

博士論文

自然免疫系一本鎖 RNA 受容体 TLR8 の活性制御機構

丹治 裕美

目次

図目次.....	3
表目次.....	5
略語一覧.....	6
1. 背景.....	8
1.1. TLR について.....	8
1.2. TLR 分子のドメイン構成および活性化機構.....	9
1.3. TLR7 と TLR8 について.....	13
1.4. TLR8 の立体構造.....	14
1.5. Z-loop について.....	16
1.6. CU-CPT 化合物について.....	18
1.7. 本研究の目的.....	19
2. 方法.....	20
2.1. Z-loop 未切断型 TLR8 の構造解析.....	20
2.1.1. 野生型 TLR8 の発現系.....	20
2.1.2. Z-loop 未切断体の発現系の構築.....	23
2.1.3. Z-loop 未切断体の発現系の選択.....	25
2.1.4. 結晶化用サンプル（糖鎖短縮）の調製.....	27
2.1.5. 性状解析用サンプル（糖鎖非短縮）の調製.....	27
2.1.6. ゲル濾過クロマトグラフィー.....	27
2.1.7. ITC.....	28
2.1.8. 結晶化.....	28
2.1.9. X 線結晶構造解析.....	28
2.1.10. NF- κ B リポータージーンアッセイ.....	29
2.2. アンタゴニスト結合型 TLR8 の構造解析.....	30
2.2.1. CU-CPT 化合物マスターストックの調製.....	30
2.2.2. ITC.....	30
2.2.3. 結晶化.....	30
2.2.4. X 線結晶構造解析.....	31
2.2.5. ゲル濾過クロマトグラフィー.....	31
3. 結果.....	33
3.1. Z-loop 未切断 TLR8 の構造解析.....	33
3.1.1. Z-loop 未切断 TLR8 の発現系の選択.....	33
3.1.2. 精製条件の再検討.....	38
3.1.3. ゲル濾過クロマトグラフィーによる会合状態およびリガンド結合能の	

評価.....	42
3.1.4. ITC によるリガンド結合能の評価.....	44
3.1.5. 結晶化と構造決定.....	45
3.1.6. TLR8 ^{Z-loop} と TLR8 ^{wt} の構造の重ね合わせ.....	48
3.1.7. TLR8 ^{Z-loop} のリガンド結合部位.....	50
3.1.8. 活性測定.....	51
3.2. アンタゴニスト結合型 TLR8 の構造解析.....	52
3.2.1. ITC による TLR8 への結合の評価.....	52
3.2.2. ITC による TLR8 へのアゴニスト結合に対する阻害の評価.....	52
3.2.3. 結晶化と構造決定.....	53
3.2.4. 全体構造.....	54
3.2.5. アンタゴニスト結合部位.....	57
3.2.6. アンタゴニスト結合による不活性化型 2 量体の安定化.....	59
3.2.7. アンタゴニストによる TLR8 の 2 量体化.....	59
3.2.8. CU-CPT8m の TLR8 選択性.....	62
4. 考察.....	63
4.1. Z-loop による TLR8 の 2 量体化の阻害.....	63
4.2. アンタゴニストによる TLR8 の 2 量体再構成の阻害.....	64
5. 参考文献.....	66
6. 謝辞.....	71

図目次

図 1.	TLR ファミリーとそのリガンドおよび活性化経路.....	8
図 2.	TLR のドメイン構成及び活性化機構	10
図 3.	TLR のドメイン構成	11
図 4.	リガンド結合型 TLR の立体構造.....	12
図 5.	TLR7/8 のアゴニスト	13
図 6.	TLR8 の結晶構造.....	15
図 7.	TLR7/8/9 のプロトマーの比較	16
図 8.	TLR7/8/9 の Z-loop の配列	17
図 9.	CU-CPT 化合物の構造式.....	18
図 10.	TLR8 発現ベクターの模式図.....	20
図 11.	ヒトおよびマウス TLR7/8/9 のアラインメント	21
図 12.	hTLR8 の塩基配列	22
図 13.	Z-loop 未切断 TLR8 のコンストラクトの作成	34
図 14.	結晶化用 RNRQ 変異体 (2 か所置換, 糖鎖短縮) の精製過程.....	35
図 15.	結晶化用 RNRQ 変異体 (2 か所置換, 糖鎖短縮) の精製過程.....	36
図 16.	結晶化用 NQSN 変異体 (4 か所置換, 糖鎖短縮) の精製過程.....	37
図 17.	結晶化用 TLR8 ^{Z-loop} (糖鎖短縮) の精製過程	39
図 18.	性状解析用 TLR8 ^{Z-loop} (糖鎖非短縮) の精製過程	40
図 19.	TLR8 ^{wt} および TLR8 ^{Z-loop} の精製サンプルの SDS-PAGE.....	41
図 20.	TLR8 ^{wt} および TLR8 ^{Z-loop} のゲル濾過クロマトグラフィー.....	43
図 21.	TLR8 ^{wt} および TLR8 ^{Z-loop} の ITC	44
図 22.	TLR8 ^{Z-loop} の結晶の写真.....	45
図 23.	TLR8 ^{Z-loop} の全体構造	47
図 24.	TLR8 ^{Z-loop} と TLR8 ^{wt} のプロトマーの比較.....	48
図 25.	TLR8 ^{Z-loop} 構造と TLR8 ^{wt} の 2 量体構造の重ね合わせ	49
図 26.	TLR8 ^{wt} の 2 量体構造の表面図	50
図 27.	TLR8 ^{Z-loop} のリガンド結合部位	51
図 28.	TLR8 ^{wt} および TLR8 ^{Z-loop} を発現させた細胞を用いた	51
図 29.	アンタゴニストを用いた ITC	52
図 30.	アンタゴニスト結合型 TLR8 の結晶の写真	53
図 31.	リガンド非結合型・アゴニスト結合型・アンタゴニスト結合型 TLR8 の 2 量体構造.....	55
図 32.	アンタゴニスト結合型およびリガンド非結合型 TLR8 の重ね合わせ.....	55
図 33.	アンタゴニスト結合型およびリガンド非結合型 TLR8 間の C α の変位..	56
図 34.	アンタゴニスト結合型およびリガンド非結合型 TLR8 の温度因子	56

図 35.	アンタゴニストの電子密度.....	57
図 36.	アンタゴニスト結合型・アゴニスト結合型・リガンド非結合型 TLR8 の LRR の配置	58
図 37.	アンタゴニスト結合部位の拡大図.....	58
図 38.	リガンド量依存的な TLR8 の会合状態の変化.....	60
図 39.	リガンド存在下における TLR8 濃度依存的な会合状態の変化	61
図 40.	TLR7 のアンタゴニスト結合部位	62
図 41.	Z-loop およびアンタゴニストによる TLR8 の活性制御機構の模式図	65

表目次

表 1. TLR8 ^{Z-loop} を作成するためのプライマー	24
表 2. TLR8 ^{Z-loop} 構造の回折強度データセット収集および構造精密化の統計値..	46
表 3. アンタゴニスト結合型構造の回折強度データセット収集および 構造精密化の統計値.....	53

略語一覧

A ₂₆₀	absorbance at 260 nm
A ₂₈₀	absorbance at 280 nm
CBB	coomassie brilliant blue
CV	column volume
DMSO	dimethyl sulfoxide
DOTAP	1, 2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane
ds	double-stranded
FBS	fetal bovine serum
h	human
HEK	human embryonic kidney
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration
IFN	interferon
IL	interleukine
IRF	interferon regulatory factor
ITC	isothermal titration calorimetry
K_d	dissociation constant
LPS	lipopolysaccharide
LRR	leucine-rich repeat
m	mouse
MD-2	myeloid differentiation factor 2
MES	2- (<i>N</i> -mopholino) ethanesulfonic acid
MyD88	myeloid differentiation primary response 88
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
PAGE	poly-acrylamide gel electrophoresis
Pam2CSK4	<i>S</i> -[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2 <i>RS</i>)-propyl]-[<i>R</i>]-cysteiny- [<i>S</i>]-seryl-[<i>S</i>]-lysyl-[<i>S</i>]-lysyl-[<i>S</i>]-lysyl- [<i>S</i>]-lysine3CF ₃ COOH
Pam3CSK4	<i>N</i> -palmitoyl- <i>S</i> -[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2 <i>RS</i>)-propyl]- [<i>R</i>]-cysteiny- <i>S</i> -[<i>S</i>]-seryl-[<i>S</i>]-lysyl-[<i>S</i>]-lysyl-[<i>S</i>]-lysyl- [<i>S</i>]-lysine3HCl
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylene glycol
poly (I:C)	polyribinosinic;polyribocytidylic acid
R.M.S.D.	root mean square deviation

S2	Schneider 2
SDS	sodium dodecyl sulfate
ss	single-stranded
TIR	Toll/Interleucine-1 receptor homology
TIRAP	TIR domain-containing adaptor protein
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR domain-containing adapter-inducing interferon- β
Tris	tris (hydroxymethyl)- aminomethane

1. 背景

1.1. TLR について

Toll 様受容体 (Toll-like receptor; TLR) は、病原体の分子パターンを認識して自然免疫を活性化させる I 型膜貫通タンパク質である¹⁻³ (図 1)。ヒトでは TLR1~TLR10 の 10 種類が同定されており、ウイルスや細菌由来の様々な分子を認識する。TLR1/2 と TLR2/6 のヘテロ 2 量体はリポタンパク質を⁴⁻⁷, TLR3 は二本鎖 (double-stranded; ds) RNA を⁸, TLR4 はアダプタータンパク質の myeloid differentiation factor 2 (MD-2) とともにリポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) を^{9,10}, TLR5 はフラジェリンを¹¹, TLR7 および TLR8 は一本鎖 (single-stranded; ss) RNA を¹²⁻¹⁴, TLR9 は CpG DNA を^{15,16}, それぞれ認識する。そのため, TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR9 は主に細菌由来の分子を認識し, TLR3, TLR7, TLR8 は主にウイルス由来の分子を認識する受容体である。TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 は細胞外に, TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 はエンドソームに局在している。

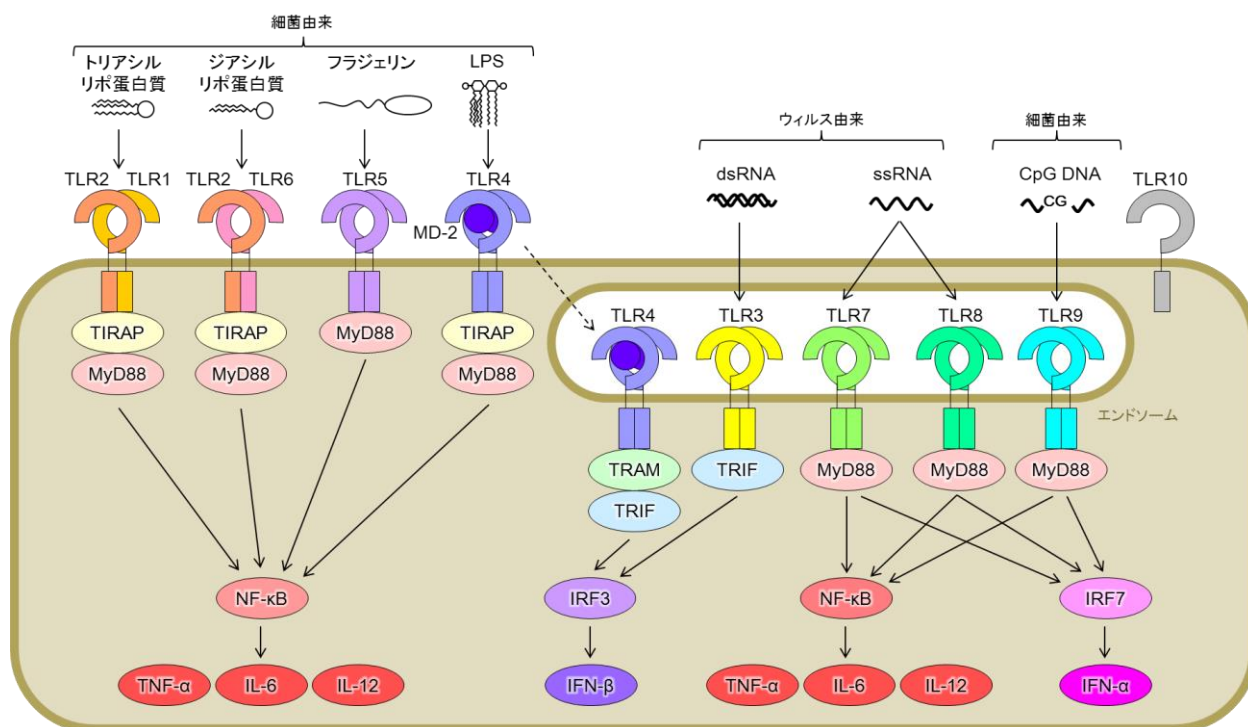


図 1. TLR ファミリーとそのリガンドおよび活性化経路

各 TLR のリガンド, 局在, 活性化経路を示す。Yang and Seki, 2012 を参考に作成した³。

1.2. TLR 分子のドメイン構成および活性化機構

TLR 分子は、リガンド認識を行う細胞外 leucine-rich repeat (LRR) ドメイン、膜貫通領域、細胞内 Toll-interleukin-1 receptor homology (TIR) ドメインから構成される² (図 2)。LRR ドメインを構成する LRR の数は TLR によって異なっており、TLR1~6 の細胞外ドメインは 20~23 個の LRR 単位で構成され、TLR7, TLR8, TLR9 の細胞外ドメインはいずれも 26 個の LRR 単位で構成されている (図 3)。

TLR は一般的に、リガンド非結合状態で不活性化型の単量体であり、リガンド結合によって活性化型の 2 量体を形成し、TIR ドメイン同士が相互作用してアダプター分子をリクルートすることでシグナルを伝えると考えられている¹⁷⁻²¹ (図 2)。各 TLR によって下流のアダプター分子は異なっており、TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 は TIR domain-containing adaptor protein (TIRAP) および myeloid differentiation factor 88 (MyD88) と、TLR3 は TIR domain-containing adaptor-inducing interferon- β (TRIF) と、TLR7, TLR8, TLR9 は MyD88 とそれぞれ相互作用し、活性化経路は MyD88 依存性経路または TRIF 依存性経路に大別することができる^{3,22} (図 1)。また、LPS は TLR4 と TRAM を細胞表面からエンドソームに移行させて TRIF 依存経路を活性化することが知られており、TLR4 は MyD88 依存性経路と TRIF 依存性経路の両者を活性化することができる。これらのアダプター分子は TLR と同様に TIR ドメインを持っており、TIR ドメイン間の相互作用によりシグナルを伝達する。MyD88 依存性経路では最終的に nuclear factor κ B (NF- κ B) が活性化して核内に移行し、tumor necrosis factor (TNF) α や interleukin (IL) -6, IL-12 などの炎症性サイトカインを産生し、炎症を引き起こす。TRIF 依存性経路では interferon regulatory factor (IRF) 3 が活性化して核内に移行し、I 型インターフェロンである interferon (IFN) β を産生して抗ウイルス作用を示す。また TLR7, 8, 9 は NF- κ B に加えて IRF7 も活性化し、その結果 interferon (IFN) α を産生して抗ウイルス作用を示す。

TLR の細胞外 LRR ドメインに関する X 線結晶構造解析により、これまで TLR1~9 のリガンド結合型構造が解明されている (図 4)。具体的には、TLR1/2/リポペプチド複合体¹⁷, TLR2/6/リポペプチド複合体¹⁸, TLR3/dsRNA 複合体¹⁹, TLR4/MD-2/LPS 複合体²⁰, TLR5/フラジェリン複合体²¹, TLR7/ssRNA 複合体²³, TLR8/ssRNA 複合体²⁴, TLR9/CpG DNA 複合体²⁵である。これらのリガンド結合型構造は、いずれも 2 つのプロトマーが C 末端同士で向かい合った m 字型の 2 量体を形成している。TLR1/2 および TLR2/6 では、2 量体の中心付近の LRR で 1 分子のリポペプチドを認識しており、TLR2: TLR1 (TLR6): リポペプチド = 1: 1: 1 の複合体である^{17,18}。TLR3 は、各プロトマーの両端で dsRNA を認識した 2 量体であり、TLR3: dsRNA = 2: 1 の複合体を形成している¹⁹。TLR4 および TLR5 は、2 量体を構成するそれぞれのプロトマーが、2 量体界面側の側面で MD-2/LPS 複合体 (TLR4) またはフラジェリン (TLR5) を認識し、TLR4: MD-2: LPS = 2: 2: 2 および TLR5: フラジェリン = 2: 2 の複合体を形成

する^{20,21}。TLR7, TLR8 はいずれも 2 種類のリガンド結合部位を持ち, TLR7 (TLR8) :
 モノヌクレオシド: ssRNA = 2: 2: 2 の複合体を形成する^{23,24}。また, TLR9 は TLR9: CpG
 DNA = 2: 2 の複合体を形成する²⁵。いずれのリガンドも TLR の 2 量体界面に結合して
 おり, 活性化型 2 量体を安定化している。その結果, 細胞内の TIR ドメインが接近し,
 シグナルを伝達すると考えられる。

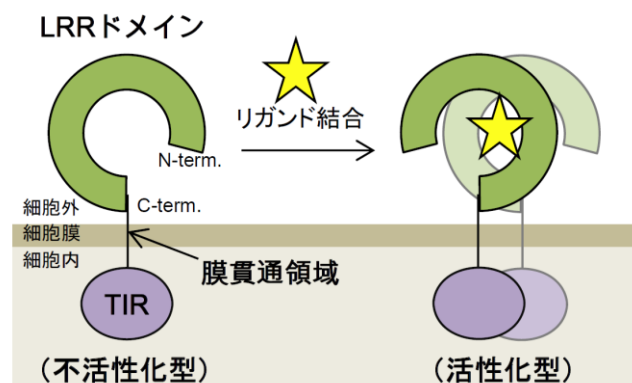


図 2. TLR のドメイン構成及び活性化機構

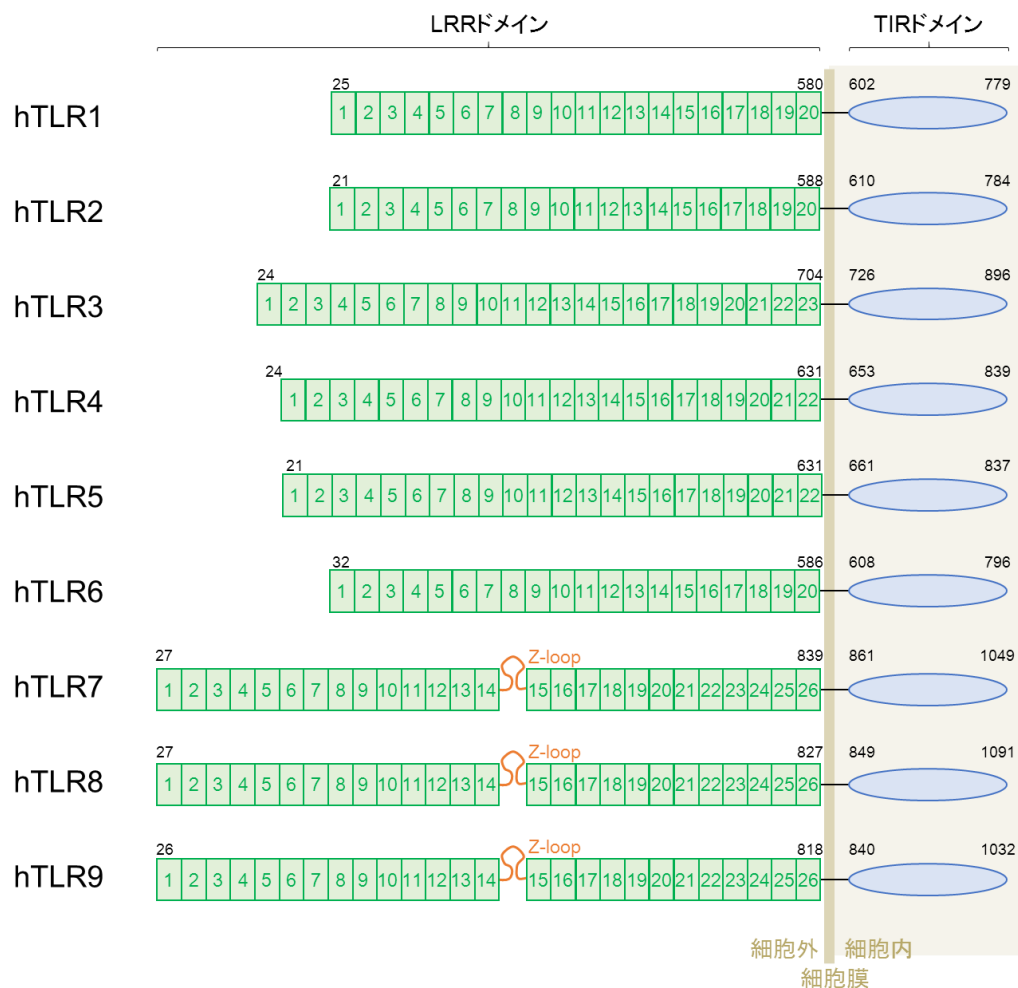


図 3. TLR のドメイン構成

ヒト (human; h) TLR1~9 のドメイン構成。緑色の四角の中は、LRR の番号を記している。各ドメインの末端の残基番号を、黒文字で記す。

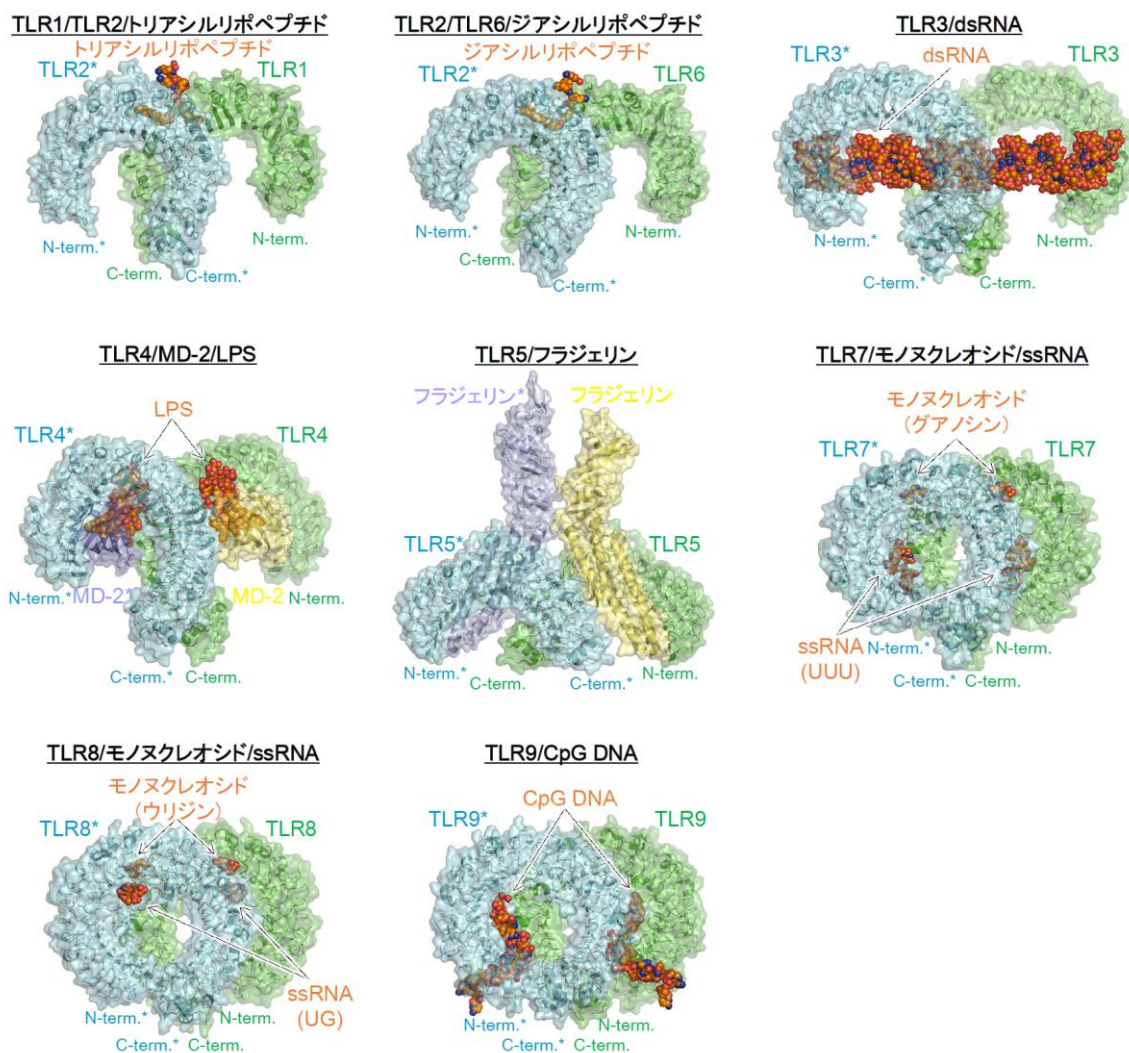


図 4. リガンド結合型 TLR の立体構造

TLR1/TLR2/トリアシルリポペプチド (PDB ID: 2Z7X)¹⁷, TLR2/TLR6/ジアシルリポペプチド (PDB ID: 3A79)¹⁸, TLR3/dsRNA (PDB ID: 3CIY)¹⁹, TLR4/MD-2/LPS (PDB ID: 3FXD)²⁰, TLR5/フラジェリン (PDB ID: 3V47)²¹, TLR7/モノヌクレオシド/ssRNA (PDB ID: 5GMF)²³, TLR8/モノヌクレオシド/ssRNA (PDB ID: 4R07)²⁴, TLR9/CpG DNA (PDB ID: 3WPC)²⁵ の立体構造。各 TLR の 2 量体のそれぞれのプロトマーを緑色および水色で、MD-2 (TLR4/MD-2/LPS 複合体)・フラジェリン (TLR5/フラジェリン複合体) のそれぞれのプロトマーを黄色および紫色で示す。その他のリガンドは球で示し、炭素原子は橙色、酸素原子は赤色、窒素原子は青色で示す。

