

審査の結果の要旨

氏名 清川 貴志

本研究はさまざまな TLR(Toll Like Receptor)の機能を制御している分子 PRAT4A の各 TLR における機能を解明するため、各 TLR との会合の強さの比較、TLR4 での会合部位の同定、ヒトの PRAT4A-SNP (Single Nucleotide Polymorphis) を発現させた細胞で TLR2、TLR4、TLR9 応答の機能障害の解析を行い、下記の結果を得た。

1. TLR1/2/3/4/7/9 それぞれ 1 つずつ発現させた M12 細胞で、TLR で免疫沈降を行い共沈する内在性 PRAT4A を Western blot で検出すると TLR4 でのみ PRAT4A が検出された。PRAT4A は TLR4 と最も強く会合することが示された。
2. HEK293 細胞に 5 種類の TLR2/TLR4 キメラ分子と PRAT4A を発現させ共沈実験を行ったところ、TLR4 の E24-F54 領域を持つキメラ分子のみ PRAT4A との共沈を認めた。TLR4 の E24-F54 領域が PRAT4A の会合に重要であることが示された。  
MD-2 と共沈を認めない変異型 TLR4 が PRAT4A とは共沈を認めた。この結果は TLR4 の MD-2 結合領域 (E24-P34) と PRAT4A の会合領域が異なることを示唆した。  
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 との会合において競合しないことが示された。
3. TLR2 及び TLR4 は PRAT4A-SNP (PRAT4A-M145K) とは共沈を認めなかった。一方、TLR9 は PRAT4A-M145K 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された。
4. PRAT4A ノックアウト樹状細胞に PRAT4A-M145K を導入すると 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。この結果より PRAT4A-M145K は TLR2 と TLR4 で細胞表面へ発現させる機能に差があることが示された。
5. PRAT4A ノックアウト樹状細胞に PRAT4A-M145K の導入した細胞では Pam3CSK4 刺激において RANTES は野生型 PRAT4A とほぼ同等の回復を認め、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。

6. M12/TLR9-GFP/shPRAT4A 細胞に PRAT4A-M145K を導入した細胞では、CpG-B 刺激で 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 が起こらないためリガンド刺激への応答が起こらなかった。この細胞を共焦点顕微鏡で観察すると PRAT4A-M145K を導入した細胞では CpG-B 刺激を行っても TLR9 は endosome/lysosome に移動せず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 が起こらないために signaling が起こらないことが示された。

以上、本論文は TLR2、TLR4、TLR9 において PRAT4A の機能が各 TLR ごとに異なることを示した。本研究は新たに発見された分子 PRAT4A の TLR 制御機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。