

ウイルス由来の RNA を感知し自然免疫受容体
Toll 様受容体 7 (TLR7) が活性化する機構を解明
～TLR7 標的のアレルギー治療薬設計等に期待～

1. 発表者：

清水 敏之（東京大学大学院薬学系研究科 教授）
張 志寛（東京大学大学院薬学系研究科 修士2年）
大戸 梅治（東京大学大学院薬学系研究科 准教授）
内山 進（大阪大学大学院工学研究科 准教授）

2. 発表のポイント：

- ◆体内に侵入してきたウイルス由来の RNA を感知して自然免疫応答を引き起こす Toll 様受容体 7 (TLR7) と呼ばれるタンパク質の立体構造を明らかにしました。
- ◆TLR7 が 2 か所の部位でウイルス由来の RNA と低分子リガンド（注1）を同時に認識し、活性化される詳細な機構を明らかにしました。
- ◆TLR7 を標的としたワクチンアジュバント（注2）やウイルス感染やアレルギーの治療薬などの設計につながることを期待されます

3. 発表概要：

東京大学大学院薬学系研究科の清水敏之教授、張志寛大学院生、大戸梅治准教授、東京大学医科学研究所の三宅健介教授、柴田琢磨助教、大阪大学大学院工学研究科の内山進准教授、首都大学東京理工学研究科の磯辺俊明教授、田岡万悟准教授らの研究グループは、微生物の侵入を感知して免疫系を活性化する TLR7 タンパク質の詳細な立体構造を世界で初めて明らかにしました。

細菌やウイルスなどの病原体に対する感染防御機構として、自然免疫機構が備わっており、TLR 受容体が主にその役割を担っています。TLR7 は TLR 受容体の 1 つで、ウイルス由来の一本鎖 RNA または合成低分子リガンドを感知することで、インターフェロン（注3）などの産生を促します。そのため TLR7 は、抗ウイルス薬、ワクチン、抗がん剤などのターゲットとして注目されていましたが、リガンドを感知する具体的な機構は不明でした。

研究グループは、TLR7 が、一本鎖 RNA (polyU (注4)) と 2 種類の低分子リガンド (グアノシン (注5)、loxoribine (注6)) のいずれか、あるいは低分子リガンド R848 (注7) に結合した複合体の立体構造を明らかにしました (図1)。その結果、TLR7 はそれぞれのリガンドと 2:2 (または 2:2:2) の複合体を形成することで、活性化型の 2 量体となることが明らかになりました。グアノシン、loxoribine および R848 などの低分子リガンドは 2 量体の界面に位置する第 1 結合部位に、polyU 一本鎖 RNA は TLR7 のリング型構造の凹面の第 2 結合部位に位置していました (図2)。構造解析と生化学的実験の結果、TLR7 はこれらの 2 種類のリガンドによって協調的に活性化されることが明らかになりました。

これらの知見は、ワクチンアジュバントの開発やウイルス感染やアレルギーなどの治療薬の設計につながることを期待されます。

4. 発表内容：

細菌やウイルスなどの病原体に対する防御機構として、自然免疫機構が備わっています。TLR 受容体は自然免疫系の受容体であり、病原体の持つ特定の分子の構造を認識しています。TLR 受容体が活性化すると、自然免疫が発動して炎症反応や抗ウイルス応答が起こり、病原体を排除します。TLR 受容体は膜貫通タンパク質であり、細胞外のロイシンというアミノ酸を多く持つ繰り返し配列部分で分子構造を認識し、細胞内の TIR ドメイン（注8）を通じてシグナルを伝えています。

TLR7は一本鎖 RNA の受容体として同定されており、HIV-1 や HCV ウイルス感染症に関与しています。また、自身の死細胞などから放出される RNA へ TLR7 が過度に応答する現象は、自己免疫疾患に関係するとされています。一方で、TLR7 はイミダゾキノリン誘導體（注9）やグアノシンなどの低分子化合物によって活性化されることも、報告されています。TLR7 が活性化するとインターフェロンなどの産生を促し、免疫反応を引き起こします。このために、TLR7 はウイルス感染や自己免疫疾患に対する治療薬やワクチンのアジュバントなどのターゲットとして注目されています。しかし、TLR7 がどのようにこれらのリガンドを認識し、免疫を活性化するのかについて具体的な機構は不明でした。

本研究グループは、TLR7 による一本鎖 RNA および低分子リガンドの認識機構を、TLR7-グアノシン-polyU、TLR7-loxoribine-polyU、TLR7-R848、の3つの複合体の立体構造を X 線結晶解析（注10）で明らかにしました。

