

論文の内容の要旨

論文題目 Unc93 homolog B1 は toll-like receptor7 と
toll-like receptor9 の応答バランスを制御する

指導教員 三宅 健介 教授

専攻名 医学博士課程
 病因・病理学 専攻

入学年 東京大学大学院医学系研究科
 平成17年4月入学

学生氏名 福井 竜太郎

免疫系は自己と非自己を認識し、非自己を選択的に排除する役割を持った生体機能である。脊椎動物には遺伝子の再構築により受容体の認識パターンを変化させる獲得免疫系と呼ばれるシステムが備わっているため、無限ともいえる種類の非自己を認識することが可能である。一方、ゲノムにコードされた認識パターンから変化を受けないタイプの免疫担当分子も存在し、これらは自然免疫系と呼ばれている。自然免疫系は無脊椎動物からヒトを含む脊椎動物まで保存されている生体防御機構であり、感染防御の最前線を担う生命機能であると同時に、内因性の様々な免疫応答を制御していることが報告されている。

自然免疫系のメカニズムを解明することは生命科学における重要な課題だが、自

自然免疫はこの10年程度で大きく発達した分野であり、未知の分子や未解明の機構が多く存在する。私は自然免疫系の全体像を描くことを目指し、新規自然免疫担当分子の発見とその機能解析を研究の目的として設定した。

自然免疫系を担当する分子には、特異性の低い認識を行う補体やレクチンなどのグループと、特異性の高いリガンド認識を行う受容体型のグループとがある。Toll-like receptor (以下、TLR) は後者に類される自然免疫担当分子で、細菌やウイルスに特異的な構成成分を認識する。TLR は約10種類からなるファミリーを形成しており、認識するリガンドの種類と局在により、大きく二つに分けることができる。一つは細胞表面で細菌の脂質やタンパク質を認識するグループであり (TLR1、2、4、5、6)、もう一つは細胞内部でウイルスや細胞内寄生菌の核酸を認識するグループである (TLR3、7、8、9)。核酸認識系 TLR はウイルスの感染に対して重要な役割を果たしている一方で、自己免疫疾患などに関わっている可能性が指摘されている。したがって、核酸認識系 TLR の分子機構を解明することは、感染防御システムの理解につながるのみならず、システム破綻時の病態を探る上でも重要であると考えられる。しかしながら、核酸認識系 TLR は他の TLR と比較して研究が遅れており、その機能解明にはほど遠いのが現状である。

一般的に、受容体の性質を解明するにあたっては、受容体によるリガンド認識機構と下流シグナルの伝達機構を解析することが必要である。そこで、各種 TLR の中で最も研究が進んでいる TLR4 を例に挙げると、そのリガンドである LPS を認識するためには LPS binding protein (LBP)、CD14、MD-2 といった分子を必要とし、シグナルの伝達には myeloid differentiation factor 88 (MyD88) や TIR domain-containing adaptor inducing interferon- β (TRIF) と呼ばれる分子を必要とする。このような分子群が TLR4 の応答性に重要な役割を果たしていることから、核酸認識系 TLR の場合も応答性を補完する関連分子の存在が示唆されると同時に、こ

うした関連分子の解析が核酸認識系 TLR の機能解明に重要な知見をもたらす可能性がある。この仮説に基づき、私は cDNA ライブラリを用いた functional cloning によって核酸認識系 TLR の関連分子を検索・同定し、その機能を解析することにした。

Functional cloning では、検討対象とする機能が欠損している細胞と、機能を備えている細胞を選択することが必要になる。そこで各種細胞のうち、プロ B 細胞由来の細胞株である Ba/F3 細胞を TLR7/TLR9 不応答性細胞、マクロファージ由来の細胞株である RAW264.7 細胞を TLR7/TLR9 応答性の細胞として選択し、Ba/F3 細胞に RAW 細胞の cDNA ライブラリを導入する形で functional cloning を行った。その結果、先行して実験を行っていた松本らによってカテプシン B およびカテプシン L が TLR9 の応答性を補完する分子として同定された。

TLR7 は TLR9 と同様のシグナル伝達経路を持つため、カテプシンは TLR7 の応答性も補完するかと思われたが、Ba/F3 細胞にカテプシンを導入した際にも TLR7 の応答性は見られなかった。このことから、TLR7 の応答にはカテプシン以外にも何らかの分子を必要とすることが予測されたため、私は TLR7 の関連分子を対象を絞って新たに functional cloning を行った。その結果、TLR7 の応答性を補完する分子として Unc93 homolog B1 (以下、Unc93B1) が同定された。Unc93B1 は Beutler らのグループによって TLR3、TLR7、TLR9 の応答性を補完する分子として報告されており、Unc93B1 に単一アミノ酸変異を持つマウス (3d マウス) は TLR3、TLR7、TLR9 のリガンドに対する応答性が欠損している。このようなことから、Unc93B1 は核酸認識系 TLR の応答に関わる重要な分子であることが伺える。

