

博士論文

論文題目

Unc93B1 による Toll-like receptor(TLR)7 及び TLR9
の応答制御機構の解析

氏名 山本 千香子

Unc93B1 による Toll-like receptor(TLR)7 及び TLR9

の応答制御機構の解析

山本 千香子

目次

1. 要旨	4
2. 略語表	5
3. 序文	
自然免疫とToll様受容体(TLR)	7
TLRとUnc93B1	11
TLRの応答異常と疾患	14
核酸認識系TLRの修飾	15
本研究の目的	16
4. 方法	17
5. 結果	
Unc93B1のD34A変異によるTLR7及びTLR9との会合への影響	25
<u>TLR9の切断と応答の関係</u>	
切断されないTLR9変異体の作製の検討	29
TLR9変異体のリガンド応答性の解析	31
TLR9変異体のノックインマウスの作製	34
TLR9変異体ノックインマウスのmRNA量解析	37
TLR9変異体のin vivoでのリガンド応答性の解析	39
細胞の種類ごとのTLR9変異体のリガンド応答性の解析	41
細胞の種類ごとのTLR9切断の比較	48
<u>Unc93B1 D34が識別するTLR内分子構造の特定</u>	
TLR7、TLR9のキメラタンパク質の作製	52

TLR7・9 キメラと Unc93B1 の会合の比較	54
TLR7・9 キメラの切断の比較	55
TLR7・9 キメラのリガンド応答能の比較	58
細胞質領域内 TLR7・9 キメラの作製	63
細胞質領域内 TLR7・9 キメラのリガンド応答能の比較	63
6. 考察	
TLR9 のリガンド応答能は切断型 TLR9 の量に依存する可能性がある	67
TLR9 のタンパク質分解の可能性	68
免疫細胞の種類により TLR9 の応答能が異なる	70
今後の課題として完全に切断されない TLR9 の変異体の解析の必要性	71
Unc93B1 D34 依存的な TLR7、TLR9 の応答性バランスの制御は TLR7 及び TLR9 の細胞質領域の中でも C 末端側を識別することで制御される	73
TLR は局在を制御されることで、応答性が制御される	74
創薬標的としての TLR7、TLR9	77
7. 謝辞	78
8. 参考文献	79

1. 要旨

TLR7 及び TLR9 は核酸特異的病原体センサーである。Unc93B1 は TLR7、TLR9 の局在を制御することで、その応答性を決定する分子である。Unc93B1 D34A 変異体は、TLR7 の応答を増強し TLR9 の応答を低下させることで TLR7 依存的な自己免疫疾患を引き起こすが、その詳細な応答制御機構は不明な点が多い。本研究において、Unc93B1 D34A 変異体では TLR9 との会合が減少し、結果として TLR9 の細胞外ドメインの切断が減弱することを見出した。また、TLR9 の切断領域に変異を導入し、これを解析することにより、TLR9 の切断が応答に重要である可能性を示した。さらに、TLR7 と TLR9 の機能ドメインを組み合わせたキメラタンパク質を作製することで、Unc93B1 が D34 依存的に TLR7 と TLR9 を識別する部位を解析し、TLR の細胞質領域が重要であることを示した。これらの結果から、Unc93B1 による TLR7、TLR9 の制御機構を示している。

2. 略語表

PAMPs	・・・	Pathogen associated molecular patterns
PRR	・・・	pattern recognition receptor パターン認識受容体
TLR	・・・	Toll-like receptor Toll 様受容体
LRR	・・・	Leucine rich repeat
IL-1	・・・	interleukin-1
TIR	・・・	Toll/IL-1 receptor
NF- κ B	・・・	Nuclear Factor- κ B
IRF	・・・	Interferon regulatory factor
IL-6	・・・	interleukin-6
TNF α	・・・	Tumor Necrosis Factor α
INF α	・・・	interferon α
LPS	・・・	lipopolysaccharide
RNA	・・・	ribonucleic acid
DNA	・・・	deoxyribonucleic acid
Unc93B1	・・・	Unc93 homolog B1
SLE	・・・	systemic lupus erythematosus 全身性エリテマトーデス
FCS	・・・	fetal calf serum
IL-3	・・・	interleukin-3
2-ME	・・・	2-mercaptoethanol
5-FU	・・・	5-fluorouracil
GM-CSF	・・・	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor

M-CSF ... Macrophage Colony-Stimulating Factor

Flt3L ... Flt3 Ligand

cDC ... Myeloid dendritic cell

pDC ... Plasmacytoid dendritic cell

KI ... Knock-In

KO ... Knock out

MFI ... mean fluorescence intensity

TM ... trans membrane

CP ... cytoplasmic

3. 序文

自然免疫と Toll 様受容体(TLR)

ヒトなどの多細胞生物は、常に外来の病原体の侵入にさらされている。そのため、免疫系の活性化による病原体の認識・排除は多細胞生物が生存するのに重要な恒常性維持機構の一つである(1)。なかでも、自然免疫系は病原体侵入時に即座に誘導される免疫機構で、T 細胞や B 細胞などのリンパ球の活性化を誘発し、獲得免疫系と協調して働く免疫系である(2, 3)。

自然免疫応答は外来微生物に共通した様々な特徴的な分子構造(PAMPs : Pathogen associated molecular patterns)を病原体センサー(パターン認識受容体 PRR : pattern recognition receptor)が認識し、シグナルを伝達する(2)。病原体センサーは限られた種類しか存在せず、獲得免疫系受容体のような遺伝子再構成(4)が起きないことが特徴である。なかでも Toll 様受容体(TLR : Toll-like receptor)は最初に同定されたシグナル伝達を行う病原体センサーで、獲得免疫系を持たないショウジョウバエで感染防御反応を誘導する分子 Toll の哺乳類ホモログとしてクローニングされた(5, 6)。現在、ヒトでは 10 種類(TLR1~10)、マウスでは 12 種類(TLR1~9, 11~13)が同定されている。TLR は I 型膜タンパク質で、リガンド認識に関わるタンパク質結合モチーフの LRR (Leucine rich repeat)領域と IL-1 (interleukin-1)受容体のシグナル伝達ドメインと相同性を持つ TIR (Toll/interleukin-1 receptor)領域を持つ(7, 8)。TLRからのシグナルは NF- κ B (Nuclear Factor- κ B)や IRF (Interferon regulatory factor)などの活性化により、IL-6 (interleukin-6)や TNF α (Tumor Necrosis Factor α)などの炎症性サイトカインや INF α (interferon α)などの I 型インターフェロンの産生を誘導する(7)。さらに、抗原提示に参与する MHC Class II (major histocompatibility complex)や補助刺激分子

(CD69、CD80、CD86、CD40、etc.…)の発現を増強することで獲得免疫担当細胞の活性化を誘発する(9)。(Fig1)

TLR は認識する分子構造の特徴により大別される。TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6 は主に細胞表面に局在し、ペプチドグリカンやリポポリサッカライド(LPS)など微生物特有のタンパク質や脂質の構造を認識する。具体的には、TLR2 は TLR1/TLR2、TLR2/TLR6 のようにヘテロダイマーを形成し、リポタンパクを認識する(10, 11)。TLR4 は MD-2 と会合することでリガンドである LPS や脂肪酸と反応する(12-15)。TLR5 は、細菌などの鞭毛の成分であるフラジェリンなどのタンパク質と反応する(16)。(Fig2)

また、TLR3、TLR7、TLR9 は細胞内のエンドリソソームに局在し、エンドソームに取り込まれた細菌やウイルス由来の核酸を認識する。TLR3 は 2 本鎖 RNA を認識(17)し、TLR7 と TLR8 は 1 本鎖 RNA(18)を、TLR9 は非メチル化 CpG-DNA を認識する(19, 20)。TLR の局在は、TLR が正常に機能するうえで非常に重要であり、多くのアクセサリ分子によって制御されている(21)。(Fig2)

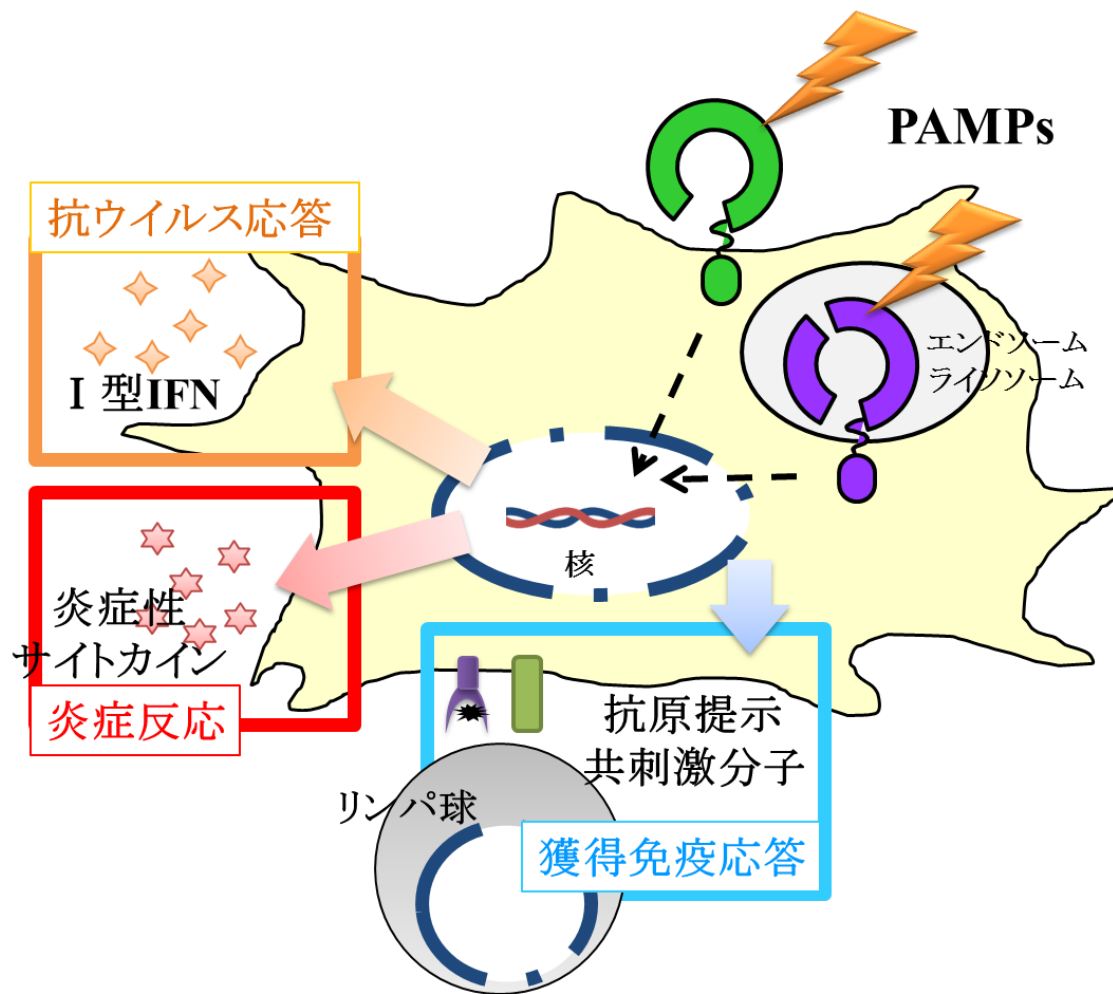


Fig1. 自然免疫応答とTLR

PAMPs の認識により、TLR は活性化しシグナルを伝達する。シグナルの伝達によって、炎症性サイトカイン産生による炎症応答の誘導や I 型インターフェロンの産生による抗ウイルス応答の誘導、抗原提示や共刺激分子の発現誘導による獲得免疫活性化の亢進などを引き起こす。

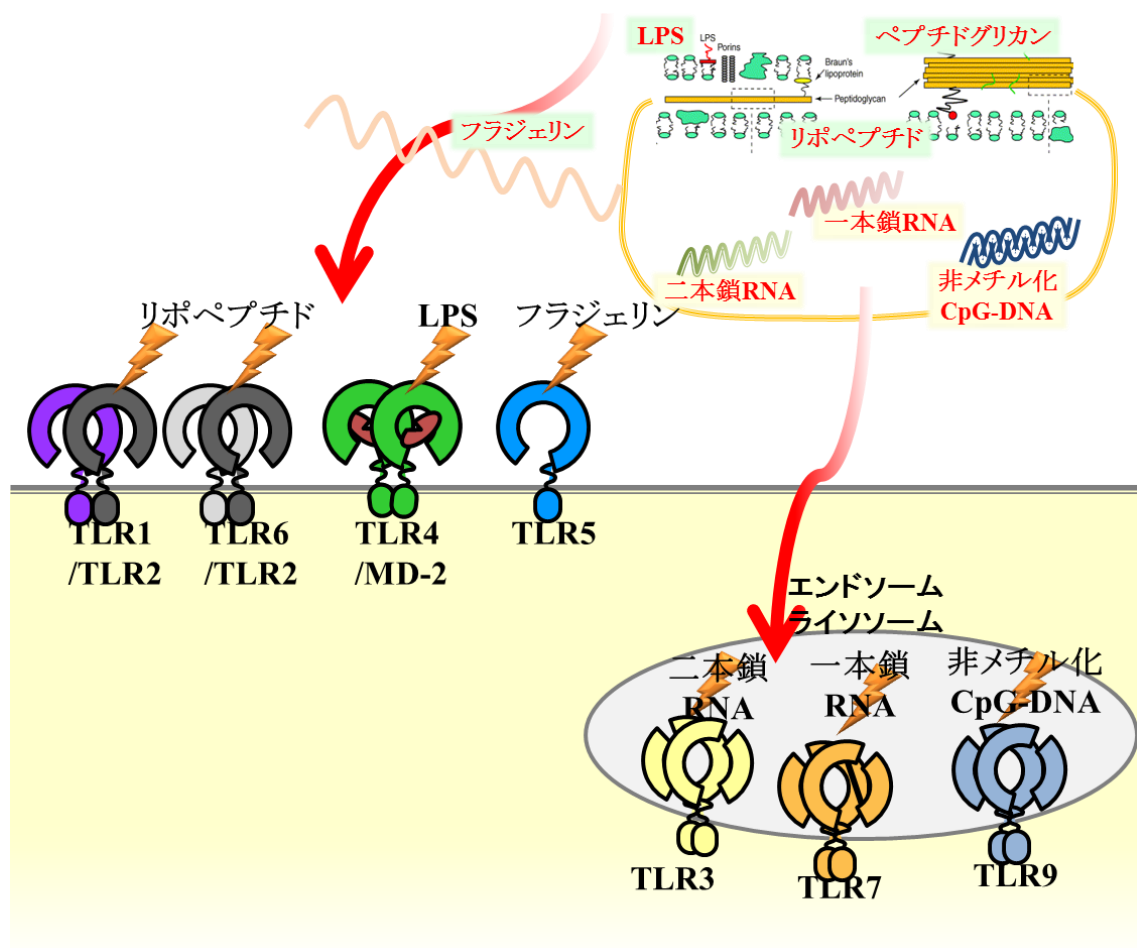


Fig2. TLR の分類

TLR は認識する分子構造によって二つに分類される。一つ目は微生物の細胞外膜成分(LPS やリポペプチド、フラジエリンなど)を認識する TLR で、これらの TLR は主に細胞表面に局在する。二つ目は微生物やウイルスの DNA や RNA を認識する TLR で、これらの TLR は小胞体を介して主にエンドソームやライソソームに局在する。

TLR と Unc93B1

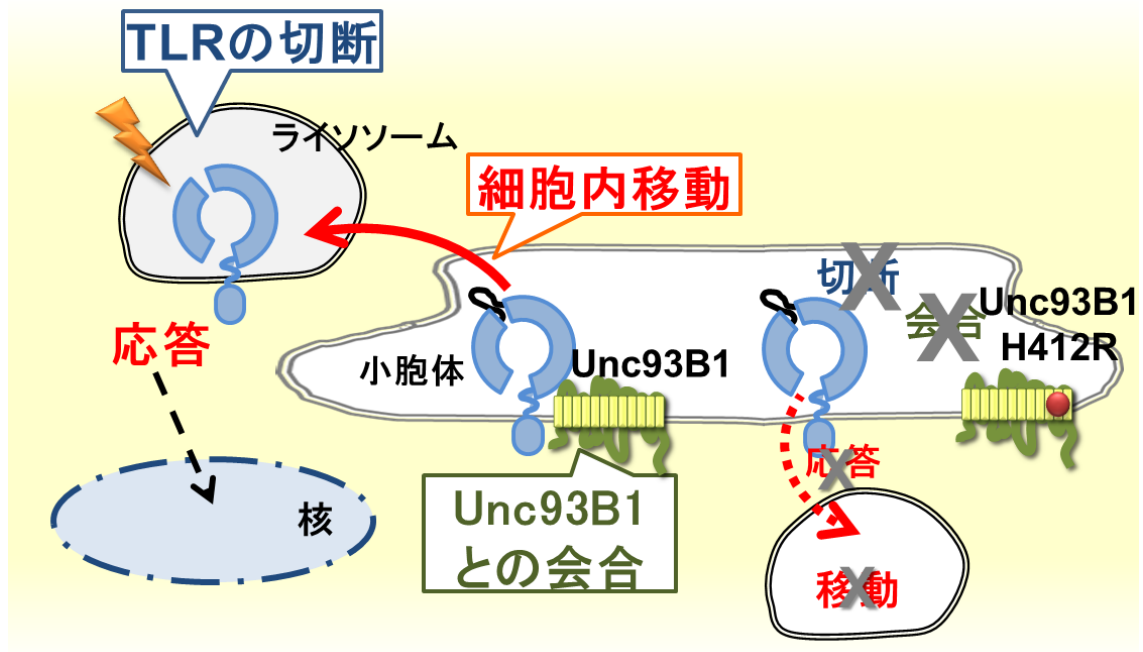
核酸認識系 TLR の局在を制御するアクセサリ分子として Unc93B1(Unc93 homolog B1)が知られている(22, 23)。Unc93B1 は小胞体膜上に存在する複数回膜貫通型のタンパク質で、線虫の運動統御タンパク質 *unc-93* の哺乳類ホモログとして同定された分子である(24)。

Unc93B1 は、TLR3、TLR7、TLR9 と会合することで応答を制御することが知られている(25)。Unc93B1 の 412 番目のヒスチジンがアルギニンに変異した (H412R) マウスでは、TLR3、TLR7、TLR9 のリガンドに対して不応答性になる事から triple defect との意味で 3d マウスと呼ばれ、サイトメガロウイルスやリステリアモノサイトゲネスなどの感染に感受性が高くなる事が報告されている(22)。この変異マウスは、N-エチル-N-ニトロソウレアを用いた大規模な変異マウスの作製・解析により発見された。また、細胞株での Unc93B1 H412R 変異体を用いた解析により、Unc93B1 は TLR3、TLR7、TLR9 と会合し、核酸認識系 TLR を小胞体からエンドリソームへと移行させ、TLR をリガンド認識の場に移す役割を果たしていることが報告された(25)。

また、Unc93B1 は核酸認識系 TLR の応答性に必要なだけではなく、N 末端側依存的に TLR7 と TLR9 の応答性を相反的に制御する機能があることを当研究室から報告している(26)。この発見は、当研究室で独自に作成した cDNA library (マウス macrophage 系細胞株 RAW 細胞由来)を用いた TLR7 の応答性を増強する Functional cloning で Unc93B1 を同定した過程に起因する。偶然にも、この Functional cloning で得られた Unc93B1 の遺伝子は、5' 末端側の 112 塩基が欠損された状態であったため第 2 メチオニン(M84)から発現する N 末端側のアミノ酸を 83 個欠失した変異体であった。この変異体を野生型の Unc93B1 と比較し、TLR7 の応答を比較した結果、野生型

に比較して N 末端 83 アミノ酸を欠失した変異体発現下で TLR7 応答が増強されたため、Unc93B1 の N 末端 83 アミノ酸からなる領域に TLR7 の応答性を制御する機能がある事が示唆された。その後の詳細な解析により、Unc93B1 の 34 番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した変異体 (D34A 変異体) は、野生型の Unc93B1 と比較して TLR7 の応答性を増強する一方、TLR9 の応答性を減弱させることが報告された(26)。この報告から、Unc93B1 は定常状態において TLR9 優位な応答性を保ちつつ、TLR7 の過剰な応答を抑制している可能性が示されている。また、Unc93B1 D34A 変異体のノックインマウスは、TLR7 活性依存的に脾腫や肝炎、糸球体腎炎などの炎症性疾患を引き起こす(27-29)。そのため、Unc93B1 による TLR の応答制御は生体において、過剰な炎症を防ぐうえで重要である。しかしながら、Unc93B1 による核酸認識系 TLR の制御機構は依然不明な点が多く残っている。

A



B

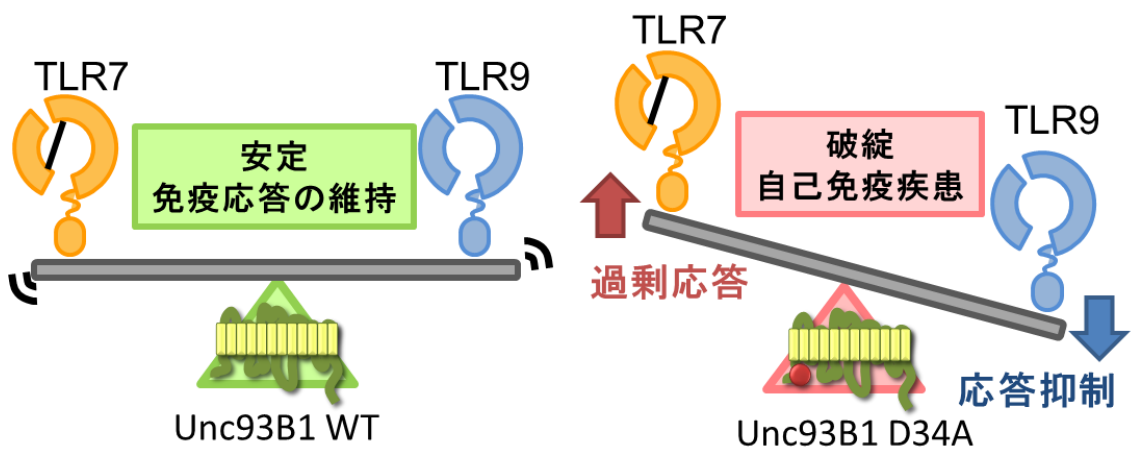


Fig3. Unc93B1 と核酸認識系 TLR

A. TLR3、TLR7、TLR9 は Unc93B1 との会合依存的に応答能を持つ。Unc93B1 H412R 変異体は TLR と会合できず、TLR は小胞体からライソソームに移行することも切断されることもできず、応答能を持たない。

B. Unc93B1 D34A 変異体は、TLR7 応答を亢進し TLR9 の応答を抑制する。Unc93B1 D34A ノックインマウスは TLR7 依存的な自己免疫疾患を引き起こす。Unc93B1 は TLR7 と TLR9 の応答バランスを制御して、免疫応答を調節している。

TLR の応答異常と疾患

TLR の活性化は感染防御において重要である一方で、近年の研究により TLR の過剰な活性化が自己免疫疾患の病態に関わることが示されつつある。

感染防御に関わる例としては、TLR3 や Unc93B1 の遺伝子変異により、TLR の機能が欠損または低下した場合、患者は単純ヘルペスウイルスに感受性が高くなり、ヘルペス脳症などの重篤な症状を起こしやすいと報告されている(30, 31)。

また、TLR の過剰応答による疾患については、アトピー性皮膚炎や光線過敏症で、皮膚上皮や浸潤してきた免疫細胞の TLR3 が変性した自己 RNA をリガンドとして認識することが疾患の重症化に関わるという報告がある(32, 33)。全身に炎症症状を引き起こす自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE : systemic lupus erythematosus)では、TLR7 や TLR9 の異常な活性化が疾患の重篤化に関与していると報告がなされている(34)。SLE をはじめとする多くの自己免疫疾患では、効果的な分子標的薬が開発されていないことから、TLR は新たな標的分子として期待されている。実際にモデルマウスを用いた解析も進められており、SLE モデルマウスの MRL-lpr/lpr マウスでは、TLR7 を欠損させることで抗 RNA 自己抗体の産生量が低下して病態が緩解することが報告されている(35)。また、TLR7 を強制的に発現させた TLR7 トランスジェニックマウスでは SLE 様の糸球体腎炎を自然発症して死亡することが報告されている(36, 37)。

