



日本学術振興会・产学協力委員会

R022 **量子構造生物学委員会**

第7回 研究会 資料

2022年10月7日（金）
13:30～17:00

ミーティングスペースAP日本橋（東京）
(ハイブリッド形式で開催)

R022 量子構造生物学委員会 第7回研究会 プログラム

2022年10月7日（金）

会場：ミーティングスペース AP 日本橋
〒103-0027 東京都中央区日本橋 3-6-2
日本橋フロント 6F
(ハイブリッド形式で開催)

13:30 – 13:35

はじめに

委員長・三木邦夫（京都大学）

講 演

13:35 – 14:35 （講演1）

司会：副委員長・中川敦史（大阪大学）

Toll様受容体(TLR)をターゲットとした創薬とSARS-CoV-2 Mタンパク質の構造解析

東京大学・大学院薬学系研究科
清水敏之

14:35 – 15:00 休憩

15:00 – 16:00 （講演2）

司会：委員長・三木邦夫（京都大学）

拡大し変容する細胞内タンパク質の世界

東京工業大学・科学技術創成研究院・細胞制御工学研究センター
田口英樹

16:00 – 17:00 （研究交流討論）

委員・講師間の自由討論

Toll 様受容体(TLR)をターゲットとした創薬と SARS-CoV-2 M タンパク質の構造解析

Drug Discovery-oriented Structural Study of TLRs
and Structural Analysis of M Protein from SARS-CoV-2

東京大学 大学院薬学系研究科

清水 敏之

Toshiyuki Shimizu

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

本講演では我々がこれまで主に取り組んできた自然免疫応答に関する Toll 様受容体(TLR)、特に一本鎖 RNA をリガンドとする TLR7, TLR8 の構造およびその活性を制御する低分子化合物との複合体構造を通して得られた知見、さらに最近報告した SARS-CoV-2 由来の M タンパク質の構造について紹介したい。

1. 自然免疫センサーToll 様受容体の構造科学的研究

自然免疫システムは病原微生物感染に対する重要な生体防御システムである。病原微生物に対しいち早くその侵入を察知し、炎症反応を引き起こす。宿主のセンサーが病原体に備わる病原体関連分子パターンを認識すると自然免疫反応が誘導されるが、この中でも中心的な役割を果たすのが Toll 様受容体(Toll-like receptor: TLR)である。ヒトでは 10 種類の TLR が知られている。

TLR7,8 は一本鎖 RNA をリガンドとする TLR であり、このような核酸認識 TLR は強力に免疫応答を誘導することから抗ウイルス薬やがん免疫賦活剤としての利用が期待される。実際に TLR7 のアゴニストであるイミキモドは尖圭コンジローマの治療薬として用いられている。その一方で、過剰な核酸認識 TLR の応答は自己免疫疾患を発症させる。以上のこととは TLR7,8 のアゴニスト、アンタゴニストは新規の治療に直結することが強く示唆される。

我々は TLR7,8 とアゴニスト、アンタゴニストとの複合体構造解析にも取り組み、以下のような知見を得てきた。

(1) アゴニスト結合による活性型二量体構造

TLR7, TLR8 のアゴニストは多数報告されており、その代表的なものがイミダ

ゾキノリン誘導体やグアノシン誘導体である。これらの化学合成リガンドは核酸の塩基部分と類似した化学構造をもち、TLR7,8 の細胞外ドメインの環状リングが重なり合った部位に存在するポケットに結合する [1,2]。その後の研究により、アゴニスト活性を示すが 3 環系の骨格をもたない化合物であっても、複合体構造解析により共通した相互作用は保存されていた [3]。

(2) アンタゴニスト結合による不活性型構造

TLR8-アンタゴニスト複合体構造解析によってアンタゴニスト結合ポケットの存在が明らかになった[4,5]。アンタゴニスト結合ポケットは主に疎水的なアミノ酸によって形成されていた。構造を詳細に検討したところ TLR8 の場合このポケットはリガンド非結合型 2 量体構造中でも存在することが判明した。アゴニスト結合型 2 量体はアンタゴニスト 2 量体とは全く異なっており、アゴニスト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、その逆も真となる。このためアゴニストとアンタゴニストは同時に TLR に結合することはできない。

