

論文の内容の要旨

論文題目

TLR4、TLR2 によって誘導される炎症性サイトカイン産生

における Protein associated with TLR4 (PRAT4A) の役割

指導教官 三宅健介教授

東京大学大学院医学系研究科

平成15年4月入学

医学博士 課程

病因・病理学 専攻

氏名 高橋浩一郎

Toll-like receptor (TLR) は自然免疫系において、病原体由来の成分を認識することによって迅速な免疫応答を惹起し生体の防御機構を発動する。TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6 は細胞表面に発現し、主に病原体由来の脂質やタンパク質を認識する。一方、TLR3、TLR7、TLR8、TLR9 は細胞内に発現しており、病原体由来の核酸成分を認識する。これら TLR の細胞における分布の違いは、それぞれのリガンドをより効率よく認識するためであると同時に、類似する自己の成分（たとえば DNA や RNA）との識別において重要であると考えられている。グラム陰性菌の膜成分である LPS (Lipopolysaccharide) は、TLR4 とその細胞外領域で会合する MD-2 のヘテロ 2 量体によって認識される。MD-2 は LPS に直接結合するとともに、TLR4 の細胞表面への発現にも影響する。MD-2 ノックアウトマウスにおいては、TLR4 は糖鎖修飾されずそのほとんどが小胞体やゴルジ体に留まり、細胞表面に発現することができない。TLR4 の細胞表面への発現には MD-2 が重要であるにもかかわらず、いくつかの研究グループから MD-2 がなくても TLR4 単独で細胞表面に発現し LPS に応答できると

いう報告がなされている。このことは、MD-2 以外にも TLR4 の細胞表面への発現を調節している未知の分子が存在していることを示唆している。最近、当教室において、TLR4 に会合しその細胞表面への発現調節を行う分子として PRAT4A (Protein associated with TLR4) がクローニングされた。

私は、この PRAT4A のマクロファージ、樹状細胞における役割について検討するために、マクロファージ細胞 (RAW264 細胞株) および骨髄由来樹状細胞 (BMDC; Bone marrow derived dendritic cell) における PRAT4A の発現を、RNAi によってノックダウンし、その細胞の病原体成分に対する応答性を解析した。この結果、PRAT4A ノックダウンによって、細胞表面の TLR4/MD-2 発現が低下し、同時に LPS に対する TNF- α 、IL-6、IL-12 などの炎症性サイトカイン産生が低下することを明らかになった。生化学的検討においても、IRAK-1、I κ B α degradation などのシグナル伝達が低下・遅延していた。

さらに興味深いことに、LPS ばかりでなく、TLR2 リガンドである Pam₃CSK₄ や FSL-1 などのリポペプチド (Pam₃CSK₄ は TLR1/TLR2 ヘテロ 2 量体、FSL-1 は TLR2/TLR6 ヘテロ 2 量体のリガンド) に対する応答性も部分的に低下していた。これまでの解析で、PRAT4A と TLR2 の会合は非常に弱いことが分かっている。そこで私は、PRAT4A が TLR1/TLR2 または TLR2/TLR6 ヘテロ 2 量体のうち、TLR1 や TLR6 に作用することによって、応答性が部分的に低下するのではないかという仮説を立てた。共沈実験において、PRAT4A と TLR1 の会合が認められた。TLR1 に対する新規モノクローナル抗体を作成し、TLR1 の細胞表面の発現を検討したところ、PRAT4A ノックダウン細胞において細胞表面の TLR1 発現が低下していた。さらに、PRAT4A ノックダウン細胞において、ウェスタン解析で糖鎖修飾された TLR1 が減少していた。つまり、PRAT4A は TLR4 と同様に TLR1 に会合しその細胞表面への発現を制御することによって、TLR1/TLR2 リガンドに対する応答性が低下していると考えられた。PRAT4A の細胞内局在を共焦点顕微鏡にて検討したところ、PRAT4A

は小胞体に局在していた。また TLR4 や TLR1 もその大部分は小胞体に局在している。TLR4 は小胞体において N-グリコシド型糖鎖修飾を受けることによって、成熟したタンパク質として、ゴルジ体系に輸送され細胞膜表面に発現することができる。PRAT4A ノックダウンによって、TLR4 (TLR1) の糖鎖修飾された細胞表面の TLR4 (TLR1) が消失・減少していた。PRAT4A は、小胞体において TLR4 (TLR1) と会合しこれらの糖鎖修飾を促進する働きを担っていると考えられた。

次に細胞内に局在する TLR3、TLR7、TLR8、TLR9 における PRAT4A の解析を行った。PRAT4A をノックダウンした RAW264 細胞と BMDC において TLR9 リガンド (CpG-DNA) に対する応答性が低下していた。共沈実験において、PRAT4A と TLR9 の会合が認められた。PRAT4A ノックダウン細胞における TLR9 の細胞内局在を共焦点顕微鏡にて検討した。TLR9 はもともと小胞体に局在しており、CpG-DNA 刺激によって lysosome または endosome へ移動し、そこで TLR9 と CpG-DNA が共局在することで応答することが知られている。PRAT4A ノックダウン細胞では、TLR9 は小胞体からリガンド認識の場である lysosome または endosome への移動ができなくなっていた。つまり、PRAT4A は小胞体において TLR9 とも会合し、TLR9 の小胞体からの移動に重要な働きを担っていると考えられた。

以上より、PRAT4A は TLR4 や TLR1 の細胞表面の発現に加え、TLR9 の細胞内局在を制御することで、病原体に対するマクロファージや樹状細胞の応答性を調節していることが明らかとなった。PRAT4A は、細胞表面に局在する TLR4、TLR1 (TLR2) のみならず細胞内に局在する TLR9 も制御している。実際の感染症を考えた場合に、一つの病原体であっても糖脂質と核酸成分のように複数の TLR リガンドが含まれていることが多い。PRAT4A は TLR4 (TLR1) のみならず TLR9 も同時に制御しているため、今後感染症または自己免疫性疾患における治療の標的分子となる可能性が考えられる。関連する疾患における治療の標的分子となる可能性が考えられた。