

論文の内容の要旨

論文題目 自然免疫受容体 TLR9 活性化機構の構造生物学的研究

氏名 石田 英子

【背景】

Toll-like receptors (TLR) は、病原体の分子パターンを認識して自然免疫を活性化させる I 型膜貫通タンパク質である。TLR9 は、エンドソームに局在し細菌やウイルス由来の一本鎖 DNA (ssDNA) の非メチル化 CpG 配列 (CpG モチーフ) を認識し、炎症性サイトカインや I 型インターフェロンの産生を誘導する。TLR は一般的に単量体で存在し、リガンド結合によって二量体を形成することで活性化状態となりシグナルを伝達すると考えられている (図 1)。これまでに TLR9 と CpG モチーフをもつ DNA (CpG DNA) との 2:2 複合体の結晶構造が解明されている (図 2, 文献 1)。しかし、CpG DNA 単独での TLR9 の二量体化は非常に弱く、実際の TLR9 の活性化には CpG DNA に加えて他の因子が介在している可能性が示唆された。最近の研究で、CpG DNA の 5'末端側の配列が TCG あるいは TCC であるものは、そうでないものと比較して TLR9 を効率的に活性化することが報告された (文献 2, 3)。これらの報告から、TLR9 には CpG DNA の結合部位とは異なる第 2 の DNA 結合部位が存在し、2 種類の DNA によって TLR9 の活性が制御されていることが推測された。本研究では、TLR9 の第 2 の DNA 結合部位を同定し、結合する DNA の配列特異性および結合様式を示し、2 種類の DNA が同時に TLR9 に結合することでより効率的に活性化する機構を明らかにした。

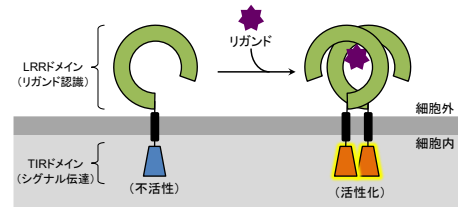


図 1. TLR の活性化機構

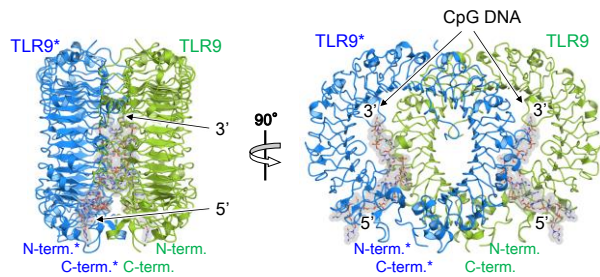


図 2. TLR9 と CpG DNA との複合体構造 (文献 1)

している可能性が示唆された。最近の研究で、CpG DNA の 5'末端側の配列が TCG あるいは TCC であるものは、そうでないものと比較して TLR9 を効率的に活性化することが報告された (文献 2, 3)。これらの報告から、TLR9 には CpG DNA の結合部位とは異なる第 2 の DNA 結合部位が存在し、2 種類の DNA によって TLR9 の活性が制御されていることが推測された。本研究では、TLR9 の第 2 の DNA 結合部位を同定し、結合する DNA の配列特異性および結合様式を示し、2 種類の DNA が同時に TLR9 に結合することでより効率的に活性化する機構を明らかにした。

【方法】

ウマ、ウシ、マウス由来の TLR9 の細胞外ドメイン全長の C 末端にトロンピン認識配列および protein A タグを付加したコンストラクトを用い、ショウジョウバエ S2 細胞で発現させた。培養上清から TLR9 を高純度精製し、性状解析用サンプル (糖鎖非短縮) と結晶化用サンプル (糖鎖短縮) を得た。結晶の品質向上を目的として、ウマおよびウシ TLR9 は糖鎖生合成阻害剤キフネンシン存在下で培養し、精製時に酵素により糖鎖を短縮した。マウス TLR9 はあらかじめ糖鎖結合可能部位に変異を導入して糖鎖付加を阻害し、性状解析用サンプルと同様に精製を行った。得られた結晶化用 TLR9 を用いて、CpG DNA と 5'-TCG DNA との共結晶化を行った。CpG DNA として AGGCGTTTTT 配列の DNA を、第 2 の結合部位に結合する DNA (5'-TCG DNA) は、2 番目のシトシン以外の塩基をさまざまな塩基に置換した DNA を結晶化に使用し、分解能 1.81-2.70 Å で構造決定した。また、等温滴定型カロリメトリー法 (ITC) により、TLR9 に対する CpG DNA

