

博士論文

Toll-Like Receptors を介した自然免疫応答における
V 型 ATPase サブユニットの役割

村瀬 本弥

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 分子免疫制御研究室

(河合 太郎 教授)

提出 平成 30 年 1 月 22 日

目次

博士論文要旨	4
第 1 章 序論	6
1.1 自然免疫を介した病原体感染に対する生体防御	6
1.2 Toll-like receptor (TLR) ファミリーの機能	6
1.2.1 TLR ファミリーの構造とリガンドの認識	6
1.2.2 TLR ファミリーを介したシグナル伝達経路	7
1.2.3 TLR ファミリーの細胞内小胞輸送	9
1.3 RLR ファミリーおよび細胞内 DNA センサーの機能	11
1.4 エンドソーム内 pH 環境と疾患および自然免疫との関与	13
1.5 TLR4 依存的なシグナル調節制御機構と自己免疫疾患	17
第 2 章 材料と方法	20
2.1 使用した実験材料	20
2.2 CRISPR/Cas9 システムによる V 型 ATPase および ARF6 欠損細胞株の樹立 ...	23
2.3 発現プラスミドの構築	27
2.4 V 型 ATPase 阻害剤 Bafilomycin A1 の投与	28
2.5 PRRs リガンド刺激によるサイトカイン量の測定	28
2.6 ルシフェラーゼレポーターアッセイ	30
2.7 PRRs リガンド刺激によるシグナル伝達経路の活性化	31
2.8 siRNA を用いたノックダウン解析	32
2.9 レトロウイルスプラスミドを用いた V0D2 KO 細胞のレスキュー実験	33
2.10 FACS 解析による細胞膜上 TLR4 の発現量の測定	33
2.11 蛍光標識された合成リガンドの細胞内取り込み量の解析	34
2.12 V 型 ATPase サブユニットと ARF6 の共免疫沈降	34
2.13 エンドトキシン・トレランスの誘導	35
2.14 統計処理	35
第 3 章 結果	36
3.1 各 V 型 ATPase 欠損細胞株は欠損標的遺伝子の ATP6V ₀ D2 又は ATP6V ₁ B2 の 発現量が低下する	36
3.2 V 型 ATPase 欠損細胞は核酸認識型 TLR (TLR3、TLR7、TLR9) を介した自 然免疫応答が減弱する	36
3.3 エンドソーム内 pH 環境は細胞内 PRRs (RLR ファミリーおよび細胞内 DNA	

センサー) を介した自然免疫応答に影響を及ぼさない.....	39
3.4 V 型 ATPase 欠損細胞は TLR4 依存的な炎症性サイトカインの産生は亢進するが、抗ウイルス応答は減弱する.....	41
3.5 V 型 ATPase 欠損細胞は TLR4 のエンドサイトーシスに異常が生じ、LPS の細胞内取り込み量が減少する	44
3.6 ARF6 はエンドソーム内酸性 pH 環境に関与して TLR4 の内在化および TLR4 依存的な自然免疫応答を制御する	46
3.6.1 ARF6 により NF- κ B プロモーターの活性化が制御される	46
3.6.2 ARF6 は V 型 ATPase と相互作用し、TLR4 リガンドである LPS の細胞内取り込み能を制御する	48
3.7 ARF6 欠損細胞は TLR4 の内在化が抑制され、TLR4 を介した自然免疫応答が抑制される	50
3.8 V 型 ATPase 欠損細胞はエンドトキシン・トレランスに異常が生じる	53
第 4 章 考察.....	56
4.1 V 型 ATPase 欠損細胞株の樹立とエンドソーム内 pH 環境	56
4.2 V 型 ATPase 欠損細胞株による核酸認識型 TLR 依存的な自然免疫応答.....	57
4.3 V 型 ATPase 欠損細胞株による TLR4 依存的な自然免疫応答	58
4.4 ARF6 欠損細胞株による TLR4 依存的な自然免疫応答	60
4.5 V 型 ATPase 欠損細胞株によるエンドトキシン・トレランス.....	61
4.6 今後の展望.....	62
第 5 章 謝辞.....	65
第 6 章 参考文献	66
参考図.....	77

博士論文要旨

所属 (主指導教員)	分子免疫制御研究室 (河合 太郎 教授)		
氏名	村瀬 本弥	提出	平成 30 年 1 月 22 日
題名	Toll-Like Receptors を介した自然免疫応答における V 型 ATPase サブユニットの役割		

