

博士論文

Toll-like receptor 3の細胞内局在，及びシグナル伝達に関する
機能ドメインの同定

舟見 健児

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)

目次

略語表		1
序章		2
第 1 章	Toll-like receptor 3 (TLR3)が局在する細胞内小器官	
1-1	実験材料	6
1-2	実験方法	9
1-3	結果	11
1-4	考察	19
第 2 章	TLR3のリンカー領域による細胞内局在の制御	
2-1	実験材料	21
2-2	実験方法	23
2-3	結果	26
2-4	考察	36
第 3 章	TLR3のリンカー領域によるシグナル伝達の制御	
3-1	実験材料	38
3-2	実験方法	39
3-3	結果	40
3-4	考察	45
終章		47
参考文献		48
謝辞		54

略語表

BPB	bromophenol blue
BSA	bovine serum albumin
DABCO	1,4-di-azobicyclo-(2,2,2)-octane
DAMP	3-(2,4-dinitroanilino)-3'-amino-N-methyldipropylamine
DMEM	Dulbecco's-modified Eagle's medium
DPBS	Dulbecco's-modified phosphate-buffered saline
DTT	dithiothreitol
ELISA	enzyme-linked immunosolvent assay
ER	endoplasmic reticulum
FACS	fluorescence activated cell sorter
FITC	fluorescein isothiocyanate
HA	hemagglutinin
HEK	human embryonic kidney
HRP	horseradish peroxydase
IFN	interferon
IRF	interferon-regulatory factor
LPS	lipopolysaccharide
LRR	leucine-rich repeat
MACS	magnetic cell sorting and separation of biomolecules
M.F.I	mean fluorescence intensity
MVB	multivesicular body
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
poly (I:C)	polyriboinosinic polyribocytidylic acid
PRR	pattern-recognition receptor
PVDF	polyvinylidene fluoride
TICAM	TIR-containing adaptor molecule
TIR	Toll-IL-1 receptor homology
TIRAP	TIR domain-containing adapter protein
TGN	trans-Golgi network
TLR	Toll-like receptor
WGA	wheat germ agglutinin

序章

地球上に存在する全ての生命体は、外界からの様々な攻撃に対応するための生体防御機構を備えている。進化の過程で多くの多細胞生物は生体防御を専門とする器官・組織・細胞・液性因子等を発達させており、免疫系と総称される。

ヒトを始めとする脊椎動物は、外界からの攻撃に対応して特異的な生体防御反応を惹起し得る。この特異性は後天的に外界からの刺激によって誘導され、個体レベルでは長期に渡って保持される（免疫記憶）が、子孫へ直接伝わることはないため、獲得免疫（acquired immunity）と呼ばれる。これに対して、より進化的に古い生物にも共通に存在する基本免疫（innate immunity）と呼ばれる生体防御機構は、獲得免疫と比較して異物認識の特異性は弱いが、遺伝情報が子孫へ直接伝えられ、進化の過程でその機能を発達させてきた。脊椎動物では、基本免疫と獲得免疫が互いに協調することで、複雑な生体防御機構が構成されている（Figure 1）。

ショウジョウバエの背腹軸形成を司る分子として見つかったI型膜貫通タンパク質、Toll[1]の哺乳類ホモログ（Toll-like receptor, TLR）が、基本免疫を司るシグナル伝達レセプターであることが1990年代後半に明らかとなった[2]。同時期には、基本免疫を活性化する分子群としてPathogen-associated molecular patterns (PAMPs)、PAMPsを認識するレセプターとしてPattern-recognition receptor (PRR)という概念が確立し[3]、リンパ球を役者とする獲得免疫の陰に隠れた形となっていた基本免疫が一躍脚光を浴びることになった。

TLRは、現在ヒトでは10種類が同定されており、それぞれのTLRが異なるPAMPsをリガンドとして認識する[4]。現在TLRのリガンドとして知られているPAMPsは、微生物細胞壁を構成するLPS等のリポ多糖[5, 6]、ペプチドグリカンなどの糖脂質成分[7, 8]、微生物鞭毛構成成分であるフラジェリン[9]などのタンパク質、非メチル化CpG-DNAや2本鎖RNAなどの微生物由来核酸成分[10-15]など多岐にわたる。また、シャペロンタンパク質[16]、クロマチン-IgG複合体[17]のように、内在性の抗原でもTLRによって認識されるものが存在する。TLRの分子進化を系統樹解析によって検討すると、一次構造の類似したTLRは似通った構造のリガンドを認識するという相関関係が認められる[18]。

TLRは細胞外領域にリガンド認識を司るLRRドメインを、細胞内領域にシグナル伝達を司るTIRドメインを有する[19]。TLRを介した細胞内シグナル伝達の分子機構は、最近の数年間で急速に解析が進んだ[4, 20]。TLRは、リガンドを認識すると凝集し、MyD88[21]、Mal/TIRAP[22, 23]、TICAM-1/TRIF[24, 25]、TICAM-2/TRAM[26, 27]等のTIRドメインを含むアダプター分子がリクルートされる。これらのアダプター分子を介して細胞内シグナル伝達系が活性化され、NF- κ B、ATF-2/c-Jun、IRF-3といっ

た転写因子によってサイトカイン産生や免疫担当細胞の増殖・活性化などが引き起こされる (Figure II) .

TLR3はウイルス増殖の際に中間体として生成する 2本鎖RNAをリガンドとしており[11, 12], 樹状細胞・マクロファージ[28]・NK細胞[29, 30]・腸管上皮細胞等[31]に発現している. TLR3を介したシグナル伝達は, TICAM-1/TRIF[24, 25]を主なアダプター分子としてIRF-3を介したinterferon (IFN)誘導性の遺伝子群が優位に活性化する[32]ことが大きな特徴としてあげられる. また, いくつかの細胞種で TLR3の発現がIFN刺激やウイルス感染によって上昇するという報告も存在する [33-35]. 一方, TLR3のウイルス感染防御に対する関与についてはウイルスの種類, 実験系などによって異なる報告がなされており[36], ウイルス感染に対する生体防御機構の中でTLR3がどのような寄与を示すかについては未だ不明である.

一方, TLRのリガンド認識機構に関する解析は, シグナル伝達の解析に比べて遅れている. この原因としては, リガンド認識を司る LRRドメインのPAMPsに対する相互作用は一般的に弱く, 検出しにくいことによるところが大きい. また, リガンド認識が細胞内のどこで行われているかを知るためには, TLRの細胞内局在についての解析が必要となる. この解析は特にTLR4, TLR9について最近行われており, 蛍光標識したPAMPsを用いて細胞内におけるリガンドとTLRの共局在が解析されている (Figure III)[37-41]. TLR3についても, ウイルス感染時のリガンド認識機構を考察するために細胞内局在の解析が重要であるが, 腸管上皮細胞のTLR3を免疫染色によって検出した報告[31]がある程度で, これまで本研究室以外でTLR3の細胞内局在を解析した報告はない. 本研究室では, これまで線維芽細胞では細胞表面と細胞内部の両方にTLR3が発現していること, および樹状細胞においては細胞内部にTLR3が発現していることを報告している[12, 42].

本研究では, TLR3が生体内でどのような役割を担うかを解明するため, TLR3の細胞内局在についてさらに解析を進めた結果, TLR3の細胞内領域に, 細胞内局在やシグナル伝達に重要な新しいドメインの存在を示唆する知見を得たので, 以下に報告する.

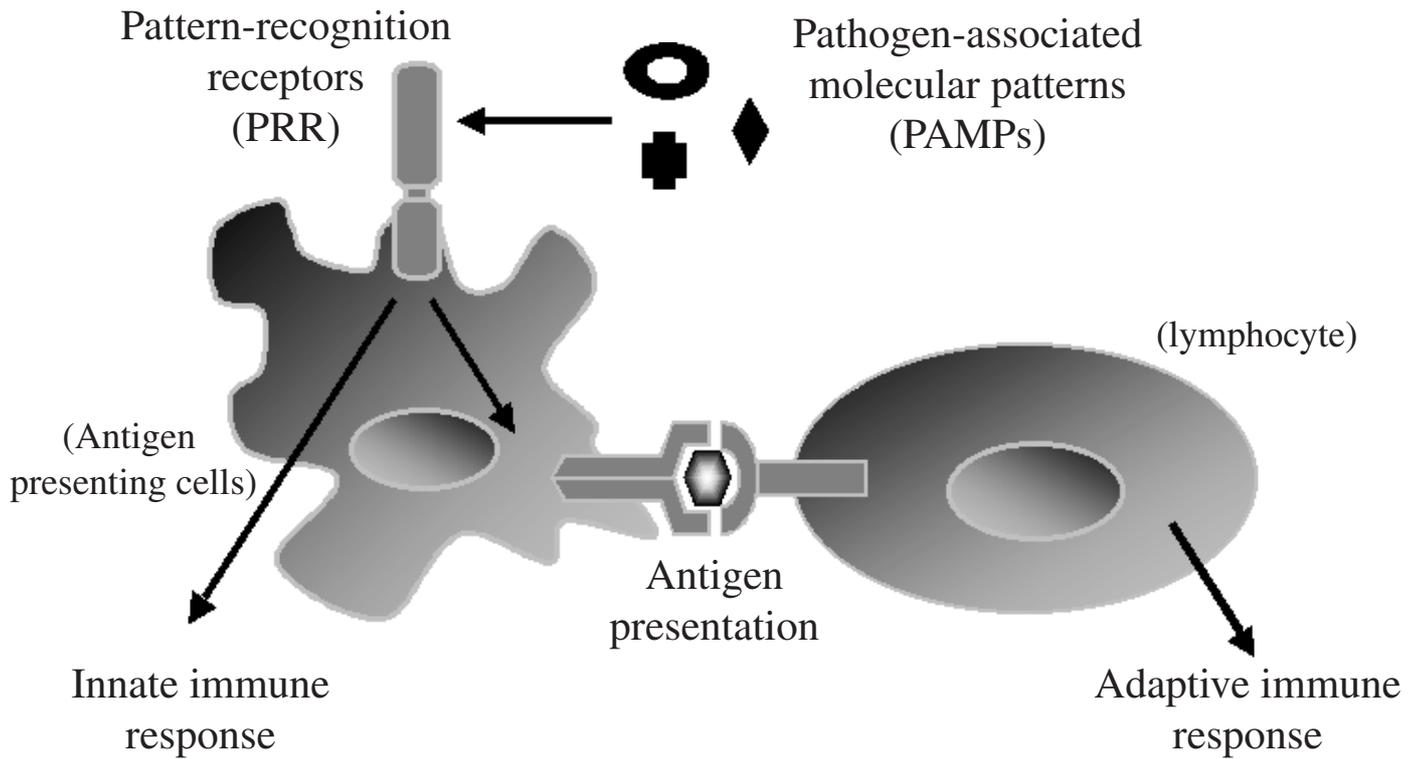


Figure I 基本免疫と獲得免疫

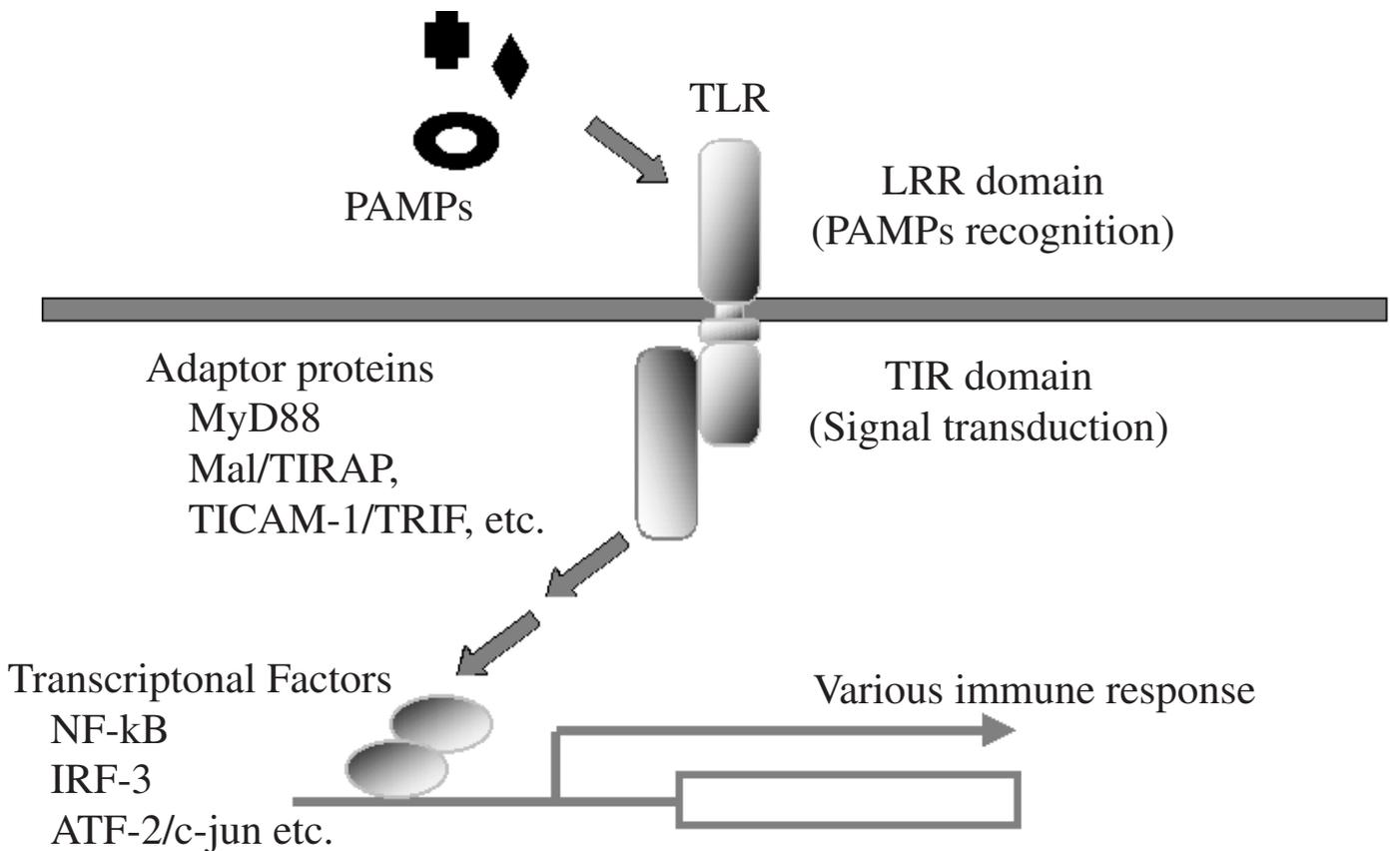


Figure II Toll-like receptor (TLR)を介した免疫応答

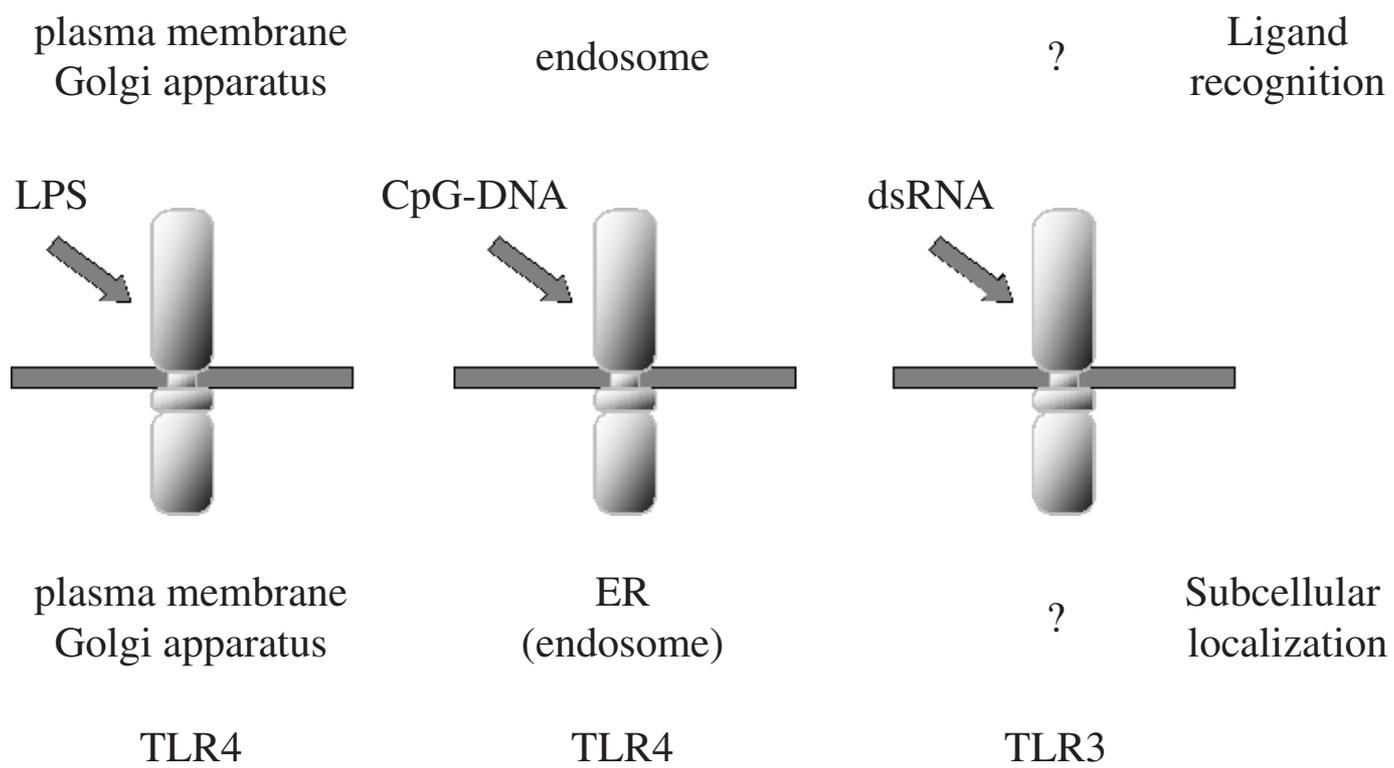


Figure III TLRの細胞内局在

第1章 Toll-like receptor 3 (TLR3)が局在する細胞内小器官

TLRファミリーに属する分子種のうち、TLR1,2,6等の、糖や脂質を主成分とするPAMPsを認識するTLRは細胞表面に発現している。これに対して、TLR7,8,9等のような核酸成分からなるPAMPsを認識するTLRは細胞内部に局在している。核酸成分である2本鎖RNAを認識するTLR3については、細胞種によってその局在に違いが見られる。本章では、TLR3の細胞内局在を強制発現させたTLR3と内在性のTLR3のそれぞれについて解析した。

1-1 実験材料

1-1-1 細胞

ヒト胎児腎細胞株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Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM : Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて37°C, 5% CO₂中で培養した。細胞の継代は、0.05% EDTA-PBSを用いて1分間処理した後、ピペティングによって細胞をはがし、遠心した後1:3から1:4の割合で行った。

健康人由来のPBMC (peripheral blood mononuclear cells)はFicoll 分画によって調製した、大阪府赤十字センターより供与されたbuffy coat 40 ml (400 ml 血液相当) に生理食塩水を加えて合計180 mlにし、2%メチルセルロース20 mlを加えて(終濃度0.2%)室温45分静置した。上清を1,500 r.p.m 5分間遠心し、生理食塩水で1回洗浄した後RPMI-10% FCSに懸濁し、チューブに用意したFicoll solution (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, U.K.)に約1:1の割合で重層した。1,500 r.p.m 30分間遠心した後、中間層の細胞を採取し、PBMCとした。

ヒト単球は、Ficoll 分画によって調製したPBMCを出発材料としてMACS system (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany)によって調製した。PBMCをMACSバッファで1回洗浄し、900 µlのMACSバッファに懸濁した後、anti-CD14 Micro beads (Miltenyi Biotech)を100 µl加えて10°Cで15分間、時々振り混ぜながら静置した。遠心した細胞を3 mlのMACSバッファに懸濁し、磁場にセットしたLC column (Miltenyi Biotech)にアプライした。さらに9 mlのMACSバッファをカラムにアプライし、自然落下で洗浄を行った後、5 mlのMACSバッファをカラムにアプライし、磁場からカラムをはずしてシリンジを押すことによってカラムから細胞を溶出した。溶出操作を3回繰り返してから遠心し、3 mlのMACSバッファに懸濁した細胞を新しいLC

columnにアプライし，同様の洗浄，溶出操作を繰り返した細胞をCD14発現ヒト単球とした．

ヒト単球由来樹状細胞 (monocyte-derived dendritic cells)は，ヒト単球を10% FCS, 100 mU/ml Penicillin G, 100 mg/ml streptomycinを添加したRPMI 1640 medium (Invitrogen) に 8×10^5 /mlの割合でまき直し，さらに500 IU/ml human rGM-CSF (Peprotech EC Ltd, London, U.K.) and 100 IU/ml human rIL-4 (Peprotech) を添加後，6日間培養して調製した．この際，3日目に培地交換を行った．

