

# 論文の内容の要旨

論文題目 自然免疫受容体TLR7の構造生物学的研究

氏名 張志寛

## 【背景】

Toll 様受容体 (Toll-like receptor, TLR) は多くの動物に存在する自然免疫受容体の一種類であり、自然免疫システムにおいて中心的な役割を果たしている。ヒトでは 10 種類の TLR が同定されており、それぞれが異なる病原体分子パターンの認識に関わる。TLR は細胞外 LRR ドメイン、一回膜貫通ドメインおよび細胞内 TIR ドメインにより構成されており、リガンド非結合状態では、一般的に単量体として存在している。LRR ドメインがリガンドを認識することによって、TLR の活性化型二量体の形成が誘導され、TIR ドメインを介して下流のアダプターにシグナルを伝達する。

TLR7 は一本鎖 RNA (ssRNA) を認識し活性化され、炎症性サイトカインや I 型インターフェロンの発現を誘導する。TLR7 はエンドソーム膜上に局在し、内因性 RNA との接触が制限されている。しかし、TLR7 が誤って内因性 RNA によって活性化されることが関節リウマチや全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患の病態形成に関与するとされている。TLR7 の活性を制御する手法の開発は RNA ウイルス感染症および自己免疫疾患の治療につながる可能性があり、そのためには TLR7 の作用機構の分子レベルでの解明が必要である。

これまでに、TLR7 は ssRNA によって活性化されることが知られている (文献 1)。また、グアノシン (G) およびイミダゾキノリン誘導体 (IQDs) などの低分子リガンドも TLR7 のアゴニストとして報告された (文献 2-4)。しかし、これらのリガンドによる TLR7 の活性化機構およびリガンドの認識機構は解明されていない。一方、TLR7 を標的とした低分子アンタゴニストも開発されており (文献 5)、これらのアンタゴニストによる TLR7 の阻害機構も明らかになっていない。

## 【方法】

ショウジョウバエ S2 細胞発現系を用いて、構造解析および性状解析に適したサル TLR7 細胞外領域の高純度精製タンパク質を調製した。X 線結晶構造解析により TLR7 と複数の低分子アゴニストおよび ssRNA との複合体構造を解明した。ゲルろ過クロマトグラフィー (SEC) 分析、超遠心分析、等温滴定型カロリメトリー法 (ITC) 分析および細胞アッセイなどの生化学解析により、詳細な TLR7 のアゴニストリガンド認識機構および活性化機構を明らかにした。

さらに、クライオ電子顕微鏡解析 (Cryo-EM) により、TLR7/アンタゴニスト複合体構造を決定し、低分子アンタゴニストによる TLR7 の阻害機構を明らかにした。

## 【結果】

### 1. アゴニストによる TLR7 の活性化機構

#### 1.1. TLR7 は二種類のアゴニストリガンドを認識する

ITC 分析により、TLR7 と G との弱い結合および poly-U ssRNA との強力な結合をそれぞれ見出した (表 1)。また、SEC 分析および超遠心分析では polyU のみの結合は TLR7 の二量体形成を誘導しないことがわかった。興味深いことに、SEC 分析および超遠心分

表 1. ITC による TLR7 と polyU および G との結合親和性

Cell			Titrant		$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )
$C_{\text{TLR7}}$ ( $\mu\text{M}$ )	RNA	$C_{\text{RNA}}$ ( $\mu\text{M}$ )	Ligand	$C_{\text{ligand}}$ ( $\mu\text{M}$ )	
100			Guanosine	1000	13.5
10			polyU_19mer	100	0.37
10			polyU_12mer	100	0.08
10			polyU_9mer	100	0.09
10			polyU_6mer	100	0.22
30	polyU_19mer	30	Guanosine	250	0.93
30	polyU_12mer	30	Guanosine	300	1.2
30	polyU_9mer	30	Guanosine	300	1.6
30	polyU_6mer	30	Guanosine	300	1.5

析では polyU と G の共存下では TLR7 の明確な二量体形成が観察された。これらの結果と一致して、ITC 分析において、G と TLR7 の結合は polyU 存在下では polyU 非存在化に比べて約十倍強くなった (表 1)。以上の結果から、強い親和性を持つ 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、TLR7 が二種類のアゴニストリガンドにより協同的に活性化される機構を提唱した。

