沈降速度法による超遠心分析 (Sedimentation velocity analytical ultracentrifugation: SV-AUC) を、大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻・内山進教授および Elena Krayukhina 博士らに依頼した。本項 2.1.6 で述べる実験は、内山らによって行われたものである。

全てのサンプルのバッファー組成が同一 (8.3 mM MES, 1.5 mM Tris, pH5.5, 147 mM NaCl) になるように SV-AUC のサンプルを調製した。SV-AUC 実験は、ProteomeLab XL-I 分析用超遠心分離機 (Beckman Coulter) で、吸光オプティックスを用いて 42,000 rpm の遠心速度で行った。分析は 20°Cで行った。収集したデータは、SEDFIT (Brautigam, 2015; Schuck, 2000) の連続 $c(s)$ 分布を用いて解析した。プログラム SEDNTERP 1.09 を用いて計算した 1.004 g/mL、1.016 cP および 0.7408 cm³/g の値を、それぞれバッファー密度、粘度および TLR7 部分比容積に用いた。

TLR7 の二量体化に対するリガンドの効果を解析するため、性状解析用 TLR7 (野生型かつ糖鎖非切断) (20 μ M) と各リガンド (polyU_6mer、polyU_9mer、polyU_12mer、polyU_19mer、

guanosine、R848) (いずれも 20 μM) を含む溶液の SV-AUC 実験を行った (図 19 および図 22)。また、TLR7 と polyU_12mer の等モル混合溶液 (5, 10, 20, 33 および 50 μM) (guanosine 存在下または非存在下) の測定を行い、polyU_12mer の存在下での TLR7 の二量体化の解離定数を決定した。得られた重量平均沈降係数の等温線を、SEDPHAT を用いて作図した (Schuck, 2003)。

2.1.7. ITC 分析

TLR7 に対する各種リガンドの結合親和性を測定するため、等温滴定カロリメトリー (ITC) を MicroCal iTC200 (GE Healthcare) を用いて行った。図 20 と図 41 で示した滴定では、10 mM MES-NaOH, pH 5.5, 150 mM NaCl のバッファーを用いた。図 23D 示した滴定では、10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl のバッファーを用いた。図 46 と 51 の滴定は、50 mM MES-NaOH, pH 5.5, 150 mM NaCl のバッファーを用いた。すべての滴定は 298 K で行った。最初に 0.4 μL の滴定を 1 回行った後、2 μL の滴定を 18 回行い、滴定の間隔は 120 秒または 180 秒として、リガンド結合の際に出入りした熱量を測定した。

ITC のデータ解析には OriginLab Software (GE Healthcare)を用いた。1 サイト結合モデルを用いたカーブフィッティングによって各パラメータを算出した。各実験を行う際のタンパク質濃度、リガンド濃度および各パラメータは (表 3 および表 6) と (図 20、図 23D、図

46 および図 51) にまとめた。表 3 の実験では性状解析用 TLR7 (野生型かつ糖鎖非切断) を用い、表 6 の実験では性状解析用 TLR7 (糖鎖結合部位変異体かつ糖鎖非切断) を用いた。図 41 の実験では性状解析用 TLR7 (野生型かつ糖鎖非切断) および TLR7 の site 2 変異体 (糖鎖非切断) を用いた。

2.1.8. 結晶化および X 線結晶構造解析

TLR7 のリガンド認識機構を解明するため、TLR7 と guanosine、イミダゾキノリン誘導体などの低分子アゴニスト、RNA9.2s、polyU_19mer などの ssRNA およびそれらの低分子アゴニストと ssRNA の組み合わせとの共結晶化のスクリーニングを行った (図 4)。良好な結晶が得られるまで結晶化スクリーニングおよび結晶化条件の最適化を繰り返した。

2.1.8.1. TLR7/Guanosine/polyU_19mer 複合体の結晶化

TLR7/Guanosine/polyU_19mer (TLR7/G/polyU) 複合体の結晶化は TLR7 タンパク質溶液 (5.0 mg/mL proteins, saturated guanosine, 75 μ M polyU_19mer) とリザーバー溶液 (10% (w/v) PEG 6000, 0.5 M calcium acetate, 0.1 M HEPES, pH 7.0) と添加物溶液 (1/10 vol. of Silver Bullets bio H1 (Hampton research)) を 0.5 μ L : 0.5 μ L : 0.1 μ L の割合で混合し、20 $^{\circ}$ C でシッティングドロップ蒸気拡散平衡法によって行った (図 13A)。良好な結晶を得るため、

結晶化ドロップを調製する前に、TLR7 と polyU_19mer を混合した後 25°C で 24 時間程度のインキュベーションが必要だった。この操作により、サンプルに混入していた RNase や phosphatase によって polyU_19mer のトリミングが行われたものと考えられる。

TLR7/G/polyU 複合体の X 線回折強度データセット収集は PF-AR NE3A (茨城) において行った。結晶をクライオプロテクトant溶液 (10% (w/v) PEG 6000, 0.1125 M sodium chloride, 7.5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.375 M calcium acetate, 0.075 M HEPES, pH 7.0, 20% (v/v) glycerol) に 5 秒程度ソーキングした後に、CryoLoop (Hampton Research) を用いてマウントし、100 K の窒素気流下で急速冷却し、波長 1.0000 Å の X 線を照射してデータセットを収集した。測定は 100 K の窒素気流下で行った。検出器にはシングルフォトンカウンティング型 2 次元 X 線検出器 PILATUS3 2M-F (DECTRIS) を使用した。回折強度データセットの指数付け、積分強度の算出およびスケールリングには、プログラム XDS (Kabsch, 2010) を用いた。位相決定にはブタ TLR7/R848 複合体の結晶構造 (未発表データ) を用いた分子置換法 (MOLREP) によって決定した (Vagin and Teplyakov, 1997)。得られた初期モデル構造をに対して構造精密化を Refmac を用いて行った (Murshudov et al., 1997)。さらに、Coot ソフトウェアを使用し、手動でモデル構造を修正した (Emsley and Cowtan, 2004)。Coot と Refmac5 のサイクルを繰り返し、最終モデル構造を得た (PDB: 5GMF) (Zhang et al., 2016)。データ収集と構造精密化の統計値は表 2 にまとめた。

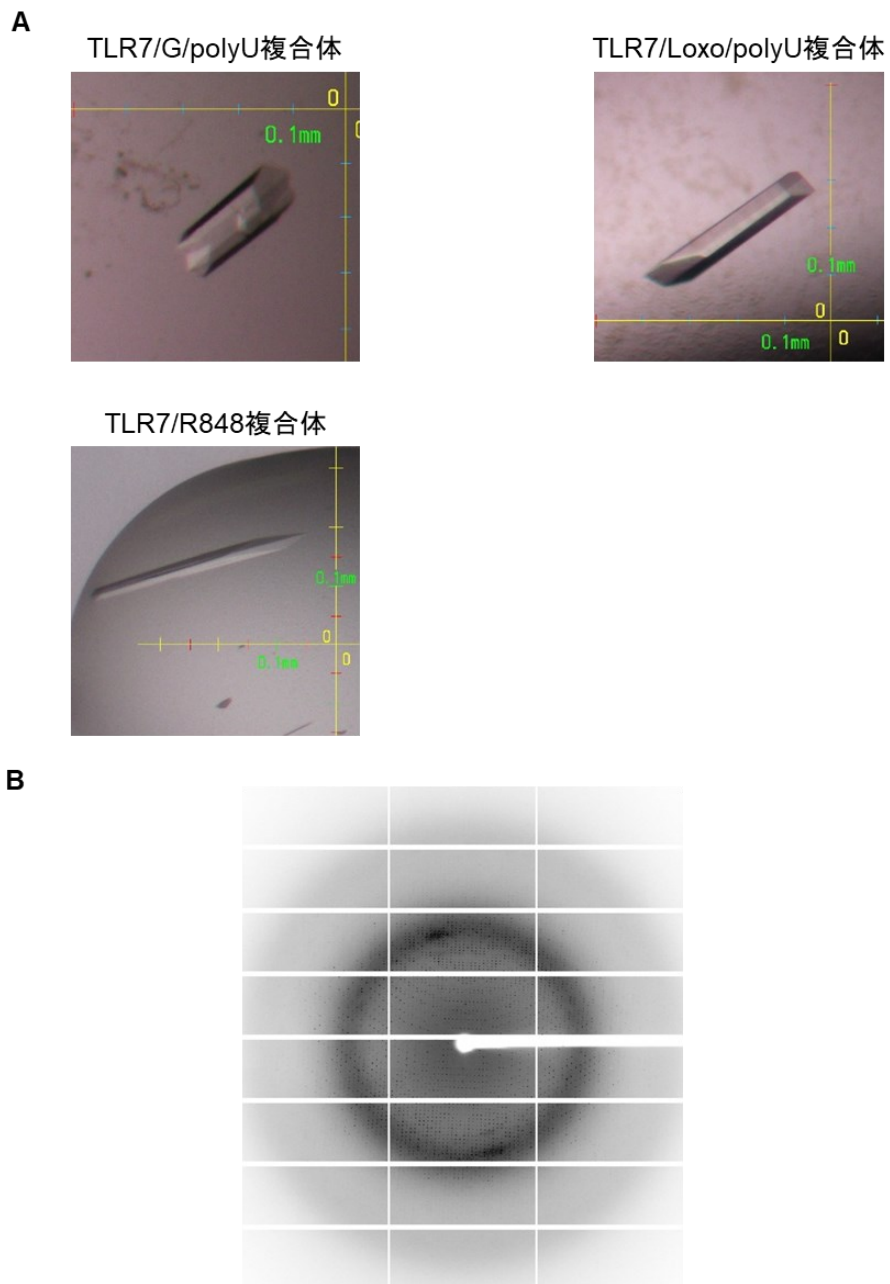


図 13. 構造解析に成功した結晶の例

(A) 構造解析に成功した 3 種類の複合体結晶の写真

(B) TLR7/R848 複合体結晶の X 線回折パターン

2.1.8.2. TLR7/Loxoribine/polyU_19mer 複合体の結晶化

TLR7/Loxoribine/polyU_19mer (TLR7/Loxo/polyU) 複合体の結晶化は TLR7 タンパク質溶液 (5.0 mg/mL proteins, saturated loxoribine, 75 μ M polyU_19mer) とリザーバー溶液 (12% (w/v) PEG 3350, 0.1 M magnesium chloride, 0.1 M sodium citrate, pH 5.0) を 0.5 μ L : 0.5 μ L の割合で混合し、20°Cでシッティングドロップ蒸気拡散平衡法によって行った (図 13A)。良好な結晶を得るためには、2.1.8.1 項と同様に、TLR7 と polyU_19mer を混合した後のインキュベートが必要であった。

X 線回折強度データセット収集は SPring-8 BL41XU (兵庫) において行った。結晶をクライオプロテクト溶液 (12% (w/v) PEG 3350, 0.1125 M sodium chloride, 7.5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.075 M magnesium chloride, 0.075 M sodium citrate, pH 5.0, 20% (v/v) DMSO) に 5 秒程度ソーキングした後に、CryoLoop (Hampton Research)を用いてマウントし、液体窒素で急速冷却し、波長 1.0000 Å の X 線 (Aluminum attenuator 1030 μ m) を照射してデータセットを収集した。測定は 100 K の窒素気流下で行った。検出器にはシングルフォトンカウンティング型 2 次元 X 線検出器 PILATUS3 6M (DECTRIS) を使用した。

回折強度データセットの指数付け、積分強度の算出およびスケージングには、プログラム XDS を用いた (Kabsch, 2010)。位相決定は前項の TLR7/G/polyU 複合体の構造を用いた分子置換法 (MOLREP) によって決定した (Vagin and Teplyakov, 1997)。得られた初期モデル

構造に対して構造精密化を Refmac5 を用いて行った (Murshudov et al., 1997)。さらに、Coot を使用し、手動でモデル構造を修正した (Emsley and Cowtan, 2004)。Coot と Refmac5 のサイクルを繰り返し、最終モデル構造を得た (PDB: 5GMG) (Zhang et al., 2016)。データ収集と構造精密化の統計値は表 2 にまとめた。

2.1.8.3. TLR7/R848 複合体の結晶化

TLR7/R848 複合体の結晶化は TLR7 タンパク質溶液 (5.0 mg/mL proteins, 250 μ M R848) とリザーバー溶液 (12% (w/v) PEG 3350, 0.1 M magnesium chloride, 0.1 M sodium citrate, pH 5.0) を 0.5 μ L : 0.5 μ L の割合で混合し、20°C でシッティングドロップ蒸気拡散平衡法によって行われた (図 13A)。

X 線回折強度データセット収集は PF-AR NE3A (茨城) において行った。結晶をクライオプロテクタント溶液 (13% (w/v) PEG 3350, 0.1125 M sodium chloride, 7.5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.225 M ammonium sulfate, 0.075 M sodium citrate, pH 5.2, 20% (v/v) glycerol) に 5 秒程度ソーキングした後に、CryoLoop (Hampton Research) を用いてマウントし、100 K の窒素気流下で急速冷却し、波長 1.0000 Å の X 線を照射してデータセットを収集した。測定は 100 K の窒素気流下で行った。検出器にはシングルフォトンカウンティング型 2 次元 X 線検出器 PILATUS3 2M-F (DECTRIS) を使用した。図 13B にこの結晶の X 線回折パターン

の一つを示す。

回折強度データセットの指数付け、積分強度の算出およびスケーリングには、プログラム HKL-2000 を用いた (Otwinowski and Minor, 1997)。位相決定は 2.1.8.1 項の TLR7/G/polyU 複合体の構造を用いた分子置換法 (MOLREP) によって決定した (Vagin and Teplyakov, 1997)。得られた初期モデル構造に対して構造精密化を Refmac5 を用いて行った (Murshudov et al., 1997)。さらに、Coot を使用し、手動でモデル構造を修正した (Emsley and Cowtan, 2004)。Coot と Refmac5 のサイクルを繰り返し、最終モデル構造を得た (PDB: 5GMH) (Zhang et al., 2016)。データ収集と構造精密化の統計値は表 2 にまとめた。

2.1.8.4. その他の TLR7/アゴニスト複合体の結晶化

TLR7/imiqimod, TLR7/gardiquimod, TLR7/CL075, TLR7/CL097, TLR7/GS9620 および 13 種類の TLR7/IMDQ/ssRNA 複合体の結晶化は TLR7 タンパク質溶液 (7.5~8.0 mg/mL) とリザーバー溶液を 0.5 μ L : 1.0 μ L の割合で混合し、20°C でシッティングドロップ蒸気拡散平衡法によって行われた。これらの結晶の結晶化条件は 2.1.8.3 項の TLR7/R848 複合体の結晶化条件に基づいて改変した。タンパク質溶液には、TLR7 タンパク質の 10 倍モル比濃度の低分子アゴニストおよびまたは TLR7 タンパク質の 2 倍モル比濃度の ssRNA を添加した。リザーバー溶液は 8%~12% (w/v) PEG3350 or PEG4000 or PEG8000 (Hampton), 0.3~0.375

M ammonium sulfate, 0.075 M sodium citrate pH 5.0 (Hampton), 2.5 mM Tris-HCl pH 7.5 and 0.0375 M NaCl を用いた。

X 線回折強度データセット収集は PF-AR NE3A, PF-BL5A (茨城) および SPring-8 BL41XU (兵庫) において行った。結晶をクライオプロテクト溶液 (12%~14% (w/v) PEG 3350 or PEG4000 or PEG8000 (Hampton), 0.1125 M sodium chloride, 7.5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.225-0.3 M ammonium sulfate, 0.075 M sodium citrate, pH 5.0, 15%~20% glycerol) に 5 秒程度ソーキングした後に、CryoLoop (Hampton Research) を用いてマウントし、100 K の窒素気流下または液体窒素で急速冷却し、波長 1.0000 Å の X 線を照射してデータセットを収集した。検出器にはシングルフォトンカウンティング型 2 次元 X 線検出器 PILATUS3 2M-F (DECTRIS) (PF-AR NE3A)、PILATUS3 S 2M (DECTRIS) (PF-BL5A) および PILATUS3 6M (DECTRIS) (SPring-8 BL41XU) を使用した。

回折強度データセットの指数付け、積分強度の算出およびスケールリングには、プログラム XDS または HKL-2000 を用いた (Kabsch, 2010; Otwinowski and Minor, 1997)。位相決定は 2.1.8.3 項の TLR7/R848 複合体の構造 (PDB: 5GMF) を用いた分子置換法 (MOLREP) によって決定した (Vagin and Teplyakov, 1997)。得られた初期モデル構造に対して構造精密化を Refmac5 または phenix.refine を用いて行った (Afonine et al., 2012; Murshudov et al., 1997)。さらに、Coot を使用し、手動でモデル構造を修正した (Emsley and Cowtan, 2004)。

Coot と Refmac5 または phenix.refine のサイクルを繰り返し、最終モデル構造を得た (PDB: 5ZSA, 5ZSB, 5ZSC, 5ZSD, 5ZSE, 5ZSF, 5ZSG, 5ZSH, 5ZSI, 5ZSJ) (Zhang et al., 2018)。

データ収集と構造精密化の統計値は表 5 にまとめた。

すべての構造図は PyMol および Coot を用いて作成した。

2.1.9. 結晶の液体クロマトグラフィー質量分析

2.1.8.1 および 2.1.8.2 項で述べた TLR7/G/polyU および TLR7/Loxo/polyU 複合体の結晶中に含まれる polyU の長さを同定するため、液体クロマトグラフィー質量分析 (liquid chromatography-mass spectrometry: LC-MS) を用いた ssRNA の分析を首都大学東京大学院理工学研究科分子物質科学専攻・磯邊俊明特任教授、田岡万悟博士および山内芳雄博士に依頼した。

2.1.9.1. 分析サンプルの準備

TLR7/G/polyU 複合体の結晶 (20~30 個程度) を (4 M NaCl, 10 mM HEPES-NaOH, pH 7.0) で 3 回洗浄し、(10 mM MES-NaOH, pH 5.5, 50 mM NaCl) 10 μ L に溶解した。

TLR7/Loxo/polyU 複合体の結晶 (20~30 個程度) を (30% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール, 10 mM Citrate-NaOH, pH 5.0) で 3 回洗浄し、(10 mM MES-NaOH, pH 5.5, 50 mM NaCl)

10 μL に溶解した。

結晶溶解液の濃度は SDS-PAGE を行って見積もった (図 14)。TLR7/G/polyU 複合体の結晶溶解液のタンパク質濃度は約 1~2 μM であり、TLR7/Loxo/polyU 複合体の結晶溶解液のタンパク質濃度は約 2~5 μM であった。

2.1.9.2. 液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS)

結晶溶解液の LC-MS は磯邊らによる実験である。逆相 LC は Develosil C30-UG-3 (径 3 μm , 野村ケミカル) を用い、バッファー (10 mM トリエチルアンモニウム酢酸, pH 7.0, 10 μM リン酸アンモニウム) を用いて、流速 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ でアセトニトリル濃度を 2%から 18%まで 30 分で勾配をかけた。溶出液はセミマイクロフローセル (2.5 μL volume, 5 mm light path; SPD-20A, Shimadzu) で 260 nm の吸光度を測定し、直列に接続した四重極オービトラップ融合型質量分析装置 Q Exactive (Thermo Fisher Scientific, Inc.) によって解析した。標準サンプルはそれぞれ 5 pmol アプライした (図 35)。MS はネガティブモードで測定し、MS と MS/MS の間は自動で切り替えた (Taoka et al., 2009)。

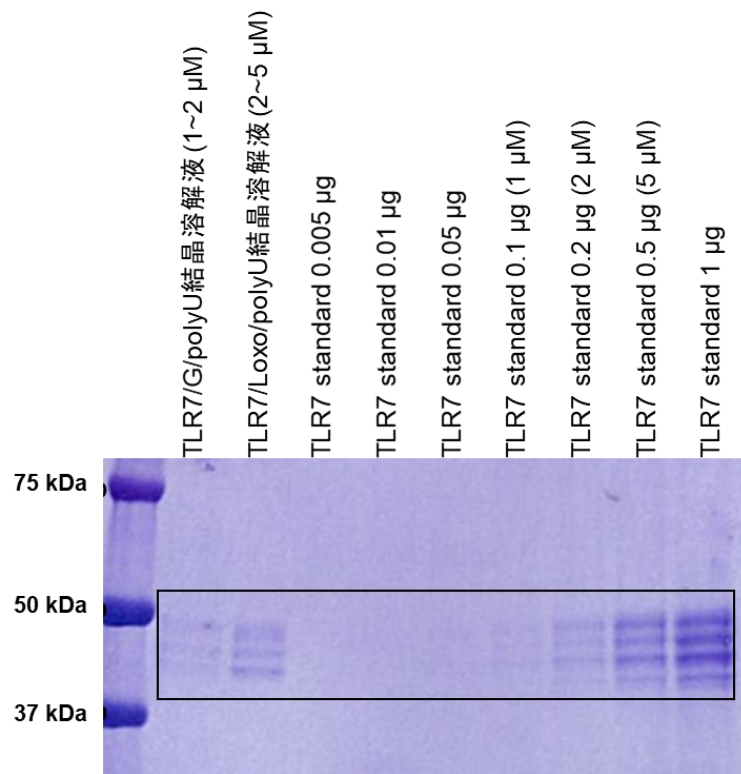


図 14. LC-MS 分析に使用した結晶溶液の SDS-PAGE

枠に囲まれているのは TLR7 タンパク質のバンドである。結晶溶液のタンパク質濃度を見積もるため、標準サンプルとして TLR7 (糖鎖結合部位変異体かつ糖鎖非切断体) の精製サンプルを 0.005 μg ~1 μg 電気泳動した。各濃度の標準サンプルのバンドの濃さと比べて、結晶溶液のタンパク質濃度を推測した。

2.1.10. NF- κ B レポーターアッセイ

ヒト TLR7 (野生型、site 1 変異体、site 2 変異体、および site 1 と site 2 どちらにも含まれないが二量体化に関与する残基の変異体) を発現した HEK293T 細胞を用いたヒト TLR7

のレポータージーンアッセイを東京大学医科学研究所・三宅健介教授および柴田琢磨博士らに依頼した。本項で述べる実験は、三宅らによって行われたものである。

図 39 および図 42 で示した NF- κ B レポーターアッセイ実験の手順を下記に示す。HEK293T 細胞用の培地は 10% FBS, 1 \times penicillin-streptomycin-glutamine (Life Technologies) および 50 μ M 2-ME (Nacalai Tesque) を添加した DMEM (Gibco, Paisley, UK) を用いた。ヒト TLR7 およびその変異体の cDNA を挿入した pMX-puro-IRES-rat CD2 ベクターを 200 ng、pELAM1-luc レポータープラスミドを 1 ng およびマウス Unc93B1 cDNA を挿入した pMX-puro ベクターを 200ng 用い、PEI (polyethylenimine ‘MAX’, MW 40,000; Polysciences, Inc.) を使用してこれらの遺伝子を HEK293T 細胞 (コラーゲン・コート 24 ウェルプレート, 2 \times 10⁵ cells/ウェル) にトランスフェクションした。HEK293T 細胞にトランスフェクション後 30 時間細胞を培養し、5 \times 10⁴ cells/ウェルで 96 ウェルプレート (Corning) に再び撒き、(1) R848 (Invivogen)、(2) polyU_19merS + Guanosine (G) (MP Biomedicals) または (3) RNA9.2sS (30 μ L/mL DOTAP と複合化したもの, Roche Diagnostics) で 6 時間刺激を行ったのち、Luciferase Assay System (Promega) で活性測定を行った。化学発光の相対発光量は GloMax 96 Microplate Lumineter (Promega) で測定した。

図 47 で示した NF- κ B レポーターアッセイ実験の手順を下記に示す。ヒト TLR7 またはマウス TLR7 の cDNA を挿入した pMX-puro-IRES-rat CD2 ベクターを 200 ng、pELAM1-luc

レポータープラスミドを 50 ng およびマウス Unc93B1 cDNA を挿入した pMX-puro ベクターを 200ng 用い、PEI (polyethylenimine'MAX', MW 40,000; Polysciences, Inc.) を使用してこれらの遺伝子を HEK293T 細胞 (コラーゲン・コート 24 ウェルプレート, 2×10^5 cells/ウェル) にトランスフェクションした。HEK293T 細胞にトランスフェクション後 24 時間細胞を培養し、384 ウェルプレート (Coring) に再び撒き、10 種類の ssRNA (30 μ L/mL DOTAP と複合化したもの, Roche Diagnostics) で 6 時間刺激を行ったのち、Luciferase Assay System (Promega) で活性測定を行った。化学発光の相対発光量は GloMax 96 Microplate Lumineter (Promega) で測定した

2.1.11. TLR7 の site 2 変異体の調製

TLR7 の site 2 変異体の *Drosophila* S2 細胞安定発現株を作成した。PCR 反応を用いて前述 2.1.1 項の *Mm*TLR7 野生型の発現ベクター (ベクター-A) に変異を導入した。計 8 個の TLR7 の site 2 変異体 (R97A, L105A, C112S, S154A, C98S, C100S, R186A および C475S) を作成した。変異導入に使用したプライマーは (表 1) にまとめた。作成した TLR7 の site 2 変異体ベクターを用いて、2.1.2 項のプロトコルに従って *Drosophila* S2 細胞の安定発現株を作成した。さらに、2.1.3 項のプロトコルに従って、site 2 変異体の発現と精製を行った。ゲルろ過クロマトグラフィー精製には、Superdex 200 Increase 10/300 GL (CV = 24 mL, GE

Healthcare) を用いた。バッファーは 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl を用い、流速は 1 mL/min とし、30 分かけて溶出させた。14 分付近における単量体に相当するピークを分取した (図 15)。

R97A, L105A, C112S, S154A, C98S, C100S および R186A に関しては、ゲルろ過分析に十分なタンパク質量が得られた。さらに、R97A, C112S および R186A に関しては、ITC 実験に十分なタンパク質量が得られた。一方、C475S に関しては、十分なタンパク質量が得られなかった。

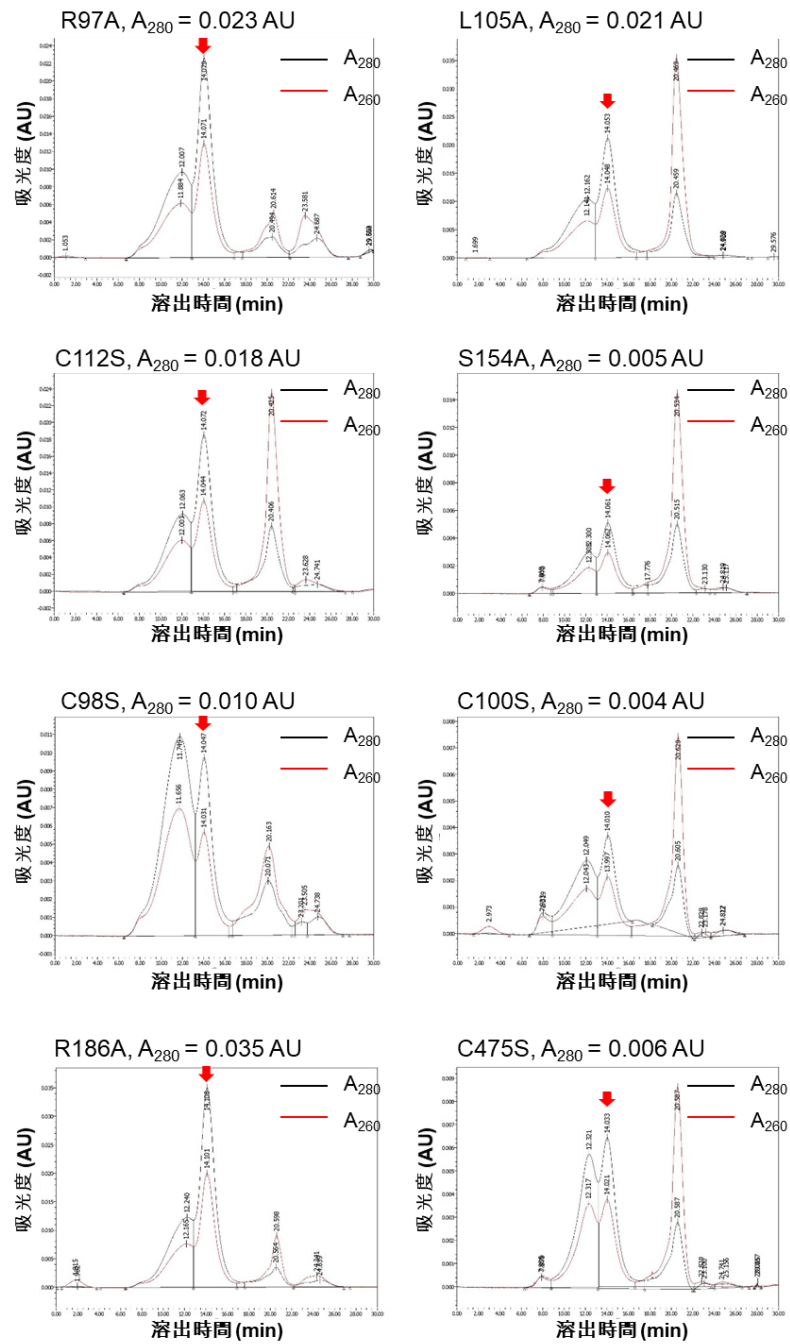


図 15. TLR7 site 2 変異体のゲルろ過クロマトグラフィー精製のチャート

目的タンパク質のピークを赤い矢印で強調した。各 TLR7 site 2 変異体の単量体ピークの A₂₈₀ の値を示した。

2.2. アンタゴニストによる TLR7 の阻害機構

2.2.1. TLR7 タンパク質の調製

2.2 項の実験 (結晶化、ITC 分析、クロスリンクアッセイおよび電子顕微鏡解析) に用いた TLR7 タンパク質は基本的に 2.1.3 および 2.1.4 項の方法により調製した。なお、クライオ電子顕微鏡解析 (Titan Krios) に用いた部分的に Protein A タグを含む TLR7 タンパク質 (糖鎖結合部位変異体かつ糖鎖切断) の調製は 2.1.4 項で示した方法と同様であるが、ゲルろ過クロマトグラフィー精製の画分を回収した際に、部分的に Protein A タグの切断されていない TLR7 単量体の画分を回収した。詳細な調製過程は 2.2.5.2 項にて記述する。

2.2.2. 結晶化および X 線結晶構造解析

TLR7/Cpd-1, TLR7/Cpd-2 および TLR7/Cpd-3 複合体の結晶化は TLR7 タンパク質溶液 (7.5~8.0 mg/mL) とリザーバー溶液を 0.5 μ L : 1.0 μ L の割合で混合し、20°C でシッティングドロップ蒸気拡散平衡法によって行われた。タンパク質溶液には、1 mM または飽和濃度のリガンドを添加した。リザーバー溶液は 8%~12% (w/v) PEG3350 or PEG8000 (Hampton), 0.3~0.375 M ammonium sulfate, 0.075 M sodium citrate pH 5.0 (Hampton), 2.5 mM Tris-HCl pH 7.5 and 0.0375 M NaCl を用いた。TLR7/Cpd-6 複合体の結晶構造は TLR7 タンパク質溶液 (10.0 mg/mL) とリザーバー溶液を 0.2 μ L : 0.2 μ L の割合で混合し、20°C でシッティング

グドロップ蒸気拡散平衡法によって行われた。タンパク質溶液には、濃度が 2.5 mM の Cpd-6 を添加した。リサーバー溶液は 15% (w/v) PEG4000, 0.2M ammonium sulfate and 0.1M tri-sodium citrate pH 5.6 (PEGs II Suite, E8) (Qiagen) を用いた。

X 線回折強度データセット収集は PF-BL5A および PF-AR NE3A (茨城) において行った。

結晶をクライオプロテクトant溶液 (12%~14% (w/v) PEG 3350 or PEG8000 (Hampton), 0.1125 M sodium chloride, 7.5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.225-0.3 M ammonium sulfate, 0.075 M sodium citrate, pH 5.0, 15%~20% glycerol) に 5 秒程度ソーキングした後に、CryoLoop (Hampton Research) を用いてマウントし、100 K の窒素気流下または液体窒素で急速冷却し、波長 1.0000 Å の X 線を照射してデータセットを収集した。検出器にはシングルフォトンカウンティング型 2 次元 X 線検出器 PILATUS3 S 2M (DECTRIS) (PF-BL5A) および PILATUS3 2M-F (DECTRIS) (PF-AR NE3A)を使用した。

回折強度データセットの指数付け、積分強度の算出およびスケールリングには、プログラム XDS または HKL-2000 を用いた (Kabsch, 2010; Otwinowski and Minor, 1997)。位相決定は 2.1.8.3 項の TLR7/R848 複合体の構造 (PDB: 5GMF) を用いた分子置換法 (MOLREP) によって決定した (Vagin and Teplyakov, 1997)。得られた初期モデル構造に対して構造精密化を Refmac5 または phenix.refine を用いて行った (Afonine et al., 2012; Murshudov et al., 1997)。さらに、Coot を使用し、手動でモデル構造を修正した (Emsley and Cowtan, 2004)。

Coot と Refmac5 または phenix.refine のサイクルを繰り返し、最終モデル構造を得た (PDB: 6LVX, 6LVY, 6LVZ, 6LW0) (Tojo et al., 2020)。データ収集と構造精密化の統計値は (表 7) にまとめた。

2.2.3. ITC 分析

TLR7 に対する Cpd-6 および Cpd-7 の結合親和性を測定するため、等温滴定カロリメトリー (ITC) を MicroCal iTC200 (GE Healthcare) を用いて行った。バッファーは pH 4.7 (~30mM Citrate-NaOH, pH 4.7, 150mM NaCl)、または pH 5.7 (~30mM Citrate-NaOH, pH 5.7 (Hampton Research), 150mM NaCl) を用い、測定は 298 K で行った。リガンド溶液の濃度は 1 mM で、TLR7 タンパク質 (糖鎖結合部位変異体かつ糖鎖非切断) の濃度は 80 μ M とした。最初に 0.4 μ L の滴定を 1 回行った後、2 μ L の滴定を 18 回行い、滴定の間隔は 180 秒として、リガンド結合の際に出入りした熱量を測定した。ITC のデータ解析には OriginLab Software (GE Healthcare) を用いた。1 サイト結合モデルを用いたカーブフィッティングによって K_d 値を算出した。

2.2.4. クロスリンクアッセイ

グルタルアルデヒドを用いたクロスリンクアッセイには、TLR7 タンパク質 (糖鎖結合部位

変異体かつ糖鎖非切断) を 10 mM HEPES-NaOH, pH 8.0, 150 mM NaCl を含むバッファーに交換し、Amicon Ultra devices (Merck) を用いて 13 mg/mL まで濃縮した。TLR7 タンパク質の濃度は、50 mM HEPES-NaOH, pH 7.0, 150 mM NaCl (中性条件) または 50 mM citrate-NaOH pH 5.0, 150 mM NaCl (酸性条件) のバッファーを用いて 25 μ M に調整した。Cpd-3、Cpd-6 および Cpd-7 を終濃度が 100 μ M または 1000 μ M になるように添加した。グルタルアルデヒド (Wako) を 5 mM (中性条件) または 20 mM (酸性条件) の終濃度で添加して反応を開始させた。室温で 25 分間インキュベートした後、Tris-HCl pH 7.5 を 100 mM の終濃度で添加して反応を終止させた。クロスリンクしたサンプルを非還元 SDS-PAGE で分析した。TLR7 単量体および二量体のバンドの強度を計算するため、ImageJ ソフトウェアを用いた (Abràmoff et al., 2004)。

2.2.5. 電子顕微鏡解析用サンプルの調製

2.2.5.1. TLR7/リガンド複合体の調製 (負染色電顕および 200-kV クライオ電顕)

電子顕微鏡解析用の TLR7/Cpd-3 クロスリンク複合体を調製するには、25 μ M の TLR7 タンパク質 (糖鎖結合部位変異体かつ糖鎖非切断)、1 mM の Cpd-3 および 20 mM のグルタルアルデヒドを酸性バッファー (50 mM Citrate-NaOH, pH 5.0, 150 mM NaCl) で混合し、常温で 30 分間反応させた。Glycine-HCl pH 5.0 を 100 mM の終濃度になるように加えて反応

を終止させた。クロスリンクされた TLR7/Cpd-3 複合体は、10 mM Citrate-NaOH, pH 5.0, 150 mM NaCl バッファーで平衡化した Superdex 200 Increase カラム (GE Healthcare) を用いてさらに精製した。TLR7 の二量体画分を回収し、Amicon Ultra devices (Merck) を用いて~0.6 mg/mL まで濃縮した。精製したサンプルは液体窒素で急冷し-70°Cで保存していた (図 58)。

電子顕微鏡解析用の TLR7 (リガンドなし)、TLR7/Cpd-6 および TLR7/Cpd-7 クロスリンク複合体を調製するには、25 μ M の TLR7 タンパク質 (糖鎖結合部位変異体かつ糖鎖非切断)、リガンド添加なしまたは 2 mM の Cpd-6 または 2 mM の Cpd-7 および 20 mM のグルタルアルデヒドを酸性バッファー (50 mM Citrate-NaOH, pH 5.0, 150 mM NaCl) で混合し、常温で 30 分間反応させた。Glycine-HCl pH 5.0 を 100 mM の終濃度になるように加えて反応を終止させた。クロスリンクされたタンパク質は、10 mM Citrate-NaOH, pH 5.0, 150 mM NaCl バッファーで平衡化されていた Superdex 200 Increase カラム (GE Healthcare) を用いてさらに精製した。TLR7 の二量体画分を回収し、Amicon Ultra devices (Merck) を用いて~2.0 mg/mL まで濃縮した。精製したサンプルは液体窒素で急冷し-70°Cで保存した (図 59)。

2.2.5.2. TLR7/Cpd-7 複合体の調製 (Titan Krios)

部分的に Protein A タグを含む TLR7 タンパク質 (糖鎖結合部位変異体かつ糖鎖切断) を調製するには、2.1.4 項で述べた結晶化用 TLR7 タンパク質を調製する手順に基づいて行った (図 65)。ゲルろ過クロマトグラフィー精製後、TLR7 単量体のピークの前~5%の部分を回収した(図 65A, B, pooled #1)。Pooled #1 の精製標品を SDS-PAGE で分析した結果、非還元条件では 100 kDa 以上のバンドが確認され、部分的に Protein A タグが切断されていなかったタンパク質が含まれていると考えられる (図 65C)。なお、還元条件ではこのサンプルの Z-loop が切断されていたことが確認された。

クライオ電子顕微鏡解析 (Titan Krios) に用いた TLR7/Cpd-7 クロスリンク複合体を調製するには、25 μ M の部分的に Protein A タグを含む TLR7 タンパク質 (糖鎖結合部位変異体かつ糖鎖切断)、2 mM の Cpd-7 および 22.5 mM のグルタルアルデヒドを酸性バッファー (50 mM Citrate-NaOH, pH 5.0, 150 mM NaCl) で混合し、常温で 30 分間反応させた。Glycine-HCl pH 5.0 を 100 mM の終濃度になるように加えて反応を終止させた。クロスリンクされたタンパク質は、10 mM Citrate-NaOH, pH 4.8, 100 mM NaCl バッファーで平衡化した Superdex 200 Increase カラム (GE Healthcare) を用いてさらに精製した。TLR7 の二量体画分を回収し、Amicon Ultra devices (Merck) を用いて 1.4 mg/mL まで濃縮した。精製したサンプルは液体窒素で急冷し-70°Cで保存した (図 65)。

2.2.6. 負染色電子顕微鏡測定とデータ解析

2.2.5.1 項で示した TLR7/Cpd-3、TLR7 (リガンドなし)、TLR7/Cpd-6 および TLR7/Cpd-7 クロスリンク複合体のサンプルについて負染色電子顕微鏡で測定した (図 60)。4 種類のサンプルを 20mM Citrate-NaOH, pH 5.0, 150mM NaCl のバッファーで 100 nM の濃度に希釈した。グロー放電で親水化したカーボングリッド (ELS-C10 STEM Cu100P、Okenshoji) に 3 μ L のサンプルを載せ、30 秒間吸着させた。余分なサンプルを濾紙で吸い取った後、3 μ L の 2% (w/v) 酢酸ウラニルで 3 回染色し、空気乾燥させた。染色されたグリッドは、4K \times 4K の CCD カメラを備えた JEM-2010F 電子顕微鏡 (日本電子) を用いて、200 kV の加速電圧で測定した。データ収集は、倍率 60,000 \times およびデフォーカス範囲 -0.5 ~ -1.5 μ m で行った。各サンプルについて、ピクセルサイズ 1.5 \AA の CCD 画像を 40~60 枚収集した。データ解析には cisTEM ソフトウェアを用いた (Grant et al., 2018)。CTF parameters estimation、automated particle picking および複数サイクルの 2D classification を行った。

2.2.7. クライオ電子顕微鏡測定

2.2.7.1. 200 kV のクライオ電子顕微鏡での測定

2.2.5.1 項で示した TLR7/Cpd-3、TLR7/Cpd-6 および TLR7/Cpd-7 クロスリンク複合体のサ

サンプルは 200 kV のクライオ電子顕微鏡 (Glacios および Talos Arctica) で測定した。3 種類のサンプルを 10mM Citrate-NaOH, pH 4.8, 100mM NaCl のバッファーで 0.6~0.7 mg/mL の濃度に希釈した。3 μ L のサンプルをグロー放電で親水化した Quantifoil グリッド (R1.2/R1.3 300 mesh, copper or copper/rhodium) に載せ、4-6°Cかつ 100%湿度の環境で 4~5 秒間ブロッキングした後、Vitrobot MkIV (Thermo Fisher Scientific) を用いて液体エタンの中に入っ込んで凍結させた。

TLR7/Cpd-3 複合体および TLR7/Cpd-6 複合体の測定は、理化学研究所放射光科学研究センターのクライオ電子顕微鏡施設 (兵庫) において、Glacios 電子顕微鏡 (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。検出には Falcon3EC 直接電子検出器を用い、カウンティングモードで行った。各ムービースタックは 150,000 \times の倍率で、40 フレームにわたって 50.0 e-/Å²の積算線量で取得した。ピクセルサイズは 0.67 Å であった。ムービースタックは EPU ソフトウェアを用いた beam-image shift 法で自動的に取得した。

TLR7/Cpd-7 複合体の測定は、東京大学のクライオ電子顕微鏡施設において、Gatan Quantum-LS Imaging Filter (GIF) を備えた Talos Arctica 電子顕微鏡 (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。検出には Gatan K2 Summit 直接電子検出器を用い、カウンティングモードで行った。各ムービースタックは 130,000 \times の倍率で、40 フレームにわたって 50.0 e-/Å²の積算線量で取得した。ピクセルサイズは 1.03 Å であった。ムービースタックは

SerialEM ソフトウェアを用いた beam-image shift 法で自動的に取得した (Mastronarde, 2005)。

2.2.7.2. 300 kV のクライオ電子顕微鏡での測定

2.2.5.2 項で示した TLR7/Cpd-7 クロスリンク複合体のサンプルは 300 kV のクライオ電子顕微鏡 (Titan Krios) で測定した。このサンプルを 10mM Citrate-NaOH, pH 4.8, 100mM NaCl, 1 mM Cpd-7 のバッファーで~0.8 mg/mL の濃度に希釈した。3 μ L のサンプルをグロー放電で親水化した Quantifoil グリッド (R1.2/R1.3 300 mesh, copper/rhodium) に載せ、6°Cかつ 100%湿度の環境で 4.5 秒間ブロッティングした後、Vitrobot MkIV (Thermo Fisher Scientific) を用いて液体エタンの中に突っ込んで凍結させた。

TLR7/Cpd-7 複合体の測定は、東京大学のクライオ電子顕微鏡施設において、Gatan Quantum-LS Imaging Filter (GIF) を備えた Titan Krios 電子顕微鏡 (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。検出には Gatan K3 直接電子検出器を用い、カウンティングモードで行った。各ムービースタックは 105,000 \times の倍率で、60 フレームにわたって 60.0 e⁻/Å² の積算線量で取得した。ピクセルサイズは 0.83 Å であった。ムービースタックは SerialEM ソフトウェアを用いた beam-image shift 法で自動的に取得した (Mastronarde, 2005)。

2.2.8. クライオ電子顕微鏡データ解析および構造モデリング

クライオ電子顕微鏡のデータ解析は RELION 3.0 を用いて行った (Zivanov et al., 2018)。各ムービースタックは, MotionCor2 を用いて motion correction を行った (Zheng et al., 2017)。CTF パラメータは CTFFIND4 プログラムを用いて推定した (Rohou and Grigorieff, 2015)。TLR7/Cpd-3 複合体 (Glacios 測定, 940 movies)、TLR7/Cpd-6 複合体 (Glacios 測定, 2,988 movies)、TLR7/Cpd-7 複合体 (Talos Arctica 測定, 2,547 movies) および TLR7/Cpd-7 複合体 (Titan Krios 測定, 4,464 movies) のデータ解析の過程は, それぞれ図 61、図 62、図 63 および図 66 にまとめた。最終分解能は独立して精密化した 2 つのハーフマップ間の gold-standard Fourier shell correlation (FSC = 0.143) によって推定した。TLR7/Cpd-6 複合体のデータ解析では、3D classification 解析で TLR7 の 2 種類の異なるコンフォメーションが得られたため、それぞれを別々に精密化した (図 62)。Glacios および Talos Arctica 電子顕微鏡で測定した 3 つのデータは、粒子の配向が偏っていたため、分解能が異方的になってしまい、密度マップの質が低かった。したがって、これらの密度マップに対してはモデル構築を実施しなかった (表 8)。

Titan Krios 電子顕微鏡で測定した TLR7/Cpd-7 複合体のデータ解析では、合計 3 回の 3D classification 解析により、301,212 個の粒子を含む粒子パッケージが得られ、最終分解能

(FSC = 0.143) は 2.8 Å となった (図 66)。TLR7/Cpd-7 複合体の密度マップに対するモデル構築は、最初に Chimera ソフトウェアを用いて、2 つの TLR7 プロトマー (PDB: 5GMH, chain A) を密度マップにドッキングさせた (Pettersen et al., 2004)。その後 COOT プログラムを用いて構造モデルを手動で精密化した (Emsley and Cowtan, 2004)。次に、Phenix プログラムを用いて real-space refinement を行った (Adams et al., 2010)。

これらのクライオ電子顕微鏡密度マップは、Electron Microscopy Data Bank (EMDB) に登録した (EMDB: EMD-0999, EMD-1000, EMD-30000, EMD-30001, EMD-30002)。TLR7/Cpd-7 複合体の構造座標は、PDB に登録した (PDB: 6LW1)。クライオ電子顕微鏡データ収集、データ解析および構造精密化の統計値は、表 8 にまとめた。局所分解能マップは ResMap プログラムで作成した (Kucukelbir et al., 2014)。構造の作図は Chimera、ChimeraX、Pymol および COOT プログラムで行った (DeLano, 2002; Emsley and Cowtan, 2004; Goddard et al., 2018; Pettersen et al., 2004)。

2.2.9. PMBC サイトカイン生産抑制アッセイ

ヒト末梢血単核細胞 (hPBMC) は、健康な成人ドナーから採取した。hPBMC は 96 ウェルプレート (BD Falcon, Durham, NC, USA) に 5×10^5 細胞/ウェルの密度で培養した。培養した細胞を DMSO または 2.5 μM のアンタゴニスト (Cpd-6 および Cpd-7) で 3 時間処理した

後、10%FBS, Penicillin-Streptomycin-Glutamine (Gibco, Paisley, UK), 50 μ M 2-ME 培地を添加した 200 mL の RPMI1640 培地 (Gibco, Paisley, UK) 中で、R848 または TLR1/TLR2 リガンドの Pam₃CSK₄ (Invivogen, Hong Kong, China) を添加し、5% CO₂ の存在下で 37°C で 20 時間刺激した。次に培養上清を回収し、ELISA により分泌されたサイトカイン濃度を測定した。培養上清中のヒト IFN- α および TNF- α の濃度は、それぞれ Verikine Human IFN- α Multi-Subtype Serum ELISA Kit (PBL Assay Science, Piscataway, NJ, USA) および Human TNF- α Uncoated ELISA (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) を用いて測定した。本項の実験は東京大学医科学研究所の研究倫理委員会の承認を得た (登録番号: 30-100-B20190419)。本項で述べた PMBC サイトカイン生産抑制アッセイは、東京大学医科学研究所・柴田琢磨博士の協力の元で行われたものである。