細胞のtransfectionの際に用いる無血清培地はopti-MEM (Invitrogen)を用いた．

1-1-2 試薬

コントロール用ウサギIgG，抗ヒトTLR3モノクローナル抗体 (TLR3.7)[12]，抗ヒトTLR2モノクローナル抗体 (TLR2.45,TLR2.524)[43]，及び抗ヒトCD46ポリクローナル抗体[44]は本研究室で樹立されたものを用いた．

以下の試薬を各メーカーより購入した．

抗Rab5aモノクローナル抗体 (S-19)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)
抗ヒトRab7モノクローナル抗体 (H-50a)	
抗ヒト α -tubulinポリクローナル抗体	
抗Lamp-2ポリクローナル抗体	Affinity Bioreagents (Golden, CO)
抗Syntaxin 7ポリクローナル抗体	Synaptic Systems (Gottingen, Germany)
抗Calnexinポリクローナル抗体	Stressgen (Victoria, Canada)
MitoTracker (R) Red CMXRos	Molecular Probes (Eugene, OR)
wheat germ agglutinin, Texas Red(R)-X conjugate (WGA-TR)	
anti-dinitrophenyl-KLH,fluorescence conjugate	
Alexa標識各種2次抗体	
FITC標識各種2次抗体	American Qualex (San Clemente, CA)
DAMP	Oxford Biomedical Research, Inc. (Oxford, MI)
Lipofectamine 2000 reagent	Invitrogen
マウスIgG1 (MOPC21, ascites)Sigma (St. Louis, MO)	
LPS (<i>E. coli</i> 0111 B4)	
Geneticin	
Chloroquine	
Poly (I:C)	Amersham Bioscience
Bafilomycin A1	和光純薬
BlockAce	雪印乳業

1-1-3 cDNA

ヒトTLR2・TLR3は本研究室でクローニングされたものを *Xho* I/*Not* I siteで発現

ベクター-pEF-BOS[45]に導入した。ヒトCD14の発現プラスミド (pME18S) はカリフォルニア大学の西村仁博士より供与された。ヒトMD-2の発現プラスミド (pEF-BOS,C末端His/FLAG) は東京大学医科学研究所の三宅健介教授より供与された。IFN-プロモーターベクター-p-125 lucは東京大学の谷口維紹教授より供与された。ネオマイシン耐性遺伝子を含む発現ベクター-pSV-neoは理研遺伝子バンクより購入した。デュアルルシフェラーゼアッセイ用内部標準ベクター-phRL-TKはPromega (Madison, WI)より購入した。

1-1-4 溶液・緩衝液の組成

FACSバッファー	0.1% BSA – DPBS
封入液	2.3% DABCO – 50% glycerol – DPBS
MACSバッファー	0.5% BSA – 2 mM EDTA – DPBS

1-2 実験方法

1-2-1 TLR3発現HEK293細胞の作成

HEK293細胞にヒトTLR3・TLR2を強制発現させた stable cloneを以下の方法で作成した。24-well plate 90%コンフルエントの細胞1 wellに対してpEF-BOS-hTLR3,あるいはpEF-BOS-hTLR2 1.0 µgを, pSV-neo 0.1 µgと共にLipofectamine 2000 3 µlを用いてトランスフェクションした。翌日24 well plateにまき直し, 翌々日よりGeneticinを終濃度600 µg/mlの割合で添加した培地を用いてセレクションを行った。約3-4週間後にTLR2については細胞表面の, TLR3については細胞内部の発現を指標にして, フローサイトメトリーによって陽性細胞のスクリーニングを行った (1-2-2参照)。

1-2-2 フローサイトメトリーによる細胞内局在の解析

FACSバッファーに懸濁したHEK293細胞を5-10 µg/ml TLR3.7/TLR2.45, もしくは同濃度のコントロール抗体50 µl/sampleで4°C, 30分反応させた。FACSバッファーで3回洗浄した後, 40倍希釈したFITC標識ヤギ抗マウスIgG抗体 25-30 µl/sampleで4°C, 30分反応させた。FACSバッファーで3回洗浄した後, FACSCaliver (BD Bioscience, San Jose, CA)によって細胞の蛍光強度を測定した。細胞内部を染色する際には, 原液を10倍希釈したpermabilizing solution (BD Bioscience) 500 µl/sampleで室温10分反応させた。抗体反応は細胞表面の染色の時と同様の操作を室温で行った。抗体反応の際には, Goat serum (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada)を終濃度10%の割合で加えた。

1-2-3 HEK293細胞の免疫染色

HEK293細胞を5X10⁴/wellの割合で24-well plateにまき直し, 12-24時間培養することによってBIOCOAT (poly-L-Lysine Coverslips 12 mm round) (BD Bioscience)に付着させた。PBSで2回洗浄した後, 3% formalin-PBS中で30分静置し, 細胞を固定化した。細胞内小器官を染色する場合, 引き続いて0.5% saponin-1% BSA-PBS中で30分静置し, 抗体の膜透過性を高めた。PBSで4回洗浄した後, 1% BSA-PBS中で10分以上静置した。1次抗体溶液としてTLR3.7 (10-20 µg/ml), もしくはコントロールマウス IgG溶液を1% BSA-PBSを用いて作成し, 室温で1時間反応させた。1% BSA-PBSで4回洗浄した後, 2次抗体溶液としてFITC標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (100倍希釈), もしくはAlexa標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (5 µg/ml) を10% Block Ace-PBSを用いて作成し, 室温で30分反応させた。2重染色を行う場合は, 2次抗体反応後, 1% BSA-PBSで4回洗浄し, ウサギポリクローナル抗体, もしくはコントロールウサギ IgGとAlexa標識ヤギ抗ウサギIgG抗体 (5 µg/ml)を用いて同様の処理を行った。抗体反応終了後, PBSで4回洗浄し, 封入液とマニキュアを用いてスライドガラスに固定した。細胞の染色像の観察は共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (オリンパス: BX50WI) を用いて行い, 付属の画像解析ソフト, Fluoviewを用いて画像の取り込みを行った。

1-2-4 樹状細胞の免疫染色

1-1-1の方法に従って調製したヒト樹状細胞 2×10^4 /sampleについて、DPBSで2回洗浄した後Cytospin6 (Thermo Shandon, Cheshire, U.K.)を用いて500 r.p.m 5分遠心を行い、スライドグラスに付着させた。付着した細胞を直ちに3% formalin-PBSで30分処理し、細胞を固定化した。以降の操作は1-2-1と同様の方法で行った。

1-2-5 ルシフェラーゼアッセイ

6-well plateに 1×10^6 cells/wellの割合でまいて終夜培養したHEK293細胞にIFN- プロモーターベクター (p-125 luc, 0.5 μ g) ,内部標準ベクター(phRL-TK, 0.0125 μ g)をTLR発現ベクターと共にLipofectamine 2000 10 μ lを用いてトランスフェクションした。Poly (I:C)刺激の際にはpEF-BOS-TLR3 (0.5 μ g)を、LPS刺激の際にはpEF-BOS-TLR4 (0.5 μ g)と、TLR4を介したシグナル伝達に必要な補助分子である pME18S-CD14 (0.5 μ g) , pEF-BOS-MD-2 (0.5 μ g)を共発現させ、pEF-BOSの空ベクターで総DNA量を4 μ gに揃えた。24時間培養した後細胞を6-well plate 1 wellにつき24-well plate 5 wellにまき直し、poly (I:C) (2 μ g/ml)もしくはLPS (100 ng/ml)を加えさらに6時間培養した。Chloroquine、及びBafilomycin A1処理はリガンド刺激の15分から2時間前に開始し、24-well plateにまき直す際にも再び添加した。抗体阻害の実験の際には、24-well plateに 2×10^5 cells/wellの割合でまいた HEK293細胞にIFN- プロモーターベクター (0.1 μ g) ,内部標準ベクター(phRL-TK, 0.0125 μ g) , pEF-BOS-TLR3 (0.5 μ g)をLipofectamine 2000 2 μ lを用いてトランスフェクションし、24時間後にpoly (I:C) (2 μ g/ml)を加えてさらに6時間培養した。この時、阻害抗体の添加はリガンド刺激1時間前に終濃度20 μ g/mlで開始した。TLR3発現293細胞を用いた抗体阻害実験の際には、IFN- プロモーターベクターと内部標準ベクターのみをトランスフェクションし、以下の操作は同様に行った。リガンド刺激終了後細胞を回収し、100 μ l/sampleのPassive Lysis Buffer (Promega : Dual-Luciferase Reporter Assay System) で可溶化した。可溶化物10 μ lについてウミホタルルシフェラーゼ活性、及びウミシイタケルシフェラーゼ活性をDual-Luciferase Reporter Assay Systemの試薬を用いてルミネッセンスリーダー (ALOCA : BLR-201)で測定した。各条件におけるウミ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、未刺激細胞の活性に対する相対値で示した。

1-3 結果

1-3-1 強制発現させたTLR3の細胞内局在解析

本研究室において、ヒト肺線維芽細胞由来培養細胞株、MRC-5ではTLR3が細胞表面に発現していること、及びヒト樹状細胞ではTLR3が細胞内部に発現していることがこれまでに報告されている。本研究では、まずTLR3の細胞内局在を、HEK293細胞に強制発現させたTLR3について解析した。1-2-1に記した方法で、ヒトTLR3、もしくはヒトTLR2を安定に発現させた細胞株(293-TLR3 / 293-TLR2)を得た。フローサイトメトリーによる解析の結果、TLR2はこれまでの報告[46, 47]と同様に細胞表面に発現していた。これに対して、TLR3は主に細胞の内部で検出された (Figure 1-1)。免疫染色によってTLR3の細胞内局在をさらに調べたところ、核の周辺部や細胞質におけるドット状の染色像が観察された (Figure 1-2)。また、TLR3のアミノ末端にGFPを付加した融合タンパク質を用いた解析でも、同様の細胞内局在が観察された (データ未提示)。

そこで、様々なオルガネラマーカーを用いてTLR3が細胞内部のどんなオルガネラに存在しているかを解析した (Figure 1-3)。ミトコンドリア (データ未提示)、細胞膜、初期エンドソームに対する共局在は観察されなかった。これに対して、TGNやトランスゴルジ体のマーカーであるWGA、後期エンドソームのマーカーであるSyntaxin 7[48]、酸性オルガネラマーカーであるDAMP[49]と部分的な共局在が認められた。

1-3-2 内在性TLR3の細胞内局在解析

次に、ヒト末梢血より1-1-1に記した方法で調製した樹状細胞を用いて、内在性TLR3の細胞内局在を免疫染色法で解析した (Figure 1-4)。樹状細胞では、細胞1個あたり1-2個の明るいドット状の染色、及び細胞質中にやや暗いドット状の染色が見られた。また、この明るいドット状の染色像は中心体のマーカーである α -tubulinの近傍に存在していた(データ未提示)。ところが、この明るいドット状の染色は、ヒトTLR3のメッセンジャーRNAが検出されない細胞株でも観察された (データ未提示)。このことから、今回内在性TLR3の検出に用いたTLR3.7は中心体近傍に存在する別の抗原と交差反応する性質があり、やや暗いドット状の染色像が内在性のTLR3の局在を示していることが判明した。

そこで、樹状細胞における内在性のTLR3が存在するオルガネラの同定を試みた。ところが、HEK293細胞に発現させたTLR3とは異なり、後期エンドソーム、リソソーム、酸性オルガネラといったTLR3の局在が予想されたオルガネラのマーカーと全く共局在を示さなかった。樹状細胞においてエンドソーム系の幅広い細胞内小胞に発現しているMHC class IIに対する共局在も観察されなかった。また、TLR9が局在していることが最近報告された、ERのマーカーに対しても、共局在は観察されなかった。

1-3-3 細胞内部で起きるTLR3を介したシグナル伝達

TLR3が細胞内部に局在していることから，TLR3のリガンドは何らかの経路でTLR3の存在する小胞内に運ばれる必要がある．そこで，TLR3を介したシグナル伝達がエンドソームの成熟化阻害剤によって受ける影響を解析した．TLR3を介したシグナル伝達の解析にはTLR3を発現させたHEK293細胞を用い，2本鎖RNAの合成アナログであるpoly (I:C)で刺激した時のIFN- プロモーターの活性化を指標とした．異なる作用機序でエンドソームの成熟化を阻害する2種の薬剤 (Chloroquine[49] ,Bafilomycin A1[50]) を前処理することで，poly (I:C)刺激によるTLR3を介したシグナル伝達は顕著に抑制された (Figure 1-5 (a),(b)) ．対照的に，LPS刺激によるTLR4を介したシグナル伝達についてはどちらの薬剤でもほとんど影響を受けなかった．また，HEK293細胞におけるTLR3を介したシグナル伝達の場合が細胞内部であることをさらに確認するため，TLR3のリガンド認識を抑制する抗ヒトTLR3モノクローナル抗体を用いて阻害実験を行った．TLR3を一過性に発現させた場合，及び細胞内局在の解析に用いたTLR3安定発現株についてIFN- プロモーターの活性化を指標にシグナル伝達を検討したが，いずれの場合も抗TLR3抗体特異的な阻害活性は検出されなかった (Figure 1-6) ．

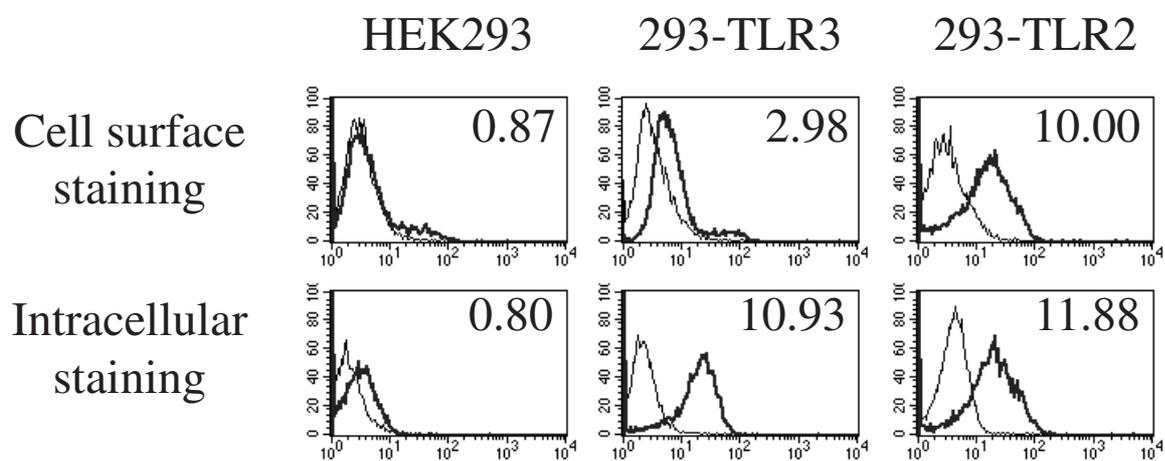


Figure 1-1 HEK293細胞に強制発現させたTLR3，及びTLR2の発現プロファイル

TLR3，またはTLR2を強制発現させたHEK293細胞における，細胞表面と細胞内部での発現を抗 TLR3抗体 (TLR3.7, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)，もしくは抗TLR2抗体 (TLR2.54, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で検出した．ヒストグラム中の数値はM.F.I値を示す．

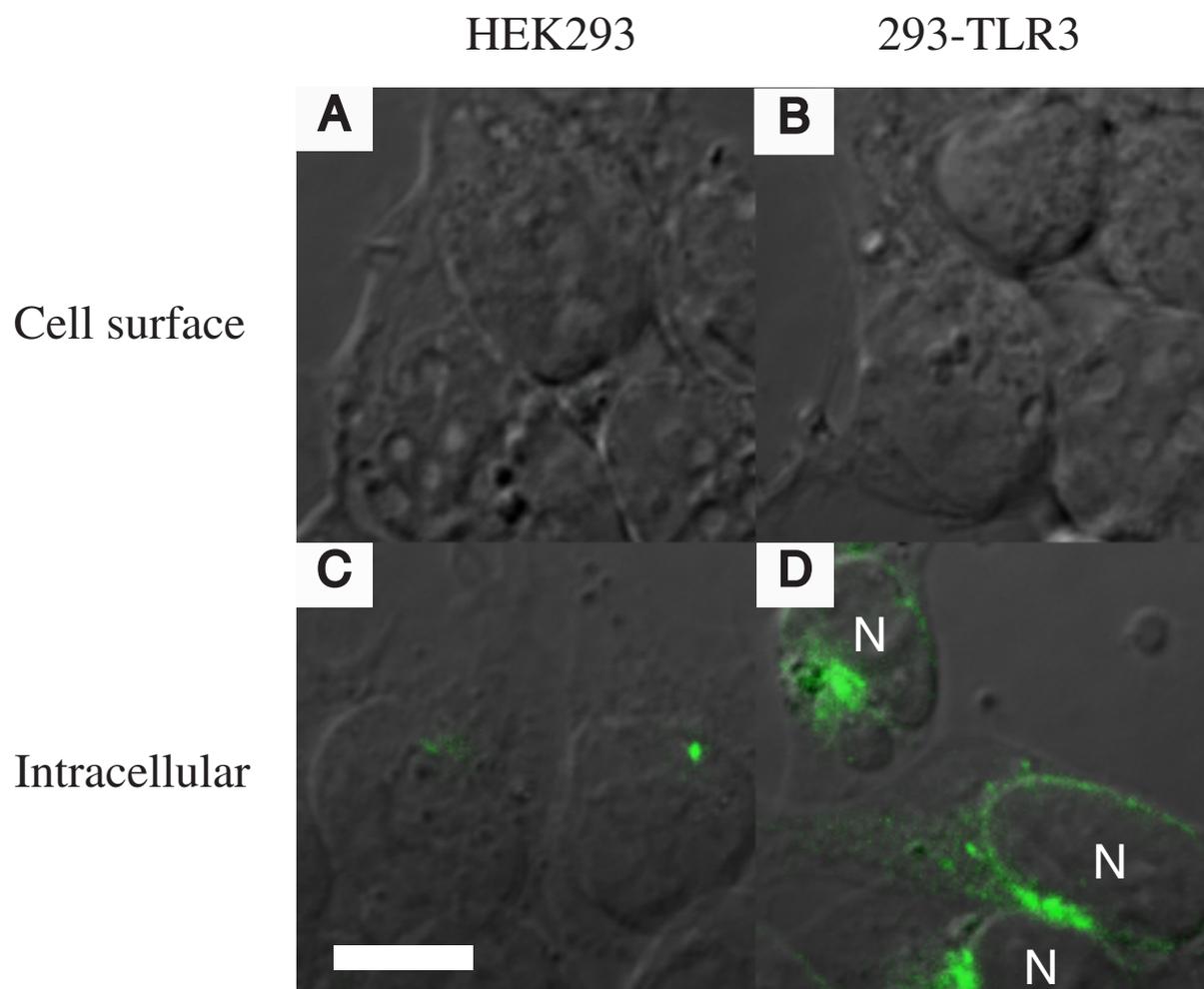


Figure 1-2 HEK293細胞に強制発現させたTLR3の細胞内局在

HEK293細胞 (A,C) , 及び293-TLR3 (B,D) におけるTLR3の細胞表面 (A,B) , 細胞内部 (C,D)での局在を抗ヒトTLR3抗体 (TLR3.7, 10-20 $\mu\text{g/ml}$) で検出した . 2次抗体にはAlexa 488/594標識抗体 (終濃度5 $\mu\text{g/ml}$)を用いた . Dにおける核の位置をNで示した . 左下のBarは10 μm を示す .

