論文の内容の要旨

論文題目

Regulatory Roles for MD-2 and Toll-like receptor 4 (TLR4) in Ligand-induced Receptor Clustering

Toll-like receptor 4 (TLR4) へのリガンド結合および TLR4 重合体形成における MD-2 の役割

指導教員　三宅健介 教授

東京大学大学院医学系研究科
平成 14 年 4 月入学
医学博士課程
病因・病理学専攻
氏名　小林　真紀子

【序】

Toll-like-receptor (TLR) ファミリーは微生物構成成分を察知し、すばやく免疫応答を引き起こす自然免疫における病原体認識分子である。TLR4 はグラム陰性菌の菌体膜を構成するリポ多糖の活性中心であるリピド A を認識する。MD-2 は TLR4 の細胞外ドメインに結合し、TLR4 の LPS 応答性に必須の分子である。LPS は菌体膜から LPS 結合蛋白および CD14 を介して TLR4/MD-2 に受け渡され、TLR4 から活性化シグナルが伝達される。TLR4 の LPS 認識過程については、TLR4/MD-2 とリピド A が特異的な結合をした後に、TLR4 が刺激依存的に一過性にクラスターを形成し、シグナル伝達が誘導されることが報告されている。

MD-2 についてはこれまでに LPS 結合に重要な部位や、応答性に関わるアミノ酸等の解析がなされている。しかし、MD-2 の TLR4 クラスター形成における役割については全くわかっていなかった。私は MD-2 点変異体を用いて LPS 結合や LPS 刺激による TLR4 のクラスター形成を調べ、LPS 認識における MD-2 の役割を検討した。

【方法と結果】

① LPS 認識における MD-2 の役割

私は、TLR4/MD-2 の細胞表面の発現には影響しないが LPS 低応答性を示す MD-2 点変異体 12 個に着目し、MD-2 変異体の LPS 低応答性の原因が LPS の結

合性もしくは TLR4 クラスター形成への影響である可能性を仮定し、これらの MD-2 点変異体について検討を行った。

抗 TLR4 抗体 MTS510 は LPS 刺激後に TLR4 に対する結合性を失う。一方、もうひとつの抗TLR4抗体Sa15-21はLPS刺激後も細胞表面のTLR4を認識する。この結果はLPS刺激により TLR4 の構造変化が誘導され、Sa15-21 は構造変化した TLR4 に結合できるが、MTS510 は結合できないことを示唆する。また、TLR4/MD-2 に結合できるが TLR4 のクラスター形成を誘導しない LPS の拮抗剤では MTS510 の染色性は低下しないことから、MTS510 の染色性低下によって検出される TLR4 の構造変化は、リガンド結合よりは TLR4 のクラスター形成による構造変化を反映していると考えられる。そこで TLR4 のクラスター形成に重要なアミノ酸を検出する方法として、まず MTS510 の染色を用いることにした。これらの MD-2 変異体と TLR4、CD14 を恒常発現した BaF/3 細胞を用い、リピド A 刺激後の MTS510 の染色性の変化を観察した。Gly59、Phe126 および Gly129 のアラニン変異体(以下 G59A、F126A および G129A と示す)を発現した Ba/F3 細胞はリピド A 刺激後の MTS510 の染色性の低下が不完全だった。これら MD-2 点変異体の LPS 応答性を次に検討した。変異 MD-2 遺伝子をトランスフェクションした HEK293/TLR4 のリピド A 刺激による IL-8 産生や、変異 MD-2 遺伝子を導入した MD-2 欠損骨髄由来樹状細胞のリピド A 刺激による TNF-α および IFN-β 産生を調べ、野生型 MD-2 導入細胞と比し MD-2 点変異体導入細胞では LPS 応答が低下していることを確認した。

これらの MD-2 点変異体が、LPS 結合や LPS 刺激による TLR4 クラスター形成にどのように影響を及ぼすかを検討した。リピド A の結合性を[^{3}H]標識リピド A またはリピド A 前駆体である[^{3}H]標識リピド IVa を用い、TLR4/MD-2 変異体のリガンド結合能を測定した。細胞は MD-2 変異体と TLR4、CD14 を恒常発現した BaF/3 細胞を用いた。G59A 発現細胞では、著しいリガンド結合の低下を示した。一方、MD-2 の LPS 結合部位とされるアミノ酸配列に存在する F126 および G129 の変異 MD-2 発現細胞は野生型と同程度のリガンド結合を示した。次にリピド A 刺激による TLR4 クラスター形成を、MD-2 変異体と TLR4、CD14 を恒常発現した BaF/3 細胞を用いて検討した。リガンド結合は異常のない F126A および G129A 発現細胞は著しくクラスター形成が低下していた。

② LPS 刺激による TLR4 クラスター細胞内移行とクラスター解離

抗 TLR4 抗体である Sa15-21 は LPS 刺激後も TLR4 を認識できる抗体である。しかし、長時間の刺激により Sa15-21 の染色性は徐々に失われていく。LPS 刺激により TLR4 は、LPS 刺激後に細胞内に凝集することが画像解析で明らかになった。このとき TLR4 は取り込まれた脂質膜と共局在していた。抗 TLR4 抗体 Sa15-21 による LPS 刺激後の細胞表面の染色性低下は TLR4 の細胞内への取り込

みを示していると考えられた。LPS 応答性の低下している MD-2 変異体を発現した細胞では、LPS 刺激依存性 TLR4 細胞内移行が低下されていた。

TLR4 クラスターの細胞内移行がシグナル依存性であるかを確認するためにシグナルを伝えない TLR4 変異体を用い検討した。TLR4 変異体は LPS 刺激による Sa15-21 の染色性低下が認められず、TLR4 の細胞内移行がシグナル依存的な現象であることが示唆された。LPS 刺激による TLR4 のクラスター形成は一過性の現象であり、時間経過とともに TLR4 クラスターは解離し、LPS も TLR4/MD-2 から解離する。TLR4 変異体では LPS により TLR4 のクラスター形成は誘導されるが、リガンド結合およびクラスターが持続していた。TLR4 のクラスター形成はシグナルに依存しないが、クラスター解離にはシグナル依存的な細胞内移行が必要であることが明らかとなった。

TLR4 の LPS 刺激後の画像解析では細胞膜と TLR4 がともに細胞内に取り込まれており、TLR4 のクラスター形成が一過性であるのはエンドソームに移行して分解されることによると推測された。LPS-TLR4 クラスターがエンドソームで解離するかをエンドソームの酸性化を抑制する NH_4Cl やクロロキンを用い検討した。これらの薬剤は TLR4 の細胞内移行に影響しないが、LPS 刺激による TLR4 クラスター形成は持続し、その解離を抑制していることが明らかとなった。

【結論】

LPS 結合において重要なアミノ酸 G59 を、また TLR4 のクラスター形成を制御するアミノ酸 F126 および G129 を新たに同定した。LPS 結合と TLR4 クラスター形成は MD-2 の制御を受け、これらの現象は異なるアミノ酸が重要であることが明らかになった。このことは LPS 結合と TLR4 クラスター形成は異なる制御を受けていることを示唆している。

LPS 結合による TLR4 クラスター形成はシグナルに依存しないが、TLR4 クラスターの細胞内移行はシグナルに依存する現象であることが分かった。さらに、TLR4 は LPS 結合によるクラスター形成後、シグナル依存的に細胞内のエンドソームに取り込まれ、エンドソーム内酸性化により LPS-TLR4 クラスターが解離することが明らかとなった。