

博士論文

魚類における自然免疫担当分子
Toll-like receptor の機能解析とその進化的意義の探索

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 細胞構造学講座
大阪府立成人病センター研究所・免疫学部門

辻田 忠志

所属 (主指導教員)	バイオサイエンス研究科 細胞構造学講座 大阪府立成人病センター研究所・免疫学部門		
氏名	辻田 忠志	提出	平成17年 1月 6日
題目	魚類における自然免疫担当分子 Toll-like receptor の機能解析と その進化的意義の探索		

要旨

魚類はその一生を水中で過ごす。陸上で生活する我々哺乳類に対して病原菌に接する機会は格段に多いはずであるが、魚類は多種多様な種が存在するほど繁栄している。生物は病原微生物に対抗するため免疫系を備えており、全ての生物が備える自然免疫と、脊椎動物のみが備える獲得免疫に大別できる。近年、自然免疫は Toll-like receptor (TLR) の発見から獲得免疫と密接にリンクしていることが明らかとなり、生体防御において、自然免疫の初期の活性化が獲得免疫の発動に重要であることが明らかとなった。翻って、魚類の生体防御機構は哺乳類とほぼ同一の機構を備えているが、獲得免疫においては哺乳類と比較すると極度に貧弱である。魚類の免疫機構はおそらく自然免疫のウエイトが高く、これが獲得免疫の未熟さを補っていると考えられた。そこで、本研究では免疫系進化の狭間の生物である魚類の自然免疫担当分子 TLR のうち、魚類特異的に存在すると考えられている可溶型と膜型の TLR5 を中心に解析を行った。

ニジマスにおいてビブリオ病原菌 *V. anguillarum* の感染時に誘導されてくる遺伝子中に TLR 様の遺伝子断片を発見し、この断片を元にニジマス可溶型 TLR5 (rtTLR5S)、さらに哺乳類と同様の膜型 TLR5 (rtTLR5M) 両遺伝子のクローニングに成功した。これらの遺伝子はスプライシングバリエーションではなく独立の遺伝子座にコードされていることがゲノム構造解析及びサザンブロッティング解析によって明らかとなった。ヒト TLR5 (huTLR5) はバクテリアの鞭毛成分である Flagellin を認識し、MyD88 を介して NF- κ B の転写活性を誘導することから rtTLR5M 及び rtTLR5S も Flagellin を認識すると予想された。ニジマス生体での組織分布は、rtTLR5M が広範囲に発現しているのに対し、rtTLR5S は肝臓に局限していた。そこでニジマス肝臓由来細胞 RTH-149 の rtTLR5M と rtTLR5S の発現を調べたところ、定常状態で rtTLR5M は発現しているが、rtTLR5S は *V. anguillarum* の死菌及び Flagellin (FlaA 及び FlaC) 刺激依存的に誘導され、他の TLR リガンドでは誘導されなかった。このようにリガンド誘導性の TLR は現在のところ報告が無く、rtTLR5M と rtTLR5S による Flagellin 認識機構は魚類特異的な自然免疫機構であると予想された。

次に、細胞外領域を rtTLR5M、細胞内領域を huTLR5 としたキメラレセプター (M-chimera) を用いて哺乳類細胞 (CHO-K1 及び HeLa) で機能解析を行った。その結果、huTLR5 と同様に *V. anguillarum* の死菌及び Flagellin (FlaA 及び FlaC) を認識できることが判明した。さらに外来的に哺乳類細胞で発現させた rtTLR5S を加えると、M-chimera を介した Flagellin 認識による NF- κ B の転写活性が顕著に増幅された。加えて、バキュロウイルスを用いた発現系で得られた組み換え rtTLR5S を添加した際にも同様に NF- κ B の転写活性が顕著に上昇した。さらに、組み換え rtTLR5S は FlaA 及び FlaC と直接結合していることが明らかとなった。この結果は細胞外領域を rtTLR5S、細胞内領域を huTLR5 としたキメラレセプター (S-chimera) を一過的に発現する CHO-K1 及び HeLa が FlaA 及び FlaC を認識できることから裏付けられた。よって、ニジマスは *V. anguillarum* など Flagellin を持った微生物の感染を受けると、rtTLR5M でその進入をキャッチし炎症性サイトカインを誘導すると同時に、肝臓で rtTLR5S を合成し Flagellin に対する応答性を高めることで、異物排除機構を強化しているのではないかと考えられた。

TLR とリガンドの認識機構に関する解析は、シグナル伝達の解析と比べると遅れており、本研究では TLR5 の Flagellin 認識における機能部位の同定を行った。HEK293 細胞は TLR5 を発現しており Flagellin を認識し NF- κ B の転写活性を誘導する。HEK293 細胞に脱糖鎖薬剤処理を行うと Flagellin の認識が減弱することから TLR5 への糖鎖付加が重要であると考えられた。本研究で取得したニジマス TLR5 とアライメントすると、保存されている N 型糖鎖付加部位は 2 カ所に絞られた。そこで、huTLR5 においてそれらのアミノ酸置換をおこなった。その結果、N342Q 変換体は完全に Flagellin 認識活性を消失しており、ドミナントネガティブにもならないことから Flagellin との結合能を消失していると考え、現在、組み換えタンパク質を作製し、確認を行っている。

最後に、本研究では魚類を中心として哺乳類以外の TLR の知識の蓄積を目指して研究を行った。これは、われわれ人類がどのような道筋で自然免疫を進化させていったかを解析するため必要不可欠である。そこで、ゲノムプロジェクトが終了している生物 (ヒト、マウス、ニワトリ及びフグ等) における TLR 遺伝子配列を用いて系統樹解析を行った。その結果、魚類と哺乳類の TLR のサブセットには遜色が無く、TLR ファミリーの増加は魚類以前で行われた可能性が高いことが判明した。

目次

略語表	ii
序章	1
第1章 ニジマス Toll-like receptor の cDNA クローニング	5
1-1. 実験材料及び試薬	5
1-2. 実験方法	6
1-3. 実験結果	12
1-4 考察	25
第2章 ニジマス膜型 TLR5 と可溶型 TLR5 の機能解析	27
2-1. 実験材料及び試薬	27
2-2. 実験方法	28
2-3. 実験結果	34
2-4 考察	54
第3章 TLR5 の Flagellin 認識における N-glycosylation の重要性の検討	57
3-1. 実験材料及び試薬	57
3-2. 実験方法	58
3-3. 実験結果	59
3-4 考察	64
終章 魚類 TLR を指標とした自然免疫の系統進化	65
謝辞	69
参考文献	I

略語表

bp(s)	base pair(s)
BPB	bromophenol blue
cDNA	complementary DNA
cpm	count per minute
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
D-PBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DTT	dithiothreitol
DW	double sterilized water
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FACS	fluorescence activated cell sorter
FCS	fetal calf serum
GST	glutathione-S-transferase
HRP	horseradish peroxidase
Ig	immunoglobulin
IPTG	isopropyl - β -D-thiogalactopyranoside
LB	Luria-Bertani
LPS	lipopolysaccharide
LRR	leucine rich repeat
mAb	monoclonal antibody
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger RNA
Ni-NTA	nickel-nitrilotriacetic acid
NP-40	Nonidet P-40
ORF	open reading frame
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PCI	phenol/chloroform/isoamyl alcohol
PCR	polymerase chain reaction
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
poly(I:C)	polyriboinosinic polybiocytidylic acid
PRR	pattern recognition receptor

PVDF	polyvinylidene difluoride
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RT	reverse transcriptase
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSC	standard saline citrate
TBS	tris buffered saline
TE	tris-EDTA buffer
TIR	toll/IL-1 receptor homology
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TLR	toll-like receptor
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
UT	untranslated region
UV	ultra violet
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -d-galactoside

序章

環境中にはおびただしい数の病原微生物（ウイルス、細菌、カビ、原虫、寄生虫）が存在しており、生物に多大な脅威をもたらす。このような感染性微生物が生体内で増殖を続けると、結果として生体は死へ向かう。病原微生物の多くは皮膚を突破することはできず、鼻咽頭、消化管、肺、生殖器、尿路などの粘膜上皮が主な感染局所となるが、このような場所も共生細菌による拮抗作用や低 pH、粘膜成分による生体防御機構を形成しており、感染が生じても生物が持つ物理的生体防御機構によって次第に排除される。しかし、この物理的障壁を突破した微生物は第 2 の障壁である免疫系に出会うことになる。

免疫系は無脊椎動物から脊椎動物までが備える自然免疫と、有顎類（軟骨魚類以降の脊椎動物）が有する獲得免疫と 2 種に大別できる。自然免疫は異物の進入を感知し各種エフェクターで応答するという単純な機構で成り立っている。驚くことに、自然免疫に関わるスカベンジャーレセプター、レクチンなどのレセプター群（**pattern recognition receptors: PRRs**）は体細胞レベルですでに生体に備わっており、細胞性防御においてはマクロファージや樹状細胞が(1)、体液性防御では補体タンパク質が重要な位置を占める(2)。これらの自然免疫担当細胞がひとたび異物を非自己として認識すると、炎症性ケモカインやサイトカインを放出し、感染局所に食細胞を遊走させ、貪食によって排除を行う。そして、さらなるサイトカインが放出され、マクロファージの貪食亢進、消化促進を誘導する。また獲得免疫を備える生物においては、これらの細胞が取り込んだ異物をペプチドとしてリンパ球に提示し、獲得免疫を誘導する。獲得免疫においては遺伝子組み換えによってレセプター（**T-cell receptor: TCR**、**B-cell receptor: BCR**）を再構成し、抗原を認識することで、直接的な細胞性免疫を誘導するばかりでなく、情報は抗体として保存される。このように獲得免疫は遺伝子再構成によるレセプターの多様化を行い記憶するという特徴を持ち、脊椎動物においては自然免疫による初期認識、排除から、獲得免疫系による排除、記憶とつながり強力な免疫機構を構築している。

しかしながら、地球上に存在する生物で獲得免疫を有する脊椎動物は実に 4%である。その他の 96%は自然免疫のみで異物を排除し、現在まで繁栄を続けてきた。これまで **PRRs** は獲得免疫の陰に隠れそれほど重要でないと認識されていた。しかし、シヨウジョウバエの背腹軸形成を司る分子として知られていた **Toll** は **IL-1** 受容体と細

胞質内領域が高い相同性を持つ分子として報告されており(3)、さらに成体においては Toll によって真菌が認識され、そのシグナルが抗真菌ペプチドを誘導することが明らかとなった(4)。また、そのファミリー分子である 18-wheeler は細菌に対して抗細菌ペプチドを誘導することが明らかとなり(5)、自然免疫系のみを持つショウジョウバエにおける PRRs として認識されるようになった。続いて、Toll ホモログ分子としてヒト Toll-like receptor (TLR) が同定されたことで脊椎動物における PRRs の認識が変わり脚光を浴びることになった(6)。

TLR は I 型の膜タンパク質であり細胞外領域に Leucine-rich-repeat (LRR)、細胞内領域に Toll/IL-1 receptor homology (TIR) ドメインを持つ分子である(図 1)。現在までにヒトにおいて 10 のファミリーの存在が明らかとなっており(7)、LPS をはじめとするリポ多糖(8)、ペプチドグリカン等の糖脂質成分(9)、微生物鞭毛構成タンパク成分であるフラジェリン(10)、非メチル化 CpG-DNA (11)や 1 本鎖及び 2 本鎖 RNA 等の微生物由来核酸成分(12-14)にあげられる外来リガンドに加え、HSP60 及び HSP70 にあげられるシャペロンタンパク質(15-18)や

クロマチン-IgG 複合体(19)などの内在性のリガンドも認識する(表 1)。TLR はリガンドを認識すると凝集し、TIR ドメインを持つ MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88) (20)、TICAM-1 (TIR-containing adaptor molecule 1 または TRIF: TIR-containing adaptor protein inducing IFN- β) (21, 22)、TICAM-2 (または TRAM: TRIF-related adaptor molecule) (23, 24)、TIRAP (TIR-domain containing adaptor protein または Mal: MyD88-adaptor-like protein) (25, 26) 等のアダプター分子をリクルートし下流の nuclear factor- κ B (NF- κ B)、activating transcription factor 2 (ATF2)及び c-Jun、interferon regulatory factor 3 (IRF3) 等の転写因子を活性化し、炎症性サイトカインの産生を促す。さらに TLR を介したリガンド刺激で自然免疫系を活性化させ、強力な獲得免疫を誘導できることから、近年ガンの免疫療法などへの応用例も報告されている

表 I. TLR とそのリガンド

Receptor	Ligand
TLR1	Triacyl lipopeptides <in combination with TLR2>
TLR2	Peptidoglycan, Zymosan, HSP70
TLR3	Double stranded RNA
TLR4	Lipopolysaccharide
TLR5	Flagellin
TLR6	Diacyl lipopeptides, Lipoteichoic acid <in combination with TLR2>
TLR7	G+U rich single strand RNA
TLR8	G+U rich single strand RNA
TLR9	Non methylated CpG DNA, chromatin-IgGcomplex
TLR10	not identified
TLR11	(Uropathogenic bacteria)

(): Ligand for mouse only.

(27, 28)。

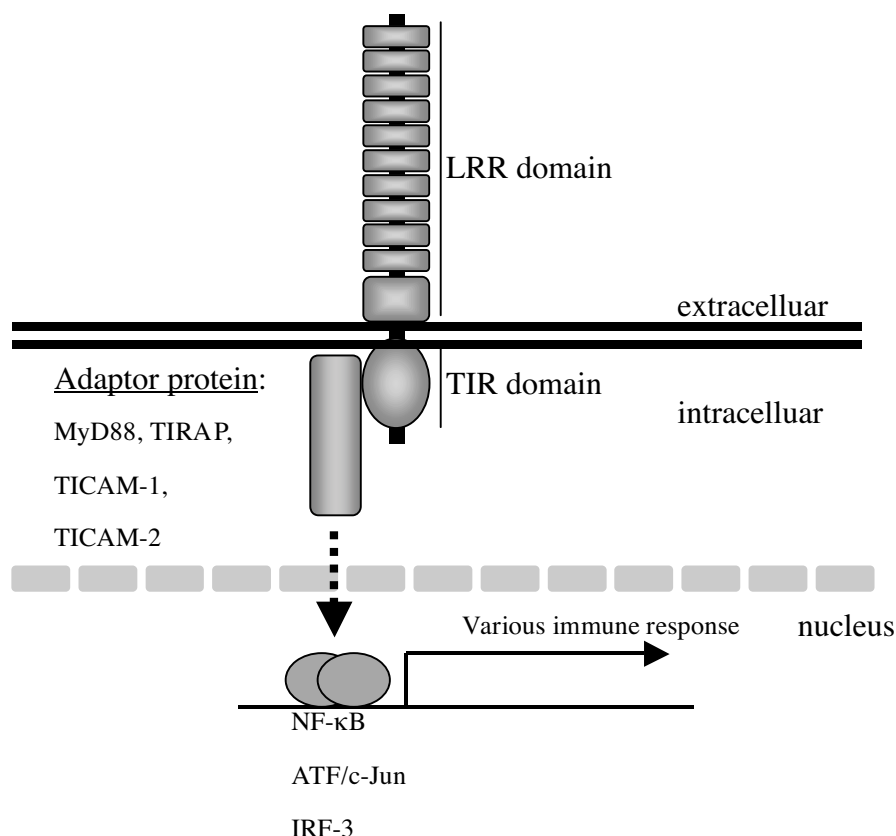


図 I. TLR の構造とシグナル伝達系の概略図

今日まで哺乳類における自然免疫研究は精力的に行われたが、それ以外の生物における研究は遅れており、幅広い生物種での研究が求められている。このような免疫の系統発生的な理解をする上で、Kasahara らによる主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) HLA 領域におけるゲノム構造の考察によると、獲得免疫の出現は頭索類と無顎類の間、有顎類の共通祖先と無顎類の間にそれぞれ一度のゲノム重複によって MHC 領域が形成されたと想定している。事実、頭索類ナメクジウオには MHC 領域のブロック重複の痕跡がないこと、円口類のメクラウナギのゲノムにはパラログス領域が 2 カ所存在することが明らかとなっている(29)。即ち、2 度のゲノム重複によって MHC 領域が形成されたばかりではなく、獲得免疫系を構成する様々な分子も誕生した可能性を示唆している (図 II)。翻って、自然免疫に関係する分子は新口動物においてはそのほとんどがそろっていることに加えて、旧口動物である昆虫類においても新口動物と遜色の無い自然免疫担当分子を持つことは、新口動物と旧口動物に分岐する以前に存在した基本遺伝子の再構成によって独自に進化したと考えられている。

そこで筆者は、獲得免疫を進化上始めて備えた魚類に焦点を当て、未熟な獲得免疫の補完をどのように行っているか TLR を中心に解析を行い、さらに自然免疫の系統進化を考察することを目的とした。まず、魚類に特異的に存在する TLR をクローニ

ングしたのでその発見からクローニング（第1章）、続いて、その機能解析について述べる（第2章）。さらに今回得られた魚類 TLR アミノ酸配列情報を元に N 型糖鎖付加部位を予測し、Flagellin 認識時における TLR5 の糖鎖付加の必要性について検討した（第3章）。終章において現在報告がある TLR の系統解析を行った考察を述べる。

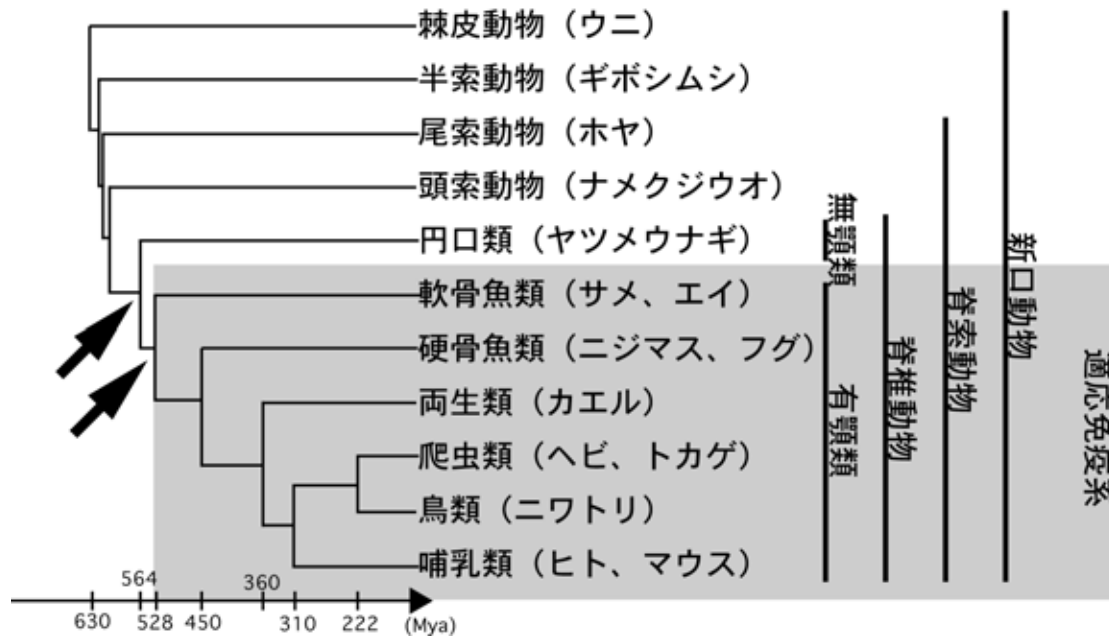


図 II. 分子時計を指標にした進化系統樹 (Ref (29)を改変して抜粋)
矢印は MHC の HLA 領域から推定される遺伝子重複の時期を示す。

第1章 ニジマス Toll-like receptor の cDNA クローニング

自然免疫担当分子として注目される TLR の機能解析はヒトおよびマウスで精力的に行われている。しかし、自然免疫は哺乳類のみならず広範囲の生物に存在し、哺乳類よりも下等な生物での解析は系統進化を理解する上で非常に重要な位置を占めてくる。本研究では獲得免疫が進化上はじめて備わった魚類に焦点を当て TLR の探索を行った。その結果、魚類に特異的に存在する TLR システム（膜型 TLR5 と可溶型 TLR5）を発見し、その遺伝子を単離することに成功した。本章では、この2種の遺伝子構造、組織分布について解析を行ったので、以下に得られた知見を報告する。

1-1. 実験材料及び試薬

1-1-1. ニジマス

ニジマスは大阪府高槻市芥川漁業協同組合より購入した。臓器は生きた個体から回収し、滅菌生理食塩水にて洗浄後、液体窒素中で急速凍結を行い-80°C で保存した。

1-1-2. 試薬

一般試薬

D-PBS:	137 mM NaCl, 8.1 mM Na ₂ PO ₄ , 2.68 mM KCl, 1.49 mM KH ₂ PO ₄
生理食塩水:	150 mM NaCl

遺伝子操作

DNA 抽出バッファー:	10 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.1% SDS, 100 μg/ml proteinase K, pH8.0
TE (Tris EDTA) buffer:	10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA
TAE (Tris acetate EDTA):	40 mM Tris, 40 mM CH ₃ COOH, 1 mM EDTA
TBE (Tris borate EDTA):	89 mM Tris, 89 mM Borate, 2 mM EDTA

サザンブロットハイブリダイゼーション

加水分解液:	0.25 M HCl
変性溶液:	1.5 M NaOH, 0.5M NaCl

2× SSC:	0.3 M NaCl, 30 mM sodium citrate (pH 7.0)
1 M Church phosphate buffer:	0.5 M Na ₂ HPO ₄ , adjusted with H ₃ PO ₄ (pH 7.2)
hybridization buffer:	0.5 M Church phosphate buffer, 1 mM EDTA, 7% SDS
Wash solution 1:	2× SSC, 0.05% SDS
Wash solution 2:	0.1× SSC, 0.1% SDS

ウエスタンブロットハイブリダイゼーション

可溶化バッファー:	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 10 mM EDTA, 25 mM iodoacetamide, 2 mM PMSF
泳動バッファー:	25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS
5×サンプルバッファー:	312.5 mM Tris-HCl (pH6.8), 50% glycerol, 10% SDS, 5mg BPB
転写バッファー:	25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% methanol
TT-TBS:	8.1 mM NaH ₂ PO ₄ , 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.1% Tween 20, 0.1% Triton X-100, pH 7.3

試薬は全て特級を用い、特別な記述がない限り、Milli Q TOC (Millipore, Billerica, MA) で精製した水をさらにオートクレーブ滅菌した Double Sterilized Water (DW)を用いた。

1-2. 実験方法

1-2-1. 臓器からの Total RNA の抽出

保存した臓器を凍結状態で 1~2 g (湿重量) 取り、1 g あたり 10 ml の TRIzol reagent (Invitrogen, San Diego, CA)を加え、ウルトラディスパーザー (Yamato, Tokyo, Japan) を用いて組織を完全に破碎した後、室温で 5 分間インキュベートした。懸濁液を 1.5 ml チューブに 1 ml ずつ移し、クロロホルムを 200 μ l 加え、激しく攪拌した後、室温で 3 分間インキュベートした。15,000 rpm、15 分間、4°C で遠心を行い、水層を新しい 1.5 ml チューブに回収し、イソプロパノール 250 μ l を加え激しく攪拌を行い、室温で 10 分間インキュベートした。15,000 rpm、15 分間、4°C で遠心を行い、上精を取り除き、沈殿を回収した。得られた沈殿を 70%エタノールで洗浄し、RNase-free DW で溶解後、260/280 nm の吸光度を分光光度計 (Model: Biospec-1600, Shimadzu, Kyoto, Japan) で測定し RNA の濃度及び純度を検定した。

1-2-2. DNase 処理

1~4 μg totalRNA、1 unit RQ1 RNase-Free DNase I (Promega, Madison, WI)、1 μl 10 \times Reaction Buffer に RNase-free DW を加えて 10 μl とし、室温で 10 分間インキュベートした。反応後、25 mM EDTA を 1 μl 加え、さらに 70 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間インキュベートし DNase を失活させた。

1-2-3. First strand cDNA の合成

DNase 処理後の RNA (1~4 μg)、4 μl M-MLV 5 \times Reaction Buffer、1 mM dNTP、5 μM Random hexamer (Promega)、0.5 μl RNasin、1 μl M-MLV(-) Reverse Transcriptase (Promega) に DW を加えて 20 μl とし、37 $^{\circ}\text{C}$ で 90 分間インキュベートし、First strand cDNA とした。

1-2-4. mRNA の精製

DNAase 処理済み totalRNA を出発材料とし、mRNA Purification kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) を用いて mRNA を精製した。totalRNA を Elution buffer で 1 ml とし、65 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間インキュベートしたのち氷冷した。200 μl の Sample buffer を加え、予め 1 ml の High-salt buffer で 2 度洗浄したカラムにアプライした。素通り画分を再度アプライし、カラムを 1,600 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ で 2 分間遠心をした。250 μl High-salt buffer で 2 度、250 μl High-salt buffer で 3 度カラムを洗浄した後、予め 65 $^{\circ}\text{C}$ に暖めておいた 250 μl の Elution buffer で 4 度溶出した。溶出した 1 ml の mRNA 溶液に 100 μl の Sample buffer、10 μl glycogen solution、2.5 ml エタノールを加え、-80 $^{\circ}\text{C}$ で一晩インキュベートし、15,000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間遠心を行った後、ペレットを 70% エタノールで洗浄し風乾した。ペレットの溶解は RNase-free DW で行い、濃度及び純度を検定した。

1-2-5. ニジマス可溶型 TLR5 の単離

ニジマスにおいて *V. anguillarum* 感染時に誘導され、Leucin-Rich Repeat (LRR) モチーフを含む遺伝子断片 (Genbank. AF281346) (30) が同定されており、この配列を元にして本研究室でニジマス可溶型 TLR5 がクローニングされた。正確な遺伝子配列は、ニジマス肝臓 1st strand cDNA ライブラリーを鋳型に rtTLR5S の 5' 及び 3' 末端に作製したプライマーを用いた PCR で決定した。PCR は LA Taq (TaKaRa, Siga, Japan) を用い、cDNA ライブラリー 5 μl 、0.5 μM rtTLR5S SF、0.5 μM rtTLR5S SR で 50 μl の合計量で反応を行った。PCR 条件は 96 $^{\circ}\text{C}$: 1 min, (98 $^{\circ}\text{C}$: 10 sec, 55 $^{\circ}\text{C}$: 30 sec, 72 $^{\circ}\text{C}$: 3 min) \times 45 cycle, 72 $^{\circ}\text{C}$: 7 min で行った。特異的な増幅産物を TA cloning kit (Promega) によって pGEM-T easy vector に組み込んで 5 つの組み換え体を得、それぞれについて Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて

ABI PRISM Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems) で塩基配列を決定した。

rtTLR5S SF: CAGTGCTTCAAGTTATCTGCGAGG

rtTLR5S SR: TGTATCATTCACTGGTCATTACAGC

1-2-6. ニジマス膜型 TLR5 (rtTLR5M) の単離

(a) 遺伝子断片の単離

ヒト、マウス、フグ TLR5 (GenBank. AB06095, AF18617, (31)) の TIR ドメインを CLUSTALW (<http://clustalw.genome.ad.jp/>) を用いてアライメントした。その中で相同性の高い部位の配列を元に縮重プライマーを設計した (degenerate forward primer U1, degenerate forward primer L5) (図 1-2)。

1-2-3 で合成したニジマス肝臓 1st strand cDNA ライブラリーを鋳型として、設計した縮重プライマーを用い PCR を行った。PCR は LA Taq を用い cDNA ライブラリー 5 μ l, 4 μ M degenerate forward primer U1, 4 μ M degenerate forward primer L5 で 50 μ l の合計量で反応を行った。PCR 条件は 96°C, 1 min, (98°C: 10 sec, 48°C: 30 sec, 72°C: 30 sec) \times 40 cycle, 72°C: 7 min で行った。PCR 産物を 1.5% TBE agarose で分離を行い、特異的な増幅産物を TA cloning kit によって pGEM-T easy vector に組み込んで 4 つの組み換え体を得、それぞれについて塩基配列を決定した。

(b) 全長配列の決定

得られた遺伝子断片を元に Marathon RACE cDNA amplification kit (BD Biosciences, San Jose, CA) を用いて行った。ニジマス肝臓 mRNA を鋳型として逆転写した cDNA にアダプターをライゲーションし、cDNA ライブラリーとした。なお全ての RACE PCR には Advantage II Polymerase Mix (BD Biosciences) を用いて行い、各反応で使用するプライマー濃度、PCR プログラムを最適化し全長を単離した。

3'RACE は 1st PCR と nested PCR と 2 段階 PCR を行った。1st PCR は 250 倍希釈した cDNA ライブラリー 5 μ l, 0.2 μ M GSP1, 0.2 μ M AP1 で 50 μ l の合計量で反応を行った。PCR 条件は 96°C, 1 min, (94°C: 5 sec, 72°C: 4 min) \times 5 cycle, (94°C: 5 sec, 70°C: 4 min) \times 5 cycle, (94°C: 5 sec, 68°C: 4 min) \times 25 cycle で行った。さらに nested PCR を 50 倍希釈した 1st PCR 産物 5 μ l, 0.2 μ M NGSP1, 0.2 μ M AP2 で 50 μ l の合計量で反応を行った。PCR 条件は 1st PCR と同様とした。

5'RACE は 3 度行い全長を単離した。また 5'RACE も 1st PCR と nested PCR と 2 段階 PCR を行った。(5'RACE-1) 1st PCR は 50 倍希釈した cDNA ライブラリー 5 μ l, 0.2 μ M GSP3, 0.2 μ M AP1 で 50 μ l の合計量で反応を行った。PCR 条件は 94°C, 1 min, (94°C: 5 sec, 72°C: 4 min) \times 5 cycle, (94°C: 5 sec, 70°C: 4 min) \times 5 cycle, (94°C: 5 sec, 68°C: 4 min) \times

25 cycle で行った。さらに nested PCR を 50 倍希釈した 1st PCR 産物 5 μ l, 0.2 μ M NGSP3, 0.2 μ M AP2 で 50 μ l の合計量で反応を行った。PCR 条件は 96°C, 1 min, (96°C: 5 sec, 68°C: 10 sec, 72°C: 4 min) \times 25 cycle で行った。

(5'RACE-2) 1st PCR は 50 倍希釈した cDNA ライブラリー 5 μ l, 0.2 μ M GSP4, 0.2 μ M AP1 で 50 μ l の合計量で反応を行った。PCR 条件は 94°C, 1 min, (94°C: 5 sec, 72°C: 4 min) \times 5 cycle, (94°C: 5 sec, 70°C: 4 min) \times 5 cycle, (94°C: 5 sec, 68°C: 4 min) \times 25 cycle で行った。さらに nested PCR を 50 倍希釈した 1st PCR 産物 5 μ l, 0.2 μ M NGSP4, 0.2 μ M AP2 で 50 μ l の合計量で反応を行った。PCR 条件は 96°C, 1 min, (96°C: 5 sec, 68°C: 10 sec, 72°C: 4 min) \times 25 cycle で行った。

