

非メチル化 CpG DNA による自然免疫応答を
増強する抗菌ペプチドに関する研究

西原 冴佳

(NISHIHARA Saeka)

同志社女子大学大学院

薬学研究科 医療薬学専攻

要旨

マクロファージなどの自然免疫細胞は、Toll 様受容体 (Toll like receptor, TLR) などのパターン認識受容体を介して、病原体に特有の構造を認識する。パターン認識受容体のうち、細胞内のエンドソーム/リソソームに局在する TLR9 は、細菌やウイルスに特有の非メチル化シトシン Guanine 配列を有する 1 本鎖 DNA (CpG DNA) を認識することで自然免疫応答を誘導する。CpG DNA は抗腫瘍薬や抗アレルギー薬、さらにはワクチンアジュバントとしての開発が進められていることから、CpG DNA による免疫応答を増強する物質の発見や、その調節メカニズムの解明は、薬学領域において非常に重要な課題である。

抗菌ペプチドもまた、自然免疫において重要な因子の 1 つである。抗菌ペプチドには殺菌作用だけでなく、免疫担当細胞の核酸認識応答を増強したり、グラム陰性菌成分のリポ多糖による炎症応答を中和したりするなど、宿主の自然免疫応答を調節する作用が知られている。このうち、核酸認識応答の増強については、増強作用を有するペプチドの特徴や、その作用機序については不明な点が多く残されている。これらを明らかにすることで、抗菌ペプチドを感染症治療薬としてだけでなく、CpG DNA による自然免疫応答を増強する補助剤としてがんやアレルギーなどの治療薬の開発やワクチンアジュバントの創生に、応用できるようになる。そこで本研究では、CpG DNA 認識応答を増強する抗菌ペプチドを探索し、増強作用を示すペプチドの性質、およびその作用メカニズムを明らかにすることを目的として解析を行った。

α -ヘリックス構造をとる 4 種の抗菌ペプチド Kn2-7、L5、Mastoparan M ならびに Temporin A の CpG DNA 認識応答増強作用を調べたところ、Kn2-7 (FIKRIARLLLRKIF-

NH₂) がマウスマクロファージ様培養細胞株 RAW264.7 の CpG DNA 認識応答を顕著に増強した。CpG DNA は細胞内に局在する TLR9 に認識されるので、CpG DNA の細胞内への取り込み増加が、細胞応答の増強にとって重要なステップの 1 つだと考えられる。そこで、蛍光標識 CpG DNA の細胞内取り込みに対する Kn2-7 の効果を共焦点顕微鏡とフローサイトメトリーで解析したところ、Kn2-7 は CpG DNA の細胞内への取り込みを増加させることがわかった。次に、Kn2-7 による CpG DNA の細胞内への取り込み増加が、CpG DNA 認識応答の増強に関与するかを調べた。ペプチドの細胞内移行性にはその配列中の Arg 残基が重要なことが知られている。このペプチドの細胞内移行性が CpG DNA 細胞内取り込み増加作用に関わると考えて、Arg に着目して Kn2-7 の配列を改変した。Kn2-7 の Arg を Ala に置換した Kn2-7RA の CpG DNA 細胞内取り込み増加作用は Kn2-7 と比べて弱く、Kn2-7 の Lys を Arg に置換した Kn2-7KR の CpG DNA 細胞内取り込み増加作用は Kn2-7 と比べて強かった。そこで、これら改変ペプチドの CpG DNA 認識応答増強作用を解析したところ、増強作用は CpG DNA 細胞内取り込み増加作用と比例していた。したがって、Kn2-7 による細胞の CpG DNA 認識応答の増強には、Kn2-7 の CpG DNA 細胞内取り込み増加作用が関与することが明らかとなった。一方、すべて D-アミノ酸で合成した Kn2-7 (D-Kn2-7) は、Kn2-7 と同様に細胞内への CpG DNA の取り込みを増加させる作用があるが、CpG DNA 認識応答は増強しなかった。このことから、Kn2-7 による細胞の CpG DNA 認識応答の増強には、CpG DNA 細胞内取り込み増加作用が必須だが、それだけでは不十分で、その他の性質や作用に関与する可能性が考えられた。

Kn2-7 が CpG DNA の細胞内への取り込みを増加させたのは、Kn2-7 が CpG DNA と結合し、その複合体が細胞内に取り込まれたためだと考えて、Kn2-7 およびその改変ペプチドの CpG DNA との結合親和性を解析した。その結果、CpG DNA との結合親和性は Kn2-7 と比べて Kn2-7RA の方が小さく、Kn2-7KR の方が大きかった。これらのペプ

チドの CpG DNA との結合親和性は、上述した CpG DNA 細胞内取り込み増加作用と比例していた。このことから、Kn2-7 による CpG DNA の細胞内取り込み増加には CpG DNA との結合親和性が重要であり、その結合には Kn2-7 の塩基性アミノ酸が関与すると考えられた。一方、Kn2-7 の Leu を Ala に置換した Kn2-7LA は Kn2-7 と同程度の CpG DNA との結合親和性を示したが、CpG DNA の取り込みを増加させなかった。これらのことから、Kn2-7 による CpG DNA の細胞内取り込み増加には、Kn2-7 の塩基性アミノ酸による CpG DNA との結合親和性と、疎水性アミノ酸による細胞膜透過性が重要であると考えられた。

L5 は CpG DNA の細胞内への取り込みを Kn2-7 と同程度増加させる作用があるが、CpG DNA 認識応答を増強しない。Kn2-7 と L5 は共に α -ヘリックス構造をとるので、ペプチドをヘリックスの中心軸から見下ろしたらせん車輪投影図を作成し、同時に平均疎水性モーメントを算出してその両親媒性を予測したところ、Kn2-7 は両親媒性が高いが L5 は両親媒性が低いと考えられた。そこで、ペプチドの両親媒性が細胞の CpG DNA 認識応答の増強に関与する可能性を考え、Kn2-7 および L5 のアミノ酸組成は変化させずに、一部のアミノ酸を入れ替えてそれぞれの両親媒性を变化させたペプチドの CpG DNA 認識応答増強作用を調べた。その結果、Kn2-7 の両親媒性を低下させたペプチドは CpG DNA 認識応答を増強しなかった。一方、L5 の両親媒性を上昇させたペプチドは、CpG DNA 認識応答を顕著に増強した。このことから、 α -ヘリックスペプチドの両親媒性が、細胞の CpG DNA 認識応答の増強にとって重要な性質であり、その機序は不明だが細胞の CpG DNA 刺激応答に何らかの作用をもたらす可能性が考えられた。

TLR9 が CpG DNA を認識すると、転写因子 NF- κ B の活性化や MAPKs のリン酸化を介して細胞のサイトカイン分泌が誘導される。そこで、CpG DNA 刺激による細胞の NF- κ B 活性化や MAPKs リン酸化に対する、Kn2-7 の効果を解析した。NF- κ B 活性化をゲルシフトアッセイにより評価したところ、CpG DNA 刺激による細胞の NF- κ B 活性化は、

Kn2-7により増強されなかった。また、ウェスタンブロット法により、3つの主な MAPKs (p38、JNK、ERK) のリン酸化タンパク質を検出したところ、Kn2-7は CpG DNA 刺激による細胞の p38 リン酸化を増強するが、JNK および ERK のリン酸化には大きな影響を与えないことがわかった。これらの結果から、Kn2-7は CpG DNA 刺激により活性化されるシグナル伝達を全体的に増強するのではなく、p38 リン酸化を含む特定のシグナルを選択的に増強すると考えられた。

以上の結果より、抗菌ペプチド Kn2-7が細胞の CpG DNA 認識応答を顕著に増強すること、そしてその増強には Kn2-7の CpG DNA 細胞内取り込み増加作用が関与することがわかった。ペプチドの性質解析により、Kn2-7による CpG DNA の細胞内取り込み増加には、CpG DNA との結合親和性が重要であり、その結合には Kn2-7の塩基性アミノ酸が関与することがわかった。また、Kn2-7と結合した後の CpG DNA 取り込み増加には、Kn2-7の疎水性アミノ酸が重要であることが示された。一方、CpG DNA 認識応答の増強には、CpG DNA の取り込み増加以外の Kn2-7の性質や作用が関与することも明らかとなり、そのような性質の1つとしてペプチドの両親媒性の関与が示唆された。さらに、Kn2-7が CpG DNA 刺激により活性化されるシグナル伝達を全体的に増強するのではなく、p38 リン酸化を含む特定のシグナルを選択的に増強したことも、Kn2-7による CpG DNA 認識応答増強メカニズムを明らかにする上で重要な手がかりになると考えられた。

目次

要旨.....	i
目次.....	v
本論文で使用した略語.....	viii
第1章 研究の背景と目的.....	1
第2章 実験材料と方法.....	4
1. 実験材料.....	4
2. DNA およびペプチド.....	4
3. 細胞培養.....	5
4. 培養上清中のサイトカインの定量.....	5
5. CpG DNA の細胞内への取り込み評価.....	6
6. CpG DNA とペプチドの結合親和性評価.....	7
7. 細胞の核抽出液の調製.....	8
8. ゲルシフトアッセイ.....	9
9. 細胞溶解液の調製.....	10
10. ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE).....	11
11. ウェスタンブロット法.....	12
第3章 結果.....	14
第1節 抗菌ペプチド Kn2-7 の CpG DNA 認識応答増強作用と、CpG DNA 細胞内取り込み増加作用の解析.....	14
1. Kn2-7 は RAW264.7 の CpG DNA 認識応答を増強する.....	15

2.	Kn2-7による CpG DNA 認識応答の増強には、Kn2-7 の CpG DNA 細胞内取り込み増加作用が関与する	17
3.	D-アミノ酸で合成した Kn2-7 は CpG DNA の細胞内への取り込みを増加させるが、CpG DNA 認識応答を増強しない.....	19
第 2 節 Kn2-7 と CpG DNA の結合親和性の解析.....		22
1.	CpG DNA とペプチドの結合親和性を評価する実験系の構築.....	22
2.	Kn2-7 による CpG DNA の細胞内への取り込み増加には、Kn2-7 と CpG DNA との結合親和性が関与する	24
3.	Kn2-7LA は CpG DNA と結合するが、CpG DNA の細胞内への取り込みを増加させない.....	25
第 3 節 Kn2-7 の両親媒性と CpG DNA 認識応答増強作用の解析.....		27
1.	ペプチドのデザイン.....	28
2.	Kn2-7-3K2I/11K12I は RAW264.7 の CpG DNA 認識応答を増強しない.....	29
3.	L5-3K4L/9K8L は RAW264.7 の CpG DNA 認識応答を増強する	30
第 4 節 Kn2-7 による CpG DNA 認識応答の増強に関わる細胞内シグナル分子の解析		33
1.	Kn2-7 は CpG DNA 刺激による RAW264.7 の NF- κ B 活性化を増強しない	33
2.	Kn2-7 は CpG DNA 刺激による RAW264.7 の p38 リン酸化を増強する.....	34
第 4 章 考察.....		37
第 1 節 細胞膜透過ペプチドとしての Kn2-7.....		37
第 2 節 Kn2-7 による CpG DNA の高次構造化.....		39
第 3 節 ペプチド両親媒性の CpG DNA 認識応答増強作用への関与.....		40
第 4 節 Kn2-7 による CpG DNA 認識応答増強メカニズム.....		42
第 5 節 本研究の臨床応用への展望.....		43

第5章 総括	45
論文目録	46
謝辞	47
参考文献	49
図	57

本論文で使用した略語

BCA	Bicinchoninic acid
BSA	Bovine serum albumin
CBB	Coomassie brilliant blue
CPPs	Cell penetrating peptides
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
Geo MFI	Geometric means of fluorescence intensity
HRP	Horseradish peroxidase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminal kinase
MAPKs	Mitogen-activated protein kinases
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PBS	Phosphate-buffered saline

PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
Poly (dI-dC)	Poly (deoxyinosinic-deoxycytidylic) acid sodium salt
PRRs	Pattern recognition receptors
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TBS	Tris-buffered saline
TLR	Toll like receptor
TMB	3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine
TNF	Tumor necrosis factor

第 1 章 研究の背景と目的

生体が細菌などの病原体の侵入を認識すると、感染防御の最初の段階として自然免疫が活性化される。自然免疫はマクロファージや好中球、樹状細胞などが担う。これらの細胞は、Toll 様受容体 (TLR) などのパターン認識受容体 (PRRs) を介して、病原体に特有の構造である病原体関連分子パターン (PAMPs) を認識することで炎症応答などを誘導し、病原微生物の排除に機能する。これらの自然免疫応答は、感染初期の生体防御に重要な役割を果たすだけでなく、T 細胞や B 細胞が担う獲得免疫の発動にとっても必要不可欠である [1, 2]。

微生物に特有の配列を有する核酸も、PAMPs の 1 つとして自然免疫応答を誘導する。Yamamoto らは、脊椎動物由来ではなく細菌由来の DNA が、自然免疫細胞の 1 つであるナチュラルキラー細胞を活性化し、インターフェロン (IFN) の分泌を誘導することを見出した [3]。この発見をきっかけに細菌由来 DNA の活性配列が調べられ、シトシンとグアニンがホスホジエステル結合でつながった CpG モチーフを含む特定配列の 1 本鎖 DNA が、ナチュラルキラー細胞の活性化を誘導することがわかった [4]。また、CpG モチーフがメチル化されていないことが、免疫応答の活性化に必要であることも明らかとなった [5]。脊椎動物において、CpG モチーフの多くはメチル化されているのに対し、細菌やウイルスなどではメチル化されていないことから、CpG モチーフのメチル化の有無が、免疫応答の誘導において重要な特徴だと考えられている。その後 Akira らのグループによって、非メチル化 CpG モチーフを有する 1 本鎖 DNA (CpG DNA) の受容体として TLR9 が同定された [6]。自然免疫の活性化はワクチンの効果発現に必須であることから、ワクチンの免疫原性を強めるアジュバントとして CpG DNA の利用が試みられている。2017 年には、B 型肝炎ワクチンの Heplisav-B が、CpG DNA をアジュ

バントとして含む世界初のワクチンとして、アメリカ食品医薬品局に承認された。さらに、CpG DNA は強い自然免疫活性化能を有するだけでなく、Th1 優位の細胞性免疫応答や細胞傷害性 T 細胞の活性化を誘導することから、抗腫瘍薬や抗アレルギー薬としての利用が期待されている [7-9]。このように、医薬品開発における CpG DNA の有用性は多岐にわたることから、CpG DNA を医薬品として利用することを目指して多くの研究が行われている。しかしながら、臨床試験におけるヒトでの効果は動物実験で得られた結果から予測された効果よりも低く、医薬品として実際に承認された例は少ない [10]。そのため、CpG DNA による免疫応答を増強する物質の発見や、その調節メカニズムの解明は、薬学領域において非常に重要な課題である。

抗菌ペプチドもまた、自然免疫において重要な因子の 1 つであり、細菌から哺乳類まで幅広い生物種に存在する [11]。抗菌ペプチドは分子中に塩基性アミノ酸を多く含み生理的条件下では正電荷を帯びるので、酸性リン脂質が多く存在し負に荷電する細菌細胞膜と静電的相互作用により結合する [12]。そして疎水性領域も有することから、細菌細胞膜に入り込んで穴をあけることで殺菌作用を示す [12]。これにより細菌やウイルス、真菌など広い範囲の微生物に作用することが知られている [13]。一方、抗菌ペプチドには殺菌作用だけでなく、血管新生促進作用や [14]、細胞のサイトカイン分泌誘導作用を有するものもあり [15, 16]、その多様な機能が注目されてきている。また、一部の抗菌ペプチドはこれらの作用だけでなく、樹状細胞やマクロファージなどの核酸認識応答を増強したり [17-19]、グラム陰性菌外膜構成成分のリポ多糖に対するマクロファージの炎症応答を中和したりするなど [20]、宿主の自然免疫応答を調節する作用も知られている。さらに、センチクバエ *Sarcophaga peregrina* から単離された抗菌ペプチドザーペシン B の部分配列をもとに改変された L5 (KLKLLLLLKLK-NH₂) は、CpG モチーフを有さない合成オリゴデオキシヌクレオチド d(IC)₁₃ (ODN1a) と組み合わせることで、樹状細胞の TLR9 を介した免疫応答を増強することが報告されている [21]。結核菌

抗原に ODN1a と L5 をアジュバントとして組み合わせることで、非常に効率的な Th1 応答が誘導されることが明らかとなったことから [22, 23]、ODN1a と L5 の組み合わせをアジュバントとして利用した新たな結核ワクチンの有用性が臨床試験で検証されている [24, 25]。以上のように抗菌ペプチドは、核酸認識応答を増強する物質として機能するが、増強作用を有するペプチドの特徴や、その作用機序については不明な点が多く残されている。これらを明らかにすることで、抗菌ペプチドを感染症治療薬としてだけでなく、CpG DNA による自然免疫応答を増強する補助剤としてがんやアレルギーなどの治療薬の開発やワクチンアジュバントの創生に、応用できるようになる。そこで本研究では、CpG DNA 認識応答を増強する抗菌ペプチドを探索し、増強作用を示すペプチドの性質、およびその作用メカニズムを明らかにすることを目的として解析を行った。

第2章 実験材料と方法

1. 実験材料

一般用試薬は市販の特級品もしくはそれに準じたものを使用した。

2. DNA およびペプチド

CpG DNA およびその対照配列の GpC DNA は InvivoGen より購入した。CpG DNA および GpC DNA の配列はそれぞれ 5'-TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-3' (ODN 1668) および 5'-TCC ATG AGC TTC CTG ATG CT-3' (ODN 1668 control) であり、すべての塩基はチオリン酸エステル結合を有した。3'末端をフルオレセインで標識した CpG DNA (CpG DNA-FAM) はニッポンジーンに合成依頼し、高速液体クロマトグラフィーにより精製されたものを購入した。

ペプチドは東レリサーチセンターもしくはスクラムに合成依頼し、純度 90%以上のものを購入した。特に記載がない限り、ペプチドはトリフルオロ酢酸塩として合成し、C末端はすべてアミド化修飾した。以下に、本研究で使用したペプチドの名称およびアミノ酸配列を示す。

ペプチドの名称	アミノ酸配列
Kn2-7	FIKRIARLLRKIF
L5	KLKLLLLLKLK
Mastoparan M	INLKAIAALAKKLL
Temporin A	FLPLIGRVLSGIL
Kn2-7RA	FIKAIAALLAKIF
Kn2-7KR	FIRRIARLLRRIF
L5KA	ALALLLLLALA
Kn2-7LA	FIKRIARAARKIF

3. 細胞培養

マウスマクロファージ様培養細胞株 RAW264.7 (DS ファーマバイオメディカル) は高グルコース (4.5 g/L) のダルベッコ改変イーグル培地 (Sigma-Aldrich) に、56°Cで 30 分間の熱処理により補体を非働化したウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich)、ペニシリンおよびストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific) をそれぞれ 10%、100 単位/mL および 100 $\mu\text{g/mL}$ となるように添加したものを培養液として使用し、37°C、5% CO_2 、加湿環境下で培養した。

4. 培養上清中のサイトカインの定量

細胞処理

5×10^5 cells/mL の RAW264.7 を 48 ウェルプレート (Corning) に 400 $\mu\text{L/well}$ ずつ播種し、一晩培養した。37°Cの培養液 400 μL で 1 回洗浄した後、10 nM DNA と図中に記載した種類および濃度のペプチドを含む培養液を 400 μL ずつ加えて 24 時間培養し、その培養上清を回収した。

酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)

培養上清中のサイトカインはサンドイッチ ELISA により定量した。

インターロイキン (IL) -10 および腫瘍壊死因子 (TNF) - α は、それぞれ Mouse IL-10 Uncoated ELISA Kit および Mouse TNF alpha Uncoated ELISA Kit (Invitrogen Life Technologies) を用いて測定した。抗体等の濃度はキットに含まれる製品情報シートに従った。以下にその方法を示す。Immulon[®]II 2HB 96 ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific) に捕捉抗体溶液を 100 μL ずつ加え、4°Cで一晩静置した。その後 250 μL の 0.05% Tween-20 を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) [137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.47

mM KH_2PO_4 、8.1 mM Na_2HPO_4 (pH 7.4)] (PBS-T) で3回洗浄し、ブロッキング溶液を 200 μL ずつ加えて室温で1時間振盪し、ブロッキングを行った。次にブロッキング溶液で2倍段階希釈したマウス組み換えタンパク質もしくは回収した培養上清を 100 μL ずつ加えて室温で2時間振盪した。その後 250 μL の PBS-T で3回洗浄して検出抗体 (ビオチン標識抗体) 溶液を 100 μL ずつ加え、室温で1時間振盪した。振盪後、250 μL の PBS-T で3回洗浄し、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) で標識されたストレプトアビジン (Avidin-HRP) 溶液を 100 μL ずつ加えて室温で30分間振盪した。次に 250 μL の PBS-T で5回洗浄し、100 μL のテトラメチルベンジジン (TMB) 溶液を加えて発色させた後、1 M リン酸を 100 μL ずつ加えて反応を停止させ、Model 680 マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) を用いて波長 450 nm における吸光度を測定した。培養上清中に含まれるサイトカイン量は、それぞれのキットに含まれるマウス組み換えタンパク質を2倍段階希釈して作成した検量線を用いて算出した。

5. CpG DNA の細胞内への取り込み評価

共焦点レーザー顕微鏡観察

1×10^5 cells/mL の RAW264.7 をノンコート 8 ウェルチャンバースライド (松浪硝子工業) に 400 μL /well ずつ播種し、一晩培養した。以降の操作は可能な限り遮光して行った。37°C の培養液 400 μL で1回洗浄した後、50 nM CpG DNA-FAM 単独もしくは 50 nM CpG DNA-FAM と 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kn2-7 を含む培養液をそれぞれ 400 μL ずつ加えて2時間培養した。培養後、400 μL の氷冷した PBS で3回洗浄を行い、4% パラホルムアルデヒドを含む PBS を 200 μL 加えて室温で10分間静置し、固定した。直ちに 400 μL の PBS で3回洗浄し、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ジアミジノフェニルインドール (DAPI) (Invitrogen Life Technologies) を含む PBS を 400 μL 加えて室温で5分間静置し、核を染色した。その後 PBS で3回洗浄を行い、Vectashield mounting medium for fluorescence (# H-1000、Vector

Laboratories) で封入し、共焦点レーザー顕微鏡 A1R (ニコン) を用いて細胞を観察した。顕微鏡の接眼レンズの倍率は 10× (視野数 22)、対物レンズの倍率は 40× (開口数 0.95)、ズーム倍率は 2×とした。フルオレセインは励起波長 488 nm、蛍光波長 500–550 nm、DAPI は励起波長 405 nm、蛍光波長 425–475 nm で検出した。蛍光画像の取得と解析は、NIS-elements AR software (ニコン) を用いた。