【背景と目的】

マクロファージや樹状細胞といった自然免疫細胞は、Toll-like receptor (TLR) ファミリーなどのパターン認識受容体 (Pattern-recognition receptors: PRRs) を介して病原体成分を認識し、抗ウイルス作用をもつ I 型インターフェロン (IFN) やインターロイキン-6 (IL-6) などの炎症性サイトカインの産生を誘導する。興味深いことに、近年エンドソーム内腔の pH 酸性環境を Bafilomycin A1 や Chloroquine などの阻害剤により中性化すると、病原体由来の核酸を認識するエンドソーム局在型の TLR3、TLR7 および TLR9 の自然免疫応答が減弱することが明らかとなった。しかしながら、これらの薬剤は細胞増殖抑制を有することや現在解明されている知見では説明不可能な作用機序のもと自然免疫応答に関与することが示唆されている。また、自然免疫細胞のエンドソーム内 pH 環境の中性化によるエンドソーム局在型 TLR 以外の PRRs の動態を示した報告はない。そこで本研究および当研究室の先行研究では、エンドソーム内 pH 制御の根幹を担う V 型 ATPase プロトンポンプの ATP6V₀D2 又は ATP6V₁B2 サブユニットの欠損 RAW264.7 細胞 (マウス系マクロファージ癌細胞株、以下 V0D2 KO および V1B2 KO) を CRISPR/Cas9 システムにより樹立し、これら欠損細胞株の自然免疫応答を詳細に解析することで、本来エンドソーム内 pH 環境が自然免疫応答に及ぼす影響を紐解くことを目的とした。

【結果と考察】

樹立した V0D2 KO 細胞および V1B2 KO 細胞の各欠損遺伝子の発現量の低下を RT-qPCR により確認し、エンドソーム内 pH 指示薬であるアクリジンオレンジ染色実験により、これら欠損細胞株は野生型細胞と比較してエンドソーム内 pH が中性側に移行していることを確認した。次に V0D2 KO および V1B2 KO 細胞に病原体成分を模倣した合成リガンド (リポ多糖 (LPS)、MALP-2、Poly(I:C)、R837、ODN1668、Immuno stimulatory DNA など) で刺激を行い、抗ウイルス作用を有する I 型 IFN や炎症性サイトカインの発現量を RT-qPCR および ELISA 法にて測定した。その結果、従来考えられていた通り、エンドソーム内に局在する TLR3、TLR7、TLR9 の合成リガンド (それぞれ Poly(I:C)、R837、ODN1668) の刺激により、これらサイトカイン量は野生型細胞と比べて顕著に減少することが確認された。一方、興味深いことに細胞膜上に発現する TLR4 の合成リガンドである LPS で処理すると、炎症性サイトカインの発現が亢進し、逆に I 型 IFN の発現が減弱することが明らかとなった。先行研究では、エンドソーム局在型の TLR はエンドソーム pH 環境化 (pH6.0~6.5) で作用するプロテアーゼにより N 末端領域の切断修飾を受

けることが自然免疫応答の誘導に重要であることが示されており、V0D2 KO および V1B2 KO 細胞はこの機能低下が生じていると考えられる。また、TLR4 の特性として細胞膜上で LPS 刺激が加わると、転写因子 NF- κ B を介した炎症応答が誘導されるのと同時に TLR4 がエンドソームへと輸送され、転写因子 IRF3 を介した I 型 IFN の産生が誘導される。V0D2 KO 細胞において、LPS 刺激後のこれら転写因子の活性化の指標となるリン酸化量をウェスタンブロットにて測定した結果、野生型細胞と比較して NF- κ B の p65 サブユニットのリン酸化量が増加し、逆に IRF3 のリン酸化量が減少することが分かった。さらに、LPS 刺激前後における細胞膜上の TLR4 の発現量を蛍光標識した抗 TLR4 抗体を用いて染色し、FACS 解析にて TLR4 のエンドソームへの輸送が正常に行われているか否かを検証した。その結果、野生型細胞は LPS 刺激により速やかに TLR4 の内在化が誘導されたのに対し、V0D2 KO 細胞は、TLR4 が一部細胞表面上に残り続けることが観察された。また、これら一連の表現型は V 型 ATPase の阻害剤である Bafilomycin A1 処理を施した RAW264.7 細胞および正常細胞であるマウス骨髄由来マクロファージや樹状細胞においても同様に誘導された。

次にエンドソーム内 pH 環境が TLR4 の内在化にどのように寄与しているかを明らかにするため、LPS の細胞内取り込み量を指標とした FACS 解析および NF- κ B プロモーター活性を指標としたルシフェラーゼアッセイを用いてその制御因子の探索を試みた結果、候補遺伝子として ARF6 を同定した。ARF6 は細胞内小胞輸送を担う ARF ファミリーに属し、主に細胞膜-エンドソーム間の輸送に貢献することが示されている。本研究より、ARF6 強発現細胞はコントロール（空プラスミド強発現時）および ARF6 機能欠損変異体（ARF6 T27N）の強発現時と比較して LPS の細胞内取り込み量が亢進されるが、Bafilomycin A1 処理や ATP6V₀D2 遺伝子のノックダウンに伴い、その取り込み量が抑えられることが分かった。また、本研究の結合実験より ARF6 は Bafilomycin A1 の標的阻害部位と考えられている V 型 ATPase の ATP6V₀C サブユニットとの共免疫沈降が認められたことから、ARF6 と V 型 ATPase 複合体の相互作用が示唆された。さらに ARF6 の自然免疫応答における役割を理解するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて ARF6 欠損細胞株（以下 ARF6 KO）を樹立し、LPS 刺激前後における細胞膜上の TLR4 の発現量を蛍光標識した抗 TLR4 抗体を用いた FACS 解析を行った。その結果、ARF6 KO 細胞は TLR4 の内在化は起こらず、細胞膜上の TLR4 の発現が強く維持されることが明らかとなった。また、ARF6 KO 細胞において TLR4 依存的な自然免疫応答に異常が生じることも明らかとなり、ARF6 はエンドソーム内 pH 環境を介した TLR4 の内在化の制御に関与する重要な因子であることが示唆された。