このように TLR は疾患との関連が多く報告されており、核酸認識系 TLR の疾患への関与の報告は多く、疾患の分子標的薬開発のために核酸認識系 TLR の詳細な応答制御機構の解明が求められている。

核酸認識系 TLR の修飾

核酸認識系の TLR は、リガンド結合領域である LRR 領域が切断されることが知られている(23)。しかしながら、その切断部位や応答への影響などについては、依然不明な点が多い。近年、当研究室や他の研究室からの報告により、様々な知見が明らかになりつつある。

当初、TLR9 は切断され、N 末側が切り離されることで初めて膜貫通領域を持つ C 末側のみが機能すると考えられてきた(38)。しかしながら近年の解析により、核酸認識系 TLR は切断された後に C 末側と N 末側は会合していることが報告されている(39-41)。また TLR7 は、切断後の N 末側と C 末側がシステイン残基同士の共有結合(ジスルフィド結合)で結合している(39)。TLR7 も TLR9 と同様に、切断後の TLR は C 末側単独ではリガンドに応答できず、切断後に N 末側と C 末側の会合が必要であることも報告されている(39-41)。また近年、TLR8、TLR9 についての結晶構造が報告されている(42, 43)。この結晶構造からも核酸認識系 TLR は切断後に N 末側と C 末側が会合しており、N 末端側と C 末側の両方にリガンドとの結合に関与する領域が存在することが示された。

さらに、TLR の切断が応答に与える影響についても報告が多くなされている。TLR3、TLR7、TLR9 は Cathepsin 阻害剤処理によって切断が抑制され、応答も減弱することが報告されている(44-46)。この結果は TLR の切断が応答に重要であることを示唆している。しかしながら、Cathepsin K、Cathepsin L、Cathepsin S のノックアウトマウスでは TLR9 応答は抑制されるが、切断は抑制されないことが報告されている(45)。また、当研究室において Cathepsin ファミリーの過剰発現下で、TLR9 応答が増強することを報告しており(47)、Cathepsin ファミリーは TLR9 の切断以外においても応答制御分子とし

て作用する可能性や TLR9 だけでなく他の応答制御分子を基質とする可能性が示唆される。

また、TLR3 や TLR7、TLR8 については TLR の切断領域を欠失させた変異体による解析から、切断されない TLR の変異体はリガンドに応答できないことが報告されている(39, 48, 49)。さらに、TLR7 はジスルフィド結合に関わると予想されるシステイン残基 (C97、C475)をセリンに置換した変異体を用いた解析により、分子内ジスルフィド結合を失うと切断もされずリガンド依存的な応答も見られないことを私たちが報告している(39)。これらの報告から、TLR3 や TLR7、TLR8 については TLR の切断が応答に必須であると考えられている。しかしながら、TLR9 の切断されない変異体を用いた生化学的な解析については未だに報告がなされていない。また、TLR3 や TLR7、TLR8 の切断されない変異体の解析は、細胞株を用いた解析にとどまっており、Primary の細胞を用いた結果はまだ報告されていない。

本研究の目的

Unc93B1 は核酸認識系 TLR の制御に関わることは報告されているものの、Unc93B1 が TLR7 と TLR9 を識別して応答性のバランスを制御している分子基盤は依然不明である。本研究では Unc93B1 D34A 変異体が TLR7 の応答性を増強し、TLR9 の応答性を減弱させる分子機序を明らかにすることを目的とした。

4. 方法

試薬

CpG-B1668 (5'-TCCATGACGTTTCCTGATGCT-3')

CpG-A1585 (5'-GGGGTCAACGTTGAGGGGGG-3')

Poly U (5'-UUUUUUUUUUUUUUUUUUUU-3')

上記の核酸リガンドはFASMAC 社に合成を委託し、TE buffer に溶かしたものを使用した。Lipid A(Sigma Aldrich)は 0.2% trimethylamine (和光純薬)に調製した Endotoxins free water に溶かして使用した。Pam3CYSK4 (EMC microcollections)、Gardiquimod (Invivogen)は Endotoxins Free Water に溶かして使用した。

抗体

Western blot で使用した抗 TLR9 抗体及び抗 Unc93B1 抗体は当研究室で樹立したラビットポリクローナル抗体を使用した。抗 GFP 抗体(598)、抗 His 抗体(PMO032)は MBL から購入した。抗 TLR7 抗体は eBio science から購入した。2 次抗体として使用した horseradish peroxidase (HRP)標識の抗ラビット Ig 抗体は BD から、抗ラット Ig 抗体と抗マウス Ig 抗体は Santa Cruz から購入した。

免疫沈降で使用した抗 Flag 抗体(M2)ビーズは Sigma Aldrich から購入した。抗 GFP 抗体ビーズは、当研究室で樹立した抗体(FM264)を 4FF Sepharose beads (GE Healthcare)に付加したものをを使用した。抗 TLR7 抗体ビーズは、当研究室で樹立した抗体(A94B10)を 4FF Sepharose beads に付加したものをを使用した。抗 TLR9 抗体ビーズは、当研究室で樹立した抗体(J15A7、B33A4)を 4FF Sepharose beads に付加したものをを使用した。

フローサイトメーターでの解析には下記の抗体を使用した。Allophycocyanin (APC)-conjugated anti-Flag (L5)、PE Cy7-conjugated anti-mouse CD11c (N418)、PerCP Cy5.5-conjugated anti-mouse Ly6G (1A8)、Fluorescein (FITC)-conjugated anti-mouse Ly6C (HK1.4) 、Pacific Blue (P.B.)-conjugated anti-mouse PDCA1 (927) 、PE-conjugated anti-rat CD2 (OX-34)は Biolegend より購入した。BV510-conjugated anti-mouse CD11b (M1/70) 、BV421-conjugated anti-mouse NK1.1 (PK136) 、BV510-conjugated anti-mouse B220 (RA3-6B2)は BD より購入した。APC-conjugated anti-mouse CD69 (H1.2F3)は eBio science より購入した。抗 TLR7 抗体は当研究室で樹立した抗体(A94B10)に EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin を付加して、Biotin 化抗体として使用した。抗 TLR9 抗体は当研究室で樹立した抗体(B33A4、J15A7)に EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin を付加して、Biotin 化抗体として使用した。

細胞株の培養

細胞培養液は RPMI1640 (Gibco またはナカライテスク)、DMEM (Gibco またはナカライテスク)を使用した。リコンビナントマウス IL-3 として、当研究室で作製した IL-3 遺伝子を発現させた CHO 細胞の培養液を使用した。Ba/F3 細胞は 10%胎児牛血清(FCS)、50 μ M 2-ME に調製した RPMI1640 にマウスリコンビナント IL-3 及びペニシリン/ストレプトマイシン/1-グルタミン混合液を添加して培養した。HEK293 パッケージング細胞株 plat E 細胞は 10% FCS、50 μ M 2-ME、10 μ g/mL Blastcidin、1 μ g/mL puromycine、に調製した DMEM にペニシリン/ストレプトマイシン/1-グルタミン混合液を添加して培養した。すべての細胞培養は、インキュベーター内において 37°C、5% CO₂ の条件下で行った。

マウス

マウスの維持・管理は東京大学医科学研究所実験動物施設内で Specific Pathogene Free (SPF)の環境下で行った。すべての動物実験は、医科学研究所(東京大学)の動物研究委員会の承認の元で行われた。

免疫沈降

回収した細胞を1×PBS で 1 回洗浄し、溶解バッファー(150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl pH7.4、1×complete EDTA- Cocktail (Roche))に 1%になるように Digitonin または Lubrol を加えて細胞溶解液とした。バッファー添加後、氷中に 30 分間静置し、溶解物を遠心分離して上清をライセートとして使用した。ライセートに抗体ビーズを加えて、4℃で 2 時間反応させた。その後、抗体ビーズに溶解バッファーに 0.1%になるように Digitonin または Lubrol を加えて洗浄する作業を 3 回繰り返し、ビーズを Sample Buffer (150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl pH7.4、10% SDS、5% 2-ME)で 96℃、5 分間処理した。

遺伝子のクローニング

TLR7、TLR9、Unc93B1 の各遺伝子はPCR で増幅し、pMX ベクター(50)に導入した。TLR9 の各変異体は TLR9 のアミノ酸のうち 1-454 と 470-1032 をつなぎ合わせたものを d13 変異体、1-455 と 470-1032 をつなぎ合わせたものを d12 変異体、1-456 と 470-1032 をつなぎ合わせたものを d11 変異体、1-457 と 470-1032 をつなぎ合わせたものを d10 変異体、1-458 と 470-1032 をつなぎ合わせたものを d9 変異体、1-459 と 470-1032 をつなぎ合わせたものを d8 変異体として pMX ベクターに導入した。TLR9

Ala13 変異体は 1-454 と 470-1032 の間に 13 個の Alanine 配列(5'-GCAGCTGCAGCTGCAGCTGCAGCTGCAGCTGCAGCTGCT-3')をつなぎ合わせたものを pMX ベクターに導入した。

TLR7・9 キメラは TLR7 のアミノ酸のうち 1-834、835-891、892-1047 と TLR9 のアミノ酸のうち 1-809、810-869、870-1032 のそれぞれを組み合わせを変えてつなぎ合わせたものを pMX ベクターに導入した。TLR の発現依存的にラット CD2 発現を誘導するベクターは TLR 配列の後ろに IRES 配列とラット CD2 の cDNA 配列を組み込んだ pMX ベクターを使用した。

レトロウイルスによる遺伝子導入

plat E 細胞に lipofectamin 2000 (Thermo) または PEI MAX (Polyscience Inc.)で目的遺伝子発現する pMX 系ベクターを導入した(50)。遺伝子導入後 12 時間で培養上清を交換し、さらに 24 時間培養した。回収した上清をウイルス懸濁液とし、DOTAP (Roche)を混ぜ合わせて、遺伝子導入先の細胞に加えた。細胞とウイルス懸濁液の反応 24 時間後に培養上清を 2 回交換し、ウイルスを取り除いた。

Western blot

免疫沈降で得たサンプルを SDS-PAGE した後、PVDF 膜 (Millipore)に転写し、Blocking One (ナカライテスク)でブロッキング後、TBS-T(0.1% Tween20 入りの TBS)で 3 回洗浄した。その後、TBS-T で希釈した抗体と 4℃、6 時間以上反応させ、TBS-T で 3 回洗浄した後、TBS-T で希釈した各種 HRP 標識の 2 時抗体で室温、2 時間反応させ、TBS-T で 3 回洗浄した。このメンブレンを ECL Select (GE healthcare)と反応させ、

基質の発光を mini LAS500 (GE healthcare)で検出した。

Western blot の結果の定量

Western blot により得た結果は、画像解析ソフト ImageJ を用いて定量した。mini LAS500 (GE healthcare)で検出後の画像データを白黒反転(Image→Invert)し、検出されたバンドを含む範囲を数値化(Analyze→Measure)してカウント数を求め、定量値とした。数値化の際に囲むバンドを含む範囲は比較している lane 間でそろえて解析した。

細胞染色とフローサイトメトリー

フローサイトメーターは FACS Caliber System (BD)及び LSR Fortessa (BD)を使用した。データの解析ソフトは FlowJo を使用した。

解析に使用する細胞を染色する分子の抗体を加えた FACS バッファー(1×PBS、5% FCS、0.1% Sodium Aside)または、0.1%サポニン入り FACS バッファーに希釈して染色した。蛍光標識された抗体は細胞と 4℃、30 分反応させ、解析した。ビオチン化された抗体は細胞と 4℃、30 分反応させた後、1 回 FACS バッファーで洗浄し、FACS バッファーに希釈した PE 標識の Streptavidin (Biolegend)で染色した。細胞表面の分子を観察する際は FACS バッファーを、細胞内の分子を観察する際は 0.1%サポニン入り FACS バッファーを使用した。

骨髄幹細胞への遺伝子導入

5-FU(5-fluorouracil) 5 mg をマウスの腹腔内に投与し、4 日後に骨髄細胞を採取した。骨髄細胞を Stem Cell Medium (100 ng/mL 幹細胞増殖因子、10 ng/mL IL-6、10

ng/mL IL-3、10% FCS、50 μ M 2-ME、ペニシリン/ストレプトマイシン/L-グルタミン混合液を含む RPMI1640)で培養し、2 日後と3 日後にあらかじめ用意した目的遺伝子と共にネオマイシン耐性遺伝子を含む pMX ベクターを導入した plat E の培養上清のウイルス懸濁液と DOTAP (Roche)を混ぜ合わせて加えた。その後、10 ng/mL リコンビナントのマウス GM-CSF を含む RPMI1640 (10% FCS、50 μ M 2-ME、ペニシリン/ストレプトマイシン/L-グルタミン混合液を含む)で 7 日間培養し、cDC(conventional dendritic cell)に誘導した。同時に G418 400 μ g/mL を加え、目的遺伝子発現細胞の選択を行った。誘導後 10 日後から 12 日後の細胞を実験に使用した。

Real Time PCR

RNeasy[®] Mini Kit (QIAGEN)を用いて細胞から RNA を回収し、ReverTra Ace (TOYOBO)を用いた逆転写により cDNA を合成した。この cDNA を使用し、TLR9 Probe(Thermo Fisher)または HPRT(hypoxanthine phosphoribosyl transferase) Probe(Thermo Fisher)と Fast Start Universal Probe Master [Rox] (Roche)との混合溶液を StepOnePlus[™] Real Time PCR System (Applied Biosystem)を用いて real-time PCR を行った。TLR9 の発現量は、HPRT の発現量との比をとることにより均一化した。

マウスへの CpG-B 静脈投与

生後 6 週～12 週のマウスに CpG-B1668 と DOTAP を 1×PBS に希釈したものを 200 μ L ずつ静脈投与した。マウス 1 匹あたりに投与する CpG-B1668 は 2nmol、DOTAP (Roche)は 8 μ L になるように希釈液を作製した。

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

96 穴平底プレートに 1×10^5 個/well となるように細胞を入れ、TLR リガンドを添加した。添加から 24 時間後に培養上清を回収後、サンドイッチ ELISA Kit を用いて各種サイトカイン、ケモカインを測定した。IL-6、IL12p40、及び TNF α の測定は eBio science の ELISA Kit を使用した。RANTES の測定は R&D System の ELISA Kit を使用した。IFN α の測定は PBL ASSAY SCIENCE の ELISA Kit を使用した。

骨髄細胞からの免疫細胞誘導

リコンビナントのマウス GM-CSF (peprotech)、マウス M-CSF (peprotech)、マウス Flt3L (peprotech) は、ultra pure water (Gibco) に溶かして使用した。

マウスの大腿骨・脛骨より採取した骨髄細胞を、 $1 \times$ PharmLyse (BD) を用いて溶血処理後、macrophage や cDC、pDC (plasmacytoid dendritic cell) の誘導に用いた。

macrophage の誘導は 3×10^5 個/mL に細胞を調製した 100 ng/mL リコンビナントのマウス M-CSF を含む RPMI1640 (10% FCS、50 μ M 2-ME、ペニシリン/ストレプトマイシン/1-グルタミン混合液を含む) で 7 日間培養した。

cDC の誘導は 1×10^6 個/mL に細胞を調製した 10 ng/mL リコンビナントのマウス GM-CSF を含む RPMI1640 (10% FCS、50 μ M 2-ME、ペニシリン/ストレプトマイシン/1-グルタミン混合液を含む) で 7 日間培養した。

pDC の誘導は 1.5×10^6 個/mL に細胞を調製した 100 ng/mL リコンビナントのマウス Flt3L を含む RPMI1640 (10% FCS、50 μ M 2-ME、ペニシリン/ストレプトマイシン/1-グルタミン混合液を含む) で 7 日間培養した後、CD11c、B220 を抗体で染色し、FACS Aria で CD11c+/B220+ の細胞をソートした。

脾臓細胞からの B 細胞分離

CD43は休止期や通常の末梢B細胞には発現しないため、CD43陰性の細胞を回収することで脾臓細胞から B 細胞を分離した。マウスより脾臓を摘出し、スライドグラスを用いて脾臓から細胞を回収した。1×PharmLyse (BD)を用いて溶血処理後、CD43 Micro beads (Miltenyi Biotec)を加え、4°Cで 15 分反応させた。1×PBS で 2 回洗浄後、Auto MACS (Miltenyi Biotec)で CD43 negative の分画を分離した。

H³ 標識 Thymidine を用いた細胞増殖試験

脾臓細胞より分離した B 細胞を 1×10^5 個/well となるように 96 穴平底プレートに入れ、各種 TLR リガンドで刺激した。72 時間後に H³ 標識 Thymidine $1 \mu\text{Ci/mL}$ 存在下でさらに 6 時間培養し、セルハーベスタシステム(Inotech)を用いて、細胞内に取り込まれた H³ 標識 Thymidine 量を測定した。

統計解析

3 回行った実験データは、F 検定後、Student の t 検定によって統計学的に分析された。その結果が 0.01 以下の時、比較群間の差が有意であると考えた。

図表へは、t 検定の結果が 0.005 未満のとき***、0.01 以下 0.005 以上のとき**と表示した。

5. 結果

Unc93B1 の D34A 変異による TLR7 及び TLR9 との会合への影響

TLR7、TLR9 の応答能は Unc93B1 との会合に依存することから、Unc93B1 とこれらの TLR の会合が Unc93B1 の D34A 変異によって影響を受けるか検討した。野生型及び Unc93B1 D34A 変異体ノックインマウスの骨髄誘導性 cDC からライセートを調製し、抗 TLR7 抗体(A94B10)および抗 TLR9 抗体(J15A7)を用いて免疫沈降後、western blot で Unc93B1 と TLR の会合量を比較した。その結果、TLR7 は、切断型(C ter.)のみが検出され、野生型および Unc93B1 D34A 変異体において Unc93B1 との会合に顕著な変化が認められなかった(Fig4. lane 1,2)。一方 TLR9 は、野生型 Unc93B1 に比較して D34A 変異体との会合が減弱した(Fig4. lane 3,4)。また、野生型 Unc93B1 細胞では TLR9 の全長(Full)と切断型(C ter.)がともに検出されるが、Unc93B1 D34A 変異体ノックイン細胞では、TLR9 の切断型(C ter.)がほぼ検出できなかった(Fig4. lane 3,4)。これらの結果から、Unc93B1 D34A 変異体は TLR9 との会合が減弱する可能性が示唆された。なお、切断型 TLR9(C ter.)のバンドは、上下に広がったシグナルとして検出されている(Fig4. lane3)が、この現象はタンパク質の不均一な糖鎖修飾によると考えられる。PNGaseF 処理によって脱糖鎖処理を行うと、切断型 TLR9 のシグナルが均一になることが報告されている(38)。TLR7 も TLR9 と同様に糖鎖修飾されることが報告されているが、切断型の TLR7 のバンドは均一に検出されていることから、TLR7 の糖鎖修飾は均一になされている可能性が考えられる(23)。

cDC を用いた解析では、野生型に比較して Unc93B1 D34A 変異体ノックインマウス由来 cDC で検出された TLR9 の量(Fig4.表中 Full+C ter.)が低いため、免疫沈降できた TLR9 の量が少ない可能性は捨てきれない。そのため、TLR や Unc93B1 の量をそ

ろえた状態でも Unc93B1 D34A 変異体は TLR9 との会合が抑制されるか確認するために、Ba/F3 細胞を用いて検討した。Ba/F3 細胞に C 末側に GFP タグを付加した Unc93B1 野生型または D34A 変異体と Flag-His タグを C 末側に付加した TLR7 または TLR9 を発現させ、抗 Flag 抗体で免疫沈降し、western blot で TLR と Unc93B1 の会合量を比較した。その結果、TLR7 は野生型、D34A 変異体間の比較において、Unc93B1 との会合も TLR7 の切断も顕著な変化が認められなかった(Fig5.A)。一方、TLR9 については、野生型に比較して D34A 変異体の Unc93B1 との会合が減弱し、TLR9 の切断も減弱した(Fig5.B)。また、Unc93B1 側から免疫沈降した結果において、TLR9 は切断前の TLR9(Full)は野生型、D34A 変異体の Unc93B1 との会合量に変化が認められないが、切断された TLR9(C ter.)は野生型 Unc93B1 に比較して、Unc93B1 D34A 変異体との会合が減弱した(Fig5.B)。

これらの結果から、Unc93B1 D34A 変異体において TLR9 の応答性が減弱するメカニズムとして、TLR9 の切断が抑制されることが原因である可能性が示唆された。しかしながら、TLR9 切断と応答の関連性は十分に証明されていない。また、TLR7 の応答性増強のメカニズムは Unc93B1 との会合能の違いでは説明できないため、Unc93B1 D34A が TLR7 の応答を制御する際に TLR 内の分子構造を識別して応答の増強、抑制を調節していると考えられる。そこで本研究では、切断されない TLR9 変異体を作製することで TLR9 の切断と応答の関係を解析する事、Unc93B1 D34A が識別する TLR 内の分子構造を特定する事の 2 点にしばって、Unc93B1 による TLR7 および TLR9 の応答制御機構を解明することを目指した。

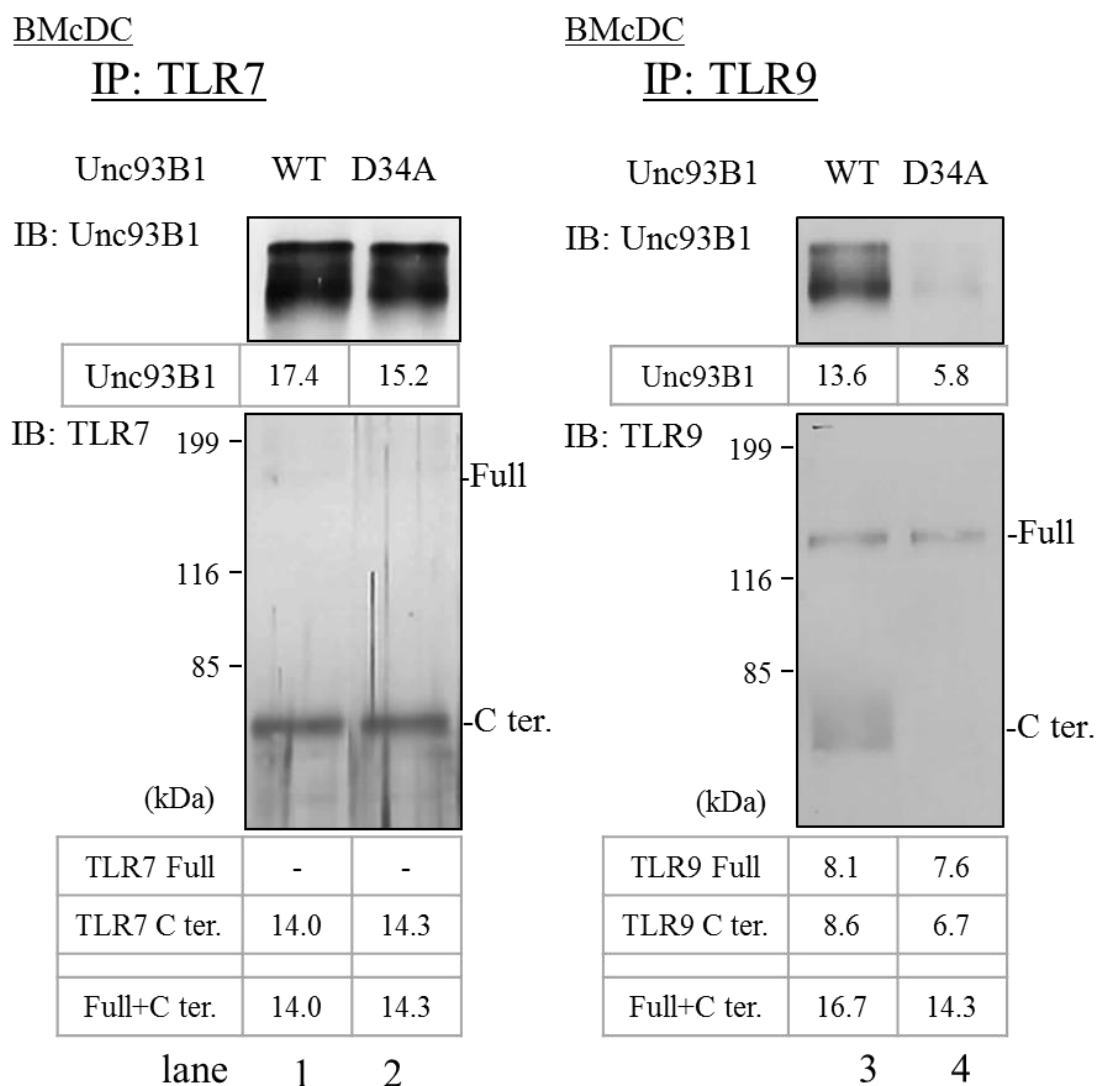
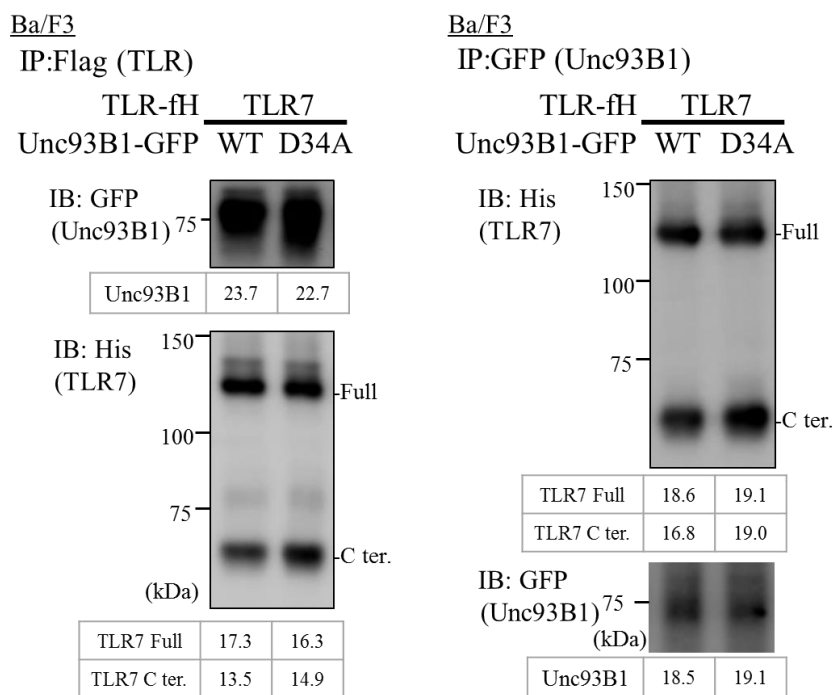


