

審査の結果の要旨

氏名：玄 彩華

本研究は自然免疫において、グラム陰性菌の認識及び排除に重要な役割を演じている Toll-like receptor 4 (TLR4) のエンドトキシン (LPS) 認識機構を解析する上で TLR4 の細胞内局在の重要性に注目し、TLR4 の細胞内局在に関わる細胞質内ドメイン解析を行ったものである。

研究アプローチ：

TLR4 を介したシグナル伝達には MyD88 依存性経路と TRIF 依存性経路の二つの経路がある。MyD88 依存性経路は細胞表面上で活性化されるのに対し、TRIF 依存性経路はリガンド認識後に TLR4 は細胞内へと internalize し、細胞内にて活性化すると報告されている。この TLR4 の internalization には、細胞内輸送小胞の中で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、TLR4 を認識し、クラスリン被覆小胞を形成するための仲介分子として adaptor protein complex (AP) に注目し、AP により認識されられると思われる Yxx ϕ , di-leucine ないしは Yxx ϕ 類似モチーフに着目した。TLR4 の細胞内領域には YDAF, YRDF, (EL)YRLL の Yxx ϕ 或は di-leucine モチーフと、YSRG, YSSQ, YEIA, YLEW の Yxx ϕ 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た変異体 TLR4 を作り解析を行った。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。

解析を行った所、下記の結果を得ている。

1. LPS 刺激後の TLR4 の internalization に関わるドメインを解析するにあたり、まずは TLR4 には存在するが TLR2 には存在しない Yxxφモチーフ、YRDF と YRLL モチーフに主眼を置いた。これらのモチーフをそれぞれ四つのアラニンに置換した TLR4 変異体を作製し、Ba/F3 細胞に強制発現させた。細胞表面に存在する TLR4 は抗 TLR4 抗体にて染色し、フローサイトメトリーにて解析したところ、これらの TLR4 変異体では野生型 TLR4 で認められるような LPS 刺激後に起こる TLR4 の internalization は起こらなかった。この時、他の Yxxφモチーフ、Yxxφ類似モチーフの変異体においては LPS 刺激後の internalization は認められた。このことより、TLR4 に特異的な Yxxφモチーフ、YRDF と YRLL モチーフは TLR4 の internalization に重要なモチーフであることが示唆された。

2. 上述した TLR4 の Yxxφ, di-leucine ないしは Yxxφ類似モチーフの中で、YDAF は TLR4 と TLR2 に共通するモチーフであった。そして、YLEW は細胞表面上に発現する全ての TLR に特異的であり細胞内に局在する TLR には存在しないモチーフであった。これらのことより、次は YDAF と YLEW モチーフに注目し、解析を行った。YDAF 又は YLEW をそれぞれ四つのアラニンに置換した TLR4 変異体では細胞表面への発現が顕著に低下していた。その原因を解明する為、細胞表面への発現低下がより顕著な YLEW 変異体を用い TLR4 の細胞表面発現に必須な指標として TLR4 の糖鎖修飾を検討した所、YLEW 変異体は糖鎖修飾に異常が認められ、TLR4 が粗面小胞体にて留まっていることが推測された。それに加えて TLR4 の Yxxφ類似モチーフの一つである YSSQ をアラニンに置換した TLR4 変異体でも、細胞表面への発現は明らかに低下していた。これらの解析により、TLR4 の YDAF, YLEW そして YSSQ モチーフは TLR4 の細胞表面上への発現に重要なモチーフであることが示唆された。

以上、本論文は TLR4 の細胞内局在制御に関わる TLR4 の細胞質内ドメイン変異体を作製して解析することにより、TLR4 の internalization には YRDF と YRLL モチーフが、TLR4 の細胞表面発現には YDAF, YLEW そして YSSQ モチーフが重要であることを明らかにした。本研究は、TLR4 を介した生体防御機構の解明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。