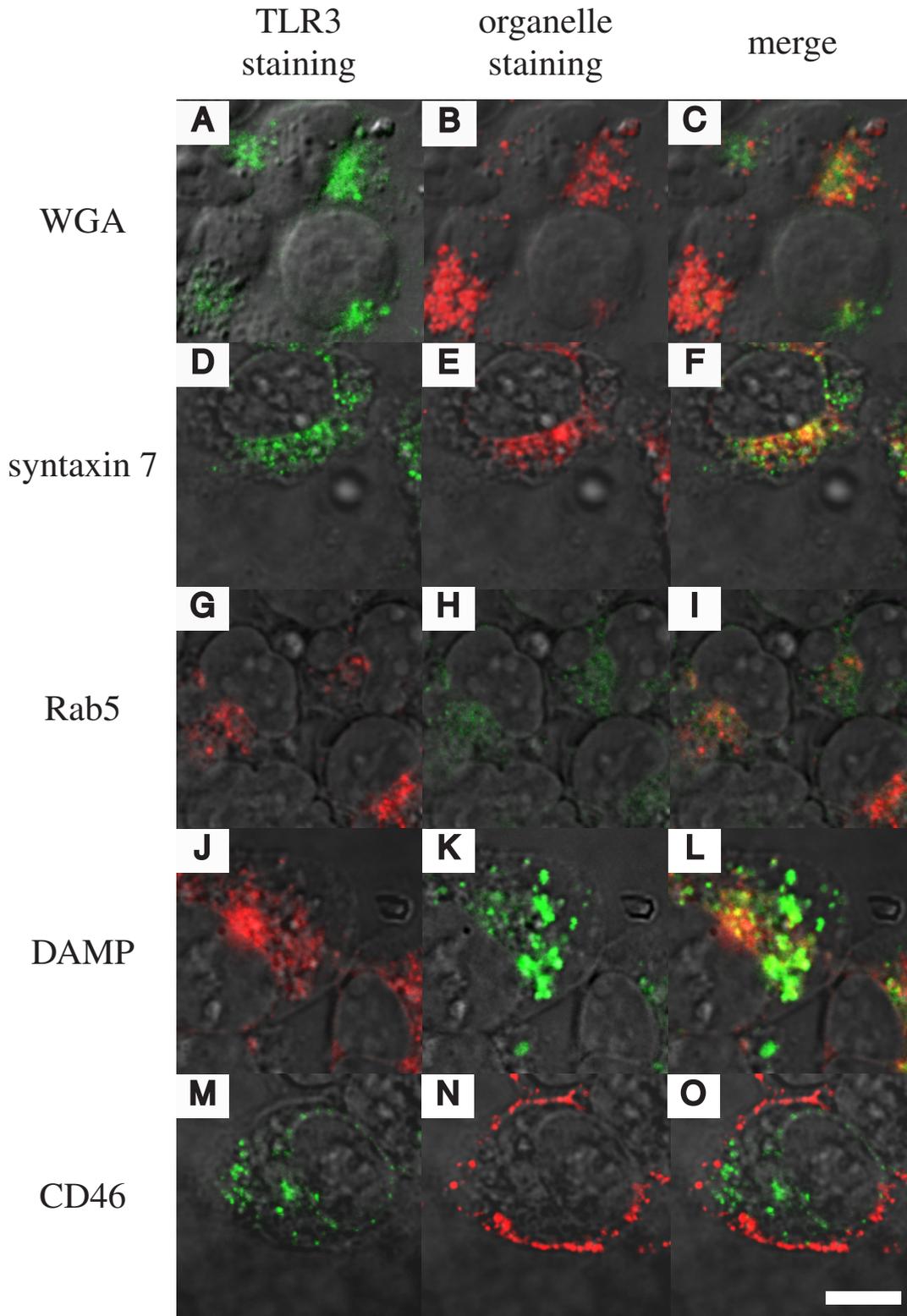


Figure 1-3 TLR3を強制発現させたHEK293細胞におけるTLR3とオルガネラマーカの共局在

TLR3の局在を抗ヒトTLR3抗体 (TLR3.7, 10-20 $\mu\text{g/ml}$) で検出した (A,D,G,J,M) . WGAの局在はWGA-TR (終濃度5 $\mu\text{g/ml}$, 室温30分)で検出した (B) . Syntaxin 7,Rab5の局在はそれぞれの特異抗体 (200倍希釈, 100倍希釈) で検出した (E,H) . DAMPの局在は 5 $\mu\text{g/ml}$ DAMP存在下で1時間培養した細胞を用い, FITC標識抗DNP-KLH抗体(100倍希釈)で検出した (K) . 細胞膜の染色は, 固定化前の細胞を抗ヒトCD46抗体 (1,000倍希釈)で処理し, 検出した (N) . 2次抗体にはAlexa 488/594標識抗体 (終濃度5 $\mu\text{g/ml}$)を用い, 共染色像をC,F,I,L,Oでそれぞれ示した . 右下のBarは10 μm を示す .

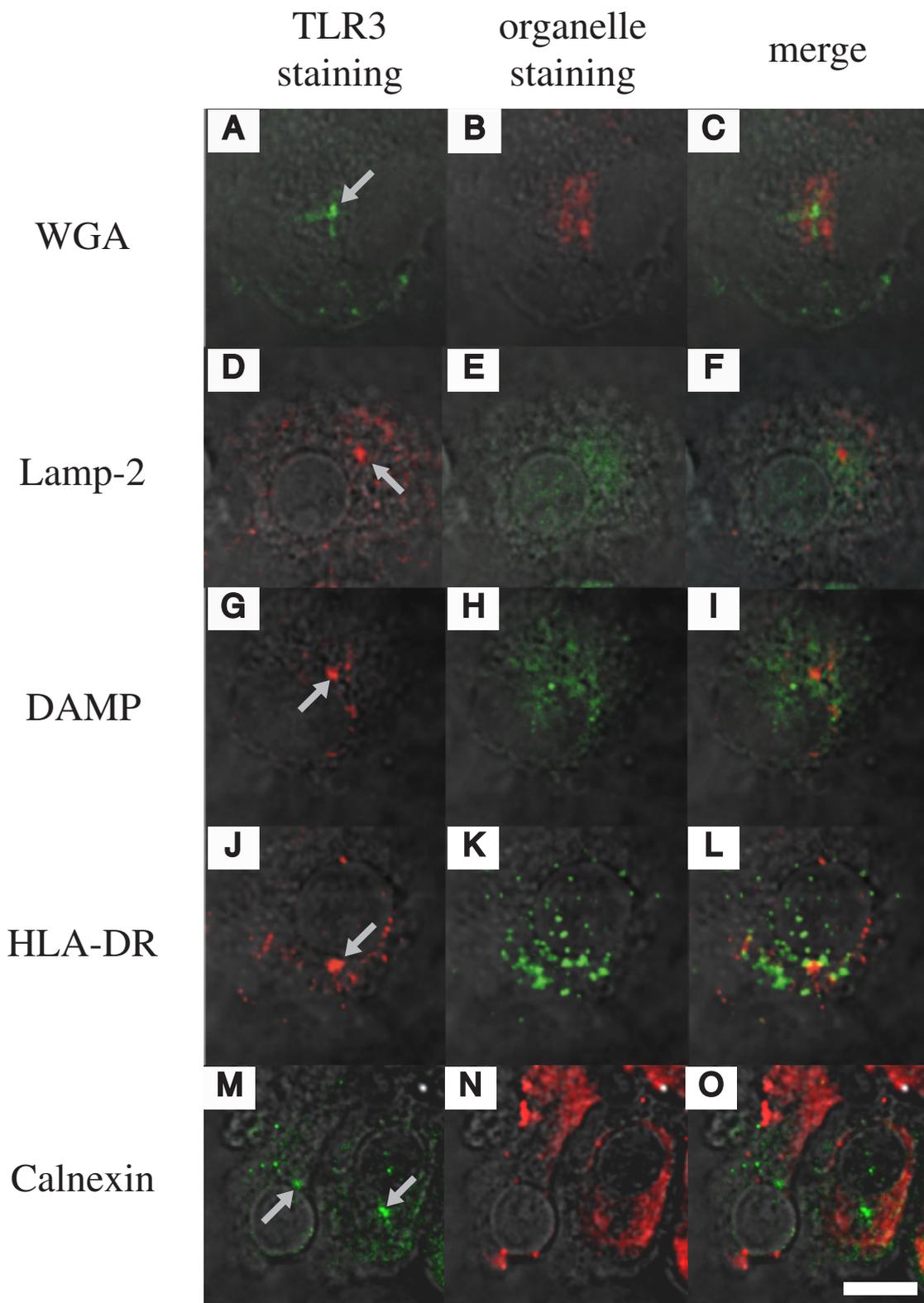


Figure 1-4 ヒト樹状細胞における内在性のTLR3とオルガネラマーカ-の共染色

TLR3の局在を抗ヒトTLR3抗体 (TLR3.7, 10-20 $\mu\text{g/ml}$) で検出した (A,D,G,J,M) . A,D,G,J,Mにおいて灰色の矢印で示したドット状の染色は中心体近傍に存在する別の分子である (本文参照) . WGAの局在はWGA-TR (終濃度5 $\mu\text{g/ml}$, 室温30分) で検出した (B) . Lamp-2,Calnexinの局在はそれぞれの特異抗体 (100倍希釈) で検出した (E,N) . DAMPの局在は5 $\mu\text{g/ml}$ DAMP存在下で1時間培養した細胞を用い , FITC標識抗DNP-KLH抗体 (100倍希釈) で検出した (H) . HLA-DRの局在はFITC標識抗HLA-DR抗体 (100倍希釈) で検出した (K) . 2次抗体にはAlexa 488/594標識抗体 (終濃度5 $\mu\text{g/ml}$) を用い , 共染色像をC,F,I,L,Oでそれぞれ示した . 右下のBarは10 μm を示す .

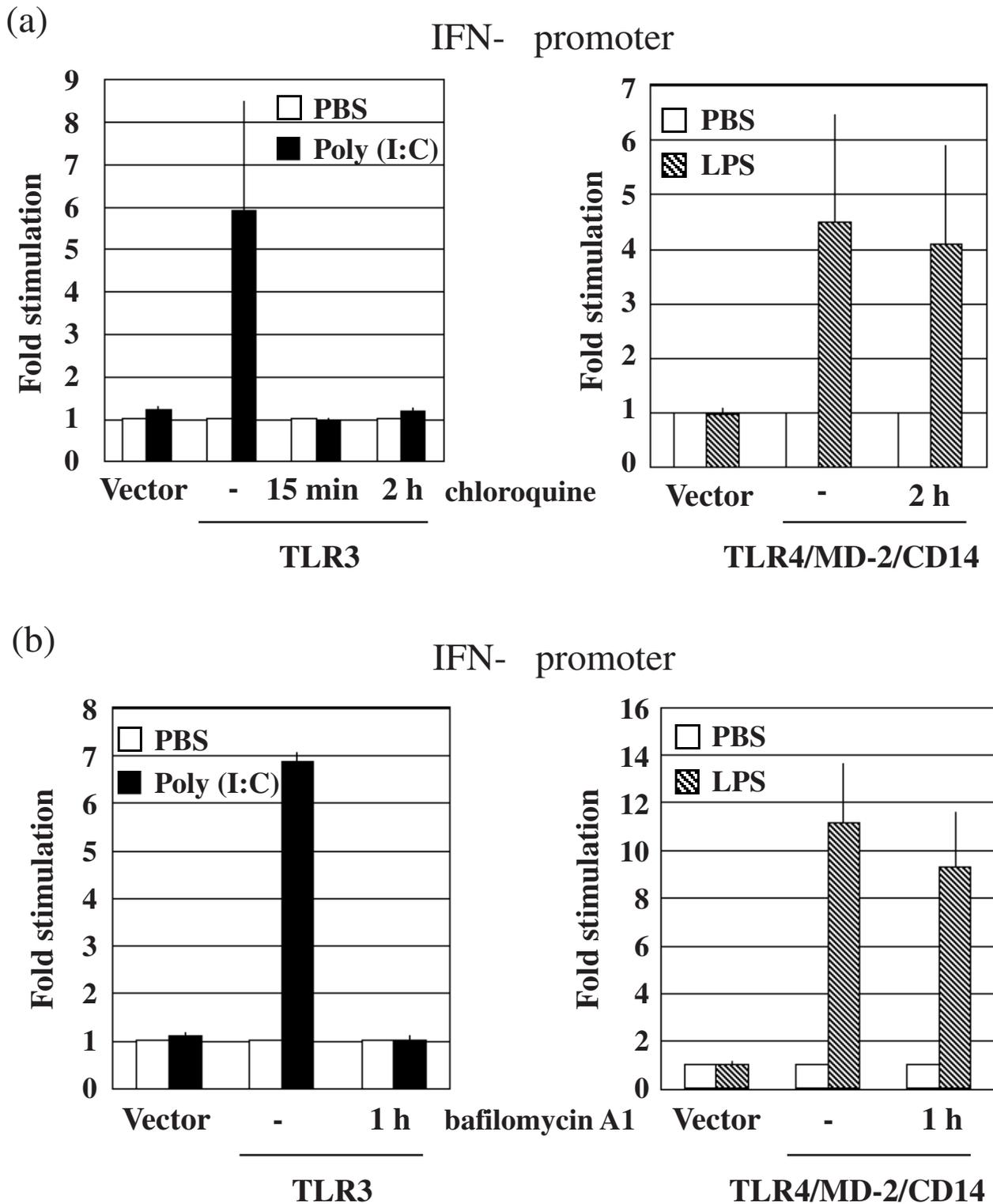


Figure 1-5 TLR3を介したリガンド認識に対してエンドソーム成熟化阻害剤が及ぼす影響
 HEK293細胞にTLR3, またはTLR4/MD-2/CD14を一過性に発現させ, poly (I:C) (終濃度2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), またはLPS (終濃度100 ng/ml)で6時間刺激した. ルシフェラーゼ活性によって表されるIFN- プロモーター活性を, 未刺激時に対する比で示した. 値は3回実験を行った平均値を使用し, 標準偏差をエラーバーで示した.

(a) 刺激15分前, または2時間前にChloroquine (終濃度5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)前処理を行った.

(b) 刺激1時間前にBafilomycin A1 (終濃度250 nM)前処理を行った.

IFN- promoter

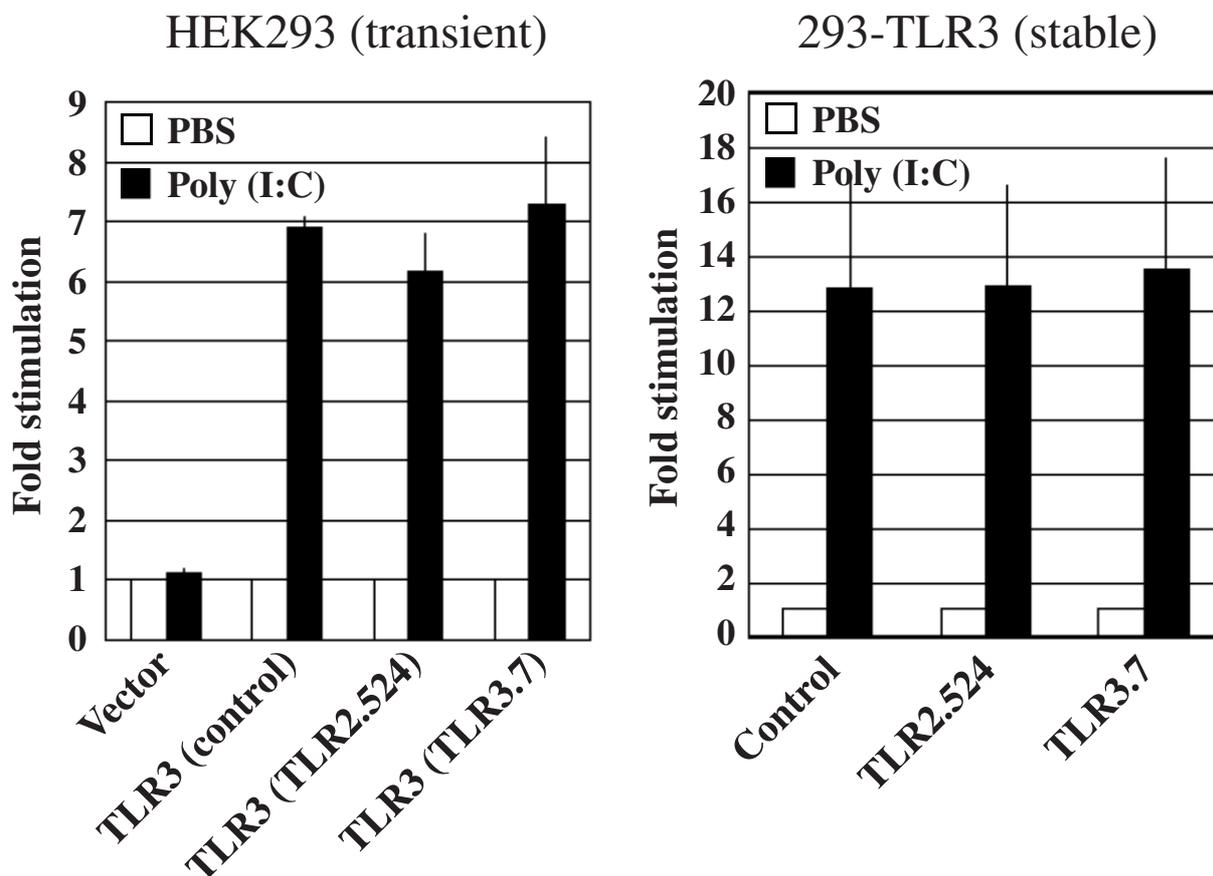


Figure 1-6 TLR3を介したリガンド認識に対して抗TLR3抗体が及ぼす影響

TLR3を一過性に (左図) , または恒常的に (右図) 発現させたHEK293細胞を用いた . 刺激1時間前に抗TLR3抗体 (TLR3.7) , またはコントロール抗体 (TLR2.524) (終濃度20 $\mu\text{g/ml}$) で前処理を行った . poly (I:C) (終濃度2 $\mu\text{g/ml}$) , で6時間刺激した時のIFN- プロモーター活性を , 未刺激時に対する比で示した . 値は3回実験を行った平均値を使用し , 標準偏差をエラーバーで示した .

1-4 考察

TLR3のリガンド認識機構について考察する目的で、本章ではTLR3の細胞内局在について解析した。内在性のTLR3が局在する細胞内小器官の同定を目的として解析を行った結果、現時点ではこれまでに知られている細胞内小器官とは異なる性質を持つ細胞内小胞にTLR3は局在していることが判明した。

TLRの細胞内局在については、TLR2,4,9においていくつか報告がある。TLR2は基本的に細胞表面に存在するが、微生物が食細胞に取り込まれる際にTLR2がエンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれるという報告 [46]がある。TLR4は細胞表面とゴルジ体に存在するが、シグナル伝達の場合がどちらであるかは細胞種によって異なる[38, 39]。TLR9については、リガンドである非メチル化 CpG-DNAの認識がエンドソームで起きる[51, 52]ことが以前から知られているが、最近TLR9がERに局在し、リガンド刺激によってエンドソームへと移行するという報告 [41]がなされた。TLR3についてタンパク質レベルでの解析は、現在本研究室でのみ報告されている。

本研究室では、マウスBcell由来の培養細胞株、Ba/F3細胞に強制発現させたTLR3がMultivesicular Body (MVB) に局在するという結果を免疫電顕によって得ている[42]。MVBは、脂質2重層が小胞内腔にくびれ込む事によって、内腔に小胞を含むようになったエンドソーム系の小胞として知られている [53]。MVBは樹状細胞においてMHC class II分子を豊富に含むことが知られており[54]、TLR3はMHC class IIを含む小胞と共局在すると予想して実験を行ったが、意外なことにTLR3とMHC class IIはほとんど共局在が観察されないという結果が得られた。このことから、樹状細胞におけるTLR3は特異的な細胞内小器官に濃縮されていることが示唆された。また、HEK293細胞において見られたゴルジ体やリソソームとの部分的な共局在は、強制発現させたTLR3が輸送、分解される過程の分子を検出していると考えられた。

本研究室での樹状細胞を用いた実験 [42]、および本研究におけるHEK293細胞を用いたIFN-プロモーターの活性化の実験 (Figure 1-5) によって、エンドソーム成熟化の阻害剤が、TLR3を介するシグナル伝達が抑制されることが明らかとなった。Poly(I:C)をリガンドとして用いた場合、リガンドがエンドソームを通るか、もしくはエンドソーム成熟化阻害によって影響を受けるような細胞内輸送系を通してTLRの局在する細胞内小器官へ運ばれると考えられる。また、HEK293細胞に恒常的にTLR3を発現させた際には、わずかに細胞表面にTLR3が発現している (Figure 1-1) が、抗体阻害の実験からはHEK293細胞における細胞表面のTLR3はシグナル伝達には寄与していないと考えられた。

ウイルス感染防御にTLR3が果たす役割については、TLR3のリガンドが明らかになってから2年の歳月が流れた現在でも明確ではない。ウイルスの生活環から、ウイルスゲノムの複製は核や細胞質で主に起きることから、ウイルス由来の2本鎖RNAも核や細胞質で生成すると考えられる。トポロジーが細胞内小胞の内腔側を向いているTLR3のLRRドメインは、一度細胞外に流出してから細胞内小胞に取り込まれたウ

ウイルス由来の2本鎖RNAを認識するのかもしれない (Figure IV) . また , 宿主への侵入の際に , 宿主のエンドサイトーシスを起こす分子機構を積極的に利用しているウイルスも多く存在する . これらのウイルスがエンドソームから細胞質への侵入に失敗して分解された場合 , TLR3によって認識されうる2本鎖RNAが生じる可能性も考えられる . しかし , TLR3自身はエンドソームに局在しないため , ウイルス由来の 2本鎖RNAがTLR3の局在する細胞内小胞まで運ばれる分子機構の解析が今後重要になると思われる .

