

学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

細胞外 LRRCT ドメイン変異体をもちいたマウス TLR5 活性化機序の解明

研究代表者 魚住 尚紀 (医学部 生化学)

緒言

Toll-like receptor (TLR) は、病原体由来の分子パターン (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) の認識に携わり、炎症反応の惹起、獲得免疫系の活性化に重要な役割を果たす自然免疫受容体である¹⁾。自然免疫系は緻密な調節のもと、病原体からの防御、自己に対する攻撃の回避をつかさどり、生体の恒常性維持に重要な役割を担っている。TLR作動薬・拮抗薬は、免疫機能の賦活・抑制を通じて、病態・生理的状態の改善に有用と考えられている。

TLRについては広汎な研究がなされてきたが、TLR活性化の分子機序には重大な未解明点が残されている。リガンドと会合したTLRの細胞外ドメインは、一般に点対称2量体を形成すると理解されている²⁻⁵⁾。その一方で、TLRの細胞内情報伝達経路において受容体直下に位置するMyddosomeは、12分子のデスドメインタンパク質によって形成される螺旋構造が報告されている⁶⁾。受容体細胞外ドメインの点対称構造が、細胞内情報伝達複合体の螺旋構造に変換される分子機序は明らかでなく、TLR活性化機序のブラックボックスである⁷⁾。

このような状況を背景に、細胞生物学的な手法によりTLR4、TLR5それぞれの一次構造と機能の相関を解析し、受容体活性化機構の解明をすすめてきた⁸⁾。我々が採用している変異体発現細胞のリガンドに対する転写を介した応答を定量化する手法は、タンパク質複合体の構造生物学的解析 (X線結晶構造解析、核磁気共鳴解析) や1分子イメージングなどによって得られるような立体構造の直接的情報を与えないが、細胞の応答を読み取っている点で、受容体機能と対応のある情報を得られる利点がある。

本研究では、特にマウスTLR5細胞外LRRCTドメインに注目して解析を進めた。LRRCTドメインは、マウスTLR3の結晶構造解析により、2量体形成した2分子のTLR3の分子間会合に関与することが示され、アミノ酸残基レベルで2分子のTLR3の分子間会合点が明らかにされている²⁾。

材料と方法

HEK293細胞を用いたTLR発現系は、TLR研究において

広く用いられている実験系に目的に合わせた改変を加え、本研究に適した手法が整えてある^{8,9)}。

簡潔に示すと、マウスTLR5の発現ベクターはプラスミドpcDNA3.1 hygro (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を骨格とし、inverse PCR法で定法に従い変異体を作製した¹⁰⁾。陰イオン交換カラム (Nucleobond Extamidi EF, Takara, Otsu, Japan) で精製したエンドトキシンフリーのプラスミド溶液をトランスフェクションに用いた。これらの組換え遺伝子の使用に関しては、埼玉医科大学第二種使用等拡散防止措置承認 (1217号) を得ている。

HEK293細胞は10% FCS添加DMEM (Sigma, St. Lewis, MO, USA) 中で培養し、6穴プレート上でLipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いたりポフェクション法にてトランスフェクションした。トランスフェクション翌日、96穴プレートに細胞数をそろえて播種 ($4 \times 10^4/100 \mu\text{L}$, 5% FCS添加DMEM)、2倍濃度のリガンド溶液を100 μL 添加して刺激した。刺激24時間後、培養上清を回収して、HEK293細胞が産生したヒトIL-8濃度をBD OptEIA Set Human IL-8 (BD biosciences, San Diego, CA, USA) にて定量した。

リガンドは、フラジェリンFLA-ST Ultrapure (cat. #tlrl-pstfla, Invivogen, San Diego, CA, USA) を生理食塩水 (Otsuka, Tokushima, Japan) に溶解し、5% FCS添加DMEMで希釈して使用した。

結果

TLRは1回膜貫通型受容体の構造を持ち、N末端側を細胞外、C末端側を細胞内の配向で発現する¹⁾。細胞外構造の大部分を占めるロイシンリッチリピート (LRR) ドメインがリガンド認識の主要な部分を担っている。LRRドメインと膜貫通部位との間には約50アミノ酸残基で形成されるLRRCTドメインがあり、マウスTLR3においては、2量体形成した2分子のTLR3の分子間会合点 (D649, T680) を構成している²⁾。LRRCTドメインに共通して保存された特徴的な4つのシステイン残基を手がかりにアラインメントを作成し、マウスTLR3のD649, T680残基と対応するマウスTLR5アミノ酸残基V597, Y627を特定した。これらの残基のアラニン変異体V597A、