あるいは 5'-TCG DNA の結合親和性、および CpG DNA 共存下の TLR9 に対する 5'-TCG DNA の結合親和性を求めた。さらに、ゲルろ過法により、各 DNA の結合に伴う TLR9 の二量体化を調べた。

【結果】

1. 2種類の DNA による TLR9 の活性化機構

ITC とゲルろ過法により、CpG DNA は TLR9 に結合するが二量体化は引き起こさないことが示された (図 3, 表 1)。5'-TCG DNA はそれ単独では TLR9 に対して全く結合しないが、CpG DNA 共存下の TLR9 に対しては CpG DNA と同時に結合し、TLR9 の二量体化を顕著に引き起こすことが明らかになった。興味深いことに、マウス TLR9 では CpG DNA 単独でも二量体化が観察された。さらに TLR9 の第 2 の DNA 結合部位の配列特異性を ITC で調べた結果、CpG DNA 共存下の TLR9 に対して、5'末端から 2 番目がシトシンである DNA

(5'-xCx DNA) が結合することが明らかになった (表 1)。

TLR9 と CpG DNA と 5'-xCx DNA の三者複合体における各 DNA の結合様式を明らかにするために、結晶構造解析を行った。その結果、TLR9 と CpG DNA と 5'-xCx DNA は、2:2:2 の複合体を形成していた (図 4A)。TLR9 の二量体構造および CpG DNA の結合様式は、以前報

告された CpG DNA との 2:2 複合体のものとよく一致していた (文献 4)。5'-xCx DNA は新規の結合部位に結合し、5'末端側から 1 番目のチミンと 3 番目のグアニンが比較的ゆるく認識されていたのに対し、2 番目のシトシンは TLR9 の 2 つのプロトマーから緊密に認識されていた (図 4B-E)。5'末端の OH 基は Tyr345 と直接水素結合を形成し、さらにその周囲を周辺残基によって囲まれているため、この部位で追加の塩基やリン酸基を収納することは難しいと考えられる (図 4C, 表 1)。また、2 番目のシトシンと TLR9* (以下では、一方のプロトマーを無印で、他方のプロト

