

論文内容の要旨

申請者 舟見健児

ヒトを始めとする脊椎動物は、外来異物を高い特異性で認識して生体防御反応を惹起する獲得免疫 (acquired immunity) を有するが、この特異性は個体限りで子孫には伝わらない。これに対して、進化的に古い生物から存在する基本免疫 (innate immunity) は、獲得免疫と比較して特異性の緩い異物認識を行うが、異物認識の特異性に関する情報が生殖細胞を介して子孫へ伝えられる。基本免疫と獲得免疫は互いに協調することで複雑な生体防御機構を構成している。

Toll-like receptor (TLR) は、基本免疫を司るシグナル伝達レセプターとして近年脚光を浴びている I 型膜貫通タンパク質で、Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) と呼ばれる外来異物特有の分子パターンを認識して、様々な生体防御反応を惹起する。細胞外領域の Leucine rich repeat (LRR) ドメインが PAMPs 認識を行い、細胞内領域の Toll-IL-1R homology (TIR) ドメインが細胞内にシグナルを伝える。ヒトでは 10 種類の存在が知られている TLR の中でも、TLR3 はウイルス感染の際に中間体として産生される 2 本鎖 RNA をリガンドとして認識し、最近当研究室で同定されたアダプター分子である TICAM-1 (TIR containing adaptor molecule) を介して I 型インターフェロンの誘導を引き起こす。インターフェロンは抗ウイルス作用を持つことから、TLR3 は何らかの形で抗ウイルス応答に関与すると考えられているが、TLR3 を介したリガンド認識の分子機構には不明な点が多い。本研究では、TLR3 の細胞内局在・シグナル伝達の分子機構に着目し、TLR3 の細胞内領域に注目して解析を行った。

TLR3 の細胞内局在については、線維芽細胞では細胞表面に存在するが樹状細胞では細胞内部に存在するという結果が当研究室における解析で明らかにされている。そこで、ヒト胎児腎由来の HEK293 細胞を用いて強制発現させた TLR3 の細胞内局在を解析したところ、樹状細胞と同じように細胞内部に局在していた。オルガネラマーカを用いた共局在の実験を行ったところ、HEK293 細胞において強制発現させた TLR3 は TGN や後期エンドソームのマーカと一部共局在が見られた。ところが、樹状細胞における内在性の TLR3 についてオルガネラマーカを用いて細胞内局在を検討したところ、既知のオルガネラマーカとは一致しなかった。このことから、内在性の TLR3 は特異的な細胞内小器官に存在している事が示唆された。また、TLR3 を介したシグナル伝達はエンドソームの成熟化阻害剤に感受性であったことから、TLR3 のリガンド認識はエンドソーム成熟化阻害によって影響を受ける輸送経路を介する可能性が考えられる。

次に、TLR3 の細胞内局在を規定する分子機構について解析するため、TLR3 の細胞内領域欠失変異体を作成した。TLR の細胞内領域は、その大半をシグナル伝達に重要である TIR ドメイ

ンが占めているが、TIR ドメイン全長の欠失変異体 (Δ TIR 体) は TLR3 全長と同様に細胞内部に局在していた。これに対し、細胞内領域を全て欠失した変異体 (Δ CYT 体) は細胞表面に強い局在が見られた。このことから、TLR3 の細胞内領域の中でも TIR ドメインと細胞膜貫通領域をつなぐ「リンカー」領域が TLR3 の細胞内局在を規定するのに重要であると考えられた。そこで、 Δ TIR 体のリンカー領域についてアミノ酸 2 残基ずつをアラニンに置換した変異体を作成した。各変異体の細胞内局在を 2 種の細胞株について調べたところ、細胞種によって異なる部位のアミノ酸変異が細胞表面への局在の変化を引き起こした。TLR3 はリンカー領域を介して細胞種特異的な細胞内局在制御を受けると考えられる。