1.3. TLR7 と TLR8 について

TLR ファミリーを構成する分子のうち、TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 は核酸を認識し、いずれもエンドソームに存在する²⁶ (図 1)。TLR3 は dsRNA を⁸, TLR7 および TLR8 (TLR7/8) は ssRNA を¹²⁻¹⁴, TLR9 は CpG DNA を¹⁵ それぞれ認識する。これらの分子は小胞体膜タンパク質である UNC93B1 によって小胞体からエンドソームに輸送される^{27,28}。TLR7, TLR8, TLR9 (TLR7/8/9) は相同性が高く、一本鎖核酸を認識するサブファミリーを形成している²⁹。また、TLR8 と TLR9 はリガンド非存在下でも既に 2 量体を形成することが示されている³⁰⁻³²。

TLR7/8 はウイルスや細菌由来の ssRNA を認識し、機能的に類似している。両者の発現している細胞は異なっており、TLR7 は主に形質細胞様樹状細胞や B 細胞に、TLR8 は主に単球、樹状細胞、マクロファージ、骨髄系樹状細胞に発現している³³⁻³⁵。TLR7/8 は A 型インフルエンザや HIV-1 などのウイルス感染や^{12,36} 細菌感染に関わっており³⁷⁻³⁹、活性化すると MyD88 経路を用いたシグナル伝達を行い、最終的に炎症性サイトカインやインターフェロンの産生を促して抗ウイルス反応や炎症応答を引き起こす^{12,13}。TLR7/8 は低分子干渉 RNA⁴⁰⁻⁴² や死細胞由来の RNA⁴³ を認識することも示されており、自己免疫疾患との関連が指摘されている。

TLR7/8 が認識する配列はウリジン (U) およびグアノシン (G) リッチな ssRNA であり、HIV-1 の ssRNA から抽出された鎖長が 20-mer の ssRNA40 や、UUGU および UUAU の繰り返し配列で鎖長が同じく 20-mer の ORN06 や ORN02 が知られている^{12,44,45} (図 5A)。その一方で、TLR7/8 は分子量が 200 から 300 程度のイミダゾキノリン系合成低分子リガンドによっても活性化される^{46,47}。たとえば、レシキモド (R848, TLR7/8 の両者を活性化)、イミキモド (TLR7 を特異的に活性化)、CL097 (TLR7/8 の両者を活性化)、CL075 (TLR7/8 の両者を活性化するが、TLR8 をより強く活性化) などである (図 5B)。これらの低分子リガンドは TLR7/8 をターゲットとした治療薬として有望視されており、実際にイミキモドは抗ウイルス剤として臨床応用されている。

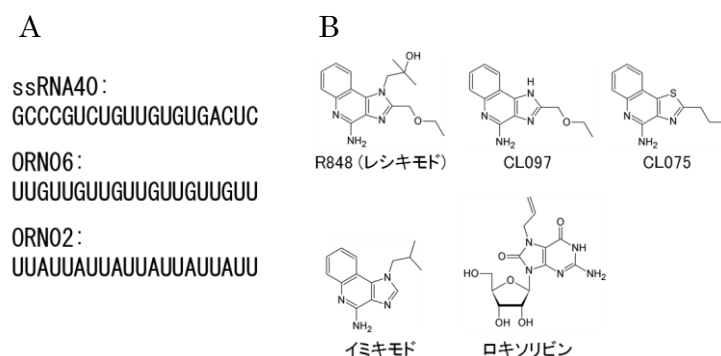


図 5. TLR7/8 のアゴニスト

TLR7/8 のリガンドである ssRNA (A) および低分子化合物 (B)。

1.4. TLR8 の立体構造

筆者らはこれまで TLR8 に関する X 線結晶構造解析に取り組んでおり、その結果アゴニストによる活性化機構を解明した^{32,24} (図 6)。これまで報告した主な構造は、

①リガンド非結合型 TLR8³² ;

不活性化型 2 量体 (図 6A)

②低分子アゴニスト結合型 TLR8³² ;

TLR8: 低分子アゴニスト (R848, CL097 など) = 2: 2 の活性化型 2 量体 (図 6B)

③RNA 結合型 TLR8²⁴ ;

TLR8: ウリジン: UG = 2: 2: 2 の活性化型 2 量体 (図 6C)

の 3 種類に大別される。TLR8 はリガンド非結合状態で既に①の 2 量体を形成しており、この構造は C 末端同士が 53 Å 離れた不活性化型である。②と③は同様の活性化型 2 量体構造であり、アゴニスト結合によって 2 量体の再構成が起これ、C 末端同士が接近 (約 30 Å) している。生体では、C 末端同士が接近することによって細胞内の TIR ドメインも接近し、シグナルを伝達すると考えられる。

TLR8 には 2 箇所のリガンド結合部位が存在する。一つ目は、低分子アゴニストやウリジンを認識する 1st site である (図 6B, C)。このリガンド結合部位は 2 量体界面に存在しており、一つの TLR8 プロトマーの LRR11-13 と、他方の TLR8 プロトマー (TLR8* と表記する。以下では、TLR8* に属する残基や LRR などを、アスタリスクをつけて表記する) の LRR17*-18* で構成されている。1st site にリガンドが結合すると、TLR8 の不活性化型 2 量体から活性化型 2 量体へ再構成が引き起こされる。

二つ目は、ssRNA を認識する 2nd site である (図 6C)。2nd site は、Z-loop とよばれる LRR14 と LRR15 の間のループ (Z-loop, 図 3, 1.5 節参照) と LRR9-13 に挟まれた位置に存在するリガンド結合部位である (図 7)。2nd site は RNA 認識の際に必要であり、2nd site に ssRNA が結合すると 1st site へのリガンド結合が増強される。結晶構造中では 2-mer の UG が観察されている。

TLR7 と TLR8 のリガンド結合部位は、1st site は共通しているものの、2nd site は異なっている^{23,24} (図 4, 図 7)。TLR7 の結晶構造は、

①低分子アゴニスト結合型 TLR7 ;

TLR7: 低分子アゴニスト (R848) = 2:2

②RNA 結合型 TLR7 ;

TLR7: グアノシン: UUU = 2: 2: 2

③低分子アゴニストおよび RNA 結合型 TLR7

TLR7: 低分子アゴニスト (ロキソリビン; 図 5B) : UUU = 2: 2: 2

の 3 種類に大別される²³。TLR7 の 1st site には、低分子アゴニストやグアノシンが結合する。TLR7/8 はいずれも RNA の分解産物のモノヌクレオシドを 1st site で認識する

が、TLR8 ではウリジンを認識するのにに対し TLR7 はグアノシンを認識し、活性化のトリガーとなるモノヌクレオシドが異なっている。TLR7 の 2nd site にはやはり ssRNA が結合し 1st site へのリガンド結合を促進するが、その位置は Z-loop と LRR1-4 に挟まれた箇所であり、TLR8 とは異なる (図 7)。

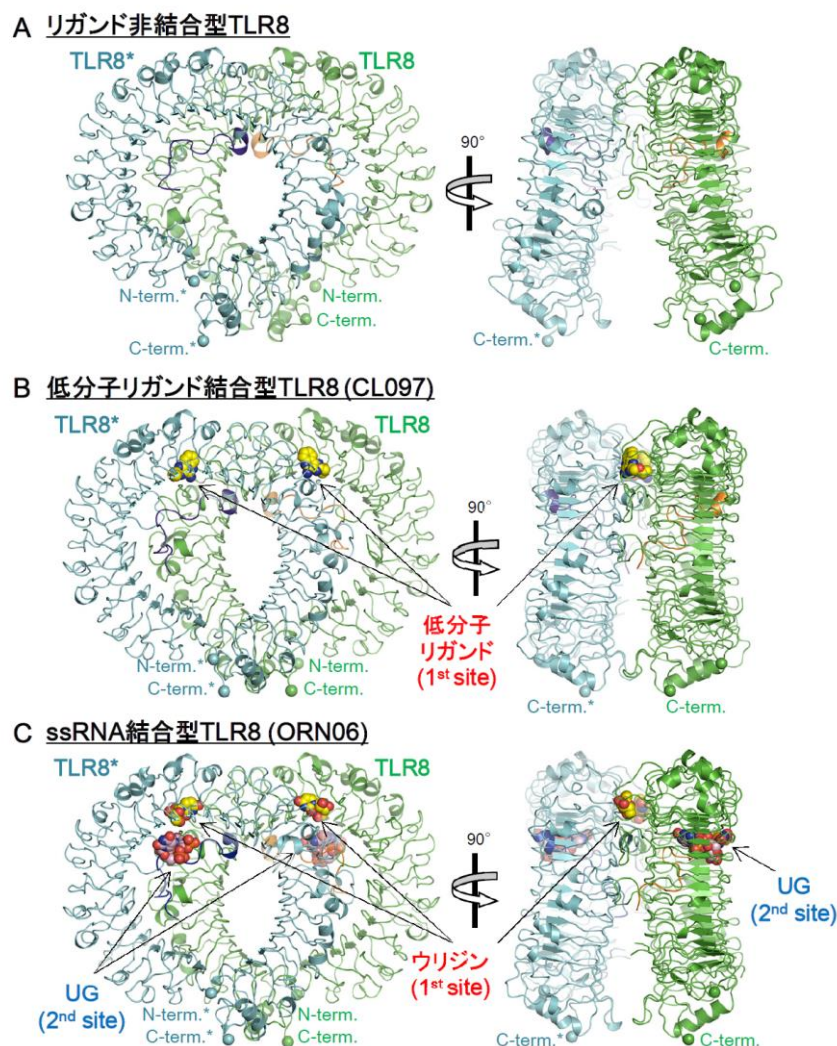


図 6. TLR8 の結晶構造

リガンド非結合型 (A, PDB ID: 3W3G)³², 低分子リガンド結合型 (B, PDB ID: 3W3J)³², RNA 結合型 (C, PDB ID: 4R07)²⁴ TLR8 の 2 量体構造。左には正面図を、右には側面図を示す。2 量体を構成する分子をそれぞれ緑と水色で示し、それぞれの分子の Z-loop は橙色と青色で示している。1st site および 2nd site のリガンドは、炭素原子を黄色 (1st site) または桃色 (2nd site) で、酸素原子を赤色で、窒素原子を青色で示している。

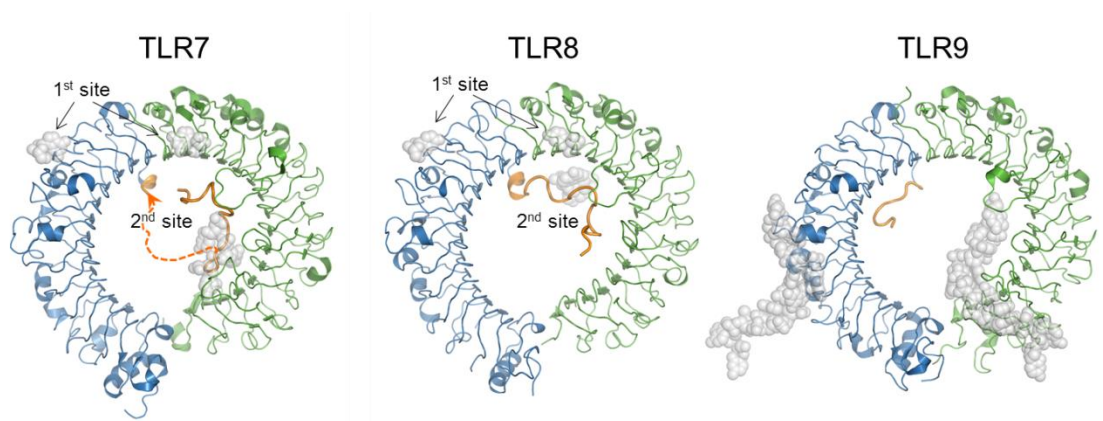


図 7. TLR7/8/9 のプロトマーの比較

TLR7 (左, PDB ID: 5GMF)²³, **TLR8** (中央, PDB ID: 4R07)²⁴, **TLR9** (右, PDB ID: 3WPC)²⁵ のリガンド結合部位の比較。いずれも活性化型 2 量体のプロトマーを表示している。Z-loop より N 末端側 (LRR1~14) は緑色で, Z-loop は橙色で, Z-loop より C 末端側 (LRR15~26) は青色で, それぞれ示している。また, TLR7 中で Z-loop がディスオーダーにより観察されていない箇所は, 点線の矢印で示している。それぞれのリガンドは灰色で示してある。

1.5. Z-loop について

TLR7/8/9 は一本鎖核酸を認識するサブファミリーを形成している。TLR7/8/9 は LRR14 と LRR15 の間に Z-loop と呼ばれる約 40 残基の挿入ループを持ち (図 3), いずれの TLR でもプロテアーゼによって Z-loop が切断されることが活性化に必要であることが報告されている^{25,48-52} (図 8)。例えば TLR8 では, furin-like proprotein convertase によって Z-loop が切断され, さらにカテプシンによって N 末端側のポリペプチドの切断が起こり, 多段階な TLR8 の切断が起こることが示されている⁵² (図 8)。また, Z-loop の切断箇所は TLR7/8/9 で異なっており, TLR8 では Z-loop の N 末端側, TLR7 では Z-loop の半ば, TLR9 では C 末端側で切断が起こる^{50-52,54,55} (図 8)。

TLR8 では, Z-loop の切断によって生じる N 末端側と C 末端側のポリペプチド鎖は細胞内で会合している⁵²。一方で, TLR9 については, リガンド認識およびシグナル伝達には C 末端側のみが必要であるという報告⁴⁹と, N 末端側と C 末端側の両者が必要である報告⁵⁵がある。これまで構造解析に用いられている TLR7/8/9 はいずれも Z-loop で切断されているが, 切断後の N 末端側と C 末端側は会合した構造であり, さらにリガンド認識には N 末端側と C 末端側の両者が関わっている^{23-25,32} (図 7)。しかし Z-loop の未切断状態の TLR7/8/9 の構造は不明であり, Z-loop による活性制御機構は不明だった。

LRR14	xLxxLxLxxN	
hTLR8	NLEI IY LSENRI S PLVKDTRQSY	441
mTLR8	KLDV IY LSGNRI A SVLDGT--DY	
hTLR7	RLKVID LSVNKI S PSGDSSEVGF	
mTLR7	NLKL I D LSVNKI S PSEESREVGf	
hTLR9	GLRYVD L S DNR I S GASELT----	
mTLR9	ALRFVD L S DNR I S GPSTLSE---	
Z-loop		
hTLR8	AN--SSSFQRHIRKRRST--DFEFDPHSNFYHFTRPL-----IKPQCAA	481
mTLR8	S-----SWRNRLRKPLSTD-DDEFDPHVNFYHSTKPL-----IKPQCTA	
hTLR7	CSNARTSVESYEPQVLEQLHYFRYDKYARSCRFFKNKE-ASFMSVNESCYK	
mTLR7	CPNAQTSVDRHGFPQVLEALHYFRYDEYARSCRFFKNKEPPSFLPLNADCHI	
hTLR9	-----ATMGEADGGGEKVWLQPGDLAPAPVDTPSSE-----DFRPNCST	
mTLR9	-----ATPEEADDAEQEELLSADPHAPPLSTPASK-----NFMDRCKN	
LRR15	xLxxLxLxxN	
hTLR8	YGKALDLSLNSIFFIGPNQFENLP	505
mTLR8	YGKALDLSLNNIFIIGKSQFEGFQ	
hTLR7	YGQTLDSLKNSIFFVKSSDFQHLS	
mTLR7	YGQTLDSLNRNNIFFIKPSDFQHLS	
hTLR9	LNFTLDSLNRNNLVTVPQPEMFAQLS	
mTLR9	FKFTMDLSRNNLVTIKPEMFVNLS	




 Furin-like proprotein convertase 認識部位
 Asparagine endopeptidase 認識部位
 未同定のプロテアーゼによる切断部位

図 8. TLR7/8/9 の Z-loop の配列

ヒト (human; h) またはマウス (mouse; m) TLR7/8/9 の、Z-loop におけるアラインメント。Furin-like proprotein convertase および asparagine endopeptidase による切断が報告されている TLR については、それらの切断可能部位を赤色および青色の三角形で、また、プロテアーゼは未同定であるものの切断が報告されている箇所を黄色の三角形で、それぞれ配列上に示した。Sepulveda et al., 2009; Hipp et al., 2013; Kanno et al., 2013; Onji et al., 2013; Ishii et al., 2014 を参考に作成した^{50-52,54,55}。

1.6. CU-CPT 化合物について

TLR7/8 は自己由来の RNA を認識し自己免疫疾患に関与すると考えられている (1.3 節参照)。実際に全身性エリテマトーデスの一部の患者では *TLR8* 遺伝子の変異が存在し, *TLR8* mRNA の発現が亢進していることが報告されている^{56,57}。そのため, TLR7/8 は自己免疫疾患における重要な創薬ターゲットであり, アンタゴニストは自己免疫疾患治療薬の候補になると考えられる。TLR7/8 の活性を阻害する低分子化合物として四環系抗うつ薬であるミアンセリンが報告されているものの, エンドソームに局在する TLR である TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 のすべてを阻害し選択性がないことが問題である⁵⁸。

近年, University of Colorado Boulder の Hang Hubert Yin 教授, 清華大学の Shuting Zhang 博士らによって, CU-CPT8m および CU-CPT9b と呼ばれる 2 種類の新規 TLR8 アンタゴニストが開発された⁵⁹ (図 9)。これ以降では, これら 2 化合物をまとめて CU-CPT 化合物と記す。TLR8 を強制発現させた human embryonic kidney (HEK)-Blue 細胞を用いた活性測定により, 低分子アゴニストによる TLR8 の活性化を CU-CPT 化合物が阻害することが示されている⁵⁹。Half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) は CU-CPT8m では 67 nM, CU-CPT9b では 0.7 nM であり, 十分な阻害活性が認められる。また細胞毒性はいずれの化合物でもほとんど認められない。さらに, 各 TLR を発現した HEK-Blue 細胞をそれぞれのアゴニストで刺激すると, CU-CPT8m は TLR8 のみに阻害活性を示すことから, TLR8 選択的なアンタゴニストである⁵⁹。これらから, CU-CPT 化合物は有望な薬剤候補であると考えられていたが, TLR8 との複合体の構造は未知であり, 活性制御機構は不明だった。

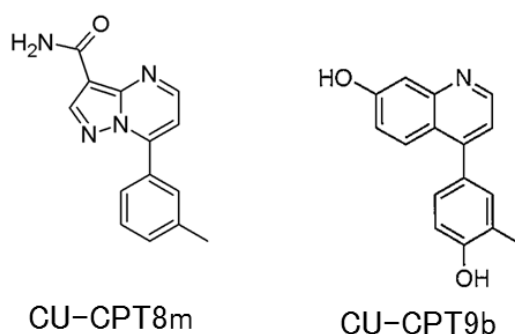


図 9. CU-CPT 化合物の構造式

CU-CPT8m (左) および 9b (右) の構造式⁵⁹。

1.7. 本研究の目的

これまでの研究によってアゴニストによる TLR8 の活性化機構が明らかになっているものの、TLR8 の阻害機構はいまだに不明であった。

TLR7/8/9 では LRR14 と LRR15 の間に Z-loop が存在し、プロテアーゼによる Z-loop の切断が活性に必要であることが示されていることから^{25,48,51,52,49,50}、Z-loop による TLR7/8/9 に共通した活性阻害が存在する可能性がある (1.5 節参照)。しかし Z-loop の未切断状態の TLR7/8/9 の構造は不明であり、活性制御機構は不明だった。本研究では、未切断の Z-loop による TLR8 の活性阻害機構を解明することを目的として、Z-loop 未切断体 TLR8 の構造解析に取り組んだ。この目的に基づいて行った研究について、2.1 節、3.1 節、4.1 節で、それぞれ、方法、結果、考察を記した。この内容は、Tanji *et al.* *PNAS*, 2016 に記載した。

また、近年、TLR8 のアンタゴニストである CU-CPT 化合物が開発された⁵⁹。CU-CPT 化合物の阻害活性は十分であり、細胞毒性も低いことから、有望な創薬候補だと考えられるが、TLR8 への作用機序は不明だった (1.6 節参照)。本研究では CU-CPT 化合物の結合部位および作用機序を明らかにするため、アンタゴニスト結合型 TLR8 の構造解析に取り組んだ。この目的に基づいて行った研究について、2.2 節、3.2 節、4.2 節で、それぞれ、方法、結果、考察を記した。この内容は、S. Zhang *et al.* *Nat. Chem. Biol.* 2018 に記載した。

2. 方法

2.1. Z-loop 未切断型 TLR8 の構造解析

2.1.1. 野生型 TLR8 の発現系

野生型 TLR8 (TLR8^{wt}) の発現系は、先行研究によって確立されたプロトコルを用いた³²。この項では、そのプロトコルを記す。

タンパク質の発現には、*Drosophila* Expression System (Invitrogen) の pMT/BiP/V5-His B 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 – ヒト (*human; h*) TLR8^{wt} 細胞外ドメイン全長遺伝子 (アミノ酸残基 27-827) – *Eco* RI – トロンビン認識配列遺伝子 – *protein A* タグ遺伝子 – *Age* I で置換したプラスミド (TLR8^{wt} ベクターと呼ぶ) を用いた (図 10~図 12)。TLR8 ベクターを作成する際に用いた遺伝子は、*Nco* I-野生型 *hTLR8* の細胞外ドメイン全長遺伝子 (*LRR1-26*, アミノ酸残基 27-827) – *Eco* RI であり、*Drosophila melanogaster* 用にコドン最適化して合成した (GenScript に依頼, 図 11, 図 12)。今後、hTLR8^{wt} 細胞外ドメインを TLR8^{wt} と表記する。この遺伝子を発現させると、RSPW (*Bgl* II および *Nco* I 由来の配列) – TLR8^{wt} (27-827 残基) – EF (*Eco* RI 由来の配列) – LVPRGS (トロンビン認識配列) – *protein A* タグ となることが予想される。

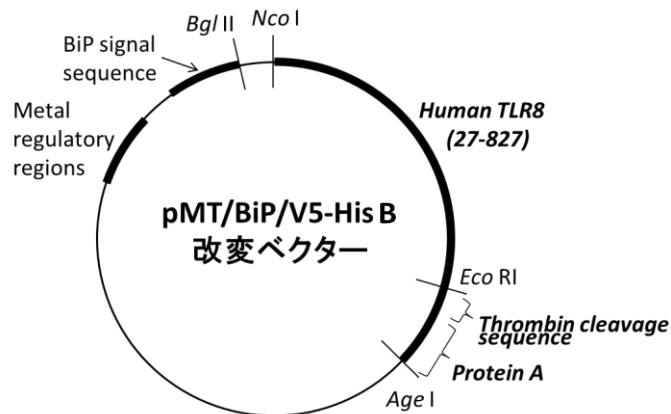


図 10. TLR8 発現ベクターの模式図

TLR8^{wt} ベクターの模式図。pMT/BiP/V5-His B 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 – hTLR8^{wt} 細胞外ドメイン全長遺伝子 – *Eco* RI – トロンビン認識配列遺伝子 – *protein A* タグ遺伝子 – *Age* I で置換したプラスミドを用いた³²。