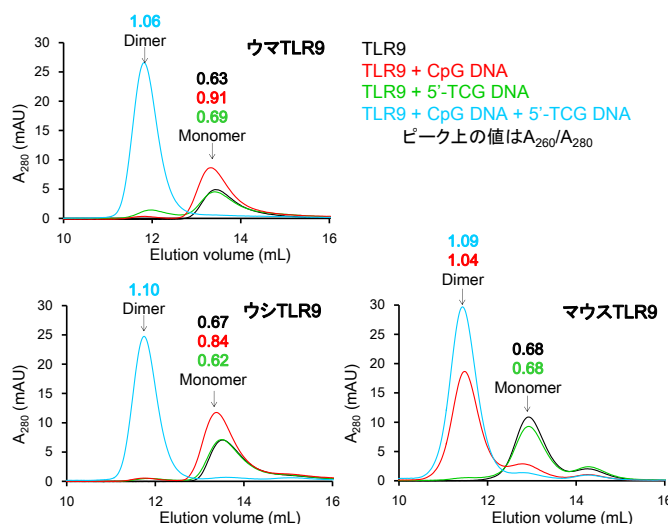


図 3. ゲルろ過クロマトグラフィーによる TLR9 と CpG DNA および 5'-xCx DNA の結合確認

表 1 ITC による結合親和性の測定

Cell	Titrant	K_d (nM)				
		ウマTLR9	ウシTLR9	マウスTLR9		
TLR9	AGGCGTTTTT	97	320	21	→ CpG DNA 単独	
	TCGCC	ND	ND	ND	→ 5'-TCG DNA 単独	
TLR9+CpG DNA (AGGCGTTTTT)	TCGCC	21	44	7.2	1塩基目置換	
	ACGCC	352	330	210		
	C CGCC	20	32	120		
	GCGCC	34	45	12	2塩基目置換	
	TAGCC	ND	ND	ND		
	TTGCC	ND	ND	ND		
	TGGCC	ND	ND	ND	3塩基目置換	
	TCACCC	39	160	11		
	TCTCC	19	5.1	6.4		
	TCCCC	40	15	12	CpG配列の逆転	
	TGCC	ND	ND	ND		
	p-TGCC	ND	ND	ND		末端への塩基またはリン酸基の付加
	TCGCC-p	12	17	6.9		
TTGCC	ND	ND	ND			

ND : Not determined.

マーとそれに属する残基はアスタリスクを付して表記する) の Asp534*, Gly565*との間の水素結合はシトシン塩基特異的であり,この位置でのシトシン選択性を説明すると考えられる(図4D)。これらは5'末端から2番目にシトシンをもつDNAがTLR9に結合するという結合実験の結果と一貫するものであった。

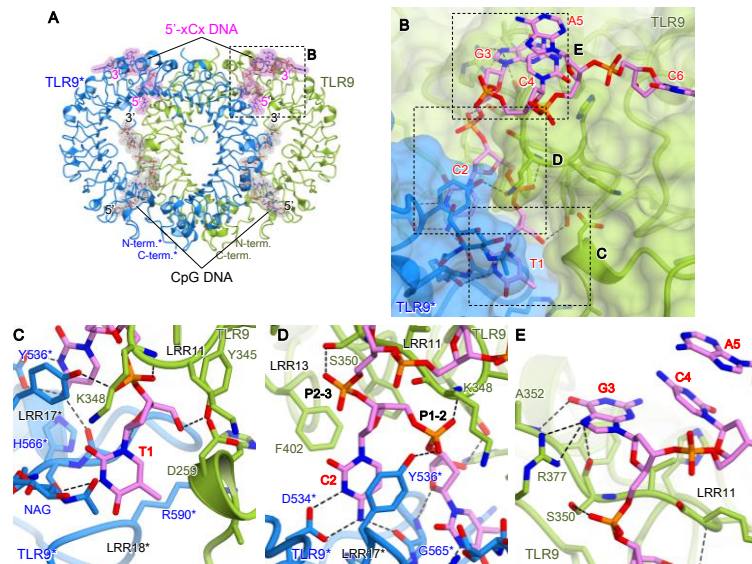


図4. CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型ウマの構造(文献4) (A) CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型 TLR9 の正面図。(B) 5'-xCx DNA 結合部位の拡大図。(C)-(E) 1, 2, 3-5 塩基目の認識の拡大図。水素結合を黒色の破線で示した。

2. マウス TLR9 の活性化型二量体の構造解析

前章のゲルろ過法での DNA 結合実験において, マウス TLR9 はウマやウシ TLR9 と異なり, CpG DNA だけで安定な二量体を形成した。このマウス TLR9 の活性化においてみられる種特異性を理解するために, マウス TLR9 と CpG DNA と 5'-xCx DNA との三者複合体の結晶構造解析を行った。構造解析の結果, マウス TLR9 においても TLR9 と CpG DNA と 5'-xCx DNA は 2:2:2 複合体を形成しており(図5), TLR9 二量体の構造, CpG DNA および 5'-xCx DNA の結合様式は, 前述のウマ TLR9 の 2:2:2 複合体と共通していた(文献5)。マウス TLR9 と CpG DNA との結合部位には, 前章で述べたようなすべての種で共通した CpG モチーフ部分の認識に加えて, Ile643*の側鎖が CpG DNA とより広い面積で接触するとともに, Pro105, Leu106, Ile643*, Phe668*の間で相補的な形状で疎水性相互作用が形成されていた。一方で, ウマ TLR9 では, マウス TLR9 の Leu106, Ile643*に相当する残基はそれぞれ Met106, Thr642*であり, この部位の相互作用の形状相補性はマウス TLR9 に比べて好ましくないと考えられる。実際, マウス TLR9 の Leu106 と Ile643 を該当するヒトの残基(それぞれ Met と Thr) に改変した変異体は活性が減

