

## 論文の内容の要旨

論文題目

Toll like receptor の応答性を調節する新たな分子 PRAT4A:  
TLR2, TLR4, TLR9 における PRAT4A の機能差異について

指導教員 瀬戸泰之 教授

東京大学大学院医学系研究科

2005 年 4 月入学

医学博士課程  
外科学専攻

清川貴志

### 背景

近年医療の急速な進歩に関わらず敗血症の治療成績は十分でない。その敗血症の原因は 25-30%がグラム陰性細菌によるものと言われている。グラム陰性細菌などの菌体膜由来の糖脂質であるエンドトキシン (LPS) は、非常に強い活性を持っており、ごくわずかな量でも自然免疫を活性化する。LPS が血液中に存在し全身を循環するエンドトキシン血症は、全身性炎症反応症候群を介してエンドトキシンショック、さらには多臓器不全を引き起こし死に至らしめる。しかし未だエンドトキシンショックといわれる病態へ移行する機序はわかっていない。エンドトキシンショックへつながる最初のステップである LPS による免疫細胞の活性化を止めることができれば敗血症治療成績の向上につながると期待される。そこで私はエンドトキシンの特異的なレセプターである Toll 様受容体 4 (TLR4) について研究を行うことにした。

TLR4 はリガンド認識に、さまざまなアクセサリー分子を必要とする。中でも LPS 認識に必須である MD-2 は TLR4 の細胞表面への発現も調節する。しかし TLR4 は MD-2 がなくても単独で細胞表面に発現できる事実があり、MD-2 以外にも TLR4 の細胞表面への発現を調節している分子があると考えられた。そこで TLR4 に会合しその細胞表面への発現調節を行う分子を検索し、新たな分子として PRAT4A がクローニングされた。PRAT4A は当初 TLR4 に会合する分子として発見されたが

その後 TLR4 だけでなく TLR1、TLR9 とも会合を認めることが示された。また応答性においては TLR1、TLR2、TLR4、TLR7、TLR9 の制御を行い PRAT4A ノックアウトマウスではエンドトキシンショックに耐性を持つことが報告されている。

PRAT4A をノックアウトすると単にすべての TLR で画一的な機能障害が起こるという簡単なものではない。TLR7 や TLR9 では完全な応答性の欠落を認めるが TLR3 だけは応答性に全く変化を認めない。また TLR2 や TLR4 は一部応答が残る。このような TLR ごとに機能の差を認めるということは、PRAT4A は TLR の相互作用にも強い影響を及ぼす可能性もある。また PRAT4A は TLR ごとに機能の差を認めることは解っていたが、その理由などは全くわかっていない。そこで、今回私は PRAT4A の各 TLR の機能の差に注目し解析することにした。TLR2、TLR4、TLR9 を中心に、PRAT4A-SNP を使用し PRAT4A の役割がそれぞれの TLR で会合、発現、応答などで異なることを実験で示した。

## 結果

TLRs と PRAT4A の会合の強さを比較するため各 TLR を発現させた M12 細胞で TLR を免疫沈降し共沈する内在性 PRAT4A を検出すると TLR4 でのみ検出できた。PRAT4A は TLR4 と最も強く会合すると思われる。

TLR4 の PRAT4A の結合領域を同定するため TLR2/4 キメラ分子を使用し実験を行った。HEK293 細胞に TLR2/4 キメラ分子と PRAT4A を発現させ共沈実験を行った。TLR4 の E24-F54 領域を持つキメラ分子はすべて PRAT4A と共沈を認めた。TLR4 の E24-F54 領域が PRAT4A の会合に重要であると考えられる。この領域は、報告されている TLR4 の MD-2 結合領域 (E24-P34) を含んでいた。

MD-2 の結合領域と PRAT4A の会合領域が同じかどうか調べるため変異型 TLR4 を用いて解析した。この変異型 TLR4 は MD-2 と共沈を認めないが PRAT4A との共沈実験では共沈を認めた。この結果は MD-2 と PRAT4A の会合領域が異なることを示唆する。