(5'RACE-3) 1st PCR は 50 倍希釈した cDNA ライブラリー 5 μ l, 0.2 μ M GSP5, 0.2 μ M AP1 で 50 μ l の合計量で反応を行った。PCR 条件は 96°C, 1 min, (96°C: 5 sec, 68°C: 10 sec, 72°C: 4 min) \times 25 cycle で行った。さらに nested PCR を 50 倍希釈した 1st PCR 産物 5 μ l, 0.2 μ M NGSP5, 0.2 μ M AP2 で 50 μ l の合計量で反応を行った。PCR 条件は 94°C, 1 min, (94°C: 5 sec, 72°C: 4 min) \times 5 cycle, (94°C: 5 sec, 70°C: 4 min) \times 5 cycle, (94°C: 5 sec, 68°C: 4 min) \times 25 cycle で行った。得られた PCR 産物は TA クローニングを行い、塩基配列を決定した。

GSP1: 5'-GTACAAGTGGGTAGAAACCGCCC-3'

NGSP1: 5'-CTAGACTCTCAGTTCGCGGAGCG-3'

GSP3: 5'-CCAGCCGTCCTTGAGGAACCCTT -3'

NGSP3: 5'-GTCTTCCTGCTCCCCCATATGGC-3'

GSP4: 5'-GCTGATGCCATGGAGATCTGAAGG-3'

NGSP4: 5'-CACGCCAGGGTCAGGAAAAGTCAC-3'

GSP5: 5'-TTTGCCTTGTCACATCGAATCC-3'

NGSP5: 5'-TTCCGAAAAGGATTTCCACATCG-3'

AP1: 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

AP2: 5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3'

1-2-7. rtTLR5S と rtTLR5M の一次構造解析と相同性比較

単離した遺伝子に対する相同性検索は BLAST (<http://blast.genome.jp/>) により行った。モチーフ解析は SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) を用いて行った。シグナルペプチドの予測には GENETIX プログラム、PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>) を用いた。またアミノ酸のアライメントには CLASTSLW (<http://clustalw.genome.jp/>) を用い、BOXSHADE (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) で配列を整形した。

1-2-8. 臓器からのゲノム DNA 抽出

保存しておいた臓器をメスで細かく刻み DNA 抽出バッファーに懸濁し、55°C で 1 時間インキュベートした後、37°C で一晩緩やかに振蕩しながらインキュベートした。Tris 飽和フェノール (pH 8.0) を等量加え、室温で十分に混和し、5,000 rpm、20°C で 5 分間遠心を行い、水層を回収した。さらに PCI を等量加え、室温で十分に混和し、5,000 rpm、20°C で 5 分間遠心を行い、水層を回収し、イソプロパノールを等量加え DNA 沈殿を回収した。得られた DNA 沈殿を TE に溶解し、RNase A (Sigma Aldorich, St. Louis, MO) (終濃度 10 µg/ml) を加え 37°C で 1 時間インキュベートした。さらに PCI を等量加え、室温で十分に混和し、5,000 rpm、20°C で 5 分間遠心を行い、水層を回収した。この操作を 2 度行い完全にタンパク質を除去した後、エタノール沈殿で DNA を回収し、適量の TE に溶解した。

1-2-9. RI 標識プローブの作製

rtTLR5S の検出には Probe S (rtTLR5S の ORF 354-1214 nt) を rtTLR5M には Probe M (rtTLR5M の ORF 1867-2707 nt) の PCR 増幅産物を用いた。[α³²P]dCTP (Daiichi-chemical, Tokyo, Japan) 標識には MegaPrime DNA Labeling System (Amersham Biosciences) を用いた。なおハイブリダイゼーションには 1 × 10⁶ cpm/ml になるようにプローブを加えた。

1-2-10. サザンブロットハイブリダイゼーション

サザンブロットハイブリダイゼーションは Church らの方法に従って行った(32)。10 µg のゲノム DNA を 10 unit の制限酵素 (EcoRI, HindIII, PstI, Sau3AI, AluI, PvuII) で一晩消化し、PCI 抽出を行った後、エタノール沈殿で DNA を回収した。得られた DNA 断片を TE で完全に溶解し、0.7% SEAKEM agarose gel (FMC, Rockland, ME) (10 cm × 10 cm) で分離を行った。DNA を Ethidium bromide で染色を行い、泳動状態を確認した。ゲルを加水分解液で 20 分、DW で 1 分、変性溶液で 30 分処理した後、0.4 M NaOH を使用したアルカリトランスファー法でニトロセルロース膜 (Hybond-N+, Amersham biosciences) に転写した。転写後の膜を 2× SSC で 1 分間洗浄し、UV cross linker (Model: XL-1000, Spectronics Co., Westbury, NY) で DNA を膜に固定した。膜をハイブリダイゼーションバックに入れ、hybridization buffer を加えて 65°C、1 時間プレハイブリダイゼーションを行った後、[α³²P]dCTP で標識したプローブ (1-2-9 参照) を 65°C で一晩ハイブリダイズした。ハイブリダイズした膜を Wash solution 1 で 20 分間、室温で 2 度洗浄し、さらに Wash solution 2 で 10 分間、50°C で 3 度洗浄した。シグナルの検出は Imaging Plate (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan) に膜を暴露することで行い。検出は FLA2000 (Fuji Photo Film) を用いて行った。

1-2-11. RT-PCR

ニジマス臓器（筋肉、精巣、鰓、胃、腸、腎臓、心臓、脾臓、脳、肝臓）より totaRNA を抽出し cDNA とした（1-2-8、1-2-3 参照）。PCR は LA Taq を用い、cDNA 0.5 μ l, 0.5 μ M Primer set [rtTLR5M, rtTLR5S, rtIL-1 β , rtTNF- α , rt- β actin（配列は下記）], 10 μ l の合計量で反応を行った。PCR 条件は rtTLR5M: 94°C, 2 min, (94°C: 30 sec, 55°C: 30 sec, 72°C: 1 min) \times 40 cycle、rtTLR5S: 94°C, 2 min, (94°C: 30 sec, 67°C: 30 sec, 72°C: 2 min) \times 45 cycle、rtIL-1 β と rtTNF- α : 94°C, 2 min, (94°C: 30 sec, 55°C: 30 sec, 72°C: 1 min) \times 30 cycle、rt- β actin: 94°C, 2 min, (94°C: 30 sec, 68°C: 30 sec, 72°C: 1 min) \times 25 cycle で行い、PCR 産物は 1.5% (w/v) の TAE agarose gel にて分離を行い ethidium bromide で染色を行った。

RT-PCR に使用したプライマー

rtTLR5M	5' - CCTTCTGCTGATGGGCCTCG - 3'
	5' - GCTTAAGCATAACAGGCTGTGGAA - 3'
rtTLR5S	5' - CAGTGCTTCAAGTTATCTGCGAGG - 3'
	5' - TCCACATCGTTTCCAGTCAAACC - 3'
rtIL-1 β	5' - GGCGCGGGGGTTACCATGGGAACCG - 3'
	5' - GGCGGTTGGGGGCTGCCTTCTGACA - 3'
rtTNF- α	5' - GACACCTGAAGACATGGAGAGGGGC - 3'
	5' - TCGGTCAGTCGATTGGTCTCAGTCC - 3'
rt- β -actin	5' - ATTCGCCGGAGATGACGCGCCTCG - 3'
	5' - CCTTCTGCATCCGGTCAGCGATGC - 3'

1-2-12. ウサギ抗 rtTLR5M ペプチド抗体の作製

rtTLR5S のアミノ酸配列において抗原性の高い部位は PHYSICO-CHEMICAL PROFILES (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_pcprof.html) を用いて探索し、GENETIX によって 2 次構造の予測を行い、高次構造を形成しないのペプチド断片を選択し、ペプチド (rtTLR5M: aa 274-292) の N 末端にシステインを加え (CTMGKSFSGSFNVKDPDRQT) バイオロジカ (Nagoya, Japan) に合成を依頼した。ペプチドはキャリアタンパク質に結合させて抗原とした。2 mg ミオグロブリン (Sigma Aldrich) を 2 ml の 0.1 M リン酸バッファー、pH 8.0 に溶かし、さらに 3 mg SMPB (Pierce, Rochford, IL) を溶解した 1 ml (1,4)-dioxane を加え混合した。混合物を LH20 カラムでミオグロブリン-SMPB 複合体を分離精製し、ペプチド溶液 (1 mg のペプチドが溶解した 50% (v/v) アセトニトリル/DW + 0.0005% トリフルオロ酢酸、

pH3.9) を加えて激しく混和し、凍結乾燥したものを抗原とした。抗原は PBS 180 μ l に溶解した後、30 μ l ずつ分注して-80°C で保存した。この免疫源に 200 μ l の Freund's complete adjuvant (FCA) (BD Bioscience) を加え、激しく混和した後、PBS 180 μ l を加え、数回シリンジをストロークさせることでエマルジョンとした。1週間おきに、計 8 回ウサギの両足のリンパ節付近に免疫し、8 回目の免疫後、ブーストを行いウサギから採血した。血清中の IgG は、終濃度 33%の硫化アンモニウムを用いて沈殿させ、血清量の 1/10 量の PBS に対して透析した。また IgG のタンパク質濃度は 280 nm の吸光度を測定し、IgG の比吸光係数 ($E^{1\%}$) を 13.6 として求めた。

1-2-13. ウエスタンブロッティング

SDS-PAGE は Laemmli らの方法に従って行った(33)。タンパク質は還元条件（終濃度 50 mM DTT で煮沸）で 10%アクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行った。、PVDF 膜への転写はセミドライ法で行った。転写装置（日本エイドー）の陽極側から順に 1) 転写バッファーに浸した 3MM 濾紙 (ADVANTEC, Tokyo, Japan) 3 枚、2)メタノールで活性化した後転写バッファーで平衡化した PVDF 膜 (Millipore)、3) 転写バッファーで平衡化したゲル、4) 1)と同様、の順で転写装置にセットし、100 mA、1 時間通電し、膜に転写した。膜を 1 時間以上ブロッキングバッファーでブロッキングを行い、抗 rtTLR5M ペプチド抗体（500 倍希釈）で 4°C で 16 時間反応を行った。TT-TBS で十分洗浄した後ブロッキングバッファーで 10,000 倍希釈した HRP 標識ヤギ抗ウサギ Ig 抗体 (BIOSOURCE, Vamarillo, CA) で室温、1 時間反応を行った。TT-TBS で十分洗浄した後 ECL 発光試薬を用いて ECL フィルムで検出を行った。また、リプロービングは湯浴することで行い、抗 Flag 抗体 (sigma) (1 μ g/ml) で室温で 1 時間反応し、続いて 10,000 倍希釈した HRP 標識ヤギ抗マウス Ig 抗体 (BIOSOURCE) で室温、1 時間反応を行い、ECL フィルムで検出を行った。

1-3. 実験結果

1-3-1. ニジマス可溶性 TLR5 の存在

ニジマスに *V. anguillarum* を感染させた際に特異的に発現が誘導される遺伝子中に LRR に高い相同性を持つタンパク質が単離された(30)。全長を RACE によって単離したところ、膜貫通領域以下を持たない TLR5 であることが判明し、ニジマス可溶性 TLR5 (rtTLR5S) とした (図 1-1)。rtTLR5S は 1,992 bp の ORF と 1,168 bp の 3'-UT により成り立っており、664 アミノ酸をコードしていた。また rtTLR5S のヒト TLR5 (huTLR5) 及びマウス TLR5 (moTLR5) に対するホモロジーはそれぞれ 35.6%、37.1%

であった (表 1-1)。

1-3-2. ニジマス膜型 TLR5 の cDNA クローニング

rtTLR5S の発見から膜型 TLR5 の存在が示唆されたが、ニジマスにはゲノムデータベースが無くホモロジークローニングを行う必要があった。そこで現在までに報告があるヒト、マウス及びフグ TLR5 の TIR ドメインのアミノ酸配列を CLASTALW でアライメントし相同性の高い部位で縮重プライマーを作製し (図 1-2A)、PCR を行った。その結果、TLR5 と相同性の高い 123 bp の遺伝子断片を得た (図 1-2B)。この配列を元にプライマーを作製し、ニジマス肝臓 Marathon cDNA library を鋳型として 3'RACE 及び 5'RACE を行った。3'RACE は一度の反応で poly(A) tail を含む配列まで伸長することができたが、5'RACE においては 3 度の PCR を要した。具体的には 1 度目で開始コドン基準にして 1,842 bp まで、2 度目で 628 bp まで、3 度目で 134 bp まで伸長することができた (図 1-2C)。取得した全長配列を再度ニジマス肝臓 cDNA よりクローニングを行い、一次構造を予測し、BLAST サーチを行った結果、TLR5 に相同性の高い遺伝子であることが確認でき、確かにニジマス膜型 TLR5M (rtTLR5M) であると確認することができた (図 1-3)。rtTLR5M は 2,637 bp の ORF と 544 bp の 3'-UTR により成り立っており、879 アミノ酸をコードしていた。rtTLR5M の huTLR5 及び moTLR5 に対するホモロジーはそれぞれ 40.1%、40.5%であった (表 1-1)。

1-3-3. ニジマス TLR5 の一次構造

予想された一次構造を用い、SMART によるモチーフ検索を行ったところ、rtTLR5S は 10 個の LRR を持っており TM、TIR ドメインを持たない可溶性の分子であった。また、rtTLR5M は 10 個の LRR をもち、1 つの TM、TIR ドメインを持つ I 型膜貫通タンパク質であった。また rtTLR5S と rtTLR5M の LRR におけるホモロジーは 81.0% と非常に高かった (図 1-4)。rtTLR5S においては哺乳類の TLR5 にて保存されているシステイン 10 残基のうち 9 残基が、rtTLR5M においてはその全てが保存されていた。さらに N 型糖鎖付加部位は rtTLR5S 及び rtTLR5M においては 2 箇所のみ保存されていた (図 1-5)。

1-3-4. rtTLR5S と rtTLR5M の組織分布

rtTLR5S と rtTLR5M の臓器分布を RT-PCR を用いて解析した。rtTLR5M はユビキタスに発現していることが確認された一方、rtTLR5S は肝臓のみに限局していた (図 1-6)。同時にノーザンブロットも行ったが、濃縮した mRNA を用いた際にも検出限界以下であった (データは示さない)。RT-PCR で検出されるサイクル数が 40 サイクル以上と言うことを考えると、rtTLR5M、rtTLR5S とともに転写量が非常に少ない遺伝子

であることが示唆された。

1-3-5. rtTLR5S と rtTLR5M のゲノム構造の決定

次に、rtTLR5S と rtTLR5M のゲノムにおける配列を決定するために、ゲノムを鋳型とした PCR を行った。その結果、rtTLR5S は開始コドンから 20 bp の位置に 757 bp のイントロンが挿入されていたが、rtTLR5M にはイントロンは存在しなかった。さらに遺伝子構造を解析するために rtTLR5S を検出する Probe S (図 1-7A) でサザンブロットハイブリダイゼーションを行った。その結果、rtTLR5S と rtTLR5M の Probe S 領域においては 90.1% のホモロジーがあることから、Probe S でハイブリダイズをおこなったブロットは rtTLR5S と rtTLR5M のどちらも検出される結果となった。Probe S 領域の下流には EcoRI、HindIII、PstI の制限酵素サイトが存在するが、上流には存在しないことから rtTLR5S 及び rtTLR5M と考えられるシグナルは 2.4 kbp 以上である。しかしながらそれ以下のところに顕著なシグナルが見られ、膜型と可溶型以外にもう一つの TLR5 がニジマスに存在することを示唆された。また Sau3AI、AluI、PvuII は Probe S 領域を挟むように rtTLR5S 及び rtTLR5M で存在しているため見かけ上一つのシグナルとして検出された (図 1-7B)。

そこで rtTLR5M のみを検出する Probe M を Transmembrane (TM) 領域、TIR domain において設計しハイブリダイズを行った (図 1-7A)。予想通り rtTLR5S は検出されず、EcoRI の 1.0 kbp、HindIII の 1.3 kbp 以上のいずれか、また PstI の 1.1 kbp のシグナルが rtTLR5M を示すことが確認できた。また、Probe S で検出されたもう一つの TLR5 遺伝子は TIR ドメインと相同性のある遺伝子配列を持つことがこのブロットで示唆された。また Sau3AI、AluI については Probe M を挟むように rtTLR5M 中に存在するため 1 つのシグナルとして検出された。しかし、PvuII の 3 つのシグナルに関しては Probe M 領域のすぐ上流に一つ制限酵素サイトが存在するのみであり 1.2 kbp 以上であるということ以外には現時点でどのシグナルが rtTLR5M のものであると断定することはできなかった (図 1-7C)。

この解析と平行して詳細なゲノム配列を決定したが、偶然にも rtTLR5M と相同性の高いゲノム配列を得た。ORF の検索を行ったが、どのフレームでもストップコドンが入ることから pseudogene になっておりタンパク質として存在しないと結論した (データは示さない)。

1-3-6. rtTLR5M 抗体の作製

2 章で示すが、rtTLR5M 及び rtTLR5S の哺乳類細胞に一過的に発現させても、ウサギに免疫可能な発現量を得ることはできず、本研究ではペプチド抗体の作製を試みた。まず抗体作製に最適な遺伝子配列を PHYSICO-CHEMICAL PROFILES で免疫源性が

高い部位を検索し、さらに α -helix、 β -sheet 等の高次構造を形成しない部位であることを GENETIX で確認した(図 1-8A)。その結果、rtTLR5M における aa 274-292 (CTMGKSFSGSFNVKDPDRQT) を用いてペプチド抗体を作製した。rtTLR5S を CHO 細胞に一過的に発現させ、免疫沈降によって濃縮したタンパク質で抗体価の確認を行った。抗 Flag 抗体では rtTLR5S が明確に検出できたが(図 1-8B)、抗 rtTLR5S ペプチド抗体ではうっすらとしか検出できなかった。このように、抗体は感度が悪い上に、rtTLR5M 及び rtTLR5S の転写量が少ないことから、本研究においてデータをとることはできなかった。

```

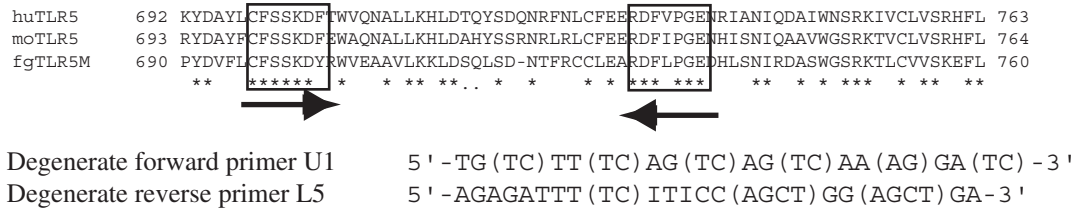
gcagtggttaacaacgcagagtagcgcaggaagcagtggttaacaacgcagagtagcgcggggaagtaaggttatctcatgtagatcactttc 90
aaaaattgctggataggaaagtcagtttctgggtttatgaaatcagtgcttcaagttatctgcgaggggagatctgataaacatactca 180
caagctgtaaacacattctttATGAGCGCGCATCACTTCAGGtaagctacaacttttcatttaattctttgattattgactactcattttt 270
M S A H H F R
7
tgttgaagttgattggttgggtttaaattgatttacttttttttttttaaatgttttacccttttttgacttaacttaatacatgcagaaa 360
atattgatttgtttttcaacattatttgaacctgattgttgacattggatttggcattgaaacttggaggaaaaatgtacaagaacttca 450
aggttcaatgcagccattttgatctccatcaaatcatttctgggtaacaactaagatctaaacttgggatgttttaattaaataggt 540
caaaaagatcaaaaaatagcttctacattctatctttgctcatgcccgtctatgaatttgagagtggtgacatttctccagct 630
cccatcctcagctgttagctcaaaaagcacctttattcattgatataatacaaacaggcctggggaagcctgttacacagactaga 720
gcaaggtgtgtagctggcacacataaagtaggggatttccattagcaggctgggacagaaacagtgactatggaccttaagttaa 810
aacagacagttaaacataaacctcctagccaaggtatgtctcatctgaaggggatacctcaagactgaaatctatccaatattatgtatg 900
tatggtgacctgtaatgacataaacattttttattatatttaataatttgcattattttctacttttgtgcaagGGGATGATGAG 990
G M M R
11
GAACTGTATACTGCTGGTTATCTTTGGAGTCTACCTGCAAGTGGTGAATGCACCCCAAGATGTCCACTATATGGTTATATAGCAGTTTG 1080
N C I L L V I F G V Y L Q V V K C T P R C P L Y G Y I A V C 41
CACC AACCTGCTCTATATCAGGTCCCTGCACCTGCCCTCCATACATTACCATGTGTATATGAGGGATAACTACATCAGTGAGATAAACGA 1170
T N L S L Y Q V P A L P P Y I T H V Y M R D N Y I S E I N E 71
GACGTCTTTCTCTGGGCTTGAAGGGCTAAAGGAACCTGACCTCAGTTGGCAACGTGCAATGGGCTAACTATAAGAACTAACACCTTTCA 1260
T S F S G L E G L K E L D L S W Q R V N G L T I R T N T F Q 101
AAGACTGGCAAACTTGGCAGTGTCTATTTAGGACATAATAGAGGTTTAAAGATTGAGCCAGGTGCCTTTGTGGGACTGTCCAACCTTGAG 1350
R L A N Q V K R I Q P S P F F V N M T D F Q E L N I T L N Q M 191
GGAAAGCATATGTGAGGAAGATTGCTTGGCTTTGTGGAAACACTTTCGGTTGCTCAAATTGAACAGTGTCTCTATATGGTATGAC 1620
E S I C E E D L L G F C G K H F R L L K L N S V S L Y G M T 221
TCAAAATGGTTTTGACTGGAAACGATGTGAAATCCCTTGAAACATGCTATAGAGACACTGACTTATCTTCCAACGGATTCAACGT 1710
Q N G F D W K R C G N P F R N M S I E T L D L S S N G F N V 251
GGACAAGGCTAAATGTTTTCAATGCAATCCAAGGAACGAAATTCACCATATTTCTGGAACACAGCACCATTGGGAAATCATTTGG 1800
D K A K L F N A I Q G T K I H I I L E H S T M G K S F G 281
TTTCAGCAATTTCAAAGCCCAAAAGAAACATTCAATGGCCTCAAGAAATAGTGGCATCAAGATTCTAGATTTGTCCAATGCTTTAT 1890
F S N F K D P N K K T F N G L K N S G I K I L D L S K C F I 311
ATTTGCTTTGCAATATGCAGTATTCACTCCACTGAGAGAGGTAGAGGACATAACATTAGCCCAAAACAAATTAACAGATTGCAGGGG 1980
F A L V L A V F S P L R E V E D I T L A Q N K I N Q I R G 341
GGCGTTTTGGGGTCTTGAATAATTACAAGGCTCAACCTGTACACAATCTTATAGGGAAATCTATTCTTACACATTGACAACTTACC 2070
A F W G L E N L Q R L N L S H N L I G E I Y S Y T F D N L P 371
CAATAATTTAGAAATTAGATTTATCTTACAATCATATTTGGTGCATTTGGGATCAAGGATTTCACAGGACTTCCAACCTACAACCTCGTGA 2160
N I L E L D L S Y N H I G A L G Y Q A F T G L P N L Q I L D 401
TCTTACAGAACTCTATTGCGCAACTAGGTACATATGGTACCTTGCACCACTACCAAACCTGCAACTCTTAATTTGGCTGATAATAA 2250
L T G N S I R Q L G T Y G Y L A P L P N L Q L L N L A D N K 431
GATCACATCCTTAGAGGCTCTTGGGCTTTGCTAACAGTACTATCATCTGAATGTTCAAAACAACAGGTTAACTAATTTAGAGGATGT 2340
I T S L E G L L G F A N S T I I L N V Q N N R L T N L E D V 461
ATACATTGTGTTAGCTAAATTCATGCGCATTGAGCTTATCTGGTATGGTAAACAACAATAAAGTGGTGCATCTTTAGCAGTAAATTTTC 2430
Y I V L A K F M R I E R I W Y G N N N I K W C I F S N C I S 491
TGIGCCCGCTGTAACCTCTCAAAGCTGCTGGAGCTCAGGAACATCGCCCTGCAGATTTTATGGGGACATGGAGTGTGTTTGGACGTATT 2520
V P A V N S L K L L E L R N I A L Q I L W G H G V C L D V F 521
TGAAATCTTATCAAGCTTTTGTCTGGATTTAAGCTTTAAGCTTCTCCAGATGGCATATTCAAAGGCTCGTCTCTCT 2610
E N L I K L F S L D L S F N S L R A L P D G I F K G V L S L 551
GGAAAGAGATGGATCTCAGCTTCAACTCTCTCACATACCTCCAACAGACATTTTCCAGCGAGTCTCAAACAGTTGACCTCTCTTACAA 2700
E E M D L S F N S L T Y L Q P D A I F P A S L K T V D L S Y N 581
TTTCCTCTCTCCAGCCAGCCGCTTTCAGTTCTCTCAGCTGGATCAACTTATATAGGAATCGGCTTCCACTGTGACGGTGGCCTGAA 2790
F L S S P D P A A F S S L S W I N L Y R N R F H C D G G L K 611
GGACTTTCTGACGTGGATGAACAGGACCAACCTGATTTTCCAGACCCCGGCTGGTGAATTCAGCTGTGAGTTCCCTCGGATCTCCA 2880
D F L T W M N R T N V T F P D P G V A E F S C E F S D L H 641
TGGTGTGACGCTGTTGAATTACAGCAAAGTCATAACGGAAGTACCCAAACCATCTTTGACAAAAATATAAaacaagacaattagagt 2970
G V S L L N Y S K V I T E K Y P K P S L T K I 660
tggattattggtgtcattttccatgctatctactctgtttacacaaattgctattgggaatcacattttattttgtgctacaatatcc 3060
tgaatgcatatggcataatgtatgataaaatcacctcatcaaacacattttgattttatcacacagcgtgtaaaaacaaatcagccaaaagac 3150
agtaaaaaggtgtcctccaaaagcatttttcaaatgtttgtctaaggaaaatacatatataatataatattgtcattctgtgctt 3240
ttttcgttattctcaccacaagaccatcctttgtgaagtgtagcctctggactactaaagaggtgctatttgatgcttatttaa 3330
gcaataaaggcccggttagccgtggtatattggccatgtaccacaaaccagaggtgccttattgctattataaactggttaccaacgta 3420
attagagcagtaaaaaacatgattttgtcatgctgtgttatacggctctgatataccaccgctgtcagccaatccgcattcagggtcga 3510
accaccagggttagctatccttatatagccattatttttcatgataatcaatataattgtctattccagagttcattttgcgtgag 3600
gttgcgattatcaacattatgtaatttcagatcatatctgctcctgctcccaaaaacattaccaatataaacttaattctttttta 3690
atgaagataaattgttattctgagaggtcaatgattgtataaacaatgacattttgaaactatccagaacgttttaatttagaga 3780
gaatggatgaataaacatttttttccccagttctacaatgtcacactagtggtgctacaggtgagggcattgtggtgtaattgggtgag 3870
agaggagtgaccagtgaccagttttgagctgaatgaccagtgatgatacaataatggggaatttctctgagtgatatttatctctatt 3960
actaccoccccttctctttgtctaccaagccgtcatatcgacttagccactagggactttgtgtatcatgtcagtaaccaatgtagt 4050
aactattgtgtgtgtgtgtttatgtaattctgtgattgattagttggttaataaataagccaatttggtt 4121

```

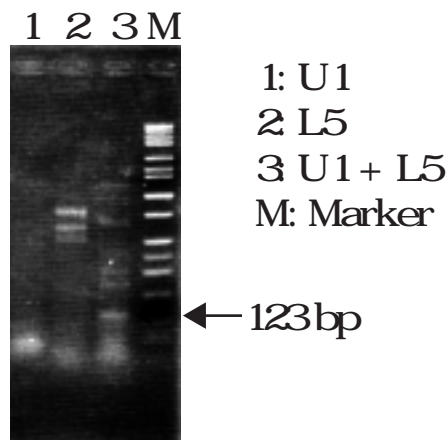
図1-1. rtTLR5Sの遺伝子配列とアミノ酸配列

得られたrtTLR5Sのゲノム配列と予想ORFにおけるアミノ酸配列を示した。rtTLR5Sは1,992 bpのORF、1,168 bpの3'-UT、開始コドンより20 bpの位置に757 bpのイントロンが挿入された遺伝子構造をしており、664アミノ酸をコードしていた。塩基配列において、*V. anguillarum*刺激時に誘導されたESTクローンの配列 (AF281346.1) を下線で、ポリAシグナル配列 (aataaa) は太字で、5'-UT、3'-UT及びイントロンは小文字で、エキソンは大文字で表した。予想アミノ酸配列においてシグナルペプチドを二重線で示した。(GenBank accession No. AB062504)