### 1.2. 天然アゴニストによる TLR7 の活性化機構

G および polyU などの天然アゴニストの認識機構を解明するため、TLR7/G/polyU 三者複合体の結晶構造を明らかにした (文献 6)。TLR7/G/polyU は対称的な 2:2:2 複合体を形成している (図 1)。G は TLR7 の二量体界面における第 1 結合部位 (site 1) に結合しており、TLR7 の二量体化を仲介する。PolyU の断片の UUU が TLR7 の N 末端側の凹面および Z-loop (LRR14 と LRR15 をつなぐ領域) から構成されている第 2 結合部位 (site 2) に結合している。UUU 断片の中間にあるウリジン塩基が TLR7 に特異的に認識されている。以上の結果から、TLR7 は site 1 に対するリガンドとして G、site 2 に対するリガンドとしてウリジンを含む ssRNA、の二種類のリガンドの相乗効果により活性化される二重受容体であると結論付けた。

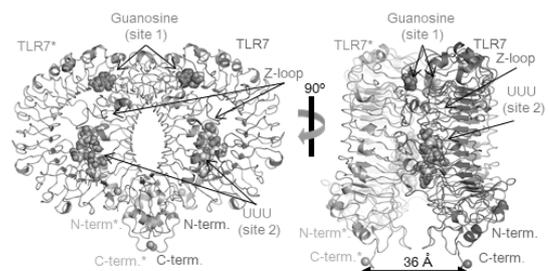


図 1. TLR7/G/polyU 三者複合体の結晶構造

さらに、TLR7 の site 2 における ssRNA の配列認識特異性を詳細に調べるため、TLR7 と 13 種類の ssRNA との共結晶構造を解明した。その結果、五種類の ssRNA (UUUUUU, AAUUA, CCUCC, GGUUGG, GUCCC) について、ssRNA の電子密度が観測された (図 2)。そのうち、四つの ssRNA は連続したウリジン塩基を有している。また、TLR7 を発現させた HEK293T 細胞を用いた NF- $\kappa$ B レポーターアッセイを行った結果、連続したウリジンを持つ ssRNA が連続したウリジンを持たない ssRNA より高い TLR7 活性化を示した。以上の結果から、TLR7 は連続したウリジン塩基を含む ssRNA を優先的に認識すると結論付けた。

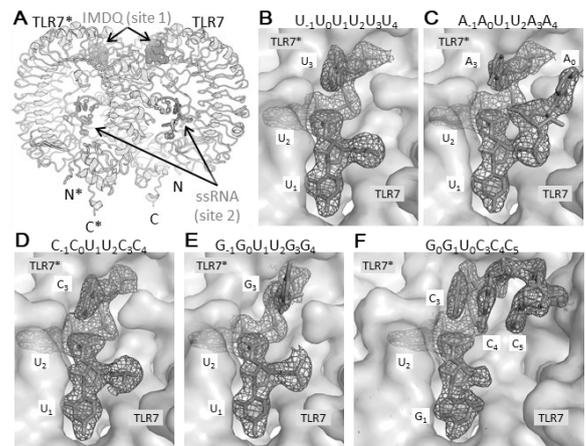


図 2. TLR7 による ssRNA の塩基認識特異性

(A) TLR7/IMDQ/ssRNA 複合体の結晶構造

(B-F) Site 2 における五種類の ssRNA の認識機構

### 1.3. 合成低分子アゴニストによる TLR7 の活性化機構

TLR7 と様々な低分子アゴニストとの結合を SEC 分析で検証した結果、リガンドの種類により TLR7 が異なる程度の二量体化を示した。強力な低分子アゴニストである R848 や GS9620 では明確な TLR7 二量体化が観察された。

低分子アゴニストによる TLR7 の活性化の構造基盤を解明するため、TLR7/R848, TLR7/Imiquimod, TLR7/Gardiquimod, TLR7/CL075, TLR7/CL097 および TLR7/GS9620 の 6 種類の複合体の結晶構造

