

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：82108

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24760655

研究課題名(和文) ヒト TOLL 様受容体 9 の非メチル化一本鎖 DNA 認識部位の同定

研究課題名(英文) Identification of the single-stranded DNA recognition site on human TLR9

研究代表者

山崎 智彦 (YAMAZAKI, TOMOHIKO)

独立行政法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・MANA研究者

研究者番号：50419264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000 円、(間接経費) 1,080,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究は自然免疫において重要な役割を果たしているヒト TOLL 様受容体 9 (TLR9) の非メチル化一本鎖 DNA (CpG ODN) の認識部位を同定することを目的とした。TLR9 のリガンド分子は、免疫活性剤として機能することから、その利用価値は高い。しかしながら TLR9 のリガンド認識については明らかではなかった。本研究ではホモロジーモデリングからリガンド結合部位を予測し、変異体 TLR9 を作成してリガンド結合部位の同定を試みたところ H505, H530, Y554 から構成されるプラスに荷電したクラスターが TLR9 におけるリガンド結合部位として重要な役割を果たしていることが示した。

研究成果の概要(英文)：Unmethylated cytosine-guanine (CpG) motif-containing oligodeoxynucleotides (ODNs) had been enormously studied for its adjuvant-potential to stimulate innate immune response via interaction with the pattern-recognition receptor Toll-like receptor 9 (TLR9). Activation of TLR9 by CpG ODN induces a signal transduction cascade that plays a pivotal role in first-line immune defense in the human body. The three-dimensional structure of TLR9 has not yet been reported, and the ligand-binding mechanism of TLR9 is still poorly understood; therefore, the mechanism of human TLR9 (hTLR9) ligand binding needs to be elucidated. In this study, we showed that H505, H530, and Y554 were vicinal-oriented and formed positively charged clusters with which negatively charged ODN could interact.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：TOLL 様受容体 合成オリゴデオキシヌクレオチド アレルギー DNA 結合部位 TLR9 CpG ODNs

1. 研究開始当初の背景

トール様受容体 9 (Toll like receptor 9: TLR9) は自然免疫獲得に関与する受容体の 1 つであり、エンドソーム内に局在し、細菌、ウイルス由来の非メチル化 DNA を認識し、自然免疫系を活性化させる。TLR9 がリガンド分子を認識することで、B 細胞においては炎症性サイトカインを誘導し炎症反応を形成する。一方で、形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell, pDC) においては I 型 IFN を誘導する。I 型 IFN は、樹状細胞の成熟、CD8+T 細胞の活性化を誘導する。TLR9 は細菌由来 DNA のほかに人工的なリガンド分子である非メチル化 CpG モチーフを有するオリゴデオキシヌクレオチド (CpG ODN) を認識することが知られており、CpG ODN を添加した場合も免疫が活性化される。この機能により、CpG ODN は感染症、癌、アレルギー治療などでの臨床応用が期待されている。

CpG ODN は体内に存在するヌクレアーゼにより容易に分解される。そのため、分解を防ぐためにヌクレオチド間のあるリン酸基をホスホロチオエート化した ODN (S 化 ODN) が広く基礎研究ならびに臨床研究に用いられている。しかしながら、S 化 ODN は非特異的に蛋白質に吸着し、また非特異的蛋白質吸着に起因する副作用・生体毒性を細胞内で示す。そのことから、医療応用においては応用の限界が指摘されている。また、S 化 ODN は非特異的に TLR9 にも結合していると考えられ、S 化 ODN を用いた TLR9 と CpG ODN の相互作用解明においては、生体内で起こっている CpG ODN と TLR9 との相互作用を正確に再現した結果は得られず、いまだ TLR9 のリガンド認識については不明な点が多い。

2. 研究の目的

TLR9 とリガンド分子の一本鎖 DNA との相互作用について解明することは、新たな免疫活性化分子の構築には不可欠である。すなわち、構造情報を基にした TLR9 のリガンド開発を行うためには、まずヒト TLR9 のリガンド結合部位を同定し、TLR9 と一本鎖 DNA との相互作用を解明する必要がある。

