

様 式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 元年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18504

研究課題名 (和文) Toll-like receptor 9のヒト特異的な基質認識メカニズムの解明

研究課題名 (英文) Structural analysis of ligand recognition mechanism in human Toll-like receptor 9

研究代表者

成田 宏隆 (NARITA, Hirotaka)

大阪大学・蛋白質研究所・特任助教 (常勤)

研究者番号：40598257

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,200,000 円

研究成果の概要 (和文) : 昆虫細胞Sf9と哺乳動物細胞HEK293を用いて、膜貫通領域を含むヒト由来TLR9の大量調製法を確立し、タンパク質と思われる微小結晶とクライオ電子顕微鏡を用いた2次元平均画像を得ることに成功した。また、サイズ排除クロマトグラフィにより、精製標品はヒト特異的なリガンドにのみ結合することを、等温滴定カロリメトリーにより、その結合はエントロピー駆動型でKDがおおよそ2 micro Mであることを明らかにした。現在、調製したヒト・マウスキメラ体TLR9を用いてさらなる相互作用解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界各地でTLR9をターゲットとした核酸アジュバント (CpG DNA) 研究が盛んに行われ、インフルエンザウイルス、B型肝炎ウイルス、ガン (メラノーマや乳ガン)、マラリアなどに対する治験が進められている。本申請研究で得られたヒト由来TLR9の大量調製法の確立とCpG DNAとの相互作用解析の結果は、「TLR9のヒト特異的なCpG DNA認識メカニズム」を立体構造解析と物理的解析によって理解することが可能となる技術基盤となり、効率的な薬剤開発に役立つことが期待できる。

研究成果の概要 (英文) : We succeeded in protein production and purification of human Toll-like receptor 9 containing the extracellular region and the membrane region (Hs-TLR9-ECD-TM) in insect cells and mammalian cells. Structural analysis of Hs-TLR9-ECD-TM was performed by X-ray crystallography and Cryo-EM. We have obtained microcrystals, and produced 2D class average EM images. Gel-filtration and isothermal titration calorimetry analyses on the ligand-binding showed that Hs-TLR9-ECD-TM recognizes human-specific CpG DNA (ODN2006PS) with a KD value = 2 micro M.

研究分野：構造生物化学

キーワード：結晶構造解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 先天的に備わっている自然免疫システムでは、自己（ヒトなど）と非自己（病原微生物など）の区別するための受容体が免疫細胞の細胞膜やエンドソーム膜上に多数存在する。特に、進化的に古いパターン（非自己）を認識する受容体として Toll 様受容体があり、これらが非自己を認識すると迅速な病原体排除機構を誘導するだけでなく、適応免疫応答を誘導するために必須なシグナルを伝えることが近年の自然免疫学の発展によって明らかとなってきた。また、自然免疫の活性化は、人工的に擬感染を起こさせることで病原体に対する抗体産生や細胞性免疫の誘導するワクチン、特にスプリットワクチンの効果を最大限発揮させるために必須で、アジュバントと呼ばれる構成成分がその役割を果たす。これまで広く臨床でアジュバントとして用いられていたアルミニウム塩（Alum）は、細胞死を起こしアレルギーの原因になる抗体を誘導する副作用を起こすことが知られており、より特異的に自然免疫の活性化するアジュバントの開発が望まれていた。

(2) その分子として最も研究が盛んに行われているのは Toll 様受容体のリガンドで、中でも TLR9 のリガンドである非メチル化 CG 配列を含む合成核酸（1 本鎖 CpG DNA）は、強い自然免疫活性化能を有している点と合成により簡便に作製できることから、新規アジュバントとして期待されている。これまでに大きく 4 種類の CpG DNA が報告されており [Bode, *et al.*, *Vaccines* 2011]、それぞれ構造や配列、自然免疫活性化能に違いがあることや、マウスと霊長類で異なる反応を示すことがわかっている。CpG DNA のエンドソームにおける滞留時間 [Honda, K., *et al.*, *Nature* 2005]、種間で TLR9 の発現する樹状細胞サブセットが異なることに起因すると考えられているが、なぜ、このような動態差が生じるのか十分に理解するに至っていない。このため、より有効で特異的な免疫応答を実現した核酸医薬開発には、ヒト由来 TLR9（Hs-TLR9）の立体構造に基づいた薬剤設計、TLR9 とその薬剤との物理的特性について解析し理解する必要があると考えられた。