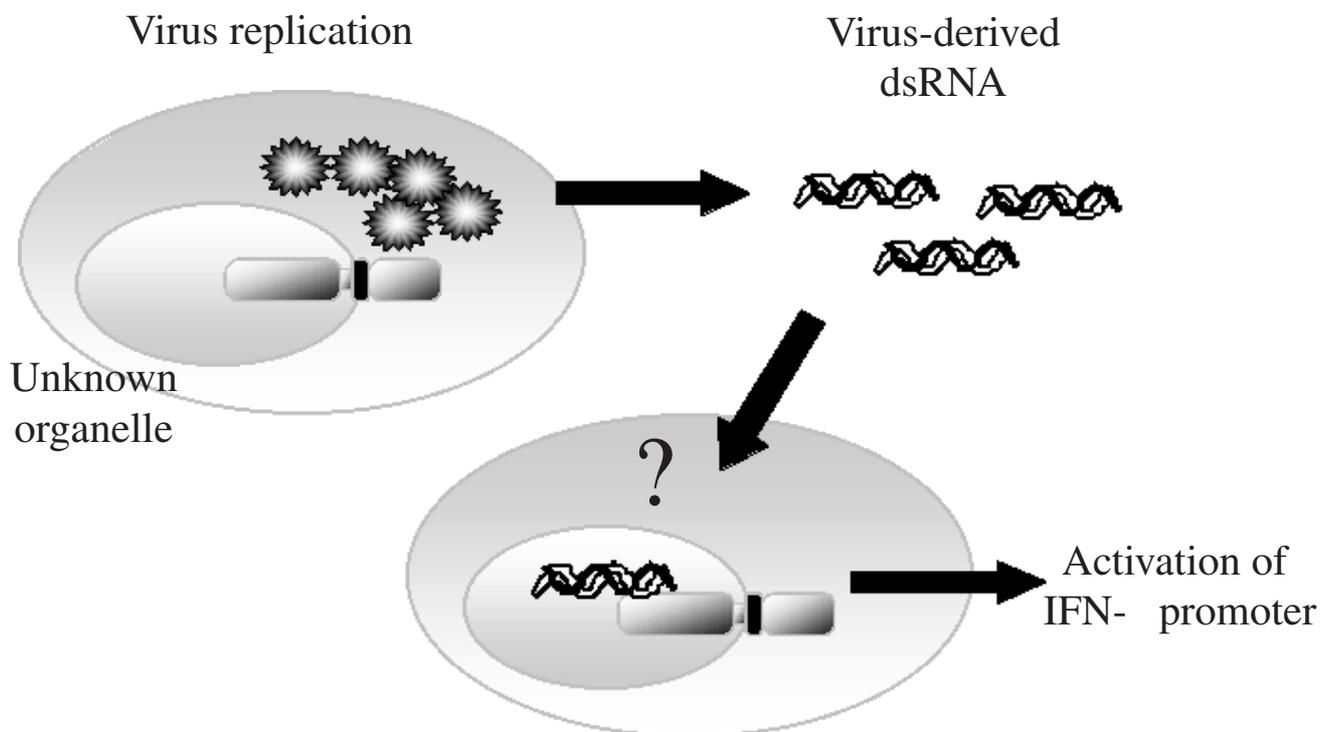


Figure IV ウイルス感染とTLR3の局在する細胞内小器官

第2章 TLR3のリンカー領域による細胞内局在の制御

第1章の解析から，TLR3の細胞内局在は他のTLRファミリー分子とは異なる独自の制御を受けていると思われた．樹状細胞は強制発現の実験が困難であり，さらに正常細胞であることから個体差が大きく細胞内局在の制御機構を解析するには不向きである．そこで，本章では培養細胞を用いてTLR3の細胞内局在がどのように制御されるか解析した．

2-1 実験材料

2-1-1 細胞

マウスプレB細胞由来培養細胞株，Ba/F3細胞は東京大学医科学研究所の三宅健介教授より供与されたものを用い，10% FCS, 5 ng/ml mouse IL-3, 100 μ M 2-ME, 100 mU/ml Penicillin G, 100 μ g/ml streptomycinを添加したRPMI 1640 medium を用いて37°C, 5% CO₂中で培養した．HEK293細胞は1-1-1の条件で培養した．

2-1-2 試薬

以下の試薬を各メーカーより購入した．

抗FLAGモノクローナル抗体 (M2)	Sigma
抗HAポリクローナル抗体	
Pfu Turbo DNA polymerase	Stratagene (La Jolla, CA)
Pyrobest DNA polymerase	宝酒造
ポリヌクレオチドキナーゼ	
DNA リガーゼ	
各種制限酵素	
Big Dye Terminator kit sequencing Ready Reaction	Applied Biosystems (Foster City, CA)
抗ヒトTLR3モノクローナル抗体 (IMG-315, ウエスタンプロット用)	Imgenex (San Diego, CA)
各種HRP標識2次抗体	Biosource (Lewisville, TX)
タンパク質分子量マーカー「第一」	第一化学薬品

2-1-3 cDNA

1-1-3で用いたヒトTLR2, TLR3cDNAを変異体cDNAの鋳型として用いた。クローニングベクター pCR-Blunt vectorはInvitrogenより購入した。発現ベクター pCMV-FLAGはSigmaより購入した。pBluescript (-)はStratageneより購入した。

2-1-4 溶液・緩衝液の組成

可溶化バッファー	50 mM Tris-HCl (pH 7.5) - 150 mM NaCl - 1% NP-40 - 10 mM EDTA - 25 mM iodoacetamide - 2 mM PMSF
泳動バッファー	50 mM Tris-HCl (pH 8.3) - 0.1% SDS-38 mM glycine
5Xサンプルバッファー	312.5 mM Tris-HCl (pH6.8) - 50% glycerol-10% SDS - 5 mg BPB
Anode 1 バッファー	0.3 M Tris-HCl - 20% methanol (pH 10.4)
Anode 2 バッファー	25 mM Tris-HCl - 20% methanol (pH 10.4)
Cathode バッファー	25 mM Tris-HCl - 40 mM glycine - 20% methanol (pH 9.4)
洗淨バッファー	
(ウエスタンブロット)	20 mM Tris-HCl - 0.5 M NaCl - 0.1% Tween 20 (pH 7.4)
ブロッキングバッファー	10% スキムミルク (雪印乳業) - 洗淨バッファー

2-2 実験方法

2-2-1 変異体TLR3 cDNAの作製

制限酵素消化，プラスミド抽出，トランスフォーメーション等の基本的な遺伝子操作は成書 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual) の記述に従って行った．PCRによる変異導入DNAの増幅にはPfu Turbo DNA polymerase，あるいはPyrobest DNA polymeraseを用い，primerは終濃度0.5 μM，鋳型DNAは10 ngでPCR反応を行った．得られたPCR産物はpCR-Blunt vectorにサブクローニングし，塩基配列を Big Dye Terminator kit sequencing Ready Reactionを用いたシーケンス反応によって確認した．解析にはABI PRISM 310/3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いた．

ヒトTLR3全長のcDNAを鋳型として，下図に示すPCR primerを用いて6種類 (TrI : 799-904 aa, TrII : 830-904 aa, TrIII : 874-904 aa, TrIV : 781-904 aa, TIR : 755-904 aa, CYT : 730-904 aa) の各欠失変異体を作製した．このとき，まずTLR3-5'-1828と各欠失変異体作製用primerを用いてTLR3の3'末端を増幅した．得られたPCR産物をサブクローニングし，塩基配列を確認した後*Cl**a* I/*Not* Iで制限酵素消化し，得られた欠失変異体の3'末端断片とTLR3全長を*Cl**a* I消化した5'末端側断片をライゲーションして各欠失変異体の全長とした．

TLR3-5'-1828	5' -AGATCCCGGTTGAGGTCTTC-3'
TrI-3'	5' -GCGGCCGCCTAAAAACACCCGCCTCAAAG-3'
TrII-3'	5' -GCGGCCGCCTATCTTTTGCATAATGGGTC-3'
TrIII-3'	5' -GCGGCCGCCTAAGATTTAAACATTCCTCTTCGC-3'
TrIV-3'	5' -GCGGCCGCCTATTCCTTTTCCATTGAAGAG-3'
TIR-3'	5' -GCGGCCGCCTATTCAAACCTGTTCTGTCTG-3'

94°C 1 min denature

94°C 30 sec – 55°C 30 sec – 72°C 1 min (30 cycle)

72°C 7 min – 4°C

TIR体については，TLR3アミノ末端に予想されるシグナルペプチド (1-29 aa)の直下にHAタグを付加したコンストラクトを，下図に示すPCR primerを用いて作製した．まずヒトTLR3全長のcDNAを鋳型としてHA-TLR3-5'とTLR3-3'-574を用いてTLR3のアミノ末端にHAタグを付加した配列をサブクローニングした，得られた配列を鋳型としてTLR3 signal peptide-HA-5'とTLR3-3'-574を用いてHAタグにTLR3シグナルペプチドを付加した配列を作製した．塩基配列を確認したTLR3シグナルペプチド-HA-TLR3の*Xho* I/*Bgl* II断片とTLR3cDNAの*Bgl* II/*Not* I消化断片をライゲーションして，HA-TLR3全長を完成させた．

HA-TLR3-5'5'	-CTCGAGCCACCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAA GTGCACTGTTAGCC-3'
--------------	---

TLR3 signal peptide-HA-5'

5' -CTCGAGCCACCATGTCTGCACTTCTGATCCTAGCTCTTGTT

GGAGCTGCAGTTGCTTACCCATACGATGTTCC-3

TLR3-3'-574 5'-CCATTATGAGACAGATCTAATG-3'

94°C 1 min denature

94°C 30 sec – 55°C 30 sec – 72°C 1 min (30 cycle)

72°C 7 min – 4°C

アミノ酸1残基，もしくは2残基をアラニンに置き換えた置換変異体は， site-directed mutagenesis法を用いて作製した．置換する配列に変異を導入した35-40塩基の相補的な primerを変異体1種類について2本ずつ設計した（配列略）．pEF-BOS-TLR3 TIRを鋳型として，2本のprimerを用いて下記の条件でPCRを行い，*Dpn I*で37°C 1時間反応させて鋳型DNAを分解した後，トランスフォーメーションと配列の確認を行った．

95°C 1 min denature

95°C 30 sec – 53°C 1 min – 68°C 17 min (16 cycle)– 4°C

TLR3の細胞外領域をヒトTLR2の細胞外領域に置き換えたキメラ体は以下の方法で作製した．pBluescriptベクターにヒトTLR2とヒトTLR3のcDNAをタンデムに挿入したコンストラクトを鋳型として，下に示したPCR primerを用いてTLR2の5'末端とTLRの3'末端を増幅した．下記の条件でPCRを行い，*Dpn I*で37°C 1時間反応させて鋳型DNAを分解した後，ゲル抽出，ポリヌクレオチドキナーゼ処理，ライゲーションを行い，2種類 (vol.1 : TLR2 1-583 aa / TLR3 697-904 aa, vol.2 : TLR2 1-639 aa / TLR3 756-904 aa)のキメラ体を作製した．また，本研究室で作製された pEF-BOS-hTLR3-CFLAGを*Xho I/Bam HI*消化したベクター側断片と2種類のキメラ体の*Xho I/Bam HI*消化断片をライゲーションすることでカルボキシル末端にFLAGタグを付加したキメラ体を作製した．

TLR2-3' chimera 1 5'-CGACACCGAGAGGCGGAC-3'

TLR3-5' chimera 1 5'-AAAGACAGTGCCCCCTTTG-3'

TLR2-3' chimera 2 5'-GATGTTCTGCTGGGAGCTT-3'

TLR3-5' chimera 2 5'-GAATATGCAGCATATATAATTC-3'

95°C 1 min denature

95°C 30 sec – 53°C 1 min – 68°C 14 min (14 cycle)– 4°C

作成した各変異体は，*Xho I/Not I* siteで発現ベクターpEF-BOSに組み込んだ．また，TLR3全長のアミノ末端にFLAGタグを付加したコンストラクトは，本研究室でpCMV-FLAGベクターにシグナルペプチドを除去したTLR3全長を組み込むことによって作製されたものを用いた．

2-2-2 変異体TLR3発現培養細胞株の樹立

HEK293細胞に各変異体TLR3を強制発現させたstable cloneは，1-2-1に記した方法で作成した．変異体TLR3の分子量確認はウエスタンブロットによって行った． 3×10^5 の細胞に可溶化バッファー 50 μ l/sample を加え，4°C 20分可溶化した．小型遠心機

の最高速で4°C 20分遠心した上清を，Laemmliの方法[55]に従って還元条件（終濃度50 mM DTT），7.5%アクリルアミドゲルでSDS-PAGEを行った後，PVDF膜への転写をセミドライ法にて行った。泳動終了前にPVDF膜を1分間メタノールで処理した後，Anode 2バッファーに浸して振とうした。泳動終了後，ゲルをCathodeバッファーに浸し，10分振とうした。転写装置（日本エイダー）の陽極側から順番に1)Anode 1バッファーに浸した3MM濾紙2枚，2)Anode 2バッファーに浸した濾紙1枚，3)PVDF膜，4)ゲル，5)Cathodeバッファーに浸した濾紙3枚の順番で転写装置にのせ，90 mA，90分間通電し，ウエスタンブロットを行った。室温1時間以上ブロッキングバッファーでPVDF膜を処理した後，抗TLR3モノクローナル抗体（Imgenex，終濃度2 µg/ml）で4°C 16時間処理した。洗浄バッファーで10分，3回洗った後，ブロッキングバッファーで10,000倍希釈したHRP標識2次抗体溶液中で室温1時間処理した。洗浄バッファーで10分，3回洗った後，ECL試薬（Amersham Bioscience）を用いて発色を行った。

Ba/F3細胞に各変異体TLR3cDNAを導入したstable cloneを樹立するため， 2×10^6 の細胞を800 µlの培地に懸濁し，変異体DNA 20 µgとpSV-neo 2.0 µgをエレクトロポレーション法（350 V，950 µF）によって導入した。室温5分間静置後，培地で希釈して96 well plateにまき直し，24時間培養後Geneticinを終濃度750 µg/mlの割合で添加した培地を用いてセレクションを行った。約2-3週間後にフローサイトメトリーによって陽性細胞のスクリーニングを行った。

2-2-3 フローサイトメトリーによる細胞内局在の解析

細胞表面，及び細胞内部における各変異体TLR3の発現は1-2-2に記した方法に従ってフローサイトメトリーによって解析した。キメラ体の検出には抗ヒトTLR2抗体（TLR2.45：終濃度5 µg/ml）を用いた。アラニン置換変異体については，各クローンについてフローサイトメトリーによって細胞表面と細胞全体の発現量をM.F.I値として数値化した。そして，変異体1種類につき少なくとも3クローン以上の値を用いて，全発現量に対する細胞表面への発現率を算出した。

2-2-4 免疫染色による細胞内局在の解析

6-well plate 90%コンフルエントのHEK293細胞1 wellに対してpEF-BOS-HA-TLR3 TIR 2 µgとpFLAG-CMV 2 µgをLipofectamine 2000 10 µlによってトランスフェクションした。24時間後に 5×10^4 /wellの割合で24-well plateにまき直し，12-24時間培養することによってBIOCOAT（poly-L-Lysine Coverslips 12 mm round）に付着させた。以降の操作は1-2-3に準じて行い，抗FLAGモノクローナル抗体と抗HAポリクローナル抗体を用いて2重染色を行った。

2-3 実験結果

2-3-1 TLR3 欠失変異体における細胞内局在

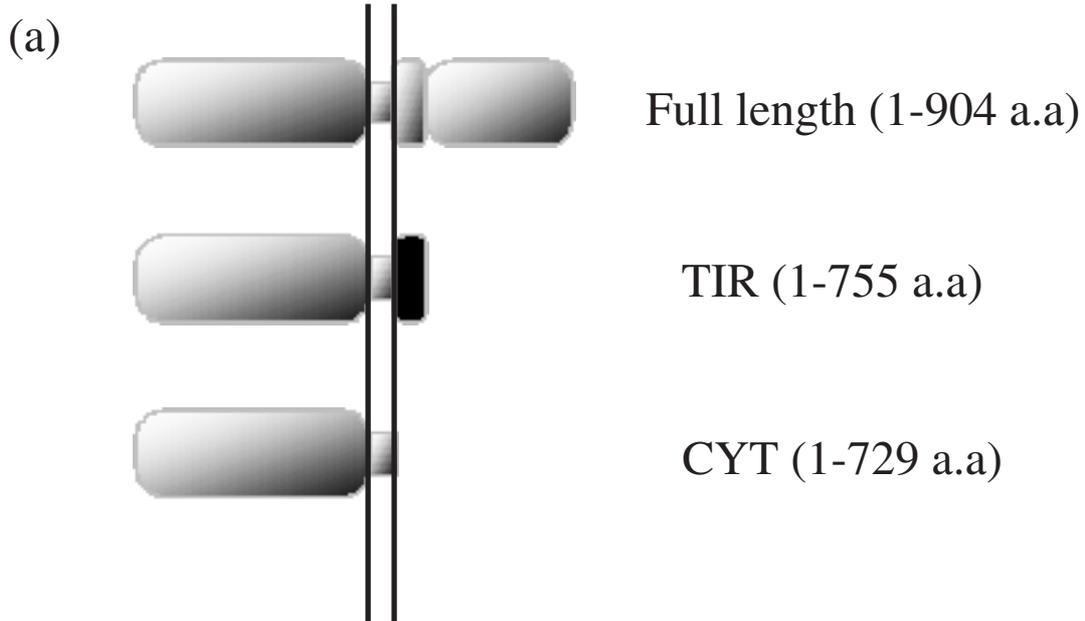
TLR3 の細胞内領域をアミノ酸 5 残基のみ残して欠失させた CYT 体 (Figure 2-1(a))を HEK293 細胞に恒常的発現させた結果, TLR3 全長とは異なり, 細胞表面に強い発現が見られた (Figure 2-2 (a)). このことから, TLR3 の細胞内局在が TLR3 の細胞内領域によって規定されている可能性を考え, TIR ドメインを部分的に欠失した変異体 (TrI-TrIV)を作成した. HEK293 細胞にこれらの変異体を恒常的に発現させたところ, 細胞の表面にはほとんど発現していなかった (データ未提示). さらに, TIR ドメインを全て欠失した変異体, TIR 体でも発現は細胞内部に限定されていた (Figure 2-2 (a)). 各変異体を HEK293 細胞に発現させた時に, 予想された分子量のタンパク質を発現していることをウエスタンブロットにより確認した (Figure 2-1(b)). また, Ba/F3 細胞を用いて同様の実験を行ったところ, HEK293 細胞と同様の結果が得られた (Figure 2-2 (b)). そこで, これらの局在を確認するために免疫染色の実験を行った結果, CYT 体における細胞表面への発現, 及び TIR 体における細胞内部への発現を確認した (Figure 2-3). また, TIR 体の細胞内局在が TLR3 全長と一致するか確かめるため, TLR3 TIR 体のアミノ末端に HA タグを付加し (HA-TLR3 TIR), FLAG タグを付加した TLR3 全長 (FLAG-TLR3)と同時に HEK293 細胞に導入した. この時の細胞内局在を免疫染色によって検討した結果, TLR3 全長と TIR 体は共局在していた (Figure 2-3). TLR3 の細胞内領域は TIR ドメインが大半を占めるが, 膜貫通領域と TIR ドメインの間に, アミノ酸 31 残基からなる配列が存在する. この配列から, CYT 体に含まれる 5 残基を除いたアミノ酸 26 残基を「リンカー領域」と命名し, 以後さらに解析を進めた.