Y627AはマウスTLR5のリガンドであるフラジェリンに対する反応性が低下していた (Fig. 1). V597, Y627の近傍にあるN599, M626のアラニン変異体では, 野性型と比してほとんどリガンドに対する反応性に違いはなく, EC50の値の変化を認めなかった. 過去の報告においてリガンド認識に寄与する可能性が示唆されているLRRドメイン中のアミノ酸残基D293, E365のアラニン変異体はV597, Y627の変異体と同様の表現型を示し, LRRCTドメインが受容体機能において重要な役割を果たしていることが示唆された¹¹⁾.

マウスTLR5 LRRCTドメイン中のV597, Y627残基の役割をさらに検討するため, アラニン以外の残基への変異導入をおこなった. Y627D変異体がりガンド用量反応曲線の最も強い右方変異を示した (Fig. 2A). Y627NはY627DとY627Aの中間的な表現型を示し, Y627HはY627Aと同様のリガンド応答性を示した. V597D変異をこれらのY627変異体に追加して導入したところ, V597D Y627D変異体はフラジェリンに対してほとんど反応を示さなかった (Fig. 2B). V597D Y627AはV597Dとほとんど違いが認められず, V597D Y627H変異体はむしろリガンド応答が改善して観察された.

マウスTLR5 P751H変異体は細胞内情報伝達を媒介する細胞内TIRドメイン中の変異体で, マウスTLR4 P712H変異体と1次構造で相同である. マウスTLR4 P712H変異体は, 情報伝達機能を欠いている^{12,13)}. マウスTLR5 P751Hもリガンドに対する応答を失っていることを確認した. TLRの野性型と変異体を共発現させると, 野性型単独発現の場合と比較して細胞応答が抑制されて観察される (ドミナントネガティブ効果) ことがあり, TLRが2量体 (多量体)

を形成してはたらくと考える根拠の一つとなっている. マウスTLR5野性型と変異体の共発現実験 (発現量比 野性型:変異体=1:3) において, V597D Y627D変異体はP751H変異体とほぼ同等の抑制効果を示した (Fig. 3). 3重変異体 V597D Y627D P751Hを用いた場合には, V597D Y627D変異体やP751H変異体のいずれかを共発現させた場合に比べて, 野性型マウスTLR5に対するより強い抑制を示した.

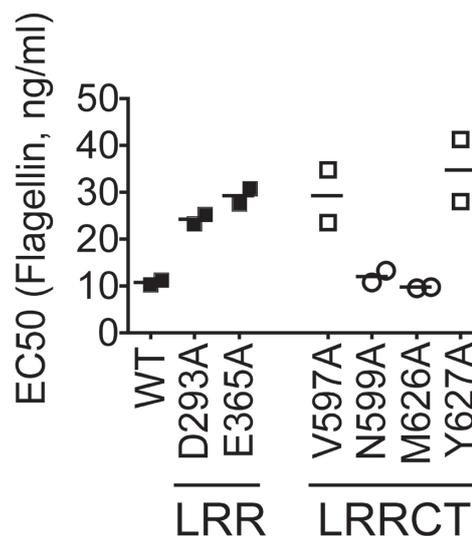


Fig. 1. マウスTLR5細胞外ドメイン アラニン変異体のフラジェリンに対する反応性. IL-8産生に対するリガンドEC50値で示した. D293, E365残基はLRRドメイン, V597からY627残基はLRRCTドメインに含まれるアミノ酸残基である. トランスフェクションベクター重量比, TLR5カセット:空ベクター=1:9 (総プラスミド量1 $\mu\text{g}/\text{well}$).