3. 結果

3.1. アゴニストによる TLR7 の活性化機構

3.1.1. TLR7 は 2 種類のアゴニストリガンドを認識する

3.1.1.1. リガンド非結合 TLR7 は単量体である

TLR7 細胞外ドメインの *Drosophila* S2 細胞安定発現株を培養し、高純度精製を行い、TLR7 の 3 種類の精製サンプル (野生型かつ糖鎖非切断、糖鎖結合部位変異体かつ糖鎖非切断、糖鎖結合部位変異体かつ糖鎖切断体) を得た (図 10、図 11 および図 12)。いずれの精製サンプルもトロンビンによって Z-loop 部分で切断されたため (図 8 および図 9)、還元状態での SDS-PAGE 分析の結果では、N 末端側部分 (LRRNT~LRR14) と C 末端側部分 (LRR15~LRRCT) の 2 本のポリペプチド鎖に分離した (図 10B、図 11B および図 12B)。一方で、ゲル濾過クロマトグラフィーでは、いずれの TLR7 サンプルも TLR7 細胞外ドメインの計算分子量 (約 90 kDa) に対応する保留時間に単一のピークとして溶出した (図 10A、図 11A および図 12A)。これらのことから、TLR7 は Z-loop 部分で切断された後も、N 末端側部分と C 末端側部分が互いに会合していると考えられる。

実際、TLR7 において C98-C475 ジスルフィド結合が報告されている (Kanno et al., 2013)。

それを検証するため、TLR7 精製サンプルの SDS-PAGE 分析を還元状態と非還元状態で行った (図 16)。還元状態では、TLR7 は 2 本のバンド (野生型かつ糖鎖非切断) または数本の

ラダー状のバンド (糖鎖結合部位変異体かつ糖鎖切断) を示した。一方で、非還元状態では、いずれの TLR7 精製サンプルも 75 kDa~100 kDa の間にシングルバンドを示した。したがって、Z-loop 部分で切断後の N 末端側部分と C 末端側部分の間にジスルフィド結合があることが判明した。糖鎖切断体でのラダー状のバンドはキフネンシン処理および Endo H_f による糖鎖のトリミングによって糖鎖に数種類のバリエーションが生じたためだと考えられる。

TLR7 精製サンプルの溶液中での会合状態、リガンド結合能およびリガンドによる二量体化を、ゲルろ過クロマトグラフィーで分析した (図 17A)。まず、標準サンプルとして apoferritin (440 kDa)、β-amylase (200 kDa)、BSA (67 kDa)、carbonic anhydrase (29 kDa) を用いて検量線を引いた ($Y = -0.8286X + 8.224$) (図 17B)。TLR7 サブファミリータンパク質はエンドソーム/エンドライソソームに局在しているため (図 1)、エンドライソソームの酸性環境を模倣するため、ゲルろ過クロマトグラフィーのバッファーは pH 5.5 のものを用いた。ゲルろ過の結果から算出されたリガンド非結合型 TLR7 の分子量 110 kDa は、TLR7 の細胞外ドメインのアミノ酸配列から計算される分子量 93 kDa とよく一致しており、溶液中でリガンド非結合型 TLR7 は単量体であることが明らかになった。この結果は 3.1.1.1 項で示した非還元 SDS-PAGE 分析の結果と一致していた。また、合成低分子アゴニスト R848 (図 4) (Hemmi et al., 2002) と混合した TLR7 サンプルでは、TLR7 の溶出時間がリガンド非結合

型の 3.84 min から 3.61 min になった (図 17)。これは、検量線から 170 kDa と算出され、ある程度の割合が二量体化しているものと考えられる。よって、本研究で調製した Z-loop で切断された TLR7 細胞外ドメインタンパク質はリガンド結合能を持つことが確認された。

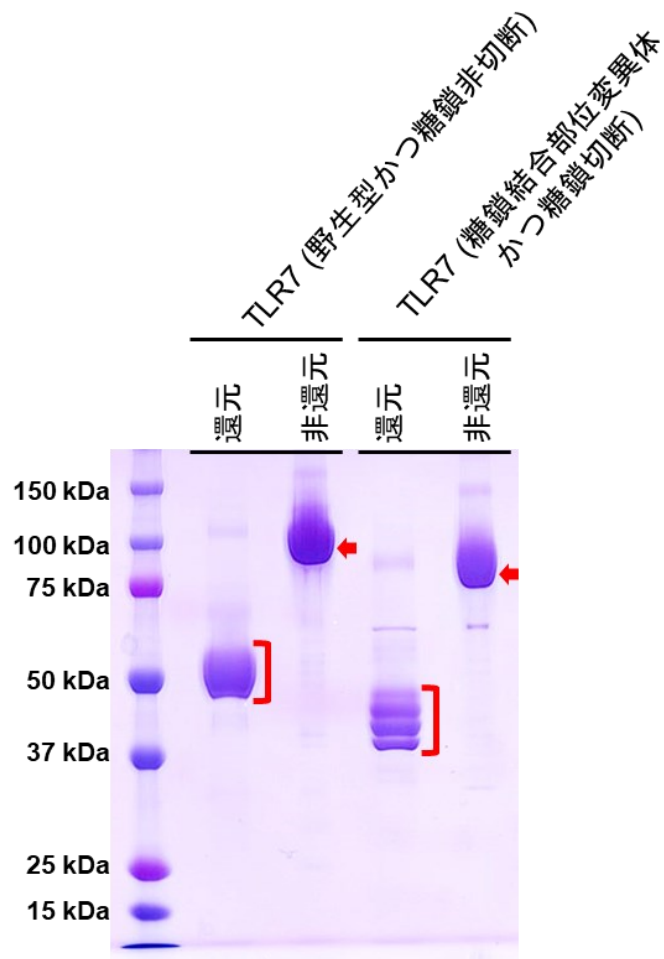
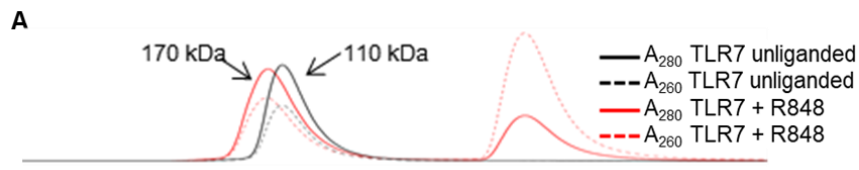


図 16. TLR7 精製サンプルの SDS-PAGE 分析

2 種類の TLR7 細胞外ドメインの精製タンパク質の SDS-PAGE 分析 (還元条件および非還元条件) の結果を示した; 目的タンパク質のバンドを赤い矢印または角括弧で強調した。



B

Protein	MW (Da)	X = Tr (min)	Y = logMW
Apoferitin	440000	3.145	5.64
Beta-amylase	200000	3.534	5.30
BSA	68000	4.006	4.83
Carbonic anhydrase	29000	4.590	4.46
フィッティング方程式: $Y = -0.8286X + 8.224$			
TLR7 (unliganded)	110000	3.841	-
TLR7 + R848	170000	3.613	-

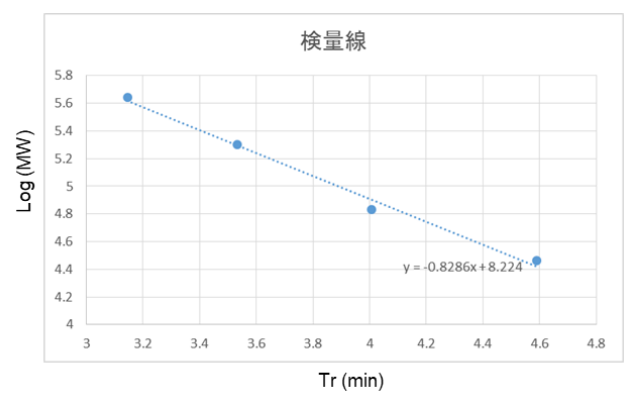


図 17. ゲル濾過クロマトグラフィーによる TLR7 の会合状態の分析 (一)

(A) TLR7 リガンド非結合型 (黒線) および TLR7 + R848 (赤線) のゲル濾過クロマトグラフィーのチャート; A_{280} は実線で、 A_{260} は点線で示した。

(B) 標準サンプルおよび TLR7 リガンド非結合型、TLR7 + R848 のゲル濾過クロマトグラフィーのまとめ (上); 後二者の溶出時間 ($X = Tr$) から、フィッティング方程式 ($Y = -0.8286X + 8.224$) を用いて、分子量 (MW) を算出した。標準サンプルのゲル濾過クロマトグラフィーから引いた検量線 (下)

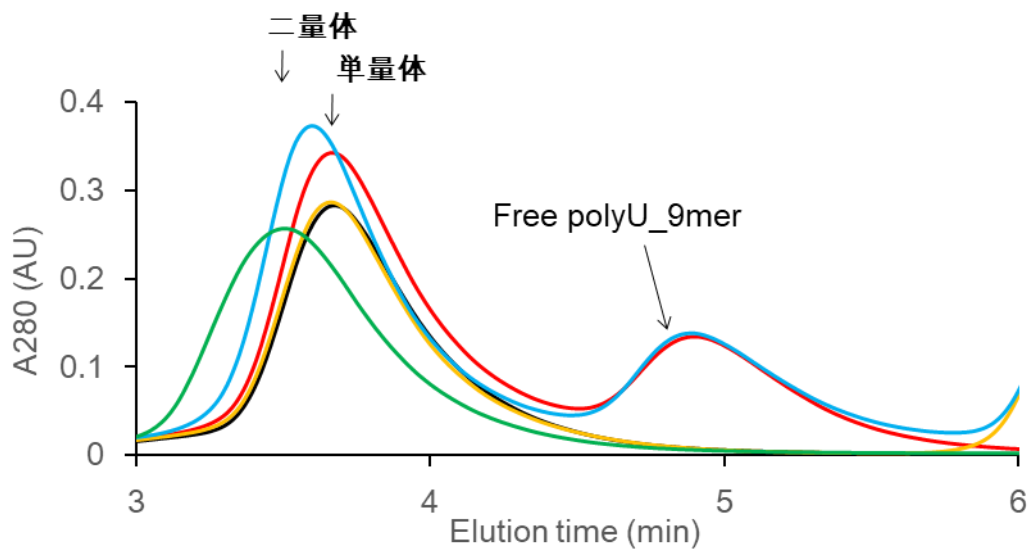
3.1.1.2. アゴニストリガンドは TLR7 の二量体化を誘導する

TLR7 は guanosine と polyU ssRNA の組み合わせによって活性化されると報告されている (Shibata et al., 2016)。そこで、guanosine と polyU_9mer を用いて、TLR7 との結合をゲルろ過分析で調べた (図 18)。polyU_9mer 単独添加では、TLR7 の溶出時間に変化がなかったが、TLR7 に対応するピークの 260 nm の吸光と 280 nm の吸光の比 (A_{260}/A_{280}) がリガンド非結合型での値 0.59 から 0.89 に上昇した。これは、polyU_9mer が結合したことで A_{260}/A_{280} の値が上昇したと考えられる。また、guanosine 単独添加では (図 18)、クロマトグラフィーの曲線に明確な変化が観測できず、TLR7 は guanosine と結合しないこと或いは結合が非常に弱いことを示した。さらに、guanosine と polyU_9mer を同時に添加した場合 (図 18)、 A_{260}/A_{280} の値の変化 (0.59 → 0.91) および溶出時間の変化 (3.67 min → 3.60 min) が観測された。これらのことから、polyU 単独では TLR7 と結合するが二量体化は誘導しないこと、一方で、guanosine と polyU の組み合わせで TLR7 の二量体化が誘導されることが示唆された。また、3.1.1.1 項と同様に R848 単独では TLR7 の二量体化が見られた (図 17 および図 18)。さらに TLR7 のリガンド依存的な二量体化を調べるために、沈降速度法超遠心分析 (SV-AUC) 実験を行った。その結果、TLR7 はリガンド非存在下では、単量体 (109 kDa) がメインピークであった (図 19)。polyU_9mer 存在下では、単量体がメインピークであったが、ピークの横幅が広くなり、これは polyU_9mer との結合を示しているものと考えられ

る。**Guanosine** 存在下では、単量体のメインピークであり、リガンド非存在下と比べてわずかに二量体 (215 kDa) のピークの割合が増加した (3.5% → 9.2%)。一方で、**guanosine** と **polyU_9mer** の同時存在下および **R848** 存在下では、両者とも二量体がメインピークとして観測された (それぞれ 62.6%と 65.5%)。

SV-AUC 分析の結果は本項のゲルろ過クロマトグラフィー分析の結果とよく一致していた。

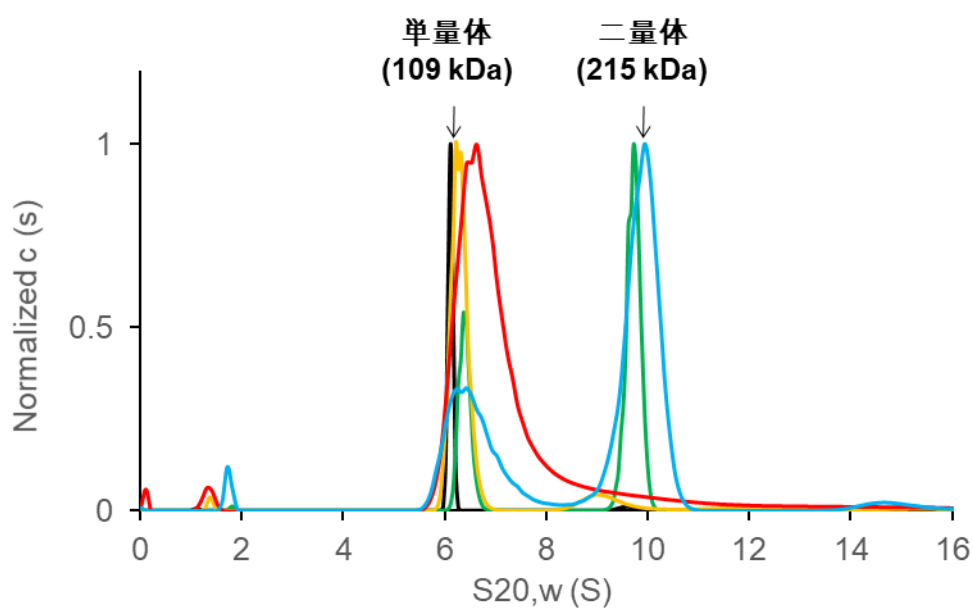
以上の結果から、溶液中で **TLR7** は単量体であり、アゴニストリガンドの結合により **TLR7** が活性化型二量体になると結論付けた。**Guanosine** 単独では僅かな二量体しか誘導しなかったが、**guanosine** と **polyU_9mer** の同時存在下では **TLR7** の二量体化が誘導された (図 18 および図 19)。一方で、合成低分子アゴニスト **R848** は単独で **TLR7** の二量体化を誘導した。



	Elution time (A_{260}/A_{280})
TLR7	3.67 min (0.59)
+ polyU_9mer	3.67 min (0.89)
+ Guanosine	3.66 min (0.58)
+ polyU_9mer + Guanosine	3.60 min (0.91)
+ R848	3.51 min (0.67)

図 18. ゲル濾過クロマトグラフィーによる TLR7 の会合状態の分析 (二)

TLR7 リガンド非結合型 (黒線)、TLR7 + polyU_9mer (赤線)、TLR7 + Guanosine (黄線)、TLR7 + polyU_9mer + Guanosine (青線) および TLR7 + R848 (緑線) のゲル濾過クロマトグラフィー分析のチャート; タンパク質の溶出時間およびピークの A_{260}/A_{280} の値 (括弧内) を示した。



	Dimer
TLR7	3.5%
+ polyU_9mer	1.3%
+ Guanosine	9.2%
+ polyU_9mer + Guanosine	62.6%
+ R848	65.5%

図 19. SV-AUC による TLR7 の会合状態の分析 (一)

TLR7 リガンド非結合型 (黒線)、TLR7 + polyU_9mer (赤線)、TLR7 + Guanosine (黄線)、TLR7 + polyU_9mer + G (青線) および TLR7 + R848 (緑線) の SV-AUC 分析のチャート; 得られた $c(s)$ 分布を最大値に対して正規化した。二量体 (Dimer) の割合を示した。単量体 (Monomer) と二量体 (Dimer) に相当する位置を矢印で示した。

3.1.1.3. ssRNA は低分子アゴニストの結合を促進する

3.1.1.2 項の SV-AUC 分析において、TLR7 は guanosine 単独ではわずかな二量体化しか引

き起こされないことに対し、**guanosine** と **polyU_9mer** の両方の存在下では効率的な TLR7 の二量体化が観測されていた。実際、細胞レベルのアッセイでは TLR7 が **guanosine** と **polyU ssRNA** の組み合わせによって活性化されると報告されている (Shibata et al., 2016)。そこで、ITC 分析およびゲル濾過クロマトグラフィー分析により、TLR7 への低分子アゴニスト (**guanosine** または合成低分子アゴニスト) の親和性に対する **ssRNA** のシナジー効果を調べた。まず、ITC 分析を用いて、**polyU** 非存在下または存在下で各種低分子アゴニスト (**guanosine**、**loxoribine** および **R848**) と TLR7 との結合親和性を測定した (図 20A, B および表 3A, B)。その結果、**guanosine**、**loxoribine** および **R848** と TLR7 との親和性は、**polyU_19mer** の存在下で顕著に増強された (それぞれ $K_d = 13.4 \mu\text{M} \rightarrow 0.93 \mu\text{M}$, $5.6 \mu\text{M} \rightarrow 0.57 \mu\text{M}$ および $0.49 \mu\text{M} \rightarrow 0.10 \mu\text{M}$ に上昇した)。さらに、より短鎖の **polyU_12mer**、**polyU_9mer** および **polyU_6mer** の存在下でも、TLR7 の **guanosine** に対する親和性が同程度まで上昇した (それぞれの K_d 値が $1.2 \mu\text{M}$, $1.6 \mu\text{M}$ および $1.5 \mu\text{M}$)。また、ゲルろ過分析の結果、**polyU_12mer** の存在下で、**guanosine**、**loxoribine**、**R848**、**gardiquimod** および **IMDQ** による TLR7 の二量体化の程度がリガンド単独の場合と比べて上昇した (図 21)。以上の結果から、**polyU ssRNA** が TLR7 の低分子アゴニストの結合を促進するシナジー効果を見出した。

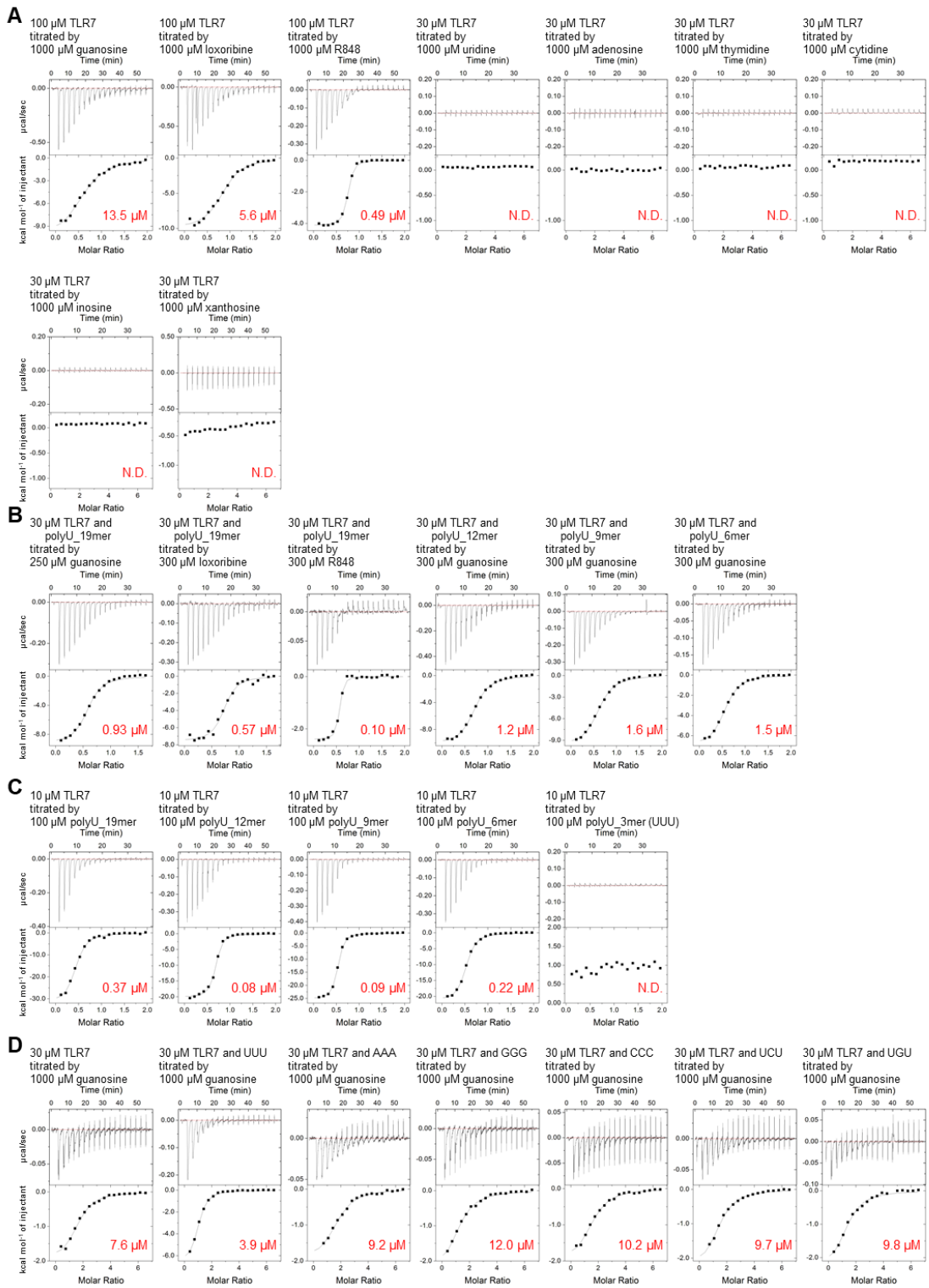


図 20. ITC 分析の thermograms (一)

各滴定から得られた K_d 値 (赤字) を示した。N.D.は「not determined」の略である。具体的な実験条件および結果に関しては表 3 を参照されたい。

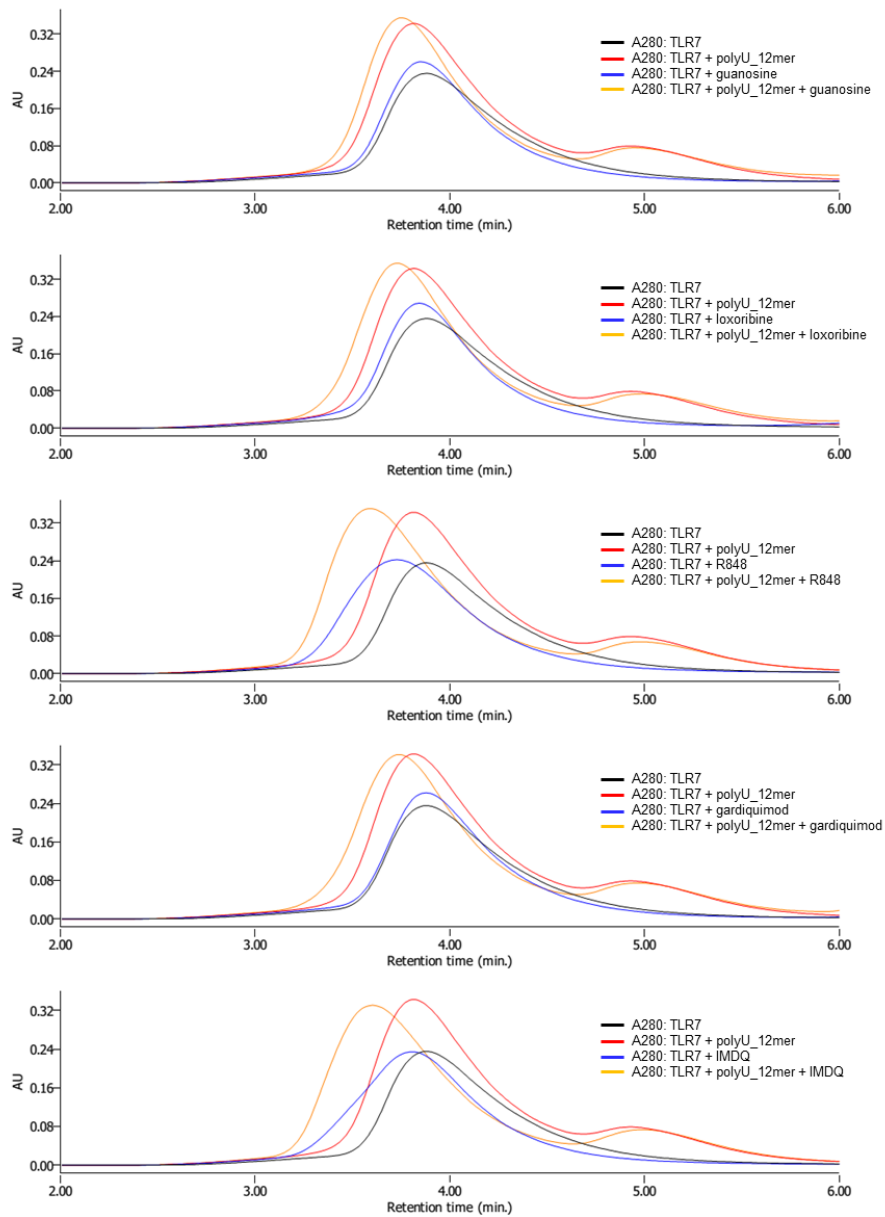


図 21. ゲル濾過クロマトグラフィーによる TLR7 の会合状態の分析 (三)

TLR7 リガンド非結合型 (黒線)、TLR7 + polyU_12mer (赤線)、TLR7 + (guanosine または loxoribine または R848 または gardiquimod または IMDQ) (青線) および TLR7 + polyU_12mer + (guanosine または loxoribine または R848 または gardiquimod または IMDQ) のゲル濾過クロマトグラフィー分析のチャートを示した。A₂₈₀ のみを示した。

3.1.1.4. ssRNAのみではTLR7の二量体化を誘導しない

3.1.1.2 項のゲルろ過クロマトグラフィー分析および SV-AUC 分析から、polyU ssRNA と TLR7 との結合が確認されたが、polyU ssRNA 単独では TLR7 の二量体化を直接は誘導しないことが示唆されている。それを検証するため、種々の長さの polyU 添加による TLR7 の二量体化を SV-AUC 分析で調べた (図 22A)。その結果、polyU_6mer および polyU_9mer 単独では TLR7 の二量体化を誘導しなかった。なお、ITC 分析で測定した polyU_6mer および polyU_9mer の TLR7 に対する結合親和性 (それぞれ 0.22 μM および 0.09 μM) は、polyU_12mer ($K_d = 0.08 \mu\text{M}$) および polyU_19mer ($K_d = 0.37 \mu\text{M}$) と同程度であり (図 20C および表 3C)、測定の際の TLR7 と polyU の濃度 (それぞれ 10 μM および 100 μM) を考慮すると TLR7 にはほぼ 100%近い割合で polyU_6mer および polyU_9mer が結合していたと考えられる。一方で、ここに guanosine を添加することで効果的に TLR7 の二量体化が誘導された (図 22B)。PolyU 存在下での TLR7 の二量体化の濃度依存性およびそこへの guanosine の効果を明らかにするため、polyU_12mer 存在下 (guanosine の有り、無し) で TLR7 の SV-AUC 分析を種々の濃度で行い、タンパク質濃度による重量平均沈降係数の等温線を分析した (図 22C)。その結果、濃度依存的な TLR7 の二量体化が観察され、guanosine の有りまたは無しの場合の二量体化の K_d 値は、それぞれ約 3 μM および 77 μM と推定され、

polyU 単独に比べて **guanosine** を添加することで二量体化が促進されることが明らかになった (図 22C)。なお、polyU_19mer および polyU_12mer 単独でも TLR7 の二量体化を誘導した (図 22A)。しかしながら、これらの二量体はおそらく活性化型二量体ではなく、polyU の鎖長が長いため、単に 1 本の ssRNA の異なる場所に 1 分子以上の TLR7 分子が同時に結合した非特異的な二量体であると予想される。

上記の結果により、polyU は TLR7 との親和性は十分に高いが直接は TLR7 の二量体化を誘導しないが、**guanosine** と TLR7 との親和性を高め、TLR7 の二量体形成を促進するシナジー効果を示すと結論付けた。

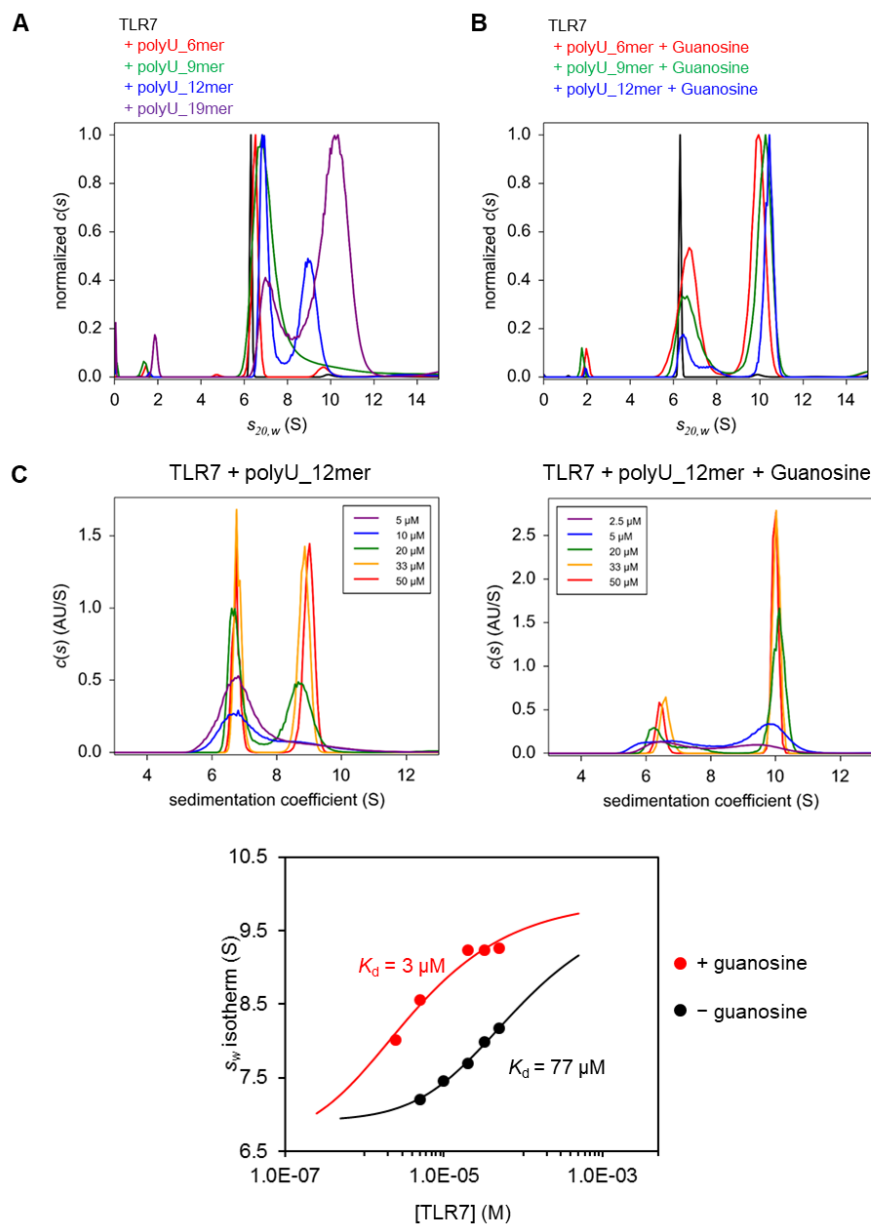


図 22. SV-AUC による TLR7 の会合状態の分析 (二)

(A) 種々の長さの polyU 添加による TLR7 の二量体化

(B) Guanosine 存在下で種々の長さの polyU 添加による TLR7 の二量体化

(C) PolyU_12mer 存在下 (guanosine の有り、無し) で種々の濃度の TLR7 の二量体化 (上);

タンパク質濃度による重量平均沈降係数の等温線 (下)

3.1.1.5. リガンド認識の pH 特異性

内因性の核酸による免疫応答を回避するために、TLR7 サブファミリーのタンパク質はエンドソーム/エンドライソソームに局在化している (Majer et al., 2017)。免疫細胞はエンドサイトーシス、食作用、マクロピノサイトーシスなどの経路を通して、体内に侵入した病原体を細胞内へ取り込む (Mercer and Helenius, 2009; Mercer et al., 2010; Sterling, 2010)。したがって、生体中では TLR7 はエンドライソソームの酸性環境において機能する。そこで、TLR7 のリガンド認識の pH 特異性を明らかにするため、酸性環境 (pH 5.5) または中性環境 (pH 7.5) において、TLR7 とリガンドとの結合をゲルろ過クロマトグラフィー分析および ITC 分析で調べた (図 23)。その結果、pH 5.5 において TLR7 は polyU と結合したが、pH 7.5 においては polyU と結合しなかった。また、pH 7.5 では polyU による低分子アゴニストに対するシナジー効果も見られなかった (図 23A-C)。このことから、TLR7 と ssRNA との結合は酸性依存的であることが明らかになった。

次に、ゲルろ過で TLR7 と R848 との結合を調べた結果、pH 5.5 でも pH 7.5 でも、同様に結合し二量体化が確認された (図 23C)。さらに、ITC 分析を行った結果、pH 7.5 における R848 と TLR7 との結合解離定数 K_d は $0.56 \mu\text{M}$ であり、酸性環境での K_d ($0.49 \mu\text{M}$) とほぼ同程度であった (図 23D および図 20A)。したがって、TLR7 と低分子アゴニストとの結合は pH 依存的ではないことが明らかになった。

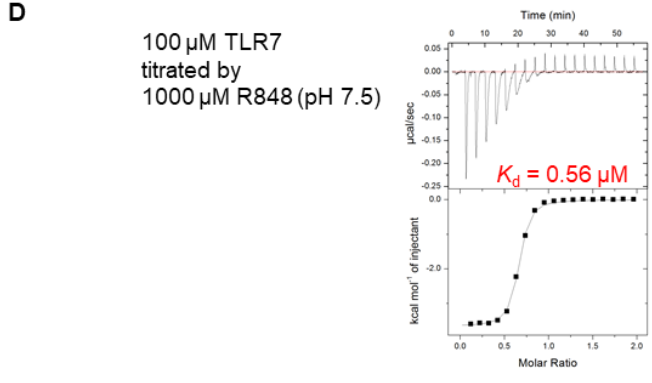
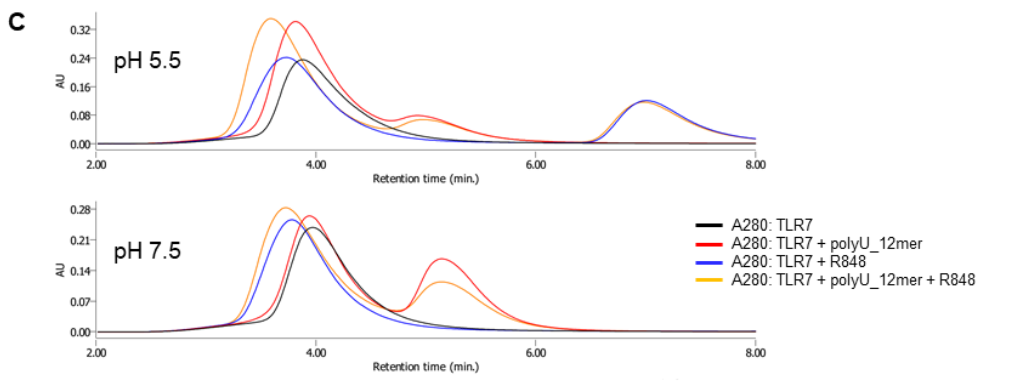
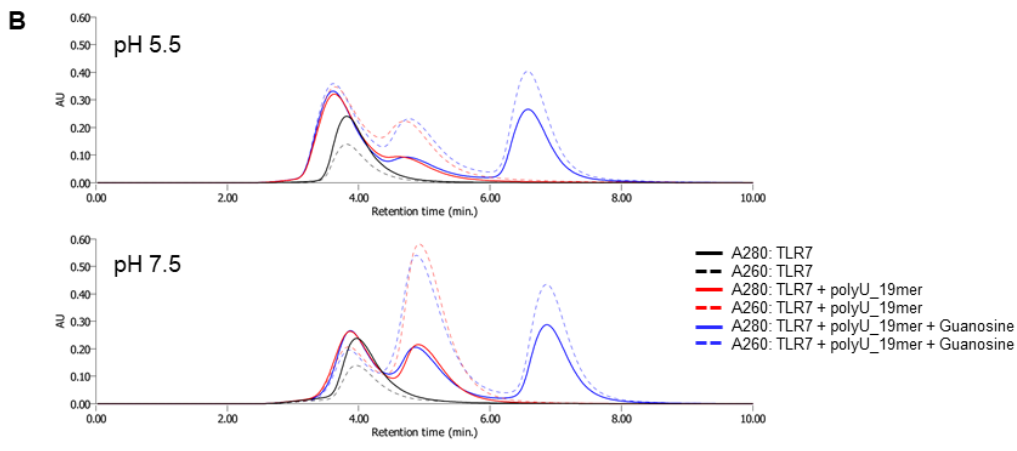
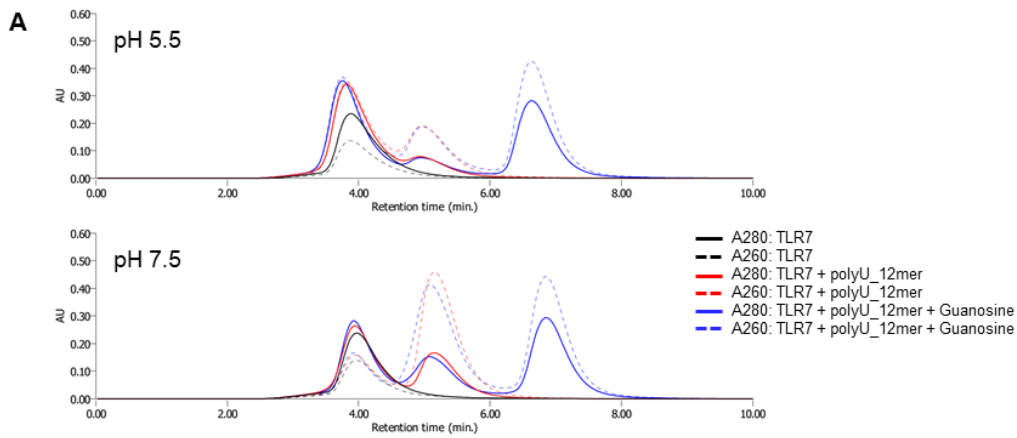


図 23. TLR7 とリガンドとの結合の pH 依存性

- (A) ゲルろ過クロマトグラフィーによる TLR7 と polyU_12mer との結合の分析
- (B) ゲルろ過クロマトグラフィーによる TLR7 と polyU_19mer との結合の分析
- (C) ゲルろ過クロマトグラフィーによる TLR7 と R848 との結合の分析
- (D) 中性条件で ITC による TLR7 と R848 との結合の分析; 滴定から得られた K_d 値 (赤字) を示した。

3.1.2. 天然アゴニストによる TLR7 の活性化機構

3.1.2.1. TLR7/G/polyU および TLR7/Loxo/polyU 複合体の結晶構造

最初に、TLR7 の立体構造および guanosine と ssRNA などの天然リガンドの認識機構を解明するため、様々な結晶化条件のスクリーニングを行い、TLR7/Guanosine/polyU_{19mer} (TLR7/G/polyU) 複合体 (PDB: 5GMF) の結晶構造解析に成功した。同時に、guanosine 類似物の合成低分子アゴニスト loxoribine を使用し、TLR7/Loxoribine/polyU_{19mer} (TLR7/Loxo/polyU) 複合体 (PDB: 5GMG) の結晶構造も解明した (図 13A)。

TLR7/G/polyU 複合体および TLR7/Loxo/polyU の結晶化条件はそれぞれ異なっており、それぞれ 2.5 Å および 2.6 Å の分解能で精密化した (表 2) (Zhang et al., 2016)。

TLR7/G/polyU 複合体および TLR7/Loxo/polyU 複合体の全体構造に大きな違いはなかった。いずれの複合体構造も、TLR8 および TLR9 の活性化型二量体構造と類似した配置の、C 末端部分で向かい会った m 字型二量体を構成していた (図 5 および図 24)。2 分子の TLR7 の C 末端残基は 2 回対称の二量体構造中の対称軸付近に位置しており、それらの Ca 原子間の距離は約 34~36 Å であった。細胞外ドメインの二量体化に伴って、細胞内の TIR ドメイン同士の接近を引き起こし、シグナル伝達するものと考えられる (図 2 および図 24)。ゆえに、上記 2 つの複合体構造はいずれも TLR7 の活性化型二量体構造を反映しているものと考えられる。なお、Z-loop の一部はディスオーダーしており (TLR7/G/polyU 複合体: アミノ酸

残基 459~478 および 490~492; TLR7/Loxo/polyU 複合体: アミノ酸残基 463~476 および 490~492)、モデルを構築することができなかった (図 24)。本論文では、TLR7 の二量体を構成するプロトマーおよびそのドメイン、残基などを、一方は無印、他方はアスタリスクをつけて表示する。

TLR7/G/polyU 複合体の構造中には、非対称単位中に二量体が 2 組存在していた (表 2)。また、TLR7/Loxo/polyU 複合体には、非対称単位中に二量体が 1 組存在していた (表 2)。

TLR7/G/polyU 複合体の結晶化条件の pH 値は中性であり、TLR7/Loxo/polyU 複合体の結晶化条件の pH 値はエンドライソソームの酸性環境と近い pH 5 付近であった (2.1.8 項)。

TLR7 と polyU ssRNA との結合は酸性 pH 依存的であるものの (3.1.1.5 項)、弱酸性と中性 pH でほぼ同じ全体構造が得られたことから、pH の変化による大きな全体構造の変化はないことが示唆された。

TLR7 の細胞外ドメインは、LRRNT、LRR1~14、Z-loop (アミノ酸残基 445-493)、LRR15~26 および LRRCT から構成されていた (図 25A)。活性化型二量体構造中の TLR7 プロトマーは、ドーナツ型のリング構造を形成し、N-末端の LRRNT と C-末端の LRRCT が直接相互作用をしていた (図 25B)。このプロトマーを TLR8 (PDB: 4R07) および TLR9 (PDB: 3WPC) の活性化型二量体構造中のプロトマーと重ね合わせると R.M.S.D がそれぞれ 1.6 Å および 1.6 Å であった (図 25C) (Ohto et al., 2015; Tanji et al., 2015)。

TLR7/G/polyU 複合体構造では、TLR8 の構造 (PDB: 4R07) で2つの異なるリガンド結合部位が見られたように、**guanosine** および **polyU_19mer** の一部分 (**UUU**) に対応する電子密度が2つの異なる部位で観察された (図 5、図 24A、図 26、図 27 および図 28)。**Guanosine** の結合部位および **polyU** の結合部位をそれぞれ **site 1** および **site 2** と命名した。TLR7 の二量体構造は2回対称を有するため、それぞれの結合部位は二量体構造中では等価な2か所が存在する。**Guanosine** が結合する **site 1** は二量体界面の中心付近に位置していた (図 26 および図 27)。一方、**UUU** が結合する **site 2** は LRR ドメインの凹面にあり、二量体界面に隣接する位置に存在していた (図 26 および図 27)。

Site 1 は、TLR8 における **uridine** または **R848** などの低分子リガンドの結合部位と同じ位置に対応していた (図 29A) (Tanji et al., 2013; Tanji et al., 2015)。よって、TLR7 も **site 1** において **R848** などの合成低分子アゴニストを認識すると予想される。一方で、**ssRNA** 結合部位である **site 2** は、TLR8 の **ssRNA** 結合部位と空間的および構造的に大きく異なっていた (図 29A) (Tanji et al., 2015)。TLR7 の **site 2** は LRR1~5 および **Z-loop** によって構成され、TLR8 の **site 2** は LRR10~13 および **Z-loop** によって構成される (図 30 および図 31)。

TLR7 の **site 2** に結合した **UUU** は二量体界面に隣接しているのに対し、TLR8 の **site 2** に結合した **UG** は完全に二量体界面からは離れていた (図 29A)。複数の動物種からの TLR7 とヒト TLR8 のアミノ酸配列のアラインメントを行った結果、**site 1** および **site 2** を形成す

る残基は、様々な種由来の TLR7 間で高度に保存されていた (図 31)。一方で、TLR7 と TLR8 との間では、**site 1** は良く保存されていたが、**site 2** は全く保存されていなかった。興味深いことに、TLR7 の **site 2** に結合した ssRNA の位置は、TLR9 活性化型二量体中の CpG DNA の位置と部分的に重なっていた (図 29B)。

TLR7/Loxo/polyU 複合体構造においても、TLR7/G/polyU 複合体構造と同様に、**site 1** および **site 2** にそれぞれ loxoribine および UUU の電子密度が確認された (図 24B)。

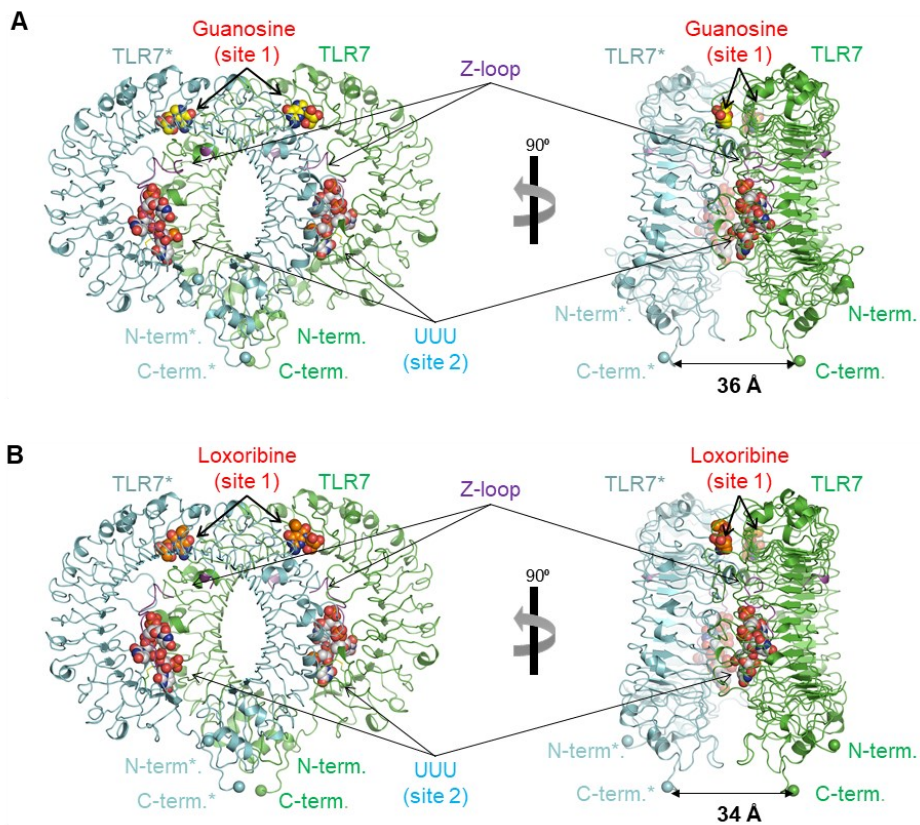


図 24. TLR7/リガンド複合体結晶構造 (一)