一般に TLR4 の内在化は細胞膜上で継続的に LPS を認識し、過剰な炎症応答が誘導されるのを防ぐ一種の免疫寛容である「エンドトキシン・トレランス（LPS トレランス）」として定義付けられている。本研究において、V0D2 KO 細胞や Bafilomycin A1 処理を施したマウス骨髄由来マクロファージに 2 度の LPS 刺激を施してエンドトキシン・トレランスを誘導したが、野生型細胞と比較してこの免疫寛容が正常に作用せず、炎症性サイトカインの産生能が依然保持されることも明らかとなった。以上のことから、本研究で得られた成果は自然免疫制御機構の一翼の解明に繋がるとともに自己免疫疾患に対する新たな理解に貢献する可能性を有している。

第 1 章 序論

1.1 自然免疫を介した病原体感染に対する生体防御

自然免疫は病原体の感染初期に作用する生体防御機構として知られている。マクロファージや樹状細胞といった自然免疫系細胞に病原体の生体内への侵入が察知されると、種々の炎症性サイトカインや抗ウイルス性作用を有する I 型インターフェロン (IFN) の産生が誘導される。これらのサイトカインは病原体の増殖抑制や炎症反応の惹起に貢献する上、T 細胞や B 細胞が司る病原体特異的獲得免疫の成立において重要な役割を果たす。こうした応答は、自然免疫系細胞や非免疫細胞にも発現が確認されているパターン認識受容体 (Pattern-recognition receptors: PRRs) を介した病原体の認識により誘導される。現在、PRRs として Toll-like receptor (TLR) ファミリー、RIG-I-like receptor (RLR) ファミリー、細胞内 DNA センサー群などが同定されている[1]。これらの PRRs は病原体間で幅広く保存された構成成分である病原体関連分子パターン (Pathogen-associated molecular patterns: PAMPs) の認識を介して下流のシグナル伝達経路を活性化し、自然免疫応答を誘導する。このように、自然免疫は侵入する種々の病原体に対応した第一線の生体防御機構として機能することで病原体感染の成立を防いでいる。

1.2 Toll-like receptor (TLR) ファミリーの機能

1.2.1 TLR ファミリーの構造とリガンドの認識

TLR ファミリーは 1 回膜貫通型タンパク質であり、細胞外に PAMPs の認識部位であるロイシンリッチリピートを、細胞内に下流へとシグナル伝達を行うためのインターロイキン 1 (IL-1) 受容体の細胞内領域と相同性を持つ TIR (Toll/IL-1R) ドメインを有する[2]。TLR はヒトにおいて 10 種類 (TLR1~10)、マウスにおいて 12 種類 (TLR1~9、11~13) 同定されており、各々が異なる PAMPs を認識する (図 1.1)。TLR にリガンドが結合すると、ホモ二量体あるいは別の TLR とヘテロ二量体 (TLR1/2 および TLR2/6) を形成し、TIR ドメインを介して下流のシグナル分子と結合する。TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6 は細胞膜上でグラム陽性菌細胞壁成分のリポタイコ酸やリポタンパク質、グラム陰性菌細胞壁成分のリポ多糖 (Lipopolysaccharide: LPS) および鞭毛構成タンパク質のフラジェリンを認識し、主に細菌感染に対する炎症応答を惹起する[3]。対照的に TLR3、TLR7、TLR9 はエンドソーム等の細胞内小器官に局在し、細菌およびウイルス由来の核酸を認識する。TLR3 は二本鎖 RNA、TLR7 は一本鎖 RNA、TLR9 は DNA の非メチル化 CpG (CG が連続した配列) モチーフをリガンドとして認識することで自然免疫応答を誘導する[4]。これらのエンドソーム局在型 TLR は自然免疫

系細胞や一部の繊維芽細胞などの貪食作用を有する細胞で選択的に発現していることから、病原体に感染した細胞をファゴサイトーシスした後、エンドソームへと移行した病原体由来の核酸成分を認識する際に重要であると考えられている。