大型放射光施設 SPring-8 および高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory の強力な X 線を使用して構造解析した結果、TLR7 はそれぞれのリガンドと 2:2（または 2:2:2）の複合体を形成することで活性化型の m 字型の 2 量体構造をとることが明らかになりました（図1）。グアノシンなどの低分子リガンドは 2 量体界面中の第1結合部位に結合し特徴的な相互作用により認識されていました。また、19 のウリジンからなる polyU の断片の UUU 部分は TLR7 の N 末端側の LRR1-LRR5 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結合部位に結合していました。UUU の中央の U 部分とその周辺のアミノ酸残基と塩基特異的およびリボース特異的な相互作用を形成していました（図2）。

さらに、TLR7 のリガンド特異性および活性化 2 量体形成機構を調べました。TLR7 の第1結合部位は各種ヌクレオシドの中でグアノシンを特異的に認識すること、第2結合部位は非末端部分にウリジン塩基を含む 3 塩基以上の長さの一本鎖 RNA を特異的に認識することを明らかにしました。また、一本鎖 RNA による TLR7 の活性化には、第1結合部位と第2結合部位の両方のリガンドが必須であること、さらに TLR7 の第1結合部位のリガンドに対する親和性は、TLR7 が一本鎖 RNA と結合することで強くなることが明らかになりました。

これらの結果から、TLR7 の活性化機構を提唱しました（図3）。TLR7 はまず第2結合部位を用い、非末端部分にウリジン塩基を含む一本鎖 RNA を認識します。次に、第1結合部位にグアノシンが結合することによって、TLR7 が活性化します。一方で、R848 などの合成低分子リガンドの場合には、第1結合部位への結合だけで TLR7 は活性化します。

エンドソーム（注11）に局在する TLR7 と、TLR7 に類似した TLR8 と TLR9 は一本鎖核酸を認識し、ウイルス感染や自己免疫疾患、さらにはがんまで、さまざまな疾患に関わっていることがわかっています。本研究グループによるこれまでの TLR8 および TLR9 の結晶構造解析に加え、今回、さらに世界で初めて TLR7 の結晶構造解析に成功しました。

これまで TLR7 は一本鎖 RNA を認識する受容体だと考えられていましたが、今回の結果から 2 つのリガンド結合部位を用いて 2 種類のリガンドを同時に認識し活性化することが明らかになりました。このことから、今後は 2 つの作用点で制御するという新しい視点で、TLR7 をターゲットとした治療薬開発が進むと期待されます。

本研究は、戦略的創造研究推進事業 (CREST)、科学研究費補助金、公益財団法人武田科学振興財団助成金、公益財団法人持田記念医学薬学振興財団助成金、公益財団法人第一三共生命科学振興財団助成金などの外部資金支援を受けて行われたものです。

5. 発表雑誌：

雑誌名：*Immunity*

論文タイトル：Structural analysis reveals that Toll-like receptor 7 is a dual receptor for guanosine and single-stranded RNA

著者：張志寛*、大戸梅治*、柴田琢磨、クラユヒナエレナ、田岡万悟、山内芳雄、丹治裕美、磯邊俊明、内山進、三宅健介、清水敏之† (*共同筆頭著者、†責任著者)

DOI 番号：10.1016/j.immuni.2016.09.011

6. 注意事項：

日本時間 10 月 12 日 (水) 午前 1 時 (米国東部時間：11 日 (火) 正午) 以前の公表は禁じられています。

7. 問い合わせ先：

東京大学大学院薬学系研究科

教授 清水 敏之 (しみず としゆき)

HP：<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~kouzou/index.html>

大阪大学大学院工学研究科

准教授 内山 進 (うちやま すすむ)

< J S T 事業に関する事 >

川口 哲 (カワグチ テツ)

科学技術振興機構 戦略研究推進部

〒102-0076 東京都千代田区五番町 7 K's 五番町

8. 用語解説：

注1) リガンド

特定の受容体に結合する物質で、それぞれの TLR（ヒトの場合 TLR1～TLR10 が存在する）は微生物やウイルス由来の異なる物質をリガンドとする。

注2) アジュバント

抗原と混合して生体に投与することで、投与した抗原に対する免疫応答を増強する物質のことで抗原性補強剤とも呼ばれる。

注3) インターフェロン

細菌やウイルスなどの病原体の侵入に対して免疫系の細胞が分泌するタンパク質で、ウイルスの増殖を抑制する作用や免疫系を活性化するなどの作用を発揮する。

注4) polyU

多数のウリジンがホスホジエステル結合で結合した配列を持つ RNA。本研究では 19 のウリジンから構成される RNA を使用している。

注5) グアノシン

RNA などの核酸の構成成分として使われている糖と塩基が結合した化合物（ヌクレオシド）の一つ。生体中では他にアデノシン、チミジン、シチジン、ウリジンなどが使われている。