を解明した (文献 6,7)。すべての TLR7/低分子アゴニスト複合体構造は 2:2 複合体を形成しており、TLR7/G/polyU 三者複合体の構造とほとんど一致している。いずれの低分子アゴニストも TLR7 の site 1 に結合し、この部位での相互作用

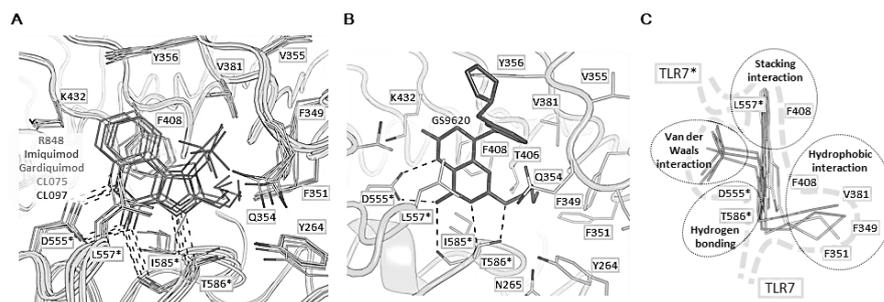


図 3. 低分子アゴニストの認識機構

(A) IQDs の認識機構 (B) GS9620 の認識機構 (C) TLR7 の site 1 における四種類の相互作用を用いて TLR7 の二量体化を引き起こす (図 3A,B)。TLR7 による低分子アゴニストの認識機構は主に四種類の相互作用に分類することができる (図 3C) : 1) 三環系・二環系骨格と F408 および L557\* とのスタッキング相互作用 ; 2) 三つの N 原子を用いた D555\* および T586\* との水素結合 ; 3) 疎水性官能基と site 1 の疎水性ポケットとの疎水性相互作用 ; 4) Site 1 の入口とのファンデルワールス相互作用。以上の四種類の相互作用は TLR7 の低分子アゴニストの結合能を大きく定義する。

## 2. アンタゴニストによる TLR7 の阻害機構

### 2.1. アンタゴニストによる TLR7 の構造変化

低分子アンタゴニストによる TLR7 の阻害機構を解明するため、まず各リガンド存在下での TLR7 の会合状態をクロスリンク実験で検証した。その結果、アンタゴニスト Cpd-6 および Cpd-7 は、アゴニスト Cpd-3 と同じく、TLR7 の二量体の形成を

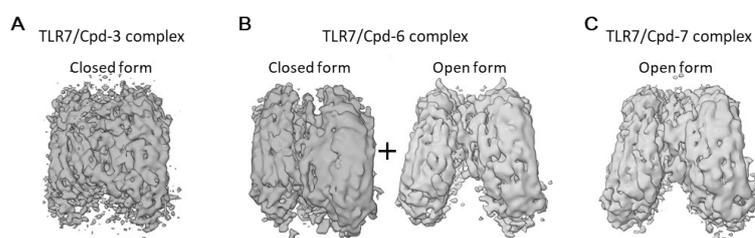


図 4. 三種類の TLR7/リガンド複合体の Cryo-EM 解析

誘導した。次に、Cryo-EM により TLR7/Cpd-3, TLR7/Cpd-6 および TLR7/Cpd-7 複合体の構造解析を実施した (図 4)。TLR7/Cpd-3 複合体の Cryo-EM 解析では結晶構造で示した活性化型二量体とよく一致したクローズ型二量体が観察された。TLR7/Cpd-6 ではクローズ型およびオープン型の二種類の異なるコンフォメーションが観察された。阻害活性のより強い Cpd7 では、主にオープン型コンフォメーションが観察された。これらの結果から、Cpd-6 および Cpd-7 により誘導される TLR7 二量体は、クローズ型 (活性化型) とオープン型 (不活性化型) のコンフォメーション間の動的な平衡状態のため、安定な活性化状態を保持できず、不活性の阻害状態となると結論付けた。

