

博士論文

自然免疫受容体 TLR9 活性化機構の
構造生物学的研究

石田 英子

目次

図目次	3
表目次	4
略語一覧	5
1. 背景	7
1.1. TLR について	7
1.2. TLR 分子のドメイン構成および活性化機構	8
1.3. TLR7 サブファミリーについて	10
1.4. TLR9 を活性化させる DNA 配列	11
1.5. TLR9 の立体構造	13
1.6. TLR9 の第二の DNA 結合部位について	15
1.7. マウス TLR9 について	15
1.8. 本研究の目的	16
2. 材料および方法	17
2.1. 2 種類の DNA による TLR9 の活性化機構	17
2.1.1. TLR9 発現用ベクターの作製	17
2.1.2. TLR9 安定発現株の作製	19
2.1.3. 性状解析用サンプル（糖鎖非短縮）の調製	19
2.1.4. 結晶化用サンプル（糖鎖短縮）の調製	20
2.1.5. マウス TLR9 の 5'-TCG DNA 結合部位変異体の調製	21
2.1.6. ITC	21
2.1.7. ゲル濾過クロマトグラフィー	22
2.1.8. 結晶化	23
2.1.9. X 線結晶構造解析	23
2.1.10. NF- κ B レポーターアッセイ	24
2.1.11. BM-MCs および BM-pDC の調製	25
2.1.12. ELISA	25
2.1.13. ウェスタンブロッティング	26
2.2. マウス TLR9 活性化型二量体の構造解析	26
2.2.2. マウス TLR9 CpG DNA 結合部位変異体の作製	27
2.2.3. ゲル濾過クロマトグラフィー	28
2.2.4. 結晶化	28
2.2.5. X 線結晶構造解析	28
2.2.6. NF- κ B レポーターアッセイ	29
2.2.7. X 線小角散乱	29

3. 結果	30
3.1. 2 種類の DNA による TLR9 の活性化機構	30
3.1.1. TLR9 サンプルの調製	30
3.1.2. 各 DNA と TLR9 の結合親和性	34
3.1.3. 2 種類の DNA による TLR9 の二量体化	36
3.1.4. 5'-TCG DNA の配列特異性 (ITC)	38
3.1.5. 5'-xCx DNA の配列特異性 (ゲル濾過クロマトグラフィー)	41
3.1.6. 結晶化と構造決定	43
3.1.7. CpG DNA の認識	48
3.1.8. 5'-xCx DNA の認識	50
3.1.9. 1 番目の塩基が異なる 5'-xCx DNA との複合体の構造比較	52
3.1.10. 5'-xCx DNA 認識に関わる残基の重要性	53
3.1.11. TLR7 サブファミリーとの構造比較	55
3.1.12. 2 種類の DNA による TLR9 の活性化	56
3.1.13. 5'-xCx DNA の 1 番目の塩基の配列特異性	60
3.2. マウス TLR9 の活性化型二量体の構造解析	62
3.2.1. マウス TLR9 サンプルの調製	62
3.2.2. 結晶化と構造決定	63
3.2.3. マウス TLR9 の CpG DNA 結合部位	67
3.2.4. マウス TLR9 のタンパク質間相互作用	68
3.2.5. 2 種類の DNA によるマウス TLR9 変異体の二量体化	70
3.2.6. マウス TLR9 変異体の活性測定	71
3.2.7. マウス TLR9 の溶液構造	72
4. 考察	73
4.1. 2 種類の DNA による TLR9 の活性化機構	73
4.1.1. TLR9 の活性化に必要な配列	73
4.1.2. CpG DNA の class との関連	74
4.1.3. TLR7 サブファミリーに共通した活性化機構	75
4.2. マウス TLR9 の活性化型二量体の構造解析	75
5. 参考文献	77
6. 謝辞	83

図目次

図 1. TLR のリガンドとその活性化経路	7
図 2. TLR の活性化機構	8
図 3. リガンド結合型 TLR の二量体構造	9
図 4. TLR9 の活性化経路	11
図 5. class A, B, C CpG DNA の代表的な配列と二次構造	12
図 6. TLR9 の結晶構造	14
図 7. TLR9 発現ベクターの模式図	17
図 8. TLR9 のアミノ酸配列アライメント	18
図 9. 性状解析用ウマ TLR9 の精製過程	31
図 10. 結晶化用ウマ TLR9 の精製過程	32
図 11. TLR9 精製サンプルの SDS-PAGE	33
図 12. ITC による TLR9 と CpG DNA との結合	34
図 13. ITC による TLR9 と各 DNA との結合	35
図 14. ゲル濾過クロマトグラフィーによる TLR9 と各 DNA との結合	37
図 15. ITC による 5'-TCG DNA の配列特異性	39
図 16. ゲル濾過クロマトグラフィーによる 5'-xCx DNA の配列特異性	42
図 17. CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型ウマ TLR9 の結晶の写真	43
図 18. CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型 TLR9 の構造比較	45
図 19. CpG DNA 結合型, CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型 TLR9 の全体構造	46
図 20. CpG DNA と 5'-xCx DNA	47
図 21. TLR9 のプロトマーの比較	48
図 22. CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型 TLR9 の CpG DNA 結合部位	49
図 23. CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型 TLR9 の 5'-xCx DNA 結合部位	51
図 24. 5'-xCx DNA の 1 塩基目の結合部位の拡大図	52
図 25. マウス TLR9 の 5'-xCx DNA 結合部位変異体の ITC	53
図 26. TLR7 サブファミリーのモノヌクレオシド結合部位との比較	55
図 27. HEK293T 細胞における NF- κ B レポーターアッセイ (三宅らによる)	56
図 28. BM-MCs におけるサイトカイン産生量 (三宅らによる)	57
図 29. ウェスタンブロッティングによる下流分子のリン酸化の検出 (三宅らによる)	58
図 30. BM-pDC におけるインターフェロン産生量 (三宅らによる)	59
図 31. 5'-xCx DNA の濃度依存的な TLR9 の二量体形成	61
図 32. マウス TLR9 精製サンプルの SDS-PAGE	62
図 33. CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型マウス TLR9 の結晶の写真	63
図 34. マウスおよびウマ TLR9 の構造の比較	65

図 35. マウス TLR9 の構造における各 DNA の電子密度	66
図 36. CpG DNA のコンセンサス配列の認識	66
図 37. CpG DNA 結合部位近傍のループ領域の比較	67
図 38. CpG DNA 結合部位近傍のタンパク質間相互作用の比較	68
図 39. タンパク質間相互作用の比較	69
図 40. CpG DNA 結合部位変異体のゲル濾過クロマトグラフィー	70
図 41. CpG DNA 結合部位変異体の NF- κ B レポーターアッセイ (三宅らによる)....	71
図 42. SAXS 解析	72
図 43. TLR9 活性化機構のモデル図	74

表目次

表 1. マウス TLR9 の 5'-TCG DNA 結合部位変異体を作製するためのプライマー ..	21
表 2. 結晶化条件と不凍液の組成	24
表 3. マウス TLR9 の N型糖鎖結合部位変異体を作製するためのプライマー	26
表 4. マウス TLR9 の CpG DNA 結合部位変異体を作製するためのプライマー	27
表 5. NF- κ B レポーターアッセイ用のマウス TLR9 の CpG DNA 結合部位変異体を作 製するためのプライマー	27
表 6. ITC による TLR9 と各 DNA との K_d 値	40
表 7. CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型 TLR9 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	44
表 8. マウス TLR9 の 5'-xCx DNA 結合部位変異体の ITC	54
表 9. CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型マウス TLR9 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	64

略語一覧

A ₂₆₀	absorbance at 260 nm
A ₂₈₀	absorbance at 280 nm
AP-1	activator protein-1
BM	bone marrow
CpG	cytosine-phosphate-guanine
CV	column volume
DNase	deoxyribonuclease
ds	double-stranded
ELISA	enzyme-linked immune sorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FBS	fetal bovine serum
Flt3L	murine fms-like tyrosine kinase-3 ligand
HEK	human embryonic kidney
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HRP	horseradish peroxidase
IFN	interferon
IKK	I κ B kinase
I κ B	inhibitor of κ B
IL	interleukine
IRAK	IL-1R-associated kinase
IRF	interferon regulatory factor
ITC	isothermal titration calorimetry
JNK	c-jun N-terminal kinase
K_d	dissociation constant
LPS	lipopolysaccharide
LRR	leucine-rich repeat
mAb	monoclonal antibody
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MC	macrophage
M-CSF	murine macrophage colony-stimulating factor
MD-2	myeloid differential factor 2
MES	2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid
MyD88	myeloid differential primary response 88
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
PAGE	poly-acrylamide gel electrophoresis

PCR	polymerase chain reaction
pDC	plasmacytoid dendritic cell
PEG	polyethylene glycol
PO	phosphodiester
PS	phosphorothioate
R.M.S.D.	root mean square deviation
S2	Schneider 2
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEC-SAXS	size-exclusion chromatography coupled with small-angle X-ray scattering
ss	single-stranded
TAK	TGF- β activated kinase
TGF	transforming growth factor
TIR	Toll/interleukin-1 receptor homology
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TRAF	TNF receptor-associated factor
TRIF	TIR-domain-containing adaptor inducing interferon- β
Tris	tris (hydroxymethyl)-aminomethane

1. 背景

1.1. TLR について

Toll-like receptors (TLRs) は、自然免疫においてウイルスや細菌の構成成分を認識し、炎症性サイトカインやI型インターフェロン産生のシグナルを伝達するパターン認識受容体である¹⁻³。ヒトではTLR1-TLR10が同定されており、それぞれ異なる分子パターンを認識し、免疫応答を活性化させる(図1)。TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6は細胞膜上に発現しており、TLR2/1とTLR2/6はヘテロ二量体を形成してリポタンパク質を⁴⁻⁶、TLR4はmyeloid differential factor 2 (MD-2)とともにリポ多糖(lipopolysaccharide; LPS)を^{7,8}、TLR5は細菌由来のフラゲリンを認識する⁹。TLR3, TLR7, TLR8, TLR9は細胞内小胞体に発現しており、TLR3は二本鎖(double-stranded; ds) RNAを¹⁰、TLR7とTLR8は一本鎖(single-stranded; ss) RNAを¹¹⁻¹³、TLR9はssDNAの非メチル化シトシン-リン酸-グアニン(CpG)配列を認識する^{14,15}。

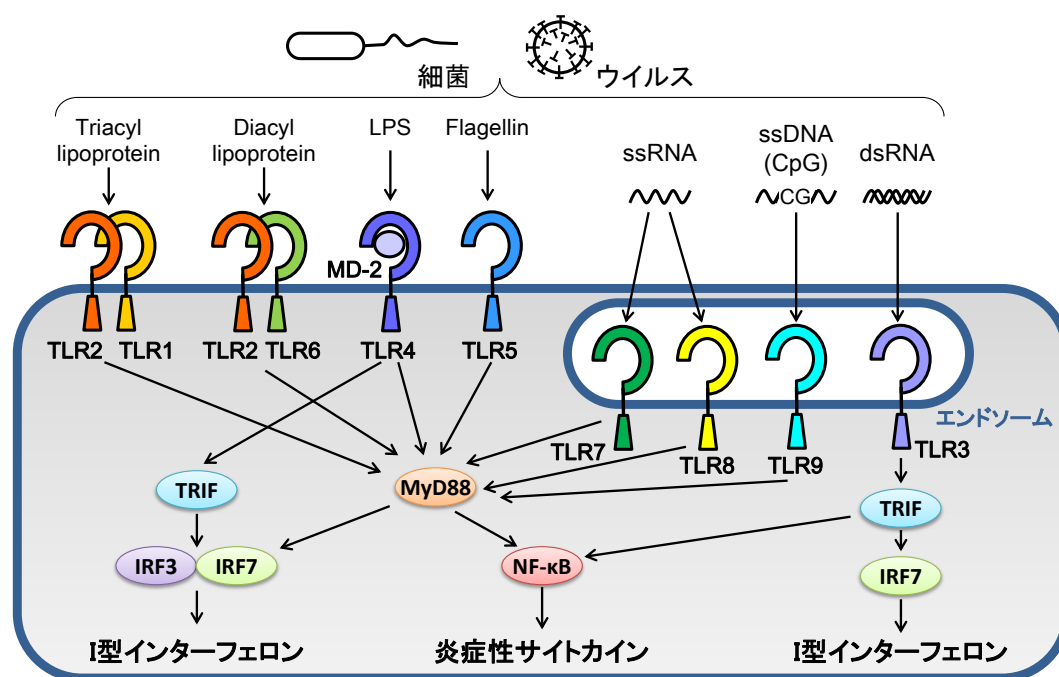


図 1. TLR のリガンドとその活性化経路

1.2. TLR 分子のドメイン構成および活性化機構

I 型膜貫通タンパク質の TLR は、N 末端側にリガンド認識を担う細胞外の LRR (leucine-rich repeat) ドメイン、膜貫通領域、C 末端側にシグナル伝達に関わる細胞内の TIR (Toll/interleukin-1 receptor homology) ドメインを持つ²。LRR は、高度に保存された LxxLxLxxN モチーフを含む 20-30 残基のアミノ酸配列の単位の繰り返りで構成される。細胞外ドメインを構成する LRR 単位の個数は TLR によって異なっており、N 末端および C 末端のキャップ構造に挟まれた 20-26 個の LRR 単位からなる。

TLR は一般的に、リガンド非結合状態では不活性化型の単量体で存在し、リガンドの結合に伴い活性化型の二量体を形成し、TIR ドメイン同士が近接して下流のアダプター分子をリクルートすることでシグナルを伝達すると考えられている¹⁶⁻²⁰ (図 2)。TLR のシグナル伝達は、アダプター分子として myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) を介する経路と、TIR-domain-containing adaptor inducing interferon (IFN)- β (TRIF) を介する経路に大別される^{3,21} (図 1)。いずれのアダプター分子も TIR ドメインを持ち、TLR の TIR ドメイン同士と相互作用してシグナルを伝達する²²。TLR3 を除くすべての TLR は MyD88 依存的経路により nuclear factor- κ B (NF- κ B) を活性化し、tumor necrosis factor (TNF)- α や interleukin (IL)-6, IL-12 などの炎症性サイトカインの産生を誘導して炎症反応を引き起こす^{23,24}。TLR3 は TRIF 依存的経路のみを活性化し、TLR4 は MyD88 と TRIF の両方の経路を活性化することができる^{25,26}。TRIF 依存的経路においては interferon regulatory factor (IRF) 3 が活性化され、I 型インターフェロンである interferon (IFN)- β の産生を誘導して抗ウイルス応答を誘起する²⁷⁻²⁹。また、TLR7, TLR8, TLR9 は MyD88 依存的経路による NF- κ B の活性化に加えて IRF7 も活性化することができ、これを介して IFN- α の産生を誘導する^{23,24}。

X 線結晶構造解析により、これまでに TLR1-TLR9 および TLR13 の細胞外ドメインのリガンド複合体の構造が解明されている。活性化型の TLR はいずれも C 末端同士で向かい合った m 字型の二量体を形成し、リガンドが 2 つのプロトマーから同時に認識されることで TLR の二量体化に寄与する (図 3)。

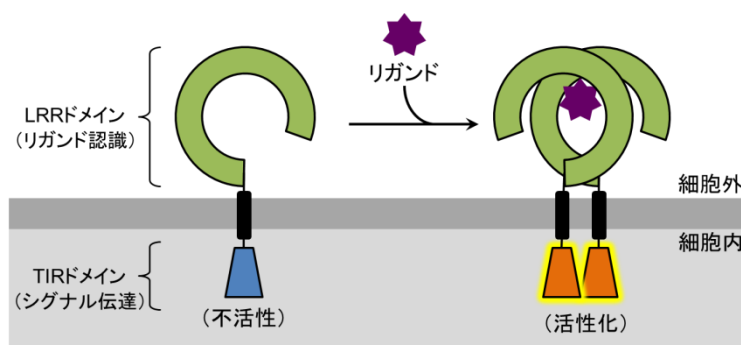


図 2. TLR の活性化機構

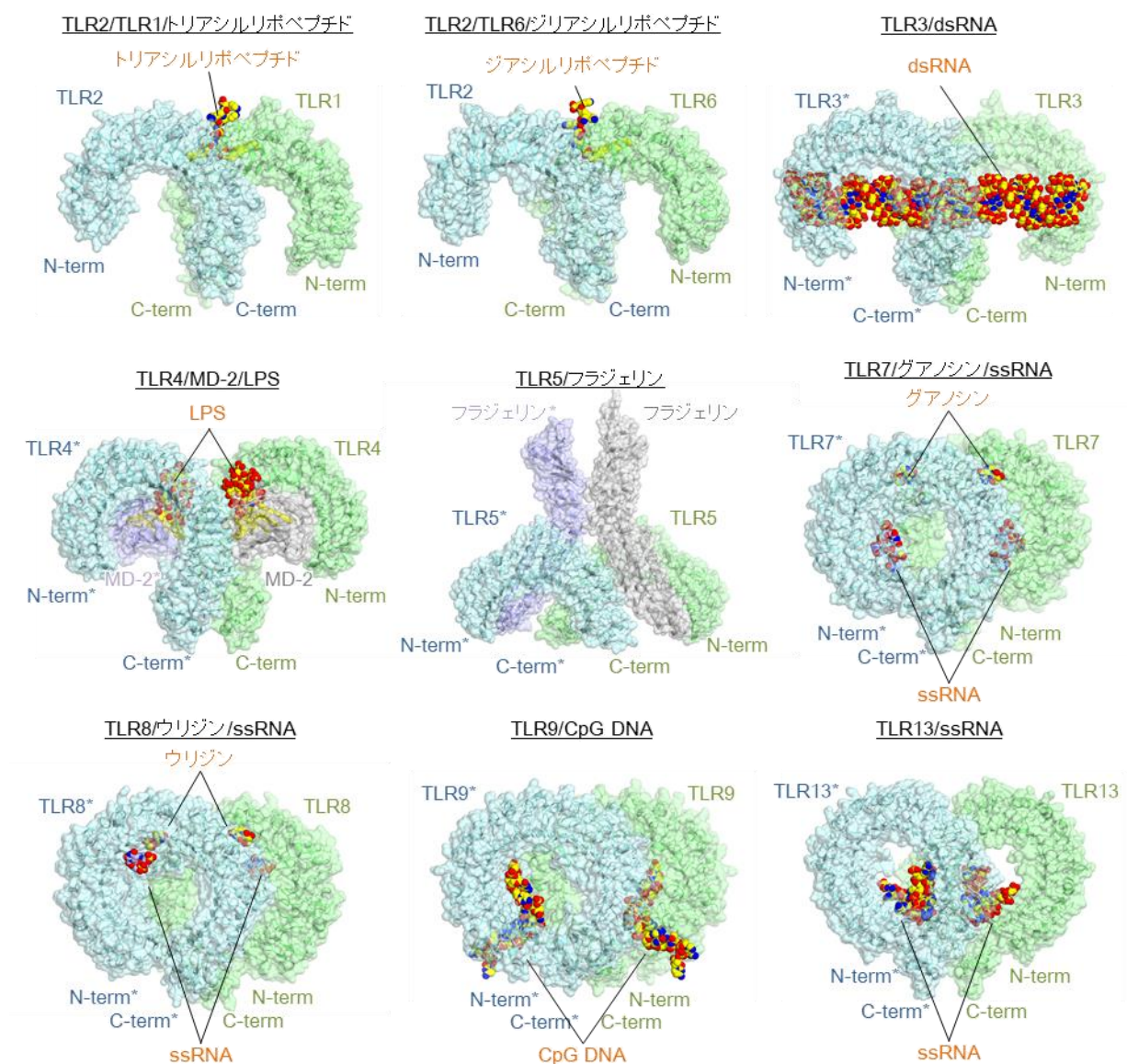


図 3. リガンド結合型 TLR の二量体構造

TLR2/TLR1/トリアシルリポペプチド (PDB ID: 2Z7X)¹⁶, TLR2/TLR6/ジアシルリポペプチド (PDB ID: 3A79)¹⁷, TLR3/dsRNA (PDB ID: 3CIY)¹⁸, TLR4/MD-2/LPS (PDB ID: 3FXI)¹⁹, TLR5/フラジェリン (PDB ID: 3V47)²⁰, TLR7/モノヌクレオシド/ssRNA (PDB ID: 5GMF)³⁰, TLR8/モノヌクレオシド/ssRNA (PDB ID: 4R07)³¹, TLR9/CpG DNA (PDB ID: 3WPC)³², TLR13/ssRNA (PDB ID: 4Z0C)³³ の立体構造。各 TLR の二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) とフラジェリン (TLR5/フラジェリン複合体) のそれぞれのプロトマーを灰色および紫色で示した。その他のリガンドは球体で示し、炭素原子を黄色、酸素原子を赤色、窒素原子を青色で示した。

1.3. TLR7 サブファミリーについて

TLR7, TLR8, TLR9 はいずれもエンドソームに局在し、一本鎖の核酸を認識する TLR7 サブファミリーに分類される³⁴。TLR7 サブファミリーのメンバーは高いアミノ酸配列相同性をもち (ヒト由来の各 TLR のアミノ酸配列一致度は TLR7/TLR8: 42%; TLR7/TLR9: 35%; TLR8/TLR9: 33%), 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。LRR14 と LRR15 の間には他の TLR にみられない Z-loop とよばれる 40-50 残基の長いループ領域が存在し、生化学的、構造学的な研究から、この Z-loop の切断が TLR7 サブファミリーの活性化に必要であることが明らかにされている^{32,35-39}。TLR7 と TLR8 は ssRNA を¹¹⁻¹³, TLR9 は ssDNA の非メチル化 CpG 配列を認識する^{14,15}。TLR7 と TLR9 は主に形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells, pDC) や B 細胞に発現し、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⁴⁰⁻⁴²。

TLR7 と TLR9 は、MyD88 を介した NF- κ B 依存的経路による炎症性サイトカインの産生に加えて、IRF7 依存的経路による I 型インターフェロンの産生も誘導する。同じアダプター分子を介した異なる遺伝子の発現は、TLR7/9 が発現している細胞種によって決定づけられる。B 細胞に発現する TLR7/9 が活性化すると最終的に炎症性サイトカインの産生が誘導され、pDC に発現する TLR7/9 は最終的に I 型インターフェロンの産生を誘導する^{23,24}(図 4)。MyD88 は、B 細胞においては IL-1R-associated kinase (IRAK)-4 をリクルートし⁴³, IRAK-1 と IRAK-2 のリン酸化, TNF receptor-associated factor (TRAF) 6 の活性化を経て⁴⁴, TGF- β activated kinase (TAK) 1 の活性化がおこる。TAK1 から下流はさらに 2 つのシグナル伝達経路に分かれ、一方では NF- κ B 転写因子の核移行が起こる。もう一方では mitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケードを活性化し、p38, c-jun N-terminal kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 のリン酸化を経て最終的に activator protein (AP)-1 転写因子が活性化される。これら転写因子の活性化は、TNF α , IL-6, IL-12 などの炎症性サイトカインの遺伝子の転写を誘導する。pDC においては、MyD88 が IRAK4, TRAF6, TRAF3, IRAK1, IKK α , IRF7 と相互作用し^{45,46}, IRAK-1 と IKK α が IRF7 をリン酸化し、IRF7 の核移行が起こる。IRF7 の活性化は、I 型インターフェロンの産生を誘導する²⁴(図 4)。

核酸は生体中の多くの細胞に普遍的に存在するため、TLR7 サブファミリーが自己の核酸を誤って認識することは、自己免疫疾患の原因になりうる。TLR7, TLR8, TLR9 の発現はエンドソームなどの細胞内小器官に限局されるため、通常は自己の核酸の認識を回避している。しかし、全身性エリテマトーデスの患者においては、ヌクレオプロテイン-RNA 複合体あるいはクロマチン-DNA 複合体に対する自己抗体が存在し、これらが免疫複合体を形成して細胞膜上に存在する Fc γ レセプターを介して取り込まれることで、TLR7/8 あるいは TLR9 により認識されると考えられる⁴⁷⁻⁴⁹。

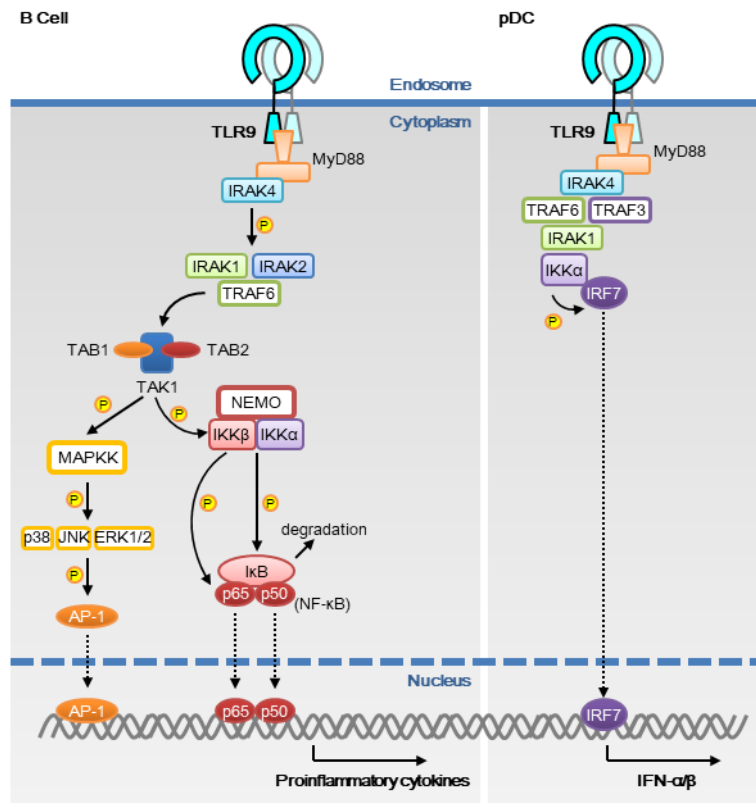


図 4. TLR9 の活性化経路

TLR9 の活性化により誘導されるシグナル伝達経路。炎症性サイトカイン産生は左に示した経路、I 型インターフェロン産生は右に示した経路によって誘起される^{21,50}。

1.4. TLR9 を活性化させる DNA 配列

TLR9 は ssDNA の中に存在する非メチル化シトシン-リン酸-グアニン (CpG) モチーフを認識する^{14,15}。CpG モチーフは細菌由来の DNA において高い頻度で存在するが、脊椎動物のゲノム DNA 中での頻度はその約 1/4 であり、さらに約 70% がメチル化されていることが知られている。これに対して、細菌の DNA 中の CpG モチーフのメチル化レベルは非常に低い^{51,52}。このため、TLR9 は非メチル化 CpG モチーフによって自己と非自己を識別していると考えられる。TLR9 の免疫賦活活性は CpG モチーフの近接配列によっても影響され、一般的に RRCGY (R; プリン塩基, Y; ピリミジン塩基) が活性化に必要とされるコンセンサス配列と言われている⁵³。

TLR9 を活性化させる DNA は、その DNA の二次構造と活性化する経路によって 3 つの class (class A, class B, class C) に分けられている (図 5)。class A CpG DNA は、5' および 3' 末端にヌクレアーゼ耐性をもつとされる phosphorothioate (PS) 骨格の

poly-G モチーフをもち、中央部分は phosphodiester (PO) 骨格の CpG モチーフを含んだパリンドローム配列で構成される⁵⁴。class A CpG DNA は、pDC において TLR9 依存的な IFN- α の産生を非常に強く誘導する一方で、NF- κ B 経路による炎症性サイトカインの産生は低い。また、末端の poly-G モチーフは細胞への取り込み効率に寄与することが報告されている^{54,55}。class B CpG DNA は、1 つあるいはそれ以上の CpG モチーフをもち、すべての塩基が PS 骨格で構成されている⁵⁶。class A CpG DNA とは対照的に、IFN- α の産生は低い、非常に強い B 細胞の刺激活性を示す⁵⁷。class C CpG DNA は class A および class B CpG DNA のキメラ DNA であり、DNA の構造と免疫刺激活性は class A および class B CpG DNA の特徴を併せ持っている^{58,59}。class A および class C の CpG DNA は DNA 分子内あるいは分子間で二本鎖を形成していると考えられる。DNA の二次構造の違いによってエンドサイトーシスのルートが異なることが示されており、このため class A および class C CpG DNA は pDC において I 型インターフェロン産生を誘導すると考えられる⁶⁰⁻⁶²。

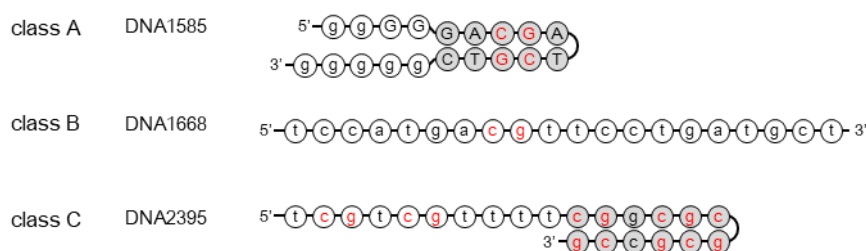


図 5. class A, B, C CpG DNA の代表的な配列と二次構造

PO 骨格を大文字, PS 骨格を小文字, CpG モチーフを赤字で表記した。二重鎖を形成している塩基対を灰色で示した。<https://www.invivogen.com/cpg-odns-classes> を参考に作図した。

1.5. TLR9 の立体構造

これまでの TLR9 に関する X 線結晶構造解析の研究の結果から、主に以下の構造が明らかになっている³²。

①リガンド非結合型 TLR9；

不活性化型単量体 (図 6A)

②アゴニスト DNA 結合型 TLR9；

TLR9: CpG DNA (DNA1668_12mer) = 2:2 の活性化型二量体 (図 6B)