フローサイトメトリー

5×10^5 cells/mL の RAW264.7 を 12 ウェルプレート (住友ベークライト) に 1.2 mL/well ずつ播種し、一晚培養した。以降の操作は可能な限り遮光して行った。37°C の培養液 1.2 mL で 1 回洗浄した後、50 nM CpG DNA-FAM と図中に記載した種類および濃度のペプチドを含む培養液を 1.2 mL ずつ加えて 2 時間培養した。以降の操作は氷上で行った。培養後、1.2 mL の氷冷した PBS で 3 回洗浄し、セルスクレーパーを用いて 1.2 mL の氷冷した PBS 中で細胞を剥離し、15 mL 遠沈管に回収した。そこに 1.2 mL の氷冷した PBS をさらに加えてよく懸濁し、FACSLytic フローサイトメーター (Becton Dickinson Biosciences) を用いて測定した。サンプルの流速は 60 μ L/min とし、未処理細胞の前方散乱光および側方散乱光の特性に基づいて、細胞片や死細胞をなるべく含まない細胞集団領域を設定した。細胞の蛍光強度は、励起波長 488 nm、蛍光波長 511–543 nm で検出した。データの取得と解析は、FACSuite software (Becton Dickinson Biosciences) を用い、設定した領域内の細胞 10,000 個の蛍光強度の幾何平均 (Geo MFI) を算出した。

6. CpG DNA とペプチドの結合親和性評価

CpG DNA とペプチドの結合親和性の解析は、Kindrachuk らの方法を参考にして行った [26]。5% (w/v) のポリアクリルアミドゲルを作製し、0.5×に希釈したトリス-ほう酸-EDTA 緩衝液 (pH 8.3) (TBE) (ナカライテスク) を泳動バッファーとして用いて 70V の

定電圧で 60 分間以上のプレランを室温で行った。プレランを行う間、11 μg の CpG DNA と図中に記載した種類およびモル比のペプチドを 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、270 mM グリセロール中で混合して全量 20 μL とし、37°Cで 10 分間反応させた。反応後、終濃度が 740 mM となるように 5.4 M グリセロールを 2 μL ずつ加え、直ちにプレランが終了したゲルに 10 μL ずつ (5 μg の CpG DNA を含む) アプライして 70V の定電圧で約 60 分間、室温で泳動した。泳動後、15 μL の GelRed nucleic acid gel stain (Biotium) を含む 50 mL のゲル固定液 [50% (v/v) メタノール、5% (v/v) 酢酸] を用いて、室温で 2 時間遮光してゲルを染色した。ゲル中の DNA は、ゲル撮影装置 Atto Printgraph AE-6905CF CCD camera controller (Atto) を用いて検出し、露光時間 3 秒で撮影した。以下にゲルの組成を示す。

5% (w/v) ポリアクリルアミドゲル (1 枚分)	(mL)
MilliQ 水	7.23
30% (w/v) アクリルアミド/ビス混合液 (37.5:1) (富士フイルム和光純薬)	1.67
10×TBE (pH8.3)	1
10% ペルオキシ二硫酸アンモニウム (富士フイルム和光純薬)	0.1
N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン (ナカライテスク)	0.005

7. 細胞の核抽出液の調製

細胞からの核抽出は、Ueno らの方法を参考にして行った [27]。2×10⁶ cells/mL の RAW264.7 を 12 ウェルプレートに 1 mL/well ずつ播種し、一晚培養した。37°Cの培養液 1 mL で 1 回洗浄した後、CpG DNA とペプチドを含む培養液を 1 mL ずつ加えて培養した (CpG DNA の濃度、ペプチドの種類および濃度、培養時間は図中に記載した)。以降の操作は氷上もしくは 4°Cで行った。培養後、セルスクレーパーを用いて細胞を剥離して 1.5 mL チューブに回収し、200×g で 10 分間遠心した後上清を取り除いた。残った沈殿物を 50 μL のバッファー A [10 mM HEPES-NaOH (pH 7.9)、10 mM KCl、0.1 mM EDTA、

0.1 mM EGTA、1 mM DTT、0.1 mM PMSF] でピペッティングにより懸濁し、15 分間静置した。その後、終濃度が 0.6%となるように 10% Nonidet P-40 を 3 μ L ずつ加え、10 秒間激しく攪拌した。攪拌後、直ちに 20,400 \times g で 1 分間遠心し、上清を除去した。残った沈殿物に 20 μ L のバッファーC [20 mM HEPES-NaOH (pH 7.9)、0.4 M NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、0.5 mM DTT、0.1 mM PMSF] を加えて、15 分間激しく攪拌した。20,400 \times g で 5 分間遠心し、上清を核抽出液として回収した。核抽出液中のタンパク質濃度は、Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) のプロトコルに従い、BCA 法により定量した。

8. ゲルシフトアッセイ

ゲルシフトアッセイは、Ueno ら [27] および Negi ら [28] の方法を参考にして行った。20 μ g のタンパク質を含む核抽出液に、1 mM DTT を含む TN バッファー [10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、100 mM NaCl] を加えて全量 10 μ L とした。そこに 1 mg/mL poly (dI-dC) (Sigma-Aldrich) を 4.2 μ L ずつ加えて 30 分間以上室温で静置した。以降の操作は可能な限り遮光して行った。反応溶液 [試料と混合した後の終濃度が 5 mM Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM NaCl、0.05% Nonidet P-40、1 mM MgCl₂、0.5 mM DTT、0.25 mM EDTA、5% グリセロール、40 μ g/mL ウシ血清アルブミン (BSA) (Sigma-Aldrich)、0.01 μ M NF- κ B 特異的プローブとなるように調製] を 5.8 μ L ずつ加えて 30 分間室温で静置した後、直ちに 6% (w/v) ポリアクリルアミドゲルに 15 μ L ずつアプライし、1 \times TBE を泳動バッファーとして用いて 150V の定電圧で約 60 分間、4 $^{\circ}$ C で泳動した (泳動時間が長く、遊離のプローブはゲル外へ出てしまうが、バンドの分離が改善されるため、この条件で泳動を行った)。なお、ポリアクリルアミドゲルは事前に作製し、試料をアプライする直前まで 1 \times TBE 中で 150V の定電圧、60 分間以上のプレランを 4 $^{\circ}$ C で行った。泳動後、ゲルを蛍光画像解析装置 FLA-5100 (富士フイルム) を用いて励起波長 473 nm、蛍光波長 510 nm

でスキャンした。以下にゲルの組成を示す。

6% (w/v) ポリアクリルアミドゲル (1枚分)	(mL)
MilliQ 水	9.5
30% (w/v) アクリルアミド/ビス混合液 (37.5:1)	2.9
10×TBE (pH8.3)	1.45
50% グリセロール	0.62
10% ペルオキシ二硫酸アンモニウム	0.125
N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン	0.01

poly (dI-dC) は 50 mM NaCl を含む TE バッファー [10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA] で 1 mg/mL となるように調製し、45°Cで 5 分間インキュベートした後に使用した。NF- κ B 特異的プローブは、5'末端を 6-カルボキシフルオレセインで標識したセンス鎖オリゴヌクレオチド (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3') と非標識のアンチセンス鎖オリゴヌクレオチド (5'-GCC TGG GAA AGT CCC CTC AAC T-3') を TN バッファー中で濃度比が 1:2 となるように混合し、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice mini Model TP100 (タカラバイオ) を用いて 98°Cで 15 分間加熱した後 90 分かけて 50°Cまで冷却し、さらに 90 分かけて 30°Cまで温度を下げてアニーリングすることにより調製した。オリゴヌクレオチドはグライナー・ジャパンに合成依頼し、高速液体クロマトグラフィーにより精製されたものを購入した。

9. 細胞溶解液の調製

2×10^6 cells/mL の RAW264.7 を 12 ウェルプレートに 1 mL/well ずつ播種し、一晚培養した。37°Cの培養液 1 mL で 1 回洗浄した後、CpG DNA とペプチドを含む培養液を 1 mL ずつ加えて培養した (CpG DNA の濃度、ペプチドの種類および濃度、培養時間は図中に記載した)。以降の操作は氷上もしくは 4°Cで行った。培養後、1 mL の氷冷したトリス緩衝生理食塩水 (TBS) [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、137 mM NaCl] で 3 回洗浄し、セ

ルスクレーパーを用いて 1 mL の氷冷した TBS 中で細胞を剥離し、1.5 mL チューブに回収した。200×g で 10 分間遠心した後上清を取り除き、残った沈殿物に 50 μL の RIPA バッファー [50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、0.25% sodium deoxycholate、1% Nonidet P-40、1 mM EDTA、cOmplete Mini protease inhibitor cocktail (Roche)、phosphatase inhibitor cocktail (ナカライテスク)] を加えてよく攪拌し、60 分間静置した。その後 10,000×g で 10 分間遠心し、上清を細胞溶解液として回収した。細胞溶解液中のタンパク質濃度は、Pierce BCA protein assay kit のプロトコルに従い、BCA 法により定量した。

10. ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

タンパク質が等量となるように調製した細胞溶解液に試料緩衝液 (SDS-PAGE 用、6 倍濃縮、還元剤含有) (ナカライテスク) を加え、5 分間煮沸したものを泳動用試料とした。事前に作製したポリアクリルアミドゲル [10% (w/v) の分離ゲル、4% (w/v) の濃縮ゲル] に泳動用試料をアプライし、泳動バッファー [25 mM Tris、192 mM glycine、0.1% (w/v) SDS] 中で電気泳動を行い、タンパク質を分離した。泳動は、50V の定電圧で約 30 分間行った後、100V の定電圧で約 70 分間、試料緩衝液に含まれるブロモフェノールブルーが分離ゲルの下端から約 5 mm のところへ移動するまで行った。泳動後、ゲルをクマシーブリリアントブルー (CBB) 染色液 [0.1% (w/v) CBB-R250、40% (v/v) メタノール、10% (v/v) 酢酸] に浸して 30 分間染色した後、脱色液 [40% (v/v) メタノール、10% (v/v) 酢酸] により脱色し、スキャナーで読み込んだ。以下にゲルの組成を示す。

SDS-PAGE 用ポリアクリルアミドゲル (1 枚分)	分離ゲル (mL)	濃縮ゲル (mL)
アクリルアミド濃度 (w/v)	10%	4%
MilliQ 水	1.98	1.19
30% (w/v) アクリルアミド/ビス混合液 (37.5:1)	1.67	0.27
4 倍濃縮 WIDE RANGE ゲル調製用緩衝液 (ナカライテスク)	1.25	0.5
10% (w/v) SDS	0.05	0.02
10% ペルオキシ二硫酸アンモニウム	0.05	0.02
N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン	0.001	0.001

11. ウェスタンブロット法

SDS-PAGE により分離したタンパク質は、タンク式転写装置を用いてニトロセルロース膜 (Bio-Rad) に転写した。転写は、転写バッファー [25 mM Tris、192 mM glycine、20% (w/w) メタノール、0.02% (w/v) SDS] 中で冷却しながら 100V の定電圧で 75 分間行った。転写後のニトロセルロース膜を 5% スキムミルクを含む TBS-T (0.1% Tween-20 を含む TBS) に浸して室温で 60 分間振盪し、ブロッキングを行った。TBS-T で 1 回リンスして 5 分間の洗浄を 3 回行った後、5% BSA を含む TBS-T で 1,000 倍希釈した 1 次抗体に浸して 4°C で一晩振盪した。1 次抗体には、抗リン酸化 p38 (Thr180/Tyr182) 抗体 (#4511、Cell Signaling Technology)、抗リン酸化 JNK (Thr183/Tyr185) 抗体 (#9251、Cell Signaling Technology)、抗リン酸化 ERK1/2 (Thr202/Tyr204) 抗体 (#9101、Cell Signaling Technology) を使用した。1 次抗体を反応させた後、約 30 分間振盪しながら室温に戻し、TBS-T で 1 回リンスして 5 分間の洗浄を 3 回行った。その後、5% スキムミルクを含む TBS-T で 2,000 倍希釈した 2 次抗体に浸して室温で 1 時間振盪した。2 次抗体には HRP で標識された抗ラビット IgG 抗体 (#7074、Cell Signaling Technology) を使用した。2 次抗体を反応させた後、TBS-T で 1 回リンスして 15 分間の洗浄を 3 回行い、さらに 5 分間の洗浄を 1 回行った。その後、SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) に 5 分間浸して発色反応を行い、生じた化学発光を LAS-3000

mini (富士フィルム) で検出した。バンド強度は、画像解析ソフトウェア ImageJ (National Institutes of Health) を用いて定量化した。

第3章 結果

第1節 抗菌ペプチド Kn2-7 の CpG DNA 認識応答増強作用と、 CpG DNA 細胞内取り込み増加作用の解析

抗菌ペプチドは α -ヘリックス構造や β -シート構造、もしくはその両方など多様な二次構造を示す [12, 29]。そのうち直鎖状 α -ヘリックス構造をとるものが最も多く、その抗菌作用にはペプチドの正電荷や疎水性が重要であることが知られている [12]。これらの性質は、CpG DNA などの細菌成分や宿主細胞との相互作用にも影響を与えることから、細胞の免疫応答調節作用にも関与すると考えられている [30]。

カテリシジンファミリーに属するヒト由来抗菌ペプチド LL-37 は、CpG DNA の細胞内への取り込みを増加させ、ヒト B リンパ球や形質細胞様樹状細胞の CpG DNA 認識応答を増強することが知られている [31]。一方、LL-37 のマウスオーソログである CRAMP は、CpG DNA の細胞内への取り込みに影響しないが、骨髄由来樹状細胞の TLR9 を介した CpG DNA 認識応答を増強する [19]。このように、 α -ヘリックス構造を有する様々な抗菌ペプチドの CpG DNA に対する免疫応答調節作用が調べられてきたが、そのメカニズムについては不明な点が多い。LL-37 および CRAMP はそれぞれ 37 残基および 34 残基のアミノ酸から構成される。抗菌ペプチドの作用には、その正電荷や疎水性、二次構造など多くの性質が関与するため、ペプチドの構成アミノ酸が多いほど作用メカニズムを解析するのが困難になると考えられる。そこで本研究では、11~14 アミノ酸残基から構成され、いずれも α -ヘリックス構造をとることが報告されている 4 種の合成抗菌ペプチド Kn2-7 [32, 33]、L5 [34, 35]、Mastoparan M [36] ならびに Temporin A [37, 38] の作用を調べることにした。

一方、TLR9 の合成リガンドとして知られる 20 塩基前後の短い 1 本鎖 CpG DNA は現在、クラス A (タイプ D)、クラス B (タイプ K)、クラス C、クラス P の主に 4 つのクラスに分類されている [39, 40]。CpG DNA はそのクラスによって、それぞれ特徴的な配列や骨格を有し、免疫細胞に対する効果も異なる [39, 40]。通常 DNA は塩基同士がリン酸ジエステル結合で連結しているが、生理的環境下ではヌクレアーゼによる加水分解を受けやすい。そのため、クラス B の CpG DNA は、リン酸ジエステル結合の酸素原子を硫黄原子に置換したチオリン酸エステル結合により、すべての塩基同士が連結されている [41, 42]。この修飾によりヌクレアーゼに対する耐性が向上するため、生体内での安定性が高まる [43]。実際に、医薬品として利用されたり、臨床試験に使用されたりしている CpG DNA の多くがクラス B である [7, 8, 10]。そこで本研究では、クラス B に分類される CpG DNA (ODN 1668) による細胞応答に対する抗菌ペプチドの効果を解析した。

1. Kn2-7 は RAW264.7 の CpG DNA 認識応答を増強する

RAW264.7 からの IL-10 分泌を指標として、マクロファージの CpG DNA に対する応答性を確認したところ、10 nM CpG DNA 処理により細胞からの IL-10 分泌が誘導された (図 1)。一方、CpG DNA の対照配列の GpC DNA を、CpG DNA と同濃度で処理した細胞では IL-10 の分泌が認められなかった (図 1)。このことから、CpG DNA 刺激による RAW264.7 の IL-10 分泌誘導は、TLR9 を介した CpG モチーフの認識による応答であると判断できた。そこで、Kn2-7、L5、Mastoparan M ならびに Temporin A が、CpG DNA に対するマクロファージの応答を増強するかを調べるために、CpG DNA 刺激による RAW264.7 のサイトカイン分泌に対する、これら 4 種の抗菌ペプチドの効果を解析した。Kn2-7 存在下で CpG DNA を処理すると、Kn2-7 の濃度依存的に CpG DNA 刺激による

IL-10 分泌が増加し、12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kn2-7 を加えた条件で CpG DNA を刺激した細胞からの IL-10 分泌量は、CpG DNA 単独処理時の約 135 倍となった (図 2)。同様に、TNF- α 分泌も Kn2-7 の添加濃度依存的に増加し、12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kn2-7 を加えた細胞からの TNF- α 分泌量は、CpG DNA 単独処理時の約 4.5 倍となった (図 3)。また、12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kn2-7 を処理しても、CpG DNA 刺激をしなければ IL-10 および TNF- α の分泌量は未処理の細胞と同程度であり、Kn2-7 による IL-10 および TNF- α の分泌誘導は認められなかった (図 2、図 3)。さらに、IL-6、IL-1 β 、IFN- β ならびに IFN- γ の分泌についても調べたところ、CpG DNA 単独処理により IL-6 の分泌誘導が認められ、12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kn2-7 を加えることによりその分泌量が約 9.1 倍増加した (データ未掲載)。その他のサイトカインについては、CpG DNA 単独処理による分泌誘導が認められなかった (データ未掲載)。これらのことから、Kn2-7 は RAW264.7 の CpG DNA 認識応答を増強すると考えられた。一方、L5 を 7.5 もしくは 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように加えた条件で CpG DNA を刺激した細胞からの IL-10 分泌量は、CpG DNA 単独処理時と比べてわずかに増加したが、その増加の程度は Kn2-7 を加えた場合と比べるとはるかに小さかった (図 2)。TNF- α 分泌も同様に、7.5 もしくは 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ L5 を加えることで増加が認められたが、その程度は Kn2-7 を加えた場合と比べると小さかった (図 3)。これらのことから、L5 は CpG DNA 認識応答をほとんど増強しないと考えられた。また、2.5、7.5 ならびに 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のどの濃度の Mastoparan M と TemporinA を加えた条件においても、細胞からの IL-10 および TNF- α の分泌量が CpG DNA 単独処理時と同程度であったので、Mastoparan M と Temporin A は RAW264.7 の CpG DNA 認識応答を増強しないと考えられた (図 2、図 3)。さらに、合成ペプチドに含まれるトリフルオロ酢酸塩がこれらの細胞応答に影響する可能性を排除するために、トリフルオロ酢酸塩よりも細胞毒性が小さいとされる酢酸塩として Kn2-7 および L5 を合成し、細胞からの IL-10 分泌量を指標としてその CpG DNA 認識応答増強作用を調べた。酢酸塩として合成した Kn2-7 および L5 は、トリフルオロ酢酸塩

として合成した Kn2-7 および L5 と同程度の CpG DNA 認識応答増強作用を示したことから、合成ペプチドに含まれる塩類が細胞応答に影響を与えている可能性は低いと考えられた (図 4)。今回調べた 4 種の抗菌ペプチドの中で、Kn2-7 が RAW264.7 の CpG DNA 認識応答を最も増強したことから、以降は Kn2-7 の CpG DNA 認識応答増強メカニズムについて詳しく調べることにした。

2. Kn2-7 による CpG DNA 認識応答の増強には、Kn2-7 の CpG DNA 細胞内取り込み増加作用が関与する

CpG DNA は細胞内のエンドソーム/リソソームに局在する TLR9 に認識されることでサイトカインの分泌を誘導することから [44]、CpG DNA の細胞内への取り込みが、TLR9 を介した細胞応答にとって重要なステップの 1 つだと考えられる。このことから、Kn2-7 による CpG DNA 認識応答の増強には、CpG DNA の細胞内への取り込み増加が関与する可能性が考えられた。そこで、蛍光標識した CpG DNA の細胞内取り込みに対する Kn2-7 の効果を解析した。共焦点レーザー顕微鏡により CpG DNA の細胞内への取り込みとその局在性を調べたところ、CpG DNA を単独処理した細胞と比べて、Kn2-7 を同時に処理した細胞の方が細胞質における緑色の蛍光が明確に観察され、CpG DNA の細胞内への取り込みが増加したと考えられた (図 5A)。また、このとき CpG DNA はドット状で観察されたことから、CpG DNA がエンドソームなどの小胞内に集積した状態であることが示された。したがって、CpG DNA は受動拡散ではなく、エンドサイトーシスなどの能動輸送機構によって細胞内に取り込まれたと考えられた。さらに、CpG DNA の細胞内への取り込みをフローサイトメトリーにより定量的に解析したところ、Kn2-7 の添加濃度依存的に CpG DNA の細胞内への取り込みが増加し、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kn2-7 を加えた細胞への CpG DNA の取り込みは、CpG DNA を単独処理した場合の約 2 倍となった (図 5B)。これらのことから、Kn2-7 は CpG DNA の RAW264.7 への取り込みを

増加させることが明らかとなった。

次に、Kn2-7による CpG DNA の細胞内への取り込み増加が、RAW264.7 の CpG DNA 認識応答の増強に関与するかを調べた。ペプチドの細胞内移行性には、その配列中のアルギニン (Arg) 残基が重要なことが知られている [45]。この理由として、プロテオグリカンなどの負電荷を有する細胞表面分子との相互作用により、ペプチドが細胞表面に集積しやすくなることなどが考えられている [46, 47]。この相互作用には、Arg の側鎖に存在するグアニジノ基 (pKa: 12.48) と細胞表面分子の負電荷を有する官能基との水素結合が重要である [48, 49]。Arg と同様に塩基性アミノ酸であるリシン (Lys) も、アミノ基 (pKa: 10.54) を側鎖に有することから負電荷を有する官能基と水素結合を 1 つ形成することができるが、グアニジノ基は 2 つの水素結合を形成可能であることから、Arg は Lys と比べて細胞表面との相互作用が強いと考えられる。そのため、Lys に富むペプチドと比べて Arg に富むペプチドの方が細胞内移行性は高いとされている [45, 50]。このペプチドの細胞内移行性が、CpG DNA 細胞内取り込み増加作用に関わると考えて、Kn2-7 の Arg をアラニン (Ala) に置換した Kn2-7RA および Lys を Arg に置換した Kn2-7KR の CpG DNA 細胞内取り込みに対する効果を調べた。Kn2-7RA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加えると、CpG DNA 単独処理時と比較して細胞内への CpG DNA の取り込みが増加したが、その増加の程度は Kn2-7 と比べると約 0.7 倍であった (図 6A)。また、Kn2-7KR (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加えると、細胞への CpG DNA の取り込みは Kn2-7 を加えた場合の約 1.7 倍となった (図 6B)。このことから、CpG DNA 細胞内取り込み増加作用は、Kn2-7 と比べて Kn2-7RA の方が弱く、Kn2-7KR の方が強いことが示された。Kn2-7 配列中の Arg を置換することにより CpG DNA 細胞内取り込み増加作用を変化させることができたので、次に、CpG DNA 刺激による RAW264.7 の IL-10 分泌に対する、Kn2-7RA および Kn2-7KR の効果を調べた。CpG DNA 刺激による IL-10 分泌は 1.25 および 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kn2-7RA を加えても CpG DNA 単独処理時と同程度であったが、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kn2-7RA を加えた条件では増加し、