アンタゴニストはリガンド非結合型構造中のアンタゴニスト結合部位に結合することで不活性化型 2 量体構造を安定化し、活性化型 2 量体への構造変化は阻害される。その結果、生体ではシグナル伝達が阻害されると考えられる。これは TLR7, 8 に共通して見られた。

図 1 に低分子化合物による TLR8 の活性制御機構を示す。

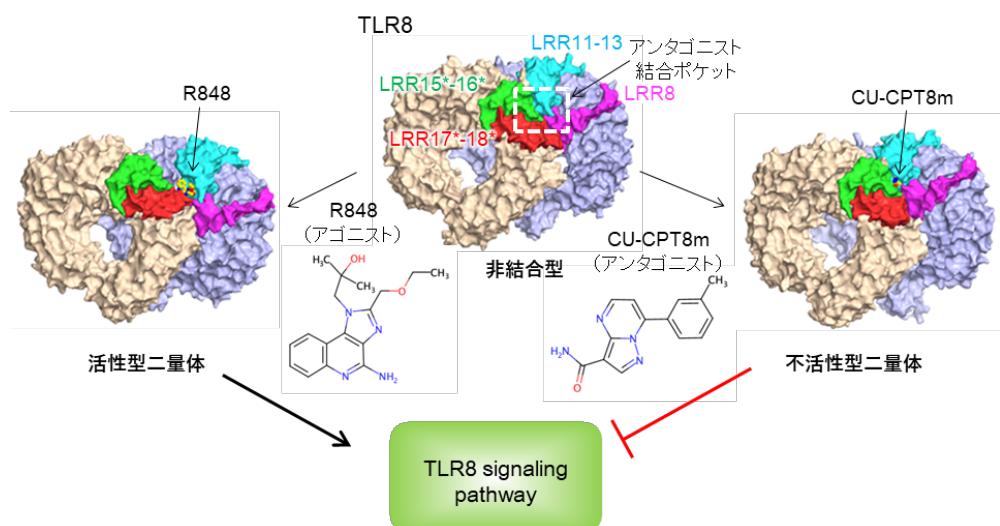


図 1. 低分子化合物による TLR8 の活性制御機構

(3) 活性型と不活性化型構造の動的平衡

最近 X 線結晶構造解析およびクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析によつて TLR7 とアゴニストおよびアンタゴニストとの複合体構造が解析された [6]。弱い阻害活性を示すアンタゴニストとの場合活性型と不活性型の両者の構造が観測された。アゴニストあるいは強い阻害活性を示すアンタゴニストを用いた場合はそれぞれ片方の構造しか観測されなかつた。これはこの両者が平衡状態にあり、クライオ電子顕微鏡によってその様子が捉えられた最初の例である。

2. SARS-CoV-2 M タンパク質の構造科学的研究

2019 年末にアウトブレークした新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、依然として世界中で猛威を振るつてゐる。COVID-19 を引き起こす新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) のウイルス粒子は、膜タンパク質であるスパイク (S), メンブレン (M) およびエンベロープ (E) タンパク質を含む脂質二重膜からなる外殻構造、および粒子内部のヌクレオカプシド (N) タンパク質とそれに包まれたゲノム RNA によって構成される。M タンパク質はウイルス粒子で最も豊富に存在し、ウイルス粒子形成の足場として機能するウイルス形成に必須のタンパク質であるが、その構造は不明であった。

我々は、M タンパク質構造認識抗体との複合体構造を高分解能で解明した [7]。驚くべきことに、二量体型の M タンパク質は、伸びたロングフォームと縮んだショートフォームの二種類のコンフォメーションを形成することが明らかになった (図 2)。SARS-CoV-2 の M タンパク質はイオンチャネルとして報告された SARS-CoV-2 の Orf3a と類似した構造をとつてゐた。M タンパク質の二量体界面には、二つの BD の間で形成される親水的なポケットが存在しているものの、TM 領域では基本的に疎水的であり、イオンが通過できるような経路は存在しておらず M タンパク質がイオンチャネルとして機能する可能性は低いと考えられる。