A



B



C

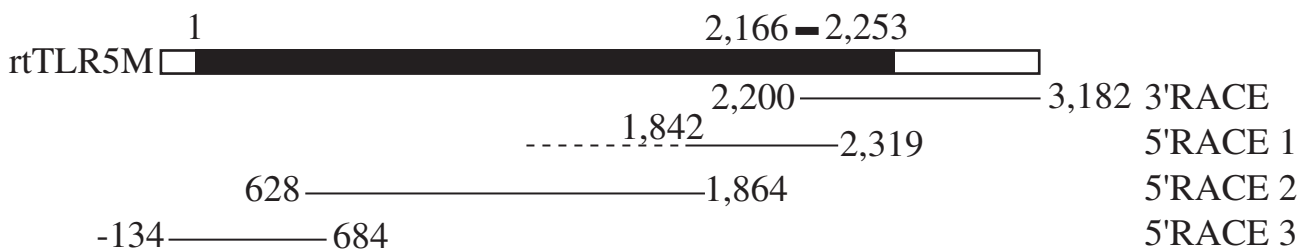


図1-2. ニジマス膜型TLR5単離のストラテジー

A, ヒト、マウス及びフグのTLR5の細胞内領域であるTIRドメインをCLASTALWでアライメントした (GenBank accession No.はそれぞれAB060695、AF186107、フグについてはRef. 31参照)。四角で示した部位において縮重プライマー (Degenerate forward primer U1及びDegenerate reverse primer L5) を設計した。B, 縮重プライマーで行ったPCR結果。予想された123 bpのPCR産物 (矢印) を切り出し、配列を確認した。C, RACEによって得られた断片のrtTLR5M遺伝子配列全長における相関図。縮重プライマーで得られた遺伝子断片を太線で、RACEによって得られた断片を線で、rtTLR5Mとは無関係の遺伝子配列を破線で示した。図中の数字はrtTLR5Mの開始コドンとしたときの相対塩基番号である。


```

acggggcaccggccatgctaaacgaacgcgctcagacttactctgtaaaggggtgtaacctatccataaacataactcaccaac 90
tcgagcgcataatgtgcttatcagcgcgcataaactcagggggATGATGAGGAACTTATACTGCTGGCTATCTTTGGAGAACTCTGC 180
M M R N L I L L A I F G E Y L
AGGTGGTGAATGCAACCCAAATGCCAATATATGGCTCTATAGCAGCTTGACCAGCCAGTCTCTATATCAGGTCCTGCGTGCCTC 270
Q V V K C N P K C P I Y G S I A A C T S Q S L Y Q V P A L P
CATACATTTACCATTTGTATATGAGGGTAACATACATCAGTGAATCAGTGAATCAGTGAATCAGTGAATCAGTGAATCAGTGAATC 45
P Y I T I L Y M R D N Y I S E I N E T S F S G L E G L K E L
ACCTCAGTTGGCAACAAGTGAATGGGCTTATTATAAGAACTAACACCTTTCAAAGGCTGGAAAACCTTGGCAGTGTCTTTATTAGGTATA 450
D L S W Q Q V N G L I I R T N T F Q R L E N L A V L Y L G Y
ACACAGGTTTACAAATGGACCCAGATGCGTTTGTGGGACTGTCCAACCTGAGAGCGCTCTCTGTATAGGTGTGACCTGACTGAATCTA 540
N T G L Q I E P D A F V G L S N L R A L S L Y R C D L T E S
TTTTACAGGGTACTATCTCAAGCCCTGGTTTCCCTGGAAACACTAGATCTGTATGGTAAACCAGGTGAAAATAATCCAACCTGCTCTAT 630
I L Q G D Y L K P L V S L E T L D L Y G N Q V K I I Q P A L
TCTTTGTGAACATGACCGATTTCCAAGAGCTAAACGTTTCCCTAAACCGGATGAAAAGCATATGTGAGGAAGATTGGCTTTGGCTTTCAAG 720
F F V N M T D F Q E L N V S L N R M E S I C E E D L L G F Q
GCAACACTTTCCGGCTCTCAAGTTGAACAGCCTCTATCTATATAGCAGTACTCAGTATGGCTTTGACTGGAAAACGATGTGAAAATCCTT 810
G K H F R L L K L N S L Y L Y S M T Q Y G F D W K R C G N P
TTCGGAACATGTCATGGAGACACTTGACTTATCTTCCAATGGATTCGATGTGGACAAGGCAAACTGTTTTTCAATGCAATCCAAGGGA 900
F R N M S M E T L D L S S N G F D V D K A K L F F N A I Q G
C AAAATCCACCATTTATTCTGGAACACAGCAGCCTTAAAGGAAATCATTGGTTTTCAGCAATGTGAAAGACCCAGGCAACACTTTG 990
T K I H H I L E H S C T M G K S F G F S N V K D P D R Q T F
AGGGCCTCGAATAGTAGTGTCAAGATTCTAGATTGTCCAAATGCTTTATATTTACATGCAATATGCAATATGCAATATGCAATATGCAAT 1080
E G L E N S S V K I L D L S K C F G F I F T L Q Y A V F S P L R
AGGTAGAGGACATAACAATAGCCAAAACAAAATTAACCAGATTGACAGGGAGGCGTTTTTTGGTCTTCAAAATGTACAAAAGCTCAACC 1170
E V E D I T I A Q N K I N Q I D R E A F F G L Q N V Q K L N
TGTCACAACTTTATAGGGGAAATCTATTTTACACGTTTGACAATCTACCAATATTTTAGAAGTATAGATATATCTTACAACCATATTG 1260
L S H N L I G E I Y S Y T F D N L P N I L E L D I S Y N H I
GTGCATTTGGGATATCAGGCATTTAAAGGACTTCCAAACCTACAAGTTCTGGATCTTACAGGAACTCTATTCCGGGACTAGGTACATATG 1350
G A L G Y Q A F K G L P N L Q V L D L T G N S I R G L G T Y
GTTCTTTGCACCACTACCAAACTCAAACTTCTCGTTTGGCTGATAAAGATTACATCCTTAGAGGGCCTCTCTGTCTTTGGCTCTTA 1440
G S L A P L P N I Q L N S L R L Y L A D N K I T S L E G L S V A P
GTACGATCATACTTAATGTTCAAAAACAGGTTAACTAATTTAGAGGATGTATACACAGTTTTAGCTAAATTAATGCACATGAGTTTC 1530
S T I I L N V Q N N R L T N L E D V Y T V L A K L M H I E F
TCTGTATGGTAACAACCTCATAAAAGTGGTGACCCCTTAAACAATAATTTTCAGTCCAGCTGTGAACTCTCTGAAGCTGTGAGCTAA 1620
L W Y G N N F I K W C T L N N N I S V P A V N S L K L L E L
GGACATCGCCTTGAGATGATATGGGACGGGAGAGTGTATGCATGTATTCAACATCTTTGGCAAGCTTTTAAAGTCTGGATTTAAAGT 1710
R N I A L Q M I W A R G E C M H V F Q H L G K L L R S L S
TTAACTCCCTGCGAGCTCCCCAGATGGTATATTTAAAGGCCTCATCTCTCTGGAAGAGATGGATCTTCACTTCAACTCACTCACATACC 1800
F N S L Q A P P D G I F K G L I S L E E M D L H F N S L T Y
TCAACAAGACATTTTCCAGAGAGTCTCAAAACGGTTGATCTCTTACAATTTCTGGCCTCTCTGACCCAGAAGCTTTCCATTCTC 1890
L K Q D I F P E S L K T V D L S Y N F L A S P D P H F S
TCAGCTGATCAACCTGTATAGAAATCAATCCACTGTGACTGCGGCTGGAGGACTTTCTGACGCGCTGAAAGGACTAACCTGACTT 1980
L S W I N L Y R N Q F H C D C G L E D F L T R L K G T N V T
TTCCTGACCCCTGGCGTGAATGAATTCAGCTGTGAGTTCCCTTTCAGATCTCCATGGCATCAGCCTGTGAATTTCACTCAGTCAATCGT 2070
F P D P G V N E F S C E F P S D L H G I S L L N F S S V I S
GTGAGGAGGATGACGAGAGGCTGGTTCAAGGAGCTGAGGCTCTCGCTCTTCATCGGCTGCACAGCGCTCATCATCTGATCATGGTCGGAT 2160
C E E D R L V Q E L R L S L F I G C T A L I I L I M V G
CAATCTTTTCACTCGTCTCCGTTGATTCTCTTCAAAGTTTATAAAAAGTTGACCCAGGATCCTTGAGGGCCCTAGGAGGGATCCCTT 2250
S I F F T R L R G F L F K V Y K K L T A R I L E G P R R D P
CTGCTGATGGGCTCGTACGAGCTTACTTATGCTTCAGNCAACAGCTACAAGTGGGTAGAACCAGCCCTGTTGAACAGACTAGACT 2340
S A D G P R Y D A Y L C F S N N D Y K W V E T A L L N R L D
CTCAGTTGCGGGAGCGAAACGTCCTCCGCTGCTGCTCGAGGTGAGACTTTCATCCAGGTGAAGATCACCTGTTCAATATCAGGGACG 2430
S Q F A E R E N V L R C C F E V R D F I P G E D H L F N I R D
CCATATGGGGAGCAGGAAGACCGTTTGTATGCTCTTAAAGGTTTCCCTCAAGGCGGCTGGTGCTGGAGGCTTTTACCTGCTCAGA 2520
A I W G S R K T V C I V S K G F L K D G W C L E A F T L A Q
GCAGGATGTGGAGGAGCTCAGAGATGTTCTCATCATGGTGGTCTGGGGAATGTCCCCATTACAGACTGATGAAACATGAAGGCATTA 2610
S R M L E E L R D V L I M V V V G N V P H Y R L M K H E G I
GGACCTTTGCCAGAGAGGAGTACCTGCACTGGCCGAGGACACAGGATATCAATGGTTCTATGAGAAGCTCATGTCCAGATTC 2700
R T F A Q K R E Y L Q W P E D T Q D I Q W F Y E K L M S K I
TTAAGGACAAAAGTACACCTCCAAGATAACAATAGGATATCACACTTGTAAATATGACAGTTGGAACCTTAAtgttgtgactcattt 2790
L K D K K Y T S K D N N R D I T C T L V N M T V G T
ttccacagcctgtatgcttaagcgaataatcttatttaactgtactgtgaattcttacctcagtcatttttattttgtctgtatagcatta 2880
agaacttttcccatattgattacaggcaaaatggagagggtcctctgtcttttgcatagcttgttttgaccactagggtggcagtcacac 2970
ctttattcactaatattggaactgtgaaactgtacctctgtataaatcaaatcaaattttattgggtcacatacacatatttagcagatg 3060
ttattgcaggtgtagcgaatgcttctattttttgaagttttttttttaagtgaagaaataacaaaatacaaaaatacaaaaatacaaaaata 3150
attgctttggcgctagaagcagagctgcatgtctgtcggcgccatctatgatgtgttttgagtggtacaatgcaaaagtctcgtgg 3240
cttaccatttacacgttgaataataactaatgaaggattttgggtacttttaataaacattccaacttctctact 3315

```

図1-3. rtTLR5Mの遺伝子配列とアミノ酸配列

得られたrtTLR5Mのゲノム配列と予想ORFにおけるアミノ酸配列を示した。rtTLR5Mは2,637 bpのORF、544 bpの3'-UTによって成り立っており、879アミノ酸をコードしていた。なお、rtTLR5Mにイントロンは存在しなかった。塩基配列において、縮重プライマーで得られた配列を下線で、ポリAシグナル配列 (aataaa) は太字で、5'-UT、3'-UTは小文字で、エキソンは大文字で表した。予想アミノ酸において、シグナルペプチドを二重線で、膜貫通領域を太線で、TIRドメインを灰色の網掛けで示した。(GenBank accession No. AB062504)

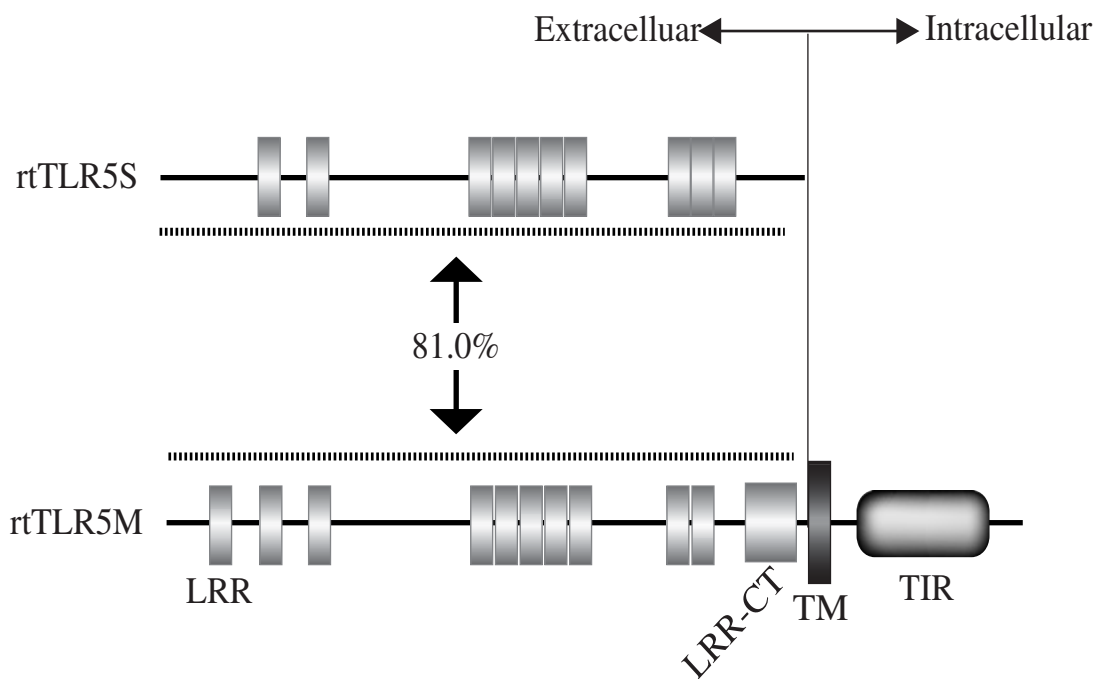


図1-4. rtTLR5M、rtTLR5Sのドメイン構造

rtTLR5M及びrtTLR5Sの推定ドメイン構造をSMARTによって予測した。rtTLR5MとrtTLR5Sは細胞外に10個のLeucine rich repeat (LRR)を持ちLRRドメインを形成していた。これに加えrtTLR5Mは、Leucine rich repeat C-terminal region (LRR-CT)、膜貫通領域 (TM) 及び Toll/IL-1 receptor homology (TIR) ドメインを有していた。また、rtTLR5MとrtTLR5SのLRRドメインにおけるアミノ酸の相同性は81.0%と非常に高い値を示した。

fgTLR5S	1	-----WLLAPASVWCVL--L-QLPGA-FDSGLSLSAAL-CSSRSRDRVPPPLPPVHLY-LEMNRIRAFINSSLSGLEQDQVLD	75
rtTLR5S	1	MSAHFRGMGR-NCIL-IVIFGVY-LO-VVKCTPRCP-LYGLTAVQTNLSLQVPPALPPYTH-HVMYRDNYISFINETSFSGLBEBKBLD	84
rtTLR5M	1	-----MMR-NLIL-IALIFGEY-LO-VVKCNPKCP-IYGSIAACTSQSLQVPPALPPYTH-ILYMRDNYISFINETSFSGLBEBKBLD	76
fgTLR5M	1	-----MFTA-LHL-VFLMWLQ-VSTCYBSC-TLSGLIANCAFKNHSWPLLPNNIT-RLPLNINRI-BEINRTSLRLYQEBEKLD	76
moTLR5	1	-----M-ACQDMLIGVIFMASPVLVISP-CS-SDGRIAFFRGNLQIPLWILNITRERLDSFNYSIMVAVTSFPLERLQDLE	77
huTLR5	1	-----M-GDHLDLLGVVLMAGFVFGIPS-CS-FDSRIAFYRFNLQIPLWVPLNITTE-RLLSFNYSIRTVTASFPFLERLQDLE	76
		*	
fgTLR5S	76	LGSDVPLVIRNEA-FSR-LRHRLSLVLCFNRGLQLEPRAFVGLSRVKVLDLQV-CSLNDSILITENFTEPLASLETNLFENKIKRIRP	161
rtTLR5S	75	LSWORVNGLTIRT-NTE-QRLANLAVMLGHNRLKTEPEAFVGLSNLRTLSL-YVCDLITE-ILQGDYLRPLVSLKTDLLYGNQVKRIQP	171
rtTLR5M	87	LGSDVNGLTIRT-NTE-QRLANLAVMLGHNRLKTEPEAFVGLSNLRTLSL-YRCDLITE-ILQGDYLRPLVSLKTDLLYGNQVKRIQP	163
fgTLR5M	77	LGSDVPLVIRNEA-FSR-LRQRKQLVWVGLQQL-----F-----LD-Y-CBLTESVLAESVLAPLLSQLEDLQYNOISTLRP	145
moTLR5	77	LGSDVPLVIRNEA-FSR-LRQRKQLVWVGLQQL-----F-----LD-Y-CBLTESVLAESVLAPLLSQLEDLQYNOISTLRP	163
huTLR5	78	LGSDVPLVIRNEA-FSR-LRQRKQLVWVGLQQL-----F-----LD-Y-CBLTESVLAESVLAPLLSQLEDLQYNOISTLRP	162
		*	
fgTLR5S	162	SAPFANMKLKFNLKLNLSDRICBPDLESFOCKRFGA-DVSSARFLGLSSKGFWDKTCGNPFGKMSPHLILDLSSNNGEVAASQOQFRAV	251
rtTLR5S	172	SPFFVNMDFQELNITLQMESICBEDDLGFCCKRFLKLNLSVYEMTQNGFDWRCGNPFRNMSITLDDLSSNNGEVDKAKLFNAI	261
rtTLR5M	164	ALFFVNMDFQELNITLQMESICBEDDLGFCCKRFLKLNLSVYEMTQNGFDWRCGNPFRNMSMETLDDLSSNNGEVDKAKLFNAI	253
fgTLR5M	146	GLFPSQLYFTEINLDLNPTRLCBSDLVGFQCKRFLKLNLSVYEMTQNGFDWRCGNPFRNMSMETLDDLSSNNGEVDKAKLFNAI	235
moTLR5	164	HSSFRNLNSLSDVNFANQLFTLCEBDEPLQCKLTSFPLKTKFSRVSVG--WSTGRNPPFRVRLTDLSSNNGEVDKAKLFNAI	251
huTLR5	163	HPSEKGLMSLKSIDFSSQLFLVCEBDEPLQCKLTSFPLKTKFSRVSVG--WSTGRNPPFRVRLTDLSSNNGEVDKAKLFNAI	250
		*	
fgTLR5S	252	QGTIKSHLKLQYQ-GKGFSSNLDPPDSSSTFEGLRNNSVLLDLSQGRIFALRQGVFVWLVVATIIDVSNRNVQIHRNFAEGLBGLRLK	340
rtTLR5S	262	QGTIKSHLKLQYQ-GKGFSSNLDPPDSSSTFEGLRNNSVLLDLSQGRIFALRQGVFVWLVVATIIDVSNRNVQIHRNFAEGLBGLRLK	351
rtTLR5M	254	QGTIKSHLKLQYQ-GKGFSSNLDPPDSSSTFEGLRNNSVLLDLSQGRIFALRQGVFVWLVVATIIDVSNRNVQIHRNFAEGLBGLRLK	343
fgTLR5M	236	QGTIKSHLKLQYQ-GKGFSSNLDPPDSSSTFEGLRNNSVLLDLSQGRIFALRQGVFVWLVVATIIDVSNRNVQIHRNFAEGLBGLRLK	324
moTLR5	252	QGSQSSLLKHLHMGDFGFGONTRDPPDQSTPASLARSVVLQDLSHGRTFLNPRFSTLQDLKMLNLSNKNIKENAFYELDGLQV	341
huTLR5	251	SKSQAFSLHLHMGDFGFGONTRDPPDQSTPASLARSVVLQDLSHGRTFLNPRFSTLQDLKMLNLSNKNIKENAFYELDGLQV	340
		*	
fgTLR5S	341	MNLSNLLGELVSHHFASLHMLKVLDSLNHIGALGYGFRLELNEALFLTGNSLSRLGPPSLPKQYLVH--LRNLSLSSASSLAAQ	427
rtTLR5S	352	MNLSNLLGELVSHHFASLHMLKVLDSLNHIGALGYGFRLELNEALFLTGNSLSRLGPPSLPKQYLVH--LRNLSLSSASSLAAQ	440
rtTLR5M	344	MNLSNLLGELVSHHFASLHMLKVLDSLNHIGALGYGFRLELNEALFLTGNSLSRLGPPSLPKQYLVH--LRNLSLSSASSLAAQ	432
fgTLR5M	325	MNLSNLLGELVSHHFASLHMLKVLDSLNHIGALGYGFRLELNEALFLTGNSLSRLGPPSLPKQYLVH--LRNLSLSSASSLAAQ	411
moTLR5	342	MNLSNLLGELVSHHFASLHMLKVLDSLNHIGALGYGFRLELNEALFLTGNSLSRLGPPSLPKQYLVH--LRNLSLSSASSLAAQ	424
huTLR5	341	MNLSNLLGELVSHHFASLHMLKVLDSLNHIGALGYGFRLELNEALFLTGNSLSRLGPPSLPKQYLVH--LRNLSLSSASSLAAQ	423
		*	
fgTLR5S	428	PANIKYL-NIKENHINLEDVHVFIDQ--LRELQILLYGGNTVRWCTLSQNGSAAVWNKLDVLDLHGSSQAVWAQDQDNLDFGJLHV	514
rtTLR5S	441	PANSTI-ILNVQNRLINLEDVHIVLAKF-MRIERIWYGNNNIK-WCFPSSNISVPAVNSLKLLELRNIAQLILWGHVQVDFVFNLIK	527
rtTLR5M	433	PAPSTI-ILNVQNRLINLEDVHIVLAKL-MHIEFLWYGNNFIK-WCTLNMINI-SVPAVNSLKLLELRNIAQLILWGHVQVDFVFNLIK	519
fgTLR5M	412	LIANST-YMDVRDNRNLNLEDVVMILITDF-HRELETMFGGNLIK-WCTLNRRKAVPINTGLKVDVHDSQKVMESKCDLDFHLLNL	498
moTLR5	425	TANFLE-LSE--NRLNLSLDFLVRVPL--QPLILNQRLS-SKAAHTPSNENPS--LQQLFLENMQLAWETSQADVFQGLSRL	505
huTLR5	424	TANLIH-LSE--NRLNLSLDFLVRVPHL--QPLILNQRFSS-SKGDQTPSNENPS--LQQLFLENMQLAWETELQDFVFGLSH	504
		*	
fgTLR5S	515	ADNLNSNQLQLDQVFOGLASVWMDLSSNLTYLQDILPHSLRKLNSNFIAPDPAAFRSLSHDLSSRFHCITRNLRGFLW	603
rtTLR5S	528	FSDDLNSLRAIPDQIFKGLVSEEMDLSFNLTYLQDIPASLKTVDL-SYNFSSPDPAAFSLSWNLNLRNPHOCGGSLKDFLW	616
rtTLR5M	520	LSDDLNSLRAIPDQIFKGLVSEEMDLSFNLTYLQDIPASLKTVDL-SYNFSSPDPAAFSLSWNLNLRNPHOCGGSLKDFLW	608
fgTLR5M	499	RGDLNSLRAIPDQIFKGLVSEEMDLSFNLTYLQDIPASLKTVDL-SYNFSSPDPAAFSLSWNLNLRNPHOCGGSLKDFLW	587
moTLR5	506	QVLYLNSNVLNFPDQIFKGLVSEEMDLSFNLTYLQDIPASLKTVDL-SYNFSSPDPAAFSLSWNLNLRNPHOCGGSLKDFLW	594
huTLR5	505	QVLYLNSNVLNFPDQIFKGLVSEEMDLSFNLTYLQDIPASLKTVDL-SYNFSSPDPAAFSLSWNLNLRNPHOCGGSLKDFLW	593
		*	
fgTLR5S	604	LNINVTFLSEVHKLR-TE-PLGWYKVPLEYYAAQFAQQ	641
rtTLR5S	617	MNRINVTFPDEGVAEFSCEPESDTHCVSLLNYSKVIKTEKYPKPSLTKI	652
rtTLR5M	609	LKGINVTFPDEGVAEFSCEPESDTHCVSLLNYSKVIKTEKYPKPSLTKI	696
fgTLR5M	588	LNINVTFLSEVHKLR-TE-PLGWYKVPLEYYAAQFAQQ	675
moTLR5	595	LNINVTFLSGSPADYV-CVYVDSFSSVSLFSLST--EGCDEEVLKS--LKFSLEIVCTVTLTLFLMTLITVT-KRFGFCIQYKTAQRL	678
huTLR5	594	LNINVTFLSGSPADYV-CVYVDSFSSVSLFSLST--EGCDEEVLKS--LKFSLEIVCTVTLTLFLMTLITVT-KRFGFCIQYKTAQRL	677
		*	
fgTLR5S	697	ILEGPRRDPDAGPRFDAYLFCFSNNDYKIVETALELNRDLSQFAERNVLRCCCEVRDFLPGEDHLFNRDAIWSRKRIVLVSXGFLKQGW	786
rtTLR5S	676	VLDAPKPPAITDQEPDVFICFSKQYRWEAVALKLDSDNTF-RCCCEARDPLPGEDHLFNRDAIWSRKRIVLVSXGFLKQGW	764
fgTLR5M	679	VFKDKVWLEFGAYRFDAYLFCFSKQYRWEAVALKLDSDNTF-RCCCEARDPLPGEDHLFNRDAIWSRKRIVLVSXGFLKQGW	768
moTLR5	678	VFKDHPQGTEDMYKVDAYLFCFSKQYRWEAVALKLDSDNTF-RCCCEARDPLPGEDHLFNRDAIWSRKRIVLVSXGFLKQGW	767
huTLR5	678	VFKDHPQGTEDMYKVDAYLFCFSKQYRWEAVALKLDSDNTF-RCCCEARDPLPGEDHLFNRDAIWSRKRIVLVSXGFLKQGW	767
		*	
fgTLR5S	787	CLEAFYLAQSRSLSEEDRDLVIMVVGNVPHYRLMKHEGIRDFPAQRREYLDWPEDDQDIQNFYEKLMKSLIKRKKYTSKDNRRDITLVNM-	875
rtTLR5S	765	CLEAFYLAQSRSLSEEDRDLVIMVVGNVPHYRLMKHEGIRDFPAQRREYLDWPEDDQDIQNFYEKLMKSLIKRKKYTSKDNRRDITLVNM-	854
rtTLR5M	769	CLEAFYLAQSRSLSEEDRDLVIMVVGNVPHYRLMKHEGIRDFPAQRREYLDWPEDDQDIQNFYEKLMKSLIKRKKYTSKDNRRDITLVNM-	858
fgTLR5M	768	CLEAFYLAQSRSLSEEDRDLVIMVVGNVPHYRLMKHEGIRDFPAQRREYLDWPEDDQDIQNFYEKLMKSLIKRKKYTSKDNRRDITLVNM-	857
moTLR5	876	TVGT	879
rtTLR5S	855	ESIQLQGIRAPQL	867
fgTLR5M	859	S	859
moTLR5	858	S	858
huTLR5	858	S	858

図1-5. TLR5ファミリーのアライメント

ニジマス膜型・可溶型TLR5、フグ膜型・可溶型TLR5、マウスTLR5及びヒトTLR5をCLASTALWを用いてアライメントした後、BOXSHADEで配列整形した。哺乳類で保存されているシステインはrtTLR5Mでは全て、rtTLR5Sでは10箇所のうち9箇所が保存されていた。また、N型糖鎖付加部位は6カ所のうちrtTLR5M及びrtTLR5Sともに2カ所のみ保存されていた。なお保存されているシステインをアスタリスクで、N型糖鎖付加部位を四角で、TIRドメインにおける機能ドメイン (Box1, 2, 3) を示した。

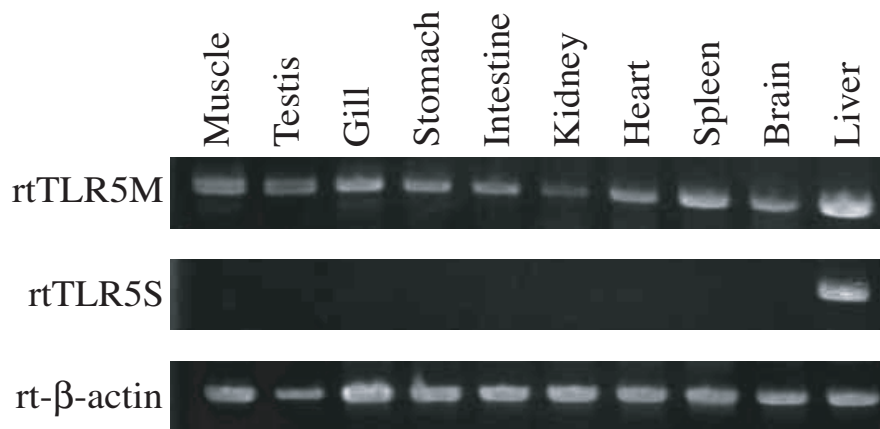


図1-6. rtTLR5MとrtTLR5SのmRNAの組織分布

rtTLR5MとrtTLR5Sを分離検出できるプライマーを用いて、それぞれのmRNAの組織分布をRT-PCRによって検討した。コントロールとして、β-actinに対するプライマーを用いて、シグナルが飽和しない条件で検討を行った。rtTLR5Mは広範囲の臓器に発現が確認されるが、rtTLR5Sは肝臓に局限していた。

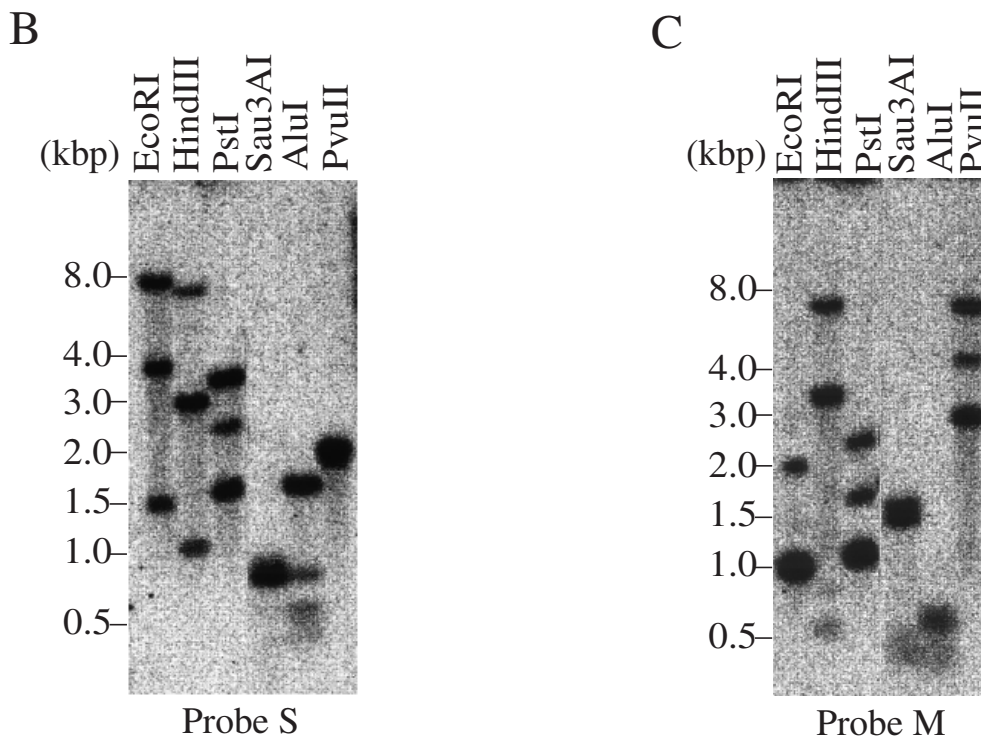
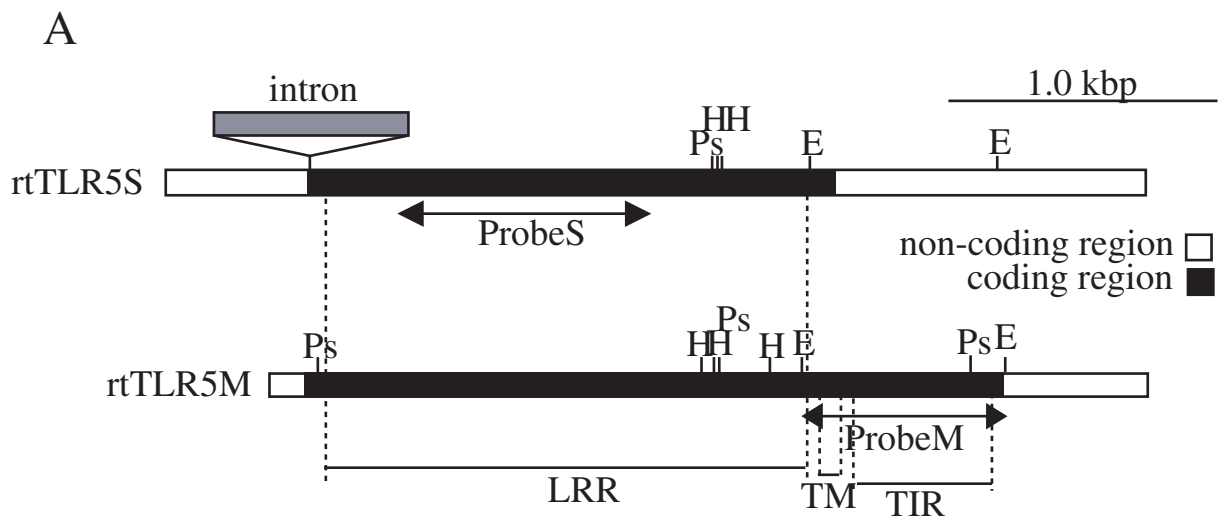
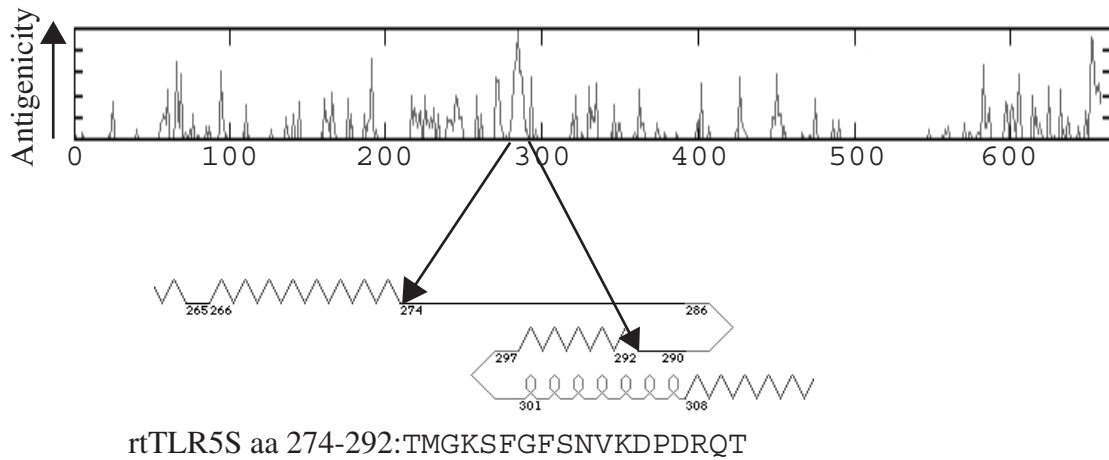