注6) loxoribine

TLR7 を活性化する低分子リガンドの 1 つでグアノシン誘導体である。

注7) R848

TLR7 を活性化する低分子リガンドの 1 つ、Resiquimod とも呼ばれる。TLR8 も活性化する。

注8) TIR ドメイン

TLR の細胞内の領域で、他のタンパク質と会合することでシグナルを伝達する役割を持っている。

注9) イミダゾキノリン誘導体

3 環系のイミダゾキノリン骨格を有する有機化合物。

注10) X線結晶解析

物質の構造を解析する手法の一つ。調べたい物質の結晶に対して X 線を照射して、そこから散乱された X 線の強度を観測し解析することで最終的に結晶の構造を知ることができる。

注11) エンドソーム

生体膜からできている小胞で細胞内に存在している。細胞内に取り込まれた物質の選別、分解、再利用などに関係する。

9. 添付資料 :

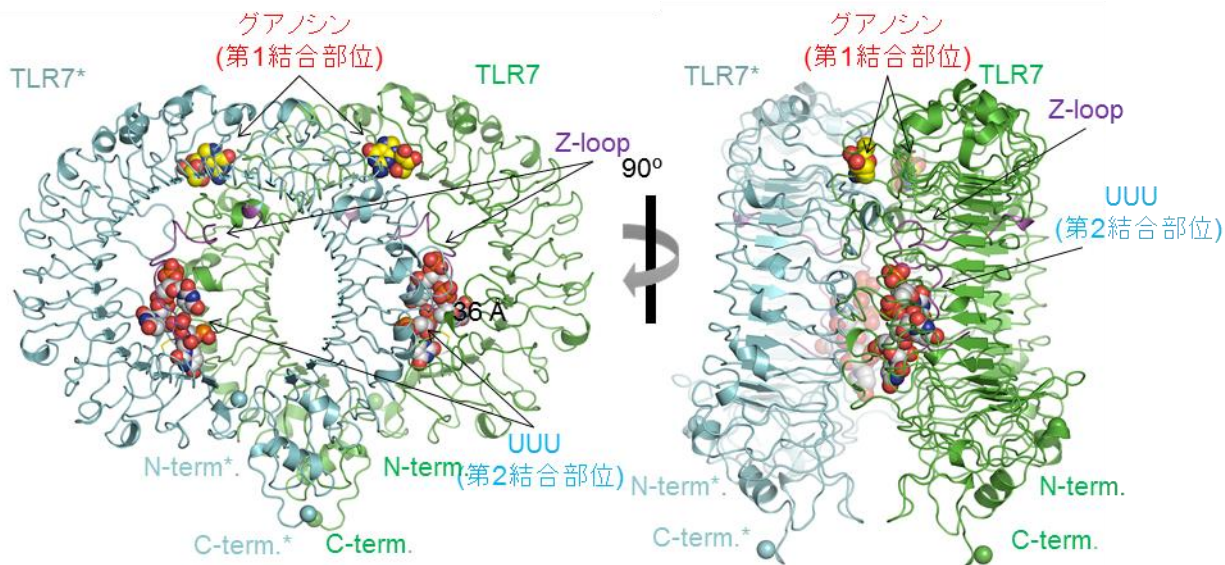


図 1 : TLR7-グアノシン-polyU の全体構造

2量体を構成している TLR7 分子の一方 (TLR7) を緑色、他方 (TLR7*) を青色で示している。赤文字で示した第 1 結合部位、および青文字で示した第 2 結合部位の二箇所のリガンド結合部位が存在し、それぞれグアノシンおよび polyU の一部の UUU が結合していた。

