

免疫刺激性オリゴヌクレオチドの2次構造特性

下里 剛士

信州大学ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点

要約 免疫刺激性オリゴヌクレオチド (ISS-ODN) の構造と免疫刺激活性に関する研究は、主に CpG 周辺領域を含めた1次構造からのアプローチがほとんどである。そこで、著者らは CpG 配列を含まない免疫刺激性配列、AT モチーフを用いて免疫刺激活性と構造相関の詳細を検討した。まず *Lactobacillus gasseri* OLL2716株のゲノム情報より AT コア配列を網羅的に検索したところ、強い免疫刺激性 AT-ODN (LGAT-243) を見出した。そこで280種の AT-ODN を用いた2次構造解析によるアプローチを行ったところ、免疫刺激活性にはループ構造が必要であり、とくに6塩基ループが高い免疫刺激活性をもつことがわかった。さらに、CpG2006 (ヒト型モチーフを含み強い免疫刺激性を有する ODN) と LGAT-243の塩基置換型 ODN の免疫刺激活性をヒト末梢血単核球からの IL-12p70産生能を指標として検討した結果、ループからステム内に5'-TTTT-3'構造をもち、ステムの部分に5'-CG-3'構造がある場合、より強い免疫刺激活性を示すことがわかった。これまで CpG の両サイドの塩基配列を基準とする1次構造より考えられてきた免疫刺激性の構造相関に関する知見とは別に、本研究結果は、2次構造からのアプローチにより、CpG および非 CpG ODN の免疫刺激性における構造特性について新たな理論の展開に繋がるものである。

キーワード : ISS-ODN, CpG-ODN, AT-ODN, ループ構造

1. はじめに

Mashiba et al. (1988) によって *Mycobacterium bovis* BCG 由来の DNA が抗腫瘍活性を示すという発見¹⁾に始まり、1995年の細菌由来 CpG DNA モチーフがBリンパ球を刺激するという Krieg らの報告²⁾を機に、微生物由来の DNA 配列の免疫刺激活性に対する関心が急激に高まった。さらに、2000年になって CpG DNA の受容体分子として Toll-like receptor (TLR) 9 が同定されたこと³⁾、免疫系における CpG DNA の作用について理解が進んでいる。現在、感染症、ガン、アレルギー、炎症性疾患の予防および治療などを目的とし、免疫刺激性オリゴヌクレオチド (ISS-ODN) をアジュバント分子とするワクチンの開発が期待されている⁴⁾。

4種の塩基による様々な配列を有する合成 ODN の免疫効果について、ヒト末梢血単核球やマウス脾臓細胞を用いた実験系で評価されている。とくにヒトやマウスに対して免疫刺激活性の極めて強い配列が同定されているが、ヒト、アカゲザル、チンパンジーおよびオランウータンなどの霊長類に強い免疫

刺激活性を有する CpG ODN が、マウスなどの齧歯類に対しては刺激性の低いことも明らかとなった⁴⁾。一般に、ほ乳類における生体防御機構は、まず侵入した病原体の認識に始まるが、その侵入を察知するのが TLR であり、現在までに、遺伝子レベルでは14種類、タンパク質レベルでは11種類が確認されている⁵⁾。これら一連の TLR ファミリーは、それぞれ細菌に特異的な分子パターン (pathogen associated molecular patterns ; PAMPs) を有する「細菌性モデュリン」を認識し、サイトカインを介して免疫応答を制御すると考えられている (図1)。

これまで著者らは、有用微生物の有するゲノム DNA に注目し、DNA/TLR9 pathway を介する免疫刺激活性配列の検索を行ってきており、様々な ISS-ODN 配列の発見に至っている⁶⁾。そこで本総説では、CpG モチーフを含まない非 CpG タイプの AT モチーフを用いた2次構造特性解析の結果より得られた、免疫刺激活性を誘導する ODN 構造に関する新知見について紹介する。

2. 新規免疫刺激性 AT モチーフの発見

Kitazawa et al. (2001) は *Lactobacillus* (*L.*)

