

審査の結果の要旨

氏名 柳元伸太郎

本研究は自然免疫において重要な役割を演じていると考えられる Toll-like receptor 4 (TLR4) の細胞における分布とシグナル伝達経路に関与する因子を明らかにするため、遺伝子操作によりヒト TLR4 の変異体を多数作成し、これをヒト胎児腎由来細胞 HEK293T に強制発現させる方法でその発現形質の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ヒト TLR4 の 815 番目のロイシンをアラニンに置換した単アミノ酸変異体である TLR4 (L815A) をヒト MD-2 とともに発現させた HEK293T は、大腸菌由来のリポポリサッカライド (LPS) による刺激を加えても、野生型 TLR4 の場合と異なり NF- κ B の転写活性の亢進を示さなかった。
2. TLR4 (L815A) に蛍光蛋白である EGFP を融合させた TLR4 (L815A) -EGFP を MD-2 とともに HEK293T に発現させたものを共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、野生型では見られる細胞外周の明瞭な蛍光パターンが認められず、TLR4 (L815A) は細胞膜には発現していないと考えられた。
3. TLR4 (L815A) -EGFP を MD-2 とともに発現させた HEK293T の細胞表面をビオチン化して精製しウエスタンブロット法で TLR4 (L815A) -EGFP の細胞膜上での発現を検討したが、TLR4 (L815A) -EGFP は認められなかった。
4. TLR4 (L815A), MD-2 に加えてヒト CD14 を HEK293T に遺伝子導入して膜結合型 CD14 が発現している状態では HEK293T は LPS 刺激に対して NF- κ B

の転写活性の亢進を示した。一方、共焦点レーザー顕微鏡および細胞表面蛋白のピオチン化による精製法ではこの条件でも TLR4 (L815A) の細胞膜への発現は観察されなかった。

以上、本論文はヒト TLR4 において 815 番目の位置にあるロイシンが、TLR4 の細胞膜への発現と LPS 刺激によるシグナル伝達経路の活性化に重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらにこの 815 番目のロイシンが関与する機構には CD14 も重要な関係がある可能性が示唆された。このような、シグナル伝達経路と細胞内の物質輸送の双方に関与する細胞内 motif はこれまで知られていなかった。本研究は感染症の免疫反応で重要な役割を果たしている Toll-like receptor 4 の機能解明とその知見の臨床に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。