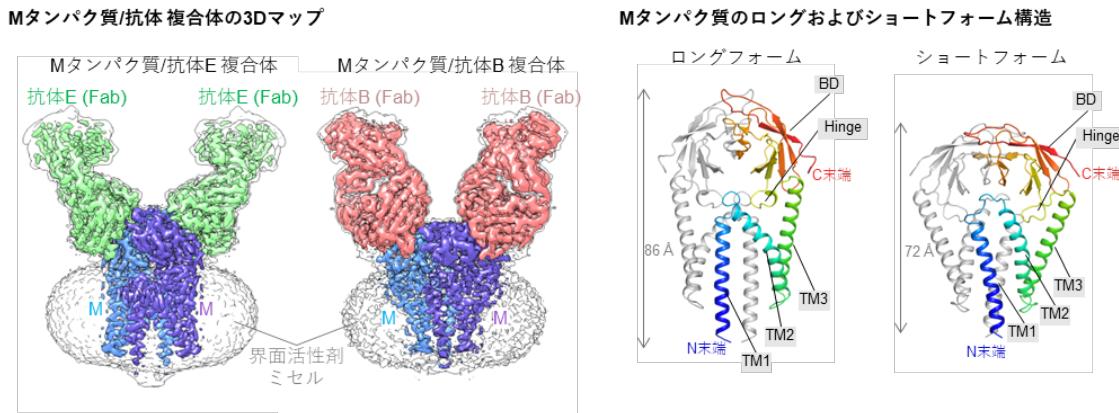


図2. SARS-CoV-2 M タンパク質のクライオ電子顕微鏡構造

1. 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).
2. Zhang, Z., Ohto, U., Shibata, T., Krayukhina, E., Taoka, M., Yamauchi, Y., Tanji, H., Isobe, T., Uchiyama, S., Miyake, K. & Shimizu, T.; Structural basis for activation of Toll-like receptor 7, a dual receptor for guanosine and single-stranded RNA. *Immunity* **45**, 737-748 (2016).
3. Zhang Z, Ohto U, Shibata T, Taoka M, Yamauchi Y, Sato R, Shukla NM, David SA, Isobe T, Miyake K & Shimizu T; Structural Analyses of Toll-like Receptor 7 Reveal Detailed RNA Sequence Specificity and Recognition Mechanism of Agonistic Ligands. *Cell Rep.* **25**, 3371-3381.e5. (2018).
4. Zhang S, Hu Z, Tanji H, Jiang S, Das N, Jing Li, Sakaniwa K, Jin J, Bian Y, Ohto U, Shimizu T & Yin H; Small-molecule inhibition of TLR8 through stabilization of its resting state. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 58-64 (2018).
5. Hu, Z., Tanji, H., Jiang, S. Zhang, S., Koo, K., Chan, J., Sakaniwa, K., Ohto U, Candia, A., Shimizu T & Yin H; Small-molecule TLR8 antagonists based on structure-based rational design. *Cell Chem. Biol.* **25**, 1286-1291 (2018).
6. Tojo, S., Zhang, Z., Matsui, H., Tahara, M., Ikeguchi, M., Kochi, M., Kamada, M., Shigematsu, H., Tsutsumi, A., Adachi, N., Shibata, T., Yamamoto, M., Kikkawa, M., Senda, T., Isobe, Y., Ohto, U. & Shimizu. T.; Structural analysis reveals TLR7 dynamics underlying antagonism. *Nat. Commun.* **11**, 5204 (2020).
7. Zhang, Z., Nomura, N., Muramoto, Y., Ekimoto, T., Uemura, T., Liu, K., Yui, M., Kono, N., Aoki, J., Ikeguchi, M., Noda, T., Iwata, S., Ohto, U. & Shimizu. T.; Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly. *Nat. Commun.* **13**, 4399 (2022).

拡大し変容する細胞内タンパク質の世界

Expanding and Transformative Protein World

東京工業大学 科学技術創成研究院 細胞制御工学研究センター

田 口 英 樹

Hideki Taguchi

Cell Biology Center, C, Institute of Innovative Research,

Tokyo Institute of Technology

【概要】

本講演では、私が代表を務める 2020 年度発足学術変革領域研究 (A) 「マルチファセット・プロテインズ：拡大し変容するタンパク質の世界」の紹介と、その領域で私たちが推進している非典型的な翻訳現象について紹介する。