2. 研究の目的

TLR9 は一回膜貫通タンパク質で、細胞外領域には N 末端約 800 残基の CpG DNA 認識ドメインと、細胞質領域には MyD88 と相互作用する C 末端約 200 残基の TIR (Toll/IL-1 receptor) ドメインを持つ。Toll 様受容体のリガンド認識・シグナル伝達メカニズムに関する研究には、これまで、細胞外領域だけを用いた構造生物学的手法により解析が行われてきた。TLR9 の構造解析については、2015 年と 2018 年に、ウマ、ウシ、マウス由来 TLR9 の細胞外領域とリガンド複合体結晶構造とその結合の物理的特性について明らかにされた [Ohto U., *et al.*, 2015, 2018, 2018]。しかし、ヒト由来 TLR9 の構造とリガンドとの特異的な親和性に関する情報は未だ明らかにされていない。そこで本申請課題では、(1) 膜貫通領域を含むヒト由来 TLR9 (Hs-TLR9-ECD-TM) のタンパク質の大量調製法の確立と、Hs-TLR9-ECD-TM 単体およびリガンドの一本鎖 CpG DNA との複合体について立体構造解析、(2) Hs-TLR9 特異的な基質認識メカニズムの解明を目指した。

(1) Hs-TLR9-ECD-TM の大量調製法および立体構造解析

これまでに Hs-TLR9 タンパク質の精製法に関する報告はなく、申請課題の構造生命研究に適したタンパク質の大量調製法を確立する。また、TLR9 はリガンドフリー状態（シグナル未伝達）では単体で、リガンド結合状態（Signaling complex）では二量体を形成すると予想される。この 2 状態の構造比較から、リガンド結合に関与するアミノ酸およびシグナル伝達に必要な二量体形成に関わるアミノ酸を同定する。また、この細胞外領域での二量体化は細胞内の「TIR ドメインの二量体化」を誘起しアダプタータンパク質を介したシグナル伝達を生じる。膜貫通領域を含む Hs-TLR9-ECD-TM の構造解析により、細胞外の二量体形成の駆動力がどのように細胞内の TIR ドメインに伝わるのか、Toll 様受容体ファミリーの本質的な理解を得る。

(2) Hs-TLR9 特異的な基質認識メカニズム解明

立体構造解析と並行して、高純度に精製した Hs-TLR9 を用いて、様々な CpG DNA との相互作用解析を行い、ヒト特異的なリガンド認識に必要な領域またはアミノ酸残基を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Hs-TLR9-ECD-TM タンパク質の大量発現には、昆虫細胞 (Sf9) -バキュロウイルス発現系と BacMam 発現系（哺乳動物細胞 HEK293S GnTi）を用いる。Hs-TLR9-ECD-TM の C 末端には、Tobacco Etch Virus プロテアーゼで切断可能な His タグおよび eGFP を融合することで、Fluorescence SEC による簡便な界面活性剤スクリーニング、高アフィニティ精製（Ni-アフィニティおよび GFP-Nanobody アフィニティ）を可能とする。「熱安定性、単分散性、均一性、CpG DNA 結合能」を指標に最適化し、高純度に精製した試料を用いてヒト特異的 CpG DNA との複合体を調製し、所属機関に設置されている自動結晶化ロボットを用いて広範囲に且つ効率的に結晶化スクリーニングを実施する。結晶化が得られた場合には、SPRING-8 BL44XU 蛋白質研究所ビームラインを利用し、迅速に回折データ収集と分子置換法による構造解析を行う。結晶化が困難であった場合は、解析手法に拘ることなく、所属機関にあるクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析に取り組む。このとき、ネガティブ染色法による精製タンパク質の単分散性の検討、氷包埋法に適したサンプル調製法（タンパク質濃度やバッファ条件）について検討をする。

(2) サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を用いて、精製 Hs-TLR9-ECD-TM がヒト特異的一本鎖 CpG DNA を結合可能か明らかにする。核酸結合の有無については、Abs 260 nm/Abs 280 nm の吸収比の増加により、またタンパク質の会合数については、溶出位置によって概算してリガンド結合による二量体形成能を評価する。その後、等温滴定カロリーメトリー (ITC) を用いて相互作用の物理学的解析を行い、リガンド種による相互作用様式を明らかにする。また、(1) の構造解析の結果をもとに、リガンド結合に関わるアミノ酸残基に関する変異体を作製し、野生型と同様に相互作用解析を進めることで、リガンド認識に必須な領域、アミノ酸残基を明らかにする。構造解析が困難な場合は、マウス由来 TLR9 (Mm-TLR9) と Hs-TLR9 のキメラ体 (HsMm-TLR9) を複数作製し相互作用解析を進めることで、種特異的な基質認識領域の特定をする。

