論文の内容の要旨

論文題目　自然免疫系一本鎖 RNA 受容体 TLR8 の活性制御機構

氏名　　丹治　裕美

【背景】

Toll 様受容体（TLR）は、病原体の分子パターンを認識して自然免疫を活性化させる I 型膜蛋白質であり、リガンド認識を行う細胞外ロイシンリッチリピート（LRR）ドメイン、膜貫通ヘリックス、シグナル伝達を行う細胞内 TIR ドメインから成る（図 1）。TLR8 はウィルス由来の一本鎖（ss）RNA および合成低分子リガンドを認識して抗ウィルス応答や炎症反応を引き起こす。一方で自己由来の RNA も認識し、自己免疫性疾患に関わっていると考えられている。これまでの構造解析の結果、TLR8 はリガンド非結合状態では不活性化型の 2 量体であり、リガンド結合に伴い活性化型 2 量体へと再構成されること、この際、低分子アゴニストやウリジンを認識し活性化型への構造変化を引き起こす 1st site と、ssRNA を認識し 1st site へのリガンド親和性を上昇させる 2nd site の 2 つのリガンド結合部位が存在することが明らかになった（図 1、文献 1, 2）。

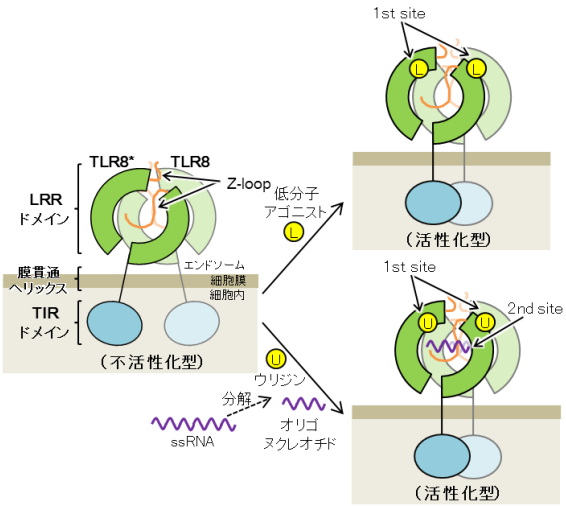

図 1. TLR8 のドメイン構成および活性化機構の模式図

TLR8 の活性化には LRR14 と LRR15 の間のループ領域（Z-loop）の切断が必要だと考えられているが、これまで構造解析に用いた TLR8 は既に Z-loop で切断されており、Z-loop による活性制御機構は不明だった。また、TLR8 の活性化を抑制するアンタゴニストは全身性エリテマトーデスのような自己免疫疾患治療薬として期待されているが、これまでその結合部位および作用機序に関しては不明であった。

本研究では、Z-loop による内在性および合成化合物による外来性の TLR8 の活性制御機構を明らかにすべく、Z-loop 未切断 TLR8、および TLR8 とアンタゴニスト複合体の構造解析を行った。

【方法】

ヒト TLR8 の細胞外ドメイン全長（LRR1-26）の C 末端に protein A タグを付加したもの（$TLR8^{wt}$）、および Z-loop で切断されることを防ぐため 452 残基目から 455 残基目を RKRR から NQSN に置換した変異体（$TLR8^{Z\text{-}loop}$）を、糖鎖生合成阻害剤キフネンシン存在下でショウジョウバエ S2 細胞を用いて発現させた。酵素によるタグの切断と糖鎖の短縮を行い、高純度精製したサンプルを用

いて結晶化を行った。アンタゴニストとして、コロラド大学 Yin 研究室から供与された CU-CPT8m および CU-CPT9b（CU-CPT 化合物）を用いた。 $TLR8^{Z\text{-}loop}$、$TLR8^{wt}$/CU-CPT8m、$TLR8^{wt}$/CU-CPT9b の複合体をそれぞれ結晶化し、高エネルギー加速器研究機構にて X 線回折データの収集を行い、分子置換法によって構造決定した。また、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて、$TLR8^{wt}$ および $TLR8^{Z\text{-}loop}$ の会合状態とリガンド結合能を評価した。さらに、等温滴定型カロリメトリー（ITC）を用いて、$TLR8^{wt}$ に対する CU-CPT 化合物、および CU-CPT 化合物存在下の $TLR8^{wt}$ に対する低分子アゴニスト R848 の結合を評価した。

【結果】

１．Z-loop 未切断 TLR8 の構造解析

$TLR8^{wt}$ は既に Z-loop 中の R455 と S456 の間で切断されていたが、$TLR8^{Z\text{-}loop}$ は Z-loop が未切断のままであることを確認した（図 2A）。ゲル濾過クロマトグラフィーの結果から、$TLR8^{Z\text{-}loop}$ は単量体であり、ssRNA は結合するが、低分子アゴニストは結合しないことが示された（図 2B）。

