

# 論文の内容の要旨

論文課題 A Novel Protein Associated with Toll-like Receptor 4 A (PRAT4A) Regulates Cell Surface Expression of TLR4

和訳 PRAT4A (Protein Associated with Toll-like Receptor 4 A)は TLR4 の細胞表面への発現を調節する

指導教員 三宅健介教授

東京大学大学院医学系研究科

2002年4月 入(進)学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 若林 靖貴

## 【目的】

生体内に侵入してきた細菌からは菌体膜脂質など菌体成分が遊離する。Toll-like receptors (TLRs)は菌体成分を認識することで生体の免疫応答を誘導する。TLRsはTLR1からTLR13まで報告されており、認識するリガンドについて研究が進んでいる。菌体膜成分の中でもGram陰性細菌の外膜を構成するLipopolysaccharide (LPS)の活性は最も強力である。LPSはTLR4によって認識される。TLR4はMD-2と会合しTLR4/MD-2複合体となる事で細胞表面への発現とLPSの認識が可能になる。しかし近年、気道上皮細胞やHEK293細胞などMD-2を発現していない細胞でもTLR4が細胞表面に発現すると報告された。本研究ではMD-2以外にもTLR4の発現を制御する分子が存在する可能性を考えそのような分子の検索を行なった。

## 【結果】

### ①TLR4単独での細胞表面への発現と、その発現を制御する分子の同定

マウスTLR4(mTLR4)を単独で発現させたHEK293細胞(HEK293/mTLR4-GFP細胞)をmTLR4に対する抗体で細胞表面の染色をした結果、mTLR4が検出された。MD-2<sup>-/-</sup> mouse骨髄由来の樹状細胞およびマクロファージでも同様の結果を得た。これら結果からTLR4がMD-2非存在下でも細胞表面に発現し得る事が確認された。

上記の結果からTLR4を細胞表面に発現させる分子がMD-2以外にも存在する可能性を考え

た。HEK293/mTLR4-GFP 細胞から mTLR4-GFP を免疫沈降し、mTLR4-GFP と共沈する分子を検索した結果 40kD 付近に単一のバンドを検出した。この分子の N 末端アミノ酸配列は human CAG repeat containing protein の 38~47 番目のアミノ酸配列と一致した。この分子を私は PRAT4A (Protein associated with TLR4 A) と名付けた。PRAT4A のマウスの臓器での発現を調べた結果、PRAT4A は調べた臓器全てに発現していた。PRAT4A の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡で検討したところ PRAT4A は小胞体とゴルジ体に局在していた。

PRAT4A の機能を解析するために、siRNA により PRAT4A の発現を低下させ、mTLR4-GFP の発現を検討したところ細胞表面の mTLR4-GFP 発現量が減少した。siRNA を導入しても mTLR4-GFP タンパクの発現量に影響はなかった。コントロールとして用いた sequence scrambled RNA は何の影響も及ぼさなかった。以上の結果から TLR4 の発現には今回新たに同定した PRAT4A が重要である事が分かった。

## ②PRAT4A の機能についての更なる検討

PRAT4A が TLR4/MD-2 複合体に対しても機能するのか次に検討した。mPRAT4A は mTLR4 と特異的に会合したが mMD-2 や mTLR2、mRP105、mMD-1 とは会合しなかった。mPRAT4A を免疫沈降すると mTLR4 の immature form のみが共沈した。このとき mMD-2 もサイズの小さい、immature form と考えられるバンドが共沈した。PRAT4A は MD-2 とは会合しない事から PRAT4A と共沈する immature TLR4 には immature MD-2 が会合していると考えられる。

mPRAT4A に対する short hairpin RNA (shRNA) を作製し、TLR4-FH/MD-2-FH を安定発現する Ba/F3 細胞 (Ba/mTLR4-FH/mMD-2-FH) に導入した。導入した shRNA は mPRAT4A mRNA 発現を抑制したが mTLR4、mMD-2 の mRNA の発現に影響は無かった。mPRAT4A shRNA 導入細胞では細胞表面の TLR4/MD-2 が顕著に低下していたが TLR2、CD43 の発現量に影響はなかった。この shRNA をマウス骨髄由来樹状細胞に導入し、PRAT4A を抑制することで、同様に細胞表面の TLR4/MD-2 が低下する事も確認した。

shRNA を導入した Ba/mTLR4/mMD-2 細胞から mTLR4 を免疫沈降したところ細胞表面に発現するサイズの大きな mTLR4 のみが低下していた。この結果は PRAT4A の発現低下により TLR4 の maturation が障害された事に起因すると考えられる。

この細胞を TLR4/MD-2 のリガンドである LPS で刺激し、転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化をルシフェラーゼアッセイで測定した。shRNA 導入細胞では LPS 応答性が低下した。コントロールとして用いた発現ベクターのみ導入した細胞はそのような低下は認められなかった。これら結果から PRAT4A の抑制が TLR4/MD-2 複合体の細胞表面への発現を減少させる事で LPS 応答に影響を及ぼす可能性が示された。

## 【結論】

TLR4 は MD-2 が無くても細胞表面に発現する事を示した。TLR4 に会合しその発現を調節する新規分子 PRAT4A を同定した。PRAT4A は TLR4/MD-2 複合体にも会合し、細胞表面への発現を調節する事を示した。PRAT4A を抑制することで LPS 応答性が低下することを示した。PRAT4A はエンドキシンショックに対する新たな創薬のターゲットとなり得ると考える。