【1. はじめに】

ここ数年間に従来のタンパク質像が大きく変革しつつある。これまでのタンパク質研究は、リボソームが mRNA 内の遺伝子読み枠 (ORF) の開始コドンから終止コドンまでを翻訳し、完成したポリペプチド鎖が立体構造を形成して機能するという過程を前提としている。しかし、近年のさまざまな発見や技術革新によるブレイクスルーから、従来のタンパク質科学の常識が大きく揺らいでいる。例えば、翻訳は、想定されている遺伝子読み枠の開始コドン AUG から始まって淡々とアミノ酸を紡いで終止コドンで終わるだけではない。翻訳はしばしば AUG 以外から始まったり、翻訳伸長途中で止まったりする。タンパク質をコードしないという定義で命名されたノンコーディング RNA が生理的に意味のあるタンパク質に翻訳される例が続々と見つかってきている。質量分析に基づくプロテオミクス解析の技術革新などによってプロテオームを構成するタンパク質のレパートリーは増加の一途をたどっている。また、タンパク質はいつもフォールディングして機能するわけではないこと、特定の場所・特定の構造状態で機能を発揮するだけではないこともわかつってきた。このように、「タンパク質の

世界」にはこれまで見えていなかった、もしくは見ようとしてこなかった多くの面があり (multifaceted)、我々の認識するタンパク質の世界は拡大し変容しつつある。すなわち、タンパク質を真に理解するには、タンパク質の合成過程、種類、機能発現様式における従来の常識を疑い、これまで欠けていた新たな視点でタンパク質を見直す必要がある。

そのような状況の下で、私が国内の関連研究者を束ねて科研費学術変革領域研究(A)に申請し、採択されたのが「マルチファセット・プロテインズ：拡大し変容するタンパク質の世界（略称：多面的蛋白質世界）」である。この領域では、タンパク質の世界を多面的に、すなわちマルチファセットに捉え直すことで、従来のタンパク質に関する固定観念を刷新し、新たなパラダイムを構築することを目的としている。あらゆる生命現象にタンパク質が関わることを考えれば、タンパク質の見方に今までにない新たな視点を導入すること自体が、あらゆる生命科学全般へ大きな波及効果をもたらすと考えている。

本講演では、この領域立ち上げに関わった私たちの研究を紹介したい。

【2. 新生鎖による翻訳速度調節】

翻訳伸長、すなわちリボソームで mRNA の読み枠内のコドンに従ってアミノ酸がつながっていく過程は、淡々と一様に進むとは限らない。翻訳伸長速度が遅くなる現象は、mRNA の二次構造や細胞内の tRNA 量など RNA 側の問題に起因する場合は古くから知られていたが、翻訳途上の新生ポリペプチド鎖（新生鎖）も翻訳伸長速度に影響を及ぼすことがある。

2-1) 新生鎖による翻訳伸長の一時停止の発見と、その生理機能

新生鎖が自らを合成しているリボソーム自身を制御しうるということが見つかった端緒は、2001 年に伊藤維昭らによって見出された SecM 新生鎖による翻訳伸長の一時停止（翻訳アレスト）である。SecM は翻訳アレストを起こすことで大腸菌の膜透過活性をモニターし、膜透過因子 SecA の発現を制御している。この発見をきっかけとして、細菌、高等植物、哺乳類細胞などで翻訳アレストが個別に見つかってきている。