(A) TLR7/G/polyU 複合体の全体構造

(B) TLR7/Loxo/polyU 複合体の全体構造

各複合体の正面図 (右) および側面図 (左) を示した。タンパク質の部分はカートゥーンモデルで示した。二量体を構成する各 TLR7 分子を緑色 (TLR7) および水色 (TLR7*) で表した。二量体を構成するプロトマーおよびそのドメイン、残基などを、一方は無印、他方はアスタリスクをつけて表示した。Z-loop を紫色で表した。N 末端残基 (N-term./N-term.*) と C 末端残基 (C-term./C-term.*) の Ca 原子を球体で表した。側面図では C 末端残基の Ca 原子同士の距離を表記した。リガンドを空間充填モデルで示した。Guanosine、loxoribine および UUU の C 原子をそれぞれ黄色、橙色および灰色で表した。リガンドの O 原子、N 原子および P 原子をそれぞれ赤色、青色および橙色で表した。

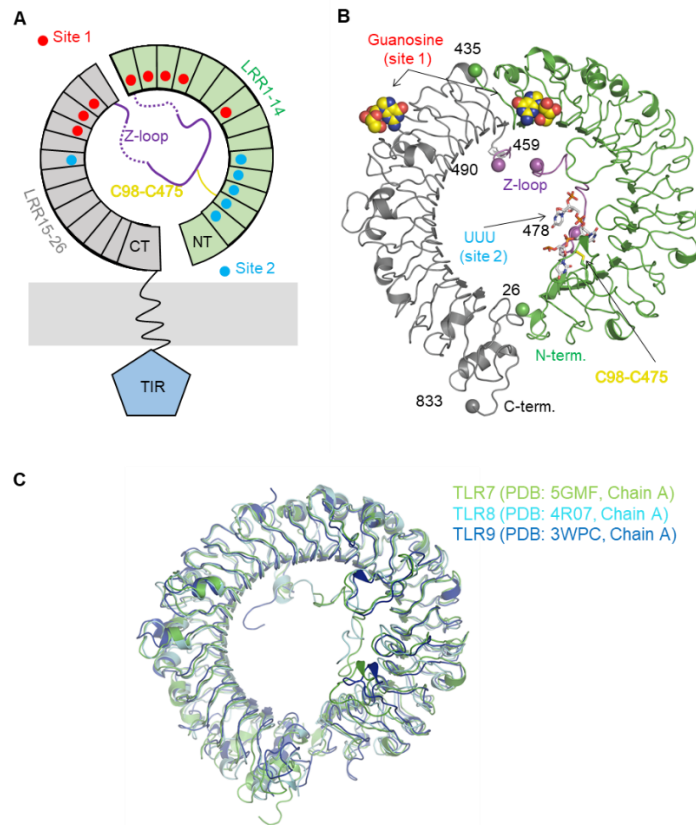


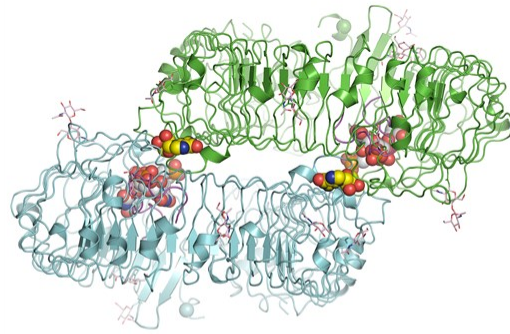
図 25. TLR7/G/polyU 複合体における TLR7 のプロトマー構造

(A) TLR7 プロトマーの模式図; N 末端部分 (LRRNT および LRR1~14), C 末端部分 (LRR15~26 および LRRCT) および Z-loop (ディスオーダーしている部分を破線で表示した) をそれぞれ緑色、灰色および紫色で表した。Site 1 および site 2 に関与する LRR モジュールをそれぞれ赤色および青色の丸印で強調した。

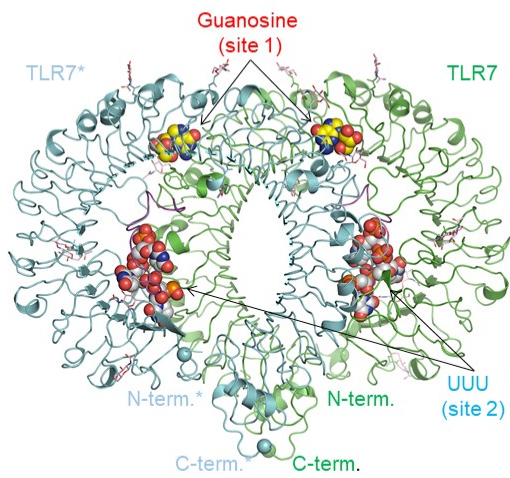
(B) TLR7 プロトマーの構造; 配色は (A) と同様である。Z-loop の各末端の残基の Ca 原子を球体で表した。UUU を骨格式モデルで表した。C98-C475 ジスルフィド結合を橙色で表した。

(C) TLR7 (PDB: 5GMF, Chain A), TLR8 (PDB: 4R07, Chain A) および TLR9 (PDB: 3WPC, Chain A) の活性化型二量体構造中のプロトマーの重ね合わせ

平面図



正面図



底面図

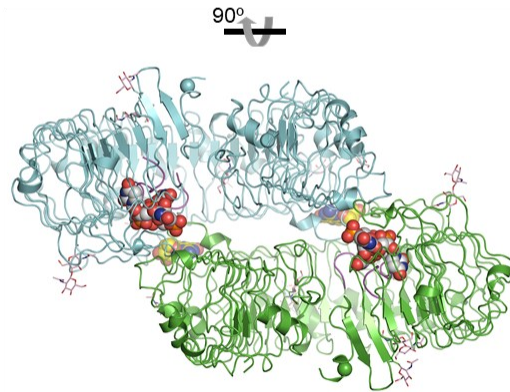


図 26. TLR7/G/polyU 複合体の全体構造

TLR7/G/polyU 複合体の平面図、正面図および底面図を上から下の順番で示した。N-結合型糖鎖分子をピンク色で表した。

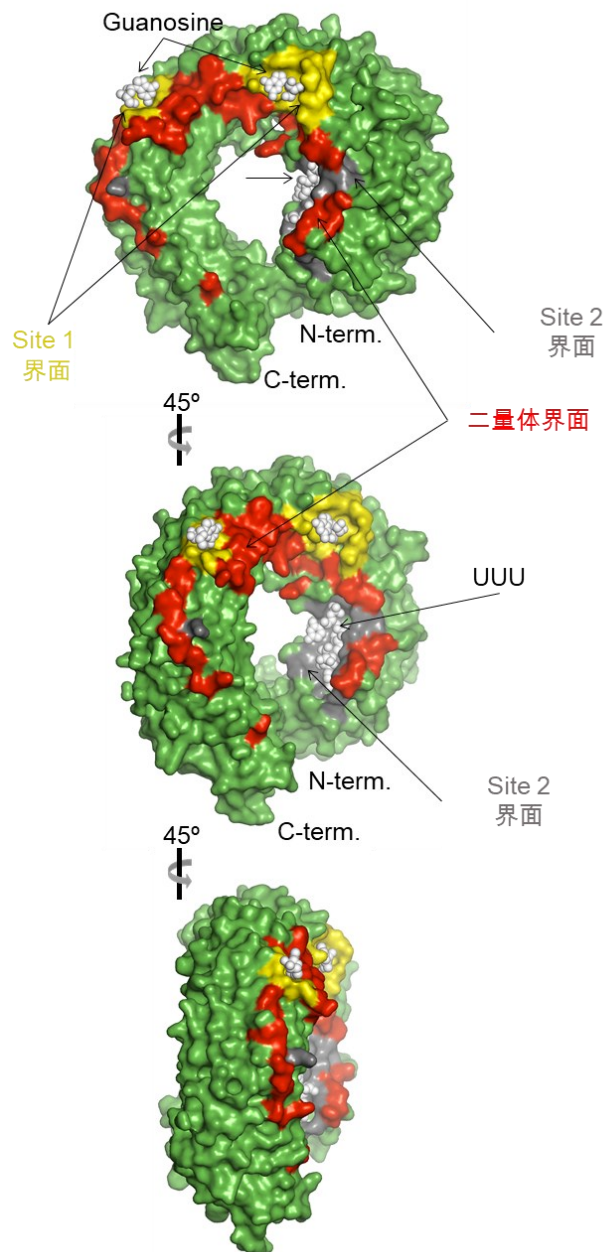


図 27. TLR7/G/polyU 複合体における TLR7 のプロトマーの表面図

TLR7 プロトマーの表面図; Site 1 界面、site 2 界面および二量体界面をそれぞれ黄色、灰色および赤色で表した。Guanosine および UUU を空間充填モデル (白色) で表した。

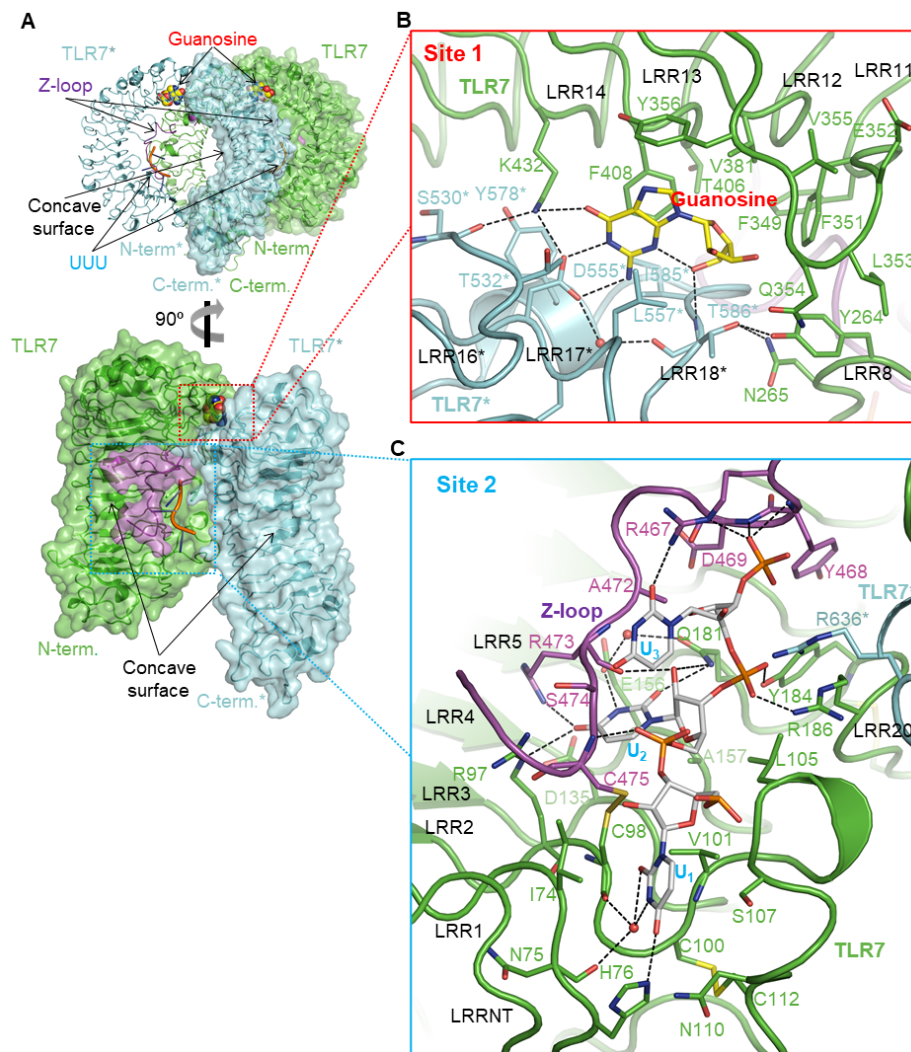


図 28. TLR7/G/polyU 複合体におけるリガンド結合部位

(A) TLR7/G/polyU 複合体の正面図 (上) および二量体の凹面を示した側面図 (下); TLR7 および TLR7*それぞれの N 末端部分 (LRRNT および LRR1~14) および C 末端部分 (LRR15~26 および LRRCT) を半透明の表面図で示した。UUU をカートゥーンモデルで示した。

(B) Site 1 の拡大図; 水分子を赤い球体で、水素結合を破線で示した。

(C) Site 2 の拡大図; 水分子を赤い球体で、水素結合を破線で示した。C98-C475, C100-C112 および C183-C189 ジスルフィド結合を示した。

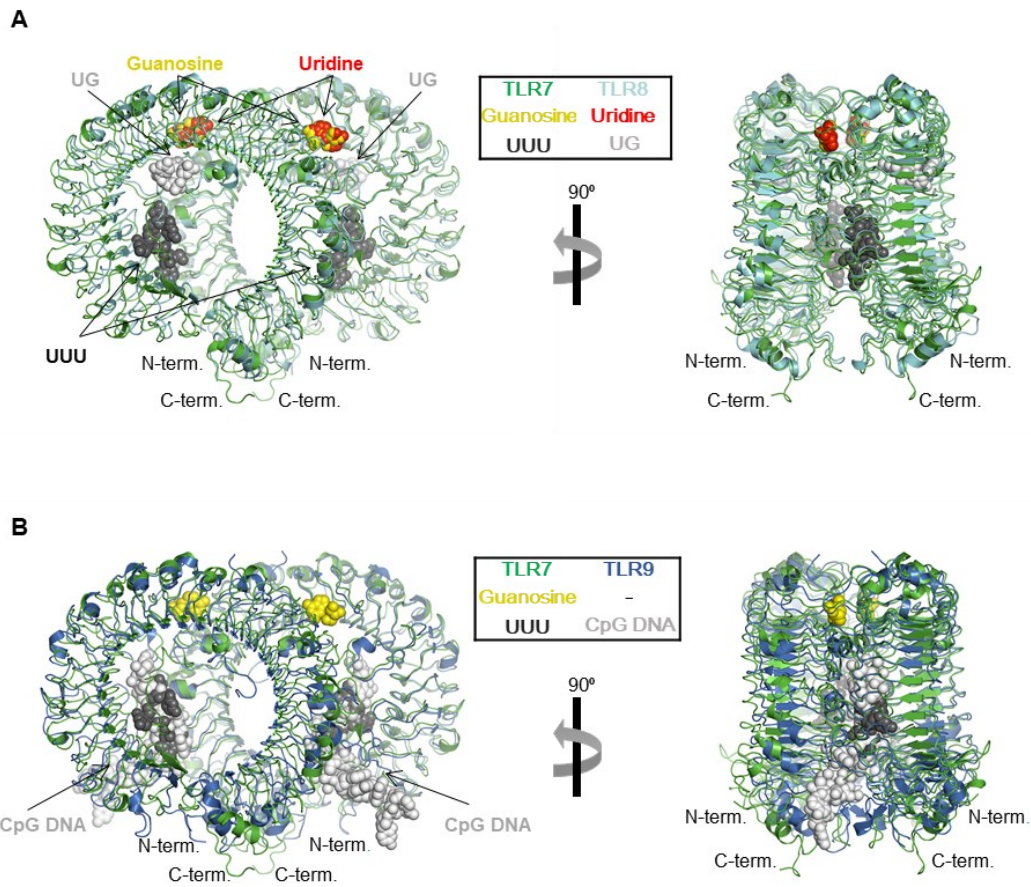


図 29. TLR7, TLR8 および TLR9 活性化型二量体の比較

(A) TLR7/G/polyU 複合体構造 (PDB: 5GMF) と TLR8/ssRNA 複合体構造 (PDB: 4R07) との重ね合わせ

(B) TLR7/G/polyU 複合体構造 (PDB: 5GMF) と TLR9/CpG DNA 複合体構造 (PDB: 3WPC) との重ね合わせ

各複合体構造中のリガンドは空間充填モデルで表した。

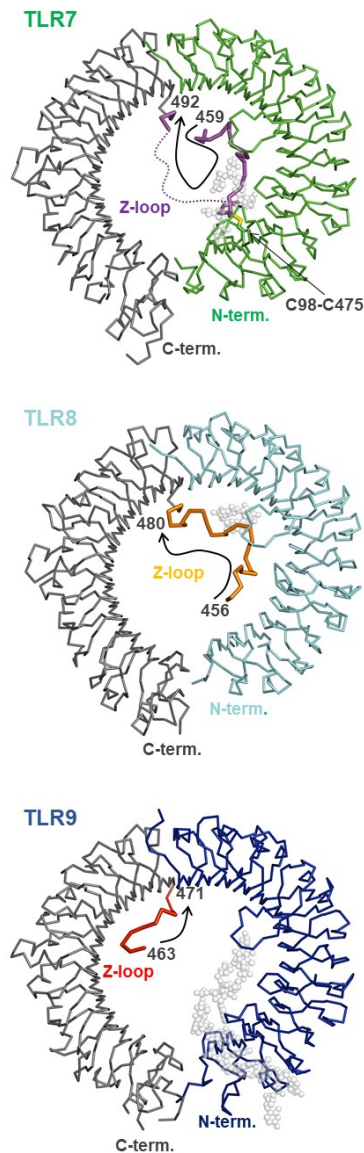


図 30. TLR7, TLR8 および TLR9 の Z-loop の比較

TLR7 (PDB: 5GMF, Chain A)、TLR8 (PDB: 4R07, Chain A) および TLR9 (PDB: 3WPC, Chain A) の構造は $\text{C}\alpha$ 表記で表示され、Z-loop を太線で強調した。オリゴヌクレオチド (TLR7 に結合した UUU, TLR8 に結合した UG および TLR9 に結合した CpG DNA) を球棒モデルで示した。TLR7 の Z-loop のディスオーダーしている部分を破線で示した。

Signal sequence

TLR7_HUMAN MVFPWTLRQILILFNILISKLLG 26
 TLR7_MONKEY MVFPWTLRQILILFNILISKLLG 26
 TLR7_MOUSE MVFPWTLRQILILFNILISLLELG 26
 TLR8_HUMAN MEMFLQSSMLTCLIFLLISGSCELCA 26

LRRNT

TLR7_HUMAN ARWFPTLPCDVLDPKSNIVVDCDTRHLTEIPGGIPT 65
 TLR7_MONKEY ARWFPTLPCDVLDPKSNIVVDCDTRHLTEIPGGIPT 65
 TLR7_MOUSE FROWPTLPCDVEKVNIPFAHVVDCDTRHLTEIPGGIPT 65
 TLR8_HUMAN EENFSRSPYCDERK--QNDVSIACSNRRILQEVPTVGK 63

LRR1

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 89
 TLR7_MONKEY NTLNLTLENIHVPISPAFHRLD 89
 TLR7_MOUSE NTLNLTLENIHVPISPAFHRLD 89
 TLR8_HUMAN VVTELDSDNFITHINESGFLQ 87

LRR2

TLR7_HUMAN HLVEIDFRCCVYPIPLGSKNICIKRLQIKPRFSGLT 127
 TLR7_MONKEY HLVEIDFRCCVYPIPLGSKNICIKRLQIKPRFSGLT 127
 TLR7_MOUSE HLEEIDFRCCVYPIPLGSKNICIKRLQIKPRFSGLS 127
 TLR8_HUMAN NLTKINLNHPNVHQNGNPGIQSGNLITDGAFLNLK 125

LRR3

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 148
 TLR7_MONKEY VLKSLYLDGNQLEIPQGLP 148
 TLR7_MOUSE DLKALYLDGNQLEIPQGLP 148
 TLR8_HUMAN NLRELLLEDNQLPQIPSGLPE 146

LRR4

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 172
 TLR7_MONKEY SLQLSLEANNFISIRKENLELA 172
 TLR7_MOUSE SLHLISLEANNFISIRKENLELA 172
 TLR8_HUMAN SLTELSLQNNIYNIKTEGISRLI 170

LRR5

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 204
 TLR7_MONKEY NIEILYLGQCYVYRPPCYVSYIEKDAFLNLT 204
 TLR7_MOUSE NIEILYLGQCYVYRPPCYVSYIEKDAFLNLT 204
 TLR8_HUMAN NLKVLNLAWNCFYKVCYVCKTNI--EDGVFELT 201

LRR6

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 225
 TLR7_MONKEY KLKVLISLKDNNVTAVPTVLP 225
 TLR7_MOUSE NLKVLISLKDNNVTAVPTVLP 225
 TLR8_HUMAN NLELLSLSFNSLSHVPKLP 222

LRR7

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 249
 TLR7_MONKEY TLETELYNMIKAEIQEDDFNINL 249
 TLR7_MOUSE TLETELYNMIKAEIQEDDFNINL 249
 TLR8_HUMAN SLKELFISNTQIKYISEEDFGGLI 246

LRR8

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 290
 TLR7_MONKEY QLQLDLDSGNCPCRCNAPFFCAPCKNSPLQIPVNAFDALT 290
 TLR7_MOUSE ELQLDLDSGNCPCRCNAPFFCAPCKNSPLQIPVNAFDALT 290
 TLR8_HUMAN NLTLDLDSGNCPCRCNAPFFCAPCGDGASINIDRAFQNL 287

LRR9

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 314
 TLR7_MONKEY ELKVLRLHNSLQHPVPPVPPKFNIN 314
 TLR7_MOUSE ELKVLRLHNSLQHPVPPVPPKFNIN 314
 TLR8_HUMAN QLRLNLSSTSLRKNAAVFKNMP 311

LRR10

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 340
 TLR7_MONKEY KLQELDSQNFIAKEIGDARFLHFLP 340
 TLR7_MOUSE KLQELDSQNFIAKEIGDARFLHFLP 340
 TLR8_HUMAN HLNLDLEFNLYGIEIASGAFITMLP 337

LRR11

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 370
 TLR7_MONKEY SLIQDLDSNFELQVIRASMLNQAFSSLK 370
 TLR7_MOUSE NLVLEDPSNFYELQVIRASMLNQAFSSLE 370
 TLR8_HUMAN RLQELDSNFYELQVIRASMLNQAFSSSKL 367

LRR12

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 397
 TLR7_MONKEY SLKILRIRGVYFKELKSNLSPHNLQ 397
 TLR7_MOUSE NLKILRIRGVYFKELKSNLSPHNLQ 397
 TLR8_HUMAN SLKILRIRGVYFKELKSNLSPHNLQ 394

LRR13

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 421
 TLR7_MONKEY NLEVLDTGTFKIAINLSMFKQFK 421
 TLR7_MOUSE NLEVLDTGTFKIAINLSMFKQFK 421
 TLR8_HUMAN NLSSTIKGLNFKIQIDFKLQNF 418

LRR14

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 445
 TLR7_MONKEY RLKVIDLSVNRISPSGDSSEVGF 445
 TLR7_MOUSE RLKVIDLSVNRISPSGDSSEVGF 445
 TLR8_HUMAN NLEIITLSENRISPLVKDTRQSY- 441

Z-loop

TLR7_HUMAN SNARTSVESYEPQVLELHIHFYDRIYRSCRFKAKE--ASFMSVNESCYK 493
 TLR7_MONKEY SNARTSVESYEPQVLELHIHFYDRIYRSCRFKAKE--ASFMSVNESCYK 493
 TLR7_MOUSE PAAQTSVDROGQVLELHIHFYDRIYRSCRFKAKEPSPFLPAAADCHI 494
 TLR8_HUMAN -----ANSSPQRHILRRRSTDFEFPHSNFYIVRVIITKPKQCAA 481

LRR15

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 517
 TLR7_MONKEY YGQTLDSLKNSIFFVKSDFQHL 517
 TLR7_MOUSE YGQTLDSLKNSIFFVKSDFQHL 518
 TLR8_HUMAN YGKALDSLKNSIFFVGNQFENLP 505

LRR16

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 542
 TLR7_MONKEY FLKCLNLSGNLISGTLNGSEFQPLA 542
 TLR7_MOUSE FLKCLNLSGNLISGTLNGSEFQPLA 543
 TLR8_HUMAN DIACLNLSANNAQNLISGTEFSATP 530

LRR17

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 566
 TLR7_MONKEY ELRYLDFSNRRLHLLYSTAFEEHL 566
 TLR7_MOUSE ELRYLDFSNRRLHLLYSTAFEEHL 567
 TLR8_HUMAN HWYLDLNNRLHLLYSTAFEEHL 554

LRR18

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 596
 TLR7_MONKEY KLEVLDISNSHYFQSEITHMLNPTKNLK 596
 TLR7_MOUSE KLEVLDISNSHYFQSEITHMLNPTKNLK 597
 TLR8_HUMAN DLEVLDSYNSHYFQSEITHMLNPTKNLK 584

LRR19

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 619
 TLR7_MONKEY VLKLMNDNDISSTSR--TMESE 619
 TLR7_MOUSE VLKLMNDNDISSTSR--TMESE 620
 TLR8_HUMAN NLKVLNLSDNITLTDKYNLESK 608

LRR20

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 650
 TLR7_MONKEY SLRTEFRGNHLDVLRAGDNRVYQLFKNLL 650
 TLR7_MOUSE SLRTEFRGNHLDVLRAGDNRVYDFKFNLF 651
 TLR8_HUMAN SLVLFVSGNRDLILNDDNRYISIFKGLK 639

LRR21

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 675
 TLR7_MONKEY KLEELDISKNSLSPVSGVFDGMP 675
 TLR7_MOUSE NLEVLDISKNSLSPVSGVFDGMP 676
 TLR8_HUMAN NLTRLDSLNRHLKHIPNEAFNLPA 664

LRR22

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 699
 TLR7_MONKEY NLKNSLAKNGLKSPVWKLQCLK 699
 TLR7_MOUSE NLKNSLAKNGLKSPVWDLQLK 700
 TLR8_HUMAN SLTEHINDMLKFFVWTLQQFP 688

LRR23

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 723
 TLR7_MONKEY NLETLDSHQNTTVPERLANSYR 723
 TLR7_MOUSE NLETLDSHQNTTVPERLANSYR 724
 TLR8_HUMAN RLELLEDRGNKLLFLDLSIDFTS 712

LRR24

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 747
 TLR7_MONKEY SLKNIILKNNQIRSLTKYFLQDAF 747
 TLR7_MOUSE SLKNIILKNNQIRSLTKYFLQDAF 748
 TLR8_HUMAN SLRTEHINDMLKFFVWTLQQFP 736

LRR25

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 773
 TLR7_MONKEY QLRYLDLSSNKIQMIDKTSFPPENVL 773
 TLR7_MOUSE QLRYLDLSSNKIQMIDKTSFPPENVL 774
 TLR8_HUMAN SLKHLDSLNNLKTINKSALETKT 762

LRR26

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 786
 TLR7_MONKEY NLKMLLHNNRFL 786
 TLR7_MOUSE NLKMLLHNNRFL 787
 TLR8_HUMAN KLMLLEHGKPF 775

LRRCT

TLR7_HUMAN xLxxLxxN 839
 TLR7_MONKEY CTCDAVFWVVN--HTEVTIPYLATDVTGCGGHRGQSVISLDLYTCELDLT 839
 TLR7_MOUSE CTCDAVFWVVN--HTEVTIPYLATDVTGCGGHRGQSVISLDLYTCELDLT 840
 TLR8_HUMAN CTCDIDGPRRMDHELVKIPRLV--DVICASPGDGRKSVISLELTYCSDVT 828

First site of TLR7 and TLR8
 Second site of TLR7
 Second site of TLR8
 Protein-protein interface of TLR
 Replaced by a thrombin-cleavage sequence

図 31. 各種 TLR7 およびヒト TLR8 細胞外ドメインのアミノ酸配列のアラインメント

ヒト TLR7 (Uniprot entry code: Q9NYK1)、サル TLR7 (*Mm*TLR7) (Uniprot entry code: B3Y653)、マウス TLR7 (Uniprot entry code: P58681) およびヒト TLR8 (Uniprot entry code: Q9NR97) のアミノ酸配列のアラインメントを CLUSTALW ソフトウェア (EMBL-European Bioinformatics Institute) を用いて行った。各 LRR モジュールに対して配列のアラインメントが表示された。Site 1 に関与する残基 (Guanosine 分子または R848 分子との距離が 5 Å 以内である) (黄色で強調された) は、TLR7/G/polyU 複合体の Chain A または TLR7/R848 複合体 (3.1.3.1 項) の Chain A から推定された。Site 2 に関与する残基 (UUU 分子との距離が 5 Å 以内である) (灰色で強調された) は、TLR7/G/polyU 複合体の Chain A から推定された。ヒト TLR8 の site 2 に関与する残基 (Tanji et al., 2015) を紫色で強調した。二量体界面の残基は、配列の上に赤色のバーが表示された。トロンビン認識配列 (LVPRGS) に置換された領域 (アミノ酸残基 440~445) は下線が引かれた。赤色の残基は最も高い類似性を示し、続いて緑色、青色、および黒色 (最も低い類似性) である。

3.1.2.2. Site 1 における guanosine の認識機構

構造解析の結果より、site 1 に結合した guanosine 分子が TLR7 の二量体界面に埋め込まれており、2 分子の TLR7 (TLR7 および TLR7*) がリガンドを介して連結されていた (図 28A)。LRR8、LRR11~14 および LRR16*~18* (および LRR8*、LRR11*~14* および LRR16~18) が site 1 を形成していた (図 25A、図 28B および図 31)。いずれのリガンドについても良好な電子密度が観測できた (図 32)。

TLR7/G/polyU 複合体の構造において、**guanosine** はリボースの 5'-OH 基がグアニン塩基の N3 と分子内水素結合を形成する **syn** コンフォメーションで TLR7 に結合していた (図 28B および図 33A)。グアニン部分は Y264、F351、Q354、V355、V381、L557*、I585*、I585* および I585* によって囲まれており、リボース部分は Y356、F408、K432、T532*、D555*、L557* および T586* によって囲まれていた。グアニン環は、F408 と L557* の側鎖に挟まれ、F408 と **face-to-face** π - π スタッキング相互作用を形成していた。さらに、グアニンのイミダゾール環は、Y356 側鎖と垂直方向の **edge-to-face** NH- π 相互作用を形成していた。グアニン部分の N1 および N2 原子と D555* 側鎖の間、およびグアニンのカルボニル基と K432 側鎖との間で水素結合が形成されていた。グアニン部分が緊密に認識されているのと対照的に、**guanosine** のリボース部分は TLR7 によって緩く認識されており、5'-OH 基と T586* 主鎖 N の間に 1 つの水素結合が形成されていた。TLR7/Loxo/polyU 複合体では、**loxoribine** の認識様式は **guanosine** の認識様式と非常に類似していた (図 33A,B)。Loxoribine も **syn** コンフォメーションをとり、修飾されたグアニン環は **guanosine** の場合と同様なスタッキング相互作用や水素結合によって認識されていた。Loxoribine 固有の N7 のアリル基および C8 のカルボニル基を収容するために Y356 側鎖は **guanosine** の場合と比べて約 1 Å シフトしていた (図 33A)。

Site 1 では、リガンドを介した相互作用に加えて、タンパク質間の直接の相互作用も二量体

形成に寄与していた。TLR7/G/polyU 複合体の構造では (図 28B)、K432 側鎖は D555*側鎖との塩橋を形成し、さらに S530*と水素結合を形成していた。T586*は、Y264 および N265 の側鎖と水素結合を形成し、F408、Y579*および I585*の側鎖はリガンド結合ポケットの奥部で疎水性相互作用を形成していた。TLR7/Loxo/polyU 複合体においても同様のタンパク質間の相互作用が観察された (図 33B)。

TLR7 とリガンドとの間で観察された複数の相互作用は、**site 1** における TLR7 のリガンド特異性を規定し、また **site 1** リガンドを介した 2 分子の TLR7 間の相互作用により二量体構造が安定化されていた。

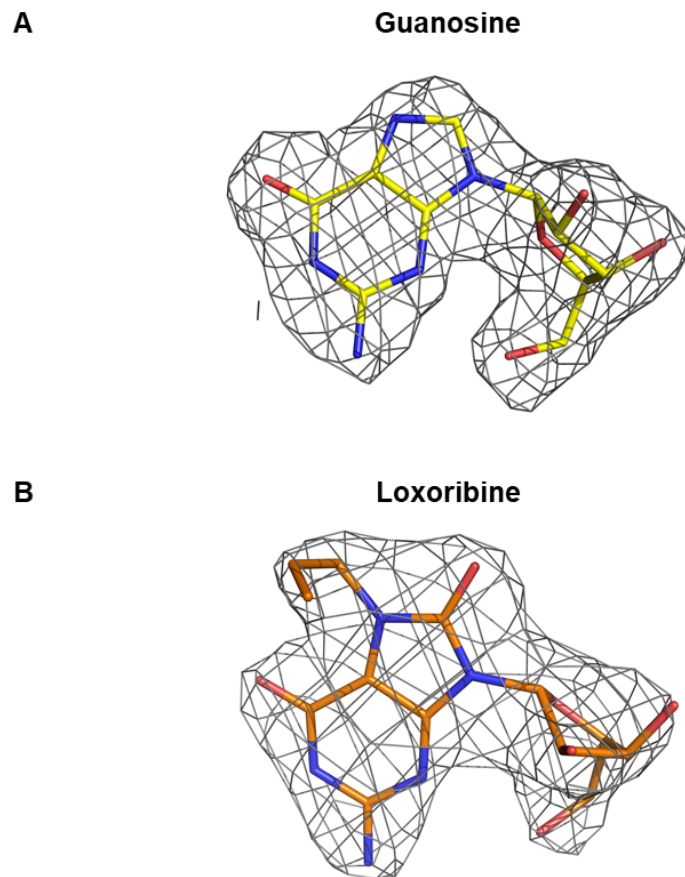


図 32. TLR7 の site 1 におけるリガンドの電子密度

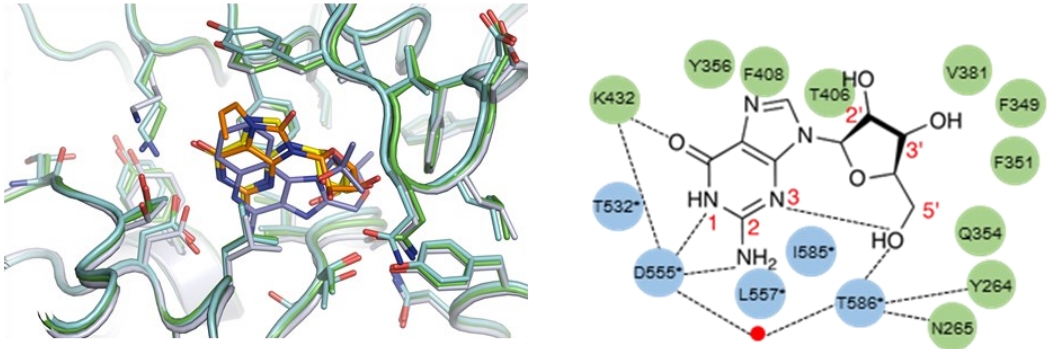
(A) TLR7/G/polyU 複合体構造における guanosine (黄色) とその電子密度

(B) TLR7/Loxo/polyU 複合体構造における loxoribine (橙色) とその電子密度

灰色のメッシュ: $2F_o - F_c$ マップ, 1.0σ

A

TLR7/G/polyU複合体	Guanosine
TLR7/Loxo/polyU複合体	Loxoribine
TLR7/R848複合体	R848



B

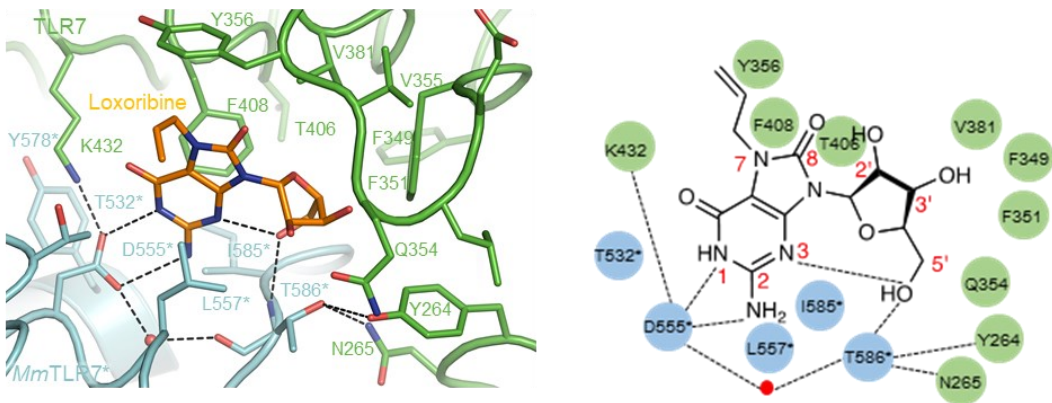


図 33. Site 1 における guanosine および loxoribine の認識機構

(A) TLR7/G/polyU 複合体 (緑色)、TLR7/Loxo/polyU 複合体 (水色) および TLR7/R848 複合体 (灰色) (3.1.3.1 項) における 3 つの低分子アゴニスト、guanosine (黄色)、loxoribine (橙色) および R848 (スレートブルー) の重ね合わせ (右); Guanosine と TLR7 との間の相互作用の模式図 (左); 水分子を赤い球体で、水素結合を破線で示した。

(B) TLR7/Loxo/polyU 複合体の site 1 の拡大図 (右) ; Loxoribine と TLR7 との間の相互作用の模式図 (左)

3.1.2.3. TLR7 は guanosine センサーである

TLR7 は細胞レベルのアッセイの結果に基づいて guanosine センサーとして機能することが報告されている (Shibata et al., 2016)。本研究での構造生物学的研究は、guanosine が TLR7 によって認識されるメカニズムを原子レベルで明らかにした (図 28B および図 33A)。

3.1.2.2 項では、TLR7 の site 1 において guanosine のグアニン塩基部分がスタッキング相互作用および水素結合により特異的に認識されていたことを記述した。

これらの研究結果を補強するために、種々のヌクレオシド (guanosine, adenosine, cytidine, uridine, inosine, xanthosine) に対する TLR7 の結合親和性を ITC 実験で測定した (図 20A および表 3A)。構造的結果と一致しており、測定したヌクレオシドの中で、guanosine のみ結合に伴う発熱が観測され結合親和性を決定することができ ($K_d = 13.5 \mu\text{M}$)、他のヌクレオシドでは熱の出入りはほとんど観測できなかった。したがって、細胞レベルの研究結果 (Shibata et al., 2016) を裏付けるように TLR7 は guanosine センサーであることがタンパク質レベルでも実証された。ただし、単独で TLR7 を活性化させる低分子アゴニストである R848 および Loxoribine の TLR7 への結合親和性は guanosine より強かった (それぞれ $K_d = 0.49$ および $5.6 \mu\text{M}$) (図 20A および表 3A)。

3.1.2.4. Site 2 における ssRNA の認識機構

TLR7/G/polyU 複合体および TLR7/Loxo/polyU 複合体構造の site 2 では、3 ヌクレオチド分の電子密度が観測されたため、UUU を構造モデルに組み込んだ (図 34)。しかし、結晶化に使用したのは長鎖の polyU_19mer であり、観測された電子密度が polyU_19mer の一部が見えて他の部分がディスオーダーしているものなのか、または実際に RNA が分解して生じたフラグメントのものなのかは結晶構造からは判断できなかった。そこで、結晶中に存在する RNA を調べるため、TLR7/G/polyU 複合体および TLR7/Loxo/polyU 複合体の結晶を溶解し、LC-MS 分析を行った (図 35)。TLR7/G/polyU 複合体の結晶を分析した結果 (図 35A)、guanosine (13.44 pmol) および polyU_19mer が分解されて生じたと考えられる 3mer~5mer の polyU (合計 1.77 pmol) が検出されたが、polyU_19mer そのものは痕跡量程度しか検出されなかった。pUUUU/UUUUp (0.63 pmol) と UUUU-OH (0.51 pmol) の polyU_4mer が最も多く、それ以外に pUUU/UUUUp (0.21 pmol) と UUU-OH (0.21 pmol) の polyU_3mer および pUUUUU/UUUUUUp (0.06 pmol) と UUUUU-OH (0.15 pmol) の polyU_5mer が同定された。LC-MS および構造解析の結果に基づいて、結晶中で site 2 に結合していた ssRNA は異なる長さを持つ polyU_19mer の分解物の混合物であり、3mer は TLR7 によって認識される最も短いオリゴヌクレオチドであると結論付けた。今回、TLR7/Loxo/polyU 複合体結晶の分析結果では (図 35B)、短鎖の polyU が検出できなかった代わりに、完全に分解された大量

の **uridine** が検出された。結晶構造から短くても **3mer** の RNA が結合しているはずなので、結晶の洗浄段階において **ssRNA** が分解したまたは RNA が解離したものと考えられる。

TLR7/G/polyU 複合体の構造において、UUU は LRR1~5 の凹面、LRR20*および Z-loop の一部に囲まれていた (図 25A、図 27 および図 28A,C)。Z-loop のオーダーしている部分、および 3 組のジスルフィド結合 (C98-C475、C100-C112 および C183-C189) が site 2 を形成するために構造的に重要な役割を果たしていた (図 36A)。特に、Z-loop の C475 と LRR2 の C98 との間のジスルフィド結合は、フレキシブルな Z-loop を LRR の凹面へつなぎとめる役割を果たしていた。この C98-C475 ジスルフィド結合によって、Z-loop で切断後の N 末端側部分と C 末端側部分が連結されていた (3.1.1.1 項) (図 16 および図 36B)。C98-C475 ジスルフィド結合は TLR7 サブファミリーの中で TLR7 にユニークな特徴であり (図 3)、TLR7 の機能に必須であることが報告されている (Kanno et al., 2013)。さらに、C100-C112 および C183-C189 ジスルフィド結合は、オリゴヌクレオチド認識に直接関与する LRR2 および LRR5 の loop 領域をそれぞれ安定化していると考えられる。

UUU の中央の U (U₂) は、ウラシル特異的およびリボース特異的相互作用によって最も緊密に認識されていた (図 28C および図 37)。U₂ のウラシル塩基が TLR7 の N 末端部分の凹面 (R97、C98、D135、E156、A157 および Q181) と Z-loop (R473、S474 および C475) との間に形成されたポケットに挿入し、周囲の残基とウラシル特異的な水素結合を形成して

いた。R97 および R473 の側鎖とウラシル塩基の C4 カルボニル基の間、E156 側鎖とウラシル塩基の N3 原子の間、および Q181 側鎖ウラシル塩基とウラシル塩基の C2 カルボニル基の間で水素結合が形成されていた。U₂ の RNA 特異的なリボース 2'-OH 基は、Q181 側鎖および R473 の主鎖 O 原子と水素結合を形成していた。また、U₂ の 3' および 5' リン酸基も TLR7 との相互作用に関与していた。Y184 および R186 の側鎖は 3'-リン酸基と、C475 の主鎖 N 原子は 5'-リン酸基と水素結合を形成していた。上記のように緊密な U₂ 塩基の認識とは対照的に、U₁ および U₃ 塩基は部分的に溶媒に露出しておりそれほど緊密に認識されていなかった (図 28C および図 37)。これらの領域では、U₁ の C4 カルボニル基と H76 側鎖との間、および U₃ の C2 カルボニル基と R467 側鎖との間、U₃ の 3'-リン酸基と Z-loop の骨格 (R469、Y468 および D469) との間、および水分子を介して C98 と U₁ との間に水素結合が形成されていた。なお、TLR7/Loxo/polyU 複合体構造中においても、UUU はほぼ同様の相互作用で認識されていた (図 34)。UUU の中で U₂ だけが緊密に認識されていたという構造的特徴から、非末端部分に uridine 塩基を含む限り、多様なオリゴヌクレオチド配列が site 2 で認識され得ることが示唆された。