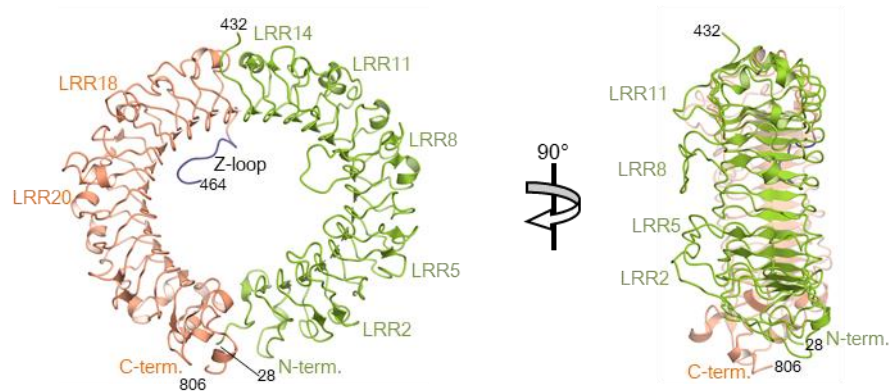
③アンタゴニスト DNA 結合型 TLR9；

TLR9: アンタゴニスト DNA (iDNA4084, iDNA_super など) = 1:1 の不活性化型単量体 (図 6C)

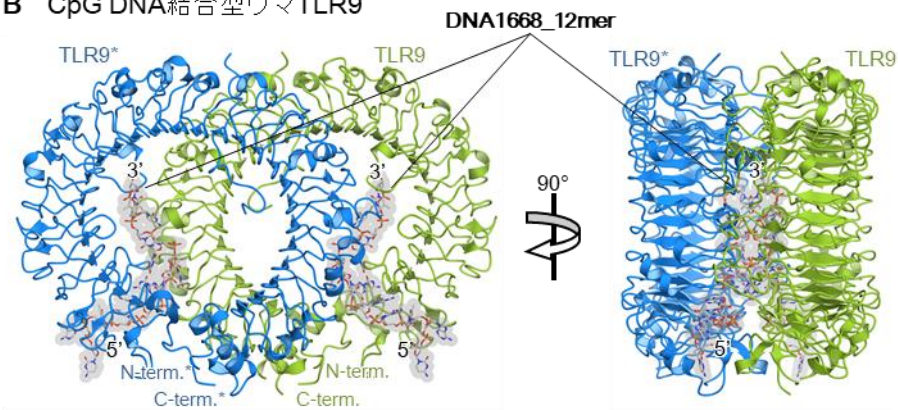
細胞中で全長の TLR9 を発現させた実験において、TLR9 が不活性な二量体を形成していることを示唆する結果が報告されていたが⁶³、①のリガンド非結合型の構造解析の結果、TLR9 細胞外ドメインは結晶中では単量体で存在していた。②のアゴニスト DNA 結合型の構造において、TLR9 は二量体を形成し、2 分子の CpG DNA (DNA1668_12mer; CATGACGTTAAT) が TLR9 の各プロトマーの等価な位置に結合し、2:2 複合体を形成していた。CpG DNA は一方の TLR9 プロトマーと他方の TLR9 プロトマー (TLR9*と表記する。以下では、TLR9*に属する残基や LRRなどを、アスタリスクを付して表記する) から同時に認識されることで、TLR9 の二量体化に寄与していた。③のアンタゴニスト結合型の構造では、TLR9 とアンタゴニスト DNA は 1:1 の複合体を形成しており、TLR9 分子は単量体で存在していた。アンタゴニスト DNA はステムループ構造を形成しており、TLR9 のリング構造の内側に結合し、主にリン酸とリボース骨格を介して LRR2-LRR11 と相互作用していた。アンタゴニスト DNA 結合部位は CpG DNA 結合部位と一部重複しており、これにより TLR9 への CpG DNA の結合を阻害していると考えられた。

TLR9 と同じサブファミリーに属する TLR7 と TLR8 の活性化型二量体の構造が明らかにされており、TLR 二量体の構造は TLR9 とよく類似していた (図 3)。一方で、リガンド結合部位は全く異なる。TLR7 と TLR8 には 2 箇所のリガンド結合部位が存在し^{30,31}、一つ目は 1st site と呼ばれ、低分子アゴニストやモノヌクレオシド (TLR7; グアノシン, TLR8; ウリジン) が結合する。1st site は TLR7 および TLR8 の二量体界面の完全に同じ位置に存在し、この部位へのリガンドの結合により、活性化型二量体形成が引き起こされる。二つ目の結合部位の 2nd site は TLR7 と TLR8 のいずれにおいても ssRNA が結合するが、結合する位置は両者で異なっている。TLR7 においては Z-loop と LRR1-LRR4 に挟まれた位置に、TLR8 においては Z-loop と LRR9-LRR13 に挟まれた位置にそれぞれ結合する。

A リガンド非結合型ウマTLR9



B CpG DNA結合型ウマTLR9



C アンタゴニストDNA結合型ウマTLR9

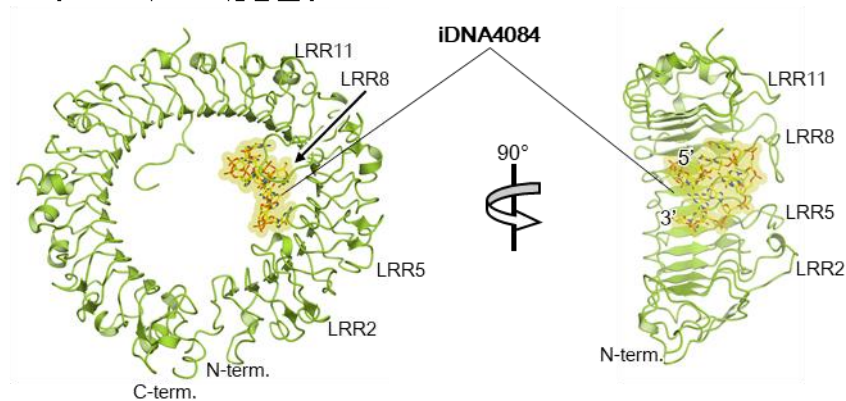


図 6. TLR9 の結晶構造

リガンド非結合型 (A, PDB ID: 3WPB), CpG DNA 結合型 (B, PDB ID: 3WPC), アンタゴニスト DNA 結合型 (C, PDB ID: 3WPD) ウマ TLR9 の構造³²。左には正面図, 右には側面図を示した。リガンド非結合型の構造は, Z-loop より N 末端側 (LRR1-LRR14) を緑色, Z-loop を紫色, Z-loop より C 末端側 (LRR15-LRR26) を橙色で示した。

1.6. TLR9 の第二の DNA 結合部位について

TLR9 活性化型二量体の構造として、これまでに CpG DNA である DNA1668_12mer との 2:2 複合体の構造が解明されている³²(図 6)。しかし、CpG DNA を介した TLR9 の二量体形成は、ゲル濾過クロマトグラフィーによる結合実験においては観察されず、超遠心分析のようなタンパク質と DNA とともに高濃度の条件下において観察され、その解離定数は約 20 μ M と見積もられた。このことから、CpG DNA による TLR9 二量体形成能は非常に弱いと考えられ、実際の TLR9 の活性化には CpG DNA 以外に他の因子が介在している可能性が示唆された。

Jerala らは、20-30 塩基の長さで、CpG モチーフに加えて 5'末端側の配列が TCG あるいは TCC である DNA は、そうでない DNA と比較してヒト TLR9 を効率的に活性化することを明らかにした⁶⁴。これは、DNA の 5'末端の配列が TLR9 の活性化において重要な役割を果たしていることを示唆している。これに加えて、5'末端に TCG モチーフをもつ短い ssDNA が CpG DNA による TLR9 の活性化を増強することが示されている⁶⁵。これらの報告から、TLR9 には CpG モチーフの結合部位とは異なる第二の DNA 結合部位が存在することが推測された。

これに関連して、他の TLR7 サブファミリーのメンバーである TLR7 と TLR8 は、ssRNA とモノヌクレオシドという 2 つの異なるリガンドが同時に結合することで二量体形成能が増強されることが明らかにされている^{30,31}。TLR7 サブファミリーの機能的、構造的類似性から、TLR9 もまた第二の DNA 結合部位をもつことが予想される。しかしながら、第二の DNA の結合部位およびその役割は明らかになっていない。

1.7. マウス TLR9 について

TLR9 を活性化するコンセンサス配列は RRCGYT であると言われているが、活性化に適した配列が種によって異なることが以前より指摘されていた。すなわち、マウスにおいては GACGTT^{53,66} あるいは AACGTT⁶⁷ である一方で、ヒト、ウマ、ウシを含めたその他脊椎動物においては GTCGTT である^{68,69}。また Jerala らのグループにより、ヒトおよびマウス由来の TLR9 を活性化させる最小の DNA 配列の系統的研究が行われ、ヒト TLR9 の活性化のためには CpG モチーフに加えて 5'末端に TCG モチーフをもつことが必須であることが示された(例; minH75 DNA: TCGT⁷CGT¹², 24 塩基)⁶⁴。一方、マウス TLR9 では 5'末端に TCC モチーフをもつ CpG DNA (例; minM80 DNA: TCCT³CGT¹⁵, 23 塩基) でより効率的に活性化されるが、5'末端をすべて T に置き換えた CpG DNA (T⁴⁻⁶CGT¹²⁻²¹, 23-29 塩基) においても活性化に大きな影響はなかったことから、このモチーフは必須ではないことが示唆された⁷⁰。

マウスは実験動物として臨床研究にも用いられており、マウスにおける研究結果をその他の種へと適用するためには、この種特異性を考慮に入れなければならない。しかし、これまでマウス TLR9 に関してはリガンド非結合型の構造は解明されているものの³²,

アゴニスト DNA による活性化型二量体の構造は未知であり、マウス TLR9 に特異的な活性化機構が存在するかどうかについては不明であった。

1.8. 本研究の目的

これまでの研究によって、CpG DNA を介した TLR9 の活性化機構が明らかになっていたが、CpG DNA 単独での TLR9 の二量体化は非常に弱く³², CpG モチーフ以外に第二の DNA 結合部位が存在している可能性が示唆された^{64,65,70}。しかし第二の DNA 結合部位に結合する DNA の配列や活性化機構は明らかになっていなかった。本研究では、TLR9 の第二の DNA 結合部位を特定し、その DNA 結合様式を明らかにするために、TLR9 と 2 種類の DNA との結晶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、Ohto and Ishida *et al. Immunity*, 2018 に記載した。

また、マウス TLR9 の活性化においては、以前より CpG モチーフを含むコンセンサス配列が他の種と異なることが知られていた。これに加えて最近、ヒト TLR9 の活性化には CpG DNA の 5'末端の TCG モチーフが必須であるのに対して、マウス TLR9 は単一の CpG モチーフで十分な活性を示すことが報告された^{64,70}。マウスのモデル動物としての汎用性にも関わらず、マウス TLR9 がヒトとは異なる配列特異性を示す要因については不明だった。本研究では、TLR9 の活性化における種間差を理解するために、マウス TLR9 の活性化型二量体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、Ishida *et al. FEBS lett.*, 2018 に記載した。

本論文では、既に明らかになっている CpG モチーフ結合部位に結合する DNA を CpG DNA, TLR9 の第二の結合部位に結合する DNA を 5'-TCG DNA と表記する。ただし、後述する結合実験の結果により、TLR9 の第二の DNA 結合部位には 5'末端から 2 番目がシトシンである DNA が結合することが明らかになったため、3.1.4 項以降は 5'-xCx DNA と表記する。

2. 材料および方法

2.1. 2 種類の DNA による TLR9 の活性化機構

2.1.1. TLR9 発現用ベクターの作製

TLR9 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。以下では、そのプロトコルを示す。

タンパク質の発現には、*Drosophila* Expression System (Thermo Fisher Scientific) 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 – TLR9 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 DNA を用いた (図 7)。TLR9 細胞外ドメイン全長遺伝子は、ウマ (残基番号 26-817), ウシ (残基番号 25-815), マウス (残基番号 26-818) 由来の遺伝子を、*Drosophila melanogaster* 用にコドン最適化して合成した (GeneScript に依頼)。この遺伝子を発現させると、RSPW (*Bg*II および *Nco*I 由来の配列) – TLR9 – EF (*Eco*RI 由来の配列) – LVPRGS (トロンビン認識配列) – proteinA タグとなることが予想される。

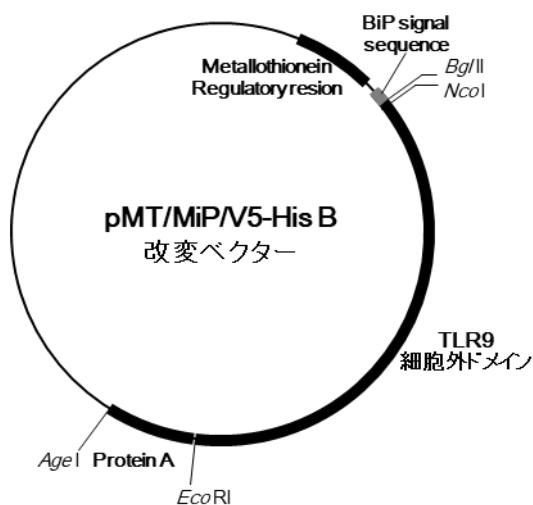


図 7. TLR9 発現ベクターの模式図

TLR9 発現用ベクターの模式図。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 – TLR9 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 DNA³² を用いた。

Signal Sequence			2-loop	
TLR9_Human	MGPCRSALHPLSLVQAIMLAMTLA	25	TLR9_Human	ATMGEADGGERVWLQPCDLAPAPVDTPSSSEDFRPNCSY 472
TLR9_Horse	MGPCHGALQPLSLVQAMLAVALA	25	TLR9_Horse	ATTGEVDGGRKVLTSRDLTPGLDTPSSSEDFMPSCKN 472
TLR9_Bovine	MGP-YCAPHPLSLVQAAALAAALA	24	TLR9_Bovine	AALGEVDSRVVWRLFRGLAPGLDAVSSKDFMPSCKN 470
TLR9_Rat	MVLCRRTLHPLSLVQAMLAVALA	25	TLR9_Rat	VAFKADAEKGVWPFASLTALPSTFPVSKFMVRCNK 473
TLR9_Mouse	MVLRRTLHPLSLVQAAVLAETLA	25	TLR9_Mouse	ATPEEADAEQEELLSADPHAPLSTPASKFMMDRCNK 473
LRRNT			LRR15	
TLR9_Human	LGTLPAPLPCCELQPHGLVNCNWFLKSVPHFSMAAPR	62	TLR9_Human	LNFTLDLSRNNLVTVPQEMFAQLS 496
TLR9_Horse	QGTLPAPLPCCELQPHGLVNCNWFLKSVPHFSAAAPR	62	TLR9_Horse	LSFTLDLSRNNLVTVPQEMFAQLS 496
TLR9_Bovine	EGTLPAPLPCCELQPHGQVDCNWFLKSVPHFSAGAPR	61	TLR9_Bovine	LNFTLDLSRNNLVTIQEMFTRLS 494
TLR9_Rat	LGTLPAPLPCCELKPHGLVDCNWFLKSVPHFSAAEPR	62	TLR9_Rat	LRFTMDLSRNNLVTIKPEMFVNL 497
TLR9_Mouse	LGTLPAPLPCCELKPHGLVDCNWFLKSVPHFSAAASC	62	TLR9_Mouse	FKFTMDLSRNNLVTIKPEMFVNL 497
LRR1			LRR16	
TLR9_Human	GNVTSLSLSNRIHHLHSDFAHLF	87	TLR9_Human	HLQCLRLSHNCSIAQAVNGSQFLPLT 521
TLR9_Horse	DNVTSLSLSNRIHHLHSDFAQLS	87	TLR9_Horse	RLQCLRLSHNCSIAQAVNGSQFVPLT 521
TLR9_Bovine	ANVTSLSLSNRIHHLHSDDFVHLS	86	TLR9_Bovine	HLQCLRLSHNCSIAQAVNGSQFVPLT 519
TLR9_Rat	SNVTSLSLSNRIHHLHSDDFVHLF	87	TLR9_Rat	HLQCLRLSHNCSIAQAVNGSQFLPLT 522
TLR9_Mouse	SNVTSLSLSNRIHHLHSDDFVHLS	87	TLR9_Mouse	HLQCLRLSHNCSIAQAVNGSQFLPLT 522
LRR2			LRR17	
TLR9_Human	SLRLNLNKNWCPVGLSPMHFCHMTIEPSTFLAVP	123	TLR9_Human	GLQVLDLSHNKLDLYHEHSFTPL 545
TLR9_Horse	NLQKLNKNWCPVGLSPMHFCHMTIEPSTFLAVP	123	TLR9_Horse	SLQVLDLSHNKLDLYHGRSFTPL 545
TLR9_Bovine	NLRVLNKNWCPVGLSPMHFCHMTIEPSTFLAVP	122	TLR9_Bovine	SLRVLDLSHNKLDLYHGRSFTPL 543
TLR9_Rat	NVRQLNKNWCPVGLSPMHFCHMTIEPSTFLAVP	123	TLR9_Rat	NLRVLDLSHNKLDLYHGRSFTPL 546
TLR9_Mouse	NLRQLNKNWCPVGLSPMHFCHMTIEPSTFLAVP	123	TLR9_Mouse	NLRVLDLSHNKLDLYHGRSFTPL 546
LRR3			LRR18	
TLR9_Human	TLEELNLSYNNIMTVPALPK	143	TLR9_Human	RLQALDLSYNSQPFQMGVGHNFSEVAHLR 575
TLR9_Horse	SLVSLNLSYNNIMTVPALPS	143	TLR9_Horse	RLQALDLSYNSQPFQMGVGHNFSEVAHLR 575
TLR9_Bovine	TLEELNLSYNNIMTVPALPS	142	TLR9_Bovine	RLQALDLSYNSQPFQMGVGHNFSEVAHLR 576
TLR9_Rat	MLEELNLSYNNIMTVPALPS	143	TLR9_Rat	QLQALDLSYNSQPFQMGVGHNFSEVAHLR 576
TLR9_Mouse	TLEELNLSYNNIMTVPALPS	143	TLR9_Mouse	QLQALDLSYNSQPFQMGVGHNFSEVAHLR 576
LRR4			LRR19	
TLR9_Human	SLISLSLSTHTNLLDASLAGLH	167	TLR9_Human	TLRLSLAHNNIHSQVSOQLCST 598
TLR9_Horse	SLVSLSLSTHTNLLDASLAGLH	167	TLR9_Horse	TLRLSLAHNNIHSQVSOQLCST 598
TLR9_Bovine	SLVSLSLSTHTNLLDASLAGLH	166	TLR9_Bovine	SLRLSLAHNNIHSQVSOQLCST 596
TLR9_Rat	SLTNLSLSTHTNLLDASLAGLH	167	TLR9_Rat	TLRLSLAHNNIHSQVSOQLCST 599
TLR9_Mouse	SLVNLSLSTHTNLLDASLAGLH	167	TLR9_Mouse	MLQSLSLAHNNIHSQVSOQLCST 599
LRR5			LRR20	
TLR9_Human	ALRFLYMDGNCYNNPCRALEVPAGLLGLG	199	TLR9_Human	SLRALDLSYNSQPFQMGVGHNFSEVAHLR 628
TLR9_Horse	ALRFLYMDGNCYNNPCRALEVPAGLLGLG	199	TLR9_Horse	SLRALDLSYNSQPFQMGVGHNFSEVAHLR 628
TLR9_Bovine	ALRFLYMDGNCYNNPCRALEVPAGLLGLG	198	TLR9_Bovine	SLRALDLSYNSQPFQMGVGHNFSEVAHLR 626
TLR9_Rat	SLRVLFMDGNCYNNPCRALEVPAGLLGLG	199	TLR9_Rat	SVRYLDFSGNGVGRMDEEDLYLHFFQGLS 629
TLR9_Mouse	SLRVLFMDGNCYNNPCRALEVPAGLLGLG	199	TLR9_Mouse	SVRYLDFSGNGVGRMDEEDLYLHFFQGLS 629
LRR6			LRR21	
TLR9_Human	NLTHLSLKNLNTLVPRNPLP	220	TLR9_Human	GLIWLDSLQNLRLHTLTPQTLRLNLPK 653
TLR9_Horse	NLTHLSLKNLNTLVPRNPLP	220	TLR9_Horse	SLIRLDSLQNLRLHTLTPQTLRLNLPK 653
TLR9_Bovine	NLTHLSLKNLNTLVPRNPLP	219	TLR9_Bovine	NLVQLDSLQNLRLHTLTPQTLRLNLPK 651
TLR9_Rat	NLTHLSLKNLNTLVPRNPLP	220	TLR9_Rat	SLIHLDSLQNLRLHTLTPQTLRLNLPK 654
TLR9_Mouse	NLTHLSLKNLNTLVPRNPLP	220	TLR9_Mouse	GLIWLDSLQNLRLHTLTPQTLRLNLPK 654
LRR7			LRR22	
TLR9_Human	SLEYLLSLNRIIVKLAPEDLANLT	244	TLR9_Human	SLQVLDLSYNSQPFQMGVGHNFSEVAHLR 677
TLR9_Horse	SLEYLLSLNRIIVKLAPEDLANLT	244	TLR9_Horse	SLQVLDLSYNSQPFQMGVGHNFSEVAHLR 677
TLR9_Bovine	SLEYLLSLNRIIVKLAPEDLANLT	243	TLR9_Bovine	SLQVLDLSYNSQPFQMGVGHNFSEVAHLR 675
TLR9_Rat	SLEYLLSLNRIIVKLAPEDLANLT	244	TLR9_Rat	SLQVLDLSYNSQPFQMGVGHNFSEVAHLR 678
TLR9_Mouse	SLEYLLSLNRIIVKLAPEDLANLT	244	TLR9_Mouse	SLQVLDLSYNSQPFQMGVGHNFSEVAHLR 678
LRR8			LRR23	
TLR9_Human	ALRVLDVGGNCRRCDDHAPNPECEPHRFQPLHSDTFSHLS	284	TLR9_Human	KLEVLDSLQNLRLHTLTPQTLRLNLPK 701
TLR9_Horse	ALRVLDVGGNCRRCDDHAPNPECEPHRFQPLHSDTFSHLS	284	TLR9_Horse	NLETLDSLQNLRLHTLTPQTLRLNLPK 701
TLR9_Bovine	ALRVLDVGGNCRRCDDHAPNPECEPHRFQPLHSDTFSHLS	283	TLR9_Bovine	RLQALDLSYNSQPFQMGVGHNFSEVAHLR 699
TLR9_Rat	SLRVLDVGGNCRRCDDHAPNPECEPHRFQPLHSDTFSHLS	284	TLR9_Rat	NLRDLDSLQNLRLHTLTPQTLRLNLPK 702
TLR9_Mouse	SLRVLDVGGNCRRCDDHAPNPECEPHRFQPLHSDTFSHLS	284	TLR9_Mouse	NLEVLDSLQNLRLHTLTPQTLRLNLPK 702
LRR9			LRR24	
TLR9_Human	RLQGLVLKDSLSLWLAASWFRGLG	308	TLR9_Human	ELKEVNLSHNLIKTVDRSWFGPIVM 725
TLR9_Horse	RLQGLVLKDSLSLWLAASWFRGLG	308	TLR9_Horse	ELKEVNLSHNLIKTVDRSWFGPIVM 725
TLR9_Bovine	RLQGLVLKDSLSLWLAASWFRGLG	308	TLR9_Bovine	ELKEVNLSHNLIKTVDRSWFGPIVM 726
TLR9_Rat	RLQGLVLKDSLSLWLAASWFRGLG	308	TLR9_Rat	ELKEVNLSHNLIKTVDRSWFGPIVM 726
TLR9_Mouse	RLQGLVLKDSLSLWLAASWFRGLG	308	TLR9_Mouse	ELKEVNLSHNLIKTVDRSWFGPIVM 726
LRR10			LRR25	
TLR9_Human	NLRVLDLSNFIYKIKTKKFAQGLT	334	TLR9_Human	ELKEVNLSHNLIKTVDRSWFGPIVM 750
TLR9_Horse	NLRVLDLSNFIYKIKTKKFAQGLT	334	TLR9_Horse	ELKEVNLSHNLIKTVDRSWFGPIVM 750
TLR9_Bovine	RLQGLDSLNFYDIYTKTKTFNDLT	333	TLR9_Bovine	ELKEVNLSHNLIKTVDRSWFGPIVM 748
TLR9_Rat	NLSVLDLSNFIYKIKTKKFAQGLT	334	TLR9_Rat	ELKEVNLSHNLIKTVDRSWFGPIVM 751
TLR9_Mouse	NLSVLDLSNFIYKIKTKKFAQGLT	334	TLR9_Mouse	ELKEVNLSHNLIKTVDRSWFGPIVM 751
LRR11			LRR26	
TLR9_Human	QRRRLNLSYNNIKKVSFAHLHASSFGSLV	364	TLR9_Human	ALQVLDLSYNSQPFQMGVGHNFSEVAHLR 763
TLR9_Horse	QRRRLNLSYNNIKKVSFAHLHASSFGSLV	364	TLR9_Horse	SEVLDLSYNSQPFQMGVGHNFSEVAHLR 763
TLR9_Bovine	QRRRLNLSYNNIKKVSFAHLHASSFGSLV	363	TLR9_Bovine	TKIKLDLSYNSQPFQMGVGHNFSEVAHLR 761
TLR9_Rat	RLRKLDLSYNNIKKVSFAHLHASSFGSLV	364	TLR9_Rat	NLTVDLSYNSQPFQMGVGHNFSEVAHLR 764
TLR9_Mouse	RLRKLDLSYNNIKKVSFAHLHASSFGSLV	364	TLR9_Mouse	NLTVDLSYNSQPFQMGVGHNFSEVAHLR 764
LRR12			LRRCT	
TLR9_Human	ALKELDLMDHGIFFRSLDETTLRPLARLP	391	TLR9_Human	CACGAAFMDFLLQVQAAVPGPLSRVKCGSPGQGLSIFAQDLRLCLDEALSWDC 818
TLR9_Horse	SLQELDMHGIFFRSLDETTLRPLARLP	391	TLR9_Horse	CACGAAFMDFLLQVQAAVPGPLSRVKCGSPGQGLSIFAQDLRLCLDEALSWDC 818
TLR9_Bovine	SLQELDMHGIFFRSLDETTLRPLARLP	390	TLR9_Bovine	CACGAAFMDFLLQVQAAVPGPLSRVKCGSPGQGLSIFAQDLRLCLDEALSWDC 816
TLR9_Rat	SLQELDMHGIFFRSLDETTLRPLARLP	391	TLR9_Rat	CACGAAFMDFLLQVQAAVPGPLSRVKCGSPGQGLSIFAQDLRLCLDEALSWDC 819
TLR9_Mouse	SLQELDMHGIFFRSLDETTLRPLARLP	391	TLR9_Mouse	CACGAAFMDFLLQVQAAVPGPLSRVKCGSPGQGLSIFAQDLRLCLDEALSWDC 819
LRR13				
TLR9_Human	MLQTLRLQMNFINAQGLGFRAFP	415		
TLR9_Horse	MLQTLRLQMNFINAQGLGFRAFP	415		
TLR9_Bovine	KLQSLHLQMNFINAQGLGFRAFP	414		
TLR9_Rat	KLHSLHLQMNFINAQGLGFRAFP	415		
TLR9_Mouse	KLHSLHLQMNFINAQGLGFRAFP	415		
LRR14				
TLR9_Human	GLRYVLDSDNRISGAEL-T	434		
TLR9_Horse	GLRYVLDSDNRISGAEL-T	434		
TLR9_Bovine	SLRFVLDSDNRISGAEL-T	433		
TLR9_Rat	ALRFVLDSDNRISGAEL-T	435		
TLR9_Mouse	ALRFVLDSDNRISGAEL-T	435		

図 8. TLR9 のアミノ酸配列アライメント

ヒト, ウマ, ウシ, ラット, マウス由来の TLR9 の細胞外ドメインのアミノ酸配列アライメントを LRR 単位ごとに表示した。配列アライメントは Clustal Omega software (EMBL-European Bioinformatics Institute) を使用した。アミノ酸残基の色は類似度を示しており, 赤が最も類似度が高く, 次いで緑, 青, 黒の順に類似度が低い。黄色は N 型糖鎖結合可能部位を示している。

2.1.2. TLR9 安定発現株の作製

先行研究に従って Schneider 2 (S2) 細胞を用いて TLR9 の安定発現株を作製した³²。以下では、そのプロトコルを示す。TLR9 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、PureYield Plasmid Miniprep System (Promega) 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 (Thermo Fisher Scientific) を播種して底面に接着させた。精製した TLR9 ベクター 2 μ g と pCoHygro ベクター 80 ng を、3 μ L の Cellfectin II Reagent (Thermo Fisher Scientific) 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、先の細胞の上清を除去してトランスフェクション溶液を静かに滴下した。4 時間後、上清を除去し、1% Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (nacalai tesque) を加えた Sf-900II SFM (Thermo Fisher Scientific) 培地を 1 mL/ウェルで添加した。翌日、細胞を 300 μ g/mL Hygromycin B Solution (50 mg/mL, nacalai tesque), 1% Penicillin-Streptomycin Mixed Solution を加えた Sf-900II SFM 培地を用いて植え継ぎ、hygromycin による選択を開始した。約 3 週間薬剤選択培養を行い、hygromycin 存在下で増殖することを確認してから、細胞を 6 ウェルプレートに植え継いだ。細胞を十分に増殖させた後、三角フラスコに植え継ぎ 27°C にて浮遊培養を開始した。以後、300 μ g/mL Hygromycin B solution, 10 μ g/mL Gentamicin Sulfate Solution (10 mg/mL, nacalai tesque), 0.1% Fungizone Antimycotic, Liquid (Thermo Fisher Scientific), 1% Penicillin-Streptomycin Mixed Solution を加えた Sf-900II SFM 培地を用いて細胞を継代培養した。これを安定発現株とする。

2.1.3. 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、性状解析用のウマ、ウシ、マウス由来の TLR9 (糖鎖非短縮) を調製した。安定発現株を用いた大量培養、精製は以前の方法に従った³²。以下では、その手法を示す。

培養には、0.5% Penicillin-Streptomycin Mixed Solution, 20 mM L-Glutamine Stock Solution (nacalai tesque) を加えた Express Five SFM (Thermo Fisher Scientific) 培地 を使用して 110 rpm で旋回培養し、細胞密度が $1.0\text{--}2.0 \times 10^6$ 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 TLR9 を分泌発現させた。