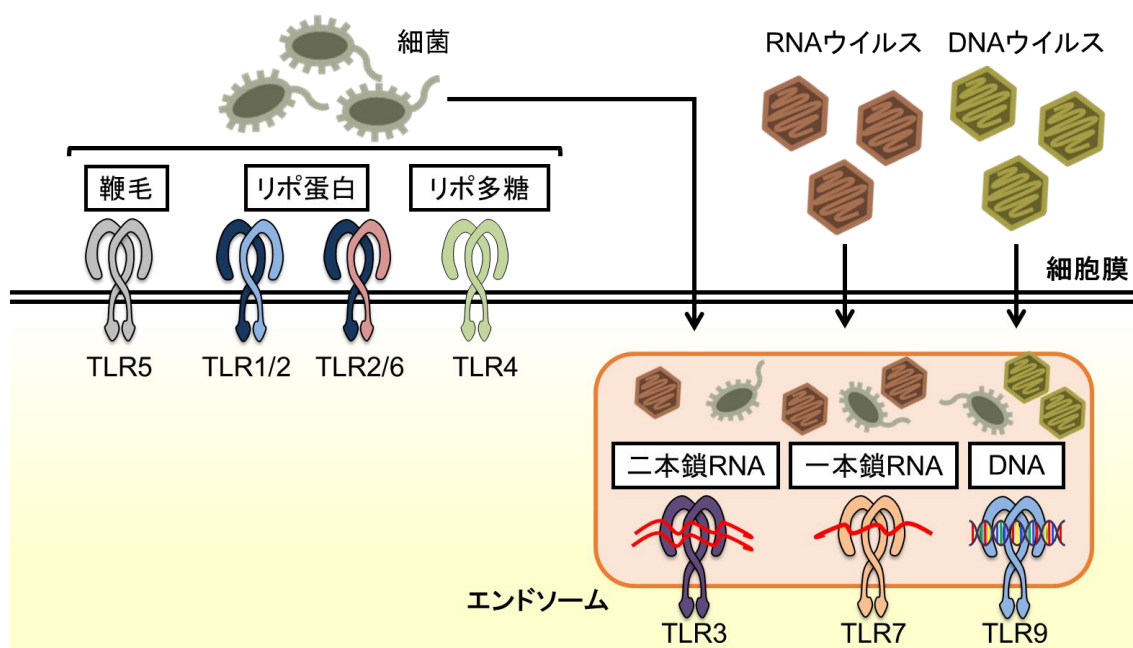


図 1.1 TLR ファミリーが認識する PAMPs

TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6 は細菌の構成成分（リポタンパク質やリポ多糖、鞭毛構成成分のフラジェリンなど）を認識し、TLR3、TLR7、TLR9 は主に細菌やウイルスの核酸成分（一本鎖または二本鎖 RNA および DNA の非メチル化 CpG 配列など）を認識する。

1.2.2 TLR ファミリーを介したシグナル伝達経路

TLR にリガンドが結合すると、二量体を形成後、TIR ドメインを有する MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88)、TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β)、TIRAP (TIR domain containing adaptor protein) および TRAM (TRIF-related adaptor molecule) といった細胞内アダプター分子を動員してシグナル伝達を開始される (図 1.2) [5]。これらのアダプター分子は細胞膜を構成するリン脂質との結合ドメインを有することで細胞膜上に局在を留め TLR との相互作用が可能となる上、PAMPs の種類に応じて選択的に各々の TLR に動員され、適切な自然免疫応答が惹起されることが知られている[6,7]。例えば、TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6 は主に IL (Interleukin) -6 や IL-12、TNF (Tumor necrosis factor) - α などの炎症性サイトカインの産生を誘導して細菌感染を抑制

するが、その産生には MyD88 や TIRAP を介した IKK (IkB kinase) 複合体 (IKK α /IKK β /NEMO (NF- κ B essential modulator)) の活性化が必要である。通常、転写因子 NF- κ B (Nuclear factor-kappa B) は IkB (Inhibitor of NF- κ B kinase) と結合した不活性状態をとるが、活性化した IKK 複合体が IkB をリン酸化することで NF- κ B から遊離し、ユビキチン-プロテアソーム系により分解される。その後、NF- κ B も同様にリン酸化を受けることで核への移行が促され、炎症性サイトカイン遺伝子の転写誘導が促進される。興味深いことに、マクロファージや樹状細胞といった自然免疫系細胞において TLR4 はこの MyD88-TIRAP 依存経路以外に一部の TLR4 が細胞膜からエンドソームなどの細胞内小器官へと輸送され、別のアダプター分子である TRIF および TRAM を介した自然免疫応答が惹起されることが知られている[8]。TLR2 においても同様の機構が活性化単球などの免疫細胞において確認されているものの、自然免疫の中核を担うマクロファージや樹状細胞においては TRIF-TRAM 経路は作用しないことが示唆されている[9]。これらのシグナル応答では、TLR4 によって動員された TRIF-TRAM により、IKK 複合体を介した NF- κ B の活性化を惹起するものの、TBK1 (TANK-binding kinase 1)/IKKi 複合体の活性化の経路をより促進し、転写因子 IRF3 (Interferon regulatory factor 3) のリン酸化を誘導する。リン酸化を受けた IRF3 は二量体となって細胞質から核へと移行し、I 型 IFN 遺伝子の転写を誘導する。したがって、自然免疫系細胞において TLR4 は 4 種類の細胞内アダプター分子と相互作用する唯一の TLR メンバーとして知られている。