### 2.2. TLR7 によるアンタゴニストの認識機構

Cpd-7 の詳細な認識機構を可視化するため、TLR7/Cpd-7 複合体について Cryo-EM 解析により 2.8 Å 分解能の密度マップを得て (図 5A)、オープン型コンフォメーションの TLR7 分子構造を構築した (図 5B)。オープン型二量体とクローズ型二量体では、二量体化界面の位置が大きく異なっている。オープン型の方は C 末端同士が離れているため、細胞内における TIR ドメインの二量体化が抑制された

不活性化型であると考えられる。Cpd-7は新たに同定されたアンタゴニスト結合部位に結合している (図 5C)。このアンタゴニスト結合部位は TLR7 の二量体界面の中心に位置し、クローズ型での site 1 と空間的に近く、一部共通した残基が両方の結合部位に含まれているが、両者におけるリガンド結合機構は大きく異なっている。Cpd-7は特徴的な疎水性相互作用および水素結合により認識されており、オープン型 TLR7 の構造を安定化している。

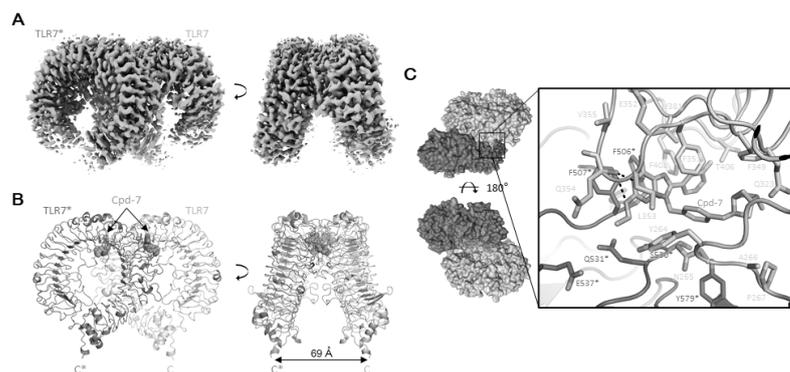


図 5. TLR7/Cpd-7 複合体の Cryo-EM 構造

(A) TLR7/Cpd-7 複合体の Cryo-EM マップ (B) TLR7/Cpd-7 複合体の Cryo-EM 構造 (C) アンタゴニスト結合部位の拡大

### 【結論】

TLR7/G/polyU 三者複合体の結晶構造を決定し、TLR7 が G および ssRNA により相乗的に活性化される二重受容体として機能する分子機構を解明した。また、TLR7 と一連の低分子アゴニストおよび ssRNA の共結晶構造により、詳細な低分子アゴニスト認識機構および ssRNA の塩基認識特異性を解明した。さらに、Cryo-EM 解析により、TLR7 の低分子アンタゴニストによる阻害機構の分子基盤を解明した。本研究によって得られた知見は、TLR7 をターゲットとしたウイルス感染症および自己免疫疾患の治療法の開発に構造基盤を提供する。

### 【参考文献】

1. Heil, Florian, et al. "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." *Science* 303.5663 (2004): 1526-1529.
2. Hemmi, Hiroaki, et al. "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway." *Nature immunology* 3.2 (2002): 196-200.
3. Heil, Florian, et al. "The Toll - like receptor 7 (TLR7) - specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily." *European journal of immunology* 33.11 (2003): 2987-2997.
4. Shibata, Takuma, et al. "Guanosine and its modified derivatives are endogenous ligands for TLR7." *International immunology* 28.5 (2016): 211-222.
5. Tojo, Shingo, et al. "Substituted purine derivative." (WO2017188287A1) (2017)
6. Zhang, Zhikuan, et al. "Structural analysis reveals that Toll-like receptor 7 is a dual receptor for guanosine and single-stranded RNA." *Immunity* 45.4 (2016): 737-748.
7. Zhang, Zhikuan, et al. "Structural analyses of Toll-like receptor 7 reveal detailed RNA sequence specificity and recognition mechanism of agonistic ligands." *Cell reports* 25.12 (2018): 3371-3381.
8. Tojo, Shingo, et al. "Structural analysis reveals TLR7 dynamics underlying antagonism." *Nature communications* 11.1 (2020): 1-11.