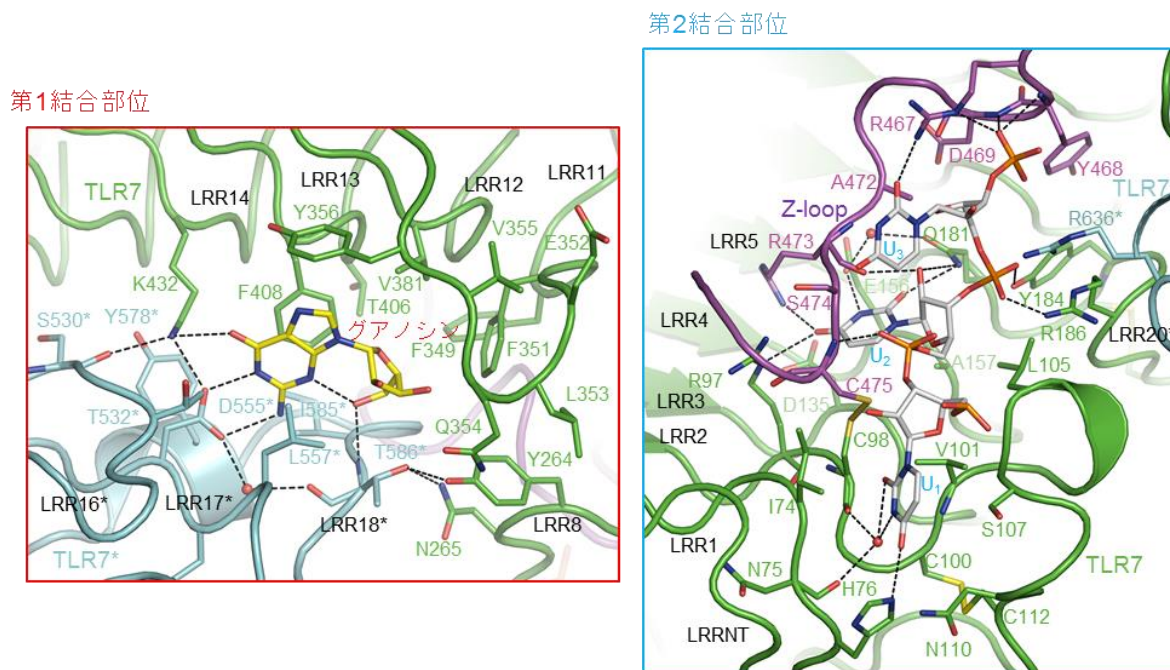


図 2 : リガンド認識部位の拡大図

(左図) 第 1 結合部位の拡大図 (グアノシンが結合している)。

(右図) 第 2 結合部位の拡大図 (PolyU が結合している)。

グアノシン、polyU、TLR7、TLR7*および Z-loop の炭素原子をそれぞれ黄色、灰色、緑色、シアンおよび紫色で示している。水素結合を破線で示している。

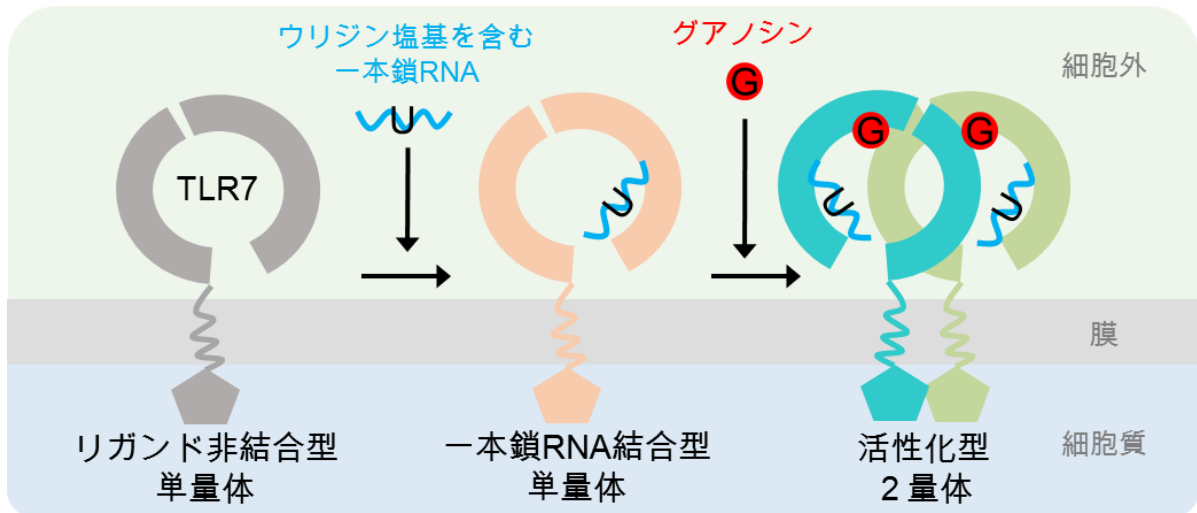


図3：TLR7の活性化機構

グアノシンおよび一本鎖RNAによるTLR7の活性化モデル。まず第2結合部位で非末端ウリジン塩基を含む一本鎖RNAを認識し、次に第1結合部位でグアノシンを認識することで活性化型の2量体が形成される。