一方、エンドソームに局在する核酸認識型 TLR である TLR3、TLR7、TLR9 は、特にウイルス感染に対抗するため、I 型 IFN の産生を強く誘導すると考えられている。TLR3 は TRIF を介して TBK1/IKKi 複合体を活性化し、IRF3 のリン酸化を誘導することで I 型 IFN の産生を惹起する。TLR7 および TLR9 は MyD88 を介して IRF7 の活性化を導き、最終的に I 型 IFN の産生を誘導する[2]。この経路は主にウイルス感染時に多量の I 型 IFN の産生を誘導することが知られている形質細胞様樹状細胞と呼ばれる樹状細胞サブセットにおいて選択的に機能している。IRF7 は IRAK1 (IL-1 receptor-associated kinase 1) や IKK α といったキナーゼによりリン酸化を受けた後、核内へと移行して IFN α などの I 型 IFN の転写を誘導する。さらに、これらの核酸認識型 TLR においても IKK 複合体の活性化を誘導し、転写因子 NF- κ B を介した炎症性サイトカイン遺伝子の転写を促進することが可能であるが、その誘導性は I 型 IFN の転写誘導能と比較して減弱することが知られている[5]。

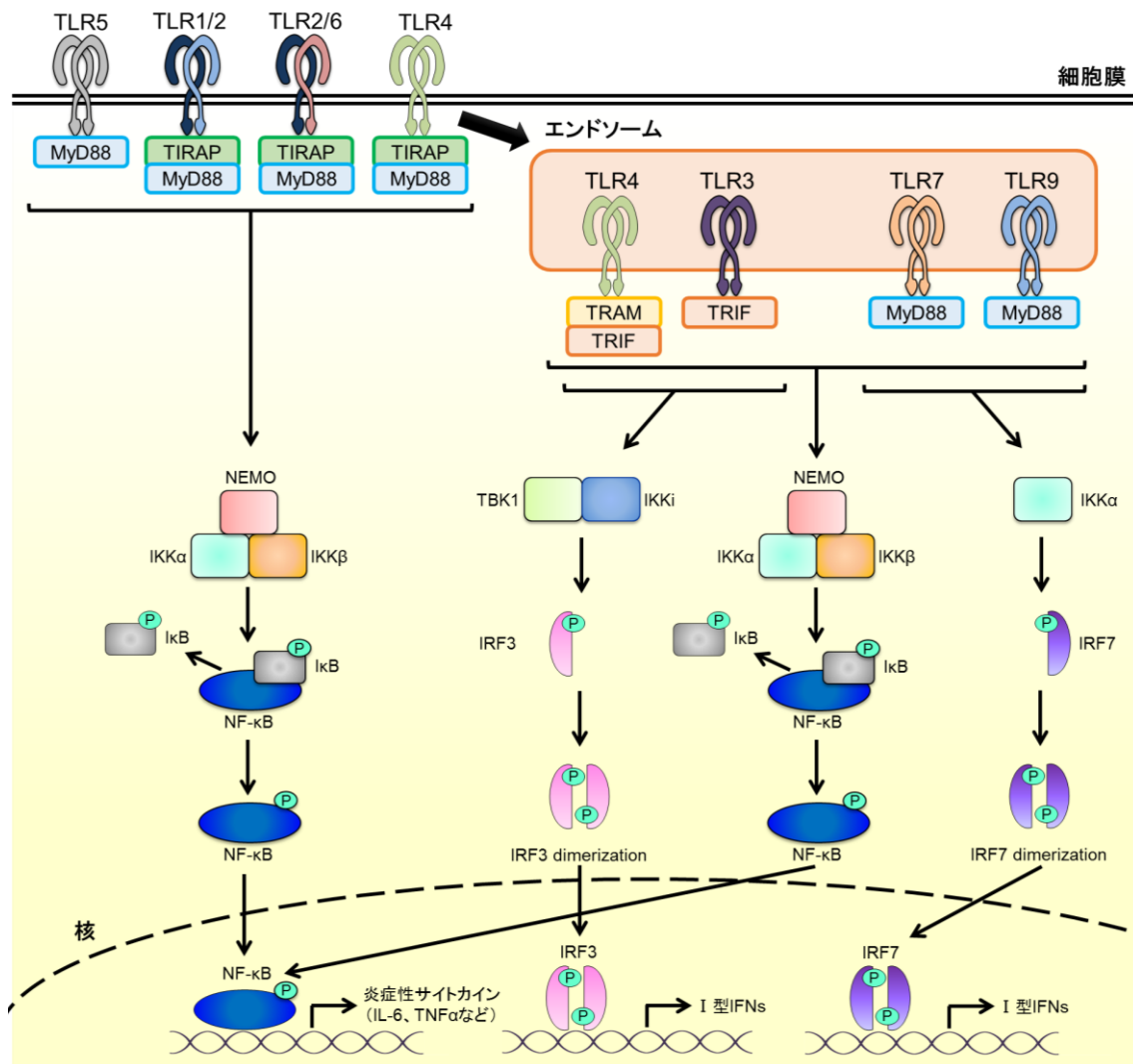


図 1.2 TLR ファミリーのシグナル伝達経路

TLR ファミリーはリガンド認識後、アダプター分子である MyD88、TRIF、TIRAP および TRAM を介して下流のシグナル伝達経路を惹起する。最終的に NF-κB や IRF ファミリー（主に IRF3 と IRF7）がリン酸化を受け、核移行されることで転写因子としての機能を有し、炎症性サイトカインや I 型 IFN の産生が誘導される。

