

## 審査の結果の要旨

氏名 張志寛

Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) は、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。TLR は病原体の分子パターンの認識を行う細胞外ロイシンリッチリピート (LRR) ドメイン、一回膜貫通ヘリックスおよびシグナル伝達を行う細胞内 TIR ドメインから構成されている。一般的に TLR はリガンド非結合状態では単量体であり、アゴニストが結合することによって活性化型の 2 量体となり、免疫活性化シグナルが伝達されることが知られている。

TLR7 は RNA ウイルス由来の一本鎖 RNA (ssRNA) を認識し、RNA ウイルスによる感染症と関与している。また、TLR7 はグアノシン (G) および R848 などの低分子アゴニストにも活性化されると知られている。これまでは、TLR7 の立体構造およびアゴニストによる活性化機構は未知であった。一方、TLR7 の過剰な活性化は自己免疫疾患の発症と関連していると知られている。そのため、TLR7 のアンタゴニストも開発されているが、これらのアンタゴニストの作用機序および TLR7 の阻害機構の分子基盤に関しては不明であった。

本論文は、TLR7 について、アゴニストによる活性化機構およびアンタゴニストによる阻害機構の解明を目的とした構造生物学的な研究成果を述べたものである。

まずアゴニストによる TLR7 の活性化機構の解明について記す。構造解析に適した高純度の TLR7 タンパク質を調製するため、サル TLR7 細胞外ドメインをショウジョウバエ S2 細胞で発現させた。正常な機能を持つ TLR7 タンパク質を得るため、自己阻害に関わる Z-loop 領域をトロンビンで切断した。ゲル濾過クロマトグラフィーと超遠心分析などの様々な生化学解析により以下のことを見出している。①TLR7 は ssRNA と低分子アゴニストを協同的に認識すること②リガンド非結合型の TLR7 は単量体であること③Polyuridine (polyU) は TLR7 と強く結合するが、TLR7 の 2 量体形成を引き起こさない。④G は TLR7 の 2 量体化をわずかに誘導するが、R848 は強く TLR7 の 2 量体化を誘導する。⑤ITC 分析において、G または R848 などの低分子アゴニストと TLR7 の結合は polyU 存在下では polyU 非

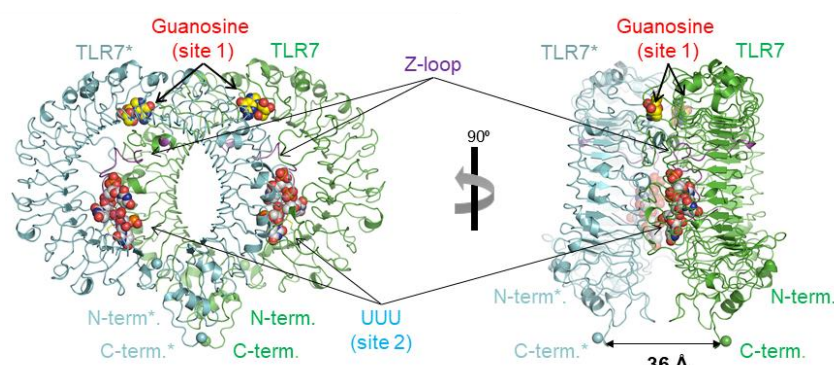


図 1 : TLR7/G/polyU 三者複合体の結晶構造

存在化に比べて約 5~10 倍強くなる。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た。

天然アゴニストによる TLR7 の活性化機構を可視化するため、TLR7/G/polyU 三者複合体の結晶構造を決定した (図 1)。TLR7/G/polyU は 2:2:2 複合体を形成しており、G は TLR7 の 2 量体界面における site 1 に結合しており、TLR7 の 2 量体化を直接に誘導する。PolyU の断片の UUU が TLR7 の N 末端側の凹面および Z-loop から構成されている site 2 に結合している。Site 2 は 2 量体界面の近傍に位置しており、polyU の結合はアロステリックに TLR7 の 2 量体を安定化する。結晶構造から、site 1 はヌクレオシドの中に G を特異的に認識し、site 2 においては非末端ウリジン塩基 (U) は ssRNA の結合に必須であることが明らかになった。

さらに、site 2 における ssRNA 認識の配列特異性を同定するため、TLR7 と 13 種類の ssRNA との共結晶構造を解明した。その結果、連続したウリジン塩基を有する ssRNA が優先的に site 2 に結合することがわかった。

TLR7/天然アゴニスト複合体の構造解析に加え、6 種類の TLR7/合成低分子アゴニスト複合体の結晶構造も決定した (図 2)。合成低分子アゴニストは TLR7 の site 1 に結合しており、G のように TLR7 の 2 量体化を誘導する。合成低分子アゴニストは G と比べて、より多様な相互作用様式を示し、主に 4 種類の特徴的な相互作用を利用して TLR7 の site 1 に結合する。

次に、アンタゴニストによる TLR7 の阻害機構の解明について記す。本論文では、アンタゴニストとして、大日本住友製薬株式会社の東城慎吾博士から供与された Cpd-6 および Cpd-7 を