Fig4. Unc93B1 の野生型、D34A 変異体間で TLR9 は Unc93B1 との会合と

切断型 TLR の量が D34A 変異体で減少するが TLR7 は変化しない。

野生型マウス及び Unc93B1 D34A ノックインマウス由来の骨髓細胞から GM-CSF で cDC に分化誘導した細胞からライセートを調製し、抗 TLR7 抗体(A94B10)および抗 TLR9 抗体(J15A7)で免疫沈降し、western blot で TLR と会合する Unc93B1 の量を比較した。

A



B

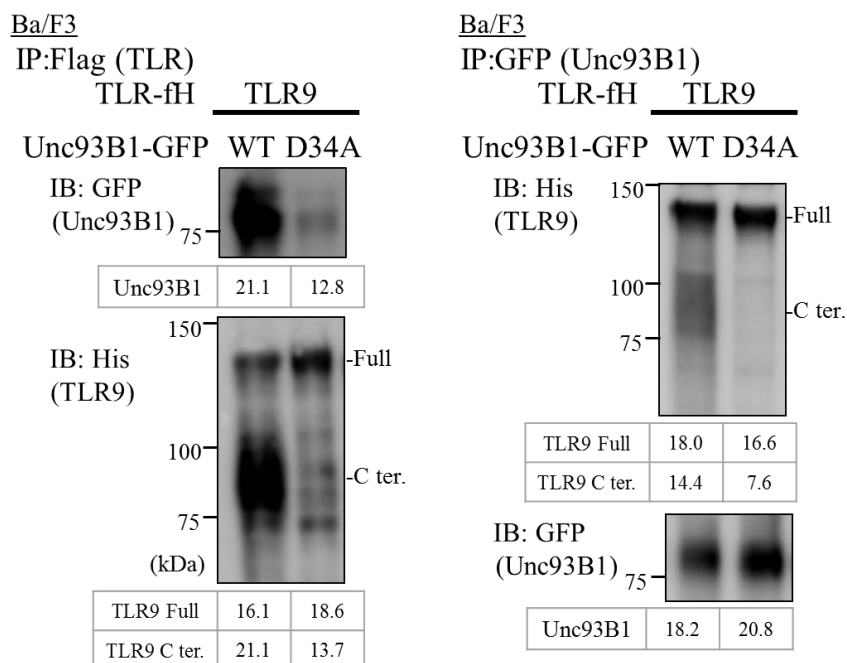


Fig5. Unc93B1 の野生型、D34A 変異体間で TLR9 は Unc93B1 との会合と

切断型 TLR の量が D34A 変異体で減少するが TLR7 は変化しない。

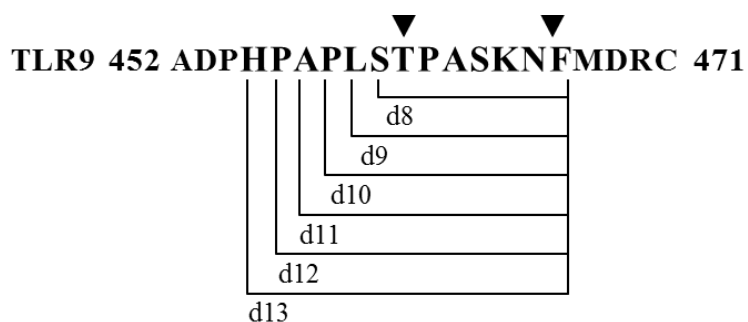
Ba/F3 細胞に GFP タグを付加した Unc93B1、野生型または D34A 変異体、と FlagHis タグを付加した TLR、(A.)TLR7 または(B.)TLR9、を発現させた細胞からライセートを調製し、抗Flag抗体または抗GFP抗体で免疫沈降し、western blotでTLRとUnc93B1の会合量を比較した。

TLR9 の切断と応答の関係

切断されない TLR9 変異体の作製の検討

TLR9 は切断型 TLR9 の N 末端のアミノ酸解析により 461～467 番目のアミノ酸の間で切断されることを当研究室から報告している(40)。この報告をもとに、TLR9 切断部位周辺のアミノ酸を 467 番目のアミノ酸から N 末側に 8～13 個欠失させた変異体を作製し、切断されない変異体を探索することにした(Fig6. A)。TLR9 ノックアウトマウスの骨髄由来幹細胞に FlagHis タグを C 末側に付加した TLR9 野生型及び切断部位欠失変異体6種類をレトロウイルスを用いて発現させた。これらの細胞からライセートを調製し、抗 Flag 抗体で免疫沈降後、western blot で切断後 TLR9(C ter.)の量を比較した。TLR9 の切断を定量化するために、検出された切断型 TLR9(C ter.)の割合(Fig6. B 表中 C ter./(Full+C ter.))を算出し、比較した。その結果、野生型 TLR9 の切断型 TLR9(C ter.)の割合が 0.7 であるのに対し、458～467 番目のアミノ酸を欠失した変異体まで(d8、d9、d10)は 0.58、0.51、0.54 と減少の傾向がみられ、459～467 番目のアミノ酸を欠失した変異体(d11)では 0.20 と顕著に減少した。461～467 番目のアミノ酸を欠失した変異体(d13)では、切断型 TLR9(C ter.)が検出できず、切断型 TLR9(C ter.)の割合が 0 になった(Fig6. B)。この結果から、455～467 番目のアミノ酸を欠失した変異体(d13)を切断されない TLR9 の変異体として解析することにした。

A



B

BMcDC

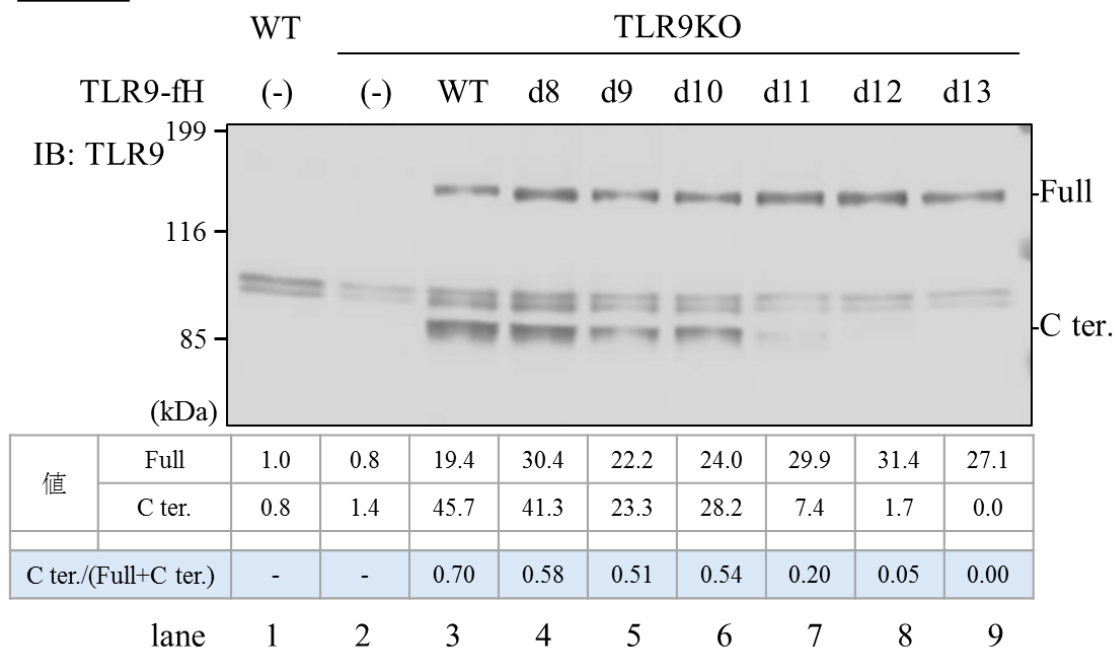


Fig6. TLR9 の 455～469 番目のアミノ酸を欠失した変異体(d13)は

切断型 TLR9(TLR9C)が検出できない

A. TLR9 は P461 から M468 の間で切断されるとの報告に基づき、TLR9 切断部位周辺のアミノ酸を 467 番目のアミノ酸から N 末側に 8～13 個欠失させた変異体を作製した。

B.マウスの骨髄幹細胞に FlagHis タグを付加した野生型 TLR9 (WT)および TLR9 変異体 6 種 (d8、d9、d10、d11、d12、d13)をレトロウイルスを用いて発現させ、GM-CSF で cDC を誘導後、細胞を回収した。得たライセートを抗 Flag 抗体で免疫沈降後、抗 TLR9 抗体を用いて western blot で検出し、切断型 TLR9 (C ter.)の量を比較した。

TLR9 変異体のリガンド応答性の解析

切断されない TLR9 の応答性を検討するために Flag-His タグを C 末側に付加した TLR9 野生型および d13 変異体、455～469 番目のアミノ酸をすべてアラニンに置換した変異体(Ala13)を、Ba/F3 細胞に発現させて解析を行った(Fig7. A)。この細胞には NF- κ B の活性化依存的に GFP を産生するレポーターも導入している。さらに、C 末側に HA タグを付加した Unc93B1 も発現させている。TLR9 の発現量の確認は、フローサイトメーターで行った。野生型 TLR9 及び TLR9 変異体を発現させた Ba/F3 細胞を限界希釈により単クローン化し、得られた細胞を、抗 Flag 抗体または、抗 TLR9 抗体 (B33A4)で染色し、細胞内の TLR9 発現量がそろっているものを使用した(Fig7. B)。

Unc93B1 との会合は TLR9 の応答に必須であることから、TLR9 と Unc93B1 の会合を確認した。それぞれの細胞からライセートを調製後、抗 Flag 抗体で免疫沈降し、western blot で TLR9 と Unc93B1 を観察した。その結果、野生型 TLR9 と TLR9 変異体ともに Unc93B1 と会合した(Fig7. C)。また、全長型の TLR9(Full)の量は顕著な変化がなかったが、切断型(C ter.)の量は野生型に比較して変異型で低下した。

次に、CpG-B1668 刺激下での NF- κ B 活性能を比較した。また、TLR9 非依存的な NF- κ B 活性能に影響がないかを確認するため、Ba/F3 細胞に内在性に発現する TLR2を刺激する Pam3CSK4をコントロールとした。その結果、Pam3CSK4 刺激下では GFP 産生量に変化がないのに対し、CpGB1668 刺激下では d13 変異体、Ala13 変異体共に野生型 TLR9 に比較して GFP 産生量が有意に減弱した(Fig8. B,C)。TLR9 を発現させていない Ba/F3 細胞でも CpG-B1668 刺激による若干量の GFP 産生が認められるが、Ba/F3 細胞への内在性 TLR9 の発現が原因と考えられる。この条件下においても、TLR9 を発現させていない Ba/F3 細胞と d13 変異体発現細胞および Ala13 変異体発現細胞との間に有意な差は見られない。この結果から TLR9 の切断は、TLR9 のリガンド応答による NF- κ B 活性化に重要である可能性が示唆された。

WT 452 ADP**HPAPLSTPASKNF**MDRC 471
d13 452 ADP- - - - - - - - - - -MDRC 471
Ala13 452 ADP**AAAAAAAAAAAAAAAA**MDRC 471

TLR9無発現株 各種TLR9-fH発現株

TLR9-fH

WT


d13

Ala13

—Flag-APC ➡ —TLR9-PE ➡

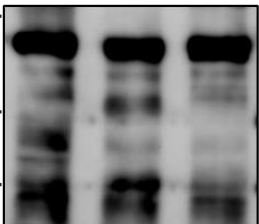
TLR9-fH WT d13 Ala13

IB: HA (Unc93B1) 75



Unc93B1	12.2	16.4	18.5

IB: His (TLR9) 150 100 75 (kDa)



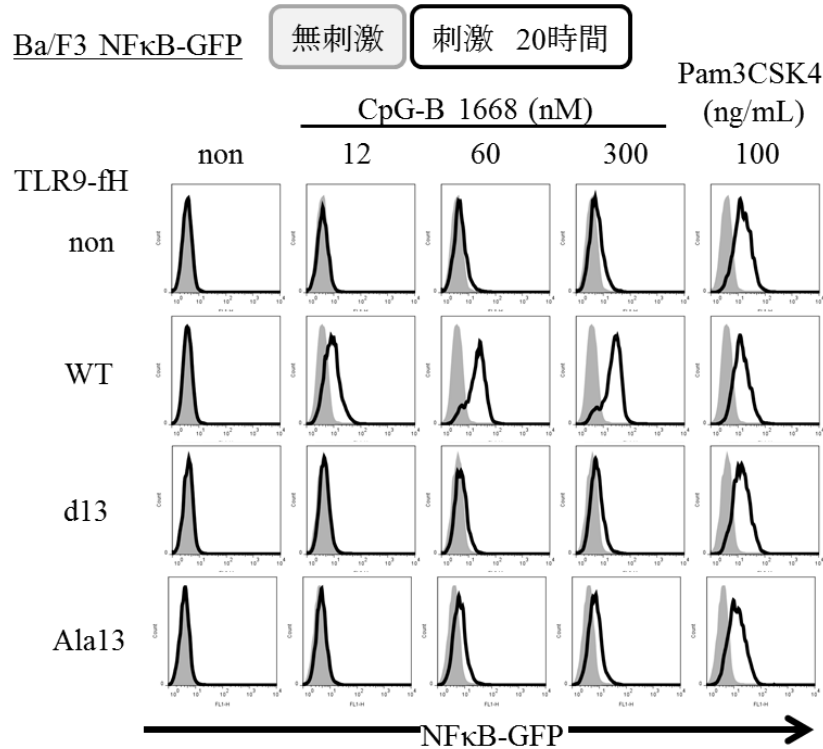
-Full
-C ter.

TLR9 Full	20.8	20.0	21.2
TLR9 C ter.	15.4	10.4	8.9

lane 1 2 3

C. Ba/F3 細胞を回収後、抗 Flag 抗体で免疫沈降し、western blot で Unc93B1 と TLR9 を観察した。

A.



B.

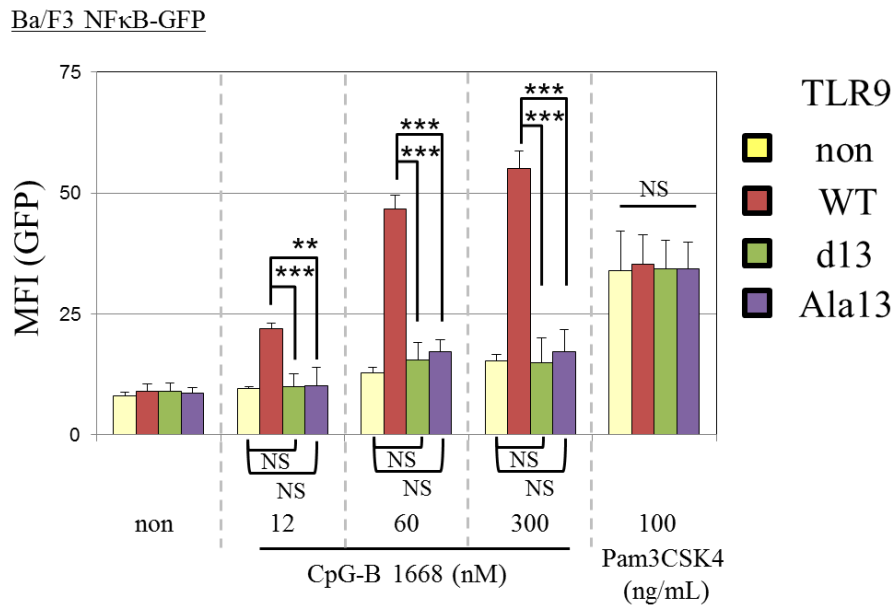


Fig8. Ba/F3 細胞で TLR9 変異体は TLR9 リガンド依存的な NF-κB 活性が抑制される NF-κB 活性依存的に GFP を産生する Ba/F3 を TLR9 リガンドの CpG-B1668、コントロールとして TLR2 リガンドの Pam3CSK4 で刺激し GFP 産生量をフローサイトメーターで解析した。(ヒストグラム→グレー:無刺激、黒:刺激後)(A.)と同様の実験を 3 回行った結果の GFP の MFI(mean fluorescence intensity)(B.)を比較した。

TLR9 変異体のノックインマウスの作製

細胞株レベルで TLR9 の切断が応答に重要である可能性が示されたことから、TLR9 の d13 変異体、Ala13 変異体を発現するノックインマウスを作製し、生体内での TLR9 切断の重要性を解析することにした。ベクター pEZ-FrtLoxDT に TLR9 をコードするゲノム領域のうち TLR9 の 455～469 番目のアミノ酸を欠失またはアラニンに置換させた変異体を組み込み、ノックインベクターとして使用した (Fig9. A)。マウス TLR9 のうち、455～469 番目のアミノ酸は第 2 エクソンに存在している。455～469 番目のアミノ酸対応コドン (5'-CACCCAGCTCCGCTGAGCACCCCTGCTTCTAAGAACTTC-3') を欠失変異させた DNA 断片および、アラニン対応コドン (5'-GCAGCTGCAGCTGCAGCTGCAGCTGCAGCTGCAGCTGCAGCTGCT-3') に変異させた DNA 断片を PCR によって作製し、In-Fusion Cloning Kit を用いてベクター pEZ-FrtLoxDT に組み込んだ。作製したノックインベクターは最終的に全塩基配列の解析を決定し、目的以外の変異が入っていないことを確認したのちに、ES 細胞に導入した。ベクター pEZ-FrtLoxDT にはネオマイシン耐性遺伝子が挿入されているため、ネオマイシン耐性を ES 細胞遺伝子導入時の選択マーカーとして使用できる。ネオマイシン耐性遺伝子の両側には Frt が付加されているため、flp マウスとの交配によりネオマイシン耐性遺伝子を除去することが出来る。また、ベクターに組み込んだ第 2 エクソンの両端のスプライシング領域を避けた部分に LoxP 付加し、cre マウスとの交配で TLR9 ノックアウトマウスを作製できるようにした。また、第 1 エクソンと第 2 エクソンの間の Bgl2 サイト (5'-AGATCT-3') を変異させたことで、サザンブロッティングによる変異アレルの検出を可能にした。

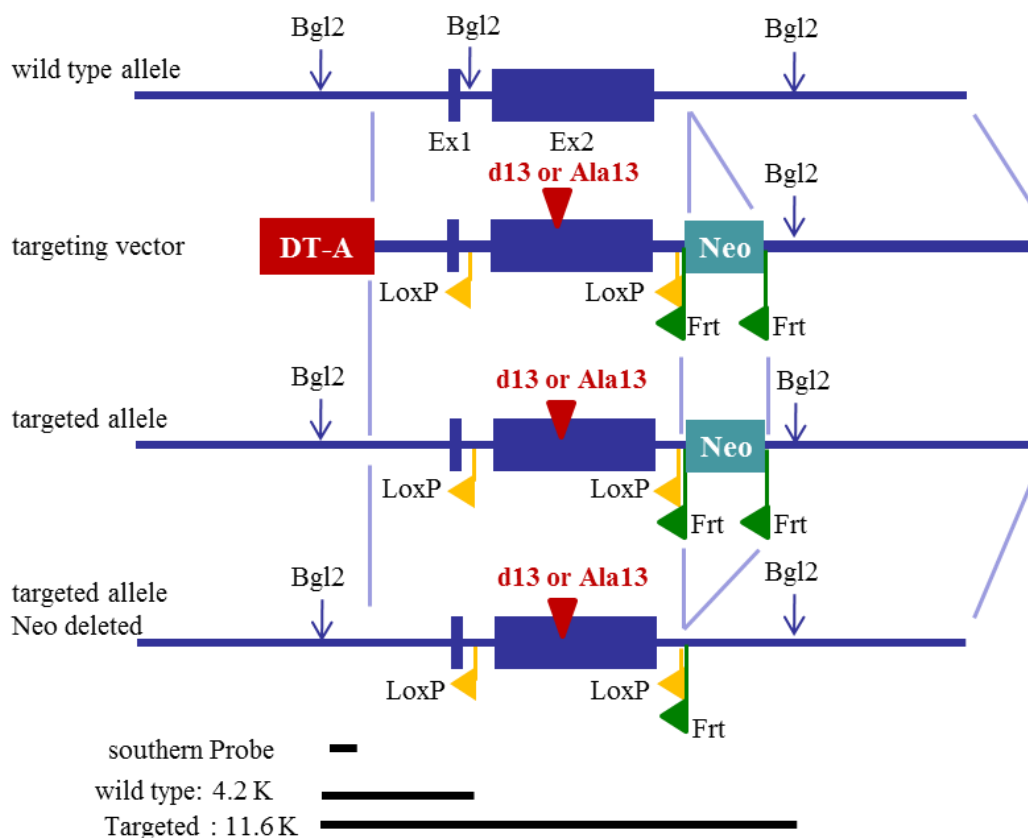
サザンで同定した相同組換え体をマイクロインジェクションに用い、得られたキメラマウスを野生型 B6 マウスと交配させ、生まれた仔マウスの尻尾から得られた DNA を用い

てPCRで遺伝子タイピングをした後、変異アレルを含むものをCAG-flp遺伝子導入マウスと交配し、ネオマイシン耐性遺伝子を除去した。交配を繰り返した後、変異アレルをホモで持ちflp遺伝子を持たないマウスをノックインマウスとして実験に用いた。ノックインマウスの尻尾から得たDNAの配列の解析を依頼し、TLR9に目的の変異が入っていることを確認した(Fig9. B)。

また、TLR9 Ala13変異体の変異アレルを持つノックインマウスをCAG-Creマウスと交配し、TLR9の第2エクソンを欠失させ、交配を繰り返したのちTLR9第2エクソン欠失遺伝子をホモで持ち、Cre遺伝子を持たないマウスをTLR9ノックアウト(KO)マウスとして用いた。

