

論文の内容の要旨

論文題目	Toll-like receptor 9 によるリガンド認識機構の解析
指導教員	三宅健介教授
所属	東京大学大学院 医学系研究科 医学博士課程 病因・病理学専攻
入学年	平成 17 年 4 月入学
氏名	松本 文

Toll-like receptor (TLR) は病原微生物の構成成分を認識して自然免疫応答を惹起し、獲得免疫系を効果的に活性化するという生体の免疫防御において不可欠な役割を担っている。TLR は細胞表面に発現して働くもの (TLR1, 2, 4, 5, 6 など) と、細胞質内の小胞において機能するもの (TLR3, 7, 8, 9 など) の二種類に大別される。これらの細胞表面 TLR と細胞内 TLR はそれぞれ、病原体の膜構成成分と核酸成分を認識している。

細胞内 TLR のうち TLR9 は病原微生物が含有する DNA の非メチル化 CpG モチーフを認識し、細胞活性シグナルを伝達していることから、他の TLR と同様に宿主感染防御に重要な分子として同定された。さらに近年では、TLR9 が非自己のみならず自己の DNA を認識し、自己免疫疾患に至る分子メカニズムが徐々に明らかになっている。このように TLR9 は核酸を認識する機能を有することにより、生体に対して防御的に、あるいは攻撃的に働く可能性を持つ興味深い分子である。ところがこれらの機能の根幹である TLR9 のリガンド認識機構については、まだ分かっていないところが多い。本研究においては TLR9 のリガンド認識機構の解明を目的として検討した。

第一章 TLR9 リガンド認識メカニズムにおける新規関連分子、カテプシンの発見

[背景]

TLR のリガンド認識において、coreceptor の存在は非常に重要な役割を担っている。例えば TLR4 は病原微生物の膜成分である Lipopolysaccharide (LPS) を細胞表面で認識

しているが、この認識には LPS-binding protein(LBP)、CD14 及び MD2 の働きが大きく影響を及ぼす。中でも MD2 は LPS 及び TLR4 の各々と結合して、まさに直接 LPS 認識に関わっていることが証明された。このように coreceptor 分子探索からのアプローチで TLR のリガンド認識メカニズム解明が進んでいる。そこで今回、TLR9 のリガンド認識において重要な分子を探索するため、遺伝子ライブラリを用いた Functional Cloning を実行した。

[結果、考察]

CpG-Oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) に対して NF- κ B 活性反応を示さないマウスプロ B 細胞株 Ba/F3 細胞に、CpG 刺激に対して NF- κ B 活性反応を示すマウス脾臓細胞あるいはマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞由来の遺伝子ライブラリを導入した。これにより CpG 刺激に対して活性化可能となった Ba/F3 細胞を選択、獲得した。このポジティブ細胞が含有する責任遺伝子をクローニングし、TLR9 の CpG 認識に重要な分子としてシステインプロテアーゼであるカテプシン B とカテプシン L を同定した。

野生型のカテプシンを遺伝子導入した Ba/F3 細胞においては CpG 刺激依存的な NF- κ B 活性反応が増強されたが、一方カテプシンの酵素活性を失活させる変異体を導入した場合にはこの増強効果は認められなかった。また他のカテプシンファミリーについて検討したところ、カテプシン S/F もカテプシン B/L と同様に TLR9 活性の増強効果を示し、カテプシン H に関しては無効であった。また、カテプシンの酵素活性阻害剤を用いた実験によりマウス初代培養 B 細胞の TLR リガンド刺激依存的な活性反応を測定したところ、阻害剤によって CpG 刺激により誘導される細胞活性反応が抑制された。興味深いことにカテプシンの阻害剤は CpG 刺激依存的な活性反応のみならず、TLR3/7 リガンド刺激に対する細胞活性反応をも抑制した。以上よりカテプシンの酵素活性は核酸認識 TLR に影響を与えていることが明らかである。次いでカテプシンの作用機序についても検討したところ、TLR9 が CpG を認識する場であるエンドリソソームにおいて pH 依存的にカテプシンが基質を切断し TLR9 活性反応に影響を与えている可能性が示唆された。

第二章 核酸認識 TLR の cleaved form に関する研究

[背景]

第二章では、カテプシンの TLR9 応答における役割について解析を進めた。カテプシンが切断する基質として第一に TLR9 が推測されうるが、これを示唆する結果が先日 2 つのグループから報告された。私自身もカテプシンが TLR9 を切断し機能的フォームを生じるのではないかと推測し、TLR9 の構造について検討を加えた。

[結果、考察]

これまでの報告ではウエスタンブロットにおいて、TLR9 分子の全長サイズのコピーだけが検出されていたが、本研究において TLR9 を各種細胞株に強制発現させてそのフォームを確認したところ、TLR9 が切断されていることが明らかとなった。TLR9 が切断修飾を受けるのは細胞内小器官のいずれかであると推測されるので、TLR9 の細胞内移動を制御していると報告されている PRAT4A 分子と Unc93-B 分子に関連して解析した。その結果、この二分子それぞれによる TLR9 の細胞内移動制御は TLR9 の切断メカニズムに重大な影響を与えていることを証明し、TLR9 の cleaved form が機能的である可能性が示唆された。また内在性 TLR9 を検出することにより生体内において生理学的に cleaved TLR9 が存在していることが明らかになったため、TLR9 が切断されるという現象についてさらに検討を加えた。TLR9 cleaved form の N 末端配列分析結果をもとに TLR9 の切断部位を決定し、non-cleaved コンストラクトを作成した。現在このコンストラクトを用いて解析を進めている。

以上の研究により、TLR9 をはじめとする核酸認識 TLR のリガンド認識においてカテプシンのプロテアーゼ活性が関与していることを発見した。またプロテアーゼ活性により生じた TLR9 の cleaved form が機能的である可能性を見出した。核酸認識 TLR と自己免疫疾患などの疾病との関わりが明らかになる一方で、リガンド認識における分子メカニズムについては大部分が未知である。それゆえに、本研究により明らかとなった分子レベルでの基礎情報は今後の研究に貢献し、ひいては疾患治療に発展する可能性を有している。