Signal sequence		Z-loop	
hTLR8 MENMFLQSSMLTCIFLLISGSCELCA mTLR8 MENMPPQSWILTCFCLLSGTSIAIFH hTLR7 MVFPMTLKRQILILFNNIILISKLLG mTLR7 MVFSMWTKRQILILFNNMLVSRVFG hTLR9 -MGFCRSALHPLSLVLQAIMLAMTLA mTLR9 -MVLRRRTLHPLSLVLQAAVLAECLA		hTLR8 AN--SSSFQRHIRKRRST--DFEFDPHSNFYHFTKPL-----IKPQCAA mTLR8 S-----SWRNRRLRKPLSTD-DDEFDPHVNIFYHSTKPL-----IKPQCTA hTLR7 CSNARTSVESYEPQVLEQLHYFRYDKYARSCRFKNKE-ASFMSVNESCYK mTLR7 CPNAQTSVDRHGPGVLEALHYFRYDEYARSCRFKNKEPPSFLPLNADCHI hTLR9 -----ATMGADGGGKVMVLPQGDAPAPVDTPPSE-----DFRPNCST mTLR9 -----ATPEADDAAEQEELLSADPHPAPLSTPASK-----NFMDRCKN	481
LRRNT hTLR8 EENFSRSYPCDEKK--QNSVIAECSNRRLQEVPP---QTVGK mTLR8 KANYSRSYPCDEIR--HNSLIVAECHNRQLHEVPP---QTIGK hTLR7 ARWFKPTLPCDVTLDVQPKNHVDCDKHLTEIP---GGIPT mTLR7 FRWFKPTLPCCEVKVNIPEAHVVDCTDKHLTEIP---EGIPT hTLR9 LGTLPAPLPCCELPQ-----HGLVNCNWLFLKSVPHFSMAAPRG mTLR9 LGTLPAPLPCCELPQ-----HGLVDCNWLFLKSVPRFSAAASCS	63	LRR15 hTLR8 YGKALDLSLNSIFFIGPNQFENLP mTLR8 YGKALDLSLNNIIFIIGKSGFEGFQ hTLR7 YQGTLDLSKNNSIFFVKSDFQHLS mTLR7 YQGTLDLSRNNIIFIIPKDFQHLS hTLR9 LNFTLDLSRNNLVTVQPEMFQALS mTLR9 FKFTMDLSRNNLVTIKPEMFVNLS	505
LRR1 hTLR8 YVTELDLSDNFIHTITNESFQGLQ mTLR8 YVTNIDLSDNAITHITKESFQKLQ hTLR7 NTNLTITINHIPDISPASFRHLD mTLR7 NTNLTITINHIPDISPDSPFRRLN hTLR9 NVTSLSSNRIHHLHDSDFAHLP mTLR9 NITRSLISNRIHHLHNSDFVHLS	87	LRR16 hTLR8 DIACLNLSANSNAQVLSGTEFSAIP mTLR8 DIACLNLSFNANTQVFNGETFSMP hTLR7 FLKCLNLSGNLISQTLNGSEFQPLA mTLR7 FLKCLNLSGNTIGQTLNGSEFWPLR hTLR9 HLQCLRLSHNCISQAVNGSQFLPLT mTLR9 RLQCLLSLHNSIAQAVNGSQFLPLT	530
LRR2 hTLR8 xLxxLxLxxN NLTKNLNNHNPNVQHONGNPGIQSNGNITDGAFLNLK mTLR8 NLTKIDLNNHNAQQHPNEN---KNGMNITEGALLSLR hTLR7 HLVEIDFRNCVPIPLGSKNMCKIKRLQKPRFSGLT mTLR7 HLEEDIDLRNCVPIVLLGSKANVCTKRLQIRPGSFGSL hTLR9 SLRHLNLKWNCPVGLSPMH--FPCMTIEPSTFLAVP mTLR9 NLRLNLKWNCPPTGLSLH--FSCMTIEPTFLAMR	125	LRR17 hTLR8 xLxxLxLxxN HVKYLDLTNNRLDFDNASALTELS mTLR8 HIKYLDLTNNRLDFDNNNAFSDLH hTLR7 ELRYLDLFSNNRLDLHSTAFEEHL mTLR7 ELRYLDLFSNNRLDLLYSTAFEEHQ hTLR9 GLQVLDLSHNKLDLYHEHSTFELP mTLR9 NLQVLDLSHNKLDLYHWKSFSELP	554
LRR3 hTLR8 xLxxLxLxxN NLRELLLEDNLQLPQIPSGLPE mTLR8 NLTVLLLEDNLQTYIPAGLPE hTLR7 YKSLYLDGNQLEIPQGLPP mTLR7 DLKALYLDGNQLEIPQDLPS hTLR9 TLEENLNSYNNIMTVPA-LPK mTLR9 TLEENLNSYNGITTVP-RPS	146	LRR18 hTLR8 xLxxLxLxxN DLEVLDSLNSHYFRTAGVTHHLEFIQNFT mTLR8 DLEVLDSLNSHAHYFSTAGVTHRLGFIQNLI hTLR7 KLEVLDSLNSHYFQSEGITHMLNFTKNLK mTLR7 SLEVLDSLNSHYFQAEGITHMLNFTKKLR hTLR9 RLEALDSLNSQPFMGQGVGHNFSPVAHLR mTLR9 QLQALDSLNSQPFMSMKGTGHNFSPVTHLS	584
LRR4 hTLR8 xLxxLxLxxN SLTELSLIQNNIYNITKEGISRLI mTLR8 SLKELSLIQNNIFOVTKNNTFGLR hTLR7 SLQLLSLEANNIFSRKENLTSLA mTLR7 SLHLLSLEANNIFSIITKENLTSLV hTLR9 SLTSLSLSHNTNLMDSASLACLH mTLR9 SLVNLSLSHNTNLVLDSANLAGLY	170	LRR19 hTLR8 xLxxLxLxxN NLKVLNLSNNIYTLTDKYNLESK mTLR8 NLRVLNLSNGIYTLTESESELKSI hTLR7 VLQKLMNNDNDISSSTSR-TMESD mTLR7 LDDKLMNNDNDISTSASR-TMESD hTLR9 TLRHLSLAHNNIHSQVSQ-QLCST mTLR9 MLQSLSLAHNDIHTRVSS-HLNSN	608
LRR5 hTLR8 xLxxLxLxxN NLKNLYLAWNCYFN-KVCEKTNIEDGVFETLT mTLR8 NLRLYLGLWNCYF--KCNQTFKVEDGAFKNLI hTLR7 NIEILYLGQNCYYRNPYVSYSEKDAFLNLT mTLR7 NIEITLYGQNCYYRNPYVSYSEKDAFLVMR hTLR9 ALRFLFMDGNCYYKNPQRQALEVAPGALLGLG mTLR9 SLRVLFMDGNCYYKNPCTGAVKVPFGALLGLS	201	LRR20 hTLR8 xLxxLxLxxN SLVELVFSGNRLDILWDDDNRYISIFKGLK mTLR8 SLKELVFSGNRLDRLWANDGKYWSIFKSLQ hTLR7 SLRTELFNGHLDVLWREGDNRYLQLFKNLL mTLR7 SLRILEFRGNHLDVLWRAGDNRYLDFKKNLF hTLR9 SLRALDFSNGALGHMAEGD-LYLHFFQGLS mTLR9 SVRFDFSNGMGMRWDEGG-LYLHFFQGLS	639
LRR6 hTLR8 xLxxLxLxxN NLLELSLSFNSLSHVPPKPLS mTLR8 HLKVLDSLNNLFVYVPPKPLS hTLR7 KLKVLDSLKNNVTAVPTVPLS mTLR7 NLKVLDSLKNNVTAVPTTLLP hTLR9 NLTHLSLKYNNLTVPVPRNLP mTLR9 NLTHLSLKYNNLTKVPRQLPP	222	LRR21 hTLR8 xLxxLxLxxN NLTRLDLSLNNRLKHIPNEAFLNLP mTLR8 NLTRLDLSYNNLQOIFNGAFLNLP hTLR7 KLEELDLSKNLSLPLFGVFDGMP mTLR7 NLEVLDSLNSNLSLPPVFEGMP hTLR9 GLIWLDSLQNRHLTLPTQLRNLPK mTLR9 GLLKLDSLQNNHLTLRPNQLDNLPK	664
LRR7 hTLR8 xLxxLxLxxN SLRKFLPLSNTQIKYISEEDFKGLI mTLR8 SLRKFLPLSNAKIMNTIQEDFKGLE hTLR7 TLTELYLYNNMIAKIQEDDFNNLN mTLR7 NLLELYLYNNIHKIQEDDFNNLN hTLR9 SLEYLLSYNRIKVLAPEDLANLT mTLR9 SLEYLLSVYNLIVKLGPEDLANLT	246	LRR22 hTLR8 xLxxLxLxxN SLTELHNDNMLKFFNNTLLQQFP mTLR8 SLQELLLSGNKLRFFNNTLLQYFP hTLR7 NLKNLSLAKNGLKSFWSKKLQCLK mTLR7 NLKNLSLAKNGLKSFWDRLQLLK hTLR9 SLQVLRDRDNYLAFKWSLHFLP mTLR9 SLKLLSLRDNYSLFFNNTLSFLP	688
LRR8 hTLR8 xLxxLxLxxN NLTLDDLSGNCPRCFNAPFCVPCDGGASINIDRFQNLTL mTLR8 NLTLDDLSGNCPRCYNAPFCPTCKENSIHHPAFQSLT hTLR7 QLQIDDLSGNCPRCYNAPFCAPCKNNSPLOIPVNAFDALT mTLR7 ELQVDDLSGNCPRCYNVYPCPTCENNSPLQIHNAFNSLT hTLR9 ALRVLDVGGNCRCDHAPNCEMCPRRHF-PQLHDPDTFSHLS mTLR9 SLRVLDVGGNCRCDHAPNCEEGQKS-LHLHPETFHHL	287	LRR23 hTLR8 xLxxLxLxxN RLELLDRGNKLLFLTDSLSDFTS mTLR8 HHLDDLRSNELYFLPNCLSKFAH hTLR7 NLETLDLSHNQTLTVPERLNSCSR mTLR7 HEITLDLSHNQTLKVPERLANCSK hTLR9 KLEVLDLAGNQLKALTNGSLPAGT mTLR9 NLEVLDLAGNQLKALTNGTLPNGT	712
LRR9 hTLR8 xLxxLxLxxN QLRYLNLSSSTSLRKINAAWFKNMP mTLR8 QLLYLNLSSSTSLRTIPSTWEFLS hTLR7 ELKVLRLHSNSLQHPVPRWKNNIN mTLR7 ELKVLRLHSNSLQHPVPTWKNMR hTLR9 RLEGLVLKDSLSWLNASWFRGLG mTLR9 HLEGLVLKDSLSLHTINSSWFQGLV	311	LRR24 hTLR8 xLxxLxLxxN SLRTLSSNHRISHLPSGFLSEVS mTLR8 SLETLLSSNHRISHLPSGFLSEAR hTLR7 SLKMLLKNNGQSLTKVFLQDAF mTLR7 SLTTLILKNNGIQLTKVFLQDAL hTLR9 RLRLDVSNCNLSVAPGFFSKAK mTLR9 LLQKLDVSSNSIVSVVPAFFALAV	736
LRR10 hTLR8 xLxxLxLxxN HLKVLDELFNYLVGEIAGSAGFTMLP mTLR8 NLKELHLEFNYLVGEIAGSAGFTKLP hTLR7 KLQELDDLSONFLAKEIGDAKFLHLP mTLR7 NLQELDDLSONFLAREIEEAKFLHLP hTLR9 NLRVLDLSENFLYKCIKTAKAQGLT mTLR9 NLVLDLSENFLYESITHTNFAQNL	337	LRR25 hTLR8 xLxxLxLxxN SLKHLDLSSNLLKTIKSALETKTTT mTLR8 NLVHLDLSPNTIKMINKSSLOTKMKT hTLR7 QLRYLDLSSNKIQIQTSPFENVLN mTLR7 QLRYLDLSSNKIQIQTSPFENVLN hTLR9 ELRELNLSANALKTVDHSWFGP-LAS mTLR9 ELKEVNLSHNLIKTVDRSWFGP-IVM	762
LRR11 hTLR8 xLxxLxLxxN RLEILDLSFNKYIGSPQHINISRNFSKLL mTLR8 SLQILDLSFNFYQKEYLQFINISSNFSKL hTLR7 SLIQILDLSFNFLQVYRASNNLSQAFSSLK mTLR7 NLVELDFSFNFLQVYHASITLPHSLSSLE hTLR9 QLRKLNLFSFNQKRVSPAHLSLAPSGSLV mTLR9 RLRKLNLFSFNRRKVSFARHLASSFKNLV	367	LRR26 hTLR8 xLxxLxLxxN KLSMLELHGNPFE mTLR8 NLSLELHGNFYD hTLR7 NLKMLLLHNNREL mTLR7 NLEMLVHNNREL hTLR9 ALQILDVSNAPLH mTLR9 NLTVLDVRSNPLH	775
LRR12 hTLR8 xLxxLxLxxN SLRALHLRGYVFQELREDDQPLMQLP mTLR8 SLKKLHLRGYVFRLEKKHFEHLQSLP hTLR7 SLKILIRRGYVFKEKLSFNLSPLHNLQ mTLR7 NLKILRVKGYVFKEKLNSSLSVLHKL hTLR9 ALKELDMHGIFFRSLDETTLRPLARLP mTLR9 LQELNMNGIFFRSLNRYTLRLWLADLP	394	LRRCT hTLR8 CTCDIGDFRRMWDEHLNVKIPRLVD-VICASPGDQRGKSIVSLEITTCVSDVT mTLR8 CTCDISDFRSWLDENLNTIPKLVN-VICSNPGDQKRSKIMSLELTTTCVSDTT hTLR7 CTCDAVFVWVWVN-HTEVTIPLYLATDVTCVGPGAHKGQSVISLDLYTCELDLT mTLR7 CNCDAVFWVWVWVN-HTDVTIPLYLATDVTCVGPGAHKGQSVISLDLYTCELDLT hTLR9 CACGAAFMDLLE--VQAAVFGPLPSRVKCGSPGQLQGLSIFAQDLRLCLDEAL mTLR9 CACGAAFVDLLE--VQTVFVGLANGVKCGSPGQLQGRSIFAQDLRLCLDEVL	827
LRR13 hTLR8 xLxxLxLxxN NLSTINLGINFIKQIDFKFLQNF mTLR8 NLATINLGINFIKIDFKAFQNF hTLR7 NLVLDLGTNFIKIANLSMPKQFK mTLR7 RLEVLDLGTNFIKIADLNIKFHE hTLR9 MLQTLRLQMNFINQAQLGIFRAPF mTLR9 KLHTLHLQMNFINQAQLSIFGTFR	418	N型糖鎖結合可能部位 (hTLR8)	
LRR14 hTLR8 xLxxLxLxxN NLEIYLSNRSPLVKDTRQSY mTLR8 KLDVIYLSGNRIASVLDTG--DY hTLR7 RLKVIDLSVKNISPSGDSSEVGF mTLR7 NLKLIDLVSKNISPSSESRVGF hTLR9 GLRYVDLSNRSIGASELT--- mTLR9 ALRFVDLSNRSIGSPSLTSE---	441		

図 11. ヒトおよびマウス TLR7/8/9 のアラインメント
 赤色の矢印は N 末端配列分析より明らかになった TLR8^{wt} における Z-loop の切断部位 (Arg455 と Ser456 の間) を, 黄色は N 型糖鎖結合可能部位を, それぞれ示している³²。

CCATGG

GAGGAGAATTTTCAGCCGAGTTATCCGTGCGATGAGAAGAAGCAGAATGACAGCGTGATTGCCGAGTGCTCCAAC
CGCCGCTGCAGGAGGTGCCCCAGACAGTGGGCAAGTACGTGACCGAGCTGGACCTGAGCGATAACTTTATCACG
CACATTACAAATGAGTCCTTCCAGGGACTGCAGAACCTGACAAAGATCAACCTGAATCACAACCCAAATGTGCAG
CATCAGAACGGCAATCCCGGCATCCAGAGCAACGGCCTGAATATCACCGACGGAGCCTTCTGAACCTGAAGAAT
CTGCGCGAGCTGCTGCTGGAGGATAACCAGCTGCCGCAGATTCCATCCGGCCTGCCAGAGTCGCTGACGGAGCTG
AGTCTGATCCAGAACAACATCTACAACATCACAAGGAGGGAATCTCCCGCCTGATCAACCTGAAGAATCTGTAC
CTGGCCTGGAAGTCTATTTCAATAAGGTGTGCGAGAAGACGAACATCGAGGACGGCGTGTGTTGAGACCCTGACG
AATCTGGAGCTGCTGTCCCTGTCGTTCAACAGTCTGAGCCACGTGCCACCAAGCTGCCAAGCTCCCTGCGCAAG
CTGTTTCTGAGCAACACCCAGATCAAGTATATTTCCGAGGAGGACTTCAAGGGCCTGATCAATCTGACGCTGCTG
GATCTGAGCGGAAACTGCCCCGCTGCTTAAATGCCCCATTCCCATGCGTGCCATGCGACGGAGGAGCCTCCATC
AACATTGATCGCTTCGCCTTTCAGAATCTGACCCAGCTGCGCTACCTGAACCTGTGAGTACGAGCCTGCGCAAG
ATTAACGCCGCTGGTTCAAGAATATGCCGCACCTGAAGGTGCTGGACCTGGAGTTAACTATCTGGTGGGCGAG
ATCGCCTCCGAGCCTTCTGACCATGTGCCACGCCTGGAGATTCTGGATCTGTCGTTTAACTACATCAAGGGC
AGTTATCCCCAGCACATCAACATTAGTCGAATTTTCAGCAAGCTGCTGTCCCTGCGCGCCCTGCATCTGCGCGGA
TACGTGTTTCAGGAGCTGCGCGAGGATGACTTCCAGCCACTGATGCAGCTGCCAACCTGTGACGATCAACCTG
GGCATCAATTTTCAATTAAGCAGATCGACTTCAAGCTGTTTCAGAACTTCAGCAATCTGGAGATCATTTACCTGAGC
GAGAACCGCATTTCCCGCTGGTGAAGGATACCCGCCAGAGCTATGCCAATAGCTCCTCGTTCCAGCGCCACATC
CGCAAGCGCCGCTCGACAGACTTCGAGTTTGATCCACACAGTAACTTTACCATTTACCCGCCCCCTGATCAAG
CCACAGTGCGCCGCTATGGCAAGGCCCTGGACCTGTCCCTGAACTCGATTTTCTTTATCGGACCGAACCAGTTC
GAGAATCTGCCAGATATTGCCTGCCTGAATCTGAGTGCCAACAGCAATGCCAGGTGCTGTGGGACCGGAGTTT
AGTGCCATCCCACATGTGAAGTACCTGGATCTGACCAACAATCGCCTGGACTTCGATAACGCCAGCGCCCTGACG
GAGCTGTCCGACCTGGAGGTGCTGGATCTGTCTACAATTCGCACATTTCCGCATTGCCGGCGTGACACACCAT
CTGGAGTTTATCCAGAACTTCACCAATCTGAAGGTGCTGAATCTGTCCATAACAATATTTACACACTGACCGAC
AAGTATAACCTGGAGTCCAAGTCGCTGGTGGAGCTGGTGTGTTTCGGGCAATCGCCTGGATATCCTGTGGAACGAT
GACGATAATCGCTACATCTCCATTTTCAAGGGACTGAAGAATCTGACGCGCCTGGACCTGTGCTGAACCGCCTG
AAGCACATTCCCAACGAGGCCTTCTGAATCTGCCGGCCTCGCTGACGGAGCTGCATATCAACGACAATATGCTG
AAGTTCTTTAACTGGACACTGCTGCAGCAGTTCCCACGCCTGGAGCTGCTGGATCTGCGCGGCAATAAGCTGCTG
TTTCTGACCGACAGTCTGAGCGATTTACCCAGTAGCCTGCGCACGCTGCTGCTGTCCACAACCGCATTTTCGCAT
CTGCCGAGTGGAATCCTGAGCGAGGTGTCTCGCTGAAGCACCTGGATCTGAGTAGCAACCTGCTGAAGACGATC
AATAAGTCGGCCCTGGAGACAAAGACCACGACAAAGCTGAGCATGCTGGAGCTGCACGGCAACCCGTTTGAGTGC
ACCTGCGACATCGGAGATTTCCGCGCTGGATGGACGAGCATCTGAATGTGAAGATTCCGCGCCTGGTGGATGTG
ATCTGCGCCTCCCCAGGCGACCAGCGCGGAAAGAGCATTTGTGAGTCTGGAGCTGACGACCTGCGTGAGTGATGTG
ACG

GAATTC

図 12. hTLR8 の塩基配列

黒文字はショウジョウバエ用にコドン最適化した hTLR8 細胞外ドメインの遺伝子（アミノ酸配列 27-827）を、青文字（CCATGG, GAATTC）はそれぞれ制限酵素 *Nco I* および *Eco RI* 認識配列を示している³²。

2.1.2. Z-loop 未切断体の発現系の構築

先行研究に従って発現させた TLR8^{wt} は, IgG アフィニティークロマトグラフィー後に既に Z-loop 中の R452-K453-R454-R455 の直後で切断されている³²。この切断部位は, Ishii らによって報告された Z-loop の切断部位と同じ箇所である⁵²。培養中にプロテアーゼによって Z-loop の切断が起こっていると考え, 切断付近に変異を導入してプロテアーゼ耐性にする事で, Z-loop が未切断になる変異体を得ることを目指した。

まず, TLR8^{wt} の発現ベクターに polymerase chain reaction (PCR) によって変異を導入した。鋳型 DNA は, QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) で精製した TLR8^{wt} ベクター (2.1.1 項参照) を用いた。変異を導入するためのプライマーを合成し (Operon に依頼, 表 1), RKRR を NQSN (すべて置換), RNQN (3 残基置換), NQRN (3 残基置換), NKNQ (3 残基置換), RNRQ (2 残基置換), RKNQ (2 残基置換) に置換させた 6 種類の遺伝子を PCR により作成した。PrimeSTAR MAX DNA Polymerase (Takara) を用いて PCR 反応を行い, PCR 反応液と Jet Competent Cell DH5α (Biodynamics Laboratory Inc.) を混合してトランスフォーメーションし, Plusgrow II (40 g/L, nacalai tesque) /アンピシリンナトリウム (100 µg/mL, nacalai tesque) を含む寒天培地に撒いて 37°C で一晩インキュベートした。翌日, コロニーをピックアップして 100 µg/mL アンピシリンナトリウム存在下で Plusgrow II 液体培地にて振とう培養し, シークエンス解析用には QIAprep Spin Miniprep Kit (Quiagen) を, トランスフェクション用には PureLink HQ Mini Plasmid Purification Kit をそれぞれ用いて DNA を精製した。シークエンス解析用 DNA を用いて, シークエンス解析を行い (fasmac に依頼), いずれの DNA も目的位置に変異が入っていることを確認した。

先行研究に従ってトランスフェクション用 DNA を用いて Schneider 2 (S2) 細胞にトランスフェクションを行い, hygromycin による選択培養を行い, 安定発現株を作成した³²。以下では, そのプロトコルを示す。TLR8^{wt} ベクターおよび pCoHygro ベクター (*Drosophila* Expression System に同梱) を大腸菌にトランスフォーメーションし, PureLink HQ Mini Plasmid Purification Kit (Invitrogen) を用いて DNA を精製した。24 ウェルプレートに 0.5×10^6 cells の *Drosophila* S2 細胞 (Invitrogen) を撒いて底面に接着させた。精製した TLR8 ベクター 2 µg と pCoHygro ベクター 80 ng を, 3 µL の Cellfectin II Reagent (Invitrogen) を用いてプロトコルに従ってトランスフェクション溶液を調製し, 先の細胞にトランスフェクションを行った。4 時間後 10 mL/L Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (nacalai tesque), Sf-900II SFM (Thermo Fisher Scientific) を 1 mL/ウェルで添加してトランスフェクションを停止した。翌日, 細胞を 6 ウェルプレートに 300 µg/mL Hygromycin B Solution (50 mg/mL, nacalai tesque), 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco), 10 mL/L Penicillin-Streptomycin

Mixed Solution, Sf-900II SFM を用いて植え継ぎ, hygromycin による選択を行った。FBS は、65℃で 1 時間加熱し非働化を行ったものを用いた。

約 3 週間選択培養を行い hygromycin 存在下で増殖することを確認してから、27℃にて浮遊培養した。以後、300 µg/mL Hygromycin B solution, 1 mg/L Gentamicin Sulfate Solution (10 mg/mL, nacalai tesque), 1 mL/L Fungizone Antimycotic, Liquid (Gibco), 10 mL/L Penicillin-Streptomycin Mixed Solution, Sf-900II SFM を用いて細胞を継代培養した。これを安定発現株とする。

発現確認のため、安定発現株を 12 ウェルプレートに継代用 SF900II SFM 2 mL 使用して 1×10^6 cells/well で撒き、終濃度 0.5 mM となるように 1 M CuSO₄ を添加して誘導を開始し、4 日間 27℃でインキュベートした。上清を回収し、10 µL IgG Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) を添加して、振動させながら室温で 4 時間吸着させた。樹脂は phosphate buffered saline (PBS) で平衡化したものを使用した。PBS による IgG セファロース樹脂の洗浄を 3 回行った後、15 µL の 0.2 M glycine-HCl pH 3.5 で溶出を行い、溶出液を sodium dodecyl sulfate-poly-acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) により発現を確認した。ゲルは rapid stain CBB (nacalai) を用いた coomassie brilliant blue (CBB) 染色を行った。

本項の結果は、図 13B, 3.1.1 項に記した。

表 1. TLR8Z-loop を作成するためのプライマー

NQSN 置換体	forward	AACCAGAGCAACTCGACAGACTTCGAGTTTGAT
	reverse	CGAGTTGCTCTGGTTGATGTGGCGCTGGAACGA
RNQN 置換体	forward	CGCAACCAGAACTCGACAGACTTCGAGTTTGAT
	reverse	CGAGTTCTGGTTGCGGATGTGGCGCTGGAACGA
NQRN 置換体	forward	AACCAGCGCAACTCGACAGACTTCGAGTTTGAT
	reverse	CGAGTTGCGCTGGTTGATGTGGCGCTGGAACGA
NKNQ 置換体	forward	AACAAGAACCAGTCGACAGACTTCGAGTTTGAT
	reverse	CGACTGGTTCTTGTTGATGTGGCGCTGGAACGA
RNRQ 置換体	forward	CGCAACCGCCAGTCGACAGACTTCGAGTTTGAT
	reverse	CGACTGGCGGTTGCGGATGTGGCGCTGGAACGA
RKNQ 置換体	forward	CGCAACAACCAGTCGACAGACTTCGAGTTTGAT
	reverse	CGACTGGTTGTTGCGGATGTGGCGCTGGAACGA

2.1.3. Z-loop 未切断体の発現系の選択

2.1.2 項で作成した 6 種類の置換体のうち、発現量が多かった RNQN 置換体 (3 か所置換) と RNRQ 置換体 (2 か所置換), また、これらに比べて発現量は少ないものの、切断箇所の直前の 4 残基がすべて置換されている NQSN 置換体 (4 か所置換) の 3 種類について、大量培養および精製を行った。

発現から IgG アフィニティーカラムによる精製までは、先行研究の TLR8^{wt} の大量培養および精製糖鎖のプロトコルに従った³²。以下では、そのプロトコルを示す。培養には、培地として 5 mL/L Penicillin-Streptomycin, 100 mL/L 200 mM-L-Glutamine Stock Solution (nacalai tesque), Express Five SFM (Gibco) を使用して 100 rpm で旋回培養し、細胞密度が 1×10^6 から 2×10^6 cells/ml 程度になった時点で終濃度 0.5 mM となるように CuSO_4 を加えて誘導を開始し、約一週間旋回培養を行って各置換体を分泌発現させた。hTLR8 には 21 箇所の N 型糖鎖結合可能部位があり、結晶化用に糖鎖切断酵素 Endo H_f 感受性の糖鎖を付加させるために、誘導と同時に糖鎖合成経路の阻害剤であるキフネンシンを終濃度 1.5 mg/L になるように添加した (図 11)。

培養液の上清を回収し、IgG Sepharose 6 Fast Flow にアプライし、PBS でカラムの洗浄を行った後、100 mM Glycine-HCl pH 3.5, 0.15 M NaCl で溶出を行った。Superdex 200 100/300 GL (column volume; CV = 24 mL, GE healthcare) ゲル濾過カラムに IgG アフィニティーカラムからの溶出液を 1 mL アプライし、サンプルの性状を確認した。バッファーは 10 mM tris (hydroxymethyl)-aminomethane (Tris) ·HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl を用い、流速 1 mL/min で行った。検出は 280 nm および 260 nm の吸光度 (Absorbance at 280 nm; A₂₈₀, Absorbance at 260 nm; A₂₆₀) を測定した。