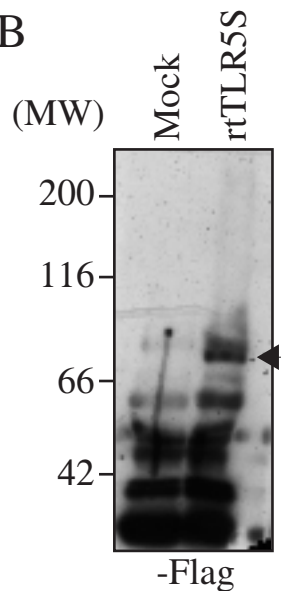
図1-7. rtTLR5MとrtTLR5Sの遺伝子構造

A, rtTLR5M及びrtTLR5Sのエキソン、イントロン構造。ORFは黒で、3'-UTおよび5'-UTは白抜き、rtTLR5Sのイントロンは灰色で挿入部とともに示す。なおrtTLR5Mにイントロンは存在しなかった。BおよびCのサザンブロットハイブリダイゼーションで用いたプローブ部はProbe S及びProbe Mとして示した。また制限酵素サイトをE (EcoRI)、H (HindIII)、Ps (PstI)として示す。B, C, サザンブロットハイブリダイゼーション。10 μ gのニジマスゲノムDNAを表記の制限酵素で消化した。DNA断片をアガロースゲルで分離し、Hi-bond N+ nylon membraneに転写した。シグナルはProbe S (B)及びProbe M (C)を用いて検出した。なお分子量マーカは左に記した。

A



B



C

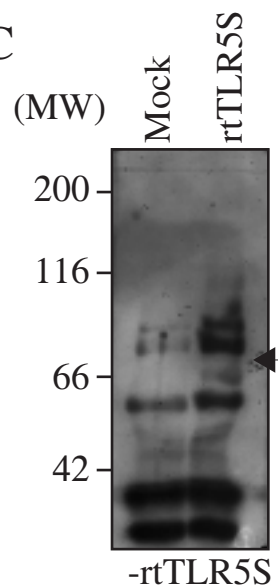


図1-8. rtTLR5Sペプチド抗体の作製

A, rtTLR5Sにおける抗原性の高い部位をNPS@ : PHYSICO-CHEMICAL PROFILESで検索し、さらにその2次構造をGENETIXで確認した。結果をもとにrtTLR5Sのアミノ酸274-292を採用し、ペプチド抗体を作製した。B,C, Flagタグ標識rtTLR5SをCHO-K1細胞に一過的に発現させ、抗Flag抗体(B)、続いて抗rtTLR5Sペプチド抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。矢印は抗Flag抗体で検出されたrtTLR5Sの位置を示す。Bにおいて確認されたrtTLR5Sは、抗rtTLR5Sペプチド抗体で検出を行った際(C)にも微量ながら確認されたが、その力価は非常に低いものであった。

表 1-1. rtTLR5M 及び rtTLR5M とヒト、マウス、フグ TLR のアミノ酸配列における
 相同性

		huTLRs									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
rtTLR5M	total	22.99	25.14	24.34	23.72	40.59	22.85	24.21	24.51	24.27	23.93
	LRR	17.28	18.57	21.70	19.50	33.66	17.11	18.78	19.74	18.96	18.85
	TIR	24.83	29.53	28.00	26.17	58.11	23.49	25.50	26.17	29.80	25.50
rtTLR5S		18.35	17.72	21.04	21.25	35.64	18.32	21.01	20.21	18.61	19.01

		moTLRs										
		1	2	3	4	5	6	7	9	11	12	13
rtTLR5M	total	19.89	19.95	22.76	21.19	40.45	19.48	20.38	20.67	16.04	19.16	22.37
	LRR	18.37	21.24	20.99	19.58	34.46	18.85	18.88	18.02	17.89	17.39	19.04
	TIR	26.17	28.19	26.67	24.83	60.81	24.83	25.50	29.80	23.49	26.85	32.43
rtTLR5S		18.50	20.78	20.00	20.72	37.09	18.80	21.12	17.53	20.00	18.08	20.74

		fgTLRs									
		1	2	3	5	5S	7	8	9	21	22
rtTLR5M	total	18.98	18.87	22.18	48.54	-	21.04	20.33	20.53	21.39	21.79
	LRR	17.70	16.90	19.73	43.32	44.87	18.98	18.27	17.87	18.26	18.12
	TIR	27.52	23.08	28.67	66.89	-	26.17	25.50	27.45	32.68	33.11
rtTLR5S		16.99	17.74	21.12	46.70	48.20	19.40	18.15	20.10	19.43	18.98

rtTLR5M 及び rtTLR5S と現在までに報告されているヒト、マウス及びフグ TLR とアミノ酸レベルで比較し rtTLR5M においては全長 (total)、LRR ドメイン (LRR) および TIR ドメイン (TIR) でそれぞれ比較した場合の相同性を示した。なお一番高いスコアを示した物については太字で示した。

1-4. 考察

自然免疫と獲得免疫が密接にリンクすることで強力な異物排除機構が誘導されることは周知の事実である。しかしながら、進化の上で、獲得免疫の出現は軟骨魚類からそれ以前の生物には備わっていない。その狭間は魚類に存在し (図 II)、自然免疫と獲得免疫の相互作用の原型を持っていると考えられる。そこで筆者は魚類の自然免疫に焦点を当て研究を行ってきた。

本章ではニジマスに可溶型 TLR5 (rtTLR5S) と膜型 TLR5 (rtTLR5M) が存在することを明らかにした。今回発見した rtTLR5M 及び rtTLR5S は独立の遺伝子座にコードされており、何らかの選択圧がかかり遺伝子重複が起こることで生じたと考えられた。しかし現在までに報告されている可溶型の TLR と幾分機構が違う。マウス可溶型 TLR4 は LPS 刺激時に negative regulator として発現される分子であるが、その発現機構は alternative splicing による。ヒト可溶型 TLR2 は単球が刺激を受けることで膜上の TLR2 を遊離させて生じる (post-transcriptional regulation)。可溶型 TLR2 は主に血漿及び母乳に存在する。おもな産生細胞は単球であり、単球が TLR2 のリガンドで刺激されることにより可溶型 TLR2 が生じ、TLR2 のリガンド認識を調節していると考えられている。また、ヒト可溶型 TLR5 は single nucleotide polymorphisms (SNPs) によって生じる分子であり、在郷軍人病 (レジオネラ菌による重度大葉性肺炎) の重篤化に関与する SNPs であることが報告されている。これらの可溶型 TLR において基本となる遺伝子配列は同一である。さらに、同じリガンドを認識すると予想される 2 つの TLR が独立の遺伝子座にコードされる例としては、当研究室で単離されたニワトリ TLR2 (chTLR2 type1 及び type2) がある。chTLR2 type1 で認識できるグラム陽性菌の数は限られるが type2 においてはグラム陰性菌も含めて広く認識することができる。このように LRR の一部が変化することによってリガンドの認識範囲が広がった鳥類に特異的に存在する TLR 認識機構がある(34)。しかしながら、独立の遺伝子座に同一のリガンドを認識すると予想される膜型と可溶型の 2 種の TLR が存在することは魚類に特異的で、新奇の認識機構と考えられた。

また rtTLR5M と rtTLR5S の細胞外領域におけるアミノ酸配列は 81% のホモロジーを示した。さらに遺伝子構造において rtTLR5S には開始メチオニンからわずか 20 bp の領域にイントロンが存在することに加え 5'UT が長い。しかし開始メチオニンから 3'UT までの mRNA の長さはほぼ同じになる。これらの結果より、rtTLR5M は rtTLR5S 及び Pseudogene の祖先遺伝子であり、TLR5 遺伝子が重複することによって生じたことが示唆された。つまり rtTLR5S は水中生活に必要な分子であったと予想され、rtTLR5M を鋳型にして積極的に遺伝子組み換えを行い獲得する必要があったと考えられる。事実、陸上で生活する哺乳類では見つかっておらず、可溶型 TLR5 は進化の

過程で失われたのではなく魚で生じた分子であると考えられる。また、ホヤの TLR は3種類のみ存在することから、頭索類から円口類さらに軟骨魚類への進化で TLR のバリエーションが広がり、その過程で TLR5 が生じ、各々の魚種で可溶型 TLR5 を備えたことが予想された。(終章参照、(31))。また TLR の進化で重要な位置を占める頭索類、円口類の TLR に関する知見は皆無で、今後解析を行うのは必須事項であると考えられる。

さらに、rtTLR5M と rtTLR5S 及びヒト及びマウス TLR5 をアライメントし、機能ドメイン及びアミノ酸の比較解析を行った。rtTLR5S は LRR CT 以降のタンパク質が存在しないことで可溶型分子として存在するが、LRR においては比較的高いホモロジーを示した。対して rtTLR5M は LRR、TIR ともに高いホモロジーを示した。しかしながら、TIR ドメインは非常に高い値を示すのに対し、LRR はそれに追随しない。事実、TIR ドメインは様々なレセプターに存在するし、LRR も転写調節因子として存在する物もある。この点で探索を行うと細胞外領域と細胞内領域が別々の進化を遂げてきた可能性もでてくる。

マウスにおいて TLR5 は肺と肝臓に発現し、特に肝臓に強く発現を示すことが報告されている(35)。ニジマスにおいて rtTLR5M はユビキタスに発現が確認され、特に肝臓において強い発現を示した。それに対し rtTLR5S は肝臓にのみ限局していた。補体やレクチンなど自然免疫に重要な役割を果たす液性因子の多くが肝臓で発現することを考慮すると(2)、ニジマスにおいて rtTLR5S は急性期応答に関係するタンパク質であるとも考えられる。また臓器における発現確認においてはノーザンブロットも同時に行ったが、転写量が極端に低く、検出することができなかった。このことは RT-PCR においても検出が難しかったことから、実際生体において存在するタンパク量は非常に少なく Flagellin 認識にはごくわずかなレセプターで十分であることが考えられる。事実、哺乳類において TLR の発現は非常に少ないことが知られており(36)、TLR の発現量の異常な増加は疾患の原因となるのではないかと考えられる。

第2章 ニジマス膜型 TLR5 と可溶型 TLR5 の機能解析

第1章でニジマスには膜型 TLR5 と可溶型 TLR5 が存在することを明らかにした。ニジマスは養殖対象魚として古くから研究の対象となっていたこともあり、連鎖地図(37)、IL-1 β (38)や TNF- α (39)等のサイトカインの機能解析などの知識の蓄積に加え、細胞株も肝臓由来 RTH-149 と生殖腺由来 RTG-2 の2種の細胞が存在するので、他の魚種と比較して解析は容易であるといえる。

そこで、本章では異物と rtTLR5M 及び rtTLR5S の3者の相互作用をシグナル伝達能を指標として検討を行うとともに、組み換えタンパク質を作製し物理的な結合を検討したので以下に得られた知見を報告する。

2-1. 実験材料および試薬

2-1-1. 細胞

ニジマス肝臓由来上皮細胞 RTH-149、ニジマス生殖腺由来繊維芽細胞 RTG-2 及びチャイニーズハムスター卵巣由来上皮細胞 CHO は ATCC: American Type Culture Collection (Manassas, VA) より購入した。ヒト子宮頸ガン由来上皮細胞株 HeLa は大阪府立成人病センター研究所、分子遺伝学部門井上徳光博士より供与された。RTH-149 及び RTG-2 は 10% (v/v) FCS、2 mM L-Glutamine、0.15 % sodium bicarbonate、0.1 mM MEM non-essential amino acids、1 mM sodium pyruvate、100 U/ml penicillin G、100 mg/ml streptomycin を含む Eagle's minimum essential (MEM) 培地 (Nissui, Tokyo, Japan) を用いて 20°C、5% CO₂ 存在下で継代培養した。CHO 細胞は 10% (v/v) FCS、0.15 % sodium bicarbonate、100 U/ml penicillin G、100 mg/ml streptomycin を含む Ham's F15 培地 (Nissui) を用いて 37°C、5% CO₂ 存在下で継代培養した。HeLa は 10% (v/v) FCS、100 U/ml penicillin G、100 mg/ml streptomycin を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) を用いて 37°C、5% CO₂ 存在下で継代培養した。

2-1-2. バクテリア

ニジマス *Vivrio* 病原菌 *Vivrio anguillarum* は独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所、飯田貴次博士より供与された。2% NaCl を含む Tryptosoya 寒天培地 (Nissui) で 25°C において 36 時間培養を行い、コロニーを形成させた。シングルコロニーを選択し 2% NaCl を含む Tryptosoya 培地 (Nissui) で 25°C において 24 時間振蕩培養を行い 6,000 rpm、5 分間、4°C で遠心を行い、菌体を回収した。回収した菌体は PBS

で3度洗浄した後、ペレットとして-80°Cにて保存した。形質転換用の *E. coli* DH5 α は invitrogen より購入し、competent cell を作製した。

2-1-3. 発現ベクター

pCR/huCD4 ベクター (XhoI/BglII によって CD4 の切り出しが可能) は当研究室の信田京子氏より供与された。pELAM-luc、dual-luciferase assay 用内部標準コントロールベクター phRL-TK ベクターは Promega より購入した。pEFBOS/huTLR5 (40)、ヒト E-selectin (ELAM) ルシフェラーゼレポータープラスミド (pELAM-luc) (41) は当研究室で単離された物を用いた。

2-1-4. 試薬

組み換え Flagellin 精製

GST binding solution: 10 mM NaH₂PO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl,
2.7 mM KCl, pH 7.3

GST elution buffer 50 mM Tris-HCl, 10 mM 還元型グルタチオン, pH 8.0

FACS

FACS buffer: 0.1% BSA, 0.1% NaN₃ in D-PBS

2-2. 実験方法

2-2-1. *V. anguillarum* ゲノム DNA の抽出

V. anguillarum のゲノム DNA は Sambrook らの方法に従って行った(42)。本培養を行って3日経過した *V. anguillarum* の培養液 200 ml を回収し、8,000 rpm、10 分間 4°C で菌体を回収し、PBS で2回菌体を洗浄した。集めた菌体ペレットを 20 ml の TE に懸濁した。その菌体懸濁液 5 ml に 5 mg のリゾチームを加え 15 分間 37°C でインキュベートした。さらに SDS (終濃度 2%) を加え菌体を完全に溶菌させた後 NaCl (終濃度 1 M) と等量の平衡化フェノールを加えよく転倒混和した。2,000 rpm で遠心して水層とフェノール層に分離し水層を回収した。タンパク質の中間層がなくなるまでこの操作を繰り返し行った。次に等量の PCI を加え転倒混和し 2,000 rpm で水層と PCI 層に分離して水層を回収した。この操作も中間層がなくなるまで繰り返し行った。次に等量のクロロホルムを加え転倒混和し 2,000 rpm で水層とクロロホルム層に分離して水層を回収した。この操作も中間層がなくなるまで繰り返し行った。得られた溶液に等量のイソプロパノールを加えて DNA を沈殿させ、この DNA を 70% エタノールで洗浄

した後、TE 5 ml に溶解した。

この DNA 溶液に RNase A (終濃度 20 $\mu\text{g/ml}$) を加え 37°C で 1 時間インキュベートし RNA を分解した。さらに Proteinase K (終濃度 100 $\mu\text{g/ml}$)、NaCl (終濃度 1 M)、10% SDS (終濃度 2%) を加え 37°C で 1 時間インキュベートし、残りのタンパク質を分解した。続いて先程と同様にフェノール抽出、クロロホルム抽出、イソプロパノール沈殿を行い 70%エタノールで洗浄して 2 ml の TE に溶解し、ゲノム DNA 溶液とした。

2-2-2. 組み換え Flagellin の作製

V. anguillarum ゲノム DNA 溶液を鋳型とし、PCR によって *V. anguillarum* FlaA (AAB06995)(43)及び FlaC (U52119)(44)の増幅を行った。なお FlaA 及び FlaC の増幅に使用したプライマーは下記に示す (プライマー配列中で制限酵素サイトは下線で示す)。増幅産物は Blunt end クローニングした後、pGEX-2T ベクター (Amersham Biosciences) に FlaA は BamHI と SmaI で、FlaC は BamHI と EcoRI で組み込み、pGEX2T/FlaA 及び pGEX2T/FlaC とした。組み換えタンパク質の発現は pGEX2T/FlaA 及び pGEX2T/FlaC でトランスフォーメーションした BL21(DE3)pLysE (Merck Biosciences, Darmstadt, Germany) を用いて行った。pGEX2T/FlaA 及び pGEX2T/FlaC を導入した BL21(DE3)pLysE は 100 $\mu\text{g/ml}$ のアンピシリンナトリウムを含む LB 培地で 600 nm の吸光度が 1.0 になるまで 25°C で培養した後、終濃度 0.1 mM になるように IPTG を添加し、さらに 2 時間培養を行い、菌体を回収した。回収した菌体を GST binding solution で懸濁した後、凍結融解、ソニケーションにて菌体を破碎し、9,000 rpm、10 分間 4°C で遠心を行い、上精を回収した。回収した上精に 50 %スラリーの Glutathione-Sepharose 4B (Amersham Biosciences) を加え 4°C で 2 時間転倒混和した。混合物を PD10 カラムにアプライし GST-binding buffer でカラムを十分に洗浄した後、GST elution buffer の溶出液を分取し、PAGE にてタンパク質の確認を行った。発現タンパク質は PBS で透析した後、thrombin (Amrsham Biosciences) で消化を行い、組み換え FlaA (rFlaA) 及び FlaC (rFlaC) とした。

FlaA 5'-CCGGATCCATGACCATTACAGTAAATACTAACGTCTCAGCAATG-3'
 5'-ATCCCGGGTTACTGCAATAGTGACATTGCAGAATTTGGCAACTG-3'
FlaC 5'-CCGGATCCATGGCGGTTAATGTAAACACTAACGTTTCAGC-3'
 5'-CCGAATTCTTAACCAAGCAAACCAAGAGCAGCATTAGG-3'

2-2-3. SDS-PAGE

SDS-PAGE は 1-2-13 に従って行った。CBB 染色においては、分離後のゲルを DW で十分洗浄を行い、BioSAFE-CBB 染色液 (Bio-Rad, Hercules, CA) でタンパク質を染色

した後、DW で十分に脱色しバンドを検出した。

2-2-4. ニジマス細胞株の *V. anguillarum*、rFlaA に対する応答

1.0 × 10⁷個の RTH-149 及び RTG-2 細胞を 6-cm dish plate に播種し、2 日間培養した後、培地を交換し、10 cfu (colony-forming unit)の *V. anguillarum* または rFlaA (1 μg/ml) で刺激を行った。計時的に細胞を回収し totalRNA を TRIzol reagent を用いて回収した (1-2-1 参照)。回収した totalRNA を鋳型として RT-PCR で rtTLR5M、rtTLR5S、rtIL-1β 及び rtTNF-α の転写量を検討した。また内部標準としては rt-β-actin を用いた (1-2-11 参照)。

2-2-5. 定量 PCR

定量 PCR は SYBR-Green ready reaction Kit (Bio-Rad) を用いて行った。RT 産物 1 μl、終濃度 0.4 μM センス・アンチセンスプライマー、2× Super Mix 12.5 μl で 25 μl の系で行った。PCR プログラムは 95°C, 3 min, (95°C: 10 sec, 60°C: 10 sec, 72°C: 30 sec) × 40 cycle で行った。なお、それぞれの遺伝子の転写量は rt-β-actin 10⁵ copy に対する割合で示した。検出する遺伝子のプライマーセットは下に示す。

rtTLR5M	5'-ACGACGCTTACTTATGCTTC-3'
	5'-CACCTGGGATGAAGTCTCTG-3'
rtTLR5S	5'-GTTGCCTACAATATCCTGAATGTCA-3'
	5'-GCAGGTAGACTCCAAAGATA-3'
rtIL-1β	5'-TAGTGTTGGAGTTGGAGTCG-3'
	5'-GCTCCATAGCCTCATTCATC-3'
rt-β-actin	5'-GCCGCGACCTCACAGACTAC-3'
	5'-CCATCTCCTGCTCAAAGTCC-3'

2-2-6. rtTLR5M 及び huTLR5 の Constitutive active 体の作製

huTLR5 と rtTLR5M の constitutive active 体は human CD4 (huCD4) の細胞外領域と huTLR5 と rtTLR5M の TM 以下の細胞内領域とのキメラとした。huTLR5 と rtTLR5M の TM 以下の細胞内領域は PCR によって増幅した。用いたプライマー、rtTLR5M TM~F/R 及び huTLR5 TM~F/R の配列は下記に示す。それぞれの PCR 産物を Blunt end クローニングし、配列を確認した後、XhoI/NotI で消化した pEFBOS ベクター(40) に XhoI/BglIII で消化した huCD4 断片、さらに BamHI/NotI で消化した rtTLR5M TM~TIR または huTLR5 TM~TIR を混合し Takara ligation kit を用いて 2 way ライゲーションを行った。作製した constitutive active 体はそれぞれ pEFBOS/CD4+rtTLR5M 及び

pEFBOS/CD4+huTLR5 とした。

CD4 + rtTLR5M TIR

rtTLR5M TM~F: 5'-GGATTCCTCTTCATCGGCTGCACAGC-3'

rtTLR5M TM~R: 5'-GCGGCCGCTTAAGTTCCAAGTGCATATTTACAA-3'

CD4 + huTLR5

huTLR5 TM~F: 5'-GGATCCCTTTTCATTGTATGCACTGT-3'

huTLR5 TM~R: 5'-GCGGCCGCTTAGGAGATGGTTGCTGCTACAG-3'

2-2-7. Flow cytometry (FACS) による発現の確認

pEFBOS/CD4+rtTLR5M 及び pEFBOS/CD4+huTLR5 を一過的に発現させた CHO 細胞を 0.05% EDTA/PBS によってはがし、FACS buffer で 3 回洗浄した。5 倍希釈 PE 標識マウス抗 IgG2a (BD Biosciences) または 5 倍希釈 PE 標識マウス抗ヒト CD4 抗体 (BD Biosciences) で 4°C で 30 分インキュベートしたのち、細胞を FACS buffer で 3 回洗浄し、3%パラホルムアルデヒドで固定した後、細胞の蛍光強度を FACSCalibur (BD Biosciences) で測定した。

2-2-8. ルシフェラーゼアッセイ

CHO 細胞を 2.0×10^5 cell ずつ 24 well plate に播種し、翌日、1 well あたり pEFBOS 空ベクター、pEFBOS/CD4+rtTLR5M または pEFBOS/CD4+huTLR5 100 ng、pELAM-luc 100 ng、pHRL-TK control vector 0.1 ng を LipofectAMINE Plus を用いトランスフェクションした。24 時間後に PBS で 3 回洗浄した後に 100 μ l/well の Passive Lysis Buffer (Promega: Dual-Luciferase Reporter Assay System) で可溶化した。可溶化物 10 μ l についてホタルルシフェラーゼ活性、ウミシイタケルシフェラーゼ活性を Dual-Luciferase Reporter Assay System の基質を用いてルミネッセンスリーダー (Model: BLB-201, ALOCA, Tokyo, Japan または Model: Lumat LB9507, BELTOLD, Wildbad, Germany) で測定した。各条件におけるホタルルシフェラーゼ活性をウミシイタケルシフェラーゼ活性で補正し、vector control に対する相対値で活性を評価した。

2-2-9. キメラレセプターの作製

(a)rtTLR5S + huTLR5 = S-chimera

huTLR5 の LRR-CT、膜貫通ドメイン及び TIR ドメインを含む配列 (aa 574-859) に rtTLR5S (aa 29-597) を融合させたキメラレセプター (S-chimera) を作製するために PCR にて遺伝子配列を増幅し、pCR Blunt ベクターへサブクローニングを行い、塩基配列を確認した。rtTLR5S 断片を HindIII 及び BamHI で、huTLR5 断片を BglIII 及び SalI

で消化した断片を、HindIII 及び SalI で消化した pFLAG-CMV-1 に 2 way ライゲーションを行い、pFLAG/S-chimera とした。

rtTLR5S LRR (aa 29-597) 5'-AAGCTTACCCCAAGATGTCCACTATATGG-3'
 5'-GGATCCAGCTGAGAGAACTGAAAGC-3'
huTLR5 TM~ (aa 574-859) 5'-AGATCTTGGATATAACTCATAACAAGTTC-3'
 5'-GTCGACCCTTTGATTAGGAGATGGTTGC-3'

(b)rtTLR5M + huTLR5 = M-chimera

(a)と同様にして huTLR5 の aa 574-859 に rtTLR5M の LRR ドメイン (aa 21-661) を融合させたキメラレセプター (M-chimera) を作製した。rtTLR5M 断片を NotI 及び BamHI で、huTLR5 断片を BglIII 及び SalI で、NotI 及び SalI で消化した pFLAG-CMV-1 に 2 way ライゲーションを行い、pFLAG/M-chimera とした。

rtTLR5M LRR (aa 21-661) 5'-GCGGCCGCGAACCCAAAATGCCCAATA-3'
 5'-GGATCCAGCTGAGAGAATG-3'

2-2-10. S-chimera 及び M-chimera の Flagellin 認識活性評価

(a)CHO 細胞を用いた評価

CHO 細胞を 2.0×10^5 cell ずつ 24 well plate に播種し、翌日、1 well あたり pFLAG-CMV-1 空ベクター、pFLAG/S-chimera、pFLAG/M-chimera または pFLAG/huTLR5 100 ng、pELAM-luc 100 ng、pHRL-TK control vector (Promega) 0.1 ng を LipofectAMINE Plus を用いトランスフェクションした。36 時間後に GST、rFlaA (0.01, 0.1 1 μ g/ml)、LPS (0.1 μ g/ml)、PGN (10 μ g/ml)、poly(I:C) (2 μ g/ml) または CpG-ODN (2 μ M) で 5 時間刺激 (CpG の場合は 9 時間) を行い、レポーター遺伝子活性を評価した。

(2-2-8 参照)

(b) HeLa 細胞を用いた評価

HeLa 細胞を 2.0×10^5 cell ずつ 24 well plate に播種し、翌日、1 well あたり pFLAG-CMV-1 空ベクター、pFLAG/S-chimera、pFLAG/M-chimera または pFLAG/huTLR5 200 ng、pELAM-luc 100 ng、pHRL-TK control vector 0.1 ng を PolyFECT (Qiagen, Valencia, CA) を用いトランスフェクションした。24 時間後に 0.05% EDTA/PBS で細胞をはがし、24 well プレート 1 well あたり 96 well プレート 6well にまき直した。16 時間培養した後に 2-2-10a と同様に刺激を行った。PBS 洗浄した後に 25 μ l/well の Passive Lysis Buffer で可溶化し、レポーター遺伝子活性を評価した。(2-2-8

参照)

2-2-11. M-chimera と rtTLR5S の相互作用

CHO または HeLa 細胞を 2.0×10^5 cell ずつ 24 well plate に播種し、翌日、1 well あたり pFLAG-CMV-1 空ベクター、pFLAG/M-chimera 200 ng、pELAM-luc 100 ng、phRL-TK control vector 0.1 ng を LipofectAMINE Plus (CHO) または PolyFECT (HeLa) を用いトランスフェクションした。24 時間後、pFLAG/rtTLR5S (1, 10,100 ng) をトランスフェクションし 24 時間経過した CHO または HeLa 細胞の培地と入れ替え、さらに 16 時間培養した後、GST、rFlaA (1 μ g/ml) で 5 時間刺激を行い、レポーター遺伝子活性を評価した。(2-2-8 参照)

2-2-12. リコンビナント rtTLR5S の発現

リコンビナント rtTLR5S は Bac-to-Bac baculo virus expression system (Invitrogen) を用いて行った。pFLAG/rtTLR5S を鋳型として C 末端に 6xHis タグを持つ遺伝子配列を PCR によって作製した。即ち、Preprotrypsin シグナルペプチド、Flag タグ、rtTLR5S、6xHis タグの順に発現するように設計した。プライマーは下記に示す。得られた PCR 断片をサブクローニングし、塩基配列を確認した後、pFastBac1 の SalI と NotI のサイトへ組み込み pFastBac1/rtTLR5S とした。組み換え Bacumid DNA の作製には大腸菌 DH10Bac を pFastBac1/rtTLR5S でトランスフォーメーションし、相同組み換えを起こさせることで行った。組み換え Bacumid DNA はアルカリミニプレップ法で回収し、以後の実験に使用した。組み換えウイルスを作製するために Bacumid DNA を Sf21 細胞に UniFECTOR (B-bridge, San Jose, CA) を用いてトランスフェクションし、3 日間ウイルスを誘導した。培養が終了したウイルス液を moi 0.1 で感染させ、ウイルスを増幅した。タンパク質を発現するときは moi 5 になるようにウイルス液をかけ、発現を誘導した。細胞をピペティングで回収し、1,500 rpm、10 分間、4°C で遠心を行い、培地を回収した。さらに 9,000 rpm、15 分間、4°C で遠心を行い、沈殿物を除去した。得られた培養上清に終濃度 20% となるように PEG#4000 を混合し、4°C で 16 時間マグネティックスターラーで混合した。混合液を 9,000 rpm、15 分間、4°C で遠心を行い、沈殿を回収し、開始容量の 1/5 量の 20 mM リン酸バッファー (pH 7.4) で溶解し、20 mM リン酸バッファー、pH 7.4 で透析を行った。透析終了後のサンプルは AKTA Explorer 10S (Amersham Biosciences) で陰イオン交換カラム RESOURCE Q (Amersham Biosciences) を用いて分離を行った。開始バッファーは 20 mM リン酸バッファー、pH 7.4 でカラムに結合させ、十分に洗浄を行い、20 mM リン酸バッファー、500 mM NaCl、pH 7.4 を溶出バッファーとし、リニアグラジエントで溶出を行った。rtTLR5S 画分をウエスタンブロッティングで確認し、溶出画分を集め、20 mM リン酸バッファー、500

mM NaCl、10 mM イミダゾール、pH 7.4 で透析を行った。透析終了後のサンプルを Hi-Trap Ni Chelating HP (Amersham Biosciences) に結合させ、20 mM リン酸バッファー、500 mM NaCl、10 mM イミダゾール、pH 7.4 を基本に 20 mM、50 mM で十分にカラムを洗浄した後、100 mM、200 mM、500 mM とイミダゾール濃度を上げ溶出を行った。rtTLR5S の検出はウエスタンブロッティングで行い、最終産物を限界膜濾過フィルター (UF30, Millipore) で濃縮し、終濃度 10%となるようにグリセロールを加えて-80°C で保存した。最終的に 1000 ml の培地から 10 μ g の rtTLR5S を回収した。