TLR9 d13変異体、TLR9 Ala13変異体のノックインマウス及び、TLR9ノックアウトマウスはいずれも、メンデル比に従って正常に生まれ、成長した。

A



B

Mouse tail genome sequence

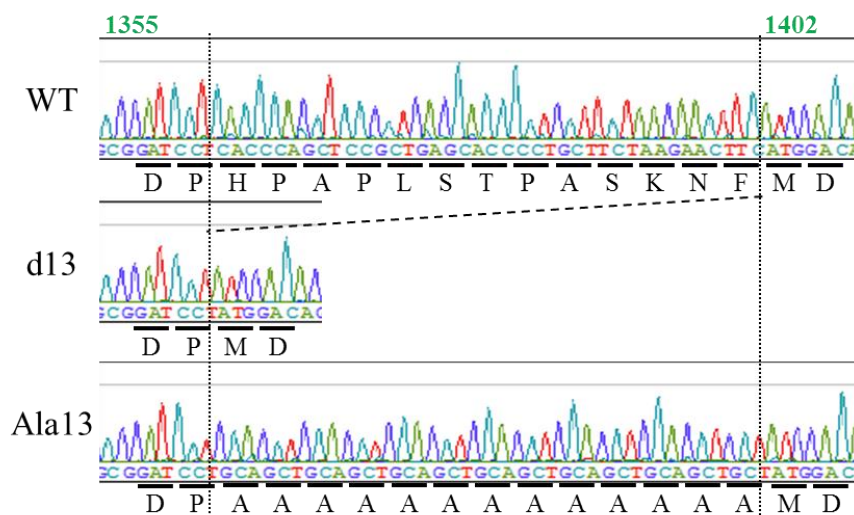


Fig9. TLR9 変異体ノックインマウスの作製

A.TLR9 変異体ノックインマウス作製用、ノックインベクターの設計図

B.野生型マウスおよびノックインマウスの尾から採取した DNA の配列解析の結果の波形図と相同するアミノ酸配列。

TLR9 変異体ノックインマウスの mRNA 量解析

作製したノックインマウスの解析にあたっては、変異の導入により転写量が影響を受ける可能性があるため、TLR9 の転写効率を確認する必要がある。そこで、TLR9 ノックアウトマウス、野生型マウス、TLR9 変異体ノックインマウスそれぞれから脾臓を採取し、TLR9 の mRNA 量を Real Time PCR で測定した。

その結果、野生型マウスと TLR9 変異体ノックインマウスの間で TLR9 の mRNA 量に有意な差は見られなかった(Fig.10)。また、ネガティブコントロールとして使用した TLR9 ノックアウトマウスでは TLR9 の mRNA は検出されなかった。

次に、TLR9 タンパク質の総発現量を検討した。しかしながら、whole cell lysate を用いた western blot では、内在性の TLR9 を検出することはできなかった。また、既存の抗体を用いた染色では、フローサイトメーターによる内在性 TLR9 の検出が出来なかった。そのため、野生型マウスと TLR9 変異体ノックインマウスの間で TLR9 の mRNA 量に顕著な差は見られなかったことから、野生型マウスと TLR9 変異体ノックインマウスの間で翻訳された TLR9 のタンパク質の量にも変化がないと仮定し、解析を進めることにした。

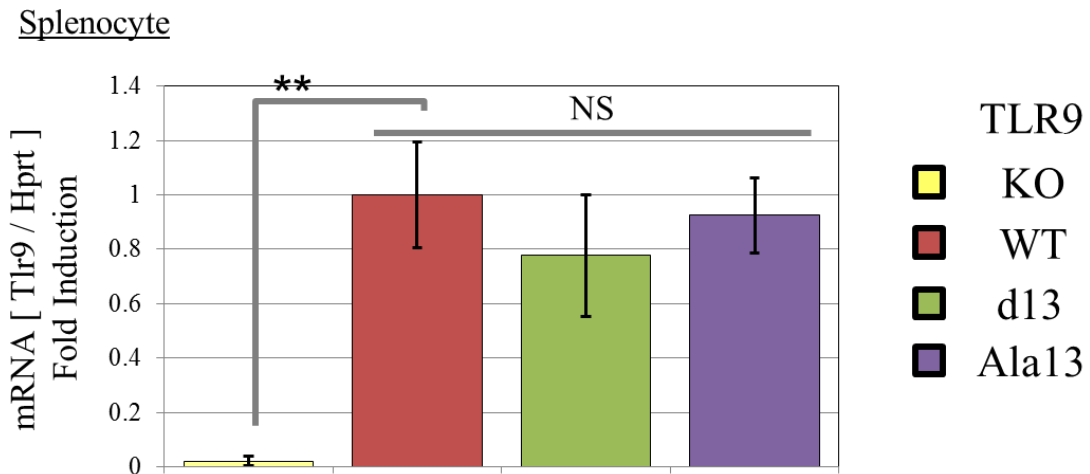


Fig10.TLR9 の mRNA 量は TLR9 変異体(d13、Ala13)ノックインマウスで
 有意な変化はない

野生型マウスおよび TLR9 ノックアウトマウス、TLR9 変異体ノックインマウスから脾臓を採取し、脾臓細胞から RNA を精製した。精製した RNA を逆転写後、real-time PCR により mRNA 量を比較した。同時に HPRT の mRNA 量を測定し、インターナルコントロールとした。野生型マウスの TLR9/HPRT 比を1とし、他のマウスと比較した結果をグラフに示す。

TLR9 変異体の in vivo でのリガンド応答性の解析

個体レベルでの TLR9 の応答性について比較するために、TLR9 ノックアウトおよび、野生型、TLR9 変異体ノックインマウスに CpG-B1668 を静脈投与し、刺激前と刺激後 1 時間、3 時間 5 時間と継時的に採血した後、血清中のサイトカイン、ケモカイン量を比較した。測定は、ELISA Kit を用いて行い、IL12p40、TNF α 、RANTES、IFN α の 4 種類をそれぞれ測定した。マウス個体に CpG-B を静脈投与すると、TNF α 、IFN α は刺激後 1 時間をピークとして産生が認められた。また、刺激後 3 時間後、5 時間後ではほぼ検出できなかった。IL12p40 は刺激後 3 時間で最も産生量が多く、刺激後 5 時間では刺激後 3 時間よりも産生量が減少した。RANTES は刺激後 3 時間、刺激後、5 時間で検出できた (Fig11)。TLR9 ノックアウトマウスでは CpG-B 投与によるサイトカイン、ケモカインの産生は見られなかった。野生型と TLR9 変異体ノックインマウスの比較では、測定した 4 種類のうち、IL12p40、TNF α 、RANTES は野生型に比較して TLR9 変異体ノックインマウスにおいて CpG-B 依存的に産生される量が有意に減弱した (Fig11. A-C)。IFN α については、誤差範囲が大きく有意差は得られなかったものの野生型に比較して TLR9 変異体ノックインマウスにおいて CpG-B 依存的に産生される量が減弱する傾向が得られた (Fig11. D)。

Ba/F3 細胞を解析した結果では、TLR9 変異体のリガンド依存的な NF- κ B 活性化はほぼ認められなかったが、TLR9 変異体ノックインマウスを用いた in vivo での解析では、野生型マウスと比べ有意に低下しているものの、TLR9 ノックアウトマウスと比べて有意にサイトカイン産生が認められた。そのため primary の細胞では TLR9 がある程度切断されることにより、TLR9 応答が認められた可能性を考えて、マウス個体から得られる各種免疫系細胞それぞれで TLR9 応答と、TLR9 の切断を検討することにした。

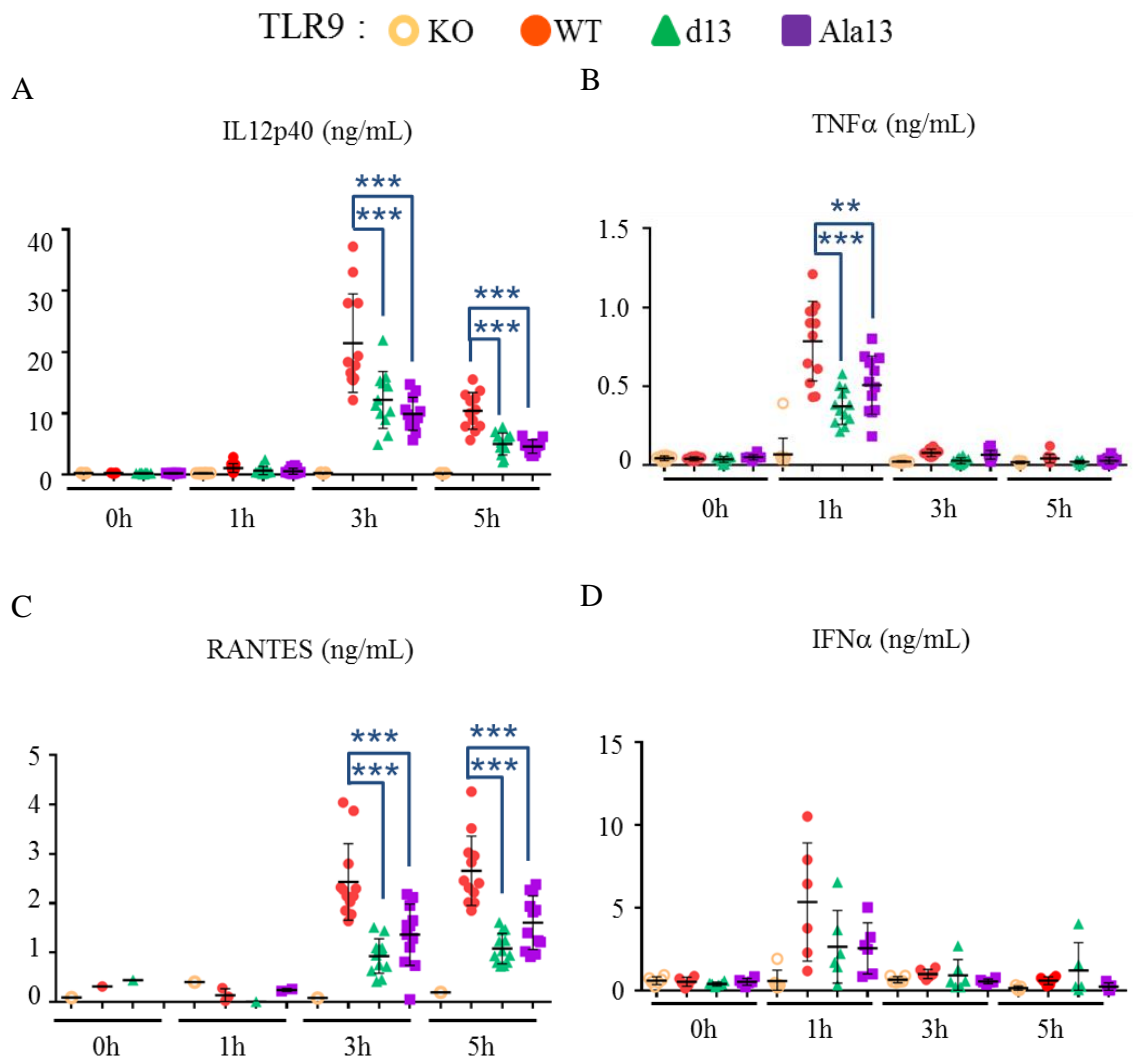


Fig11. TLR9 変異体ノックインマウスでは

CpG-B1668 刺激によるサイトカイン産生が抑制される

A-D. 野生型マウスおよび TLR9 ノックアウトマウス、TLR9 変異体ノックインマウスから採血した後、TLR9 リガンド CpG-B1668 (2 nmol)を静脈投与後、継時的に採血し血清中に含まれるサイトカイン量を ELISA で測定した。

(N=12) A. IL12p40、B. TNFα、C. RANTES、 (N=6) D. IFNα

細胞の種類ごとの TLR9 変異体のリガンド応答性の解析

細胞の種類ごとの検討は、骨髄誘導性 macrophage、cDC、pDC 及び、脾臓細胞から分離した B 細胞を用いた。

骨髄誘導性 macrophage の誘導効率に差がないか確認するため、フローサイトメーターで CD11c と CD11b の発現効率を比較した結果、TLR9 ノックアウト、野生型、TLR9 変異体ノックイン間で顕著な差は認められなかった(Fig12. A)。この細胞を用いて、CpG-B1668 刺激後の IL-6 の産生を ELISA で比較した。TLR9 非依存的な応答に影響がないかを確認するため、TLR4/MD-2 のリガンドである lipid A をコントロールとした。TLR9 ノックアウトマウス由来の macrophage では CpG-B1668 刺激依存的なサイトカイン産生は認められなかった。また、TLR9 変異体ノックインマウス由来の macrophage では野生型に比較して lipid A 刺激では有意な差は認められなかったが、CpG-B1668 刺激では IL-6 産生が優位に低下した(Fig12. B)。

次に骨髄誘導性 cDC を解析した。誘導効率に差がないか確認するため、フローサイトメーターで CD11c と CD11b の発現効率を比較した結果、TLR9 ノックアウト、野生型、TLR9 変異体ノックイン間で顕著な差は認められなかった(Fig13. A)。この細胞を用いて、CpGA-1585 及び CpG-B1668 刺激後の IL-6 の産生を ELISA で比較した。その結果、TLR9 ノックアウトマウス由来細胞では CpGA-1585 及び CpG-B1668 刺激依存的な IL-6 産生は認められなかった。また、TLR9 変異体ノックインマウス由来細胞では野生型に比較してコントロールである lipid A 刺激では有意な差は認められなかったが、CpGA-1585 及び CpG-B1668 刺激では IL-6 産生が有意に低下した(Fig13. B)。

次に骨髄誘導性 pDC を解析した。pDC は骨髄細胞から Flt3L を用いて誘導した細胞を CD11c と B220 で染色し、CD11c 陽性・B220 陽性細胞をソーティングで分離した

ものを使用した。TLR9 ノックアウト、野生型、TLR9 変異体ノックインマウス由来の pDC 間で誘導効率に顕著な差は見られなかった (Fig14. A)。この細胞を用いて、CpGA-1585 及び CpG-B1668 刺激後の IL-6 産生を ELISA で比較した。pDC には TLR4 が発現していない(51)ため、TLR9 非依存的な応答に影響がないかを確認するためにコントロールとして TLR7 を刺激する 1 重鎖 RNA poly U を用いた。その結果、TLR9 ノックアウトマウス由来 pDC では CpGA-1585 及び CpG-B1668 刺激依存的な IL-6 産生は見られなかった。また、TLR9 変異体ノックインマウス由来 pDC では野生型に比較して poly U 刺激では有意な差は認められなかったが、低濃度の CpG-B1668 刺激、CpG-A1585 刺激では IL-6 産生量が有意に低下したが高濃度の CpG-B1668 刺激では有意な差が認められなかった (Fig14. B)。

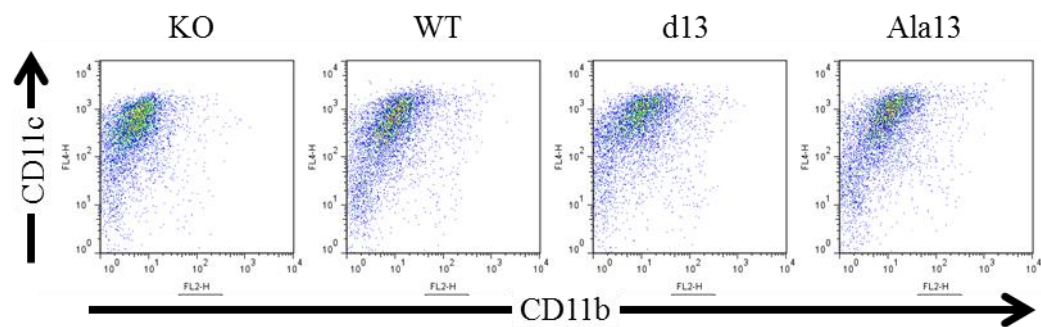
また、脾臓細胞から分離した B 細胞を解析した。脾臓細胞から抗 CD43 抗体 Micro beads を用いて CD43 陰性細胞を Auto MACS で分離し、B 細胞として使用した。分離前の脾臓細胞及び分離後の B 細胞の B220 で染色し、B 細胞の割合をフローサイトメーターで測定した結果、TLR9 ノックアウト、野生型、TLR9 変異体ノックインマウス間で顕著な差は認められなかった (Fig15. A)。この細胞を用いて、CpGA-1585 及び CpG-B1668 刺激した 72 時間後 H^3 標識された Thymidine を添加し、12 時間後の H^3 標識された Thymidine の取り込みを指標に細胞増殖を比較した。TLR9 非依存的な細胞増殖に影響がないかを確認するため、TLR4/MD-2 を刺激する lipid A をコントロールとした。その結果、TLR9 ノックアウトでは CpG-B1668 刺激依存的な細胞増殖は見られなかった。また、lipid A 刺激では有意な差は認められなかったが、TLR9 変異体ノックインでは野生型に比較して高濃度の CpG-B1668 刺激、CpG-A1585 刺激では細胞増殖が有意に低下したが低濃度の CpG-B1668 刺激では有意な差が認められなかつ

た (Fig15. B)。

これらの結果から、すべての細胞において野生型に比較して TLR9 変異体ノックインマウス由来細胞で TLR9 依存的な応答、サイトカイン産生や細胞増殖が減弱している事が観察されたが、細胞の種類によっては TLR9 変異体ノックインマウス由来細胞での TLR9 応答の一部に有意な差が認められなかった。macrophage や cDC では、野生型に比較して TLR9 変異体マウス由来細胞において応答が有意に抑制された (Fig12-15. B)。一方、pDC や B 細胞ではと有意差がない条件もあった (Fig12-15. B)。この結果から、macrophage や cDC では TLR9 切断の応答への重要性が強く pDC や B 細胞では弱いと予測した。この結果から、TLR9 の切断が細胞によって異なる可能性を考え、細胞の種類ごとに TLR9 の切断について比較することにした。

A. Bone Marrow Cells derived by M-CSF

Macrophages



B.

Macrophages

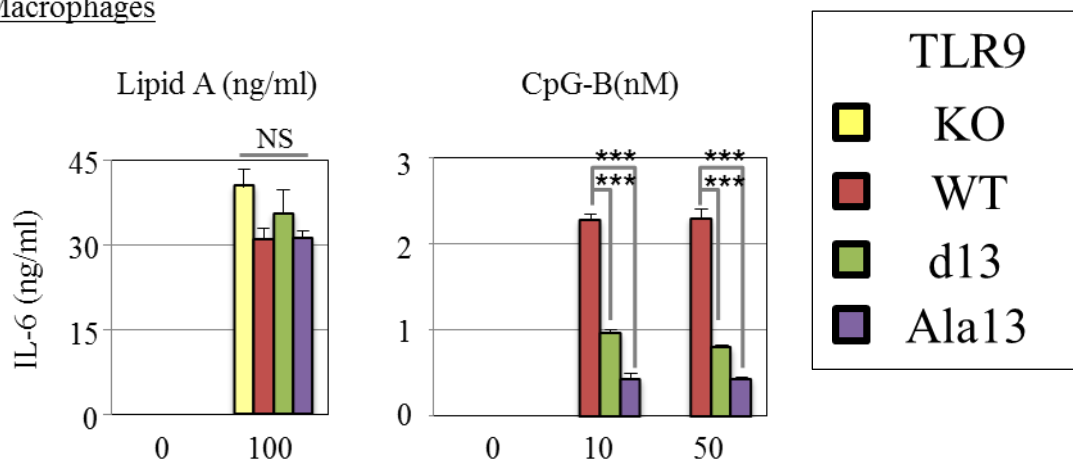
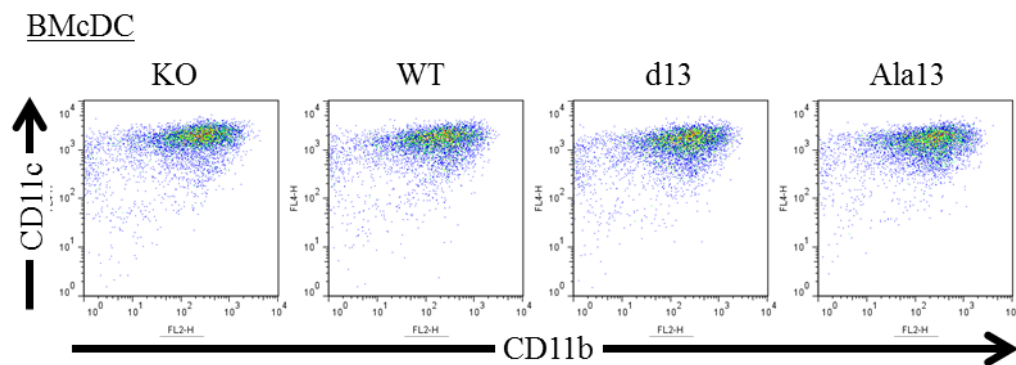


Fig12. 骨髄誘導性 macrophage では TLR9 変異体で TLR9 応答が低下する

A. M-CSF 入りの溶媒で 7 日間培養した骨髄細胞を抗 CD11b 抗体と抗 CD11c 抗体で染色しフローサイトメーターで観察した。

B. 骨髄誘導性 macrophage を CpG-B1668 及び lipid A で刺激した 24 時間後、培養上清を回収し、ELISA で IL-6 産生量を比較した。

A. Bone Marrow Cells derived by GM-CSF



B.

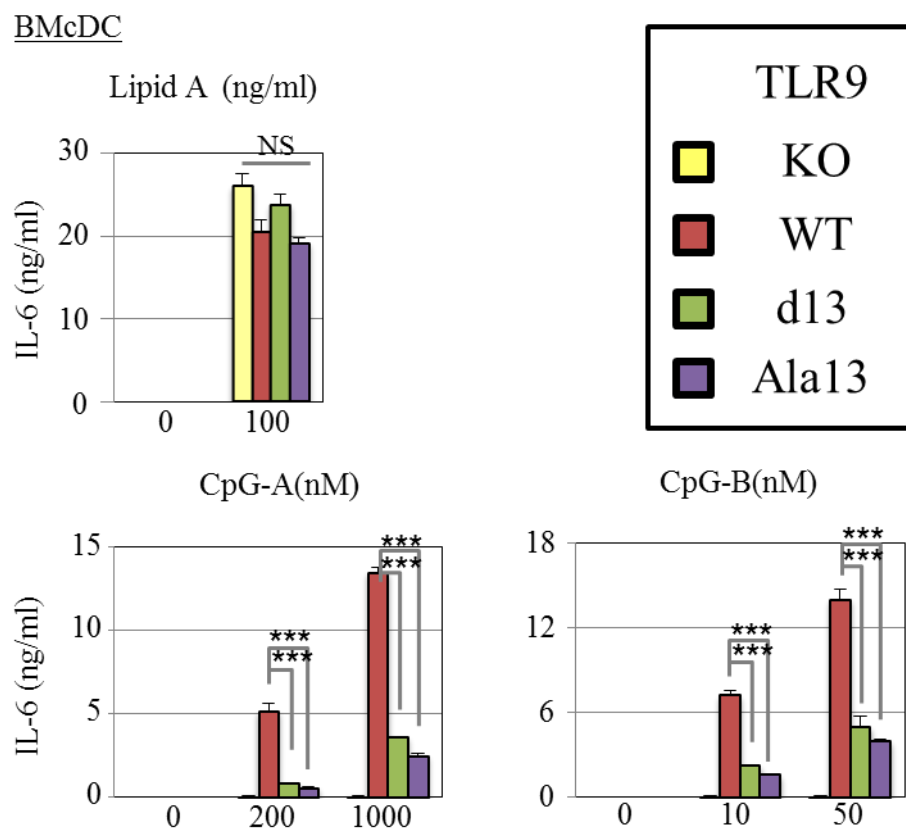
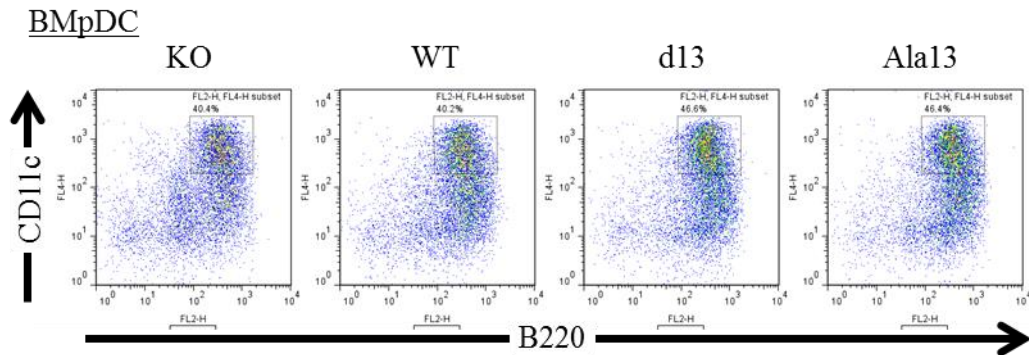


Fig13. 骨髓誘導性 cDC では TLR9 変異体で TLR9 応答が低下する

A. GM-CSF 入りの溶媒で 7 日間培養した骨髓細胞を抗 CD11b 抗体と抗 CD11c 抗体で染色しフローサイトメーターで観察した。

B. 骨髓誘導性 cDC を CpG-B1668、CpG-A1585 及び lipid A で刺激した 24 時間後、培養上清を回収し、ELISA で IL-6 産生量を比較した。

A. Bone Marrow Cells derived by Flt3L



B.