RNRQ 置換体 (2 か所置換) では、Amicon Ultra-50 (Merck) を用いた限外濾過により濃縮し、10 mM 2- (N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) ·NaOH pH 5.5, 0.15 M NaCl にバッファー置換してさらに濃縮した。A₂₈₀ = 29 になったところで、1 mg のタンパク質 (A₂₈₀ = 1 のとき蛋白質は 1 mg/mL と計算) に対し Endo H_f 1,000 U を加え、室温で一晩静置して、糖鎖の短縮を行った。15,000 rpm で約 5 分遠心を行って沈殿を除去し、上清を Superdex 200 100/300 GL ゲル過カラムにアプライし、置換体の分子量相当のピーク (17.0-18.5 min 程度) を分取した。ゲル濾過クロマトグラフィーの条件は、前段落の条件に倣った。ゲル濾過カラムから分取したサンプルを Amicon Ultra-50 を用いて濃縮し、A₂₈₀ = 10 になった時点で、タンパク質 1 mg (A₂₈₀ = 1 のときタンパク質は 1 mg/mL と計算) に対しトロンビン 1 U を加え、室温で一静置して protein A タグを切断した。陽イオン交換クロマトグラフィー用 A バッファー (10 mM MES·NaOH pH 5.0) を用いて 4 倍希釈したところ沈殿が生じたため、15,000 rpm で 3 分程度遠心分離を行い、上清を HiTrap SP (CV = 5 mL, GE healthcare) 陽イオン交

換カラムにアプライした。A バッファー (10 mM MES-NaOH pH 5.0), B バッファー (10 mM MES-NaOH pH 5.0, 1 M NaCl) を用い, 10 分で B バッファーを 0% から 100% までグラジエントをかけ, 置換体を溶出させた。SDS-PAGE を行い, サンプルの状態を確認した。

RNQN 置換体 (3 か所置換) でも RNRQ 置換体と同様に精製を行い, トロンビンと Endo H_f で酵素処理を行ったサンプルを Superdex 200 100/300 GL ゲル濾過カラムにアプライし, 分子量相当 (14.0-17.0 min 程度) を分取した。ゲル濾過クロマトグラフィーの条件は, RNRQ 置換体の際の条件に倣った。各ステップでのサンプルを SDS-PAGE を行った結果, ゲル濾過クロマトグラフィー後のサンプルで 37 kDa から 50 kDa の間に Z-loop で切断されたと考えられるバンドが観察され, サンプルの半分以上をこの切断体が占めていたため, これ以上の精製は行わなかった。

NQSN 置換体 (4 か所置換) では, Amicon Ultra-50 を用いた限外濾過により濃縮し, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl にバッファー置換してさらに濃縮した。A₂₈₀ = 9 になったところで, タンパク質 1 mg (A₂₈₀ = 1 のときタンパク質は 1 mg/mL と計算) に対し トロンビン 1 U を加え, 室温で 2 時間静置して protein A タグを切断した。そのうち, 終濃度 0.1 M となるように 1 M 酢酸バッファー pH 5.0 を加えて pH を酸性にし, さらに 1 mg のタンパク質 (A₂₈₀ = 1 のときタンパク質は 1 mg/mL と計算) に対し Endo H_f 1,000 U を加え, 室温で一晩静置した。サンプルを Superdex 200 100/300 GL ゲル濾過カラムをにアプライし, 置換体の分子量相当のピーク (14.0-16.5 min 程度) を分取した。ゲル濾過クロマトグラフィーの条件は, RNRQ 置換体の際の条件に倣った。分取したサンプルを Amicon Ultra-50 を用いて A₂₈₀ = 14 になるまで濃縮した。A バッファー (10 mM MES-NaOH pH 5.0) を用いて 4 倍希釈し, HiTrap SP (CV = 5 mL) 陽イオン交換カラムに 3 mL/min でアプライした。A バッファー (10 mM MES-NaOH pH 5.0), B バッファー (10 mM MES-NaOH pH 5.0, 1 M NaCl) を用い, 20 分で B バッファーを 0% から 60 パーセントまでグラジエントをかけ, 置換体を溶出させた。A₂₈₀ を測定し, ピーク 1 (4.4~7.7 分程度), ピーク 2 (8.7~10.2 分程度), ピーク 3 (10.2~13.5 分程度) を分取し, これらの SDS-PAGE を行った。ピーク 3 のフラクションを Amicon Ultra-50 を用いてバッファーを 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl に交換し, 10 mg/mL まで濃縮した。

NQSN 置換体は Z-loop 未切断体 TLR8 の割合が多く, 陽イオン交換クロマトグラフィーにより切断体と未切断体を分離できたことから, 以降では NQSN 置換体を用いて実験を行うことにした (3.1.1 項参照)。これ以降, NQSN 置換体から得られる Z-loop 未切断体 TLR8 を, TLR8^{Z-loop} と記す。

本項の結果は、図 14～図 16 および 3.1.1 項に記した。

2.1.4. 結晶化用サンプル（糖鎖短縮）の調製

結晶化用 TLR8^{Z-loop} サンプル（糖鎖短縮）を得るため、キフネンシン存在下で培養を行って EndoH_f 感受性糖鎖を有する TLR8^{Z-loop} を発現させた。細胞培養～IgG セファロースカラムからの溶出までのステップは 2.1.3 項に従い、そのあと濃縮を行わずに HiTrap SP (CV = 5 mL) 陽イオン交換カラムで精製した。A バッファー (20 mM MES-NaOH pH 6.0), B バッファー (2 M NaCl) とし、10 分で B バッファーの濃度を 2% から 50% まで線型的にグラジエントをかけ溶出を行った。流速は 3 mL/min とした。溶出ピークを分取し、トロンビンによるタグの切断と EndoH_f による糖鎖の短縮を行い、再び HiTrap SP カラムを用いて精製した。Amicon Ultra-50 を用いて濃縮および 10 mM MES-NaOH pH 5.5, 50 mM NaCl へバッファー交換し、最終的に 13 mg/mL まで濃縮した。

本項の結果は、図 17, 図 19, 3.1.2 項に記した。

2.1.5. 性状解析用サンプル（糖鎖非短縮）の調製

等温滴定カロリーメトリー (isothermal titration calorimetry; ITC) やゲル濾過クロマトグラフィーなどを用いた性状解析を行うために、性状解析用 TLR8^{Z-loop} (糖鎖非短縮) を調製した。発現時にキフネンシンを加えずに培養し、精製時は EndoH_f による糖鎖の短縮を行わず、それら以外は結晶化サンプル（糖鎖短縮）と同様に調製した (2.1.4 項参照)。最終的に濃度が 10 mg/mL まで濃縮した。サンプルバッファーは 10 mM MES-NaOH pH 5.5, 0.1 M NaCl を用いた。

本項の結果は、図 18, 図 19, 3.1.2 項に記した。

2.1.6. ゲル濾過クロマトグラフィー

TLR8^{Z-loop} 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、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。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 10 mM MES-NaOH pH 5.5, 0.15 M NaCl を用い、流速は 0.5 mL/min とした。コントロールとして TLR8^{wt} を用い、同様の実験を行った。いずれの TLR8 も性状解析用サンプル（糖鎖非短縮）を用いた。

TLR8 は 100 μM とし、低分子リガンドとして R848 (図 5, TLR8 の 10 倍量) を、ssRNA として ORN06 (図 5, TLR8 の等量) を用いた。R848 は超純水で 10 mM に溶解したものをを用いた (Invitrogen)。ORN06 は超純水で 1 mM に溶解したものをを用いた (北海道システム・サイエンスに合成を依頼, HPLC 精製)。サンプルはそれぞれ 50 μL

をインジェクションし、 A_{280} , A_{260} を検出した。分子量マーカーとして Apoferritin (440 kDa), β -amylase (200 kDa), bovine serum albumin (BSA, 67 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa) を用いて検量線を作成して、溶出時間から各サンプルの分子量を計算した。

本項の結果は、図 20 および 3.1.3 項に記した。

2.1.7. ITC

ITC を用いて TLR8^{Z-loop} の低分子リガンドおよび ssRNA への親和性を測定した。装置は MicroCal iTC₂₀₀ (GE Healthcare) を用い、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 120 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。バッファーは 10 mM MES-NaOH pH 5.5, 100 mM NaCl を用い、298 K で測定を行った。

低分子リガンドの親和性の測定については、100 μ M R848 を 15 μ M の性状解析用 TLR8^{Z-loop} (糖鎖非短縮) に滴定した。ssRNA の親和性の測定については、300 μ M ORN06 を 30 μ M の性状解析用 TLR8^{Z-loop} (糖鎖非短縮) に滴定した。いずれのリガンドも、2.1.6 項で用いたものと同じものを用いた。

TLR8^{Z-loop} に対して ORN06 を滴定したデータは、OriginLab software (GE Healthcare) を用いて解析を行い、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結合解離定数 (dissociation constant: K_d) を算出した。TLR8^{Z-loop} に対して R848 を滴定したデータは熱の出入りが観察されなかったため、カーブフィッティングは行わなかった。

本項の結果は、図 21 および 3.1.4 項に記した。

2.1.8. 結晶化

Z-loop 未切断の TLR8 の構造を明らかにするため、結晶化用 TLR8^{Z-loop} (糖鎖短縮) の結晶構造解析を行った。TLR8^{Z-loop} の結晶は、2.1 M 硫酸アンモニウム, 0.1 M 酢酸ナトリウム pH 4.8, 20~30% glycerol を含むリザーバー溶液を用い、タンパク質溶液とリザーバー溶液を 0.75 μ L:0.75 μ L で混合してシッティングドロップを作製して、蒸気拡散平衡法により 293 K で結晶化することで得られた。結晶化用プレートは CrystalClear 'P' strips with platforms (Douglas Instruments Ltd.) を用いた。

本項の結果は、図 22 および 3.1.5 項に記した。

2.1.9. X線結晶構造解析

TLR8^{Z-loop} の結晶の回折強度データセット収集は、PF-AR NE3A (茨城) で行った。

検出器として ADSC QANTUM 270 (CCD) を使用した。

いずれの結晶も CryoLoop (Hampton Research) を用いてマウントし、窒素ガスによるクライオストリーム条件下 (100 K) で急速凍結し、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 4 個の結晶を用いて行い (結晶 1~4 と呼ぶ), いずれも振動角を 0.5°/frame とし, 結晶 1 から露光時間 1 秒で 360 枚, 結晶 2 から露光時間 2 秒で 301 枚, 結晶 3 から露光時間 4 秒で 232 枚, 結晶 4 から露光時間 4 秒で 360 枚のデータを収集した。結晶 4 の測定は抗凍結剤を使用せず, それ以外の結晶のデータ測定時は抗凍結剤として 1.5 M 硫酸アンモニウム, 75 mM 酢酸ナトリウム pH 4.8, 8 mM MES-NaOH pH 5.5, 0.1 M NaCl, 35~40% glycerol に結晶を浸漬して周辺の溶液を置換してから測定を行った。

XDS⁶⁰ を用いて回折データから指数付けと積分処理を行った。放射線損傷の少ないデータを構造解析に用いるため, 結晶 1 から 100 枚の画像を, 結晶 2 から 200 枚の画像を, 結晶 3 から 232 枚の画像を, 結晶 4 から 90 枚の画像を選択してマージし, 各指数に対する回折強度を算出した。

CL097 結合型 TLR8 複合体結晶 (PDB ID: 3W3J) をモデル構造として Molrep⁶¹ を用いた分子置換法によって位相を決定し, COOT⁶¹ によるモデリングと REFMAC⁶² を用いた構造精密化を *R* 因子が十分に下がるまで繰り返し, 最終的なモデル構造を得た。リガンド分子, 糖鎖, 水分子は構造精密化の後の段階で構造に加えた。また, 全反射のうち 5% を cross validation に用いて *R*_{free} 因子を算出した。また, 本論文で用いた構造の図は, PyMOL (<http://www.pymol.org>) を用いて描画した。

本項の結果は, 表 2, 図 23~図 25, 図 27, 3.1.5~3.1.7 項に記した。

2.1.10. NF-κB リポータージーンアッセイ

HEK293T 細胞を用いた TLR8^{Z-loop} および TLR8^{wt} 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。以下は三宅らによる実験である。

TLR8 野生型および TLR8^{Z-loop} の cDNA を挿入した pMX-puro-IRES-rat CD2 (2 μg) および NF-κB レポータープラスミド pELAM1-luc (hE-selectin promoter 領域を含む, 5 ng) を, polyethylenimine 'Max' (Polysciences) を用いて HEK293T 細胞に共トランスフェクションした。細胞は, DMEM (Gibco), 10% FBS, 2 mM L-glutamine (Gibco), 50 μM 2-ME で培養した。20 時間培養後, コラーゲンコートした 96 ウェルプレート (corning) に 1×10⁵ cells/well に再び撒き, 6 時間の前培養を行った。DOTAP を利用して, 1 μg/mL R848 および 25 μg/mL ORN06, または, 1 mM ウリジンおよび 25 μg/mL ORN06 を用いた刺激を行い, Promega Luciferase Assay System を用いたルシフェラーゼアッセイを行った。化学発光の相対発光量は Mini Lumat LB 9506 Luminometer

(EG&G Berthold) で測定した。

本項の結果は、図 28 および 3.1.8 項に記した。

2.2. アンタゴニスト結合型 TLR8 の構造解析

本節では、TLR8^{wt}を単に TLR8 と表記する。

2.2.1. CU-CPT 化合物マスターストックの調製

University of Colorado Boulder の Hang Hubert Yin 教授、清華大学の Shuting Zhang 博士らから、TLR8 のアンタゴニストである CU-CPT8m および CU-CPT9b を供与された (図 9)。これらを 50 mM となるように dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し、マスターストック溶液とした。以降では、このマスターストックを用いた。

2.2.2. ITC

TLR8 に対するアンタゴニストの結合の強さおよびアゴニスト結合の阻害を測定するため、ITC を行った。バッファーは 25 mM MES-NaOH pH 5.5, 0.20 M NaCl, 2.5% DMSO を用いた。TLR8 は先行研究³²に従い調製した性状解析用サンプル (糖鎖非短縮) を用い、CU-CPT 化合物は 2.2.1 項で調製したものをを用いた。ITC の条件は 2.1.7 項に従った。

アンタゴニストの TLR8 に対する親和性の測定には、100 μ M アンタゴニストをシリンジ側のサンプル、10 μ M の TLR8 をセル側のサンプルとして滴定を行った。アンタゴニスト存在下の TLR8 に対する低分子アゴニスト (R848) の親和性の測定には、100 μ M R848 をシリンジ側のサンプルとし、10 μ M TLR8, または、10 μ M TLR8 と 50 μ M アンタゴニストを混合したものをセル側のサンプルとして滴定を行った。データは 2.1.7 項に従って解析を行った。

本項の結果は、図 29, 3.2.1 項, 3.2.2 項に記した。

2.2.3. 結晶化

CU-CPT 化合物と TLR8 の複合体構造を明らかにするため、これらの共結晶化を行った。TLR8 は先行研究³²に従い調製した結晶化用サンプル (糖鎖短縮) を用い、7 mg/mL TLR8 と CU-CPT 化合物をモル比 1:5 で混合して結晶化サンプルとした。結晶化用のタンパク質溶液のバッファー組成は 10 mM MES-NaOH pH 5.5, 150 mM NaCl, 5% DMSO である。CU-CPT 化合物は 2.2.1 項で調製したものをを用いた。

リザーバー溶液として 12.5% polyethylene glycol (PEG) 4000 (Hampton Reserch), 0.2 M CaCl₂ (Nacalai tesque), 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 (Hampton Reserch), 20% ethylene glycol (Nacalai tesque) を用い、結晶化サンプル溶液:リザーバー溶液 = 0.5

μL :0.5 μL から 0.75 μL :0.75 μL でシッティングドロップを作製して、293 K で蒸気拡散平衡法による結晶化を行った。結晶化用プレートは CrystalClear 'P' strips with platforms (Douglas Instruments Ltd.) を用い、CU-CPT8m 結合型 TLR8 結晶を Crystal Probe (Hampton Research) を用いたストリークシーディングを行った。

本項の結果は、図 30 および 3.2.3 項に記した。

2.2.4. X線結晶構造解析

アンタゴニスト結合型 TLR8 の結晶の回折強度データセット収集は、CU-CPT8m 結合型 TLR8 は PF-AR NE3A (茨城)、CU-CPT9b 結合型 TLR8 は PF BL5A (茨城) にて行った。PF-AR NE3A における測定は ADSC QANTUM 270 (CCD)、PF BL5A における測定は ADSC QANTUM 315r (CCD) を検出器として用いた。

いずれの結晶も CryoLoop (Hampton Research) を用いてマウントし、窒素ガスによるクライオストリーム条件下 (100 K) で急速凍結し、波長 1.0000 Å の X 線を照射してデータセットを収集した。0.5°/frame で回転させながら露光時間 0.5 秒で測定し、それぞれ 720 枚の反射イメージを取得した。測定は 100 K で行った。

HKL2000⁶³ または imosflm⁶⁴ を用いてデータセットの処理を行った。CU-CPT8m 結合型 TLR8 の構造は、リガンド非結合型 TLR8 (PDB ID: 3W3G) の構造をモデルとして Molrep⁶¹ を用いた分子置換法によって位相を決定し、COOT⁶¹ によるモデリングと REFMAC⁶² を用いた構造精密化を R 因子が十分に下がるまで繰り返し、モデル構造を得た。リガンド分子、糖鎖、水分子は構造精密化の後の段階で構造に加えた。また、全反射のうち 5% を cross validation に用いて R_{free} 因子を算出した。CU-CPT9b 結合型 TLR8 の構造は、CU-CPT8m 結合型 TLR8 の構造をモデルとして Molrep を用いた分子置換法によって位相を決定し、CU-CPT8m 結合型 TLR8 と同様にモデル構造を得た。また、本論文で用いた構造の図は、PyMOL (<http://www.pymol.org>; 図 37 以外) または CueMol (<http://www.cuemol.org>; 図 37) を用いて描画した。

本項の結果は、図 31~図 36, 図 40, 表 2, 3.2.3~3.2.6 項, 3.2.8 項に記した。

2.2.5. ゲル濾過クロマトグラフィー

TLR8 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、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。カラムは Superdex 200 Increase 5/150 GL (CV = 3 mL, GE Healthcare) を用い、 A_{280} , A_{260} を検出した。バッファーには 25 mM MES-NaOH pH 5.5, 0.20 M NaCl, 5% DMSO を用い、流速は 0.5 mL/min とした。TLR8 は先行研究³² に従い調製した性状解析用サンプル (糖鎖非短縮) を用いた。CU-CPT9b は 2.2.1 項で調製したものを、R848 は 2.1.6 項で調製したものをを用いた。

リガンド量依存的な会合状態の変化を調べるため、1 μM TLR8 に半量, 等量, 2 倍

量, 5 倍量の CU-CPT9b を混合したサンプルのインジェクションを行った。また, コントロールとして, 1 μ M TLR8 に半量, 等量, 2 倍量, 5 倍量, 10 倍量の R848 を混合したサンプルも同様にインジェクションを行った。サンプルはそれぞれ液量 25 μ L をインジェクションした。

濃度依存的な会合状態の変化を調べるため, リガンド非存在下の TLR8 に関しては 0.5, 1, 3, 10, 30, 100, 150 μ M TLR8 を, CU-CPT9b 存在下の TLR8 に関しては 0.3, 0.4, 0.5, 1, 2 μ M TLR8 および 5 倍量の CU-CPT9b を, R848 存在下の TLR8 に関しては 0.5, 1, 2, 3, 5, 10 μ M TLR8 および 5 倍量の R848 を, いずれも液量 50 μ L に調製してインジェクションを行った。

それぞれのリガンド濃度またはタンパク質濃度に対して, 各ピークトップの時間をプロットし, ImageJ を用いてカーブフィッティングを行い, シグモイド曲線を求めた。

本項の結果は, 図 38, 図 39, 3.2.7 項に記した。

3. 結果

3.1. Z-loop 未切断 TLR8 の構造解析

3.1.1. Z-loop 未切断 TLR8 の発現系の選択

Z-loop の切断箇所直前に存在する塩基性アミノ酸が4残基続いている箇所（アミノ酸残基 452~455, アミノ酸配列は RKRR）を2~4残基置換した変異体の遺伝子をPCRによって作成した（図 13A）。この置換体の遺伝子をS2細胞にトランスフェクションし、安定発現株の発現確認を行った結果、NQSN置換体、RNQN置換体、NKNQ置換体、RNRQ置換体が発現し、特にRNQN置換体とRNRQ置換体の発現量が多かった（図 13B）。

2.1.3項に従いRNQN置換体（3箇所置換）およびRNRQ置換体（2か所置換）の結晶化用サンプルの大量培養及び精製を行った結果、精製過程でZ-loop未切断のTLR8が減少し、その代わり37 kDaと50 kDaの間にZ-loopで切断されたと考えられるバンドが増加していた（図 14C, 図 15C）。さらに、切断体と未切断体はゲル濾過クロマトグラフィーおよび陽イオン交換クロマトグラフィーのいずれでも完全にピークが分かれず、分離することが困難だった（図 14B, C, 図 15B, C）。

次に、塩基性アミノ酸がすべて置換されたNQSN置換体の結晶化用サンプルを得るため大量培養し、ゲル濾過クロマトグラフィーと陽イオン交換クロマトグラフィーで精製した（図 16）。陽イオン交換クロマトグラフィーでは3つのピークが溶出したため（ピーク1~3）、それらをSDS-PAGEにより確認した結果、ピーク2がZ-loopの未切断体であったため、回収して最終精製サンプルとした（図 16C）。NQSN置換体では他の置換体と比べてZ-loop未切断のTLR8のサンプルが良好に得られたことから、以降ではこのコンストラクトを用いて結晶化および性状解析を行うことにした。今後はNQSN置換体をTLR8^{Z-loop}と表記する。一方で、NQSN置換体でも精製過程でZ-loop切断体が生じ、ゲル濾過および陽イオン交換クロマトグラフィーではZ-loop未切断体と切断体を完全に分離できないことが問題だった。

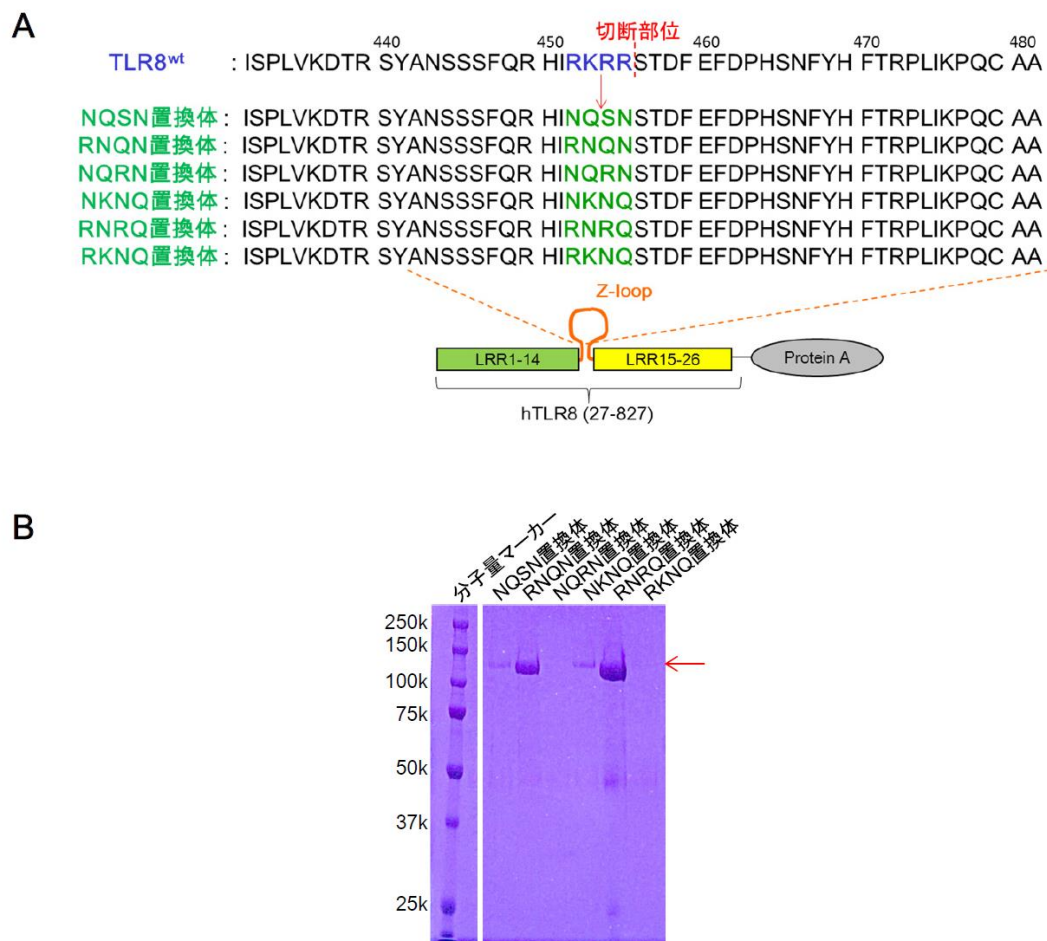
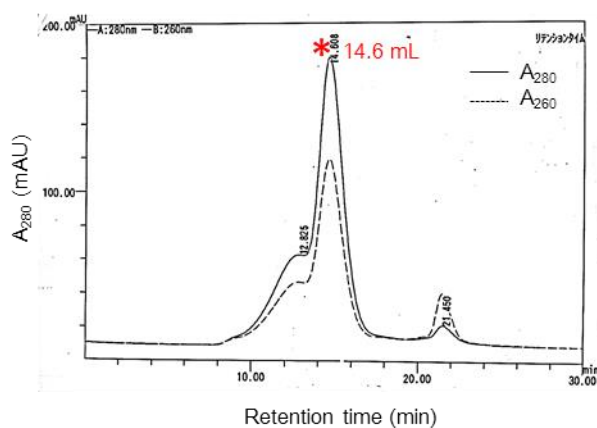