培養液を遠心分離して上清を回収し、IgG Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) に吸着させた。PBS でカラムの洗浄を行った後、0.1 M Glycine-HCl pH 3.5, 0.15 M NaCl で 溶 出 さ せ た 。 溶 出 液 に 直 ち に 1/20 (v/v) の 1 M tris (hydroxymethyl)-aminomethane (Tris)-HCl pH 8.0 を加えて中性にした。溶出液を Amicon Ultra-100 (Merck millipore) を用いた限外濾過により 10 mL 程度まで濃縮後、

15,000 rpm, 4°C, 10 分間遠心を行って沈殿を除去し, 上清を HiLoad Superdex 200 26/60 prep grade (CV=320 mL, GE Healthcare) ゲル濾過カラムにアプライした。バッファーは 10 mM Tris-HCl pH7.5, 0.15 M NaCl を用い, 流速 2 mL/min で行った。280 nm の吸光度 (Absorbance at 280 nm; A_{280}) を測定することでタンパク質の溶出をモニターし, TLR9 分子量相当のピークの画分 (約 151 ml-175 ml) を分取した。ウマおよびウシ由来の TLR9 については, タンパク質 1 mg に対して V8 プロテアーゼ (Wako) を 40 μ g 添加し, 室温で 55-60 時間静置して protein A タグおよび Z-loop を切断した。マウス由来の TLR9 については, タンパク質 1 mg に対して V8 プロテアーゼを 10 μ g 添加し, 室温で一晩静置して protein A タグおよび Z-loop を切断した。V8 プロテアーゼによる切断後, 15,000 rpm, 4°C, 10 分間遠心を行って沈殿を除去し, 上清を陽イオン交換クロマトグラフィー用 A バッファー (10 mM 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES)-NaOH pH 6.0) を用いて 6 倍に希釈し, 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 6.0), B バッファー (10 mM MES-NaOH pH 5.0, 2 M NaCl) を用い, 25 mL の 5% B バッファーでカラムを洗浄後, 100 mL で B バッファーを 5%から 30% までグラジエントをかけ, TLR9 を溶出させた。TLR9 の画分を回収し, Amicon Ultra-50 を用いてバッファーを 10 mM MES-NaOH pH5.5, 0.15 M NaCl に置換し, 10-20 mg/mL に濃縮した。各段階におけるサンプルの状態は SDS-PAGE により確認した。

本項の結果は, 図 9, 図 11, 図 32 および 3.1.1 項, 3.2.1 項に記した。

2.1.4. 結晶化用サンプル (糖鎖短縮) の調製

ウマおよびウシ TLR9 には, それぞれ 13 箇所と 11 箇所の *N*型糖鎖結合可能部位が存在する (図 8)。糖鎖は結晶化の障害となるため, 結晶化用のウマおよびウシ TLR9 サンプル (糖鎖短縮) を得る目的で, 誘導と同時に糖鎖生合成経路の阻害剤であるキフネンシン (Cayman Chemical) を添加し, 糖鎖切断酵素 EndoH_r 感受性の糖鎖を付加させた。大量培養は 2.1.3 項の方法に従った³²。誘導時にキフネンシンを終濃度 1.8 μ g/mL, CuSO₄ を終濃度 0.6 mM となるよう添加した。IgG アフィニティークロマトグラフィーによる精製までは, 2.1.3 項の性状解析用サンプルと同様に行った。溶出液を Amicon Ultra-100 を用いた限外濾過により 10 mL 程度まで濃縮後, 1/10 (v/v) 1 M 酢酸バッファー pH 5.0 を添加し, 1 mg のタンパク質に対し Endo H_r (NEB) 1,000 U を加え, 室温で一晩静置し, 糖鎖の短縮を行った。その後のゲル濾過カラムクロマトグラフィー, V8 プロテアーゼ処理, 陽イオン交換カラムクロマトグラフィーによる精製は, 2.1.3 項の方法に従った。TLR9 の含まれる画分を回収し, Amicon Ultra-50 を用いてバッファーを 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl に置換し, 5-15 mg/mL に濃縮した。

本項の結果は, 図 10 および 3.1.1 項に記した。

2.1.5. マウス TLR9 の 5'-TCG DNA 結合部位変異体の調製

5'-TCG DNA の認識に関わる残基の重要性を調べるために、マウス TLR9 の 5'-TCG DNA 結合部位変異体を作製した。2.1.1 項で作製したマウス TLR9 野生型の pMT/BiP/V5-His B 発現ベクターを鋳型として、PCR 反応により変異を導入した。計 4 個の 5'-TCG DNA 結合部位変異体のマウス TLR9 (F375A, F402A, D535A, Y537A) を作製した。変異導入に使用したプライマーは表 1 にまとめた。PCR 酵素には PrimeSTAR MAX DNA polymerase (TaKaRa) を使用し、添付の取扱説明書に従って変異導入のための PCR 反応を行った。作製したマウス TLR9 の 5'-TCG DNA 結合部位変異体ベクターは、シーケンス解析により目的位置に変異が入っていることを確認した (Fasmac に依頼)。

表 1. マウス TLR9 の 5'-TCG DNA 結合部位変異体を作製するためのプライマー

	forward	reverse
F375A	TGGCATTGCTTTTCGCTCCCTGAATAAG	GCGAAAAGCAATGCCATTCATGTTTCAG
F402A	ATGAACGCTATCAATCAGGCCAGCTG	ATTGATAGCGTTCATCTGCAGATGCAG
D535A	AAGCTGGCTCTGTACCATTGGAAGTCG	GTACAGAGCCAGCTTATTGTGGCTCAG
Y537A	GACCTGGCTCATTGGAAGTCGTTTCAGT	CCAATGAGCCAGGTCCAGCTTATTGTG

作製した発現用のベクターを用いて、2.1.2 項に従って安定発現株を作製し、大量培養を行い、性状解析用のサンプルを調製した。2.1.3 項に示した性状解析用サンプルの調製方法に従って IgG アフィニティークロマトグラフィーを行い、サンプルを濃縮後、V8 プロテアーゼで protein A タグと Z-loop の切断を行った (タンパク質 1 mg に対して 10 µg 添加、室温一晩静置)。15,000 rpm, 4℃, 10 分間遠心を行って沈殿を除去し、上清を Superdex 200 Increase 10/300 (CV=24 mL, GE Healthcare) ゲル濾過カラムで精製を行った。バッファーは 10 mM MES-NaOH pH5.5, 0.15 M NaCl を用いた。TLR9 の含まれる画分を回収し、Amicon Ultra-50 を用いて 5-20 mg/mL に濃縮した。また、これらの 5'-TCG DNA 結合部位変異体に加えて、コントロールとして CpG DNA 結合部位変異体であるマウス TLR9 W96A 変異体³²についても同様に性状解析用のサンプルを調製した。

2.1.6. ITC

ITC を用いて TLR9 と各 DNA の結合親和性を測定した。装置は MicroCal iTC200 (Malvern) を使い、最初に 0.4 µL の滴定を 1 回行った後、2 µL の滴定を 18 回を行い、DNA 結合の際に出入りした熱量を測定した。滴定の間隔は 120 秒とし、バッファーは 10 mM MES-NaOH pH 5.5, 0.15 M NaCl を用いて、298 K で測定を行った。CpG DNA

および 5'-TCG DNA は超純水で 2 mM に溶解したものをを用いた（すべて PO 骨格，eurofin に合成を依頼）。

TLR9 と CpG DNA 単独あるいは 5'-TCG DNA 単独との結合については，10 μ M の TLR9 に対して 100 μ M の CpG DNA あるいは 5'-TCG DNA を滴定した。TLR9 に対する CpG DNA と 5'-TCG DNA の協調的な結合については，10 μ M の TLR9 と等モル量の CpG DNA の混合液に対して，100 μ M の 5'-TCG DNA を滴定した。

測定データは OriginLab software (Malvern) 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。有意な熱の出入りが観測されなかったものについては，解離定数を算出なかった。

本項の結果は，3.1.1 項，3.1.4 項，3.1.10 項および図 12，図 13，図 15，図 25，表 6，表 8 に記した。

2.1.7. ゲル濾過クロマトグラフィー

TLR9 の会合状態および DNA の結合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。

図 14 の結果については，カラムは Superdex 200 Increase 10/300 (CV = 24 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 1 mL/min で行った。TLR9 は 1 μ M とし，2 μ M の CpG DNA と 5'-TCG DNA を混合した（モル比 2 倍）。サンプルはそれぞれ 200 μ L をアプライし， A_{280} と A_{260} を検出した。いずれの DNA も，2.1.6 項と同じものをを用いた。

本項の結果は，3.1.3 項および図 14 に記した。

図 16 の結果については，カラムは Superdex 200 Increase 5/150 (CV = 3 mL, GE Healthcare) を用いた。バッファーは 25 mM MES-NaOH pH 5.5, 0.25 M NaCl を用い，流速は 0.5 mL/min で行った。TLR9 は 2 μ M とし，等モル量の CpG DNA と 5'-TCG DNA を混合した。サンプルはそれぞれ 50 μ L をアプライし， A_{280} を検出した。

本項の結果は，3.1.5 項および図 16 に記した。

図 31 の結果については，カラムは Superdex 200 Increase 10/300 (CV = 24 mL) 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 1 mL/min で行った。TLR9 および CpG DNA の濃度を 125 nM に固定して，各配列の 5'-TCG DNA をさまざまな濃度（31–250 nM）で混合した。サンプルはそれぞれ 200 μ L をアプライし， A_{280} を検出した。また，5'-TCG DNA の濃度に対する TLR9 の二量体の面積をプロットした。

本項の結果は，3.1.13 項および図 31 に記した。

2.1.8. 結晶化

結晶化実験はシッティングドロップ蒸気拡散法により、293 Kで行った。結晶化ドロップはタンパク質溶液と等量のリザーバー溶液を 0.5–1.0 μL ずつ混合することによって作製した。結晶化の条件は表 2 に記した。結晶化用プレートは CrystalClear ‘P’ strips with platforms (Hampton research) を用いた。

2.1.9. X 線結晶構造解析

CpG DNA/5'-xCxDNA 結合型ウマ TLR9 の結晶 (3 種) の回折強度データセット収集は SPring-8 BL41XU (兵庫) で行い、検出器は PILATUS3 6M (DECTRIS) を使用した。CpG DNA/5'-xCxDNA 結合型ウシ TLR9 の結晶の回折強度データセット収集は PF-AR NE3A (茨城) で行い、検出器は PILATUS 2M (DECTRIS) を使用した。

結晶は表 2 に示した不凍液に浸漬後、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。測定はいずれも 1 個の結晶を用いて行った。ウマ TLR9 の結晶については、振動角を 0.5°/frame とし、露光時間 0.5 秒で 360 枚のデータを収集した。ウシ TLR9 の結晶については、振動角を 0.5°/frame とし、露光時間 1.5 秒で 360 枚のデータを収集した。

回折強度データセットは HKL2000⁷¹あるいはXDS⁷²により回折データから指数付けと積分処理を行った。結晶構造の位相は、DNA1668_12mer 結合型複合体結晶の構造 (PDB ID: 3WPC および 3WPE) をモデル構造として用い、Molrep プログラム⁷³による分子置換法により初期位相を決定した。COOT⁷⁴によるモデリングと REFMAC プログラム⁷⁵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。本論文で用いた構造の図は、CueMol (<http://www.cuemol.org/>; 図 26 以外) または PyMOL (<https://pymol.org/>; 図 26) を用いて描画した。

本項の結果は、3.1.6–3.1.9 項, 3.1.11 項および表 7, 図 18–図 24, 図 26 に記した。

表 2. 結晶化条件と不凍液の組成

	ウマ TLR9 AGGCGTTTTT 5'-xCx1: TCGCAC	ウマ TLR9 AGGCGTTTTT 5'-xCx2: GCGCAC	ウマ TLR9 AGGCGTTTTT 5'-xCx3: CCGCAC	ウシ TLR9 AGGCGTTTTT 5'-xCx4: TCGTTT
Protein solution	2.6 mg/mL ウマ TLR9 8 mM Tris-HCl pH7.5 0.40 M NaCl 72 μ M CpG1 DNA 145 μ M xCx1 DNA	6.5 mg/mL ウマ TLR9 9 mM Tris-HCl pH 7.5 0.44 M NaCl 77 μ M CpG1 DNA 154 μ M xCx2 DNA	6.5 mg/mL ウマ TLR9 9 mM Tris-HCl pH 7.5 0.44 M NaCl 77 μ M CpG1 DNA 154 μ M xCx3 DNA	4.3 mg/mL ウシ TLR9 9 mM Tris-HCl pH 7.5 0.44 M NaCl 77 μ M CpG1 DNA 154 μ M xCx4 DNA
Reservoir solution	2% (w/v) PEG 10000 20 mM Mg-acetate 20 mM Mes-NaOH pH6.5	4-6% (w/v) PEG 4000 4-6% (v/v) 2-propanol 0.2 M NaCl 0.1 M citrate-NaOH pH 5.6	4-6% (w/v) PEG 4000 4-6% (v/v) 2-propanol 0.2 M NaCl 0.1 M citrate-NaOH pH 5.6	10% (w/v) PEG 4000 0.5 M NaCl 0.1 M Mes-NaOH pH 6.5
Cryoprotectant solution	2% (w/v) PEG 10000 20 mM Mg-acetate 0.3 M NaCl 20 mM Mes-NaOH pH6.5 20% (v/v) ethylene glycol	5% (w/v) PEG 4000 5% (v/v) 2-propanol 0.3 M NaCl 0.1 M citrate-NaOH pH 5.6 25% (v/v) ethylene glycol	5% (w/v) PEG 4000 5% (v/v) 2-propanol 0.3 M NaCl 0.1 M citrate-NaOH pH 5.6 25% (v/v) ethylene glycol	10% (w/v) PEG 4000 0.5 M NaCl 0.1 M Mes-NaOH pH 6.5 20% (v/v) glycerol

2.1.10. NF- κ B レポーターアッセイ

本項および 2.1.11 項-2.1.13 項に示した実験を東京大学医科学研究所 三宅健介教授、柴田琢磨博士、佐藤亮太博士らに依頼した。以下の実験は三宅らによるものである。

HEK293T 細胞を用いた TLR9 のレポーターアッセイを行った。HEK293T 細胞は 10% FBS, Penicillin-Streptomycin-Glutamine (Thermo Fisher Scientific), 50 μ M 2-Mercaptoethanol (nacalai tesque) を添加した RPMI1640 培地 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、5%二酸化炭素存在下で 37°Cにおいて培養した。

野生型のマウス TLR9 の cDNA を導入した pMX-puro-IRES-ratCD2 ベクター, 野生型のマウス Unc93B1 の cDNA を導入した pMX-puro ベクター, pNL3.2.NF- κ B-RE [NlucP/NF- κ B-RE/Hygro] ベクターを, Polyethylenimine 'Max' MW40,000 (Polysciences) を用いて HEK293T 細胞に共トランスフェクションした。30 分間インキュベート後, コラーゲンコートした 384 ウェルの平底プレート (Corning) に細胞を播種し, 6 時間培養後に各種 DNA により刺激した。Nano-Glo Luciferase assay system (Promega) を用いて, 刺激した細胞の Nanoluc 活性を測定した。化学発光の相対発光量は GloMax 96 Microplate Luminometer (Promega) で測定した。CpG DNA 単独の刺激によるデータと各データを比較したときの統計学的有意性は, two-tailed Student's *t* 検定により決定し, *p* 値が 0.05 以下のものを有意差があるとした (**p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.005)。DNA はすべて PS 骨格のものを用いた (Fasmac に合成を依頼)。

本項の結果は 3.1.12 項および図 27, 図 28, 図 29, 図 30 に示した。

2.1.11. BM-MCs および BM-pDC の調製

骨髓由来マクロファージ (bone marrow-derived macrophages, BM-MCs) および骨髓由来形質細胞様樹状細胞 (bone marrow-derived plasmacytoid dendritic cells, BM-pDC) の誘導には、野生型および *Tlr9*^{-/-} のオスのマウスの脛骨および大腿骨より得た骨髓細胞 (bone marrow, BM) を用いた。野生型のマウスは C57BL/6 マウス (日本エスエルシー株式会社) を、*Tlr9*^{-/-} マウス¹⁴ は大阪大学の審良静男教授より譲渡を受けたものを用いた。BD Pharm Lyse lysing buffer (BD Biosciences) を用いて BM から赤血球を除去した。得られた BM は BM-MCs および BM-pDC の誘導に用いた。

BM-MCs の誘導は、 7×10^6 個の BM をポリスチレン 94 mm ディッシュ (Greiner Bio-One) に播種し、10 mL の 10% FBS, Penicillin-Streptomycin-Glutamine, 50 μ M 2-Mercaptoethanol, 100 ng/mL M-CSF (murine macrophage colony-stimulating factor, PeproTech Inc.) を添加した RPMI1640 培地で 6 日間培養することにより行った。BM-pDC の誘導は、 2.5×10^7 個の BM を細胞培養用 10 cm ディッシュに播種し、10 mL の 10% FBS, Penicillin-Streptomycin-Glutamine, 50 μ M 2-Mercaptoethanol, 100 ng/mL Flt3L (murine fms-like tyrosine kinase-3 ligand, PeproTech Inc.) を添加した RPMI1640 培地で 7 日間培養することにより行った。Flt3L 処理した細胞は抗マウス CD11c 抗体 (clone: N418) と抗マウス B220 抗体 (clone: RA3-6B2) ポリクローナル抗体 (TONBO bioscience) で染色し、最終的に CD11c 陽性かつ B220 陽性の細胞を FACS Aria フローサイトメーター (BD Biosciences) によりソーティングし、BM-pDC として実験に用いた。

2.1.12. ELISA

1×10^5 個/mL の BM-MCs を 96 ウェル平底プレート (BD Falcon) で培養し、各種 DNA により 16-20 時間刺激した。上清中のマウス IL-12p40 の濃度を Ready-Set-Go! ELISA kits (eBioscience) により測定した。いずれの DNA も、2.1.10 項と同じものを用いた。

本項の結果は、3.1.12 項および図 28 に示した。

5×10^4 個/mL の BM-pDCs を 96 ウェル丸底プレート (BD Falcon) で培養し、各種 DNA により 16-20 時間刺激後、上清中のマウス IFN- α の濃度を IFN- α ELISA Kit (PBL Assay Science) により測定した。CpG DNA 単独の刺激によるデータと各データを比較したときの統計学的有意性は、two-tailed Student's *t* 検定により決定し、*p* 値が 0.05 以下のものを有意差があるとした (**p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.005)。DNA1585 (ggGGTCAACGTTGAgggggg, 二重鎖を形成している部分を下線で示した) は、小文字で示した部分は PS 骨格、大文字で示した部分は PO 骨格のものを用いた (Fasmac に合成を依頼)。

本項の結果は、3.1.12 項および図 30 に示した。

2.1.13. ウェスタンブロッティング

12 ウェル 平底プレート (Thermo Scientific) に播種した 1×10^6 個の BM-MCs を, 15 分間あるいは 30 分間, 各種 DNA により刺激した。CpG DNA (AGGCGTTTTT) および 5'-xCx DNA (TCGCCC) は 2.1.10 項と同じものを用い, DNA1668 (TCCATGACGTTTCCTGATGCT, 20 塩基) は, すべて PS 骨格のものを用いた。PBS で洗浄後, BM-MCs を 50 mM Tris-HCl pH7.5, 10%グリセロール, 1% SDS により可溶化した。室温で 10 分間インキュベート後, SDS-PAGE で分離し, ウェスタンブロッティングを行った。一次抗体に用いたモノクローナル抗体 (monoclonal antibody, mAb) は CanGetSignals Solution 1 (TOYOBO) で希釈し使用した。抗 phospho p65 mAb (clone: 93H1), 抗 phospho JNK mAb (clone: 81E11), 抗 phospho Erk1/2 mAb (clone: D13.14.4E), 抗 phospho p38 mAb (clone: D3F9) は Cell Signaling Technology より購入した。二次抗体には, ヤギ抗マウス IgG-HRP (Santa Cruz) および proA-HRP (GE Healthcare) を CanGetSignals Solution 2 (TOYOBO) で希釈して使用した。

本項の結果は, 3.1.12 項および図 29 に記した。

2.2. マウス TLR9 活性化型二量体の構造解析

2.2.1. 結晶化用マウス TLR9 サンプル (糖鎖結合部位変異) の調製

マウス由来の TLR9 には 13 箇所の *N* 型糖鎖結合可能部位がある (図 8)。マウス TLR9 は EndoH_f による糖鎖の短縮により沈殿を生じ精製が困難であったため, 糖鎖結合可能部位のアミノ酸に変異を導入することで糖鎖修飾を阻害した。表 3 にまとめたプライマーを使用して, 4 箇所の糖鎖結合可能部位 (N325Q, N495Q, N514Q, N670Q) に変異を導入した。2.1.1 項で作製したマウス TLR9 野生型の pMT/BiP/V5-His B 発現ベクターを鋳型として, 2.1.5 項と同様に変異体を作製した。変異を 1 箇所導入したベクターを鋳型にして 2 箇所目の変異を導入し, 最終的に 4 箇所の変異を導入したベクターを作製した。作製したマウス TLR9 糖鎖結合部位変異体の発現用のベクターを用いて, 2.1.2 項に従って安定発現株を作製し, 2.1.3 項に従って性状解析用のサンプル調製を行った³²。

表 3. マウス TLR9 の *N* 型糖鎖結合部位変異体を作製するためのプライマー

	forward	reverse
N325Q	AGCATCCAGCACACGAATGCCTTTCAG	CGTGTGCTGGATGCTCTCGTACAGGAA
N495Q	TTCGTGCAGCTGTCGCGCCTGCAGTGC	CGACAGCTGCACGAACATCTCGGGCTT
N514Q	GCCGTGCAGGGCTCGCAGTTTCTGCCG	CGAGCCCTGCACGGCCTGGGCAATACT
N670Q	TTCTTTCAGTGGACCAGCCTGTCTTC	GGTCCACTGAAAGAAGCTCAGATAGTT

2.2.2. マウス TLR9 CpG DNA 結合部位変異体の作製

マウス TLR9 における CpG DNA 認識に関わる残基の二量体化への寄与を確認するために、性状解析用および NF- κ B レポーターアッセイ用の CpG DNA 結合部位変異体をそれぞれ作製した。

2.1.1 項で作製した野生型マウス TLR9 の細胞外ドメインを導入した pMT/BiP/V5-His B ベクターを鋳型として、PCR 反応により変異を導入し、計 3 個の CpG DNA 結合部位変異体 (I643A, A667A, I643A/S667A) を作製した。変異導入に使用したプライマーは表 4 にまとめた。変異体の作製は 2.1.5 項と同様に行った。作製したマウス TLR9 の CpG DNA 結合部位変異体ベクターを用いて 2.1.2 項に従って安定発現株を作製し、2.1.5 項に示したマウス TLR9 5'-TCG DNA 結合部位変異体の性状解析用のサンプルと同様に調製した。

表 4. マウス TLR9 の CpG DNA 結合部位変異体を作製するためのプライマー

	forward	reverse
I643A	CTGCATGCTCTGCGCCACAGAACCTG	GCGCAGAGCATGCAGATTGTTCTGGGA
S667A	TATCTGGCTTTCTTTAATTGGACCAGC	AAAGAAAGCCAGATAGTTGTCTCGCGCAG

HEK293T 細胞での NF- κ B レポーターアッセイ (2.2.6 項参照) のために、CpG DNA 結合部位の残基を該当するヒト TLR9 の残基に置換した変異体を作製した。2.1.10 項で用いた野生型のマウス TLR9 の cDNA を導入した pMX-puro-IRES-ratCD2 ベクターを鋳型として、PCR 反応により変異を導入した。計 5 個の CpG DNA 結合部位変異体 (L106M, S109P, I643T, S667A, I643T/S667A) を作製した。変異導入に使用したプライマーは表 5 にまとめた。変異体の作製は 2.1.5 項および前段と同様に行った。

表 5. NF- κ B レポーターアッセイ用のマウス TLR9 の CpG DNA 結合部位変異体を作製するためのプライマー

	forward	reverse
L106M	AGCCCCATGCACTTCTCTTGCCACATG	GAAGTGCATGGGGCTAAGGCCAGTGGG
S109P	CACTTCCCTTGCCACATGACCATTGAG	GTGGCAAGGGAAGTGCAGGGGGCTAAG
I643T	CTGCATACTCTCCGGCCCCAGAACCTT	CCGGAGAGTATGCAGGTTATTTTGAGA
S667A	TACCTAGCTTTCTTTAACTGGACCAGT	AAAGAAAGCTAGGTAGTTGTCTCGGAG

2.2.3. ゲル濾過クロマトグラフィー

2.2.2 項で作製したマウス TLR9 の CpG DNA 結合部位変異体の DNA 結合能を調べるため、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。

カラムは Superdex 200 Increase 10/300 (CV = 24 mL) 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 1 mL/min で行った。CpG DNA および 5'-TCG DNA にはそれぞれ AGGCGTTTTT 配列および TCGCCC 配列の DNA を用いた。マウス TLR9 は 1 μ M とし、2 μ M の CpG DNA と 5'-TCG DNA を混合した (モル比 2 倍)。サンプルはそれぞれ 200 μ L をアプライし、A₂₈₀を検出した。いずれの DNA も 2.1.6 項と同じものを用いた。

本項の結果は、3.2.5 項および図 40 に記した。

2.2.4. 結晶化

マウス TLR9 の活性化型二量体の構造を明らかにするために、CpG DNA および 5'-TCG DNA との共結晶化を行った。マウス TLR9 は 2.2.1 項に従って調製した結晶化用サンプルを用いて、6 mg/mL マウス TLR9 と 66 μ M CpG DNA (AGGCGTTTTT) と 66 μ M 5'-xCx DNA (TCGCCA) を混合し、結晶化サンプルとした。バッファーは 10 mM Tris-HCl pH7.5, 0.5 M NaCl を用いた。

リザーバー溶液として 20% (w/v) polyethylene glycol (PEG) 4000 (Hampton Research), 0.15 M Ammonium sulfate (nacalai tesque), 0.1 M HEPES-NaOH pH 7.0 (Hampton Research) を用い、結晶化サンプル:リザーバー溶液 = 0.2 μ L:0.2 μ L で混合し、シッティングドロップ蒸気拡散法で 293 K 下で結晶化を行った。結晶化プレートは Intelli-Plate 96-2 shallow well (Hampton Research) を用いた。

2.2.5. X 線結晶構造解析

CpG DNA/5'-xCxDNA 結合型マウス TLR9 の結晶の回折強度データセット収集は、SPRING-8 BL41XU (兵庫) で行った。検出器は PILATUS3 6M (DECTRIS) を使用した。

結晶は不凍液 (20% (w/v) PEG 4000, 0.15 M ammonium sulfate, 0.1 M HEPES-NaOH pH 7.0, 0.35 M NaCl, 20% (v/v) ethyleneglycol (nacalai tesque)) に浸漬後、CryoLoop を用いて液体窒素で急速凍結後、窒素ガスによるクライオストリーム条件下 (100 K) で波長 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 1 個の結晶を使用し、振動角を 0.25°/frame とし、露光時間 0.25 秒で 1440 枚のデータを収集した。

回折強度データセットは XDS⁷²により回折データから指数付けと積分処理を行った。リガンド非結合型マウス TLR9 の結晶構造 (PDB ID: 3WPF)³² をモデル構造として用い、Molrep プログラム⁷³による分子置換法により初期位相を決定した。COOT⁷⁴によるモデリングと REFMAC プログラム⁷⁵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。本論文中で用いた構造の図は、CueMol (<http://www.cuemol.org/>; 図 38, 図 39 以外) または PyMOL (<https://pymol.org/>; 図 38, 図 39) を用いて描画した。

本項の結果は、3.2.1–3.2.4 項および表 9, 図 34–図 39 に記した。

2.2.6. NF- κ B レポーターアッセイ

2.2.2 項において作製したマウス TLR9 の CpG DNA 結合部位変異体を用いて、HEK293T 細胞を用いたレポーターアッセイを行った。

2.1.10 項に記載した pNL3.2.NF- κ B-RE [NlucP/NF- κ B-RE/Hygro] ベクターの代わりに pELAM1-luc reporter ベクターを用い、その他の手法は 2.1.10 項と同様に行った。TLR9 の刺激は、TCGT³CGT¹⁵ 配列⁷⁰ の DNA により行った。

野生型のマウス TLR9 のデータと各変異体のデータを比較したときの統計学的有意性は、two-tailed Student's t 検定により決定し、 p 値が 0.05 以下のものを有意差があるとした ($*p < 0.05$)。

本項の結果は、3.2.6 項および図 41 に記した。

2.2.7. X 線小角散乱

CpG DNA 単独でのマウス TLR9 の活性化型二量体の構造情報を得るために、X 線小角散乱法による解析を行った。測定する分子の単分散度を向上させるために、ゲル濾過カラムから溶出する分離したサンプル画分に X 線を照射する SEC-SAXS 法 (Size-exclusion chromatography coupled with small-angle X-ray scattering) で測定を行った。SEC-SAXS データ測定は PF BL10C (茨城) において行った。

56 μ M の TLR9 に対して 84 μ M の各種 DNA (モル比 1.5 倍) を混合し、全量 200 μ L に調製した。カラムは Superdex 200 Increase 10/300 GL (CV = 24 mL) を用い、バッファーは 10 mM MES-NaOH pH5.5, 0.15 M NaCl を用いた。SAXS データ測定中は流速 0.025 mL/min とし、ゲル濾過クロマトグラフィーの溶出液に対して 293 K 条件下で波長 1.000 Å の X 線を照射し、SAXS 測定を行った。検出器は PILATUS 2M (Dectris) を使用し、サンプルと検出器間の距離は 2.0 m に設定した。各 SAXS データは、SAngher プログラム⁷⁶を用いて、円周平均化、バックグラウンド差し引き、データ平均化を行い、 q ($q = 4\pi \sin\theta/\lambda$, 2θ は散乱角を、 λ は波長を表す) の関数として一次元散乱データ $I(q)$ を得た。