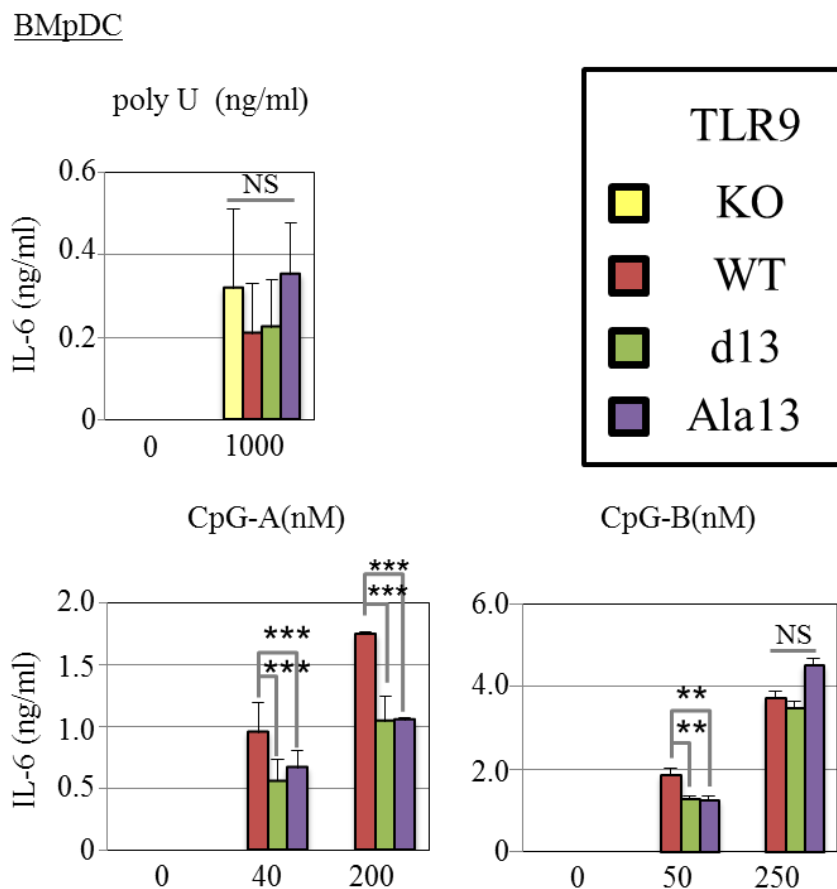


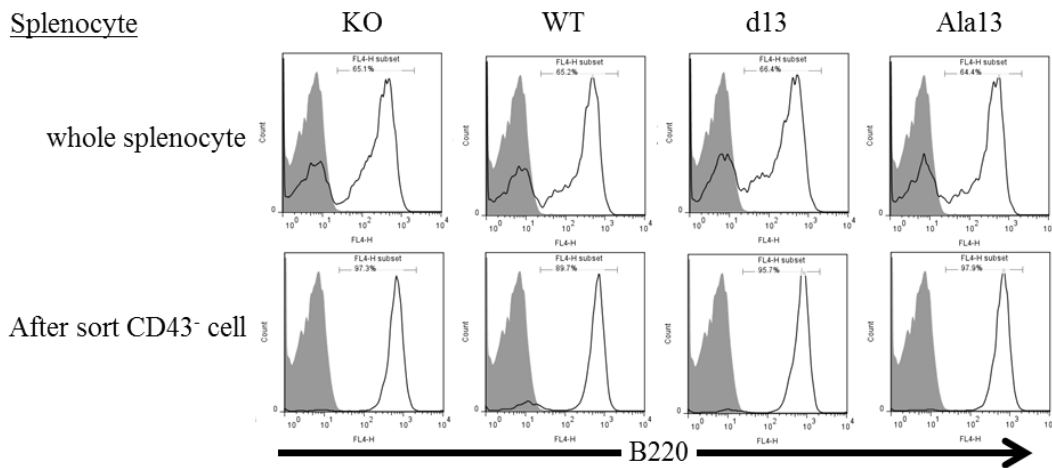
Fig14. 骨髓誘導性 pDC では TLR9 変異体で TLR9 応答が低下する

A. Flt3L 入りの溶媒で 7 日間培養した骨髓細胞を抗 CD11c 抗体と抗 B220 抗体で染色し FACS Aria で観察後 CD11c+/B220+細胞をソートした。

B. ソートした pDC を CpG-B1668、CpG-A1585 及び poly U で刺激した 24 時間後、培養上清を回収し、ELISA で IL-6 の産生量を比較した。

A.

Splenocyte



B.

Splenic B-cell

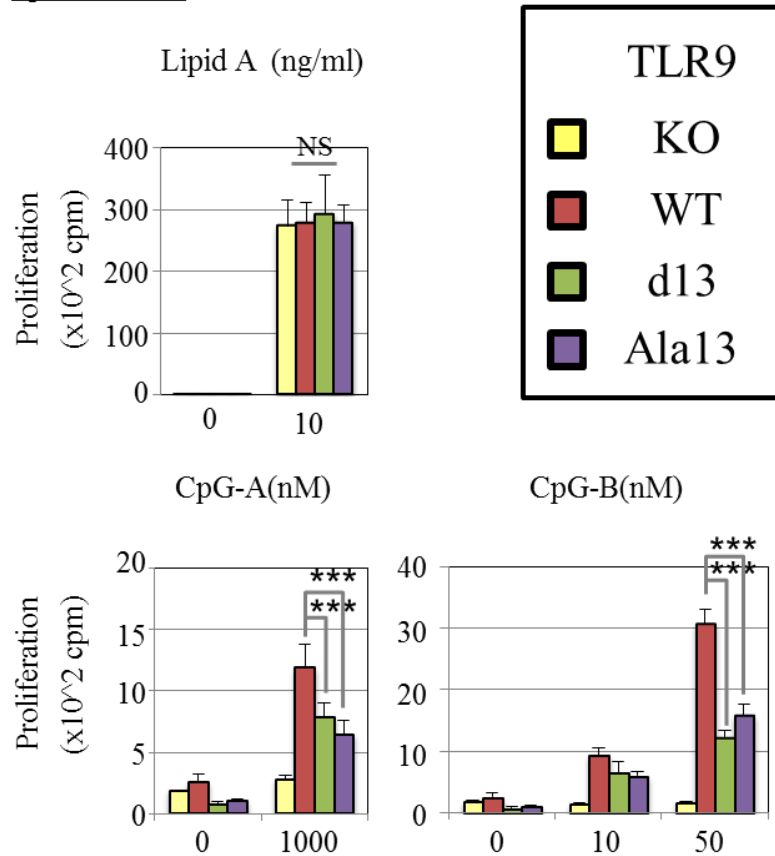


Fig15. 脾臓由来 B 細胞では TLR9 変異体で TLR9 応答が低下する

A. 脾臓細胞から抗 CD43 抗体 Micro beads を用いて CD43-細胞を Auto MACS で分離し、分離前と分離後で B220 陽性細胞の割合をフローサイトメーターで比較した。

B. 分離した B 細胞を pDC を CpG-B1668、CpG-A1585 及び lipid A で刺激した 72 時間後、H3 標識 Thymidine の取り込みを指標に刺激依存的な細胞増殖を比較した。

細胞の種類ごとの TLR9 切断の比較

次に、細胞の種類ごとに TLR9 の切断について比較した。TLR9 応答の解析と同様に骨髄誘導性 macrophage、cDC、pDC 及び脾臓細胞を用いた。それぞれの細胞を回収し、1% Lubrol を含むバッファーでライセートを調製後、抗 TLR9 抗体(B33A4)で免疫沈降し、western blot で TLR9 切断を比較した。TLR9 の切断を定量化するために、検出された切断型 TLR9(C ter.)の割合(Fig16 表中 C ter./Total)を算出し、比較した。macrophage、cDC、pDC、脾臓細胞のすべての細胞で TLR9 ノックアウトマウス由来の細胞では、TLR9 のバンドが検出されないことを確認した(Fig16)。TLR9 のバンドを数値化した際に TLR9 ノックアウトマウスでも数値が出ているが、TLR9 非特異的なバックグラウンドと判断した。同じ細胞数のサンプルを用いたことを示す loading control として、whole cell lysate 中の β -actin を検出した結果を示した。

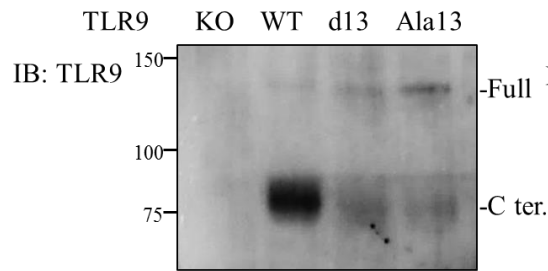
骨髄誘導性 macrophage では、野生型に比較して TLR9 変異体ノックインマウス由来細胞で切断型 TLR9 (C ter.)の量、切断型 TLR9(C ter.)の割合がともに減弱した。また、TLR9 の総量(Fig16.A 表中 Total : Full+C ter.)は野生型で 24.5、d13 変異体で 24.1、Ala13 変異体で 24.6 と野生型と変異体間で顕著な差は認められなかった(Fig17.A)。この結果から、骨髄誘導性 macrophage では TLR9 の切断領域の変異により、TLR9 の切断が抑制されることが示唆された。一方、骨髄細胞から誘導した cDC では、野生型に比較して TLR9 変異体ノックインマウス由来細胞で切断型 TLR9 (C ter.)の量は減弱したが、切断されていない TLR9(Full)の量も減弱したため、TLR9 の総量も野生型で 37.9、d13 変異体で 29.3、Ala13 変異体で 21.3 と TLR9 変異体では低下した(Fig16.B)。また、骨髄誘導性 pDC では、野生型に比較して TLR9 変異体ノックインマウス由来細胞で切断型 TLR9 (C ter.)の量が減弱した。また、切断されていない TLR9 (Full)は野

野生型と TLR9 変異体(d13、Ala13)ノックインともにほぼ検出されなかった (Fig16.C) 。脾臓細胞では、野生型に比較してTLR9 変異体(d13、Ala13)ノックインで切断型 TLR9 (C ter.)の量は減弱した(Fig16.D)が、切断されていない TLR9(Full)の量は、野生型と変異体の間で顕著な差が認められず、結果として TLR9 の総量は野生型で 34.2、d13 変異体で 30.7、Ala13 変異体で 28.0と TLR9 変異体では低下した(Fig16.D)。これらの結果から、macrophage では、TLR9 変異体は、TLR9 の切断が抑制された結果として応答が低下した可能性が示唆された。また、マウスの primary 細胞では455～467 番目のアミノ酸の欠失あるいはアラニンへの置換では TLR9 の切断を完全に抑制することは困難であることが分かった。一方、cDC や pDC 脾臓細胞では、全長型 TLR9、切断型 TLR9 を合わせた TLR9 の総量が低下しており、TLR9 の切断の低下だけで応答性の低下を説明することは困難であることが分かった。TLR9 変異体ノックインマウスでは、TLR9 の mRNA 量に有意な変化がなかった(Fig.10)にも関わらず、TLR9 のタンパク量の減少が疑われる原因については、考察にて詳細に記述する。

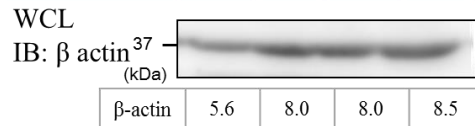
次に、primary の細胞での TLR9 と Unc93B1 の会合を比較した。TLR9 と Unc93B1 が会合しないコントロールとして Unc93B1 H412R 変異体を用いた。Unc93B1 H412R 変異体マウス、TLR9 ノックアウトマウス、野生型マウス、TLR9 変異体ノックインマウスそれぞれから、脾臓細胞を集め、1% Lubrol を含むバッファーでライセートを調製後、抗 TLR9 抗体(B33A4)で免疫沈降し western blot で TLR9 と Unc93B1 を検出した。その結果、TLR9 ノックアウトマウスでは TLR9 が検出されず、Unc93B1 H412R 変異体マウスでは TLR9 と Unc93B1 の会合が認められなかった。これらの結果から、TLR9 の免疫沈降での Unc93B1 の共沈が検出できていることが確認できた。TLR9 変異体は primary の細胞でも Unc93B1 と会合することが確認できた(Fig17)。

A Macrophage

IP: TLR9



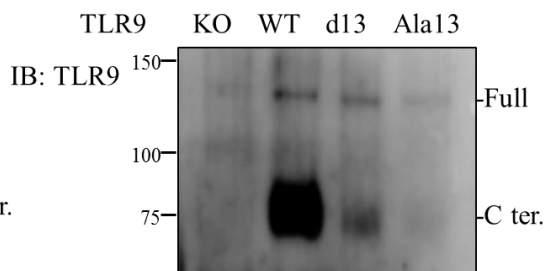
値	Full	7.8	8.4	10.5	11.8
	C ter.	7.8	16.1	13.6	12.9
Total : Full+C ter.		15.5	24.5	24.1	24.6
C ter./Total	-	0.66	0.56	0.52	



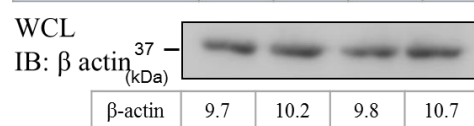
β-actin	5.6	8.0	8.0	8.5
---------	-----	-----	-----	-----

B cDC

IP: TLR9



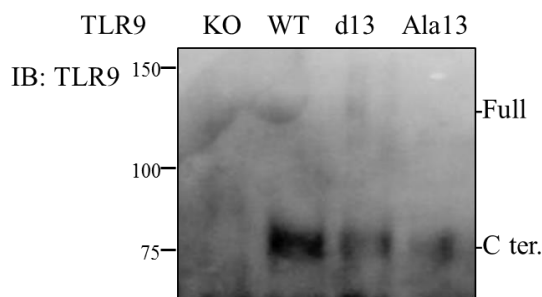
値	Full	12.8	15.9	13.7	10.2
	C ter.	15.3	22.0	15.6	11.1
Total : Full+C ter.		28.0	37.9	29.3	21.3
C ter./Total	-	0.58	0.53	0.52	



β-actin	9.7	10.2	9.8	10.7
---------	-----	------	-----	------

C pDC

IP: TLR9



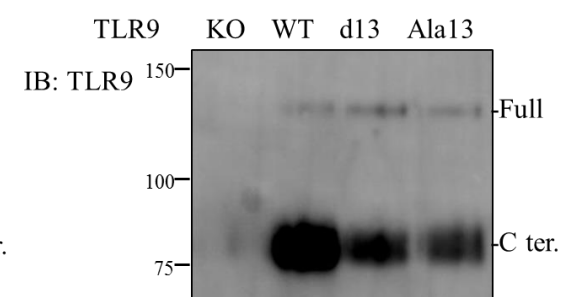
値	Full	-	-	-	-
	C ter.	15.7	20.8	16.9	15.6



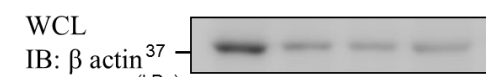
β-actin	4.8	8.6	8.2	8.6
---------	-----	-----	-----	-----

D Splenocyte

IP: TLR9



値	Full	10.2	11.6	12.7	11.6
	C ter.	13.1	22.6	18.0	16.4
Total : Full+C ter.		23.3	34.2	30.7	28.0
C ter./Total	-	0.66	0.59	0.59	



β-actin	11.3	7.9	7.4	7.8
---------	------	-----	-----	-----

Fig16. TLR9 変異体ノックインマウスで TLR9 切断の抑制度合いが

細胞の種類によって異なる

野生型および TLR9 KO、TLR9 変異体ノックインマウスから得た macrophage(A)、cDC(B)、pDC(C)、脾臓細胞(D)からそれぞれライセートを作製し、抗 TLR9 抗体で免疫沈降後抗 TLR9 抗体による western blot で TLR9 の切断を比較した。

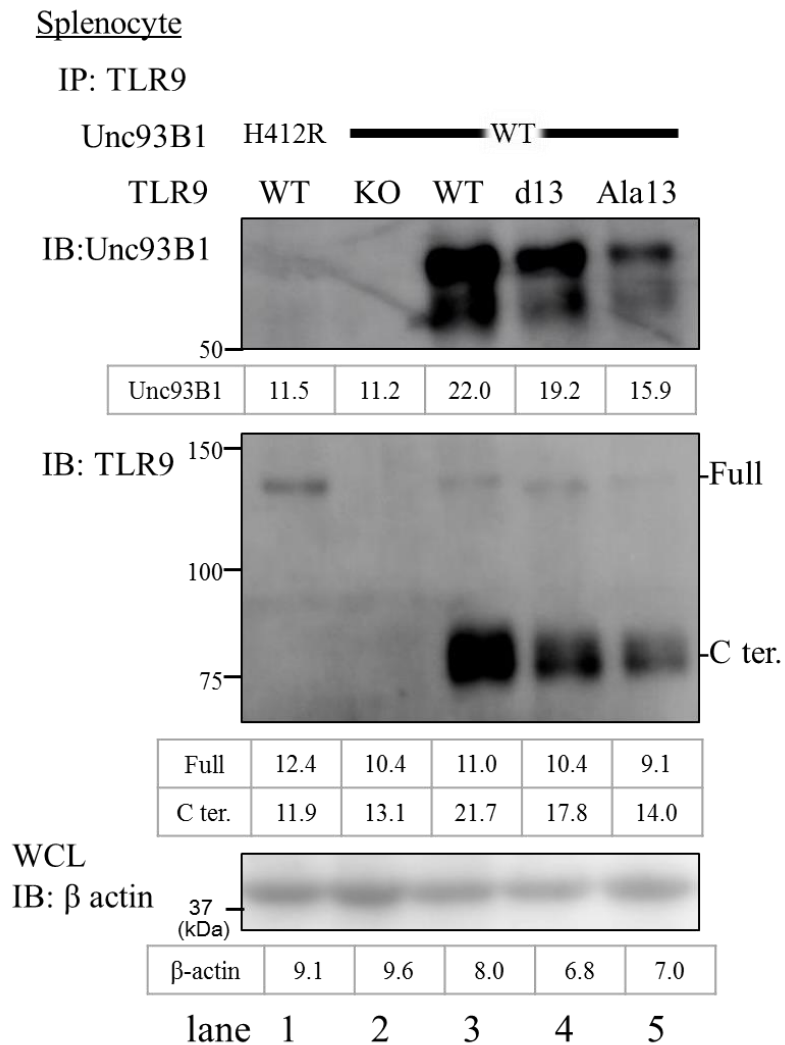


Fig17. 内在性の Unc93B1 と TLR9 変異体は会合する

Unc93B1 H412R 変異体マウス、TLR9 ノックアウトマウス、野生型マウス、TLR9 変異体ノックインマウスそれぞれから、脾臓細胞を集め、1% Lubrol を含むバッファーでライセートを調製後、抗 TLR9 抗体(B33A4)で免疫沈降し western blot で TLR9 と Unc93B1 を検出した。

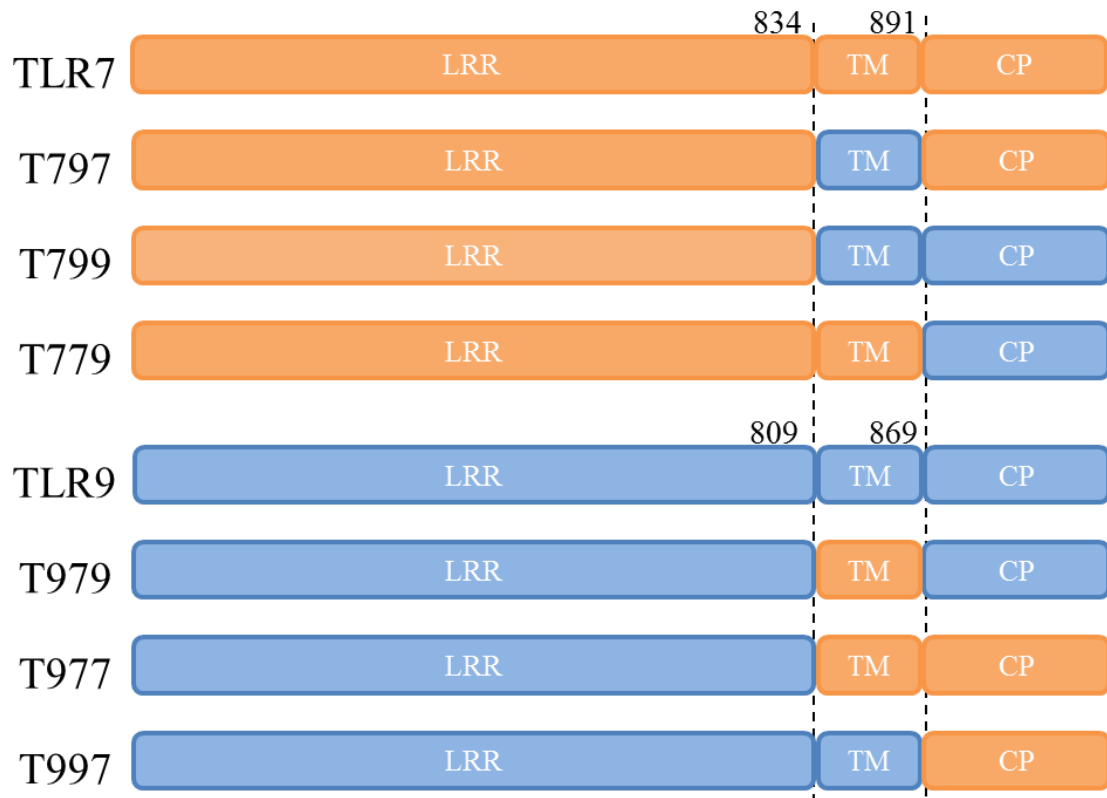
Unc93B1 D34 が識別する TLR 内分子構造の特定

TLR7、TLR9 のキメラタンパク質の作製

Unc93B1 D34A 変異体で TLR9 応答の抑制は、TLR9 の切断が抑制されることが原因である可能性が示唆された(Fig4～5)。しかしながら、TLR9 と Unc93B1 の会合量が Unc93B1 の野生型、D34A 変異体間で変化する原因は依然として不明である。さらに、TLR7 と Unc93B1 の会合量に Unc93B1 の野生型、D34A 変異体間で顕著な変化がなかったことから、Unc93B1 D34A 変異体における TLR7 応答亢進は、TLR7 と Unc93B1 の会合の変化では説明できない(Fig4～5)。

そこで、Unc93B1 の N 末端の D34 が TLR7 及び TLR9 をどのように識別し、応答を制御しているのか明らかにすることにした。まず、TLR7 と TLR9 を 3 つの機能ドメイン、LRR・膜貫通領域・細胞質領域に分け、それぞれを入れ替えたキメラ TLR を作製し、解析することで Unc93B1 によって識別される領域を特定することを試みた。TLR7 は 1050 アミノ酸、TLR9 は 1032 アミノ酸からなるタンパク質で BLAST を参考に TLR7 の 1～834、TLR9 の 1～809 を LRR、TLR7 の 835～891、TLR9 の 810～869 を膜貫通領域、TLR7 の 892～1050、TLR9 の 870～1032 を細胞質領域とし、それぞれを入れ替えた TLR7・9 キメラタンパク質 6 種類(T797、T799、T779、T979、T977、T997)を発現するベクターを作製した(Fig18.A)。TLR7・9 キメラの発現の確認のために、TLR の遺伝子配列の下流に IRES 領域を挟んでラットの CD2 遺伝子配列を組み込んだベクター(Fig19.B)を使用した。そのため、ラット CD2 発現細胞を TLR 発現細胞として解析した。