TLR の機能にリンカー領域が及ぼす影響についてこれまで全く報告がなかったため、TLR3 を介したシグナル伝達活性にリンカー領域が及ぼす影響を解析した。TIR ドメインを含む野生型 TLR3 のリンカー領域についてアラニン置換変異体を作成し、レポータージーンアッセイによってシグナル伝達活性を解析した結果、2 種の置換変異体 (FY/AA 体, LG/AA 体) がシグナル伝達活性を完全に失っていた。一方、これらの置換変異体の細胞内局在は野生型と同様であった。また、FY/AA 体における 733 番目のチロシンリン酸化がシグナル伝達活性に及ぼす影響について解析するため、1 残基置換変異体を作成してシグナル伝達活性について調べた結果、チロシンの 1 残基 N 末端側に位置する 732 番目のフェニルアラニンが TLR3 のシグナル伝達活性に重要であることが分かった。TLR3 は TIR ドメインを介してアダプター分子である TICAM-1 と会合し、下流にシグナルを伝えるが、TIR ドメインの変異によって TICAM-1 と相互作用できなくなった変異体 TLR3 はシグナル伝達活性を持たないことが分かっている。しかし、リンカー領域の変異によって活性を失った変異体 TLR3 は TICAM-1 に対する結合活性を保持しており、TIR ドメインの立体構造は正常に保たれていると考えられた。さらに、リンカー領域の置換変異体は、過剰発現によって野生型 TLR3 によるシグナル伝達を抑制したことから、リンカー領域における置換変異体は LRR ドメインによるリガンド認識を正常に行っていると考えられた。リンカー領域におけるアミノ酸変異は、リガンド認識に伴うレセプターの凝集、TICAM-1 のリクルートの過程に何らかの異常を生じることによってシグナル伝達活性を失うと考えられた。

以上本研究では TLR3 の細胞内局在・シグナル伝達についての解析から、TLR の新たな機能ドメインの存在を明らかにした。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 舟見健児

Toll-like receptor 3 (TLR3) は、ウイルス感染の際に中間体として産生される 2 本鎖 RNA をリガンドとして認識し、I 型インターフェロンの誘導を引き起こす。インターフェロンは抗ウイルス作用を持つことから、TLR3 は何らかの形で抗ウイルス応答に関与すると考えられているが、TLR3 を介したリガンド認識の分子機構には不明な点が多い。申請者は、TLR3 の細胞内領域に注目し、TLR3 の細胞内局在・シグナル伝達の分子機構を明らかにすることにより、TLR3 が基本免疫反応において果たす役割を理解するための研究を行った。

まず、TLR3 が線維芽細胞では細胞表面に存在するが、樹状細胞では細胞内部に存在するという所属研究室における知見に基づき、ヒト胎児腎由来の HEK293 細胞を用いて強制発現させた TLR3 の細胞内局在と樹状細胞における内在性の TLR3 について細胞内局在を比較検討したところ、HEK293 細胞において強制発現させた TLR3 は TGN や後期エンドソームのマーカールと一部共局在が見られたのに対し、内在性の TLR3 は特異的な細胞内小器官に存在している事を示すことが出来た。また、TLR3 を介したシグナル伝達はエンドソームの成熟化阻害剤に感受性であったことから、TLR3 の機能発現にはエンドソーム成熟化阻害によって影響を受ける輸送経路を介する可能性を示す結果を得ている。

そこで、TLR3 の細胞内局在を規定する分子機構を理解するために、リンカー領域に関する種々の欠失変異分子を作成し、局在との関連を解析した。その結果、細胞種によって異なる部位のアミノ酸変異が細胞表面への局在の変化を引き起こすことが明らかとなった。従って、TLR3 はリンカー領域を介して細胞種特異的な細胞内局在制御を受けると考えられる。

次に、リンカー領域が TLR3 を介したシグナル伝達活性に及ぼす影響を解析することにより、リンカー領域が TLR の機能において果たす役割について新しい知見を得ることに成功した。すなわち、TIR ドメインを含む野生型 TLR3 のリンカー領域についてアラニン置換変異体を作成し、レポータージーンアッセイによってシグナル伝達活性を解析した結果、リンカー領域におけるアミノ酸変異は、リガンド認識に伴うレセプターの凝集あるいはアダプター分子 TICAM-1 のリクルートの過程に何らかの異常を生じることによってシグナル伝達活性を失うことを明らかにした。

以上のように、本研究では TLR3 の細胞内局在・シグナル伝達についての解析から、TLR の新たな機能ドメインの存在を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。