受理日 2009年12月3日

採択日 2010年2月1日

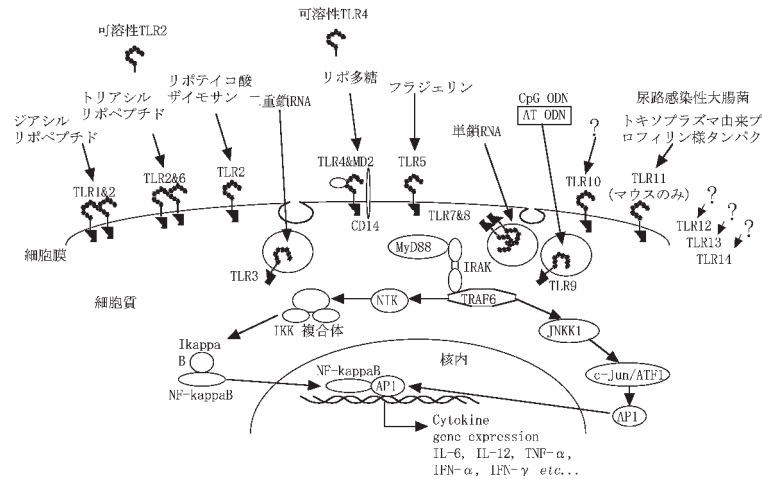


図1 TLRファミリーと対応する細菌性モデュリン(リガンド)およびシグナル伝達経路
細胞は樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞を示し、細胞内のシグナル伝達経路についてはTLR9のリガンド(CpG-ODN, AT-ODN)の場合のみを示した。AT-ODNは筆者らが見出した新規なリガンドである。

表1 有用微生物由来免疫刺激性オリゴヌクレオチド配列

<i>Lactobacillus bulgaricus</i> NIAIB6	OLLB7: CGGCACGCTCACGATTCTTG
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	ID35: ACTTTCGTTTTCTGCGTCAA
<i>Bifidobacterium longum</i> BB536	BL7: GCGTCGGTTTCGGTGCTCAC
<i>Lactobacillus gasseri</i> JCM1131T	AT5ACL: TATAATTTTTACCAACTAGC
<i>Lactobacillus gasseri</i> OLL2716	LGAT243: TTAACAATTTTTACCCAAGA
<i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC19258	MsST: CAGGACGTTGTATCACTGAA

acidophilus グループ乳酸菌の示すリンパ球幼若化活性が染色体ゲノムDNAにより発揮されることを明らかにしている⁷⁾。とくに、*L. bulgaricus* NIAIB6由来の“OLLB7”⁸⁾、*Bifidobacterium longum*由来のBLO7⁹⁾、*L. rhamnosus* GG由来の“ID35”¹⁰⁾、*L. gasseri* JCM1131T由来の“AT5ACL”⁸⁾、*L. gasseri* OLL2716由来の“LGAT243”¹¹⁾、*Streptococcus thermophilus*由来の“MsST”¹²⁾など多くの有用微生物の染色体ゲノム中に、Th-1系免疫応答を誘導する活性配列を見出した(表1)。なかでも、Kitazawa et al. (2003)は、*L. gasseri*由来のAT5ACLおよびLGAT243はCpGモチーフを含まず、アデニン(A)とチミン(T)に富むことからATモチーフと命名した。またTLR9の強制発現細胞株(トランスフェクタント)を用いた研究から、AT-ODNがTLR9を介して免疫活性を誘導し、強いTh-1免疫誘導能を有することが明らかとなった¹³⁾。リンパ球の一種であるTh-1型T細胞は、TLR9を強く発現する樹状細胞やマクロファージなどの自然免疫系の細胞集団の刺激により、主として細胞性免疫に重要な役割を果たしている。著者

らは、これまでに腸管免疫組織およびパイエル板上皮のM細胞でTLR9の強い発現を発見しており^{14,15)}、Kitazawa et al. (2008)はAT-ODNの免疫効果は、腸管リンパ組織で発揮されている可能性が高いと考えている⁶⁾。