1.2.3 TLR ファミリーの細胞内小胞輸送

小胞体において合成された TLR は、リガンド刺激が加わることでゴルジ体を經由して各々が機能する細胞内小器官へと選択的に輸送される（図 1.3）。一般に、細菌成分を認識する TLR（TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6）は細胞膜へと輸送されるのに対し、病原体の核酸成分を認識する核酸認識型 TLR（TLR3、TLR7、TLR9）は、エンドソームなどの細胞内小器官へと輸送される[10,11]。こうした TLR の適切な輸送後の局在がそれら機能に必要不可欠であり、TLR ファ

ミリーの細胞内小胞輸送は様々な分子群により密接に制御されている。例えば、12 回膜貫通型タンパク質である UNC93B1 (Unc-93 Homolog B1) の機能欠損型変異やノックアウトマウスにおいて、核酸認識型 TLR の輸送が正常に行われず小胞体に留まることが明らかとなっている[12,13]。これらの知見によると、核酸認識型 TLR が UNC93B1 を介して、コートタンパク質 COP (Coat protein complex) II を動員することで小胞体からゴルジ体へと輸送されることが示されている。また TLR3 を除く TLR ファミリーは、熱ショックタンパク質である PRAT4A (Protein Associated with TLR4) や gp96 (Heat shock protein 90kDa beta member 1 (HSP90B1) とも呼称される) の結合がその輸送に必要不可欠であること、核酸認識型 TLR はゴルジ体-エンドソーム間の輸送にコートタンパク質である AP (Adaptor protein complex) ファミリーと複合体を形成して輸送されることが報告されている[14-17]。TLR7 と TLR9 はそれぞれ AP ファミリーに属する AP4 および AP2 と特異的に相互作用することで輸送が亢進され、AP2 の機能欠損型変異により TLR9 が誤って細胞膜へと輸送されると、自己免疫疾患の発症に関与することが報告されている[18,19]。加えて近年、TLR7 と TLR9 の輸送制御因子として新たに IRAP (insulin-responsive aminopeptidase) が同定され、この IRAP 欠損マウスにおいて病原体感染時の生存率が著しく低下することが明らかとなっている[20]。一方、細菌成分を認識する TLR を小胞体から細胞膜へと輸送する過程を特異的に制御する機構は未解明な部分も多いものの、TLR4 においては COP II のアダプター分子として同定されている TMED7 (Transmembrane emp24 protein transport domain containing 7) や主に小胞輸送の繫留に関与する低分子 GTPase である Rab ファミリーの一種の Rab10 がその役割を担うことが示唆されている[21,22]。さらに、細胞膜へと輸送された TLR4 がリガンドである LPS と結合すると、クラスリン-AP2 依存的なエンドサイトーシスが開始される[23]。この輸送過程は、TLR4 のリガンド認識を補助するために不可欠な LBP (LPS binding protein) や CD14 (Cluster of differentiation 14)、MD2 (Myeloid differentiation factor 2) の機能低下ならびにクラスリンまたは AP2 のノックダウンにおいて、著しく阻害されることが報告されている[23-25]。CD14 はリガンド認識に寄与する機能以外にも、下流の PLC (Phosphoinositide-specific phospholipase C) - γ 2-Syk (Spleen tyrosine kinase) のシグナル伝達経路の活性化を介して TLR4 のエンドサイトーシスを促進し、TRIF-TRAM 依存的な I 型 IFN の産生を誘導する[26]。また、TLR4 は HRS (Hepatocyte-growth-factor-regulated tyrosine-kinase substrate) を介してモノユビキチン化されることでエンドソームへの輸送が促進され、逆に E3 ユビキチンリガーゼである Triad3A (Triad domain-containing protein 3A) にポリユビキチン化されると、プロテアソーム系で分解されることが報告されている[27,28]。これら TLR4 の内在化の制御機構以外に近年の先行研究から細胞膜

-エンドソーム間の輸送を制御する因子として p120-catenin および ARF6 (ADP-ribosylation factor 6) が同定されている[29,30]。p120-catenin はエンドサイトーシスを負に制御することで知られる RhoA (Ras homolog gene family member A) の活性化を抑制することにより、細胞膜-エンドソーム間の TLR4 の輸送を促進する。細胞内小胞輸送に密接に関与する ARF ファミリーに属する ARF6 はエンドサイトーシスの開始を促す低分子 GTPase であり、ARF6 の機能を阻害することで、TLR4 を介した TRIF-TRAM 依存的な I 型 IFN の産生が顕著に抑制されることが報告されている。また、低分子 GTPase である Rab ファミリーに分類される Rab7b および Rab11a においても TLR4 の細胞内小胞輸送に寄与して TRIF-TRAM 依存的なシグナル応答を制御することが知られている[31,32]。