本項の結果は、3.2.7 項および図 42 に記した。

3. 結果

3.1. 2 種類の DNA による TLR9 の活性化機構

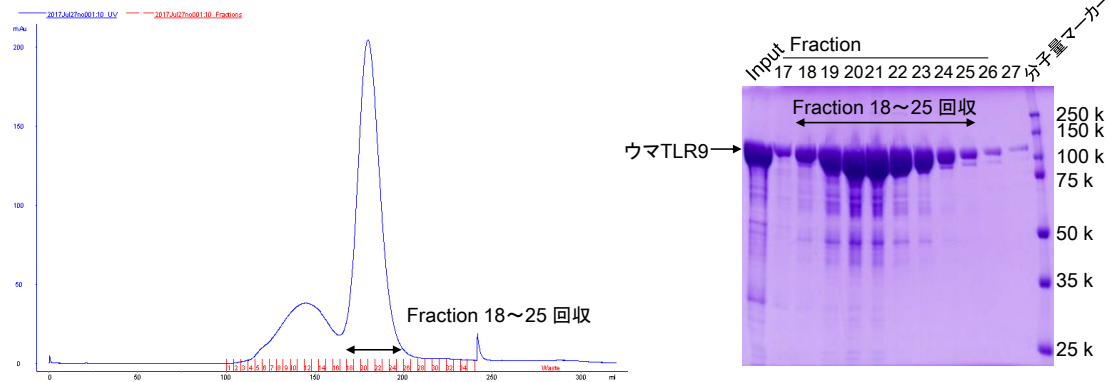
3.1.1. TLR9 サンプルの調製

2.1.2 項および 2.1.4 項に従い、各種 TLR9 の性状解析用および結晶化用サンプルの精製を行った。代表的な例として、ウマ TLR9 の精製結果を図 9, 図 10 に示した。ウシおよびマウス TLR9 においても基本的に同様の結果だったため、ウマ TLR9 の精製結果のみを示す。

培養上清を回収し、IgG アフィニティークロマトグラフィー精製後、溶出液を濃縮した。結晶化用サンプルのみ Endo H_f 処理を行い、ゲル濾過クロマトグラフィー後、TLR9 単量体のピークを回収した。得られた画分を V8 プロテアーゼ処理し、protein A タグと Z-loop の切断を行った。その後陽イオン交換クロマトグラフィーを行い、ウマ TLR9 では、性状解析用と結晶化用のいずれにおいても培養液 1 L から 0.6 mg の精製タンパク質が得られた。またウシ TLR9 では、性状解析用と結晶化用のいずれも培養液 1 L から 3.4 mg, マウス TLR9 の性状解析用サンプルは培養液 1 L から 0.9 mg の精製タンパク質が得られた。各種 TLR9 の最終精製サンプルの SDS-PAGE の結果を図 11 に示した。

また、TLR9 の 5'-TCG DNA との結合に重要な残基を調べるために、マウス TLR9 の 5'-TCG DNA 結合部位変異体を精製した。精製方法は 2.1.3 項に従い、性状解析用サンプルと同様に行った。マウス TLR9 5'-TCG DNA 結合部位変異体として F375A, F402A, D535A, Y537A 変異体を調製した結果、それぞれ培養液 1 L から 0.7 mg, 4.7 mg, 2.2 mg, 4.3 mg の精製タンパク質が得られた。

A キフネンシン (-), ゲル濾過クロマトグラフィー



B キフネンシン (-), 陽イオン交換クロマトグラフィー

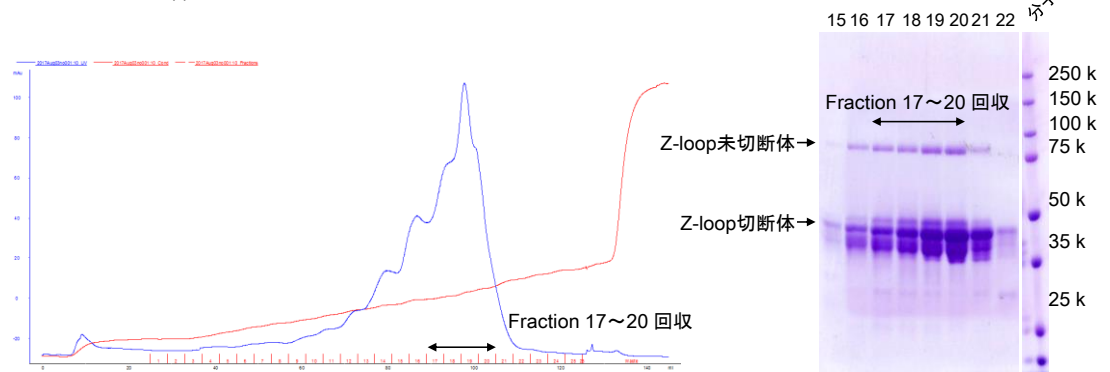
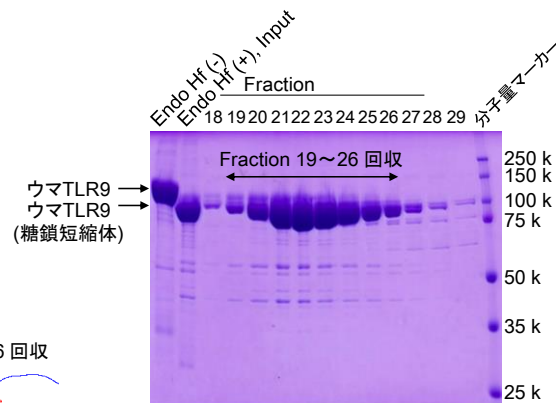
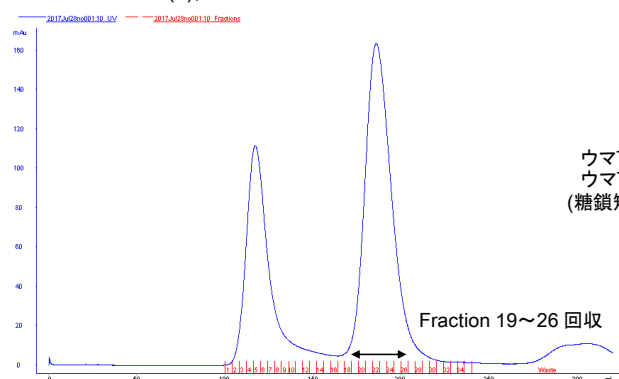


図 9. 性状解析用ウマ TLR9 の精製過程

性状解析用ウマ TLR9 の精製過程の各チャートおよび対応する SDS-PAGE。(A) IgG アフィニティークロマトグラフィー溶出液のゲル濾過クロマトグラフィー。(B) V8 プロテアーゼ処理後サンプルの陽イオン交換クロマトグラフィー。

A キフネンシン (+), ゲル濾過クロマトグラフィー



B キフネンシン (+), 陽イオン交換クロマトグラフィー

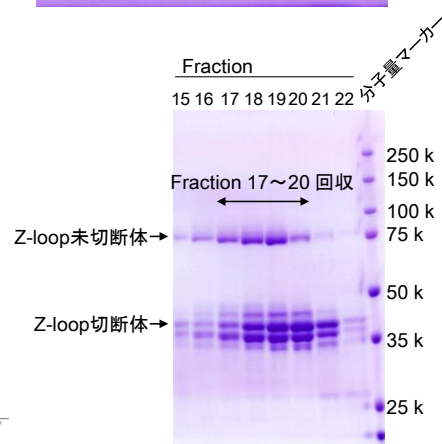
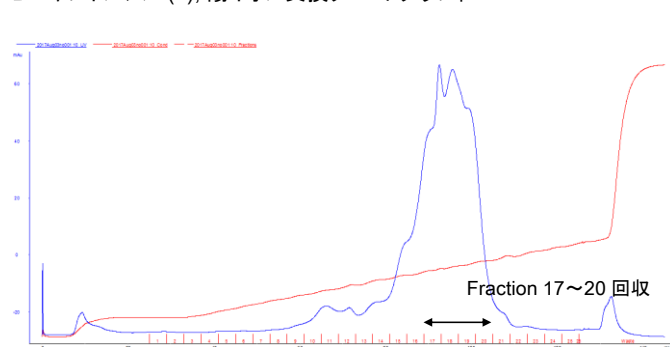


図 10. 結晶化用ウマ TLR9 の精製過程

結晶化用ウマ TLR9 の精製過程の各チャートおよび対応する SDS-PAGE。(A) EndoH_f 処理サンプルのゲル濾過クロマトグラフィー。(B) V8 プロテアーゼ処理サンプルの陽イオン交換クロマトグラフィー。

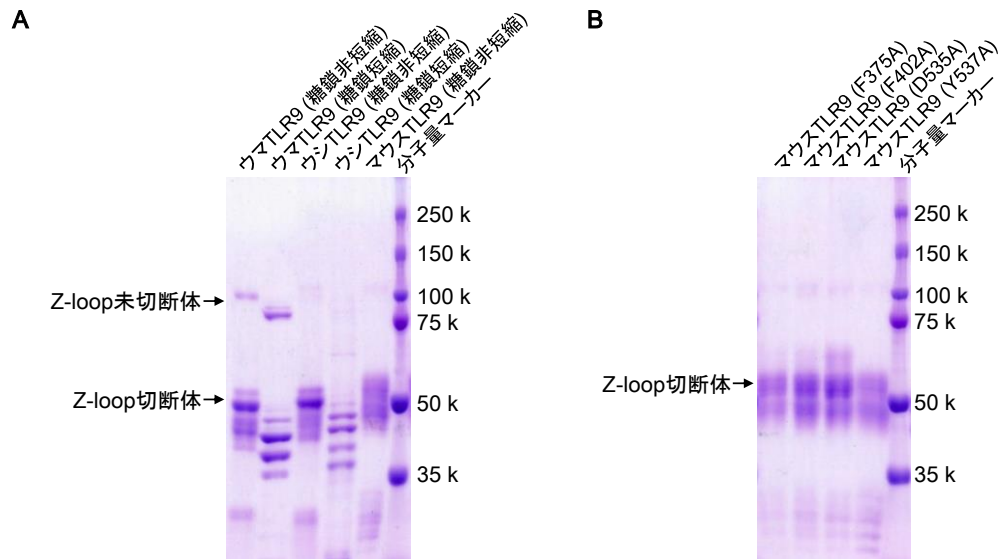


図 11. TLR9 精製サンプルの SDS-PAGE

各種 TLR9 精製サンプルの SDS-PAGE。(A) 性状解析用ウマ TLR9 (糖鎖非短縮), 結晶化用ウマ TLR9 (糖鎖短縮), 性状解析用ウシ TLR9 (糖鎖非短縮), 結晶化用ウシ TLR9 (糖鎖短縮), 性状解析用マウス TLR9 (糖鎖非短縮)。(B) 性状解析用マウス TLR9 5'-TCG DNA 結合部位変異体 4 種 (糖鎖非短縮)。

3.1.2. 各 DNA と TLR9 の結合親和性

2.1.6 項に従い、性状解析用 TLR9 に対する CpG DNA および 5'-TCG DNA の結合親和性を、ITC を用いて測定した (図 12)。

まず CpG DNA として使用する DNA の配列を決定するために、10 塩基の AGGCGTTTTT, AGACGTTTTT, AGTCGTTTTT の 3 種類の CpG DNA を用いて、ITC を行った。ウマ、ウシ、マウス TLR9 に対する 3 種類の CpG DNA の K_d を比較したところ、AGACGTTTTT 配列の CpG DNA において最も強い結合が確認された (ウマ、ウシ、マウス TLR9 においてそれぞれ $K_d = 50$ nM, 140 nM, 14 nM)。しかし、DNA の希釈熱 (図 12, 中央列のパネル, 7 滴定目以降に観測される熱量) が他の CpG DNA と比較して大きかったため、AGACGTTTTT は除外し、これ以外で最も結合の強かった AGGCGTTTTT (ウマ、ウシ、マウス TLR9 においてそれぞれ $K_d = 97$ nM, 320 nM, 21 nM) を CpG DNA として選択し、以降の実験に用いることにした。

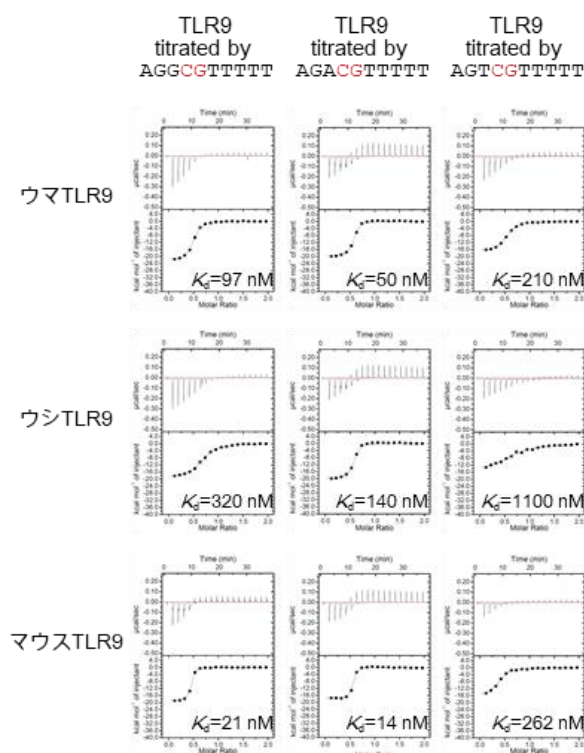


図 12. ITC による TLR9 と CpG DNA との結合

ウマ (上段), ウシ (中段), マウス (下段) 由来の TLR9 に対して、異なる配列の 3 種類の CpG DNA AGGCGTTTTT (左列), AGACGTTTTT (中央列), AGTCGTTTTT (右列) を滴定した結果。算出された K_d 値は図中に示した (表 6 参照)。

5'-TCG DNA として、6 塩基の TCGCCC 配列の DNA を用いた。5'-TCG DNA を TLR9 に対して滴定したところ、いずれの TLR9 においても熱の出入りが観測されなかったため、5'-TCG DNA は単独では TLR9 に結合しないと判断した (図 13, 中央列のパネル)。

CpG DNA と 5'-TCG DNA の TLR9 に対する協調効果を ITC により確認した。CpG DNA 共存下の TLR9 に対して 5'-TCG DNA を滴定した結果、解離定数はそれぞれ $K_d = 21 \text{ nM}$, 44 nM , 7.2 nM と求められ、非常に強い結合が確認された (図 13, 右列のパネル)。

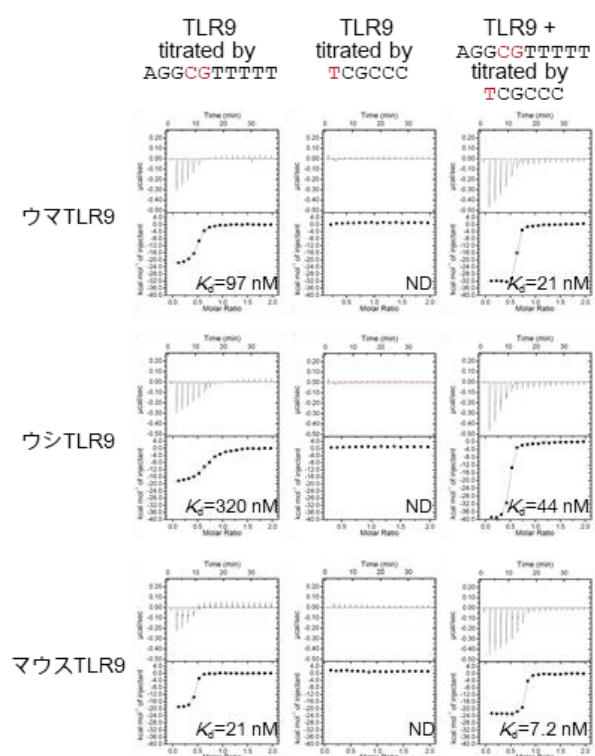


図 13. ITC による TLR9 と各 DNA との結合

CpG DNA 単独 (左列), 5'-TCG DNA 単独 (中央列), CpG DNA 存在下で 5'-TCG DNA (右列) をウマ (上段), ウシ(中段), マウス (下段) 由来の TLR9 に滴定した結果。算出された K_d 値は図中に示した (表 6 参照)。

3.1.3. 2 種類の DNA による TLR9 の二量体化

2.1.7 項に従い、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて、性状解析用のウマ、ウシ、マウス由来の TLR9 に対する各 DNA の結合能および DNA 結合に伴う TLR9 の二量体化を調べた。

いずれの種の TLR9 も、DNA 非存在下においては単量体と思われる位置に溶出していた (図 14)。CpG DNA (AGGCGTTTTT) 存在下においては、ウマおよびウシ TLR9 は単量体とほぼ同じ位置に溶出していたが、 A_{260} と A_{280} の比 (A_{260}/A_{280}) が DNA 非存在下ではそれぞれ 0.63 および 0.67 であったのに対し、CpG DNA 存在下では 0.91 と 0.84 まで上昇したことから、TLR9 に CpG DNA が結合していると判断した。マウス TLR9 はウマおよびウシ TLR9 と異なり、CpG DNA 単独でも二量体を形成していた。5'-TCG DNA (TCGCCC) 存在下においては、いずれの TLR9 も DNA 非存在下の TLR9 とほぼ同じ位置に溶出し、 A_{260}/A_{280} の値もほとんど変わらなかったことから、5'-TCG DNA は単独では TLR9 に結合しないと判断した。しかし、CpG DNA と 5'-TCG DNA が同時に存在するとき、TLR9 のメインピークは 12 分付近にシフトし、CpG DNA 単独の場合と比較して A_{260}/A_{280} の値が上昇した (ウマ、ウシ、マウス TLR9 においてそれぞれ TLR9+CpG DNA: 0.91, 0.84, 1.04, TLR9+CpG DNA+5'-TCG DNA: 1.06, 1.10, 1.09)。このことから、CpG DNA と 5'-TCG DNA が同時に TLR9 に結合し、二量体化を促進したと考えられた。マウス TLR9 は、CpG DNA 単独でも、CpG DNA と 5'-TCG DNA の共存下においても二量体を形成していたが、CpG DNA 単独の場合と比較して A_{260}/A_{280} の値が上昇していたため (マウス TLR9+CpG DNA: 1.04, マウス TLR9+CpG DNA+5'-TCG DNA: 1.09), CpG DNA と 5'-TCG DNA が同時にマウス TLR9 に結合していると考えられた。

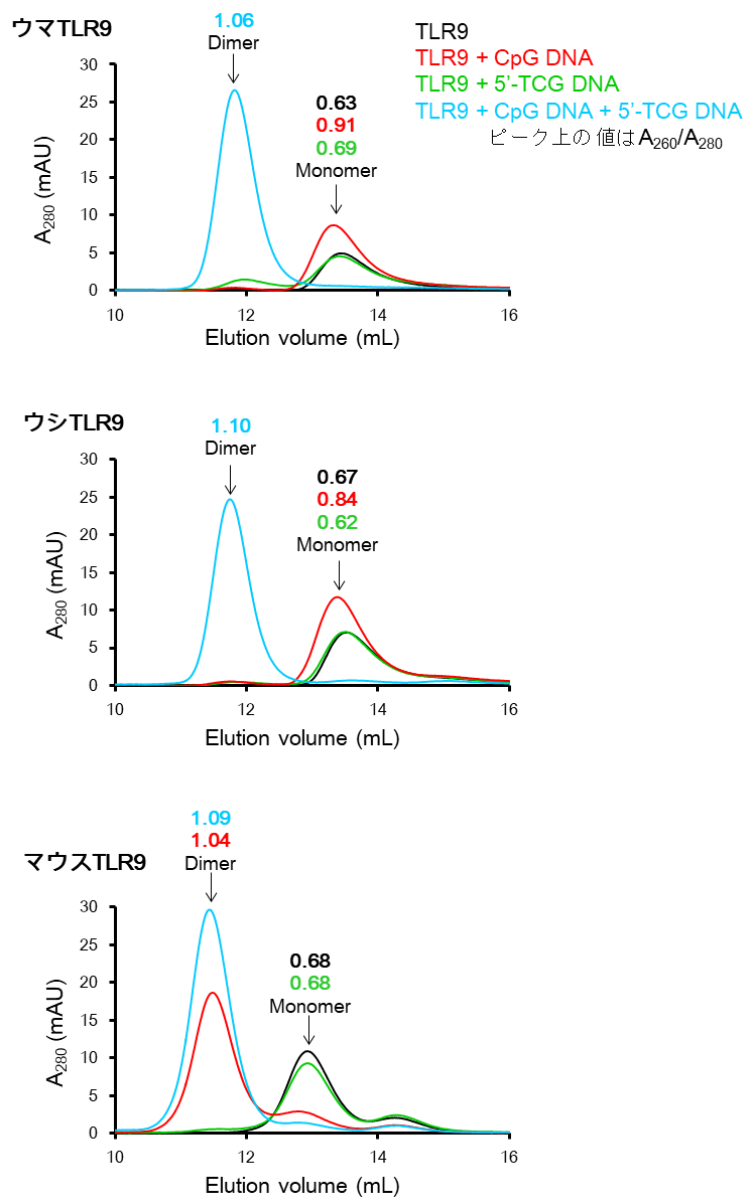


図 14. ゲル濾過クロマトグラフィーによる TLR9 と各 DNA との結合

TLR9 のみ (黒), CpG DNA 共存下 (橙), 5'-TCG DNA 共存下 (緑), CpG DNA および 5'-TCG DNA 共存下 (青) のウマ (上段), ウシ (中段), マウス (下段) 由来の TLR9 のゲル濾過クロマトグラフィーの結果。ピーク上の数値は, 対応する色のクロマトグラムの A_{260}/A_{280} を表記している。

3.1.4. 5'-TCG DNA の配列特異性 (ITC)

2.1.6 項に従い, ITC により 5'-TCG DNA の配列特異性を調べた。5'-TCG DNA (TCGCCC) の 5'末端側の 3 つの塩基を置換した DNA を用い, CpG DNA (AGGCGTTTTT) 存在下での TLR9 との結合を ITC により確認した (図 15, 表 6)。測定には性状解析用の TLR9 を用いた。

まず, 1 番目の塩基のチミジン¹を置換した 5'-TCG DNA を用いて測定を行った。その結果, アデニンに置換した 5'-TCG DNA (ACGCCC) においては, 若干の結合親和性の低下が見られた。しかし, シトシンおよびグアニンへの置換 (CCGCCC, GCGCCC) は結合親和性にほとんど影響を与えなかった。次に, 2 番目の塩基のシトシンを置換した 5'-TCG DNA を用いて測定を行った。2 番目の塩基のシトシンは, 他のいずれの塩基に置換した場合も ITC において熱の出入りが観測されなかったため, TLR9 に対する結合が著しく低下したと判断した。3 番目の塩基のグアニンは, 他のいずれの塩基に置換した場合も元の 5'-TCG DNA の K_d とほとんど変わりがなかったことから, 3 番目の塩基の置換は TLR9 との結合に影響がないと考えられた。

5'-TCG DNA の 2 番目の位置のシトシン塩基が重要であることを確かめるために, さらに配列を変化させた 5'-TCG DNA を用いて, ITC による測定を行った。5'-TCG DNA の 2 番目のシトシンと 3 番目のグアニンを反転させた場合 (TGCCCC), また 5'-TCG DNA の 5'末端にリン酸基あるいは塩基を付加した場合 (p-TCGCCC, TTCGCCC) は熱の出入りが観測されず, TLR9 との結合が著しく低下していると考えられた。一方で, 5'-TCG DNA の 3'末端にリン酸基を付加した場合は (TCGCCC-p), 結合親和性に影響が見られなかった。以上の結果は, CpG DNA 存在下の TLR9 に対して, 5'末端から 2 番目の位置の塩基がシトシンである DNA が結合することを強く示唆している。このため, TLR9 の第二の DNA 結合部位の配列特異性は 5'-xCx であると結論付けた。今後本論文では, TLR9 の第二の DNA 結合部位に結合する DNA を 5'-xCx DNA と表記する。

CpG DNA である DNA1668_12mer (CATGACGTTAAT) は TLR9 に強く結合するが ($K_d = 20$ nM), CpG モチーフのシトシンとグアニンを逆転させると結合が著しく低下することが分かっている (CATGAGCTTAAT, $K_d = 570$ nM)³²。そこで, 本研究においても CpG DNA の CpG モチーフを反転させた DNA を用いて (AGGGCTTTTT), TLR9 との共存下で 5'-xCx DNA を滴定したところ, 熱の出入りが観測されなかった。これは, CpG モチーフの反転により, CpG DNA が TLR9 に結合しなくなり, TLR9 の CpG DNA 結合部位が占有されなかったため, 5'-xCx DNA も TLR9 に結合できなかったものと考えられる。また, TLR9 の認識配列は非メチル化 CpG モチーフであり, DNA1668_12mer の CpG モチーフのシトシン塩基をメチル化すると結合親和性が減弱することが分かっている (CATGAC(met)GTTAAT, $K_d = 50$ nM)³²。そこで, 5'-xCx DNA のシトシンのメチル化が TLR9 との結合に影響を及ぼすかどうかを調べるために, 5'-xCx DNA の 2

番目のシトシンをメチル化し (TC(met)GCCC), CpG DNA 存在下の TLR9 に対して滴定を行った。その結果, 2 番目のシトシンのメチル化によって, いずれの種においても大幅な結合の減弱が確認された。



図 15. ITC による 5'-TCG DNA の配列特異性

CpG DNA 存在下のウマ (上段), ウシ(中段), マウス (下段) 由来の TLR9 に, 5'-TCG DNA の配列置換体を滴定した結果。算出された K_d 値は図中に示した (表 6 参照)。

表 6. ITC による TLR9 と各 DNA との K_d 値

Titrant	Cell	K_d (nM)		
		ウマ TLR9	ウシ TLR9	マウス TLR9
AGG <u>C</u> GTTTT	TLR9	97	320	21
AGAC <u>G</u> TTTT	TLR9	50	140	14
AGTC <u>G</u> TTTT	TLR9	210	1100	262
<u>I</u> CGCCC	TLR9	ND	ND	ND
<u>I</u> CGCCC	TLR9 + AGG <u>C</u> GTTTT	21	44	7.2
<u>A</u> CGCCC	TLR9 + AGG <u>C</u> GTTTT	352	330	210
<u>C</u> CGCCC	TLR9 + AGG <u>C</u> GTTTT	20	32	120
<u>G</u> CGCCC	TLR9 + AGG <u>C</u> GTTTT	34	45	12
T <u>A</u> GCCC	TLR9 + AGG <u>C</u> GTTTT	ND	ND	ND
T <u>I</u> GCCC	TLR9 + AGG <u>C</u> GTTTT	ND	ND	ND
T <u>G</u> GCCC	TLR9 + AGG <u>C</u> GTTTT	ND	ND	ND
TC <u>A</u> CCC	TLR9 + AGG <u>C</u> GTTTT	39	160	11
TC <u>I</u> CCC	TLR9 + AGG <u>C</u> GTTTT	19	5.1	6.4
TC <u>C</u> CCC	TLR9 + AGG <u>C</u> GTTTT	40	15	12
T <u>G</u> CCCC	TLR9 + AGG <u>C</u> GTTTT	ND	ND	ND
TC(<u>met</u>)GCCC	TLR9 + AGG <u>C</u> GTTTT	1900	89	400
TCGCCC	TLR9 + AGGGCTTTTT	ND	ND	ND
p-TCGCCC	TLR9 + AGG <u>C</u> GTTTT	ND	ND	ND
TCGCCC-p	TLR9 + AGG <u>C</u> GTTTT	12	17	6.9
TTCGCCC	TLR9 + AGG <u>C</u> GTTTT	ND	ND	ND

図 12, 図 13, 図 15 の ITC により算出された K_d 値を示した。それぞれの結果は, 1 回の測定で得られた結果を示している。ND: Not determined.