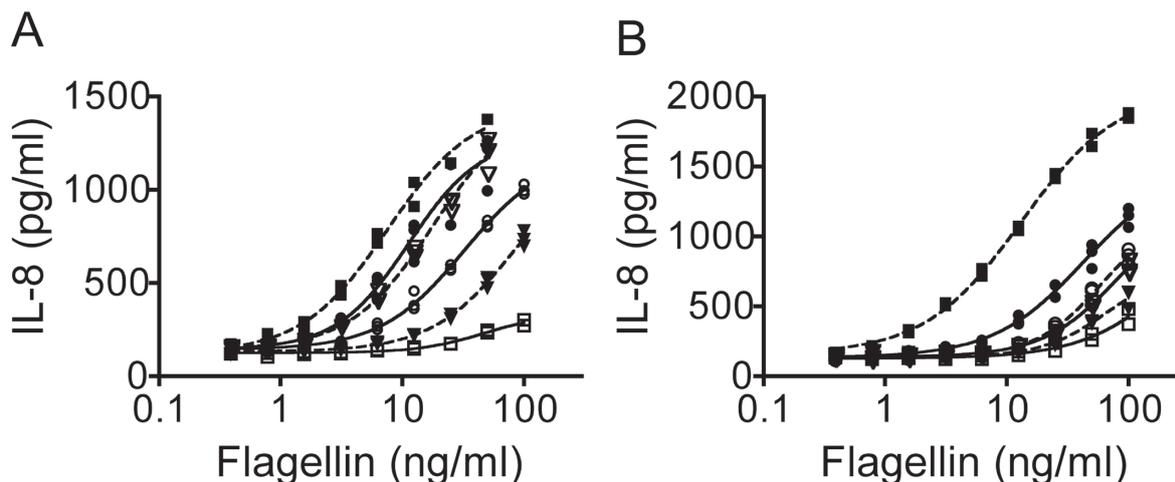


Fig. 2. マウスTLR5細胞外LRRCTドメインのV597, Y627変異体のフラジェリンに対する反応性. リガンド用量応答曲線で示した. トランスフェクションベクター重量比, TLR5カセット:空ベクター=1:32 (総プラスミド量1 $\mu\text{g}/\text{well}$). A, Y627アミノ酸残基変異体. □: 空ベクター導入細胞, ■: 野生型マウスTLR5, ●: Y627H変異体, ▽: Y627A変異体, ○: Y627N変異体, ▼: Y627D変異体. B, V597D Y627アミノ酸残基複合変異体. □: 空ベクター導入細胞, ■: 野生型マウスTLR5, ●: V597D Y627H変異体, ▽: V597D Y627A変異体, ○: V597D Y627N変異体, ▼: V597D Y627D変異体. V597D Y627A変異体(▽)とV597D Y627N変異体(○)のプロットは重なり合いが大きい.

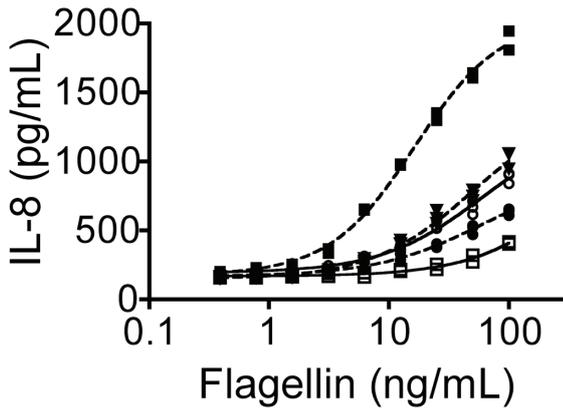


Fig. 3. 共発現したマウスTLR5細胞外LRRCTドメイン変異体による野生型マウスTLR5機能の抑制. リガンド用量応答曲線で示した. トランスフェクションベクター重量比, TLR5野生型カセット:TLR5変異体カセット:空ベクター=1:3:16 (総プラスミド量1 μ g/well). □:空ベクター導入細胞, ■:野生型マウスTLR5のみ, ▼:野生型マウスTLR5とV597D Y627D変異体の共発現, ○:野生型マウスTLR5とP751H変異体の共発現, ●:野生型マウスTLR5とV597D Y627D P751H変異体の共発現.