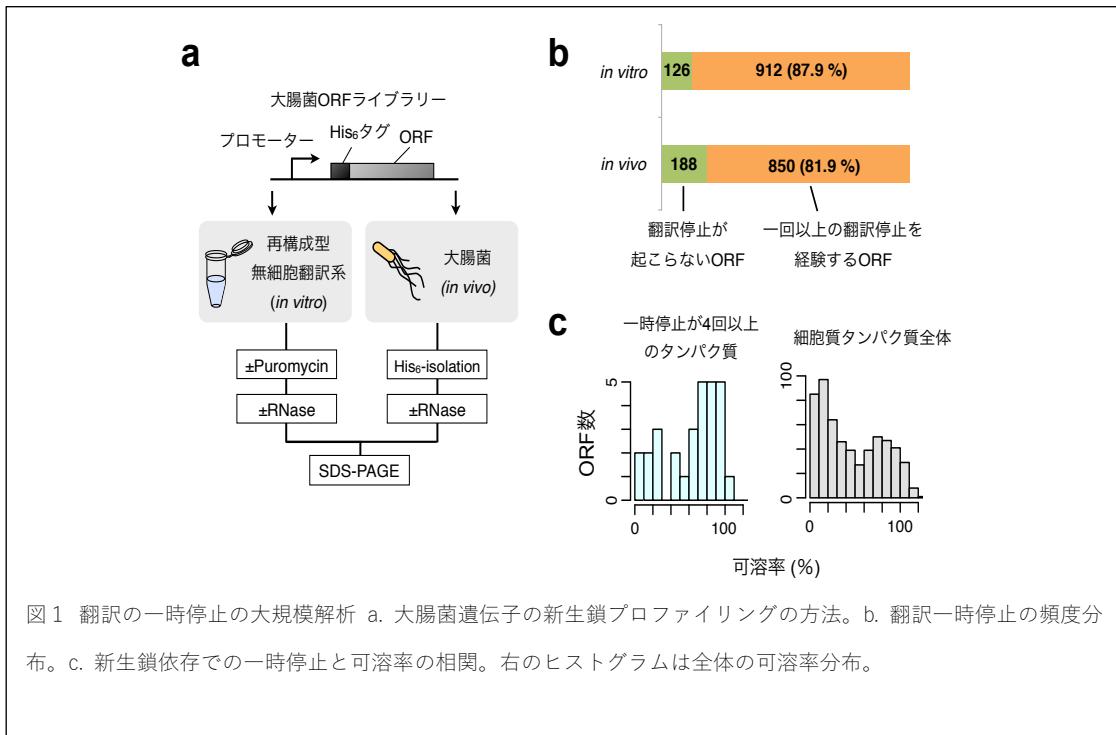


図1 翻訳の一時停止の大規模解析 a. 大腸菌遺伝子の新生鎖プロファイリングの方法。b. 翻訳一時停止の頻度分布。c. 新生鎖依存での一時停止と可溶率の相関。右のヒストグラムは全体の可溶率分布。

2-2) 翻訳伸長の一時停止の普遍性

翻訳アレストの例が少しずつ知られるようになってきた。では、細胞内に存在する数千、数万種類のタンパク質の翻訳時の一時停止はどの程度普遍的に起こるのだろうか。私たちは、リボソームでタンパク質が合成される際の「一時停止」の頻度を大腸菌の1000種類以上のタンパク質について系統的に調べた(1)。一時停止したかどうかは、新生鎖の化学的実体であるペプチジル tRNA が特定の大きさで蓄積するかどうかを評価することで解析した(新生鎖プロファイリング、図1a)。その結果、試験管内、細胞内ともに80%以上のタンパク質で翻訳伸長は一時停止しながら合成されてくることが明らかとなった(図1b)。しかも、その多くはORF内で複数回停止する。つまり、翻訳の一時停止は決して珍しい現象ではない(強弱の程度はさまざまで、そのほとんどはSecMほど強くない)。さらにそのうちの半分以上は、mRNAの二次構造やtRNA量(いわゆるレアコドン問題)などRNA側の理由で停止するのではなく、リボソームの翻訳活性そのものが阻害されて起こることがわかった。つまり、新生鎖とリボソーム出口トンネルとの相互作用によって起こる翻訳の一時停止はこれまで考えられていた以上に普遍的な生命現象のようだ。

では、このような新生鎖に依存した翻訳の「緩急のリズム」はどのような生理的意義があるのだろうか。生物情報学的な解析によると、新生鎖依存の翻訳一時停止の回数が多いほどタンパク質の可溶性が高い傾向にあること（図 1c）、膜タンパク質と細胞質タンパク質とでは一時停止のパターンが異なることなどがわかった。個別のタンパク質フォールディングに翻訳一時停止がどう関与するのかについては今後の研究を待たねばならないが、今後のフォールディング研究に新たな視点を導入したと言える。

【3. 新生鎖による翻訳途中終了】

新生鎖による翻訳速度が普遍的で、さまざまな生命現象を司っている可能性がわかってきた。さらに、新生鎖はアミノ酸配列によっては翻訳を止めるだけなく翻訳を途中で（終止コドンもないのに）終わらせる場合があることもわかつてきた。