3.1.5. 5'-xCx DNA の配列特異性 (ゲル濾過クロマトグラフィー)

2.1.7 項に従い, 5'-xCx DNA (TCGCCC) の 5'末端側の 3 つの塩基の置換が, CpG DNA (AGGCGTTTTT) 共存下での TLR9 の二量体化に及ぼす影響を, ゲル濾過クロマトグラフィーにより確認した。測定には性状解析用の TLR9 を用いた。

その結果, 1 番目と 3 番目の塩基を置換した 5'-xCx DNA は, 元の配列の 5'-xCx DNA と同様に, CpG DNA 存在下で TLR9 ピークの高分子量側へのシフトが観察され, 二量体化を促進していると考えられた。2 番目の塩基を置換した 5'-xCx DNA は, DNA 非存在下の TLR9 と同じ位置に溶出しており, TLR9 に結合していないと考えられた。さらに, 5'-xCx DNA の 2 番目のシトシンと 3 番目のグアニンを反転すると (TGCCCC), 二量体化は観察されなかったことから, 結合していないと考えられた。また, 5'末端から 2 番目の位置のシトシンをメチル化した場合 (TC(met)GCCC), 元の配列の TCGCCC と比較して二量体成分が減少したことから, 結合が減弱したと考えられた。3.1.4 項と本項の結果から, CpG DNA 存在下の TLR9 に対する 5'-xCx DNA の結合親和性の強さと, TLR9 の二量体形成能は連動するものだということが分かった。ただし, マウス TLR9 は CpG DNA 単独でも二量体化を引き起こすため, 5'-xCx DNA による TLR9 の二量体化と TLR9 に対する結合親和性を連動させて考えることはできない。

3.1.4 項および本項の ITC とゲル濾過クロマトグラフィーの結果をまとめると, 5'末端から 2 番目の位置に非メチル化シトシン塩基をもつ DNA が, CpG DNA 共存下で TLR9 に強固に結合し, TLR9 の二量体化を促進するということが明らかになった。

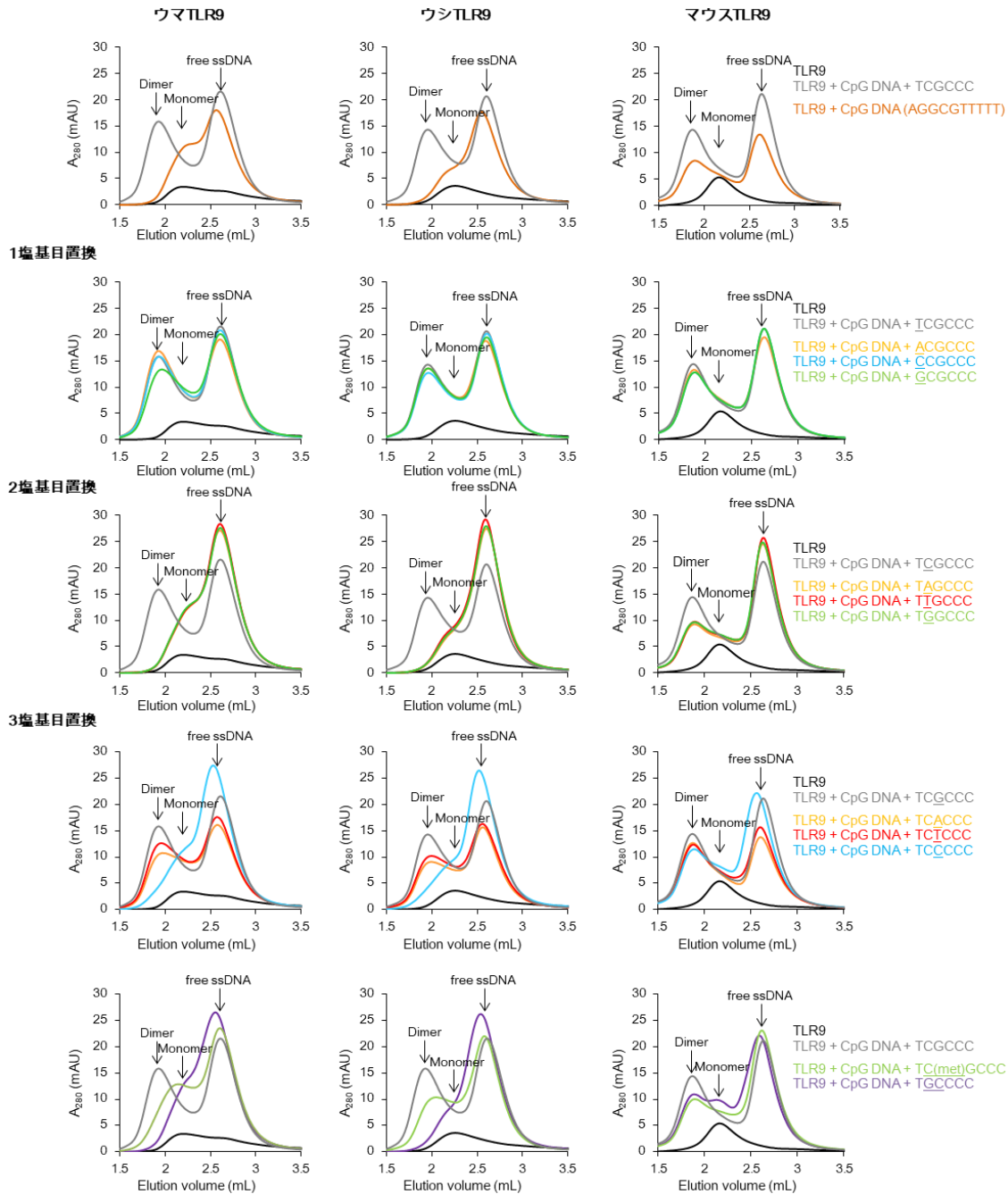


図 16. ゲル濾過クロマトグラフィーによる 5'-xCx DNA の配列特異性

各種 DNA とウマ (上段), ウシ(中段), マウス (下段) 由来の TLR9 のゲル濾過クロマトグラフィーの結果。対照として, すべてのパネルに TLR9 のみ (黒), CpG DNA 共存下 (橙), CpG DNA および 5'-xCx DNA 共存下 (灰色) のクロマトグラムを示した。5'-xCx DNA の 1 番目の塩基の置換 (2 段目), 2 番目の塩基の置換 (3 段目), 3 番目の塩基の置換 (4 段目), 2 番目のシトシンをメチル化したものおよび C2-G3 を逆転させたもの (5 段目) のデータを示した。

3.1.6. 結晶化と構造決定

2.1.8 項に従い、ウマおよびウシ由来の結晶化用 TLR9 を使用し、CpG DNA (AGGCGTTTTT) と 5'-xCx DNA との共結晶化を行った。ITC とゲル濾過クロマトグラフィーによる結合実験の結果、5'-xCx DNA の 1 番目と 3 番目はいずれの塩基の場合も TLR9 と結合したため (図 15, 図 16, 表 6), それぞれを他の塩基に置換した数種類の 5'-xCx DNA を用いて結晶化スクリーニングを行った。また、4-6 番目の配列は TLR9 との結合に寄与しないと考えられたため、結晶化の成功率を上げる目的で、4-6 塩基目をさまざまな配列に変化させた 10 種類以上の 5'-xCx DNA を用いて結晶化スクリーニングを行った。その結果、下記の 4 つの複合体の構造解析に成功した。

- (1) CpG DNA/5'-xCx1 DNA (TCGCAC) 結合型ウマ TLR9 (PDB: 5Y3J, 図 17)
- (2) CpG DNA/5'-xCx2 DNA (GCGCAC) 結合型ウマ TLR9 (PDB: 5Y3K)
- (3) CpG DNA/5'-xCx3 DNA (CCGCAC) 結合型ウマ TLR9 (PDB: 5Y3L)
- (4) CpG DNA/5'-xCx4 DNA (TCGTTT) 結合型ウシ TLR9 (PDB: 5Y3M)

それぞれの結晶化条件と結晶学的統計値を表 2 および表 7 に示した。いずれも基本的に同じ構造だったため (図 18), 本論文では主に (1) CpG DNA/5'-xCx DNA (TCGCAC) 結合型ウマ TLR9 (PDB: 5Y3J) の構造について記述する。

いずれの結晶構造中でも単位胞中に TLR9 と CpG DNA と 5'-xCx DNA が 2 分子ずつ観察され、TLR9 は C 末端同士で向かい合った m 字型の二量体を形成していた (図 19)。CpG DNA と 5'-xCx DNA の 2 つの DNA の電子密度は別々の位置に明確に確認できた (図 20)。リガンド非結合型 TLR9 (PDB ID: 3WPB) および CpG DNA (DNA1668_12mer; CATGACGTTAAT) 結合型 TLR9 (PDB ID: 3WPC) と重ね合わせると, root mean square deviation (R.M.S.D.) はそれぞれ 0.8 Å および 0.4 Å だった (図 21)。TLR9 の二量体の構造は、CpG DNA 結合型の 2:2 複合体の構造とよく一致していた。CpG DNA の CpG モチーフ部分は TLR9 の N 末端側に存在する溝に結合しており、2:2 複合体において報告された結合部位と同じ位置に結合していた。一方で、5'-xCx DNA は TLR9 分子の上部の新規の結合部位に結合していた (図 19, 図 21)。

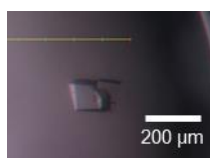


図 17. CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型ウマ TLR9 の結晶の写真

CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型ウマ TLR9 の結晶の写真。CpG DNA として AGGCGTTTTT 配列、5'-xCx DNA として TCGCAC 配列の DNA を用いた。

表 7. CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型 TLR9 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

	ウマ TLR9 AGGCGTTTTT 5'-xCx1: TCGCAC	ウマ TLR9 AGGCGTTTTT 5'-xCx2: GCGCAC	ウマ TLR9 AGGCGTTTTT 5'-xCx3: CCGCAC	ウシ TLR9 AGGCGTTTTT 5'-xCx4: TCGTTT
Data Collection				
Beamline	SPRing-8 BL41XU	SPRing-8 BL41XU	SPRing-8 BL41XU	PF-AR NE3A
Wavelength (Å)	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
Space group	C2	C2	C2	P2 ₁
Unit cell parameters				
<i>a</i> (Å)	109.5	106.9	108.0	88.2
<i>b</i> (Å)	125.2	126.5	125.6	68.7
<i>c</i> (Å)	139.3	140.7	138.7	153.5
β (°)	94.8	98.5	94.7	100.6
Resolution range (Å)	49.4–1.81	47.1–2.7	48.8–2.6	49.0–2.5
Completeness (%)	98.9 (99.1)	98.9 (99.4)	98.6 (98.6)	99.9 (100.0)
Redundancy	3.5 (3.6)	3.5 (3.6)	3.5 (3.5)	5.1 (5.3)
R_{sym} (<i>I</i>) ^b	0.072 (0.697)	0.077 (0.790)	0.072 (0.836)	0.216 (0.973)
Average <i>I</i> / σ (<i>I</i>)	8.6 (1.7)	12.0 (1.7)	13.1 (1.8)	8.0 (1.9)
Refinement				
Resolution (Å)	1.81	2.7	2.6	2.5
No. of reflections used	159,206	47,705	53,074	59,852
Model	TLR9 × 2	TLR9 × 2	TLR9 × 2	TLR9 × 2
	CpG1 DNA × 2 xCx1 DNA × 2	CpG1 DNA × 2 xCx2 DNA × 2	CpG1 DNA × 2 xCx3 DNA × 2	CpG1 DNA × 2 xCx4 DNA × 2
Average <i>B</i> -factor (Å ²)	26.3	62.0	60.3	31.3
<i>R</i> (%) ^c	17.8	20.7	21.1	21.3
R_{free} (%) ^d	20.6	25.3	26.8	25.1
Rms deviations				
Bond length (Å)	0.014	0.010	0.011	0.012
Bond angles (°)	1.68	1.56	1.62	1.74

^a 括弧の中は、最外殻における値を示す。

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

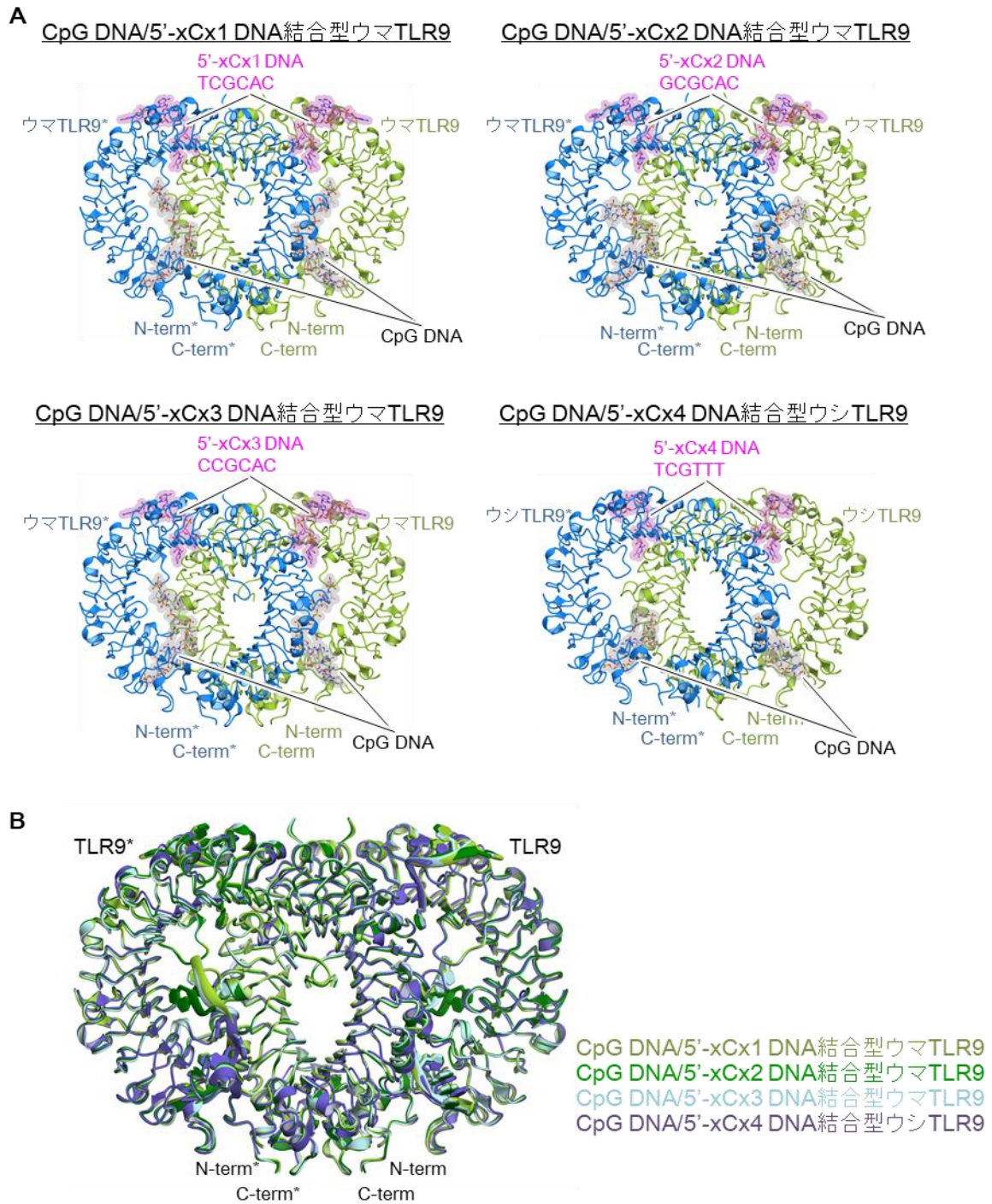


図 18. CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型 TLR9 の構造比較

(A) CpG DNA/5'-xCx DNA1-3 結合型ウマ TLR9 と、CpG DNA/5'-xCx DNA4 結合型ウシ TLR9 の構造の正面図。TLR9 の二量体を形成するプロトマーをそれぞれ緑 (TLR9) と青 (TLR9*) で、CpG DNA を灰色、5'-xCx DNA をマゼンタで示した。(B) (A) に示した 4 つの構造の重ね合わせ。

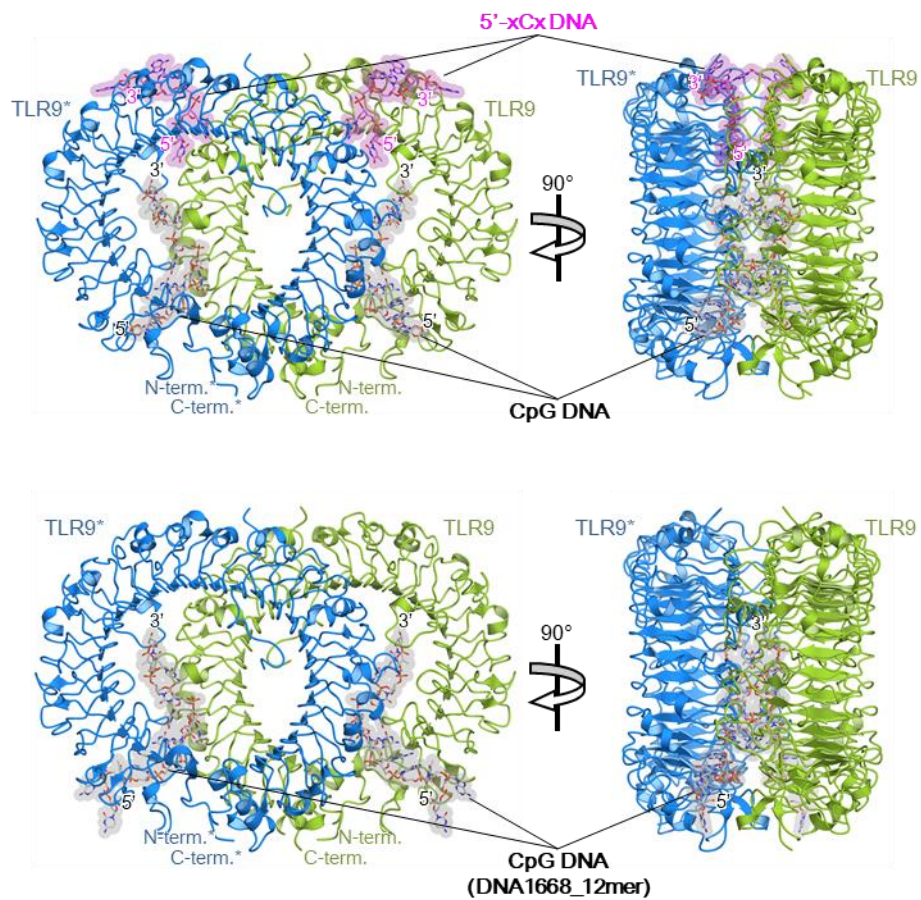


図 19. CpG DNA 結合型, CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型 TLR9 の全体構造

CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型 TLR9 (上, PDB ID: 5Y3J), CpG DNA (DNA1668_12mer) 結合型 TLR9 (下, 3WPC)³² の二量体構造の, 正面図 (左) および側面図 (右)。TLR9 の二量体を形成するプロトマーをそれぞれ緑 (TLR9) と青 (TLR9*) で, CpG DNA を灰色, 5'-xCx DNA をマゼンタで示した。

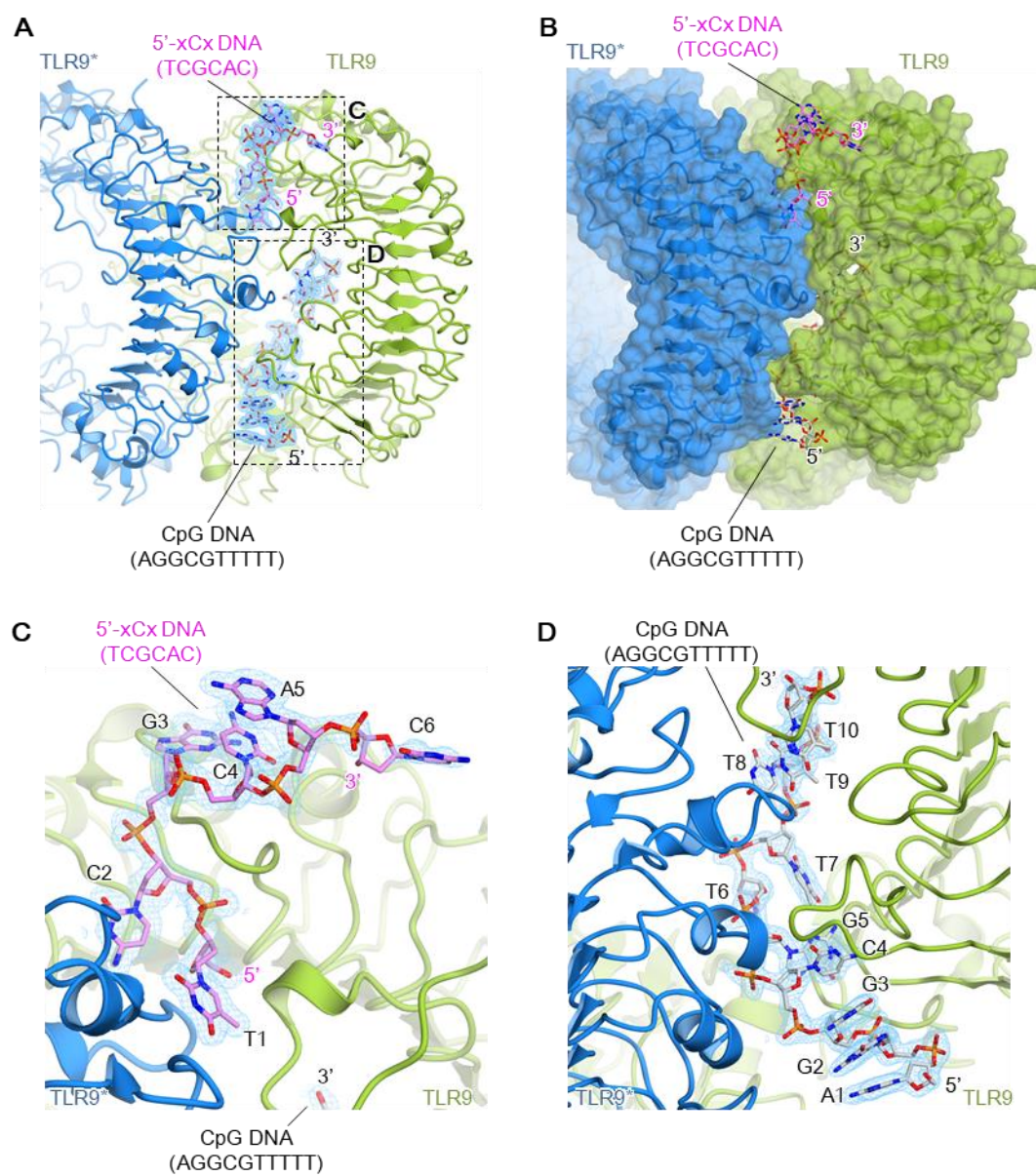


図 20. CpG DNA と 5'-xCx DNA

(A) CpG DNA と 5'-xCx DNA の電子密度を *2Fo-Fc* マップで、 1.5σ で表示した。(B) TLR9 の二量体を構成するプロトマーをリボン図および半透明の表面図で表示した。(C), (D) 5'-xCx DNA および CpG DNA の電子密度。

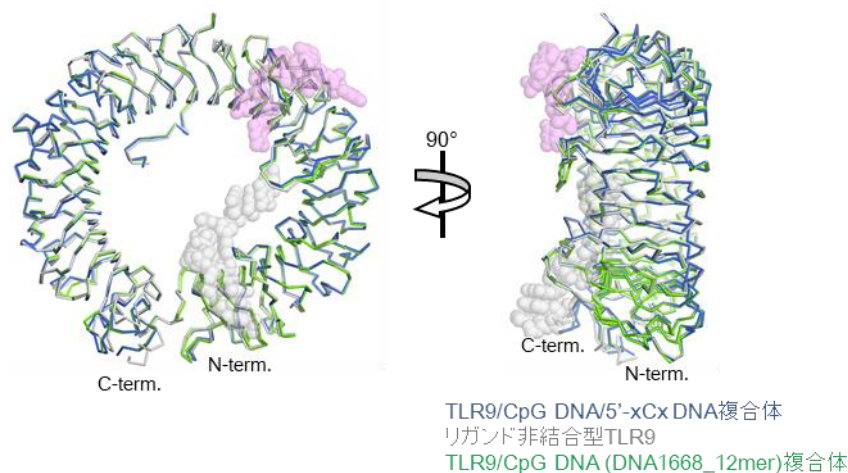


図 21. TLR9 のプロトマーの比較

CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型 TLR9 (青, PDB ID: 5Y3J), リガンド非結合型 TLR9 (灰色, PDB ID: 3WPB)³², CpG DNA 結合型 TLR9 (緑, PDB ID: 3WPC)³² のプロトマーの重ね合わせ。CpG DNA を灰色で, 5'-xCx DNA をマゼンタの半透明の球体で示した。

3.1.7. CpG DNA の認識

結晶化に用いた CpG DNA の配列のうち, 2 番目のグアニンから 6 番目のチミジンまで (AGGCGT~~TT~~TTT) が TLR9 の 6 塩基のコンセンサス配列に相当しており, 主にこの部分が TLR9 の 2 つのプロトマーから認識されていた (図 22)。C4, G5, T7 の 3 つの塩基部分は TLR9 の一方のプロトマーの LRRNT, LRR1, LRR2 で構成される N 末端側の溝に入り込んで特徴的な相互作用を形成し, G2, G3 は Phe108 の側鎖と三層のスタッキング相互作用を形成していた。また, T6 は Trp47 の側鎖とスタッキング相互作用していた。TLR9 のもう一方のプロトマーからは, 主にリン酸とリボース骨格が認識されていた。

これらの特徴的な CpG DNA の結合様式は, 既報の CpG DNA (DNA1668_12mer) 結合型 TLR9 の構造 (PDB ID: 3WPC) と共通していた³²。

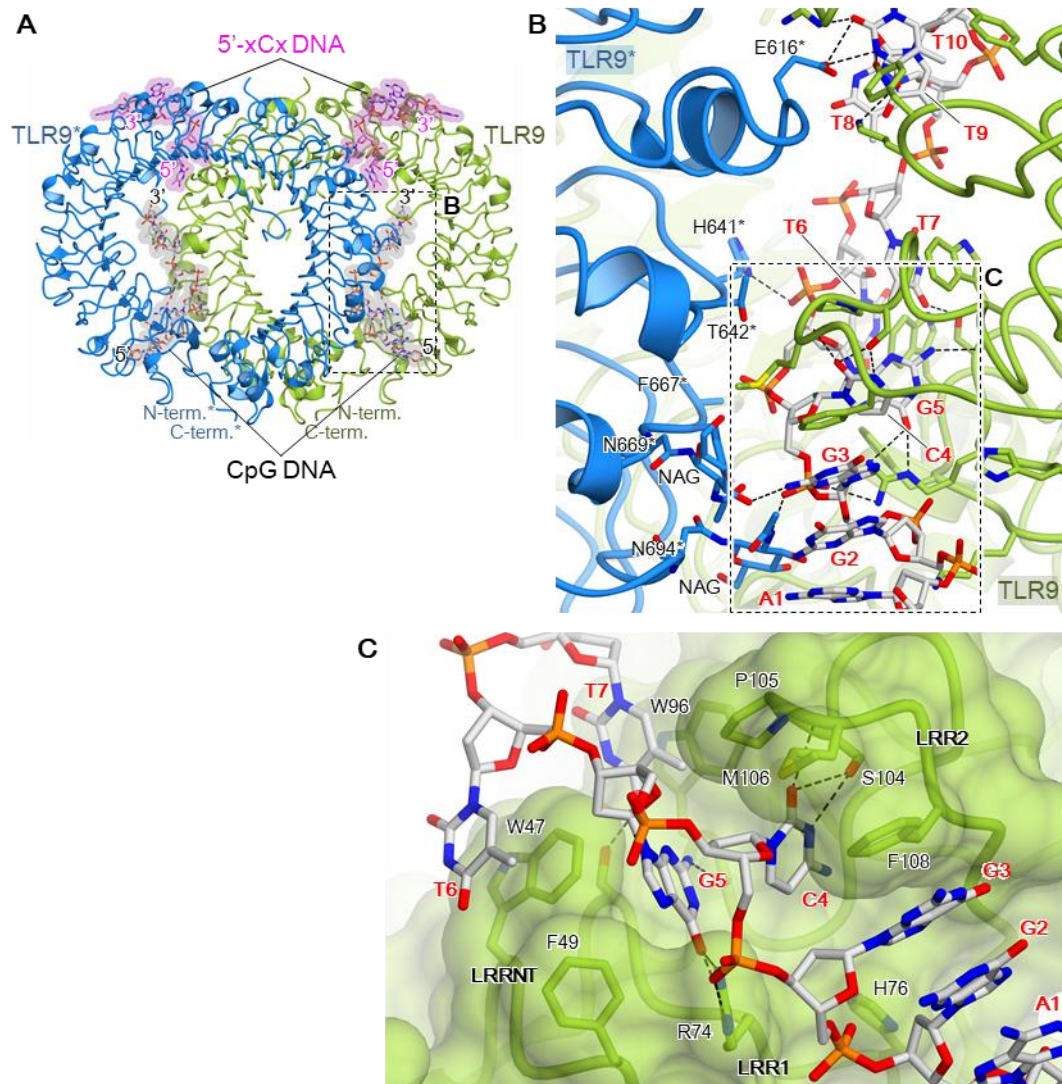


図 22. CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型 TLR9 の CpG DNA 結合部位

(A) CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型 TLR9 の正面図。(B) CpG DNA 結合部位の拡大図。(C) CpG モチーフを含む 6 塩基のコンセンサス配列の認識の拡大図。(B) および (C) における水素結合は黒色の破線で示した。

3.1.8. 5'-xCx DNA の認識

5'-xCx DNA の 5'末端側から 3 塩基 (T1, C2, G3) は TLR9 と相互作用していた (図 23)。

5'末端側から 1 番目の T1 塩基は LRR18* と LRR19* に存在する二量体界面側に突き出したループ構造の上に存在しており, Asn567* に結合した *N* 型糖鎖 (LRR18*), LRR8 のループ領域, Tyr345 (LRR11) および Phe375 (LRR12) の側鎖が形成する空間に入り込んでいた (図 23C)。この部位では, 塩基部分を収納する空間には余裕があり, また TLR9 との相互作用も少なかった。このことから, ITC での親和性の結果と一致して, 5'-xCx DNA の 1 番目の位置では様々な塩基を許容できると考えられる。T1 の 5'末端の OH 基は Tyr345 (LRR11) と水素結合を形成し, さらに周囲を Asp259, His260, Gly563*, Arg590* に囲まれているため, 5'末端側にさらに塩基を追加することは難しいと推測された。これは, 5'-xCx DNA の 5'末端への塩基やリン酸基の付加によって結合親和性が著しく減弱する結果と一貫していた (図 15, 表 6)。

5'末端側から 2 番目の C2 塩基は TLR9 の 2 つのプロトマーが LRR11-13 と LRR17*-18* の間で形成する界面の間に位置し, 2 つのプロトマーと複数の相互作用を形成していた (図 23D)。シトシンの N3 および N4 原子は Asp534* (LRR17*) の側鎖と良好な配置で水素結合を形成していた。また, N4 原子は Gly565* (LRR18*) の主鎖の O 原子とも水素結合を形成していた。これに加えて, C2 の塩基部分は Phe402 (LRR13) および Tyr536* (LRR17*) の側鎖に挟まれるようにスタッキング相互作用していた。3.1.4 項において, 5'-xCx DNA の 2 番目のシトシンをメチル化したもの (TC(met)GCCC) は, CpG DNA 存在下の TLR9 に対する結合親和性が大幅に減弱していた (図 15, 表 6)。シトシン塩基の 5 位の炭素原子にメチル基が付加されると, Gly565* のカルボニル基および T1 のリボースと衝突すると予想され (図 23D), これが原因で親和性が低下したと考えられる。また, T1 と C2 間のリン酸基 (P1-2) は Lys348 (LRR11) の主鎖の NH₂ 基および Tyr536* (LRR17*) の側鎖の OH 基と, P2-3 のリン酸基は Ser350 (LRR11) と水素結合を形成しており, 二量体形成に寄与していた (図 23D)。