考 察

LRRCTドメインは細胞外でLRRドメインと膜貫通部位に挟まれた領域を占める. マウスTLR3の結晶構造解析の結果では, 2本鎖RNAリガンド存在時に形成されるリガンド・受容体複合体において, LRRCTドメインが2分子のTLR3細胞外構造間の唯一の直接接触点を形成することが明らかになっている²⁾. このような接触点は, TLR4やTLR5の細胞外ドメインの立体構造解析では示されておらず^{3,4)}, また, TLR3のLRRCTドメインの役割について機能面から解析した結果も知られていない. 本研究の結果は, マウスTLR5 LRRCTドメイン中の2つのアミノ酸残基 (V597, Y627) が受容体機能において重要な役割を果たしていることを示している. これらのアミノ酸残基はそれぞれ, マウスTLR3のD648, T679残基と一次構造上対応する位置にある. マウスTLR3の場合と同様に2分子のTLR間の会合点を形成するかどうかについては, 今後の検討が必要である. ごく近傍のアミノ酸残基の変異は受容体機能に影響を与えないことが示されており, 部位特異的な役割を果たしていると考えられる.

アラニン置換体以外の変異体を解析した結果からは, マウスTLR5 V597D Y627D変異体がフラジェリン受容体としての機能をほとんど失っていることが明らかになった. 疎水性, 芳香族のアミノ酸残基を酸性アミノ酸に置換したことによる, 分子内構造の変化による影響と, 分子間相互作用に対する影響 (会合面の形状, 相互作用の強さなどの変化による) が原因になっていると考えられる.

野生型TLR5との共発現実験では, V597D Y627D変異体は野生型TLR5によるリガンド応答を抑制することが

示された. 3重変異体V597D Y627D P751Hの野生型TLR5との共発現実験の結果は, V597D Y627D変異とP751H変異の野生型TLR5に対する抑制効果は相乗的であることを示している. 受容体が持つ2つの機能, すなわち1) 受容体・リガンド複合体の形成 (細胞外構造: LRRドメイン, LRRCTドメインが媒介) と2) 胞内情報伝達経路の活性化 (細胞内構造: TIRドメインが媒介) に分割して, これらの結果を解釈すると次のようになる. P751残基はTIRドメイン中にあり, P751H変異は細胞内情報伝達の機能を持たず, 共発現実験において受容体・リガンド複合体の形成を阻害しないものの, 野生型TLR5の細胞内情報伝達機能を抑制する. 一方, V597D Y627D変異はLRRCTドメインの変異であり, 受容体・リガンド複合体の形成に異常をきたしていると考えられる. V597D Y627D変異体を野生型TLR5と共発現させたときに野生型TLR5の機能を抑制した実験結果からは, V597D Y627D変異体が野生型受容体と複合体を形成できることが推測される. ここで野生型・V597D Y627D変異体のリガンド会合複合体が細胞情報伝達を媒介できるか否か2通りの可能性が考えられる. 3重変異体V597D Y627D P751Hを共発現させた場合に抑制の相乗効果が認められることは, 野生型・V597D Y627D変異体のリガンド会合複合体が, 弱いながらも細胞情報伝達機能を有することを示唆する. さらに, V597D Y627D変異体の野生型TLR5に対する抑制能が, P751H変異体のそれと同等であったことは, 野生型・変異体複合体の形成という点で, V597D Y627D変異体がより効率的に野生型TLR5と会合できることを推測させる. こうした解釈は, タンパク質レベルでの発現量が同水準であることを前提としており, 慎重に議論を進める必要がある.

マウスTLR5は2量体を形成して細胞内情報伝達をおこなうと考えられるが, 活性化状態にある2量体化したTLR5・リガンド複合体の構造を, 直接的に観測することは困難である. 細胞内情報伝達タンパク質複合体Myddosomeの螺旋構造を勘案すると, TLR5の2量体は点対称構造ではなく, 非対称構造である方がよりよく適合すると考えられる. 本研究プロジェクトでは, マウスTLR5の全長にわたるアミノ酸変異体を作成し解析を進めてきた. 細胞内TIRドメイン中のD718, P834残基がP751残基と同様にTLR5の機能に重要であることは, 以前報告したとおりである⁸⁾. これらを含め, マウスTLR5の機能欠損変異体が細胞外, 細胞膜貫通部位, 細胞内のそれぞれの領域で見いだされている. 現在, これらの機能欠損変異体の共発現実験を進めており, 機能相補性を示す組み合わせを探している. 機能相補するヘテロ2量体は, 構造上非対称であり, どのようにして情報伝達複合体を形成するかを解析する上で重要なツールとなると思われる. V597D Y627D変異体は野生型マウスTLR5との共発現で情報伝達能力を持つヘテロ複合体を形成できることが示唆されており, 機能相補性を持つ変異体ペアの一方