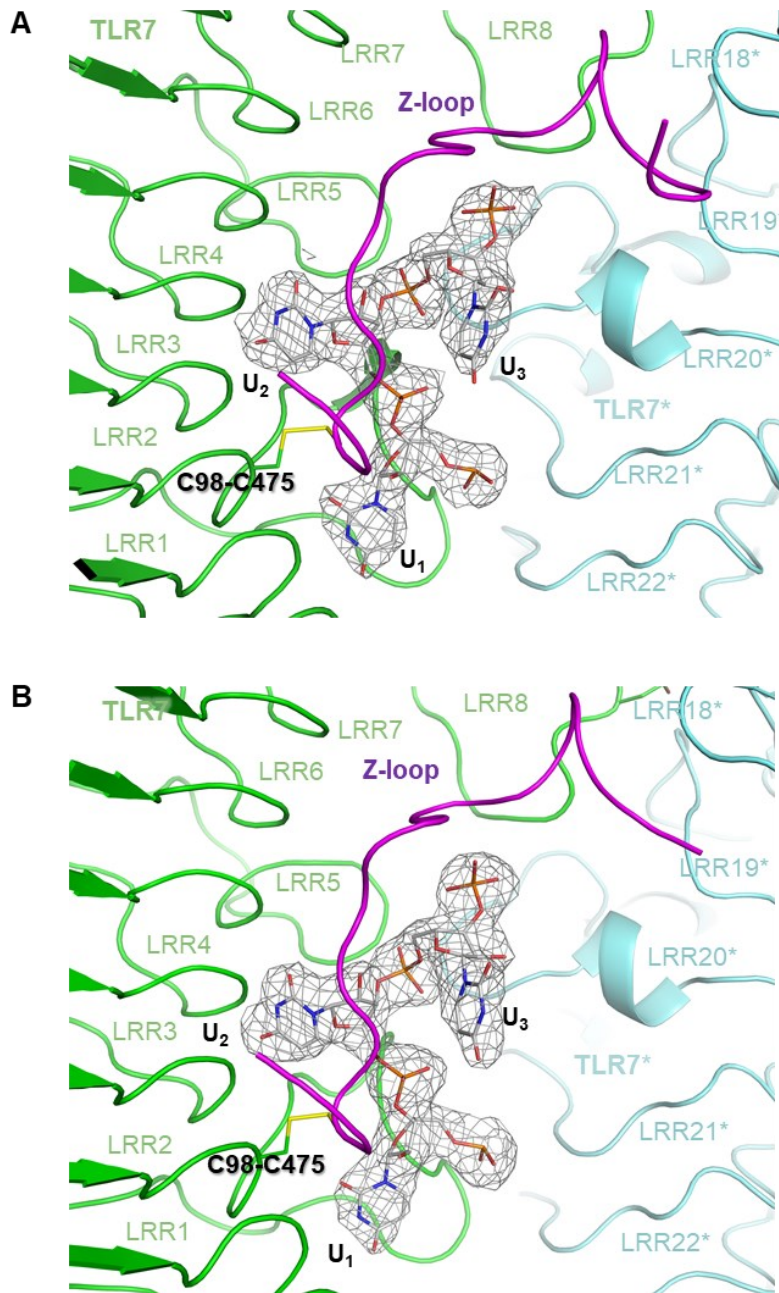


図 34. UUU の電子密度

(A) TLR7/G/polyU 複合体構造における UUU とその電子密度

(B) TLR7/Loxo/polyU 複合体構造における UUU とその電子密度

灰色のメッシュ: $2F_o - F_c$ マップ, 1.0σ

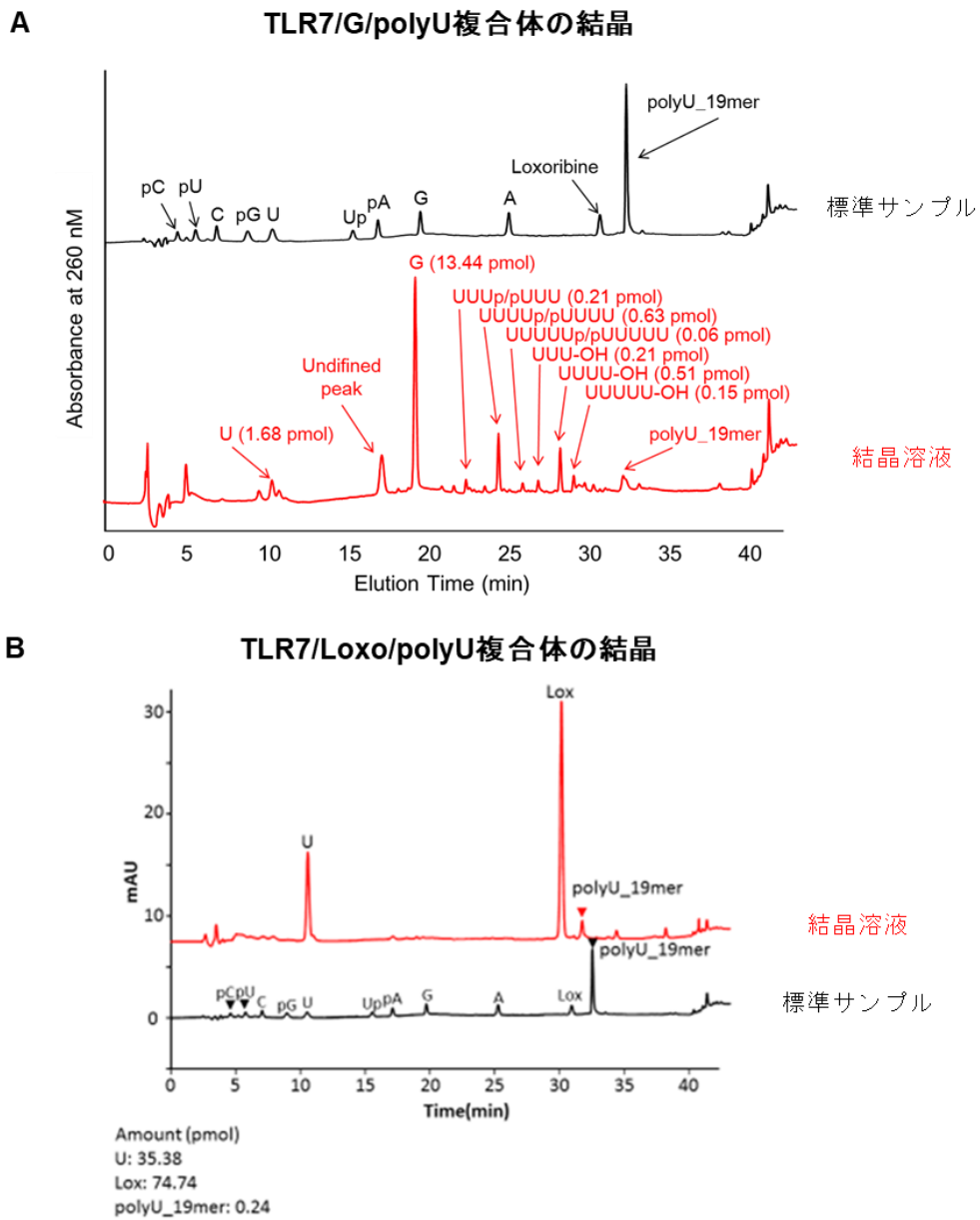


図 35. 結晶溶液の LC-MS 分析

(A) TLR7/G/polyU 複合体の結晶溶液の LC-MS 分析

(B) TLR7/Loxo/polyU 複合体の結晶溶液の LC-MS 分析

赤い線および黒い線はそれぞれ結晶溶液および標準サンプルのクロマトグラフィーである。

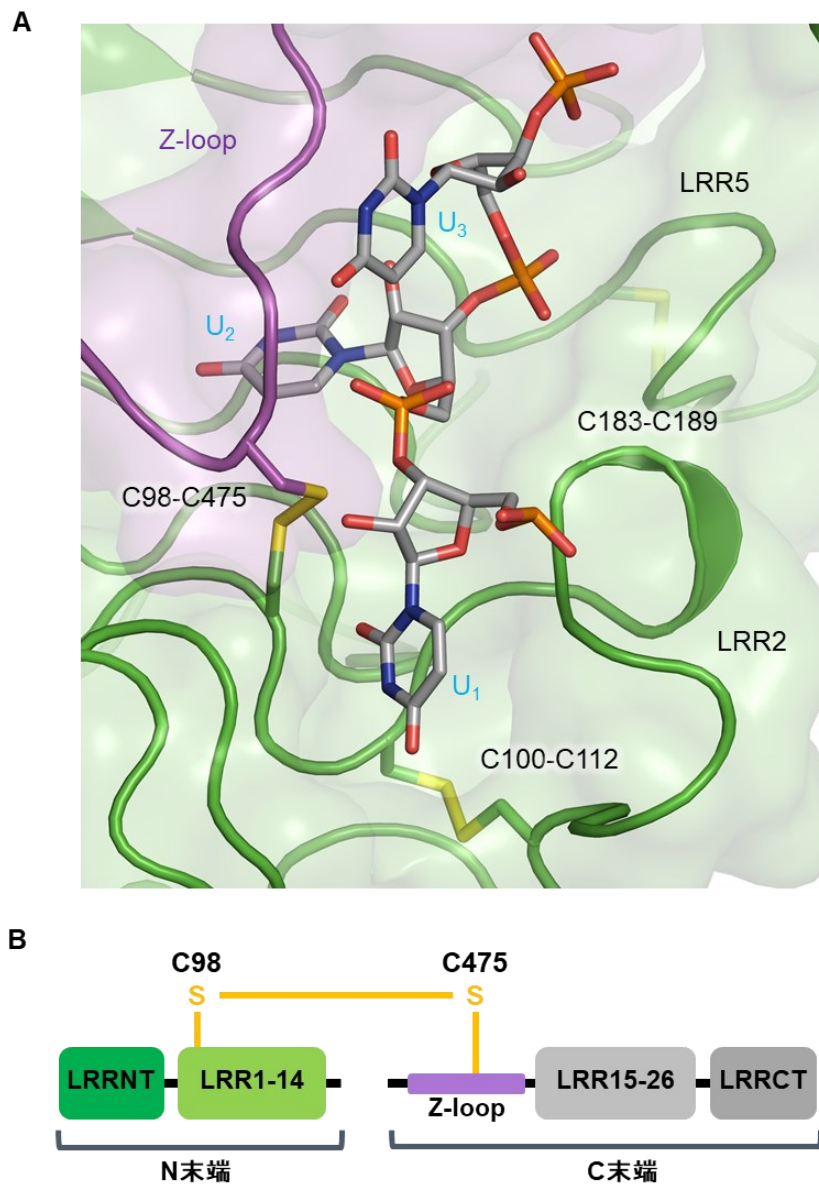


図 36. Site 2 の形成に重要であるジスルフィド結合

(A) TLR7 の site 2 における 3 組のジスルフィド結合; C98-C475 ジスルフィド結合 (LRR2 と Z-loop との間)、C100-C112 ジスルフィド結合 (LRR2 の loop) および C183-C189 ジスルフィド結合 (LRR5 の loop) を示した。

(B) C98-C475 ジスルフィド結合の模式図

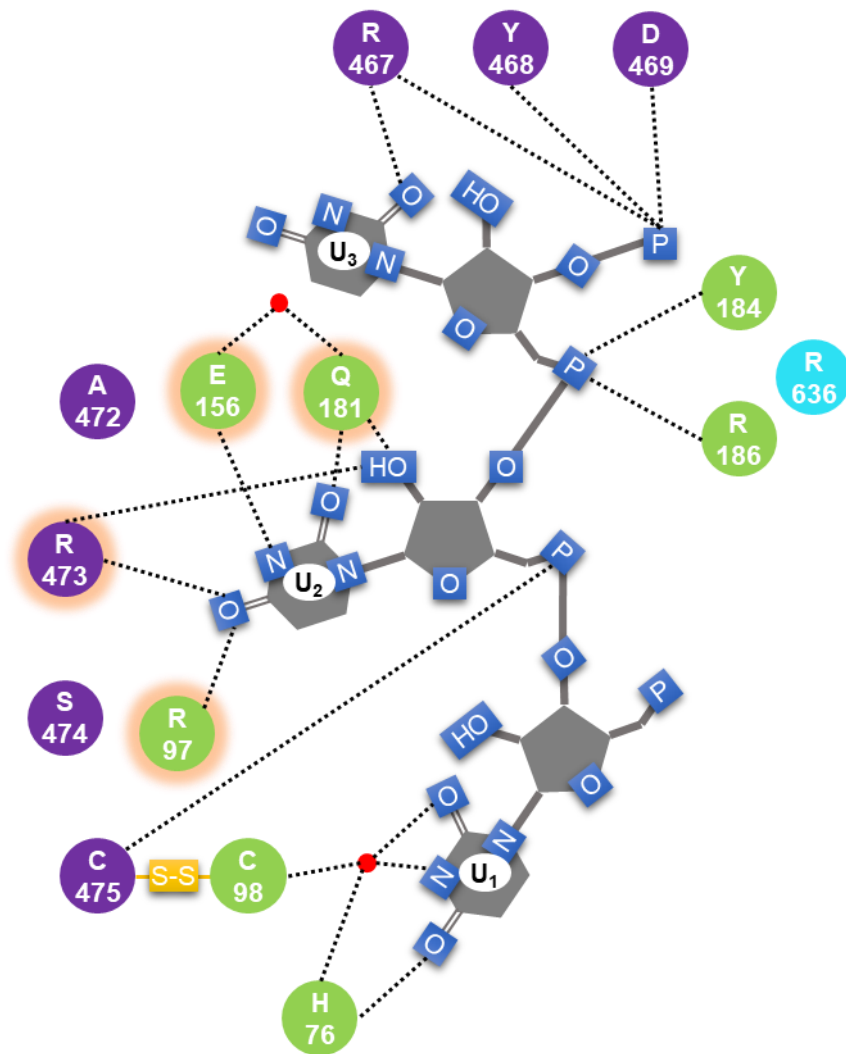


図 37. UUU と TLR7 との間の相互作用の模式図

図 28C を表示する模式図; UUU を灰色で示し、非 C 原子を青色で示した。ウラシル特異的およびリボース特異的相互作用に関与するアミノ酸残基を橙色で強調した。C98-C475 ジスルフィド結合を示した。水分子を赤い球体で、水素結合を破線で示した。

3.1.2.5. TLR7 は ssRNA センサーである

TLR7 が ssRNA と ssDNA とを区別するかどうかを調べるために、ゲル濾過クロマトグラフィーを行い、TLR7 と ssDNA との結合を調べた (図 38)。まず、polyU_12mer と polydU_12mer を比較したところ、TLR7 のピークの A_{260}/A_{280} の値 (polyU_12mer では 1.02、polydU_12mer では 0.59) から判断すると、ssDNA と TLR7 との結合は ssRNA に比べて非常に弱いことが明らかになった (図 38A, B)。同様に、polydA_12mer、polydT_12mer、polydG_12mer および polydC_12mer においても、TLR7 との結合が見られなかった (図 38C-F)。また、いずれの ssDNA を使用しても、guanosine の存在下で TLR7 の二量体化を誘導しなかった (図 38)。この結果は、site 2 において UUU の U₂ リボースの RNA 特異的 2'-OH 基が Q181 および R473 によって認識されていたという構造的特徴と良く対応しており (図 28C および図 37)、TLR7 が ssRNA と ssDNA を区別していることが明らかになった。

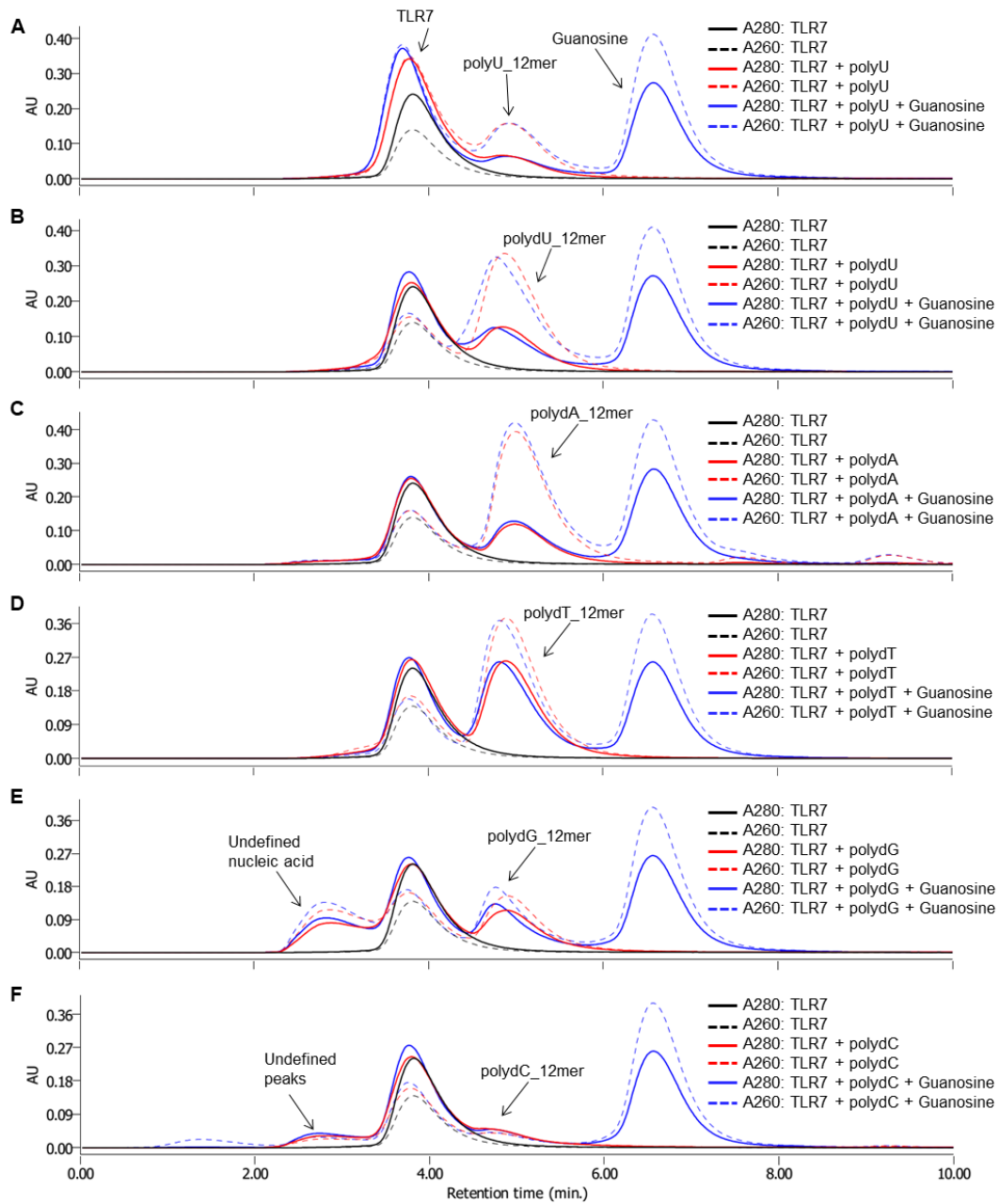


図 38. TLR7 と ssDNA との結合の分析

Guanosine 添加なしまたは添加ありの条件で、TLR7 と polyU_12mer (A)、polydU_12mer (B)、polydA_12mer (C)、polydT_12mer (D)、polydG_12mer (E) および polydC_12mer (F) との結合をゲルろ過クロマトグラフィーで分析した。A₂₈₀ は実線で、A₂₆₀ は点線で示した。

3.1.2.6. 非末端 uridine 塩基は TLR7 の ssRNA 認識に必須である

3.1.2.4 項の構造解析の結果、UUU の中央の U₂ 部分のみが uridine 特異的な相互作用によって緊密に認識されることを明らかにした (図 28C および図 37)。そこで、ssRNA の結合に非末端 uridine 塩基が必須であることを確認するために、トリヌクレオチド (UUU、AAA、GGG、CCC、UCU および UGU) を用いて、ssRNA によるシナジー効果を ITC で調べた (図 20D および表 3D)。なお、トリヌクレオチド UUU と TLR7 の直接の相互作用は ITC で観測できなかったため (図 20C および表 3C)、シナジー効果を観測することで間接的にその結合を評価した。その結果、これらのトリヌクレオチドの中で、UUU のみが TLR7 への guanosine 結合にシナジー効果を示した。Guanosine の親和性は、UUU の存在下で K_d 値 7.6 μM から 3.9 μM に上昇した。UUU を用いてシナジー効果が明らかに観察されたため、UUU は TLR7 に結合していると考えられる。ただし、ここで ssRNA の短縮によって、シナジー効果はかなり減弱していた。対照的に、他のトリヌクレオチド (いずれも第 2 の位置に uridine を含まない) では、測定された ITC パラメータ (K_d , ΔH , ΔS および N 値) のいずれにも影響を及ぼさなかった (図 20D および表 3D)。よって、シナジー効果を示さないことから、これらのトリヌクレオチドは TLR7 に結合しないと考えられる。これらの結果より、TLR7 への結合には ssRNA の非末端 uridine 塩基が必須であると結論付けた。

3.1.2.7. Site 1, site 2 および二量体界面残基の機能的重要性

Site 1 および site 2 の機能的重要性を確認するために、これらの部位の残基をアラニンまたはセリンに変異させ、NF- κ B レポーターアッセイを行った (図 39)。このアッセイでは、HEK293T 細胞にヒト TLR7 の変異体を発現させ、R848 単独、ホスホロチオエート化 RNA9.2s (RNA9.2sS) 単独、または guanosine とホスホロチオエート化 polyU_19mer (polyU_19merS) の組み合わせによる 3 種類の刺激を行った (図 39)。

Site 1 におけるアゴニストの認識に直接に関与する F408、D555、L557 および T586 のアラニン変異は、3 種類の刺激に対する TLR7 の応答性が完全に消滅した。したがって、site 1 が低分子アゴニストおよび ssRNA による TLR7 活性化に必須であることを示した。多くの site 2 の変異 (I74A、H76A、R97A、L105A、E156A、Q181A、Y184A および R473A) では、R848 に対する応答性はある程度残存していた一方で (図 39A)、ssRNA リガンドに対する応答性は著しく減少した (図 39B, C)。これらの結果は、site 2 が TLR7 の ssRNA の認識のみに必須であることを示唆した。

さらに、ssRNA 結合における site 2 の重要性を確かめるため、TLR7 の site 2 変異体タンパク質を用いたゲル濾過クロマトグラフィー分析を行った (図 40)。NF- κ B レポーターアッセイの結果と対応して、TLR7 の site 2 の変異体は、野生型 TLR7 と比べて polyU_12mer との結合が減少したが、R848 による二量体化は影響を受けなかった (図 39)。さらに、一部の

site 2 変異体 (R97A、C112S および R186A) では、ITC 分析によって polyU_12mer との結合を調べた (図 41A)。野生型 TLR7 と polyU_12mer との結合解離定数 K_d は 0.12 μM であり、R97A、C112S および R186A 変異体と polyU_12mer との結合解離定数 K_d はそれぞれ 0.72 μM , 1.0 μM および 0.25 μM でありいずれも結合が減弱した。なお、R186A 変異体は polyU_12mer との親和性は弱くなったが、NF- κ B レポーターアッセイにおいては、活性が逆に上昇したあるいはわずかに減少するにとどまった。これは、おそらく ITC では通常の RNA を用い、NF- κ B アッセイではホスホチオエート化した RNA を用いたことによる違いであろう。実際、R186A 変異体は、ホスホチオエート化した polyU_12mer (polyU_12merS) に対しては野生型 TLR7 と比べて同程度の親和性を示した (図 41B)。

Site 1 と site 2 どちらにも含まれないが二量体化に関与する残基も機能的に重要であった。これらの残基のうち、E583、L528 および R553 の変異体は、NF- κ B アッセイにおいて、R848 および ssRNA リガンドの両方への応答性が消滅した (図 42)。

この項の結果より、site 1 がすべてのリガンドによる TLR7 の活性化に必須であることおよび site 2 は ssRNA による活性化に必須であると結論付けた。

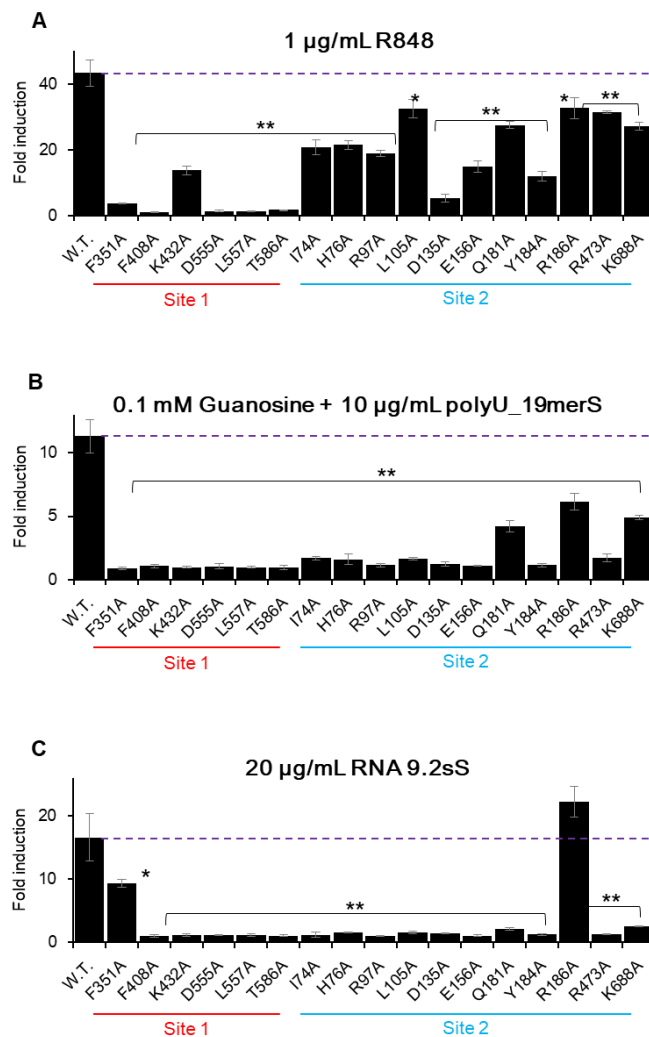


図 39. ヒト TLR7 の site 1 および site 2 変異体を用いた NF-κB レポーターアッセイ

ヒト TLR7 の野生型 (WT) または変異体を発現する HEK293T 細胞を R848 (A)、Guanosine + polyU_19merS (B) または RNA9.2sS (C) により刺激した。結果 (n = 3, + SD) は非刺激の HEK293T 細胞の相対光単位 (Relative light units: RLU) で割ったリガンドで刺激した細胞の RLU として計算した NF-κB 活性の fold induction を表した。Paired t-test を用いて、野生型 (WT) と各変異体との間の統計的有意性を決定した。ダブルアスタリスクおよびシングルアスタリスクは、それぞれ p < 0.01 および p < 0.05 (t 検定) を意味する。点線は WT の fold induction を示した。

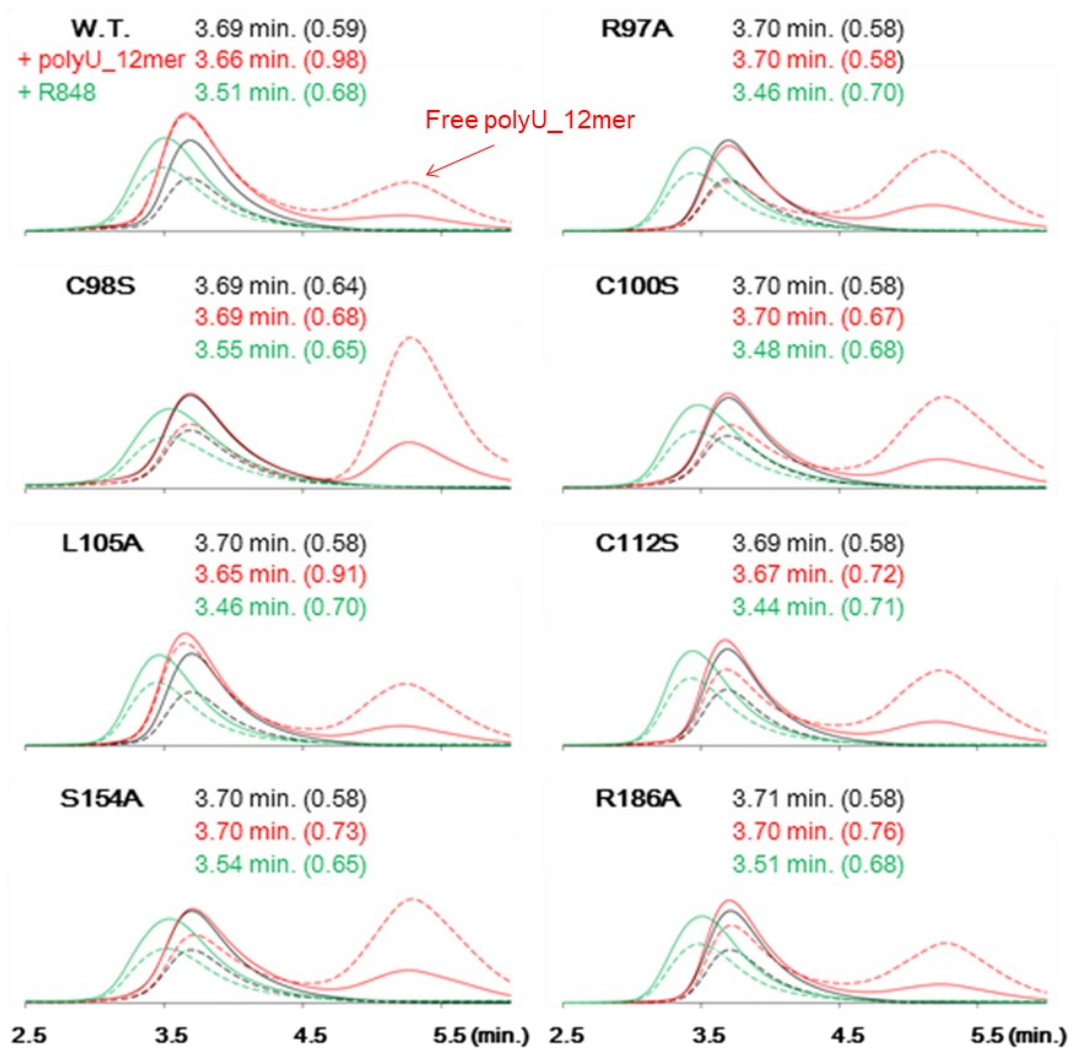


図 40. TLR7 の site 2 変異体のゲルろ過クロマトグラフィー分析

TLR7 リガンド非結合型 (黒線)、polyU_12mer 存在下で (赤線) および R848 存在下で (緑線) のクロマトグラフィーを示した。A₂₈₀ および A₂₆₀ をそれぞれ実線および点線で示した。溶出時間および A₂₈₀/A₂₆₀ の値 (括弧内) を示した。各リガンド非結合型の A₂₈₀ が正規化されたクロマトグラフィーを示した。

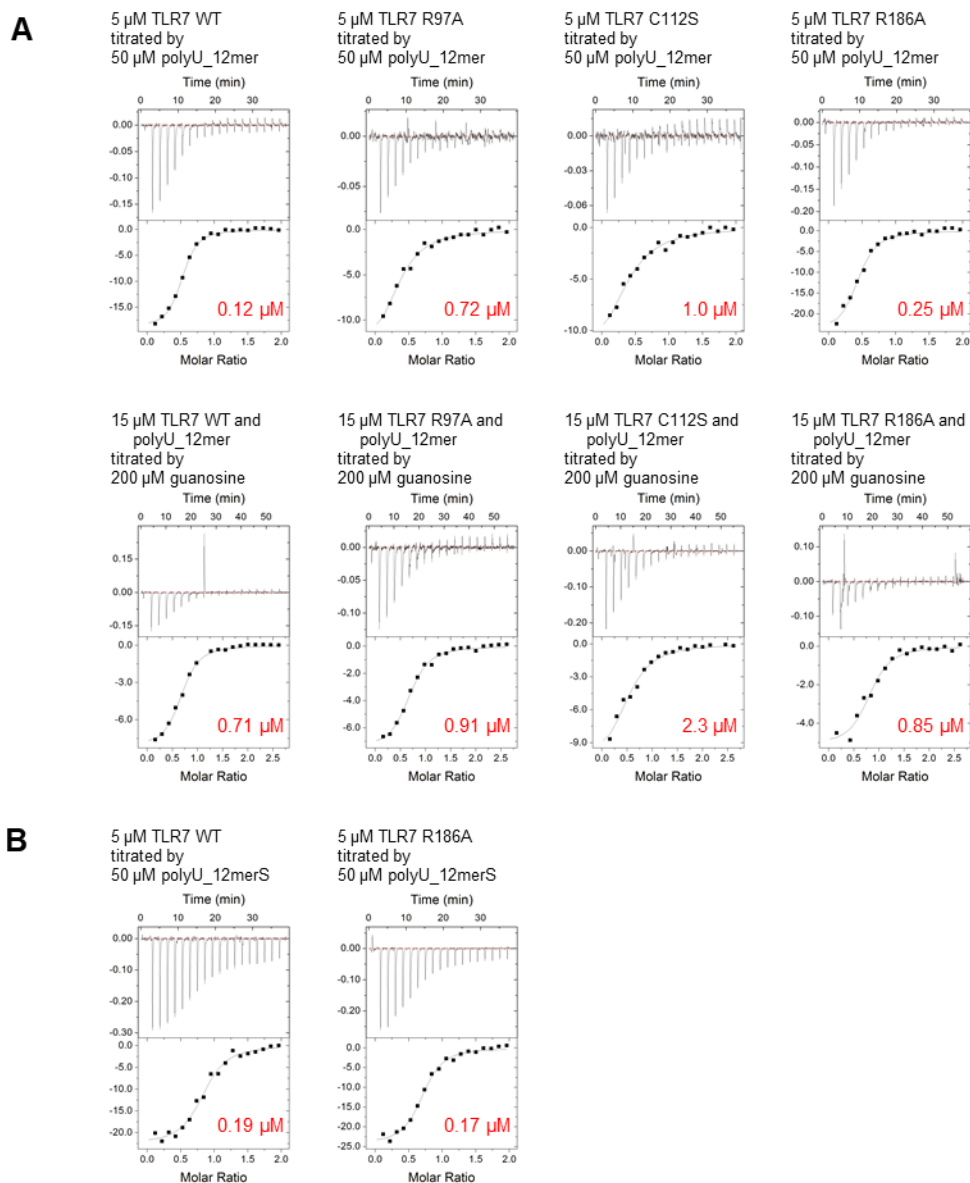


図 41. ITC 分析の thermograms (二)

(A) TLR7 の site 2 変異体 (R97A、C112S および R186A) の ITC 分析の thermogram

(B) TLR7 (WT および R186A) と polyU_12merS との結合の ITC 分析の thermogram

各滴定から得られた K_d 値 (赤字) を示した。

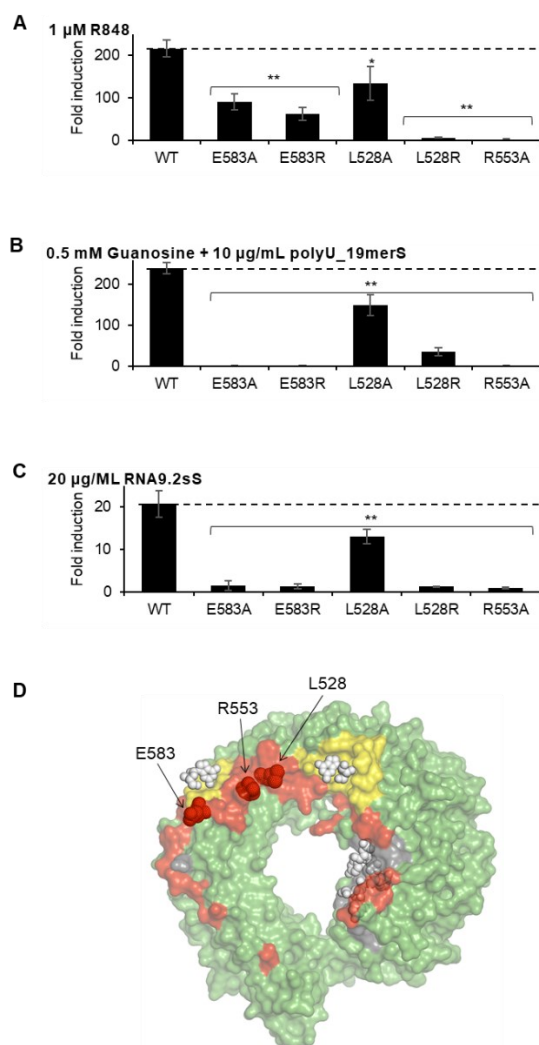


図 42. ヒト TLR7 の二量体界面における残基の変異体を用いた NF- κ B レポーターアッセイ
ヒト TLR7 の野生型 (WT) または二量体界面変異体を発現する HEK293T 細胞を R848 (A)、
Guanosine + polyU_19merS (B) または RNA9.2sS (C) により刺激した。結果 (n = 3, + SD)
は非刺激の HEK293T 細胞の相対光単位 (Relative light units: RLU) で割ったリガンドで刺
激した細胞の RLU として計算した NF- κ B 活性の fold induction を表した。Paired t-test を用
いて、野生型 (WT) と各変異体との間の統計的有意性を決定した。ダブルアスタリスクお
よびシングルアスタリスクは、それぞれ $p < 0.01$ および $p < 0.05$ (t-test) を意味する。点線
は WT の fold induction を示した。

3.1.2.8. TLR7 は連続した uridine 塩基を含む ssRNA を優先的に認識する

3.1.2.6 項で TLR7 への結合には ssRNA の非末端 uridine 塩基が必須であると結論付けた。

しかし、非末端 uridine 塩基と隣接する塩基の認識特異性は明らかにされていなかった。本項では、TLR7 の詳細な ssRNA 認識の配列特異性を同定するため、単一の uridine 塩基または 2 つの連続した uridine 塩基を含む 13 種類の 6mer ssRNA 配列を設計し、それぞれを 1U-RNA および 2U-RNA と呼ぶ (表 4)。これらの ssRNA と TLR7 との共結晶化を TLR7 の合成低分子アゴニスト IMDQ 存在下で行い、13 種類の TLR7/IMDQ/ssRNA 複合体の結晶構造を決定した (表 4)。すべての TLR7/IMDQ/ssRNA 複合体は TLR7/G/polyU 複合体と同様な活性化型二量体構造を構成していた。低分子アゴニスト結合部位の site 1 ではすべての複合体において IMDQ 由来の電子密度が観察されたが、ssRNA 結合部位の site 2 では ssRNA 配列により電子密度の強弱が見られた (図 43)。このことは TLR7 に対する ssRNA の親和性の違いを反映していると思われる。13 種類の ssRNA のうち 5 種類 (UUUUU、AAUUAA、CCUUC、GGUUGG、GGUCCC) は、構造モデリングに十分な電子密度を示し、最終的に構造が精密化された (表 5、図 44 および図 45)。注目すべきは、すべての 2U-RNA は明確な電子密度を示したが、1U-RNA は GGUCCC を除いて不明確な電子密度を示した (図 43)。この結果から、単一の uridine 塩基を含む ssRNA は TLR7 との結合に十分ではないことが示唆された。さらに 2U-RNA と 1U-RNA と TLR7 との結合の強弱を検証するために、各

ssRNA の TLR7 に対する結合親和性を ITC 分析で測定した (表 4、表 6 および図 46)。これらの ssRNA の親和性プロファイルは、結晶構造解析の結果とよく一致していた。2U-RNA は、完全から中程度の TLR7 結合親和性を示した。1U-RNA を TLR7 に滴定したところ、弱い ΔH 値しか観測されず、 K_d 値の定量的な解析には不十分であった (表 4、表 6 および図 46)。GGUCCC は比較的明確な電子密度を示したが (図 43 および図 44)、この配列も 2U-RNA よりも弱い結合親和性を示した (表 4、表 6 および図 46)。

UUUUU、AAUUA、CCUUC および GGUUGG における U_1U_2 モチーフの詳細な認識機構は TLR7/G/polyU 複合体構造における U_1U_2 モチーフの認識機構と類似していた。中間の uridine 塩基 (U_2) の結合部位を基準位置 (位置 2) として、前後のヌクレオチド結合部位を番号つけた (表 4 および図 44)。位置 2 の U_2 は R97*、E156*、Q181* および R473* の各側鎖と uridine 塩基特異的な水素結合で緊密に認識されていた (図 45)。位置 1 の U_1 は、TLR7 の LRR1 と LRR2 の側面と LRR2 のループ領域が形成する溝に位置し、塩基の先端にある uridine 塩基特有のカルボニル基の O 原子を介して H76* の側鎖と水素結合を形成していた (図 45)。さらに、 U_1 と N75* および C98* 主鎖の O 原子との間に 1 つの水分子を介した水素結合が観察された (TLR7/IMDQ/GGUUGG 複合体では、この部分での電子密度が弱いためこの水分子はモデリングされなかった)。TLR7/IMDQ/GGUCCC 複合体の位置 1 の G_1 は、H76* と類似した水素結合を形成していたが、 U_1 塩基と水分子の組み合わせは、 G_1 よりも

TLR7にとってより構造的な相補性が高いため (図 44G)、構造的に位置 1 での uridine 塩基認識特異性が裏付けられた。TLR7 は位置 3 ではどのようなヌクレオチドも許容できるが、adenosine/guanosine 塩基よりも uridine/cytidine 塩基を好む傾向があった (表 4、表 6 および図 46)。この位置 3 での認識には主にヌクレオチドのバックボーンのリン酸基が関与していた: それらのヌクレオチドの 5'-リン酸基は Y184*、R186*、R636 の側鎖と、3'-リン酸基は R467*、R636 の側鎖と Y468*、D469*の主鎖と相互作用していた (図 45)。また、TLR7/IMDQ/UUUUUU および TLR7/IMDQ/CCUUCC 複合体では、U₂の 5'-リン酸と R467*の側鎖の間に U₃/C₃ のピリミジン塩基がぴったりと収まり、結合にさらに貢献していた (図 44H)。対照的に、TLR7/IMDQ/AAUAA および TLR7/IMDQ/GGUUGG 複合体の A₃/G₃プリン塩基は、この位置 3 での接触がかなり緩く弱い電子密度を示していた (図 44E, F, H)。したがって、TLR7 の site 2 の位置 3 ではプリン塩基よりもピリミジン塩基の方がサイズや形状が結合に有利だと考えられる。

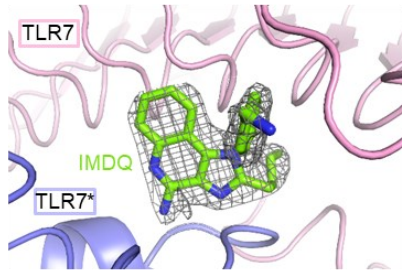
次に、2U-RNA と 1U-RNA が細胞内で異なるレベルの TLR7 活性化を引き起こすかどうかを評価した。マウスまたはヒト TLR7 を発現させた HEK293T 細胞を ssRNA 単独または guanosine との組み合わせで刺激した (図 47)。マウスとヒト TLR7 を発現させた細胞の活性化パターンは類似していた。Guanosine 存在下で、2U-RNA (polyU2G、polyU2A、polyU2C) は polyU20 と同等のレベルの TLR7 活性化を誘導し、1U-RNA (polyU1G、polyU1A、

polyU1C) よりも有意に高かった。細胞アッセイでも 2U-RNA は 1U-RNA よりも効率的に TLR7 の活性化を誘導した。注意すべきことに、いくつかの 1U-RNA が依然として一定レベルの TLR7 活性化を誘導したことが見られていた (図 47)。興味深いことに、CUC モチーフを含む polyU1C は、GUG/AUA モチーフを含む RNA (polyU1G/polyU1A) よりも高い TLR7 活性化を誘導した。同様に、polyGUCCC は polyGUGCC よりも TLR7 の活性化を誘導した。これらの結果は、TLR7 の site 2 の位置 3 では、adenosine/guanosine 塩基よりも cytidine 塩基が優先されるという考えをさらに裏付けるものであった (図 44H)。実際、2 つの UUC モチーフを含む RNA9.2s は、TLR7 の完全な活性化を誘導した。

以上の結晶学的、生物物理学のおよび細胞学的解析により、TLR7 の詳細な ssRNA 認識の配列特異性が解明された (図 48)。まず、site 2 の位置 1 では、C/A/G よりも U を好むことがわかった。さらに、位置 2 では U しか結合できず、位置 3 では A/G よりも U/C の方が認識に有利である。

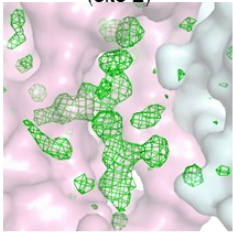
A

TLR7/IMDQ/CCUUCC complex (site 1)

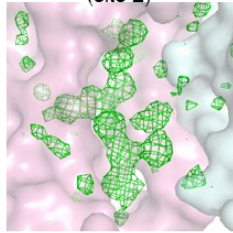


B

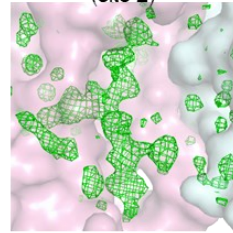
TLR7/IMDQ/UUUUUU複合体 (site 2)



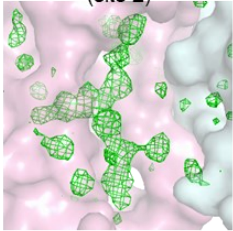
TLR7/IMDQ/AAUUAA複合体 (site 2)



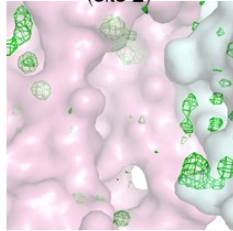
TLR7/IMDQ/CCUUCC複合体 (site 2)



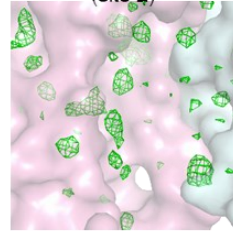
TLR7/IMDQ/GGUUGG複合体 (site 2)



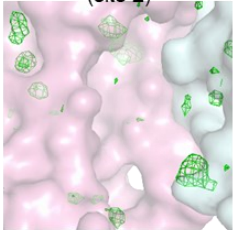
TLR7/IMDQ/AAUAAA複合体 (site 2)



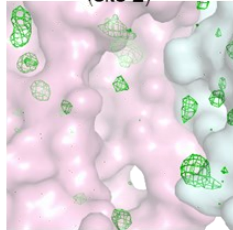
TLR7/IMDQ/AAUCCC複合体 (site 2)



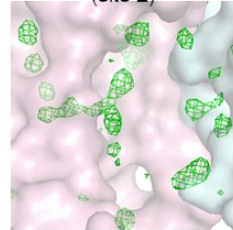
TLR7/IMDQ/AAUGGG複合体 (site 2)



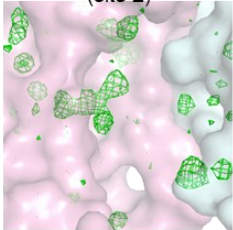
TLR7/IMDQ/CCUAAA複合体 (site 2)



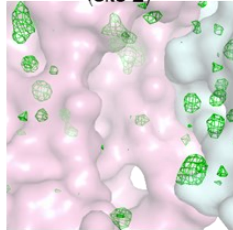
TLR7/IMDQ/CCUCCC複合体 (site 2)



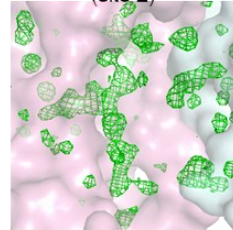
TLR7/IMDQ/CCUGGG複合体 (site 2)



TLR7/IMDQ/GGUAAA複合体 (site 2)



TLR7/IMDQ/GGUCCC複合体 (site 2)



TLR7/IMDQ/GGUGGG複合体 (site 2)

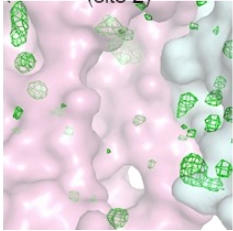


図 43. 13 種類の TLR7/IMDQ/ssRNA 複合体の site 2 に観察された電子密度

(A) TLR7/IMDQ/CCUCCC 複合体の site 1 の拡大図; TLR7 タンパク質と IMDQ はそれぞれカートゥーンモデルとスティックモデルで示した。IMDQ の電子密度を灰色のメッシュ ($2F_o-F_c$ マップ, 1.5σ) で示した。

(B) 13 種類の TLR7/IMDQ/ssRNA 複合体結晶構造の site 2 における初期電子密度; 各複合体結晶の回折データに対し、分子置換法で初期位相を決定し 10 サイクルの Refmac5 による精密化を行った。その時点での電子密度マップ (F_o-F_c マップ, 3.0σ) を示した。TLR7 と TLR7* はそれぞれシアンと紫の表面図で示した。TLR7/IMDQ/UUUUUU、TLR7/IMDQ/AAUUAA、TLR7/IMDQ/CCUCC、TLR7/IMDQ/GGUUGG および TLR7/IMDQ/GGUCCC 複合体のみが ssRNA のモデル構築に十分な電子密度を示した。

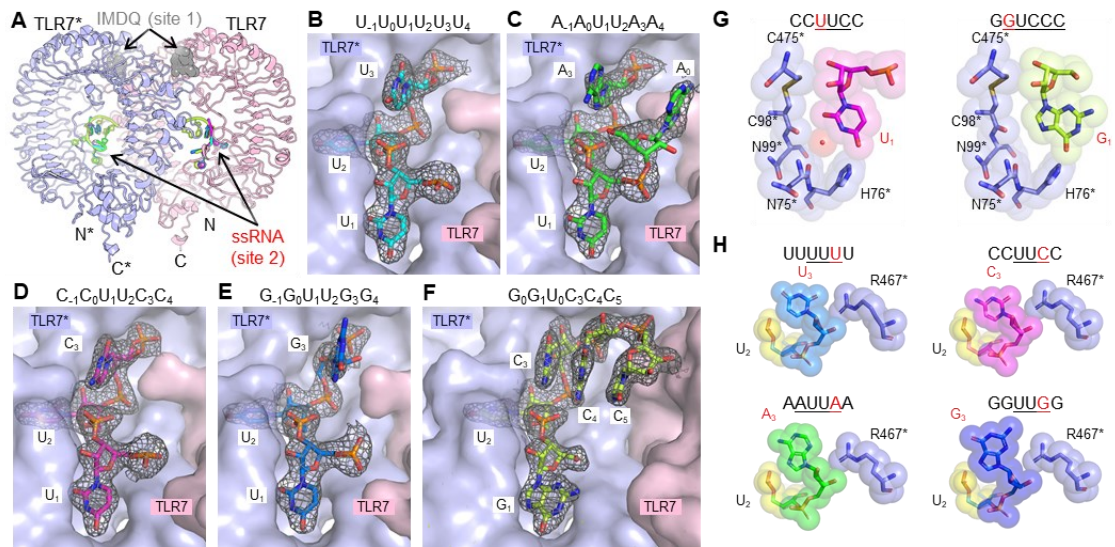


図 44. 5 種類の TLR7/IMDQ/ssRNA 複合体結晶構造 (一)

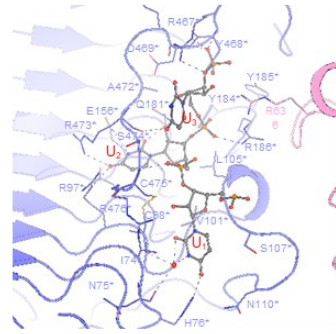
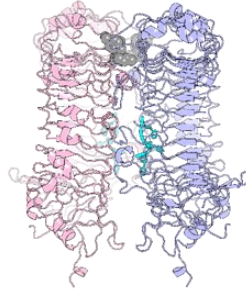
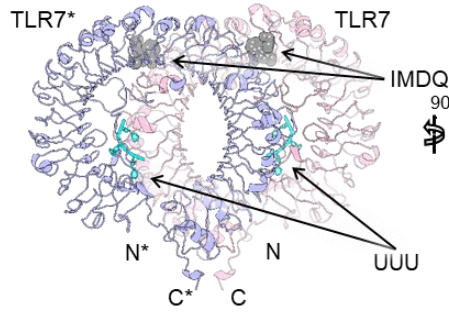
(A) TLR7/IMDQ/UUUUUU 、 TLR7/IMDQ/AAUUA A 、 TLR7/IMDQ/CCUCC 、 TLR7/IMDQ/GGUUGG および TLR7/IMDQ/GGUCCC 複合体構造の重ね合わせ; TLR7、TLR7*および ssRNA (site 2) はそれぞれピンク、紫およびマルチカラーのカーตูนモデルで示した。IMDQ (site 1) は灰色の空間充填モデルで示した。