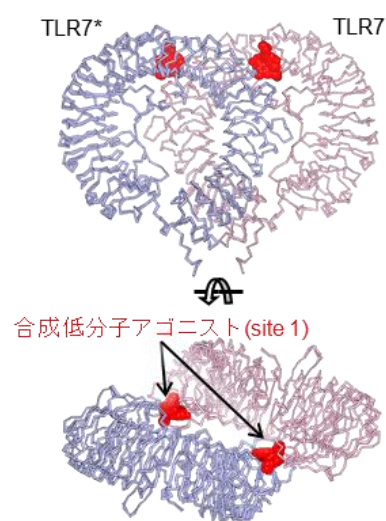


図 2: 6 種類の TLR7/合成低分子アゴニスト複合体の結晶構造の重ね合わせ

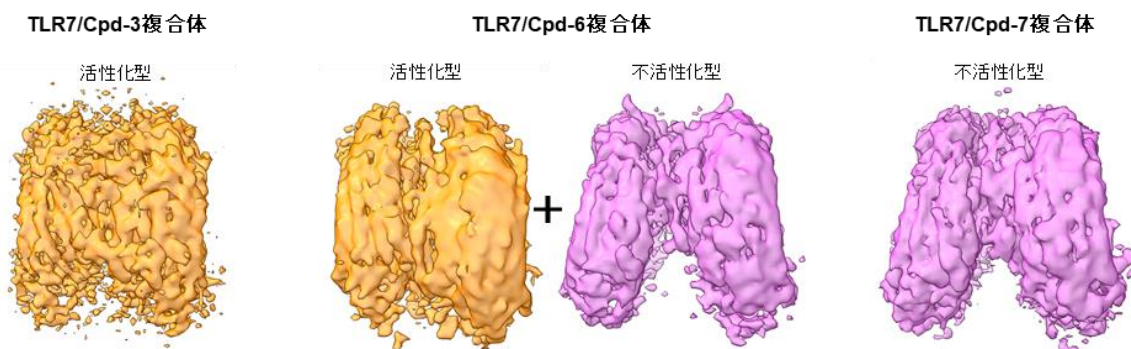


図 3: TLR7/Cpd-3、TLR7/Cpd-6 および TLR7/Cpd-7 複合体の cryo-EM 密度マップ

用いた。これらのアンタゴニストは同社が開発した Cpd-3 (アゴニスト) をリード化合物として開発された。そのうちの Cpd-7 は自然免疫モデルマウスに対して、良好な治療効果を示していた。クロスリンクアッセイおよび ITC 分析の結果から、Cpd-6 と Cpd-7 は TLR7 と直接に結合し、TLR7 の 2 量体化を誘導したことが明らかになった。TLR7/Cpd-6 複合体の結晶構造解析に成功したが奇妙なことに活性化型 2 量体構造を形成しており、この結晶構造からアンタゴニストによる TLR7 の阻害機構の考察は困難であった。

そこで、クライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) 解析を用い、アンタゴニストによる TLR7 の構造変化を観察することにした。TLR7/Cpd-3、TLR7/Cpd-6 および TLR7/Cpd-7 複合体の cryo-EM 構造解析を行った (図 3)。TLR7/Cpd-3 複合体は結晶構造で示した活性化型 2 量体が観察された。TLR7/Cpd-6 では活性化型 2 量体および不活性化型 2 量体の 2 種類の異なるコンフォメーションが観察された。Cpd7 では主に不活性化型 2 量体が観察された。したがって、Cpd-6 および Cpd-7 は TLR7 の不活性化型 2 量体を誘導することで、TLR7 が安定な活性化状態を保持できず、阻害状態となると結論付けた。

さらに、アンタゴニストの詳細な認識機構を可視化するため、TLR7/Cpd-7 複合体の cryo-EM 構造を 2.8-Å 分解能で決定した (図 4)。Cpd-7 は TLR7 の不活性化型 2 量体で新たに見られたアンタゴニスト結合部位に結合していた。この結合部位は活性化型 2 量体の site 1 と空間的に近く、両方で共通する残基もあるが、両者におけるリガンド認識機構は全く共通していない。Cpd-7 は TLR7 と特徴的な疎水性相互作用および水素結合を形成し、TLR7 の不活性化型 2 量体を安定化する。

本研究で、一連の TLR7/アゴニスト複合体の結晶構造を解明し、低分子アゴニストおよび ssRNA の 2 種類のリガンドによる TLR7 の活性化機構を分子レベルで明らかにした。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も解明した。これらの構造的知見は TLR7 を標的とした免疫賦活剤または免疫抑制剤の開発と構造基盤となる。本論文はこれまで不明だったリガンドによる TLR7 の活性化機構および阻害機構を解明したものであり、博士 (薬科学) の学位請求論文として合格と認められる。

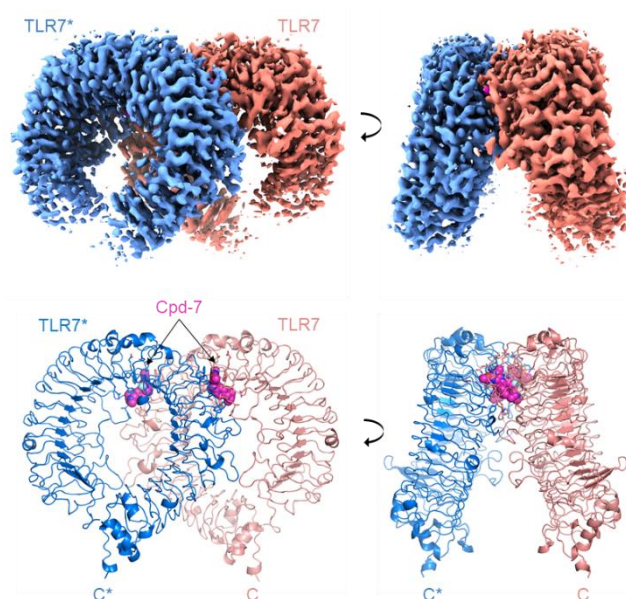


図 4: TLR7/Cpd-7 複合体のクライオ電子顕微鏡構造