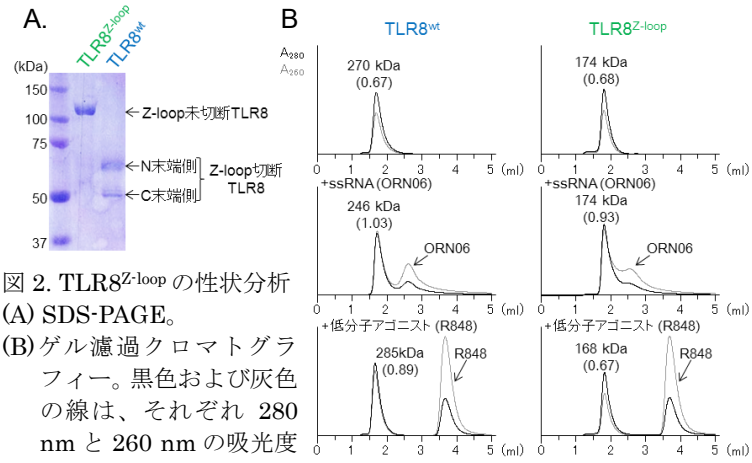

図 2. $TLR8^{Z\text{-}loop}$ の性状分析
(A) SDS-PAGE。
(B) ゲル濾過クロマトグラフィー。黒色および灰色の線は、それぞれ 280 nm と 260 nm の吸光度を表す。

$TLR8^{Z\text{-}loop}$ の構造を分解能 2.5 Å で構造決定した結果、$TLR8^{Z\text{-}loop}$ は単量体で、$TLR8^{wt}$ のプロトマーと類似していた（文献 3）。$TLR8^{Z\text{-}loop}$ では、Z-loop 中の 443～451 残基目の電子密度が、$TLR8^{wt}$ において 2 量体を形成する界面側に新たに観察され、この部分はリガンド非結合型および結合型 $TLR8^{wt}$ 2 量体構造との重ね合わせの結果、いずれにおいても 2 量体を形成する相手の分子と衝突することが示唆された。

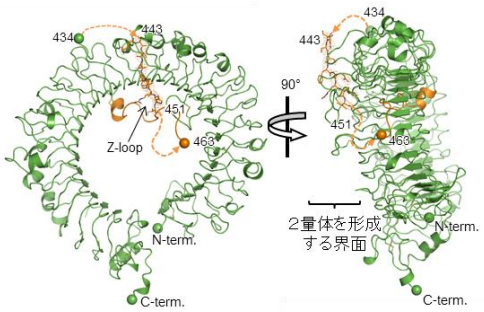

図 3. $TLR8^{Z\text{-}loop}$ の結晶構造
正面図（左）および側面図（右）。

２．$TLR8^{wt}$/アンタゴニスト複合体の構造解析

ITC により、アンタゴニスト CU-CPT 化合物と $TLR8^{wt}$ の結合解離定数 K_d は 224 nM（CU-CPT8m）と 21 nM（CU-CPT9b）と算出された（図 4A）。また、CU-CPT 化合物存在下では R848 の $TLR8^{wt}$ に対する親和性が顕著に低下した（図 4B）。

TLR8^{wt} と CU-CPT 化合物を共結晶化し、分解能 2.4 Å（CU-CPT8m）と 2.3 Å（CU-CPT9b）で構造決定した（文献 4）。その結果、TLR8^{wt}/CU-CPT 化合物はいずれもリガンド非結合型と類似した 2 量体を形成していた。2 分子の C 末端間の距離が約 49 Å 離れていることから、不活性化型 2 量体だと考えられる（図 5）。CU-CPT 化合物は、不活性化型 2 量体にのみ存在する結合部位に結合し、Y348 および F425*とのスタッキング相互作用、F405 や F494*などが構成するポケットとの疎水性相互作用、G351 および V520*との水素結合によって認識されていた（図 6）。