図 13. Z-loop 未切断 TLR8 のコンストラクトの作成

- A. Z-loop 置換体の配列。TLR8（上）および置換体（下）の Z-loop 付近の配列。TLR8 では R452-K453-R454-R455（青文字）の直後で Z-loop が切断されていた²³。これらの4残基を置換（緑文字）した置換体を6種類作成した。
- B. 作成した各置換体コンストラクトのスマールスケールでの発現確認の結果。細胞上清を IgG アフィニティークロマトグラフィーで粗精製したサンプルの SDS-PAGE。

A IgGアフィニティークロマトグラフィー溶出後



B トロンピン+ Endo H_f +

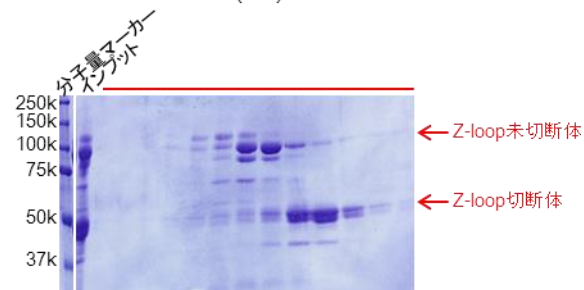
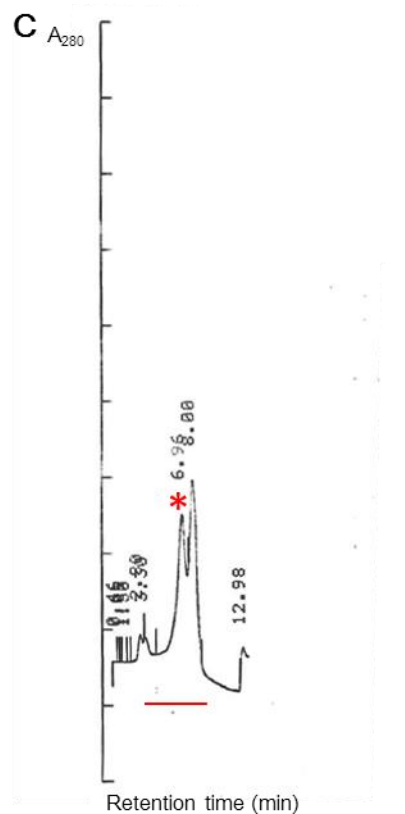
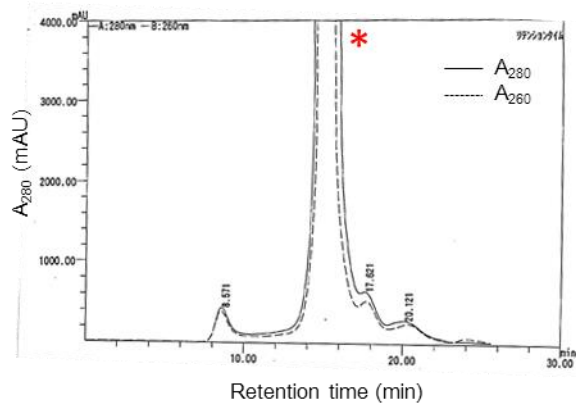
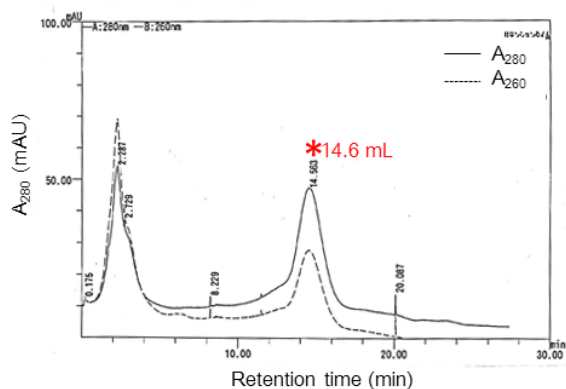


図 14. 結晶化用 RNRQ 変異体 (2 か所置換, 糖鎖短縮) の精製過程

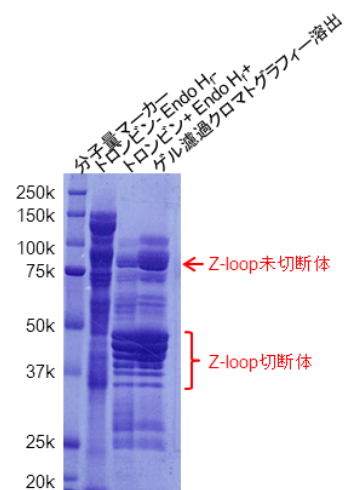
結晶化用 RNRQ 変異体 (2 か所置換, 糖鎖短縮) の精製過程の各チャート。

- A. IgG アフィニティークロマトグラフィーの溶出液のゲル濾過クロマトグラフィー。
- B. トロンピン, Endo H_fによる酵素反応後のゲル濾過クロマトグラフィー。
- C. 陽イオン交換クロマトグラフィー (上) と SDS-PAGE (下)。

A IgGアフィニティークロマトグラフィー溶出後



C



B トロンビン+ Endo H_f+

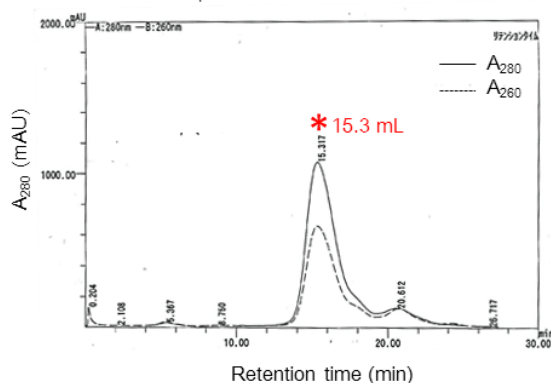


図 15. 結晶化用 RNRQ 変異体 (2 か所置換, 糖鎖短縮) の精製過程

結晶化用 RNRQ 変異体 (2 か所置換, 糖鎖短縮) の精製過程の各チャート。

A. IgG アフィニティークロマトグラフィーの溶出液のゲル濾過クロマトグラフィー。

B. トロンビン, Endo H_fによる酵素反応後のゲル濾過クロマトグラフィー。

C. 各精製ステップの SDS-PAGE。

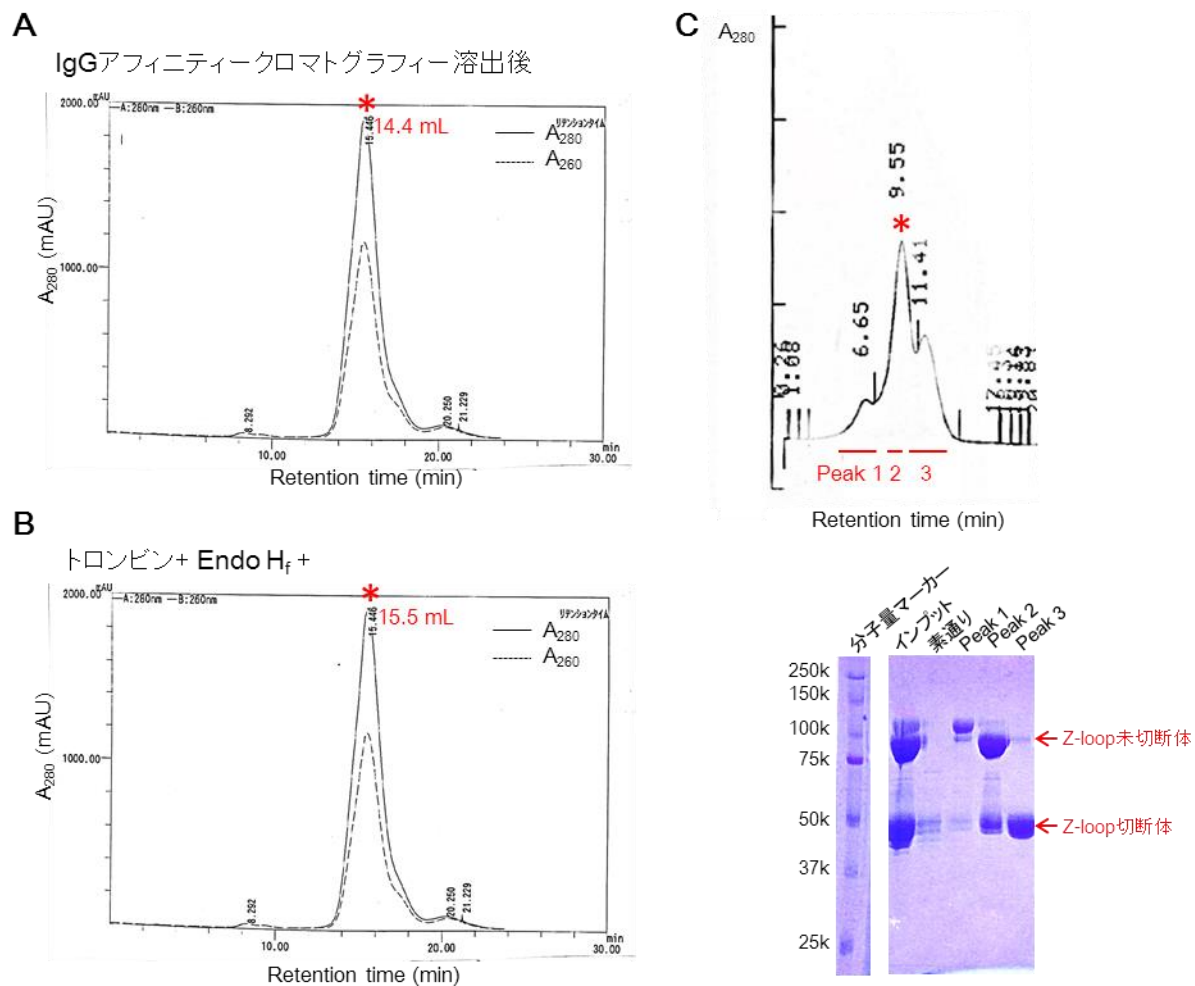


図 16. 結晶化用 NQSN 変異体 (4 か所置換, 糖鎖短縮) の精製過程

結晶化用 NQSN 変異体 (4 か所置換, 糖鎖短縮) の精製過程の各チャート。

- A. IgG セファローズ溶出液のゲル濾過クロマトグラフィー。
- B. トロンビン, Endo H_fによる酵素反応後のゲル濾過クロマトグラフィー。
- C. 陽イオン交換クロマトグラフィーのチャート (上) およびその結果の SDS-PAGE (下)。

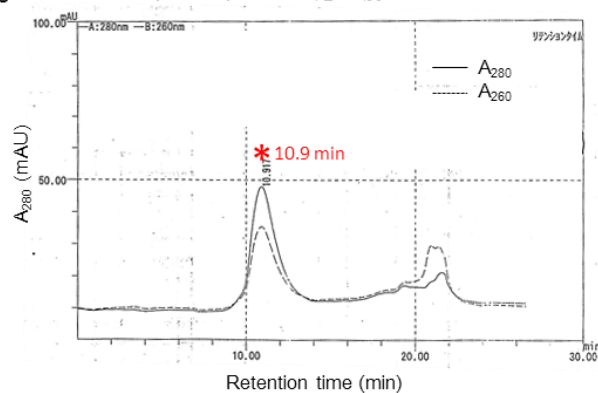
3.1.2. 精製条件の再検討

2.1.4 項に従い、再度結晶化用 TLR8^{Z-loop} の培養を行った。3.1.1 項では TLR8^{Z-loop} の精製過程で Z-loop が経時的に切断され、切断体と未切断体が完全に分離できないことが問題だった。これは精製過程でプロテアーゼが混入しており、濃縮によってその濃度が高くなるためだと考え、本項では IgG カラムからの溶出液を濃縮せず、陽イオン交換カラムに直接アプライした。カラムの洗浄後、NaCl 濃度のグラジエントをかけて陽イオン交換カラムから溶出を行った結果、TLR8^{Z-loop} のシングルピークが得られた (図 17B)。得られたピークを回収し、トロンビンによる ProteinA の切断と Endo H_f による糖鎖の短縮を行った後、再度陽イオン交換カラムにアプライし、再度 TLR8^{Z-loop} のシングルピークを得た (図 17C)。このピークを回収して限外濾過による濃縮を行い、結晶化用 TLR8^{Z-loop} サンプル (糖鎖短縮) とした (図 19)。精製サンプルの SDS-PAGE の結果、Z-loop 未切断体のバンドが 75 kDa と 100 kDa の間に観察され、Z-loop 切断体のバンドもほとんど観察されないことから、高純度の TLR8^{Z-loop} が調製できたと判断した (図 19)。培養液 1 L 当たり 0.6 mg の収量で TLR8^{Z-loop} のサンプルが得られた。

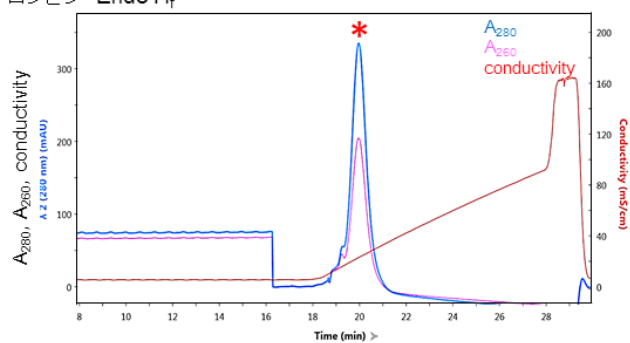
さらに、この精製方法を用いて、2.1.5 項に従い性状解析用 TLR8^{Z-loop} サンプル (糖鎖非短縮) も同様に精製を行った結果、各クロマトグラフィーのチャートは結晶化用 TLR8^{Z-loop} サンプル (糖鎖短縮) での結果と同様であった (図 18)。この性状解析用 TLR8^{Z-loop} サンプル (糖鎖非短縮) は、培養液 1 L 当たり 0.4 mg の収量で得られた。精製サンプルの SDS-PAGE から、この性状解析用 TLR8^{Z-loop} サンプル (糖鎖非短縮) も結晶化用 TLR8^{Z-loop} サンプル (糖鎖短縮) と同様に高純度であることが確認された (図 19)。

これ以降は、これらのサンプルを用いて実験を行った。

A IgGアフィニティークロマトグラフィー溶出後



B トロンビン- Endo H_f-



C トロンビン+ Endo H_f+

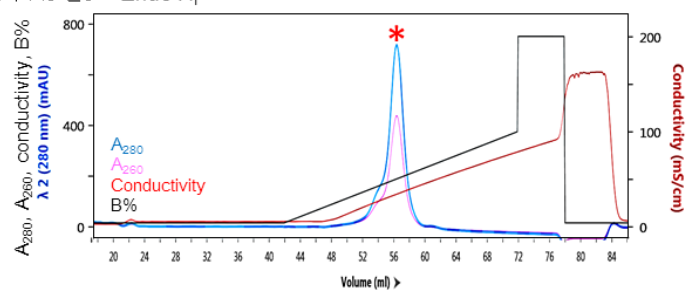
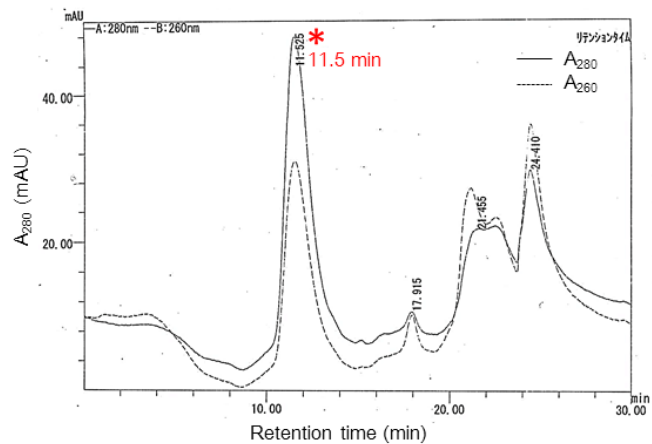


図 17. 結晶化用 TLR8^{Z-loop} (糖鎖短縮) の精製過程

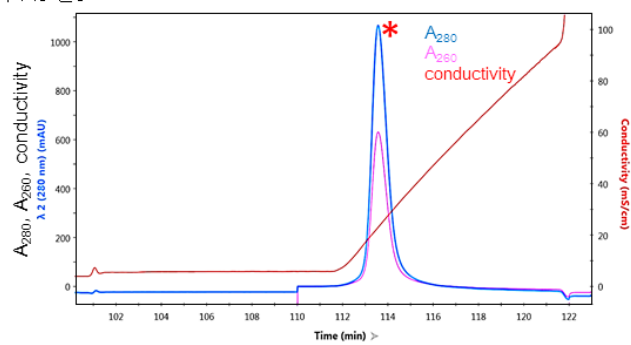
結晶化用 TLR8^{Z-loop} (糖鎖短縮) の精製過程の各チャート。

- A. IgG アフィニティークロマトグラフィーの溶出液のゲル濾過クロマトグラフィー。
- B. 陽イオン交換クロマトグラフィー。
- C. トロンビン, Endo H_fによる酵素反応後の陽イオン交換クロマトグラフィー。

A IgGアフィニティークロマトグラフィー溶出後



B トロンビン-



C トロンビン+

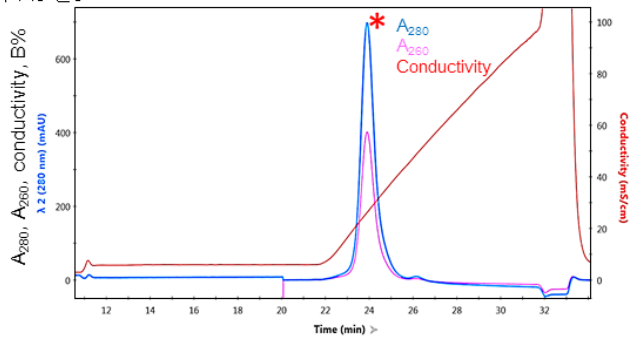


図 18. 性状解析用 TLR8Z-loop (糖鎖非短縮) の精製過程

結晶化用 TLR8Z-loop (糖鎖短縮) の精製過程の各チャート。

- A. IgGアフィニティークロマトグラフィーの溶出液のゲル濾過クロマトグラフィー。
- B. 陽イオン交換クロマトグラフィー。
- C. トロンビン, Endo H_fによる酵素反応後の陽イオン交換クロマトグラフィー。

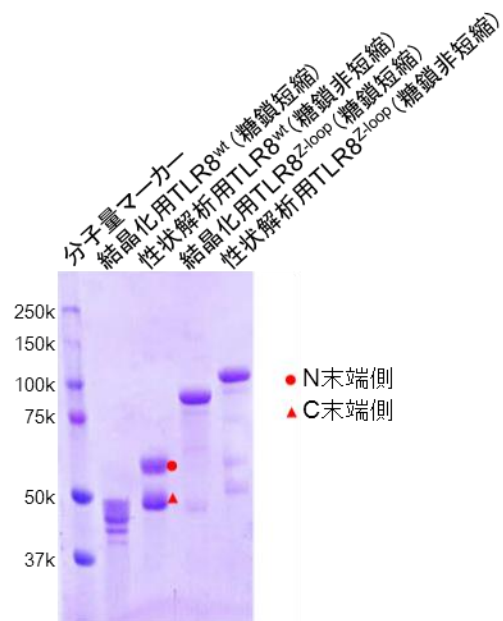


図 19. TLR8^{wt} および TLR8^{Z-loop} の精製サンプルの SDS-PAGE

結晶化用 TLR8^{wt} (糖鎖短縮), 性状解析用 TLR8^{wt} (糖鎖非短縮), 結晶化用 TLR8^{Z-loop} (糖鎖短縮), 性状解析用 TLR8^{Z-loop} (糖鎖非短縮) の精製サンプルの SDS-PAGE。性状解析用 TLR8^{wt} (糖鎖非短縮) は, N 末端アミノ酸配列分析で明らかになった Z-loop の N 末端側および C 末端側を示している³²。

3.1.3. ゲル濾過クロマトグラフィーによる会合状態およびリガンド結合能の評価

2.1.6 項に従い、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて TLR8^{Z-loop} の会合状態およびリガンド結合能を調べた。まず、マーカートンパク質の保持体積から、計算分子量を求めるための検量線を作成した (図 20A)。

リガンド非存在下の TLR8^{wt} はピークトップの計算分子量が 270 kDa と算出され、2 量体を形成していた (図 20B)。その一方で、TLR8^{Z-loop} のピークトップの計算分子量は 174 kDa であり単量体であった。ssRNA 存在下の TLR8^{wt} は、ピークトップの計算分子量が 246 kDa と算出され、2 量体を形成していた。A₂₆₀ と A₂₈₀ の比 (A₂₆₀/A₂₈₀) は 1.03 まで上昇したことから、ssRNA が結合していると判断した。TLR8^{Z-loop} では計算分子量は 174 kDa と単量体であり、A₂₆₀/A₂₈₀ が 0.93 まで上昇し、TLR8^{Z-loop} は単量体で ssRNA に結合すると判断した。低分子リガンドの R848 存在下の TLR8^{wt} は、計算分子量は 285 kDa と算出され、2 量体を形成していた。A₂₆₀/A₂₈₀ は 0.89 に上昇し、これは低分子アゴニストの結合を示していると考えられる。一方で TLR8^{Z-loop} では計算分子量は 168 kDa と単量体であり、さらに A₂₆₀/A₂₈₀ の変化は認められず、低分子リガンドが結合しないことが示唆された (リガンド非存在下: 0.68, 低分子アゴニスト存在下: 0.67)。

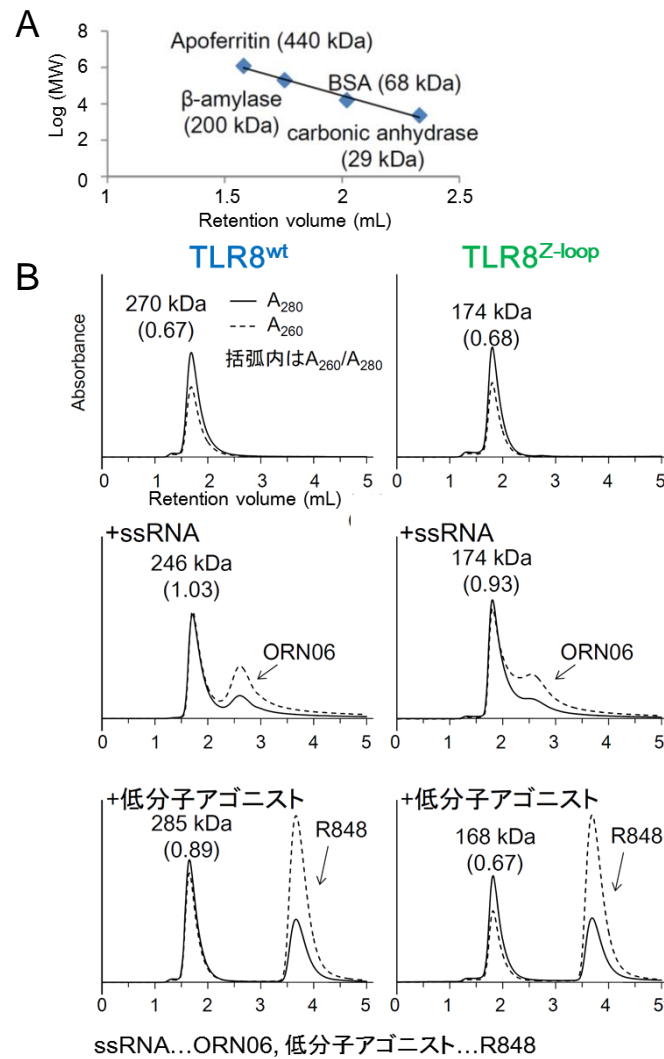


図 20. TLR8^{wt} および TLR8^{Z-loop} のゲル濾過クロマトグラフィー

- A. 分子量の算出に用いたマーカータンパク質の検量線。
- B. TLR8^{wt} および TLR8^{Z-loop} のゲル濾過クロマトグラフィーの結果。 A_{280} を実線で,
 A_{260} を点線で示した。ピークの上には A から算出した計算分子量を、括弧の中
 には A_{260}/A_{280} を表記している。

3.1.4. ITC によるリガンド結合能の評価

2.1.7 項に従い、性状解析用 TLR8^{Z-loop} (糖鎖非短縮) に対する低分子リガンドおよび ssRNA の親和性を、ITC を用いて測定した (図 21)。

TLR8^{wt} に対する低分子アゴニスト (R848) および ssRNA (ORN06) の解離定数 (dissociation constant; K_d) は、0.20 μM および 4.8 μM である²⁴。一方 TLR8^{Z-loop} では、低分子アゴニストを滴定すると熱の出入りが観察されなかったため、低分子アゴニストは TLR8^{Z-loop} に結合しないと判断した。ssRNA を滴定すると発熱が観測され、カーブフィッティングを行った結果、 $K_d = 2.9 \mu\text{M}$ と算出され、TLR8^{wt} と TLR8^{Z-loop} の ssRNA に対する K_d はほとんど変わらなかった。

