

審査の結果の要旨

氏名 龍野 桂太

本研究は自然免疫がリポ多糖類（LPS）を認識する過程で重要な役割を演じているToll様受容体4（TLR4）の、免疫担当細胞における細胞内局在を決定するアミノ酸配列を同定し、その部位に作用する蛋白質との関係性を研究したものであり、下記の結果を得ている

1. TLR4をC末側から順次縮小していったトランケーション変異体を、HEK293T細胞に遺伝子導入し共焦点顕微鏡で観察すると、N末から数えて815番目より短い変異体では細胞表面発現が消失したが、826番目より長い変異体では細胞表面発現に変化は認められなかった。815番目から826番目の間にあるアミノ酸の中で、TLR4の細胞表面発現に関連のある配列が存在していることが示された。

2. 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の一つであるdi-leucineモチーフに配列が似ていることに着目し、816番目のロイシンをアラニンに点変異させたL816A-TLR4を作成した。このL816A-TLR4をHEK293T細胞に遺伝子導入し、共焦点顕微鏡で観察すると、細胞質全体にび慢性に存在していた。各種細胞内小器官を免疫染色して確認したところ、L816A-TLR4は野生型と異なり、ゴルジ体だけではなく小胞体にも多量に局在していた。

3. 共焦点顕微鏡で観察する限り、L816A-TLR4の細胞表面発現は消失して見えたが、細胞表面タンパクをビオチン化して検出する実験では、わずかながら細胞表面発現が確認された。

L816A-TLR4は野生型と比較して、細胞膜表面蛋白に相当する150kDaの成熟型TLR4が少量であり、細胞内蛋白に相当する130kDaの未成熟型TLR4の量が多めであった。L816A-TLR4はゴルジ体でグリコシル化を受け成熟化する過程に、何らかの障害があることが示された。

4. L816A-TLR4のLPSに対する反応性をNF- κ Bルシフェラーゼレポーターアッセイで検討したところ、野生型とほぼ同様の反応性が確認された。細胞内にLPSを取り込み、細胞内にあるTLR4からシグナル伝達が始まっている可能性も考慮し、LPSをビーズに吸着させてから、あるいは、cytochalasinBでHEK293T細胞の食食を抑制してからLPS刺激実験を行ったが、結果は同様であった。細胞表面に少量発現しているL816A-TLR4が、細胞表面でLPSを認識することでシグナル伝達が始まり、その程度としては野生型と同様のものであることが示された。

5. TLR4が成熟化する過程に関与するgp-96とMD-2について、TLR4との結合能を評価するため、抗TLR4抗体で免疫沈降し、gp-96ないしMD-2抗体でブロットする実験が行われた。

L816A-TLR4のgp-96との結合能は野生型と変わりなかったが、MD-2との結合能は低下してい

た。MD-2との結合能が弱まった結果、L816A-TLR4の成熟化が抑制され、細胞表面発現が低下し、未成熟なTLR4が主にゴルジ体と小胞体に広く細胞内分布していたことが示された。

以上、本論文はTLR4においてN末から数えて816番目のロイシンが、MD-2との相互作用を介してTLR4の細胞内局在を決定する際に、重要な役割を果たしていることを明らかにした。本研究は、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、学位の授与に値するものと考えられる。