A



B

pMX-TLR-IRES-rat CD2

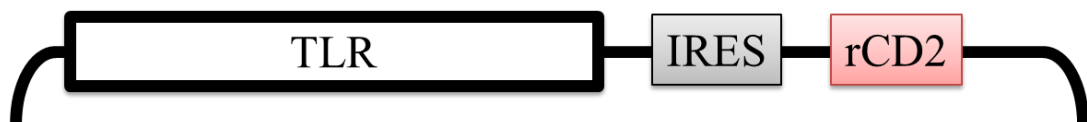


Fig18. TLR7・9 キメラの作製

A. TLR7 と TLR9 を 3 つの機能ドメイン、LRR・膜貫通領域(TM: trans membrane) ・細胞質領域 (CP: cytoplasmic) 、に区切りそれぞれを入れ替えた TLR7・9 キメラを作製した。

B. TLR7・9 キメラの発現には TLR の遺伝子配列の下流に IRES 領域を挟んでラットの CD2 遺伝子配列を組み込んだベクターを使用した。

TLR7・9 キメラと Unc93B1 の会合量の比較

まず、TLR7・9 キメラと Unc93B1 の会合量を Unc93B1 の野生型、D34A 変異体間で比較した。C 末に FlagHis タグを付加した TLR7、TLR9 及び TLR7・9 キメラと GFP タグを付加した野生型 Unc93B1 または Unc93B1 D34A 変異体を Ba/F3 細胞に共発現し、抗 Flag 抗体または抗 GFP 抗体で免疫沈降した後 western blot で TLR と Unc93B1 を観察した。これまでの結果と同様に、野生型 Unc93B1 と Unc93B1 D34A 変異体の間で TLR7 との会合量は顕著な差が見られなかった(Fig19.A.lane 3, 4, B. lane 3, 4)。TLR7 の膜貫通領域と細胞質領域の両方を TLR9 に置換した T799 と Unc93B1 の会合量は、TLR9 と同様に野生型 Unc93B1 と比較して Unc93B1 D34A 変異体で減少した(Fig19.A.lane 7, 8, B. lane 7, 8)。TLR7 の膜貫通領域を TLR9 に置換した T797 及び TLR7 の細胞質領域を TLR9 に置換した T779 と Unc93B1 の会合量は、Unc93B1 の野生型と D34A 変異体の間で顕著な変化は見られなかった(Fig19.A.lane 5,6,9,10, B. lane 5,6,9,10)。また、他の TLR7・9 キメラと比較して、T779 変異体と Unc93B1 の会合量は、Unc93B1 の野生型、D34A 変異体に関わらず減少した(Fig19. A. lane 9, 10, B. lane 9, 10)。この結果から、TLR7 は膜貫通領域と細胞質領域の両方を TLR9 に置換した T799 のみ、Unc93B1 D34A 変異体と TLR の会合量の減少がみられた。

一方、TLR9 と Unc93B1 の会合量は野生型 Unc93B1 と比較して Unc93B1 D34A 変異体で減少した(Fig20.A.lane 3, 4, B. lane 3, 4)。TLR9 の膜貫通領域を TLR7 に置換した T979 及び TLR9 の膜貫通領域と細胞質領域を TLR7 に置換した T977、TLR9 の細胞質領域を TLR7 に置換した T997 と Unc93B1 の会合量はどれも、野生型 Unc93B1 と Unc93B1 D34A 変異体の間で顕著な差が見られなかった(Fig20)。また、

他の TLR7・9 キメラと比較して、T979 変異体と Unc93B1 の会合量は、Unc93B1 の野生型、D34A 変異体に関わらず減少した(Fig20. A. lane 5, 6, B. lane 5, 6)。

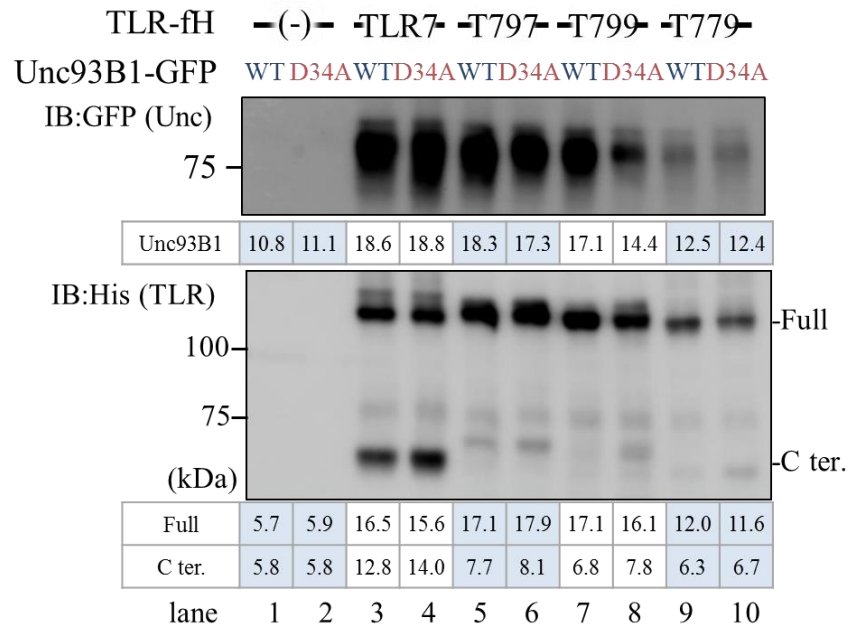
これらの結果から、Unc93B1 の N 末端側 D34 は TLR7 と TLR9 の膜貫通領域と細胞質領域の両方を識別することで TLR との会合量を制御している可能性が示唆された。

TLR7・9 キメラの切断の比較

次に、TLR7・9 キメラの切断型(C ter.)の量を Unc93B1 の野生型、D34A 変異体間で比較した。これまでの結果と同様に、野生型 Unc93B1 と Unc93B1 D34A 変異体の間で TLR7 の切断型 TLR(C ter.)の量に顕著な変化はない(Fig19. A. lane3, 4, B. lane3, 4) が、TLR9 は野生型 Unc93B1 共発現下に比較して Unc93B1 D34A 変異体の共発現下で切断型 TLR(C ter.)の量が減弱した(Fig20. A. lane3, 4, B. lane3, 4)。この結果を踏まえて、TLR7・9 キメラについても切断型 TLR(C ter.)の量を Unc93B1 の野生型、Unc93B1 D34A 変異体間で比較した。

TLR9 の膜貫通領域と細胞質領域を TLR7 に置換した T977 や細胞質領域を TLR7 に置換した T997 では、Unc93B1 の野生型と Unc93B1 D34A 変異体の間で TLR の切断型(C ter.)の割合(Fig20 表中 C ter./Total)に顕著な変化は見られなかった(Fig20. A. lane 7-10)。また、TLR9 の膜貫通領域のみを TLR7 に置換した変異体 T979 は、野生型 Unc93B1 と比較して Unc93B1 D34A 変異体で切断型 TLR(C ter.)の割合(Fig21 表中 C ter./Total)が減弱した(Fig20. A. lane 5, 6)。この結果から、TLR の切断から判断すると、TLR7 および TLR9 の細胞質領域を Unc93B1 の N 末端側 D34 が識別している可能性が示唆された。

A

Ba/F3 IP:Flag (TLR)

B

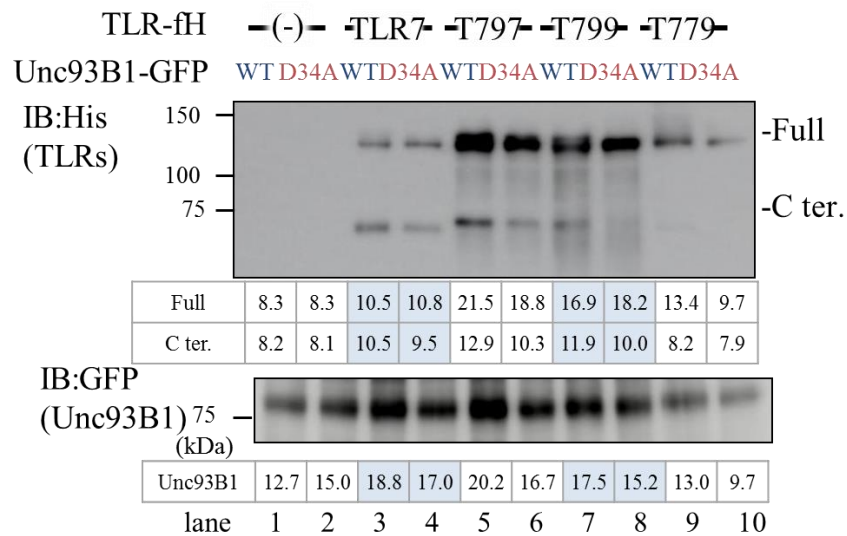
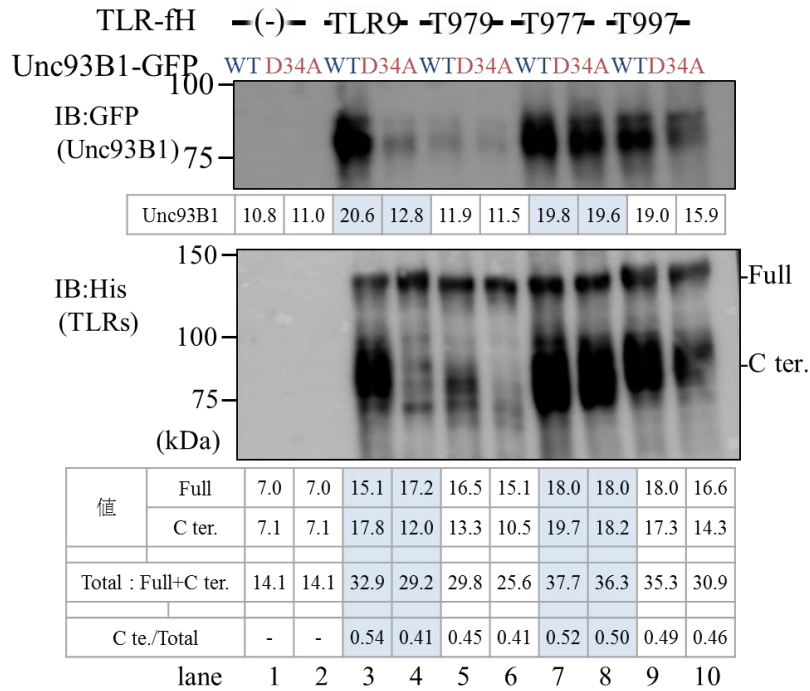
Ba/F3 IP:GFP (Unc93B1)

Fig19. Unc93B1 と TLR の会合は細胞質領域によって制御される

野生型 TLR7 及び TLR7・9 キメラを野生型 Unc93B1 または Unc93B1 D34A 変異体と Ba/F3 細胞に共発現し、抗 Flag 抗体または抗 GFP 抗体で免疫沈降した後 western blot で TLR と Unc93B1 の会合量を比較した。

A.

Ba/F3 IP:Flag (TLR)



B.

Ba/F3 IP:GFP (Unc93B1)

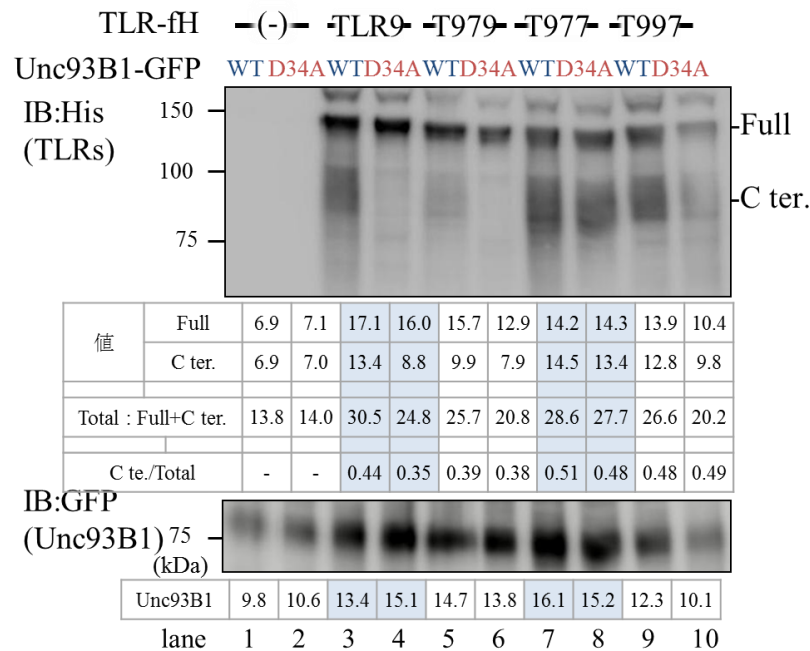


Fig20. Unc93B1 と TLR9 の会合は細胞質領域によって制御される

野生型 TLR9 及び TLR7・9 キメラを野生型 Unc93B1 または Unc93B1 D34A 変異体と Ba/F3 細胞に共発現し、抗 Flag 抗体(A.)または抗 GFP 抗体(B.)で免疫沈降した後 western blot で TLR と Unc93B1 の会合量を比較した。

TLR7・9 キメラのリガンド応答能の比較

次に TLR7・9 キメラの応答についても比較した。NF- κ B の活性化依存的に GFP を産生する Ba/F3 細胞に野生型 Unc93B1 または Unc93B1 D34A 変異体と TLR7・9 キメラを共発現させ、リガンド刺激依存的な GFP 産生量を比較した。TLR の発現はラット CD2 発現を指標にしており、ラット CD2 発現細胞におけるリガンド刺激依存的な GFP 産生量を解析した。これまでの報告の通り、Unc93B1 の野生型と D34A 変異体の間でリガンド刺激依存的な NF- κ B 活性化比較した結果、野生型 TLR7 発現株では野生型 Unc93B1 発現下に比較して Unc93B1 D34A 変異体発現下で TLR7 のリガンドである Gardiquimod 依存的な NF- κ B 活性化が有意に増強し(Fig21,23)、野生型 TLR9 発現株では TLR9 リガンド CpG-B1668 依存的な NF- κ B 活性化が野生型 Unc93B1 発現下に比較して Unc93B1 D34A 変異体発現下で有意に減弱した(Fig22,23)。また、TLR7 及び TLR9 非依存的な NF- κ B 活性化には影響がないことを確認するために Ba/F3 細胞に内在性に発現する TLR2 のリガンド、Pam3CSK4 でも刺激をしたが、野生型 TLR7 発現株、野生型 TLR9 発現株は共に Pam3CSK4 依存的な NF- κ B 活性化には顕著な差は見られなかった(Fig21-23)。

T797 及び T799 発現株はコントロールの Pam3CSK4 依存的な NF- κ B 活性化は示したが、Gardiquimod 刺激依存的な応答を示さなかった(Fig21, 23)。T779 発現株では野生型 Unc93B1 発現下に比較して Unc93B1 D34A 変異体発現下でリガンド依存的な NF- κ B 活性化が有意に減弱した(Fig21, 23)。コントロールの Pam3CSK4 依存的な NF- κ B 活性化には顕著な差は見られなかった。

T979 発現株は、コントロールの Pam3CSK4 依存的な NF- κ B 活性化には顕著な差は見られなかったが、野生型 Unc93B1 発現下に比較して Unc93B1 D34A 変異体発現

下で TLR9 リガンドである CpG-B1668 刺激依存的な NF- κ B 活性化が有意に減弱した (Fig22,23)。T977 発現株は、無刺激時にも GFP 産生がみられ、Unc93B1 D34A 変異体において有意に増強した (Fig22,23)。また、コントロールの Pam3CSK4 刺激時にも野生型 Unc93B1 発現下に比較して Unc93B1 D34A 変異体発現下で有意な NF- κ B 活性化増強がみられる (Fig22,23)。CpG-B1668 刺激依存的な NF- κ B 活性化は、野生型 Unc93B1 発現下に比較して Unc93B1 D34A 変異体発現下で有意に増強した (Fig22,23)。T997 発現株では、コントロールの Pam3CSK4 依存的な NF- κ B 活性化には顕著な差は見られなかったが、CpG-B1668 刺激依存的な NF- κ B 活性化が野生型 Unc93B1 共発現下に比較して D34A 変異体の共発現下で有意に増強した (Fig22,23)。

TLR7・9 キメラの刺激依存的な応答を Unc93B1 の野生型と D34A 変異体の間で比較した結果、TLR7 は細胞質領域を TLR9 に入れ替えた T779 で野生型 TLR9 のように野生型の Unc93B1 に比較して D34A 変異体で応答が有意に減弱し (Fig21,23)、TLR9 は膜貫通領域と細胞質領域の両方を TLR7 に入れ替えた T977 だけでなく、細胞質領域だけを TLR7 に入れ替えた T997 で野生型 TLR7 のように野生型の Unc93B1 に比較して D34A 変異体で応答が有意に増強した (Fig22,23)。

これらの結果、TLR7 の細胞質領域を TLR9 に入れ替えた T779 は、Unc93B1 D34A 変異体で応答が減弱し、TLR9 の細胞質領域を TLR7 に入れ替えた T997 は、Unc93B1 D34A 変異体で応答が増強したように、TLR7 及び TLR9 の細胞質領域をそれぞれ入れ替えた TLR7・9 キメラで TLR 応答の変化に相関がみられた。よって、TLR7 及び TLR9 は Unc93B1 の N 末端側 D34 に細胞質領域で識別され、応答が制御されることが示唆された。

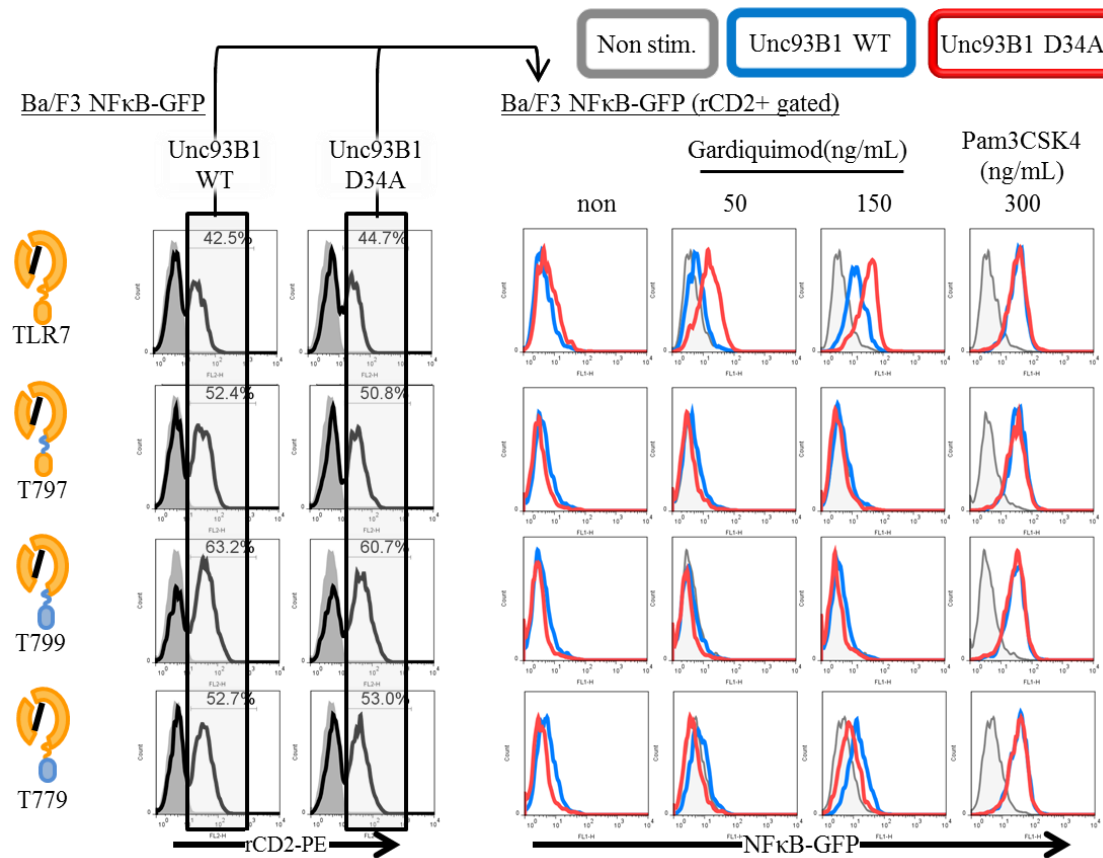


Fig21. Unc93B1 D34 依存的な TLR のリガンド応答は細胞質領域によって制御される

TLR7・9 キメラと Unc93B1 の野生型 (青) または D34A 変異体 (赤) を Ba/F3 細胞に共発現させ、細胞表面ラット CD2 発現陽性細胞の TLR リガンド刺激依存的な NF-κB の活性化をフローサイトメーターで解析した。刺激は、TLR7 リガンドの Gardiquimod とコントロールとして TLR2 リガンドの Pam3CSK4 を用いた。刺激後、20 時間後の TLR 発現細胞 (ラット CD2 陽性細胞) の GFP 産生を解析した。

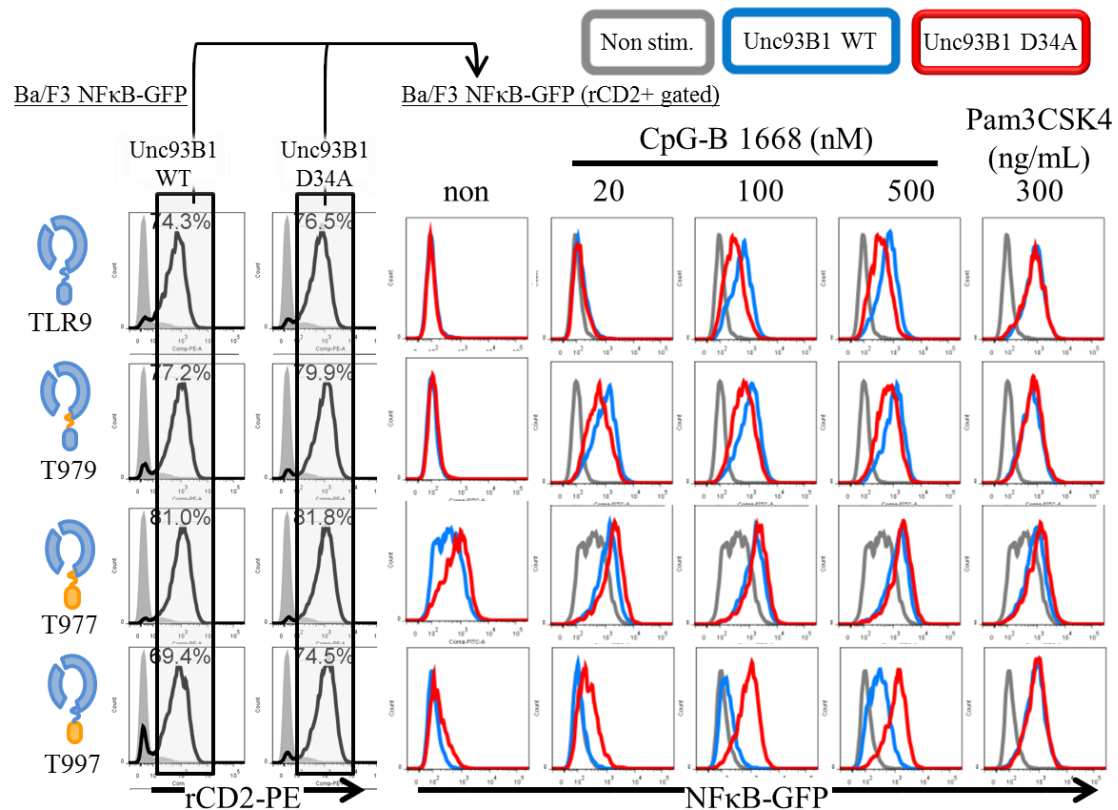


Fig22. Unc93B1 D34 依存的な TLR のリガンド応答は細胞質領域によって制御される
TLR7・9 キメラと Unc93B1 の野生型 (青)または D34A 変異体(赤)を Ba/F3 細胞に共発現させ、細胞表面ラット CD2 発現陽性細胞の TLR リガンド刺激依存的な NF- κ B の活性化をフローサイトメーターで解析した。刺激は、TLR9 リガンドの CpG-B1668 とコントロールとして TLR2 リガンドの Pam3CSK4 を用いた。刺激後、20 時間後の TLR 発現細胞(ラット CD2 陽性細胞)の GFP 産生を解析した。