2-2-13. in vitro binding assay

Flagellin と rtTLR5S の結合を検討するために GST Pull down アッセイを行った。20 ng 6 \times His タグ rtTLR5S と 0-5 μ g の GST または GST-FlaA を 300 μ l の PBS (pH 8.0) 中で 4°C で 2 時間、転倒混和した。混合物に 10 μ l の Glutathione-Sepharose 4B を加え、さらに 4°C で 2 時間、転倒混和した。混合物から Glutathione-Sepharose を遠心で回収し、PBS で 4 回洗浄した。Glutathione-Sepharose からの結合物の溶出は 10 mM 還元型グルタチオン/PBS で行い、溶出物を還元条件下で SDS-PAGE を行い、ウエスタンブロッティングを行った。一次抗体マウス抗 His タグ抗体 (Qiagen) (終濃度 0.2 μ g/ml) で標識し HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (10,000 倍希釈) で可視化し、検出した (1-2-13 参照)。

2-3. 実験結果

2-3-1. *V. anguillarum* 組み換え Flagellin の精製

V. anguillarum は FlaA, B, C, D, E と 5 つの Flagellin を持つことが明らかとなっており、この中で病原性と関係ある Flagellin は FlaA 及び FlaC とされている。本研究では pGEX-2T ベクターを使用し FlaA 及び FlaC の N 末端に GST を融合させた組み換えタンパク質 (GST-FlaA 及び GST-FlaC) を大腸菌 BL21(DE3)pLysE で発現させた。その結果、推定分子量 40 k と GST 26 k を加えた 66 k の付近に発現が確認された。500 ml の菌体培養液から GST-FlaA は 1.17 mg、GST-FlaC は 1.80 mg 得ることができた (図 2-1A)。また pGEX-2T ベクターは thrombin で GST を切り離すことができるように設計されており、より自然に近い Flagellin を得るため GST-FlaA 及び GST-FlaC を thrombin で消化し、精製を行った (図 2-1B)。その結果、rFlaA 及び rFlaC は予想される 40 k よりも若干大きい分子として検出されたが、その差異に関しては本研究では明らかにできなかった。

2-3-2. RTH-149 細胞の *V. anguillarum* 加熱死菌に対する応答

rtTLR5M と rtTLR5S の発現が肝臓で特に強く発現していたことから、ニジマス肝臓由来細胞 RTH-149 を *V. anguillarum* 加熱死菌で刺激した際の rtTLR5M、rtTLR5S 及び rtIL-1 β の発現変動を RT-PCR によって計時的に検討した。その結果、rtTLR5S は定常状態で発現を確認することはできないが、*V. anguillarum* 刺激から 4 時間後に誘導された。そのピークは刺激より 6 時間後にあり、徐々に発現量が減少し 48 時間後には発現が確認できなくなった。対して rtTLR5M の発現量は刺激によらず一定であった。同条件下で急性期応答サイトカインである rtIL-1 β は刺激から 1 時間後に誘導され、そのピークは 3-10 時間後まで持続した (図 2-2)。これより、rtTLR5S は rtIL-1 β とは異なった急性期応答タンパク質であると考えられるが、その検出には 45 サイクルもの PCR を要し、25 サイクルで検出可能な rtIL-1 β と比較すると非常に微量であることが示唆された。

2-3-3. RTH-149 細胞の組み換え Flagellin に対する応答

2-3-2 より RTH-149 細胞は rtTLR5M を定常状態で発現しているが、rtTLR5S は刺激に応じて発現が誘導されることが明らかとなった。そこで、rtTLR5M のリガンドと考えられる Flagellin (rFlaA 及び rFlaC) で刺激を行い rtTLR5M、rtTLR5S、rtIL-1 β 及び rtTNF α の発現変動を RT-PCR によって検討した。その結果、rtTLR5S は定常状態では発現を確認することはできないが、*V. anguillarum* 刺激と同様、rFlaA 刺激時においても 4 時間後に誘導され、そのピークは 6 時間後で、徐々に発現が減少した。この場合でも rtTLR5M は刺激によらず一定の発現を示した。rtIL-1 β 及び rtTNF- α の発現量は 1 時間後から誘導され 6 時間後にピークとなった (図 2-3)。しかしながら、*V. anguillarum* 刺激時に比べて転写量が少ないことから、Flagellin のみでは強い急性期応答サイトカインの発現誘導は起こらないが、rtTLR5S の転写誘導活性は遜色ないことから、rtTLR5M によって Flagellin が認識され rtTLR5S の発現を誘導しており、さらなるサイトカインの誘導には Flagellin 以外の物質がリガンドとなっていると考えられた。同時にニジマス生殖腺由来細胞 RTG-2 を用いて同様の解析を行ったが、rtTNF- α の転写誘導活性が低い物の、それ以外は と同様の反応を示した (図 2-3)。また RTH-149 における rtTLR5M、rtTLR5S 及び rtIL-1 β の発現量を定量 PCR を用いて検討した (図 2-4)。その結果、rtTLR5S は 6 時間にピークを持ち、それ以降徐々に減少する傾向が確かめられたが、rtTLR5M の転写量は低く安定しており、刺激に応じて転写量が上昇する傾向は認められず、RT-PCR の結果と一致した。なおデータは示さないが、同様の実験を rFlaC を用いて行ったが rFlaA と同様の活性を示した。

2-3-4. RTH-149 細胞の他の PAMPs に対する応答

RTH-149 の *V. anguillarum*、Flagellin に対する応答性は 2-3-2、2-3-3 で明らかにした。

しかしながら RTH-149 を使用するに当たり、その他の PAMPs 刺激に対する応答も検討しておく必要がある。そこで LPS (0.1 $\mu\text{g/ml}$)、PGN (10 $\mu\text{g/ml}$)、poly(I:C) (2 $\mu\text{g/ml}$) 及び CpG-ODN (2 μM) で刺激を行い 6、12 時間後の細胞を回収し RT-PCR を行った。その結果 RTH-149 細胞は LPS 刺激に対してはほとんど応答を示さなかった。これはヒト及びマウスの肝臓由来の細胞は LPS に対して不応答であることから予想がつく。PGN 刺激によっても RTH-149 は応答しないが、なぜか rtTLR5M の発現の減少が観察された。この機能については解析していないが、興味深い現象である。Poly(I:C) については微弱ながら rtTLR5S 及び rtIL-1 β の発現誘導が観察された。また rtTNF- α の誘導も起こることから RTH-149 は TLR3 をはじめとする dsRNA を認識する機構が備わっていることが示唆された。CpG-ODN は rtTLR5S、rtIL-1 β 及び rtTNF- α の転写活性には影響を及ぼさなかった (図2-5)。

2-3-5. 哺乳類細胞でのアッセイ系の確立

これまでの魚類の細胞を用いた実験は本研究において大きな指針となっているが、遺伝子導入効率が非常に悪いことと、成長速度が遅いことから、哺乳類細胞を用いた系の確立が必須であった。一般に TLR の機能解析で用いられるヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293 細胞は TLR5 を発現していることが判明しており、TLR5 を介した Flagellin 認識機構の解析には使用できない。そこで本研究では TLR5 を発現していないチャイニーズハムスター胎盤由来細胞株 CHO 及びヒト子宮頸ガン由来 HeLa 細胞を用いた(10, 45)。

a) 哺乳類細胞での rtTLR5M のシグナル伝達活性

rtTLR5M の Flagellin 認識活性を検討するために CHO 及び HeLa 細胞において rtTLR5M の TIR ドメインが転写活性を誘導することができるか検討を行った。そこで、クラスタリングによってシグナルを増強する活性がある CD4 を使用したキメラ分子を作製し、constitutive active 体とすることで検討を行った(20)。具体的には、ヒト CD4 遺伝子の細胞外ドメイン (aa 1-396) と rtTLR5M の膜貫通領域以下 (aa 661-880) を接合した。またポジティブコントロールとしては huTLR5 の膜貫通領域以下 (aa 643-859) を接合したものを用いた (図 2-6A)。作製した constitutive active 体の発現ベクターを用いて CHO 細胞に一過的に発現させ、FACS によって発現を確認した結果、ベクターコントロールでは見られないアイソタイプコントロールと抗 CD4 抗体との明確なシフトが見られ、作製した constitutive active 体が CHO 細胞に発現していることが確認できた(図 2-6B)。ヒト TLR の刺激によるシグナルは MyD88 をまたは TICAM-1/TRIF を介し、それぞれ NF- κ B、IFN- β の転写誘導活性へと伝えられる。ヒト TLR5 は主に MyD88 を介して NF- κ B の転写活性を誘導することが明らかとなっているが(10)、rtTLR5M の TIR ドメインは MyD88 及び TICAM-1 のいずれのアダプター分子もリク

ルートできないことが判明した。一方 huTLR5 の TIR ドメインは MyD88 をリクルートし、NF- κ B の転写活性を誘導した (図 2-6C)。よって、哺乳類細胞において rtTLR5M 全長を用いた機能解析を行うことはできないことが判明した。

b) rtTLR5M 及び rtTLR5S と huTLR5 のキメラ分子による解析

そこで、rtTLR5M と rtTLR5S の Flagellin 認識活性を評価するため、rtTLR5S と rtTLR5M の細胞外ドメイン (rtTLR5S: aa 29-597、rtTLR5M: aa 21-661) と huTLR5 の LRR-CT 以下 TIR (aa 574-859) を結合したキメラレセプター (S-chimera 及び M-chimera) を作製した (図 2-7)。S-chimera 及び M-chimera を CHO 及び HeLa 細胞に一過的に発現させ、FACS 及びウエスタンブロッティングで発現確認をした。その結果、FACS、ウエスタンにおいてもその発現は確認できなかった (データは示さない)。しかしながら、S-chimera を CHO 及び HeLa 細胞に発現させ、Flagellin で刺激を行うと、濃度依存的に NF- κ B の転写活性を誘導した (図 2-8)。CHO 細胞では HeLa 細胞と比較して弱い活性しか観察されなかったことは明らかにできなかった。同様に M-chimera を CHO 及び HeLa 細胞に一過的に発現させ、Flagellin で刺激を行った。その結果、CHO 細胞においては濃度依存的に NF- κ B の転写活性を誘導したのに対し (図 2-9A)、HeLa 細胞においては全く応答を示さなかった (図 2-9B)。次にこれらキメラレセプターと他の TLR リガンドとの反応を検討した。S-chimera を一過的に発現した CHO 細胞または HeLa 細胞に、rFlaA (1 μ g/ml)、LPS (0.1 μ g/ml)、PGN (10 μ g/ml)、poly(I:C) (2 μ g/ml) または CpG-ODN (2 μ M) で刺激を行った。その結果、他の PAMPs には応答を示さず Flagellin のみに応答することが明らかとなった (図 2-10)。しかしながら M-chimera を一過的に発現した CHO 細胞または HeLa 細胞においては同様に刺激を行ったが、CHO 細胞においては Flagellin 認識活性が観察されたのに対し、HeLa 細胞ではどの PAMPs にも応答は示さなかった (図 2-11)。

2-3-6. M-chimera と rtTLR5S の相互作用の検討

M-chimera は単体で Flagellin を認識できるが、rtTLR5S の共存下では Flagellin 認識活性にどのような影響を与えるか検討を行った。M-chimera を一過的に発現させた CHO 細胞または HeLa 細胞の培地を Flagellin 刺激前に可変量の rtTLR5S の発現ベクターで発現させた CHO 細胞または HeLa 細胞の培地に交換し、rFlaA で刺激を行った。その結果、rtTLR5S の発現ベクターの量依存的に NF- κ B の転写活性を誘導した (図 2-12)。また HeLa 細胞においては単体では rFlaA を認識できなかったが、rtTLR5S を共存させることで rFlaA を認識できることが明らかとなった (図 2-12B)。

2-3-7. 組み換え rtTLR5S の発現と精製

さらに rtTLR5S の Flagellin との結合能とシグナル増強活性について検討を行うため、rtTLR5S の組み換えタンパク質の発現精製を試みた。本研究では昆虫細胞-バキュロウイルスベクター発現系を採用した。本発現系は哺乳類細胞における発現タンパク質とほぼ同じ修飾を受け、機能や性質を保持し、高い発現効率が期待できる系である。しかしながら糖鎖修飾については高マンノース型の糖鎖合成で止まってしまうので注意せねばならない。ドナーベクター pFastBac1 に rtTLR5S の C 末端に 6xHis タグを付加した配列をクローニングし、大腸菌 DH10Bac 中で Bacumid DNA にトランスポジションさせ、組み換え Bacumid DNA を得た。Bacumid DNA を Sf9 細胞にトランスフェクションすることで組み換えウイルスを得た。得られたウイルスを増幅し Sf9 細胞へ感染させ組み換えタンパク質の発現を行った。精製はバキュロウイルス培養上精を出発材料とし、PEG#4000 でタンパク質を濃縮した後、RESORSE Q、Hi-trap Ni Chelating HP で行った (図 2-13)。最終的に 1,000 ml の Sf9 培養上精から 10 μ g のタンパク質を得ることができた。

2-3-8. 組み換え rtTLR5S と Flagellin の直接結合

rtTLR5S と Flagellin の直接の結合を観察するため、組み換え rtTLR5S (20 ng) と GST-FlaA または GST を混合し、混合液に Gltathione-Sepharose を加え、結合複合体を 10 mM Gltathione/PBS で溶出した。溶出液を抗 His タグ抗体でウエスタンブロッティングを行い rtTLR5S の結合量を検出した。その結果、GST には rtTLR5S は結合しないが、GST-FlaA を増加すると rtTLR5S の結合は量依存的に増加した(図 2-14)。またデータは示さないが、ヤツメウナギ C3(46)について同様の実験を行ったが GST 及び GST-FlaA への結合は観察されなかった。このことは rtTLR5S と Flagellin は特異的に直接結合していることを示唆している。

2-3-9. 組み換え rtTLR5S が M-chimera の Flagellin 認識に及ぼす影響

さらに、この組み換え rtTLR5S を使用し、M-chimera を一過的に発現させた CHO 細胞または HeLa 細胞に対して外来的に加えることで Flagellin 刺激への応答への影響を検討した。その結果、組み換え rtTLR5S を 1, 10, 100 ng/ml と増加させるに従い Flagellin に対する応答が増強されることが明らかとなった。特に HeLa 細胞においては高濃度の rtTLR5S が存在すると Flagellin に対する応答が非常に強く観察された。(図 2-15)

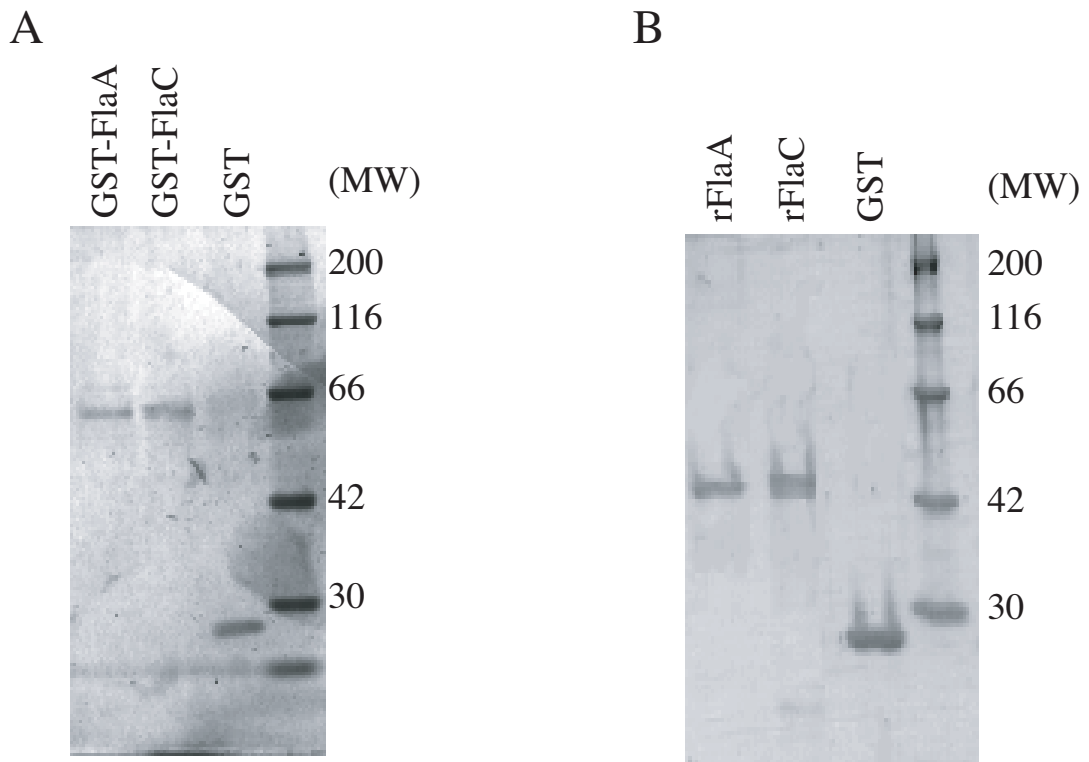


図2-1. *V. anguillarum* Flagellin (FlaA及びFlaC) の精製

A, N末端にGSTを融合させた*V. anguillarum* Flagellin (FlaA及びFlaC) を大腸菌 BL21(DE3)pLysEで発現させ、Glutathione-Sepharoseで精製を行った。精製したタンパク質をSDS-PAGE (10%) で分離を行い、Bio-Safe Coomassie Brilliant Blueを用いて染色を行った。B, thrombin消化で得られたrFlaA及びrFlaC。

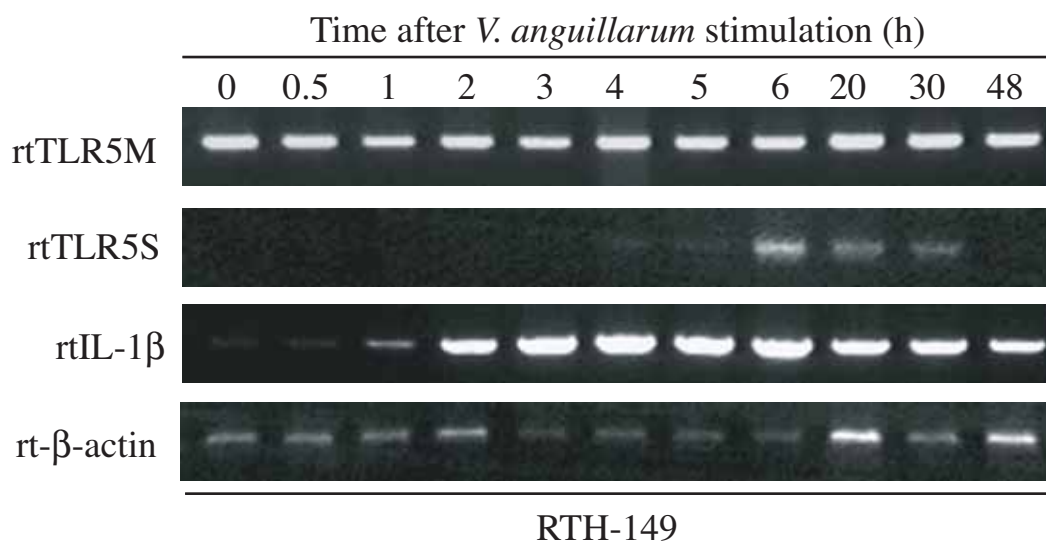


図2-2. *V. anguillarum*刺激時のRTH-149細胞の応答

RTH-149を凍結融解した*V. anguillarum*で刺激を行い、rtTLR5M, rtTLR5S, rtIL-1 β , rt- β -actinのmRNA量をRT-PCRで測定した。rt- β -actinは内部標準として用いた。PCR産物をアガロース電気泳動 (1.5% TAEアガロース) で分離した後、ethidium bromide (1 μ g/ml) で可視化した。

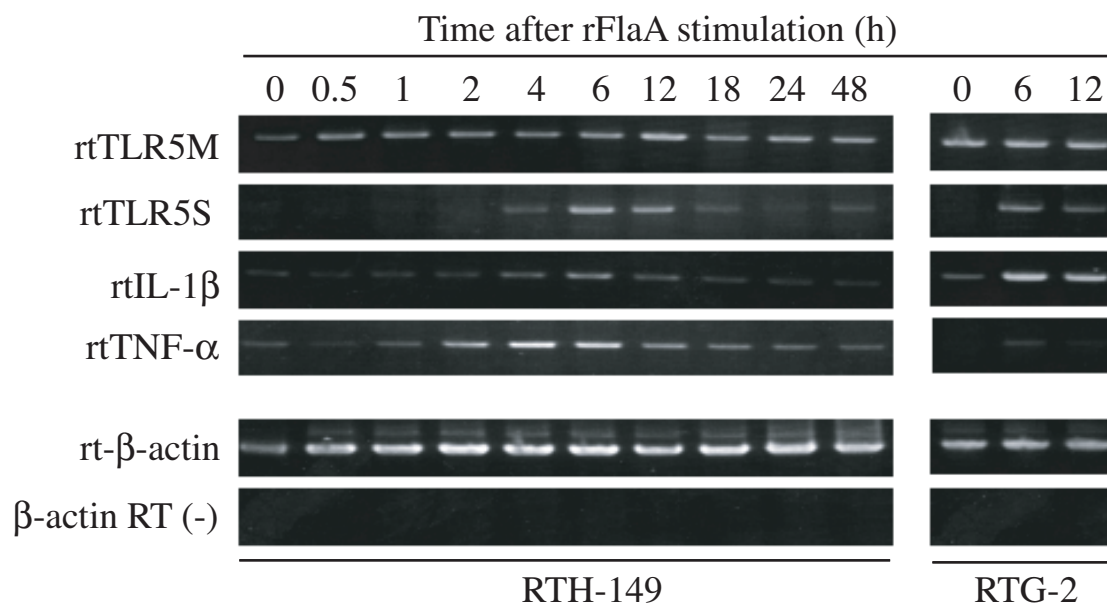


図2-3. RTH-149及びRTG-2のrFlaAに対する応答

RTH-149及びRTG-2を精製rFlaA (1 μ g/ml) で刺激を行い、rtTLR5M, rtTLR5S, rtIL-1 β 及びrtTNF- α のmRNA量の変動をRT-PCRで検討した。rt- β -actinは内部標準として用いた。PCR産物をアガロース電気泳動 (1.5% TAEアガロース) で分離した後 ethidium bromide (1 μ g/ml) で可視化した。

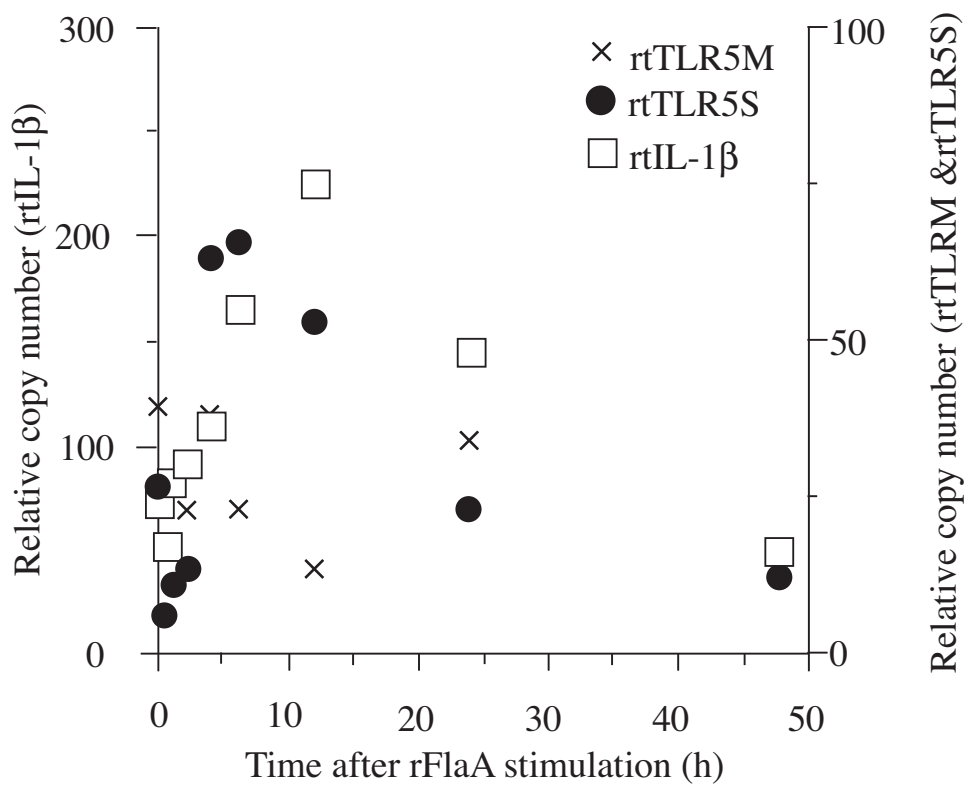


図2-4. RTH-149のrFlaAに対する応答

RTH-149を精製rFlaA (1 $\mu\text{g/ml}$) で刺激を行い、rtTLR5M、rtTLR5S及びrtIL-1 β のmRNA量を定量PCRで検討した。定量PCRはiQ SYBER Green Super Mixを用いiCycler iQ real-time PCRで行った。なお、rtTLR5M、rtTLR5S及びrtIL-1 β のmRNA量は β -actin 1.0×10^5 copyに対する相対値で示した。

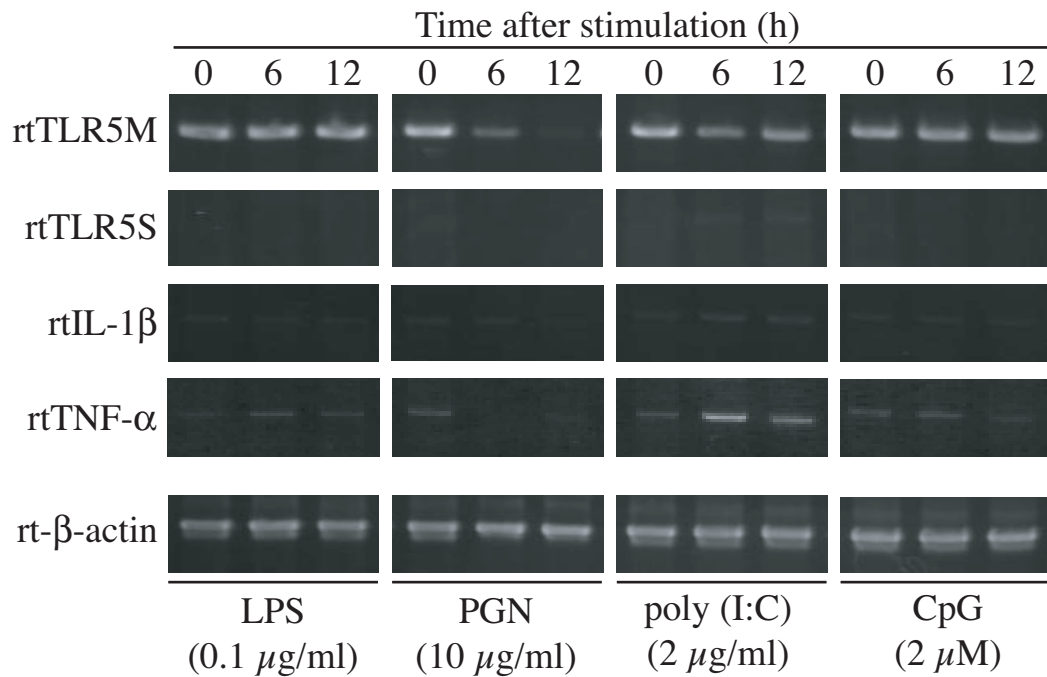


図2-5. RTH-149の他のPAMPsに対する応答

RTH-149をLPS (0.1 μ g/ml), PGN (10 μ g/ml), poly(I:C) (2 μ g/ml) 及びCpG-ODN (2 μ M)で刺激を行った。継時的に細胞の回収を行い、totalRNAを回収し、RT-PCRによってrtTLR5M, rtTLR5S, rtIL-1 β 及びrtTNF- α のmRNA量の変動を観察した。rt- β -actinは内部標準として用いた。PCR産物をアガロース電気泳動 (1.5% TAEアガロース) で分離した後ethidium bromide (1 μ g/ml) で可視化した。

