

審査の結果の要旨

氏名 石田 英子

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 の非メチル化 CpG モチーフを認識することで、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。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。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。これに関連して、TLR9 と同じサブファミリーに属し、ウイルスや細菌由来の一本鎖 RNA を認識する TLR7 と TLR8 は、一本鎖 RNA とモノヌクレオシドという 2 つの異なるリガンドを同時に認識することで活性が増強することが明らかにされている。以上のことから、TLR9 には CpG DNA の結合部位とは異なる第二の 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る。一方で、マウス TLR9 はヒト TLR9 と異なり、CpG DNA 単独でも十分な活性を示す種特異性があることが報告されている。これまで TLR9 の第二の DNA 結合部位や、TLR9 活性化の種特異性に関する構造生物学的な知見は得られていなかった。本論文は、TLR9 について、2 種類の DNA による活性化機構と、活性化の種特異性に寄与する分子機構の解明を目指して行った研究成果について述べたものである。

はじめに、二種類の DNA による TLR9 の活性化機構について記述する。等温滴定型カロリメトリー法およびゲル濾過法を用い、各 DNA とウマ、ウシ、マウス由来の TLR9 との結合実験を行った。その結果、CpG DNA は TLR9 に強く結合するが二量体化は引きおこさないこと、5'-TCG DNA は単独では TLR9 に対してまったく結合を示さないことが明らかになった。一方、5'-TCG DNA は CpG DNA 共存下の TLR9 に対しては非常に強く結合し、TLR9 の二量体化を誘導した。ただし、マウス TLR9 においては CpG DNA 単独でも二量体化が観察された。5'-TCG DNA の配列置換体を用いたさらなる結合実験の結果、TLR9 の第二の DNA 結合部位には 5'末端から 2 塩基目にシトシンをもつ DNA (5'-xCx DNA) が結合することを見出した。2 種類の DNA の結合様式を明らかにすべく、TLR9 と CpG DNA および 5'-xCx DNA からなる三者複合体の結晶構造解析を行い、ウマおよびウシ由来の TLR9 について構造決定に成功した。TLR9 と CpG DNA と 5'-xCx DNA は 2:2:2 の複合体を形成しており、5'-xCx DNA は TLR9 のリング型

構造の上部で 2 分子の TLR9 には含まれた新規の結合部位に結合していた。5'-xCx DNA の 5' 末端側の 3 塩基は、2 分子の TLR9 には含まれる形で TLR9 と相互作用し、TLR9 の二量体化に寄与していた。2 番目のシトシンは TLR9 二量体の 2 つのプロトマーから複数の相互作用により緊密に認識され、特に Asp534*, Gly565* (二量体を構成する 2 分子の TLR9 の一方を無印で、他方をアスタリスクを付して表記する) との間の水素結合はシトシン塩基特異的であることから、2 番目の位置でのシトシンの選択性を説明すると考察している。また、2 番目のシトシンの結合部位は TLR7 と TLR8 におけるモノヌクレオシド結合部位と完全に一致しており、Phe402 とのスタッキング相互作用および Asp534* との水素結合はサブファミリー間で共通していたことから、TLR7 サブファミリーのリガンド認識におけるこれら相互作用の重要性について言及している。

次に、TLR9 の種特異的な活性化の分子機構について記述する。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。この種特異的な活性化機構を解明するために、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。その結果、マウス TLR9 においても TLR9 と CpG DNA と 5'-xCx DNA は 2:2:2 の複合体を形成しており、TLR9 二量体の構造、CpG DNA および 5'-xCx DNA の結合様式は、ウマおよびウシ TLR9 の 2:2:2 複合体と共通していた。マウス TLR9 と CpG DNA との結合部位には、すべての種で共通した CpG モチーフ部分の認識に加えて、Pro105, Leu106, Ile643*, Phe668* の間で相補的な形状で疎水性相互作用を形成しており、二量体形成に有利に働いていることを見出した。実際、マウス TLR9 のこれらの残基を該当するヒトの残基に改変した変異体を作製し、活性が減弱することを確認している。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かと考察している。

本研究により、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。CpG DNA 単独での TLR9 の二量体化および活性化は弱く、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。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だろう。

本論文は TLR9 の活性化機構に新たな知見を与えるものであり、博士 (薬科学) の学位請求論文として合格と認められる。