として有力な候補と考えている。

マウスTLR4に対しても同様の実験を計画し、準備を進めている。マウスTLR4 P712H変異体が、野性型マウスTLR4の機能を抑制する効果が、マウスTLR5の場合ほど顕著ではないことを示す予備実験結果を得ている。マウスTLR4変異体の表現型がマウスTLR5の対応する変異体のそれと顕著な対比を示すことが多く、一次構造上や機能面での類似性からの予測に反して、マウスTLR4とTLR5が異なる分子機序によって活性化されることが示唆されている⁸⁾。「マウスTLR4は単量体で細胞内情報伝達経路を活性化する」可能性についての検証をおこなう計画を立てている。

TLRの受容体活性化機序は、2量体モデルが広く受け入れられ、免疫学は言うに及ばず、一般的な細胞生物学教科書にも掲載されている。しかしながら、分子レベルでの活性化機序の詳細は未解明である。TLRの細胞内情報伝達を担うTIRドメインが、増殖因子、サイトカインの受容体でよくみられるような酵素活性を持たず、複合体形成の足場 (scaffold) であることが解析を困難にしている原因の1つであろうと思われる。本プロジェクトで解析の対象としている細胞レベルでの応答は、分子レベルの空間解像度を持たない反面、受容体細胞内ドメインから細胞内情報伝達複合体に至るシグナルの時間・空間的な積算を反映している。受容体の情報伝達能力を総合的に読み取っているという点で、本研究からは受容体機能についての情報を多く得ることができ、構造生物学が得意とする形の情報と両輪をなすと考えている。

TLRは自然免疫における主要な受容体群であり、炎症・免疫反応の調節を試みる上で、創薬ターゲットとして魅力的な存在である。本研究を通して、TLR活性化機構の分子機序が明らかになり、分子内のよりよい創薬ターゲットの選択につながることを期待される。

引用文献

- 1) Kawai T and Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11: 373-84.
- 2) Liu L, Botos I, Wang Y, Leonard JN, Shiloach J, Segal DM, et al. Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science* 2008; 320: 379-81.
- 3) Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H and Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 2009; 458: 1191-5.
- 4) Yoon SI, Kurnasov O, Natarajan V, Hong M, Gudkov AV, Osterman AL, et al. Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. *Science* 2012; 335: 859-64.
- 5) Tanji H, Ohto U, Shibata T, Miyake K and Shimizu T. Structural reorganization of the Toll-like receptor 8 dimer induced by agonistic ligands. *Science* 2013; 339: 1426-9.
- 6) Lin SC, Lo YC and Wu H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* 2010; 465: 885-90.
- 7) Gay NJ, Gangloff M and O'Neill LA. What the Myddosome structure tells us about the initiation of innate immunity. *Trends Immunol* 2011; 32: 104-9.
- 8) 魚住尚紀. 単量型マウスTLR4による細胞内情報伝達の分子機序と意義の解明. *埼玉医科大学雑誌* 2013; 40: 48-51.
- 9) Divanovic S, Trompette A, Atabani SF, Madan R, Golenbock DT, Visintin A, et al. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105. *Nat Immunol* 2005; 6: 571-8.
- 10) Martin A, Toselli E, Rosier MF, Auffray C and Devignes MD. Rapid and high efficiency site-directed mutagenesis by improvement of the homologous recombination technique. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 1642-3.
- 11) Andersen-Nissen E, Smith KD, Bonneau R, Strong RK and Aderem A. A conserved surface on Toll-like receptor 5 recognizes bacterial flagellin. *J Exp Med* 2007; 204: 393-403.
- 12) Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282: 2085-8.
- 13) Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999; 162: 3749-52.

研究成果リスト

学会発表

- 1) 魚住尚紀, 村越隆之. マウスTLR 5細胞外LRRCTドメイン変異体の機能解析, BMB2015 (第38日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会), 平成27年12月, 神戸