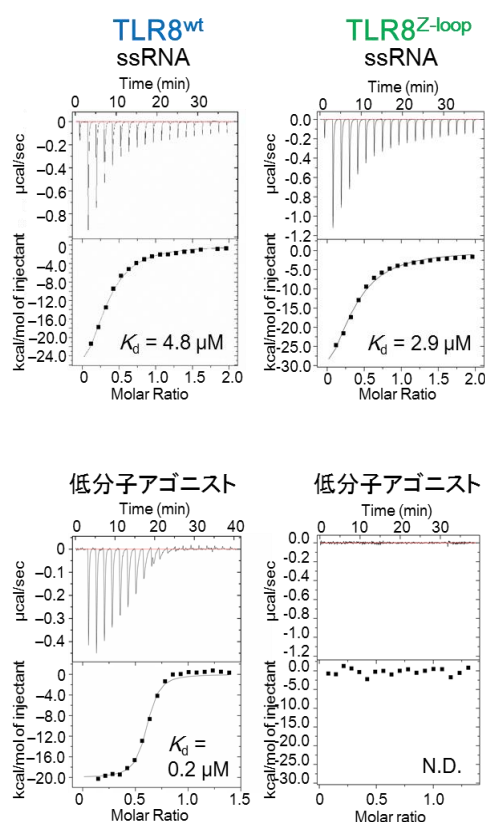


図 21. TLR8^{wt} および TLR8^{Z-loop} の ITC

TLR8^{wt}²⁴ (左) および TLR8^{Z-loop} (右) に対して、ssRNA である ORN06 (上段) もしくは低分子アゴニストである R848 (下段) を滴定した結果。

3.1.5. 結晶化と構造決定

2.1.8 項および 2.1.9 項に従い、結晶化用 TLR8^{Z-loop} (糖鎖短縮) を結晶化し、2.5 Å で構造決定した (図 22, 表 2)。

その結果、単位胞中に 1 分子の TLR8 分子が観察された (図 23B)。TLR8^{Z-loop} の全体構造は、TLR8^{wt} の 2 量体を構成するプロトマーと類似したリング型の単量体であり、リガンド非結合型構造 (PDB ID: 3W3G) および低分子リガンド結合型構造 (CL097; PDB ID: 3W3J) と重ね合わせると、root mean square deviation (R.M.S.D.) がそれぞれ 1.0 Å および 0.9 Å だった (図 24)。これまで TLR8^{wt} の構造では、Z-loop は 432 残基まで (N 末端側) と 459 残基目から (C 末端側) が観察されており、その間の 433 残基目から 458 残基目は観察されていない³² (図 23A)。TLR8^{Z-loop} の構造では、Z-loop は 434 残基まで (N 末端側) と 463 残基目から (C 末端側) が観察され、さらに、他の構造では観察されなかった 443~451 残基目と考えられる電子密度が 2 量体を形成する表面側の LRR11 付近に観察された (図 23C)。Z-loop の残りの部分 (アミノ酸残基 435~442 および 452~462) は TLR8^{Z-loop} の構造中で電子密度が観察されず、構造が揺らいでいると考えられる。

これまでの TLR8^{wt} の結晶構造解析からは、TLR8^{wt} は Z-loop で切断されており、さらに Asp436 から Thr457 までの領域はいずれの結晶構造中でも電子密度が観察されなかったため、Z-loop が TLR8 の 2 量体界面を形成する面ととその逆の面のどちらを通っているのかは不明だった^{24,32}。今回の TLR8^{Z-loop} の構造解析の結果、未切断の Z-loop は TLR8 の 2 量体界面を形成する面を通っていることが明らかになった。また、Z-loop の C 末端側 (アミノ酸残基 463~) はリガンド非結合型構造および結合型構造と同様の構造であり、未切断の Z-loop による構造変化は認められなかった (図 24)。

TLR8^{Z-loop} の全体構造はリガンド非結合型 TLR8^{wt} と類似しているが、LRR8 および LRR18 のループの構造は異なり、2 量体を構成する界面側に突出していた (図 24)。

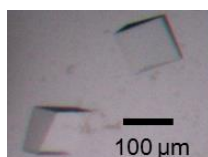


図 22. TLR8^{Z-loop} の結晶の写真

表 2. TLR8^{Z-loop} 構造の回折強度データセット収集および構造精密化の統計値 ^a

TLR8 ^{Z-loop}	
Data Collection	
X-ray source	PF-AR NE3A
Wavelength	1.0000
Space group	<i>R</i> 32
Unit cell parameters	
<i>a</i> (Å)	171.5
<i>b</i> (Å)	171.5
<i>c</i> (Å)	301.3
Resolution (Å)	2.6
Completeness (%)	100.0 (100.0)
Redundancy	19.5 (19.5)
$R_{\text{merge}} (I)^b$	0.127 (1.146)
Average $I/\sigma(I)$	17.3 (3.1)
Refinement	
Resolution range (Å)	133.2-2.6
No. of reflections used	49,947
Model	1×TLR8
$R (\%)^c$	20.6
$R_{\text{free}} (\%)^d$	23.9
Rms deviations	
Bond length (Å)	0.012
Bond angles (°)	1.77

^a 括弧の中は，最外殻における値を示す。

^b I を強度とし， $R_{\text{merge}} (I) = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$ とした。

^c F_o および F_c はそれぞれ実測および計算構造因子振幅であり， $R = \sum |F_o - F_c| / \sum F_o$ とした。

^d 全反射の 5%を用いて計算した R 値が R_{free} であり，これらの反射は精密化には用いなかった。

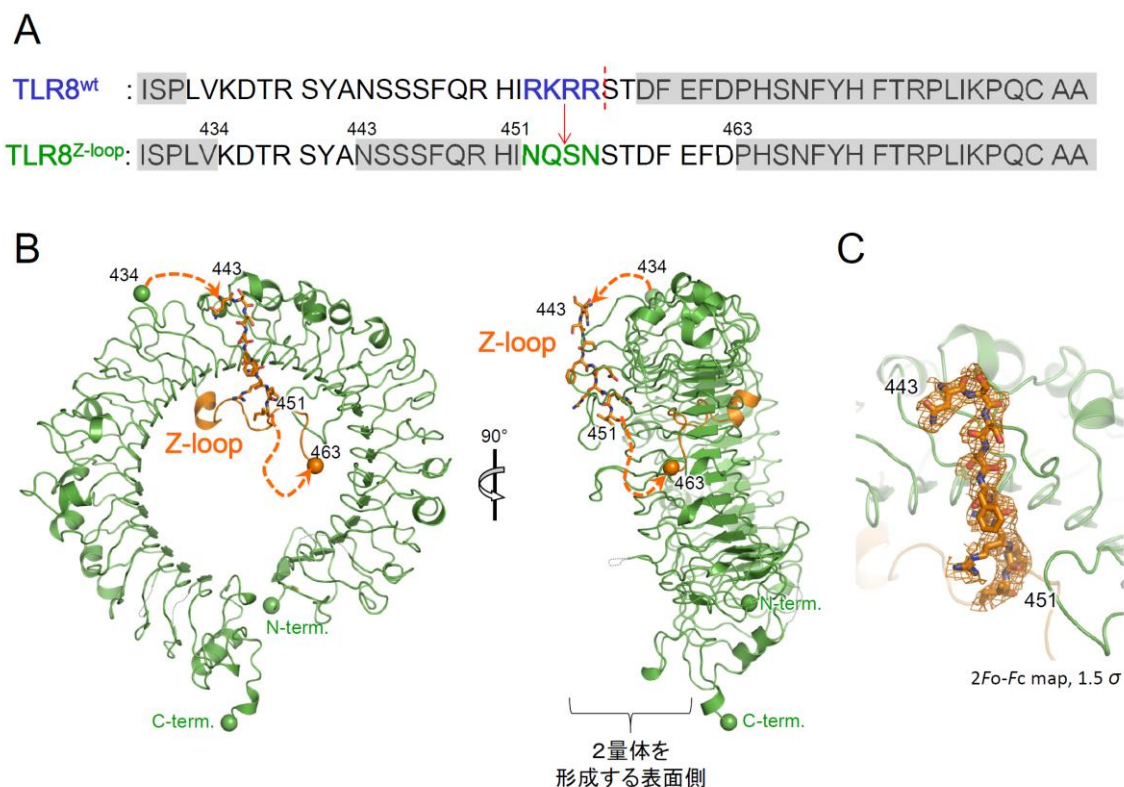


図 23. TLR8^{Z-loop} の全体構造

- A. TLR8^{wt} および TLR8^{Z-loop} の Z-loop の配列。TLR8^{wt}/CL097 (PDB ID:3W3J) の chain A および TLR8^{Z-loop} (PDB ID: 5HDH) 中で構造が観察された部分は灰色の網掛けで示し、TLR8^{wt} の切断箇所は赤の点線で示した³²。
- B. TLR8^{Z-loop} の構造 (PDB ID: 5HDH)。TLR8^{Z-loop} で新規に電子密度が観察された部分はスティックで表示し、N 末端および C 末端は球で表示している。
- C. TLR8^{Z-loop} で新規に観察された電子密度を 2Fo-Fc マップで、1.5 σ で表示している。

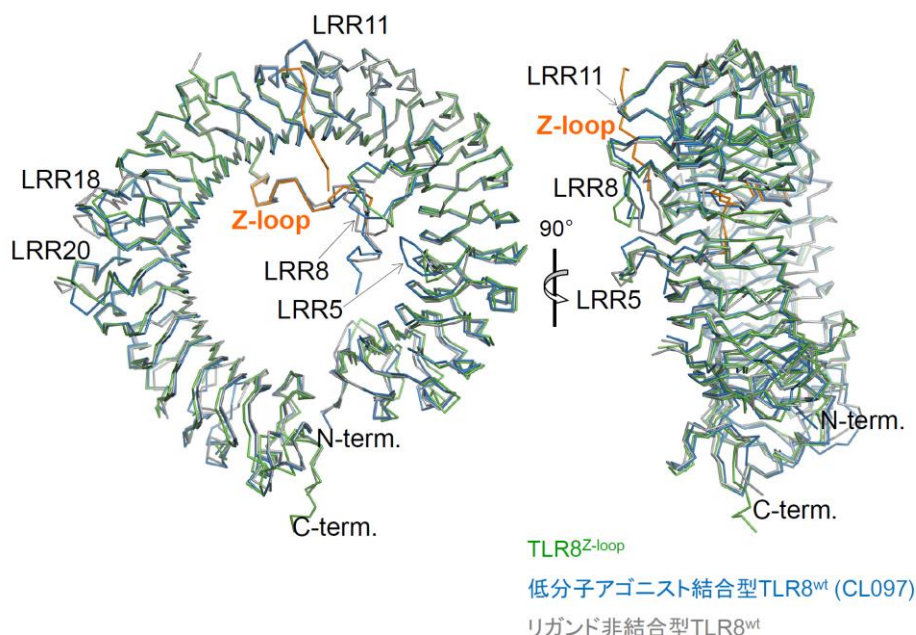


図 24. TLR8^{Z-loop} と TLR8^{wt} のプロトマーの比較

TLR8^{Z-loop} (緑, PDB ID: 5HDH), 低分子アゴニスト結合型 TLR8^{wt} (青, PDB ID: 3W3J)³², リガンド非結合型 TLR8^{wt} (灰色, PDB ID: 3W3G)³² の重ね合わせ。

3.1.6. TLR8^{Z-loop} と TLR8^{wt} の構造の重ね合わせ

TLR8^{wt} のリガンド非結合型 2 量体 (PDB ID: 3W3G) と TLR8^{Z-loop} の構造を重ね合わせると, TLR8^{Z-loop} で新たに観察された未切断の Z-loop (アミノ酸残基 443~451) は, 2 量体を構成する相手のプロトマー (TLR8^{*}) の LRR13^{*}, LRR14^{*}, LRR18^{*}と衝突した (図 25A)。さらに TLR8^{wt} の 2 量体には 2 量体界面に Z-loop が通る空間がないことから, 未切断の Z-loop が存在すると TLR8 は 2 量体構造を形成できないと考えられる (図 26)。実際に 3.1.3 項から, 溶液中でも TLR8^{Z-loop} は 2 量体を形成しないことが示されている。以上から, 未切断の Z-loop によって TLR8 の 2 量体形成が阻害されると結論付けた。

TLR8^{Z-loop} を低分子アゴニスト結合型 2 量体 (CL097, PDB ID: 3W3J) と重ね合わせると, リガンド非結合型構造との重ね合わせの際と同様に, 未切断の Z-loop が LRR18^{*}と衝突した (図 25B)。この未切断の Z-loop は低分子アゴニストが結合する 1st site を遮っており, Z-loop が未切断であると 1st site にアゴニストが接近できないと考えられる。

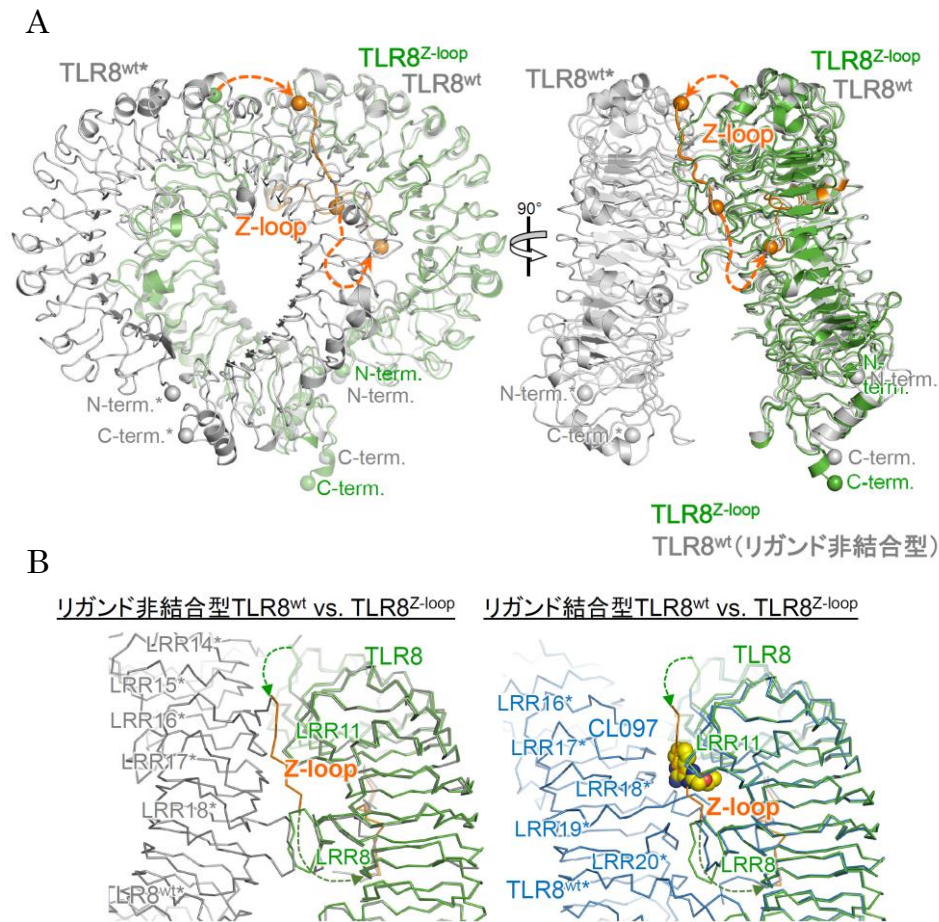


図 25. TLR8^{Z-loop} 構造と TLR8^{wt} の 2 量体構造の重ね合わせ

- A. TLR8^{Z-loop} (緑および橙, PDB ID: 5HDH) とリガンド非結合型 TLR8^{wt} (灰色, PDB ID: 3W3G)³² の重ね合わせ。Z-loop および LRR14 のループ以外は緑で、Z-loop および LRR14 のループは橙色で表示している。構造が見えていないところは点線で表示した。
- B. TLR8^{Z-loop} (緑および橙, PDB ID: 5HDH) とリガンド非結合型 TLR8^{wt} (灰色, PDB ID: 3W3G)³² の Cα をリボン図で表示し重ねあわせた構造 (左) および低分子リガンド結型 TLR8^{wt} (青色, PDB ID: 3W3J)³² を重ねあわせた構造 (右) の、Z-loop 付近の拡大図。

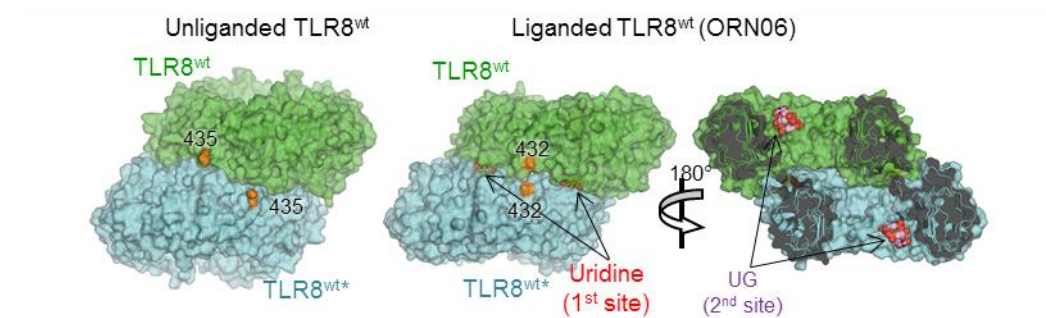


図 26. TLR8^{wt} の 2 量体構造の表面図

リガンド非結合型 TLR8 (左, PDB ID: 3W3G)³² および ssRNA 結合型 TLR8 (右, PDB ID: 4R07)²⁴ の表面図。2 量体を構成する 2 つのプロトマーをそれぞれ緑色と水色で表している。各プロトマーの N 末端側のフラグメントの, C 末端の残基 (リガンド非結合型: 435, リガンド結合型: 432) を橙色で示している。

3.1.7. TLR8^{Z-loop} のリガンド結合部位

ゲル濾過クロマトグラフィーと ITC で, TLR8^{Z-loop} に対して RNA は結合するが低分子アゴニストは結合しないことを示した (3.1.3 項, 3.1.4 項参照)。そこで, リガンドの種類による結合能の違いを説明するため, 未切断の Z-loop による TLR8 のリガンド結合への影響について考察する。

TLR8^{Z-loop} の表面図上で未切断の Z-loop が 1st site の上を通過していることから, Z-loop が未切断だと 1st site にアゴニストが接近できないと考えられる (図 27)。さらに, 1st site は 2 量体を形作る 2 つのプロトマー間で構成されるため, 単量体である Z-loop 未切断体ではそもそも 1st site を形成することができないと考えられる。一方で, 2nd site は 2 量体界面と逆の面に存在しており, 未切断の Z-loop による影響を受けない位置にあるため, 未切断の Z-loop は RNA 結合に影響しないと考えられる。

以上の理由から, TLR8^{Z-loop} は RNA に対して結合能を示したが, 低分子アゴニストには結合能を示さなかったと結論付けた。

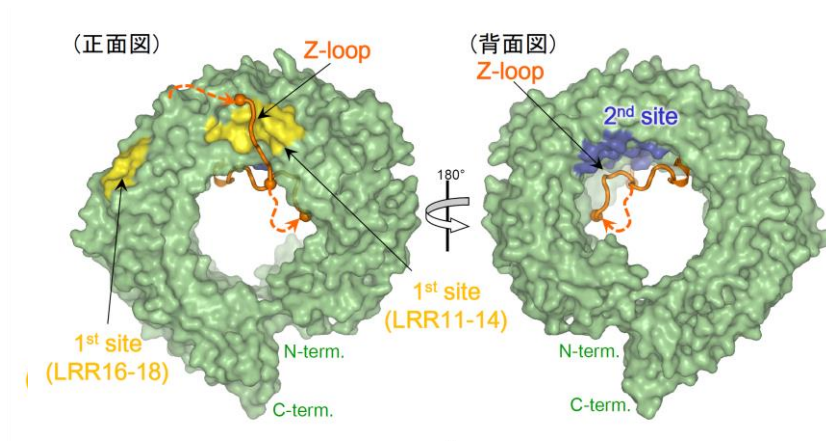


図 27. TLR8^{Z-loop} のリガンド結合部位

TLR8^{Z-loop} (PDB ID: 5HDH) の表面図。1st site は黄色、2nd site は青色で示した。Z-loop は橙色で示し、電子密度が観察されなかった領域は点線で表示した。

3.1.8. 活性測定

TLR8^{Z-loop} が実際に細胞中でも不活性かどうかを調べるため、2.1.10 項に従って、TLR8^{Z-loop} および TLR8^{wt} のレポータージーンアッセイを行った。本実験は、東京大学医科学研究所の三宅教授、柴田博士らによるものである。

まず、TLR8^{wt}を発現させた細胞に、ssRNA である ORN06 と低分子アゴニストである R848 で共刺激を行った際、また、ORN06 とウリジンで共刺激を行った際のいずれも、TLR8 の活性化が起こることが確認された (図 28)。一方、TLR8^{Z-loop} を発現させた細胞に対してこれらの刺激を行った結果、いずれの刺激に対してもほとんど活性を示さず、TLR8^{Z-loop} は細胞中でも不活性であることが示された。

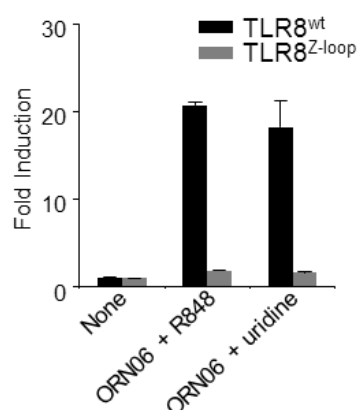


図 28. TLR8^{wt} および TLR8^{Z-loop} を発現させた細胞を用いた NF- κ B リポータージーンアッセイ (三宅らによる)

3.2. アンタゴニスト結合型 TLR8 の構造解析

本章では、TLR8^{wt}を単に TLR8 と表記する。

3.2.1. ITC による TLR8 への結合の評価

Colorado University Boulder, Hang Hubert Yin 教授らが新規開発した CU-CPT 化合物は、TLR8 選択的に活性を阻害する (1.6 節参照)。TLR8 に対して CU-CPT 化合物が結合するかどうかを調べるため、2.2.2 項に従って ITC を行った。その結果、CU-CPT 化合物の TLR8 に対する結合解離定数 K_d は、224 nM (CU-CPT8m) および 21 nM (CU-CPT9b) と算出された (図 29 上)。CU-CPT8m は低分子アゴニストである R848 ($K_d = 116$ nM, 図 29 下) と同程度の結合能を有し、CU-CPT9b は R848 よりもさらに強力に TLR8 に結合した。

3.2.2. ITC による TLR8 へのアゴニスト結合に対する阻害の評価

さらに、CU-CPT 化合物が TLR8 のアゴニスト結合を阻害するかどうかを調べるため、CU-CPT 化合物の存在下および非存在下の TLR8 に対して、低分子アゴニストである R848 を滴定する ITC を 2.2.2 項に従って行った。

まず R848 をアンタゴニスト非存在下で TLR8 に対して R848 を滴定した結果、発熱が観測され $K_d = 116$ nM と求められた (図 29 下)。次に、CU-CPT8m および CU-CPT9b 存在下の TLR8 に対して同様の実験を行った結果ほとんど熱の出入りが観測されず、CU-CPT 化合物存在下では R848 は TLR8 に結合しなかった。

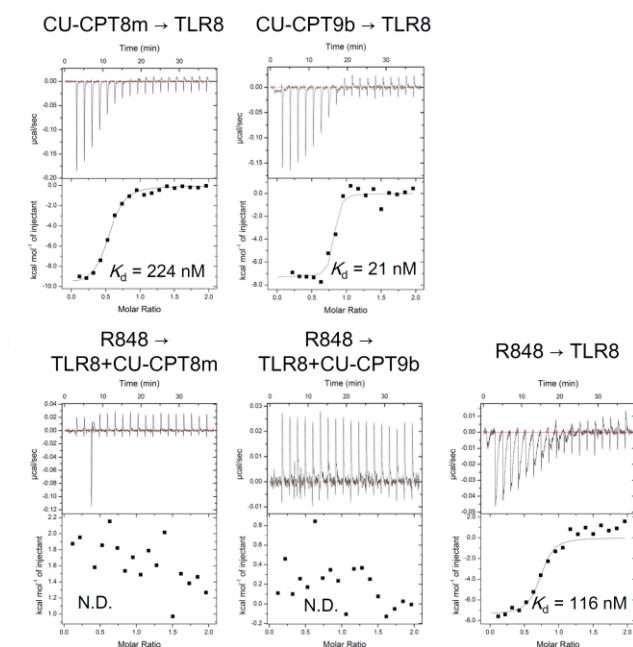
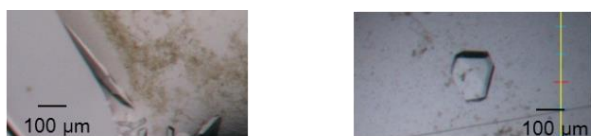


図 29. アンタゴニストを用いた ITC

CU-CPT 化合物を TLR8 に対して滴定した結果 (上) および R848 を CU-CPT 化合物存在下の TLR8 に対して滴定した結果 (下)。

3.2.3. 結晶化と構造決定

CU-CPT 化合物による TLR8 の活性制御機構を明らかにするため、2.2.3 項に従って TLR8 と CU-CPT8m および CU-CPT9b を共結晶化した。2.2.4 項に従って構造解析を行い、2.4 Å (CU-CPT8m) および 2.3 Å (CU-CPT9b) で構造決定した (図 30, 表 3)。



CU-CPT8m結合型TLR8 CU-CPT9b結合型TLR8

図 30. アンタゴニスト結合型 TLR8 の結晶の写真

表 3. アンタゴニスト結合型構造の回折強度データセット収集および構造精密化の統計値^a

	CU-CPT8m 結合型	CU-CPT9b 結合型
Data Collection		
X-ray source	PF-AR NE3A	PF BL-5A
Wavelength	1.0000	1.0000
Space group	C2	C2
Unit cell parameters		
<i>a</i> (Å)	144.1	143.6
<i>b</i> (Å)	99.1	99.0
<i>c</i> (Å)	140.2	139.5
β (°)	108.1	108.4
Resolution (Å)	2.40	2.30
Completeness (%)	99.7 (99.4)	100.0 (100.0)
Redundancy	6.8 (6.5)	6.6 (6.6)
R_{sym} (I) ^b	0.064 (0.460)	0.082 (0.780)
Average $I/\sigma(I)$	30.0 (2.6)	12.3 (2.4)
Refinement		
Resolution range (Å)	133.33-2.40	132.39-2.30
No. of reflections used	70,051	78,165
Model	2xTLR8	2xTLR8
Average <i>B</i> -factor (Å ²)	59.6	60.2
<i>R</i> (%) ^c	20.1	20.5
R_{free} (%) ^d	25.6	27.1
Rms deviations		
Bond length (Å)	0.015	0.014
Bond angles (°)	1.91	1.68