このときの IL-10 分泌量は 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kn2-7 を加えた場合の約 0.4 倍であった (図 6C)。一方、Kn2-7KR を加えるとその濃度依存的に CpG DNA 刺激による IL-10 分泌が増加し、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kn2-7KR を加えた細胞からの IL-10 分泌量は 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kn2-7 を加えた場合の約 2.4 倍となった (図 6D)。このことから、細胞の CpG DNA 認識応答増強作用は、Kn2-7 と比べて Kn2-7RA は弱く、Kn2-7KR は強いことが示された。このように、Kn2-7 とそのアルギニン改変ペプチドの CpG DNA 認識応答増強作用の強弱が CpG DNA 細胞内取り込み増加作用の強弱と比例していたことから、Kn2-7 による RAW264.7 の CpG DNA 認識応答の増強には、Kn2-7 の CpG DNA 細胞内取り込み増加作用が関与することが明らかとなった。

3. D-アミノ酸で合成した Kn2-7 は CpG DNA の細胞内への取り込みを増加させるが、CpG DNA 認識応答を増強しない

CpG DNA 認識応答の増強に影響する Kn2-7 の性質をさらに詳しく調べるために、すべて D-アミノ酸で合成した Kn2-7 (D-Kn2-7) の作用を解析した。D-アミノ酸で構成されるペプチドは、L-アミノ酸で構成されるペプチドと比べて立体構造が変化するため、生体分子との相互作用が変化する。これにより、D-アミノ酸で合成したペプチドは、プロテアーゼに対して抵抗性を示すため [51]、抗菌ペプチドの修飾法の 1 つとして利用されている [35]。図 7A に示すように、D-Kn2-7 (7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加えた時の CpG DNA の細胞内への取り込みは CpG DNA 単独処理時と比べて増加し、その増加の程度は Kn2-7 の約 1.5 倍となった。これは、Kn2-7 より D-Kn2-7 の方がプロテアーゼによる分解を受けにくいという可能性が考えられる。また、D-アミノ酸で合成した Kn2-7KR (D-Kn2-7KR) (7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加えた細胞への CpG DNA の取り込みは、D-Kn2-7 を加えた場合の約 1.4 倍となった (図 7B)。Kn2-7 と比べて Kn2-7KR の方が CpG DNA 細胞内取り込み増加作用が大きいという図 6B で得られた結果が、D-Kn2-7 と D-Kn2-7KR でも確認

できたことから、D-アミノ酸で合成したペプチドは、L-アミノ酸で合成したペプチドと同様の機構で CpG DNA の細胞内への取り込み増加を行うと考えられた。そこで、CpG DNA 刺激による RAW264.7 の IL-10 分泌に対する、D-Kn2-7 および D-Kn2-7KR の効果を調べた。しかしながら、CpG DNA に 1.25、2.5 ならびに 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のどの濃度の D-Kn2-7 もしくは D-Kn2-7KR を加えても、細胞からの IL-10 分泌量は CpG DNA を単独処理した場合と同程度であった (図 7C、D)。したがって、D-Kn2-7 およびその改変ペプチド D-Kn2-7KR は共に、それぞれ L-アミノ酸で合成したものと同様に CpG DNA の細胞内への取り込みを増加させるにも関わらず、CpG DNA 認識応答を増強しないことが明らかとなった。これまでの結果をまとめると、Kn2-7 による RAW264.7 の CpG DNA 認識応答の増強には、Kn2-7 の CpG DNA 細胞内取り込み増加作用が必須だが、それだけでは不十分で、その他の性質や作用が関与する可能性が示された。

本節では、抗菌ペプチド Kn2-7 が RAW264.7 の CpG DNA 認識応答を増強することを見出した。そこで、Kn2-7 による CpG DNA 応答増強メカニズムについて詳しく調べることにした。CpG DNA の細胞内取り込みに対するペプチドの効果を解析したところ、Kn2-7 およびそのアルギニン改変ペプチドの CpG DNA 細胞内取り込み増加作用が、それらの CpG DNA 認識応答増強作用と比例していたことから、Kn2-7 による CpG DNA 認識応答の増強には、Kn2-7 の CpG DNA 細胞内取り込み増加作用が関与することが示された。一方、D-アミノ酸で合成した Kn2-7 と Kn2-7KR は共に、それぞれ L-アミノ酸で合成したものと同様に細胞内への CpG DNA の取り込みを増加させる作用があったが、CpG DNA 認識応答は増強しなかった。このことから、CpG DNA の細胞内への取り込みが増加しても、CpG DNA 認識応答が増強するとは限らないことがわかった。したがって、Kn2-7 による CpG DNA 認識応答の増強には、CpG DNA 細胞内取り込み増加

作用が必須だが、それだけでは不十分で、その他の性質や作用が関与する可能性が考えられた。

第2節 Kn2-7 と CpG DNA の結合親和性の解析

第1節では、抗菌ペプチド Kn2-7 が CpG DNA の細胞内への取り込みを増加させ、その作用が RAW264.7 の CpG DNA 認識応答の増強に参与することを明らかにした。DNA 認識応答を促進することが知られている抗菌ペプチド LL-37 は、静電的相互作用により細胞外 DNA と複合体を形成し、その複合体が形質細胞様樹状細胞のエンドソーム内に取り込まれることで、細胞の TLR9 活性化につながるとされている [17]。また、d(IC)₁₃ (ODN1a) との組み合わせが樹状細胞の免疫応答増強作用を示す L5 は、ODN1a と複合体を形成して樹状細胞表面と結合した後、ペプチドの大部分は細胞表面に結合したままであるが、細胞内の TLR9 が存在する小胞への、エンドサイトーシスによる ODN1a の取り込みを促進することが示されている [52, 53]。これらの知見を踏まえると、Kn2-7 は CpG DNA と複合体を形成することによって、CpG DNA の細胞内への取り込みを増加させたと推測される。しかしながら、Kn2-7 の CpG DNA との結合親和性と、CpG DNA 細胞内取り込み増加作用との関係は不明である。そこで、CpG DNA とペプチドの結合親和性を評価する実験系を構築し、Kn2-7 およびその改変ペプチドの CpG DNA との結合親和性を解析した。

1. CpG DNA とペプチドの結合親和性を評価する実験系の構築

L5 は ODN1a と結合して複合体を形成し、ODN1a の細胞内への取り込みを促進してヒトおよびマウス樹状細胞の活性化を増強することが知られている [52]。このことから、L5 は核酸と結合し、細胞内への核酸の取り込みを促進する作用があると考えられる。L5 が CpG DNA と結合する可能性を検証するために、RAW264.7 への CpG DNA の取り込みに対する L5 の効果を、フローサイトメトリーを用いて確認した。その結果、

図 8A に示すように、L5 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加えたときの CpG DNA の細胞内への取り込みは、CpG DNA 単独処理時と比べて約 2.7 倍増加した。L5 が RAW264.7 への CpG DNA の取り込みを増加させることが確認できたことから、L5 は CpG DNA と結合する可能性が示された。したがって、L5 を用いて CpG DNA とペプチドの結合親和性を評価する実験系を構築することにした。CpG DNA とペプチドの結合親和性は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動による測定系を利用して評価しようと考えた。これは、CpG DNA がペプチドと結合して分子量が増加することで、ゲル中の移動度が変化することを指標とした方法である。図 8B に示すように、CpG DNA に対するモル比が 1、2 ならびに 4 倍となるように L5 を混合した条件では CpG DNA のバンドが検出されたのに対し、6、8 ならびに 10 倍では CpG DNA のバンドが検出されなかった。また、L5 を加えた条件ではゲル上部に発光物が検出された。これは、CpG DNA と L5 が複合体を形成し、そのサイズが非常に大きかった、もしくは L5 の正電荷により CpG DNA の負電荷が中和された、などの理由により CpG DNA がポリアクリルアミドゲル中に泳動されず、ゲル上部にとどまったためだと考えられた。これらのことから、CpG DNA に対するモル比が 6 倍以上の L5 を混合することで、ほとんどの CpG DNA が L5 との複合体形成に利用されたことが推察された。一方、L5 の Lys を Ala に置換して電荷をなくした L5KA を、CpG DNA に対するモル比が 10 倍となるように混合した条件では、CpG DNA を単独で泳動した場合と同程度の強度の CpG DNA バンドが検出された (図 8B)。これは、L5KA が CpG DNA とほとんど複合体を形成せず、大部分の CpG DNA が遊離の状態で存在するためだと考えられた。したがって、CpG DNA と L5 の複合体形成は、L5 の正電荷に依存することが示された。以上の結果より、ペプチドと複合体を形成した CpG DNA はポリアクリルアミドゲル中には検出されなかったが、ペプチドとの複合体形成に CpG DNA が利用されることで遊離の CpG DNA バンドが検出されなくなることから、そのときのペプチド/CpG DNA モル比を指標とすることで、ペプチドの正電荷による CpG

DNA との結合の親和性を評価できると考えられた。

2. Kn2-7による CpG DNA の細胞内への取り込み増加には、Kn2-7 と CpG DNA との結合親和性が関与する

第1項で構築したポリアクリルアミドゲル電気泳動による測定系を用いて、CpG DNA と Kn2-7 の結合親和性を調べた。その結果、図 9A に示すように、CpG DNA に対するモル比が 1、2 ならびに 4 倍となるように Kn2-7 を混合した条件では CpG DNA のバンドが検出されたのに対し、6、8 ならびに 10 倍では CpG DNA のバンドが検出されなかった。Kn2-7 を混合することによる CpG DNA のバンド変化が、CpG DNA に L5 を混合した場合と同様となったので (図 8B)、Kn2-7 は CpG DNA と結合し、その結合親和性は L5 と同程度だと考えられた。次に、Kn2-7 の CpG DNA との結合親和性が、Kn2-7 による CpG DNA の細胞内への取り込み増加に関与するかを調べるために、Kn2-7RA および Kn2-7KR の CpG DNA との結合親和性を解析した。CpG DNA のバンドは、CpG DNA に対するモル比が 1、2、4 ならびに 6 倍となるように Kn2-7RA を混合した条件では検出されたのに対し、8 もしくは 10 倍では検出されなかった (図 9B)。また、CpG DNA に対して Kn2-7KR を 1 もしくは 2 モル倍となるように混合した条件では CpG DNA のバンドが検出されたのに対し、4、6、8 ならびに 10 モル倍では検出されなかった (図 9C)。CpG DNA のバンドが検出されなくなるペプチド/CpG DNA モル比が Kn2-7 を混合した場合と比べて Kn2-7RA を混合した場合の方が大きく、Kn2-7KR を混合した場合の方が小さかった。このことから、CpG DNA との結合親和性は Kn2-7 と比べて Kn2-7RA の方が小さく、Kn2-7KR の方が大きいと考えられた。この結果は、CpG DNA 細胞内取り込み増加作用が Kn2-7 と比べて Kn2-7RA の方が弱く (図 6A)、Kn2-7KR の方が強い (図 6B)、という第1節2項で示した結果と比例した。これらのことから、Kn2-7 による RAW264.7 への CpG DNA の取り込み増加には、Kn2-7 と CpG DNA との結合親和性が

重要であり、その結合には Kn2-7 の塩基性アミノ酸が関与すると考えられた。

3. Kn2-7LA は CpG DNA と結合するが、CpG DNA の細胞内への取り込みを増加させない

Kn2-7 の CpG DNA との結合親和性と、Kn2-7 による CpG DNA の細胞内への取り込み増加との関係をさらに詳しく調べるために、Kn2-7 のロイシン (Leu) を Ala に置換した Kn2-7LA の性質も解析した。CpG DNA に対するモル比が 1、2 ならびに 4 倍となるように Kn2-7LA を混合した条件では CpG DNA のバンドが検出されたのに対し、6、8 ならびに 10 倍では CpG DNA のバンドが検出されなかった (図 10A)。CpG DNA のバンドが検出されなくなる Kn2-7LA/CpG DNA モル比が、Kn2-7 を混合した場合と顕著な差が認められなかったことから (図 9A)、Kn2-7LA の CpG DNA との結合親和性は Kn2-7 と同程度だと考えられた。これは、Kn2-7LA の配列中の塩基性アミノ酸の組成や位置が Kn2-7 と同じだからだと考えられた。そこで、RAW264.7 への CpG DNA の取り込みに対する Kn2-7LA の効果をフローサイトメトリーで調べた。その結果、図 10B に示すように、Kn2-7LA (12.5 µg/mL) を加えても CpG DNA の細胞内への取り込みは CpG DNA 単独処理時と同程度となった。このことから、Kn2-7LA は CpG DNA の細胞内への取り込みを増加させないことがわかった。以上の結果より、Kn2-7 による RAW264.7 への CpG DNA の取り込み増加には、Kn2-7 の疎水性アミノ酸が重要であると考えられた。

本節では、CpG DNA とペプチドの結合親和性を評価するために、ポリアクリルアミドゲル電気泳動による測定系を構築し、Kn2-7 およびその改変ペプチドの CpG DNA との結合親和性を解析した。CpG DNA とペプチドの複合体が大きすぎる、もしくはペプチドの正電荷により CpG DNA の負電荷が中和されるなどの理由により、ペプチドと複

合体を形成した CpG DNA はポリアクリルアミドゲル中には検出されず、ゲル上部の発光物として検出されたが、遊離の CpG DNA バンドが検出されなくなるペプチド/CpG DNA モル比を指標として CpG DNA とペプチドの結合親和性を評価することが可能となった。この測定系により、Kn2-7 は CpG DNA と結合することが示された。Kn2-7 の CpG DNA との結合親和性が、Kn2-7 による CpG DNA の細胞内への取り込み増加に関与するかを調べるために、Kn2-7 およびそのアルギニン改変ペプチド Kn2-7RA、Kn2-7KR の CpG DNA との結合親和性を解析し、CpG DNA 取り込み増加作用と比較した。すると、これらのペプチドの CpG DNA との結合親和性は、CpG DNA 細胞内取り込み増加作用と比例していた。このことから、Kn2-7 による RAW264.7 への CpG DNA の取り込み増加には、Kn2-7 と CpG DNA との結合親和性が重要であり、その結合には Kn2-7 の塩基性アミノ酸が関与すると考えられた。一方、Kn2-7LA は Kn2-7 と同程度の CpG DNA との結合親和性を示したが、CpG DNA の取り込みを増加させなかった。したがって、ペプチドが細胞膜を透過するには、ペプチドの適度な疎水性が必要であると考えられた。以上のことから、Kn2-7 による CpG DNA の細胞内への取り込み増加には、Kn2-7 の塩基性アミノ酸による CpG DNA との結合親和性と、疎水性アミノ酸による細胞膜透過性が重要であると考えられた。

第3節 Kn2-7の両親媒性と CpG DNA 認識応答増強作用の解析

第1節では、Kn2-7がRAW264.7のCpG DNA 認識応答を増強し、その増強にはKn2-7のCpG DNA 細胞内取り込み増加作用が関与することを示した。一方、L5はCpG DNAの細胞内への取り込みをKn2-7と同程度増加させたが(図8A)、CpG DNA 認識応答をほとんど増強しなかった(図2、図3)。Kn2-7とL5は、CpG DNAとの結合に重要な塩基性アミノ酸の割合が同程度で(Kn2-7: 約38.5%、L5: 約36.4%)、CpG DNAとの結合親和性も同程度であることを第2節で述べた(図8B、図9A)。このことからKn2-7とL5は、CpG DNAとの結合およびその後のCpG DNAの細胞内への取り込みに対しては同様の効果を示すが、CpG DNA 認識応答に対する効果は異なる(図11)。したがって、Kn2-7とL5で異なる何らかの性質が、ペプチドのCpG DNA 認識応答増強作用に重要であると考えられる。

抗菌ペプチドの抗菌活性や哺乳動物細胞の細胞膜に対する透過能などの作用には、配列中の正電荷残基や疎水性残基の数だけでなく、 α -ヘリックス性や両親媒性など、それぞれのアミノ酸残基の位置に由来する性質も重要であることが知られている[54, 55]。例えば、 α -ヘリックス構造を有する両親媒性抗菌ペプチドLL-37は大腸菌に対して殺菌作用を示すが、LL-37のアミノ酸配列をランダムに並び替えて両親媒性を低下させたペプチドは殺菌作用を示さない[31]。また、両親媒性合成ペプチドR6W3(RRWRRRWR-NH₂)はHeLa細胞にエンドサイトーシスを誘起するが、R6W3の配列中のトリプトファン残基をD-アミノ酸に置換して二次構造を失わせると、エンドサイトーシス誘起能が低下する[56]。Kn2-7とL5は共に α -ヘリックス構造をとることが知られている[33, 57]。そこで、これらのペプチドの性質をさらに詳しく知るために、 α -ヘリックスの特性を予測するウェブサーバーHeliQuest (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr>)を用いてペプチドをヘリックスの中心軸から見下ろしたらせん車輪投影図を作成し、同時に平均疎水性モーメ

ント $\langle\mu H\rangle$ を算出した [58]。すると、Kn2-7 は $\langle\mu H\rangle=0.908$ 、L5 は $\langle\mu H\rangle=0.095$ となった (図 12)。 $\langle\mu H\rangle$ は、長さの異なるペプチドの両親媒性の程度を直接比較することができる指標の1つで、その値が大きいほど両親媒性が高いと評価できる [59]。両親媒性が高いペプチドの配列を識別する上で、 $\langle\mu H\rangle$ が 0.6 より大きいことを1つの目安とする例がある [58]。このことから、Kn2-7 は両親媒性が高いが L5 は両親媒性が低いと考えられる。そこで、ペプチドの両親媒性が RAW264.7 の CpG DNA 認識応答の増強に関与する可能性を考え、Kn2-7 および L5 のアミノ酸組成は変化させずに、一部のアミノ酸を入れ替えてそれぞれの両親媒性を变化させたペプチドを新たにデザインし、それらのペプチドの CpG DNA 認識応答増強作用を調べることにより、両親媒性の重要性を検討した。

1. ペプチドのデザイン

ヘリックスの一方の面に親水性残基が多く存在し、その反対の面に疎水性残基が多く存在すると、 α -ヘリックスペプチドは両親媒性を示す。そこで、Kn2-7 の両親媒性が低下するように親水性残基に富む領域に含まれる3番目の Lys および11番目の Lys を、疎水性残基に富む領域に含まれる2番目のイソロイシン (Ile) および12番目の Ile とそれぞれ入れ替えた Kn2-7-3K2I/11K12I (FKIRIARLLRIKF-NH₂) を作成した (図 13 上)。HeliQuest を用いて $\langle\mu H\rangle$ を算出したところ、Kn2-7-3K2I/11K12I の $\langle\mu H\rangle$ は 0.267 であり、Kn2-7-3K2I/11K12I の両親媒性は Kn2-7 と比べて低いことが確認できた (図 13 上)。また、L5 の両親媒性が上昇するように L5 の3番目の Lys および9番目の Lys を、それぞれ4番目の Leu および8番目の Leu と入れ替えた L5-3K4L/9K8L (KLLKLLLKLLK-NH₂) を作成した (図 13 下)。L5-3K4L/9K8L の $\langle\mu H\rangle$ は 0.799 であり、L5-3K4L/9K8L の両親媒性は L5 と比べて高いことが確認できた (図 13 下)。

2. Kn2-7-3K2I/11K12I は RAW264.7 の CpG DNA 認識応答を増強しない

ペプチドの両親媒性が RAW264.7 の CpG DNA 認識応答の増強に関与する可能性を検証するために、Kn2-7 の両親媒性を低下させた Kn2-7-3K2I/11K12I の CpG DNA 認識応答増強作用を、RAW264.7 からの IL-10 分泌を指標として解析した。その結果、2.5、7.5 ならびに 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のどの濃度の Kn2-7-3K2I/11K12I を加えた条件で CpG DNA を処理しても、RAW264.7 からの IL-10 分泌量は CpG DNA 単独処理時と同程度となった (図 14)。このことから、Kn2-7-3K2I/11K12I は RAW264.7 の CpG DNA 認識応答を増強しないことがわかった。

ペプチドの両親媒性の変化が CpG DNA との結合親和性や CpG DNA 細胞内取り込み増加作用に影響した可能性もある。そこで、Kn2-7-3K2I/11K12I の CpG DNA との結合親和性および CpG DNA 細胞内取り込み増加作用を解析した。まず、第 2 節で構築した方法により Kn2-7-3K2I/11K12I の CpG DNA との結合親和性を調べた。CpG DNA に対するモル比が 1 もしくは 2 倍となるように Kn2-7-3K2I/11K12I を混合した条件では CpG DNA のバンドが検出されたのに対し、4、6、8 ならびに 10 倍では CpG DNA のバンドが検出されなかった (図 15)。CpG DNA のバンドが検出されなくなるペプチド/CpG DNA モル比が Kn2-7 と比べて Kn2-7-3K2I/11K12I の方が小さかったことから (図 9A、図 15)、Kn2-7-3K2I/11K12I の CpG DNA との結合親和性は Kn2-7 より大きいと考えられた。Kn2-7 の両親媒性低下により、CpG DNA との結合親和性が大きくなった可能性もあるが、Kn2-7-3K2I/11K12I の CpG DNA との結合親和性が Kn2-7 と比べて低下しなかったことから、この変化は Kn2-7-3K2I/11K12I が CpG DNA 認識応答を増強しなかったことを説明するものではないと考えられた。

次に、CpG DNA の細胞内取り込みに対する Kn2-7-3K2I/11K12I の効果をフローサイ

トメトリーで調べた。その結果、図 16 に示すように、Kn2-7-3K2I/11K12I を加えるとその添加濃度依存的に CpG DNA の細胞内への取り込みがわずかに減少した。一方、Kn2-7 では同じ条件下で CpG DNA の細胞内への取り込みが増加することが確認できた (図 16)。このことから、Kn2-7-3K2I/11K12I は CpG DNA の細胞内への取り込みを増加させないことがわかった。ペプチドの CpG DNA 細胞内取り込み増加作用が、CpG DNA 認識応答の増強に關与するという第 1 節 2 項で述べた内容を考慮すると、Kn2-7-3K2I/11K12I が CpG DNA 認識応答を増強しなかったのは、Kn2-7-3K2I/11K12I が CpG DNA 細胞内取り込み増加作用を有さないためである可能性がある。したがって、これらの結果からは Kn2-7 の両親媒性が CpG DNA 認識応答の増強に關与するとはいえない。

3. L5-3K4L/9K8L は RAW264.7 の CpG DNA 認識応答を増強する

次に、L5 の両親媒性を上昇させた L5-3K4L/9K8L の CpG DNA 認識応答増強作用を調べた。RAW264.7 に L5-3K4L/9K8L 存在下で CpG DNA を処理すると、L5-3K4L/9K8L の濃度依存的に CpG DNA 刺激による IL-10 分泌が増加し、12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ L5-3K4L/9K8L を加えた条件で CpG DNA を刺激した細胞からの IL-10 分泌量は、CpG DNA 単独処理時の約 12.6 倍となった (図 17)。また、12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ L5-3K4L/9K8L を単独処理した細胞からは IL-10 の分泌が認められなかった (図 17)。このことから、L5-3K4L/9K8L は RAW264.7 の CpG DNA 認識応答を増強することが明らかとなった。