2-3-2 TLR2-TLR3キメラ体における細胞内局在

TLR3の細胞内局在に対する TIRドメインの関与について解析するため, 細胞表面に局在することが分かっているTLR2とTLR3のキメラ体を作成した (Figure 2-4(a)). 2種類のキメラ体は, 共に細胞外領域が TLR2由来であり, 細胞内の TIRドメインが TLR3由来である. 一方, 膜貫通領域と細胞内リンカー領域は, キメラ体vol.1はTLR3由来であるのに対し, キメラ体vol.2はTLR2由来である. 両キメラ体が予想された分子量のタンパク質を発現していることを, カルボキシル末端にFLAGタグを付加したコンストラクトを用いてウエスタンブロットによって確認した (Figure 2-4(b)). そこで, 両キメラ体の細胞内局在についてフローサイトメトリーで検討したところ, どちらのキメラ体も主に細胞内部に局在していた (Figure 2-5). また, FLAGタグを付加したキメラ体とTLR3全長を共発現させ, 共染色の実験を行った結果, 共局在は観察されなかった (データ未提示).

2-3-3 TLR3のリンカー領域が細胞内局在に及ぼす影響

リンカー領域がTLR3の細胞内局在に影響する分子機構を解析するにあたり，TIRドメインが存在するとそれだけで細胞内局在が変化してしまうことから，TIR体におけるリンカー領域のアミノ酸を2残基ずつアラニンに置換した変異体を10種，1残基をアラニンに置換した変異体1種，リンカー領域のC末端5残基のアミノ酸を欠失した変異体を1種作成した(Figure 2-6)．合計12種の変異体をHEK293細胞，及びBa/F3細胞に恒常的に発現させ，各変異体について細胞表面への発現率を2-2-3に記した方法で算出した．HEK293細胞では，Mutant 6 (RV/AA体)が他の変異体に比べて細胞表面への発現が強く見られた (Figure 2-7)．これに対して，Ba/F3細胞ではMutant 8 (KE/AA体)，Mutant 9 (ID/AA体) が細胞表面に強く発現していた(Figure 2-8)．



(b)

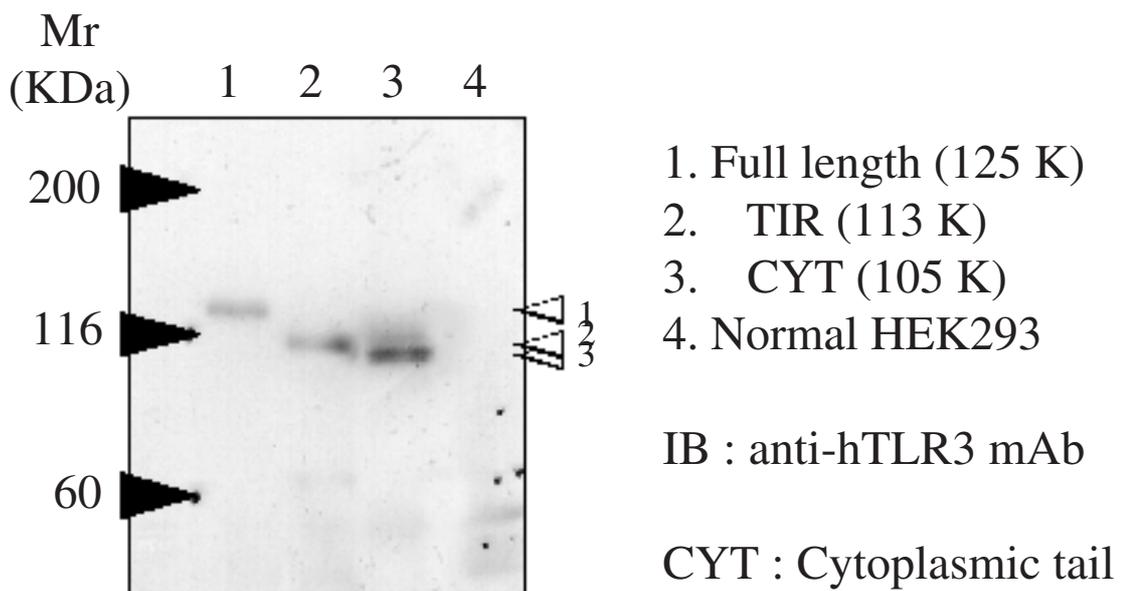
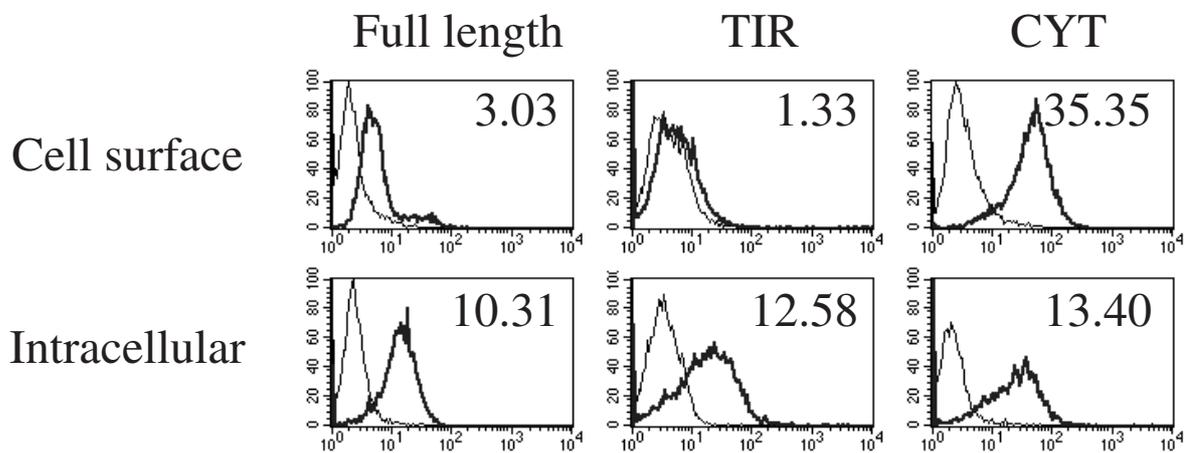


Figure 2-1 TLR3の細胞内領域を欠失した変異体の作成

(a) 細胞内領域を欠失した変異体の模式図を示した。

(b) HEK293細胞に発現させた各変異体の分子量を抗ヒトTLR3抗体 (Imgenex, 終濃度2 $\mu\text{g/ml}$) を用いてウエスタンブロッティングで確認した。

(a)



(b)

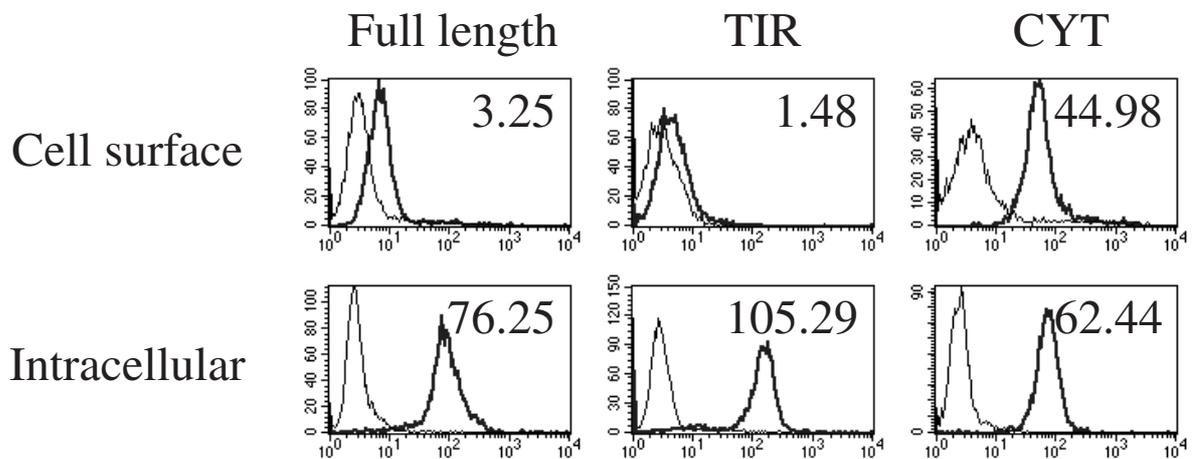


Figure 2-2 細胞内領域を欠失した変異体の細胞内局在 (1)

(a) HEK293細胞に恒常的に発現させた各細胞内領域欠失変異体の細胞内部，及び細胞表面での発現をフローサイトメトリーで解析した．図中の数値はM.F.I値を示す．

(b) Ba/F3細胞に恒常的に発現させた各細胞内領域欠失変異体の細胞内部，及び細胞表面での発現をフローサイトメトリーで解析した．図中の数値はM.F.I値を示す．

CYT
(cell surface)

TIR
(intracellular)

FLAG-TLR3
HA-TLR3 TIR
(intracellular)

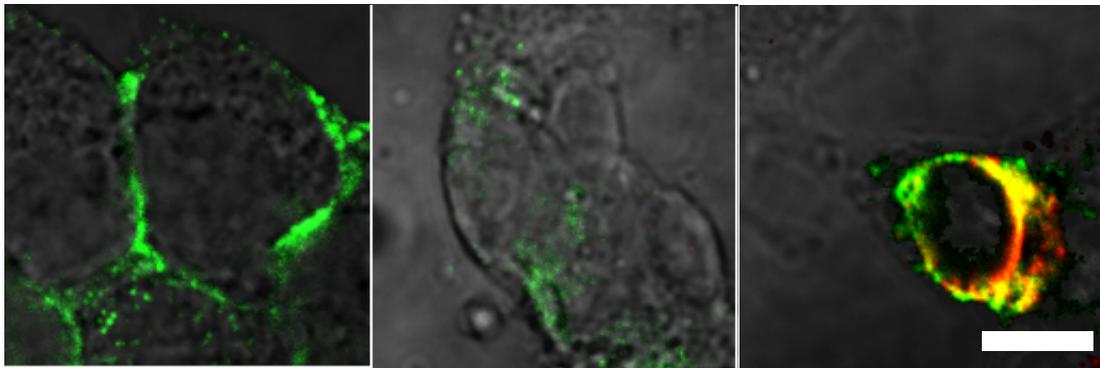


Figure 2-3 細胞内領域を欠失した変異体の細胞内局在 (2)

HEK293細胞に恒常的に発現させた各細胞内領域変異体の細胞内局在を抗ヒトTLR3抗体 (TLR3.7, 10-20 $\mu\text{g/ml}$) で検出した (左図, 中図). HEK293細胞にアミノ末端にFLAGタグを付加したTLR3全長と, HAタグを付加したTLR TIR体を一過性に共発現させ, 抗FLAG抗体 (終濃度5 $\mu\text{g/ml}$, 赤色)と抗HA抗体 (終濃度10 $\mu\text{g/ml}$, 緑色)でそれぞれ検出した. 右下のBarは10 μm を示す.

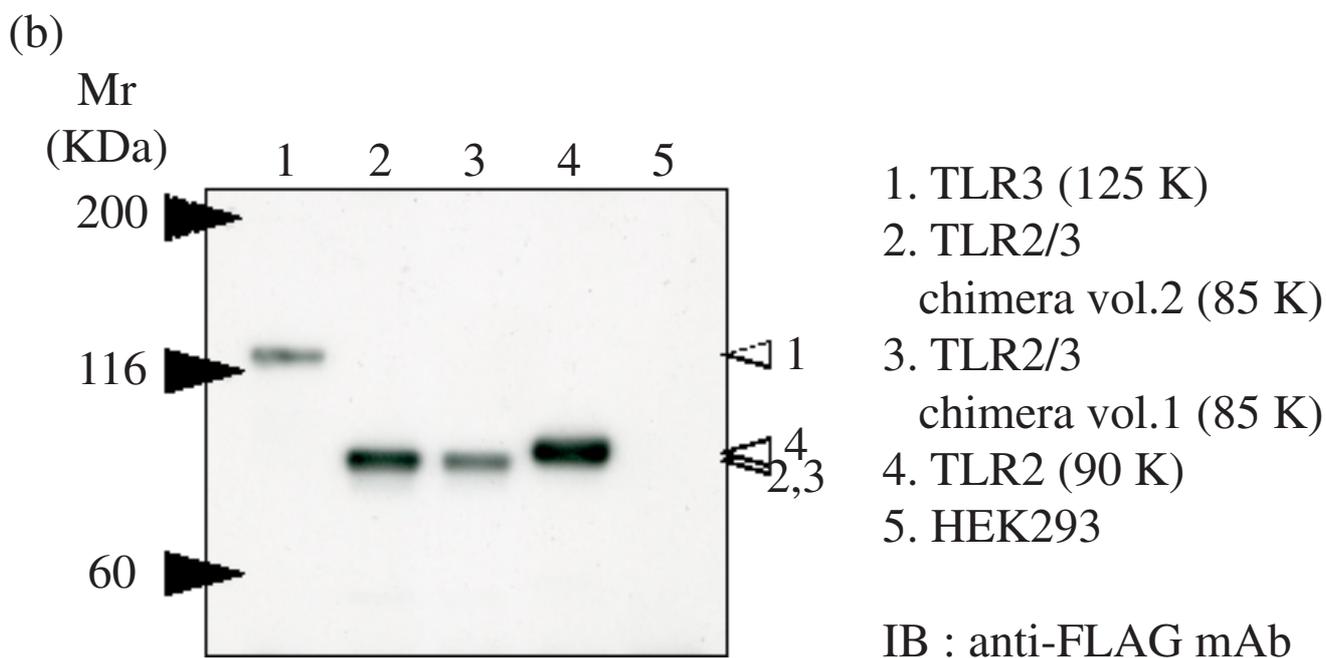
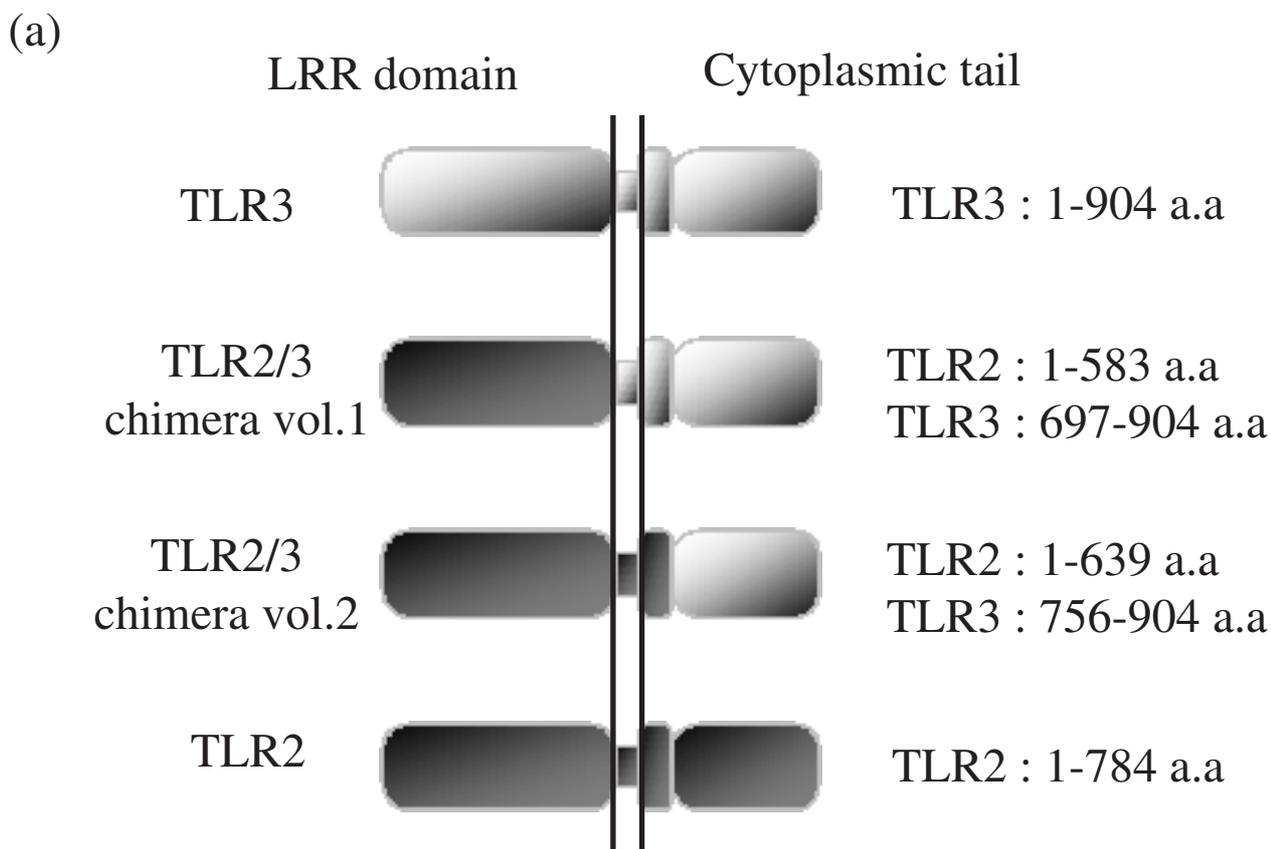


Figure 2-4 キメラ体TLRの作成

(a) 2種類のキメラ体 TLR(TLR2/3 chimera vol.1 , TLR2/3 chimera vol.2)の構造を図示した。

(b) FLAGタグを付加した TLR2 , TLR3 , 及び2種類のキメラ体 について , HEK293細胞に恒常的に発現させた。各変異体の分子量を抗FLAGモノクローナル抗体 (Sigma , 終濃度 2.5 µg/ml) を用いてウエスタンブロッティングで確認した。

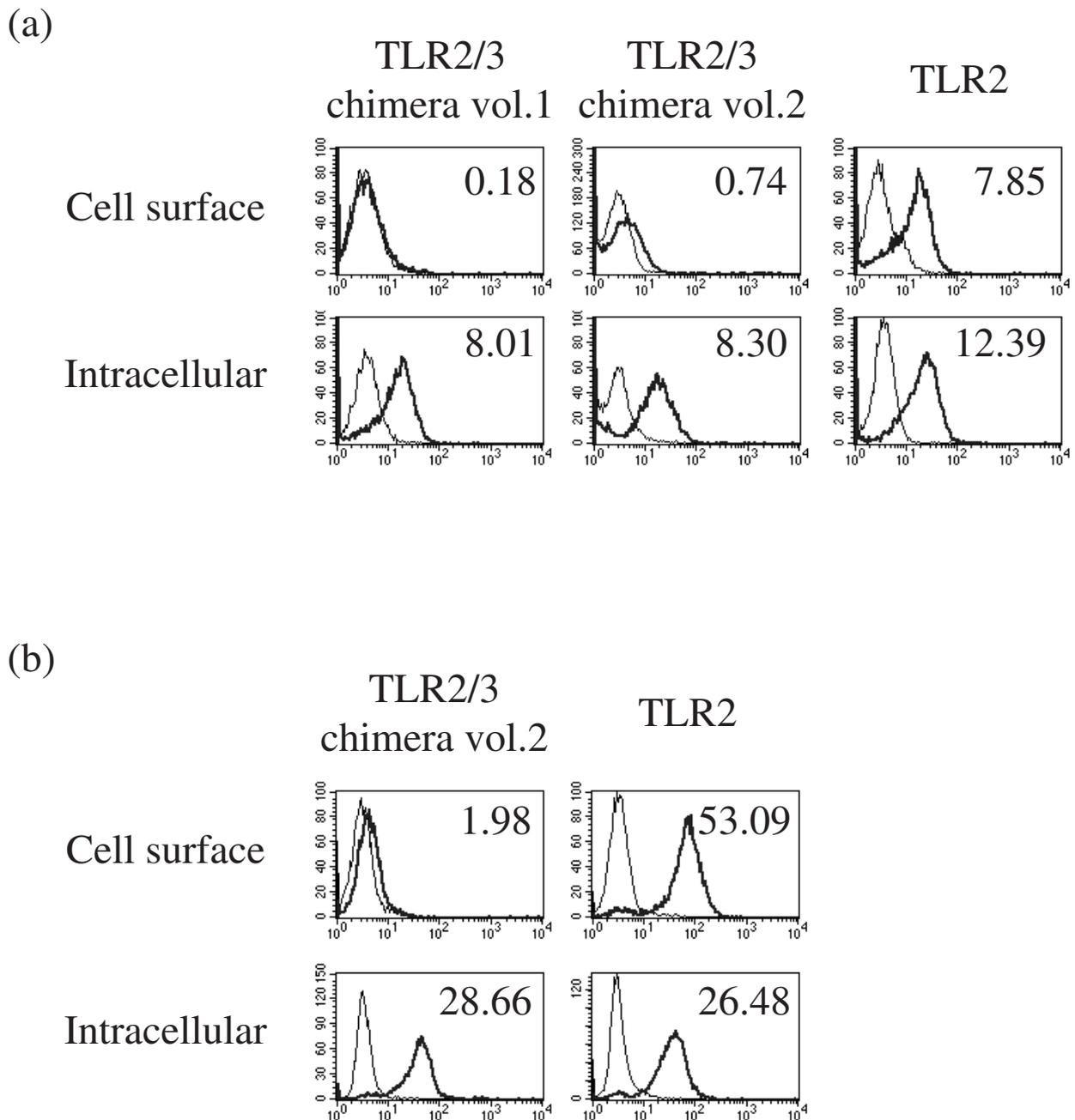


Figure 2-5 キメラ体TLRの細胞内局在

(a) HEK293細胞に恒常的に発現させたTLR2, 及び2種類のカメラ体 について, 細胞内部と細胞表面での発現をフローサイトメトリーで解析した. 図中の数値はM.F.I値を示す.