(B-F) Site 2 における ssRNA の拡大図; ssRNA と TLR7 はそれぞれスティックモデルと表面図で示した。各 ssRNA の電子密度は灰色のメッシュで示した ($2 F_o - F_c$ マップ, 1.0σ , GGUCCC; $2 F_o - F_c$ マップ, 1.5σ , GGUCCC 以外)。

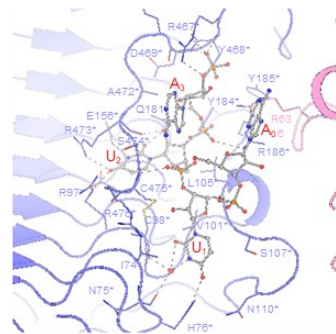
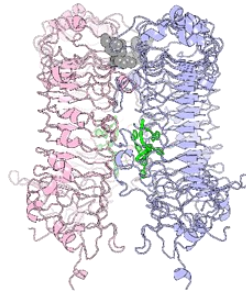
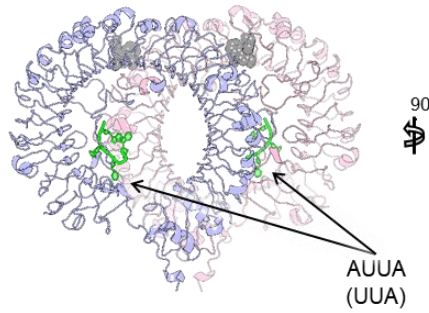
(G) Site2 の位置 1 における塩基の認識; 水分子は赤い球体で表示した。

(H) Site2 の位置 3 における塩基の認識

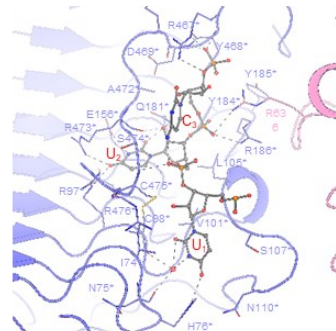
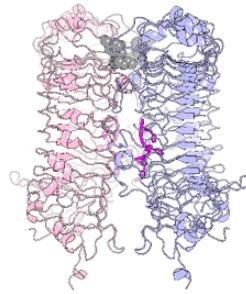
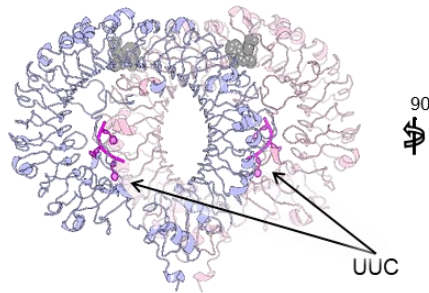
TLR7/IMDQ/UUUUUU複合体



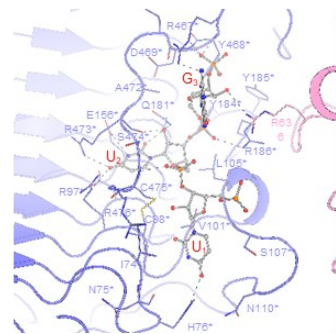
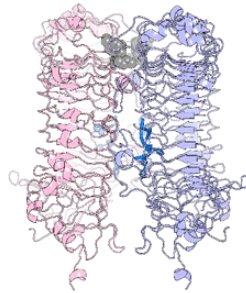
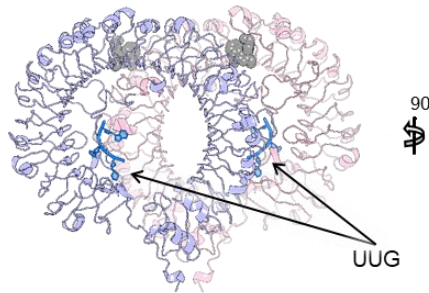
TLR7/IMDQ/AAUUAA複合体



TLR7/IMDQ/CCUUCC複合体



TLR7/IMDQ/GGUUGG複合体



TLR7/IMDQ/GGUCCC複合体

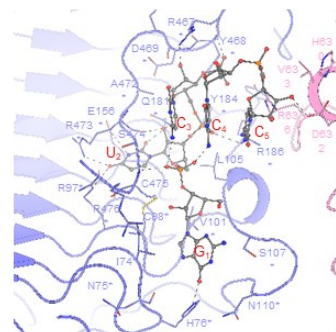
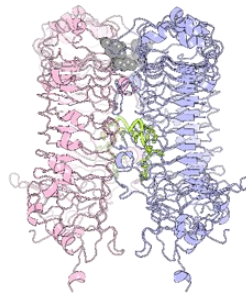
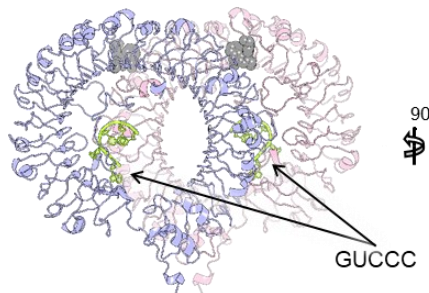


図 45. 5 種類の TLR7/IMDQ/ssRNA 複合体結晶構造 (二)

TLR7/IMDQ/UUUUUU 、 TLR7/IMDQ/AAUUAA 、 TLR7/IMDQ/CCUCC 、
TLR7/IMDQ/GGUUGG および TLR7/IMDQ/GGUCCC 複合体構造の正面図 (左)、側面図 (中)
および site 2 の拡大図 (右); 破線は水素結合を、赤い球は水分子を示した。

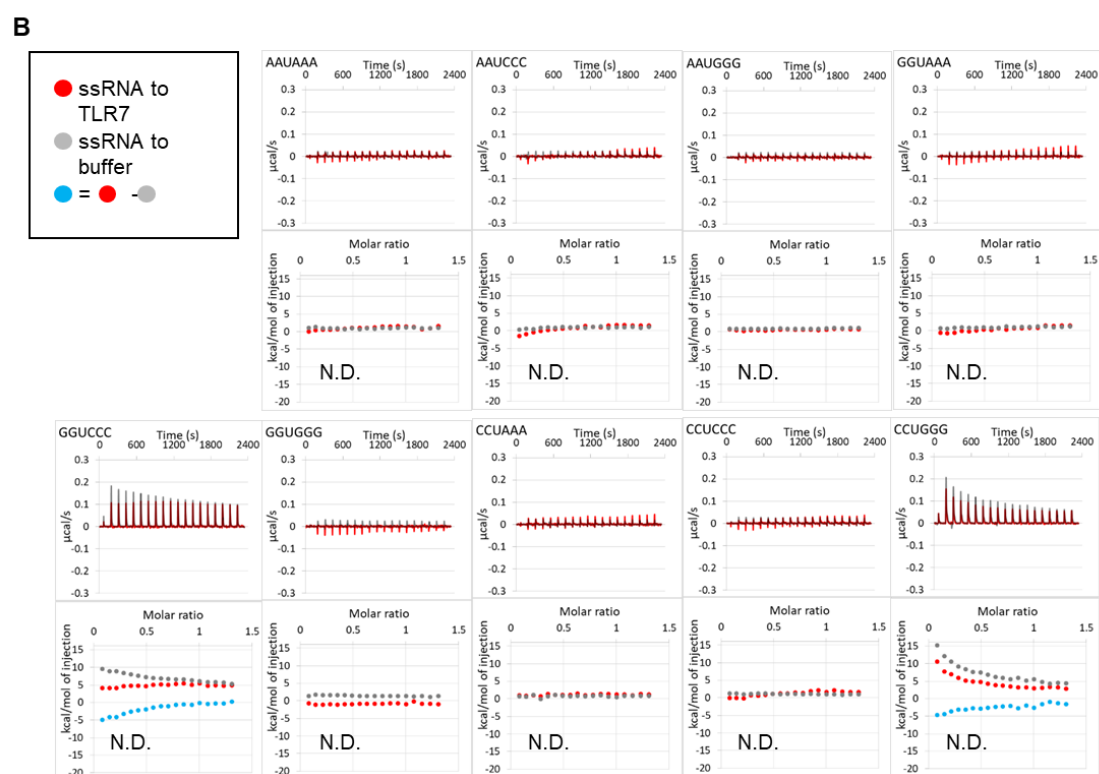
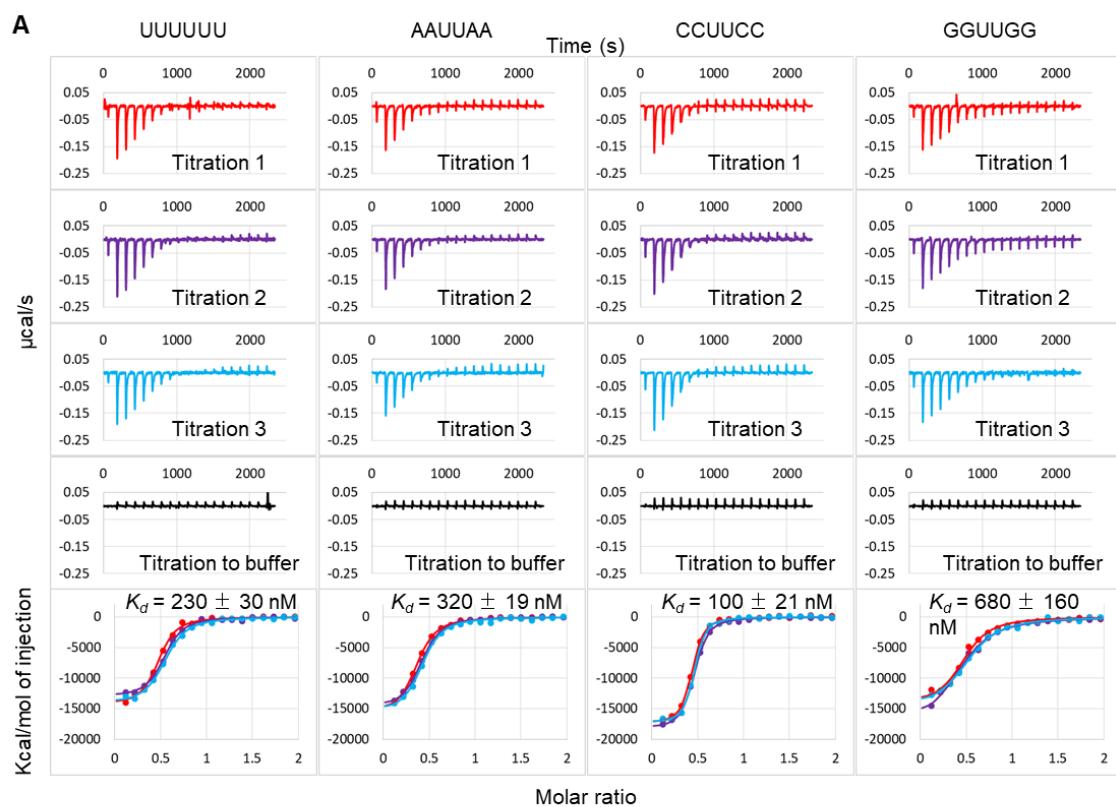


図 46. ITC 分析の thermograms (三)

ITC による 13 種類の 6mer ssRNA と TLR7 との結合の分析

(A) TLR7 に対する 2U-RNA の滴定; 3 回の独立した滴定と 1 回のブランク滴定 (バッファーへの ssRNA の滴定) の結果を示した。

(B) TLR7 に対する 1U-RNA の滴定; 1 回の滴定と 1 回のブランク滴定 (バッファーへの ssRNA の滴定) の結果を示した。

TLR7 に対する ssRNA の滴定 (赤)、ブランクの滴定 (灰色)、およびそれらの減算 (青、GGUCCC と CCUGGG のデータのみ表示) の結果を表示した。2U-RNA の 3 回の滴定から得られた $K_d \pm SD$ 値を示した。N.D.は「not determined」の略である。本実験に関連する結果 (K_d , ΔH , ΔS , N など) は表 4 および表 6 にも掲載した。

ssRNAs used to simulate HEK293T cells

- | | |
|---------------------------|-----------|
| 1. UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU | polyU20 |
| 2. GUGUGUGUGUGUGUGUGUGU | polyU1G |
| 3. GGUUGUUGUUGUUGUUGUUG | polyU2G |
| 4. AUAUAUAUAUAUAUAUAUAU | polyU1A |
| 5. AAUAUAUAUAUAUAUAUAUA | polyU2A |
| 6. CUCUCUCUCUCUCUCUCUCU | polyU1C |
| 7. CCUUCUCUCUCUCUCUCUCU | polyU2C |
| 8. GUCCCGUCCCGUCCCGUCCC | polyGUCCC |
| 9. GUGCCGUGCCGUGCCGUGCC | polyGUGCC |
| 10. UGUCCUUCA AUGCCUUCA | RNA9.2s |

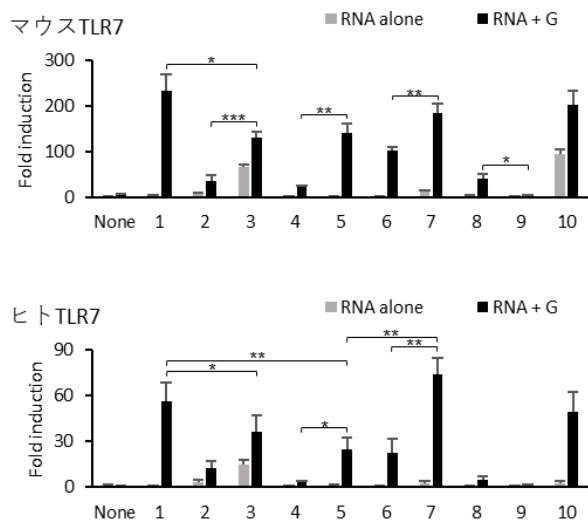


図 47. マウスまたはヒト TLR7 を用いた NF-κB レポーターアッセイ

マウスまたはヒト TLR7 を発現する HEK293T 細胞を ssRNA または ssRNA + Guanosine (G) により刺激した。結果 (n = 4, + SD) は非刺激の HEK293T 細胞の相対光単位 (Relative light units: RLU) で割ったリガンドで刺激した細胞の RLU として計算した NF-κB 活性の fold induction を表した。Paired t-test を用いて、異なるリガンドの間の統計的有意性 (*< 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001) を決定した。

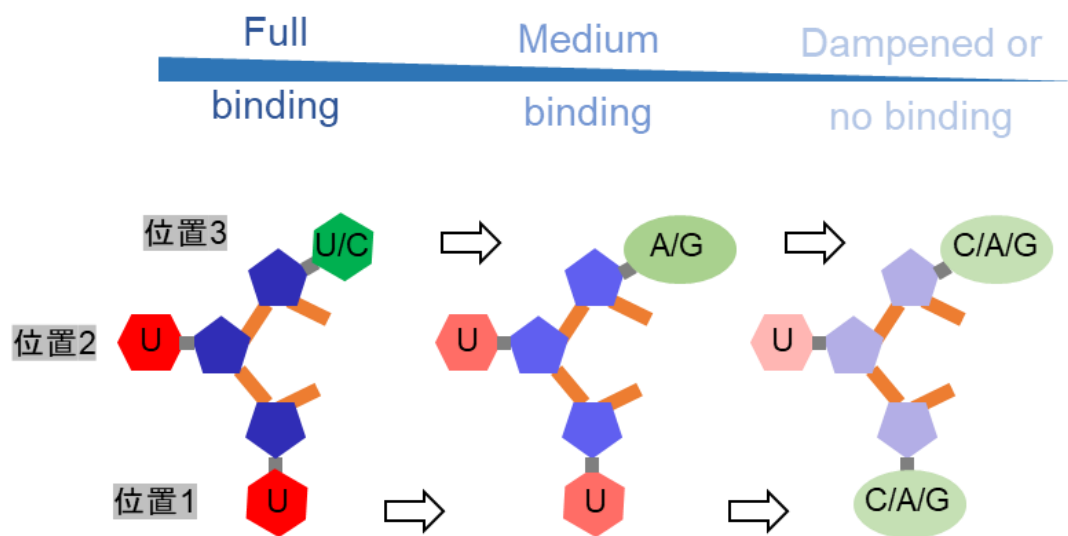


図 48. TLR7 の詳細な ssRNA 認識の配列特異性

3.1.3. 合成低分子アゴニストによる TLR7 の活性化機構

3.1.3.1. TLR7/合成低分子アゴニスト複合体の結晶構造

3.1.2 項では、天然アゴニストによる TLR7 の活性化機構を明らかにした。Guanosine とその類似物および uridine 塩基を含む ssRNA 以外に、TLR7 を活性化させるいくつかの合成低分子アゴニストが開発されていた (図 4)。本項では 5 種類の典型的なイミダゾキノリン (Imidazoquinoline) 誘導体 (IQD) および新規化学骨格を有する TLR7 特異的アゴニストの GS9620 と TLR7 との共結晶構造を高分解能で決定した (表 2、表 5 および図 49)。TLR7/R848 複合体、TLR7/imiquimod 複合体、TLR7/gardiquimod 複合体、TLR7/CL075 複合体、TLR7/CL097 複合体および TLR7/GS9620 複合体の構造はすべて、TLR7/G/polyU 複合体と類似した活性化型二量体を形成していた (図 24A および図 49)。6 つの複合体構造の site 1 において、低分子アゴニストの明確な電子密度が観察された。また、これらの構造の site 2 においては ssRNA 由来の電子密度が観察されなかった (図 49)。

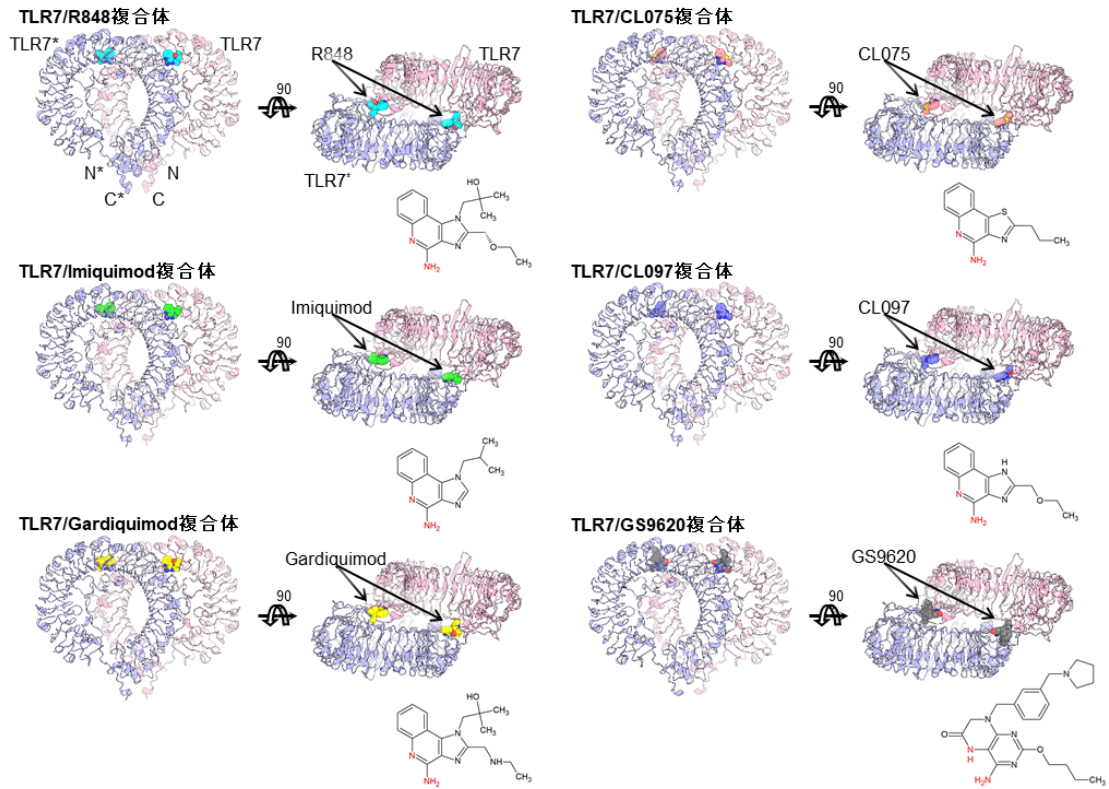


図 49. TLR7/合成低分子アゴニスト複合体の結晶構造

TLR7/R848、TLR7/Imiquomd、TLR7/Gardiquimod、TLR7/CL075、TLR7/CL097 および TLR7/GS9620 複合体構造の正面図と上面図を示した。TLR7 と低分子アゴニストはそれぞれカートゥーンモデルと空間充填モデルで示した。各低分子アゴニストの化学構造を示した。

3.1.3.2. IQD の認識機構

TLR7 を活性化させるイミダゾキノリン誘導体 (IQD) は 3 つの部分の化学構造 (R_0 , R_1 および R_2) で特徴づけられている (図 50A)。イミダゾキノリン骨格を R_0 と呼び、イミダゾール環に結合した 2 つの主要な置換基を R_1 および R_2 と呼ぶ (図 50A)。Imiquimod は R_1 部分

を持たず、CL075 と CL097 は R₂ 部分を持たない。TLR7 の site 1 に結合した 5 つの IQD 分子を重ね合わせると、これらのリガンドは guanosine の場合と類似した相互作用と異なる相互作用で認識されていた (図 50D)。IQD の R₁ 部分は site 1 のポケットの底に挿入され、R₂ 部分は site 1 の入り口側に結合している (図 33A および図 50B)。TLR7 と IQD の相互作用は、大きく 4 種類に分類される: (1) R₀ 骨格のキノリン環と F408 と L557*側鎖の間とのスタッキング相互作用、(2) R₀ の N1、N2、N3 原子と D555*側鎖や T586*主鎖との水素結合、(3) R₁ 部分と F349、F351、V381、F408 で形成される疎水性ポケットとの疎水性相互作用、および (4) R₂ 部分と LRR11 のループ領域 (F351-V355) や V381、L557*側鎖とのファンデルワールス接触 (図 50D)。

TLR7 と R₀ 部分とのスタッキング相互作用および水素結合は、すべての TLR7/IQD 複合体構造の間で保存されていた。R₁ 部分を持たない imiquimod は、polyU ssRNA の存在下でもゲルろ過クロマトグラフィー分析で極めて弱い TLR7 の二量体化しか誘導せず、ITC 分析では定量可能な ΔH を示さなかったことから (図 51)、R₁ 部分を介した疎水性相互作用が IQD の TLR7 への強力な結合に不可欠であることが示唆された。このことは site 1 の疎水性ポケットとの相互作用を持たない guanosine と TLR7 との弱い結合と一致していた (図 28A および図 51)。また、R₁ 部分の長さや化学的特性も IQD と TLR7 との結合に重要である。

Gardiquimod と R848 は、R₁ 部分の N 原子 (gardiquimod) と O 原子 (R848) のみが異なっ

ていたが (図 50A)、gardiquimod は R848 よりも弱い TLR7 の二量体化を誘導した (図 51A)。

このことから、TLR7 の結合における R₁ 部分を介した疎水性相互作用の重要性が明らかになった。R₁ 部分のわずかな違い、たとえ 1 原子の違いであっても、リガンドの親和性に大きな影響を与える可能性がある。CL075 の R₁ 部分の長さ (3 原子) は、R848 や CL097 の R₁ 部分 (4 原子) よりも短かった。そのため、CL075 の R₀ 骨格は、他の 4 つの化合物の R₀ 骨格の平面に比べて約 8° 回転しており、この違いは短い R₁ 部分でも同様の疎水性相互作用が形成されるためであると考えられる (図 50D)。ゲルろ過クロマトグラフィー分析の結果、CL075 の存在化では R848 や CL097 の存在化よりも TLR7 の溶出時間が遅いことから、CL075 が R848 や CL097 よりも弱いアゴニストであることがわかった (図 51A)。この結果から、TLR7 の site 1 の疎水性ポケットと効果的に相互作用するためには、4 原子の長さを持つ R₁ 部分が適していることが示唆された。また、R848、imiquimod および gardiquimod の R₂ 部分は、置換基の形状が site 1 ポケットの入り口部分と相補的に相互作用することで、TLR7 への結合に寄与していた (図 50D)。実際、CL097 は R848 と比較して R₂ 部分のみを持たず、R848 よりも弱い TLR7 の二量体化を誘導した (図 51A)。

以上の 5 つの TLR7/IQD 複合体の結晶構造および生化学実験から、IQD のような合成低分子アゴニストの TLR7 結合能を規定する構造基盤が明らかになった。

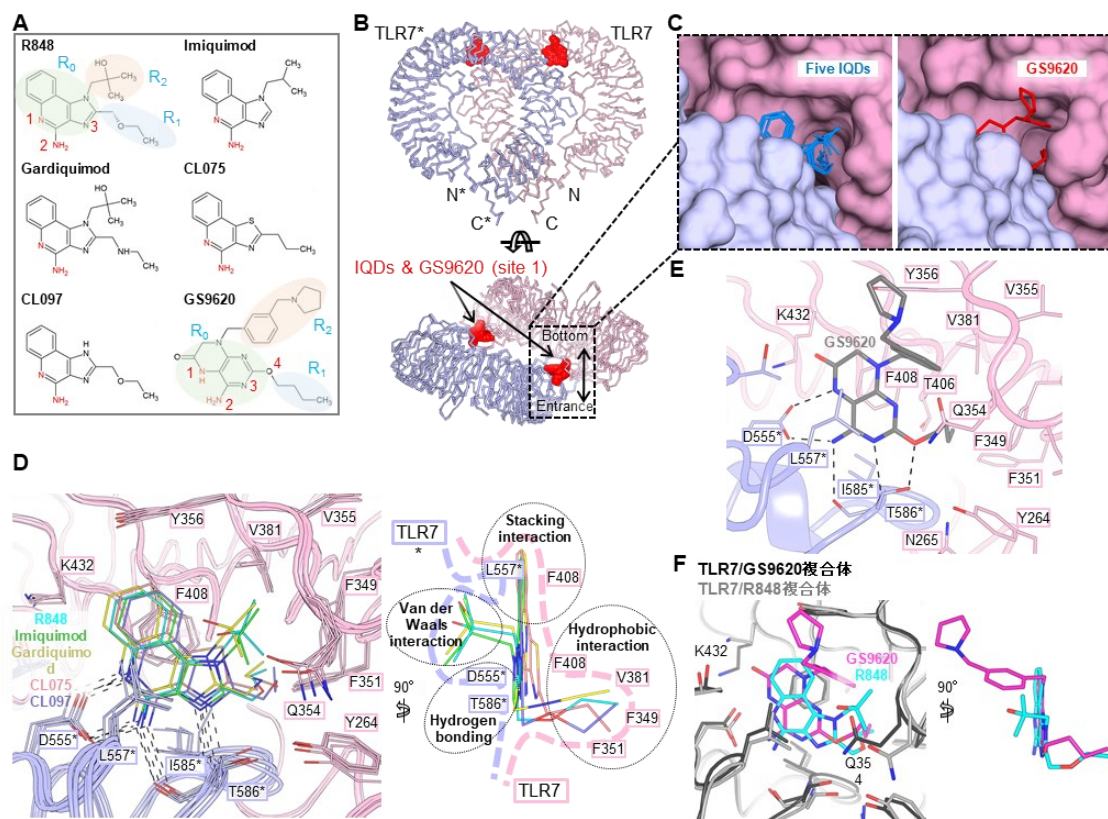


図 50. IQD および GS9620 の認識機構

(A) 5つのIQDとGS9620の化学構造; R848とGS9620のR₀, R₁, R₃部分はそれぞれ緑、青、オレンジでハイライトされた。D555*と結合したN原子は赤文字で表示した。

(B) TLR7/R848、TLR7/Imiquomd、TLR7/Gardiquimod、TLR7/CL075、TLR7/CL097およびTLR7/GS9620複合体構造の重ね合わせ; TLR7と低分子アゴニストはそれぞれリボンモデルと空間充填モデルで示した。リガンド結合部位の方向を矢印で示した。

(C) TLR7/IQD複合体(左)およびTLR7/GS9620複合体(右)のsite 1の表面図; IQDは青の、GS9620は赤のスティックモデルで示した。左側の表面図は、TLR7/R848複合体のものである。

(D) 5つのIQDが結合したsite 1の拡大図; 5つのTLR7/IQD複合体構造の重ね合わせを示した。水素結合は破線で示した。TLR7とTLR7*が形成するリガンド結合部位の模式図を太

い破線で示した (右)。IQD の認識に関与する 4 種類の相互作用を示した。

(E) GS9620 が結合した site 1 の拡大図; 水素結合は破線で示した。

(F) TLR7/R848 複合体および TLR7/GS9620 複合体の site 1 の重ね合わせ; わかりやすくするために、タンパク質の表示を省略した (右)。

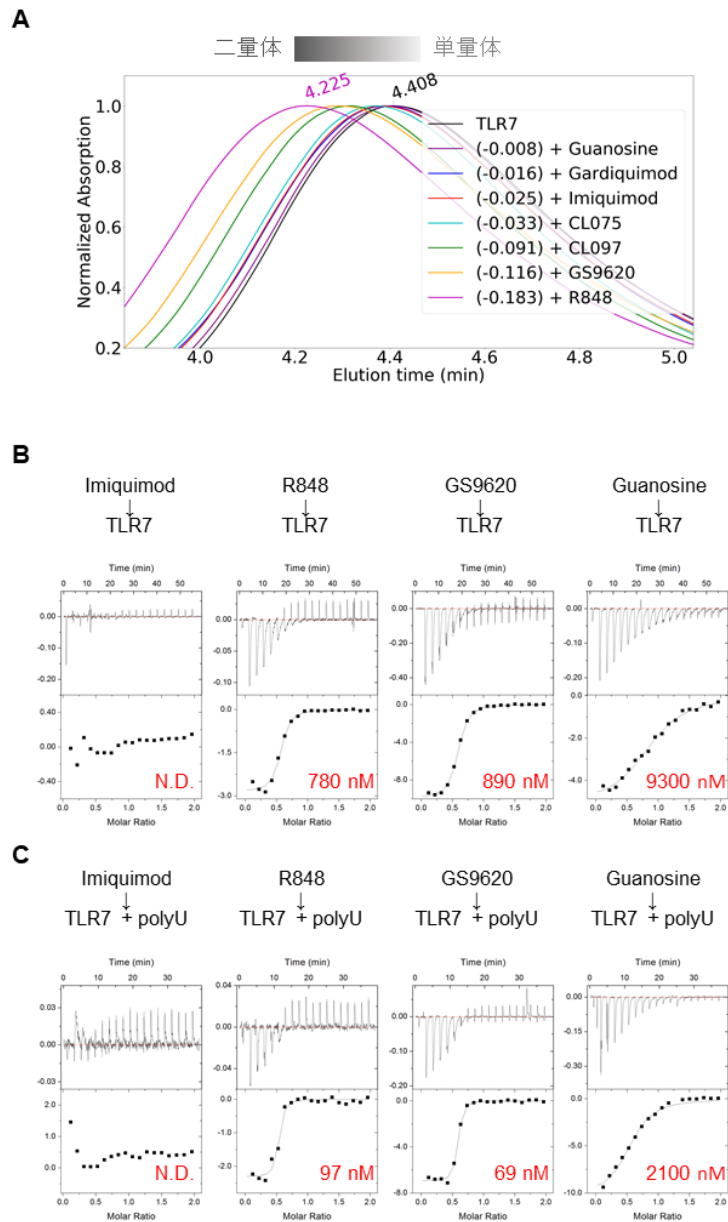


図 51. TLR7 と低分子アゴニストとの結合解析

(A) ゲルろ過クロマトグラフィーによる低分子アゴニストと TLR7 との結合解析; TLR7 リガンド非結合型 (4.408 min) および TLR7 + R848 (4.225 min) の溶出時間をピークの上に表示した。二量体化の程度を色のグラデーションで示した。TLR7 リガンド非結合型と比較した溶出時間の変化を括弧内に示した。

3.1.3.3. GS9620 の認識機構

GS9620 は pteridinone 骨格を持ち、そのファーマコフォアは IQD や guanosine とは大きく異なっている (Roethle et al., 2013)。TLR7/GS9620 複合体の結晶構造から、GS9620 の認識機構が明らかになった (図 50E)。GS9620 は、その pteridinone 環 (R_0 骨格) が L557* と F408 に挟まれ、IQD の R_0 骨格と完全に重なっていることから、IQD と類似した相互作用で TLR7 の site 1 に認識された (図 50A, F)。3.1.3.2 項で述べた IQD の認識に関与する 4 種類の相互作用、すなわち、(1) R_0 骨格でのスタッキング相互作用、(2) R_0 骨格での水素結合、(3) R_1 部分での疎水性相互作用、(4) R_2 部分でのファンデルワールス接触は、GS9620 の認識でも観察されていたが、明確な相違点も観察された。 R_0 骨格と D555 との水素結合は、IQD 認識では 1 つの炭素原子で隔てられた 2 つの N 原子 (N1 と N2) によって媒介されていたが、GS9620 の認識では、水素結合に関与する 2 つの N 原子が炭素原子 2 個分離していた (図 50D, E)。TLR7/GS9620 複合体の K432 の側鎖は、TLR7/IQD 複合体と異なる構造をとり、S530* や D555* と水素結合を形成し、TLR7 の二量体化に寄与していた (図 52)。TLR7/G/polyU 複合体で見られた guanosine のカルボニル基が GS9620 のカルボニル基とほぼ同じ位置にあり、この部位での K432 も同様の下向きコンフォメーションをとっており、二量体化に関与していた (図 52)。実際、TLR7 の site 1 の K432A 変異体は R848 刺激に対する応答性はある程度残存するが guanosine/ssRNA リガンドに対する応答性は完全に

失った (図 39B, C)。これは、K432 が guanosine の認識には関与するが、R848 の認識には関与しないという構造解析の結果と対応している (図 52)。一方、TLR7/GS9620 複合体では、T586*側鎖が GS9620 の R₀ 骨格と水素結合を形成していた (図 50E)。GS9620 の大きな R₂ 部分は、IQD の R₂ 部分と比べて Y356 側にシフトした位置に配置していた (図 50F)。GS9620 の大きな R₂ 部分は LRR11 のループ領域と L557* の側鎖との間の空間を埋め、TLR7 の site 1 に適合した分子形状を形成するのに役立っていることが考えられる (図 50C)。

次に、GS9620 と TLR7 との結合親和性を ITC 分析で測定した (図 51B, C)。PolyU ssRNA の非存在下または存在下での GS9620 の TLR7 への結合の K_d 値は、それぞれ 890 および 69 nM であり、R848 の結合親和性と同程度であった (図 51B, C)。また、ゲルろ過クロマトグラフィー分析により、GS9620 が強力なアゴニストであることも確認された (図 51A)。

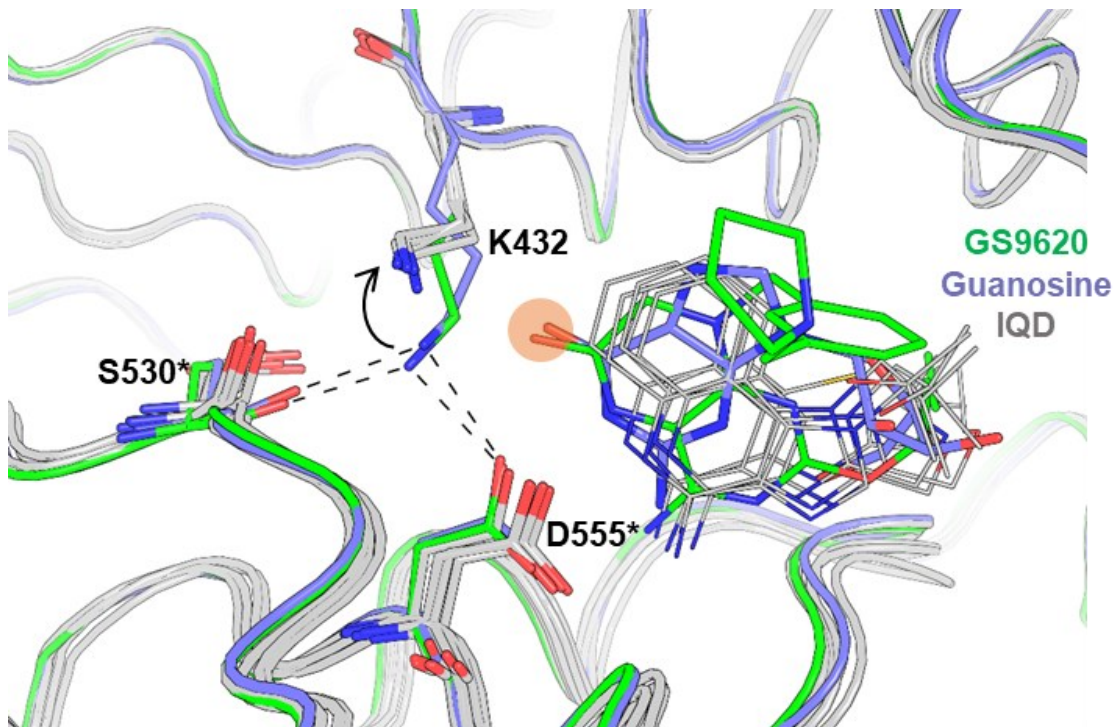


図 52. GS9620 と guanosine は IQD と比較して K432 残基の異なるコンフォメーションを誘導した

TLR7/GS9620、TLR7/G/polyU および 5 つの TLR7/IQD 複合体の site 1 の重ね合わせ; 赤丸は GS9620 と G のカルボキシル基を強調した。矢印は K432 のコンフォメーションの違いを示した。破線は水素結合を示した。

3.2. アンタゴニストによる TLR7 の阻害機構

3.2.1. TLR7/リード化合物 (アゴニスト) 複合体の結晶構造

Cpd-6 および Cpd-7 は TLR7 の低分子アンタゴニストである。これらの化合物は TLR7 の低分子アゴニストの Cpd-1~3 の誘導体として開発されていた (図 6) (Tojo et al., 2020)。

Cpd-1~3 は 8-oxoadenine (8-OA) の化学骨格を有し、TLR7 の低分子アゴニストの GS9620 と類似しているため、TLR7 の site 1 により認識されると考えられる。最初に、これらのリード化合物と TLR7 との結合様式を確認するため、Cpd-1、Cpd-2 および Cpd-3 を用いて、TLR7 との共結晶化を行い、それぞれの共結晶構造を決定した (表 7 および図 53)。

TLR7/Cpd-1、TLR7/Cpd-2 および TLR7/Cpd-3 複合体の全体構造は、前述の TLR7/低分子アゴニスト複合体の構造と類似していた (図 49)。これらの化合物は TLR7 の site 1 に結合しており、3.1.3.2 項で述べた IQD 認識で観察された 4 種類の相互作用で認識されていた (図 53D および図 50D)。

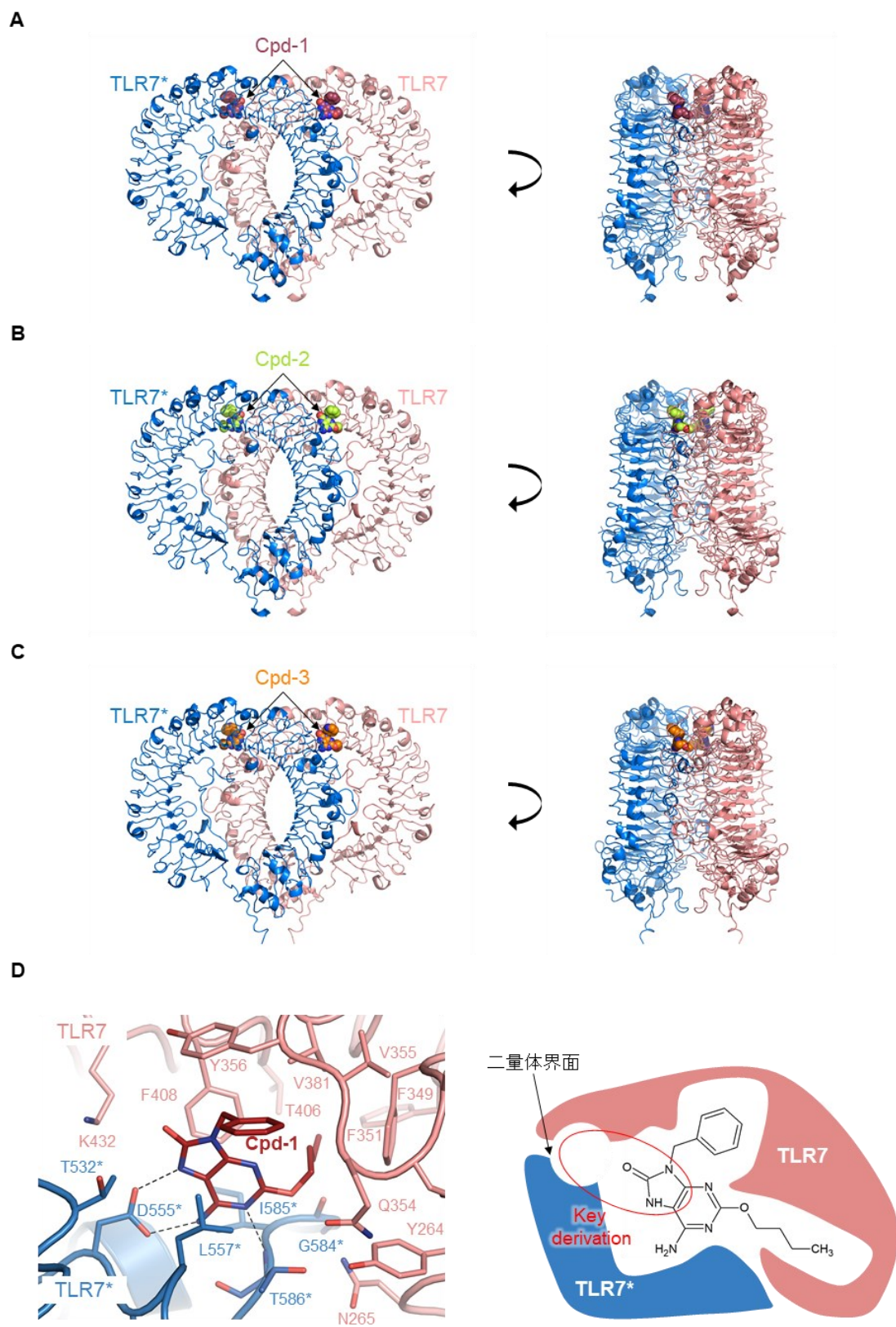


図 53. TLR7/リード化合物 (低分子アゴニスト) 複合体の結晶構造

(A-C) TLR7/Cpd-1、TLR7/Cpd-2 および TLR7/Cpd-3 複合体構造の正面図と側面図を示した。TLR7 とリード化合物 (低分子アゴニスト) はそれぞれカートゥーンモデルと空間充填モデルで示した。

(D) TLR7/Cpd-1 複合体構造 site 1 の拡大図 (左); 破線は水素結合を示した。Cpd-1 の認識の模式図 (右); Site 1 における TLR7 二量体化界面の内側の空間と Cpd-1 のアンタゴニストへの変換に重要な部分を赤い楕円で示した。

3.2.2. Cpd-6 および Cpd-7 は TLR7 による PBMC の免疫反応を抑制する

Cpd-6 および Cpd-7 の TLR7 のアンタゴニスト活性を確認するため、TLR7 依存的にインターフェロン- α (IFN- α) を産生するヒト初代末梢血単核細胞 (PBMC) を用いた阻害アッセイを実施した (図 54)。その結果、Cpd-6 と Cpd-7 は、2.5 μ M の濃度で TLR7 低分子アゴニスト R848 の刺激による IFN- α 産生を完全に阻害したが、Cpd-6 と Cpd-7 は同じ濃度でヒト PBMC からの TLR2 依存性の TNF- α 産生を阻害しなかった。このことから、これらのアンタゴニストは細胞毒性を持たず、ヒト初代免疫細胞の TLR7 応答を選択的に阻害することが示唆された。これらの結果は、Cpd-6 および Cpd-7 の TLR7 アンタゴニスト活性を示すものである。

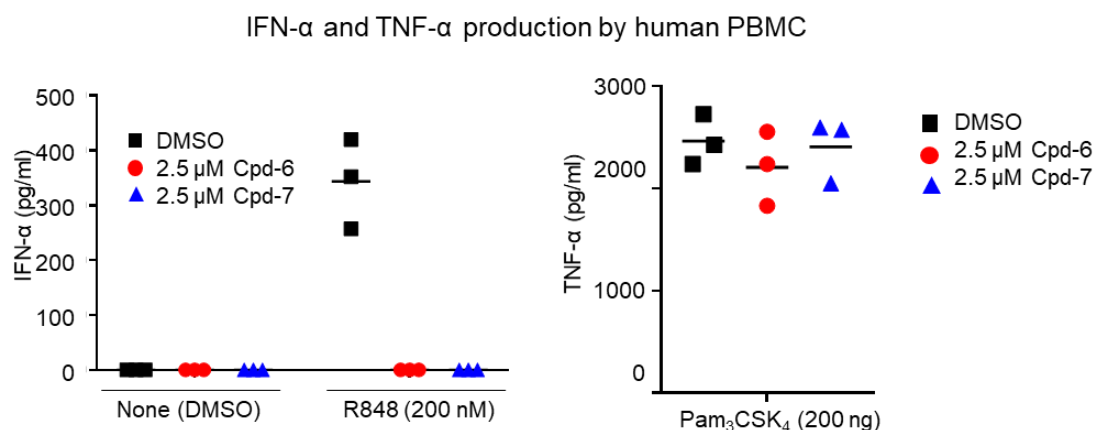


図 54. PMBC サイトカイン生産抑制アッセイ

ヒト初代 PBMC を用いた TLR7 阻害アッセイ; PBMC を DMSO、Cpd-6 または Cpd-7 で 3 時間前処理した後、DMSO または R848 または Pam₃CSK₄ で 20 時間刺激した。ELISA で定量した分泌 IFN- α または TNF- α 濃度を示した。各グループ (n = 3) のドットプロットおよび平均値 (横線) を示した。

3.2.3. TLR7 と各種リガンドとの結合解析

Cpd-6 および Cpd-7 による TLR7 の阻害機構を理解するため、TLR7 精製タンパク質を用いて生化学的解析を行った。ITC 分析により、pH 5.7 では Cpd-6 および Cpd-7 と TLR7 との結合が見られなかったが、pH 4.7 では両方のリガンドと TLR7 との中程度の結合が見られた (Cpd-6, $K_d = 10.0 \mu\text{M}$; Cpd-7, $K_d = 7.4 \mu\text{M}$) (図 55)。以上の結果から、Cpd-6 および Cpd-7 が TLR7 と直接結合することおよびその結合が酸性 pH に依存することが確認された。また、結合に必要な臨界 pH 値が 5 付近であることは、TLR7 が存在するエンドリソソーム内

の pH 値とよく一致している。次に、Cpd-6 および Cpd-7 による TLR7 の二量体化の有無を確認するため、グルタルアルデヒドを用いたクロスリンクアッセイを行い、その定量的な解析を行った (図 56)。アゴニストの Cpd-3 は、中性および酸性条件下でほぼ完全な TLR7 の二量体化を誘導した。リガンド非存在下の TLR7 はほとんど単量体のままであったが、Cpd-6 および Cpd-7 の存在下での TLR7 の二量体化の程度は酸性条件下でのみ増加した。以上の生化学的解析の結果から、アンタゴニストの Cpd-6 および Cpd-7 は TLR7 に酸性条件下において直接結合することで TLR7 の二量体化を誘導することが示された。

