

審査の結果の要旨

氏名 福井 竜太郎

本研究は自然免疫担当分子であるtoll-like receptor (以下、TLR) のうち、核酸を認識するTLRの機能解明を目的として、新規関連分子の同定と機能解析を行ったものである。Functional cloningにより関連分子が同定され、未知であった機能が発見されるなど、以下に挙げる成果を得ている。

1. Ba/F3細胞はTLR7不応答性の細胞であり、RAW264.7細胞はTLR7応答性の細胞である。Ba/F細胞にRAW細胞由来のcDNAライブラリを導入し、functional cloningを行った結果、Unc93 homolog B1 (以下、Unc93B1) と呼ばれる分子がTLR7の応答性を補完する分子として同定された。
2. Unc93B1はTLR3、TLR7、TLR9の応答性を補完する分子として知られている。同定されたUnc93B1を詳細に検討した結果、N末端側のアミノ酸が83分子欠損した変異体であった。そこで、野生型のUnc93B1を改めてクローニングし、Ba/F細胞に導入したが、TLR7の応答性は補完されなかった。このことから、Unc93B1のN末端側にはTLR7の応答性を制御する部位が存在する可能性が示された。
3. N末端側のアミノ酸を欠損させたUnc93B1の各種変異体を作製し、TLR7の応答性を制御する部位を絞り込んだ。さらに、絞り込んだ部位のアミノ酸をアラニンに置換した変異体を作製して検討した。これらのうち、34番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した変異体 (D34A) がTLR7の応答性を亢進させたことから、Ba/F細胞におけるTLR7の応答性はUnc93B1のD34依存的であることが示された。
4. Ba/Fで見られた現象をより生体に近いレベルで検討するため、Unc93B1機能欠損マウス (3dマウス) から骨髓細胞を採取し、野生型及びD34A変異型のUnc93B1を導入して樹状細胞に分化させた。この細胞を刺激したところ、D34A

変異体を導入した樹状細胞では野生型のUnc93B1を導入した樹状細胞よりもTLR7に対する応答性が著しく亢進していた。一方、TLR9の応答性は野生型を導入した樹状細胞よりも減弱しており、TLR7とTLR9の応答性がUnc93B1のD34によって相反的に制御されていることが示された。

5. Unc93B1によるTLRの応答補完は、膜貫通領域依存的な結合と、それに基づくTLRの細胞内移動によっておこなわれる。TLR7やTLR9はUnc93B1と結合することによって、刺激依存的に反応の場であるendosome/lysosomeへと移行することができる。Unc93B1のD34A変異体を導入したBa/F細胞を刺激した場合、TLR7の細胞内移動が見られるのに対し、TLR9の細胞内移動が見られなかった。このことから、Unc93B1の変異によるTLRの応答性変化には、TLRの細胞内移動が反映されていることが示された。

6. Unc93B1とTLRとの結合を調べるため、野生型およびD34A変異型のUnc93B1を樹状細胞に導入し、Unc93B1を免疫沈降することでどのTLRがより強く結合するかを検討した。樹状細胞はTLR3、TLR7、TLR9などを内生的に発現しているため、競合条件下における検討が可能になる。共沈したタンパク質をLC-MS/MSによって検出・同定し、TLRのデータを抽出して数値化したところ、D34A変異体は野生型と比較してTLR7が多く共沈している一方、TLR9は野生型よりも共沈が少なかった。

以上、本論文はTLR7とTLR9の応答を相反的に制御する因子として、Unc93B1の新機能を提示したものである。さらに、新規関連分子の同定から機能部位の特定まで、連続的に行われている点で完成度が高いといえるだろう。なお、自然免疫系における応答バランスは病態モデルマウスの解析などから存在が示唆されているものの、具体的な制御因子などは全く知られていないのが現状である。このような未開の領域において、本研究は今後の研究発展に重要な意義を持つ可能性があり、学位の授与に値するものであると考えられる。