(b) Ba/F3細胞に恒常的に発現させたTLR2とTLR2/3 chimera vol.2について, 細胞内部と細胞表面での発現をフローサイトメトリーで解析した. 図中の数値はM.F.I値を示す.

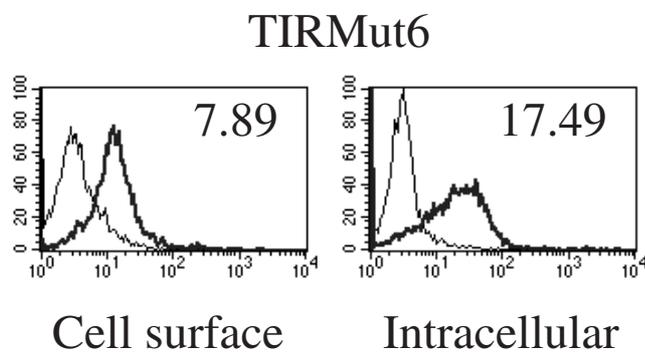
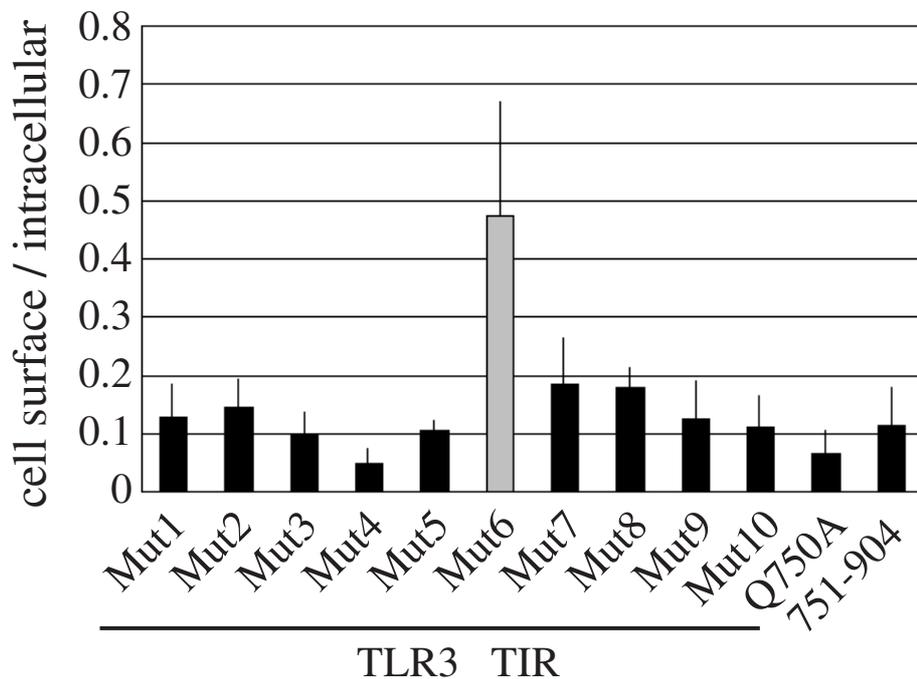
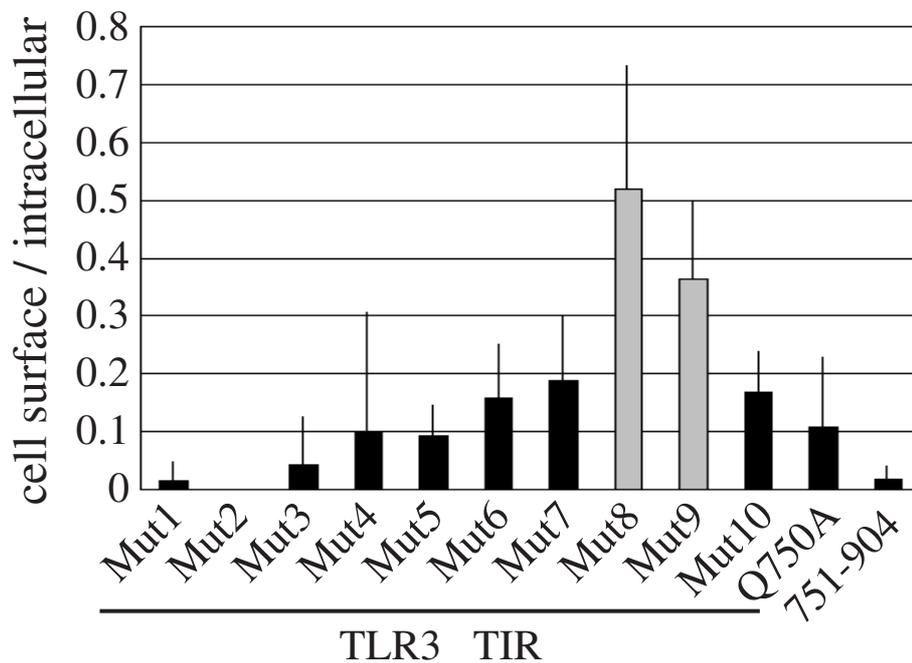


Figure 2-7 HEK293細胞における置換変異体の細胞内局在

HEK293細胞に各置換変異体を恒常的に発現させ，変異体1種につき3クローン以上の株について全発現量に対する細胞表面への発現率をM.F.I値の割合として求め，グラフ化した．細胞表面により強い発現が見られたクローンの代表例を下図に示した．上図の値は3回以上実験を行った平均値を使用し，標準偏差をエラーバーで示した．



TIRMut8

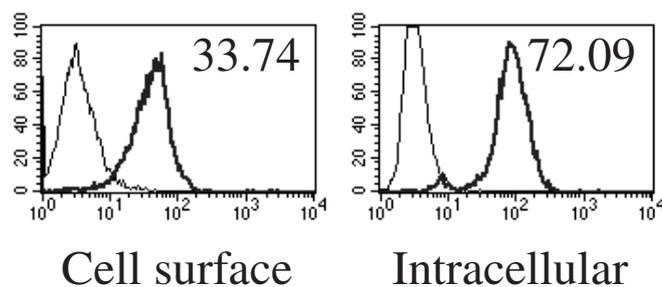


Figure 2-8 Ba/F3細胞における置換変異体の細胞内局在

Ba/F3細胞に各置換変異体を恒常的に発現させ、変異体1種につき3クローン以上の株について全発現量に対する細胞表面への発現率をM.F.I値の割合として求め、グラフ化した。細胞表面により強い発現が見られたクローンの代表例を下図に示した。上図の値は3回以上実験を行った平均値を使用し、標準偏差をエラーバーで示した。

2-4 考察

TLRの細胞内領域はその大半をTIRドメインが占めており，TLRを介するシグナル伝達に重要なアダプター分子群と相互作用する事から，シグナル伝達の分子機構に関連した解析が数多くなされている．これに対して，本章においてTLR3の細胞内局在を規定するのに重要な役割を果たすことが明らかとなったリンカー領域はこれまで全く機能解析が行われていない．リンカー領域はTIRドメインに比べて各分子種間でアミノ酸配列の相同性が低く，機能を有する可能性のある特徴的な配列に乏しい．リンカー領域において細胞内局在に影響を与え得るモチーフとしては，YWNVというtyrosine based motif (YXX，は疎水性アミノ酸)様の配列[56]が考えられたが，この部位の変異 (Mutant 2-Mutant 4) は細胞内局在に影響しなかった (Figure 2-7,2-8)．一方，細胞内部でリガンド認識が起きるTLR7[57]とTLR9[37]は，TLR3と同じ核酸誘導体を認識するレセプターであるが，ごく最近の報告によるとTLR9は定常状態ではERに局在しており，リガンド刺激によって初めてエンドソームに移行する [41]．またリンカー領域におけるTLR3のTLR7やTLR9に対する相同性はあまり高くないことから，TLR7やTLR9の細胞内局在制御機構はTLR3とは異なると考えられる．ただ，TLR7やTLR9のリンカー領域が細胞内局在に果たす役割は今後の課題として興味深い．

細胞表面に発現することが知られている，TLR2のTIRドメインのみをTLR3由来の配列に置き替えたキメラ体vol.2は細胞内部に局在した (Figure2-5) ことから，TLR3のTIRドメインは，リンカー領域とは独立にTLR3を細胞内部へ局在させる機能を持つことになる．しかし，キメラ体の細胞内局在は野生型TLR3とは異なっており(データ未提示)，TLR3のTIRドメインは，リンカー領域を含まない状態ではTLR3の本来の局在とは異なる細胞内小器官に運ばれていると思われた．また，リンカー領域を欠失したCYT体は細胞表面に発現している (Figure 1-1,1-2) ことから，TLR3が本来局在する細胞内小器官へ運ばれるためには少なくともリンカー領域が必要であると考えられる．

リンカー領域が細胞内局在に果たす役割についてさらに解析するため，TIR体を鋳型としたアラニン置換の実験を行った．2種の細胞株について同様の解析を行った結果，HEK293細胞とBa/F3細胞で異なる結果が得られた．第1章でも触れたように，Ba/F3細胞においてTLR3はMVBに局在している．最近の知見によれば，膜貫通型タンパク質のMVBへの局在は自身のユビキチン化によって制御されていると言われている[53]．リンカー領域におけるリジンを含むアミノ酸配列の変異によってBa/F3細胞特異的に細胞内局在が変化したことから，Ba/F3細胞ではTLR3がユビキチン化されることによって局在が規定される可能性が考えられる．しかし，HEK293細胞ではリジンの変異による細胞表面への局在の変化は見られず，他の部位のアミノ酸変異が細胞表面への局在変化を誘導した．また，樹状細胞においてMVBに存在するMHC class II分子はTLR3と共局在しなかった (Figure 1-4)．これらのことから，HEK293細胞や樹状細胞におけるTLR3の細胞内局在は，Ba/F3細胞とは別の分子機構で規定さ

れることが示唆される。

これらのことから、HEK293細胞や樹状細胞では、リンカー領域に結合する未知のアダプター分子がTLR3の細胞内局在を制御しているという分子機構を想定している (Figure V)。この場合、線維芽細胞や腸管上皮細胞ではTLR3が細胞表面に発現している理由をこのアダプター分子の発現低下、もしくは機能抑制によって説明する。Mutant 6 (RV/AA体)は、このアダプター分子との相互作用に何らかの異常が生じるために、HEK293細胞において細胞表面への発現が上昇していると考えられる。Mutant 6 (RV/AA体)がBa/F3細胞では細胞表面への発現が観察されなかった理由は、TLR3がBa/F3細胞特異的な別の分子機構でMVBに運ばれているためであろう。このアダプター分子は、リンカー領域が細胞膜近傍に位置しており、更にTIRドメインによる立体障害の影響を受けると思われることから、リンカー領域とアダプター分子の相互作用は細胞膜による影響を受けている可能性が考えられる。この事を考慮に入れてアダプター分子の同定を可能とするような実験系を構築し、TLR3の細胞内局在制御について詳細な分子機構を明らかにする予定である。

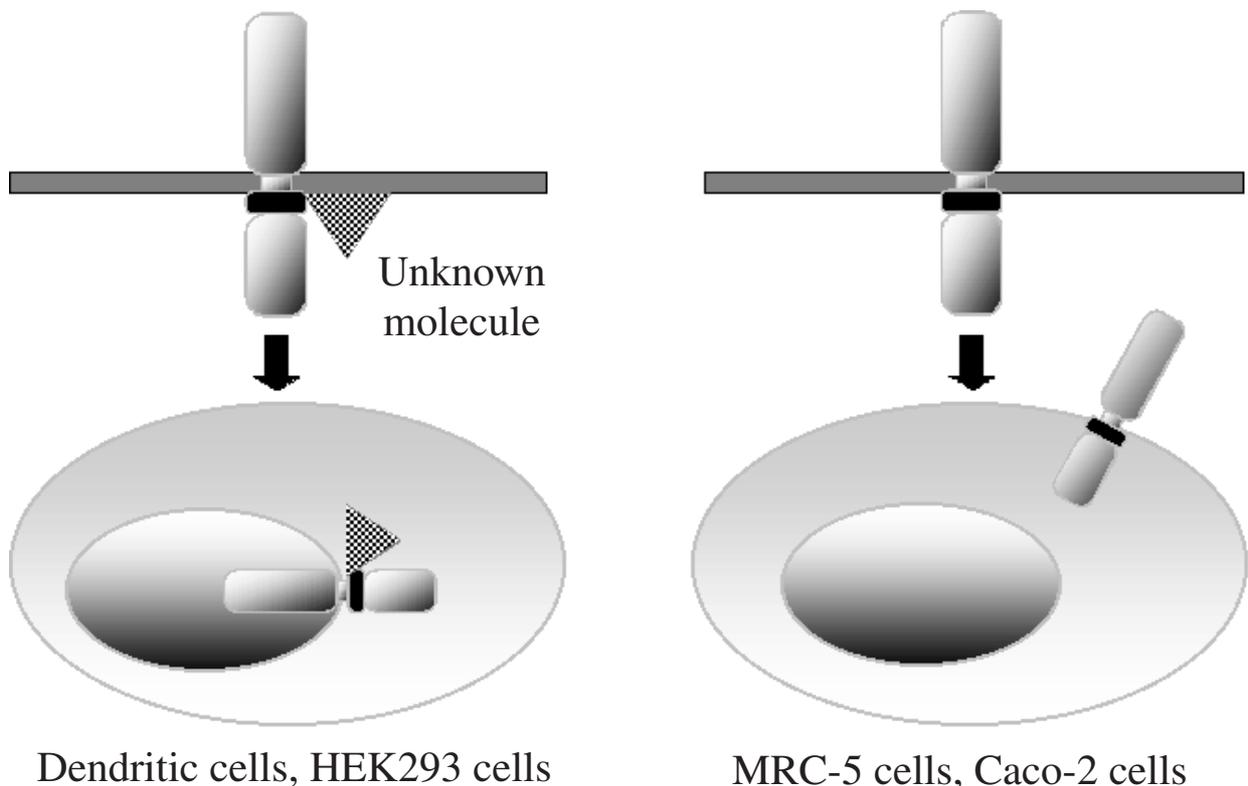


Figure V リンカー領域に結合する未知因子の予想される機能

3-2 実験方法

3-2-1 変異体TLR3 cDNAの作成・変異体TLR3発現培養細胞株の樹立

TLR3全長をコードするcDNAを鋳型として、アミノ酸1残基、もしくは2残基をアラニンに置き換えた置換変異体を2-2-1に記した方法で作成した。変異体TLR3発現培養細胞株は、1-2-1に記した方法で作成した。変異体TLR3の発現は、2-2-2に記した方法でウエスタンブロットによって確認した。

3-2-2 ルシフェラーゼアッセイ

6-well plates に 1×10^6 cells/well の割合でまいた HEK293 細胞に IFN- β プロモーターベクター (p-125 luc, 0.5 μ g) もしくは NF- κ B レポータープラスミド (pNF- κ B, 0.5 μ g) , 内部標準ベクター (pCMV , 0.0125 μ g) , 各変異体の発現ベクター (0.5 μ g) を Lipofectamine 2000 15 μ l を用いてトランスフェクションした。この時、pEF-BOS の空ベクターで総 DNA 量を 4 μ g に揃えた。ドミナントネガティブ効果の検討の場合は、野生型 TLR3 発現ベクター 0.5 μ g と変異体 TLR3 発現ベクター 0.5/3.0 μ g をレポータープラスミドとともに共発現させた。24 時間後の細胞を 24-well plate にまき直し、poly (I:C) (2 μ g/ml) を加えさらに 6 時間培養した。細胞を回収し PBS で 2 回洗浄した後、100 μ l/sample の Reporter Lysis Buffer (Promega) で可溶化し、可溶化物 10 μ l についてウミホタルルシフェラーゼ活性を Picagene (東洋インキ) の基質を用いてルミネッセンスリーダーで測定した。-galactosidase 活性は、可溶化物 4 μ l について -Galactosidase Enzyme Assay System (Promega) の試薬を用いて ELISA で測定した。ウミホタルルシフェラーゼ活性は -galactosidase 活性で補正し、未刺激細胞の活性、もしくは TLR を発現させていない細胞の活性に対する相対値で示した。

3-2-3 免疫沈降

6-well plates に 1×10^6 cells/well の割合でまいた HEK293 細胞に各変異体の発現ベクター (3.0 μ g) と pEF-BOS-TICAM-1-HA (0.5 μ g) を、Lipofectamine 2000 10 μ l を用いてトランスフェクションした。この時、pEF-BOS の空ベクターで総 DNA 量を 4 μ g に揃えた。24 時間後の細胞を回収し、PBS で洗浄した後可溶化バッファー 150 μ l/sample を加え、4°C 20 分可溶化した。小型遠心機の最高速で 4°C 20 分遠心した上清に Protein G-Sepharose (Amersham Bioscience) を約 15 μ l 加えて 4°C、1 時間振とうした後、スピンドウンした上清に TLR3.7 (4 μ g/sample) を加えて 4°C、2 時間振とうした。新たに Protein G-Sepharose 約 15 μ l を加えて 4°C、1 時間振とうした後、洗浄バッファーで 3 回洗い、20 μ l の 2X サンプルバッファーを加えて 100°C、3 分処理し、ビーズを取り除いて免疫沈降物とした。2-2-3 の方法に準じて SDS-PAGE、及びウエスタンブロットを行った。一次抗体には抗 HA ポリクローナル抗体 (終濃度 1 μ g/ml) もしくは抗 TLR3 モノクローナル抗体 (Imgenex, 終濃度 2 μ g/ml) を用いた。

3-3 実験結果

3-3-1 リンカー領域においてシグナル伝達に関するアミノ酸配列の同定

TLR3 全長を鋳型としてリンカー領域に 2 残基ずつ変異を導入した置換変異体を 13 種作成し (Figure 3-1), poly (I:C)刺激によるシグナル伝達について検討した。最初に各変異体が正常な分子量の膜タンパク質として発現していることを, HEK293 細胞に一過性に発現させた細胞株の可溶化物を用いてウエスタンブロットによって確認した (Figure 3-2 (b), データ未提示)。各変異体を発現させた HEK293 細胞について, poly (I:C)刺激した際のシグナル伝達を IFN- プロモーターの活性化を指標として解析した結果, Mutant 2 (FY/AA 体)と Mutant 7 (LG/AA 体)の 2 種類の変異体が, 全くプロモーターを活性化しなかった。(Figure 3-2 (a))。この 2 種類の変異体の細胞内局在についてフローサイトメトリーで解析した結果, いずれも細胞内部に発現していた(Figure 3-2 (b))。