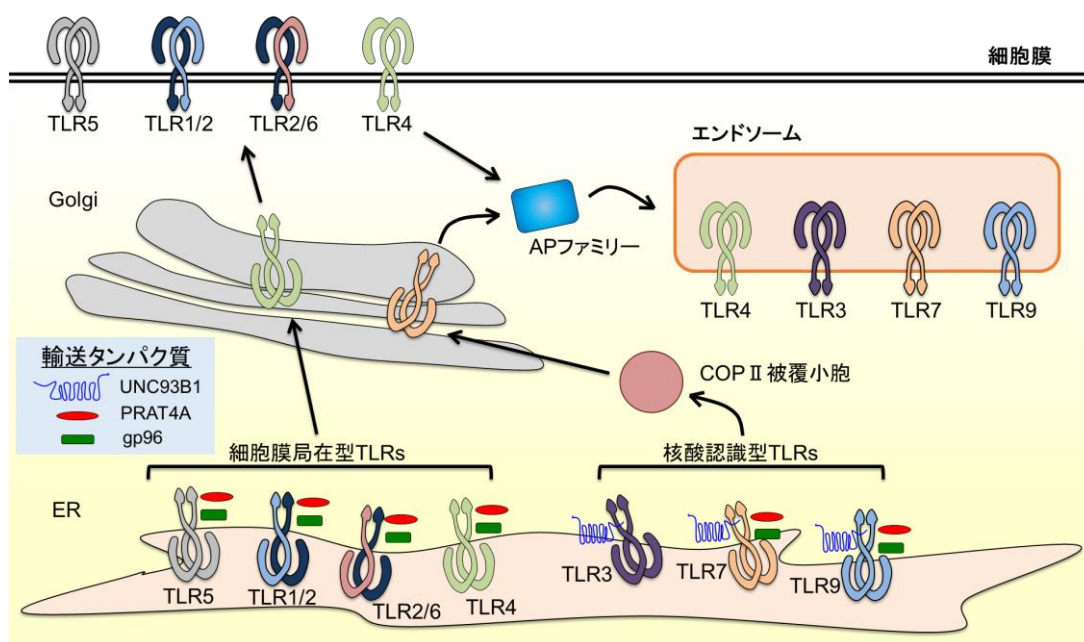


図 1.3 TLR ファミリーの細胞内小胞輸送

TLR ファミリーは小胞体内で様々な輸送タンパク質 (UNC93B1、PRAT4、gp96 など) と結合し、COP II や AP ファミリーなどのコートタンパク質を動員して輸送される。最終的に TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6 は細胞膜に輸送されるのに対し TLR3、TLR7、TLR9 はエンドソームへと輸送され、自然免疫応答が活性化する。さらに、TLR4 に関しては細胞膜でリガンド認識後、AP ファミリーを介してエンドソームへと輸送されることも明らかとなっている。

1.3 RLR ファミリーおよび細胞内 DNA センサーの機能

前述した TLR ファミリーはどれも細胞膜やエンドソームなどの細胞内オルガネラに局在を有していることから細胞質内に侵入した病原体を察知するには、

TLR ファミリー以外の PRRs の機能が重要である (図 1.4)。RLR ファミリーは細胞質に局在を示し、細胞質内に侵入した外来遊離 RNA を検知し、I 型 IFN を産生することで抗ウイルス応答を惹起する細胞内 RNA センサーである[33]。RLR ファミリーの RIG-I (Retinoic acid-inducible gene-I) と MDA5 (Melanoma differentiation-associated protein 5) が RNA を認識するとアダプター分子である IPS-1 (Interferon-beta promoter stimulator 1) と会合し、TBK1-IKKi や IKK 複合体の活性化を誘導する。これらのキナーゼは IRF3 や NF- κ B のリン酸化を促進し、最終的に I 型 IFN や炎症性サイトカインの産生を誘導する。さらに、細胞内 DNA センサー群も細胞質に局在を示し、細胞質内に遊離した外来 DNA を認識する細胞内 PRRs である[34]。細胞内 DNA センサー群の中でも、cGAS (Cyclic GMP-AMP synthase) 欠損マウスにおいて DNA ウイルス感染に対する抵抗性が著しく失われることから、cGAS が細胞内 DNA センサーとして中心的な役割を担うと