3. ATモチーフの構造特性

これまでの免疫刺激性ODNの構造と活性に関する研究は、CpG周辺領域を含めた1次構造からのアプローチがほとんどであった⁴⁾。そこで、ATコア配列を含むAT-ODNを網羅的に検索し、免疫刺激活性と構造相関の詳細を検討するため、明治乳業株式会社との共同で、*L. gasseri* OLL2716株(ピロリ菌に有効な機能性発酵乳で有名になったLG21)のゲノム情報より検索したところ、強い免疫刺激性AT-ODN(LGAT243)を見出した¹¹⁾。*L. gasseri* OLL2716株のゲノム情報より見出された280種のATモチーフ含有配列を用いた2次構造解析から、免疫刺激活性にはループ構造が必要であり、とくに6塩基ループが高い活性をもつことがわかつ

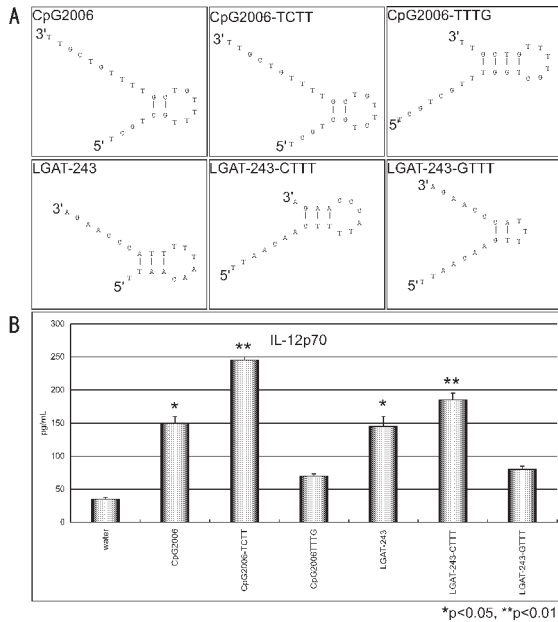


図2 免疫刺激性 ODN の 2 次構造と免疫刺激活性の相関

- A : CpG2006 および LGAT-243 のプロトタイプと塩基置換型の 2 次構造
- B : 各種 ODN 存在下でのヒト末梢血単核球による IL-12p70 産生性 (サイトカイン量は ELISA 法により測定)

た。さらに、CpG2006 (ヒト型モチーフを含み強い免疫刺激性を有する ODN) と LGAT243 の塩基置換型 ODN の免疫刺激活性をヒト末梢血単核球からの IL-12p70 産生能を指標として検討した結果、ループからステム内に 5'-TTTT-3' 構造をもち、ステムの部分に 5'-C...G-3' 構造がある場合、より強い免疫刺激活性を示すことが明らかとなった。その場合、AT-ODN の免疫刺激活性は CpG2006 と同程度かそれ以上であり、CpG2006 については、ループ内に 5'-C...G-3' 構造をデザインすることにより、プロトタイプよりさらに強力な ODN を見出すことに繋がっている¹¹⁾ (図 2)。著者らが見出したこれらの AT-ODN は、最近になってマラリアゲノム中にも多数見出され、医学分野においても重要視されている¹⁶⁾。また、2 次構造に基づく免疫刺激活性相関から、非常に安定な構造を有し、マクロファージを強く活性化する Y-shape ODN が報告されている¹⁷⁾。著者らの研究成果は、これまで CpG の両サイドの塩基配列を基準とする 1 次構造より考えられてきた免疫刺激性の構造相関に関する知見に加えて、2 次構造からのアプローチの重要性を提案するものである。今後、CpG および非 CpG DNA の免疫刺激性における構造特性について、新たな理論の展開に繋

がるものと期待している。

4. おわりに

近年、プロバイオティクスによる抗感染症、抗アレルギーおよび抗炎症作用に関する研究が進展し、医学と食品科学の境界領域研究の発展が注目されている。国内では、アレルギー予防効果を狙った新商品が誕生するなど、プロバイオティクスの免疫機能性に関する興味や関心は確実に消費者の間に浸透してきている。最近では、プロバイオティクス由来の DNA が潰瘍性大腸炎を改善したとする興味深い知見が得られ¹⁸⁻²⁰⁾、プロバイオティクス由来の免疫刺激性 DNA が TLR9 を介して様々な疾病の予防や改善に寄与する可能性があり、新たな利用性の開拓が期待されている。