3-3-2TLR3 リンカー領域によるシグナル伝達制御の作用機序

TLR3 の細胞内領域におけるチロシンリン酸化が TLR3 を介したシグナル伝達に重要であるという報告が Sacker らによってなされている[58]。FY/AA 体における 733 番目のチロシンの重要性を検討するため, 1 残基置換変異体を 3 種類 (F732A 体, Y733F 体, Y733A 体) 作成した (Figure 3-1)。変異体タンパク質が正常な分子量で発現していることをウエスタンブロットで確認した (データ未提示) 後, poly (I:C) 刺激によるシグナル伝達について IFN- プロモーターの活性化を指標として解析した。その結果, Y733F 体と Y733A 体は IFN- プロモーターが活性化されたのに対して, F732A 体は全く活性化が起こらなかった (Figure 3-3 (a))。また, IFN- プロモーターを活性化しなかった FY/AA 体, LG/AA 体, F732A 体は, NF- B の活性化も起こさなかった (Figure 3-3 (b))。

リンカー領域における置換変異体がシグナル伝達の活性を失っている理由について探るため, また, TLR3 を介したシグナル伝達に必須のアダプター分子である TICAM-1 と, シグナル伝達を起こさない 3 種の変異体 TLR3 を HEK293 細胞にそれぞれ共発現させた。そして, 各変異体について免疫沈降の実験を行った結果, いずれの変異体も TICAM-1 との会合が見られた (Figure 3-4 (a))。さらに, これら 3 種の変異体を HEK293 細胞に過剰発現させると, poly (I:C)刺激による野生型 TLR3 を介した IFN- プロモーターの活性化を顕著に阻害した (Figure 3-4 (b))。

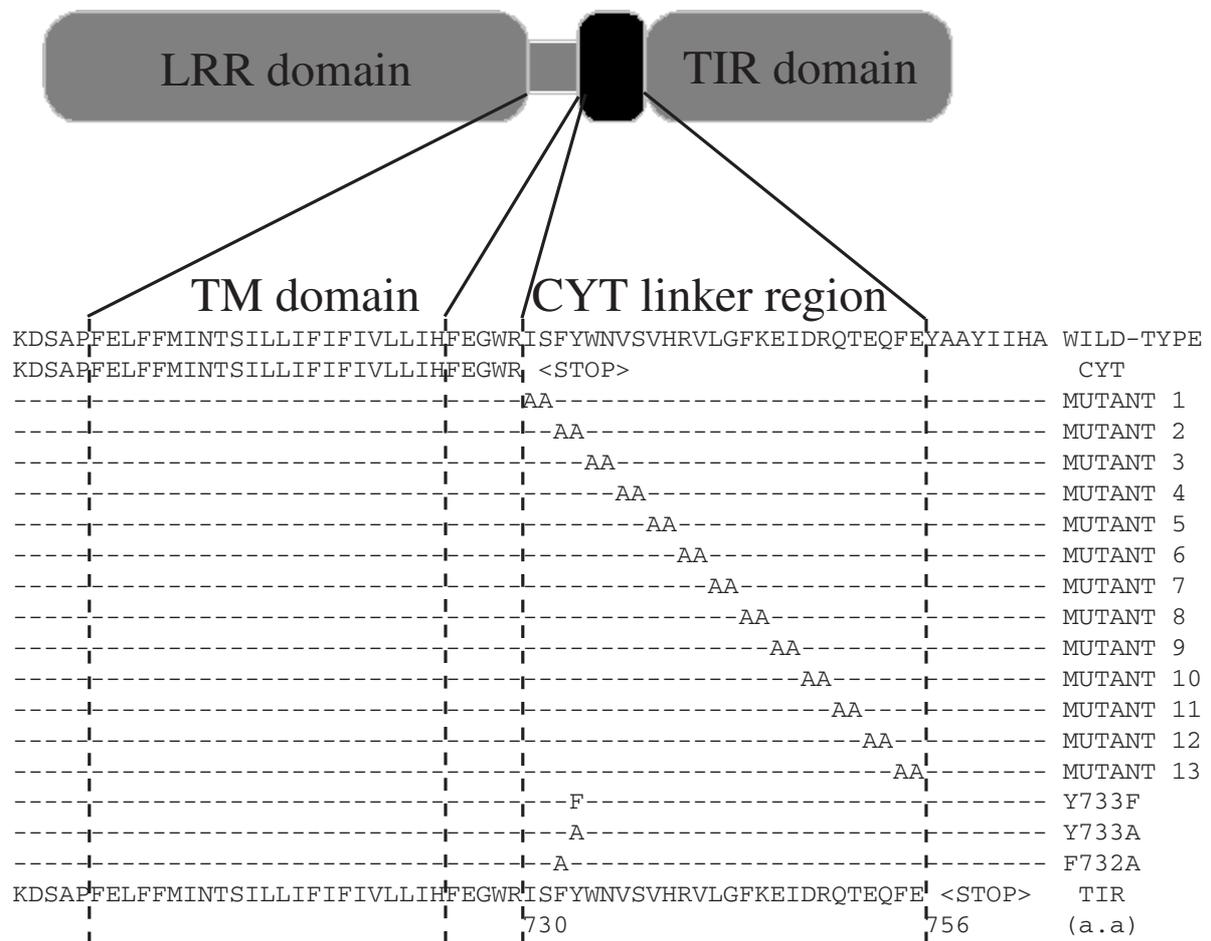
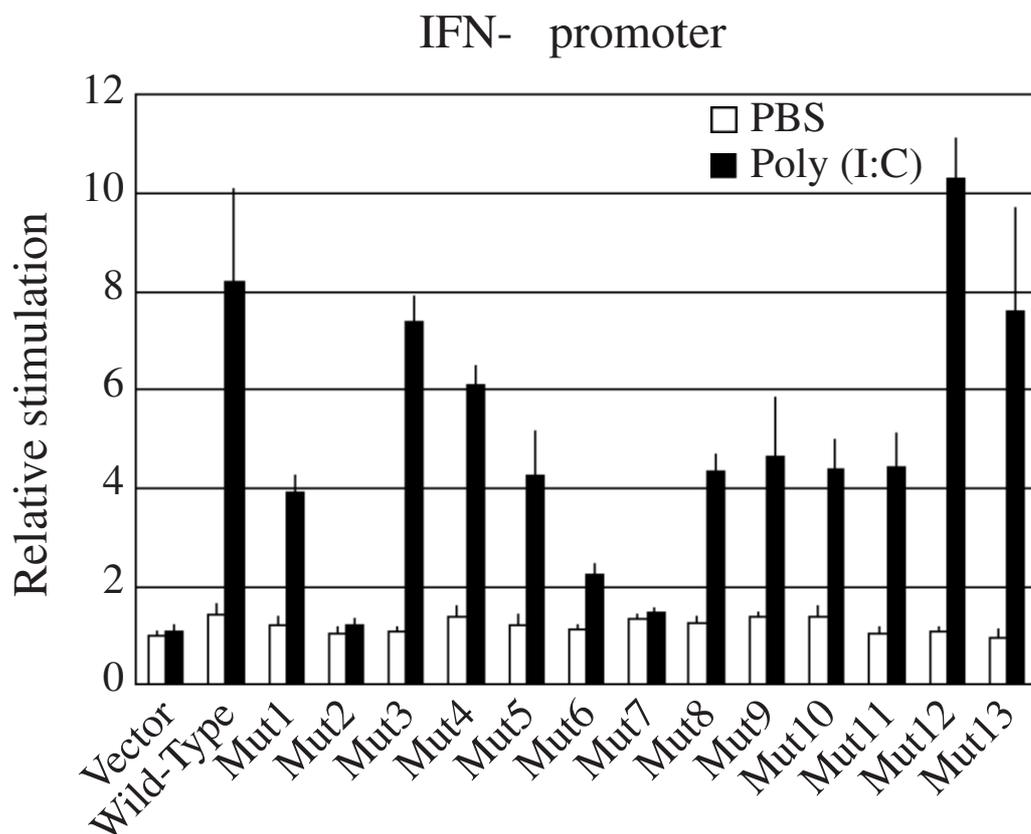


Figure 3-1 TLR3全長を鋳型としたアラニン置換変異体の構造

(a)



(b)

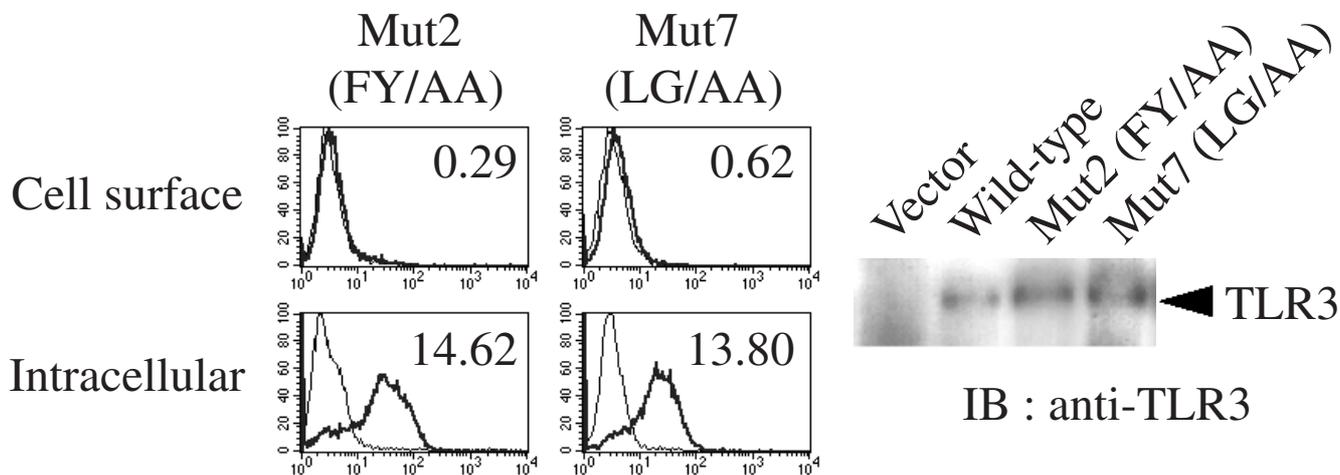
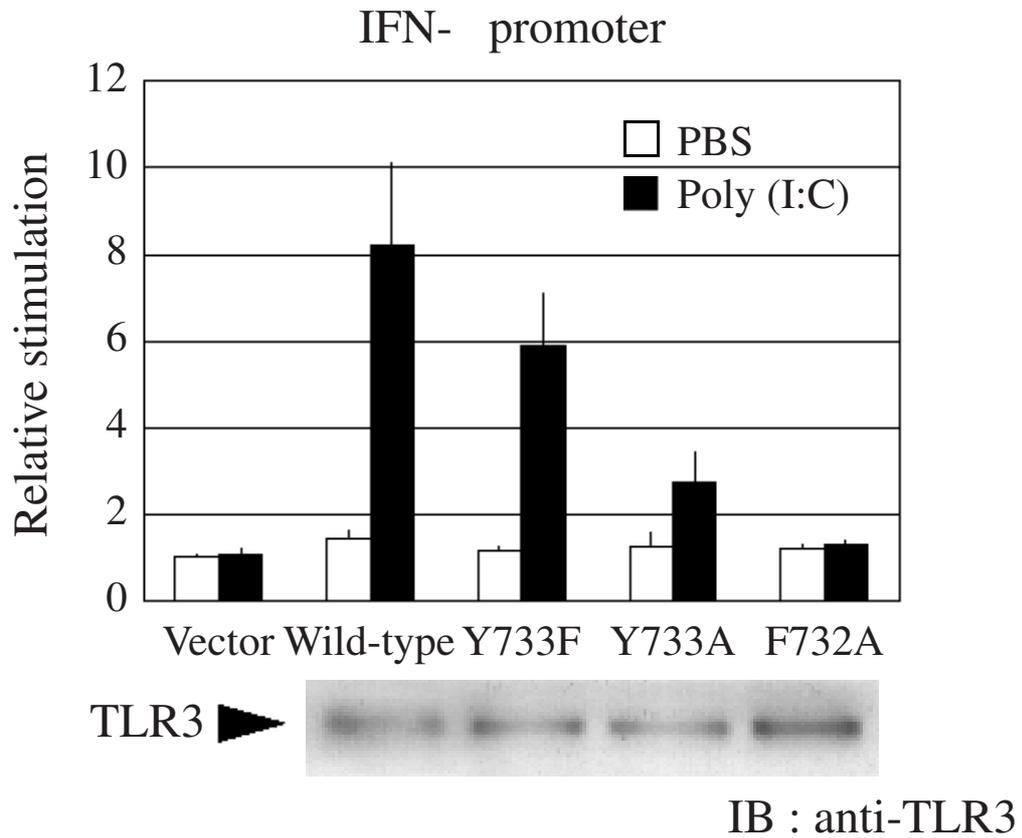


Figure 3-2 TLR3リンカー領域においてシグナル伝達を制御するアミノ酸配列の同定

(a) HEK293細胞に各変異体とレポーター遺伝子をトランスフェクションし，poly (I:C) 刺激 (終濃度2 $\mu\text{g/ml}$) 時のIFN- プロモーター活性を，TLR3未発現細胞の活性に対する比で示した．値は3回以上実験を行った平均値を使用し，標準偏差をエラーバーで示した．

(b) Mut2 (FY/AA)体，及びMut7 (LG/AA)体をHEK293細胞に恒常的に発現させ，細胞内局在をフローサイトメトリーで解析した (左図)．また，変異体発現細胞の可溶化物について抗TLR3抗体 (Imgenex, 終濃度2 $\mu\text{g/ml}$)を用いてウエスタンブロットを行った (右図)．

(a)



(b)

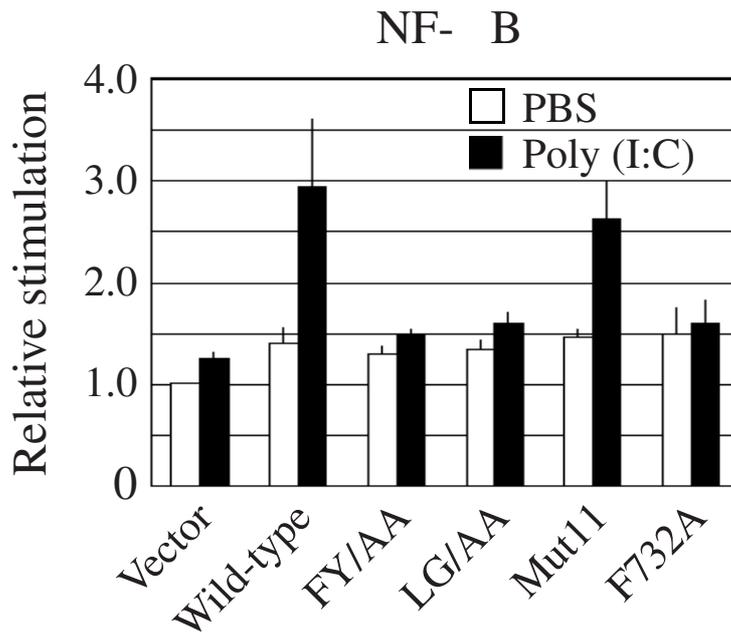
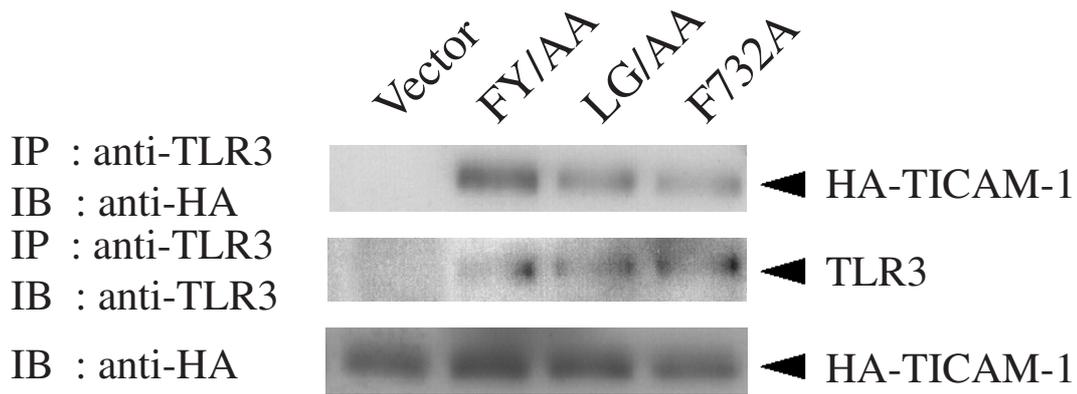


Figure 3-3 1残基置換体のシグナル伝達活性

(a) HEK293細胞に3種の1残基置換体 (Y733F体, Y733A体, F732A体)とレポーター遺伝子をトランスフェクションし, poly (I:C) 刺激 (終濃度2 $\mu\text{g/ml}$) 時のIFN- プロモーター活性を, TLR3未発現細胞の活性に対する比で示した(上図). 値は3回以上実験を行った平均値を使用し, 標準偏差をエラーバーで示した. また, 変異体発現細胞の可溶化物について抗TLR3抗体 (Imgenex, 終濃度2 $\mu\text{g/ml}$)を用いてウエスタンブロットを行った(下図).

(b) HEK293細胞に野生型TLR3, もしくはアラニン置換変異体とレポーター遺伝子をトランスフェクションし, poly (I:C) 刺激 (終濃度2 $\mu\text{g/ml}$) によるNF- Bの活性化をTLR3未発現細胞の活性に対する比で示した. 値は3回実験を行った平均値を使用し, 標準偏差をエラーバーで示した.