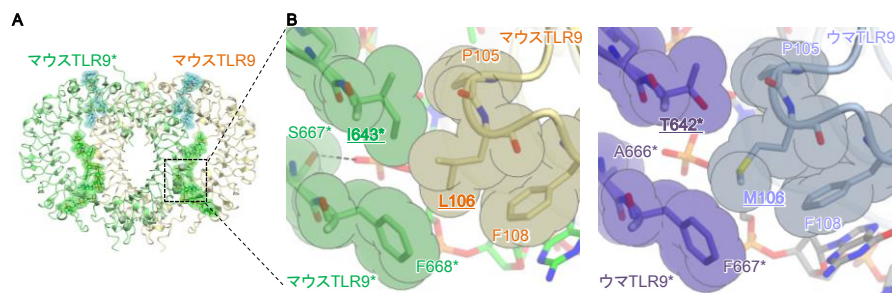


図5. マウス TLR9 に特異的な CpG DNA 結合部位近傍の疎水性相互作用(文献5) (A) CpG DNA/5'-xCx DNA 結合型マウス TLR9 の全体構造, (B) マウス TLR9 (左) とウマ TLR9 (右) の CpG DNA 認識部位の拡大図。

弱した。これらの相互作用の違いが、マウス TLR9 が CpG DNA 単独で二量体化を引き起こし活性化する一因になっている可能性がある。

【結論】

今回の結果から、TLR9 が TLR7 および TLR8 と同様に 2 種類のリガンドにより相乗的に活性化されることが解明された (文献 6, 7)。CpG DNA だけでは TLR9 の二量体化と活性化は弱く、ここにさらに 5'-xCx DNA が結合することで二量体化と活性化が増強される (図 6)。ただし、マウス TLR9 は、種特異的な相互作用によって二量体を形成しやすいため、CpG DNA 単独でも十分な活性を示す。本研究によって得られた知見は、TLR9 の活性化機構を理解するうえで重要な構造的基盤を提供し、TLR9 を標的とした薬剤の開発に貢献すると考えられる。

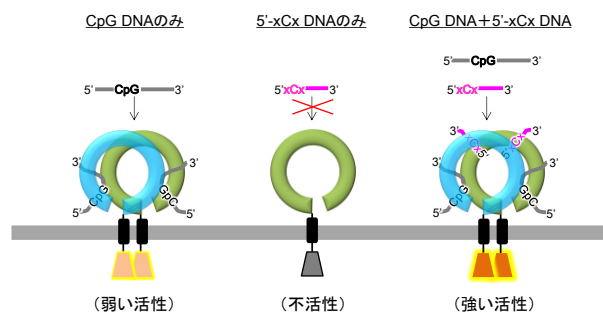


図 6. TLR9 の活性化機構の模式図

【参考文献】

1. Ohto, U. *et al.* (2015) Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9. *Nature* **520**, 702–705.
2. Pohar, J. *et al.* (2015) Species-Specific Minimal Sequence Motif for Oligodeoxyribonucleotides Activating Mouse TLR9. *J. Immunol.* **195**, 4396-4405.
3. Pohar, J. *et al.* (2015) Minimal sequence requirements for oligodeoxyribonucleotides activating human TLR9. *J. Immunol.*, **194**, 3901-3908.
4. Ohto, U.*, Ishida, H.* *et al.* (2017) Toll-like receptor 9 contains two DNA binding sites that function cooperatively to promote receptor dimerization and activation. *Immunity* **48**, 649-658. (* co-first author)
5. Ishida, H. *et al.* (2018) Structural basis for species - specific activation of mouse Toll - like receptor 9. *FEBS letters*, **592**, 2636-2646.
6. Zhang, Z. *et al.* (2016) Structural Analysis Reveals that Toll-like Receptor 7 is a Dual Receptor for Guanosine and Single-Stranded RNA. *Immunity*. **45**, 737–748.
7. Tanji, H. *et al.* (2015) Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 109-115.