5'末端側から 3 番目の G3 塩基は TLR9 の一方のプロトマーとのみ相互作用していた (図 23E)。G3 の塩基部分は LRR11 の突き出した表面に位置し, Ala352 の主鎖の N 原子および Arg377 の側鎖と水素結合を形成していた。5'-xCx DNA の残りの 3 塩基 (C4, A5, C6) は TLR9 の二量体分子の上方に突き出しており, TLR9 の二量体化には寄与していなかった (図 23E)。

以上の結果をまとめると, 5'末端側から 1 番目の T1 塩基と 3 番目の G3 塩基が比較的ゆるく認識されていたのに対して, 2 番目の C2 塩基は構造中で緊密に認識されていた。これは ITC とゲル濾過クロマトグラフィーの結果とよく一致するものであった。

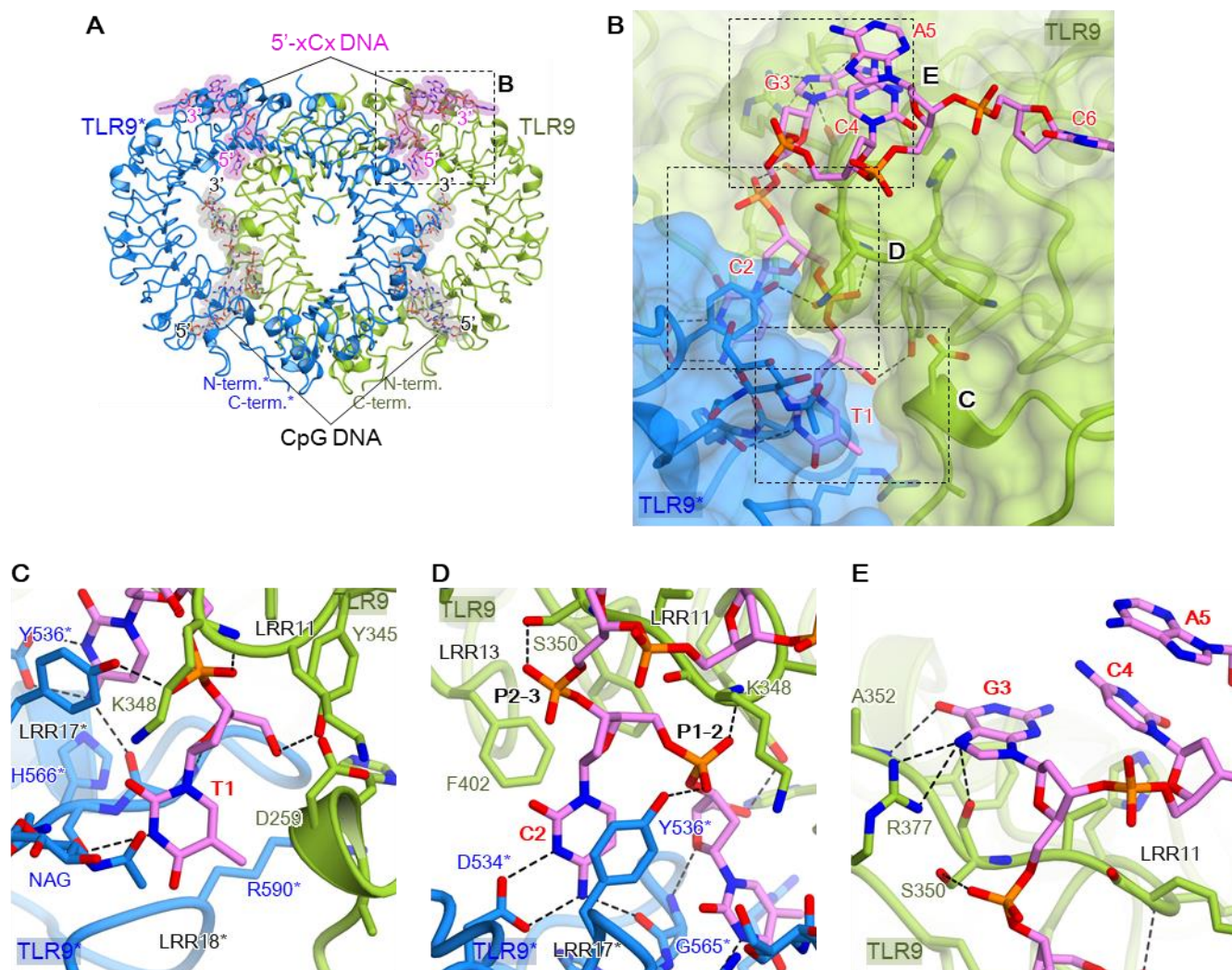


図 23. CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型 TLR9 の 5'-xCx DNA 結合部位

(A) CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型 TLR9 の正面図。(B) 5'-xCx DNA 結合部位の拡大図。
(C)-(E) 1, 2, 3-5 塩基目の認識の拡大図。水素結合を黒色の破線で示した。

3.1.9. 1 番目の塩基が異なる 5'-xCx DNA との複合体の構造比較

ウマ TLR9 において、1 番目の塩基が異なる 3 種類の 5'-xCx DNA (TCGCAC, GCGCAC, CCGCAC) との複合体の構造解析に成功した。

1 番目の塩基はピリミジン塩基 (チミン, シトシン) あるいはプリン塩基 (グアニン) で塩基部分の大きさに違いがあるにも関わらず、いずれの場合においても同じ位置を占めていた (図 24)。また、5'末端の OH 基と Tyr345 との水素結合も維持されていた。ITC による結合親和性の結果によると、5'-xCx DNA の 1 番目の位置にはアデニン塩基を好まない傾向がみられたが、ゲル濾過クロマトグラフィーによる結合実験においては、いずれの塩基も同様に TLR9 の二量体化が確認されていた (図 15, 図 16, 表 6)。本項の結果は、1 番目の塩基を収納するスペースにはさまざまな塩基を許容できることを構造からも示している。

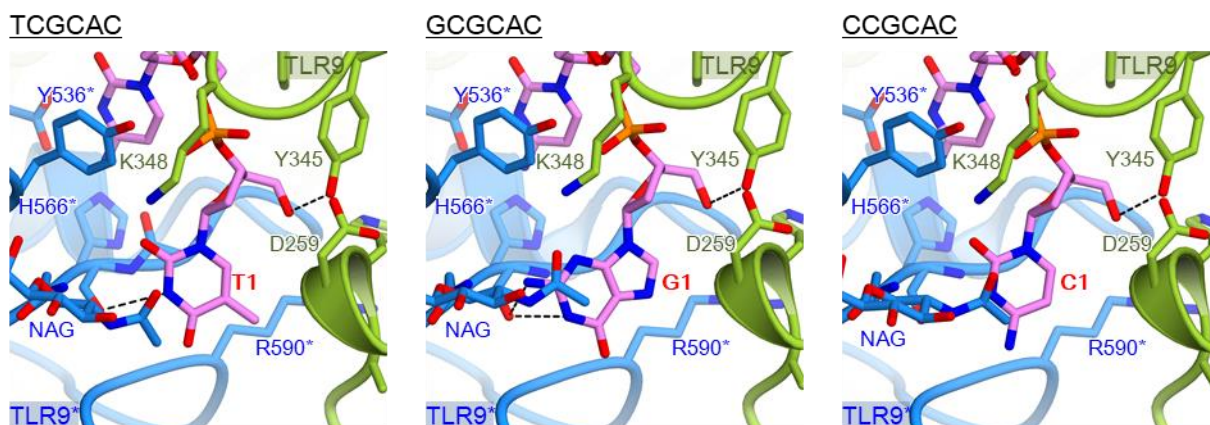


図 24. 5'-xCx DNA の 1 塩基目の結合部位の拡大図

CpG DNA/TCGCAC 結合型 (左, PDB ID: 5Y3J), CpG DNA/GCGCAC 結合型 (中央, PDB ID: 5Y3K), CpG DNA/CCGCAC 結合型 (右, PDB ID: 5Y3L) TLR9 の構造の、5'-xCx DNA の 1 塩基目の結合部位の拡大図。水素結合を黒色の破線で示した。

3.1.10. 5'-xCx DNA 認識に関わる残基の重要性

構造解析によって明らかになった TLR9 と 5'-xCx DNA の相互作用に関わる残基の重要性を確かめるために、2.1.5 項に従って、マウス TLR9 の 5'-xCx DNA 結合部位変異体 (F375A, F402A, D535A, Y537A) を作製し、2.1.6 項に従い、ITC により CpG DNA 存在下での 5'-xCx DNA との結合を確認した。

コントロールとして用いた CpG DNA 結合部位変異体の W96A においては、CpG DNA 単独との結合親和性は減弱したが、CpG DNA 存在下での 5'-xCx DNA との結合には影響がなかった。対照的に、作製したすべての 5'-xCx DNA 結合部位変異体は、CpG DNA との結合には影響がなかった一方で、CpG DNA 存在下での 5'-xCx DNA との結合親和性は顕著に低下した。これらの結果は、5'-xCx DNA の認識に直接関与する残基が TLR9 との相互作用に重要であること、また TLR9 が 2 種類の DNA を 2 つの異なる部位で認識していることを示している。

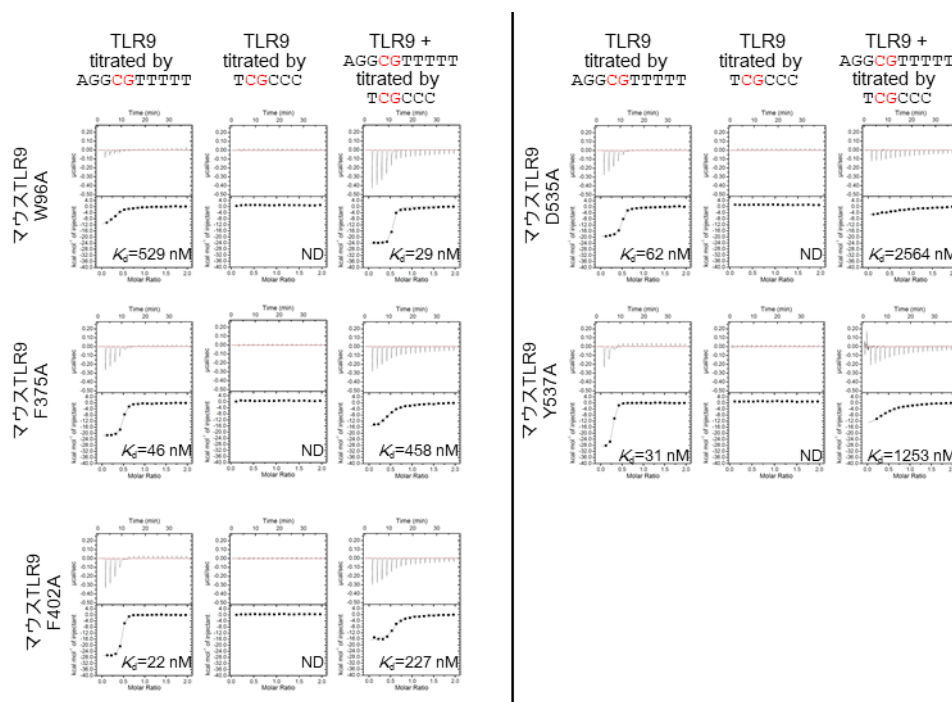


図 25. マウス TLR9 の 5'-xCx DNA 結合部位変異体の ITC

マウス TLR9 の CpG DNA 単独 (左列), 5'-xCx DNA 単独 (中央列), CpG DNA 存在下で 5'-TCG DNA (右列) をマウス TLR9 の 5'-xCx DNA 結合部位変異体に滴定した結果。CpG DNA 結合部位変異体の W96A はコントロールとして用いた。算出された K_d 値は図中に示した。

表 8. マウス TLR9 の 5'-xCx DNA 結合部位変異体の ITC

Cell		Titrant	K_d (nM)
Protein	DNA		
マウス TLR9 (wild type)	-	AGG <u>C</u> GTTTTT	21
	-	T <u>C</u> GCCC	ND
	AGG <u>C</u> GTTTTT	T <u>C</u> GCCC	7.2
マウス TLR9 (W96A)	-	AGG <u>C</u> GTTTTT	529
	-	T <u>C</u> GCCC	ND
	AGG <u>C</u> GTTTTT	T <u>C</u> GCCC	29
マウス TLR9 (F375A)	-	AGG <u>C</u> GTTTTT	46
	-	T <u>C</u> GCCC	ND
	AGG <u>C</u> GTTTTT	T <u>C</u> GCCC	458
マウス TLR9 (F402A)	-	AGG <u>C</u> GTTTTT	22
	-	T <u>C</u> GCCC	ND
	AGG <u>C</u> GTTTTT	T <u>C</u> GCCC	227
マウス TLR9 (D535A)	-	AGG <u>C</u> GTTTTT	62
	-	T <u>C</u> GCCC	ND
	AGG <u>C</u> GTTTTT	T <u>C</u> GCCC	2600
マウス TLR9 (Y537A)	-	AGG <u>C</u> GTTTTT	31
	-	T <u>C</u> GCCC	ND
	AGG <u>C</u> GTTTTT	T <u>C</u> GCCC	1300

図 25 の ITC により算出された K_d 値を示した。それぞれの結果は、1 回の測定で得られた結果を示している。ND: Not determined.

3.1.11. TLR7 サブファミリーとの構造比較

CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型 TLR9 の構造において、5'-xCx DNA はリング型の TLR9 分子の上部に位置していた。これはグアノシン/ssRNA (UUU) 結合型 TLR7 およびウリジン/ssRNA (UG) 結合型 TLR8 におけるヌクレオシド結合部位と同じ位置だった (図 26)。これら 3 種類の構造を重ね合わせたとき、5'-xCx DNA の 5'末端から 2 番目のシトシンは、TLR7 におけるグアノシン、TLR8 におけるウリジンと完全に重なる位置に存在していた。

シトシン塩基とグアノシンおよびウリジンに共通する相互作用として、Phe 残基によるスタッキング相互作用と、Asp 残基と塩基部分の N 原子との水素結合という、2 種類の相互作用が観察された (図 26)。3.1.10 項に示した 5'-xCx DNA 結合部位変異体の ITC においても、マウス TLR9 の F402A および D535A の変異体は 5'-xCx DNA との結合が著しく低下していたことから (図 25, 表 8)、この相互作用がリガンド認識において特に重要だと考えられる。

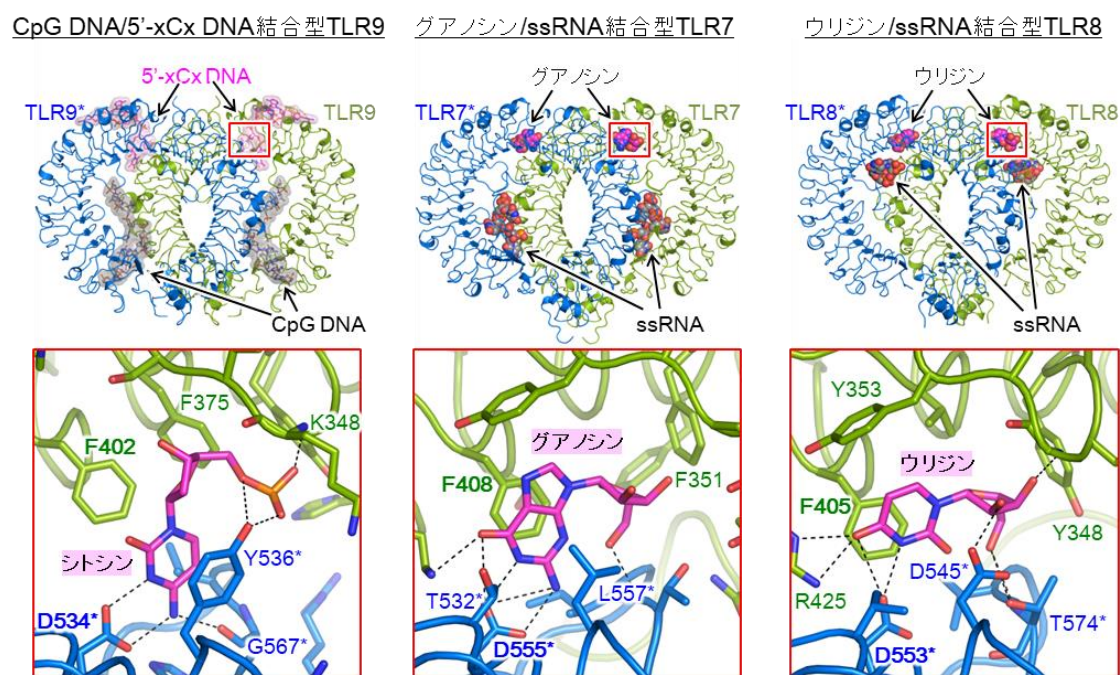


図 26. TLR7 サブファミリーのモノヌクレオシド結合部位との比較

CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型 TLR9 (左), グアノシン/ssRNA 結合型 TLR7 (中央, PDB ID: 5GMH), ウリジン/ssRNA 結合型 TLR8 (右, PDB ID: 4R07) の構造。上段に二量体構造を、下段に TLR7 および TLR8 におけるモノヌクレオシド結合部位の拡大図を示した。水素結合を黒色の破線で示した。

3.1.12.2 種類の DNA による TLR9 の活性化

CpG DNA と 5'-xCx DNA の結合が、細胞中における TLR9 の活性化においても重要かどうかを確認するために、各種細胞における TLR9 の活性を測定した。本実験は、東京大学医科学研究所の三宅教授、柴田博士、佐藤博士らによるものである。

2.1.10 項に従って、マウス TLR9 を発現させた HEK293T 細胞に対して 2 種類の DNA (CpG DNA: AGGCGTTTTT, 5'-xCx DNA の 5'末端側の 3 つの塩基の配列置換体) による共刺激を行い、TLR9 の活性化を NF- κ B レポーターアッセイにより確認した。その結果、CpG DNA 単独で刺激した細胞においては弱い活性化が観察されたが、CpG DNA と 5'末端から 2 塩基目にシトシンをもつ 5'-xCx DNA とで共刺激した細胞においては、CpG DNA 単独での刺激と比較して、活性化の増強効果が観察された (図 27)。また、2 番目の塩基がシトシン以外の 5'-xCx DNA では、活性化の増強効果は弱かった。5'-xCx DNA 配列置換体の活性化の傾向は、ITC の結果と概ね一致していた。CpG DNA の CpG モチーフを逆転させた DNA (AGGGCTTTTT) は単独での刺激においても、またいずれの 5'-xCx DNA 配列置換体との共刺激においても、活性化は確認できなかった。

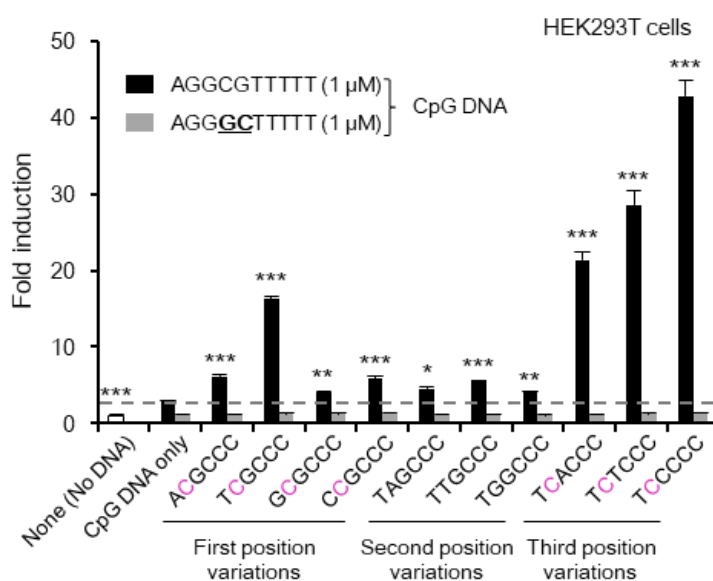


図 27. HEK293T 細胞における NF- κ B レポーターアッセイ (三宅らによる)

マウス TLR9 およびマウス Unc93B1 を発現させた HEK293T 細胞を 1 μ M の CpG DNA と 1 μ M の 5'-xCx DNA の配列置換体で刺激したときの NF- κ B 活性を示した。

次に、各種細胞に発現している TLR9 においても、CpG DNA と 5'-xCx DNA による活性化の増強がみられるかを確認した。2.1.11 項に従って得たマウス BM-MCs を用いて、2 種類の DNA で刺激したときの炎症性サイトカイン (IL-12p40) 産生量を、2.1.12 項に従って ELISA で定量した。その結果、HEK293T 細胞における NF- κ B レポーターアッセイで得られた結果と同様の傾向が観察された (図 28)。野生型マウスから得た BM-MCs において、CpG DNA 単独の刺激では IL-12p40 の産生はわずかに確認されたが、5'末端から 2 塩基目にシトシンをもつ DNA との共刺激においては、IL-12p40 の産生量が顕著に上昇した。一方で *Tlr9*^{-/-}マウスから得た BM-MCs においてはまったく IL-12p40 の産生が検出できなかったことから、CpG DNA と 5'-xCx DNA が TLR9 依存的にサイトカイン産生を誘導していると考えられた。

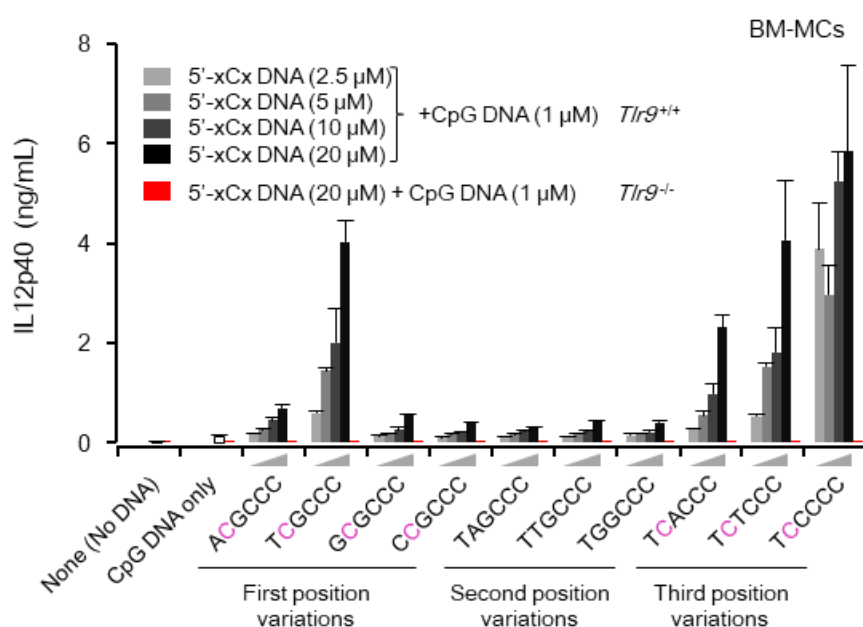


図 28. BM-MCs におけるサイトカイン産生量 (三宅らによる)

野生型マウス (*Tlr*^{+/+}) および *Tlr*^{-/-}マウスから得た BM-MCs を用いて、1 μ M の CpG DNA と 2.5, 5, 10, 20 μ M の 5'-xCx DNA 配列置換体で刺激したときの IL-12p40 産生量を ELISA で検出した。

さらに、BM-MCsにおいてTLR9の活性化によってMAPKとNF- κ Bのシグナル伝達が誘導されるかどうかを確かめるために、2.1.13項に従って、下流分子のリン酸化(図4参照)をウエスタンブロッティングにより検出した。その結果、CpG DNAと5'-xCx DNAの共刺激によりMAPK経路の下流分子であるErk1/2, JNK1/2, p38およびNF- κ B経路の下流分子であるp65のリン酸化が誘導されることが分かった(図29)。これらの結果は、CpG DNAと5'-xCx DNAの刺激によってTLR9依存的なシグナル伝達が誘導されていることを示している。

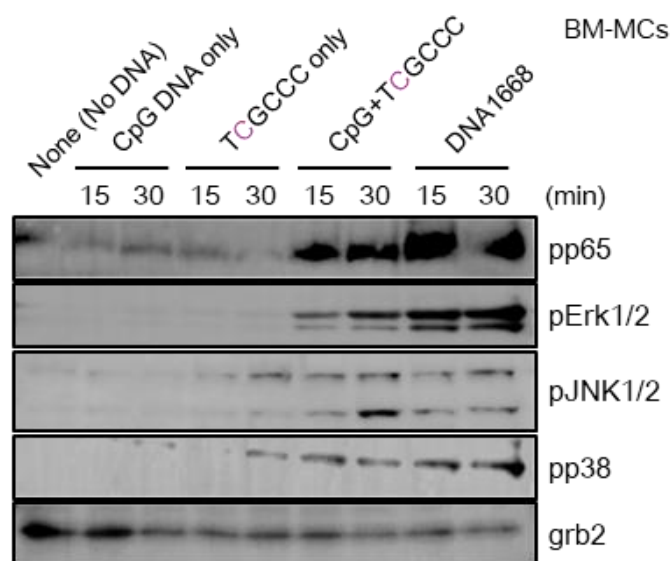


図 29. ウエスタンブロッティングによる下流分子のリン酸化の検出 (三宅らによる)

野生型マウス ($Th^{+/+}$) および $Th^{-/-}$ マウスから得た BM-MCs を用いて、CpG DNA と 5'-xCx DNA (TCGCCC) で刺激したときの下流分子のリン酸化をウエスタンブロッティングにより検出した。DNA1668 (TCCATGACGTTTCCTGATGCT) は CpG と 5'-xCx の 2 つのモチーフをもつポジティブコントロール DNA として用いた。

2.1.12 項に従って、BM-pDC を用いて 2 種類の DNA による刺激を行った。pDCs に発現する TLR7 あるいは TLR9 は、活性化により IFN- α を強力に誘導する。BM-pDCs において、CpG DNA と 5'-xCx DNA による TLR9 依存的な IFN- α の産生量は、DNA1585 での刺激に匹敵する IFN- α の産生量だった (図 30)。DNA1585 は class A CpG DNA に分類され、IFN- α 産生を強力に誘導することが知られている。

本項に示した結果は、CpG DNA と 5'-xCx DNA による相乗的な刺激が、さまざまな免疫細胞に発現する TLR9 の活性化に十分であることを示している。

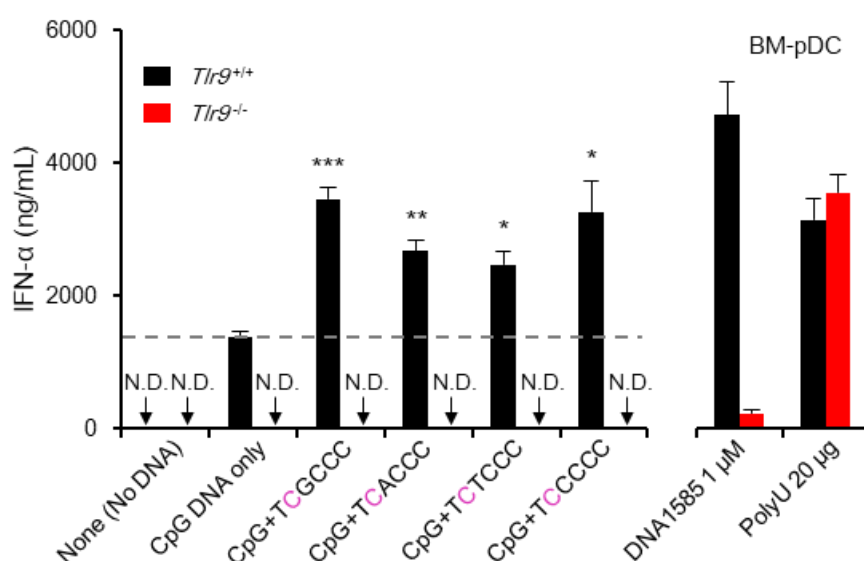


図 30. BM-pDC におけるインターフェロン産生量 (三宅らによる)

野生型マウス (*Tlr*^{+/+}) および *Tlr*^{-/-} マウスから得た BM-pDC を用いて、CpG DNA と 5'-xCx DNA の配列置換体で刺激したときの IFN- α 産生量を ELISA で検出した。DNA1585 (ggGGTCAACGTTGAgggggg, PS 骨格を小文字, PO 骨格を大文字, 二重鎖を形成している部分を下線で示した) は pDC における TLR9 活性化のポジティブコントロール DNA として、PolyU は TLR7 活性化のポジティブコントロール RNA として用いた。

3.1.13. 5'-xCx DNA の 1 番目の塩基の配列特異性

3.1.4 項に示した ITC による結合実験においては、5'末端から 1 番目の塩基にはアデニンが好まれないものの、それ以外の塩基への置換はほとんど結合親和性に影響を与えなかった (図 15, 表 6)。また構造解析の結果からも、1 番目の塩基の選択性に寄与する相互作用は見出せなかった (図 23, 図 24)。一方で、3.1.12 項に示した細胞を用いた活性測定では、5'末端から 1 番目の塩基はチミジンで特に活性化の増強効果が高く、アデニン、シトシン、グアニンでは低いことが複数の実験において示された (図 27, 図 28, 図 30)。この結果の不整合を生み出す要因の一つに、TLR9 と各 DNA の濃度の違いが挙げられる。ITC やゲル濾過クロマトグラフィーでの結合実験における TLR9 と DNA の濃度は、生体内での濃度よりも高いと予想され、そのため TLR9 と各 DNA の結合は飽和に達していると考えられる。そこで、1 番目の塩基を置換した 5'-xCx DNA を低濃度でゲル濾過クロマトグラフィーに用い、それぞれの 5'-xCx DNA の結合の強さを TLR9 の二量体化の効率から見積もった。

2.1.7 項に従い、TLR9 と CpG DNA (AGGCGTTTTT) の濃度を固定し、5'-xCx DNA の濃度を段階的に希釈し、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。その結果、5'-xCx DNA の 5'末端の配列は、5'-ACG, 5'-GCG, 5'-CCG よりも、5'-TCG の DNA において明らかに二量体化の効率が高いことが分かった。5'-TCG DNA による TLR9 の二量体のピークの面積は、他の配列の DNA では二量体化が飽和していない DNA 濃度においても飽和に達していた (図 31, 5'-xCx 濃度が 187.5 nM のとき)。この結果は、すべての 5'-xCx DNA は TLR9 の二量体化を引き起こすが、その中でも 5'-TCx DNA がより TLR9 の二量体化を強く誘導することを実証している。この結果は、細胞中における TLR9 の活性化において観察された結果と一致していた。