^a 括弧の中は、最外殻における値を示す。

^b I を強度とし、 $R_{\text{merge}}(I) = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$ とした。

^c F_o および F_c はそれぞれ実測および計算構造因子振幅であり、 $R = \sum |F_o - F_c| / \sum F_o$ とした。

^d 全反射の 5%を用いて計算した R 値が R_{free} であり、これらの反射は精密化には用いなかった。

3.2.4. 全体構造

いずれの結晶構造中でも単位胞中に TLR8 が 2 分子観察され、それらの TLR8 分子は C 末端同士で向かい合った m 字型を構成していた (図 31)。CU-CPT8m 結合型と CU-CPT9b 結合型の 2 量体同士の R.M.S.D は 0.5 \AA であり、同様の 2 量体を形成していた。また、2 量体界面の 2 箇所に、アンタゴニストと考えられる電子密度が存在していた。以下では、CU-CPT8m の構造を例に結果を記す。

C 末端付近の S816 同士の距離を 2 量体間で比較すると、CU-CPT8m 結合型では 49 \AA 、リガンド非結合型 (PDB ID: 3W3G) では 51 \AA 、低分子アゴニスト結合型 (PDB ID: 3W3L) では 34 \AA であり、アンタゴニスト結合型はリガンド非結合型と同様に C 末端同士が離れた不活性化型 2 量体構造だった (図 31)。CU-CPT8m 結合型とリガンド非結合型の 2 量体同士の重ね合わせたときの R.M.S.D は 2.2 \AA 、CU-CPT8m 結合型とアゴニスト結合型では 5.7 \AA であり、CU-CPT8m 結合型構造はリガンド非結合型に類似した構造だった (図 32)。

さらに、CU-CPT8m 結合型とリガンド非結合型を $C\alpha$ で重ね合わせたときの変位を算出してプロットした (図 33)。LRR8, LRR11, LRR18 のそれぞれのループ部分は 4 \AA 以上の高い変位を示したものの (3.2.6 項参照)、それ以外の領域では 1 \AA 以下の低い変位を示し、これらのループ部分以外はアンタゴニスト結合型とリガンド非結合型の間で構造変化がないと結論付けた。また、CU-CPT8m 結合型とリガンド非結合型の $C\alpha$ の温度因子をプロットした結果、LRR18 のループ部分以外はおおむね一致した温度因子を示し、温度因子の観点からもこれら 2 者のループ部分以外の構造は同一であると結論付けた (図 34)。

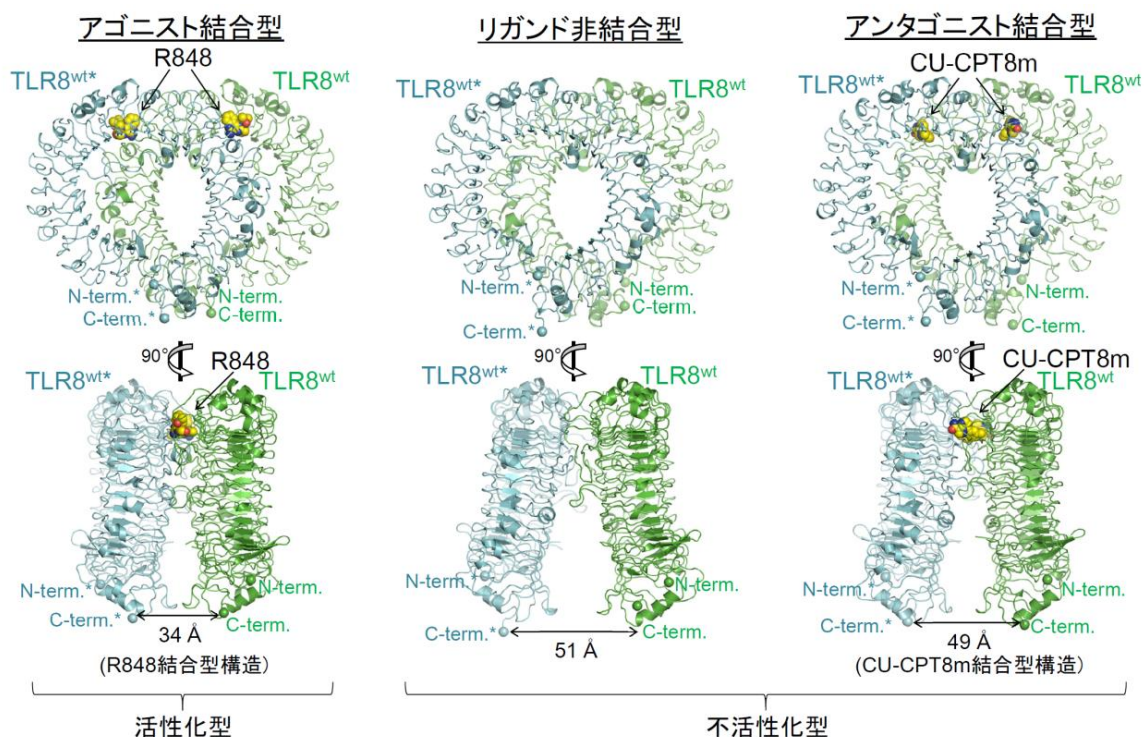


図 31. リガンド非結合型・アゴニスト結合型・アンタゴニスト結合型 TLR8 の 2 量体構造

アゴニスト結合型 (左, PDB ID: 3W3L)³², リガンド非結合型 (中央, PDB ID: 3W3G)³², アンタゴニスト結合型 (右, PDB ID: 5WYX) の 2 量体構造の, 正面図 (上) および側面図 (下)。TLR8 の 2 量体を形成するプロトマーを, それぞれ緑 (TLR8) と水色 (TLR8*) で示した。リガンドの炭素原子は黄色, 窒素原子は青, 酸素原子は赤で表示した。

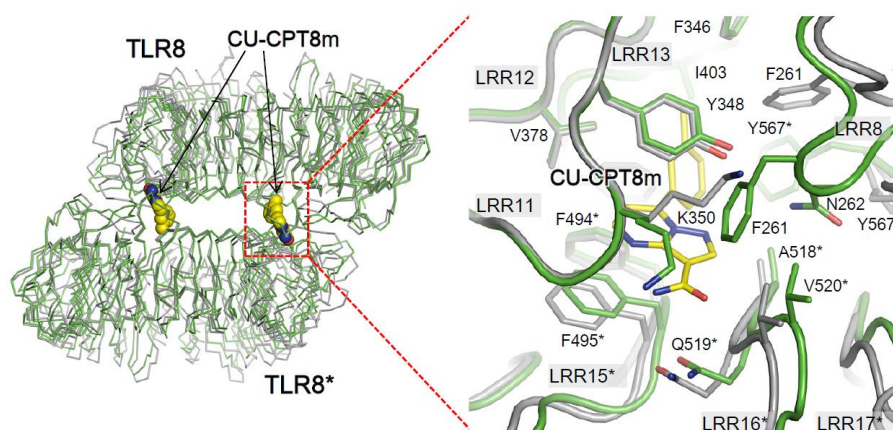


図 32. アンタゴニスト結合型およびリガンド非結合型 TLR8 の重ね合わせ

CU-CPT8m 結合型 (緑, PDB ID: 5WYX) とリガンド非結合型 (灰色, PDB ID: 3W3G)³² の 2 量体構造の重ね合わせ。上からの図 (左) およびアンタゴニスト結合部位の拡大図 (右) を示す。

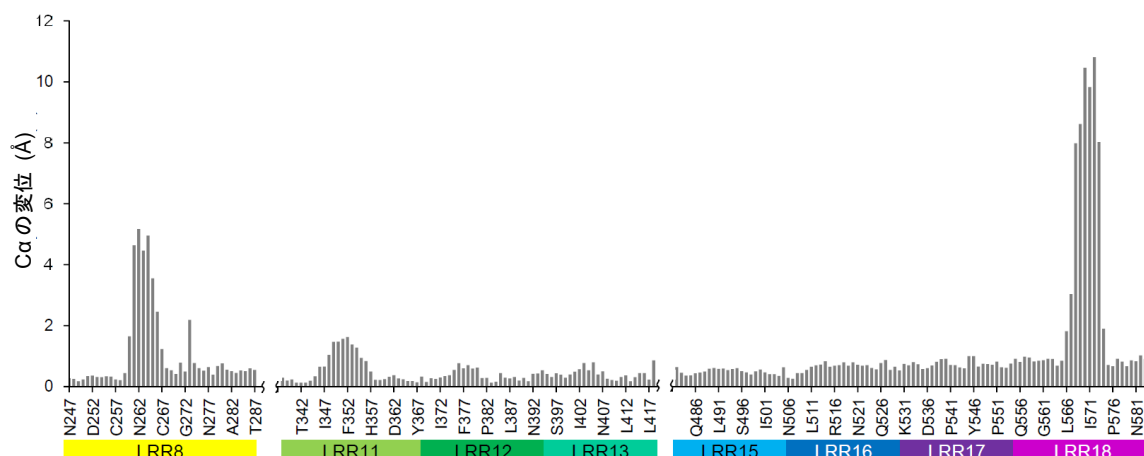


図 33. アンタゴニスト結合型およびリガンド非結合型 TLR8 間の C α の変位

CU-CPT8m 結合型 (PDB ID: 5WYX) とリガンド非結合型 (PDB ID: 3W3G)³² の間の C α の変位。それぞれの構造の 1 つのプロトマーを重ね合わせ、LRR8, LRR11~13, LRR15~18 の残基について変位をプロットした。LRR は横軸の下に表記している。

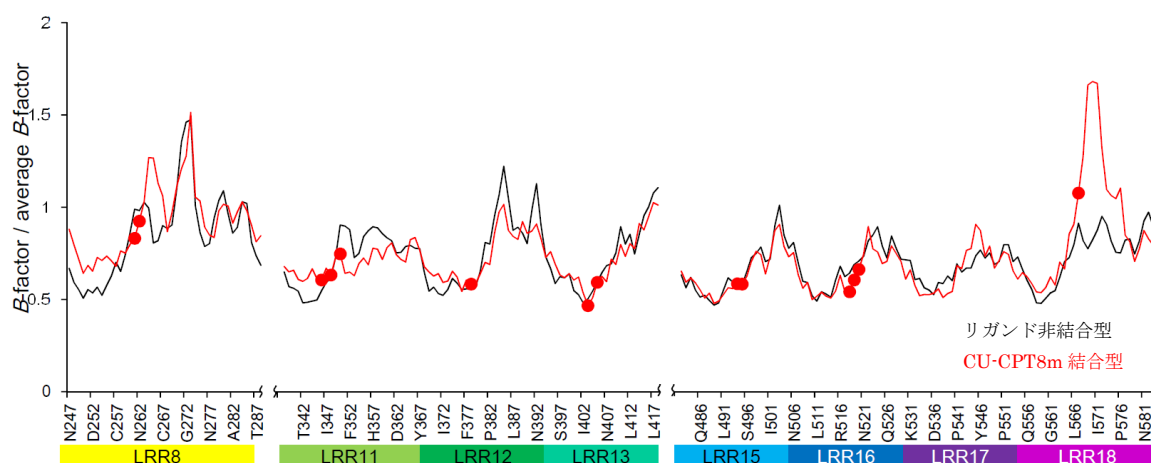


図 34. アンタゴニスト結合型およびリガンド非結合型 TLR8 の温度因子

CU-CPT8m 結合型 (PDB ID: 5WYX) とリガンド非結合型 (PDB ID: 3W3G)³² の温度因子 (B -factor) / 平均の温度因子 (average B -factor) を、LRR8, LRR11~13, LRR15~18 の残基についてプロットした。リガンド非結合型は黒、CU-CPT8m 結合型は赤で表示しており、アンタゴニスト結合部位は赤丸で表示している。LRR は横軸の下に表記している。

3.2.5. アンタゴニスト結合部位

アンタゴニスト結合部位は2回軸で関係づけられた2量体界面の2箇所であり、いずれの CU-CPT 化合物も電子密度が明瞭に観察された (図 35)。主に LRR11-13 および LRR17*-18*, LRR11*-13*および LRR17-18 で構成されるポケットにアンタゴニストは結合しており、リガンド非結合型構造でもこのポケットは存在していた (図 37)。

CU-CPT 化合物に共通する TLR8 との相互作用として、主に下記の3種類が観察された (図 36)。

①Y348 および F425*とのスタッキング相互作用

②F261, N262, F346, V378, I403, F405, F494*, A518*, Q519*, V520*, Y567*が構成するポケットとの疎水性相互作用

③G351 の主鎖 N 原子および V520*主鎖 N 原子との水素結合

②の疎水性ポケットを形成している F261, N262, Y567*は、CU-CPT 化合物と接近して相互作用を形成するようにリガンド非結合型から構造変化しており、その結果、LRR8 および LRR18 のループ全体の構造変化を引き起こしていると考えられる (3.2.4 項参照)。

CU-CPT8m では、①～③の3種類の相互作用が観察された。CU-CPT9b ではこの3種類に加え、S516*の主鎖 O 原子および Q519*の側鎖 N 原子との間で水分子を介した水素結合が観察された。さらに CU-CPT9b 結合型では Y567*の側鎖のコンホメーションが CU-CPT8m 結合型と異なっており、より CU-CPT9b に接近していた。

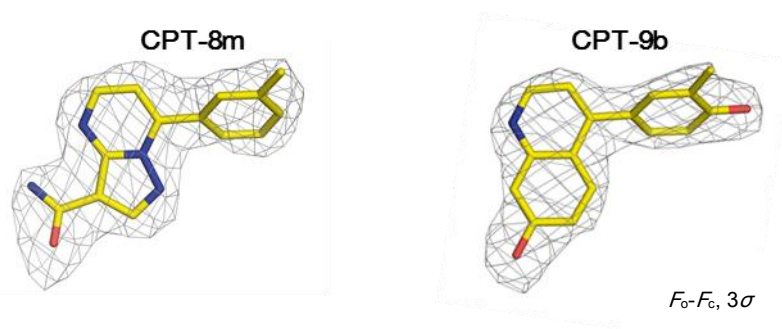


図 35. アンタゴニストの電子密度

CU-CPT8m (左, PDB ID: 5WYX) および CU-CPT9b (右, PDB ID: 5WYZ) の電子密度。 $F_o - F_c$ マップを 3σ で表示した。

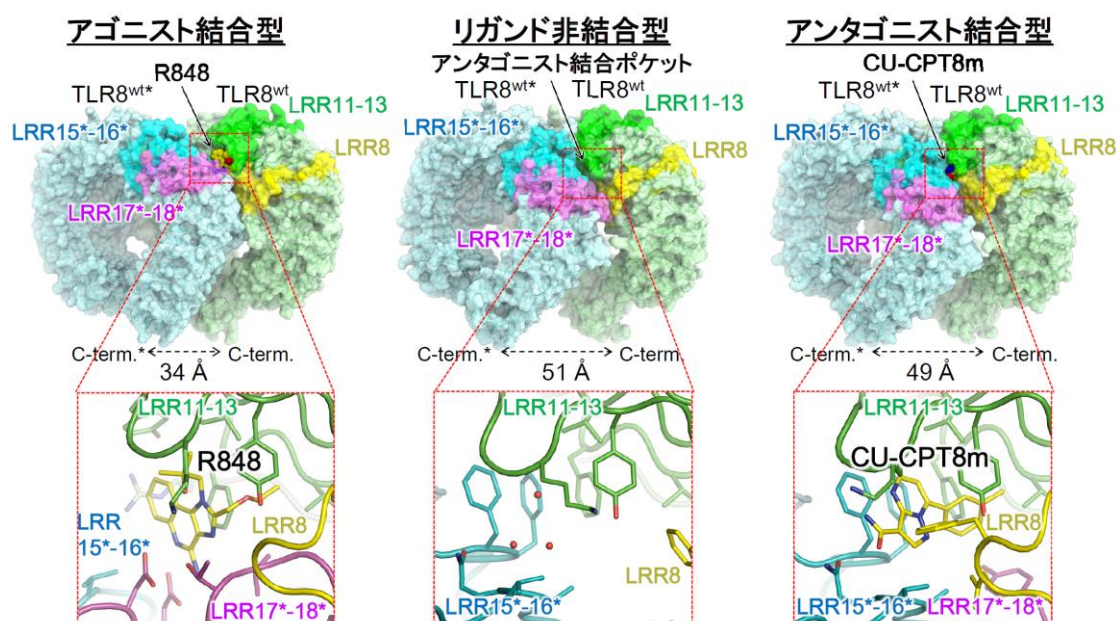


図 37. アンタゴニスト結合型・アゴニスト結合型・リガンド非結合型 TLR8 の LRR の配置

アゴニスト結合型（左，R848 結合型を示している。PDB ID: 3W3L)³²，リガンド非結合型（中央，PDB ID: 3W3G)³²，アンタゴニスト結合型（右，PDB ID: 5WYX) の 2 量体構造（上）および LRR11-13 と LRR8 の拡大図（下）。LRR8 は黄色で，LRR11-13 は緑色で，LRR15*-16* は青色で，LRR17*-18* は紫色で示した。

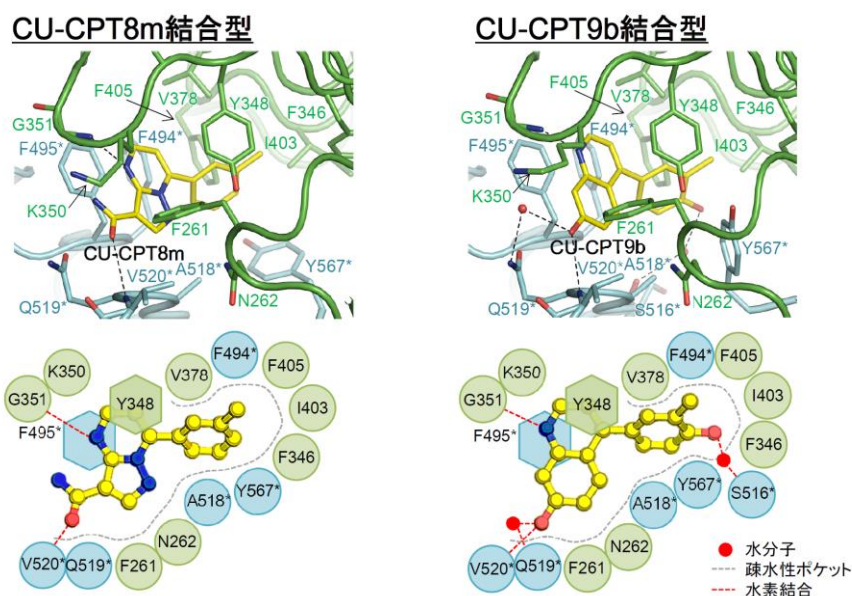


図 36. アンタゴニスト結合部位の拡大図

CU-CPT8m（左，PDB ID: 5WYX)および CU-CPT9b（右，PDBID:5WYZ) の，アンタゴニスト結合部位の拡大図（上）およびその模式図（下）。水素結合は黒色の点線で，水分子は赤色の球で示した。

3.2.6. アンタゴニスト結合による不活性化型 2 量体の安定化

アンタゴニストが結合するポケットは LRR11-13 および LRR15*-16* から構成されており、リガンド非結合型 2 量体構造中にも存在する (図 37)。リガンド非結合型構造中のポケットの中には水分子が 3 分子観察され、水素結合のネットワークを形成していた。また LRR8 および LRR18 のループはアンタゴニスト結合型とリガンド非結合型の間での変位が大きく、構造が異なっていた (図 33, 3.2.4 項参照)。その理由として、疎水性ポケットを形成している F261 (LRR8), N262 (LRR8), Y567 (LRR18) が CU-CPT 化合物と接近して相互作用を形成するようにリガンド非結合型から構造変化していたことが挙げられる。その結果これらのループ全体がアンタゴニスト結合部位に接近するように構造変化し、アンタゴニスト結合部位はループによってフタをされていた (図 37)。

リガンド結合型 2 量体は、リガンド非結合型やアンタゴニスト結合型 2 量体とは全く異なる 2 量体構造である。そのため、リガンド結合型構造にはアンタゴニスト結合ポケットは存在せず、そのかわり、TLR8 の活性化を引き起こすアゴニスト結合部位である 1st site が存在する (1.4 節参照)。1st site は主に LRR11-13 および LRR17*-18* で構成されている。例えば低分子アゴニストである R848 の場合、1st site での主な相互作用は

- ①F405 によるスタッキング相互作用
- ②D543*, T574* などとの水素結合
- ③F346, Y348, V378, I403, G572*, V573* との疎水性相互作用

である。アンタゴニストとアゴニストのリガンド結合部位は異なるが、I403 (LRR13), V378 (LRR12), F405 (LRR13), F346 (LRR11) などの LRR11-13 にある疎水性残基は両者の認識に共通して関わっている。

CU-CPT 化合物は、リガンド非結合型構造中のアンタゴニスト結合ポケットに結合することで、不活性化型 2 量体構造を安定化する。アンタゴニストが結合すると、LRR8 および LRR18 のループは局所的に構造変化を起こし、よりアンタゴニストと相互作用した安定な構造を形成するが、不活性化型 2 量体の全体構造は変化しない。つまりアンタゴニストは不活性化型 2 量体を安定化し、TLR8 へのアゴニスト結合およびそれによる活性化型 2 量体への構造変化を阻害すると結論付けた。

3.2.7. アンタゴニストによる TLR8 の 2 量体化

アンタゴニストはリガンド非結合型 TLR8 に存在するポケットに結合して不活性化型 2 量体を安定化し、活性化型 2 量体への構造変化を阻害することが明らかになった (3.2.6 項参照)。さらに、単量体の TLR8 に対するアンタゴニストの作用を調べるため、2.2.5 項に従ってゲル濾過クロマトグラフィーを行った。

TLR8 はリガンド非存在下で 2 量体を形成するが、低濃度では解離して単量体で存在する。そこで TLR8 が単量体で観察される濃度で、CU-CPT9b または R848 の量を増加させた (図 38)。その結果、いずれの化合物でもリガンド依存的に TLR8 の 2 量体化が観察された。CU-CPT9b では TLR8: CU-CPT9b = 1: 2, R848 では TLR8: R848 = 1: 5 の時点で TLR8 の 2 量体が飽和し、CU-CPT9b のほうが R848 よりも TLR8 の 2 量体化を強く引き起こした。

さらに、リガンド非存在下の TLR8, CU-CPT9b 存在下の TLR8 (TLR8: CU-CPT9b = 1: 5), R848 存在下の TLR8 (TLR8: R848 = 1: 5) について、TLR8 の濃度依存的な会合状態の変化を調べた (図 39)。その結果、2 量体が飽和する際の TLR8 の注入量は、リガンド非存在下では 5 nmol, CU-CPT9b 存在下では 0.05 nmol, R848 存在下では 0.25 nmol であり、CU-CPT9b および R848 存在下ではより低濃度で 2 量体化が起こった。

以上の結果から、CU-CPT9b は TLR8 の不活性化型 2 量体の形成を誘導すると結論付けた。

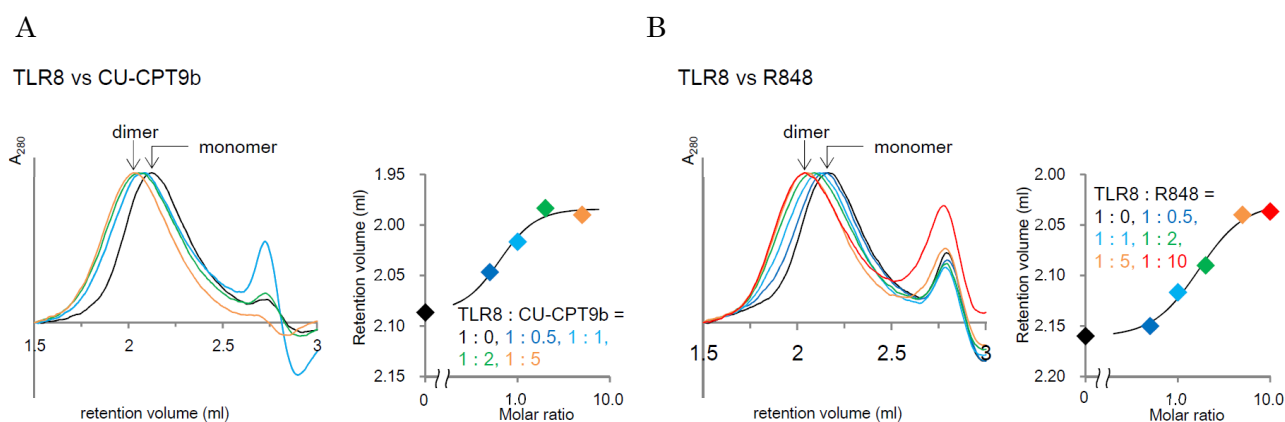


図 38. リガンド量依存的な TLR8 の会合状態の変化

CU-CPT8m (A) および CU-CPT9b (B) を TLR8 に添加した際の、ゲル濾過クロマトグラフィーでの保持体積の変化。各パネルの、左はゲル濾過クロマトグラフィーのチャート、右はピークトップの保持体積 (縦軸) とリガンドと TLR8 の量比 (横軸) を示した。1 μ M TLR8 に対して 0.5, 1, 2, 5, 10 μ M CU-CPT9b または R848 (10 μ M は R848 のみ) を混合して液量を 25 μ L に調製し、インジェクションした。