本研究では、ヒト TLR9 のリガンド結合部位を *in silico* で予測し、蛋白質工学的手法を用いて変異体を作成し、変異体のリガンド認識を細胞を用いて評価することにより、ヒト TLR9 のリガンド結合部位を明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト TLR9 の立体構造予測

既に立体構造が報告されている TLR1/2/3/4 の構造とアミノ酸配列の情報を基に、タンパク質ホモロジーモデリングソフト Modellar を用いてホモロジーモデリングによりヒト TLR9 の立体構造予測を行った。特に、二本鎖 RNA を認識する TLR3 の二本鎖 RNA 結合部位に着目し、I-TASSER program を

用いて TLR9 での結合部位を予測した。

(2) TLR9 変異体の構築

立体構造予測の結果をもとに、CpG ODN 結合部位として予測されたアミノ酸をアラニンに置換した変異体を Quick change PCR 法により作成した。また、N 末端の配列を欠如した変異体については、インバース PCR 法により構築した。構築した TLR9 変異体の構造遺伝子は、動物細胞においてタンパク質発現に用いられる発現ベクター (pUNO vector, Invivogen 社) に導入した。

(3) TLR9 変異体の動物細胞内での評価

ヒト胎児腎細胞株 HEK293XL/null 細胞にそれぞれの TLR9 変異体構造遺伝子を含む TLR9 発現用ベクターならびに Luciferase の構造遺伝子の 5' 上流に ELAM プロモーターを、さらにその上流に NF- κ B 結合配列を付加したプラスミドをトランスフェクションした。これらのプラスミドが導入された細胞は、TLR9 がリガンド分子に結合し、構造変化が起こることで、アダプタータンパク質の Myd88 が TLR9 と結合し、最終的には NF- κ B の活性化に至る。活性化された NF- κ B は NF- κ B 結合配列に結合することで、ELAM プロモーター下流の Luciferase が発現するため、細胞内の Luciferase 活性を測定することで、TLR9 の DNA 結合 (TLR9 の活性化) を調べることができる。

具体的には、トランスフェクション 1 日後の細胞に CpG-ODN を終濃度 0.5 μ M となるように添加し、2 日間インキュベートしたのち細胞を回収し、細胞破碎液を作成し、細胞破碎液の Luciferase 活性を Dual-GloTM Luciferase Assay System (プロメガ社) を用いて測定した。

また、ウェスタンブロットングにより、細胞内の TLR9 変異体の発現の確認を行った。

4. 研究成果

ヒト TLR9 の立体構造予測 TLR9 については、マウス由来の TLR9 については多くの報告があるが、ヒト TLR9 についての報告は少なく、特に DNA 認識機構についての報告がほとんどない。マウス TLR9 とヒト TLR9 はアミノ酸配列の相同性が 80% 以上と非常に高いが、TLR9 が認識する配列が異なることから分子機能は同一ではないと考えられる。マウス TLR9 については、リガンド結合領域であるロイシンリッチリピート (LRR) ドメインのプロテアーゼによる切断が起き、切断された TLR9 がエンド/ライソソームで DNA 認識ならびにシグナル伝達機能を示すと報告されている。本研究では、ホモロジーモデリングにより予想された一本鎖 DNA 結合部位のアミノ酸残基をアラニンに置換した TLR9 変異体を多数作成し、非メチル化 CpG モチーフを有する合成オリゴデオキシリボヌクレオチド

(ODN)を用いて機能評価を行った。

モデリングならびに既報から TLR9 の一本鎖 DNA 結合部位ではないかと予測された部位ならびに領域の変異体を構築した。(Table 1)

Table 1 構築した TLR9 変異体

Region	Vectors	Amino-acid mutation	Remarks
N-terminal	LRR2	87-110	Deletion
N-terminal	LRR5	167-190	Deletion
N-terminal	LRR8	243-268	Deletion
C-terminal	R481	Lysine 481	Substitution with Arginine
C-terminal	N483	Asparagine 483	Substitution with Arginine
C-terminal	T486	Threonine 486	Substitution with Arginine
C-terminal	H505	Histidin 505	Substitution with Arginine
C-terminal	Q510	Glutamic Acid 510	Substitution with Arginine
C-terminal	H530	Histidine 530	Substitution with Arginine
C-terminal	K532	Lysin 532	Substitution with Arginine
C-terminal	Y554	Tyrosine 554	Substitution with Arginine
C-terminal	S556	Serin 556	Substitution with Arginine
C-terminal	Q557	Glutamic Acid 557	Substitution with Arginine