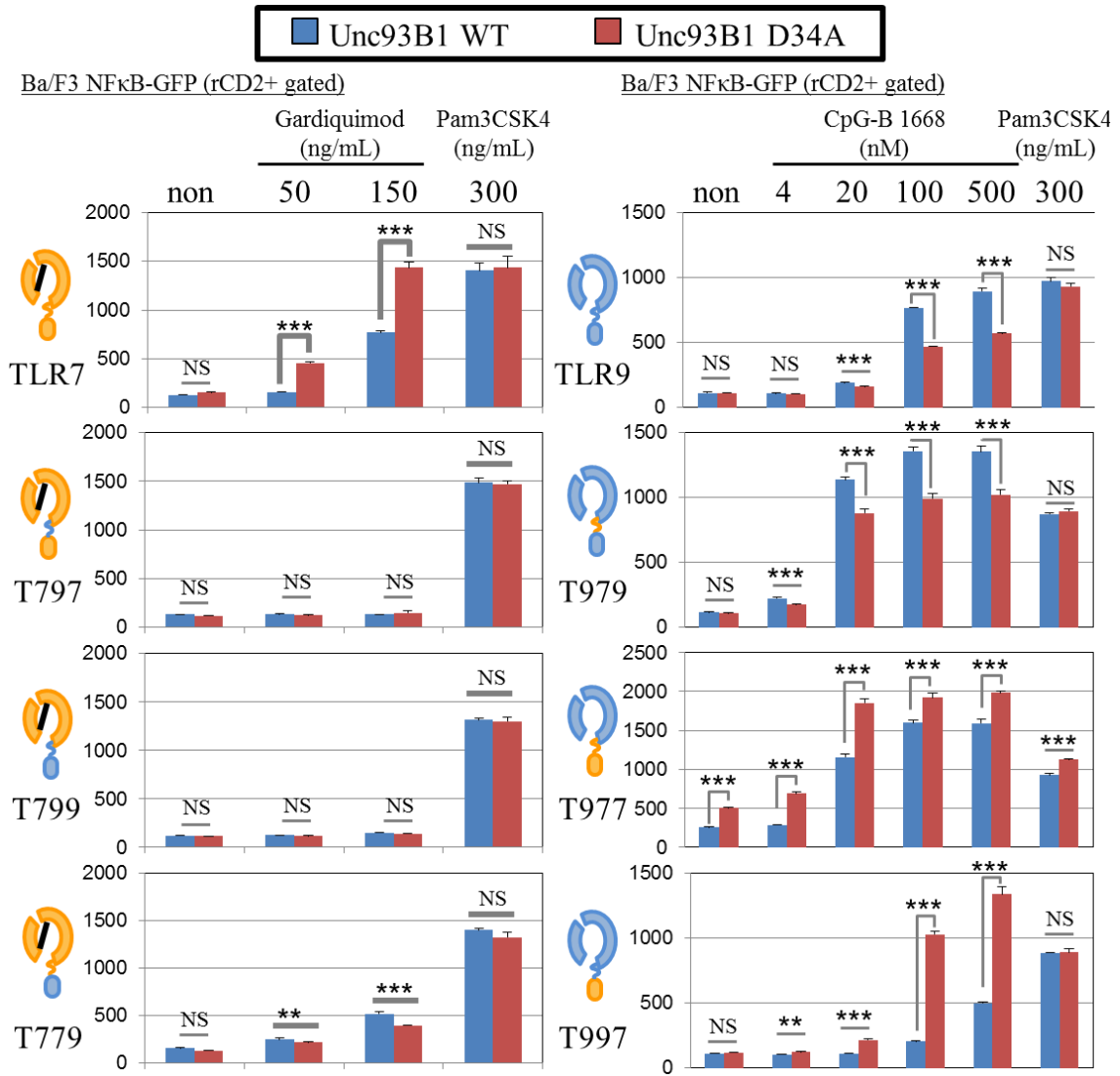


Fig23. Unc93B1 D34 依存的な TLR のリガンド応答は細胞質領域によって制御される

TLR7・9 キメラと Unc93B1 の野生型 (青)または D34A 変異体(赤)を Ba/F3 細胞に共発現させ、細胞表面ラット CD2 発現陽性細胞の TLR リガンド刺激依存的な NF- κ B の活性化をフローサイトメーターで解析した。刺激は、TLR7 リガンドの Gardiquimod または TLR9 リガンドの CpG-B1668 とコントロールとして TLR2 リガンドの Pam3CSK4 を用いた。刺激後、20 時間後の TLR 発現細胞(ラット CD2 陽性細胞)の GFP の MFI を求め、解析した。

細胞質領域内 TLR7・9 キメラの作製

Unc93B1 D34 依存的な TLR 応答制御に細胞質領域が重要であることが示唆されたことから、より詳細に TLR が制御される領域を特定するため BLAST を参考に細胞質領域を前半と後半に分け、TLR7 と TLR9 それぞれで置換した TLR7・9 キメラを作製した。TLR7 の 892～985 番目のアミノ酸を前半、986～1050 番目のアミノ酸を後半とした。TLR9 の 870～964 番目のアミノ酸を前半、965～1032 番目のアミノ酸を後半とした。T997 が Unc93B1 D34A 変異体での NF- κ B 活性の変化が最も評価しやすかったことから、LRR 領域と膜貫通領域は TLR9 の TLR7・9 キメラに絞って解析することにした。細胞質領域の前半を TLR7 に置換したものを T997A、後半を TLR7 に置換したものを T997C とし TLR の遺伝子配列の下流に IRES 領域を挟んでラットの CD2 遺伝子配列を組み込んだベクターを作製し、ラット CD2 発現細胞を TLR 発現細胞として解析した (Fig24. A)。

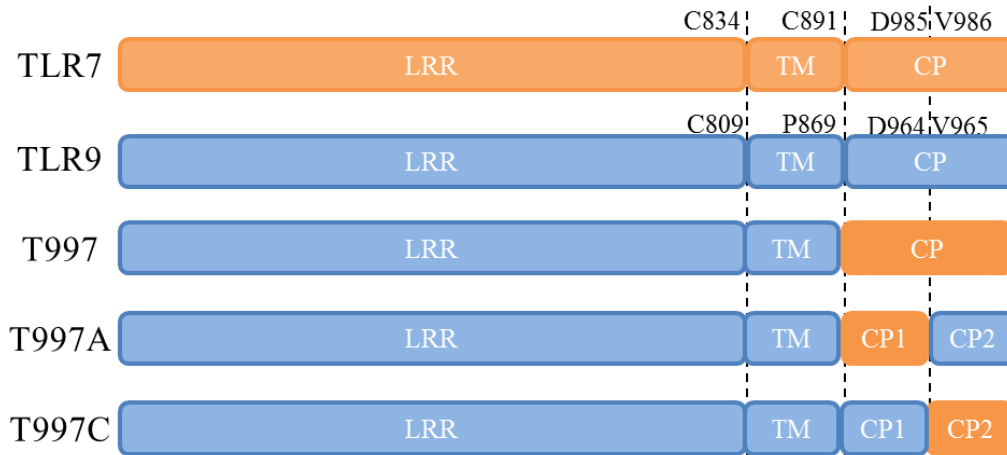
細胞質領域内 TLR7・9 キメラのリガンド応答能の比較

作製した TLR7・9 キメラを NF- κ B の活性化依存的に GFP を産生する Ba/F3 細胞に野生型 Unc93B1 または Unc93B1 D34A 変異体と共発現させ、TLR7・9 キメラ発現細胞のリガンド刺激依存的な GFP 産生量を比較した。その結果、TLR9 の細胞質領域の前半を TLR7 に置換した T997A ではコントロールの Pam3CSK4 依存的な NF- κ B 活性化は示したが、CpG-B1668 刺激依存的な応答を示さなかった (Fig24. B, Fig25)。TLR9 の細胞質領域の後半を TLR7 に置換した T997C では T997 同様に野生型 Unc93B1 発現下に比較して Unc93B1 D34A 変異体発現下で、コントロールの

Pam3CSK4 依存的な NF- κ B 活性化には顕著な差は見られなかったが、CpG-B1668 刺激依存的な NF- κ B の活性化が有意に増強した(Fig24. B, Fig25)。

この結果から、TLR7 及び TLR9 は Unc93B1 の N 末端側 D34 に細胞質領域の後半の約 70 アミノ酸の配列を識別され、応答が制御されることが示唆された。

A



B

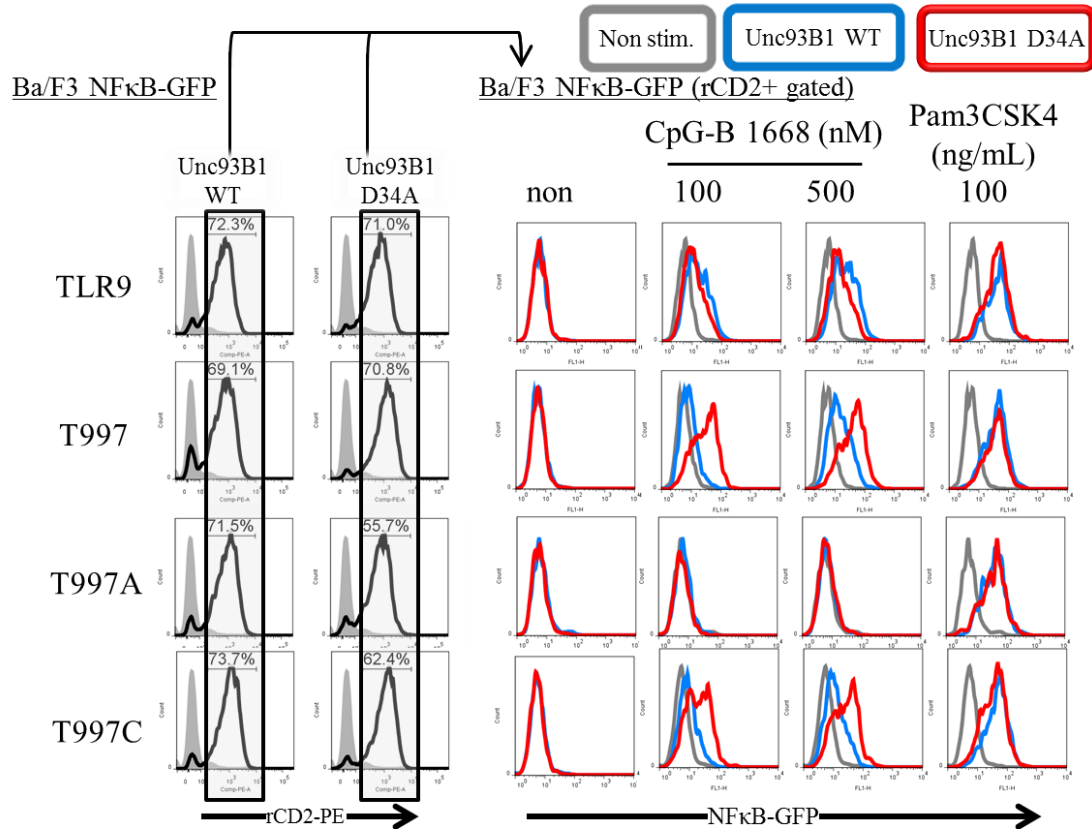


Fig24. Unc93B1 D34 依存的な TLR リガンド応答は細胞質領域の C 末端で制御される

A. T997 の細胞質領域一部を TLR7 と TLR9 を入れ替えた TLR7・9 キメラを作製した。

B. TLR7・9 キメラと Unc93B1 の野生型 (青) または D34A 変異体 (赤) を Ba/F3 細胞に共発現させ、細胞表面ラット CD2 発現陽性細胞の TLR リガンド刺激依存的な NF-κB の活性化をフローサイトメーターで解析した。刺激は、TLR9 リガンドの CpG-B1668 とコントロールとして TLR2 リガンドの Pam3CSK4 を用いた。刺激後、20 時間後の TLR 発現細胞 (ラット CD2 陽性細胞) の GFP 産生を解析した。

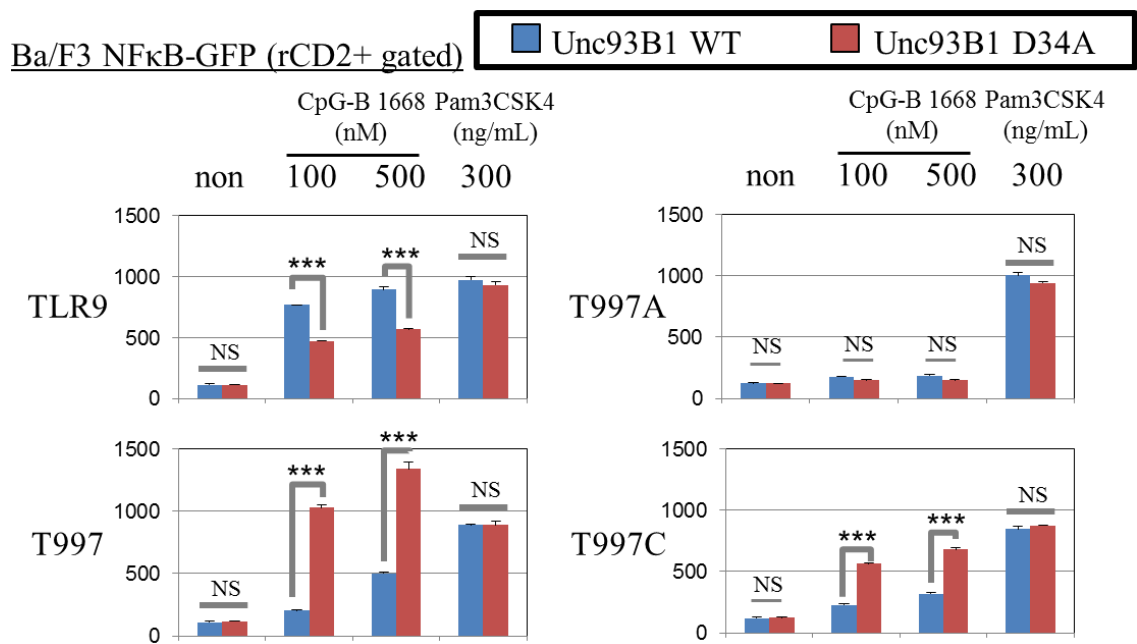


Fig25. Unc93B1 D34 依存的な TLR リガンド応答は細胞質領域の C 末端で制御される

TLR7・9 キメラと Unc93B1 の野生型 (青) または D34A 変異体 (赤) を Ba/F3 細胞に共発現させ、細胞表面ラット CD2 発現陽性細胞の TLR リガンド刺激依存的な NF-κB の活性化をフローサイトメーターで解析した。刺激は、TLR9 リガンドの CpG-B1668 とコントロールとして TLR2 リガンドの Pam3CSK4 を用いた。刺激後、20 時間後の TLR 発現細胞 (ラット CD2 陽性細胞) の GFP の MFI を求め、解析した。

6. 考察

本研究では、Unc93B1 による TLR7 と TLR9 の応答制御メカニズムをより詳細に明らかにすることを目的とした。以下で本研究により得られた結果について考察する。

TLR9 のリガンド応答能は切断型 TLR9 の量に依存する可能性がある

本研究では、TLR9 の切断と応答の関係について解析するために、TLR9 の切断領域に変異を導入することで、切断に対して抵抗性の変異体の作製と変異体のノックインマウスを用いた解析を進めた。Ba/F3 細胞での解析から TLR9 の応答が切断型 TLR9 の量に依存する可能性が示唆された (Fig7, Fig8)。また、骨髄誘導性 macrophage においても TLR9 変異体ノックインマウス由来の細胞では、TLR9 リガンド応答が野生型由来に比較して有意に低下した (Fig12)。また、免疫沈降した TLR9 のタンパク量 (Total) が野生型マウス由来細胞と TLR9 変異体ノックインマウス由来細胞ではほぼ同等であるにもかかわらず、切断型 TLR9 (C_{ter.}) の量や切断型 TLR9 の割合 (C_{ter./Total}) が減少した (Fig16)。この結果から、TLR9 変異体は primary の細胞である骨髄誘導性 macrophage でも切断に対して抵抗性であることが示唆された。また、primary の細胞においても TLR9 の切断が応答に重要である可能性が示唆された。しかしながら、TLR9 変異体においても切断型 TLR9 が検出できるため、完全に切断されない TLR9 は作製することはできなかった。TLR9 についての結晶構造が報告されており (43)、その報告の中で TLR9 の切断領域が、TLR9 二量体形成に重要な dimerization interface に近接しており、切断されないと二量体形成を阻害する可能性が示されている。TLR9 は切断されないと TLR9 の二量体を形成することが出来ないため、この二量

体化が応答に重要と考察されている(43)。この報告も、本論文と同様に、TLR9 の切断が応答に重要である可能性を支持している。

本研究で作成した TLR9 変異体は、骨髓幹細胞への導入時は切断されなかった(Fig6)にもかかわらず、ノックインマウスで解析した macrophage や cDC、pDC、脾臓細胞では切断された(Fig16,17)。この原因として、TLR9 の C 末端へのタグの付加が TLR9 の切断に影響された事が考えられる。私たちは、以前に TLR7 の切断と応答の関係についても報告しており、その報告の中で TLR7 の C 末端にタグを付加すると TLR7 が切断されにくくなることを報告している(39)。TLR9 においても同様の影響が示唆され、C 末端にタグを付加して TLR9 切断の状態を比較した骨髓幹細胞への導入時には切断されなかった変異体が、ノックインマウスの作製後のタグがない状態での解析では切断されたと考えられる。この結果は、本研究室で樹立した抗 TLR9 抗体(40)があったからこそ明らかになった結果であり、実際にタグがない状態で解析することが必要であることを示している。

TLR9 のタンパク質分解の可能性

TLR9 の切断について解析した際、TLR9 の変異体ノックインマウス由来の cDC や pDC では、切断された TLR9(C ter.)だけでなく全長の TLR9(Full)の量も減弱した(Fig16)。脾臓細胞においても、全長の TLR9(Full)の量は減少しないが、増加もしていなかった。そのため、TLR9 のタンパク量(Total)は野生型に比較して TLR9 変異体(d13、Ala13)ノックインマウス由来の脾臓細胞では減弱した。cDC、pDC、脾臓細胞では、TLR9 の変異体(d13、Ala13) ノックインマウス由来細胞で TLR9 応答が減弱しているものの、TLR9 の切断抑制だけではなく、TLR9 のタンパク量(Total)の減少の影響もある

と考えられる。しかし、脾臓細胞の TLR9 の mRNA 量を解析した結果では、TLR9 変異体(d13、Ala13)ノックインマウス由来と野生型マウス由来で TLR9 の mRNA 量顕著な差は得られなかった(Fig10)。そのため、TLR9 タンパク質の翻訳量は変化がないと予測される。さらに、macrophage については免疫沈降された TLR9 の量が変化していなかった(Fig16)ことから、翻訳された TLR9 の量は変化していないと考えられる。

一方、cDC、pDC、脾臓細胞においては、ER からライソソームへ移行した TLR9 は何らかの経路で分解されている可能性がある。Unc93B1 H412R 変異体マウスでは、全長の TLR9 の量は野生型マウスの TLR9 に比較して増加した(Fig16)。Unc93B1 H412R 変異体は TLR9 と会合することが出来ず、TLR9 が ER に留まることから ER で TLR9 は切断されないと考えられる。TLR9 変異体は Unc93B1 と会合していることから、ER からライソソームに移行できる可能性が高い。ヒト TLR9 については、E3 ユビキチンリガーゼの Triad3A を介してプロテアソーム経路で分解されることが報告されている(52)。そのため、今回解析したマウス TLR9 もヒト TLR9 同様の経路で分解されている可能性が考えられる。また、TLR3 においてもユビキチン化されプロテアソーム経路で分解されることが報告されている(53)。全長型 TLR3 は半減期が 3〜7 時間と短く、切断型 TLR3 は半減期が 24 時間を超えており、より安定であることが報告されている。全長型 TLR9 も同様に分解を受けやすいと仮定すると、TLR9 変異体では、全長型 TLR9 が増加したとしても、すぐに分解されて検出できない可能性が考えられる。この可能性を検討するために、プロテアソームの阻害剤などで処理をしたうえで、TLR9 の発現を検討する必要がある、今後の課題である。

免疫細胞の種類により TLR9 の応答能が異なる

TLR9 変異体(d13、Ala13)ノックインマウスの解析から、TLR9 の変異が及ぼす、TLR9 の切断や TLR9 の量的変化への影響が、macrophage や cDC、pDC、B 細胞など、細胞の種類によって異なる可能性が示された(Fig16)。TLR9 変異体の切断程度は細胞の種類によって異なり、脾臓では多くの TLR9 が切断された(Fig16)。また、全長型 TLR9(Full)も、macrophage では増加したが、脾臓細胞では変わらず、cDC では逆に減少し、pDC では野生型も含めて検出できなかった。これらの結果は、TLR9 の切断や TLR9 の安定性が細胞の種類によって大きく異なる可能性を示している。

TLR9 の切断に関わる分子として、Cathepsin がある。免疫細胞の種類によって活性化している Cathepsin の種類が異なり、免疫系制御に Cathepsin の活性化状態の変化が影響する報告がされている(54-56)。樹状細胞はライソソーム膜上の ATP 依存的なプロトンポンプの活性を変化させることで成熟状態によってライソソームの pH が異なる。そのため、immature DC と mature DC 間で発現している Cathepsin H、Cathepsin D、Cathepsin S、Cathepsin L の量に変化はないものの、mature DC では活性化型の Cathepsin L が多くなり、mature DC で MHC class II の抗原提示に使われる抗原の分解効率が亢進することが報告されている。TLR9 の切断も、樹状細胞の成熟とともに進む可能性は十分に考えられる。序章でも述べたように、Cathepsin ファミリーは、TLR9 のアクセサリ分子としての報告も多数ある(44-47)。Cathepsin ファミリーの阻害剤によって TLR9 の CpG-B への応答が減弱する事や、Cathepsin B や Cathepsin L との共発現によって TLR9 の CpG-B への応答が亢進されることが報告されている(45, 47)。また、Cathepsin 阻害剤により TLR9 や TLR3 の切断が抑制されることも報告されており(44-46, 53)、Cathepsin ファミリーは核酸認識系 TLR の切断分子と考えられている。しかしなが

ら、Cathepsin B や Cathepsin L 単独のノックアウトマウスでは、野生型マウスと比較して TLR9 の切断に変化がない結果が得られている。これらの結果から、TLR9 の切断分子は一つではなく、複数の分子がお互いを補完し合って切断を制御していると考えられる。また、細胞の活性化状態や成熟度合いによって TLR9 の切断や分解の制御も異なることが予想され、それに応じて細胞種ごとの TLR9 活性化度合いの変化も生じると考えられる。

今後の課題として完全に切断されない TLR9 の変異体の解析の必要性

本研究では、完全に切断されない TLR9 の変異体は作成できなかったため、今後、結晶構造により明らかになった TLR9 の Z-loop を欠失させた変異体など、完全に切断されない変異体を作製することで未切断の TLR9 のタンパク分解やリガンド応答への影響についての解析が必要と考える。

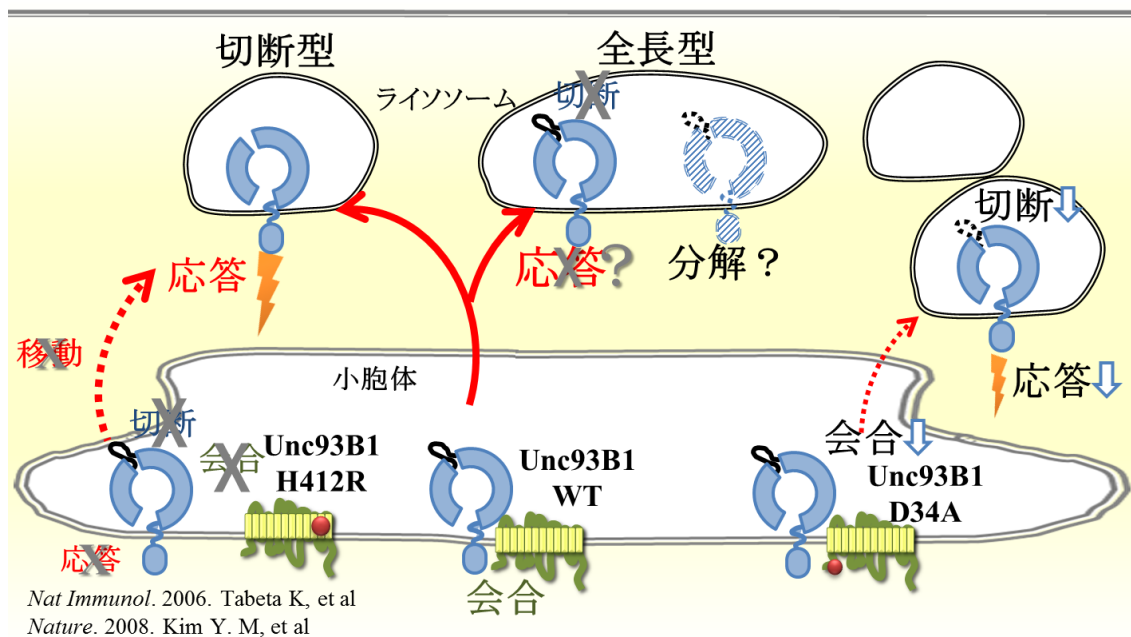


Fig26. TLR9 の切断と応答の関係の解析の総括

TLR9 のリガンド応答は TLR9 の切断に依存する可能性が示唆された。また、切断されない TLR9 は小胞体から移行したあと、プロテアソーム経路で分解されやすいことが予測される。