私も独自に Unc93B1 を同定したことから詳細な検討を行ったところ、functional cloning によって同定された Unc93B1 は、N 末端側が 83 アミノ酸欠損した変異体であることがわかった。そこで野生型の Unc93B1 を改めてクローニングし、変異体

と機能を比較したところ、Ba/F3 細胞における TLR7 の応答性は変異体でのみ補完された。この結果より、欠損した 83 アミノ酸の中に TLR7 の応答性を制御する部位が存在していると考え、各種変異体を作成し詳細な解析を行った。その結果、34 番目に位置するアスパラギン酸をアラニンに置換した変異体 (D34A) を Ba/F 細胞に導入した際、TLR7 リガンドに対する応答性が補完されたことから、34 番目のアスパラギン酸が TLR7 の応答性を制御している可能性が示唆された。

この現象をより生体に近いレベルで検討するため、骨髄由来の樹状細胞に野生型および D34A 変異型の Unc93B1 を導入して刺激を行ったところ、変異型の Unc93B1 を導入した細胞では野生型と比較して TLR7 の応答性が著しく増強された。一方、TLR9 の応答性は野生型と比較して著しく減弱していたことから、Unc93B1 の D34A 変異体存在下においては、TLR7 と TLR9 の応答性が野生型と逆転していることが明らかとなった。

Unc93B1 は膜貫通領域依存的に核酸認識系 TLR と結合し、刺激に応じて小胞体から endosome/lysosome へと運搬しているという報告がある。Endosome/lysosome は TLR7 や TLR9 のリガンド認識の場であるため、Unc93B1 による核酸認識系 TLR の応答補完メカニズムはこのような結合・運搬によるものであるとされている。

D34A 変異体についても TLR の結合と細胞内移動を検討したところ、Ba/F 細胞に D34A 変異体を導入した場合には、刺激に応じて TLR7 が lysosome へと移動する様子が観察された。一方、TLR9 は lysosome への移動が見られなかったため、D34A 変異による TLR 応答性の変化は、TLR の細胞内移動を反映していることが明らかとなった。

こうした TLR の細胞内移動は Unc93B1 と TLR との結合に基づいていることから、D34A 変異体は TLR との結合状態が野生型と異なっていると考えられる。そこで、野生型 Unc93B1 および D34A 変異型 Unc93B1 をそれぞれ樹状細胞に発現させ、

Unc93B1 を免疫沈降して共沈した TLR を LC-MS/MS で検出した。樹状細胞には内生的に TLR7 と TLR9 が発現しており、D34A 変異型 Unc93B1 がどちらの TLR と結合しやすいかを競合条件下で検討することができる。LC-MS/MS によって検出された TLR を数値化して比較した結果、D34A 変異型 Unc93B1 は野生型 Unc93B1 よりも TLR7 との結合が強く見られる一方、TLR9 との結合は野生型よりも弱いことが明らかとなった。これらのことから、野生型の Unc93B1 は TLR7 よりも TLR9 に強く結合することによって、TLR9 に傾斜した応答性を保っていることが示唆された。

上記の結果からは、自然免疫系における応答バランスの存在を伺わせる。現在までに、自己免疫疾患のモデルマウスを使用した実験によって TLR7 が症状を増悪させる一方、TLR9 は症状を緩和するという報告がなされている。ただし、TLR9 に関しては過剰反応により自己免疫疾患を惹起するという報告もなされているため、正常な免疫応答には TLR7 と TLR9 の応答バランスが適正に保たれている必要があるといえるだろう。Unc93B1 は、このようなバランスを保つ因子として考えることができるのではないだろうか。すなわち、Unc93B1 は核酸認識系 TLR の応答性を補完するために存在するのみならず、TLR9 とより強く結合することによって TLR7 の応答性が著しく亢進するのを防ぎ、TLR の応答バランスを保つ役割をも果たしている可能性がある。今回使用した D34A 変異型の Unc93B1 からは、野生型の Unc93B1 が持つ TLR の応答性を制御する機能を垣間見ることができる。

さらに、このような機能が単一アミノ酸かつ単一塩基に依存していることは、今後の研究を進めて行く上で意義深い。LC-MS/MS などのプロテオミクスを利用した新規関連分子の検索から、一塩基多型の検索まで幅広い発展性を持つものであり、この現象をより詳細に検討する上で重要な要素となるだろう。今後は詳細なメカニズムを明らかにすると同時に、*in vivo* での解析を行っていくことが課題である。