C 末端領域でリガンド結合部位として予想されたアミノ酸残基をアラニンに置換した TLR9 変異体(R481A, N483A, H505A, Q510A, H530A, K532A, Y554A, Q557A)の機能について、申請者らのグループで構築した CpG ODN である CpG ODN-PD を添加したときの NF- κ B の活性化をそれに伴い発現される Luciferase の活性を指標に評価した。申請者らは天然の DNA の骨格を持ちながらもヌクレアーゼに対する耐性を持ち、かつ細胞内で TLR9 のリガンドとなる DNA 配列を持つ CpG ODN の開発を進めてきた。その結果として、72mer の CpG ODN (CpG_B72P0)を見出した。この CpG ODN はヒトの TLR9 のリガンドとして報告されている CpG2006 を改良した 72mer の直鎖構造を持つ一本鎖 DNA であり、血清中のエキソヌクレアーゼならびに細胞内に多く存在するエンドヌクレアーゼに対して耐性を示し、またレポーターアッセイの原理を用いた TLR9 の活性化の評価においても既存の S 化 ODN 以上の効果を示した。また TLR9 やほかのタンパク質に対する秘匿的吸着を示さないことから、CpG_B72PD を用いることにより、細胞内部での一本鎖 DNA と TLR9 の分子認識を正確に再現することができる。

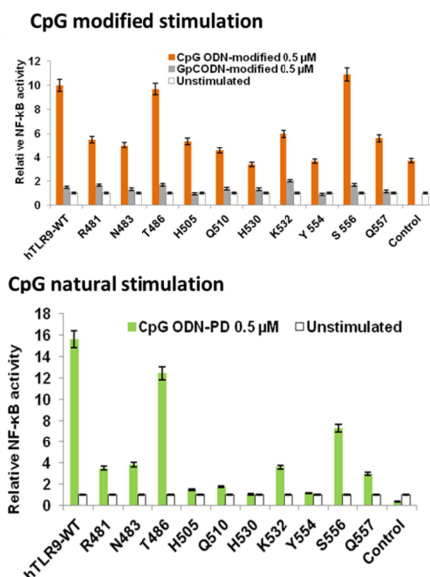


図 1 TLR9 変異体の活性

トランスフェクション後のそれぞれの変異体の発現量をウェスタンブロッティングにより確認した結果、すべての変異体において野生型 TLR9 と同等量発現していることが確認された。CpG ODN による免疫活性化の結果を図 1 に示す。S 化 ODN である CpG ODN-PT ならびに天然型の CpG ODN-PD をリガンド分子として細胞に添加した場合、ほとんどの変異体において Luciferase 活性が低下した。特に H505, Q510, H530, Y554 をアラニンに置換した TLR9 変異体は機能を失った。

次に、構造予測により構築した TLR9 予測構造での、それぞれのアミノ酸残基の位置関係を図 2 に示す。ここに示されるように H505, H530, Y554 は LRR ドメインにおいてプラスにチャージしたクラスターを形成しており、この部位にマイナスにチャージした DNA が結合することが予測された(図 2)

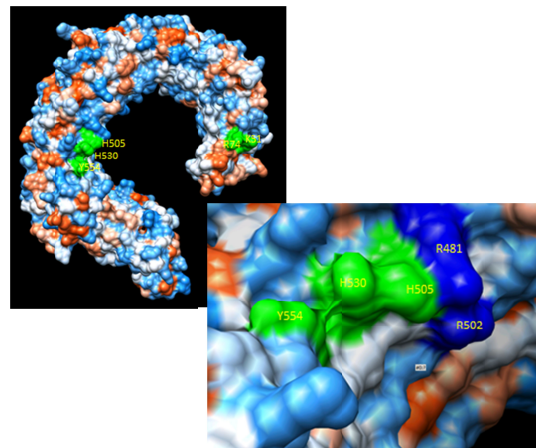


図 2 TLR9 構造予測におけるリガンド結合部位の予測

これらの結果から、H505, H530, Y554 から構成されるプラスに荷電したクラスターが TLR9 におけるリガンド結合部位として重要な役割を果たしていることが示された。