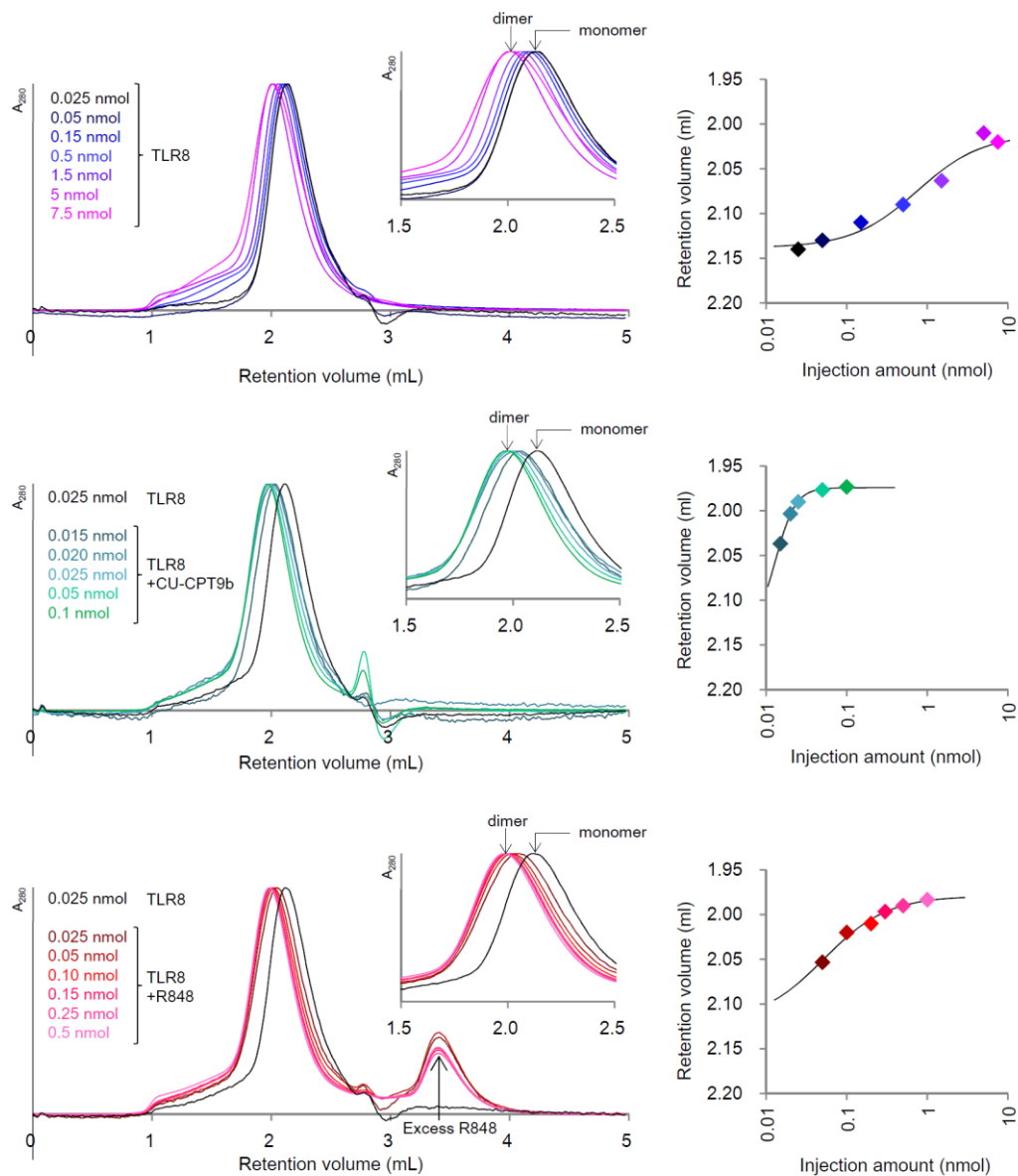


図 39. リガンド存在下における TLR8 濃度依存的な会合状態の変化

リガンド非存在下 (上), CU-CPT9b 存在下 (中央), R848 存在下 (下) で, TLR8 の濃度を变化させた際のゲル濾過クロマトグラフィーでの保持体積の変化。各パネルで, 左はゲル濾過クロマトグラフィーのチャート, 右はピークトップの保持体積 (縦軸) およびリガンドと TLR8 の量比 (横軸) を示した。TLR8: リガンド = 1: 5 とした。リガンド非存在下の TLR8 は 0.5, 1, 3, 10, 30, 100, 150 μ M TLR8 を, CU-CPT9b 存在下の TLR8 は 0.3, 0.4, 0.5, 1, 2 μ M TLR8 および 5 倍量の CU-CPT9b を, R848 存在下の TLR8 は 0.5, 1, 2, 3, 5, 10 μ M TLR8 および 5 倍量の R848 を, いずれも液量 50 μ L に調製してインジェクションした。

3.2.8. CU-CPT8m の TLR8 選択性

hTLR7 と hTLR8 の identity は 42% と高く、実際にそれぞれの 1st site では R848 などの共通したアゴニストを認識する (図 11)。その一方 CU-CPT8m は TLR8 を選択的に阻害する (1.6 節参照)。そこで、TLR7 を CU-CPT8m が阻害しないことを説明するため、TLR7 の構造 (R848 結合型, PDB ID: 5GMH)²³ のプロトマーを CU-CPT8m 結合型 TLR8 の構造に重ね合わせたモデル構造を作成し、アンタゴニスト結合部位周辺を比較した (図 40)。TLR7 と TLR8 のアンタゴニスト結合ポケット周辺の構造は一致し、さらにポケットを形成する残基の相同性が高いことから、TLR7 は TLR8 と同様のアンタゴニスト結合ポケットを形成しうると推測される。しかしその一方で、TLR8 の F261 に相当する残基は TLR7 では Y264 であり、重ね合わせの構造中では Y264 のヒドロキシ基が CU-CPT8m と衝突した。この残基の違いの結果、CU-CPT8m は TLR7 を阻害しないと考えられる。

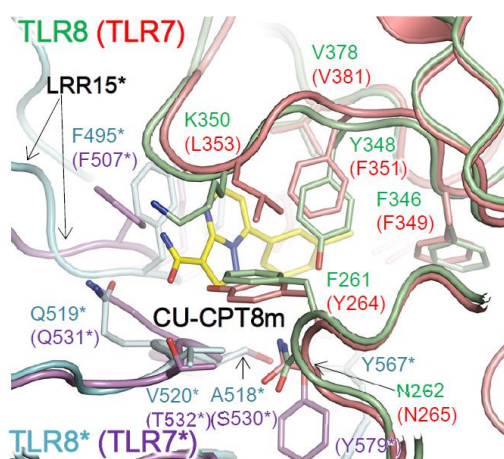


図 40. TLR7 のアンタゴニスト結合部位

CU-CPT8m 結合型 TLR8 (緑色と水色, PDB ID: 5WYX) に対して、TLR7 の構造 (R848 結合型, 赤色と紫色, PDB ID 5GMH)²³ のプロトマーを重ね合わせたモデル構造の、アンタゴニスト結合部位周辺の拡大図。

4. 考察

4.1. Z-loop による TLR8 の 2 量体化の阻害

Z-loop の切断が TLR7/8/9 サブファミリーの活性に必要であることはこれまで複数報告されており、Z-loop によって活性制御が行われていることが示されているが、実際の活性制御機構は不明だった^{25,48,51-53} (1.5 節参照)。TLR8^{wt} を S2 細胞で発現させると、Z-loop 内の R455 の直後でプロテアーゼによる切断を受けて 2 本のポリペプチド鎖に分かれていることが精製の初期段階から確認できるが、両者は会合してリガンド認識に関わっている^{24,32}。そこで Z-loop の機能を構造から明らかにするため、Z-loop 未切断体である TLR8^{Z-loop} を変異導入によって作成して構造解析を行った。

その結果、TLR8^{Z-loop} の結晶構造は単量体であり、2 量体を形成する際の界面側に未切断の Z-loop の一部が観察された (図 23, 3.1.5 項参照)。新規に観察されたこの Z-loop の一部は、Z-loop が切断された TLR8^{wt} では電子密度が観察されなかった領域である。さらに、この未切断の Z-loop の領域は、2 量体を形成する際の相手となる TLR8 分子 (TLR8*) と衝突することから、Z-loop が未切断の TLR8 は 2 量体を形成できないと考えられる (図 25A, 3.1.6 項参照)。実際にゲル濾過クロマトグラフィーから、TLR8^{wt} が 2 量体を形成する濃度であっても TLR8^{Z-loop} は溶液中では単量体であることが明らかになり、未切断の Z-loop は TLR8 の 2 量体の形成を阻害することが示された (図 20, 3.1.3 項参照)。

また、低分子アゴニストは TLR8^{Z-loop} に結合しなかった (図 21, 3.1.4 項参照)。これは、低分子アゴニストの結合部位である 1st site は 2 量体界面に存在しているため、2 量体を形成できない TLR8^{Z-loop} ではリガンドを結合することができないためだと説明できる。一方で ssRNA が結合する 2nd site は TLR8 の一つのプロトマー内のリガンド結合部位であり未切断の Z-loop に影響を受けないと考えられ、実際に ssRNA は TLR8^{Z-loop} に結合した (図 20, 図 21, 3.1.3 項, 3.1.4 項参照)。しかしシグナル伝達には 1st site へのリガンド結合が必須であり、2nd site にリガンドが結合するのみではシグナルを伝達することができないことが先行研究から示されている²⁴。実際に Z-loop 未切断の TLR8 は細胞中でもアゴニスト刺激に応答しなかった (図 28, 3.1.8 項参照)。以上から、Z-loop の切断によってはじめて TLR8 は活性化が可能になることが構造上からも示された (図 41)。TLR7/8/9 は UNC93B1 によって小胞体からエンドソームに輸送される^{27,28}。TLR8 を UNC93B1 と共発現させると Z-loop 切断体が増加することから⁵²、TLR8 が正確にエンドソームに輸送されて初めて活性を生じるように、Z-loop の切断によって活性制御が行われていると考えられる。

また、TLR7/8/9 の間で Z-loop の配列はほとんど保存されていない (図 8)。さらに Z-loop の切断部位や切断を行うプロテアーゼも異なっている。たとえば、hTLR8 は furin-like proprotein convertase によって Z-loop が切断され、

convertase の認識配列が R/K-Xn- R/K (X は任意のアミノ酸; n = 0, 2, 4, 6) であることから、その切断可能部位は R452 の直後、K453 の直後、R454 の直後、R455 の直後である⁵²。この切断箇所は Z-loop の前半に存在する。しかし、hTLR7 は hTLR8 と同様に furin-like proprotein convertase で Z-loop が切断されることが報告されているものの、その切断可能部位は TLR8 と異なった箇所であり、Z-loop の半ばに存在する⁵¹。また、mTLR7 では、Z-loop の前半にある L460 の直後と E461 の直後で切断された切断体が細胞中で検出されている⁵⁴。さらに mTLR9 は asparagine ecopeptidase などでも切断されることが示されているが、その切断箇所は Z-loop の後半に位置している^{55,65}。しかし、いずれの TLR でも活性化型 2 量体を形成することがシグナル伝達に必須であることは変わりがなく、TLR7/9 でも TLR8 と同様に未切断の Z-loop による阻害機構が働き、2 量体化が制御されている可能性がある。実際に TLR9 では、Z-loop が未切断だと 2 量体化しないことが示されている²⁵。

本研究により、TLR8 の Z-loop は 2 量体形成を抑制する自己阻害ループであり、プロテアーゼによる切断によりその阻害が解除されてはじめて 2 量体形成が可能となり、リガンド応答が可能になるという活性制御機構の構造基盤が明らかになった (図 41)。この Z-loop による活性制御により、生体中では TLR8 が適切にエンドソームに局在して初めてリガンド応答が可能になるよう、厳密に活性制御されている可能性がある。

4.2. アンタゴニストによる TLR8 の 2 量体再構成の阻害

TLR7/8 はウイルス由来の RNA だけでなく、自己由来の RNA も認識すると考えられており、実際に全身性エリテマトーデスや関節リウマチなどの自己免疫疾患に関わっていることが報告されている^{33,41,43,56,57,66}。そのため重要な創薬ターゲットである。これまで四環系抗うつ薬のミアンセリンが TLR7/8 の活性を阻害することが報告されているが、TLR3 および TLR9 も同時に阻害するため、創薬への応用は難しいと考えられていた⁵⁸。一方、Hang Hubert Yin 教授らが発見した TLR8 のアンタゴニストである CU-CPT 化合物は、TLR8 を選択的に阻害し細胞毒性も低いことから、新薬の候補化合物になると期待される⁵⁹ (1.6 節参照)。ITC の結果、実際に CU-CPT 化合物は TLR8 に結合し、さらに低分子アゴニストの TLR8 に対する結合を阻害することが明らかになった (3.2.2 項, 3.2.1 項参照)。しかし TLR8 に対する CU-CPT 化合物の作用機序は不明であり、例えば不活性化型 2 量体の安定化や (1.4 節参照)、単量体の安定化など、複数の機構が考えられた。CU-CPT 化合物の作用機序および相互作用を調べるため、TLR8 と CU-CPT 化合物複合体の構造解析を行った。

その結果、アンタゴニストはリガンド非結合型 TLR8 の 2 量体に存在する疎水性ポケットに結合し、不活性化型 2 量体の安定化を引き起こしていた (図 31, 図 36, 3.2.4, 3.2.6 項参照)。TLR8 の活性に必須である 1st site は活性化型 2 量体のみに存在するた

め、アンタゴニストが不活性化型 2 量体を安定化すると必然的に TLR8 に対してアゴニストが結合できなくなる。そのため、TLR8 へのアンタゴニストの結合によって活性化型 2 量体への構造変化が阻害され、生体ではシグナル伝達が阻害されると考えられる (図 41)。

本研究で用いた CU-CPT 化合物である CU-CPT8m と CU-CPT9b はいずれも TLR8 の阻害活性を示すものの、その IC_{50} を比較すると CU-CPT9b のほうが低い。実際に、TLR8 に対する結合は CU-CPT8m が $K_d = 224 \text{ nM}$ であるのに対し、CU-CPT9b が $K_d = 21 \text{ nM}$ と、CU-CPT9b のほうが 10 倍程度強力に TLR8 に結合する (3.2.1 項)。結晶構造中では、いずれの化合物も同じアンタゴニスト結合部位に結合しており、基本的な相互作用 (Y348 および F425* とのスタッキング相互作用、疎水性残基が形成するポケットとの疎水性相互作用、G351 の主鎖 N 原子および V520* 主鎖 N 原子との水素結合) は共通していたが、CU-CPT9b ではさらに S516* の主鎖 O 原子および Q519* の側鎖 N 原子との間で水分子を介した水素結合が観察され、これらの相互作用が TLR8 に対する強力な結合に寄与している可能性がある (図 36, 3.2.5 項参照)。

本知見は、構造解析によって初めて得られたものであり、今後 TLR8 を標的とした自己免疫疾患治療薬の開発に寄与すると考えられる。

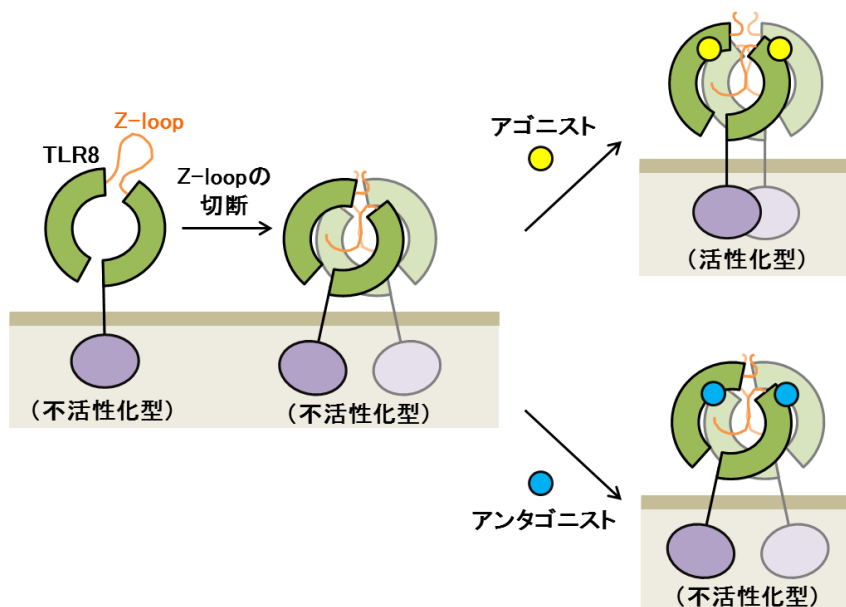


図 41. Z-loop およびアンタゴニストによる TLR8 の活性制御機構の模式図

5. 参考文献

1. Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499–511 (2004).
2. Song, D. H. & Lee, J.-O. Sensing of microbial molecular patterns by Toll-like receptors. *Immunol. Rev.* **250**, 216–229 (2012).
3. Yang, L. & Seki, E. Toll-Like Receptors in Liver Fibrosis: Cellular Crosstalk and Mechanisms. *Front. Physiol.* **3**, 1–18 (2012).
4. Alexopoulou, L. *et al.* Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nat. Med.* **8**, 878–884 (2002).
5. Takeuchi, O. *et al.* TLR6: A novel member of an expanding Toll-like receptor family. *Gene* **231**, 59–65 (1999).
6. Takeuchi, O. *et al.* Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol.* **13**, 933–940 (2001).
7. Takeuchi, O. *et al.* Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 1 in Mediating Immune Response to Microbial Lipoproteins. *J. Immunol.* **169**, 10–14 (2002).
8. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732–738 (2001).
9. Poltorak, A. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in *Tlr4* Gene. *Science* **282**, 2085–2088 (1998).
10. Shimazu, R. *et al.* MD-2, a Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4. *J. Exp. Med.* **189**, 1777–1782 (1999).
11. Hayashi, F. *et al.* The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099–103 (2001).
12. Heil, F. Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526–1529 (2004).
13. Diebold, S. S. Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA. *Science* **303**, 1529–1531 (2004).
14. Lund, J. M. *et al.* Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 5598–5603 (2004).
15. Hemmi, H. *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740–745 (2000).
16. Bauer, S. *et al.* Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 9237–9242

- (2001).
17. Jin, M. S. *et al.* Crystal Structure of the TLR1-TLR2 Heterodimer Induced by Binding of a Tri-Acylated Lipopeptide. *Cell* **130**, 1071–1082 (2007).
 18. Kang, J. Y. *et al.* Recognition of Lipopeptide Patterns by Toll-like Receptor 2-Toll-like Receptor 6 Heterodimer. *Immunity* **31**, 873–884 (2009).
 19. Liu, L. *et al.* Structural Basis of Toll-Like Receptor 3 Signaling with Double-Stranded RNA. *Science* **320**, 379–381 (2008).
 20. Park, B. S. *et al.* The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4–MD-2 complex. *Nature* **458**, 1191–1195 (2009).
 21. Yoon, S. I. *et al.* Structural Basis of TLR5-Flagellin Recognition and Signaling. *Science* **335**, 859–864 (2012).
 22. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* **140**, 805–820 (2010).
 23. Zhang, Z. *et al.* Structural Analysis Reveals that Toll-like Receptor 7 Is a Dual Receptor for Guanosine and Single-Stranded RNA. *Immunity* **45**, 737–748 (2016).
 24. Tanji, H. *et al.* Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 109–115 (2015).
 25. Ohto, U. *et al.* Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9. *Nature* **520**, 702–705 (2015).
 26. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373–384 (2010).
 27. Itoh, H. *et al.* UNC93B1 Physically Associates with Human TLR8 and Regulates TLR8-Mediated Signaling. *PLoS One* **6**, e28500 (2011).
 28. Kim, Y.-M., Brinkmann, M. M., Paquet, M.-E. & Ploegh, H. L. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* **452**, 234–238 (2008).
 29. Roach, J. C. *et al.* The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 9577–9582 (2005).
 30. Zhu, J. *et al.* Characterization of bovine Toll-like receptor 8: Ligand specificity, signaling essential sites and dimerization. *Mol. Immunol.* **46**, 978–990 (2009).
 31. Latz, E. *et al.* Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat. Immunol.* **8**, 772–779 (2007).
 32. Tanji, H., Ohto, U., Shibata, T., Miyake, K. & Shimizu, T. Structural Reorganization of the Toll-Like Receptor 8 Dimer Induced by Agonistic

- Ligands. *Science* **339**, 1426–1429 (2013).
33. Hornung, V. *et al.* Quantitative Expression of Toll-Like Receptor 1-10 mRNA in Cellular Subsets of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Sensitivity to CpG Oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* **168**, 4531–4537 (2002).
 34. Renn, C. N. *et al.* TLR Activation of Langerhans Cell-Like Dendritic Cells Triggers an Antiviral Immune Response. *J. Immunol.* **177**, 298–305 (2006).
 35. Zarembek, K. A. & Godowski, P. J. Tissue Expression of Human Toll-Like Receptors and Differential Regulation of Toll-Like Receptor mRNAs in Leukocytes in Response to Microbes, Their Products, and Cytokines. *J. Immunol.* **168**, 554–561 (2002).
 36. Wang, J. P. *et al.* Toll-like receptor-mediated activation of neutrophils by influenza A virus. *Blood* **112**, 2028–2034 (2008).
 37. Cervantes, J. L. *et al.* Human TLR8 is activated upon recognition of *Borrelia burgdorferi* RNA in the phagosome of human monocytes. *J. Leukoc. Biol.* **94**, 1231–1241 (2013).
 38. Shen, N. *et al.* Sex-specific association of X-linked Toll-like receptor 7 (TLR7) with male systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 15838–15843 (2010).
 39. Gantier, M. P. *et al.* Genetic modulation of TLR8 response following bacterial phagocytosis. *Hum. Mutat.* **31**, 1069–1079 (2010).
 40. Hornung, V. *et al.* Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat. Med.* **11**, 263–270 (2005).
 41. Sioud, M. Induction of Inflammatory Cytokines and Interferon Responses by Double-stranded and Single-stranded siRNAs is Sequence-dependent and Requires Endosomal Localization. *J. Mol. Biol.* **348**, 1079–1090 (2005).
 42. Makni-Maalej, K. *et al.* TLR8, but not TLR7, induces the priming of the NADPH oxidase activation in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **97**, 1081–1087 (2015).
 43. Barrat, F. J. *et al.* Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* **202**, 1131–1139 (2005).
 44. Diebold, S. S. *et al.* Nucleic acid agonists for Toll-like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides. *Eur. J. Immunol.* **36**, 3256–3267 (2006).

45. Forsbach, A. *et al.* Identification of RNA Sequence Motifs Stimulating Sequence-Specific TLR8-Dependent Immune Responses. *J. Immunol.* **180**, 3729–3738 (2008).
46. Hemmi, H. *et al.* Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* **3**, 196–200 (2002).
47. Jurk, M. *et al.* Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat. Immunol.* **3**, 499 (2002).
48. Ewald, S. E. *et al.* The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* **456**, 658–662 (2008).
49. Park, B. *et al.* Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat. Immunol.* **9**, 1407–1414 (2008).
50. Sepulveda, F. E. *et al.* Critical role for asparagine endopeptidase in endocytic Toll-like receptor signaling in dendritic cells. *Immunity* **31**, 737–48 (2009).
51. Hipp, M. M. *et al.* 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 (2013).
52. Ishii, N., Funami, K., Tatematsu, M., Seya, T. & Matsumoto, M. Endosomal Localization of TLR8 Confers Distinctive Proteolytic Processing on Human Myeloid Cells. *J. Immunol.* **193**, 5118–5128 (2014).
53. Ewald, S. E. *et al.* Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. *J. Exp. Med.* **208**, 643–651 (2011).
54. Kanno, A. *et al.* Essential role for Toll-like receptor 7 (TLR7)-unique cysteines in an intramolecular disulfide bond, proteolytic cleavage and RNA sensing. *Int. Immunol.* **25**, 413–422 (2013).
55. Onji, M. *et al.* An essential role for the N-terminal fragment of Toll-like receptor 9 in DNA sensing. *Nat. Commun.* **4**, 1949 (2013).
56. Laska, M. J. *et al.* Polymorphisms within Toll-like receptors are associated with systemic lupus erythematosus in a cohort of Danish females. *Rheumatology* **53**, 48–55 (2014).
57. Lee, Y. H., Choi, S. J., Ji, J. D. & Song, G. G. Association between toll-like receptor polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis update. *Lupus* **25**, 593–601 (2016).
58. Sacre, S. M. *et al.* Inhibitors of TLR8 Reduce TNF Production from Human

- Rheumatoid Synovial Membrane Cultures. *J. Immunol.* **181**, 8002–8009 (2008).
59. Zhang, S. *et al.* Small-molecule inhibition of TLR8 through stabilization of its resting state. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 58–64 (2018).
 60. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 (2010).
 61. Vagin, A. & Teplyakov, A. Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 22–25 (2010).
 62. Murshudov, G. N. *et al.* REFMAC 5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67**, 355–367 (2011).
 63. Otwinowski, Z. & Minor, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307–326 (1997).
 64. Battye, T. G. G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H. R. & Leslie, A. G. W. iMOSFLM : a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67**, 271–281 (2011).
 65. Matsumoto, F. *et al.* Cathepsins are required for Toll-like receptor 9 responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **367**, 693–699 (2008).
 66. Sioud, M. Innate sensing of self and non-self RNAs by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* **12**, 167–176 (2006).

6. 謝辞

本研究テーマを与えてくださり、熱心なご指導を賜りました 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。

本研究を行う上で、一から実験のご指導、ご助言を賜りました 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 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、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、本井 祐二 氏に心から御礼申し上げます。

本研究の共同研究者として、アンタゴニストの供与を行ってくださった University of Colorado Boulder, Hang Hubert Yin 教授, Zhenyi Hu 氏, 清華大学 Shuting Zhang 博士 に心から御礼申し上げます。

X 線回折実験において大変なご助力を賜りました 高エネルギー加速器研究機構 山田 悠介 博士 および 篠田 晃 博士, ビームラインスタッフの皆様に心から御礼申し上げます。

本研究の共同研究者として、結晶化を行ってくださった東京大学 大学院薬学系研究科蛋白構造生物学教室 坂庭 賢太郎 氏に心から御礼申し上げます。

本研究を進めるに当たり、多くのご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 藤間 祥子 博士に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、日ごろから大変お世話になりました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。