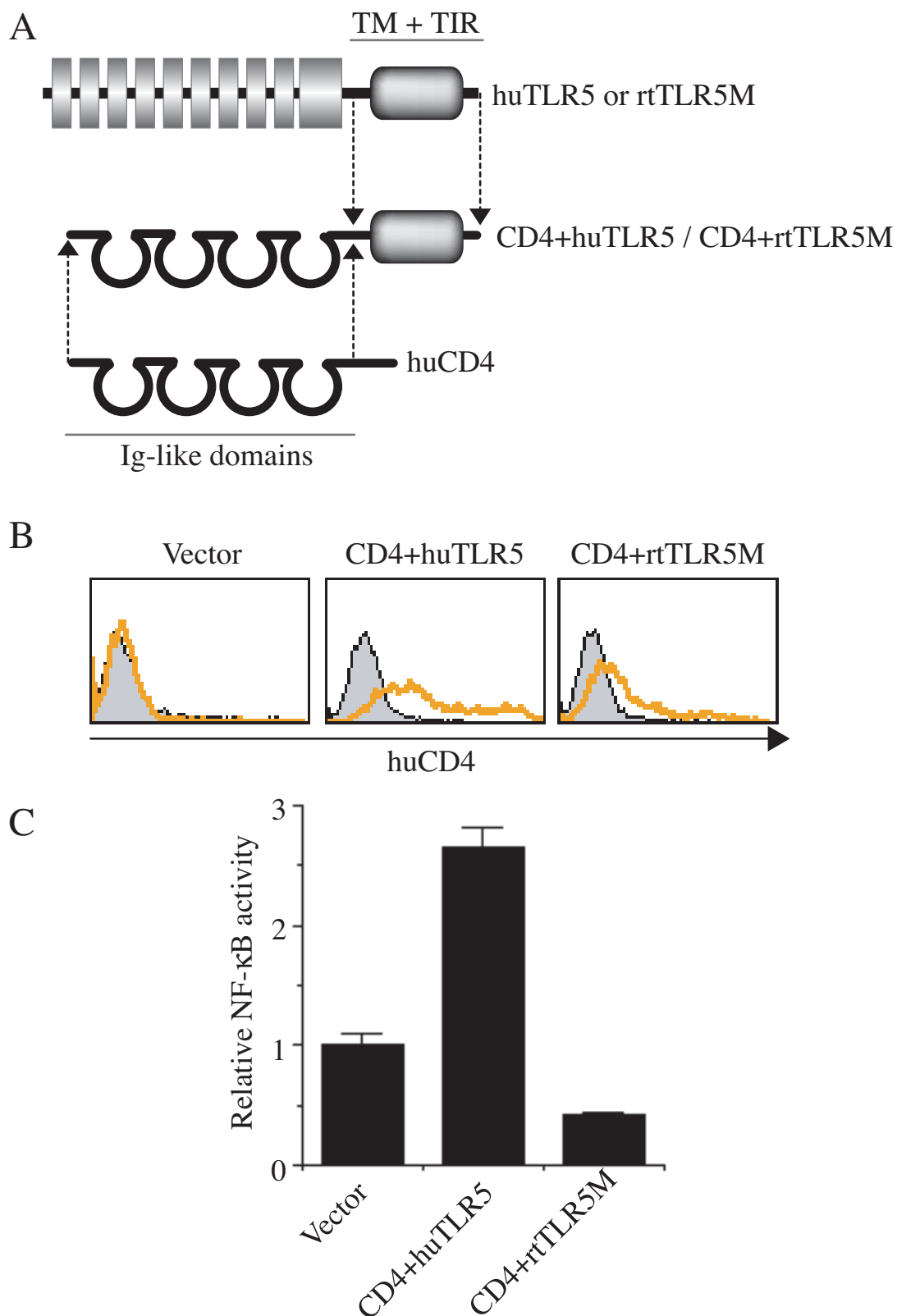


図2-6. 哺乳類細胞におけるrtTLR5Mのシグナル伝達活性

A, constitutive active体作製ストラテジー。huCD4細胞外ドメイン (aa 1-396) と huTLR5の膜貫通領域以下 (aa 643-859) またはrtTLR5Mの膜貫通領域以下 (aa 661-880) を接合した。それぞれのconstitutive active体はCD4+huTLR5、CD4+rtTLR5Mとした。B, CHO-K1細胞にCD4+huTLR5、CD4+rtTLR5Mを発現させPE標識抗huCD4抗体を用いたFACSによって発現を確認した。細線はIgG2aのisotype control、太線はhuCD4の発現を表している。C, CHO-K1細胞に一過的にCD4+huTLR5、CD4+rtTLR5Mを発現させ、24時間後、ホタルルシフェラーゼ活性によって現れるNF- κ Bプロモーター活性を未刺激時における値の相対値で表した。なお、値は3回の実験結果の平均値を用い、標準偏差をエラーバーで表した。

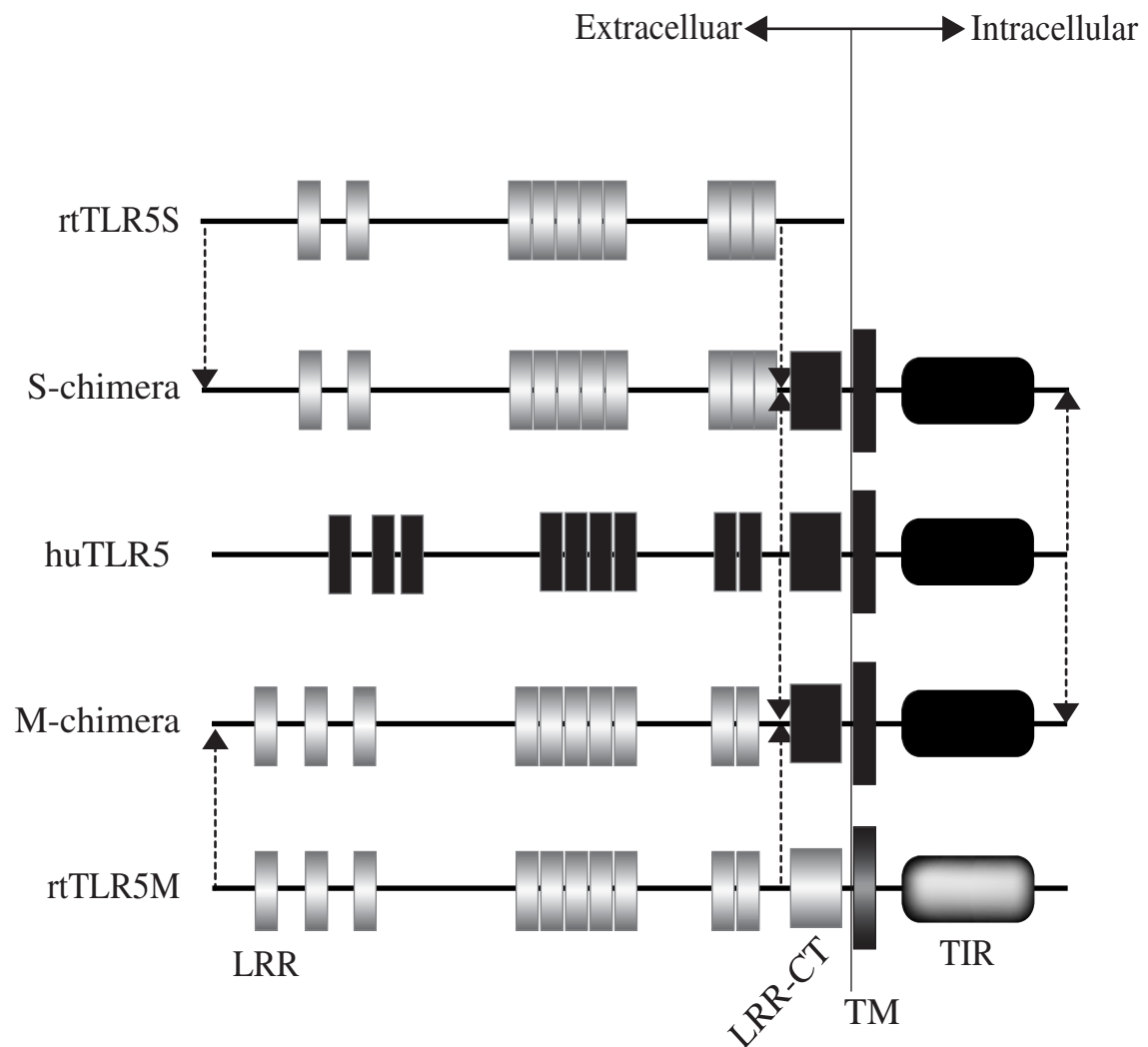


図2-7. キメラTLR5 (rtTLR5S及びrtTLR5M) の概略図

rtTLR5SのLRRドメイン (aa 29-597) とhuTLR5のLRR-CT以降細胞内領域 (aa 574-859) を接合したキメラ分子をS-chimera、rtTLR5MのLRRドメイン (aa21-661) とhuTLR5のLRR-CT以降細胞内領域 (aa 574-859) を接合したキメラ分子をM-chimeraとし以降の実験に用いた。なお、灰色の部分はニジマス由来の配列、黒の部分はヒト由来の配列を示す。

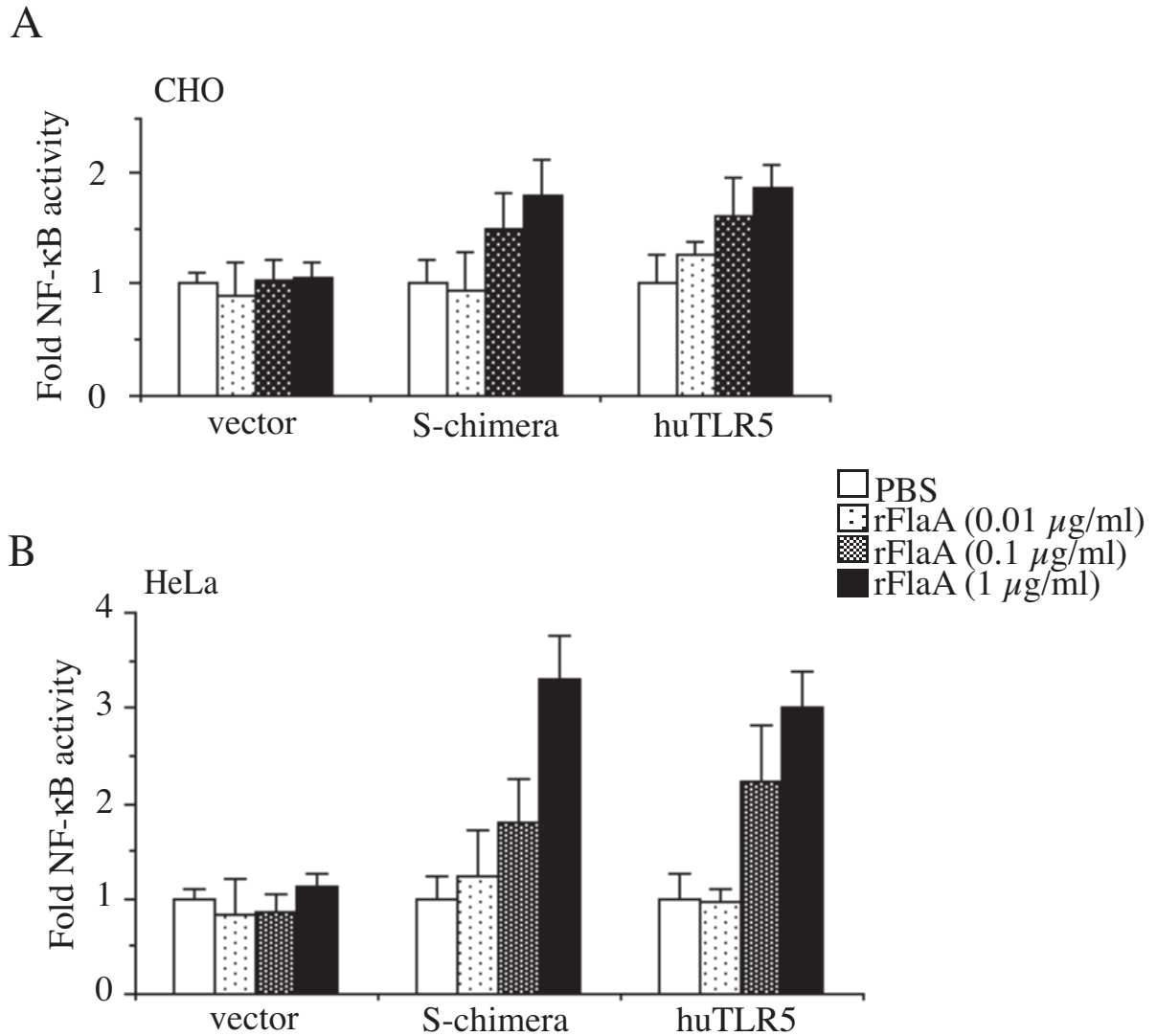


図2-8. S-chimeraのFlagellin認識活性

S-chimera及びhuTLR5をCHO (A) またはHeLa (B) 細胞に一過的に発現させ、rFlaA (0.01, 0.1, 1 μ g/ml) で5時間刺激を行った。ホタルルシフェラーゼ活性によって現れるNF- κ Bプロモーター活性を未刺激時における値の相対値で表した。なお、値は3回の実験結果の平均値を用い、標準偏差をエラーバーで表した。

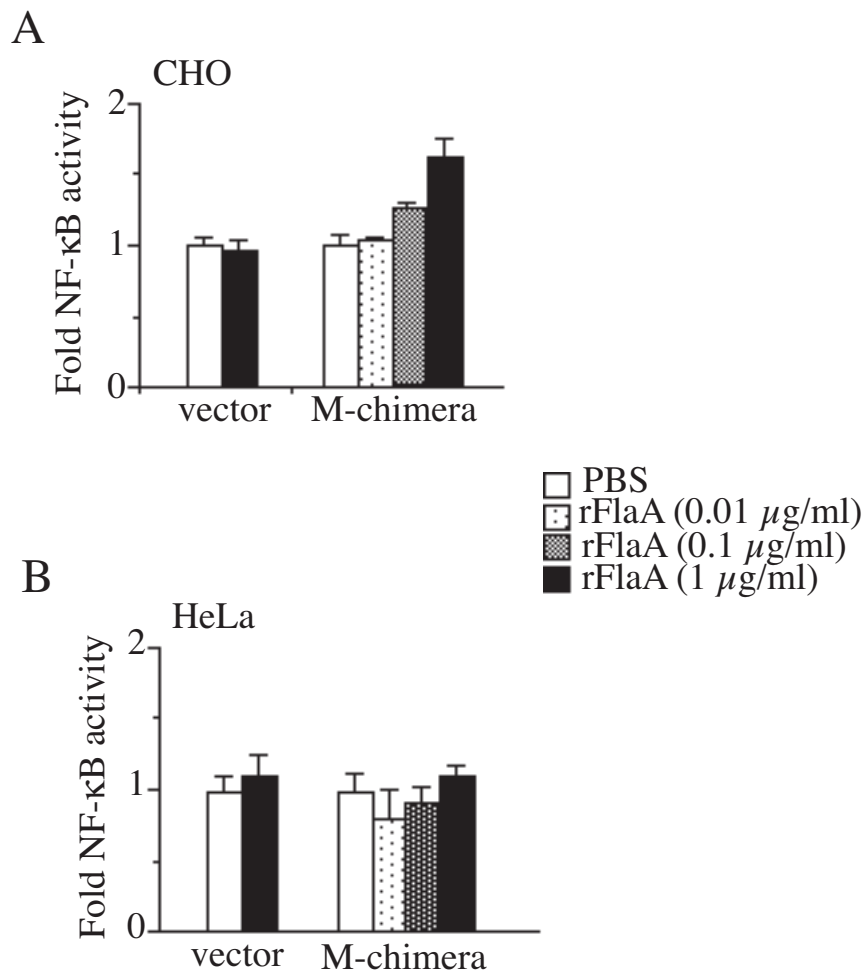


図2-9. M-chimeraのFlagellin認識活性

M-chimera及びhuTLR5をCHO (A) またはHeLa (B) 細胞に一過的に発現させ、rFlaA (0.01, 0.1, 1 μ g/ml) で6時間刺激を行った。ホタルルシフェラーゼ活性によって現れるNF- κ Bプロモーター活性を未刺激時における値の相対値で表した。なお、値は3回の実験結果の平均値を用い、標準偏差をエラーバーで表した。

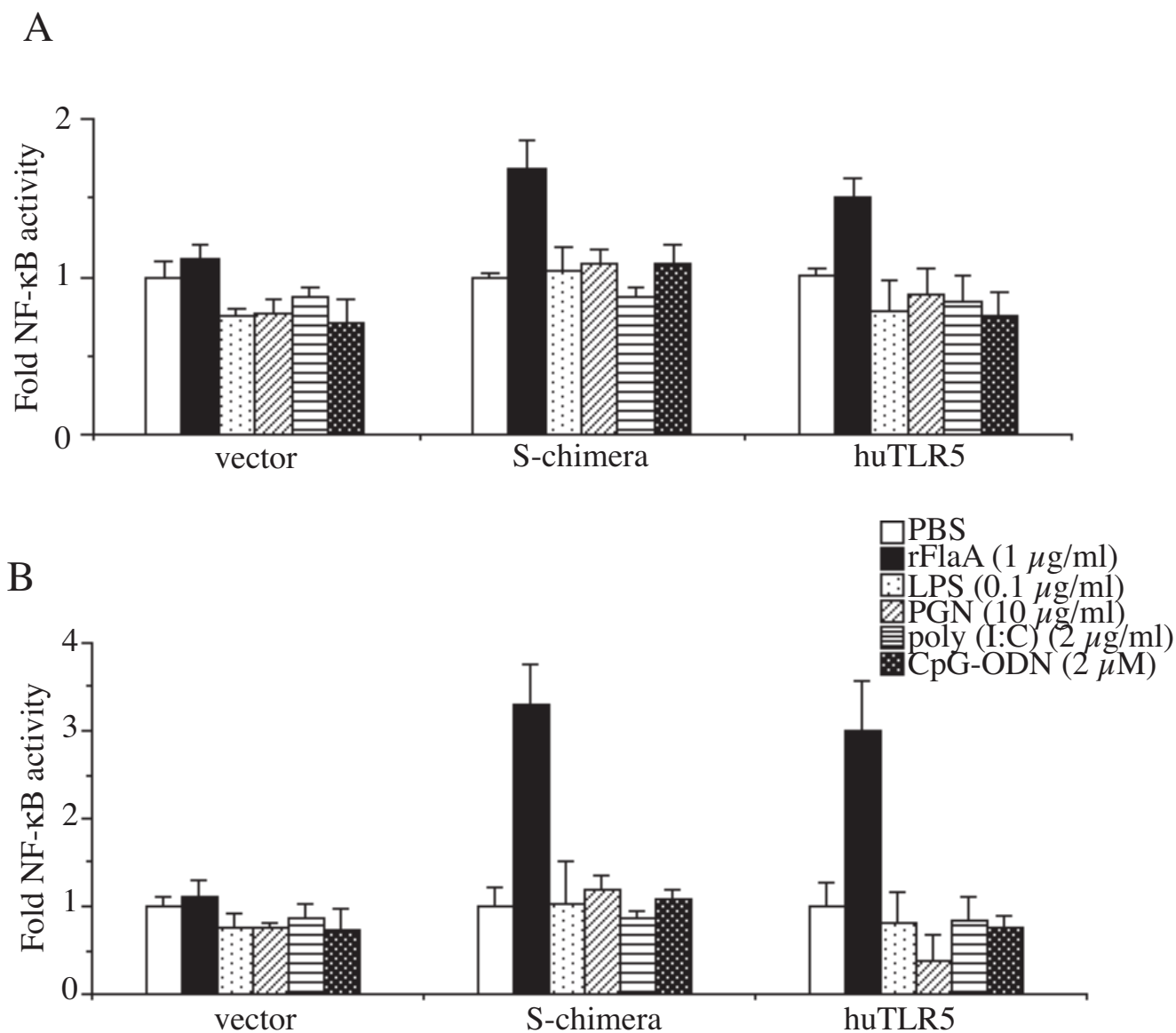
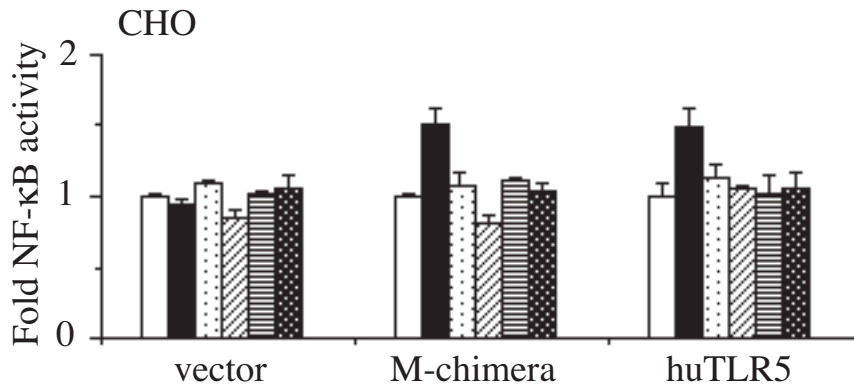


図2-10. S-chimeraの各種PAMPs認識活性

S-chimera及びhuTLR5をCHO (A) またはHeLa (B) 細胞に一過的に発現させ、rFlaA (1 $\mu\text{g/ml}$)、LPS (0.1 $\mu\text{g/ml}$)、PGN (10 $\mu\text{g/ml}$)、poly(I:C) (2 $\mu\text{g/ml}$)またはCpG-ODN (2 μM)で6時間刺激を行った (CpGの場合は9時間)。ホタルルシフェラーゼ活性によって現れるNF- κ Bプロモーター活性を未刺激時における値の相対値で表した。なお、値は3回の実験結果の平均値を用い、標準偏差をエラーバーで表した。

A



B

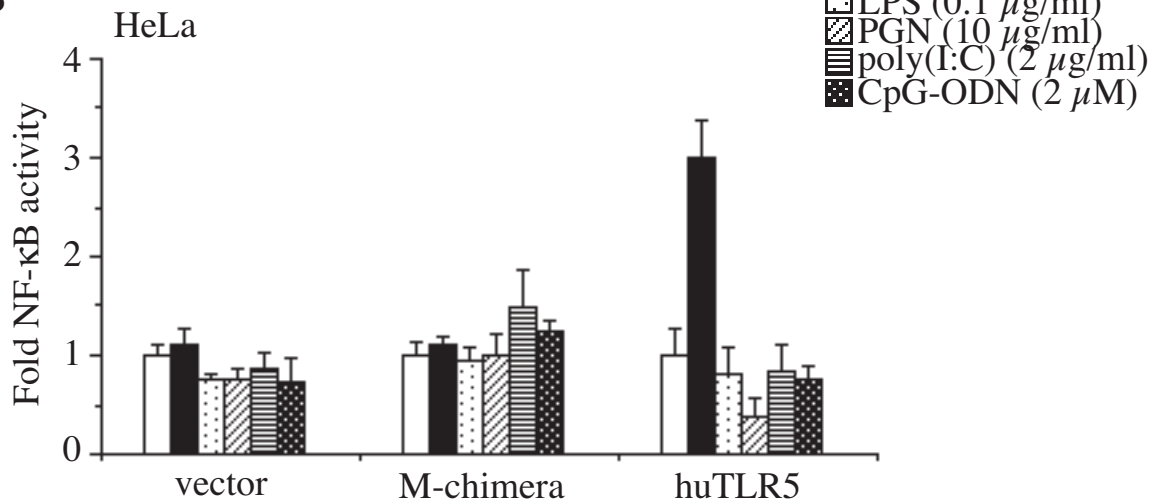


図2-11. M-chimeraの各種PAMPs認識活性

M-chimera及びhuTLR5をCHO (A) またはHeLa (B) 細胞に一過的に発現させ、rFlaA (1 μg/ml)、LPS (0.1 μg/ml)、PGN (10 μg/ml)、poly(I:C) (2 μg/ml)またはCpG-ODN (2 μM)で6時間刺激を行った (CpGの場合は9時間)。ホタルルシフェラーゼ活性によって現れるNF-κBプロモーター活性を未刺激時における値の相対値で表した。なお、値は3回の実験結果の平均値を用い、標準偏差をエラーバーで表した。

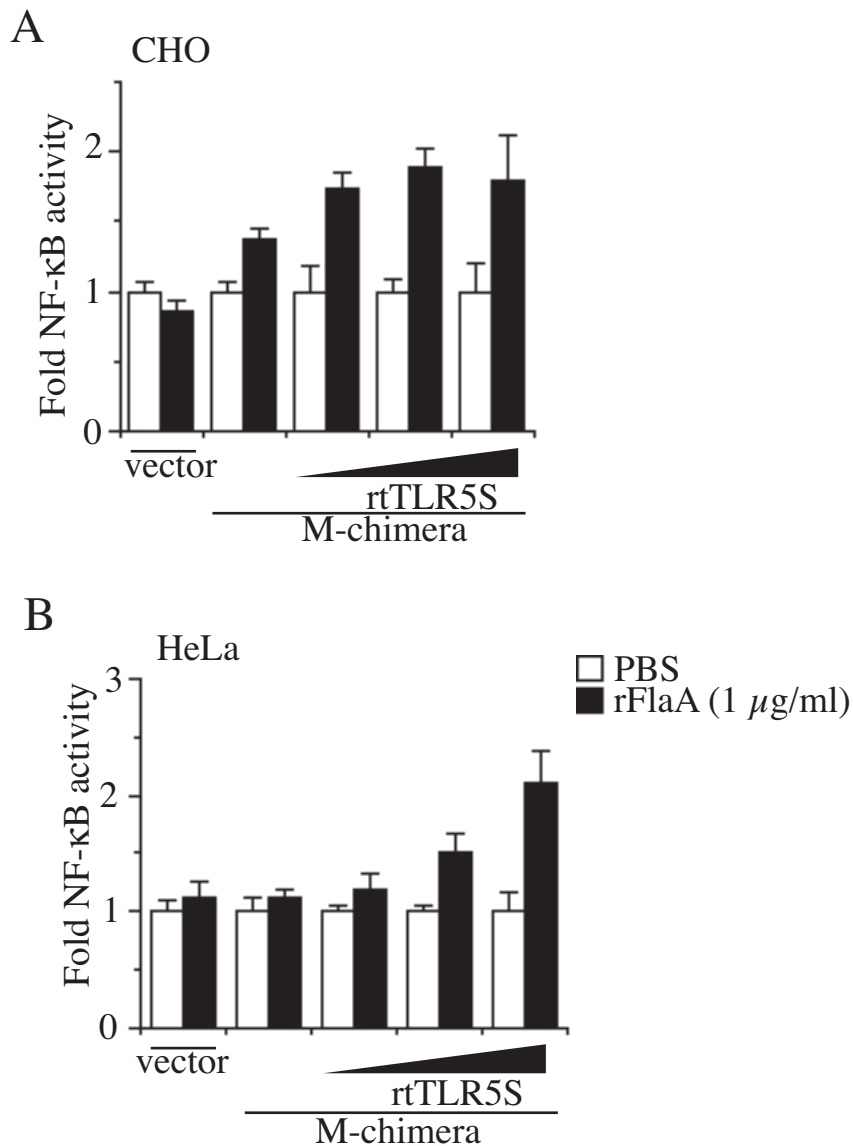


図2-12. rtTLR5SによるM-chimeraのFlagellin認識能の活性化

M-chimeraをCHO (A)またはHeLa (B)細胞に一過的に発現させ、刺激12時間前に可変量(1-100 μg)のrtTLR5S発現ベクターを導入したCHO (A)またはHeLa (B)細胞の培養上清と交換し、CHO-K1細胞またはrFlaA (1 μg/ml)で6時間刺激を行った。ホタルルシフェラーゼ活性によって現れるNF-κBプロモーター活性を未刺激時における値の相対値で表した。CHO細胞においてはrtTLR5Sを加えることによってrFlaA認識活性が上昇した。特にHeLa細胞においてはM-chimera単体ではrFlaAに応答できないが、rtTLR5Sを加えることによってrFlaAを認識しNF-κBの転写を誘導した。なお、値は3回の実験結果の平均値を用い、標準偏差をエラーバーで表した。

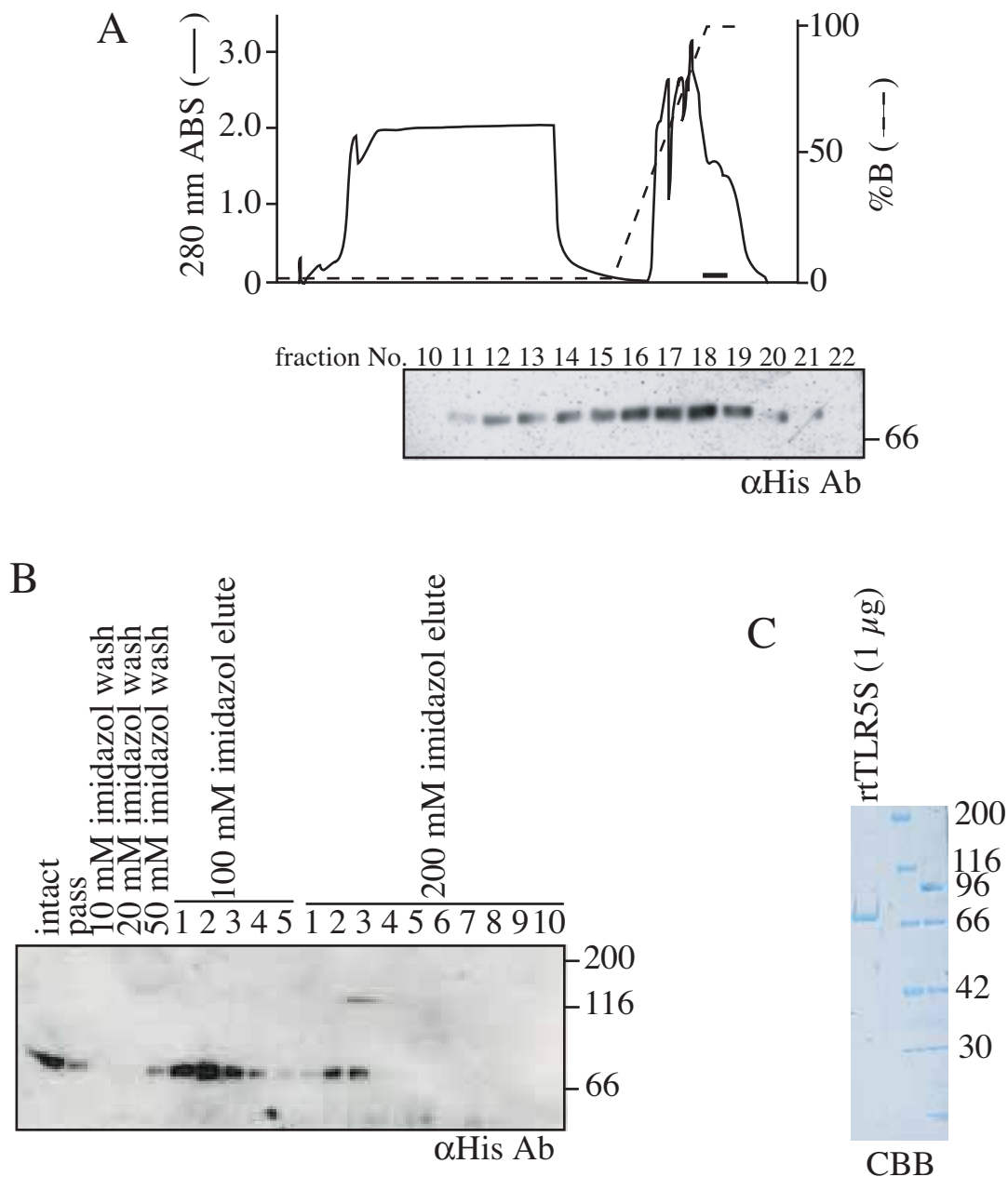


図2-13. 組み換えrtTLR5Sの精製

バキュロウイルス-昆虫細胞発現系にてrtTLR5Sを発現させ、PEG#4000で濃縮を行った培養上精を出発材料として精製を行った。A, RESOURCE Qで分画を行った。溶出はリニアグラジエントで行い点線で示した。タンパク質量は280 nmの吸光度でモニターした(実線)。rtTLR5Sの溶出確認は抗Hisタグ抗体によるウエスタンブロッティングで行い、回収したfraction No及びその部位を太線で示した。B, 同様にHi-Trap Ni Chelating HPで精製を行い、rtTLR5S画分を抗Hisタグ抗体によるウエスタンブロッティングで確認し、100 mM 及び200 mM imidazol溶出画分を回収し、精製タンパク質とした。C, 精製rtTLR5S 1 μgをSDS-PAGEで分画した後、Coomassie brilliant blueで染色した。