第 2 項と同様に、CpG DNA との結合親和性や CpG DNA 細胞内取り込み増加作用に対する、ペプチドの両親媒性の影響を解析した。まず、CpG DNA との結合親和性を調べたところ、CpG DNA に対するモル比が 1、2 ならびに 4 倍となるように L5-3K4L/9K8L を混合した条件では CpG DNA のバンドが検出されたのに対し、6、8 ならびに 10 倍で

は CpG DNA のバンドが検出されなかった (図 18)。CpG DNA のバンドが検出されなくなるペプチド/CpG DNA モル比が L5-3K4L/9K8L と L5 で顕著な差が認められなかったことから (図 8B、図 18)、L5-3K4L/9K8L の CpG DNA との結合親和性は L5 と同程度だと考えられた。このことから、L5 の両親媒性を上昇させても CpG DNA との結合親和性は変化せず、L5 と L5-3K4L/9K8L の CpG DNA 認識応答増強作用の違いに、ペプチドの CpG DNA との結合親和性は寄与しないと考えられた。

次に、CpG DNA の細胞内取り込みに対する L5-3K4L/9K8L の効果をフローサイトメトリーで調べた。その結果、図 19 に示すように、CpG DNA の細胞内への取り込みは 5 および 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ L5-3K4L/9K8L を加えても CpG DNA 単独処理時と同程度で、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ L5-3K4L/9K8L を加えた時にわずかに増加した。しかしながら、L5 による CpG DNA の細胞内への取り込み増加の程度と比べると、L5-3K4L/9K8L は CpG DNA の細胞内への取り込みをほとんど増加させないと考えられた。このことから、L5-3K4L/9K8L は L5 と比べて CpG DNA の細胞内への取り込みをほとんど増加させないが、CpG DNA 認識応答を顕著に増強することがわかった。L5 と L5-3K4L/9K8L の CpG DNA 認識応答増強作用が CpG DNA 細胞内取り込み増加作用と比例しなかったことから、L5 と L5-3K4L/9K8L の CpG DNA 認識応答増強作用の違いに、CpG DNA 細胞内取り込み増加作用が寄与する可能性は低いと考えられた。以上の結果より、L5-3K4L/9K8L による CpG DNA 認識応答の増強には、L5-3K4L/9K8L の両親媒性が関与することが示唆された。

本節では、ペプチドの両親媒性が RAW264.7 の CpG DNA 認識応答の増強に関与する可能性を考え、Kn2-7 および L5 のアミノ酸組成は変化させずに、一部のアミノ酸を入れ替えてそれぞれの両親媒性を变化させたペプチドの CpG DNA 認識応答増強作用を調べた。CpG DNA 認識応答増強作用を示す Kn2-7 の両親媒性を低下させた Kn2-7-

3K2I/11K12I は RAW264.7 の CpG DNA 認識応答を増強しなかった。また、Kn2-7-3K2I/11K12I は CpG DNA の細胞内への取り込みを増加させなかったことから、Kn2-7 の両親媒性は CpG DNA の細胞内への取り込み増加およびそれに伴う CpG DNA 認識応答の増強に重要であると考えられた。一方、CpG DNA 認識応答をほとんど増強しない L5 の両親媒性を上昇させた L5-3K4L/9K8L は、L5 と比べて CpG DNA の細胞内への取り込みをほとんど増加させなかったが、CpG DNA 認識応答を顕著に増強した。したがって、L5-3K4L/9K8L による CpG DNA 認識応答の増強に、CpG DNA 細胞内取り込み増加作用が寄与する可能性は低く、L5-3K4L/9K8L の両親媒性が関与することが示唆された。以上の結果より、ペプチドの両親媒性が RAW264.7 の CpG DNA 認識応答の増強に関与する可能性が明らかとなった。

第4節 Kn2-7による CpG DNA 認識応答の増強に関わる細胞内シグナル分子の解析

TLR9 が CpG DNA を認識すると、アダプター分子である MyD88 を介して転写因子 NF- κ B の活性化や MAPKs のリン酸化が起こり、細胞のサイトカイン分泌が誘導される [60, 61]。第1節では、Kn2-7 が CpG DNA の細胞内への取り込みを増加させ、CpG DNA 刺激により誘導される RAW264.7 のサイトカイン分泌を増強することを明らかにした。しかしながら、その細胞内シグナル増強の詳細については不明である。Kn2-7 を同時に処理することにより、CpG DNA 刺激による活性化がさらに増強される細胞内シグナル分子は、RAW264.7 の CpG DNA 認識応答の増強に関わる。したがって、そのような分子の同定は、ペプチドによる CpG DNA 認識応答増強メカニズムを解明する手がかりとなる。そこで、ペプチドにより増強される細胞内シグナル分子の探索を目的として、CpG DNA 刺激による RAW264.7 の NF- κ B 活性化や MAPKs リン酸化に対する、Kn2-7 の効果を解析した。

1. Kn2-7 は CpG DNA 刺激による RAW264.7 の NF- κ B 活性化を増強しない

NF- κ B が活性化すると、核内へ移行した後 NF- κ B 結合配列 (5'-GGGACTTCC-3') を特異的に認識することで DNA と結合し、サイトカインなどの目的遺伝子の転写活性化を行う [62]。CpG DNA 刺激による RAW264.7 の NF- κ B 活性化は、細胞の核抽出液と NF- κ B 特異的プローブを用いたゲルシフトアッセイにより解析した。図 20A に示すように、CpG DNA 単独処理によりシフトバンドが検出され、そのバンド強度は刺激後 1 時間で最大となり、その後経時的に減少した。このことから CpG DNA 刺激により NF-

κ B が活性化され、その活性化レベルは刺激後 1 時間で最大になることが確認できた。これに Kn2-7 (12.5 μ g/mL) を加えても、CpG DNA の刺激時間に関わらず、シフトバンドの強度は CpG DNA 単独処理時と比べて増強しなかった (図 20A)。さらに、刺激後 1 時間におけるシフトバンドの強度は CpG DNA の刺激濃度依存的に増強したが、どの濃度の CpG DNA で刺激した条件においても、Kn2-7 (12.5 μ g/mL) を加えた場合のシフトバンドの強度は CpG DNA 単独処理時と同程度となった (図 20B)。また、未処理もしくは 12.5 μ g/mL Kn2-7 を単独処理した条件ではシフトバンドはほとんど検出されなかった (図 20)。これらの結果より、Kn2-7 は CpG DNA 刺激による RAW264.7 の NF- κ B 活性化を増強しないと考えられた。

2. Kn2-7 は CpG DNA 刺激による RAW264.7 の p38 リン酸化を増強する

第 1 項において、Kn2-7 は CpG DNA 刺激による RAW264.7 の NF- κ B 活性化を増強しないことがわかった。このことから、Kn2-7 による CpG DNA 認識応答の増強には、NF- κ B 以外の分子が関わりと考慮された。そこで、CpG DNA 刺激により活性化される他の細胞内シグナル分子の 1 つである MAPKs のリン酸化に対する Kn2-7 の効果を解析した。哺乳動物細胞において、MAPKs は主に p38、c-Jun N 末端キナーゼ (JNK)、細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) の 3 つに分類される [63]。そこで、Kn2-7 を同時に処理した時の、CpG DNA 刺激によるこれら 3 種類の MAPKs のリン酸化タンパク質存在量の変化をウェスタンブロットにより解析した。図 21 に示すように、0.5~1 時間の CpG DNA 刺激によりリン酸化 p38 (p-p38)、リン酸化 JNK (p-JNK) ならびにリン酸化 ERK (p-ERK) の存在量は未処理の細胞と比べて増加し、刺激後 2 時間でその存在量が減少に転じ、刺激後 4 時間では未処理の細胞と同程度となった。このことから p38、JNK、ERK のいずれもが CpG DNA 刺激によりリン酸化誘導され、そのリン酸化レベルは刺激後 0.5~1 時間で最大になることが確認できた。これに Kn2-7 (12.5 μ g/mL) を加えると、4 時

間刺激した場合を除いて、CpG DNA 単独で刺激した場合と比べて p-p38 の存在量がわずかに増加した (図 21A)。一方、p-JNK および p-ERK の存在量は Kn2-7 を加えてもほとんど変化しなかった (図 21A)。これらの結果は、ImageJ によるバンド強度の定量解析においても確認できた (図 21B)。

次に、CpG DNA 刺激濃度を変化させたときの MAPKs のリン酸化に対する Kn2-7 の効果を解析した。CpG DNA 刺激後の経時的な解析により p38、JNK ならびに ERK のリン酸化レベルが、CpG DNA 刺激後約 1 時間で最大になることが確認できたことから (図 21)、CpG DNA 刺激後 1 時間において、p-p38、p-JNK ならびに p-ERK 存在量の変化を解析した。刺激後 1 時間における p-p38 存在量は CpG DNA の刺激濃度依存的に増加したが、50 nM CpG DNA で刺激した時点で最大に達し、それ以上の濃度の CpG DNA 刺激では減少に転じた (図 22)。これに Kn2-7 (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加えると、どの濃度の CpG DNA で刺激した条件においても、CpG DNA 単独処理時と比べて p-p38 量が増加した (図 22A)。一方、刺激後 1 時間における p-JNK および p-ERK の存在量は CpG DNA の刺激濃度依存的に増加し、CpG DNA の刺激濃度が 100 nM 付近でその存在量が飽和に達した (図 22)。これに Kn2-7 (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加えても、CpG DNA の刺激濃度に関わらず、p-JNK および p-ERK の存在量は CpG DNA 単独処理時と比べて大きな差異が認められなかった (図 22A)。これらの結果は、ImageJ によるバンド強度の定量解析においても確認できた (図 22B)。また、12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kn2-7 を単独処理した細胞の p-p38、p-JNK ならびに p-ERK 存在量はいずれも、未処理の細胞と同程度だった (図 21、図 22)。これらの結果より、CpG DNA 刺激によりリン酸化誘導される MAPKs のうち、Kn2-7 は p38 のリン酸化を選択的に増強すると考えられた。

本節では、Kn2-7が CpG DNA 刺激による RAW264.7 の p38 リン酸化を増強することを明らかにした。一方、CpG DNA 刺激による JNK や ERK のリン酸化、NF- κ B の活性化に対して Kn2-7 は大きな影響を与えなかった。このことから、Kn2-7 は CpG DNA 刺激により活性化されるシグナル伝達を全体的に増強するのではなく、p38 リン酸化を含む特定のシグナルを選択的に増強すると考えられた。

第4章 考察

第1節 細胞膜透過ペプチドとしての Kn2-7

第3章1節では、抗菌ペプチド Kn2-7 が RAW264.7 の CpG DNA 認識応答を増強し、その増強には CpG DNA 細胞内取り込み増加作用が関与することを明らかにした。一方、D-アミノ酸で合成した Kn2-7 と Kn2-7KR を用いた解析結果より、Kn2-7 による細胞の CpG DNA 認識応答の増強には、CpG DNA 細胞内取り込み増加作用だけでは不十分で、その他の性質や作用が関与する可能性が考えられた。

哺乳動物細胞の細胞膜を通過し、通常細胞内へは取り込まれにくい核酸、タンパク質、ナノ粒子などの様々な機能性分子を細胞内へ輸送することができる約 30 以下のアミノ酸残基からなるペプチドを総称して、細胞膜透過ペプチド (CPPs) と呼ぶ [64]。CPPs はアミノ酸配列の特性によって塩基性 CPPs、疎水性 CPPs、両親媒性 CPPs の主に 3 つに分類される [65]。塩基性 CPPs の細胞膜透過には、エンドサイトーシスなどのエネルギー依存的な機構が関与すると考えられている [66-68]。第3章1節の結果より、Kn2-7 により取り込み促進された CpG DNA は、エンドサイトーシスなどの能動輸送機構によって取り込まれることが示唆された。したがって、本研究において Kn2-7 は CPPs として機能し、結合した CpG DNA をエンドソーム内に輸送した可能性がある。エンドソーム内に取り込まれた CPPs は、後期エンドソームやリソソームに多く存在する酸性リン脂質 bis(monoacylglycero)phosphate の負電荷との静電的相互作用によりエンドソーム膜を攪乱し、細胞質に放出される [69]。このようなエンドソームからのペプチドの放出は、endosomal escape と呼ばれている [69]。さらに、D-アミノ酸で合成された CPPs は L-アミノ酸で合成された CPPs と比べて endosomal escape が起こりやすいことが報告されて

いる [70]。このことから、D-Kn2-7はKn2-7と比べて **endosomal escape** が起こりやすいことが推察される。CpG DNAはエンドソーム/リソソームに局在するTLR9に認識されることでその下流シグナル伝達経路が活性化することから [44]、D-Kn2-7はCpG DNAの取り込みを増加させる作用があるが、CpG DNA認識応答の増強に対しては **endosomal escape** が不利に作用した可能性が考えられる。

第2節 Kn2-7による CpG DNA の高次構造化

第3章2節の結果より、Kn2-7による CpG DNA の細胞内への取り込み増加には、Kn2-7の塩基性アミノ酸による CpG DNA との結合親和性と、疎水性アミノ酸による細胞膜透過性が重要であることが考えられた。このことから、Kn2-7は CpG DNA と複合体を形成して細胞内へ取り込まれることで、CpG DNA の細胞内への取り込みを増加させたと考えられた。しかしながら、Kn2-7と CpG DNA の複合体が細胞内へ取り込まれることを確認するには至らなかったため、今後のさらなる研究が必要である。

近年、CpG DNA を高次構造化することで、その免疫刺激活性が増強することが明らかにされつつあり、その技術の利用が進められている。塩基配列のそれぞれ半分ずつが相補的な、30塩基からなる3種類の1本鎖 CpG DNA を等モルずつ混合してアニーリングすることで作製した Y 型 DNA は、1本鎖もしくは2本鎖 DNA と比較して RAW264.7 への取り込みが増大し、これらの DNA の刺激により誘導される細胞からのサイトカイン分泌が有意に増加することが Nishikawa らの研究により示されている [71]。さらにこの Y 型 DNA を、DNA リガーゼを用いて連結した dendritic 型 DNA は、Y 型 DNA と比べてそのサイズ依存的に RAW264.7 への取り込みが増大し、細胞に対する免疫刺激活性も増強することが同グループの Rattanakit らにより報告されている [72]。本研究で使用した CpG DNA の配列中には互いに相補的となる部分が存在しないので、CpG DNA 単独で高次構造体となる可能性は低いですが、Kn2-7 と結合することで複合体が形成されることが本研究で明らかとなった。CpG DNA が Kn2-7 と結合することで形成される複合体がどのような高次構造を示すかについてはさらなる解析が必要であるが、CpG DNA がペプチドと結合することで複合体を形成し、その時の高次構造が細胞の CpG DNA 認識応答を増強する上で有利に働いた可能性がある。

第3節 ペプチド両親媒性の CpG DNA 認識応答増強作用への関与

第3章3節では、CpG DNA 認識応答増強作用を示す Kn2-7 の両親媒性を低下させた Kn2-7-3K2I/11K12I が RAW264.7 の CpG DNA 認識応答を増強しないのに対し、CpG DNA 認識応答をほとんど増強しない L5 の両親媒性を上昇させた L5-3K4L/9K8L は CpG DNA 認識応答を顕著に増強することを見出した。このことから、ペプチドの両親媒性が RAW264.7 の CpG DNA 認識応答の増強に関与する可能性が明らかとなった。しかしながら、ペプチドの両親媒性は細胞の CpG DNA 認識応答増強作用だけでなく、CpG DNA 細胞内取り込み増加作用に影響する場合もある。Kn2-7 の両親媒性を低下させた Kn2-7-3K2I/11K12I は、CpG DNA の細胞内への取り込みを増加させなかった。このことから、Kn2-7-3K2I/11K12I が Kn2-7 と比べて CpG DNA 認識応答を増強しなかったのは、両親媒性が低いためだけでなく、CpG DNA 細胞内取り込み増加作用が小さいためである可能性も考えられた。したがって、ペプチドの CpG DNA 認識応答増強作用に対するペプチドの両親媒性の関与を明確に示すためには、CpG DNA 細胞内取り込み増加作用が元の配列のペプチドと同程度の両親媒性改変ペプチドを作成することが必須である。

一方、L5 の両親媒性を上昇させた L5-3K4L/9K8L は、L5 と比べて CpG DNA の細胞内への取り込みをほとんど増加させなかった。L5 と L5-3K4L/9K8L の両親媒性が、CpG DNA 細胞内取り込み増加作用と比例しなかったことから、L5-3K4L/9K8L の両親媒性は CpG DNA の細胞内取り込み増加作用に寄与しないと考えられた。一方、L5-3K4L/9K8L は L5 と比べて CpG DNA の細胞内への取り込みをほとんど増加させなかったが、CpG DNA 認識応答を顕著に増強したことから、L5-3K4L/9K8L の両親媒性が CpG DNA 認識応答の増強に関与する可能性が考えられた。L5-3K4L/9K8L の細胞応答増強メカニズムが Kn2-7 と異なる可能性も否定できないが、この結果は、ペプチドによる CpG DNA 認識応答の増強には、CpG DNA 細胞内取り込み増加作用だけでなく、その他の性質や作

用が関与するという第 3 章 1 節の結果とも一致した。そして、L5-3K4L/9K8L は CpG DNA の細胞内への取り込みをほとんど増加させなかったことから、その CpG DNA 認識応答増強メカニズムを調べることは、増強に関わる CpG DNA の取り込み増加以外のペプチドの性質や作用を知る上で重要だと考えられる。ペプチドの両親媒性と CpG DNA 細胞内取り込み増加作用との関係は明らかにできなかったが、第 3 章 3 節の結果から、 α -ヘリックスペプチドの両親媒性が、RAW264.7 の CpG DNA 認識応答の増強にとって重要な性質であり、その機序は不明だが細胞の CpG DNA 刺激応答に何らかの作用をもたらす可能性が考えられた。

第4節 Kn2-7によるCpG DNA認識応答増強メカニズム

第3章4節では、Kn2-7がCpG DNA刺激によるRAW264.7のp38リン酸化を増強することを明らかにした。一方、CpG DNA刺激によるJNKやERKのリン酸化、NF- κ Bの活性化に対してKn2-7は大きな影響を与えなかった。このことから、Kn2-7はCpG DNA刺激により活性化されるシグナル伝達を全体的に増強するのではなく、p38リン酸化を含む特定のシグナルを選択的に増強すると考えられた。

第3章1節において、Kn2-7による細胞のCpG DNA認識応答の増強には、CpG DNA細胞内取り込み増加作用が関与することを示した。しかし、Kn2-7を同時に処理したときのCpG DNAの取り込み増加はCpG DNA単独処理時と比較して数倍程度だったのに対し、IL-10分泌量の増加は数十倍にも及んだので、CpG DNA取り込み増加によるDNA認識量の増加だけがIL-10分泌量の増加の原因であるとは考えにくい。このことと第3章4節の結果を合わせると、Kn2-7はCpG DNAの細胞内への取り込みを増加させることでTLR9に認識されるCpG DNAを増加させるのではなく、TLR9下流シグナルとは異なるシグナル伝達経路の活性化など、他の作用が関与して細胞のCpG DNA認識応答を増強した可能性がある。これらのことは、ペプチドによるCpG DNA認識応答の増強が、CpG DNA細胞内取り込み増加作用だけでは不十分であるという第3章1節の結果とも一致する。Kn2-7によるCpG DNA活性化シグナルの選択的な増強が、CpG DNA認識応答の増強に関与するかについてはさらなる解析が必要だが、Kn2-7がCpG DNA刺激によるRAW264.7のp38リン酸化を選択的に増強した理由を探ることは、Kn2-7によるCpG DNA認識応答増強メカニズムを明らかにする上で重要な手がかりとなる可能性が示された。

第5節 本研究の臨床応用への展望

本研究では、マクロファージの CpG DNA 認識応答を抗菌ペプチド Kn2-7 が顕著に増強することを見出し、その増強メカニズムの一端を明らかにした。緒言でも述べたように、CpG DNA は強い自然免疫活性化能を有するだけでなく、Th1 優位の細胞性免疫応答や細胞傷害性 T 細胞の活性化を誘導することから、医薬品として利用することを目指して多くの研究が行われている。しかしながら、臨床試験におけるヒトでの効果は動物実験で得られた結果から予測された効果よりも低く、医薬品として実際に承認された例は少ない。本研究で見出した、Kn2-7 をはじめとした CpG DNA による免疫応答を増強する物質を併用することが、その効果を高める上で有効なアプローチになると考えられる。

マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞の働きによってヘルパーT 細胞が分化すると、細胞性 (Th1 型) 免疫応答もしくは液性 (Th2 型) 免疫応答が誘導される。Th1 型免疫では細胞傷害性 T 細胞やナチュラルキラー細胞が活性化されるため抗腫瘍活性や抗ウイルス活性につながるが、Th2 型免疫ではマスト細胞や好酸球、抗体産生を担う B 細胞が活性化されるため、アレルギー反応につながる可能性がある。そのため、医薬品としての利用を考えた場合、Th1 型免疫応答を優位に誘導する物質の方が開発に有利であると考えられる。本研究は細胞株を用いて *in vitro* で実験を行ったが、CpG DNA と Kn2-7 の組み合わせが医薬品として有用であるかを評価する上で、Th1 型と Th2 型のどちらの免疫応答が誘導されるかを明確にすることは重要である。

CpG DNA の受容体である TLR9 は、主に単球/マクロファージ、B 細胞や樹状細胞に発現している。ヒトと他の動物種では TLR9 を発現する細胞が異なり、ヒトでは特に形質細胞様樹状細胞において優位に発現することが知られている [73-75]。これらの TLR9 発現細胞の種差は、動物実験と臨床試験における CpG DNA の効果の違いを考える上で

重要である。本研究で得られた知見がマクロファージ以外の細胞を用いた *in vitro* の実験、あるいは *in vivo* での実験やヒトに対しても適応できるかについてはさらなる検証が必要であるが、今後、より詳細な増強メカニズムを明らかにすることで、医薬品開発における CpG DNA の有用性がさらに高まると確信する。

第5章 総括

本研究において、抗菌ペプチド Kn2-7 が殺菌作用だけでなく、RAW264.7 の CpG DNA 認識応答を顕著に増強する作用も有すること、そしてその増強には Kn2-7 の CpG DNA 細胞内取り込み増加作用が関与することを見出した。ペプチドの性質解析により、Kn2-7 による CpG DNA の細胞内への取り込み増加には、CpG DNA との結合親和性が重要であり、その結合には Kn2-7 の塩基性アミノ酸が関与することがわかった (図 23①)。また、Kn2-7 と結合した後の CpG DNA 取り込み増加には、Kn2-7 の疎水性アミノ酸が重要であることが示された (図 23②)。一方、Kn2-7 による CpG DNA 認識応答の増強には、CpG DNA の取り込み増加以外の Kn2-7 の性質や作用が関与することも明らかとなり、そのような性質の 1 つとしてペプチドの両親媒性の関与が示唆された (図 23③)。さらに、Kn2-7 が CpG DNA 刺激により活性化されるシグナル伝達を全体的に増強するのではなく、p38 リン酸化を含む特定のシグナルを選択的に増強したことも、Kn2-7 による CpG DNA 認識応答増強メカニズムを明らかにする上で重要な手がかりになると考えられた (図 23③)。しかしながら、これらの性質や作用が Kn2-7 による CpG DNA 認識応答の増強に関わるのか、そのメカニズムについては多くの検討課題が残っている。特に、正電荷、疎水性、両親媒性などのペプチドの性質はそれぞれ独立しているとは限らず、 α -ヘリックス性などペプチドの他の性質にも影響を与える可能性があるため、CpG DNA 認識応答の増強に関わるペプチドの性質を特定することは難しい。今後、Kn2-7 をはじめとした抗菌ペプチドによる CpG DNA 認識応答増強メカニズムをより詳細に明らかにすることで、感染症治療だけでなく、がんやアレルギーなどの新規治療薬の開発や、より安全性が高く、強い効果を有するワクチンアジュバントの創生につながることを期待される。

論文目録

本研究成果の一部は、以下の学術雑誌に公表した。

- [1] Saeka Nishihara, and Kiyoshi Kawasaki: Enhanced cellular uptake of CpG DNA by α -helical antimicrobial peptide Kn2-7: Effects on macrophage responsiveness to CpG DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, **530**(1): 100–106.