3-1) 負電荷に富んだ新生鎖によるリボソーム不安定化 (IRD) で起こる翻訳途中終了

私たちは、翻訳速度を制御するアミノ酸配列を大腸菌で詳細に調べる過程でこれまで知られていない非典型的な翻訳動態を発見した。酸性アミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸）が 10 回程度連続した配列（もしくは、酸性アミノ酸とプロリンとの混成配列）を含むタンパク質の翻訳の際、翻訳が中途で終わることを見いだしたのだ（図 2a）（2）。この中途終了は、特定の性質のアミノ酸配列の合成時に、新生鎖の作用によって翻訳途上のリボソームが不安定化（IRD = intrinsic ribosome destabilization と命名）し、最終的にリボソームは大小サブユニットに解離する。リボソームは新生鎖のアミノ酸配列によっては翻訳伸長を一時停止するだけでなく、翻訳を終わらせることもできる。つまり、IRD は終止コドンに依存しない新規の翻訳終結機構と見なすこともできる。

IRD 現象の発見により、リボソームには「苦手な」アミノ酸配列があることがわかった。これは一見リボソームの欠陥とも見なせるが、大腸菌は IRD を利用して細胞内環境をモニターしている例が見つかった。IRD を誘発しやすくした

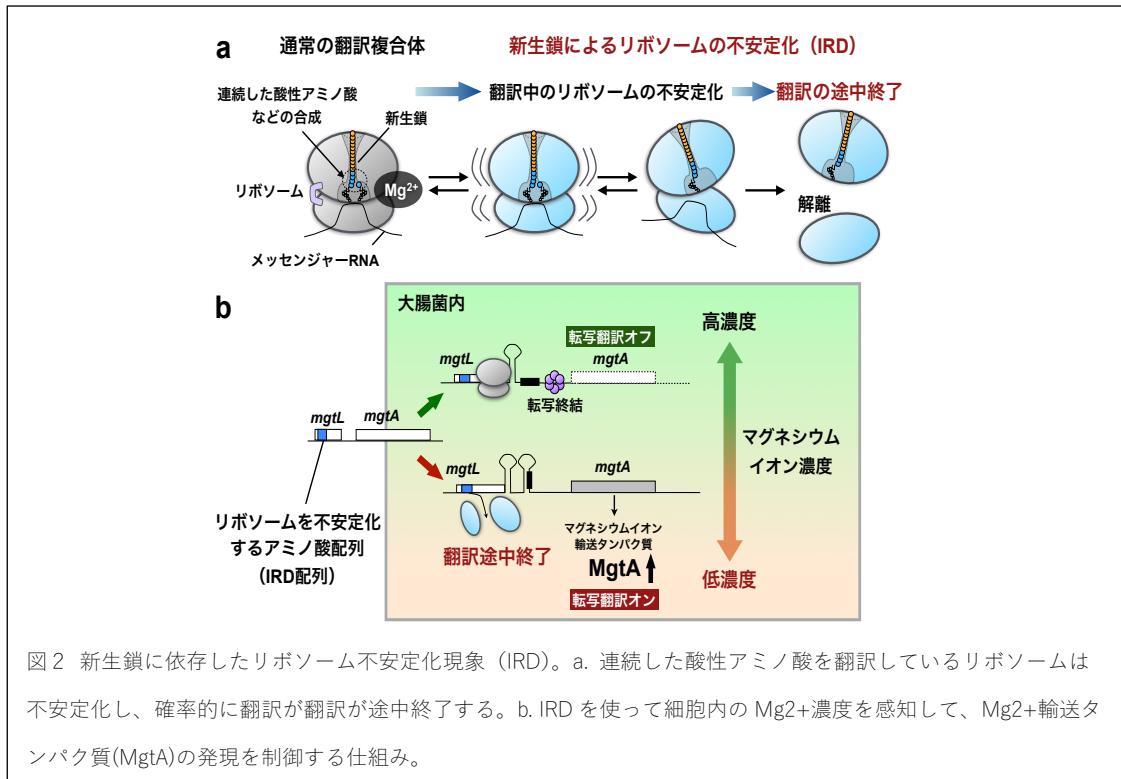


図2 新生鎖に依存したリボソーム不安定化現象 (IRD)。a. 連続した酸性アミノ酸を翻訳しているリボソームは不安定化し、確率的に翻訳が翻訳が途中終了する。b. IRD を使って細胞内の Mg^{2+} 濃度を感じて、 Mg^{2+} 輸送タンパク質(MgtA)の発現を制御する仕組み。