本総説で示した知見は、今後、腸管における TLR9 を介するシグナル伝達経路について、その認識メカニズムを分子レベルで明らかにするための糸口となり、自然免疫という基本的な免疫システムがより発展的に解明されるための原動力になると確信する。さらに、免疫賦活化作用に関わる乳酸菌 DNA 配列を同定し、サイトカイン誘導による腸管免疫ネットワーク調節作用として発展的に把握することで、アレルギーや感染症予防に寄与する生体防御食品の創製に向けた基礎的研究として大いに期待できる。今後、免疫刺激性 DNA モチーフのように新たな免疫活性因子の特定とその受容体を介する活性発現メカニズムの解明を通して、自然免疫から獲得免疫の基本的な免疫システムを食品免疫学の観点から応用することで、感染症、アレルギーや炎症性疾患などの予防や改善に寄与する新たな「イムノバイオティク食品」の創製が実現するものと信じている。

5. 謝 辞

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金 (若手研究 B : No.20780238)、また、本研究は、文部科学省の平成 19 年度科学技術振興調整費による「若手研究者の自立的研究環境整備促進プログラム」の一環としても行った。本研究を遂行するにあたりご助力頂いた、東北大学大学院農学研究科の北澤春樹先生、ならびに National Cancer Institute (NCI) の Dennis M. Klinman 博士、横浜市立大学医学研究科の佐藤隆先生に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Mashiba, H., Matsunaga, K., Tomoda, H., Furusawa, M., Jimi, S. and Tokunaga, T., In vitro augmentation of natural killer activity of peripheral blood cells from cancer patients by a DNA fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **41**, 197-202, 1988.
- 2) Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A. and Klinman, D. M., CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, **374**, 546-9, 1995.
- 3) Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. and Akira, S., A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, **408**, 740-5, 2000.
- 4) Klinman, D. M., Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat. Rev. Immunol.*, **4**, 249-58, 2004.
- 5) Kawai, T. and Akira, S., TLR signaling. *Semin. Immunol.*, **19**, 24-32, 2007.
- 6) Kitazawa, H., Tohno, M., Shimosato, T. and Saito, T., Development of molecular immunoassay system for probiotics via toll-like receptors based on food immunology. *Anim. Sci. J.*, **79**, 11-21, 2008.
- 7) Kitazawa, H., Ueha, S., Itoh, S., Watanabe, H., Konno, K., Kawai, Y., Saito, T., Itoh, T. and Yamaguchi, T., AT oligonucleotides inducing B lymphocyte activation exist in probiotic *Lactobacillus gasseri*. *Int. J. Food. Microbiol.*, **65**, 149-162, 2001.
- 8) Kitazawa, H., Watanabe, H., Shimosato, T., Kawai, Y., Itoh, T. and Saito, T. 2003. Immunostimulatory oligonucleotide, CpG-like motif exists in *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* NIAI B6. *Int. J. Food. Microbiol.*, **85**, 11-21, 2003.
- 9) Takahashi, N., Kitazawa, H., Shimosato, T., Iwabuchi, N., Xiao, J. Z., Iwatsuki, K., Kokubo, S. and Saito, T., An immunostimulatory DNA sequence from a probiotic strain of *Bifidobacterium longum* inhibits IgE production in vitro. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **46**, 461-469, 2006
- 10) Iliev, I. D., Kitazawa, H., Shimosato, T., Katoh, S., Morita, H., He, F., Hosoda, M. and Saito, T., Strong immunostimulation in murine immune cells by *Lactobacillus rhamnosus* GG DNA containing novel oligodeoxynucleotide pattern. *Cellular Microbiol.*, **7**, 403-414, 2005.
- 11) Shimosato, T., Kimura, T., Tohno, M., Iliev, I. D., Katoh, S., Ito, Y., Kawai, Y., Sasaki, T., Saito, T. & Kitazawa, H. 2006. Strong immunostimulatory activity of AT-oligodeoxynucleotide requires a six-base loop with a self-stabilized 5'-C G-3' stem structure. *Cellular Microbiol.*, **8**, 485-495, 2006.
- 12) Shimosato, T., Tohno, M., Sato, T., Nishimura, J., Kawai, Y., Saito, T. & Kitazawa, H. Identification of a potent immunostimulatory oligodeoxynucleotide from *Streptococcus thermophilus lacZ*. *Anim. Sci. J.*, **80**, 597-604, 2009.
- 13) Shimosato, T., Kitazawa, H., Katoh, S., Tohno, M., Iliev, I. D., Nagasawa, C., Kimura, T., Kawai, Y. and Saito, T. Augmentation of T-H-1 type response by immunoactive AT oligonucleotide from lactic acid bacteria via Toll-like receptor 9 signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **326**, 782-787, 2005.
- 14) Shimosato, T., Tohno, M., Kitazawa, H., Katoh, S., Watanabe, K., Kawai, Y., Aso, H., Yamaguchi, T. and Saito, T., Toll-like receptor 9 is expressed on follicle-associated epithelia containing M cells in swine Peyer's patches. *Immunol. Lett.*, **98**, 83-89, 2005.
- 15) Tohno, M., Shimosato, T., Moue, M., Aso, H., Watanabe, K., Kawai, Y., Yamaguchi, T., Saito, T. & Kitazawa, H., Toll-like receptor 2 and 9 are expressed and functional in gut-associated lymphoid tissues of presuckling newborn swine. *Vet. Res.*, **37**, 791-812, 2006.
- 16) Parroche, P., Lauw, F. N., Goutagny, N., Latz, E., Monks, B. G., Visintin, A., Halmen, K. A., Lamphier, M., Olivier, M., Bartholomeu, D. C., Gazzinelli, R. T. & Golenbock, D. T., Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 1919-24, 2007.
- 17) Nishikawa, M., Matono, M., Rattanakit, S., Matsuoka, N. and Takakura, Y., Enhanced immunostimulatory activity of oligodeoxynucleotides by Y-shape formation. *Immunology*, **124**, 247-55, 2008.
- 18) Watson, J. L. and McKay, D. M., The immunophysiological impact of bacterial CpG DNA on the gut. *Clin. Chim. Acta.*, **364**, 1-11, 2006.
- 19) Dotan, I. and Rachmilewitz, D., Probiotics in inflammatory bowel disease: possible mechanisms