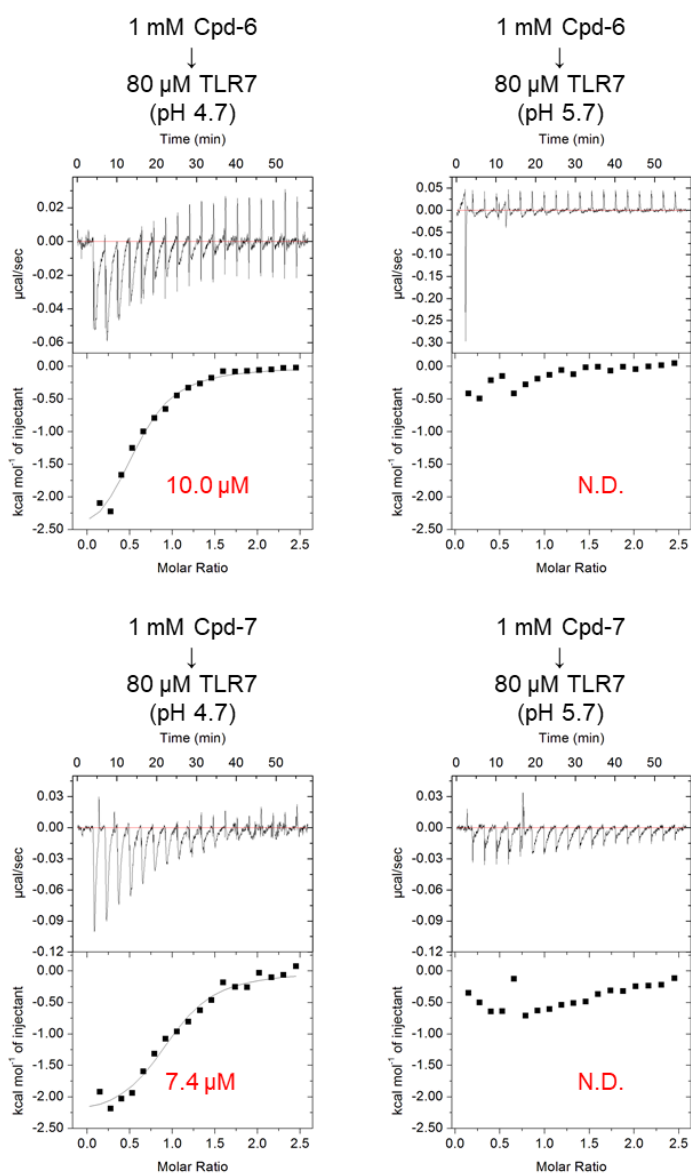


図 55. ITC 分析の thermograms (四)

ITC による Cpd-6 および Cpd-7 と TLR7 との結合の分析; 各滴定から得られた K_d 値 (赤字) を示した。N.D.は「not determined」の略である。

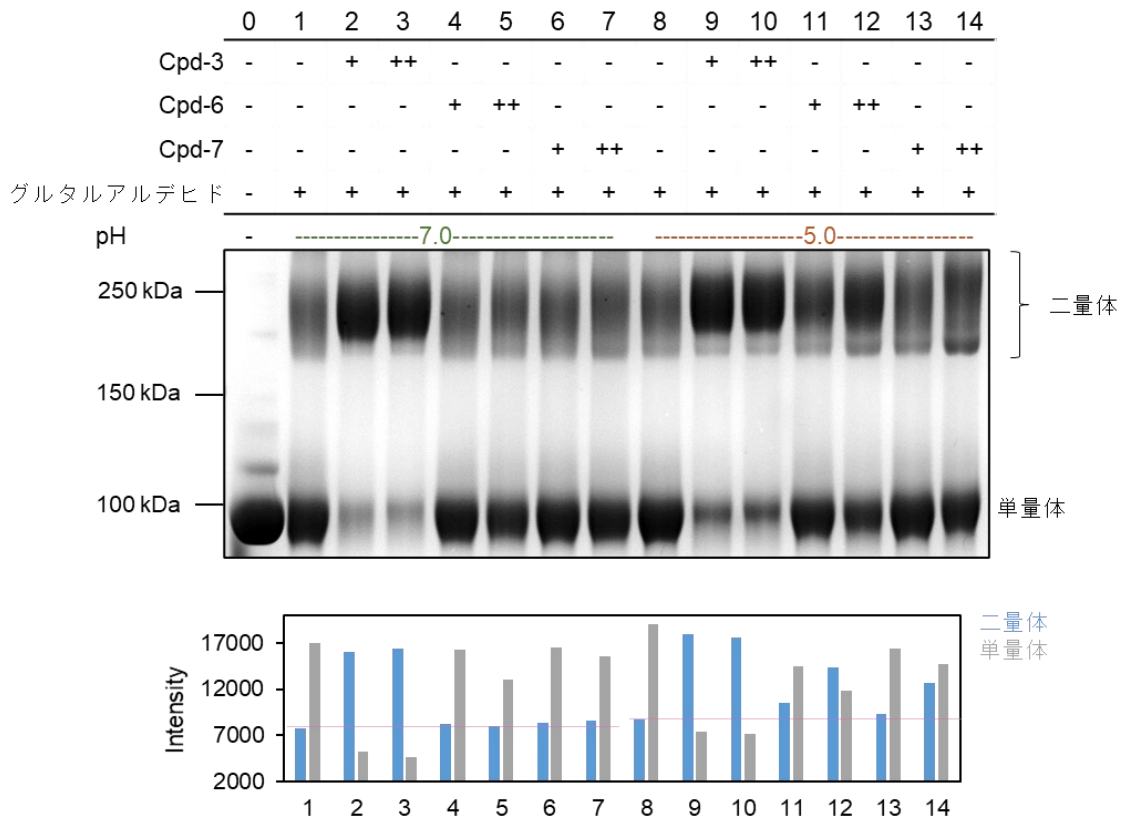


図 56. クロスリンクアッセイによる TLR7 の会合状態の分析

グルタルアルデヒドによりクロスリンクされた TLR7 サンプルの非還元性 SDS-PAGE 分析のゲル写真 (上) およびバンド強度の定量的解析 (下); リガンドの濃度に関して、+と++はそれぞれ 100 μ M と 1000 μ M を意味する。ImageJ ソフトウェアを用い、二量体の TLR7 と単量体の TLR7 に対応するバンド領域の強度をそれぞれ算出した。

3.2.4. TLR7/Cpd-6 複合体の結晶構造

Cpd-6 および Cpd-7 による TLR7 の阻害機構の分子機構を解明するため、TLR7 と Cpd-6 または Cpd-7 との共結晶化を行った。その結果、TLR7/Cpd-6 複合体の良質な結晶が得られ

た。一方、様々な結晶化条件のスクリーニングを実施したが、TLR7/Cpd-7 複合体の良質な結晶は得られず、構造決定に至らなかった。

驚くべきことに、TLR7/Cpd-6 複合体の結晶構造解析の結果、この複合体構造は TLR7/低分子アゴニスト複合体構造と同様の活性化型二量体構造を形成していた (図 57A)。Cpd-6 は低分子アゴニストの Cpd-1 と非常によく類似した認識機構で TLR7 の site 1 に結合していた (図 57B)。Cpd-6 の C8 置換基は比較的弱い電子密度を示し、この部分の高い柔軟性が示されていた (図 57B)。リード化合物の 8-OA 骨格の構造活性相関 (SAR) から、6-アミノ基と 8-オキソ基の両方が TLR7 のアゴニスト活性に重要であることが示されている (Nakamura et al., 2013)。しかし、8-オキソ基は TLR7 タンパク質と直接は相互作用せず、その周辺には他の置換基を導入できるスペースがある (図 53D)。したがって、8-OA の 8-オキソ基の置換により、TLR7 のアゴニスト (Cpd-1) 活性がアンタゴニスト (Cpd-5, Cpd-6 および Cpd-7) 活性に変換したと考えられる (図 6)。TLR7/Cpd-6 複合体構造から Cpd-6 の C8 置換基が周りの TLR7 の二量体界面を不安定化させる役割があることが示唆された。しかし、静止的な結晶構造は Cpd-6 の結合様式の一面を示しているにすぎず、今回の結晶構造のみからその阻害機構の全貌は説明できない。

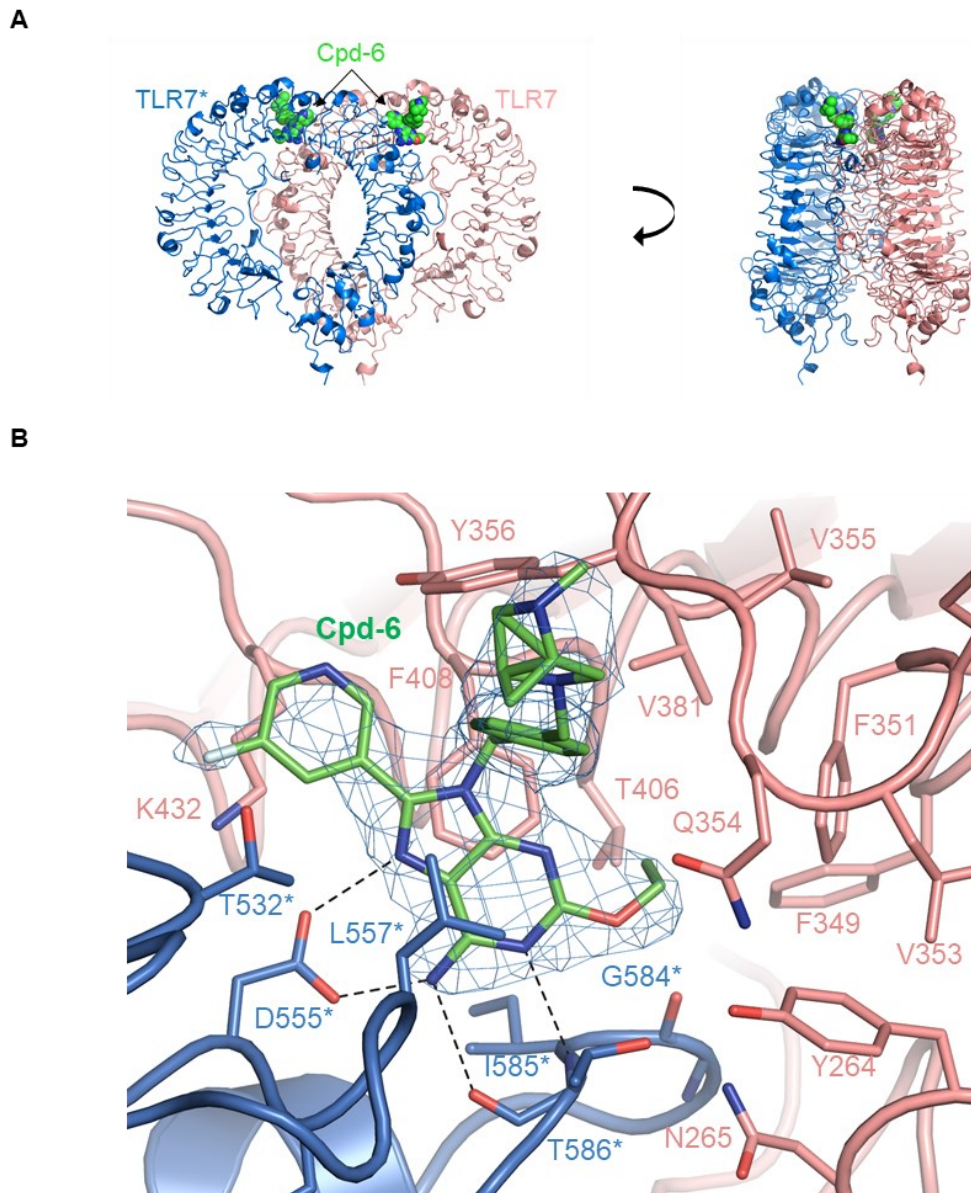


図 57. TLR7/Cpd-6 複合体の結晶構造

(A) TLR7/Cpd-6 複合体結晶構造の正面図と側面図を示した。TLR7 と Cpd-6 はそれぞれカーブトゥーンモデルと空間充填モデルで示した。

(B) TLR7/Cpd-6 複合体 site 1 の拡大図; 破線は水素結合を示した。Cpd-6 の電子密度は青色のメッシュで示した ($2F_o - F_c$ マップ, 1.0σ)。

3.2.5. アンタゴニスト結合による TLR7 のコンフォメーション・ダイナミクス

前項において TLR7/Cpd-6 複合体の結晶構造は活性化型二量体構造を形成していた一方で Cpd-6 は TLR7 の阻害活性を示したことから (図 54 および図 57)、Cpd-6 の結合により TLR7 のコンフォメーション・ダイナミクスが引き起こされ、活性化型二量体はその一状態であるという可能性を考えた。そこで、次に電子顕微鏡解析を行い TLR7 のコンフォメーション・ダイナミクスを捉えることにした。電子顕微鏡解析には、TLR7 タンパク質の二量体を安定化させるため、クロスリンクされた TLR7 の二量体サンプルを用いた。アゴニスト (Cpd-3) またはアンタゴニスト (Cpd-6, Cpd-7) を添加した状態または添加していない状態で、グルタルアルデヒドを用いクロスリンク反応を行い、共有結合で安定化された TLR7/Cpd-3、TLR7 (リガンドなし)、TLR7/Cpd-6 および TLR7/Cpd-7 複合体の二量体を調製した (図 58 および図 59)。最初に、負染色電子顕微鏡解析により上記の 4 種類の TLR7 二量体サンプルの性質を確認した (図 60)。その結果、TLR7 (リガンドなし) クロスリンク複合体では明確な二量体構造が見られず、非特異的にクロスリンクされた二量体の割合が高いと考えられた (図 60B)。TLR7/Cpd-3、TLR7/Cpd-6 および TLR7/Cpd-7 クロスリンク複合体では、明確な二量体構造が確認された。面白いことに、Cpd-6 および Cpd-7 の存在下では TLR7 の二量体が Cpd-3 存在下の二量体と比べて 2 つの TLR7 プロトマーがより開いているコンフォメーションが存在した (図 60C, D)。

次に、より高分解能で TLR7 のコンフォメーション・ダイナミクスを可視化するため、クライオ電子顕微鏡を用い、TLR7/Cpd-3、TLR7/Cpd-6 および TLR7/Cpd-7 複合体の構造解析を行った (2.2.7.1 項) (図 61、図 62、図 63 および表 8)。これらの 3 種類の複合体のクライオ電子顕微鏡解析では、粒子の配向バイアスの問題が深刻で、異方的な分解能になってしまったが、得られた 3 次元再構成密度マップでは、異なるリガンドによって形成される TLR7 の異なるコンフォメーションが明確に示された (図 64)。TLR7/Cpd-3 複合体のクライオ電子密度マップは、TLR7/Cpd-3 複合体の結晶構造とよく一致するクローズ型コンフォメーション (closed form) を形成していた (図 53 および図 64A)。驚くべきことに、TLR7/Cpd-6 複合体では 2 種類の異なる密度マップが再構築され、TLR7/Cpd-6 複合体の二量体には 2 種類のコンフォメーションがあることが示された (図 62 および図 64B)。1 つは、TLR7/Cpd-6 複合体の結晶構造でも観察されたクローズ型コンフォメーションであり (図 57)、もう 1 つは本研究で同定された、2 つの TLR7 プロトマーがリング構造の下部で互いに離れているオープン型コンフォメーション (open form) であった。Cpd-7 は、TLR7 のオープン型コンフォメーションのみを誘導し、これは TLR7/Cpd-6 複合体で観察されたオープン型コンフォメーションとよく一致した (図 63 および図 64C)。クライオ電子顕微鏡解析により、アンタゴニストの Cpd-6 および Cpd-7 によって引き起こされる TLR7 のコンフォメーション・ダイナミクスを可視化することに成功した。

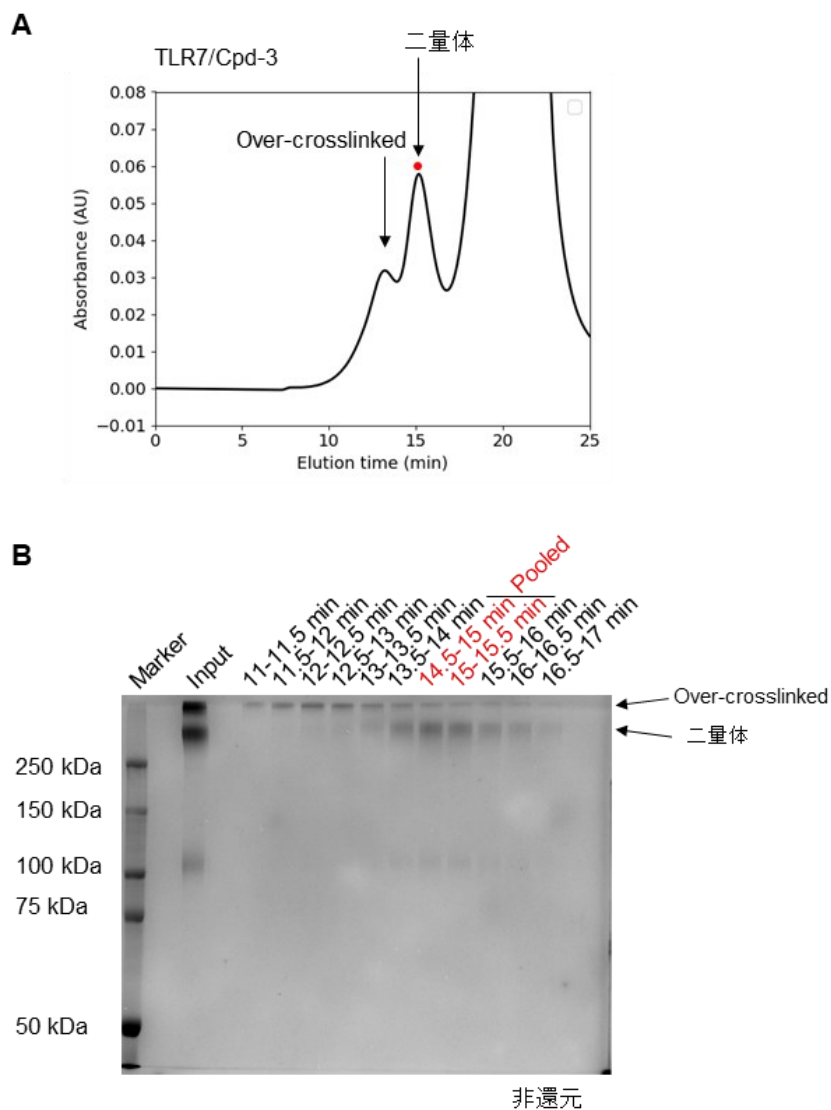


図 58. TLR7/Cpd-3 複合体の調製

- (A) ゲルろ過クロマトグラフィーによるクロスリンクされた TLR7/Cpd-3 複合体の精製; A_{280} を実線で示した。赤い点は、回収されたピークを示した。
- (B) 非還元性 SDS-PAGE によるゲルろ過クロマトグラフィー精製の各画分の分析; 回収された画分を赤字で示した。

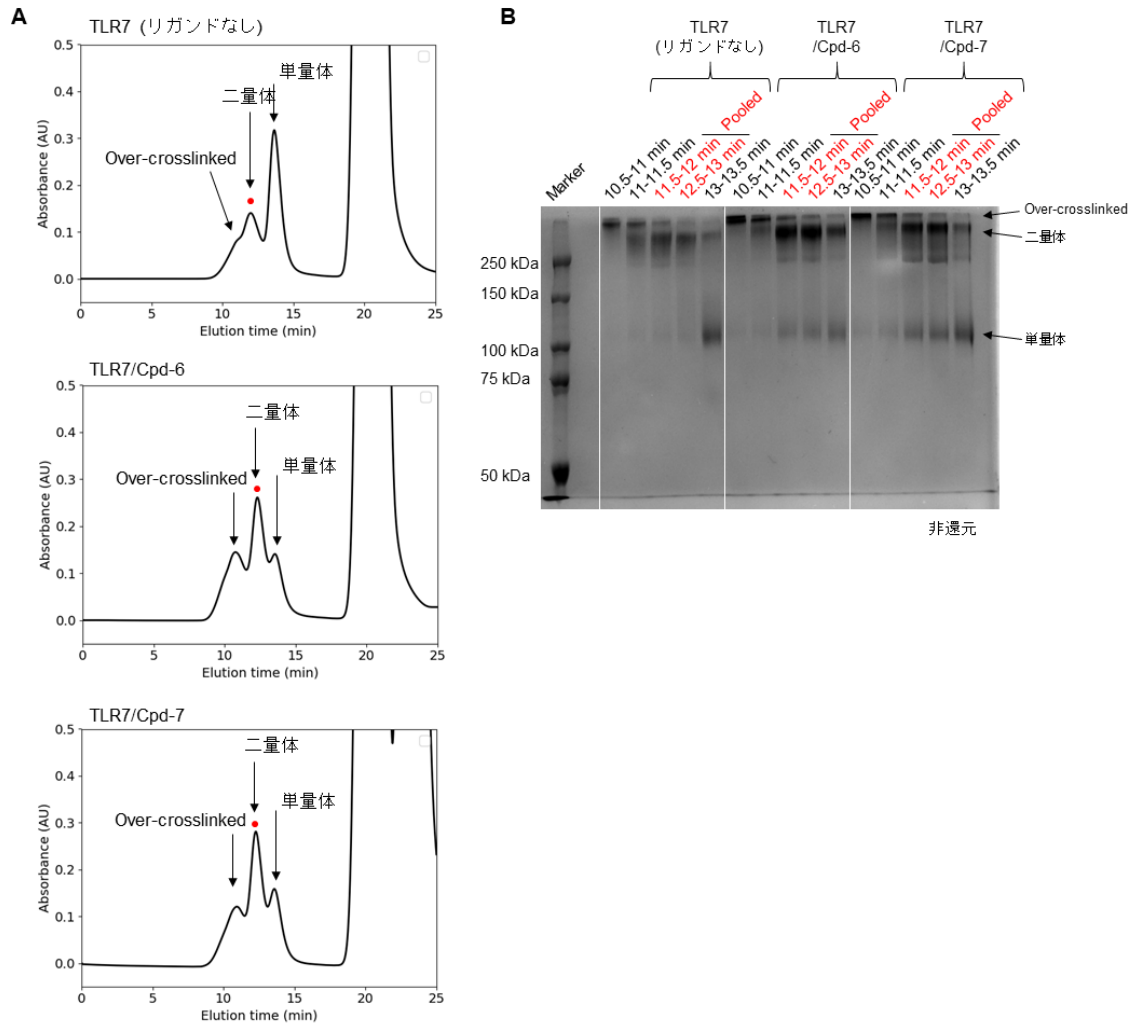
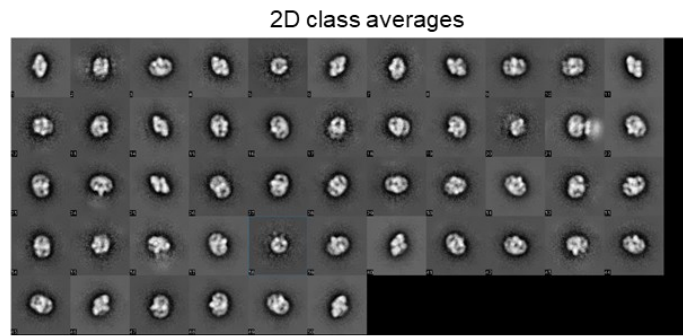
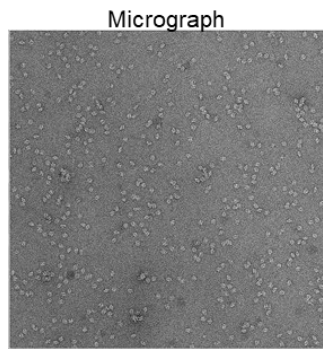


図 59. TLR7 (リガンドなし)、TLR7/Cpd-6 および TLR7/Cpd-7 複合体の調製

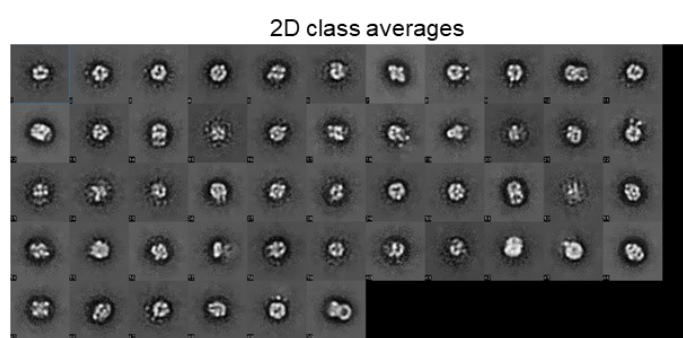
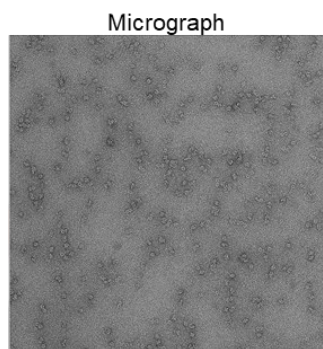
(A) ゲルろ過クロマトグラフィーによるクロスリンクされた TLR7 (リガンドなし)、TLR7/Cpd-6 および TLR7/Cpd-7 複合体の精製; A₂₈₀ を実線で示した。赤い点は、回収されたピークを示した。

(B) 非還元性 SDS-PAGE によるゲルろ過クロマトグラフィー精製の各画分の分析; 回収された画分を赤字で示した。

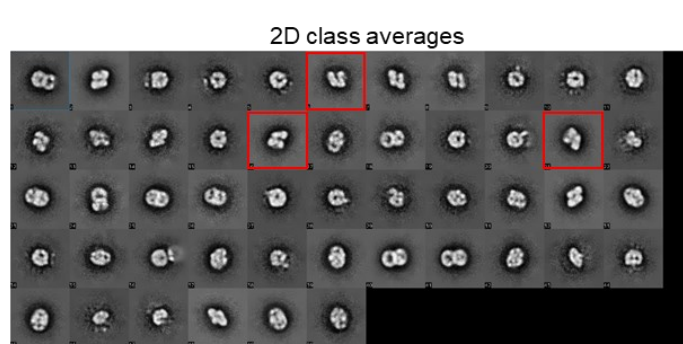
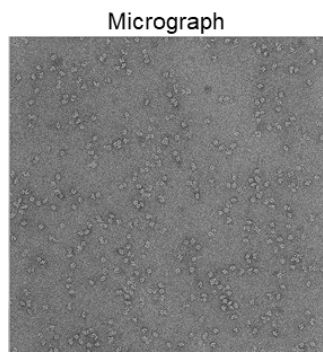
A. TLR7/Cpd-3複合体



B. TLR7 (no ligand) 複合体



C. TLR7/Cpd-6複合体



D. TLR7/Cpd-7複合体

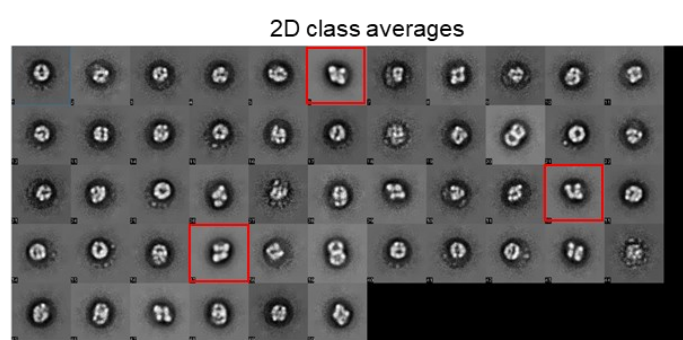
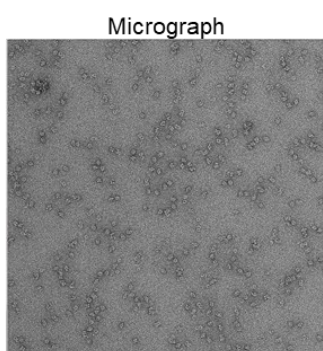
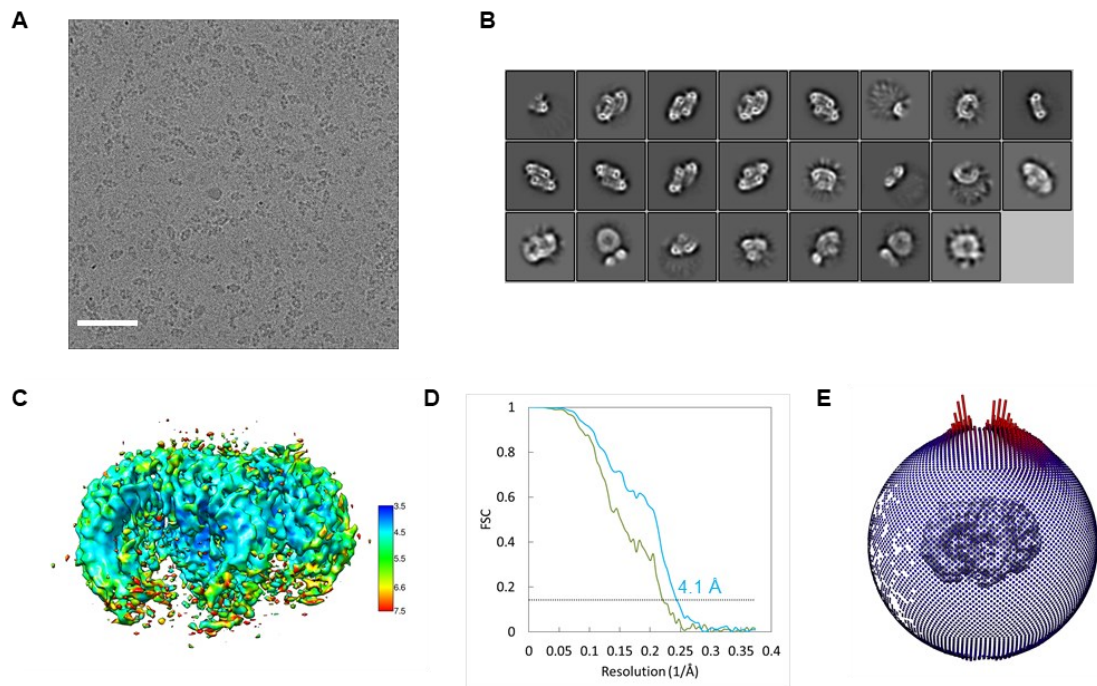


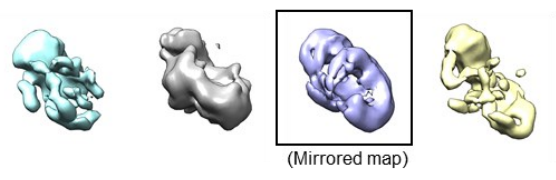
図 60. 負染色電子顕微鏡解析

(A-D) クロスリンクされた TLR7/Cpd-3、TLR7 (リガンドなし)、TLR7/Cpd-6 および TLR7/Cpd-7 複合体の負染色電顕解析; 各サンプルの代表的な電子顕微鏡像 (左) と 2 次元クラス平均像 (右) を示した。赤い四角は TLR7 のオープン型コンフォメーションの可能な例を示した



F

- 940 movie stacks (pixel size = 0.67 Å)
- ↓ Motion correction
- ↓ CTF estimation
- 849 movie stacks
- ↓ Autopick
- 436,505 particles
- ↓ 2D classification
- 264,837 particles
- ↓ 3D classification



123,273 particles
↓ 3D classification



52,612 particles
↓ 3D refinement (C2 symmetry)

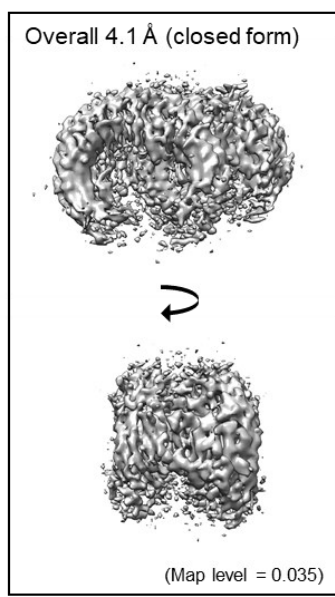


図 61. TLR7/Cpd-3 複合体のクライオ電顕データ解析 (Glacios)

(A) Glacios 電子顕微鏡で撮影した代表的な電子顕微鏡像 (スケールバー, 50 nm)

(B) 2次元クラス平均像

(C) TLR7/Cpd-3 複合体のクライオ電顕密度マップ; 密度マップは局所分解能により着色された。

(D) 最終的な 3D 再構成密度マップの gold-standard FSC 曲線 (分解能カットオフ, FSC = 0.143); 緑と青の線はそれぞれ、マスクされていない密度マップとマスクされた密度マップの FSC 曲線を示した。

(E) 最終的な 3D 再構成に使用した粒子の配向分布のプロット

(F) データ解析の手順

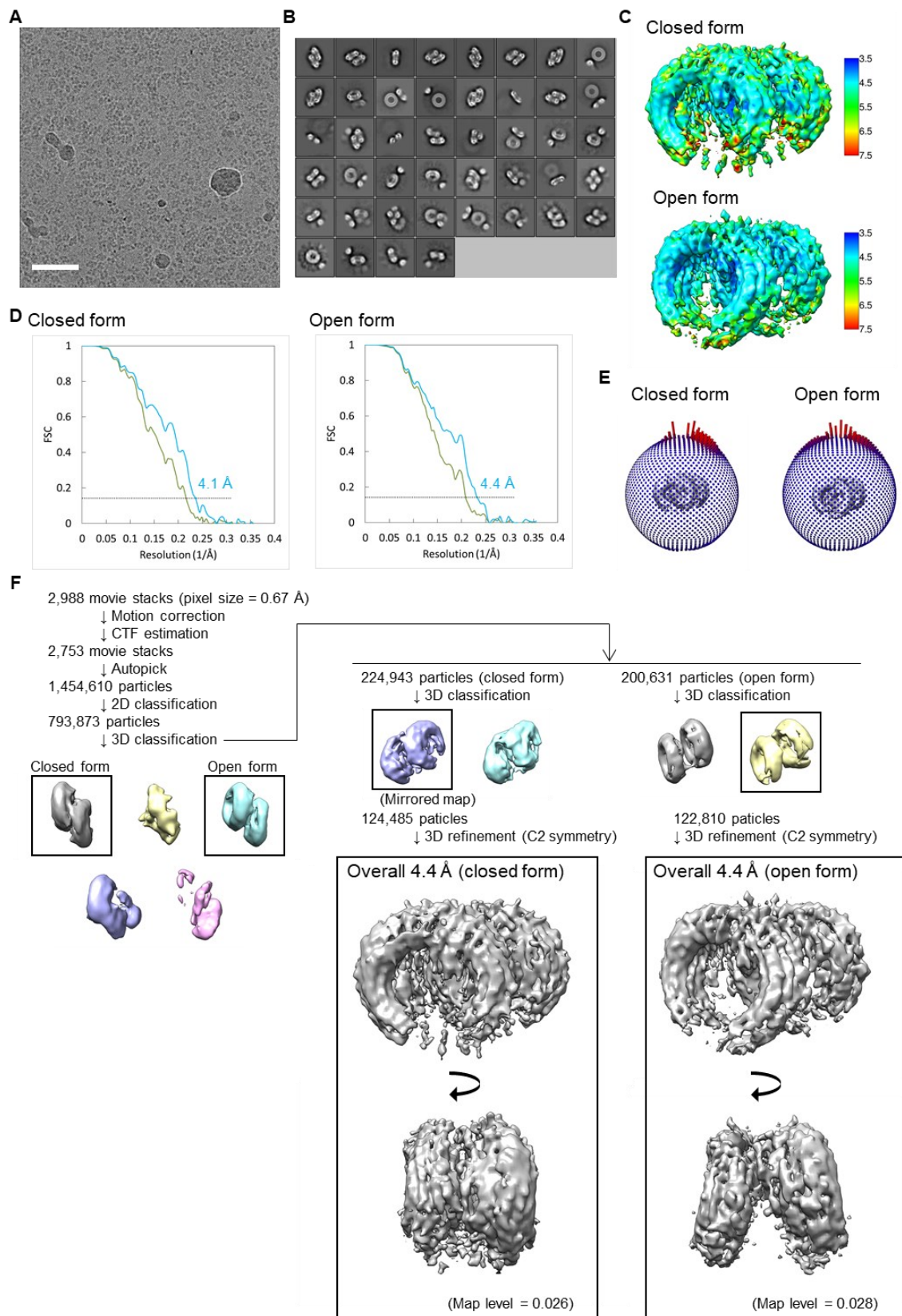


図 62. TLR7/Cpd-6 複合体のクライオ電顕データ解析 (Glacios)

(A) Glacios 電子顕微鏡で撮影した代表的な電子顕微鏡像 (スケールバー, 50 nm)

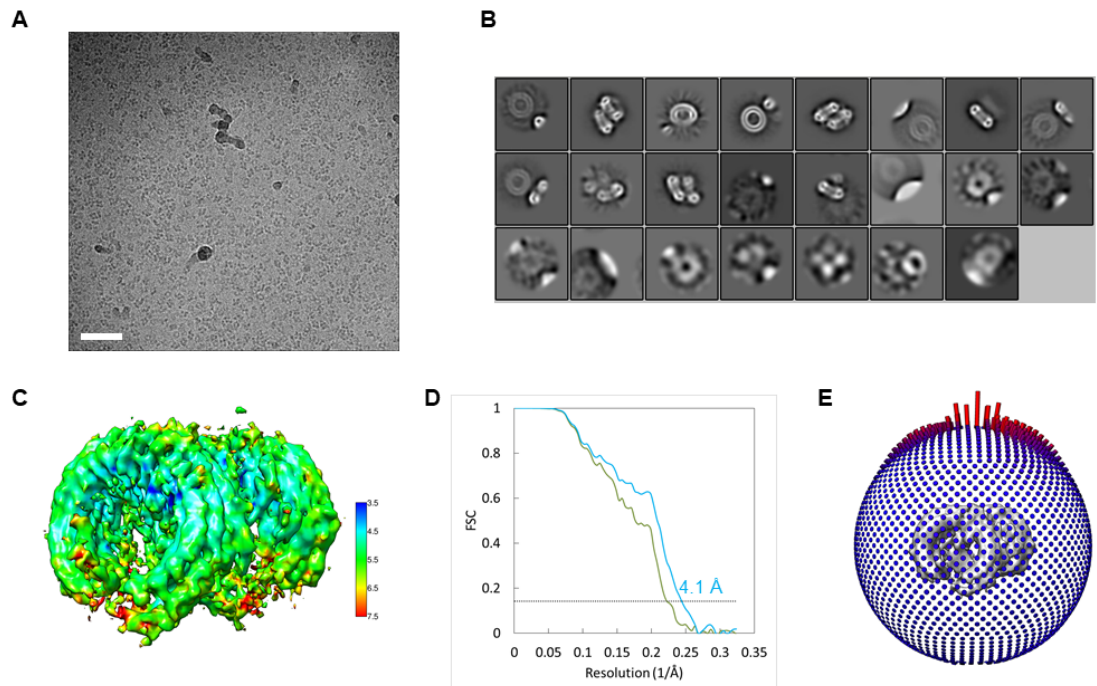
(B) 2次元クラス平均像

(C) TLR7/Cpd-6 複合体のクライオ電顕密度マップ; 密度マップは局所分解能により着色された。

(D) 最終的な 3D 再構成密度マップの gold-standard FSC 曲線 (分解能カットオフ, FSC = 0.143); 緑と青の線はそれぞれ、マスクされていない密度マップとマスクされた密度マップの FSC 曲線を示した。

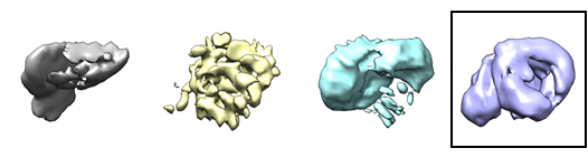
(E) 最終的な 3D 再構成に使用した粒子の配向分布のプロット

(F) データ解析の手順

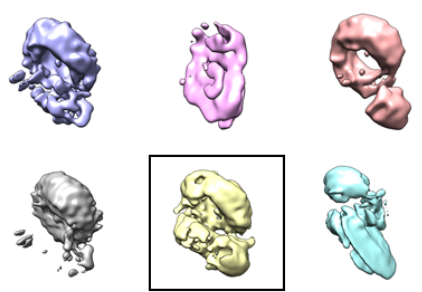


F

2,547 movie stacks (pixel size = 1.03 Å)
 ↓ Motion correction
 ↓ CTF estimation
 2,293 movie stacks
 ↓ Autopick
 2,174,366 particles
 ↓ 2D classification
 1,855,038 particles
 ↓ 3D classification



1,246,938 particles
 ↓ 3D classification



330,327 particles
 ↓ 3D refinement (C2 symmetry)

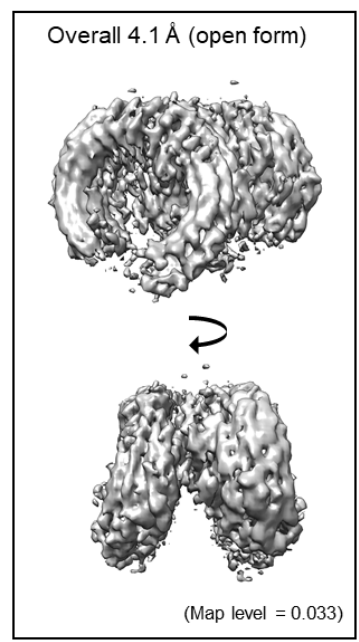


図 63. TLR7/Cpd-7 複合体のクライオ電顕データ解析 (Talos Arctica)

(A) Talos Arctica 電子顕微鏡で撮影した代表的な電子顕微鏡像 (スケールバー, 50 nm)

(B) 2次元クラス平均像

(C) TLR7/Cpd-7 複合体のクライオ電顕密度マップ; 密度マップは局所分解能により着色された。

(D) 最終的な 3D 再構成密度マップの gold-standard FSC 曲線 (分解能カットオフ, FSC = 0.143); 緑と青の線はそれぞれ、マスクされていない密度マップとマスクされた密度マップの FSC 曲線を示した。

(E) 最終的な 3D 再構成に使用した粒子の配向分布のプロット

(F) データ解析の手順

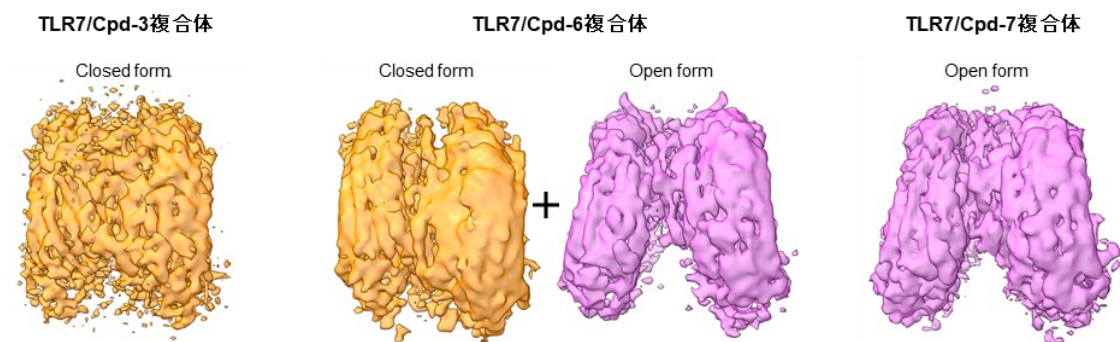


図 64. TLR7/Cpd-3、TLR7/Cpd-6 および TLR7/Cpd-7 複合体の密度マップ

200 kV クライオ電顕から得られた TLR7/Cpd-3、TLR7/Cpd-6 および TLR7/Cpd-7 複合体の密度マップ; TLR7 二量体のクローズ型およびオープン型コンフォメーションの密度マップをそれぞれオレンジとマゼンタで示した。

3.2.6. TLR7/Cpd7 複合体の高分解能クライオ電顕構造

Cpd-7 によって誘導される TLR7 のオープン型コンフォメーション構造でのリガンド認識の構造基盤を解明するため、TLR7/Cpd-7 複合体のクライオ電子顕微鏡構造を 2.8 Å 分解能で決定した (表 8)。3.2.5 項での 3 種類のクロスリンクされた TLR7 サンプルでは、粒子の配向バイアスの問題により良質な密度マップが得られず、構造モデルの構築が困難であった。そこで、試料に何らかの不均一性を持たせることで、粒子の配向バイアスの問題を改善できるのではないかと考え、切断されていない Protein A タグが付加したままの TLR7 タンパク質が一部混ざった試料を使用することにした (図 65)。その結果、粒子の配向分布が大

幅に改善され、高品質の密度マップが得られた (図 66)。この TLR7/Cpd-7 複合体は、グルタルアルデヒドを用いて共有結合で安定化されており、部分的に protein A タグも含まれていたが、グルタルアルデヒドとタグの密度は全く観察されなかった (図 66)。2.8 Å 分解能の密度マップに基づき、C2 対称の TLR7 二量体のオープン型コンフォメーション構造を構築することができた (図 67)。2 分子の Cpd-7 の密度が TLR7 の二量体界面に明確に観察された (図 68)。

オープン型とクローズ型のコンフォメーションでは、TLR7 の二量体化の界面が全く異なっていた (図 69)。2 つのプロトマーの C 末端間の距離は、オープン型コンフォメーションでは約 69 Å であり、クローズ型コンフォメーションでは約 36 Å であった (図 70A)。オープン型コンフォメーションの構造では C 末端の空間的に離れているため、下流の細胞内 TIR ドメインの二量体化により TLR7 を活性化することができず、結果的に阻害作用を示すと考えられる。

オープン型コンフォメーションの構造におけるアンタゴニスト結合部位は、クローズ型コンフォメーションの site 1 と空間的に近いが、それぞれのリガンド結合機構は大きく異なっていた (図 70B)。リガンド結合部位の片側はアゴニストとアンタゴニストの両方の結合に共通の残基を利用していたが、もう片側ではコンフォメーションの変化により全く異なる結合部位となっていた (図 69)。興味深いことに、これらのアンタゴニストはアゴニストに

基づいて開発されたが、アゴニストの認識における相互作用はオープンコンフォメーション構造におけるアンタゴニストの認識では保存されていなかった。Cpd-7 の認識は、主に疎水性残基との相互作用によって特徴づけられる (図 71)。6-メチルアデニン環と 8-フルオロピリジン部位は、F408、F506*、F507* (Cpd-7 の後方) と F349、F351、L353 (Cpd-7 の前方)、V381 (Cpd-7 の上部) で形成される結合チャンネルにスタッキングされていた。N1 原子は Q354 の主鎖と水素結合を形成していた。さらに、かさ高い 9 位の置換基は、Q323、F349、Y264、N265、F351、S530*、Y579* と広範囲に接触していた。以上のような TLR7 と Cpd-7 との複数の相互作用により、TLR7 二量体のオープンコンフォメーション構造が安定化され、安定した活性化型に変化できず阻害状態となると考えられる。