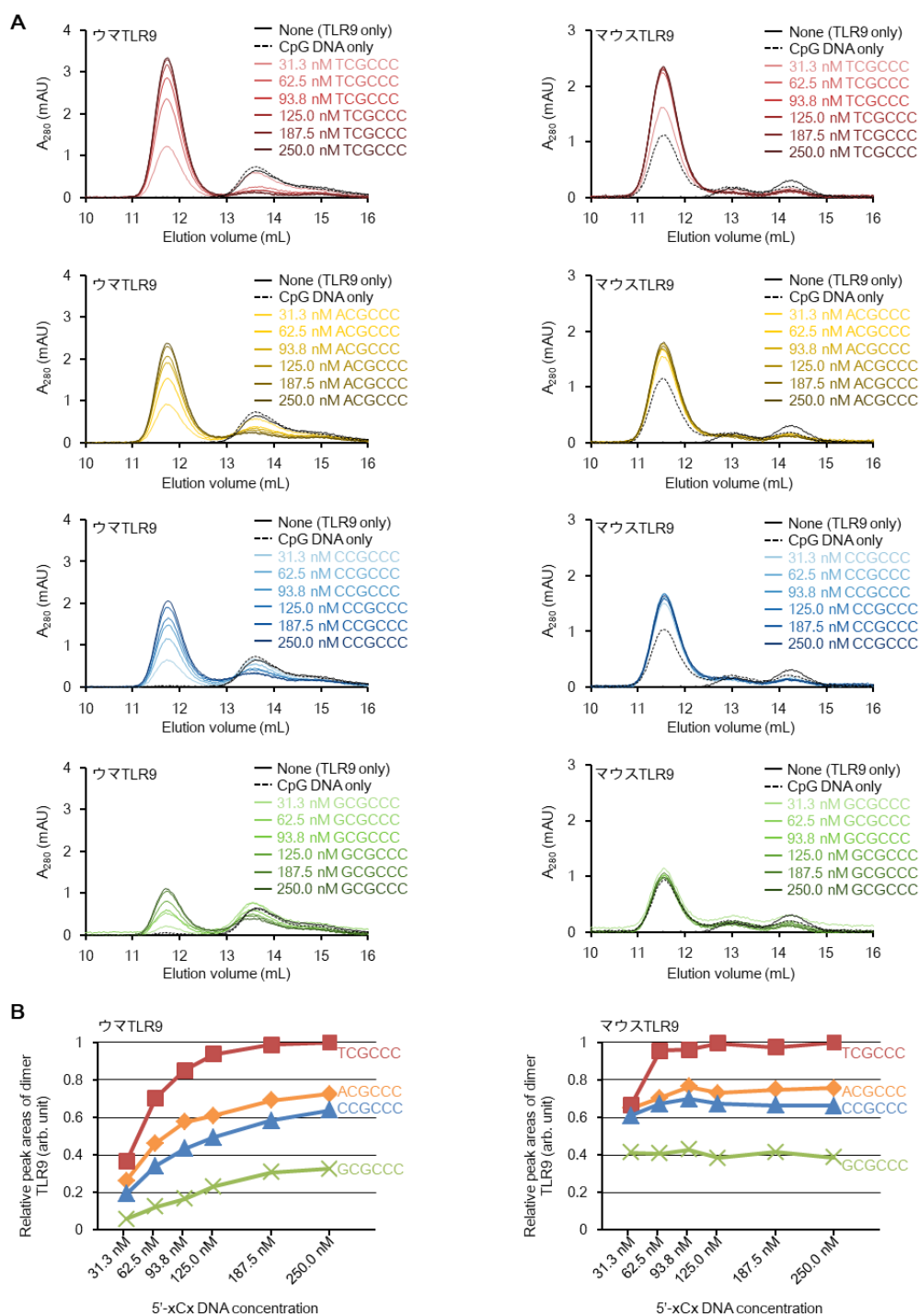


図 31. 5'-xCx DNA の濃度依存的な TLR9 の二量体形成

(A) ウマ TLR9 (左) およびマウス TLR9 (右) と、CpG DNA の濃度を 125 nM とし、1 番目の塩基が異なる 5'-xCx DNA を終濃度 0, 31.3, 62.5, 93.8, 125.0, 187.5, 250.0 nM になるように混合し、200 μ M をインジェクションした。(B) 二量体のピーク面積 (縦軸) と 5'-xCx DNA の濃度 (横軸) をプロットした。

3.2. マウス TLR9 の活性化型二量体の構造解析

3.2.1. マウス TLR9 サンプルの調製

2.2.1 項に従って作製した結晶化用マウス TLR9 糖鎖結合変異体サンプルの精製を行った。マウス TLR9 は糖鎖結合部位にあらかじめ変異を導入したコンストラクトを発現させているため、Endo H_fによる糖鎖の短縮は行わずに、2.1.3 項に示した性状解析用サンプルの調製方法と同様の手順で精製を行った。また、性状解析用のマウス TLR9 CpG DNA 結合部位変異体のサンプルは 2.1.5 項と同様に精製を行った。精製サンプルの SDS-PAGE の結果を図 32 に示した。結晶化用のマウス TLR9 は、培養液 1 L から 0.2 mg の精製タンパク質が得られた。CpG DNA 結合部位変異体マウス TLR9 の I643T, S667A, I643T/S667A は培養液 1 L からそれぞれ 1.0 mg, 0.5 mg, 0.3 mg の精製タンパク質が得られた。

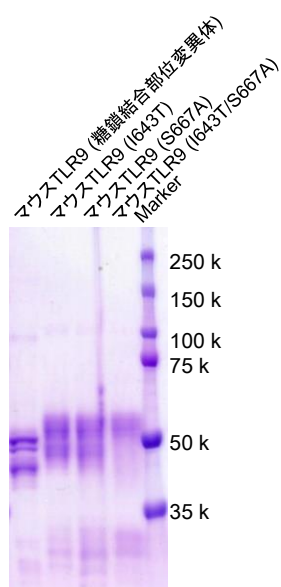


図 32. マウス TLR9 精製サンプルの SDS-PAGE

結晶化用マウス TLR9 糖鎖結合部位変異体、性状解析用マウス TLR9 (I643T)、性状解析用マウス TLR9 (S667A)、性状解析用マウス TLR9 (I643T/S667A) の精製サンプルの SDS-PAGE。

3.2.2. 結晶化と構造決定

マウス TLR9 の活性化型二量体の構造を明らかにするために、2.2.4 項に従って *N* 型糖鎖結合部位変異体マウス TLR9 と CpG DNA (AGGCGTTTTT) と 5'-xCx DNA との共結晶化を行った。結晶化の成功率を上げる目的で、マウス TLR9 の *N* 型糖鎖結合部位変異体には、変異数と導入箇所の異なる数種類の変異体を用い、5'-xCx DNA には、基本となる配列 (TCGCCC) の 4-6 塩基目をさまざまな配列に変化させた 10 種類以上の DNA を用いて結晶化を行った。その結果、マウス TLR9 として 4 箇所の糖鎖結合部位変異体 (N325Q/N495Q/N514Q/N670Q) を用いたときに良好な回折を与える結晶が得られ、CpG DNA および 5'-xCx DNA として TCGCCA 配列との複合体の結晶構造解析に成功した。2.2.5 項に従って構造解析を行い、分解能 2.3 Å で構造決定した (図 33, 表 9)。

その結果、マウス TLR9 においても単位胞中に TLR9 と CpG DNA と 5'-xCx DNA が 2 分子ずつ観察され、2:2:2 複合体を形成していた。TLR9 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 34)。TLR9 の二量体の構造, CpG DNA 結合部位, 5'-xCx DNA 結合部位は、CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型ウマ TLR9 の構造とよく一致していた (図 34)。

5'-xCx DNA は、6 塩基のうち 5' 末端から 4 番目の塩基までの電子密度が確認されたが (図 35)、残りの部分の電子密度は観察されなかった。CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型ウマ TLR9 (PDB ID: 5Y3J)³² の構造と重ね合わせると、5'-xCx DNA は 5' 末端から 3 番目の塩基まではよく一致したが、4 番目の塩基の位置は大きく動いていたことから (図 34C)、3.1.8 項での 5'-xCx DNA の 5' 末端から 4 番目以降は TLR9 から認識されていないという観察結果とよく一致していた (3.1.8 項, 図 23E 参照)。



図 33. CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型マウス TLR9 の結晶の写真

CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型マウス TLR9 の結晶の写真。CpG DNA として AGGCGTTTTT 配列, 5'-xCx DNA として TCGCCA 配列の DNA を用いた。

表 9. CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型マウス TLR9 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

マウス TLR9/AGGCGTTTT/TCGCCA	
Data Collection	
Beamline	SPring-8 BL41XU
Wavelength (Å)	1.0000
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁
Unit cell parameters	
<i>a</i> (Å)	114.3
<i>b</i> (Å)	128.1
<i>c</i> (Å)	156.8
Resolution range (Å)	49.61–2.30 (2.34–2.30)
Completeness (%)	99.8 (97.2)
Redundancy	11.3 (10.8)
<i>R</i> _{merge}	0.178 (1.710)
<i>R</i> _{meas}	0.186 (1.795)
CC _{1/2}	0.997 (0.574)
Average <i>I</i> / σ (<i>I</i>)	11.4 (1.5)
Refinement	
Resolution (Å)	2.30
No. of reflections used	97,358
Model	TLR9×2 CpG DNA×2 5'-xCx DNA×2
Average <i>B</i> -factor (Å ²)	41.0
<i>R</i> (%) ^c	19.1
<i>R</i> _{free} (%) ^d	23.8
Rms deviations	
Bond length (Å)	0.012
Bond angles (°)	1.59

^a 括弧の中は、最外殻における値を示す。

^b *I*を強度とし、 $R_{\text{merge}} (\bar{I}) = \Sigma |I - \langle I \rangle| / \Sigma I$ 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、 $R = \Sigma |F_o - F_c| / \Sigma F_o$ 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。

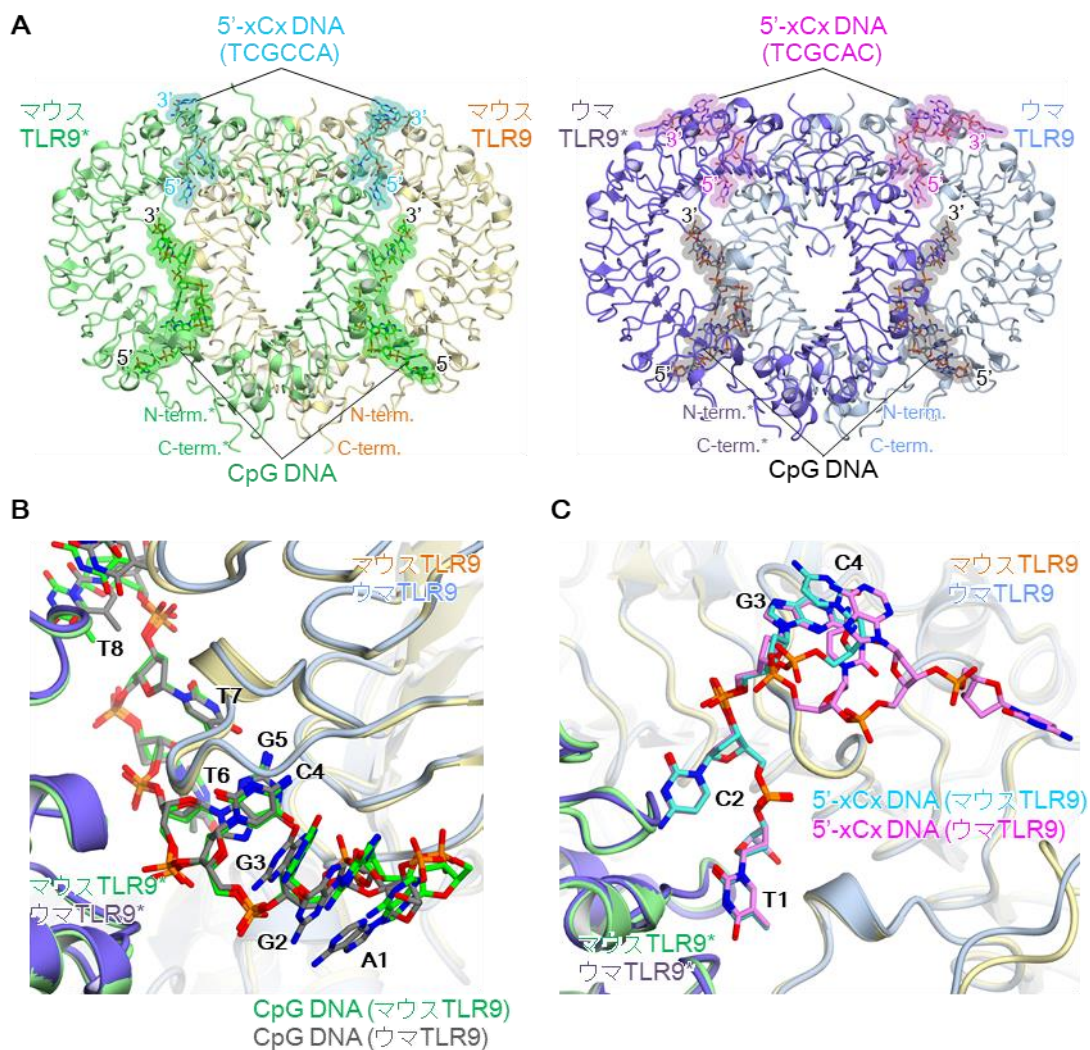


図 34. マウスおよびウマ TLR9 の構造の比較

(A) マウス TLR9 (左) およびウマ TLR9 (右) の CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型二量体の全体構造の正面図。(B) CpG DNA 結合部位の重ね合わせ。(C) 5'-xCx DNA 結合部位の重ね合わせ。

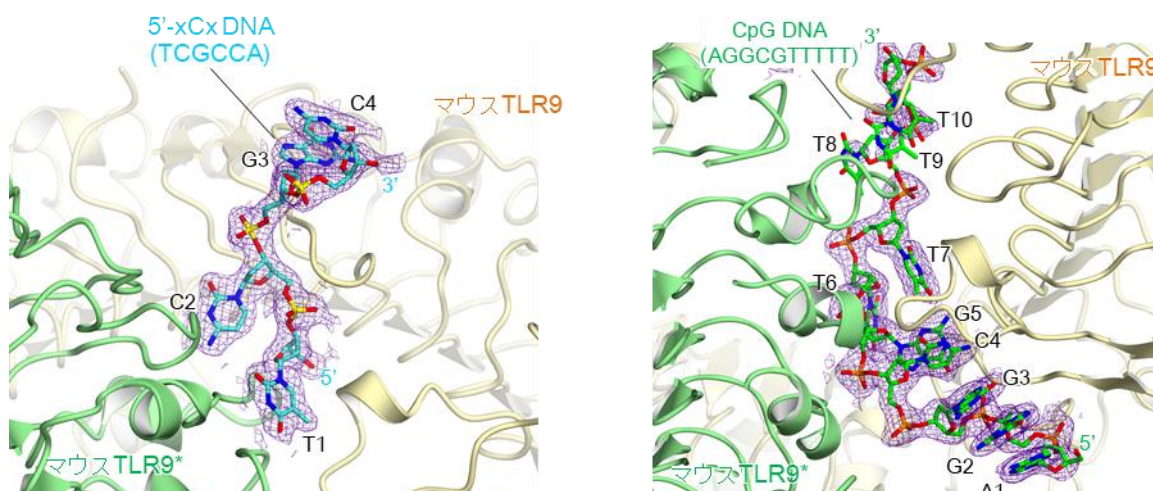


図 35. マウス TLR9 の構造における各 DNA の電子密度

CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型マウス TLR9 構造における 5'-xCx DNA の電子密度。
2*Fo*-*Fc* マップを 1.5 σ で表示した。

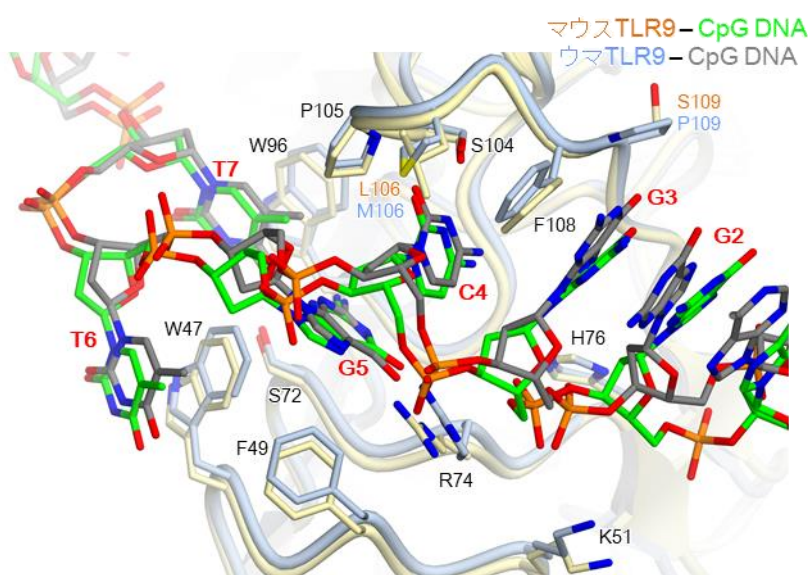


図 36. CpG DNA のコンセンサス配列の認識

マウスおよびウマ TLR9 における、CpG モチーフを含む 6 塩基のコンセンサス配列 (RRCGYG) の認識。マウス TLR9 と結合する CpG DNA をそれぞれ黄色と緑で、ウマ TLR9 と結合する CpG DNA をそれぞれ水色と灰色で示した。CpG DNA の認識に関わる残基の側鎖のうち、同じアミノ酸については黒字で示し、異なるアミノ酸についてはそれぞれの分子の色で示した。

3.2.3. マウス TLR9 の CpG DNA 結合部位

マウス TLR9 における CpG DNA と直接相互作用している残基のほとんどはウマ TLR9 と共通していたが (図 36), マウス TLR9 とウマ TLR9 の間で異なる残基による相互作用が観察された (図 37, マウス TLR9: Leu106, Ser109, Ile643*, Ser667*; ウマ TLR9: Met106, Pro109, Thr642*, Ala666*). この中で Ile643*は嵩高い疎水性の側鎖をもっており, CpG DNA の CpG モチーフのリボース骨格部分と広く接触するとともに, Leu106 と Phe668*を介して LRR2, LRR21*, LRR22*間での相互作用に寄与していた。このうち Leu106 と Ile643 はマウス特異的であり, 二量体化の促進に寄与していると考えられる。さらに, マウス TLR9 における Ser667*の側鎖の OH 基は CpG モチーフのリン酸基と直接水素結合を形成していた。この水素結合は CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型ウマ TLR9 構造においては観察されない相互作用だった。

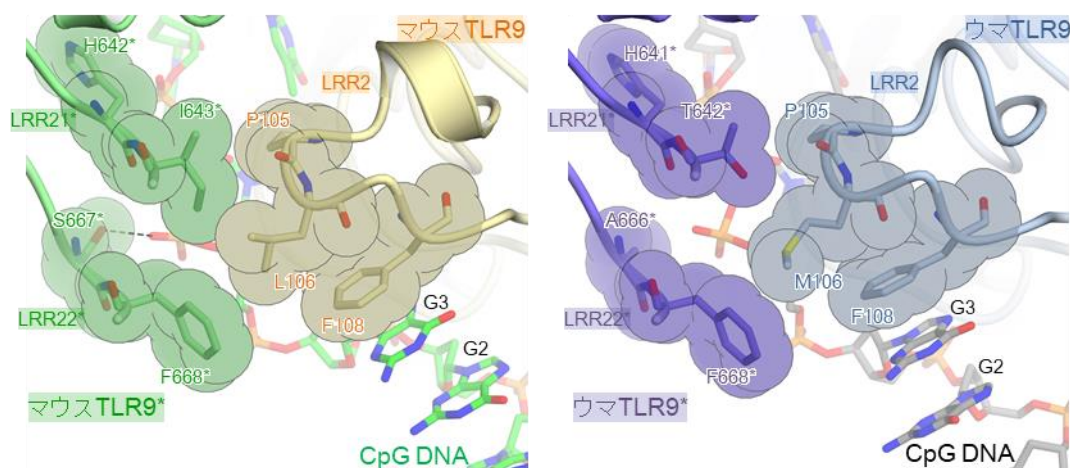


図 37. CpG DNA 結合部位近傍のループ領域の比較

マウス TLR9 (左) およびウマ TLR9 (右) の CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型構造におけるタンパク質間相互作用の比較。相互作用に寄与する残基を半透明の球体で示した。水素結合を黒色の破線で示した。

3.2.4. マウス TLR9 のタンパク質間相互作用

CpG DNA を介した相互作用に加えて、TLR9 の 2 つのプロトマー間で形成されるタンパク質間相互作用も、マウス TLR9 特異的な二量体形成に関わっていると考えられた。マウス TLR9 とウマ TLR9 の構造の二量体界面を比較すると、主鎖のコンフォメーションは基本的に一致しているが (図 38A), マウス TLR9 に特異的な水素結合が観察された。具体的には, Pro105-Arg645* (ウマでは Leu644*), His107-Gln647* (ウマでは Cys646*), Gly792-Lys739* (ウマでは Arg738*) において, マウス TLR9 特異的なタンパク質間相互作用が観察された (図 38B, 図 38C, 図 39)。一方で, Arg262-Gln612*-Glu616* (マウスでは Pro262, Arg613*, Glu617*), His505-Gln557*, Ala736-Gln797* (マウスでは Ile737, Gln798*) において, ウマ TLR9 特異的なタンパク質間相互作用が観察された。

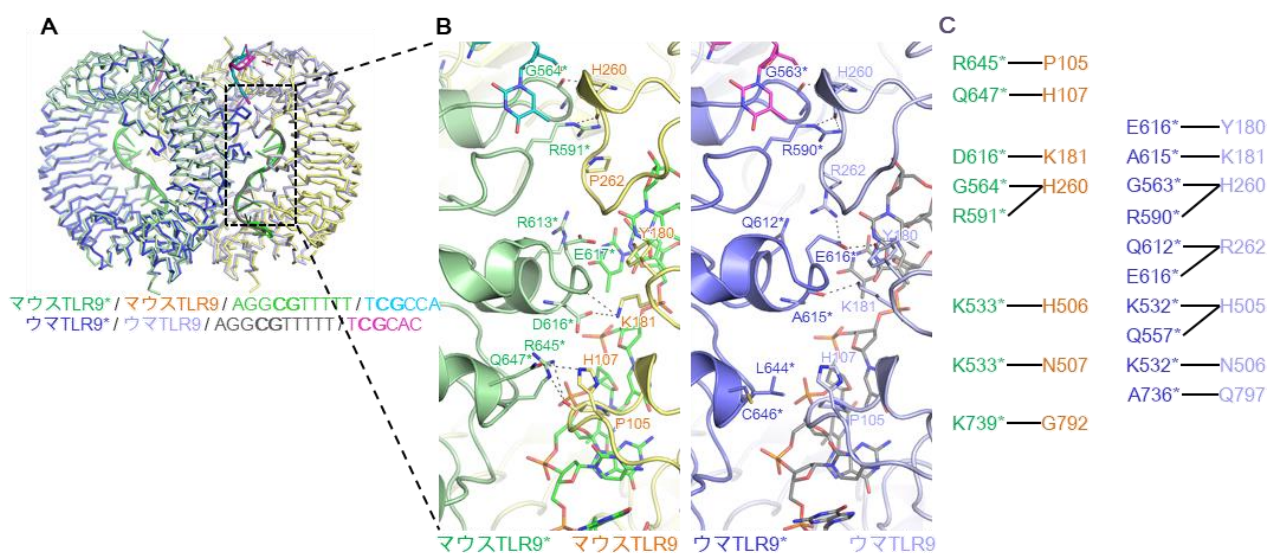


図 38. CpG DNA 結合部位近傍のタンパク質間相互作用の比較

(A) CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型マウス TLR9 とウマ TLR9 (PDB ID: 5Y3J) の Cα のトレース図を重ね合わせた構造。(B) マウス TLR9 (左) およびウマ TLR9 (右) における CpG DNA 結合部位の拡大図。それぞれの TLR9 をリボン図で、水素結合を黒色の破線で示した。(C) タンパク質間で形成される水素結合のスキーム図。

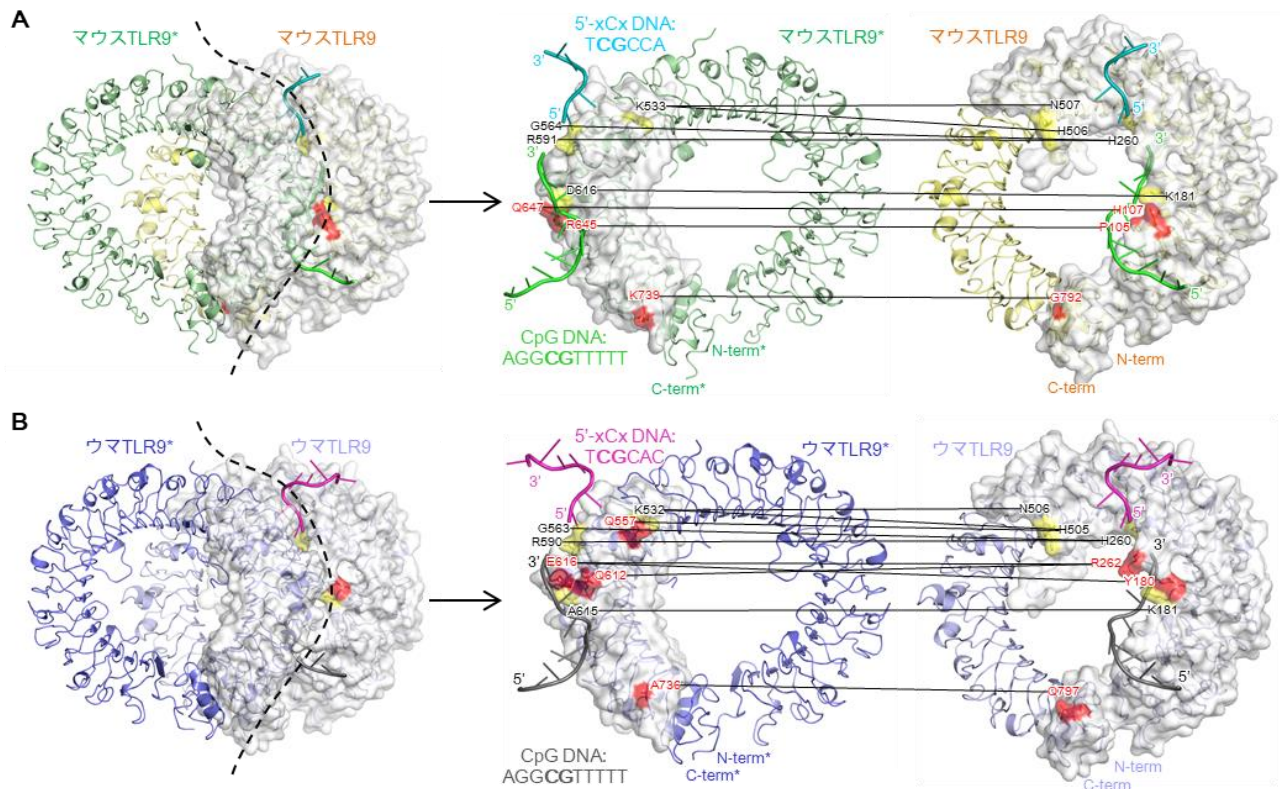


図 39. タンパク質間相互作用の比較

CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型マウス TLR9 (上) およびウマ TLR9 (下, PDB ID: 5Y3J) の構造。TLR9 二量体を中央で二分したときの右半分における TLR9 (LRRNR, LRR1-LRR16, LRRCT) および TLR9* (LRR17-LRR26) を半透明の表面図で示した。タンパク質間相互作用に関わる残基で、マウス TLR9 とウマ TLR9 の間で保存されている残基を黄色で、保存されていない残基を赤色で示した。

3.2.5. 2種類の DNA によるマウス TLR9 変異体の二量体化

3.2.3項で示した, マウス TLR9 と CpG DNA との種特異的な相互作用における Ile643 と Ser667 の寄与を確かめるために, 2.2.2 項に従って, マウス TLR9 の Ile643 および Ser667 を該当するヒトの残基に置換した変異体を作製した。得られたマウス TLR9 の CpG DNA 結合部位変異体を用いて, ゲル濾過クロマトグラフィーにより二量体形成能を調べた。その結果, Ser667 の変異は CpG DNA 単独での二量体化に影響を及ぼさなかったものの, Ile643 および Ile643/Ser667 変異体マウス TLR9 においては, CpG DNA 単独での TLR9 の二量体の割合が減少した (図 40)。また, Ile643/Ser667 変異体においては, CpG DNA と 5'-xCx DNA 共存下での TLR9 の二量体化も減弱していた。