本研究において立体構造情報の明らかとなっていない TLR9 について、ホモロジーモデリングと我々の開発した非特異的な反応を抑えることができる CpG ODN を用いた細胞内アッセイにより CpG_B72PD を用いることにより、TLR9 の DNA 結合部位の同定ができた。

TLR9 のリガンド分子による効果的な免疫治療を実現するためには、TLR9 の CpG ODN の認識機構を明らかにし、その情報を基に新規リガンド分子を開発する必要がある。本研究により、今まで明らかにされなかった TLR9 の一本鎖 DNA 結合部位を同定されたことから、次のステップとしてヒト TLR9 の新規リガンドデザインに研究を展開する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

S. Suwarti, T. Yamazaki, C. Svetlana and N. Hanagata. "Recognition of CpG oligodeoxynucleotides by human Toll-like receptor 9 and subsequent cytokine Induction" Biochem. Biophys. Res. Commun. **430** (2013) 1234-1239

査読有

DOI:10.1016/j.bbrc.2012.12.068

H. Zhang, S. Chen, C. Zhi, T. Yamazaki, N. Hanagata : "Chitosan-coated boron nitride nanospheres enhance delivery of CpG oligodeoxynucleotides and induction of cytokines" Int. J. Nanomed. **8** (2013) 1783-1793 査読有

DOI:10.2147/IJN.S43251

〔学会発表〕(計7件)

T. Yamazaki, Y Sugiyama, K Sode, W Tsugawa, K Ikebukuro, N. Hanagata, "Immunostimulation effect of G-rich CpG oligonucleotide" International Symposium on Smart Biomaterials, 2014年3月24日~3月25日, NIMS(つくば市 茨城県)

杉山 雄紀, 早出 広司, 津川 若子, 池袋 一典, 花方信孝, 山崎智彦 "オリゴグアノシン配列付加による CpG ODN の免疫活性化能の向上", 分子・物質合成プラットフォーム平成25年度シンポジウム, 2014年3月10日~3月11日, つくば国際会議場(つくば市 茨城県)

T. Yamazaki, Y Sugiyama, K Sode, W Tsugawa, K Ikebukuro, N. Hanagata : "G-quadruplex structure extend the immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides" MANA International Symposium 2014, 2014年3月4日~3月7日, つくば国際会議場(つくば市 茨城県)

杉山 雄紀, 早出 広司, 津川 若子, 池袋 一典, 花方信孝, 山崎智彦 "オリゴグアノシンを有する免疫活性化オリゴヌクレオチドの開発" つくば医工連携フォーラム 2014, 2014年1月28日, 産業技術総合研究所(つくば市 茨城県)

山崎智彦, 花方信孝 "天然型免疫活性化 CpG オリゴデオキシヌクレオチドの開発" 第7回 バイオ関連化学シンポジウム, 2013年9月27日~9月29日, 名古屋大学(名古屋市 愛知県)

C. Svetlana, T. Yamazaki and N. Hanagata "Characterization of interleukin-6

induction by natural CpG oligodeoxynucleotide", 第6回ナノバイオメディカル学会大会, 2012年7月9日~7月10日, 産業技術総合研究所(つくば市 茨城県)

S. Suwarti, T. Yamazaki, and N. Hanagata. "Natural CpG ODNs-induced human TLR9 specific immunostimulation" Homeostatic Inflammation Symposium, 2012年10月23日~10月24日, 一橋記念講堂(東京都)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nims.go.jp/bmc/group/control/GBSCUM/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山崎 智彦 (YAMAZAKI TOMOHIKO)

独立行政法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・MANA 研究者

研究者番号: 50419264

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし