

論文の内容の要旨

論文題目 Assessment of the impact of toll-like receptor 4 (TLR4) mutation on the interaction with MD-2 and cell surface expression

和訳 Toll 様受容体 4 (TLR4) のアミノ酸変異による MD-2 との結合能、および細胞膜表面発現に与える影響についての研究

指導教員 小池 和彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 龍野 桂太

病原微生物に対して免疫応答する仕組みとして自然免疫系の存在が知られている。自然免疫を司るマクロファージや樹状細胞などでは、病原微生物の種を超えて共通して存在する特異的分子群を認識する受容体が発現しており、病原微生物の侵入を認識し、初期免疫応答を惹起し、更に獲得免疫へと誘導している。この受容体は Toll 様受容体 (TLR) と呼ばれている。これまでに 10 種類のヒト TLR が発見され、各タイプの TLR が異なった特異分子群を認識しており、今回私が研究対象とした TLR4 はグラム陰性細菌の細胞壁構成成分である LPS を認識する上で中心的な役割を担っている。

TLR4 が細胞表面に発現するためには、いくつかの段階を経る必要がある。リボソーム RNA で翻訳された TLR4 は、小胞体内で MD-2 と会合し、ここに gp96 が作用することで MD-2 との会合が安定化し、小胞体からゴルジ体への細胞内輸送が進む。ゴルジ体で TLR4 はグリコシル化され、成熟型 TLR4 となって初めて細胞膜表面に発現できるようになるが、この段階には PRAT4A が必要であると考えられている。MD-2、gp96、PRAT4A、いずれかの作用が欠損すると、TLR4 の細胞表面への発現は低下する。TLR4 が LPS を認識するためには細胞膜表面に発現していることが必要であるため、LPS に対する反応も低下する。

この様にして細胞膜表面に発現した TLR4/MD-2 複合体が LPS を認識し、TIR ドメインに MyD88 などのアダプター蛋白が結合し、細胞内情報伝達から最終的には炎症系サイトカインの転写因子である NF- κ B が核内に移動することで、炎症系サイトカインが産生されるが、実は LPS に最初に会合する受容体は TLR4/MD2 ではない。LPS に親和性のある可溶性蛋白である LPS binding protein (LBP) が結合し、LPS/LBP 複合体の状態では膜蛋白である CD14 によって細胞表面にアンカーされる事が、第一段階とされている。現在一般的に広く受け入れられている TLR4 の LPS 認識モデルでは、TLR4/MD-2 複合体が CD14 から LPS/LBP を受け取り、TLR4 の多量化が進むことで細胞内の TIR ドメインに複数種類のアダプター蛋白が結合し、炎症系サイトカイン産生に至るシグナル伝達を開始すると考えられ、少なくとも CD14 と MD-2 の存在が必要であるとされている。

しかし、一方でこれに反するモデルを提唱するものもある。TLR4 を発現しているマクロファージや、HEK293 細胞などの腫瘍細胞に遺伝子導入した場合と異なり、腸管上皮由来の腫瘍細胞の場合、TLR4 は細胞内小器官の一つである Golgi 体に存在し、LPS を内在化して Golgi 体でこれを認識しているとするものである。

この様に TLR4 が LPS を認識するためには、適切な細胞内局在が不可欠であるが、それにもかかわらず細胞系によってその局在や LPS の認識機構が異なり、未だに議論が分かれているのが現状である。そこで、本研究ではまず、TLR4 の細胞内ドメインに存在する、TLR4 の細胞内分布および LPS 刺激に対する反応に関与するアミノ酸配列を探索するため、トランケーション変異体を作成した。この研究は前任者である柳元伸太郎氏と共同で行った。N 末から数えて 766 番目、788 番目、802 番目、815 番目、826 番目のアミノ酸以降を切断し、その後蛍光蛋白を結合した。作成した変異体に LPS 刺激による NF- κ B 転写活性を測定したところ、変異体の中で反応したのは TLR4-826tr のみであった。また、細胞内での局在を共焦点顕微鏡で確認したところ、TLR4-826tr を除いた変異体では細胞外周は不明瞭で、明らかな細胞膜での発現が認められなかった。以上の結果から、815 番目から 826 番目のアミノ酸の間に、TLR4 の細胞膜への発現と LPS 刺激に対する反応性に関与するアミノ酸が存在すると考えられた。

私は今回、TLR4 の 815 番目と 816 番目のアミノ酸が共にロイシンであり、sorting signal motif のなかでも di-leucine モチーフに配列が似ている事に注目し、816 番目のロイシンをアラニンに点変異させた TLR4 (L816A-TLR4) を作成し、L816A-TLR4 の細胞内分布および LPS に対する感受性について、また、細胞膜表面への発現を抑制する分子機序について解析を行った。

まず、HEK293T 細胞に野生型あるいは変異ヒト TLR4-GFP 融合タンパクと、ヒト MD-2 および CD14 が安定発現した HEK293T 細胞 (WT-TLR4 および L816A-TLR4)