[第3章第1節]

- [2] Saeka Nishihara, Mayu Wakita, and Kiyoshi Kawasaki: Relationship between affinity of Kn2-7 to CpG DNA and the ability of Kn2-7 to enhance cellular uptake of CpG DNA by RAW264.7 Cells. *BPB Reports*, 2021, **4**(2): 55–58.

[第3章第2節]

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なる御指導・御鞭撻を賜りました同志社女子大学大学院 薬学研究科 微生物薬品化学研究室 川崎清史教授に深甚なる感謝の意を表します。川崎教授には、学部在籍中より親切な御指導と暖かい御支援をいただきました。学術論文や学位論文を執筆する際には、ご多忙にも関わらず、御配慮を賜りましたことを心より感謝いたします。また、今後も研究を継続できる環境を整えてくださったこと、心より深く感謝申し上げます。この機会を活かせるよう、これからも一層努力をする所存です。

学位論文審査において、終始有益なる御助言と御校閲を賜りました同大学院 医薬品分析学研究室 前川京子教授、ならびに薬理学研究室 藤井健志教授に深く感謝の意を表します。

学部在籍時に直接ご指導していただき、本学を退職された後においても数々の御助言・御激励を賜りました旭川医科大学病院臨床研究支援センター 眞鍋貴行助教に心より感謝申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり多くの御協力を賜りました同志社女子大学 薬学部 微生物薬品化学研究室 上野貴之特任助教 (現 倉敷紡績株式会社) に深く感謝いたします。

本論文における CpG DNA とペプチドの結合親和性を評価する実験系の構築に協力してくださった、同志社女子大学薬学部 第 11 期卒業生 脇田真由氏に感謝いたします。

本研究は日本薬学会長井記念薬学研究奨励金 (N-184602) のご支援を賜りました。この場をお借りして、心より感謝いたします。

最後になりますが、この場には書ききれない多くの皆様方の御支援・御協力に深い感謝の意を表します。

参考文献

1. Palm NW, Medzhitov R: Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunological reviews*, 2009, **227**(1): 221-233.
2. Iwasaki A, Medzhitov R: Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature immunology*, 2015, **16**(4): 343-353.
3. Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada S, Kuramoto E, Yano O, Kataoka T, Tokunaga T: DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiology and immunology*, 1992, **36**(9): 983-997.
4. Kuramoto E, Yano O, Kimura Y, Baba M, Makino T, Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, Tokunaga T: Oligonucleotide sequences required for natural killer cell activation. *Japanese journal of cancer research : Gann*, 1992, **83**(11): 1128-1131.
5. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM: CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 1995, **374**(6522): 546-549.
6. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S: A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 2000, **408**(6813): 740-745.
7. Klinman DM: Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nature reviews Immunology*, 2004, **4**(4): 249-258.
8. Krieg AM: Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nature reviews Drug discovery*, 2006, **5**(6): 471-484.
9. Kumagai Y, Takeuchi O, Akira S: TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Advanced drug delivery reviews*, 2008, **60**(7): 795-804.
10. Scheiermann J, Klinman DM: Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer. *Vaccine*, 2014, **32**(48): 6377-6389.
11. Hancock RE, Scott MG: The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, **97**(16): 8856-

8861.

12. Zasloff M: Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 2002, **415**(6870): 389-395.
13. Scott MG, Hancock RE: Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Critical reviews in immunology*, 2000, **20**(5): 407-431.
14. Nishikawa T, Nakagami H, Maeda A, Morishita R, Miyazaki N, Ogawa T, Tabata Y, Kikuchi Y, Hayashi H, Tatsu Y, Yumoto N, Tamai K, Tomono K, Kaneda Y: Development of a novel antimicrobial peptide, AG-30, with angiogenic properties. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2009, **13**(3): 535-546.
15. Wu TM, Chou TC, Ding YA, Li ML: Stimulation of TNF-alpha, IL-1beta and nitrite release from mouse cultured spleen cells and lavaged peritoneal cells by mastoparan M. *Immunology and cell biology*, 1999, **77**(6): 476-482.
16. Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock RE: The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 2002, **169**(7): 3883-3891.
17. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, Cao W, Su B, Nestle FO, Zal T, Mellman I, Schroder JM, Liu YJ, Gilliet M: Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*, 2007, **449**(7162): 564-569.
18. Tewary P, de la Rosa G, Sharma N, Rodriguez LG, Tarasov SG, Howard OM, Shirota H, Steinhagen F, Klinman DM, Yang D, Oppenheim JJ: β -Defensin 2 and 3 promote the uptake of self or CpG DNA, enhance IFN- α production by human plasmacytoid dendritic cells, and promote inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 2013, **191**(2): 865-874.
19. Nakagawa Y, Gallo RL: Endogenous intracellular cathelicidin enhances TLR9 activation in dendritic cells and macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 2015, **194**(3): 1274-1284.
20. Jantaruk P, Roytrakul S, Sitthisak S, Kunthalert D: Potential role of an antimicrobial peptide, KLK in inhibiting lipopolysaccharide-induced macrophage inflammation. *PloS one*, 2017, **12**(8): e0183852.
21. Schellack C, Prinz K, Egyed A, Fritz JH, Wittmann B, Ginzler M, Swatosch G, Zauner W,

- Kast C, Akira S, von Gabain A, Buschle M, Lingnau K: IC31, a novel adjuvant signaling via TLR9, induces potent cellular and humoral immune responses. *Vaccine*, 2006, **24**(26): 5461-5472.
22. Agger EM, Rosenkrands I, Olsen AW, Hatch G, Williams A, Kritsch C, Lingnau K, von Gabain A, Andersen CS, Korsholm KS, Andersen P: Protective immunity to tuberculosis with Ag85B-ESAT-6 in a synthetic cationic adjuvant system IC31. *Vaccine*, 2006, **24**(26): 5452-5460.
23. Kamath AT, Valenti MP, Rochat AF, Agger EM, Lingnau K, von Gabain A, Andersen P, Lambert PH, Siegrist CA: Protective anti-mycobacterial T cell responses through exquisite in vivo activation of vaccine-targeted dendritic cells. *European journal of immunology*, 2008, **38**(5): 1247-1256.
24. Geldenhuys H, Mearns H, Miles DJ, Tameris M, Hokey D, Shi Z, Bennett S, Andersen P, Kromann I, Hoff ST, Hanekom WA, Mahomed H, Hatherill M, Scriba TJ, van Rooyen M, Bruce McClain J, Ryall R, de Bruyn G: The tuberculosis vaccine H4:IC31 is safe and induces a persistent polyfunctional CD4 T cell response in South African adults: A randomized controlled trial. *Vaccine*, 2015, **33**(30): 3592-3599.
25. Nemes E, Geldenhuys H, Rozot V, Rutkowski KT, Ratangee F, Bilek N, Mabwe S, Makhetha L, Erasmus M, Toefy A, Mulenga H, Hanekom WA, Self SG, Bekker LG, Ryall R, Gurunathan S, DiazGranados CA, Andersen P, Kromann I, Evans T, Ellis RD, Landry B, Hokey DA, Hopkins R, Ginsberg AM, Scriba TJ, Hatherill M: Prevention of M. tuberculosis Infection with H4:IC31 Vaccine or BCG Revaccination. *The New England journal of medicine*, 2018, **379**(2): 138-149.
26. Kindrachuk J, Jenssen H, Elliott M, Townsend R, Nijnik A, Lee SF, Gerdt V, Babiuk LA, Halperin SA, Hancock RE: A novel vaccine adjuvant comprised of a synthetic innate defence regulator peptide and CpG oligonucleotide links innate and adaptive immunity. *Vaccine*, 2009, **27**(34): 4662-4671.
27. Ueno T, Yamamoto Y, Kawasaki K: Phagocytosis of microparticles increases responsiveness of macrophage-like cell lines U937 and THP-1 to bacterial lipopolysaccharide and lipopeptide. *Scientific reports*, 2021, **11**(1): 6782.
28. Negi S, Yoshioka M, Mima H, Mastumoto M, Suzuki M, Yokoyama M, Kano K, Sugiura Y: Efficient cleavage of DNA oligonucleotides by a non-FokI-type zinc finger nuclease containing one His4-type finger domain derived from the first finger domain of Sp1.

Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2015, **25**(19): 4074-4077.

29. Yi HY, Chowdhury M, Huang YD, Yu XQ: Insect antimicrobial peptides and their applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 2014, **98**(13): 5807-5822.
30. Lee EY, Lee MW, Wong GCL: Modulation of toll-like receptor signaling by antimicrobial peptides. *Seminars in cell & developmental biology*, 2019, **88**: 173-184.
31. Hurtado P, Peh CA: LL-37 promotes rapid sensing of CpG oligodeoxynucleotides by B lymphocytes and plasmacytoid dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 2010, **184**(3): 1425-1435.
32. Zeng XC, Wang SX, Zhu Y, Zhu SY, Li WX: Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch. *Peptides*, 2004, **25**(2): 143-150.
33. Cao L, Dai C, Li Z, Fan Z, Song Y, Wu Y, Cao Z, Li W: Antibacterial activity and mechanism of a scorpion venom peptide derivative in vitro and in vivo. *PloS one*, 2012, **7**(7): e40135.
34. Alvarez-Bravo J, Kurata S, Natori S: Novel synthetic antimicrobial peptides effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Biochemical journal*, 1994, **302** (Pt 2): 535-538.
35. Manabe T, Kawasaki K: D-form KLKLLLLLKLK-NH₂ peptide exerts higher antimicrobial properties than its L-form counterpart via an association with bacterial cell wall components. *Scientific reports*, 2017, **7**: 43384.
36. Lin CH, Tzen JT, Shyu CL, Yang MJ, Tu WC: Structural and biological characterization of mastoparans in the venom of *Vespa* species in Taiwan. *Peptides*, 2011, **32**(10): 2027-2036.
37. Simmaco M, Mignogna G, Canofeni S, Miele R, Mangoni ML, Barra D: Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *European journal of biochemistry*, 1996, **242**(3): 788-792.
38. Mangoni ML, Rinaldi AC, Di Giulio A, Mignogna G, Bozzi A, Barra D, Simmaco M: Structure-function relationships of temporins, small antimicrobial peptides from amphibian skin. *European journal of biochemistry*, 2000, **267**(5): 1447-1454.
39. Klein DC, Latz E, Espevik T, Stokke BT: Higher order structure of short

immunostimulatory oligonucleotides studied by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 2010, **110**(6): 689-693.

40. Hanagata N: Structure-dependent immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides and their delivery system. *International journal of nanomedicine*, 2012, **7**: 2181-2195.
41. Verthelyi D, Ishii KJ, Gursel M, Takeshita F, Klinman DM: Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 2001, **166**(4): 2372-2377.
42. Hartmann G, Krieg AM: Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 2000, **164**(2): 944-953.
43. Mutwiri GK, Nichani AK, Babiuk S, Babiuk LA: Strategies for enhancing the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 2004, **97**(1): 1-17.
44. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT: TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nature immunology*, 2004, **5**(2): 190-198.
45. Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, Yagami T, Tanaka S, Ueda K, Sugiura Y: Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *The Journal of biological chemistry*, 2001, **276**(8): 5836-5840.
46. Suzuki T, Futaki S, Niwa M, Tanaka S, Ueda K, Sugiura Y: Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides. *The Journal of biological chemistry*, 2002, **277**(4): 2437-2443.
47. Gonçalves E, Kitas E, Seelig J: Binding of oligoarginine to membrane lipids and heparan sulfate: structural and thermodynamic characterization of a cell-penetrating peptide. *Biochemistry*, 2005, **44**(7): 2692-2702.
48. Sakai N, Matile S: Anion-mediated transfer of polyarginine across liquid and bilayer membranes. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, **125**(47): 14348-14356.
49. Rothbard JB, Jessop TC, Lewis RS, Murray BA, Wender PA: Role of membrane potential

and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, **126**(31): 9506-9507.

50. Amand HL, Fant K, Norden B, Esbjorner EK: Stimulated endocytosis in penetratin uptake: effect of arginine and lysine. *Biochemical and biophysical research communications*, 2008, **371**(4): 621-625.
51. Wade D, Boman A, Wählén B, Drain CM, Andreu D, Boman HG, Merrifield RB: All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, **87**(12): 4761-4765.
52. Aichinger MC, Ginzler M, Weghuber J, Zimmermann L, Riedl K, Schutz G, Nagy E, von Gabain A, Schweyen R, Henics T: Adjuvating the adjuvant: facilitated delivery of an immunomodulatory oligonucleotide to TLR9 by a cationic antimicrobial peptide in dendritic cells. *Vaccine*, 2011, **29**(3): 426-436.
53. Aichinger MC, Ortbauer M, Reipert S, Zauner W, Bogner P, Froschauer E, Nowikovsky K, Lingnau K, von Gabain A, Schweyen R, Henics T: Unique membrane-interacting properties of the immunostimulatory cationic peptide KLKL(5)KLLK (KLK). *Cell biology international*, 2008, **32**(11): 1449-1458.
54. Matsuzaki K: Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta*, 2009, **1788**(8): 1687-1692.
55. Zhang SK, Song JW, Gong F, Li SB, Chang HY, Xie HM, Gao HW, Tan YX, Ji SP: Design of an α -helical antimicrobial peptide with improved cell-selective and potent anti-biofilm activity. *Scientific reports*, 2016, **6**: 27394.
56. Masuda T, Hirose H, Baba K, Walrant A, Sagan S, Inagaki N, Fujimoto T, Futaki S: An Artificial Amphiphilic Peptide Promotes Endocytic Uptake by Inducing Membrane Curvature. *Bioconjugate chemistry*, 2020, **31**(6): 1611-1615.
57. Naidoo VB, Rautenbach M: Self-assembling organo-peptide bolophiles with KLK tripeptide head groups display selective antibacterial activity. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*, 2013, **19**(12): 784-791.
58. Gautier R, Douguet D, Antonny B, Drin G: HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2008, **24**(18):

2101-2102.

59. Eisenberg D, Weiss RM, Terwilliger TC: The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature*, 1982, **299**(5881): 371-374.
60. Kawai T, Akira S: TLR signaling. *Cell death and differentiation*, 2006, **13**(5): 816-825.
61. Kawai T, Akira S: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*, 2010, **11**(5): 373-384.
62. O'Neill LA, Kaltschmidt C: NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends in neurosciences*, 1997, **20**(6): 252-258.
63. Kim EK, Choi EJ: Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et biophysica acta*, 2010, **1802**(4): 396-405.
64. Snyder EL, Dowdy SF: Cell penetrating peptides in drug delivery. *Pharmaceutical research*, 2004, **21**(3): 389-393.
65. Böhmová E, Machová D, Pechar M, Pola R, Venclíková K, Janoušková O, Etrych T: Cell-penetrating peptides: a useful tool for the delivery of various cargoes into cells. *Physiological research*, 2018, **67**(Suppl 2): S267-S279.
66. Richard JP, Melikov K, Vives E, Ramos C, Verbeure B, Gait MJ, Chernomordik LV, Lebleu B: Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *The Journal of biological chemistry*, 2003, **278**(1): 585-590.
67. Fuchs SM, Raines RT: Pathway for polyarginine entry into mammalian cells. *Biochemistry*, 2004, **43**(9): 2438-2444.
68. Madani F, Lindberg S, Langel U, Futaki S, Gräslund A: Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *Journal of biophysics (Hindawi Publishing Corporation : Online)*, 2011, **2011**: 414729.
69. Erazo-Oliveras A, Najjar K, Truong D, Wang TY, Brock DJ, Prater AR, Pellois JP: The Late Endosome and Its Lipid BMP Act as Gateways for Efficient Cytosolic Access of the Delivery Agent dFTAT and Its Macromolecular Cargos. *Cell chemical biology*, 2016, **23**(5): 598-607.
70. Najjar K, Erazo-Oliveras A, Brock DJ, Wang TY, Pellois JP: An l- to d-Amino Acid

Conversion in an Endosomolytic Analog of the Cell-penetrating Peptide TAT Influences Proteolytic Stability, Endocytic Uptake, and Endosomal Escape. *The Journal of biological chemistry*, 2017, **292**(3): 847-861.

71. Nishikawa M, Matono M, Rattanakit S, Matsuoka N, Takakura Y: Enhanced immunostimulatory activity of oligodeoxynucleotides by Y-shape formation. *Immunology*, 2008, **124**(2): 247-255.
72. Rattanakit S, Nishikawa M, Funabashi H, Luo D, Takakura Y: The assembly of a short linear natural cytosine-phosphate-guanine DNA into dendritic structures and its effect on immunostimulatory activity. *Biomaterials*, 2009, **30**(29): 5701-5706.
73. Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A: Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *European journal of immunology*, 2001, **31**(11): 3388-3393.
74. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G: Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 2002, **168**(9): 4531-4537.
75. Liu YJ: IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annual review of immunology*, 2005, **23**: 275-306.

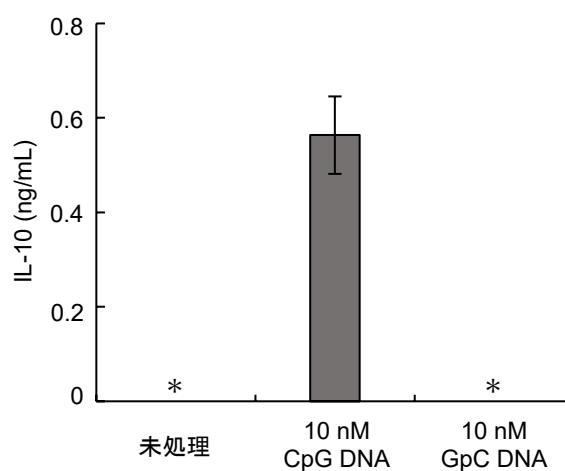


図1 DNA刺激によるRAW264.7のIL-10分泌誘導は、CpGモチーフの認識による応答である。

RAW264.7を未処理、10 nM CpG DNAもしくは10 nM GpC DNAで24時間刺激した時の培養上清中のIL-10濃度をELISAにより定量した。棒グラフは各条件3サンプルずつ測定したIL-10濃度 (ng/mL) の平均値、エラーバーは標準偏差を表す。アスタリスク (*) は、IL-10が検出限界 (0.03 ng/mL) 以下であることを示す。

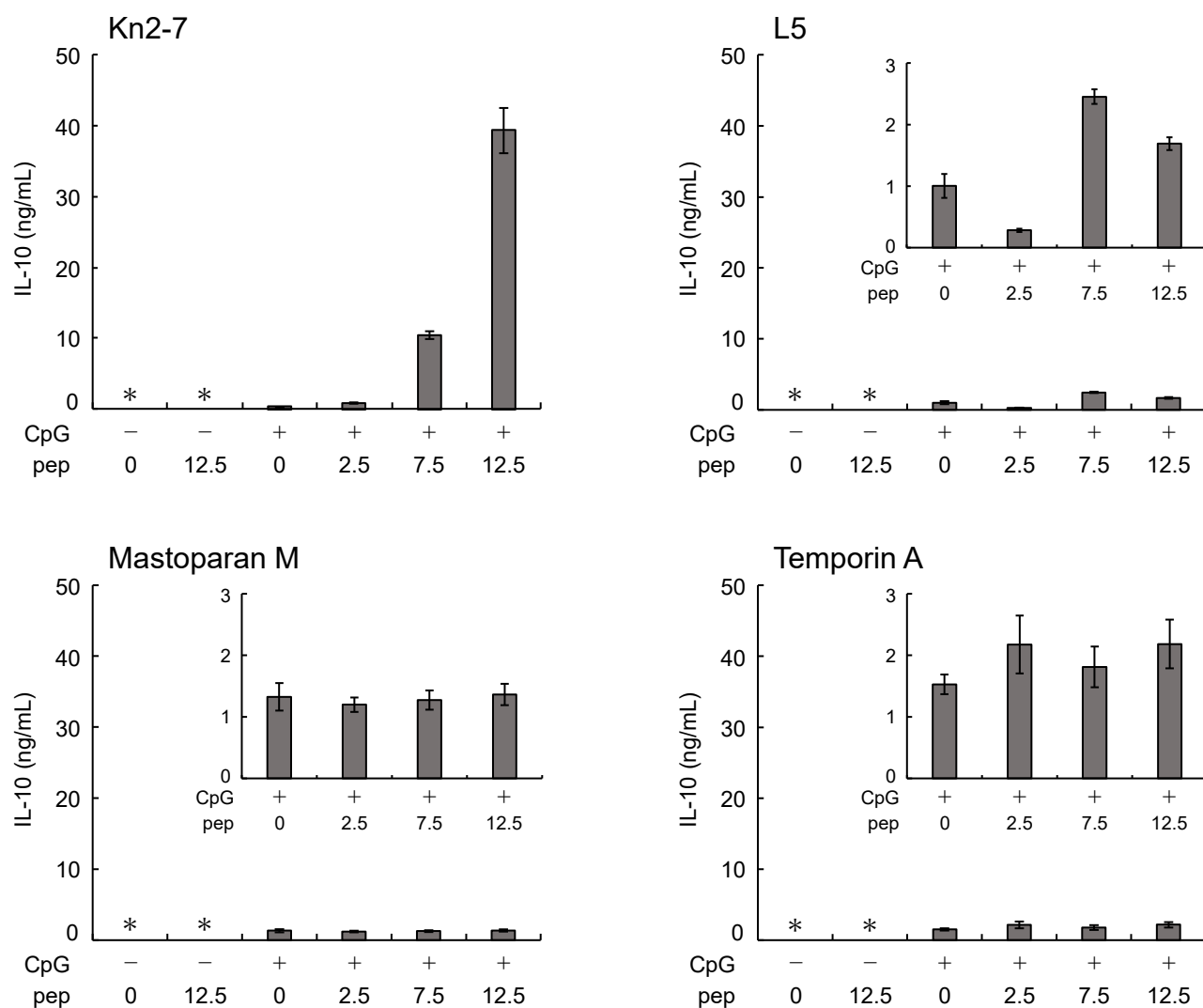


図2 Kn2-7はCpG DNA刺激によるRAW264.7のIL-10分泌を増強する。

RAW264.7をKn2-7、L5、Mastoparan MならびにTemporin A存在下で、10 nM CpG DNA (CpG) で24時間刺激 (+) もしくは未刺激 (-) した時の培養上清中のIL-10濃度をELISAにより定量した。それぞれのペプチド (pep) の濃度 ($\mu\text{g/mL}$) を図中に示す。棒グラフは各条件3サンプルずつ測定したIL-10濃度 (ng/mL) の平均値、エラーバーは標準偏差を表す。アスタリスク (*) は、IL-10が検出限界 (0.03 ng/mL) 以下であることを示す。一部のグラフは、部分的に拡大して別パネルで表示している。