(a)



(b)

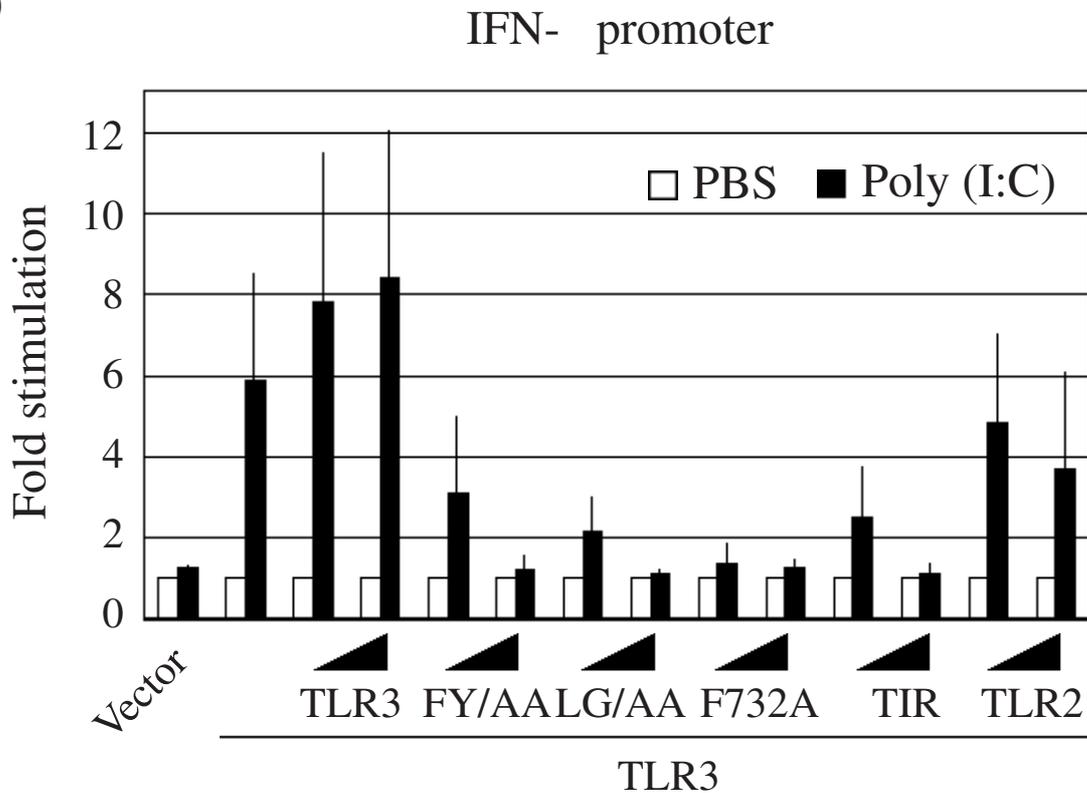


Figure 3-4 TLR3リンカー領域によるシグナル伝達制御の作用機序

(a) シグナルを伝達しない各アラニン置換変異体とHAタグを付けたTICAM-1をHEK293細胞に共発現させ、抗ヒトTLR3抗体 (TLR3.7, 4 μ g) で免疫沈降した。沈降物, または可溶化物中の変異体TLR3を抗ヒトTLR3抗体 (Imgenex, 終濃度2 μ g/ml) で, TICAM-1を抗HA抗体 (終濃度1 μ g/ml) でそれぞれ検出した。

(b) レポーター遺伝子と野生型TLR3に加えて, 0.5/3.0 μ gの各レセプターcDNAをトランスフェクションし, poly (I:C) 刺激 (終濃度2 μ g/ml) 時のIFN- プロモーター活性を未刺激時に対する相対値で示した。値は3回実験を行った平均値を使用し, 標準偏差をエラーバーで示した。

3-4 考察

TLRを介したシグナル伝達に重要な作用部位の解析は、これまで1)LRRドメインを介したリガンド認識に重要な部位 [59] , 2)TIRドメインを介したアダプター分子との相互作用に重要な部位 [60-62]について多くの報告がある。本研究で同定されたリンカー領域における変異体TLR3は、以下に述べる考察からこれまでに報告のない新しい作用機序でシグナルを伝えられなくなったと考えられる。

変異体TLR3は、TLR3を介したシグナル伝達に必須のアダプター分子であるTICAM-1と結合しうることが、細胞可溶化物を用いた免疫沈降の実験によって検出された (Figure 3-4(a))。この結果からは、変異体TLR3のTIRドメインはアダプター分子と結合できる正常な立体構造を保持していることが分かる。また、野生型TLR3を介したシグナル伝達は、変異体TLR3を過剰発現させることによって競合的に阻害された (Figure 3-4(b))。この結果からは、変異体TLR3のLRRドメインは2本鎖RNAをリガンドとして認識できることを分かる。

また、FY/AA体がチロシンを含むことから、リンカー領域のチロシンリン酸化がシグナル伝達の制御に関与している可能性を解析するため、1残基置換変異体を作成した。しかし、実際には732番目のフェニルアラニンがチロシンよりも大きな寄与を示していることが判明した。一方、LG/AA体についても1残基変異体 (L742A体、G743A体) を作成して同様にシグナル伝達の解析をおこなったが、どちらの変異体も弱いながらシグナルを伝達した (データ未提示)。LG/AA体の場合は、742番目のロイシンと743番目のグリシンの変異が協同的に働いてシグナル伝達が抑制されるらしい。フェニルアラニン、ロイシン、グリシンといった今回同定したアミノ酸残基はいずれも疎水性であり、置換によってリンカー領域における荷電状態が大きく変わることは想像しにくい。これらのアミノ酸置換による影響は、分子のかさ高さの変化による立体構造の変化という形で現れることが多いと考えられる。

これらのことから、TLR3のリンカー領域における変異体は、膜貫通型レセプターであるTLR3の立体構造が変化することによって、リガンドを認識した後レセプターが凝集してアダプター分子をリクルートする過程に何らかの異常がおり、細胞内にシグナルを伝達できなくなっていると考えられる (Figure VI)。

TLR3がリガンド認識に伴って多量体を形成してシグナル伝達を引き起こすというモデルは、CD4やインテグリンの細胞外領域とTIRドメインのキメラ体では恒常的にシグナルが入るといふ実験が根拠となっている [21, 63]。序論でも触れたように、TLRリガンドとLRRドメインの相互作用を生化学的に証明するのは困難であり、生細胞中における共局在という形での証明が最近なされている。しかし、この場合でも、リガンド認識によるTLRの凝集を直接証明するような実験は行われていない。また、第1章における解析から、内在性のTLR3は局在する細胞内小器官の性質が未知であり、リガンド認識による凝集がどのような小胞内環境で起こるかが不明である。TLR3の凝集を検討する実験系の構築には、まずTLR3の局在する細胞内小器官の

性質を明らかにする必要がある。

TLRの凝集にともなう起きるアダプター分子のリクルートについては、TLR3以外のTLRでは主要な役割を果たしているMyD88について、リガンド刺激によって細胞膜や細胞内部に存在するTLRにリクルートされることが生細胞で実験的に証明されている[37, 38]。TLR3の場合も、リガンド刺激を受けると凝集に伴ってTICAM-1がTLR3のTIRドメインにリクルートされると考えられているが、TICAM-1を生細胞で可視化する実験は未だ行われていない。本研究で行った可溶化物を用いた相互作用の実験以外に、細胞内でのTICAM-1の挙動を解析することで、TICAM-1のリクルートを司る分子機構について新たな知見が得られることが期待される。

今後の課題としては、リンカー領域がシグナル伝達を制御する分子機構を明らかにするために、リガンド刺激時に起きるTLR3の凝集、もしくはTICAM-1のリクルートを検出する実験系の確立が重要である。

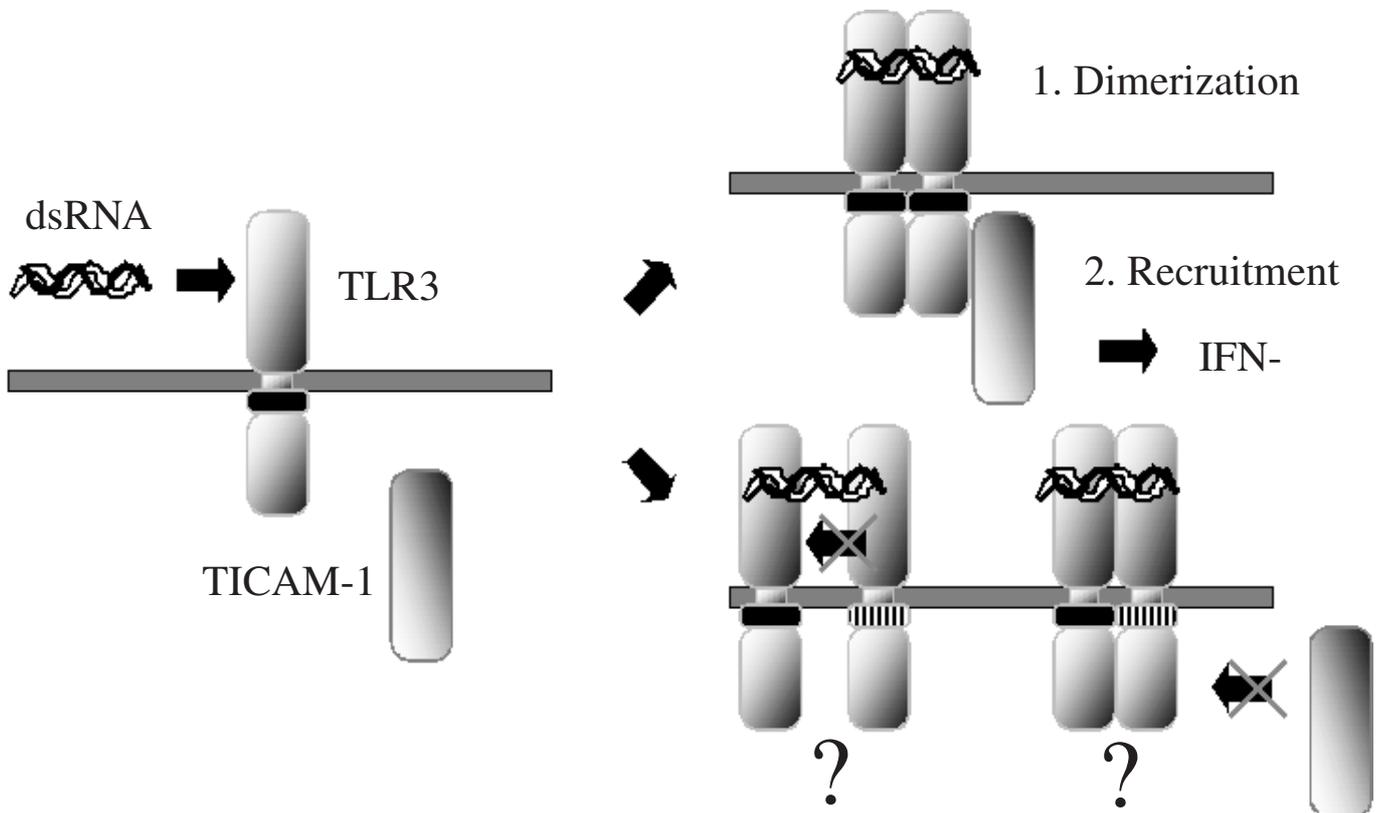


Figure VI リンカー領域における変異体がTLR3のリガンド認識を阻害する分子機構

終章

本研究において、以下の事実を明らかにした。

1. 樹状細胞において、TLR3は既知のオルガネラマーカ―と共局在しない特異的な細胞内小器官に存在していた。
2. HEK293細胞に強制発現させたTLR3を介したシグナル伝達活性は、エンドソームの成熟化阻害剤によって抑制された。
3. TLR3が細胞内へ局在するためには、膜貫通領域とTIRドメインの間の領域（リンカー領域）が重要であった。また、細胞種によって異なる部位のアミノ酸残基が細胞内局在の制御に重要であった。
4. リンカー領域における732番目のフェニルアラニン、ならびに742番目のリジンと743番目のグリシンはTLR3によるシグナル伝達活性に重要であった。

今後は、リンカー領域に特異的に結合する分子の探索を通じて、TLR3の機能制御にリンカー領域が果たす役割についてより詳細に解析することで、TLR3とウイルス感染防御の関係について新しい知見が得られることが期待される。

参考文献

- 1 Hashimoto, C., Hudson, K. L. and Anderson, K. V. (1988) The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* **52**, 269-79.
- 2 Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, C. A., Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-7.
- 3 Medzhitov, R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 135-45.
- 4 Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S. (2003) Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 335-76.
- 5 Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. and Beutler, B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* **282**, 2085-8.
- 6 Chow, J. C., Young, D. W., Golenbock, D. T., Christ, W. J. and Gusovsky, F. (1999) Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* **274**, 10689-92.
- 7 Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M. and Kirschning, C. J. (1999) Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* **274**, 17406-9.
- 8 Lien, E., Sellati, T. J., Yoshimura, A., Flo, T. H., Rawadi, G., Finberg, R. W., Carroll, J. D., Espevik, T., Ingalls, R. R., Radolf, J. D. and Golenbock, D. T. (1999) Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J. Biol. Chem.* **274**, 33419-25.
- 9 Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M. and Aderem, A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099-103.
- 10 Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. and Akira, S. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-5.
- 11 Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. and Flavell, R. A. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*

- 413**, 732-8.
- 12 Matsumoto, M., Kikkawa, S., Kohase, M., Miyake, K. and Seya, T. (2002) Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 1364-9.
 - 13 Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K. and Akira, S. (2002) Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* **3**, 196-200.
 - 14 Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. and Bauer, S. (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526-9. Epub 2004 Feb 19.
 - 15 Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. and Reis e Sousa, C. (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529-31. Epub 2004 Feb 19.
 - 16 Vabulas, R. M., Wagner, H. and Schild, H. (2002) Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **270**, 169-84.
 - 17 Leadbetter, E. A., Rifkin, I. R., Hohlbaum, A. M., Beaudette, B. C., Shlomchik, M. J. and Marshak-Rothstein, A. (2002) Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* **416**, 603-7.
 - 18 Oshiumi, H., Tsujita, T., Shida, K., Matsumoto, M., Ikeo, K. and Seya, T. (2003) Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the pufferfish, *Fugu rubripes*, genome. *Immunogenetics* **54**, 791-800.
 - 19 Dunne, A. and O'Neill, L. A. (2003) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci. STKE.* **2003**, re3.
 - 20 Underhill, D. M. and Ozinsky, A. (2002) Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 103-10.
 - 21 Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S. and Janeway, C. A., Jr. (1998) MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* **2**, 253-8.
 - 22 Fitzgerald, K. A., Palsson-McDermott, E. M., Bowie, A. G., Jefferies, C. A., Mansell, A. S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M. T., McMurray, D., Smith, D. E., Sims, J. E., Bird, T. A. and O'Neill, L. A. (2001) Mal (MyD88-adaptor-like) is

- required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* **413**, 78-83.
- 23 Horng, T., Barton, G. M. and Medzhitov, R. (2001) TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol.* **2**, 835-41.
- 24 Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T. and Seya, T. (2003) TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat. Immunol.* **4**, 161-7.
- 25 Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K. and Akira, S. (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**, 6668-72.
- 26 Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C., Barnes, B. J., Caffrey, D. R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P. M. and Golenbock, D. T. (2003) LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J. Exp. Med.* **198**, 1043-55.
- 27 Oshiumi, H., Sasai, M., Shida, K., Fujita, T., Matsumoto, M. and Seya, T. (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**, 49751-62.
- 28 Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L. P., Allavena, P. and Mantovani, A. (2000) Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* **164**, 5998-6004.
- 29 Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S. and Hartmann, G. (2002) Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* **168**, 4531-7.
- 30 Schmidt, K. N., Leung, B., Kwong, M., Zarembek, K. A., Satyal, S., Navas, T. A., Wang, F. and Godowski, P. J. (2004) APC-independent activation of NK cells by the Toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA. *J. Immunol.* **172**, 138-43.
- 31 Cario, E. and Podolsky, D. K. (2000) Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect. Immun.* **68**, 7010-7.
- 32 Doyle, S., Vaidya, S., O'Connell, R., Dadgostar, H., Dempsey, P., Wu, T., Rao, G., Sun, R., Haberland, M., Modlin, R. and Cheng, G. (2002) IRF3 mediates a TLR3/TLR4-

- specific antiviral gene program. *Immunity* **17**, 251-63.
- 33 Heinz, S., Haehnel, V., Karaghiosoff, M., Schwarzfischer, L., Muller, M., Krause, S. W. and Rehli, M. (2003) Species-specific regulation of Toll-like receptor 3 genes in men and mice. *J. Biol. Chem.* **278**, 21502-9.
- 34 Sakaguchi, S., Negishi, H., Asagiri, M., Nakajima, C., Mizutani, T., Takaoka, A., Honda, K. and Taniguchi, T. (2003) Essential role of IRF-3 in lipopolysaccharide-induced interferon-beta gene expression and endotoxin shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 860-6.
- 35 Tanabe, M., Kurita-Taniguchi, M., Takeuchi, K., Takeda, M., Ayata, M., Ogura, H., Matsumoto, M. and Seya, T. (2003) Mechanism of up-regulation of human Toll-like receptor 3 secondary to infection of measles virus-attenuated strains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 39-48.
- 36 Tabet, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., Alexopoulou, L., Flavell, R. A. and Beutler, B. (2004) Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3516-21. Epub 2004 Mar 1.
- 37 Ahmad-Nejad, P., Hacker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R. M. and Wagner, H. (2002) Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur. J. Immunol.* **32**, 1958-68.
- 38 Latz, E., Visintin, A., Lien, E., Fitzgerald, K. A., Monks, B. G., Kurt-Jones, E. A., Golenbock, D. T. and Espevik, T. (2002) Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *J. Biol. Chem.* **277**, 47834-43.
- 39 Hornef, M. W., Normark, B. H., Vandewalle, A. and Normark, S. (2003) Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. *J. Exp. Med.* **198**, 1225-35.
- 40 Sandor, F., Latz, E., Re, F., Mandell, L., Repik, G., Golenbock, D. T., Espevik, T., Kurt-Jones, E. A. and Finberg, R. W. (2003) Importance of extra- and intracellular domains of TLR1 and TLR2 in NFkappa B signaling. *J. Cell. Biol.* **162**, 1099-110.
- 41 Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K. A., Monks, B. G., Knetter, C. F., Lien, E., Nilsen, N. J., Espevik, T. and Golenbock, D. T. (2004) TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.* **11**, 11

- 42 Matsumoto, M., Funami, K., Tanabe, M., Oshiumi, H., Shingai, M., Seto, Y., Yamamoto, A. and Seya, T. (2003) Subcellular localization of toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol.* **171**, 3154-62.
- 43 Uehori, J., Matsumoto, M., Tsuji, S., Akazawa, T., Takeuchi, O., Akira, S., Kawata, T., Azuma, I., Toyoshima, K. and Seya, T. (2003) Simultaneous blocking of human Toll-like receptors 2 and 4 suppresses myeloid dendritic cell activation induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin peptidoglycan. *Infect. Immun.* **71**, 4238-49.
- 44 Seya, T., Turner, J. R. and Atkinson, J. P. (1986) Purification and characterization of a membrane protein (gp45-70) that is a cofactor for cleavage of C3b and C4b. *J. Exp. Med.* **163**, 837-55.
- 45 Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res.* **18**, 5322.
- 46 Underhill, D. M., Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Bassetti, M. and Aderem, A. (1999) The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* **401**, 811-5.
- 47 Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L. and Aderem, A. (2000) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13766-71.
- 48 Nakamura, N., Yamamoto, A., Wada, Y. and Futai, M. (2000) Syntaxin 7 mediates endocytic trafficking to late endosomes. *J. Biol. Chem.* **275**, 6523-9.
- 49 Anderson, R. G., Falck, J. R., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (1984) Visualization of acidic organelles in intact cells by electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 4838-42.
- 50 Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M. and Tashiro, Y. (1991) Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 17707-12.
- 51 Hacker, H., Mischak, H., Miethke, T., Liptay, S., Schmid, R., Sparwasser, T., Heeg, K., Lipford, G. B. and Wagner, H. (1998) CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.* **17**, 6230-40.
- 52 Yi, A. K., Tuetken, R., Redford, T., Waldschmidt, M., Kirsch, J. and Krieg, A. M.

- (1998) CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Immunol.* **160**, 4755-61.
- 53 Katzmann, D. J., Odorizzi, G. and Emr, S. D. (2002) Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**, 893-905.
- 54 Kleijmeer, M., Ramm, G., Schuurhuis, D., Griffith, J., Rescigno, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Rudensky, A. Y., Ossendorp, F., Melief, C. J., Stoorvogel, W. and Geuze, H. J. (2001) Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. *J. Cell. Biol.* **155**, 53-63.
- 55 Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- 56 Bonifacino, J. S. and Traub, L. M. (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 395-447.
- 57 Lee, J., Chuang, T. H., Redecke, V., She, L., Pitha, P. M., Carson, D. A., Raz, E. and Cottam, H. B. (2003) Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: Activation of Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **8**, 8
- 58 Sarkar, S. N., Smith, H. L., Rowe, T. M. and Sen, G. C. (2003) Double-stranded RNA signaling by Toll-like receptor 3 requires specific tyrosine residues in its cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* **278**, 4393-6.
- 59 Bell, J. K., Mullen, G. E., Leifer, C. A., Mazzoni, A., Davies, D. R. and Segal, D. M. (2003) Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol.* **24**, 528-33.
- 60 Xu, Y., Tao, X., Shen, B., Horng, T., Medzhitov, R., Manley, J. L. and Tong, L. (2000) Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* **408**, 111-5.
- 61 Ronni, T., Agarwal, V., Haykinson, M., Haberland, M. E., Cheng, G. and Smale, S. T. (2003) Common interaction surfaces of the toll-like receptor 4 cytoplasmic domain stimulate multiple nuclear targets. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2543-55.
- 62 Dunne, A., Ejdeback, M., Ludidi, P. L., O'Neill, L. A. and Gay, N. J. (2003) Structural complementarity of Toll/interleukin-1 receptor domains in Toll-like receptors and the adaptors Mal and MyD88. *J. Biol. Chem.* **278**, 41443-51.
- 63 Zhang, H., Tay, P. N., Cao, W., Li, W. and Lu, J. (2002) Integrin-nucleated Toll-like receptor (TLR) dimerization reveals subcellular targeting of TLRs and distinct mechanisms of TLR4 activation and signaling. *FEBS Lett.* **532**, 171-6.

謝辞

本研究を遂行するにあたり有益な御指導・御助言を頂きました，北海道大学大学院医学研究科病態制御医学講座感染症制御学分野，瀬谷司教授，ならびに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，竹家達夫教授に深く感謝致します．

終始的確な御指導・御助言を頂きました，大阪府立成人病センター研究所免疫学部門長，奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科客員教授，松本美佐子博士に深く感謝致します．

免疫染色の実験に関して有益な御助言を頂きました，長浜バイオ大学，山本章嗣教授に深く感謝致します．

本論文を審査してください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動物遺伝子機能学講座，川市正史教授，石田靖雅助教授，ならびに同研究科細胞内情報学講座，伊東広教授に深く感謝致します．

研究生活のあらゆる面で筆者にお力添えを頂いた，大阪府立成人病センター研究所免疫学部門の皆様は厚く御礼申し上げます．

最後に，長い間筆者を見守ってくれた家族に感謝します．

2004年6月