- of action. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, **21**, 426-30, 2005.
- 20) Jijon, H., Backer, J., Diaz, H., Yeung, H., Thiel, D., McKaigney, C., De Simone, C. and Madsen, K., DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology*, **126**, 1358-73, 2004.
-

Immunostimulatory Oligodeoxynucleotide Requires a Specific Secondary Structure

Takeshi SHIMOSATO

Fiber-Nanotech Young Researcher Empowerment Center, Shinshu University

Summary

The molecular mechanism by which immunostimulatory sequences of oligodeoxynucleotides (ISS-ODNs) activate immune cells remains unclear. There is also no information on the relationship between the secondary structure and immunostimulation of ISS-ODNs. Therefore I focused on the role of the secondary structure, particularly the number of bases and the presence of consecutive T's (5'-TTTT-3') in the loop on immunostimulatory activity. I finally found that a six-base loop is optimal for immunostimulatory activity and the strong immunostimulatory ODNs require a 5'-C...G-3' self-stabilized stem structure. These structures may be important for the induction of the strong immunostimulation not only in non-CpG ODNs but also in CpG ODNs. These structures may be needed for the induction of a Th-1-type response via TLR9 by non-CpG ODNs. Although further study on the relationship between the immunostimulatory ODNs and the ODN binding pocket of TLR9 is needed to elucidate the molecular mechanism of ODN recognition, the current study emphasized an important role of immunostimulation by ODNs.

Key word : ISS-ODN, CpG-ODN, AT-ODN, loop structure