を樹立した。WT-TLR4 は、免疫蛍光染色で主として細胞膜上と核周囲に局在して観察されたが、L816A-TLR4 は細胞質全体に分布し、細胞膜表面上にはほとんど観察されなかった。次に抗ヒト TLR4 抗体である HTA125 で免疫沈降し、GFP 抗体でウェスタンブロットを行うと、WT、L816A いずれも約 130kDa と 150kDa の 2 つの大きさの異なるバンドとして検出された。このうち、L816A-TLR4 では 150kDa のバンドの強度は 130kDa よりも相対的に弱く観察された。また、細胞表面蛋白を細胞膜不透過性のビオチンで標識し、細胞膜表面に発現する蛋白を検出する方法で検出した場合、150kDa のバンドのみが検出され、特に L816A-TLR4 の発現量はごく少量であった。以上より、細胞膜表面に発現する TLR4 は 150kDa の TLR4-GFP のみであり、L816A-TLR4 の細胞表面の発現量は、野生型に比べきわめて減少していると考えられた。

さらに、TLR4-GFP が局在している細胞内小器官がどこであるかについて解析する目的で免疫蛍光染色を行った。*cis*-Golgi 体、*trans*-Golgi 体、小胞体について、各々のマーカーである GM130、p230、ER トラッカーを用いてそれぞれ細胞内小器官を染色し、TLR4 の細胞内分布と比較検討した。その結果、WT-TLR4 は、細胞表面と核周囲に偏在して観察されたが、後者は GM130 と p230 に局在が一致していた。一方、L816-TLR4 は細胞表面にはほとんど認められず、細胞質内ではび慢性に分布しており、後者の分布は GM130 と p230 に加えて、ER トラッカーとも一部局在が一致していた。これらの結果より、L816A-TLR4 は特定の細胞内小器官に限局せず、ER や Golgi 体などを含む細胞質内にび慢性に分布していると考えられた。

L816A-TLR4 は細胞膜表面への発現量が少ないため、LPS に対する反応性が乏しいものと推測された。これを検証するため、LPS 刺激に対する反応を NF- κ B ルシフェラーゼレポーターアッセイで評価した。結果は予想に反し、WT-TLR4 でも L816A-TLR4 でもほぼ同様に、LPS 刺激で NF- κ B 転写活性は無刺激に比べ約 2 倍程度に亢進した。この結果は、HEK293T 細胞が LPS を細胞内に取り込み、細胞内で LPS を認識して情報伝達を開始される可能性が考えられた。これを検証するため、細胞内取り込みを阻害しながら刺激する実験を行った。第一に、LPS を HEK293T 細胞では貪食できない大きさのビーズに吸着させ、ビーズで刺激し NF- κ B 転写活性を検証した。この方法でも WT-TLR4 と L816A-TLR4 はほぼ同様に、NF- κ B ルシフェラーゼ活性が約 2 倍程度に亢進した。第二に、細胞内に取り込む際に必要なアクチン重合を、cytochalasin B で化学的に阻害してから刺激を行い、NF- κ B 転写活性を検証した。この実験でもほぼ同様に、LPS 刺激で NF- κ B 転写活性は亢進し、反応性に変化は見られなかった。これらの結果より、L816A-TLR4 は細胞膜表面への発現量は少量であっても、細胞膜表面に発現している TLR4 により LPS を認識し、WT-TLR4 と同様に細胞膜表面から細胞内情報伝

達が起きるものと考えられた。

L816A-TLR4 が細胞膜表面の発現量が少ないのは、細胞膜表面に発現するための分子との相互作用が欠落しているためではないかと推測される。第一の候補として MD-2 があげられる。MD-2 と TLR4 の会合を検証するため、Flag タグをつけたヒト MD-2 と WT-TLR4 あるいは L816A-TLR4 を HEK293T 細胞に一過性に発現させ、HTA125 抗体で免疫沈降を行い、Flag 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。その結果、MD-2 は WT-TLR4 でも L816A-TLR4 でも HTA125 抗体によって共役的に免疫沈降したが、その量は L816A-TLR4 において相対的に少量であった。第二の候補として gp96 との会合を同様の方法を用いて検証したが、MD-2 の場合と異なり WT-TLR4 でも L816A-TLR4 でも同量の gp96 が結合していた。

本研究において、TLR4/MD-2 複合体の形成が抑制されることにより、細胞表面への発現が低下することが示された。さらに、TLR-4 と MD-2 との複合体の形成には、816 番目のロイシンが重要であることを証明した。この結果、L816A-TLR4 は細胞膜表面への発現が低下し、細胞内小器官の Golgi 体や小胞体など広く細胞質内に分布していたものと考えられる。また、細胞膜表面への発現量が低かったものの、LPS に対する反応性は WT-TLR4 とほぼ同様であり、細胞膜表面に発現する TLR4 が少量であっても、LPS を十分認識することが可能であると考えられた。

MD-2 との相互作用異常とそれに続く TLR4 の細胞内局在の変化は、敗血症という過剰な炎症反応によって引き起こされる病態の理解に貢献し、新しい治療法としてその反応を特異的に制御する候補になり得るものと考えられる。