

[別紙 2]

## 審査の結果の要旨

氏名 若林 靖貴

本研究は MD-2 を発現していない細胞でも Toll-like receptor 4 (TLR4) が細胞表面に発現する可能性があるという報告を受け、MD-2 以外に TLR4 の細胞表面への発現を調節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い、その結果同定した分子の機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. TLR4 を単独で発現させた HEK293 細胞 (HEK293/ mTLR4-GFP 細胞) を抗 TLR4 抗体で染色することで MD-2 非存在下でも TLR4 が細胞表面に発現する事を確認した。MD-2<sup>-/-</sup>マウスの骨髄由来樹状細胞およびマクロファージにおいても TLR4 が単独で細胞表面に発現する事を確認した。上記の結果から TLR4 は単独で細胞表面に発現し得る事を明らかとした。
2. TLR4 が単独で細胞表面に発現する細胞を用いて TLR4 と共沈する分子の検索を行なったところ、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 PRAT4A (Protein associated with TLR4 A) と名付け、その機能を解析するために siRNA により PRAT4A の発現を抑制したところ HEK293/ mTLR4-GFP 細胞の細胞表面に単独で発現している TLR4 の発現量が減少したが、このとき細胞表面に発現している他の分子の発現量に

影響は無かった。上記の結果からTLR4が単独で細胞表面に発現するには PRAT4A が重要であることを明らかとした。

3. PRAT4A と TLRs との物理的会合の特異性を検討した。PRAT4A は TLR4 と会合したが MD-2 や TLR2 との会合はみられなかった。また PRAT4A と会合する TLR4 はサイズの小さな immature form であり、同時にサイズの小さな immature form と考えられる MD-2 も会合していたが mature TLR4/MD-2 複合体とは会合しなかった。PRAT4A は immature TLR4 および immature TLR4/MD-2 複合体と会合することを明らかとした。
4. PRAT4A/TLR4/MD-2 を安定発現する Ba/F3 細胞に shRNA 発現ベクターを導入し、PRAT4A の発現を抑制すると TLR4/MD-2 複合体の細胞表面の発現が顕著に低下したが、このとき細胞表面の TLR2、CD43 の発現量には影響が無かった。この shRNA 発現ベクターを野生型マウス骨髄由来樹状細胞に導入したところ同様の結果を得た。TLR4/MD-2 を安定発現する Ba/F3 細胞に shRNA 発現ベクターを導入し TLR4/MD-2 のリガンドである LPS で刺激し、転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化を測定したところ shRNA 導入細胞では LPS 応答性が低下していたが、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の LPS 応答性は元の細胞と変わらなかった。上記の結果から PRAT4A の抑制が TLR4/MD-2 複合体細胞表面への発現を減少させることで LPS 応答性を調節する可能性を示した。

以上、本論文は HEK293 細胞に TLR4 を単独で発現させた細胞を用いることで TLR4 と特異的に会合しその細胞表面への発現を調節する新規分子 PRAT4A を同定した。PRAT4A は TLR4/MD-2 の細胞表面への発現も調節する事を明らかとした。本研究は臨床において重要な疾患であるエンドトキシンショックの予防、治療法を開発する上で重要な貢献をなし、免疫学の発展に寄与するところが大きいと思われる。したがって、本論文は学位の授与に値するものと考えられる。