大腸菌変異株の解析から、マグネシウムを細胞内に運ぶ膜輸送タンパク質の一つ MgtA の上流 ORF に IRD を起こす ORF (*mgtL*) が潜んでいることが見つかった。マグネシウムイオンの働きの一つとして翻訳時にリボソームの大小サブユニットを安定化することが知られている。*mgtL* の IRD 配列はマグネシウムイオン濃度が正常時には何とか翻訳が進み、そのとき下流の主たる ORF の *mgtA* の発現が起こらないが、マグネシウムイオンが生育環境中で少なくなった際に、*mgtL* の IRD 配列を介して MgtA を大量に発現させてマグネシウムイオン濃度を高めるしくみをもっている。つまり、生物は IRD 現象を逆手にとって細胞内の環境変化をモニターするしくみを持っていることがわかった (図 2b)。(2)

3-2) IRD を抑制して翻訳伸長の連続性を保証する分子機構

負電荷に富んだアミノ酸配列が機能に必要なタンパク質は多々あることが知られている。負電荷に富んだ新生鎖による IRD がいつも起こってしまうと、読み取りが途中で止まってタンパク質の「不良品」が生み出されてしまうなど生命の維持に不利益になると考えられる。こうしたタンパク質の「不良品」を生み出さないためには、mRNA の開始コドンから終止コドンまでの領域を途切ることなく連続的に翻訳できるよう保証することが、生命にとって必須となる。これ

まで、細胞内で、タンパク質合成の場となるリボソーム自身が翻訳の連続性に寄与すると経験的に理解されていたものの、具体的にどのようなメカニズムで「翻訳」の連続性が保証されているのかは不明だった。

私たちは、IRD の起こりやすさを調べることで、リボソームが翻訳伸長をできるだけ維持する仕組みを調べた（3）。系統的な解析の結果、リボソーム内部の「トンネル」において作られた新生鎖が長ければ長いほど、また、リボソームのペプチド転移中心部位付近の新生鎖のサイズ（嵩高さ）が大きくなるほど「リボソームの不安定化」が免れることができた。このメカニズムにより、リボソームは多種多様なアミノ酸配列のタンパク質を途切れることなく合成できる万能性を獲得し、今日に至るまでのタンパク質進化が可能になったものと考えられる。

この IRD 現象は大腸菌の系で見つかったが、出芽酵母やヒトにおいても起こることもわかってきた（4）。つまり、あらゆる生物において負電荷アミノ酸が富んだ配列の翻訳はリスクを有する。特に、リボソームトンネルを新生鎖が占有しない翻訳開始直後がもっともリスクが高い。さまざまな生物のプロテオームにおけるアミノ酸分布を調べると、N 末端にはアスパラギン酸/グルタミン酸が富んだ配列を進化の過程で避けていることがわかった（3, 4）。

【4. おわりに】

以上、タンパク質科学における新たな潮流の紹介と、それに関連する私たちの研究を一部紹介した。いずれも、この半世紀ほどの間におけるさまざまなタンパク質研究の膨大な蓄積があったからこそ見えてきた未開拓の分野であると言えよう。この 10 年ほどの中でも、デノボデザインタンパク質の実現、超高精度のタンパク質の立体構造予測、細胞内でのタンパク質の液-液相分離現象など多くのブレイクスルーが起こった。今後の展開を楽しみつつ、私たち自身でもフロントティアを拡げていきたいと考えている。

-
1. Chadani Y, Niwa T, Chiba S, *Taguchi, H., *Ito K. Integrated in vivo and in vitro nascent chain profiling reveals widespread translational pausing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **113**, E829-38 (2016).
doi.org/10.1073/pnas.1520560113
 2. Chadani Y, Niwa T, Izumi T, Sugata N, Nagao A, Suzuki T, Chiba S, *Ito K, *Taguchi H. Intrinsic ribosome destabilization underlies translation and provides an organism with a strategy of environmental sensing. *Mol. Cell* **68**, 528-539 (2017).
doi: 10.1016/j.molcel.2017.10.020
 3. *Chadani Y, Sugata N, Niwa T, Ito Y, Iwasaki S, *Taguchi H. Nascent polypeptide within the exit tunnel stabilizes the ribosome to counteract risky translation. *EMBO J.* (2021) Oct 20: e108299.
doi: 10.15252/embj.2021108299
 4. Ito Y, *Chadani Y, Niwa T, Yamakawa A, Machida K, Imataka H, *Taguchi H. Nascent peptide-induced translation discontinuation in eukaryotes impacts biased amino acid usage in proteomes. (under revision) *BioRxiv*
doi.org/10.1101/2022.01.27.477990