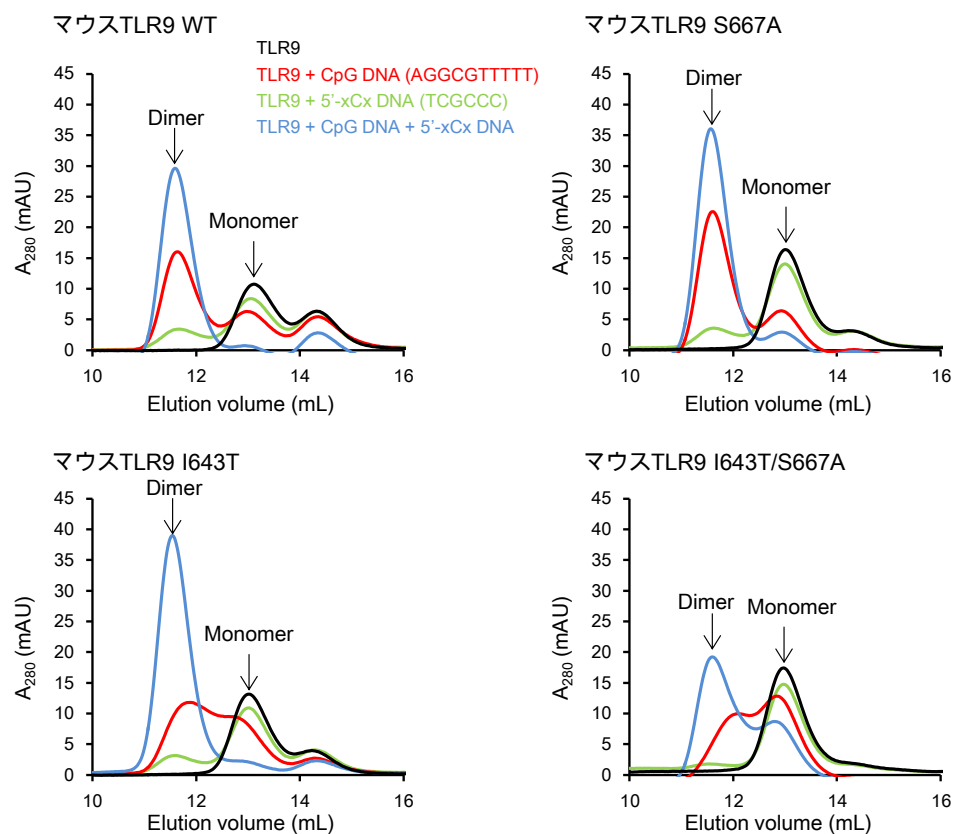


図 40. CpG DNA 結合部位変異体のゲル濾過クロマトグラフィー

TLR9 のみ (黒), CpG DNA 共存下 (赤), 5'-xCx DNA 共存下 (緑), CpG DNA および 5'-xCx DNA 共存下 (青) のマウス TLR9 変異体のゲル濾過クロマトグラフィーの結果。

3.2.6. マウス TLR9 変異体の活性測定

3.2.3 項で示したマウス TLR9 に特異的な CpG DNA 結合部位の残基が、細胞中での活性においても重要かどうかを確認するために、HEK293T 細胞における TLR9 の活性を測定した。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。

2.2.2 項で作製したマウス TLR9 の CpG DNA 結合部位変異体を使用し、NF- κ B レポーターアッセイを行ったところ、I643T と I643T/S667A の変異は野生型と比較して細胞活性が低下していた (図 41)。一方、S667A 単独の変異はマウス TLR9 の活性化にほとんど影響がなかった。これらの結果は、3.2.5 項でのゲル濾過クロマトグラフィーによる結合実験の結果と一致していた。

注目すべきことに、L106M 変異体においても I643T 変異体と同程度の細胞活性の低下が見られた。Leu106 はマウス TLR9 において Ile643* と疎水性相互作用を形成している。L106M および I643T 変異体においては、この疎水性相互作用が減弱したことにより活性が低下したと考えられる。これらの結果は、Leu106 と Ile643 が CpG DNA による二量体化と活性化に重要であることを示唆している。

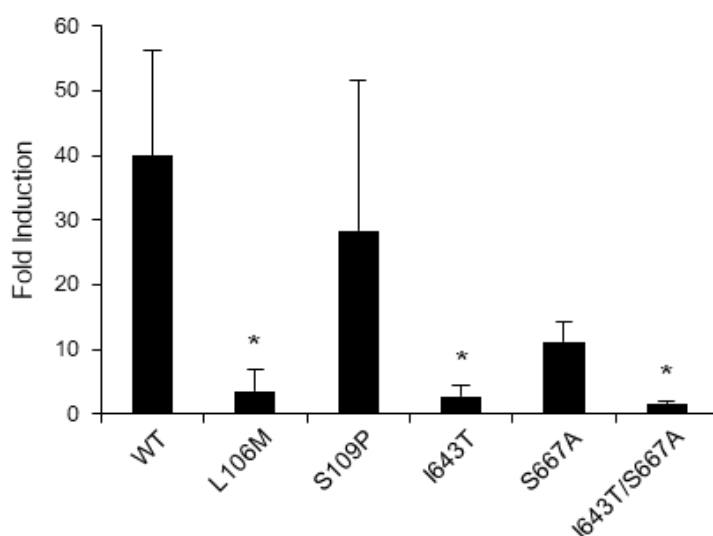


図 41. CpG DNA 結合部位変異体の NF- κ B レポーターアッセイ (三宅らによる)

マウス TLR9 の野生型および CpG DNA 結合部位変異体とマウス Unc93B1 を発現させた HEK293T 細胞を TCGTTTCGTTTTTTTTTTTTTTT 配列の DNA⁷⁰ で刺激したときの NF- κ B 活性を示した。

3.2.7. マウス TLR9 の溶液構造

マウス TLR9 と CpG DNA の 2:2 複合体の結晶構造は得られなかったため、構造情報を得るために、2.2.7 項に従って、SEC-SAXS 解析を行った。SAXS 測定前のゲル濾過クロマトグラフィーにおいて、CpG DNA 共存下のマウス TLR9 と CpG DNA/5'-xCx DNA 共存下のマウス TLR9 は同じ位置に溶出し、溶液散乱曲線を重ね合わせたところ、よく一致していた (図 42)。これは両者の構造が似ていることを示している。一方で、CpG DNA 共存下のウマ TLR9 と CpG DNA/5'-xCx DNA 共存下のウマ TLR9 は、SAXS 測定前のゲル濾過クロマトグラフィーにおいてそれぞれ単量体と二量体と思われる位置に溶出し、溶液散乱曲線も異なるパターンを示していたことから、ウマ TLR9 が CpG DNA と 5'-xCx DNA の共存下でのみ二量体化するというゲル濾過解析の結果 (図 14) を反映していた。これらの結果は、CpG DNA 単独で誘導されるマウス TLR9 の二量体と、CpG DNA と 5'-xCx DNA の共存下で誘導されるマウス TLR9 の二量体の構造が似ていることを示唆しており、CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型マウス TLR の構造学的特徴は、CpG DNA 結合型マウス TLR9 においても共通するものと考えられる。

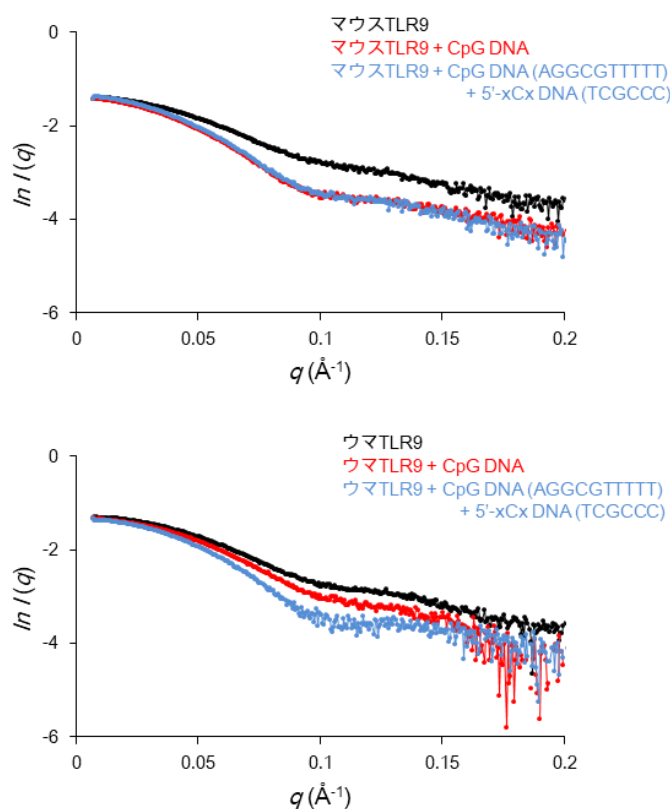


図 42. SAXS 解析

TLR9 のみ (黒色), CpG DNA 共存下 (赤), CpG DNA および 5'-xCx DNA 共存下 (青) のマウス TLR9 (上) およびウマ TLR9 (下) の散乱曲線。

4. 考察

4.1. 2 種類の DNA による TLR9 の活性化機構

4.1.1. TLR9 の活性化に必要な配列

本研究により, TLR9 は CpG DNA と 5'-xCx DNA の 2 つの DNA 結合部位をもつことが明らかになった。まず CpG DNA が 1 つの TLR9 分子に結合し, その後 5'-xCx DNA が結合することで TLR9 の二量体化を促進することが分かった (図 43)。

最近 Jerala らのグループにより, ヒトおよびマウス由来の TLR9 を活性化させる最小の DNA 配列の系統的研究が行われ, ヒト TLR9 の最小の配列が TCGT⁶⁻¹⁰CGT⁹⁻¹⁹ (21-35 塩基) であり, 5'末端の TCG 配列が活性化に重要であることが示された⁶⁴。彼らはまた, 既知の CpG DNA 結合部位とは異なる第二の DNA 結合部位が存在することを予想し, TLR9 における TLR7 および TLR8 の低分子化合物結合部位に相当する残基の変異体解析を行い, その結果, ヒト TLR9 における Tyr345, Phe375, Arg377, Phe402, Asp534, Tyr536, Gly560 が第二の DNA の認識に関わる残基であると予想している⁷⁷。これらの残基は, 本研究において 5'-xCx DNA の認識に重要であることが示されており, 本研究の結果と一貫していた。以前の研究において, 5'-xCx モチーフをもたない DNA1668_12mer (CATGACGTTTCCT) を単独で用いたときには, ウマ TLR9 とウシ TLR9 の二量体形成および活性化は弱い一方で, 全長の DNA1668 (TCCATGACGTTTCCTGATGCT) は TLR9 を十分に活性することが分かっている³²。これは全長の DNA1668 が CpG モチーフと 5'-xCx モチーフの両方のモチーフをもつためだと考えられる。

ヒト TLR9 の活性化に最適化した配列には (minH75: TCGT⁷CGT¹²) 2 つの CpG モチーフが存在しているため, Jerala らは, 5'末端の最初の CpG モチーフ (本論文で 5'-xCx モチーフとしているもの) が CpG 結合部位に結合し, 2 番目の CpG モチーフが 5'-xCx 結合部位に結合して 2:2 の複合体を形成すると予想していた⁷⁷。しかし今回の結果から, 5'-xCx DNA 結合部位には 5'末端の TCG モチーフだけが結合し, 2 番目の CpG モチーフは結合できないことが明らかとなり, 結合部位はこの予想の反対であることを強く示唆していた。5'-xCx DNA の 5'末端の OH 基は Tyr345 と水素結合を形成しており, 5'-xCx DNA 結合部位の底面は TLR9 二量体の 2 つのプロトマー間で TLR9 の LRR8 のループ領域および LRR10-12 の凹面と TLR9* の LRR18-19* のループ領域の相互作用により閉じられているため (図 20, 図 23B, C), 2 つのプロトマー間に DNA が通る間隙が存在しない。実際, 5'-xCx DNA の 5'末端へのリン酸基の付加により結合親和性が著しく低下した (図 15, 表 6)。従って, 我々の構造において 2 つの DNA は二量体界面で隔てられており, 単一の DNA が 2 つの結合部位に結合するためには 2 つのモチーフ間に少なくとも 10 塩基以上のスペースが必要であると考えられた。ヒト TLR9 の

活性化に最適化した配列 (minH75: TCGT⁷CGT¹²) においては, 2つのモチーフの間が 10 塩基以下であり, この配列の場合には別々の DNA 断片により 2:2:2 の複合体を形成しているモデルが妥当と考えられる。しかし, 2つのモチーフ間の長さによっては, 1つの DNA 分子中の 2つのモチーフが 2つの結合部位に同時に結合し, 2:2 の複合体を形成することができると考えられる (図 43)。また Jerala らは, 5'-TCG モチーフをもつ短い ssDNA が CpG DNA と協調的に TLR9 の活性を増強することも報告している⁶⁵。この報告は本研究における TLR9 の活性化モデルとも一貫するものである。

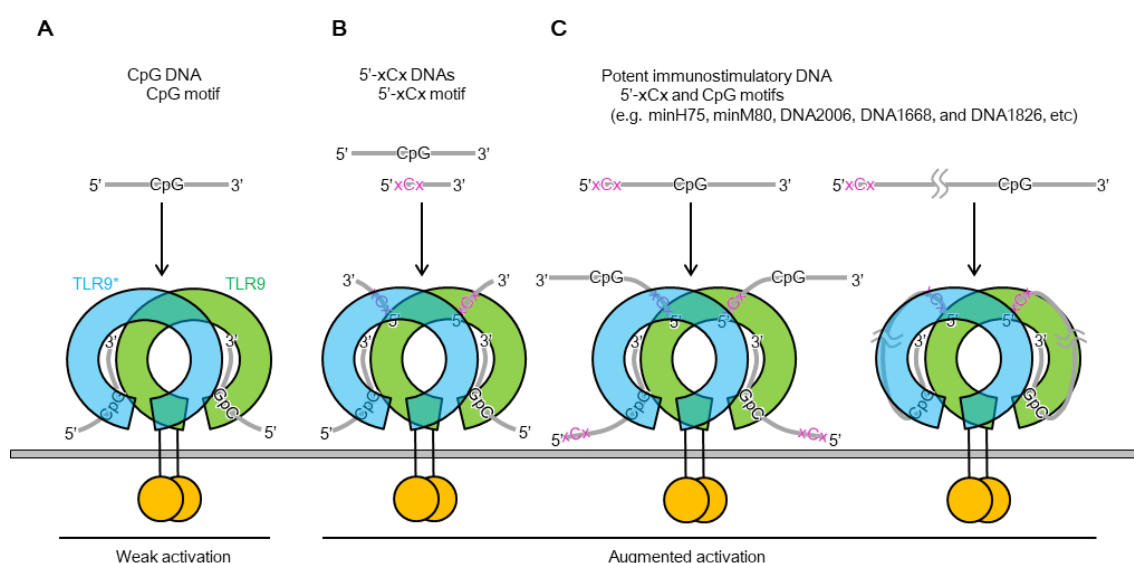


図 43. TLR9 活性化機構のモデル図

(A) CpG モチーフは TLR9 に結合し, 弱い活性化を引き起こす。(B) 5'-xCx DNA は単独では TLR9 に結合しないが, TLR9 の CpG モチーフ結合部位が占有されているとき結合し, 活性化を引き起こす。(C) CpG モチーフと 5'-xCx モチーフを含む DNA は, CpG モチーフと 5'-xCx モチーフの間の長さが 10 塩基未満の場合は左のような 2:2:2 複合体を形成し, 10 塩基以上あるものは左の 2:2:2 複合体と右の 2:2 複合体の 2 種類の結合様式をとる可能性がある。

4.1.2. CpG DNA の class との関連

TLR9 の活性化における 5'-xCx モチーフの必要性は, TLR9 が DNA の分解産物を認識していることを強く示唆している。実際, Chan らは DNase II による DNA の分解が TLR9 による class A CpG DNA の認識に重要であること, DNase II により生じた 5'末端に TCG 配列をもつ class A CpG DNA の断片が, 骨髄由来樹状細胞における TLR9 のシグナル伝達を効率的に誘導することを示している⁶¹。

class A CpG DNA は I 型インターフェロンを, class B CpG DNA は炎症性サイトカ

インを優位に誘導するが、これらは DNA の二次構造によってエンドサイトーシスのルートが異なるためと考えられる⁶⁰⁻⁶²。class A CpG DNA は pDC で I 型インターフェロンの産生を、class B CpG DNA は B 細胞で炎症性サイトカインの産生を誘導する。本研究に使用した DNA はパリンδροーム配列を持たず、二重鎖などの二次構造をとっていないと考えられることから、class B CpG DNA に分類される。3.1.12 項において、BM-pDCs を CpG DNA と 5'-xCx DNA により共刺激したところ、class A CpG DNA である DNA1585 と同程度の IFN- α の産生が見られた (図 30)。これは、異なる細胞種においても、CpG と 5'-xCx の 2 つのモチーフが TLR9 の活性化に重要であることを示している。DNase には、中性条件ではたらく DNase I および III、酸性条件ではたらく DNase II の 3 つのファミリーが存在し、それぞれ循環系、細胞質、リソソームに局在している。DNase I は分解産物に 5'リン酸末端を持つ断片を生じることが知られているが、DNase II は 3'リン酸末端を持つ断片を生じる⁷⁸。これは本研究において、TLR9 の 5'-xCx DNA 結合サイトが 5'ヒドロキシ末端の DNA を認識しているという結果とも一貫していた。

4.1.3. TLR7 サブファミリーに共通した活性化機構

本研究により、一本鎖の核酸を認識する TLR7, TLR8, TLR9 が、2 種類のリガンドにより協調的に二量体を形成するという活性化機構を共通してもつことが明らかになった。TLR7 と TLR8 におけるモノヌクレオシドと TLR9 における 5'-xCx DNA は、いずれもこれら受容体の LRR 構造の中央部分に結合していた。5'-xCx DNA の 2 番目のシトシン塩基は TLR9 との結合に重要であり、TLR7 におけるグアノシンおよび TLR8 におけるウリジンと同じ位置を占有していた。また、TLR7 サブファミリー間で保存された Phe 残基とのスタッキング相互作用と Asp 残基との水素結合による認識も共通している (ウマ TLR9 における Phe402 および Asp534*)。これらのリガンドは 2 つのプロトマーから同時に認識されているため、TLR の二量体化に直接貢献していると考えられる。しかしながら、もう一方の結合部位である TLR7 および TLR8 における ssRNA 結合部位と、TLR9 における CpG DNA 結合部位は、結合位置も二量体化における役割も異なっていた。CpG DNA は単独でも TLR9 の二量体化を弱いながらも誘起するが、TLR7 や TLR8 への ssRNA の結合は二量体化を引き起こさない。すなわち、TLR9 において CpG DNA はアゴニストであり、TLR7 および TLR8 における ssRNA は、グアノシンあるいはウリジンの結合のエンハンサーであると考えられる。

4.2. マウス TLR9 の活性化型二量体の構造解析

以前より、CpG モチーフを含む 6 塩基のコンセンサス配列に種特異性があることが知られていた (マウス TLR9 においては GACGTT^{53,66} あるいは AACGTT⁶⁷, その他の

脊椎動物の TLR9 では GTCGTT^{68,69})。また、ヒト TLR9 の活性化には CpG モチーフに加えて 5'末端の TCG モチーフが必要とされる一方で、マウス TLR9 は単一の CpG モチーフでも十分に活性化することが報告された^{64,70}。マウスは実験動物として臨床研究においても広く用いられていることから、ヒトとマウスの間での反応性の違いを明らかにすることは、TLR9 を標的とする薬剤の開発において重要な意味をもつと考えられる。しかしながら、CpG DNA によるマウス TLR9 活性化型の構造が得られていなかったために、CpG DNA による TLR9 活性化の種特異性は明らかになっていなかった。

本研究において、我々はマウス TLR9 と CpG DNA および 5'-xCx DNA との複合体の活性化型二量体の結晶構造を決定し、CpG DNA と 5'-xCx DNA の認識機構がウマ、ウシ、マウス TLR9 の間で高度に保存されていることを明らかにした。マウス TLR9 の活性化型二量体の構造解析の結果、CpG DNA 結合部位はマウスとウマの間で高度に一致しており、CpG モチーフを含む 6 塩基のコンセンサス配列が、マウスとその他の種で異なる要因となるような構造的な違いは認められなかった (図 36)。一方で、マウス TLR9 の CpG DNA 単独での活性化に寄与すると考えられる違いが明らかになった。実際、マウスに特異的な残基である Ile643 に変異を導入することで、CpG DNA によるマウス TLR9 の二量体化が阻害された。これに加えて、レポーターアッセイにより、マウス特異的な残基である Leu106 と Ile643 がマウス TLR9 の活性化において重要であることが明らかになった。アミノ酸配列比較によると、これら 2 つの残基は Murinae (ネズミ亜科) に特異的であった (図 8)。また、CpG DNA を介する相互作用に加えて、ウマおよびマウス TLR9 の二量体界面では、それぞれ異なる残基によってタンパク質間相互作用が形成されていた。構造中のこれらの局所的な違いが、全体構造の類似性にも関わらず、マウス TLR9 が他種の TLR9 よりも CpG DNA によって二量体化を引き起こしやすい要因になっている可能性が考えられる。

本研究により、異なる種間での二量体形成機構における相違点が明らかになった一方で、CpG と 5'-xCx という 2 種類のモチーフをもつ DNA が同時に TLR9 に結合することで二量体化が促進されるという基本的な活性化機構は共通していることが明らかになった。これらの知見は TLR9 の活性を制御する薬剤の開発と臨床研究において重要な情報を提供し、TLR9 を標的とする薬剤の開発に貢献すると考えられる。

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**, 138 (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**, 878–84 (2002).
5. Takeuchi, O. *et al.* Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol.* **13**, 933–940 (2001).
6. 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).
7. Poltorak, A. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science (80-.).* **282**, 2085–2088 (1998).
8. Shimazu, R. *et al.* MD-2, a Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4. *J. Exp. Med.* **189**, 1777–1782 (1999).
9. Hayashi, F. *et al.* The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099–1103 (2001).
10. 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).
11. Heil, F. *et al.* Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526–9 (2004).
12. Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529–31 (2004).
13. Lund, J. M. *et al.* Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 5598–5603 (2004).
14. Hemmi, H. *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740–745 (2000).
15. Bauer, S. *et al.* Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9237–42 (2001).

16. 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).
17. Kang, J. Y. *et al.* Recognition of Lipopeptide Patterns by Toll-like Receptor 2-Toll-like Receptor 6 Heterodimer. *Immunity* **31**, 873–884 (2009).
18. Liu, L. *et al.* Structural Basis of Toll-Like Receptor 3 Signaling with Double-Stranded RNA. *Science (80-.).* **320**, 379–381 (2008).
19. Park, B. S. *et al.* The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* **458**, 1191–1195 (2009).
20. Yoon, S. Il *et al.* Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. *Science (80-.).* **335**, 859–864 (2012).
21. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805–20 (2010).
22. O'Neill, L. A. J. & Bowie, A. G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 353–364 (2007).
23. Hoshino, K. *et al.* I κ B kinase- α is critical for interferon- α production induced by Toll-like receptors 7 and 9. *Nature* **440**, 949–953 (2006).
24. Honda, K. *et al.* IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**, 772 (2005).
25. Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T. & Seya, T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat. Immunol.* **4**, 161–7 (2003).
26. Yamamoto, M., Sato, S. & Hemmi, H. Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-Like Receptor Signaling Pathway. *Science (80-.).* **301**, 640–643 (2003).
27. Sasai, M. *et al.* Cutting Edge: NF- κ B-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN regulatory factor 3 activation. *J. Immunol.* **174**, 27–30 (2005).
28. Häcker, H. *et al.* Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* **439**, 204–207 (2006).
29. Oganessian, G. *et al.* Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* **439**, 208–211 (2006).
30. 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).
31. Tanji, H. *et al.* Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 109–116 (2015).
 32. Ohto, U. *et al.* Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9. *Nature* **520**, 702–705 (2015).
 33. Song, W. *et al.* Structural basis for specific recognition of single-stranded RNA by Toll-like receptor 13. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 782–7 (2015).
 34. Roach, J. C. *et al.* The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 9577–9582 (2005).
 35. Ewald, S. E. *et al.* The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* **456**, 658–62 (2008).
 36. 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).
 37. Sepulveda, F. E. *et al.* Critical Role for Asparagine Endopeptidase in Endocytic Toll-like Receptor Signaling in Dendritic Cells. *Immunity* **31**, 737–748 (2009).
 38. 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).
 39. 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).
 40. Renn, C. N. *et al.* TLR Activation of Langerhans Cell-Like Dendritic Cells Triggers an Antiviral Immune Response. *J. Immunol.* **177**, 298–305 (2006).
 41. 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).
 42. 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).
 43. Suzuki, N. *et al.* Severe impairment of interleukin-1 and toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* **416**, 750–754 (2002).
 44. Kobayashi, K. *et al.* IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor

- signaling. *Cell* **110**, 191–202 (2002).
45. Kawai, T. *et al.* Interferon- α induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat. Immunol.* **5**, 1061–1068 (2004).
 46. Shinohara, M. L. *et al.* Osteopontin expression is essential for interferon- α production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Immunol.* **7**, 498–506 (2006).
 47. Krieg, A. M. & Vollmer, J. Linking Innate Immunity To Autoimmunity. *Immunol. Rev.* **220**, 251–269 (2007).
 48. Leadbetter, E. A. *et al.* Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* **416**, 603–607 (2002).
 49. Vollmer, J. *et al.* Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J. Exp. Med.* **202**, 1575–1585 (2005).
 50. Blasius, A. L. & Beutler, B. Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity* **32**, 305–315 (2010).
 51. Bird, A. P. CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus. *Trends Genet.* **3**, 342–347 (1987).
 52. Burge, C., Campbell, A. M. & Karlin, S. Over- and under-representation of short oligonucleotides in DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 1358–62 (1992).
 53. Krieg, A. M. *et al.* CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**, 546–549 (1995).
 54. Ballas, Z. K., Rasmussen, W. L. & Krieg, A. M. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J. Immunol.* **157**, 1840–5 (1996).
 55. Kimura, Y. *et al.* Binding of oligoguanylate to scavenger receptors is required for oligonucleotides to augment NK cell activity and induce IFN. *J. Biochem.* **116**, 991–994 (1994).
 56. Krieg, A. M. Now I know my CpGs. *Trends Microbiol.* **9**, 249–252 (2001).
 57. Lipford, G. B. *et al.* Immunostimulatory DNA: Sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. *Eur. J. Immunol.* **27**, 3420–3426 (1997).
 58. Hartmann, G. *et al.* Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN- α induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **33**, 1633–41 (2003).
 59. Vollmer, J. *et al.* Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes

- with distinct immunostimulatory activities. *Eur. J. Immunol.* **34**, 251–262 (2004).
60. Samulowitz, U. *et al.* A novel class of immune-stimulatory CpG oligodeoxynucleotides unifies high potency in type I interferon induction with preferred structural properties. *Oligonucleotides* **20**, 93–101 (2010).
 61. Chan, M. P. *et al.* DNase II-dependent DNA digestion is required for DNA sensing by TLR9. *Nat. Commun.* **6**, 5853 (2015).
 62. Yu, D. *et al.* Impact of secondary structure of toll-like receptor 9 agonists on interferon alpha induction. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 4320–4325 (2008).
 63. Latz, E. *et al.* Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat Immunol* **8**, 772–779 (2007).
 64. Pohar, J., Kužnik Krajnik, A., Jerala, R. & Benčina, M. Minimal Sequence Requirements for Oligodeoxyribonucleotides Activating Human TLR9. *J. Immunol.* **194**, 3901–3908 (2015).
 65. Pohar, J. *et al.* Short single-stranded DNA degradation products augment the activation of Toll-like receptor 9. *Nat. Commun.* **8**, 15363 (2017).
 66. Yi, A. K., Chang, M., Peckham, D. W., Krieg, A. M. & Ashman, R. F. CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J. Immunol.* **160**, 5898–906 (1998).
 67. Sen, G. *et al.* The critical DNA flanking sequences of a CpG oligodeoxynucleotide, but not the 6 base CpG motif, can be replaced with RNA without quantitative or qualitative changes in Toll-like receptor 9-mediated activity. *Cell. Immunol.* **232**, 64–74 (2004).
 68. Hartmann, G. & Krieg, A. M. Mechanism and Function of a Newly Identified CpG DNA Motif in Human Primary B Cells. *J. Immunol.* **164**, 944–953 (2000).
 69. Rankin, R. *et al.* CpG Motif Identification for Veterinary and Laboratory Species Demonstrates That Sequence Recognition Is Highly Conserved. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **11**, 333–340 (2001).
 70. Pohar, J. *et al.* Species-Specific Minimal Sequence Motif for Oligodeoxyribonucleotides Activating Mouse TLR9. *J. Immunol.* **195**, 4396–4405 (2015).
 71. Otwinowski, Z. & Minor, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307–326 (1997).
 72. Kabsch, W. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement.

- Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 133–144 (2010).
73. Vagin, A. A. & Teplyakov, A. Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 22–25 (2010).
 74. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–32 (2004).
 75. Murshudov, G. N. *et al.* REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67**, 355–367 (2011).
 76. Shimizu, N. *et al.* Software development for analysis of small-angle x-ray scattering data. *AIP Conf. Proc.* **1741**, (2016).
 77. Pohar, J. *et al.* Selectivity of Human TLR9 for Double CpG Motifs and Implications for the Recognition of Genomic DNA. *J. Immunol.* **198**, 2093–2104 (2017).
 78. HAROSH, I., BINNINGER, D. M., HARRIS, P. V., MEZZINA, M. & BOYD, J. B. Mechanism of action of deoxyribonuclease II from human lymphoblasts. *Eur. J. Biochem.* **202**, 479–484 (1991).

6. 謝辞

本研究を行う上で多くの御指導，御助力を賜り，また博士号取得という得難い機会を与えてくださいました清水敏之 教授に深く感謝申し上げます。本研究だけでなく，研究全般にわたる多大な御指導，御支援を賜りました大戸梅治 博士に心から感謝申し上げます。困難に直面した際にはいつも手厚く，辛抱強く御支援くださいました。大戸先生の御尽力がなければ，本研究を遂行し学位論文にまとめることはできなかったと痛感しております。また共同研究者として，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，佐藤亮太 博士に，多くの活性測定試験を行っていただきました。この場を借りて心から御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり，多くの御助言を頂くとともに，いつもあたたかく励ましてくださいました奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 藤間祥子 博士に深く感謝申し上げます。X線回折実験において，高度な専門技術と昼夜を問わない御支援により，本研究に大変なお力添えを賜りました大型放射光施設 **SPring-8, Photon Factory** のビームラインスタッフの皆様に，この場を借りて心より感謝申し上げます。最後に，研究室生活を送るうえで，いろいろと至らない点の多い私を理解し助けてくださいました蛋白構造生物学教室の室員の方々に深く感謝いたします。