MD-2 と PRAT4A が会合において競合しないかどうか PRAT4A を発現させた条件及び発現させてない条件において共沈実験を行った。PRAT4A の有無にかかわらず TLR4 と共沈する MD-2 に変化なく、PRAT4A は MD-2 と TLR4 との結合において会合部位は近接するが競合しないことが示された。

以前の報告で PRAT4A の C 末のアミノ酸 20 個を欠損させても機能に差はなかった。さらに上流に変異を認めるヒト PRAT4A の 3 種類の SNP を解析に使用することとした。HEK293 細胞に TLR2、TLR4、TLR9 のいずれかと野生型 PRAT4A もしくは PRAT4A-SNP の 1 つ (PRAT4A-R95L、PRAT4A-M145K、PRAT4A-S231I) を発現させ共沈により TLR と PRAT4A の会合を調べた。TLR2 及び TLR4 は PRAT4A-M145K とのみ共沈を認めなかった。しかし TLR9 はすべてと共沈を認めた。この結果より TLR9 は PRAT4A との会合において TLR2 及び TLR4 とは異なることが示唆された。

PRAT4A ノックアウト樹状細胞で TLR2、TLR4/MD-2 の細胞表面への発現が障害されることが報告されている。PRAT4A ノックアウト樹状細胞に野生型 PRAT4A もしくは 3 種類の PRAT4A-SNP いずれかを導入し TLR2、TLR4/MD-2 の細胞表面への発現を FACS で解析すると PRAT4A-M145K 以外ではすべて回復していたが PRAT4A-M145K は TLR2 の細胞表面への発現は回復したが TLR4/MD-2 の発現は回復しなかった。

次に野生型 PRAT4A と変異型 PRAT4A での TLR リガンドに対する応答性の回復の差を解析した。PRAT4A ノックアウト樹状細胞に野生型 PRAT4A もしくは 3 種類の PRAT4A-SNP のいずれかを発現させた。PRAT4A ノックアウト樹状細胞では Pam3CSK4、lipid A、CpG-B 刺激のすべてにおいて IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12、RANTES の産生は低下していたが野生型 PRAT4A、PRAT4A-R95L、PRAT4A-S231I の導入でほぼ完全な回復を認めた。しかし PRAT4A-M145K では Pam3CSK4 刺激において RANTES は野生型 PRAT4A とほぼ同等の回復を認め、また TNF- $\alpha$  では野生型の 3/4 程度、IL-6、IL-12 は野生型 PRAT4A の 1/3 程度の回復を認めた。一方 lipid A 刺激、CpG-B 刺激においては回復を認めなかった。この実験により PRAT4A-M145K の機能は TLR 応答において TLR ごとに差異を認めることが示された。

TLR9 と PRAT4A-M145K は会合を認めるにも関わらずサイトカイン産生の回復が起らないことは TLR9 においてはサイトカイン産生において PRAT4A の会合の次にさらなるステップが必要あり、そこが障害されていると考えられた。その段階がどこなのかを解明するために PRAT4A-M145K 発現細胞で TLR9 の signaling および trafficking の解析を行った。M12/TLR9-GFP/shPRAT4A 細胞にベクターのみ、野生型 PRAT4A、PRAT4A-M145K いずれかを導入した細胞を樹立した。CpG-B 刺激の後 JNK のリン酸化及び IKB $\alpha$  の分解を計測した。PRAT4A-M145K を導入したものでは JNK のリン酸化及び IKB $\alpha$  の分解は全く認められなかった。つまり TLR9 の signaling が起らないためリガンド刺激への応答が起らなかったと考えられる。

次に TLR9 の signaling がどの段階で障害されているかを調べるため上述の細胞を共焦点顕微鏡で観察した。野生型 PRAT4A の導入細胞では、CpG-B 刺激を行った場合に TLR9 は小胞体から endosome/lysosome に移動しそこで CpG-B と共局在を認めたが PRAT4A-M145K を導入した細胞ではベクターを導入した細胞と同様に CpG-B 刺激を行っても TLR9 は小胞体に留まっていた。PRAT4A-M145K では TLR9 が endosome/lysosome に移動することができずリガンドとの interaction が起らないために signaling が起らないことが示された。