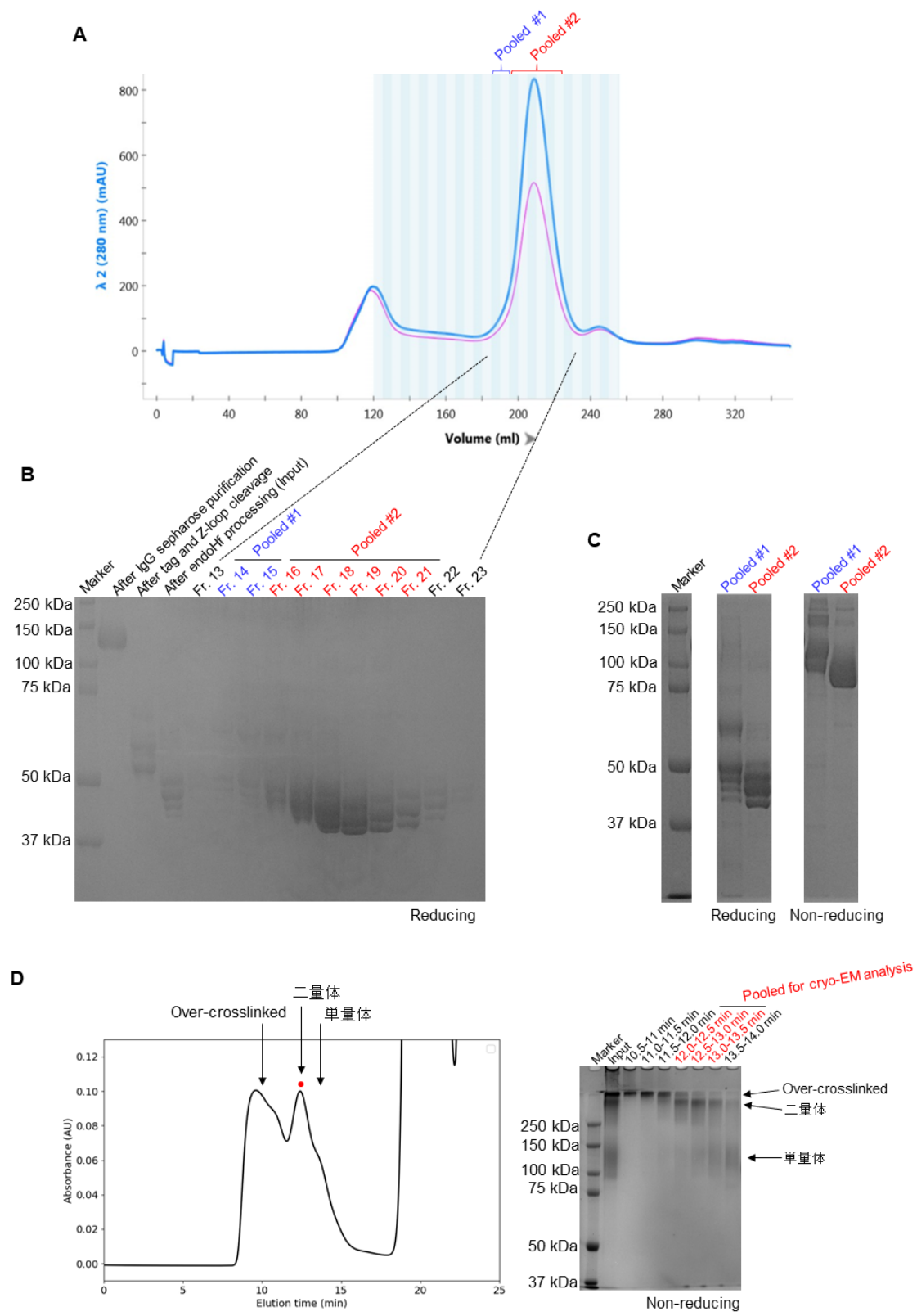
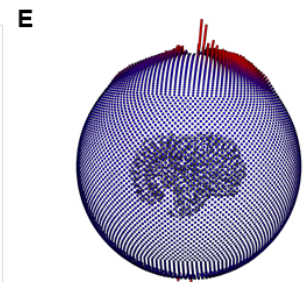
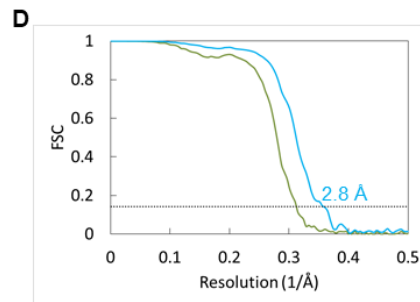
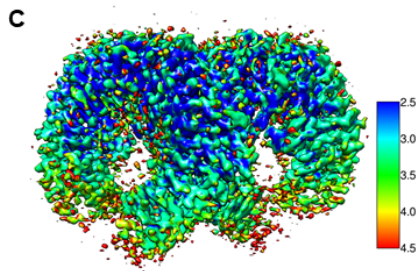
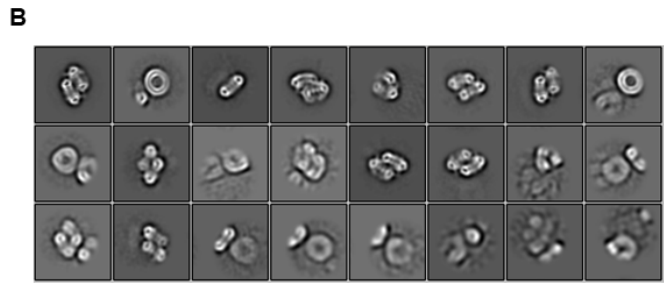
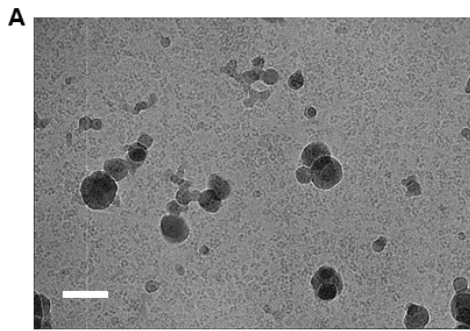


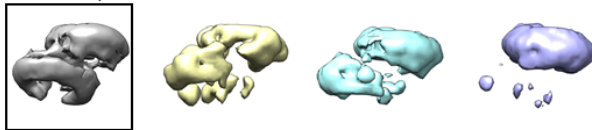
図 65. TLR7/Cpd-7 複合体の調製 (Titan Krios)

- (A) ゲルろ過クロマトグラフィーによる部分的に Protein A タグを含む TLR7 タンパク質 (糖鎖結合部位変異体かつ糖鎖切断) の調製; A_{280} と A_{260} をそれぞれ青と紫の線で示した。
- (B) 非還元性 SDS-PAGE によるゲルろ過クロマトグラフィー精製 (A) の各画分の分析
- (C) 還元性および非還元性 SDS-PAGE による 2 種類の精製サンプル (Pooled #1 および Pooled #2) の分析; Pooled#1 の精製サンプルを用いて TLR7/Cpd-7 複合体を調製した。
- (D) ゲルろ過クロマトグラフィーによるクロスリンクされた TLR7/Cpd-7 複合体の精製 (左); A_{280} を実線で示した。赤い点は、回収されたピークを示した。非還元性 SDS-PAGE によるゲルろ過クロマトグラフィー精製の各画分の分析 (右); 回収された画分を赤字で示した。この TLR7/Cpd-7 複合体サンプルを用いて Titan Krios での測定を行った。

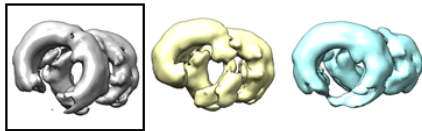


F

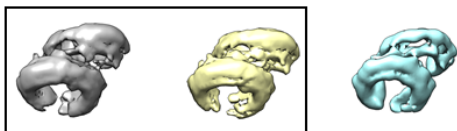
4,464 movie stacks (pixel size = 0.83 Å)
 ↓ Motion correction
 ↓ CTF estimation
 4,346 movie stacks
 ↓ Autopick
 4,150,564 particles
 ↓ 2D classification
 1,865,000 particles
 ↓ 3D classification



936,420 particles
 ↓ 3D classification



388,567 particles
 ↓ 3D classification



301,212 particles
 ↓ 3D refinement (C2 symmetry)

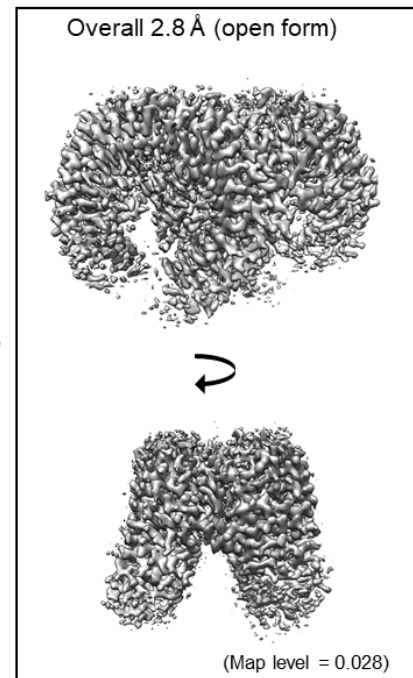


図 66. TLR7/Cpd-7 複合体のクライオ電顕データ解析 (Titan Krios)

- (A) Titan Krios 電子顕微鏡で撮影した代表的な電子顕微鏡像 (スケールバー, 50 nm)
- (B) 2 次元クラス平均像
- (C) TLR7/Cpd-7 複合体のクライオ電顕密度マップ; 密度マップは局所分解能により着色された。
- (D) 最終的な 3D 再構成密度マップの gold-standard FSC 曲線 (分解能カットオフ, FSC = 0.143); 緑と青の線はそれぞれ、マスクされていない密度マップとマスクされた密度マップの FSC 曲線を示した。
- (E) 最終的な 3D 再構成に使用した粒子の配向分布のプロット
- (F) データ解析の手順

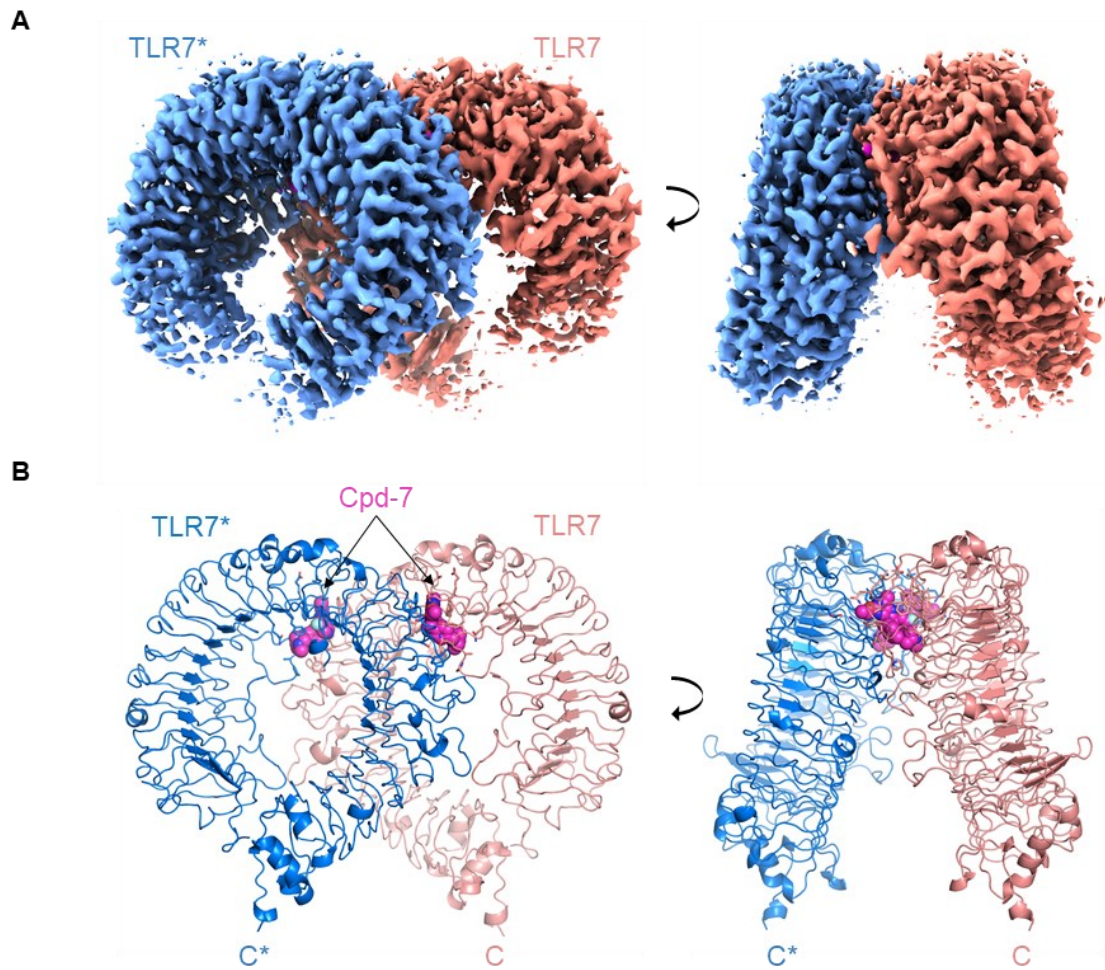
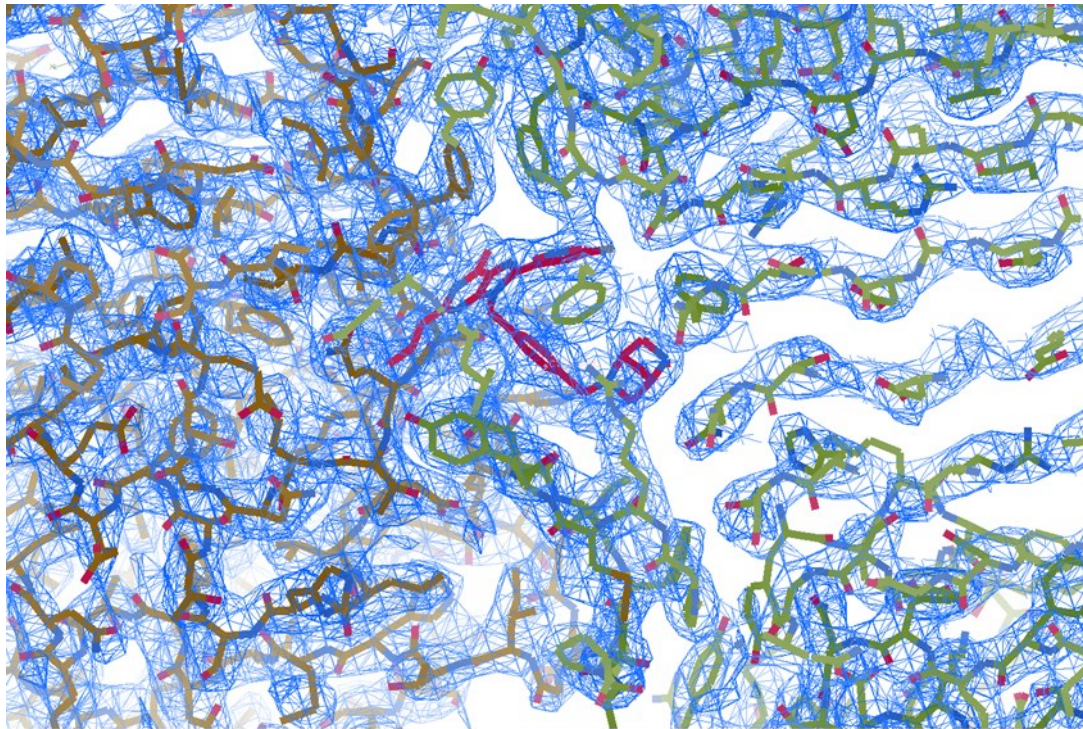


図 67. TLR7/Cpd-7 複合体のクライオ電顕構造

(A) Titan Krios 電子顕微鏡から得られた TLR7/Cpd-7 複合体の密度マップ; 2つの TLR7 プロトマーと Cpd-7 の周辺の密度はそれぞれアクアマリン、サーモン、マゼンタに着色した。

密度マップは 0.028 のレベルで表示した。

(B) TLR7/Cpd-7 複合体のクライオ電顕構造; TLR7 と Cpd-7 はそれぞれカートゥーンモデルと空間充填モデルで示した。



Map level = 5.0 σ

図 68. Cpd-7 周辺の密度マップ

Titan Krios 電子顕微鏡から得られた TLR7/Cpd-7 複合体の密度マップおよび TLR7/Cpd-7 複合体構造の拡大図; Cpd-7 結合部位周辺の密度マップを青色のメッシュ (マップレベル, 5.0 σ) で示した。2つの TLR7 プロトマーと Cpd-7 の C 原子は、それぞれ茶色、黄色とマゼンタに着色した。

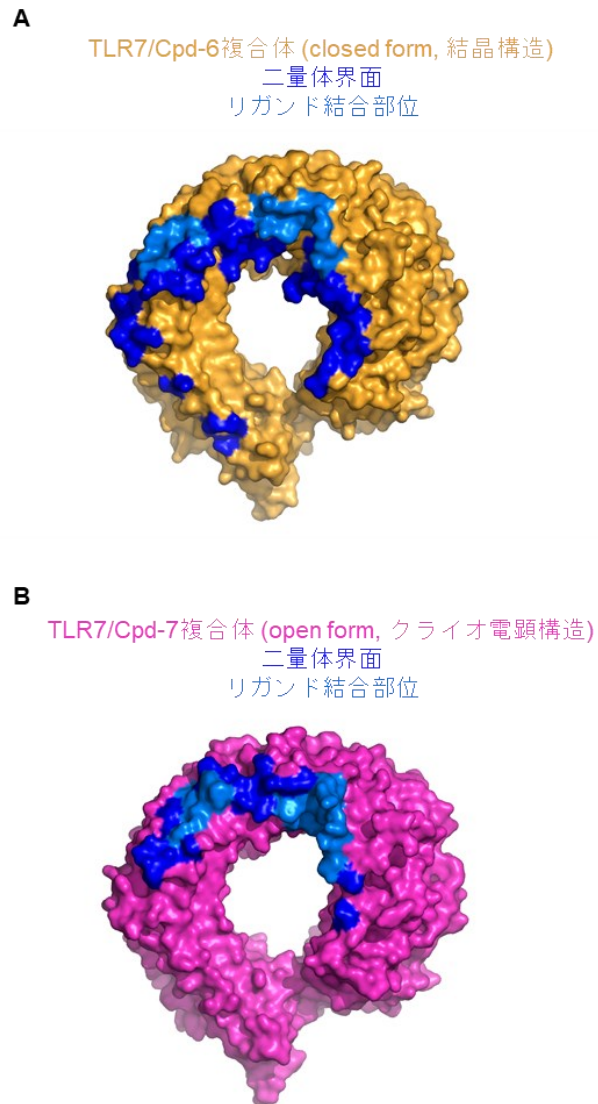


図 69. 2 種類のコンフォメーションにおける二量体界面とリガンド結合部位の比較

(A) クローズ型コンフォメーション構造 (TLR7/Cpd-6 複合体の結晶構造) における TLR7 プロトマーの表面図

(B) およびオープン型コンフォメーション構造 (TLR7/Cpd-7 複合体のクライオ電顕構造) における TLR7 プロトマーの表面図

二量体界面およびリガンド結合部位 (Cpd-6 または Cpd-7) の界面をそれぞれ濃紺および水色で表示した。

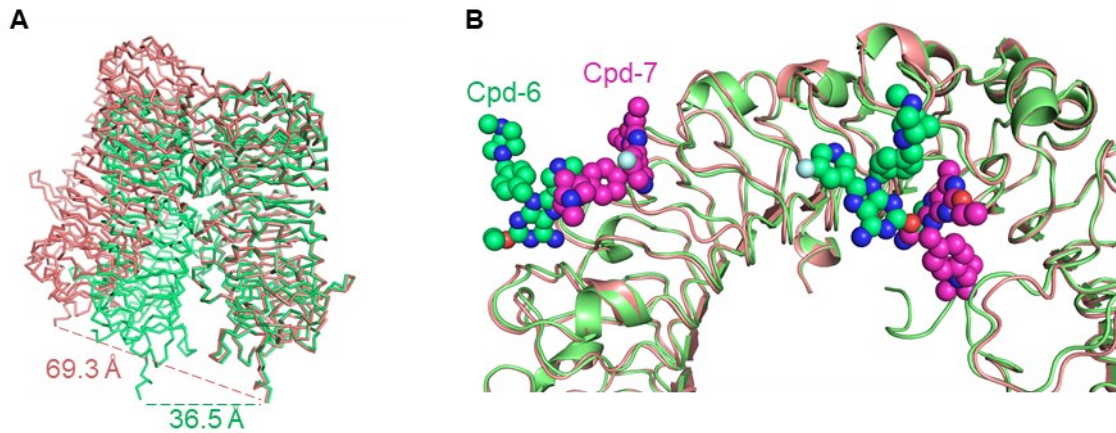


図 70.2 種類のコンフォメーションの比較

(A) TLR7 クローズ型コンフォメーション構造 (TLR7/Cpd-6 複合体の結晶構造) とオープン型コンフォメーション構造 (TLR7/Cpd-7 複合体のクライオ電顕構造) との比較; 2 つの構造の片側の TLR7 プロトマーを基準として重ね合わせた。TLR7 はリボンモデルで表示した。Cpd-6 および Cpd-7 は非表示にした。両構造の C 末端の 2 つの残基の C α 原子間の距離 (破線) を示した。

(B) クローズ型コンフォメーション構造に結合した Cpd-6 とオープン型コンフォメーション構造に結合 Cpd-7 との比較; 各構造の片方の TLR7 プロトマーをカートゥーンモデルで表示した。2 分子 Cpd-6 および Cpd-7 を空間充填モデルで示した。

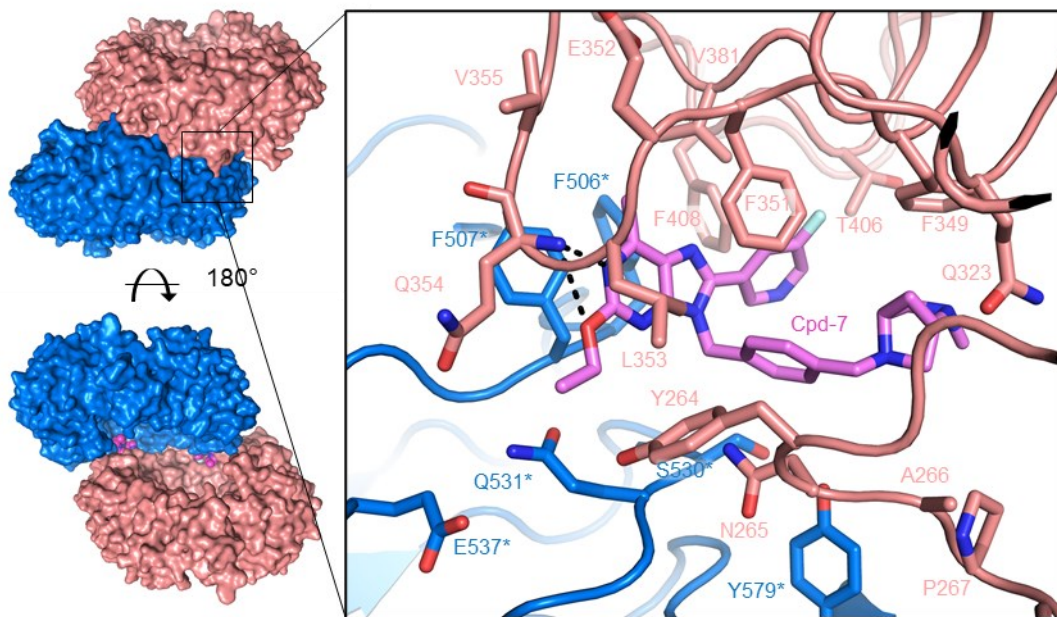


図 71. Cpd-7 の認識機構

TLR7/Cpd-7 複合体構造の上面図と下面図 (左) およびアンタゴニスト結合部位における Cpd-7 認識の拡大図 (右); 破線は水素結合を示した。

4. 考察

4.1 アゴニストによる TLR7 の活性化機構

4.1.1. TLR7 サブファミリーの Z-loop プロセッシングの意義

TLR7 サブファミリーのメンバーは、エンドソーム/エンドライソソームにおける Z-loop のプロセッシングが活性化に重要であることが知られている (Ewald et al., 2011; Ewald et al., 2008; Hipp et al., 2013; Ishii et al., 2014; Kanno et al., 2013; Ohto et al., 2015; Sepulveda et al., 2009; Tanji et al., 2016)。TLR8 に関して、Z-loop 未切断体を用いて構造解析した結果、未切断の Z-loop が活性化型二量体界面側を横切っており、そのため未切断体の Z-loop は立体障害により二量体化を阻害していることが示されている (図 5B) (Tanji et al., 2016)。実際に、TLR8 または TLR9 において、Z-loop 未切断体は ssRNA や CpG DNA への結合能は有するが二量体化しないことが示されている (Ohto et al., 2015; Tanji et al., 2016)。TLR7 に関しても、同様の機構で Z-loop 未切断体は二量体化しないことが予想される。

興味深いことに、今回の構造解析の結果、TLR7 の Z-loop は ssRNA 認識を行う site 2 の形成に重要な役割を果たしていた。先行研究において、マウス TLR7 の Z-loop の正確な切断部位は L460 または E461 (サル TLR7 の L460 または E461 に対応する) の後であり、生成された N 末端側部分が、C98-C475 ジスルフィド結合を介して C 末端側部分と結合したままであることが示されている (Kanno et al., 2013)。一方、今回の研究で使用されたサル

TLR7 精製タンパク質はアミノ酸残基 443 の後で人為的に切断されたものであるが (図 8)、得られた N 末端側部分と C 末端側部分が C98-C475 ジスルフィド結合および他の相互作用によって結合したままであり、実際にリガンド結合能やリガンド依存的な二量体化能を有していた。したがって、Z-loop の正確な切断部位は重要ではないと考えられる。そして、今回の構造解析および変異体解析の結果によって、この TLR7 におけるユニークな C98-C475 ジスルフィド結合が site 2 の形成および ssRNA の認識に極めて重要であることが明らかになった (図 40)。

本研究は TLR7 サブファミリーメンバーの Z-loop の類似点および相違点を明らかにした。

切断後の Z-loop の構造は、TLR7、TLR8 及び TLR9 の間で完全に異なっていた (図 30)。

TLR9 の Z-loop は、C 末端部分の凹面に位置し、リガンド認識には関与していない (Ohto

et al., 2015)。TLR7 および TLR8 の Z-loop は、いずれも N 末端側部分の凹面と相互作用し

てオーダーしており、ssRNA 認識に関与していた。しかし、両者の Z-loop のペプチド鎖の

配向は逆方向であり、Z-loop によって形成される ssRNA 結合部位 (site 2) は全く異なっ

ていた (図 29A および図 30) (Tanji et al., 2013; Tanji et al., 2015; Zhang et al., 2016)。

4.1.2. TLR7、TLR8 と TLR9 の比較

病原体に由来する核酸が免疫を活性化させること、そして、TLR7、TLR8、TLR9 がその認

識に重要な役割を果たすことが報告されて以来、十数年にわたり、この TLR7 サブファミリーに関して数多くの研究がなされてきた。本研究グループによるこれまでの TLR8 (Tanji et al., 2013; Tanji et al., 2015) および TLR9 (Ohto et al., 2018; Ohto et al., 2015) の結晶構造解析に加え、さらに TLR7 の結晶構造解析に成功したことで(Zhang et al., 2016; Zhang et al., 2018)、このサブファミリーによる一本鎖核酸の認識機構の全貌が明らかになってきた。TLR7、TLR8、TLR9 の活性化型二量体構造を重ねて比較したところ (図 29)、3 つの構造は類似した二量体配置を形成していた。一方で、リガンド認識に関しては類似点と相違点が認められた。TLR8 のリガンド非結合型は **preformed** 二量体構造を形成し、アゴニストの結合によって、活性型二量体に再構成する (Tanji et al., 2013)。この現象は TLR7 の精製タンパク質には見られず、TLR7 のリガンド非結合型は単量体であった (3.1.1.1 項)。TLR7 と TLR8 は、保存された部位 (**site 1**) で低分子アゴニストを認識する。しかし、両者の **ssRNA** 結合部位 (**site 2**) は全く異なる特徴を有していた。TLR7 の **site 2** は二量体界面に隣接し連続した **uridine** 塩基を含む **ssRNA** を認識する。一方、TLR8 の **site 2** は二量体界面から完全に離れていた (図 29)。また、TLR7 の **site 2** に結合した **ssRNA** の位置は、TLR9 活性化型二量体中の **CpG-DNA** の位置と部分的に重なっていた (図 29)。ただし、両者の間で核酸の認識機構に類似点は認められなかった。

本研究では、TLR7 がヌクレオシドの中で **guanosine** を特異的に認識することを明らかにし

た (3.1.2.3 項)。ピリミジンヌクレオシド (cytidine、thymidine および uridine) の場合、分子サイズが guanosine より小さいため、guanosine に適したサイズの TLR7 の site 1 にうまく結合できないことが予想される。Adenosine の場合、2-アミノ基を欠くため、認識に重要である D555* との水素結合が形成できないため、親和性が弱いことが予想される。ヒト TLR7 とヒト TLR8 の間で site 1 のアミノ酸残基は高度に保存されており (43% の一致度、72% の類似性) (図 31)、両者とも R848 および gardiquimod などのイミダゾキノリン誘導体を認識する (Hemmi et al., 2002; Tanji et al., 2013; Zhang et al., 2016; Zhang et al., 2018)。一方で、TLR7 と TLR8 はそれぞれ guanosine と uridine ヌクレオシドを特異的に認識する (Tanji et al., 2015; Zhang et al., 2016)。両者のヌクレオシドの認識様式は非常に類似しているが、site 1 ポケットの入口 (ヒト・サル TLR7 の L557、ヒト TLR8 の D545) の静電ポテンシャル、および結合ポケットのサイズが異なっている (図 72)。これらの差異によりヌクレオシド認識の特異性が生み出されていると考えられるが、さらなる研究が必要となるだろう。

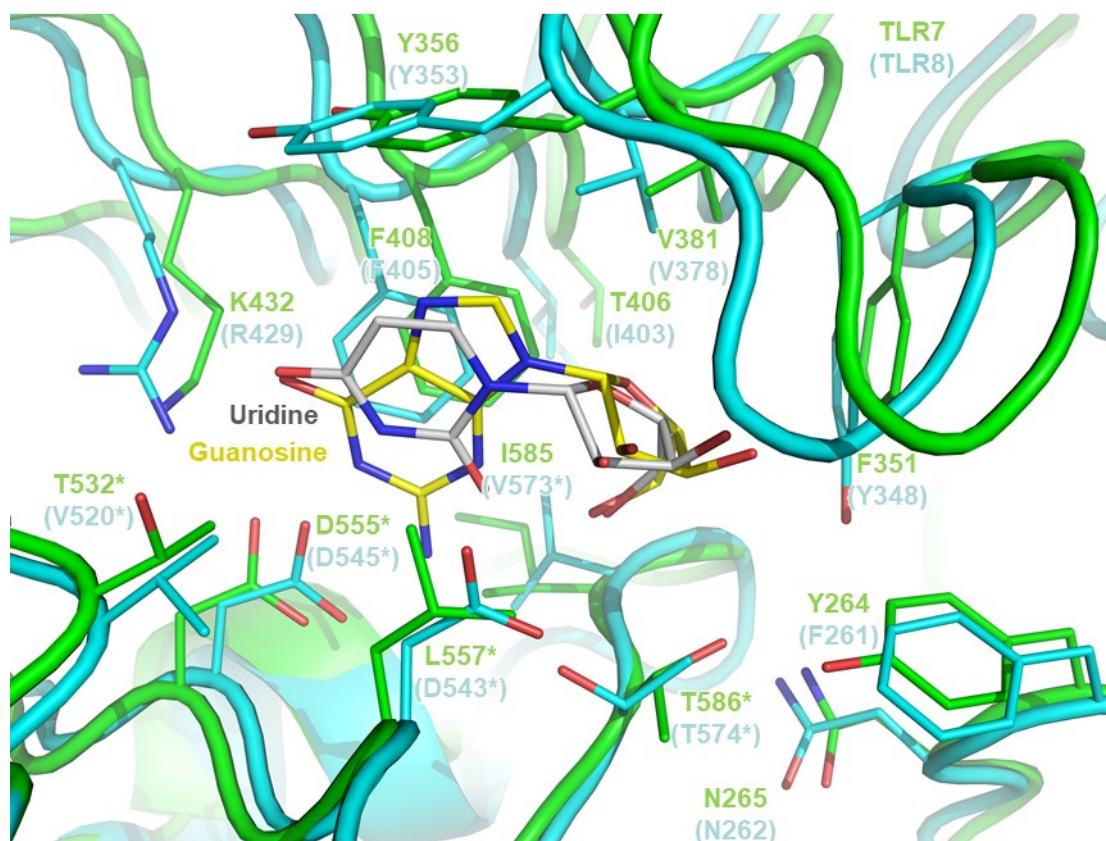


図 72. TLR7 の guanosine の認識様式と TLR8 の uridine の認識様式との比較

TLR7/G/polyU 複合体の site 1 と TLR8/ssRNA 複合体 (PDB: 4R07) の site 1 の重ね合わせ; TLR7 の site 1 を形成する残基 (緑色) はラベルされており、括弧内は TLR8 における対応する残基 (水色) である。

4.1.3. TLR7 の ssRNA 認識の配列特異性

TLR7 の ssRNA 認識の配列特異性は広く研究されていたが、これまで決定的な結論が得られていなかった (Diebold *et al.*, 2004; Diebold *et al.*, 2006; Heil *et al.*, 2004; Hornung *et al.*, 2005)。本研究では、TLR7 の精製タンパク質を用いた ITC 実験により、非末端 uridine 塩基

を含む ssRNA が site 2 への結合に必須であることを示した (図 37)。結合に必要な ssRNA の長さに関して、3mer の UUU を使用した場合においてもシナジー効果が観察された (図 20D および表 3D)。構造解析の結果と生化学実験の結果を総合的に考えると、3mer より長く、非末端位置に uridine 塩基を含む ssRNA が TLR7 を活性化する可能性がある結論付けた。さらに、13 種類の TLR7/IMDQ/ssRNA の結晶構造解析、ITC 分析および NF- κ B レポーターアッセイの結果により、TLR7 の詳細な ssRNA 認識の配列特異性を見出した: UU(U/C) モチーフは TLR7 の site 2 に完全に結合し、次いで UU(G/A) モチーフ (中程度の結合)、XUX (X は A、G、C のいずれかを表す) モチーフ (弱い結合または結合なし) が続いた (図 48)。つまり、TLR7 は連続した uridine 塩基を持つ ssRNA を優先的に認識する。SLE の自己抗原として知られる Ro60 は、U-rich 配列を持つレトロウイルス由来の RNA と複合体を形成する。この免疫複合体が TLR7 を活性化させることが示唆されている (Hung et al., 2015)。また、GUCCUUCAA 配列を持つある種の siRNA が樹状細胞における IFN-I の産生を強く誘導すると報告されている (Hornung et al., 2005)。興味深いことに、いずれの RNA も UUX モチーフを有している。一方、注意すべきことに、いくつかの 1U-RNA は TLR7 活性のレポーターアッセイにおいてもある程度 TLR7 を活性化させた (図 47)。一般的に、病原体において XUX モチーフは UUX モチーフよりも数が多いため (例えば、1 本の HIV-1 の ssRNA [GenBank:AF033819.3] には、XUX モチーフが約 2,000 コピー、UUX モチーフ

が約 500 コピー含まれている)、XUX モチーフも特定の条件下で TLR7 の活性化に寄与していると考えられる。本研究の結果は、TLR7 の活性化の詳細な理解や、免疫原性のより低い siRNA、mRNA ワクチン、CRISPR 関連システムの治療用 RNA の設計のための構造基盤を提供する。

4.1.4. TLR7 の低分子アゴニスト認識機構

本研究では、TLR7 がヌクレオチドの中で guanosine を特異的に認識することを明らかにした (3.1.2.3 項)。エンドソームにおける guanosine は ssRNA の分解物であると考えられる。また、TLR7 は deoxyguanosine、8-hydroxydeoxyguanosine、7-thia-8-oxoguanosine および loxoribine などの guanosine 類似物によっても活性化される (Lee et al., 2003; Shibata et al., 2016)。TLR7/Loxo/polyU 複合体の構造から、loxoribine が guanosine とほぼ同様の結合様式で TLR7 に結合することが明らかになった (図 33)。したがって、guanosine のグアニン基の N7 および C8 への置換基の付加は TLR7 に許容され、実際、loxoribine は guanosine よりも高い結合親和性を持っていた (図 20A および表 3A)。また、2'-deoxyguanosine は guanosine と同程度の親和性を示すと報告されている (Shibata et al., 2016)。TLR7/G/polyU 複合体構造では、guanosine のリボース特異的 2'-OH 基は TLR7 といかなる特異的相互作用も形成していなかった (図 28B および図 33A)。このため、2'-deoxyguanosine は guanosine

と同程度の親和性を持つものと考えられる。TLR7 は、RNA 由来の **guanosine** に限らず、DNA 由来の **2'-deoxyguanosine** や DNA が損傷されることで生成する **8-hydroxydeoxyguanosine** などの **guanosine** 類似物によっても活性化される (Shibata et al., 2016)。したがって、TLR7 は単に **ssRNA** の受容体だけではなく、免疫システムにおいてさらなる複雑な機能を持っていると考えられる。

IQD は古典的な TLR7 アゴニストとして知られている (Hemmi et al., 2002)。この研究では、IQD の R₀、R₁ および R₂ を介した 4 種類の相互作用が、IQD 間で保存されていることが明らかになった (図 50D)。興味深いことに、**imiquimod** は HPV やがんの治療に使用されている、現在のところ唯一の TLR7 を標的とした治療薬であるが (Edwards et al., 1998; Geisse et al., 2004)、今回の研究では、IQD の中で TLR7 に対する親和性が最も弱いことがわかった (図 51)。TLR7/**imiquimod** 複合体の結晶構造により、**imiquimod** が他の IQD と同様の様式で TLR7 と結合することを構造的に示したが、R₁ 部分を欠くため R₁ 部分を介した TLR7 の **site 1** の疎水性ポケットとの疎水性相互作用を形成しなかった。これが **imiquimod** の極めて弱い TLR7 活性の理由であると考えられる (Mark et al., 2014)。また、最近の研究では **imiquimod** が間接的に NLRP3 を活性化することが示されている (Groß et al., 2016)。したがって、今後 **imiquimod** の抗ウイルスおよび抗がんの治療効果の分子機構をさらに精査する必要がある。同様に、R848 などの IQD は **guanosine** より強い結合親和性を示した (図

20A および図 51)。IQD の認識様式は **guanosine** と似ているが、**guanosine** も TLR7 の site 1 の疎水性ポケットと相互作用を形成していなかった (図 28B)。この部位での相互作用の違いにより TLR7 の低分子アゴニストの親和性が大きく異なっている。本研究で示した様々な TLR7 低分子アゴニスト認識の詳細な構造基盤により、さらなる有効な TLR7 低分子アゴニストの開発が期待される。

4.1.5. TLR7 の活性化機構

Guanosine 単独では、細胞レベルのアッセイにおいて TLR7 を効果的に活性化することができないことが報告されている (Heil et al., 2004; Lee et al., 2003; Shibata et al., 2016)。これには TLR7 に対する **guanosine** の結合親和性が R848 の結合親和性よりも遥かに低いことが原因として考えられる。したがって、生体内では **guanosine** を効率的に認識するために、**ssRNA** のシナジー効果が不可欠である。**Guanosine** の TLR7 との結合は、**polyU** の存在下で約 10 倍に上昇され (K_d 値は約 1.0 μM)、R848 と同程度の親和性を示した (図 20B および表 3B)。**Loxoribine** や R848 など低分子アゴニストについても同様のシナジー効果が見られた。一方、**ssRNA** と TLR7 との親和性は非常に強い ($K_d = 0.08\sim 0.37 \mu\text{M}$) (図 20C および表 3C) が、単独では TLR7 の活性化型二量体を誘導しない (3.1.1.4 項参照)。したがって、生体内では TLR7 は高親和性の **ssRNA** を認識してから、**guanosine** を認識するものと

考えられる。

シナジー効果の構造的要因を以下で考察する。Z-loop は LRR2 および LRR5 の loop 領域と相互作用しており、それらの loop 領域は LRR18*~22* と相互作用することによって二量体形成に直接関与している (図 73)。また、Z-loop は site 1 の LRR8 および LRR11 とも疎水性相互作用を形成していた。したがって、ssRNA が site 2 に結合することによって Z-loop が安定化され、それによって site 1 や二量体形成に関与する loop 領域が二量体形成により適したコンフォメーションに安定化されることがシナジー効果の要因であると推測した。

本研究において行った結晶構造解析および様々な生化学実験の結果に基づいて、以下の TLR7 の活性化機構を提唱する (図 74)。ssRNA と guanosine などの天然アゴニストによる活性化の場合、まず TLR7 の site 2 に連続した uridine 塩基を持つ ssRNA が結合する。次に、シナジー効果によって、site 1 に guanosine が結合することで、TLR7 を活性化する (図 74A)。一方で、R848 など合成低分子アゴニストの場合、site 1 への結合が強いため、site 2 への ssRNA 結合を必要とせず、site 1 のみの結合で TLR7 を活性化する (図 74B)。

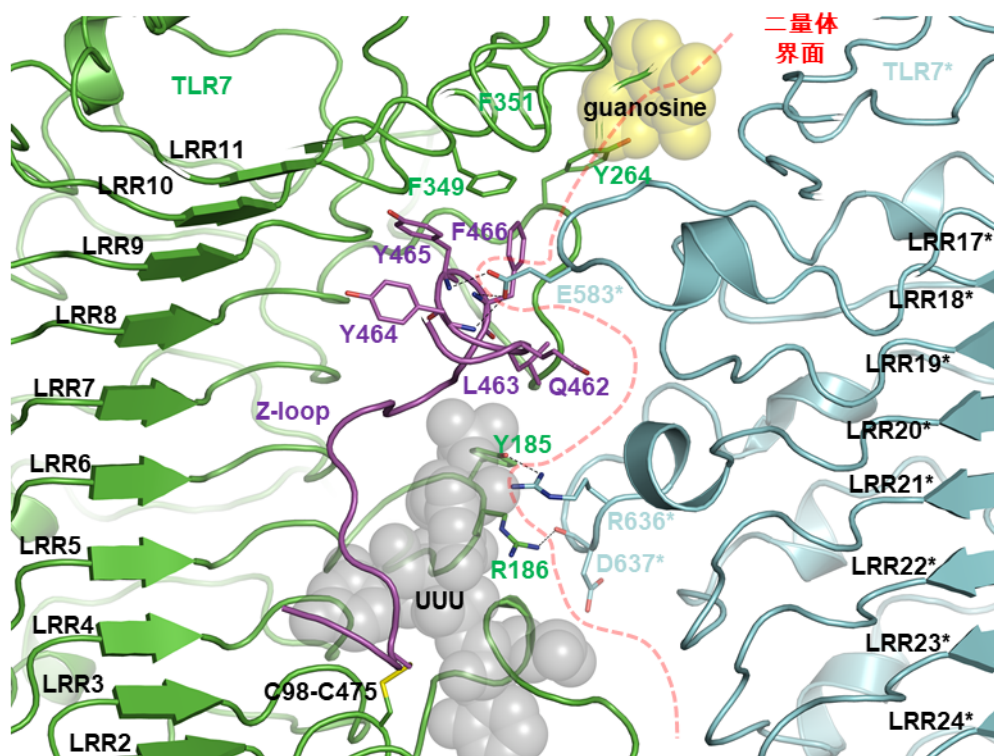
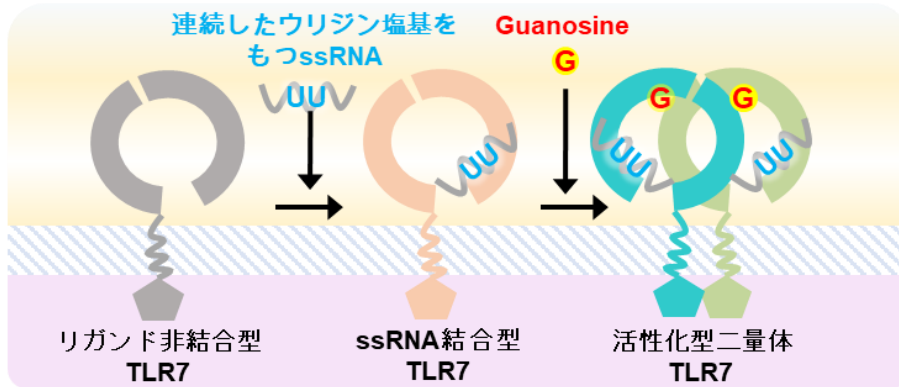


図 73. シナジー効果の構造的要因に関する考察

TLR7/G/polyU 複合体の site 2 の拡大図; 赤い破線は二量体界面を示した。Z-loop の Q462、L463、Y464、Y465 および F466 は TLR7 の site 1 の疎水性ポケットと相互作用を形成しており、site 1 を安定化させる役割を果たすと考えている。

A

天然アゴニスト (ssRNAと Guanosine) による活性化



B

合成低分子アゴニストによる活性化

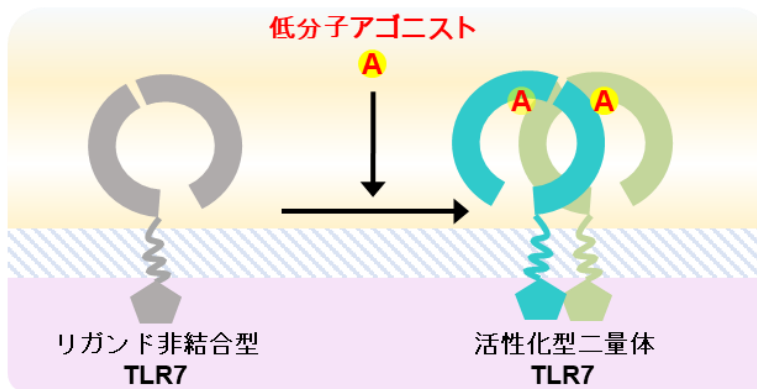


図 74. TLR7 の活性化機構

(A) 天然アゴニスト (Guanosine と ssRNA) による TLR7 活性化機構のモデル図

(B) 合成低分子アゴニストによる TLR7 活性化機構のモデル図

4.2 アンタゴニストによる TLR7 の阻害機構

4.2.1. アゴニストからアンタゴニストに変換する構造基盤

アゴニストからアンタゴニストへの変換は、8-OA 骨格の C8 位にかさ高い置換基を導入することで実現したと考えられる (図 6)。この修飾の効果は TLR7 のオープン型コンフォメーションへのシフトをもたらした。クローズ型コンフォメーションからオープン型コンフォメーションへのシフトは 2 つの異なる解釈が考えられる。1 つのシナリオでは、C8 位のかさ高い置換基が活性型二量体を不安定にさせる。もう 1 つのシナリオでは、アンタゴニストの結合部位との広範な接触が形成されることでオープン型コンフォメーションが安定化される。Cpd-6 は TLR7 のクローズ型とオープン型コンフォメーションの両方を引き起こすため、Cpd-6 の阻害作用はこの 2 つのコンフォメーションの間の平衡状態から生じると考えられる。8-OA 骨格の 6-アミノ基は、D555*側鎖と相互作用することで TLR7 の活性化に必要であるため、すべてのアゴニスト結合した TLR7 の活性化型二量体構造で観察されるように、Cpd-6 の 6-アミノ基を Cpd-7 の 6-メチル基で置換すると、Cpd-7 のクローズ型コンフォメーションへの結合が破壊された。その結果、平衡状態が主にオープン型コンフォメーションにシフトし、それによって Cpd-7 はより強力な TLR7 阻害活性が見られる (Tojo et al., 2020)。

4.2.2. TLR7 の阻害機構

TLR7/Cpd-6 複合体の結晶構造はクローズ型コンフォメーション構造をとっており、Cpd-6 は TLR7 のアゴニスト結合部位 (site 1) に結合していた (図 57)。この複合体結晶構造では TLR7 の阻害機構の解釈が困難であった。驚くべきことに、クライオ電子解析の結果、TLR7/Cpd-6 複合体はほぼ均等な割合でクローズ型とオープン型コンフォメーションの両方を形成していることが明らかになった (図 63)。一方、より強力なアンタゴニストである Cpd-7 は、主にオープン型コンフォメーションのみを誘導していた (図 64)。Cpd-6 によって誘導された TLR7 のクローズ型コンフォメーションはダイナミックな構造変化の一状態のため、シグナル伝達には十分ではないと推測している。また、TLR7 のオープン型コンフォメーション構造と TLR8 の非活性化型二量体構造 (PDB: 3W3G) と重ね合わせると、2 つの TLR7 プロトマーが TLR8 プロトマーよりも離れていることにより、この TLR7 オープン型コンフォメーション構造が非活性化状態、すなわち阻害状態である (図 75)。