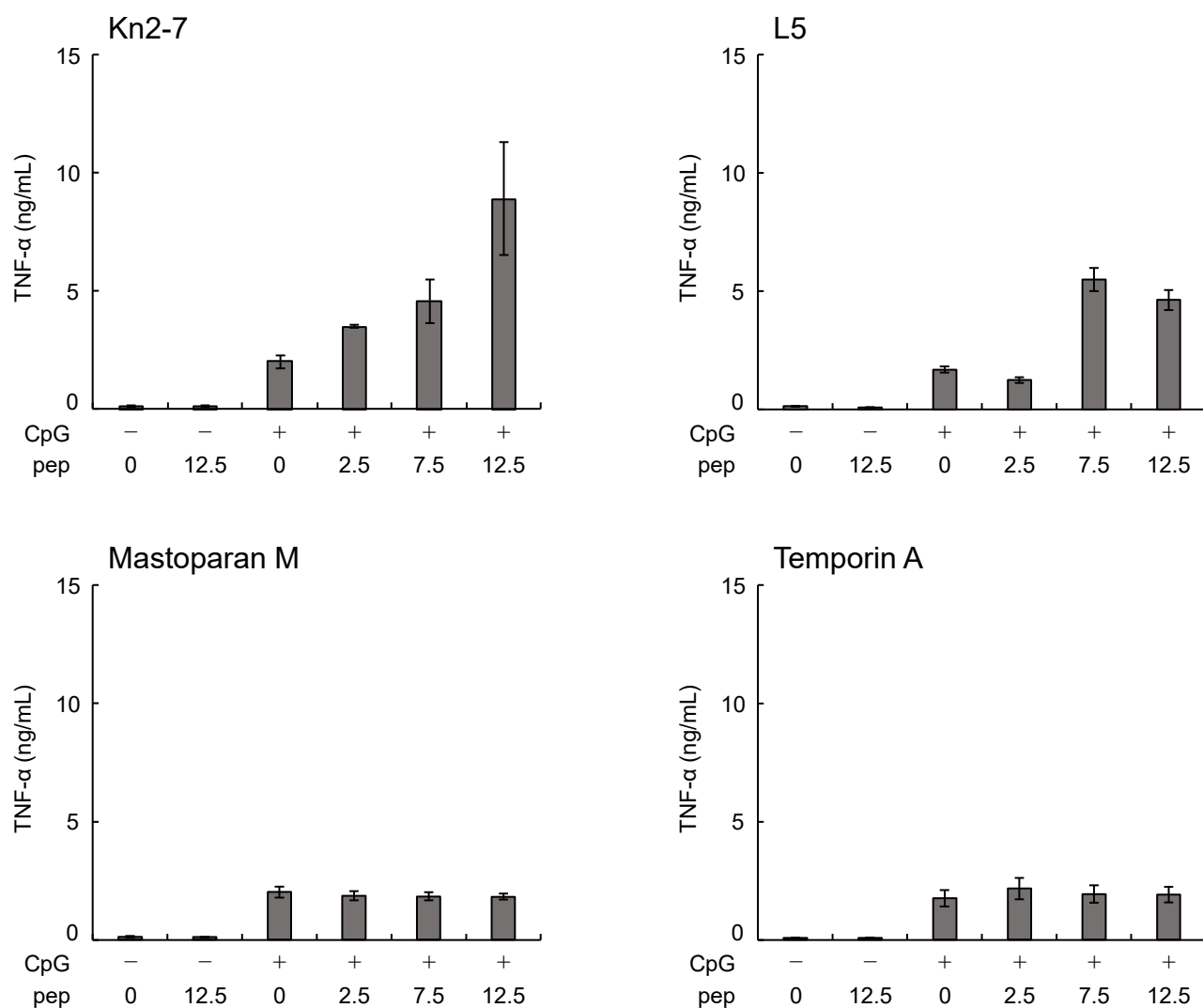


図3 Kn2-7はCpG DNA刺激によるRAW264.7のTNF-α分泌を増強する。
 RAW264.7をKn2-7、L5、Mastoparan MならびにTemporin A存在下で、10 nM CpG DNA (CpG) で24時間刺激 (+) もしくは未刺激 (-) した時の培養上清中のTNF-α濃度をELISAにより定量した。それぞれのペプチド (pep) の濃度 (μg/mL) を図中に示す。棒グラフは各条件3サンプルずつ測定したTNF-α濃度 (ng/mL) の平均値、エラーバーは標準偏差を表す。

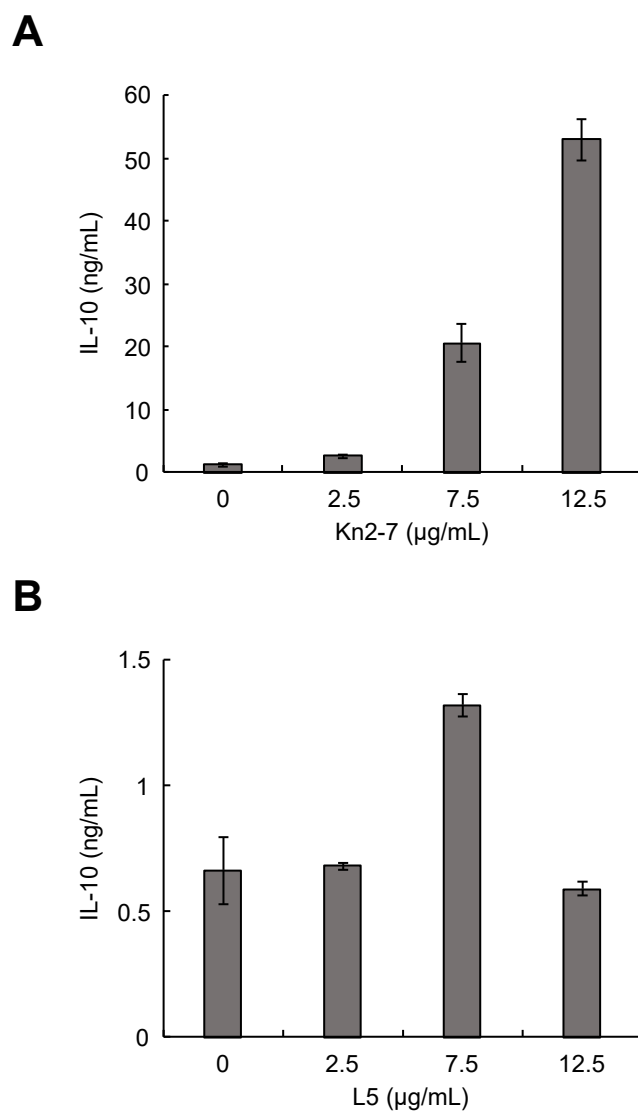
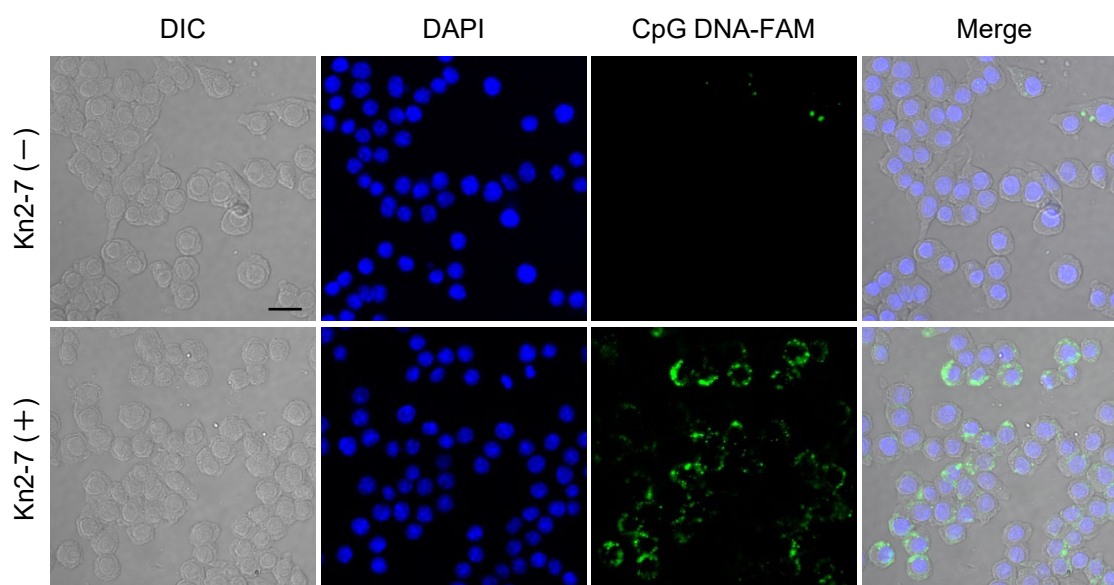


図4 CpG DNA刺激によるRAW264.7のIL-10分泌に対する、酢酸塩として合成したKn2-7およびL5の効果解析

RAW264.7を図中に示した濃度 (µg/mL) の酢酸塩として合成したKn2-7 (A) もしくはL5 (B) 存在下で、10 nM CpG DNAで24時間刺激した時の培養上清中のIL-10濃度をELISAにより定量した。棒グラフは各条件3サンプルずつ測定したIL-10濃度 (ng/mL) の平均値、エラーバーは標準偏差を表す。

A



B

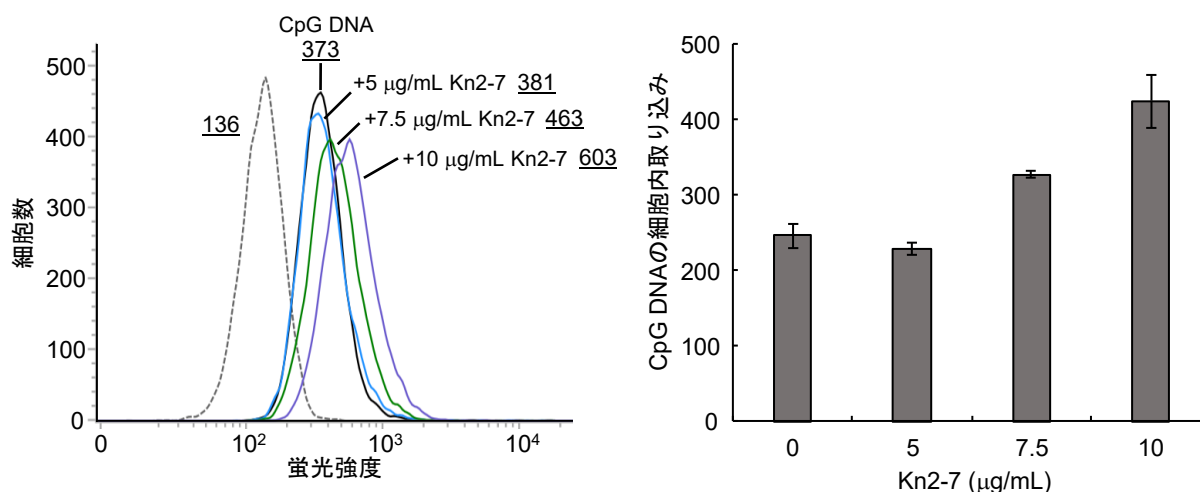


図5 Kn2-7はRAW264.7へのCpG DNAの取り込みを増加させる。

(A) RAW264.7に50 nM CpG DNA-FAMを10 µg/mL Kn2-7存在下 (+) もしくは非存在下 (-) で処理し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。微分干渉観察像 (differential interference contrast, DIC)、DAPIによる核染色像 (DAPI)、フルオレセイン蛍光像 (CpG DNA-FAM) ならびに重ね合わせ像 (Merge) を示す。スケールバーは20 µmを表す。(B) 左図: RAW264.7に50 nM CpG DNA-FAMを単独もしくは5 µg/mL、7.5 µg/mLならびに10 µg/mL Kn2-7存在下で処理した時の蛍光強度をフローサイトメトリーにより解析した。細胞の自家蛍光 (未処理細胞の蛍光強度) はグレーの点線で示す。下線の値はGeo MFIを示す。右図: Geo MFIよりCpG DNAの細胞内取り込みを求めた。CpG DNAの細胞内取り込みの値は、CpG DNA-FAMを処理した細胞のGeo MFIから未処理細胞のGeo MFIを差し引いたものである。棒グラフは各条件3サンプルずつ測定したCpG DNAの細胞内取り込みの平均値、エラーバーは標準偏差を表す。Kn2-7の濃度 (µg/mL) はグラフの横軸に示す。

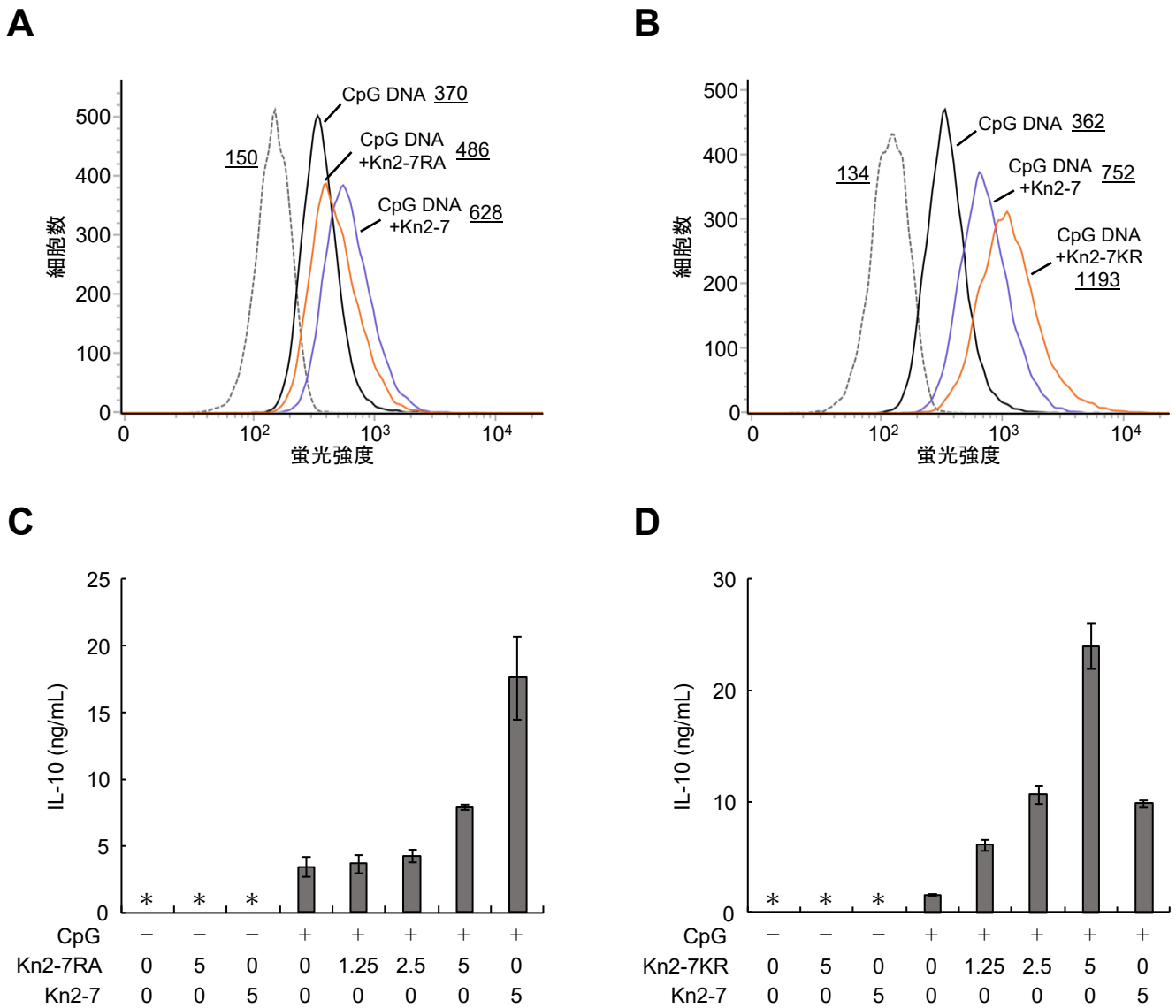


図6 Kn2-7RAおよびKn2-7KRのRAW264.7に対するCpG DNA認識応答増強作用はCpG DNA細胞内取り込み増加作用と比例する。
 (A,B) RAW264.7に50 nM CpG DNA-FAMを単独もしくは10 μ g/mL Kn2-7および10 μ g/mL Kn2-7RA (A) または10 μ g/mL Kn2-7KR (B) 存在下で処理した時の蛍光強度をフローサイトメトリーにより解析した。細胞の自家蛍光 (未処理細胞の蛍光強度) はグレーの点線で示す。下線の値はGeo MFIを示す。(C,D) RAW264.7を図中に示した濃度 (μ g/mL) のKn2-7およびKn2-7RA (C) またはKn2-7KR (D) 存在下で、10 nM CpG DNA (CpG) で24時間刺激 (+) もしくは未刺激 (-) した時の培養上清中のIL-10濃度をELISAにより定量した。棒グラフは各条件3サンプルずつ測定したIL-10濃度 (ng/mL) の平均値、エラーバーは標準偏差を表す。アスタリスク (*) は、IL-10が検出限界 (0.03 ng/mL) 以下であることを示す。

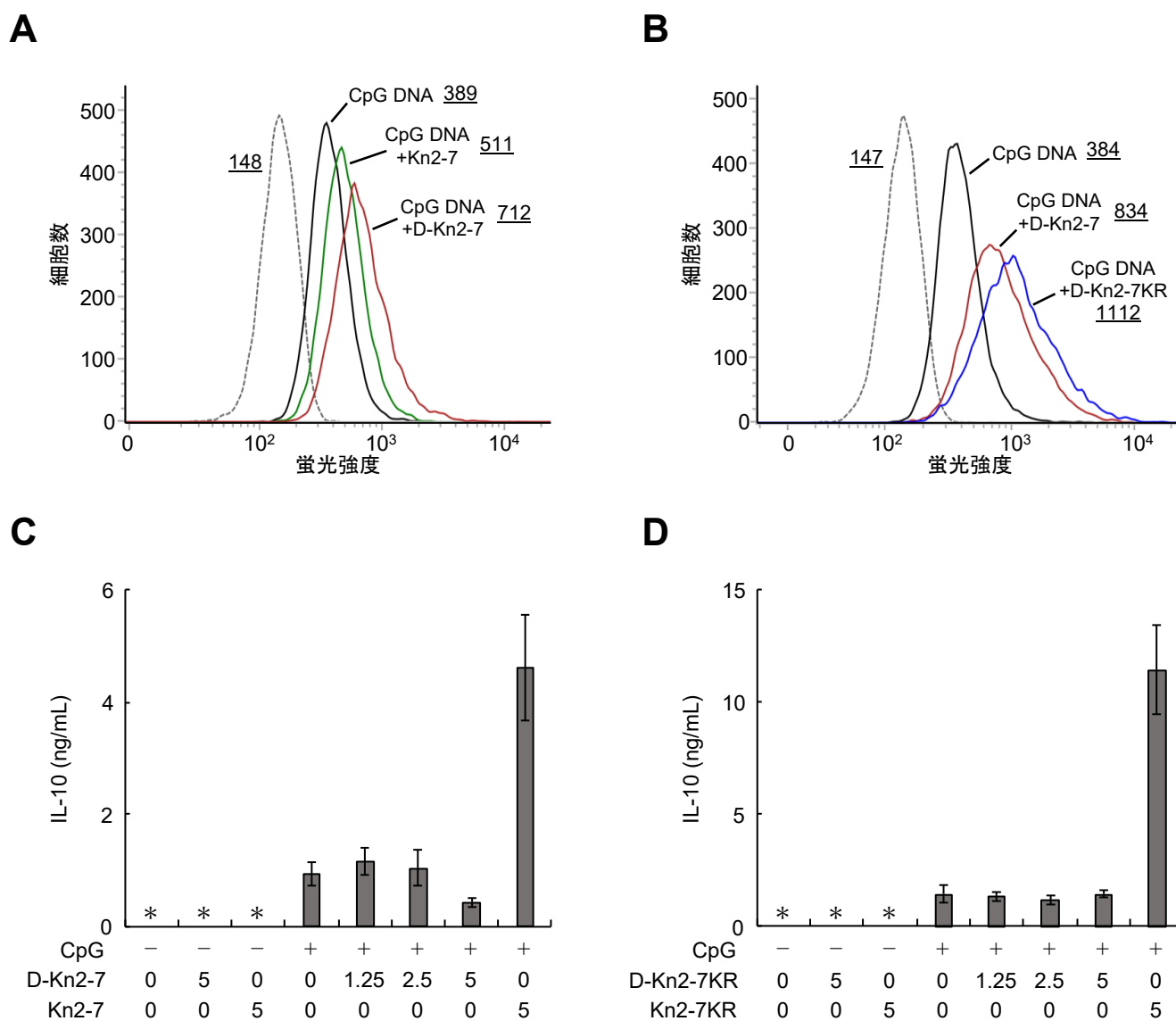


図7 D-Kn2-7およびD-Kn2-7KRはRAW264.7へのCpG DNAの取り込みを増加させるが、CpG DNA認識応答を増強しない。

(A,B) RAW264.7に50 nM CpG DNA-FAMを単独もしくは7.5 μ g/mL Kn2-7 (A)、7.5 μ g/mL D-Kn2-7 (A,B) ならびに7.5 μ g/mL D-Kn2-7KR (B) 存在下で処理した時の蛍光強度をフローサイトメトリーにより解析した。細胞の自家蛍光 (未処理細胞の蛍光強度) はグレーの点線で示す。下線の値はGeo MFIを示す。(C,D) RAW264.7を図中に示した濃度 (μ g/mL) のD-Kn2-7およびKn2-7 (C) またはD-Kn2-7KRおよびKn2-7KR (D) 存在下で、10 nM CpG DNA (CpG) で24時間刺激 (+) もしくは未刺激 (-) した時の培養上清中のIL-10濃度をELISAにより定量した。棒グラフは各条件3サンプルずつ測定したIL-10濃度 (ng/mL) の平均値、エラーバーは標準偏差を表す。アスタリスク (*) は、IL-10が検出限界 (0.03 ng/mL) 以下であることを示す。