## 考察

PRAT4A が TLR4 と最も強く会合する要因として一番考えられるものは TLR4 も TLR2 も同じような部位で PRAT4A と会合するが、PRAT4A は TLR4 とは理由は不明

であるが特別に強い会合を示すというものである。会合の実験で PRAT4A-M145K とは TLR2 及び TLR4 共に共沈を認めないということは両者が PRAT4A と会合することにおいて共通するものがあると考えられる。そして PRAT4A-M145K と TLR9 が会合を認めることは、TLR9 は TLR2 や TLR4 とは違う結合領域を持つのではないとも考えられる。TLR2 や TLR4 と TLR9 の間で PRAT4A との会合の仕方に違いがあると思われ、PRAT4A の会合の差を研究することにより細胞表面に移動する TLR2 や TLR4 と endosome/lysosome に移動する TLR9 との新たな違いが見つかる可能性もある。

PRAT4A ノックアウト樹状細胞に PRAT4A-M145K を導入することにより PRAT4A と TLR の関係のさらなる違いを解明することができた。TLR2 とは PRAT4A-M145K は共沈を検出することができないにも関わらず細胞表面の発現はほぼ完全回復し、リガンド刺激で RANTES の産生は野生型 PRAT4A とほぼ同等の回復を認めた。また TNF- $\alpha$  では野生型の 3/4 程度、IL-6、IL-12 は野生型 PRAT4A の 1/3 程度の回復を認めた。細胞表面への発現やリガンド応答が回復することを考えると Western blot で検出できるレベル以下のわずかな量の会合があるのかもしれない。TLR4 とは PRAT4A-M145K は会合することができず、細胞表面への発現や炎症性サイトカインの産生は回復しなかった。TLR4 と PRAT4A の強い会合を考えるとその強い会合が TLR4/MD-2 の細胞表面への発現に必要なのかもしれない。逆に TLR2 と PRAT4A の弱い会合が要因で TLR2 と PRAT4A-M145K は、わずかでも会合を認めれば細胞表面に発現することができるのかもしれない。

TLR2 や TLR4 が PRAT4A-M145K との会合を認めない理由として conformation の変化も考えられる。PRAT4A-M145K は非極性アミノ酸のメチオニンから極性電荷アミノ酸のリジンへと、極性・電荷が変異するのでその conformation が変化している可能性は十分ある。また PRAT4A が他の分子を介して TLR と会合している可能性も否定できず PRAT4A-M145K の conformation が変わることによりその分子との会合が障害されるのかもしれない。

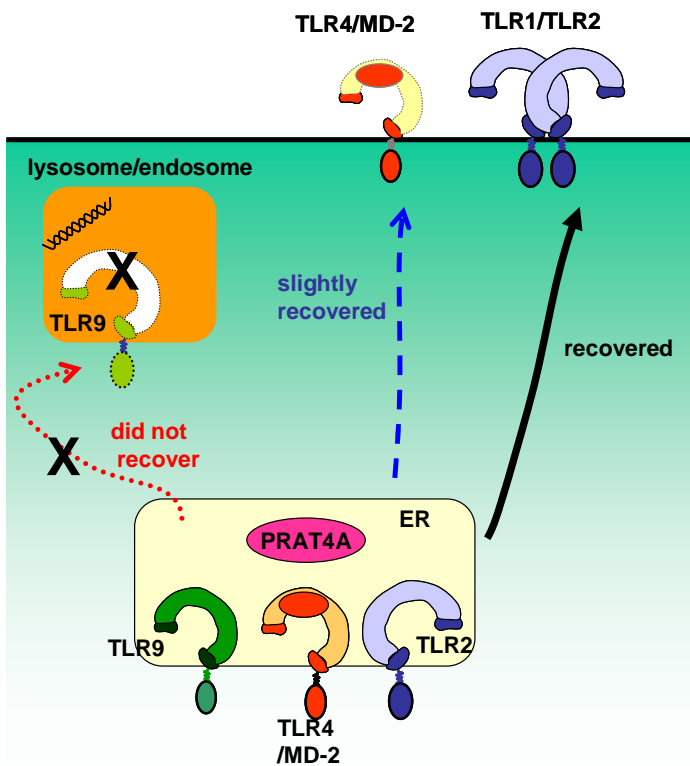
NCBI の SNP データベースでは PRAT4A-M145K は報告例のみである。この研究結果が示すように障害される機能が TLR ごとに異なるということは PRAT4A-M145K のホモ接合体やヘテロ接合体を持つヒトでは特定の感染症に対して不利になると思われる。

