

論文の内容の要旨

論文題目: TLR4 の細胞内局在制御における TLR4 細胞質内ドメインの役割

指導教員: 三宅 健介教授

東京大学大学院医科系研究科

平成15年4月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名: 玄 彩華

Toll 様受容体 (TLR) は自然免疫において、病原体に共通の構造パターンを認識し第一線で病原体を排除するとともに獲得免疫を誘導する役割を持っている。TLR はリガンドを認識する場所により二つのグループに分けられる: TLR1, 2, 4, 5, 6 等は細胞表面で病原体膜成分を認識し、TLR3, 7, 8, 9 等は細胞内で病原体核酸成分を認識する。リガンド刺激を受けると、TLR は細胞内分布が大きく変わりオルガネラの間で移動する。これらの TLR のリガンド認識場所とリガンド刺激後の局在変化は病原体認識及びシグナル伝達において非常に重要である。このようリガンド刺激後の局在変化は TLR9 において明らかにされている。非メチル化 DNA (CpG) により細胞を刺激すると、TLR9 は粗面小胞体より endosome/lysosome に移動する。そして endosome/lysosome で TLR9 は細胞内に取り込まれた CpG を認識する。さらにリガンド認識場所の微妙な違いは TLR9 の応答を大きく変える。TLR9 はそのリガンドである CpG-A 及び CpG-B のわずかな DNA 配列の違いに対して大きく異なる応答を示す。それは CpG-A が細胞内に取り込まれて late endosome に留まり、late endosome にて TLR9 により認識されるのに対し、CpG-B は late endosome を通過し lysosome で TLR9 により認識されることによる(1)。当研究室は TLR4 においてもリガンド刺激後の TLR4

の細胞内への移動が、TLR4のシグナル伝達に重要であると報告している(2)。その中で、TLR4はLPS刺激後にアダプター分子のTRAMと会合し、細胞膜から endosome/lysosome へと移行することを明らかにした。そして細胞内の endosome/lysosome で、TRAMとTRIFの下流のアダプター分子TRAF3に出会うことで、更なる下流へのシグナル伝達に繋がるということを報告した。TLR4シグナルにはMyD88依存性経路とTRIF依存性経路の二つの経路があり、それぞれ炎症性サイトカインとI型インターフェロンを産生する。炎症性サイトカインは全てのTLRが産生するが、I型インターフェロンにおいてはTLR3, 4, 7, 9が産生し、TLR4以外は全てが細胞内のTLRに限られている。このことよりTRIFシグナルを活性化する為には、TLR4が細胞内へと入る必要があるということが予想された。そして当研究室が報告した結果は細胞内にてTRIFシグナルが起こることを示唆した。これらのことよりTLR4の細胞内における局在制御によって、シグナル伝達が制御されていることを示唆している。従って、TLR4によって誘導されるLPS応答を理解する上で、TLR4の細胞内での局在が如何に制御されているかを理解することが重要である。本論文において、TLR4の細胞内局在の制御を分子レベルで理解するために、TLR4の細胞内ドメインの中で、TLR4の細胞内局在を制御している部位の解析を行った。

TLR4のinternalizationには、細胞内輸送小胞の中で一番良く知られているクラスリン被覆小胞が関与するという報告がなされていることから、積荷のタンパクを認識しクラスリン被覆小胞に積み込む仲介の役割を持つ adaptor protein complex (AP) に注目し、TLR4の細胞内ドメインの中で、APにより認識されると思われる Yxxφ, di-leucine ないしは Yxxφ 類似モチーフに着目した。TLR4の細胞内領域には YDAFとYRDFのYxxφモチーフ、(EL)YRLLのYxxφ或は di-leucine モチーフと、YSRG, YSSQ, YEIA, YLEWのYxxφ類似モチーフがあることが分かり、これらのモチーフをそれぞれ四つのアラニンに置換し、TLR4変異体を作製し、解析を行うことにした。

解析を進める上では、リガンド刺激で細胞内に入らない TLR2 の細胞内領域と並べて比較することで、TLR4 の細胞内制御機構をより明らかにすることを図った。

まず、LPS 刺激後の TLR4 のエンドサイトーシスを検討した。結果として、LPS 刺激後に起こるエンドサイトーシスは一つの Yxx ϕ モチーフの YRDF/aaaa と、一つの Yxx ϕ 或は di-leucine モチーフの(EL)YRLL/aaaa-TLR4 変異体において認められなくなり、TLR4 の internalization には YRDF と YRLL モチーフが重要であることが分かった。興味深いことに、リガンド刺激で細胞内に入らない TLR2 には、YRDF と YRLL モチーフが存在しておらず、TLR4 にユニークなモチーフであることが分かった。

以上の結果を得ると共に、3 つの TLR4 変異体(YSSQ/aaaa、YDAF/aaaa、YLEW/aaaa)において、細胞表面への発現が低下していることが明らかとなった。細胞表面発現の低下がもっとも顕著なのは YDAF/aaaa と YLEW/aaaa-TLR4 変異体であり、興味深いことに、YDAF は細胞表面に発現する TLR の中で TLR2 だけに共通してみられており、YLEW は細胞表面に局在する TLR に特異的に存在することが分かった。次に、細胞表面へと移動する過程でどの段階で止まっているのかを調べる為に、細胞表面発現がもっとも顕著に低下している YLEW/aaaa-TLR4 変異体を用い、TLR4 細胞表面発現に必修とされる TLR4 の糖鎖修飾を検討してみた。TLR4 は 90kDa の I 型膜貫通蛋白質であり、N-linked 糖鎖修飾を受け、その結果 110kDa の immature form と 130kDa の mature form となり、細胞表面には mature form のみが出る(3, 4)。YLEW/aaaa-TLR4 変異体を生化学的に解析すると、YLEW/aaaa-TLR4 変異体では成熟型 TLR4 が減少し、未熟型が多くなっている。このことから、YLEW/aaaa-TLR4 変異体は小胞体(ER)での成熟過程に障害があることが示唆された。より詳しく、ER での成熟過程で、どの段階で YLEW/aaaa-TLR4 変異体の成熟が止まっているのかを明らかにするために、TLR4 の ER での成熟に関わる PRAT4A、そして MD-2 との会合を検討してみた。PRAT4A は未熟型 TLR4 と強く結合し、MD-2 は未熟型 TLR4 との結合を

経て成熟型 TLR4 と共に細胞表面上に出ると知られている。興味深いことに、YLEW/aaaa-TLR4 変異体では、共沈する PRAT4A そして MD-2 の量が野生型 TLR4 により多く検出された。従って、YLEW/aaaa-TLR4 変異体は ER 内での成熟の後期にて留まっていると推察された。

以上の TLR4 変異体の解析により、TLR4 の成熟、移動には TLR4 の細胞内に存在する Yxxφモチーフないしは Yxxφ類似モチーフと di-leucine モチーフが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。TLR4 のタンパク成熟に伴って小胞体とゴルジ体を移行する上で重要なモチーフは、二つの Yxxφ類似モチーフの YLEW, YSSQ と一つの Yxxφモチーフの YDAF であることが明らかとなった。そして、TLR4 の細胞表面への発現には全く関与しないが、LPS 刺激後の TLR4 のエンドサイトーシスに重要なドメインとして、一つの Yxxφモチーフの YRDF と、一つの di-leucine モチーフの YRLL が明らかとなった。これらのモチーフを他の TLR も含めて更に解析することで、TLR の細胞内局在とリガンド認識、シグナル伝達の関係がより明らかになるものと期待される。