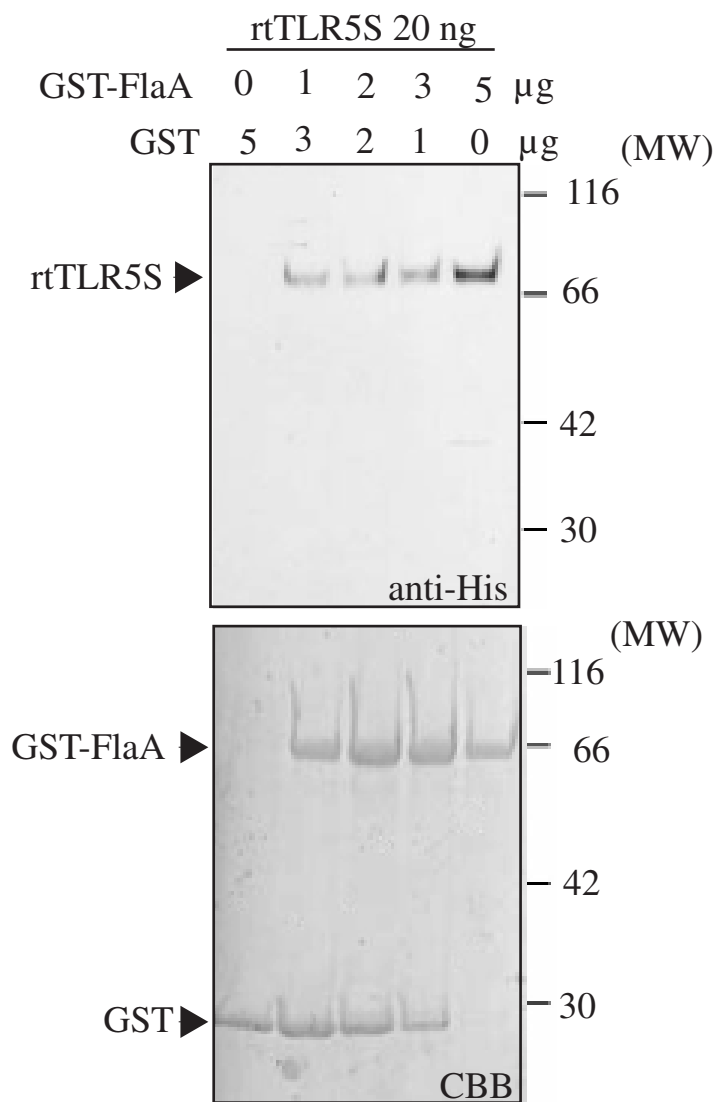


図2-14. rtTLR5SとFlagellinは直接結合する

PBS中でrtTLR5S (20 ng) と表記のGST、GST-FlaAを混合し、さらにGlutathione-sepharoseを加え、PBSで十分洗浄した後、複合体を10 mM還元型グルタチオン/PBSにて溶出を行った。溶出物をSDS-PAGEで分離し、Hisタグ抗体でrtTLRSを検出した。またGST及びGST-FlaAはCoomassie Brilliantblueで染色した。なお、分子量は右に示す。

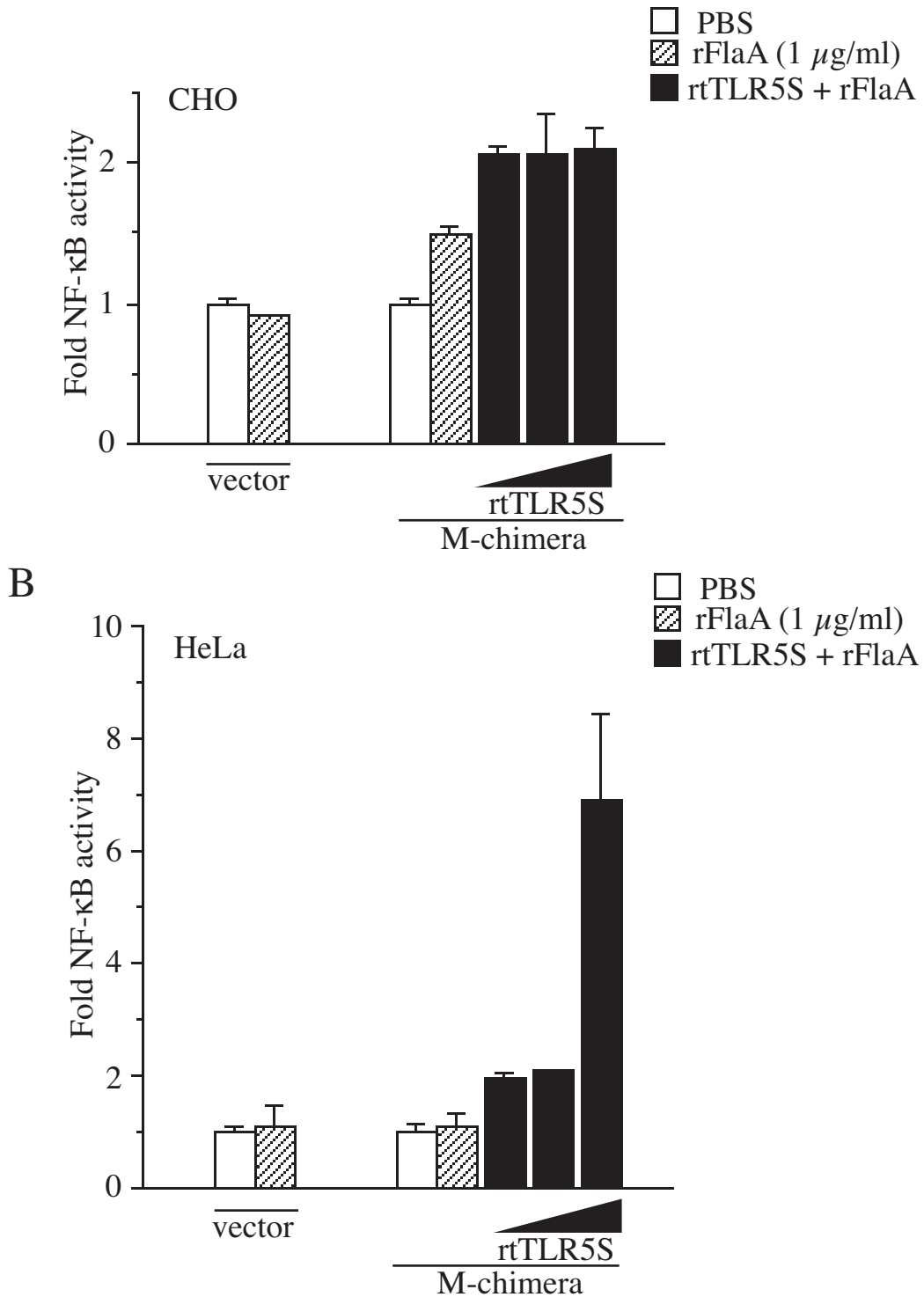


図2-15. Flagellin認識におけるrtTLR5Sの影響

M-chimeraをCHO-K1 (A) またはHeLa (B) 細胞に一過的に発現させ、刺激16時間前に可変量 (1-100 ng/ml) の精製rtTLR5Sを加え、GST (1 μg/ml) またはrFlaA (1 μg/ml) で5時間刺激を行った。ホタルルシフェラーゼ活性によって現れるNF-κBプロモーター活性を未刺激時における値の相対値で表した。なお、値は3回の実験結果の平均値を用い、標準偏差をエラーバーで表した。

2-4. 考察

本章では、ニジマス可溶型及び膜型 TLR5 (rtTLR5S と rtTLR5M) の機能解析を行い、rtTLR5M 及び rtTLR5S がヒト及びマウスの TLR5 と同様のリガンド (Flagellin) を認識し、魚類から哺乳類まで TLR5 による Flagellin 認識機構が保存されていることを明らかにした。また、rtTLR5S 及び rtTLR5M による Flagellin 認識機構は

- 1, Flagellin が rtTLR5M によって認識される。
- 2, rtTLR5M からのシグナルによって rtTLR5S が誘導される。
- 3, rtTLR5S は細胞外で Flagellin と直接結合する。
- 4, rtTLR5M と rtTLR5S が共存することで Flagellin 認識能が高まる。

となっていると考えられ、現在までに報告がない新奇の Flagellin 認識機構をニジマスが備えていることを明らかにした。

魚類の TLR には本章で解析した可溶型 TLR5 と膜型 TLR5 による Flagellin 認識機構以外にも、LPS 認識に関与する TLR4 が存在しない、魚類特異的な TLR が 2 種 (TLR21、TLR22) 存在する点で哺乳類と異なっている(31)。近年、他の魚種についても TLR の報告があり(47-50)、いずれの報告も遺伝子を指標とし機能予測を行っているが、TLR 自体の発現量を指標としておりサイトカインなどの転写量を検証していない。本研究においてはニジマス細胞株 RTH-149 及び RTG-2 に *V. anguillarum* 死菌及び Flagellin 刺激を行い、rtTLR5M、rtTLR5S、rtIL-1 β 及び rtTNF- α の発現量を評価することで機能予測を行った。その結果、rtTLR5M は刺激によっても発現量は変動しないが、rtTLR5S は rtIL-1 β 及び rtTNF- α 等のサイトカインと同様、PAMPs 誘導性の分子であることを明らかにした。1-4 で述べたように、PAMPs 依存的に発現されるスプライシングバリエーションは存在するが、発現から制御されている TLR はこの rtTLR5S が始めてである。また今後は、1 章におけるゲノム配列をもとに rtTLR5S の転写調節機構について解析をおこなう必要がある。

TLR5 のリガンドとなる Flagellin はバクテリアの鞭毛 (Flagella) の構成成分として存在しており、N 末端と C 末端に長い α -helix 構造をもつ。この部分が疎水結合をすることによってしゃもじのような形を作っている(51)。しかも、様々なバクテリアの Flagellin は同様の構造をとり、この幹となる部分が TLR5 による認識に関係していると示された(52)。

上皮細胞へのバクテリアの感染に際しては、CaCo-2、T84、MDCK 細胞によって再現されている(45, 53, 54)。バクテリアは腸管 apical 側より感染しうるが、Flagellin 認識に預かる TLR5 は basolateral 側に局在しており、バクテリア感染を検知することはできない(45)。しかし、驚くことに、近年 *Salmonella typhimurium* は salmonella

pathogenicity island (SPI-2) を腸管上皮細胞に作用させることにより、小胞輸送によって Flagellin を apical 側から basolateral 側へ送り込み、IL-8 の過剰分泌を誘導し、炎症反応を引き起こすことが明らかとなった(55)。一方同じプラスミドにコードされる SPI-1 は *S. typhimurium* 自体の細胞内侵入に関与するが、Flagellin の translocation には関与しておらず、IL-8 の過剰分泌も誘導しない。つまり、腸管上皮細胞においては常在菌の Flagellin は認識されないように仕組みられており、SPI-2 等を持つ病原性のバクテリアの Flagellin が basolateral 側に局在する TLR5 によって認識され、IL-8 等の炎症性サイトカインの過剰分泌を誘導し、腸炎を引き起こすことが示唆された。また本研究で使用した *V. anguillarum* は経口感染が主な進入経路であり、腸管が感染局所となる(56)。リンパ系が発達していない魚類においては、侵入した微生物は局所でマクロファージによって貪食されるか、血流にのり広がった場合には頭腎や脾臓のリンパ様組織でトラップされることによって免疫応答を惹起する(57)。*V. anguillarum* がどのようにして腸管粘膜から侵入し全身に広がるか明らかではないが、魚類の腸管上皮細胞はタンパク質等の高分子を取り込む性質を有していることを考えると(58)、腸管上皮細胞に存在する rtTLR5M によって Flagellin が認識され rtTLR5S は急性期応答タンパク質として機能することが予想される。また、現在までに相乗的に働く TLR 分子の報告はなく、rtTLR5S は Flagellin 認識時における活性化因子であることも急性期応答タンパク質として考えられる。またこのようなシステムは哺乳類において、LPS に応答し、可溶性の LBP(59)や CD14(60)が誘導され活性化する機構と似ている。

近年、初期発生の実験に使用されてきたメダカやゼブラフィッシュなどの小型魚類が、免疫機構を理解するモデルとして注目されつつある。その利点は、①発生を通して体が透明である。②蛍光タンパク質を指標とした時空間的な解析が可能。③フォワードジェネティクスによって得られた数々の変異体が存在する。④データベースが構築が進んでいる。⑤モルフォリノオリゴを用いて発生初期段階のみであるが遺伝子のノックダウンが可能ながあげられる(61)。現在までに *Micobacterium marinum* を用いた結核や *S. typhimurium* の細菌感染モデル(62, 63)や、白血病モデル(64)、老化モデル(65)などの構築が進んでいる。最近、ゼブラフィッシュにおいて *in silico* クローニングによって TLR ファミリーが同定された(48, 49)。当研究室で行われたフグの結果とは幾分異なり、1, TLR4 が存在する、2, 可溶型 TLR5 が存在しない、3, フグに比べてバリエーションが多く存在することがあげられるが、これはゲノムプロジェクトが不完全なためと、ゼブラフィッシュが偽4倍体あることが原因と考えられており、今後ゲノム配列が詳細になることで明らかとなると考えられる。また、ほとんどの TLR は発生 12 時間で TLR5 を除いては揃うが、MyD88 を始めとするアダプター分子は 5 日後から発現することが示されており(49)、自然免疫応答が発生のどの段階から機能を発揮するのか考察する上で興味深い。さらに、ショウジョウバエにおいて Toll は発

生に関与し、成体となると異物認識レセプターとして機能する(4)名残としても予想できる。今後、魚類を用いて自然免疫を題材にした研究を行うには魚類と哺乳類の違いを明らかにする必要がある、本研究はその一つを解決することができた。今後は魚類特異的に存在する TLR21 と TLR22 の機能解析の結果が待たれる。

現在までに組み換え TLR を用いてリガンドとの直接結合を観察した知見は TLR2 と TLR9 においてのみ報告されており TLR の発現効率の低さから生化学的な解析が遅れている。ヒト TLR2 における PGN との結合は PGN を固層化したプレートの上に、組み換え TLR2 を加え、抗 TLR2 抗体で検出することで検討している(66)。また TLR9 については BIACORE を用いた知見がある。組み換え TLR9 をセンサーチップに固層化し、アナライトに CpG-ODN を流すことで結合を観察している(67, 68)。本研究においては、TLR とリガンドがどちらもタンパク質である利点を生かして GST-Pull down アッセイを採用し、rtTLR5S と Flagellin は直接結合することができることを証明した。今後は rtTLR5S と rtTLR5M 及び Flagellin の3者の複合体の存在を組み換えタンパクで証明し、この仮説を裏付ける必要があると考えている。

最後に、1章及び本章で、ヒトと魚類で TLR ファミリーの原型が保存されており、事実、魚類と哺乳類の TLR5 は Flagellin を認識しできることを明らかにした。さらに、魚類には膜型の TLR5 に加え、可溶型の TLR5 も存在し、Flagellin 認識を強化していることが明らかとなった。おそらく、可溶型 TLR5 は水系環境による圧力によって出現した分子であると考えられ、今後、他の魚種ばかりではなく、他の生物種でも発見される可能性もあるのではないだろうか。

第3章 TLR5 の Flagellin 認識における N-glycosylation の重要性の検討

TLR においてリガンド認識に必要な部位の同定は、アダプター分子を中心としたシグナル伝達の知見に比べて少なく、現在のところ TLR2 と TLR5 においてなされている。TLR2 は N 末端より 7 つの LRR はペプチドグリカンの認識には関与しておらず、8-20 番目の LRR が PGN 認識に重要な役割を果たしている(69, 70)。また Mizel らは TLR5 の deletion mutant を発現させた COS-1 細胞の lysate と His タグ標識 Flagellin で混合し、His タグで精製することによって結合能を確認し、huTLR5 の LRR (aa 386-407) が Flagellin 認識に関わる部位であると示唆している(71)。一方、Jacchieri らは huTLR5 と *Salmonella enterica*、*S. Typhimurium*、*Pseudomonas aeruginosa* 及び *Listeria monocytogenes* の Flagellin における共通部分の配列との疎水結合指数から huTLR5 の結合ドメイン (aa 552-561) と導き出しているが、シュミレーションのみにとどまっている(72)。そこで本研究では第1章で得られた rtTLR5M 及び rtTLR5S、さらにフグ TLR5M 及び TLR5S をアライメントし、huTLR5 において Flagellin 認識に必須の機能アミノ酸について検討したので報告する。

3-1. 実験材料

3-1-1. 細胞

ヒト胎児由来腎細胞株 HEK (human embryonic kidney) 293 細胞は住友製薬より供与されたものを用い、10% FCS、100 mU/ml Penicillin G、100 µg/ml streptomycin を添加した D-MEM を用いて 37°C、5% CO₂ 中で培養した。

3-1-2. バクテリア

緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* AN19 は九州大学生物資源環境科学科・海洋資源科学研究室、沖野望博士より供与された。LB 寒天培地で 25°C において 36 時間培養を行い、コロニーを形成させた。シングルコロニーを選択し LB 培地で 25°C において 24 時間振蕩培養を行い 6,000 rpm、5 分間、4°C で遠心を行い、菌体を回収した。回収した菌体は PBS で 3 度洗浄した後、ペレットとして -80°C にて保存した。

3-2. 実験方法

3-2-1. *P. aeruginosa* AN19 からのゲノム DNA の抽出

2-2-1 参照。

3-2-2. 組み換え Flagellin の作製

P. aeruginosa AN19 ゲノム DNA 溶液を鋳型とし、PCR によって *P. aeruginosa* FliC (AAG04481.1)(73)の増幅を行った。なお FliC の増幅に使用したプライマーは下記に示す (プライマー配列中で制限酵素サイトは下線で示す)。以下の手法は 2-2-2 に従って行った。

FliC 5'-AGGATCCATGGCCCTTACAGTCAACAC-3'
 5'-TGAATTCGCGCAGCAGGCTCAGGAC-3'

3-2-3. 脱糖鎖処理が及ぼす Flagellin 認識活性の検討

HEK293 細胞を 2.0×10^5 cell ずつ 24 well plate に播種し、翌日、1 well あたり pELAM-luc 300 ng、phRL-TK control vector 0.1 ng を LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) を用いトランスフェクションした。脱糖鎖処理は、12 時間後に tunicamycin (終濃度 0.01, 0.1 $\mu\text{g/ml}$) を加え 16 時間インキュベートするか、刺激 1 時間前に培地を OPTI-MEM (Invitrogen) に換え NaIO_4 (終濃度 0.01, 0.1 mM) を添加することで行った。脱糖鎖処理が終わった細胞を GST (1 $\mu\text{g/ml}$) または rFliC (1 $\mu\text{g/ml}$) で 5 時間刺激を行い、レポーター遺伝子活性を評価した。(2-2-8 参照)

3-2-4. 1 アミノ酸置換体の作製

pFLAG/huTLR5 を鋳型として、T4 Polynucleotide Kinase (PNK) で 5'末端をリン酸化したプライマー (huTLR5 N342Q F、huTLR5 N598Q F) を用いて PCR を行った。PCR は 2.5 U Pfu turbo DNA ポリメラーゼ (Stratagene, La Jolla, CA) を用い pFLAG/huTLR5 50 ng, 0.2 μM huTLR5 N342Q F 及び huTLR5 N598Q F (変異導入箇所は太字で示す)、20 U Taq DNA リガーゼ (New England Biolabs, Beverly, MA)、0.5 \times Pfu バッファー、0.5 \times Taq DNA リガーゼバッファー、0.2 mM dNTP で 50 μl の合計量で反応を行った。PCR 条件は 65°C, 5 min, 95°C, 2 min, (95°C: 10 sec, 55°C: 30 sec, 65°C: 14 min) \times 25 cycle, 75°C: 7 min で行った。PCR 産物を DpnI (New England Biolabs, Beverly, MA) でメチル化 DNA を分解し、引き続き PCR を行った。PCR 条件は 95°C, 30 sec, (95°C: 30 sec, 55°C: 2 min, 70°C: 14 min) \times 2 cycle, 75°C: 7 min で行い、PCR 産物を大腸菌にトランスフォー

メーションした後、シーケンスにて塩基置換を確認し、それぞれ pFLAG/huTLR5 N342Q と pFLAG/huTLR5 N598Q とした。

huTLR5 N342Q F: 5'-TGACAACCTCCAAGTTCTCCAGTTGTCATATAACCTTCTG-3'

huTLR5 N598Q F: 5'-CAATTGGCTTAATCACACCCAGGTCACACTATAGCTGGGCC-3'

3-2-5. HeLa 細胞を用いた評価

HeLa 細胞を 2.0×10^5 cell ずつ 24 well plate に播種し、翌日、1 well あたり pFLAG-CMV-1 空ベクター、pFLAG/huTLR5、pFLAG/huTLR5 N342Q または pFLAG/huTLR5 N598Q 200 ng、pELAM-luc 100 ng、pRL-TK control vector 0.1 ng を PolyFECT を用いトランスフェクションした。24 時間後に 0.05% EDTA/PBS で細胞をはがし、24 well プレート 1 well あたり 96 well プレート 6 well にまき直した。16 時間培養した後に rFliC (1 μ g/ml) で刺激を行い、PBS 洗浄した後に 25 μ l/well の Passive Lysis Buffer で可溶化し、レポーター遺伝子活性を評価した (2-2-8 参照)。

3-3. 実験結果

3-3-1. 脱糖鎖処理

HEK293 細胞は内因的に TLR5 を発現しており、Flagellin を認識することができる (45)。ヒト TLR5 の機能解析を行うに当たり、ヒト日和見感染菌である緑膿菌 *P. aeruginosa* の Flagellin FliC をクローニングし GST との融合タンパク質として発現させ、精製した。GST-FliC は予想される分子量 49 k + 26 k よりも若干小さい分子として発現した。しかしながら thrombin で GST を切断すると、予想された分子量 49 k のところに rFliC が確認できた (図 3-1A)。この rFliC を用いて、TLR5 の糖鎖が及ぼす Flagellin 認識能の評価を脱糖鎖処理剤 tunicamycin 及び NaIO₄ を用いて検討した。その結果、HEK293 細胞の rFliC 認識活性は細胞にダメージが大きいためかデータのぶれは大きくなっているものの tunicamycin 及び NaIO₄ 濃度依存的に減少し、確かにリガンド認識に糖鎖が関係していることが示唆された (図 3-1B)。

3-3-2. 糖鎖付加部位の探索

huTLR5 には 6 つの N 型糖鎖付加部位が存在するが、図 1-5 でニジマス、フグの TLR5 も含めアライメントすると、その部位は 2 つに絞られた。即ち huTLR5 において 342 番目と 598 番目のアスパラギンである (図 3-2)。そこでこの部位に PCR によって塩基置換を導入した発現ベクター pFLAG/huTLR5 N342Q 及び pFLAG/huTLR5 N598Q を

作製し HeLa 細胞にて Flagellin 認識活性を検討した。その結果、wt と比較して N598Q は遜色のない活性を示したが、N342Q は完全に活性を消失していた。しかしながら発現量が少なく、ウエスタンブロッティング及び FACS では発現の確認はとれなかった。

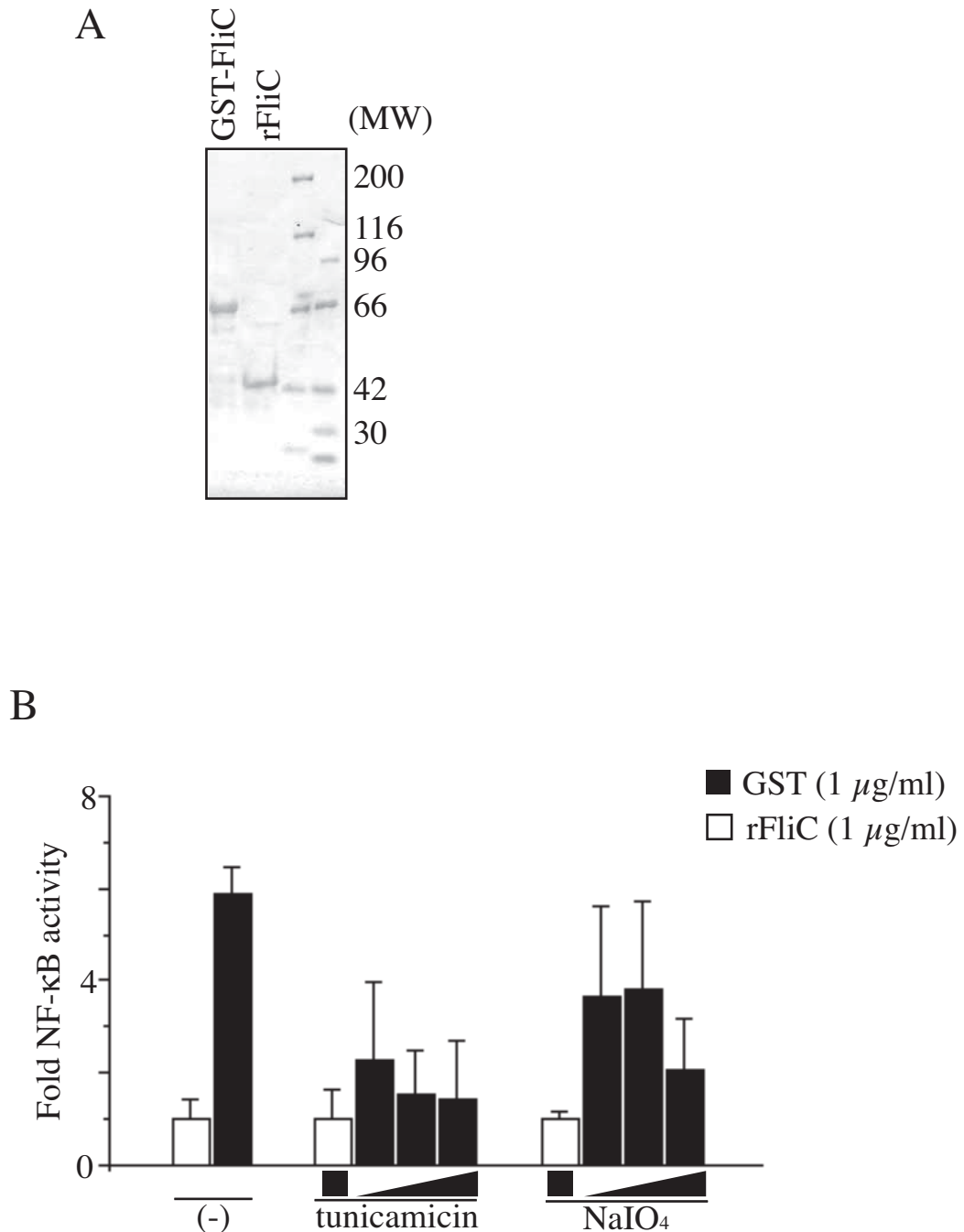
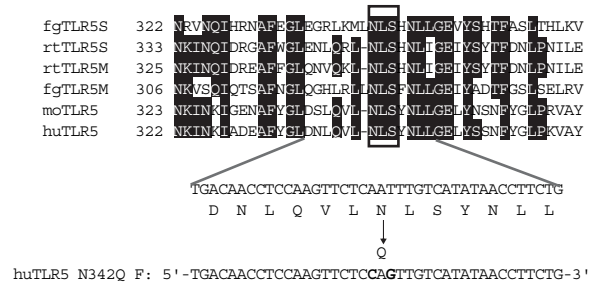


図3-1. 脱糖鎖処理によるFlagellin認識の低下

A, N末端にGSTを融合させた*P. aeruginosa*のFlagellin (FliC) を大腸菌 BL21(DE3)pLysEで発現させ、Glutathione-Sepharoseで精製を行った。精製したGST-FliC及びthrombin消化で得られたrFliCをSDS-PAGE (10%) で分離を行い、Bio-Safe Coomassie Brilliant Blueを用いて染色を行った。B, HEK293細胞を刺激12時間前にtunicamycin (0.01, 0.1, 1 μg/ml)、または刺激1時間前にNaIO₄ (0.01, 0.1, 1 mM) で脱糖鎖処理を行い、GST (1 μg/ml) またはrFliC (1 μg/ml) で5時間刺激を行った。ホタルルシフェラーゼ活性によって現れるNF-κBプロモーター活性を未刺激時における値の相対値で表した。なお、値は3回の実験結果の平均値を用い、標準偏差をエラーバーで表した。

N342Q



N598Q

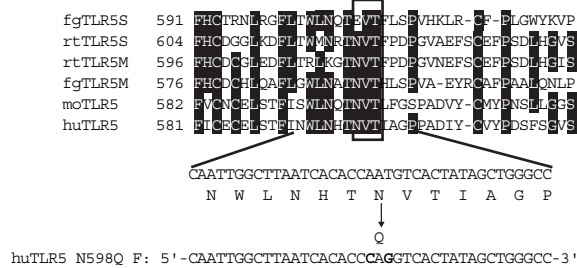


図3-2. N型糖鎖付加部位変異体の作製

ヒト、マウス、フグ及びニジマスTLR5において保存されているN型糖鎖付加部位を図1-5より抜粋して示した。huTLR5において保存されている342、598番目のアスパラギンをhuTLR5 N342Q F及びhuTLR5 N598Q Fを用いてdirect mutagenesis法で太字で示した塩基へ置換を行い、グルタミンへと置換した。huTLR5におけるそれぞれの置換体はhuTLR5/N342Q及びhuTLR5/N598Qとした。

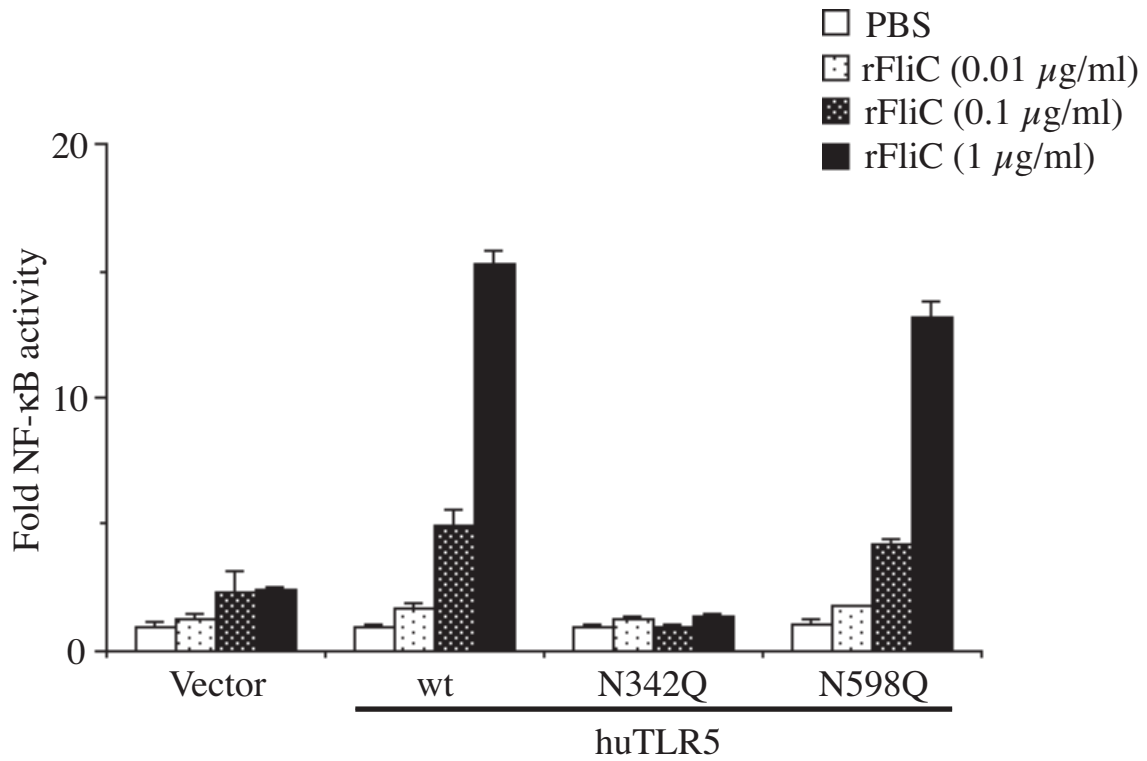


図3-3. N型糖鎖欠質体N342QとN598QのFlagellin認識能

huTLR5/wt, N342QまたはN598QをHeLa細胞に一過的に発現させ24時間後にGST (1 μg/ml) またはrFlaA (0.01, 0.1, 1 μg/ml) で5時間刺激を行った。ホタルルシフェラーゼ活性によって現れるNF-κBプロモーター活性を未刺激時における値の相対値で表した。なお、値は3回の実験結果の平均値を用い、標準偏差をエラーバーで表した。