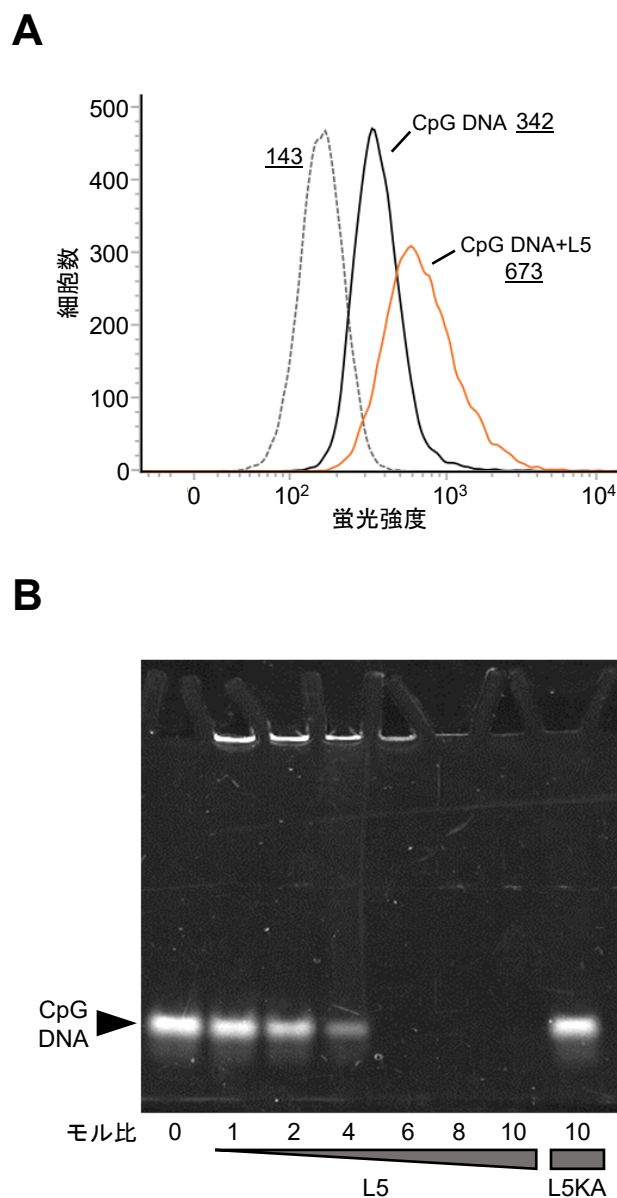


図8 L5はCpG DNAと結合し、RAW264.7へのCpG DNAの取り込みを増加させる。
 (A) RAW264.7に50 nM CpG DNA-FAMを単独もしくは10 μ g/mL L5存在下で処理した時の蛍光強度をフローサイトメトリーにより解析した。細胞の自家蛍光 (未処理細胞の蛍光強度) はグレーの点線で示す。下線の値はGeo MFIを示す。(B) CpG DNAに、図中に示したモル比となるようにL5もしくはL5KAを混合し、電気泳動を行った。ゲル中のDNAはGelRed nucleic acid gel stainを用いて染色し、検出した。矢じりはCpG DNAバンドを示す。

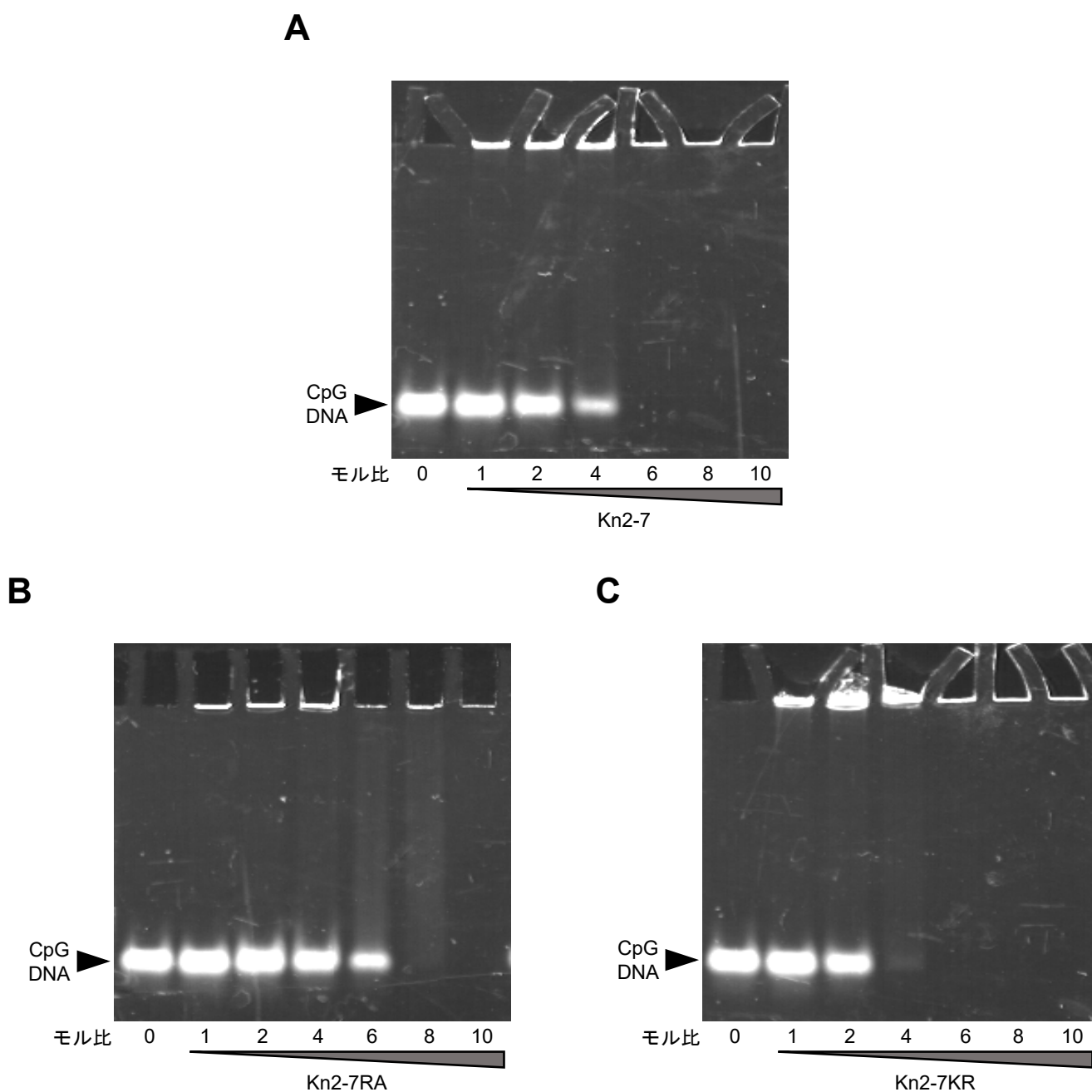


図9 CpG DNAとの結合親和性はKn2-7と比べてKn2-7RAは小さく、Kn2-7KRは大きい。
 CpG DNAに、図中に示したモル比となるようにKn2-7 (A)、Kn2-7RA (B) もしくはKn2-7KR (C)を混合し、電気泳動を行った。ゲル中のDNAはGelRed nucleic acid gel stainを用いて染色し、検出した。矢じりはCpG DNAバンドを示す。

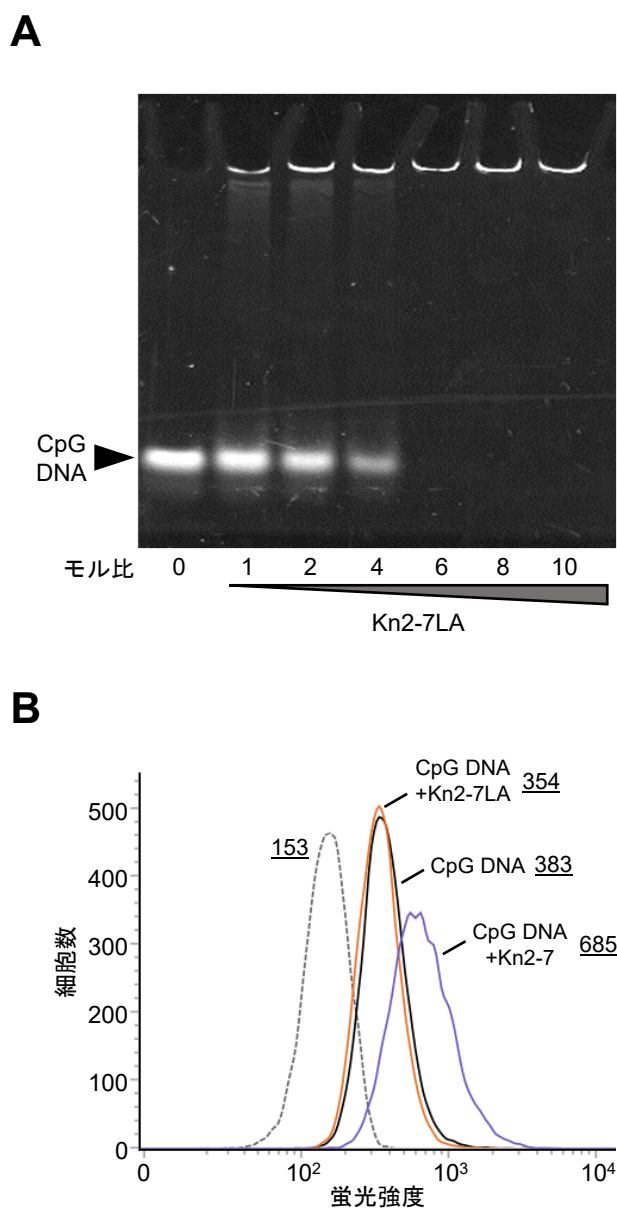


図10 Kn2-7LAはCpG DNAと結合するが、RAW264.7へのCpG DNAの取り込みを増加させない。

(A) CpG DNAに、図中に示したモル比となるようにKn2-7LAを混合し、電気泳動を行った。ゲル中のDNAはGelRed nucleic acid gel stainを用いて染色し、検出した。矢じりはCpG DNAバンドを示す。(B) RAW264.7に50 nM CpG DNA-FAMを単独もしくは12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kn2-7LAおよび12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kn2-7存在下で処理した時の蛍光強度をフローサイトメトリーにより解析した。細胞の自家蛍光(未処理細胞の蛍光強度)はグレーの点線で示す。下線の値はGeo MFIを示す。

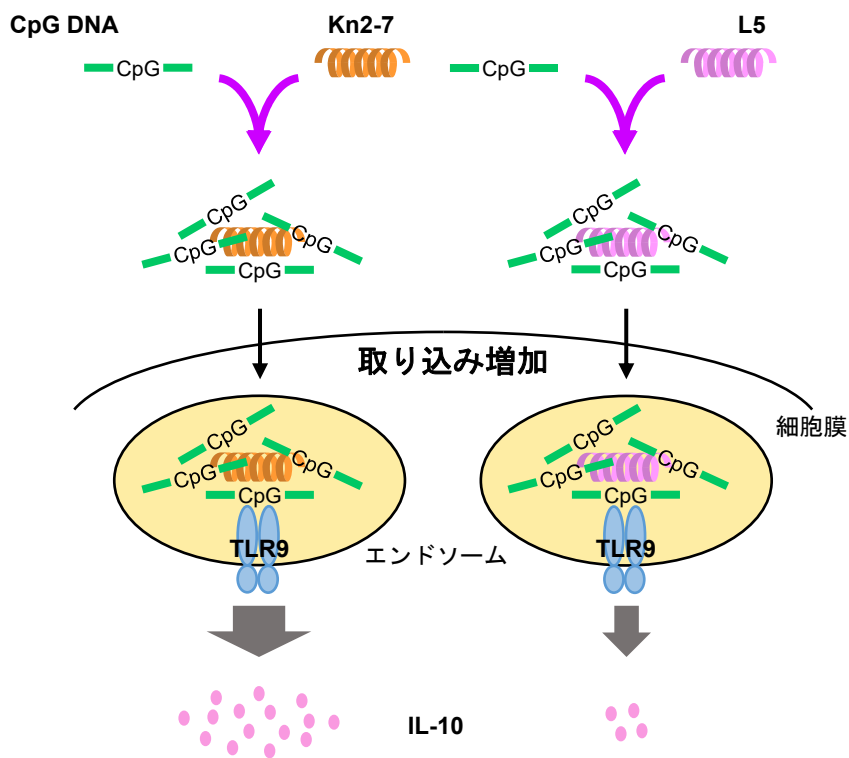


図11 細胞のCpG DNA認識応答に対するKn2-7とL5の効果の違いの模式図

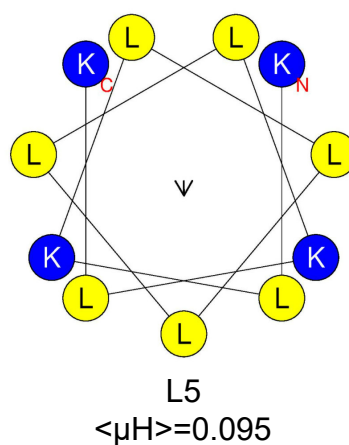
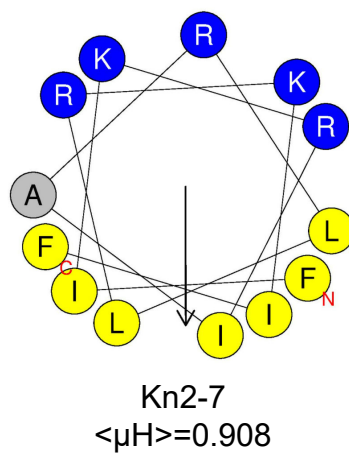


図12 Kn2-7とL5のらせん車輪投影図

HeliQuestを用いてKn2-7 (上) およびL5 (下) のらせん車輪投影図を作成し、同時に平均疎水性モーメント $\langle \mu_H \rangle$ を算出した。青の塗りつぶしは塩基性アミノ酸、黄の塗りつぶしは疎水性アミノ酸、グレーの塗りつぶしは非極性アミノ酸を示す。矢印は平均疎水性モーメント $\langle \mu_H \rangle$ の大きさと方向を示す。

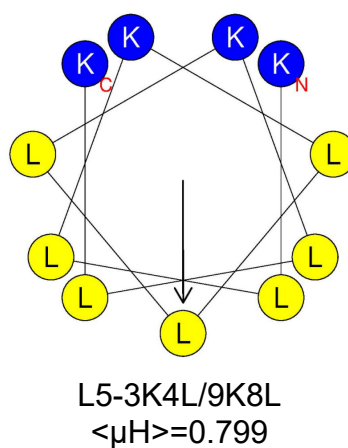
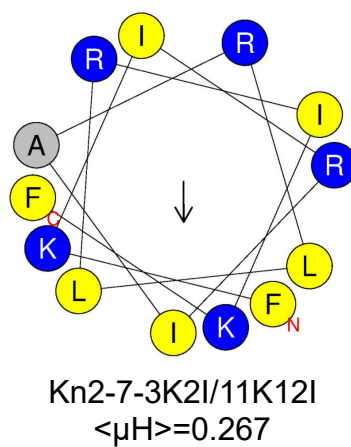


図13 Kn2-7-3K2I/11K12IとL5-3K4L/9K8Lのらせん車輪投影図

HeliQuestを用いてKn2-7-3K2I/11K12I(上)およびL5-3K4L/9K8L(下)のらせん車輪投影図を作成し、同時に平均疎水性モーメント $\langle \mu_H \rangle$ を算出した。青の塗りつぶしは塩基性アミノ酸、黄の塗りつぶしは疎水性アミノ酸、グレーの塗りつぶしは非極性アミノ酸を示す。矢印は平均疎水性モーメント $\langle \mu_H \rangle$ の大きさと方向を示す。

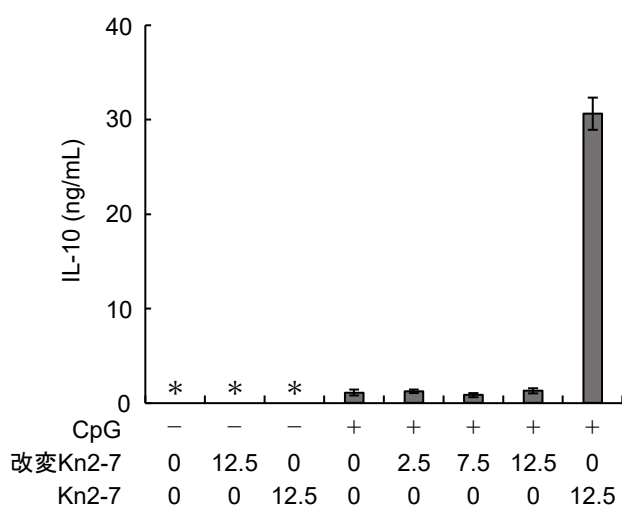


図14 Kn2-7-3K2I/11K12IはCpG DNA刺激によるRAW264.7のIL-10分泌を増強しない。

RAW264.7を図中に示した濃度 (μg/mL) のKn2-7-3K2I/11K12I (改変Kn2-7) およびKn2-7存在下で、10 nM CpG DNA (CpG) で24時間刺激 (+) もしくは未刺激 (-) した時の培養上清中のIL-10濃度をELISAにより定量した。棒グラフは各条件3サンプルずつ測定したIL-10濃度 (ng/mL) の平均値、エラーバーは標準偏差を表す。アスタリスク (*) は、IL-10が検出限界 (0.03 ng/mL) 以下であることを示す。

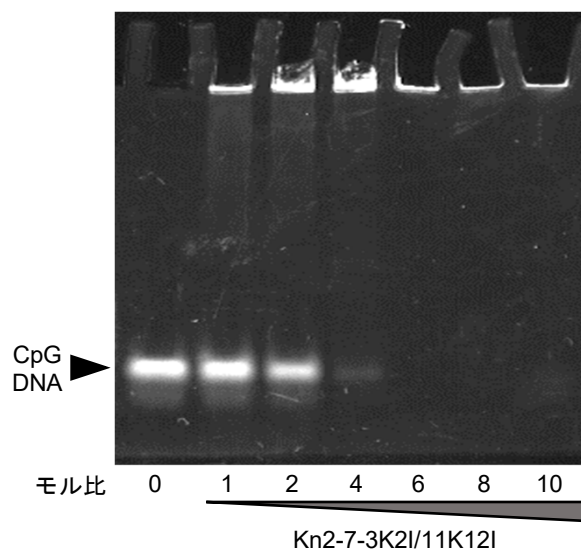


図15 Kn2-7-3K2I/11K12IとCpG DNAの結合親和性解析

CpG DNAに、図中に示したモル比となるようにKn2-7-3K2I/11K12Iを混合し、電気泳動を行った。ゲル中のDNAはGelRed nucleic acid gel stainを用いて染色し、検出した。矢じりはCpG DNAバンドを示す。

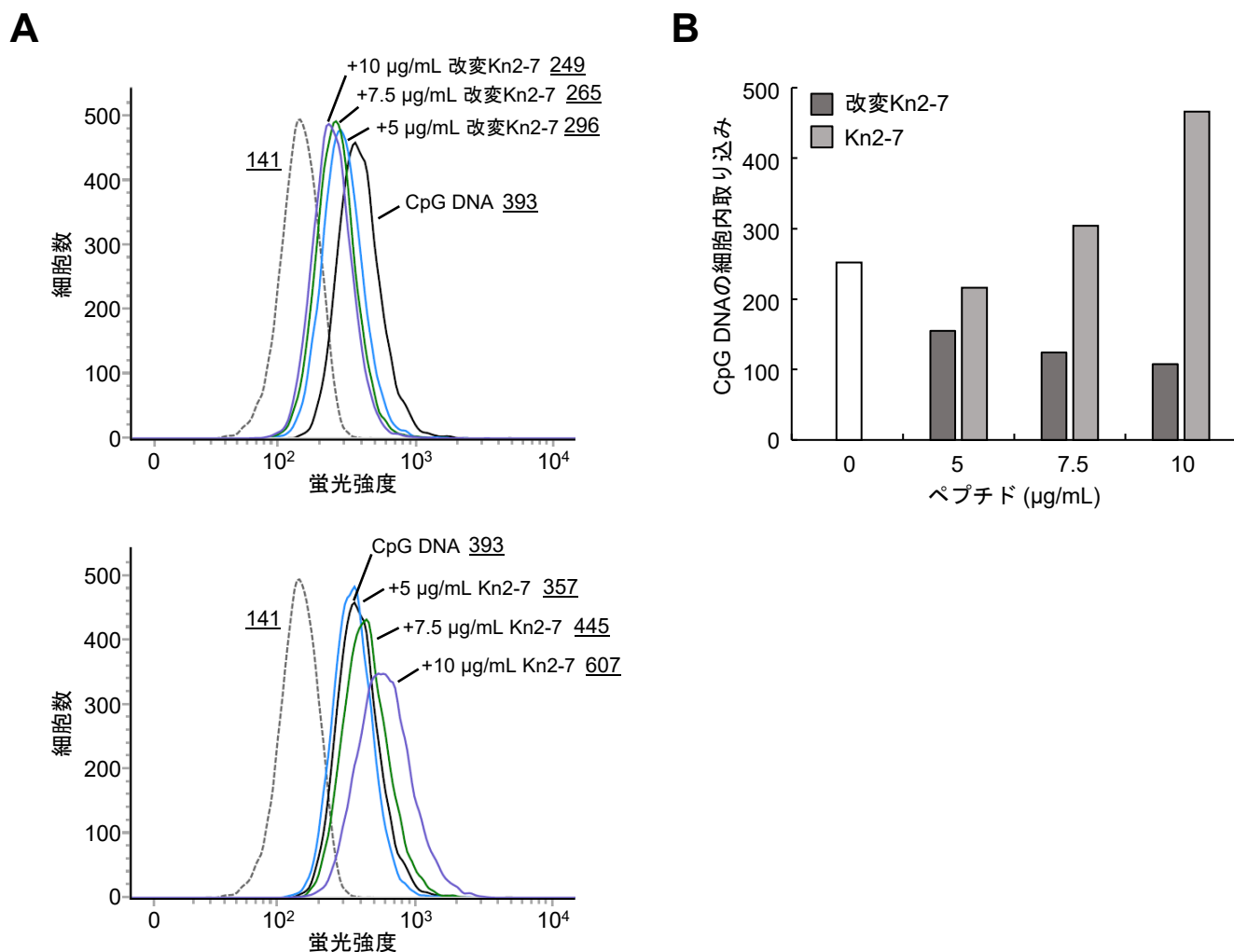


図16 RAW264.7へのCpG DNAの取り込みに対するKn2-7-3K2I/11K12Iの効果解析
 (A) RAW264.7に50 nM CpG DNA-FAMを単独もしくは5 μg/mL、7.5 μg/mLならびに10 μg/mL Kn2-7-3K2I/11K12I (改変Kn2-7) (上) およびKn2-7 (下) 存在下で処理した時の蛍光強度をフローサイトメトリーにより解析した。細胞の自家蛍光 (未処理細胞の蛍光強度) はグレーの点線で示す。下線の値はGeo MFIを示す。(B) (A) のGeo MFIより求めたCpG DNAの細胞内取り込みを棒グラフに表す (白: CpG DNA-FAM単独、濃いグレー: 改変Kn2-7存在下、薄いグレー: Kn2-7存在下)。CpG DNAの細胞内取り込みの値は、CpG DNA-FAMを処理した細胞のGeo MFIから未処理細胞のGeo MFIを差し引いたものである。それぞれのペプチドの濃度 (μg/mL) はグラフの横軸に示す。