今後の研究課題であるが、敗血症時の PRAT4A の役割の解析は興味深い。リガンド刺激後に PRAT4A の mRNA が低下を示すということは何らかの negative feedback 機能が働いていると考えられる。その原因として TLR を介しての応答を抑制するために（例えば PRAT4A が減少すれば TLR4 の細胞表面への発現が抑制され応答性が低下するのではと考えられる）に PRAT4A の産生抑制が起きているなどの可能性や、細胞内に何らかの理由で PRAT4A が増加し産生が抑制されて

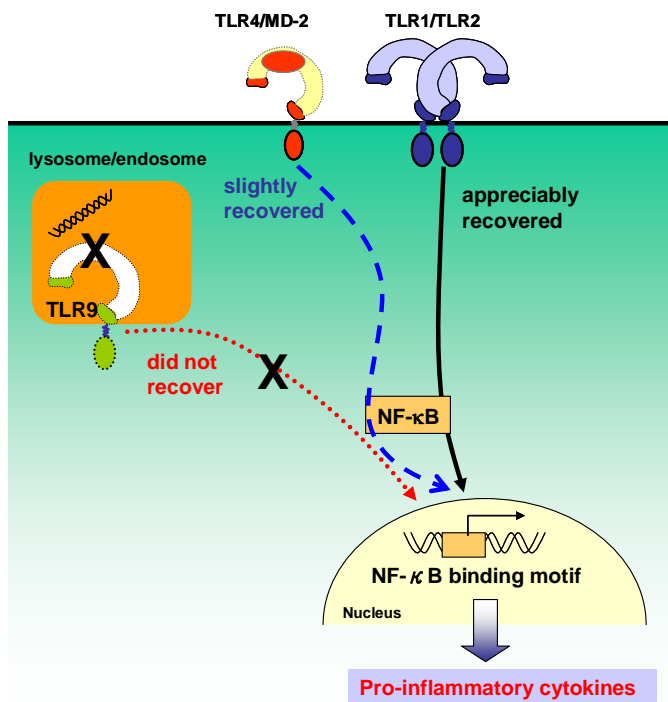
いる可能性が考えられる。前者であれば抗 PRAT4A 抗体を投与すれば TLR 全般の応答を阻害させるかもしれない。また後者であれば例えば TLR4/MD-2/LPS や他の TLR とともに細胞内に PRAT4A が取り込まれ病原物質の代謝排出に関するのかもしれない。そうであれば逆に精製 PRAT4A を投与すれば LPS などの病原物質を血中から除去できる可能性もある。PRAT4A のように TLR 全般を制御する分子を標的とした治療は複数菌による敗血症時、例えば腸管穿孔などで効果的かもしれない。

## 結論

私は PRAT4A-SNP M145K を使用することで TLR2、TLR4、TLR9 において PRAT4A の役割がそれぞれの TLR で会合、細胞表面への発現・細胞内移動、応答性で異なることを示した。



PRAT4A-M145K で TLR2 の細胞表面への発現はほぼ完全回復する。TLR4 は回復せず、TLR9 の細胞内移動は全く回復しない。



PRAT4A-M145K で TLR2 のサイトカイン産生は一部回復する。TLR4、TLR9 では回復しない。