4. 研究成果

(1) Hs-TLR9-ECD-TM タンパク質の大量発現に用いる宿主細胞には、Sf9 と HEK293S GnTi を併用し、高純度大量調製を継続的に実施した。X線結晶構造解析およびクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析において、どちらの宿主由来の精製タンパク質が適しているのか不明であったため両細胞を用いた。結晶化では、Hs-TLR9-ECD-TM は膜貫通領域を含むため Bicelle 法や HiLiDe 法によって大規模結晶化条件スクリーニングを実施した。その結果、最近になり図 A のような微結晶を得ることに成功した。UV 顕微鏡観察の結果から、タンパク質性の析出物であることがわかった。今後は早期に、結晶化条件の最適化と放射光施設にて回折実験を行って結晶構造解析に着手する予定である。電子顕微鏡解析では、ネガティブ染色法によって結晶化に使用した界面活性剤では単分散性が低く凝集が認められたため、単粒子解析に適した界面活性剤の探索を行った。現在までに、氷包埋法によるクライオ電子顕微鏡観察を行って、Sf9 と HEK293S GnTi の 2 つ宿主由来のタンパク質で 2 次元平均画像の取得に成功している。今後は、2 次元平均画像を指標に、より最適な界面活性剤の探索を進め、単粒子解析を実施する。

(2) SEC を用いて、各種一本鎖 CpG DNA と精製 Hs-TLR9-ECD-TM との相互作用解析を行ったところ、ヒト特異的なリガンドである ODN2006PS との結合を確認した (図 B)。ODN2006PS はヌクレオチド間結合にホスホロチオエート結合をもつ S 化オリゴであるが、本申請課題で精製した Hs-TLR9-ECD-TM は、ヒト特異的なリガンドにのみ結合活性をもつこと明らかにした。一方で、リガンド結合による会合数の大きな変化はなく、SEC の溶出位置から計算される分子量は二量体を示すことから、Hs-TLR9-ECD-TM は、リガンドフリー状態においても二量体を形成していることが示唆された。ITC を用いた相互作用解析では、ODN2006PS との相互作用は、予想に反してエントロピー駆動型で約 2 μ M の K_D 値であったが (図 C)、その他の CpG DNA についてはリガンド滴定過程において Hs-TLR9-ECD-TM が凝集体を形成することから、正確な物理量を測定できなかった。膜貫通部分をナノディスクに埋め込むなどサンプル調製法の検討を進めたが凝集体の改善はされなかった。キメラ体 HsMm-TLR9 については、14 種のうちこれまでに 6 種類キメラ体の精製に成功した。今後はまず、SEC を用いて結合活性変化を測定する予定である。

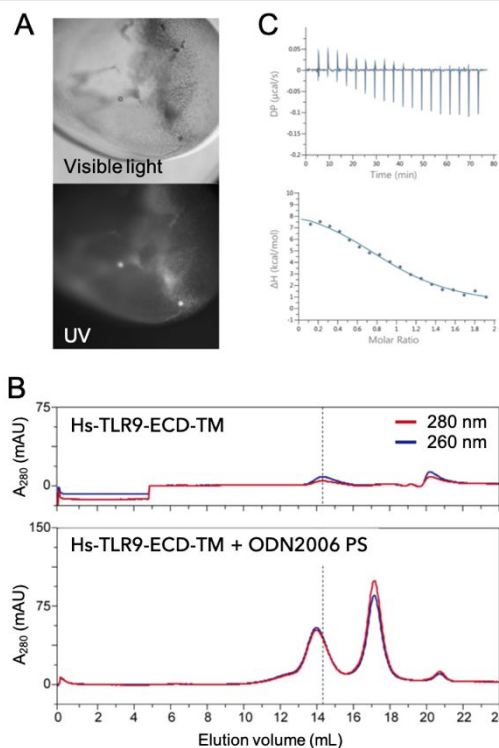


図 A. Hs-TLR9-ECD-TM の結晶、B-C. ヒト特異的な CpG DNA ODN2006PS と Hs-TLR9-ECD-TM の SEC 解析と ITC 解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし。

(2)研究協力者
なし。

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。