

審査の結果の要旨

氏名 高橋 浩一郎

本研究は自然免疫系の病原体認識受容体である Toll-like receptor 4(TLR4)と会合し、その細胞表面への発現を制御している分子 Protein associated with TLR4(PRAT4A)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. PRAT4A の機能解析を 21 塩基配列による short hairpin RNA(shRNA)を用いた RNA 干渉法により行った。shRNA の off-target 効果を除外するために、silent mutation を加えた PRAT4A の導入実験を行い、PRAT4A 特異的である事が示された。RAW264 細胞株やマウス骨髄由来樹状細胞において、PRAT4A をノックダウンした場合、細胞表面の TLR4/MD-2 発現が低下する事が示された。
2. RAW264 細胞株や樹状細胞の PRAT4A ノックダウン細胞では、TLR4 リガンドの LPS(LipidA)によって誘導される TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 などの炎症性サイトカインと I 型インターフェロン産生が低下する事が示された。さらに、TLR2 リガンドの Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>、TLR9 リガンドの CpG-DNA に対する応答性も低下していた。また、TLR 下流のシグナル伝達分子の生化学的解析において、IRAK-1、I $\kappa$ B $\alpha$  degradation が減弱・遅延している事が示された。
3. PRAT4A ノックダウン RAW264 細胞株では、LPS(LipidA)に対する I 型インターフェロン産生はコントロール細胞と差が認められなかった。生化学的解析においても、IRF-3 リン酸化は PRAT4A ノックダウン細胞においても同等に認められた。RAW264 細胞株においては、PRAT4A は MyD88 依存的経路特異的に機能している可能性が示された。
4. Ba/F3 細胞株を用いた会合実験で、生化学的解析においても PRAT4A は TLR4 以外に TLR1、TLR9 と会合する事が示された。
5. 生化学的に TLR4 および TLR1 の糖鎖修飾を検討した結果、PRAT4A ノックダウン細胞においては、両者ともに Endo-Hf 処理抵抗性の TLR4(TLR1)が消失しており、小胞体に留まっている事が示された。さらに、TLR9 の細胞内局在を共焦点顕微鏡にて検討した結果、PRAT4A ノックダウン細胞において、CpG-DNA 刺激による TLR9 の小胞体から lysosome (または endosome) への局在変化が認められず、TLR9 は小胞体に留まっている事が示された。つまり、PRAT4A は TLR4、TLR1、TLR9 が小胞体から細胞表面や lysosome などの認識の場への細胞内局在を制御している事が示された。

以上、本論文は TLR による病原体認識機構において、RNA 干渉を用いた機能的解析から、PRAT4A は、TLR4、TLR1、TLR9 の細胞内局在を制御している分子であり、この結果 LPS や Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>、CpG-DNA によって誘導される炎症性サイトカイン産生や I 型インターフェロン産生が低下することを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、TLR の細胞内局在に関する制御機構の解明に重要な貢献をすると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。