本研究のクライオ電子顕微鏡解析と生化学実験の結果に基づいて、TLR7 リガンドの作用メカニズムを総括する (図 76)。Cpd-1、Cpd-2、Cpd-3 およびその他の既知の TLR7 低分子アゴニストは、主にクローズ型コンフォメーション構造を誘導し、TLR7 を活性化させる。アンタゴニストの Cpd-6 は、TLR7 のオープン型とクローズ型の間のコンフォメーション・ダイナミクスを誘導し、TLR7 の活性化を阻害する。より強力なアンタゴニストである Cpd-

7 は、主に TLR7 のオープン型コンフォメーション構造を誘導し、Cpd-6 よりも強い阻害効果を示す。

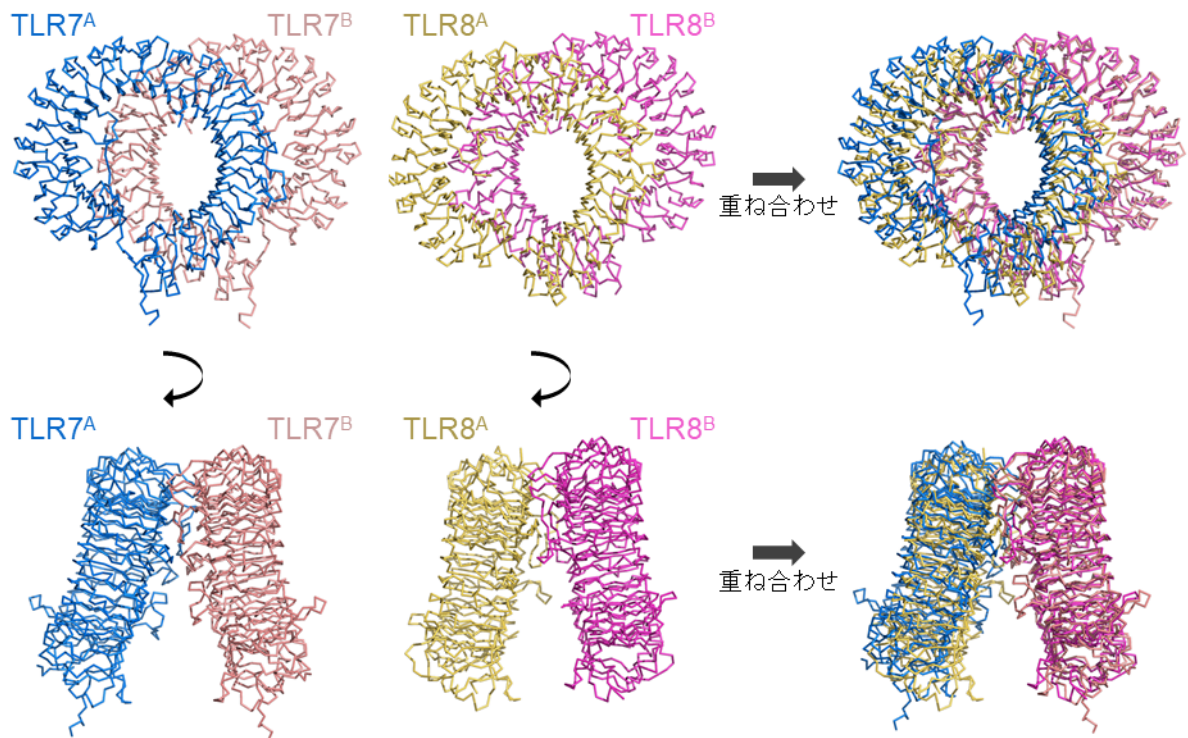


図 75. TLR7/Cpd-7 複合体構造と TLR8 非活性化型構造との比較

TLR7/Cpd-7 複合体のクライオ電顕構造 (左) と TLR8 リガンド非結合型の結晶構造 (非活性化型二量体) (PDB: 3W3G) (中) の正面図と側面図をリボンで表した。2つの構造は、それぞれのプロトマーBを参照して重ね合わせた。重ね合わせた構造を右に示した。TLR7^AのプロトマーはTLR8^Aのプロトマーに比べてよりプロトマーBから離れている。

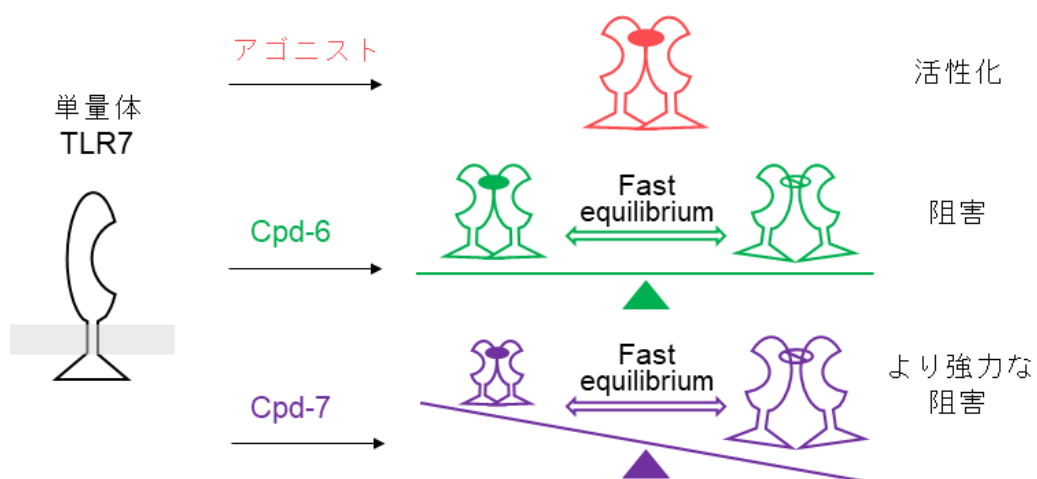


図 76. TLR7 の阻害機構

TLR7 のリガンド作用機構のモデル図; リガンド非結合型の TLR7 は単量体である。アゴニストは、TLR7 のクローズ型コンフォメーションを誘導し、TLR7 の活性化を引き起こす。Cpd-6 は、TLR7 のクローズ型とオープン型コンフォメーションの間のダイナミックスを誘導し、TLR7 の活性化を阻害する。Cpd-7 は、主に TLR7 のオープン型コンフォメーションを誘導し、Cpd-6 よりも強い阻害効果を持つ。

4.3 総論

TLR7は自然免疫における ssRNA の受容体として同定された。ssRNA 以外に、TLR7 は guanosine とその類似物および IQD などの合成低分子アゴニストにも活性化される。しかしながら、これまでにこれらのアゴニストの認識機構およびアゴニストによる活性化機構はほとんど不明のままであった。本研究では、X線結晶構造解析により種々の TLR7/アゴニストリガンド複合体構造を解明し、TLR7 が 2 つのリガンド結合部位 (site 1 および site 2) を有し、リガンド依存的に活性化型二量体を形成することを明らかにした。TLR7 の site 1 ではヌクレオシドの中で guanosine を優先的に認識し、site2 では連続した uridine 塩基を含む 3 塩基以上の長さの ssRNA を特異的に結合する。さらに、TLR7 は ssRNA と低分子アゴニストによるシナジー効果により効果的に活性化されることを明らかにした。また、site 1 における一連の合成低分子アゴニストの詳細な認識機構も明らかにした。本研究では構造生物学的および生化学的研究を行い、生体内では TLR7 が guanosine および ssRNA のデュアル受容体であることを示した。このことは TLR7 を標的とした治療薬やワクチンのアジュバントの開発において、2 つの作用点で活性を制御するという新しい視点を提供するものである。

一方、TLR7 の過剰な活性化は複数の自己免疫疾患と関連している。TLR7 を標的としたアンタゴニストが開発されていたものの、これらのアンタゴニストによる TLR7 の阻害機構

も不明であった。本研究ではクライオ電子顕微鏡解析を用い、TLR7/アンタゴニスト複合体の高分解能構造を決定した。阻害状態である TLR7 オープン型コンフォメーションの二量体構造から新規アンタゴニスト結合部位を同定し、詳細なアンタゴニスト認識機構を明らかにした。このことは TLR7 を標的とした自己免疫疾患治療薬の開発の構造基盤を提供するものである。

5. 付表

表 1. TLR7 site 2 変異体を作成した際のプライマー

変異部位	プライマー 名称	5'~3' 配列
R97A	R97A_f	5' GACTTTGCCTGCAACTGCGTGCCAATC 3'
	R97A_r	5' GTTGCAGGCAAAGTCAATCTCCACCAG 3'
C98S	C98S_f	5' TTTCGCTCCAAGTCAATCTCCACCAG 3'
	C98S_r	5' GCAGTTGGAGCGAAAGTCAATCTCCAC 3'
C100S	C100S_f	5' TGCAACTCCGTGCCAATCCGCCTGGGC 3'
	C100S_r	5' TGGCACGGAGTTGCAGCGAAAGTCAAT 3'
L105A	L105A_f	5' ATCCGCGCCGGCTCCAAGTCGAATATG 3'
	L105A_r	5' GGAGCCGGCGCGGATTGGCACGCAGTT 3'
C112S	C112S_f	5' AATATGTCCCCGCGCCGCCTGCAGATT 3'
	C112S_r	5' GCGCGGGGACATATTCGACTTGGAGCC 3'
S154A	S154A_f	5' CTGCTGGCCCTGGAGGCCAACAAATATT 3'
	S154A_r	5' CTCCAGGGCCAGCAGCTGCAGGGATGG 3'
R186A	R186A_f	5' TACTATGCCAATCCCTGCTACGTGTCC 3'
	R186A_r	5' GGGATTGGCATAGTAGCAGTTCTGGCC 3'

表 2. X線結晶構造解析のデータセット収集および構造精密化の統計値 (一)

	TLR7/G/polyU 複合体	TLR7/Loxo/polyU 複合体	TLR7/R848 複合体
PDB ID	5GMF	5GMG	5GMH
Data collection			
Beamline	PF-AR NE3A	SPring-8 BL41XU	PF-AR NE3A
Space group	$P1$	$P2_1$	$P2_12_12_1$
Cell dimensions			
a, b, c (Å)	98.1, 111.3, 113.4	98.3, 99.4, 112.1	99.1, 140.1, 151.1
α, β, γ (°)	93.8, 94.3, 91.5	98.6	-
Resolution (Å)	2.50 (2.64-2.50)	2.60 (2.64-2.60)	2.20 (2.24-2.20)
R_{merge}	0.112 (0.921)	0.080 (0.410)	0.103 (0.937)
$\ \sigma /$	8.9 (1.4)	15.1 (1.8)	21.3 (1.9)
Completeness (%)	97.6 (96.3)	93.9 (88.5)	98.8 (98.1)
Redundancy	3.5 (3.6)	2.8 (2.7)	13.5 (13.1)
Refinement			
Resolution (Å)	50.0-2.50	50.0-2.59	50.0-2.20
No. reflections	153,109	58,705	100,054
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$ (%)	0.207 / 0.243	0.215 / 0.258	0.185 / 0.224
No. atoms			
Protein	25,188	12,330	12,528
First site ligand	80	48	46
Second site ligand	256	128	-
Water	157	33	653
B-factors (Å ²)			
Protein	51.9	68.4	42.0
First site ligand	36.5	70.7	37.3
Second site ligand	62.6	69.6	-
Water	37.3	49.0	40.6
R.m.s deviations			
Bond lengths (Å)	0.013	0.012	0.017
Bond angles (°)	1.78	1.67	1.86

括弧の中は、最外殻における値を示した。 F_o および F_c は実測および計算構造因子振幅であり、 $R = \sum |F_o - F_c| / \sum F_o$ を用いた。全反射の 5% を用いて計算した R 値が R_{free} であり、これらの反射は構造精密化には用いていない。

表 3. ITC 分析のまとめ (一)

	Cell			Titrant		K_d (μM)	ΔH (kcal/M)	ΔS (cal/mol/d eg)	N
	C_{TLR7} (μM)	RNA	C_{RNA} (μM)	Ligand	C_{ligand} (μM)				
A	100	-	-	Guanosine	1000	13.5	-10.8	-14.0	0.64
	100	-	-	Loxoribine	1000	5.6	-10.1	-9.7	0.85
	100	-	-	R848	1000	0.49	-4.1	15.1	0.71
	30	-	-	Uridine	1000			N.D.	
	30	-	-	Adenosine	1000			N.D.	
	30	-	-	Thymidine	1000			N.D.	
	30	-	-	Cytidine	1000			N.D.	
	30	-	-	Inosine	1000			N.D.	
	30	-	-	Xanthosine	1000			N.D.	
	B	30	polyU_19mer	30	Guanosine	250	0.93	-9.3	-3.5
30		polyU_19mer	30	Loxoribine	300	0.57	-7.6	3.1	0.71
30		polyU_19mer	30	R848	300	0.10	-2.4	23.6	0.53
30		polyU_12mer	30	Guanosine	300	1.2	-10.2	-7.2	0.69
30		polyU_9mer	30	Guanosine	300	1.6	-9.8	-6.5	0.60
30		polyU_6mer	30	Guanosine	300	1.5	-7.1	2.9	0.55
C	10	-	-	polyU_19mer	100	0.37	-32.3	-78.8	0.42
	10	-	-	polyU_12mer	100	0.08	-20.1	-34.8	0.65
	10	-	-	polyU_9mer	100	0.09	-25.2	-52.3	0.49
	10	-	-	polyU_6mer	100	0.22	-21.4	-41.2	0.50
	10	-	-	polyU_3mer	100			N.D.	
D	30	-	-	Guanosine	1000	7.6	-2.0	16.6	1.62
	30	UUU	30	Guanosine	1000	3.9	-6.9	1.7	0.94
	30	AAA	30	Guanosine	1000	9.2	-2.0	16.3	1.75
	30	GGG	30	Guanosine	1000	12.0	-2.4	14.3	1.27
	30	CCC	30	Guanosine	1000	10.2	-2.1	15.8	1.60
	30	UCU	30	Guanosine	1000	9.7	-2.4	15.0	1.46
	30	UGU	30	Guanosine	1000	9.8	-2.4	14.7	1.36

N.D.は“not determined”の略である。ITC 実験の thermograms に関しては図 20 を参照された
い。

表 4. TLR7/IMDQ/ssRNA 複合体結晶構造および各 ssRNA の ITC 分析のまとめ

結晶化に用いたリガンド		結晶構造						ssRNA の ITC 分析	
Site 1 低分子アゴニスト	Site 2 ssRNA	Resolution (Å)	Modelled ssRNA ² (5'~3')						K_d (nM)
IMDQ	UUUUUU	2.50	-	-	U ₁	U ₂	U ₃	-	230 ± 30
	AAUUAA	2.70	-	A ₀	U ₁	U ₂	A ₃	-	320 ± 19
	CCUUCC	2.20	-	-	U ₁	U ₂	C ₃	-	100 ± 21
	GGUUGG	2.60	-	-	U ₁	U ₂	G ₃	-	680 ± 160
	AAUAAA	2.50	N.D.						N.D.
	AAUCCC	2.60	N.D.						N.D.
	AAUGGG	2.85	N.D.						N.D.
	CCUAAA	2.60	N.D.						N.D.
	CCUCCC	2.60	N.D.						N.D.
	CCUGGG	2.50	N.D.						N.D.
	GGUAAA	2.60	N.D.						N.D.
	GGUCCC	2.20	-	G ₁	U ₂	C ₃	C ₄	C ₅	N.D.
	GGUGGG	2.40	N.D.						N.D.

N.D.は“not determined”の略である。ssRNA の塩基番号は TLR7/IMDQ/UUUU 複合体構造における U₁U₂U₃ に相当する位置を参照している。ssRNA を含まない複合体構造は最終的に精密化されておらず、Protein Data Bank にも登録されていない。UUUUUU, AAUUAA, CCUUCC, GGUUGG の ITC 分析はそれぞれ 3 回、その他の ssRNA の ITC 分析は 1 回行った。ITC 実験の thermograms に関しては図 20 を参照されたい。

表 5. X線結晶構造解析のデータセット収集および構造精密化の統計値 (二)

Protein	TLR7									
Ligand	IMDQ + UUUUUU	IMDQ + AAUUAA	IMDQ + CCUUCC	IMDQ + GGUUGG	IMDQ + GGUCCC	Imiquimod	Gardiquimod	CL075	CL097	GS9620
PDB ID	5ZSA	5ZSB	5ZSC	5ZSD	5ZSE	5ZSF	5ZSG	5ZSH	5ZSI	5ZSJ
Data collection										
Beamline	SPring-8 BL41XU	PF-AR NE3A	PF-AR NE3A	PF-AR NE3A	PF-AR NE3A	PF-AR NE3A	PF-AR NE3A	PF-AR NE3A	PF-AR NE3A	PF BL5A
Wavelength (Å)	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Cell dimensions										
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	99.2, 139.7, 150.4	98.9, 139.2, 150.0	98.6, 138.8, 149.5	99.0, 139.3, 150.1	98.9, 138.8, 149.5	99.3, 140.1, 151.3	99.3, 140.2, 151.7	99.7, 139.7, 150.4	99.4, 140.0, 149.5	99.1, 138.6, 149.3
Resolution (Å)	2.50 (2.55-2.50)	2.70 (2.75-2.70)	2.20 (2.24-2.20)	2.60 (2.64-2.60)	2.20 (2.24-2.20)	2.10 (2.14-2.10)	2.30 (2.34-2.30)	2.60 (2.66-2.60)	2.70 (2.77-2.70)	2.40 (2.45-2.40)
R_{means}	0.118 (1.498)	0.189 (1.302)	0.129 (0.955)	0.136 (1.015)	0.124 (1.017)	0.102 (1.775)	0.117 (1.230)	0.428 (3.846)	0.194 (1.571)	0.164 (1.059)
$\ \sigma \ $	12.8 (1.4)	15.4 (1.4)	21.5 (1.8)	18.4 (2.1)	21.6 (1.7)	19.9 (1.9)	18.8 (2.7)	15.2 (1.7)	17.0 (2.2)	18.6 (3.1)
Completeness (%)	100.0 (99.7)	99.6 (99.1)	100.0 (99.9)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)	100.0 (99.9)
Redundancy	6.7 (6.7)	12.6 (11.1)	13.4 (12.2)	13.4 (14.1)	13.2 (11.6)	13.5 (13.4)	13.5 (13.8)	12.8 (13.4)	13.4 (13.9)	13.4 (14.3)
Refinement										
Resolution (Å)	47.2-2.5	49.5-2.7	49.3-2.2	46.6-2.6	46.9-2.2	47.2-2.1	47.2-2.3	47.2-2.6	49.7-2.7	46.9-2.4
No. reflections	72,858	58,185	105,667	63,902	104,497	123,381	94,528	65,252	57,899	80,881
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0.199 / 0.250	0.192 / 0.251	0.191 / 0.227	0.190 / 0.233	0.195 / 0.232	0.195 / 0.232	0.186 / 0.224	0.197 / 0.244	0.199 / 0.259	0.195 / 0.236
Model										
Protein	2 × TLR7	2 × TLR7	2 × TLR7	2 × TLR7	2 × TLR7	2 × TLR7	2 × TLR7	2 × TLR7	2 × TLR7	2 × TLR7
Ligand in site 1	2 × IMDQ	2 × IMDQ	2 × IMDQ	2 × IMDQ	2 × IMDQ	2 × Imiquimod	2 × Gardiquimod	2 × CL075	2 × CL097	2 × GS9620
Ligand in site 2	2 × UUU	1 × UUA, 1 × AUUA	2 × UUC	2 × UUG	2 × GUCCC	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Average B-factors (Å ²)	56.5	51.4	41.6	47.9	43.7	44.6	44.1	47.5	50.9	36.0
R.m.s deviations										
Bond lengths (Å)	0.009	0.010	0.009	0.009	0.009	0.009	0.010	0.010	0.010	0.008
Bond angles (°)	1.22	1.22	1.17	1.19	1.13	1.26	1.22	1.39	1.44	1.12

括弧の中は、最外殻における値を示した。 F_o および F_c は実測および計算構造因子振幅であり、 $R = \sum |F_o - F_c| / \sum F_o$ を用いた。全反射の 5% を用いて計算した R 値が R_{free} であり、これらの反射は構造精密化には用いていない。

表 6. ITC 分析のまとめ (二)

	Cell			Titrant		Replicates	K_d (nM)	ΔH (Kcal/M)	ΔS (cal/mol/deg)	N (sites)
	CTLR7 (μ M)	RNA	C_{RNA} (μ M)	Ligand	C_{ligand} (μ M)					
A	10	/	/	UUUUUU	100	3	230 \pm 30	-13.9 \pm 0.6	-16.4 \pm 1.9	0.50 \pm 0.03
	10	/	/	AAUUAA	100	3	320 \pm 19	-15.6 \pm 0.4	-22.7 \pm 1.3	0.38 \pm 0.03
	10	/	/	CCUUCC	100	3	100 \pm 21	-17.7 \pm 0.4	-27.4 \pm 1.8	0.42 \pm 0.01
	10	/	/	GGUUGG	100	3	680 \pm 160	-15.8 \pm 1.5	-24.8 \pm 4.9	0.48 \pm 0.03
	15	/	/	AAUAAA	100	1	N.D.			
	15	/	/	AAUCCC	100	1	N.D.			
	15	/	/	AAUGGG	100	1	N.D.			
	15	/	/	CCUAAA	100	1	N.D.			
	15	/	/	CCUCCC	100	1	N.D.			
	15	/	/	CCUGGG	100	1	N.D.			
	15	/	/	GGUAAA	100	1	N.D.			
	15	/	/	GGUCCC	100	1	N.D.			
	15	/	/	GGUGGG	100	1	N.D.			
B	80	/	/	R848	800	1	780	-2.8	18.4	0.53
	80	/	/	Imiquimod	800	1	N.D.			
	80	/	/	GS9620	800	1	890	-9.9	-5.5	0.55
	80	/	/	Guanosine	800	1	9300	-5.1	5.8	0.90
C	30	polyU_9mer	35	Guanosine	300	1	2100	-10.4	-8.9	0.55
	30	polyU_9mer	35	GS9620	300	1	69	-7.0	9.4	0.54
	30	polyU_9mer	35	R848	300	1	97	-2.3	24.3	0.50
	30	polyU_9mer	35	Imiquimod	300	1	N.D.			

N.D.は“not determined”の略である。ITC 実験の thermograms に関しては図 46 および図 51 を参照されたい。

表 7. X線結晶構造解析のデータセット収集および構造精密化の統計値 (三)

Data	TLR7/Cpd-1 複合体 (closed form)	TLR7/Cpd-2 複合体 (closed form)	TLR7/Cpd-3 複合体 (closed form)	TLR7/Cpd-6 複合体 (closed form)
PDB ID	6LVX	6LVY	6LVZ	6LW0
Data collection				
Beamline	PF BL-5A	PF BL-5A	PF BL-5A	PF-AR NE3A
Wavelength (Å)	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Cell dimensions				
a, b, c (Å)	98.8, 138.5, 148.5	99.0, 138.4, 148.7	98.6, 139.1, 149.2	98.2, 139.4, 149.0
Resolution (Å)	2.77 (2.86-2.77)	2.60 (2.66-2.60)	2.83 (2.92-2.83)	2.60 (2.66-2.60)
R_{meas}	0.110	0.142	0.116	0.119
$\ \sigma \ $	27.4 (7.0)	20.8 (2.6)	16.2 (2.2)	13.8 (1.8)
Completeness (%)	100.0 (99.9)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)
Redundancy	13.0 (13.7)	13.4 (13.8)	6.7 (7.0)	6.7 (6.8)
Refinement				
Resolution (Å)	50.01-2.77	50.01-2.60	46.87-2.83	46.29-2.60
No. reflections	49,888	60,395	47,103	63,496
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0.2120 / 0.2518	0.1944 / 0.2393	0.1871 / 0.2451	0.2054 / 0.2596
Model				
Protein	2 × TLR7	2 × TLR7	2 × TLR7	2 × TLR7
Ligand	2 × Cpd-1	2 × Cpd-2	2 × Cpd-3	2 × Cpd-6
Average B-factors (Å ²)	34.4	48.5	58.9	53.5
R.m.s deviations				
Bond lengths (Å)	0.013	0.013	0.010	0.010
Bond angles (°)	1.68	1.68	1.48	1.39

括弧の中は、最外殻における値を示した。 F_o および F_c は実測および計算構造因子振幅であり、 $R = \sum |F_o - F_c| / \sum F_o$ を用いた。全反射の 5% を用いて計算した R 値が R_{free} であり、これらの反射は構造精密化には用いていない。

表 8. クライオ電子顕微鏡データ収集、データ解析および構造精密化の統計値

Data	TLR7/Cpd-3 複合体 (closed form)	TLR7/Cpd-6 複合体 (closed form)	TLR7/Cpd-6 複合体 (open form)	TLR7/Cpd-7 複合体 (open form)	TLR7/Cpd-7 複合体 (open form)
EMDB ID	EMD-0999	EMD-1000	EMD-30000	EMD-30001	EMD-30002
PDB ID	-	-	-	-	6LW1
Data collection and processing					
Cryo-EM facility	RIKEN RSC Cryo-EM facility			University of Tokyo	
Microscope	Glacios	Glacios		Talos Arctica	Titan Krios
Voltage (kV)	200	200		200	300
Detector	Falcon 3EC	Falcon 3EC		K2 summit	K3
Magnification	150,000	150,000		130,000	105,000
Pixel size (Å)	0.67	0.67		1.03	0.83
Total dose (e-/Å ²)	50	50		50	60
Total movie stacks	940	2,988		2,547	4,464
Initial particle images (no.)	436,505	1,454,610		2,174,366	4,150,564
Final particle images (no.)	52,612	224,943	200,631	330,327	301,212
Symmetry imposed	C2	C2	C2	C2	C2
Map resolution (Å)	4.1	4.4	4.4	4.1	2.8
FSC threshold	0.143	0.143	0.143	0.143	0.143
Map sharpening B factor (Å ²)	-93.4	-202.2	-214.0	-195.3	-69.8
Refinement					
Initial model used (PDB ID)	-	-	-	-	5GMH
Model resolution (Å)	-	-	-	-	3.0
FSC threshold	-	-	-	-	0.5
Model composition	-	-	-	-	
Protein	-	-	-	-	TLR7 × 2
Ligand	-	-	-	-	Cpd-7 × 2
Average B-factors (Å ²)	-	-	-	-	
Protein	-	-	-	-	72.3
Ligand	-	-	-	-	17.1
R.m.s deviations	-	-	-	-	
Bond lengths (Å)	-	-	-	-	0.009
Bond angles (°)	-	-	-	-	0.96
Validation	-	-	-	-	
Molprobrity score	-	-	-	-	2.79
Clashscore	-	-	-	-	11.25
Poor rotamers (%)	-	-	-	-	7.1
Ramachandran plot	-	-	-	-	
Favored (%)	-	-	-	-	89.2
Allowed (%)	-	-	-	-	10.3
Outliers (%)	-	-	-	-	0.5

6 参考文献

Abràmoff, M.D., Magalhães, P.J., and Ram, S.J. (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics international* 11, 36-42.

Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.-W., Kapral, G.J., and Grosse-Kunstleve, R.W. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 66, 213-221.

Aderem, A., and Ulevitch, R.J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782-787.

Afonine, P.V., Grosse-Kunstleve, R.W., Echols, N., Headd, J.J., Moriarty, N.W., Mustyakimov, M., Terwilliger, T.C., Urzhumtsev, A., Zwart, P.H., and Adams, P.D. (2012). Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 68, 352-367.

Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-738.

Anderson, K.V., Jürgens, G., and Nüsslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* *42*, 779-789.

Bauer, S., Kirschning, C.J., Häcker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H., and Lipford, G.B. (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proceedings of the national academy of sciences* *98*, 9237-9242.

Blasius, A.L., and Beutler, B. (2010). Intracellular toll-like receptors. *Immunity* *32*, 305-315.

Brautigam, C.A. (2015). Calculations and publication-quality illustrations for analytical ultracentrifugation data. *Methods in enzymology* *562*, 109-133.

Deane, J.A., Pisitkun, P., Barrett, R.S., Feigenbaum, L., Town, T., Ward, J.M., Flavell, R.A., and Bolland, S. (2007). Control of toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation. *Immunity* *27*, 801-810.

DeLano, W.L. (2002). Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter on protein crystallography* *40*, 82-92.

Desnues, B., Macedo, A.B., Roussel-Queval, A., Bonnardel, J., Henri, S., Demaria, O., and Alexopoulou, L. (2014). TLR8 on dendritic cells and TLR9 on B cells restrain TLR7-mediated spontaneous autoimmunity in C57BL/6 mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *111*, 1497-1502.

Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and e Sousa, C.R. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* *303*, 1529-1531.

Edwards, L., Ferenczy, A., Eron, L., Baker, D., Owens, M.L., Fox, T.L., Hougham, A.J., and Schmitt, K.A. (1998). Self-administered topical 5% imiquimod cream for external anogenital warts. *Archives of Dermatology* *134*, 25-30.

Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* *60*, 2126-2132.

Ewald, S.E., Engel, A., Lee, J., Wang, M., Bogoy, M., and Barton, G.M. (2011). Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. *Journal of Experimental Medicine* *208*, 643-651.

Ewald, S.E., Lee, B.L., Lau, L., Wickliffe, K.E., Shi, G.-P., Chapman, H.A., and Barton, G.M. (2008). The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* *456*, 658-662.

Fairhurst, A.M., Hwang, S.h., Wang, A., Tian, X.H., Boudreaux, C., Zhou, X.J., Casco, J., Li, Q.Z., Connolly, J.E., and Wakeland, E.K. (2008). Yaa autoimmune phenotypes are conferred by overexpression of TLR7. *European journal of immunology* *38*, 1971-1978.

Gane, E.J., Lim, Y.-S., Gordon, S.C., Visvanathan, K., Sicard, E., Fedorak, R.N., Roberts, S., Massetto, B., Ye, Z., and Pflanz, S. (2015). The oral toll-like receptor-7 agonist GS-9620 in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Journal of hepatology* *63*, 320-328.

Geisse, J., Caro, I., Lindholm, J., Golitz, L., Stampone, P., and Owens, M. (2004). Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *Journal of the American Academy of Dermatology* *50*, 722-733.

Goddard, T.D., Huang, C.C., Meng, E.C., Pettersen, E.F., Couch, G.S., Morris, J.H., and Ferrin, T.E. (2018). UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in

visualization and analysis. *Protein Science* 27, 14-25.

Grant, T., Rohou, A., and Grigorieff, N. (2018). cisTEM, user-friendly software for single-particle image processing. *elife* 7, e35383.

Groß, C.J., Mishra, R., Schneider, K.S., Médard, G., Wettmarshausen, J., Dittlein, D.C., Shi, H., Gorka, O., Koenig, P.-A., and Fromm, S. (2016). K⁺ efflux-independent NLRP3 inflammasome activation by small molecules targeting mitochondria. *Immunity* 45, 761-773.

Hashimoto, C., Hudson, K.L., and Anderson, K.V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269-279.

Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., and Akira, S. (2003). The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *European journal of immunology* 33, 2987-2997.

Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526-1529.

Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature immunology* *3*, 196-200.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., and Takeda, K. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* *408*, 740-745.

Hipp, M.M., Shepherd, D., Gileadi, U., Aichinger, M.C., Kessler, B.M., Edelmann, M.J., Essalmani, R., Seidah, N.G., e Sousa, C.R., and Cerundolo, V. (2013). Processing of human toll-like receptor 7 by furin-like proprotein convertases is required for its accumulation and activity in endosomes. *Immunity* *39*, 711-721.

Hirota, K., Kazaoka, K., Niimoto, I., Kumihara, H., Sajiki, H., Isobe, Y., Takaku, H., Tobe, M., Ogita, H., and Ogino, T. (2002). Discovery of 8-hydroxyadenines as a novel type of interferon inducer. *Journal of medicinal chemistry* *45*, 5419-5422.

Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., and de Fougères, A.

(2005). Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nature medicine* *11*, 263-270.

Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdörfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1–10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *The Journal of immunology* *168*, 4531-4537.

Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *The Journal of Immunology* *162*, 3749-3752.

Hung, T., Pratt, G., Sundararaman, B., Townsend, M., Chaivorapol, C., Bhangale, T., Graham, R., Ortmann, W., Criswell, L., and Yeo, G. (2015). The Ro60 autoantigen binds endogenous retroelements and regulates inflammatory gene expression. *Science* *350*, 455-459.

Ishii, N., Funami, K., Tatematsu, M., Seya, T., and Matsumoto, M. (2014). Endosomal localization of TLR8 confers distinctive proteolytic processing on

human myeloid cells. *The Journal of Immunology* *193*, 5118-5128.

Janeway Jr, C.A., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual review of immunology* *20*, 197-216.

Jin, M.S., Kim, S.E., Heo, J.Y., Lee, M.E., Kim, H.M., Paik, S.-G., Lee, H., and Lee, J.-O. (2007). Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* *130*, 1071-1082.

Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A.M., Wagner, H., Lipford, G., and Bauer, S. (2002). Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nature immunology* *3*, 499-499.

Kabsch, W. (2010). Xds. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* *66*, 125-132.

Kang, J.Y., Nan, X., Jin, M.S., Youn, S.-J., Ryu, Y.H., Mah, S., Han, S.H., Lee, H., Paik, S.-G., and Lee, J.-O. (2009). Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity* *31*, 873-884.

Kanno, A., Yamamoto, C., Onji, M., Fukui, R., Saitoh, S.-i., Motoi, Y., Shibata, T., Matsumoto, F., Muta, T., and Miyake, K. (2013). Essential role for Toll-like receptor 7 (TLR7)-unique cysteines in an intramolecular disulfide bond,

proteolytic cleavage and RNA sensing. *International immunology* *25*, 413-422.

Kim, Y.-M., Brinkmann, M.M., Paquet, M.-E., and Ploegh, H.L. (2008). UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* *452*, 234-238.

Kobe, B., and Kajava, A.V. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current opinion in structural biology* *11*, 725-732.

Koga-Yamakawa, E., Dovedi, S.J., Murata, M., Matsui, H., Leishman, A.J., Bell, J., Ferguson, D., Heaton, S.P., Oki, T., and Tomizawa, H. (2013). Intratracheal and oral administration of SM-276001: a selective TLR7 agonist, leads to antitumor efficacy in primary and metastatic models of cancer. *International journal of cancer* *132*, 580-590.

Kucukelbir, A., Sigworth, F.J., and Tagare, H.D. (2014). Quantifying the local resolution of cryo-EM density maps. *Nature methods* *11*, 63-65.

Kurimoto, A., Hashimoto, K., Nakamura, T., Norimura, K., Ogita, H., Takaku, H., Bonnert, R., McInally, T., Wada, H., and Isobe, Y. (2010). Synthesis and biological evaluation of 8-oxoadenine derivatives as toll-like receptor 7 agonists introducing the antedrug concept. *Journal of medicinal chemistry* *53*, 2964-2972.

Lee, B.L., and Barton, G.M. (2014). Trafficking of endosomal Toll-like receptors. *Trends in cell biology* *24*, 360-369.

Lee, J., Chuang, T.-H., Redecke, V., She, L., Pitha, P.M., Carson, D.A., Raz, E., and Cottam, H.B. (2003). Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *100*, 6646-6651.

Lehmann, S.M., Rosenberger, K., Krüger, C., Habel, P., Derkow, K., Kaul, D., Rybak, A., Brandt, C., Schott, E., and Wulczyn, F.G. (2012). Extracellularly delivered single-stranded viral RNA causes neurodegeneration dependent on TLR7. *The Journal of Immunology* *189*, 1448-1458.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* *86*, 973-983.

Liu, L., Botos, I., Wang, Y., Leonard, J.N., Shiloach, J., Segal, D.M., and Davies, D.R. (2008). Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science* *320*, 379-381.

Majer, O., Liu, B., and Barton, G.M. (2017). Nucleic acid-sensing TLRs: trafficking

and regulation. *Current opinion in immunology* *44*, 26-33.

Mark, K.E., Spruance, S., Kinghorn, G.R., Sacks, S.L., Slade, H.B., Meng, T.-C., Selke, S., Magaret, A., and Wald, A. (2014). Three phase III randomized controlled trials of topical resiquimod 0.01-percent gel to reduce anogenital herpes recurrences. *Antimicrobial agents and chemotherapy* *58*, 5016-5023.

Marques, J.T., and Williams, B.R. (2005). Activation of the mammalian immune system by siRNAs. *Nature biotechnology* *23*, 1399-1405.

Mastrorarde, D.N. (2005). Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements. *Journal of structural biology* *152*, 36-51.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* *388*, 394-397.

Mercer, J., and Helenius, A. (2009). Virus entry by macropinocytosis. *Nature cell biology* *11*, 510-520.

Mercer, J., Schelhaas, M., and Helenius, A. (2010). Virus entry by endocytosis. *Annual review of biochemistry* *79*, 803-833.

Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* *53*, 240-255.

Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M., and Miyake, K. (2002). Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nature immunology* *3*, 667-672.

Nakamura, T., Wada, H., Kurebayashi, H., McNally, T., Bonnert, R., and Isobe, Y. (2013). Synthesis and evaluation of 8-oxoadenine derivatives as potent Toll-like receptor 7 agonists with high water solubility. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* *23*, 669-672.

O'Neill, L.A., Golenbock, D., and Bowie, A.G. (2013). The history of Toll-like receptors—redefining innate immunity. *Nature Reviews Immunology* *13*, 453-460.

Ohto, U., Fukase, K., Miyake, K., and Shimizu, T. (2012). Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *109*, 7421-7426.

Ohto, U., Ishida, H., Shibata, T., Sato, R., Miyake, K., and Shimizu, T. (2018). Toll-like receptor 9 contains two DNA binding sites that function cooperatively to

promote receptor dimerization and activation. *Immunity* 48, 649-658. e644.

Ohto, U., Shibata, T., Tanji, H., Ishida, H., Krayukhina, E., Uchiyama, S., Miyake, K., and Shimizu, T. (2015). Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9. *Nature* 520, 702-705.

Oldenburg, M., Krüger, A., Ferstl, R., Kaufmann, A., Nees, G., Sigmund, A., Bathke, B., Lauterbach, H., Suter, M., and Dreher, S. (2012). TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science* 337, 1111-1115.

Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997). [20] Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in enzymology* 276, 307-326.

Park, B., Brinkmann, M.M., Spooner, E., Lee, C.C., Kim, Y.-M., and Ploegh, H.L. (2008). Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nature immunology* 9, 1407.

Park, B.S., Song, D.H., Kim, H.M., Choi, B.-S., Lee, H., and Lee, J.-O. (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458, 1191-1195.

Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M.,

Meng, E.C., and Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry* *25*, 1605-1612.

Pisitkun, P., Deane, J.A., Difilippantonio, M.J., Tarasenko, T., Satterthwaite, A.B., and Bolland, S. (2006). Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science* *312*, 1669-1672.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.-Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., and Galanos, C. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* *282*, 2085-2088.

Roach, J.C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M.K., Smith, K.D., Hood, L.E., and Aderem, A. (2005). The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *102*, 9577-9582.

Robbins, M., Judge, A., Liang, L., McClintock, K., Yaworski, E., and MacLachlan, I. (2007). 2'-O-methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonists. *Molecular Therapy* *15*, 1663-1669.

Roethle, P.A., McFadden, R.M., Yang, H., Hrvatin, P., Hui, H., Graupe, M., Gallagher, B., Chao, J., Hesselgesser, J., and Duatschek, P. (2013).

Identification and optimization of pteridinone Toll-like receptor 7 (TLR7) agonists for the oral treatment of viral hepatitis. *Journal of medicinal chemistry* *56*, 7324-7333.

Rohou, A., and Grigorieff, N. (2015). CTFFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs. *Journal of structural biology* *192*, 216-221.

Santiago-Raber, M.-L., Baudino, L., and Izui, S. (2009). Emerging roles of TLR7 and TLR9 in murine SLE. *Journal of autoimmunity* *33*, 231-238.

Savarese, E., Chae, O.-w., Trowitzsch, S., Weber, G., Kastner, B., Akira, S., Wagner, H., Schmid, R.M., Bauer, S., and Krug, A. (2006). U1 small nuclear ribonucleoprotein immune complexes induce type I interferon in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Blood* *107*, 3229-3234.

Schuck, P. (2000). Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophysical journal* *78*, 1606-1619.

Schuck, P. (2003). On the analysis of protein self-association by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *Analytical biochemistry* *320*, 104-124.

Sepulveda, F.E., Maschalidi, S., Colisson, R., Heslop, L., Ghirelli, C., Sakka, E.,

Lennon-Duménil, A.-M., Amigorena, S., Cabanie, L., and Manoury, B. (2009). Critical role for asparagine endopeptidase in endocytic Toll-like receptor signaling in dendritic cells. *Immunity* *31*, 737-748.

Shibata, T., Ohto, U., Nomura, S., Kibata, K., Motoi, Y., Zhang, Y., Murakami, Y., Fukui, R., Ishimoto, T., and Sano, S. (2016). Guanosine and its modified derivatives are endogenous ligands for TLR7. *International immunology* *28*, 211-222.

Sloan, D., Irrinki, A., Tsai, A., Kaur, J., Lalezari, J., Murry, J., and Cihlar, T. (2015). TLR7 agonist GS-9620 activates HIV-1 in PBMCs from HIV-infected patients on cART. Paper presented at: Conference on retroviruses and opportunistic infections.

Song, D.H., and Lee, J.O. (2012). Sensing of microbial molecular patterns by Toll-like receptors. *Immunological reviews* *250*, 216-229.

Song, W., Wang, J., Han, Z., Zhang, Y., Zhang, H., Wang, W., Chang, J., Xia, B., Fan, S., and Zhang, D. (2015). Structural basis for specific recognition of single-stranded RNA by Toll-like receptor 13. *Nature structural & molecular biology* *22*, 782-787.

Souyris, M., Cenac, C., Azar, P., Daviaud, D., Canivet, A., Grunenwald, S., Pienkowski, C., Chaumeil, J., Mejía, J.E., and Guéry, J.-C. (2018). TLR7 escapes X chromosome inactivation in immune cells. *Science immunology* *3*.

Sterling, J. (2010). Virus infections. *Rook's textbook of dermatology* *1*, 1-81.

Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* *140*, 805-820.

Tanji, H., Ohto, U., Motoi, Y., Shibata, T., Miyake, K., and Shimizu, T. (2016). Autoinhibition and relief mechanism by the proteolytic processing of Toll-like receptor 8. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *113*, 3012-3017.

Tanji, H., Ohto, U., Shibata, T., Miyake, K., and Shimizu, T. (2013). Structural reorganization of the Toll-like receptor 8 dimer induced by agonistic ligands. *Science* *339*, 1426-1429.

Tanji, H., Ohto, U., Shibata, T., Taoka, M., Yamauchi, Y., Isobe, T., Miyake, K., and Shimizu, T. (2015). Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA. *Nature structural & molecular biology* *22*, 109.

Taoka, M., Yamauchi, Y., Nobe, Y., Masaki, S., Nakayama, H., Ishikawa, H., Takahashi, N., and Isobe, T. (2009). An analytical platform for mass

spectrometry-based identification and chemical analysis of RNA in ribonucleoprotein complexes. *Nucleic acids research* *37*, e140-e140.

Tojo, S., Zhang, Z., Matsui, H., Tahara, M., Ikeguchi, M., Kochi, M., Kamada, M., Shigematsu, H., Tsutsumi, A., and Adachi, N. (2020). Structural analysis reveals TLR7 dynamics underlying antagonism. *Nature communications* *11*, 1-11.

Vagin, A., and Teplyakov, A. (1997). MOLREP: an automated program for molecular replacement. *Journal of applied crystallography* *30*, 1022-1025.

Wagstaff, A.J., and Perry, C.M. (2007). Topical Imiquimod. *Drugs* *67*, 2187-2210.

Wallace, D.J., Gudsoorkar, V.S., Weisman, M.H., and Venuturupalli, S.R. (2012). New insights into mechanisms of therapeutic effects of antimalarial agents in SLE. *Nature Reviews Rheumatology* *8*, 522.

Yoon, S.-i., Kurnasov, O., Natarajan, V., Hong, M., Gudkov, A.V., Osterman, A.L., and Wilson, I.A. (2012). Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. *Science* *335*, 859-864.

Zhang, Z., Ohto, U., Shibata, T., Krayukhina, E., Taoka, M., Yamauchi, Y., Tanji, H., Isobe, T., Uchiyama, S., and Miyake, K. (2016). Structural analysis reveals that Toll-like receptor 7 is a dual receptor for guanosine and single-stranded RNA.

Immunity 45, 737-748.

Zhang, Z., Ohto, U., Shibata, T., Taoka, M., Yamauchi, Y., Sato, R., Shukla, N.M., David, S.A., Isobe, T., and Miyake, K. (2018). Structural analyses of Toll-like receptor 7 reveal detailed RNA sequence specificity and recognition mechanism of agonistic ligands. *Cell reports* 25, 3371-3381. e3375.

Zheng, S.Q., Palovcak, E., Armache, J.-P., Verba, K.A., Cheng, Y., and Agard, D.A. (2017). MotionCor2: anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy. *Nature methods* 14, 331-332.

Zivanov, J., Nakane, T., Forsberg, B.O., Kimanius, D., Hagen, W.J., Lindahl, E., and Scheres, S.H. (2018). New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3. *Elife* 7, e42166.

7. 謝辞

本研究を行う上で有益な御指導、御討論、御助力を賜りました東京大学大学院薬学系研究科
蛋白構造生物学教室 清水 敏之 教授に心から御礼申し上げます。

本研究を進めるに当たり、一から実験の御指導、御助言を賜りました東京大学大学院薬学系
研究科蛋白構造生物学教室 大戸 梅治 准教授に心から御礼申し上げます。

本研究の共同研究者として、レポータージーンアッセイを用いた活性測定を行ってくださ
った東京大学医科学研究所感染・免疫部門感染遺伝学分野 三宅 健介 教授、柴田 琢磨 博
士および佐藤 亮太 博士に心から御礼申し上げます。

本研究の共同研究者として、LC-MS を用いた結晶溶液の分析を行ってくださった首都大学
東京大学院理工学研究科分子物質科学専攻 磯邊 俊明 特任教授、田岡 万悟 博士、山内 芳
雄 博士に心から御礼申し上げます。

本研究の共同研究者として、SV-AUC を用いた TLR7 の分析を行ってくださった大阪大学
大学院工学研究科生命先端工学専攻 内山 進 教授および Elena Krayukhina 博士に心から
御礼申し上げます。

本研究の共同研究者として、IMDQ を提供してくださったミネソタ大学 Sunil A. David 教
授および Nikunj M. Shukla 博士に心から御礼申し上げます。

本研究の共同研究者として、リガンド (Cpd-1~Cpd-7) を提供してくださった大日本住友製

薬株式会社 東城慎吾 博士に心から御礼申し上げます。

本研究の共同研究者として、**Glacios** 電子顕微鏡測定を協力してくださった国立研究開発法人理化学研究所 放射光科学研究センター 山本 雅貴 部門長および重松 秀樹 博士に心から御礼申し上げます。

本研究の電子顕微鏡測定を協力してくださった東京大学医学系研究科・生体構造学分野 吉川 雅英 教授、包 明久 博士および坂巻 陽一 技術補佐員に心から御礼申し上げます。

本研究の電子顕微鏡測定を協力してくださった高エネルギー加速器研究機構・**Cryo-EM facility** 千田 俊哉 教授、安達 成彦 博士、川崎 政人 博士に心から御礼申し上げます。

本研究の先行研究者として、ベクターの作成などを行ってくださった元東京大学大学院薬学系研究科蛋白構造生物学教室 丹治 裕美 博士に心から御礼申し上げます。

本研究における X 線回折実験において、有益な御助力を賜りました大型放射光施設 **Photon Factory** 山田 悠介 博士、篠田 晃 博士およびビームラインスタッフの皆様にご心から御礼申し上げます。

本研究における X 線回折実験において、有益な御助力を賜りました大型放射光施設 **SPring-8** 平田 邦夫 博士およびビームラインスタッフの皆様にご心から御礼申し上げます。

東京大学大学院薬学系研究科蛋白構造生物学教室の皆様には日頃から大変御世話になりました。感謝いたします。