Unc93B1 D34A 変異体は、TLR9 との会合が抑制されることで、TLR9 の切断が減弱することが示唆された。その結果、TLR9 応答が抑制される可能性が示唆される。

Unc93B1 D34 依存的な TLR7、TLR9 の応答性バランスの制御は

TLR7 及び TLR9 の細胞質領域の中でも C 末端側を識別することで制御される

TLR7・9 キメラの解析の結果から、Unc93B1 D34 は TLR の細胞質領域を識別することで TLR の応答性バランスを制御していることが示唆された。これまで、TLR と Unc93B1 の会合は TLR の膜貫通領域で制御されていると考えられてきた(Fig27.A)。実際、TLR3 の膜貫通領域(アミノ酸 705-725 番目)を TLR9(アミノ酸 818-838 番目)に変異させた TLR では、Unc93B1 依存的な細胞膜表面への TLR3 の発現が抑制されることが報告されている(57, 58)。また、TLR9 の膜貫通領域(アミノ酸 811-832 番目)を TLR3(アミノ酸 698-719 番目)と入れ替えた TLR は細胞表面に発現することが出来、細胞内に取り込まれていないリガンドにも反応すると報告されている(59)。さらに、TLR9 の LRR(アミノ酸 1-810 番目)と Unc93B1 と会合しない TLR4 の膜貫通領域(アミノ酸 626-835)を組み合わせた TLR9・4 キメラは Unc93B1 と会合せず、Unc93B1 H412R 変異体マウスの cDC に発現させた際も、野生型の TLR9 は ER に留まるにもかかわらず、TLR9・4 キメラは細胞膜表面に移行すると報告されている(25)。

しかしながら、今回の TLR7・9 キメラを用いた解析で Unc93B1 D34 による TLR 応答のバランス制御に着目した結果、Unc93B1 による TLR7 と TLR9 の応答性の変化は細胞質領域で制御されていることが示唆された(Fig21-25)。また、TLR9 との会合が減弱する Unc93B1 D34A 変異体は、TLR9 の細胞質領域だけでなく膜貫通領域と細胞質領域の両方を入れ替えた TLR7 キメラで Unc93B1 D34A で会合量の減弱が見られる結果や、膜貫通領域が TLR7 で細胞質領域が TLR9 になっている TLR7・9 キメラはもとの Unc93B1 との会合量が低い結果から、Unc93B1 による TLR7 または TLR9 との会合量の制御は膜貫通領域と細胞質領域の両方が認識されていることが示唆され

る(Fig19,20)。これらの結果から、Unc93B1 D34A での TLR7、TLR9 応答の制御は、単純に TLR と Unc93B1 との会合量の変化によっては説明できず、Unc93B1 が何らかの方法で TLR を識別することで制御されている。この制御が Unc93B1 の変化による直接的な制御か、第三の分子を挟んで制御されているかは依然として不明であるため、今後の課題である。

この疑問点に答えるため、今後、特定の遺伝子をノックアウトする gRNA のライブラリーを用いる必要がある。D34A Unc93B1 発現下において野生型 TLR9 と T997 キメラの応答を比較し、T997 の応答に特異的に関与する分子を探索することで、Unc93B1 D34A による TLR7 活性化亢進を制御する分子を特定できると考える。また、この分子が TLR7 の過剰な活性化による疾患の治療薬開発の新たな標的になりうると考えている。

TLR は局在を制御されることで、応答性が制御される

Unc93B1 D34A ノックインマウス由来の骨髄誘導性 cDC において、TLR7 リガンド刺激下で LAMP1 と共局在する TLR7 が野生型マウス由来の骨髄誘導性 cDC 内の TLR7 に比較して多いことが報告されている(27)。そのため、Unc93B1 D34A 変異体での TLR7 応答の増強はこの局在変化が影響していることが予測される。今後 TLR7・9 キメラの局在を比較することで、TLR7 の局在変化が TLR7 応答増強の原因であるのかを解析する必要がある。

また、TLR7 の膜貫通領域を TLR9 に置換した T797 や TLR7 の膜貫通領域と細胞質領域を TLR9 に置換した T799 が western blot での観察において切断されていない TLR のバンドが 2 本検出され、切断型 TLR のバンドの高さも野生型 TLR7 と異なる (Fig19, 20)ことから、TLR7・9 キメラが野生型 TLR7 とは異なる何らかの修飾を受けてい

ることが予測される。たんぱく質は ER やゴルジ体への局在変化によって修飾を受けることから、T797 や T799 が野生型 TLR7 とは異なる局在を示すことが予想される。T797 と T799 は TLR7 リガンド依存的な応答が認められなかった(Fig21,23)ことから、T797 と T799 の細胞内局在を野生型 TLR7 と比較することで TLR7 のリガンド応答に必要な細胞内局在を解析できると予想される。

これらの疑問点を解消することが出来れば、TLR7 及び TLR9 の局在を制御する分子を TLR 応答の制御を目的とした創薬の標的とすることが可能になると考える。

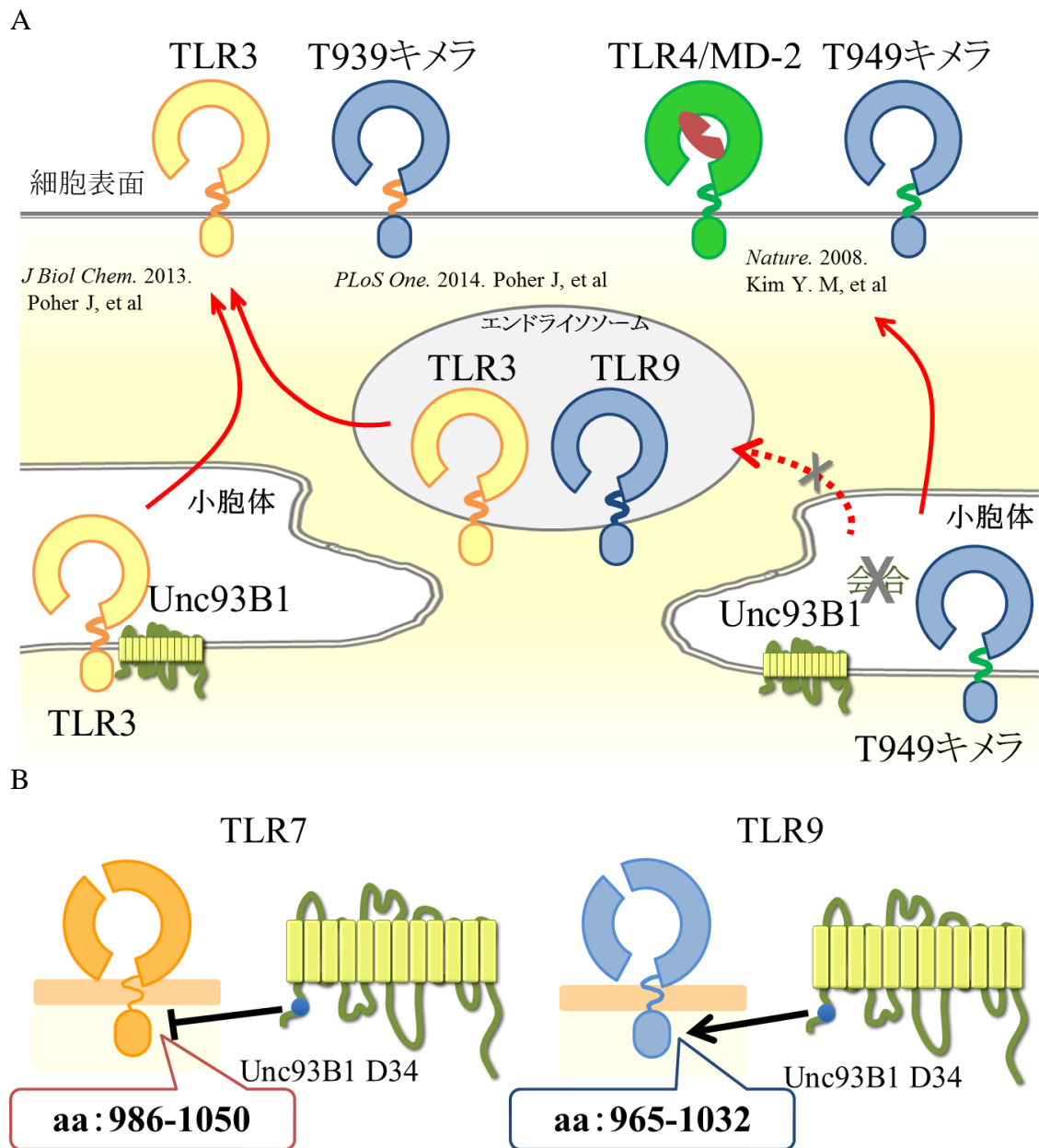


Fig27 核酸認識系 TLR の Unc93B1 による制御領域

A. Unc93B1 と核酸認識系 TLR の会合は、TLR の膜貫通領域の識別によって制御されると考えられていた。

B. 本研究での解析の結果、Unc93B1 の N 末端 D34 による TLR7 と TLR9 の識別は、TLR の細胞質領域でなされていることが示唆された。

創薬標的としての TLR7、TLR9

序章でも既述したように、TLR の過剰応答は自己免疫疾患などの原因となるため、TLR は自己免疫疾患のあらたな創薬標的分子になる事が期待されている。一方で、TLR の応答欠失も感染症などの原因となるため過剰な応答抑制は副作用になる危険もある。本研究も含め、近年 TLR の応答制御について詳細なメカニズムを示す報告が多くなされている。また、TLR7 の活性阻害抗体(A94B10)によって Unc93B1 D34A ノックインマウスの炎症を軽減することを当研究室からも報告している(29)。

本研究の成果のさらなる発展によって、Unc93B1 D34 の変異依存的な TLR7 の過剰応答や TLR9 の応答抑制の制御機構を明らかにすることが、Unc93B1 D34 の変異非依存的な TLR7 の過剰応答や TLR9 の応答抑制の制御機構の解明のきっかけになる可能性があると考ええる。これらの成果から、TLR 応答をすべて抑制するのではなく過剰な応答を引き起こす原因を特異的に抑制するメカニズムを見出すことで、TLR がより良い自己免疫疾患などの分子標的になると期待している。

7. 謝辞

本研究を進めるにあたり、的確なご指導を賜り、研究する環境を与えてくださった東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野の三宅健介教授に厚く感謝の意を表します。

また、研究の方向性にアドバイスを頂き、実験技術などのご指導を頂いた感染遺伝学分野の諸先輩方に深く感謝申し上げます。さらに、研究のみならず日常の様々な面でご支援くださいました感染遺伝学分野の後輩、同期、秘書、アルバイトスタッフの皆様にも深く感謝いたします。

最後に、博士課程に進学したいという私のわがまを聞き入れ、生活面や精神面で支えになってくださいました家族にも心から感謝いたします。

8. 参考文献

1. Round, J. L., and S. K. Mazmanian. 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 9: 313-323.
2. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783-801.
3. Pone, E. J., H. Zan, J. Zhang, A. Al-Qahtani, Z. Xu, and P. Casali. 2010. Toll-like receptors and B-cell receptors synergize to induce immunoglobulin class-switch DNA recombination: relevance to microbial antibody responses. *Crit Rev Immunol* 30: 1-29.
4. Schatz, D. G. 2004. V(D)J recombination. *Immunol Rev* 200: 5-11.
5. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira. 2009. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 388: 621-625.
6. Anderson, K. V., G. Jürgens, and C. Nüsslein-Volhard. 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 42: 779-789.
7. Takeda, K., and S. Akira. 2004. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 16: 3-9.
8. Gay, N. J., and M. Gangloff. 2007. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem* 76: 141-165.
9. Mills, K. H. 2011. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 11: 807-822.
10. Ozinsky, A., D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder, and A. Aderem. 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation

- between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13766-13771.
11. Takeuchi, O., T. Kawai, P. F. Mhlradt, M. Morr, J. D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda, and S. Akira. 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13: 933-940.
 12. Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, and M. Kimoto. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189: 1777-1782.
 13. Miller, S. I., R. K. Ernst, and M. W. Bader. 2005. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol* 3: 36-46.
 14. Wright, S. D., R. A. Ramos, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch, and J. C. Mathison. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249: 1431-1433.
 15. Hoshino, K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162: 3749-3752.
 16. Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill, and A. Aderem. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410: 1099-1103.
 17. Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413: 732-738.
 18. Heil, F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G.

- Lipford, H. Wagner, and S. Bauer. 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303: 1526-1529.
19. Krieg, A. M., A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky, and D. M. Klinman. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 546-549.
 20. Krieg, A. M. 2000. The role of CpG motifs in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 12: 35-43.
 21. Gay, N. J., M. F. Symmons, M. Gangloff, and C. E. Bryant. 2014. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat Rev Immunol* 14: 546-558.
 22. Tabeta, K., K. Hoebe, E. M. Janssen, X. Du, P. Georgel, K. Crozat, S. Mudd, N. Mann, S. Sovath, J. Goode, L. Shamel, A. A. Herskovits, D. A. Portnoy, M. Cooke, L. M. Tarantino, T. Wiltshire, B. E. Steinberg, S. Grinstein, and B. Beutler. 2006. The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat Immunol* 7: 156-164.
 23. Lee, B. L., J. E. Moon, J. H. Shu, L. Yuan, Z. R. Newman, R. Schekman, and G. M. Barton. 2013. UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs. *Elife* 2: e00291.
 24. Levin, J. Z., and H. R. Horvitz. 1992. The *Caenorhabditis elegans* unc-93 gene encodes a putative transmembrane protein that regulates muscle contraction. *J Cell Biol* 117: 143-155.
 25. Kim, Y. M., M. M. Brinkmann, M. E. Paquet, and H. L. Ploegh. 2008. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes.

Nature 452: 234-238.

26. Fukui, R., S. Saitoh, F. Matsumoto, H. Kozuka-Hata, M. Oyama, K. Tabeta, B. Beutler, and K. Miyake. 2009. Unc93B1 biases Toll-like receptor responses to nucleic acid in dendritic cells toward DNA- but against RNA-sensing. *J Exp Med* 206: 1339-1350.
27. Fukui, R., S. Saitoh, A. Kanno, M. Onji, T. Shibata, A. Ito, M. Matsumoto, S. Akira, N. Yoshida, and K. Miyake. 2011. Unc93B1 restricts systemic lethal inflammation by orchestrating Toll-like receptor 7 and 9 trafficking. *Immunity* 35: 69-81.
28. Fukui, R., A. Kanno, and K. Miyake. 2015. Type I IFN Contributes to the Phenotype of Unc93b1D34A/D34A Mice by Regulating TLR7 Expression in B Cells and Dendritic Cells. *J Immunol*.
29. Kanno, A., N. Tanimura, M. Ishizaki, K. Ohko, Y. Motoi, M. Onji, R. Fukui, T. Shimozato, K. Yamamoto, T. Shibata, S. Sano, A. Sugahara-Tobinai, T. Takai, U. Ohto, T. Shimizu, S. Saitoh, and K. Miyake. 2015. Targeting cell surface TLR7 for therapeutic intervention in autoimmune diseases. *Nat Commun* 6: 6119.
30. Zhang, S. Y., E. Jouanguy, S. Ugolini, A. Smahi, G. Elain, P. Romero, D. Segal, V. Sancho-Shimizu, L. Lorenzo, A. Puel, C. Picard, A. Chapgier, S. Plancoulaine, M. Titeux, C. Cognet, H. von Bernuth, C. L. Ku, A. Casrouge, X. X. Zhang, L. Barreiro, J. Leonard, C. Hamilton, P. Lebon, B. Héron, L. Vallée, L. Quintana-Murci, A. Hovnanian, F. Rozenberg, E. Vivier, F. Geissmann, M. Tardieu, L. Abel, and J. L. Casanova. 2007. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* 317: 1522-1527.
31. Casrouge, A., S. Y. Zhang, C. Eidenschenk, E. Jouanguy, A. Puel, K. Yang, A.

- Alcais, C. Picard, N. Mahfoufi, N. Nicolas, L. Lorenzo, S. Plancoulaine, B. Sénéchal, F. Geissmann, K. Tabeta, K. Hoebe, X. Du, R. L. Miller, B. Héron, C. Mignot, T. B. de Villemeur, P. Lebon, O. Dulac, F. Rozenberg, B. Beutler, M. Tardieu, L. Abel, and J. L. Casanova. 2006. Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science* 314: 308-312.
32. Bernard, J. J., C. Cowing-Zitron, T. Nakatsuji, B. Muehleisen, J. Muto, A. W. Borkowski, L. Martinez, E. L. Greidinger, B. D. Yu, and R. L. Gallo. 2012. Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nat Med* 18: 1286-1290.
 33. Borkowski, A. W., I. H. Kuo, J. J. Bernard, T. Yoshida, M. R. Williams, N. J. Hung, B. D. Yu, L. A. Beck, and R. L. Gallo. 2015. Toll-like receptor 3 activation is required for normal skin barrier repair following UV damage. *J Invest Dermatol* 135: 569-578.
 34. Guiducci, C., C. Tripodo, M. Gong, S. Sangaletti, M. P. Colombo, R. L. Coffman, and F. J. Barrat. 2010. Autoimmune skin inflammation is dependent on plasmacytoid dendritic cell activation by nucleic acids via TLR7 and TLR9. *J Exp Med* 207: 2931-2942.
 35. Banchereau, J., and V. Pascual. 2006. Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity* 25: 383-392.
 36. Santiago-Raber, M. L., I. Dunand-Sauthier, T. Wu, Q. Z. Li, S. Uematsu, S. Akira, W. Reith, C. Mohan, B. L. Kotzin, and S. Izui. 2010. Critical role of TLR7 in the acceleration of systemic lupus erythematosus in TLR9-deficient mice. *J Autoimmun* 34: 339-348.
 37. Fairhurst, A. M., S. H. Hwang, A. Wang, X. H. Tian, C. Boudreaux, X. J. Zhou, J.

- Casco, Q. Z. Li, J. E. Connolly, and E. K. Wakeland. 2008. Yaa autoimmune phenotypes are conferred by overexpression of TLR7. *Eur J Immunol* 38: 1971-1978.
38. Ewald, S. E., B. L. Lee, L. Lau, K. E. Wickliffe, G. P. Shi, H. A. Chapman, and G. M. Barton. 2008. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* 456: 658-662.
 39. Kanno, A., C. Yamamoto, M. Onji, R. Fukui, S. Saitoh, Y. Motoi, T. Shibata, F. Matsumoto, T. Muta, and K. Miyake. 2013. Essential role for Toll-like receptor 7 (TLR7)-unique cysteines in an intramolecular disulfide bond, proteolytic cleavage and RNA sensing. *Int Immunol* 25: 413-422.
 40. Onji, M., A. Kanno, S. Saitoh, R. Fukui, Y. Motoi, T. Shibata, F. Matsumoto, A. Lamichhane, S. Sato, H. Kiyono, K. Yamamoto, and K. Miyake. 2013. An essential role for the N-terminal fragment of Toll-like receptor 9 in DNA sensing. *Nat Commun* 4: 1949.
 41. Murakami, Y., R. Fukui, Y. Motoi, A. Kanno, T. Shibata, N. Tanimura, S. Saitoh, and K. Miyake. 2014. Roles of the cleaved N-terminal TLR3 fragment and cell surface TLR3 in double-stranded RNA sensing. *J Immunol* 193: 5208-5217.
 42. Tanji, H., U. Ohto, T. Shibata, M. Taoka, Y. Yamauchi, T. Isobe, K. Miyake, and T. Shimizu. 2015. Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA. *Nat Struct Mol Biol* 22: 109-115.
 43. Ohto, U., T. Shibata, H. Tanji, H. Ishida, E. Krayukhina, S. Uchiyama, K. Miyake, and T. Shimizu. 2015. Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9. *Nature* 520: 702-705.
 44. Ewald, S. E., A. Engel, J. Lee, M. Wang, M. Bogoyo, and G. M. Barton. 2011.

- Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. *J Exp Med* 208: 643-651.
45. Park, B., M. M. Brinkmann, E. Spooner, C. C. Lee, Y. M. Kim, and H. L. Ploegh. 2008. Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat Immunol* 9: 1407-1414.
 46. Garcia-Cattaneo, A., F. X. Gobert, M. Müller, F. Toscano, M. Flores, A. Lescure, E. Del Nery, and P. Benaroch. 2012. Cleavage of Toll-like receptor 3 by cathepsins B and H is essential for signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 9053-9058.
 47. Matsumoto, F., S. Saitoh, R. Fukui, T. Kobayashi, N. Tanimura, K. Konno, Y. Kusumoto, S. Akashi-Takamura, and K. Miyake. 2008. Cathepsins are required for Toll-like receptor 9 responses. *Biochem Biophys Res Commun* 367: 693-699.
 48. Ishii, N., K. Funami, M. Tatematsu, T. Seya, and M. Matsumoto. 2014. Endosomal localization of TLR8 confers distinctive proteolytic processing on human myeloid cells. *J Immunol* 193: 5118-5128.
 49. Toscano, F., Y. Estornes, F. Virard, A. Garcia-Cattaneo, A. Pierrot, B. Vanbervliet, M. Bonnin, M. J. Ciancanelli, S. Y. Zhang, K. Funami, T. Seya, M. Matsumoto, J. J. Pin, J. L. Casanova, T. Renno, and S. Lebecque. 2013. Cleaved/associated TLR3 represents the primary form of the signaling receptor. *J Immunol* 190: 764-773.
 50. Morita, S., T. Kojima, and T. Kitamura. 2000. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* 7: 1063-1066.
 51. Li, H. S., A. Gelbard, G. J. Martinez, E. Esashi, H. Zhang, H. Nguyen-Jackson, Y. J. Liu, W. W. Overwijk, and S. S. Watowich. 2011. Cell-intrinsic role for

- IFN- α -STAT1 signals in regulating murine Peyer patch plasmacytoid dendritic cells and conditioning an inflammatory response. *Blood* 118: 3879-3889.
52. Chuang, T. H., and R. J. Ulevitch. 2004. Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors. *Nat Immunol* 5: 495-502.
 53. Qi, R., D. Singh, and C. C. Kao. 2012. Proteolytic processing regulates Toll-like receptor 3 stability and endosomal localization. *J Biol Chem* 287: 32617-32629.
 54. Trombetta, E. S., M. Ebersold, W. Garrett, M. Pypaert, and I. Mellman. 2003. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* 299: 1400-1403.
 55. Obermajer, N., U. Svajger, M. Bogyo, M. Jeras, and J. Kos. 2008. Maturation of dendritic cells depends on proteolytic cleavage by cathepsin X. *J Leukoc Biol* 84: 1306-1315.
 56. Magister, S., N. Obermajer, B. Mirković, U. Svajger, M. Renko, A. Softić, R. Romih, J. D. Colbert, C. Watts, and J. Kos. 2012. Regulation of cathepsins S and L by cystatin F during maturation of dendritic cells. *Eur J Cell Biol* 91: 391-401.
 57. Pohar, J., N. Pirher, M. Benčina, M. Manček-Keber, and R. Jerala. 2013. The role of UNC93B1 protein in surface localization of TLR3 receptor and in cell priming to nucleic acid agonists. *J Biol Chem* 288: 442-454.
 58. Pohar, J., N. Pirher, M. Benčina, M. Manček-Keber, and R. Jerala. 2014. The ectodomain of TLR3 receptor is required for its plasma membrane translocation. *PLoS One* 9: e92391.
 59. Mouchess, M. L., N. Arpaia, G. Souza, R. Barbalat, S. E. Ewald, L. Lau, and G. M. Barton. 2011. Transmembrane mutations in Toll-like receptor 9 bypass the requirement for ectodomain proteolysis and induce fatal inflammation. *Immunity*

35: 721-732.