3-4. 考察

TLR はリガンドを認識しシグナルを伝達するレセプターであることは周知の事実であるが、その認識メカニズムについての報告は非常に少ない。このことは TLR 自体の発現が非常に弱く、生化学的な解析が困難なことが原因と考えられる。現在までの報告は、LRR の欠質変異体を用いた解析であり(69-71)、タンパク質は α -helix、 β -sheet等の2次構造を形成し、システインによる架橋が行われることで3次構造を形成するばかりか、膜タンパク質や分泌タンパク質の多くは糖鎖付加されており、その機能に重要な役割を果たすことを考えると、本来の立体構造から大きくかけ離れている可能性が高い。そこで、本研究では TLR5 に付加される糖鎖がリガンド認識に関与するか検討を行い、脱糖鎖処理剤 (Tunicamycin 及び NaIO_4) 処理で Flagellin 認識活性が減少することを明らかにした。

哺乳類以外の生物におけるホモログタンパク質の同定は分子進化の考察に寄与するばかりではなく、そのタンパク質の機能ドメイン同定において良い指針となる。特に自然免疫に関係する分子は広く生物に存在するので良いサンプルとなる。最近 Weber らは哺乳類から鳥類まで全ての TLR2 において保存されている 442 番目のアスパラギンに付加される N 型糖鎖が I 型膜タンパク質として発現するために必須であることを示した(74)。また da Silva Correia らは TLR4 に存在する 4 つの N 型糖鎖部位のうち 2 つが膜タンパク質としての発現、LPS との結合、MD2 との結合全てにおいて必須であると示唆している(75)。しかしながら、精製組み換えタンパクを用いたリガンド認識に関係する N 型糖鎖部位の考察は行われておらず、今後の解析が待たれる。本研究では比較対照とする遺伝子配列を魚類まで加えることにより、進化上重要な N 型糖鎖付加部位及び機能アミノ酸の探索を行った。その結果、哺乳類 TLR5 間における N 型糖鎖部位は実に 6 つ全てが保存されているが、本研究で取得したニジマス膜型及び可溶型 TLR5 と、フグ膜型及び可溶型 TLR5 をアライメントすることにより 2 カ所に絞り込むことが可能となり、実際にそのうちの 342 番目のアスパラギンが Flagellin 認識に重要な役割を果たすことを明らかにした。今後は、野生型 huTLR5 と 342 番目のアスパラギンをグルタミンへ変換した huTLR5 の組み換えタンパク質を HEK293FT 細胞にて発現検討し、生化学的な解析を進めていく予定である。

終章 TLR を指標とした自然免疫の系統進化

免疫研究においては病気へ直結することからヒト及びマウスで精力的に研究が行われているが、なぜ脊椎動物が獲得免疫を備える必要があったかという命題に答えることはできない。先にも述べたが免疫系には獲得免疫と自然免疫が存在し、お互いが協調しあって強力な生体防御機構を構築している。しかし、獲得免疫を持たない、あるいはそれが原始的な生物が哺乳類と比較して貧弱な免疫機構であるとは言い切れない。それは我々と同様、現代まで病原微生物に抵抗し生存できたためであり、筆者はこのような生物には脊椎動物には存在しない免疫機構が存在すると考えている。本研究室におけるフグゲノムデータベース解析から TLR は魚類にも存在し、そのサブセットはほぼ共通であることが示唆された(31)。このことは自然免疫で重要な役割を果たすとされる TLR の拡散は魚類以前に行われたことを示す。現在までに data base 上に存在する TLR のアミノ酸配列(ヒト、マウス、ニワトリ(76)、フグを中心に out group は *C. elegans* Tol-1(77)とした)を用い系統樹解析を行うと、TLR は TLR1, 6, 10、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7, 8, 9 でクレードを形成した(図 III)。さらに、この TLR ファミリーにおいて遺伝距離は種間で保存され、魚類から哺乳類まで正常進化を遂げている分子といえる。個々のクレードについて述べると、

- ・ TLR1, 6, 10 ; 現在までに魚類、鳥類において TLR1 の拡散は見られず、TLR1, 6, 10 という拡散は哺乳類に分岐して起こっている。また哺乳類において TLR1, 6, 10 は TLR2 の co-receptor となりうることも、TLR2 と TLR1, 6, 10 の遺伝距離が近接している故の結果であると考えられる。

- ・ TLR4 ; 魚類には存在しないので哺乳類と鳥類のみでの解析になるが、その他のクレードと比較してそれぞれの種間でアミノ酸置換度は2倍近くになっており、変異の蓄積が他の TLR の2倍おこっていることが考えられる。ヒトにおいて TLR4 は様々なリガンドを認識するために co-receptor、アダプター分子を多様化させ進化速度を加速させて機能を獲得したのかもしれない。

- ・ TLR5 ; 本研究において解析を行った rtTLR5M 及び rtTLR5S とフグ膜型及び可溶性 TLR5 (fgTLR5M 及び fgTLR5S) との類縁関係において、可溶性 TLR5 は魚類への分岐によって生じた分子ではなく、個々の個体へ分岐し、何らかの選択圧が生じることで備える必要があったことが示唆された。

- ・ TLR3, 7, 8, 9 ; これらの TLR は細胞内に局在することが報告されており(78)、系統関係においても比較的近くに集積することから、細胞内へ局在する TLR の祖先分子から拡散したものであると考えられる。

・TLR21 ; data base で検索した結果、ニワトリにも TLR21 ホモログがあることが判明した。これらの分子はマウス TLR13 とクレードを形成するが、分岐の時期が近接することからそれぞれの種で分化していることが考えられる。

・TLR22 ; 現在までにフグ、金魚、ヒラメにおいてこの分子が見つまっている。また data base に存在していたナメクジウオ（頭索類）の TLR はこのクレードに属することから、頭索類にはすでに祖先遺伝子が存在し、その後魚類で拡散した遺伝子であることが示唆された。今後、鳥類、哺乳類で消失した原因は魚類での TLR22 の機能解析から明らかになると思われる。

・その他 ; マウスには TLR11 及び TLR12 が存在するが、他の TLR とはアウトグループとなる。また、棘皮動物であるウニにも TLR が存在するが、これもウニで独自に分化を遂げていると考えられ、哺乳類に備わる TLR とは分化の過程が若干異なることが予想された。

以上の結果から、TLR1, 6, 10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, 8, 9 に関しては個体の遺伝距離と同程度となりこのファミリーは魚類以前に備わったことが示唆された。また TLR にはヒトには存在しない独自の TLR がそれぞれの種に存在し、環境に応じて備えたことが考えられる。まだ全てではないが棘皮動物にも TLR が存在するようであるが、系統樹によるとその進化は独自であり、脊椎動物の TLR の原型と考えるには厳しく思える。とすると、このような TLR の拡散はどの生物で起こったのであろうか？

近年、円口類のヤツメウナギには Variable lymphocyte receptor (VLR) という細胞外に LRR を持つ GPI アンカー型のタンパク質が存在し、ゲノムに存在する LRR のカセットを組み替えることによって、多様性の獲得に関係していることが示された(79)。それまで円口類には抗体に代表される獲得免疫、つまり遺伝子の組み換え、記憶という形質は存在しないとされていたが、TCR や BCR の多様性が有顎類で見られるように、円口類では VLR がその機能を担っている可能性が出てきた。さらに VLR は細胞外ドメインにおいて TLR と同様の LRR ドメインを形成することから TLR の拡散は VLR のように拡散したのかもしれない。しかし、機能の選択に関し疑問点が残るのも確かである。今後は円口類まで TLR の解析を進め、TLR の拡散と機能についての知見を待ちたいと思う。

最後に、本研究においては魚類に存在する TLR の機能の一端を解析することができた。以下に本研究で得られた知見をまとめると、

1. ニジマスには哺乳類と同様の膜型 TLR5 (rtTLR5M) と現在までに報告がない可溶性 TLR5 (rtTLR5S) が存在することが明らかとなった。rtTLR5M 及び rtTLR5S は独立

の遺伝子座にコードされており、rtTLR5M は広範囲の臓器で発現が確認されたが、rtTLR5S は肝臓に局限していた。

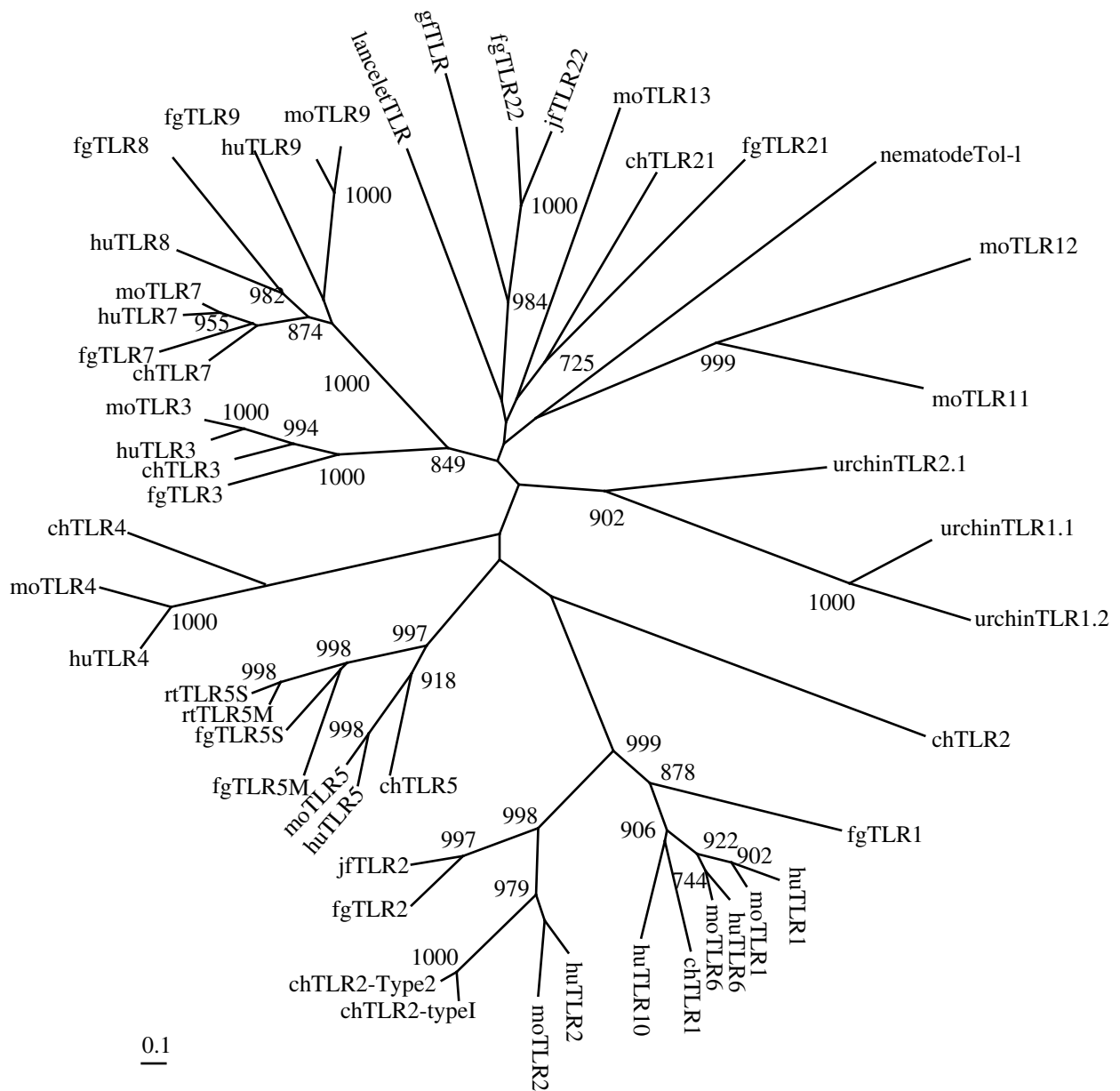
2. rtTLR5S は *V. anguillarum* 及びその Flagellin で発現が誘導され rtTLR5M と協調してシグナル伝達を補助していることが予想された。

3. バキュロウイルス-昆虫細胞発現系で組み換え rtTLR5S を作製し、Flagellin と直接結合できることを確認した。

4. 現在まで報告がある TLR5 とアライメントすることにより TLR5 においては2箇所
の N 型糖鎖付加部位がその機能に重要な機能を持つことを予想し、そのうちヒト
TLR5 における 342 番目のアスパラギンがその機能発現に必須であることを示した。

5. 現在まで報告がある TLR を用いて進化系統樹を作製し、TLR は魚類から哺乳類までその機能は保存されていること、また TLR の拡散は魚類以前の生物で行われた可能性が考えられた。

今後は魚類でその存在が確認されている TLR21 及び TLR22 の機能解析から哺乳類とは異なる TLR サブセットをなぜ魚類が持つ必要があったのか明らかにし、魚類免疫において自然免疫が未熟な獲得免疫を補う主要な免疫機構であることを証明できたらと考えている。



図III. Toll-like receptorの進化系統樹

現在までに配列が明らかになっているTLRの進化系統樹。解析にはヒト、マウス、ニワトリ、フグを主に使用し、金魚 (gfTLR)、ヒラメ (jfTLR2、jfTLR22)、ナメクジウオ (lanceletTLR)、ウニ (urchinTLR1.1、1.2、2.1)を加えた。またTLRのアウトグループとして線虫 (nematodeTol-1)、を加えた。数値はブートストラップ値を示し、800以上の高いスコアについて表記した。系統樹の長さはアミノ酸の置換度を示す。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始適切なお指導、ご討論を賜りました北海道大学大学院医学研究科感染症制御学分野 瀬谷司教授に深く感謝いたします。

終始、有益なお助言、ご討論を賜りました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞構造学講座 塩坂貞夫教授、大阪府立成人病センター研究所免疫学部門 松本美佐子博士に深く感謝いたします。

本論文を審査していただきました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞増殖学講座 竹家達夫教授、分子神経分化制御学講座 中島欽一教授、動物遺伝子機能学講座 石田靖雅助教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するに当たり、実験材料を恵与いただきました、九州大学大学院生物資源環境科学府水族生化学分野 中尾実樹教授、海洋資源科学分野 沖野望助教授、独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所 飯田貴次博士に深く感謝いたします。

研究だけではなく様々な部分でお世話になりました大阪府立成人病センター研究所免疫学部門ならびに、北海道大学大学院医学研究科感染症制御学分野のみなさまには感謝の意に耐えません。

最後に 21 年間に及ぶ学生生活を経済的ばかりではなく精神的に支え、筆者の進む道を見守ってくれた辻田芳徳・敏子様をはじめ家族、親戚に心から感謝いたします。

2005 年 3 月

参考文献

1. Peiser, L., S. Mukhopadhyay, and S. Gordon. (2002). Scavenger receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **14**:123-128.
2. Carroll, M. C. (2004). The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat. Immunol.* **5**:981-986.
3. Hashimoto, C., H. L. Hudson, and K. V. Anderson. (1988). The toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* **52**:269-279.
4. Lemaître, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**:973-983.
5. Williams, M. J., A. Rodriguez, D. A. Kimbrell, and E. D. Eldon. (1997). The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense. *EMBO J.* **16**:6120-6130.
6. Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **1**:135-145.
7. Takeda, K., and S. Akira. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* **17**:1-14.
8. Poltorak, A., P. Ricciardi-Castagnoli, S. Citterio, and B. Beutler. (2000). Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:2163-2167.
9. Schwandner, R., R. Dziarski, H. Wesche, M. Rothe, and C. J. Kirschning. (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* **274**:17406-17409.
10. Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill, and A. Aderem. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**:1099-1103.
11. Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**:740-745.
12. Heil, F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner, and S. Bauer. (2004). Species-specific recognition of

- single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**:1526-1529.
13. Diebold, S. S., T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, and C. Reis e Sousa. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**:1529-1531.
 14. Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**:732-738.
 15. Ohashi, K., V. Burkart, S. Flohe, and H. Kolb. (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J. Immunol.* **164**:558-561.
 16. Asea, A., M. Rehli, E. Kabingu, J. A. Boch, O. Bare, P. E. Auron, M. A. Stevenson, and S. K. Calderwood. (2002). Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* **277**:15028-15034.
 17. Bulut, Y., E. Faure, L. Thomas, H. Karahashi, K. S. Michelsen, O. Equils, S. G. Morrison, R. P. Morrison, and M. Arditi. (2002). Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway. *J. Immunol.* **168**:1435-1440.
 18. Vabulas, R. M., P. Ahmad-Nejad, S. Ghose, C. J. Kirschning, R. D. Issels, and H. Wagner. (2002). HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J. Biol. Chem.* **277**:15107-15112.
 19. Leadbetter, E. A., I. R. Rifkin, A. M. Hohlbaum, B. C. Beaudette, M. J. Shlomchik, and A. Marshak-Rothstein. (2002). Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* **416**:603-607.
 20. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, E. Kopp, A. Stadlen, C. Chen, S. Ghosh, and C. A. Janeway, Jr. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* **2**:253-258.
 21. Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa, and T. Seya. (2003). TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat. Immunol.* **4**:161-167.
 22. Yamamoto, M., S. Sato, K. Mori, K. Hoshino, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira. (2002). Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* **169**:6668-6672.
 23. Oshiumi, H., M. Sasai, K. Shida, T. Fujita, M. Matsumoto, and T. Seya. (2003).

- TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J. Biol. Chem.* **278**:49751-49762.
24. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, S. Uematsu, K. Hoshino, T. Kaisho, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira. (2003). TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.* **4**:1144-1150.
 25. Horng, T., G. M. Barton, and R. Medzhitov. (2001). TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol.* **2**:835-841.
 26. Fitzgerald, K. A., E. M. Palsson-McDermott, A. G. Bowie, C. A. Jefferies, A. S. Mansell, G. Brady, E. Brint, A. Dunne, P. Gray, M. T. Harte, D. McMurray, D. E. Smith, J. E. Sims, T. A. Bird, and L. A. O'Neill. (2001). Mal (MyD88-adapter-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* **413**:78-83.
 27. Akazawa, T., H. Masuda, Y. Saeki, M. Matsumoto, K. Takeda, K. Tsujimura, K. Kuzushima, T. Takahashi, I. Azuma, S. Akira, K. Toyoshima, and T. Seya. (2004). Adjuvant-mediated tumor regression and tumor-specific cytotoxic response are impaired in MyD88-deficient mice. *Cancer Res.* **64**:757-764.
 28. Suzuki, Y., D. Wakita, K. Chamoto, Y. Narita, T. Tsuji, T. Takeshima, H. Gyobu, Y. Kawarada, S. Kondo, S. Akira, H. Katoh, H. Ikeda, and T. Nishimura. (2004). Liposome-encapsulated CpG oligodeoxynucleotides as a potent adjuvant for inducing type 1 innate immunity. *Cancer Res.* **64**:8754-8760.
 29. Flajnik, M. F., and M. Kasahara. (2001). Comparative genomics of the MHC: glimpses into the evolution of the adaptive immune system. *Immunity* **15**:351-362.
 30. Bayne, C. J., L. Gerwick, K. Fujiki, M. Nakao, and T. Yano. (2001). Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization. *Dev. Comp. Immunol.* **25**:205-217.
 31. Oshiumi, H., T. Tsujita, K. Shida, M. Matsumoto, K. Ikeo, and T. Seya. (2003). Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the pufferfish, *Fugu rubripes*, genome. *Immunogenetics* **54**:791-800.
 32. Church, G. M., and W. Gilbert. 1984. Genomic Sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:1991-1995.
 33. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
 34. Fukui, A., N. Inoue, M. Matsumoto, M. Nomura, K. Yamada, Y. Matsuda, K. Toyoshima, and T. Seya. (2001). Molecular cloning and functional characterization of

- chicken toll-like receptors. A single chicken toll covers multiple molecular patterns. *J. Biol. Chem.* **276**:47143-47149.
35. Sebastiani, G., G. Leveque, L. Lariviere, L. Laroche, E. Skamene, P. Gros, and D. Malo. (2000). Cloning and characterization of the murine toll-like receptor 5 (Tlr5) gene: sequence and mRNA expression studies in Salmonella-susceptible MOLF/Ei mice. *Genomics* **64**:230-240.
 36. Matsumoto, M., K. Funami, M. Tanabe, H. Oshiumi, M. Shingai, Y. Seto, A. Yamamoto, and T. Seya. (2003). Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol.* **171**:3154-3162.
 37. Sakamoto, T., R. G. Danzmann, K. Gharbi, P. Howard, A. Ozaki, S. K. Khoo, R. A. Woram, N. Okamoto, M. M. Ferguson, L. E. Holm, R. Guyomard, and B. Hoyheim. (2000). A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates. *Genetics* **155**:1331-1345.
 38. Zou, J., C. Cunningham, and C. J. Secombes. (1999). The rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* interleukin-1 beta gene has a differ organization to mammals and undergoes incomplete splicing. *Eur. J. Biochem.* **259**:901-908.
 39. Laing, K. J., T. Wang, J. Zou, J. Holland, S. Hong, N. Bols, I. Hirono, T. Aoki, and C. J. Secombes. (2001). Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumour necrosis factor-alpha. *Eur. J. Biochem.* **268**:1315-1322.
 40. Mizushima, S., and S. Nagata. (1990). pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic. Acids Res.* **18**:5322.
 41. Ray, K. P., S. Farrow, M. Daly, F. Talabot, and N. Searle. (1997). Induction of the E-selectin promoter by interleukin 1 and tumour necrosis factor alpha, and inhibition by glucocorticoids. *Biochem. J.* **328**:707-715.
 42. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory manual* 2nd Ed. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
 43. Milton, D. L., R. O'Toole, P. Horstedt, and H. Wolf-Watz. (1996). Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **178**:1310-1319.
 44. McGee, K., P. Horstedt, and D. L. Milton. (1996). Identification and characterization of additional flagellin genes from *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **178**:5188-5198.
 45. Gewirtz, A. T., T. A. Navas, S. Lyons, P. J. Godowski, and J. L. Madara. (2001). Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J. Immunol.* **167**:1882-1885.
 46. Kimura, Y., N. Inoue, A. Fukui, H. Oshiumi, M. Matsumoto, M. Nonaka, S. Kuratani,

- T. Fujita, and T. Seya. (2004). A short consensus repeat-containing complement regulatory protein of lamprey that participates in cleavage of lamprey complement 3. *J. Immunol.* **173**:1118-1128.
47. Stafford, J. L., K. K. Ellestad, K. E. Magor, M. Belosevic, and B. G. Magor. (2003). A toll-like receptor (TLR) gene that is up-regulated in activated goldfish macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* **27**:685-698.
48. Meijer, A. H., S. F. Gabby Krens, I. A. Medina Rodriguez, S. He, W. Bitter, B. Ewa Snaar-Jagalska, and H. P. Spaink. (2004). Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish. *Mol. Immunol.* **40**:773-783.
49. Jault, C., L. Pichon, and J. Chluba. (2004). Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio*. *Mol. Immunol.* **40**:759-771.
50. Hirono, I., M. Takami, M. Miyata, T. Miyazaki, H. J. Han, T. Takano, M. Endo, and T. Aoki. (2004). Characterization of gene structure and expression of two toll-like receptors from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Immunogenetics* **56**:38-46.
51. Yonekura, K., S. Maki-Yonekura, and K. Namba. (2003). Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* **424**:643-650.
52. Smith, K. D., E. Andersen-Nissen, F. Hayashi, K. Strobe, M. A. Bergman, S. L. Barrett, B. T. Cookson, and A. Aderem. (2003). Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat. Immunol.* **4**:1247-1253.
53. Eaves-Pyles, T., K. Murthy, L. Liaudet, L. Virag, G. Ross, F. G. Soriano, C. Szabo, and A. L. Salzman. (2001). Flagellin, a novel mediator of Salmonella-induced epithelial activation and systemic inflammation: I kappa B alpha degradation, induction of nitric oxide synthase, induction of proinflammatory mediators, and cardiovascular dysfunction. *J. Immunol.* **166**:1248-1260.
54. Gewirtz, A. T., P. O. Simon, Jr., C. K. Schmitt, L. J. Taylor, C. H. Hagedorn, A. D. O'Brien, A. S. Neish, and J. L. Madara. (2001). Salmonella typhimurium translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. *J. Clin. Invest.* **107**:99-109.
55. Lyons, S., L. Wang, J. E. Casanova, S. V. Sitaraman, D. Merlin, and A. T. Gewirtz. (2004). Salmonella typhimurium transcytoses flagellin via an SPI2-mediated vesicular transport pathway. *J. Cell. Sci.* **117**:5771-5780.
56. Saito, Y., M. Otsuru, T. Furukawa, K. Kanda, and A. Sato. (1964). Studies on an Infectious Disease of Rainbow-Trout. *Acta. Med. Biol. (Niigata)* **11**:267-295.
57. Zappa, A. G., A. Chiba, and A. Varas. (1996). Cells and tissues of the immune system

- in fish. The Fish Immune System-Organism, Pathogen and Environment. Iwama, G., and Nakanishi, T., ed. (San Diego CA: Academic Press).1-62.
58. Rombout, J. H. W. M., and A. A. Van Der Berg. (1989). Immunological importance of the second gut segment of carp I. uptake and processing of antigens by epithelial cells and macrophages. *J. Fish. Biol.* **35**:13-22.
 59. Schumann, R. R., S. R. Leong, G. W. Flaggs, P. W. Gray, S. D. Wright, J. C. Mathison, P. S. Tobias, and R. J. Ulevitch. (1990). Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* **249**:1429-1431.
 60. Wright, S. D., R. A. Ramos, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch, and J. C. Mathison. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**:1431-1433.
 61. Trede, N. S., D. M. Langenau, D. Traver, A. T. Look, and L. I. Zon. (2004). The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity* **20**:367-379.
 62. Davis, J. M., H. Clay, J. L. Lewis, N. Ghori, P. Herbomel, and L. Ramakrishnan. (2002). Real-time visualization of mycobacterium-macrophage interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos. *Immunity* **17**:693-702.
 63. van der Sar, A. M., R. J. Musters, F. J. van Eeden, B. J. Appelmelk, C. M. Vandenbroucke-Grauls, and W. Bitter. (2003). Zebrafish embryos as a model host for the real time analysis of Salmonella typhimurium infections. *Cell Microbiol.* **5**:601-611.
 64. Langenau, D. M., D. Traver, A. A. Ferrando, J. L. Kutok, J. C. Aster, J. P. Kanki, S. Lin, E. Prochownik, N. S. Trede, L. I. Zon, and A. T. Look. (2003). Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish. *Science* **299**:887-890.
 65. Kishi, S., J. Uchiyama, A. M. Baughman, T. Goto, M. C. Lin, and S. B. Tsai. (2003). The zebrafish as a vertebrate model of functional aging and very gradual senescence. *Exp. Gerontol.* **38**:777-786.
 66. Iwaki, D., H. Mitsuzawa, S. Murakami, H. Sano, M. Konishi, T. Akino, and Y. Kuroki. (2002). The extracellular toll-like receptor 2 domain directly binds peptidoglycan derived from Staphylococcus aureus. *J. Biol. Chem.* **277**:24315-24320.
 67. Cornelie, S., J. Hoebeke, A. M. Schacht, B. Bertin, J. Vicogne, M. Capron, and G. Riveau. (2004). Direct evidence that toll-like receptor 9 (TLR9) functionally binds plasmid DNA by specific cytosine-phosphate-guanine motif recognition. *J. Biol. Chem.* **279**:15124-15129.
 68. Rutz, M., J. Metzger, T. Gellert, P. Lippa, G. B. Lipford, H. Wagner, and S. Bauer. (2004). Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and

- pH-dependent manner. *Eur. J. Immunol.* **34**:2541-2550.
69. Mitsuzawa, H., I. Wada, H. Sano, D. Iwaki, S. Murakami, T. Himi, N. Matsushima, and Y. Kuroki. (2001). Extracellular Toll-like receptor 2 region containing Ser40-Ile64 but not Cys30-Ser39 is critical for the recognition of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* **276**:41350-41356.
 70. Meng, G., A. Grabiec, M. Vallon, B. Ebe, S. Hampel, W. Bessler, H. Wagner, and C. J. Kirschning. (2003). Cellular recognition of tri-/di-palmitoylated peptides is independent from a domain encompassing the N-terminal seven leucine-rich repeat (LRR)/LRR-like motifs of TLR2. *J. Biol. Chem.* **278**:39822-39829.
 71. Mizel, S. B., A. P. West, and R. R. Hantgan. (2003). Identification of a sequence in human toll-like receptor 5 required for the binding of Gram-negative flagellin. *J. Biol. Chem.* **278**:23624-23629.
 72. Jacchieri, S. G., R. Torquato, and R. R. Brentani. (2003). Structural study of binding of flagellin by Toll-like receptor 5. *J. Bacteriol.* **185**:4243-4247.
 73. Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrener, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory, and M. V. Olson. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**:959-964.
 74. Weber, A. N., M. A. Morse, and N. J. Gay. (2004). Four N-linked glycosylation sites in human toll-like receptor 2 cooperate to direct efficient biosynthesis and secretion. *J. Biol. Chem.* **279**:34589-34594.
 75. da Silva Correia, J., and R. J. Ulevitch. (2002). MD-2 and TLR4 N-linked glycosylations are important for a functional lipopolysaccharide receptor. *J. Biol. Chem.* **277**:1845-1854.
 76. Yilmaz, A., S. Shen, D. L. Adelson, S. Xavier, and J. J. Zhu. (2005). Identification and sequence analysis of chicken Toll-like receptors. *Immunogenetics*. (in Press)
 77. Pujol, N., E. M. Link, L. X. Liu, C. L. Kurz, G. Alloing, M. W. Tan, K. P. Ray, R. Solari, C. D. Johnson, and J. J. Ewbank. (2001). A reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* **11**:809-821.
 78. Iwasaki, A., and R. Medzhitov. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **5**:987-995.

79. Pancer, Z., C. T. Amemiya, G. R. Ehrhardt, J. Ceitlin, G. L. Gartland, and M. D. Cooper. (2004). Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature* **430**:174-180.