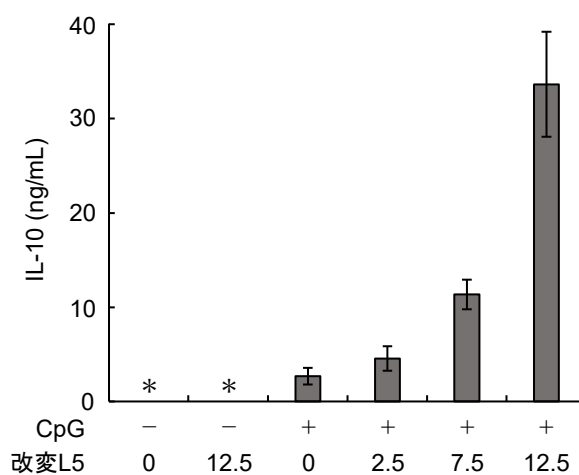


図17 L5-3K4L/9K8LはCpG DNA刺激によるRAW264.7のIL-10分泌を増強する。
 RAW264.7を図中に示した濃度 (μg/mL) のL5-3K4L/9K8L (改変L5) 存在下で、10 nM CpG DNA (CpG) で24時間刺激 (+) もしくは未刺激 (-) した時の培養上清中のIL-10濃度をELISAにより定量した。棒グラフは各条件3サンプルずつ測定したIL-10濃度 (ng/mL) の平均値、エラーバーは標準偏差を表す。アスタリスク (*) は、IL-10が検出限界 (0.03 ng/mL) 以下であることを示す。

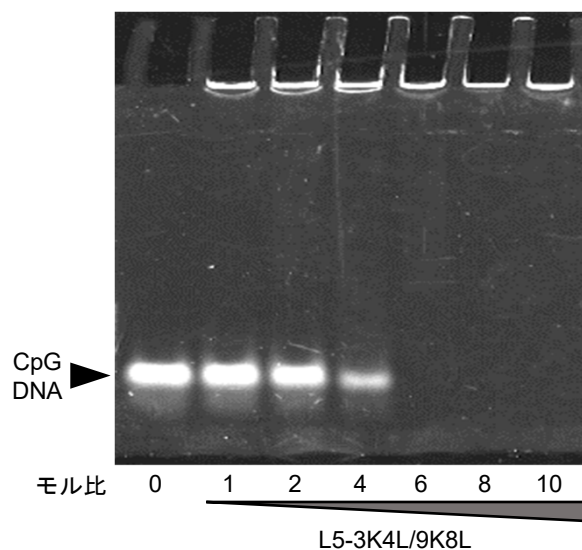


図18 L5-3K4L/9K8LとCpG DNAの結合親和性解析

CpG DNAに、図中に示したモル比となるようにL5-3K4L/9K8Lを混合し、電気泳動を行った。ゲル中のDNAはGelRed nucleic acid gel stainを用いて染色し、検出した。矢じりはCpG DNAバンドを示す。

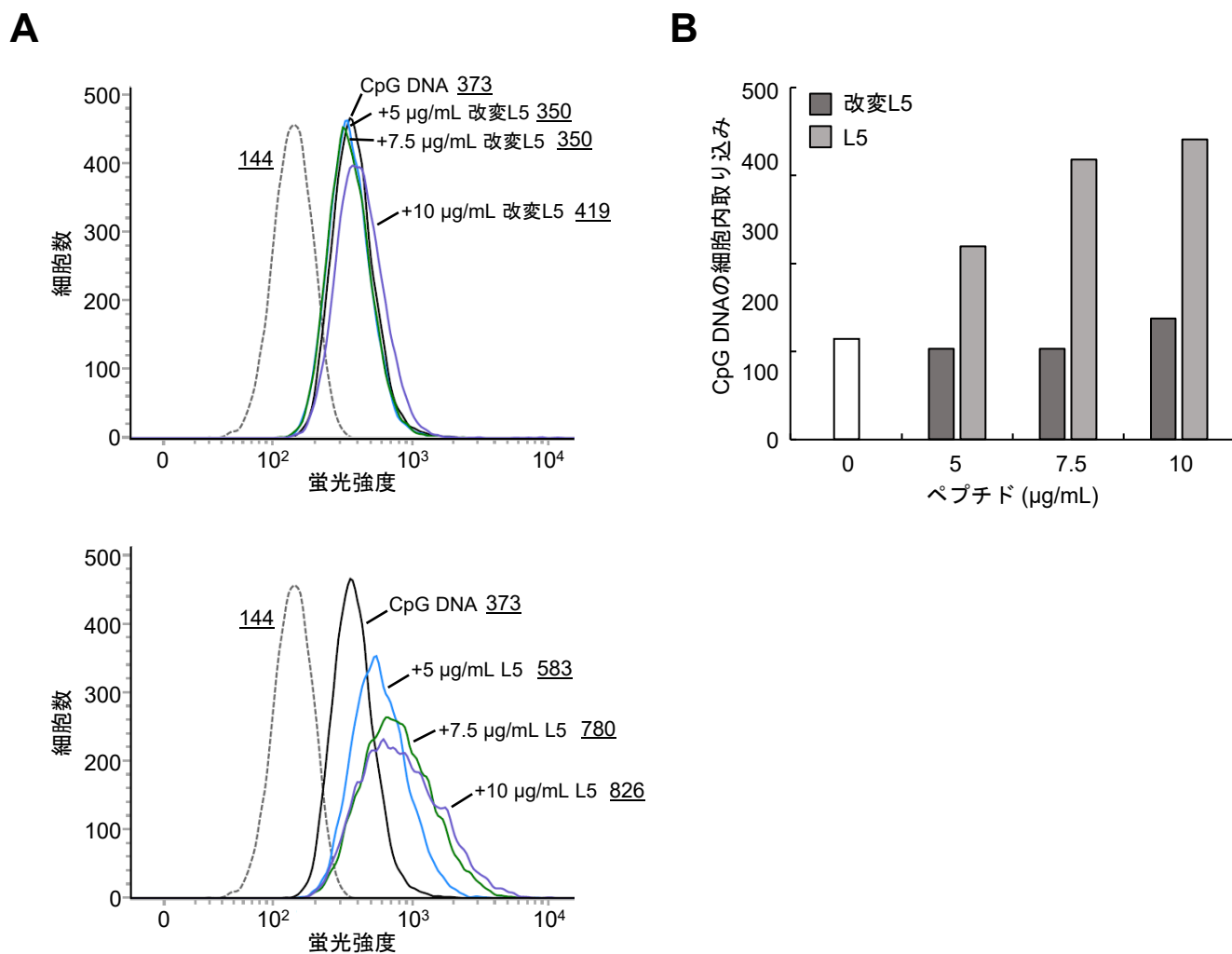
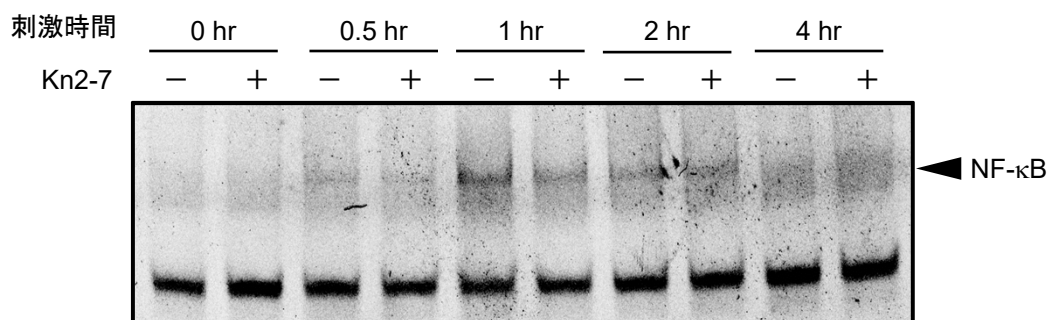


図19 RAW264.7へのCpG DNAの取り込みに対するL5-3K4L/9K8Lの効果解析

(A) RAW264.7に50 nM CpG DNA-FAMを単独もしくは5 $\mu\text{g/mL}$ 、7.5 $\mu\text{g/mL}$ ならびに10 $\mu\text{g/mL}$ L5-3K4L/9K8L (改変L5) (上) およびL5 (下) 存在下で処理した時の蛍光強度をフローサイトメトリーにより解析した。細胞の自家蛍光 (未処理細胞の蛍光強度) はグレーの点線で示す。下線の値はGeo MFIを示す。(B) (A) のGeo MFIより求めたCpG DNAの細胞内取り込みを棒グラフに表す (白: CpG DNA-FAM単独、濃いグレー: 改変L5存在下、薄いグレー: L5存在下)。CpG DNAの細胞内取り込みの値は、CpG DNA-FAMを処理した細胞のGeo MFIから未処理細胞のGeo MFIを差し引いたものである。それぞれのペプチドの濃度 ($\mu\text{g/mL}$) はグラフの横軸に示す。

A



B

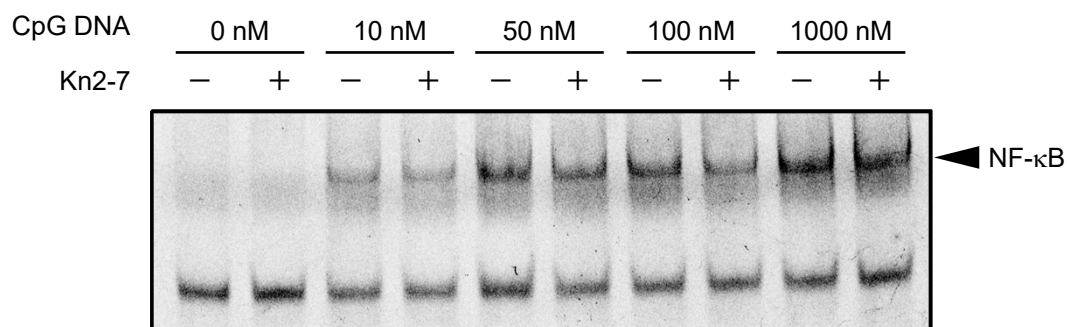


図20 CpG DNA刺激によるRAW264.7のNF- κ B活性化はKn2-7により増強されない。(A) RAW264.7を12.5 μ g/mL Kn2-7存在下 (+) もしくは非存在下 (-) で、50 nM CpG DNAで0、0.5、1、2ならびに4時間刺激した。(B) RAW264.7を12.5 μ g/mL Kn2-7存在下 (+) もしくは非存在下 (-) で、0、10、50、100ならびに1000 nM CpG DNAで1時間刺激した。(A、B) それぞれの条件でCpG DNAおよびペプチドを処理した後、細胞の核抽出液を調製し、ゲルシフトアッセイによりNF- κ Bの活性化を評価した。矢じりは核抽出液中のタンパク質がNF- κ B特異的プローブと結合することにより検出されたシフトバンドを示す。

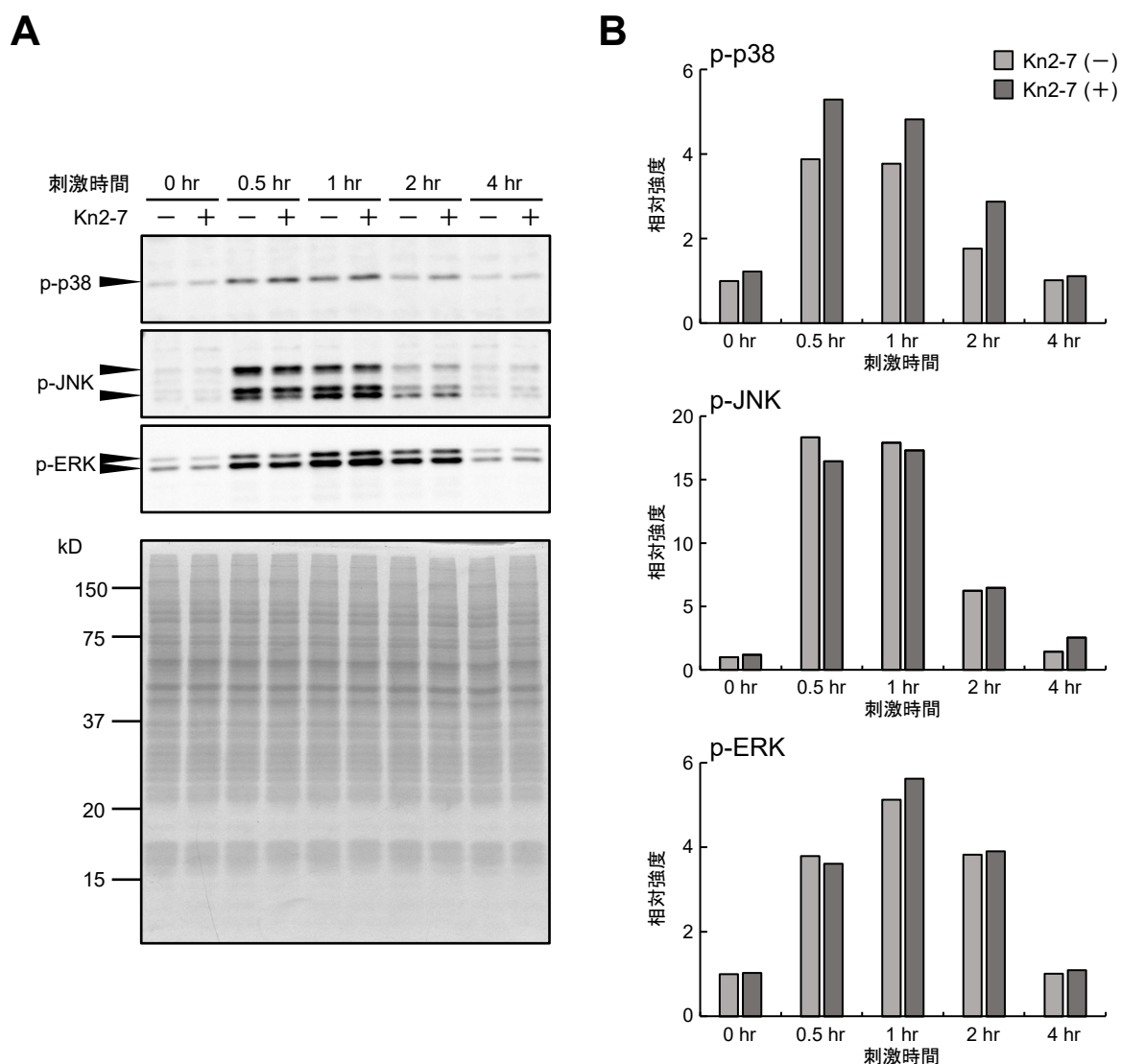


図21 Kn2-7はCpG DNA刺激によるRAW264.7のp38リン酸化を増強する (CpG DNAの刺激時間変化)。

(A) RAW264.7を12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kn2-7存在下 (+) もしくは非存在下 (-) で、50 nM CpG DNAで0、0.5、1、2ならびに4時間刺激した。上図：タンパク質量が10 μg となるように調製した細胞溶解液を10% アクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEで分離し、リン酸化p38 (p-p38)、リン酸化JNK (p-JNK) ならびにリン酸化ERK (p-ERK) をウェスタンブロット法により検出した。

下図：タンパク質が等量泳動されていることをCBB染色により確認した。(B) (A) で検出されたバンド強度をImageJで数値化し、未処理のバンド強度を1とした相対強度を棒グラフに表す (薄いグレー：Kn2-7非存在下、濃いグレー：Kn2-7存在下)。

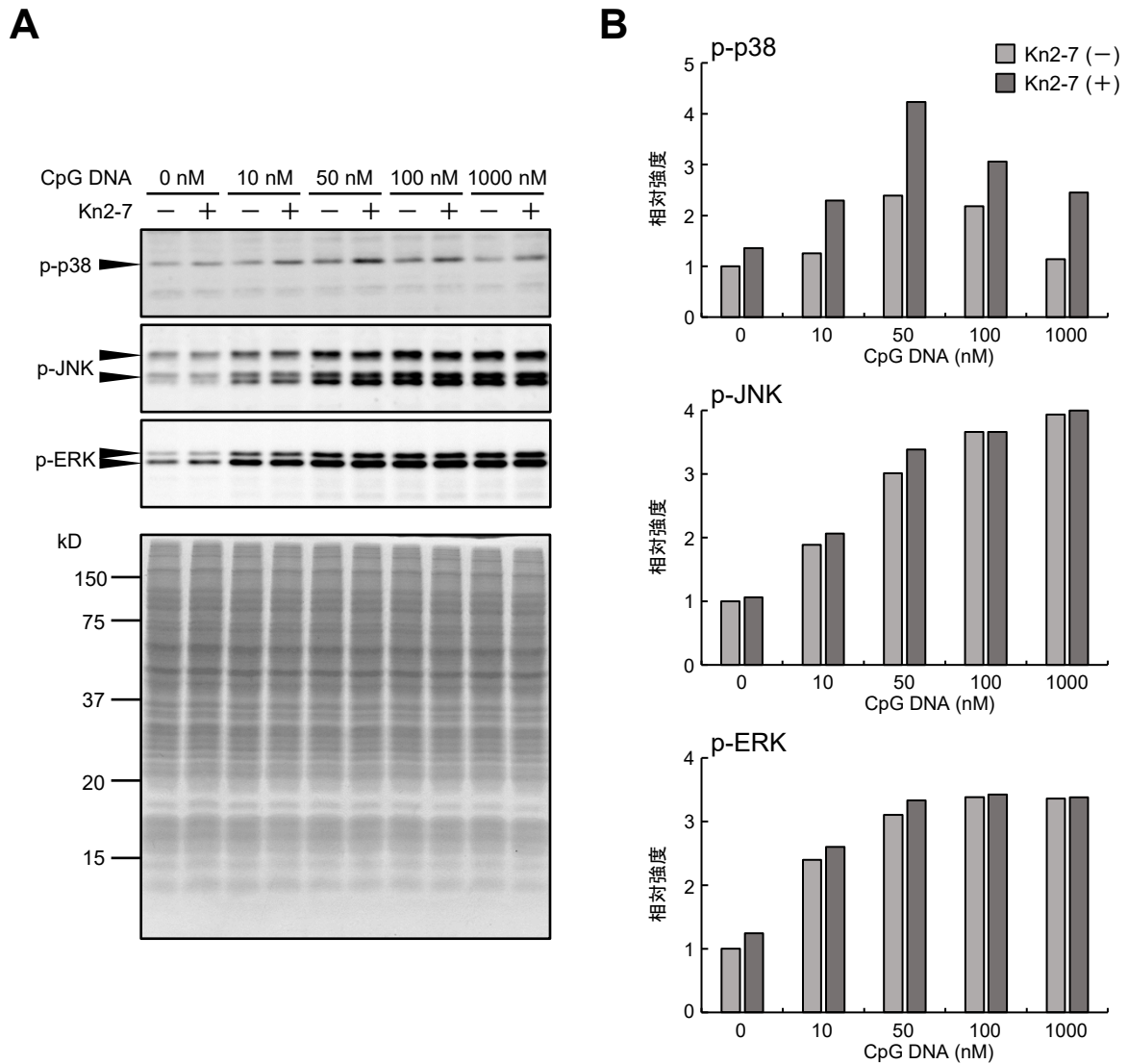


図22 Kn2-7はCpG DNA刺激によるRAW264.7のp38リン酸化を増強する (CpG DNAの刺激濃度変化)。

(A) RAW264.7を12.5 μg/mL Kn2-7存在下(+)もしくは非存在下(-)で、0、10、50、100ならびに1000 nM CpG DNAで1時間刺激した。上図：タンパク質が等量となるように調製した細胞溶解液を10% アクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEで分離し、リン酸化p38 (p-p38)、リン酸化JNK (p-JNK) ならびにリン酸化ERK (p-ERK) をウェスタンブロット法により検出した。なお、タンパク質泳動量はp-p38が30 μg、p-JNKおよびp-ERKが10 μgである。下図：タンパク質が等量泳動されていることをCBB染色により確認した (タンパク質泳動量は30 μg)。(B) (A) で検出されたバンド強度をImageJで数値化し、未処理のバンド強度を1とした相対強度を棒グラフに表す (薄いグレー：Kn2-7非存在下、濃いグレー：Kn2-7存在下)。

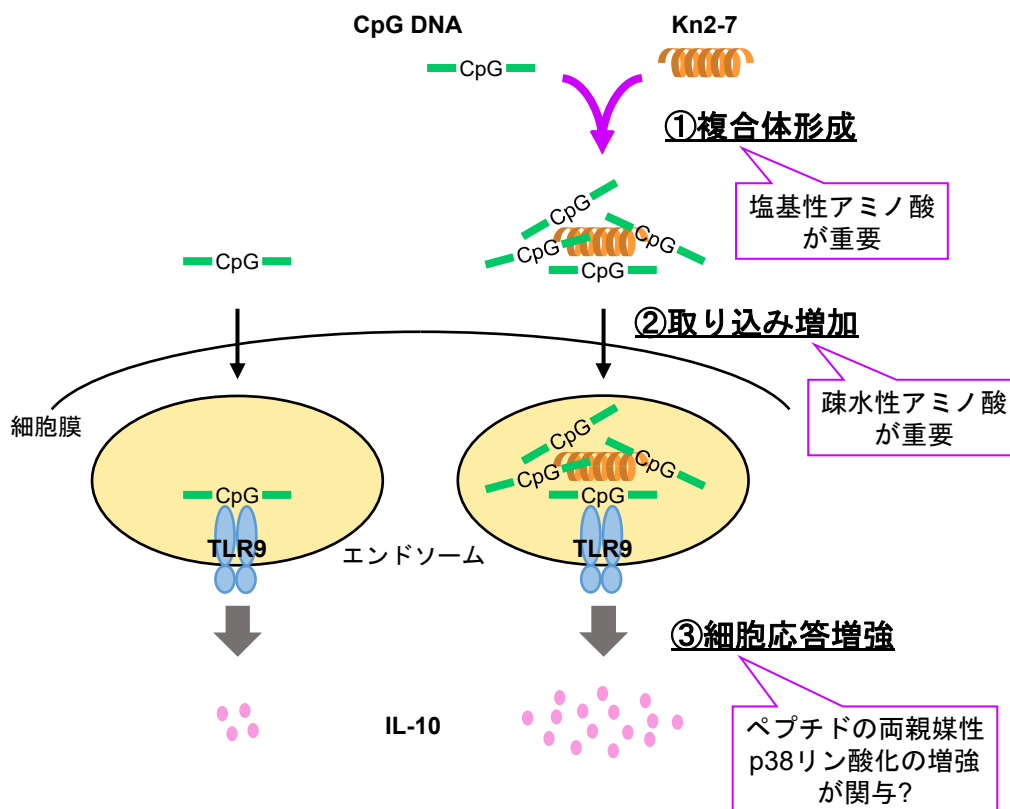


図23 細胞のCpG DNA認識応答に対するKn2-7の作用の予想モデル図