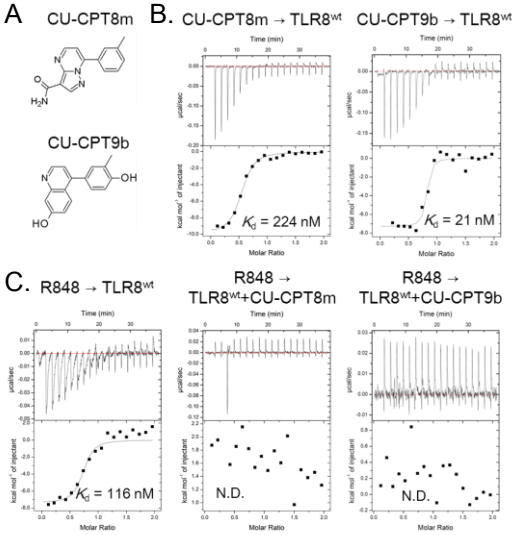

図 4. ITC

(A) CU-CPT 化合物の構造式。
(B) CU-CPT 化合物を TLR8 に滴定した結果。
(C) 低分子アゴニスト R848 を TLR8 に滴定（左）および CU-CPT 化合物存在下 TLR8 に滴定（中央、右）した結果。

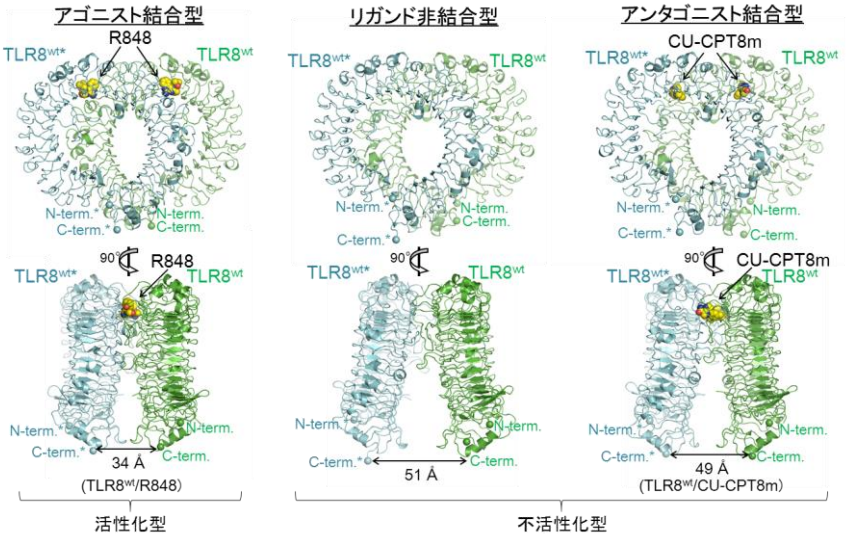

図 5. 各 TLR8 の結晶構造

アゴニスト結合型（右）・リガンド非結合型（中央）・アンタゴニスト結合型（右）TLR8 の結晶構造の、正面図（上）および側面図（下）。

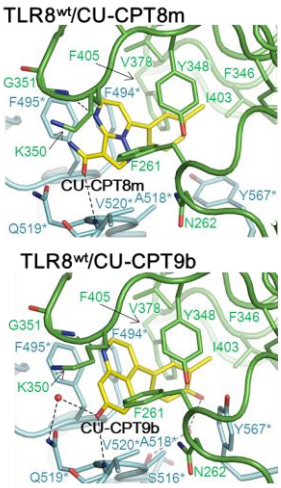

図 6.アンタゴニスト結合部位の拡大図

TLR^{wt}/CU-CPT8m（上）および TLR^{wt}/CU-CPT9b（下）のアンタゴニスト結合部位の拡大図。

【考察・結論】

Z-loop が未切断の TLR8 は溶液および結晶中で単量体であり、Z-loop が 2 量体界面を遮っていたことから、未切断の Z-loop が TLR8 の 2 量体化を阻害すると結論付けた。本研究により、TLR8 の Z-loop は 2 量体形成を抑制する自己阻害ループであり、プロテアーゼによる切断によりその阻害が解除され 2 量体形成が可能となるという活性制御機構の構造基盤が明らかになった。

TLR8 のアンタゴニストは不活性化型 2 量体にのみ存在する結合部位に結合していた。アゴニス

トが活性化型２量体構造を安定化して TLR8 を活性化するのに対し、本研究に用いたアンタゴニストは不活性化型２量体構造を安定化して TLR8 の活性化を抑制すると考えられる。本知見は構造解析によってはじめて得られたものであり、TLR8 を標的とした自己免疫性疾患治療薬の開発に寄与するだろう。

1. Tanji, H. et al. (2013) Structural Reorganization of the Toll-Like Receptor 8 Dimer Induced by Agonistic Ligands. *Science* **339**, 1426-1429
2. Tanji H. et al. (2015) Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 109-115
3. Tanji, H. et al. (2016) Autoinhibition and relief mechanism by the proteolytic processing of Toll-like receptor 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 3012-3017
4. *Zhang, S., *Hu, Z., *Tanji, H. et al. (2018) Small-molecule inhibition of TLR8 through stabilization of its resting state. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 58-64 （* 同等貢献）