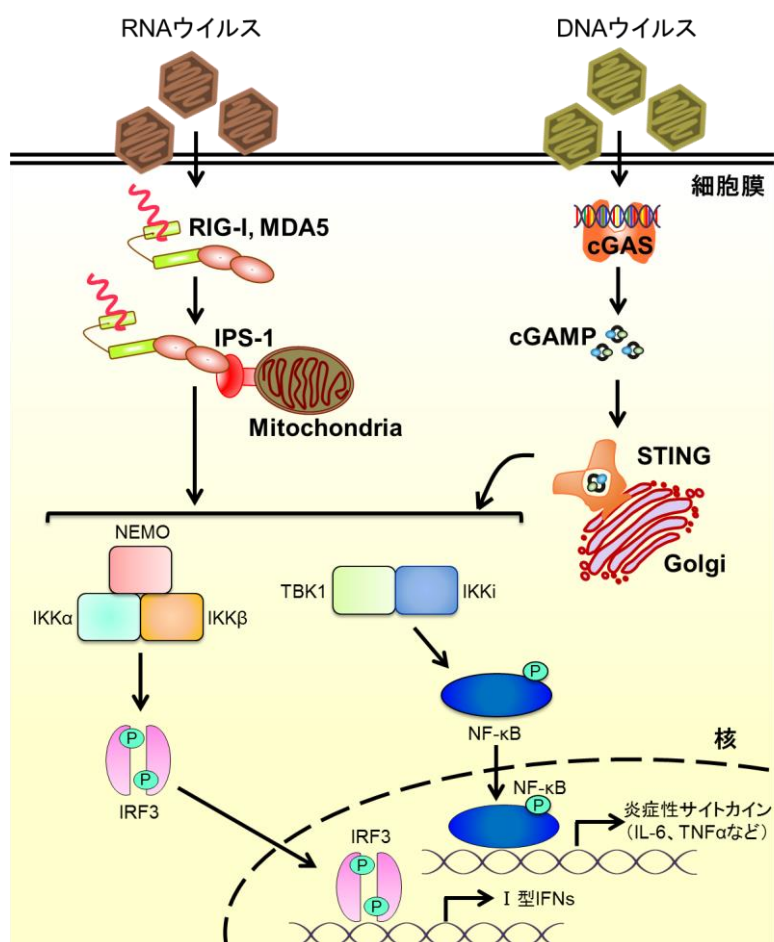


図 1.4 RLR ファミリーおよび細胞内 DNA センサー (cGAS) のシグナル伝達経路

RLR ファミリーや cGAS などの細胞内 PRRs が主に病原体由来の核酸成分を認識すると、IRF3 や NF- κ B を活性化し、I 型 IFN や炎症性サイトカインの産生が誘導される。

考えられている[35]。cGAS は細胞質内で遊離 DNA を認識した後、GTP と ATP から cGAMP (Cyclic GMP-AMP) を生成する。cGAMP はアダプター分子である STING (Stimulator of interferon genes) と結合することでその活性化を導き、TBK1-IKKi や IKK 複合体の活性化を誘導する。これらのキナーゼにより同様に IRF3 や NF- κ B のリン酸化が促進され、I 型 IFN や炎症性サイトカインの産生が誘導される。その後、各々の PRRs のシグナル伝達により産生された I 型 IFN および炎症性サイトカインは自身の細胞あるいは隣接する細胞上の該当する受容体へと結合し、抗ウイルス応答や炎症応答が活性化される[36,37]。

1.4 エンドソーム内 pH 環境と疾患および自然免疫との関与

小胞体や細胞質内は pH7.2 程度の中性を示すのに対し、ゴルジ体、エンドソームおよびリソソーム内部は恒常的に酸性環境下 (それぞれ pH4.5~6.5 の範囲内) で維持されている[38,39]。この酸性環境は酸性オルガネラ内に存在する酵素の至適 pH 条件を満たし、ユビキチン化タンパク質や病原体などの細胞外物質の分解反応の誘導ならびにタンパク質の翻訳後修飾といった多種多様な細胞内生体反応を果たすための重要な場として機能する[30]。そのため、酸性オルガネラであるエンドソームやリソソーム環境の恒常性は多くの分子により密接に制御されている。現在、細胞内小胞の pH 制御因子として V 型 ATPase、Na⁺/H⁺交換輸送体 (NHE) ファミリー、Cl⁻チャネル (CIC) ファミリーなどが同定されている[40-42]。V 型 ATPase (Vacuolar-type H⁺-ATPase) は酸性オルガネラの pH 制御の根幹を担うプロトンポンプとして機能し、ATP の加水分解エネルギーを利用して細胞外のプロトンを小胞内へと輸送する。CIC ファミリーは小胞内にクロライドを取り込むことで、V 型 ATPase による正電位の蓄積を解消し、小胞内の正負電荷のイオンバランスを調節する。一方、NHE ファミリーは小胞内のプロトンと細胞質のポタシウムを交換輸送することで内部の過剰な酸性化を抑制している。先行研究より、これら酸性オルガネラの制御を司る分子の破綻は重篤な疾患の発症に起因することが明らかとなっている。例えば、ヒトにおいて V 型 ATPase の機能欠損型の変異に伴い、ゴルジ体の糖鎖修飾や輸送障害を介した II 型皮膚弛緩症の発症に関与することやエンドソームおよびリソソームの酸性化阻害により破骨細胞の機能不全が誘発され、骨吸収障害に基づくびまん性骨硬化性病変の大理石病の発症に繋がることが知られている[43,44]。また、CIC5 の異常により近位尿細管機能不全を特徴とする尿細管性障害であるデント病、CIC7 の異常においても破骨細胞の機能不全が生じ、大理石病を発症することが明らかとなっている[45,46]。これらの疾患に加え、オルガネラ内腔の酸性化はエンドソームやリソソームの加水分解酵素を有するオートファジーにおいても密接に関与することが酸性オルガネラの酸性化阻害剤を用いた研究から明らかとなってい

る[47]。一方、エンドソームやリソソーム内腔の酸性化障害に伴う正の側面としては、ウイルス感染に対して宿主の抵抗性が増加するという知見が近年の複数の研究より報告されてきている。これらの研究では、酸性化阻害剤である **Chloroquine** やそのホモログ化合物の処理を細胞に施すことでエボラウイルスやデングウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、C 型肝炎ウイルスなどの多くのウイルスが利用する宿主由来のエンドソーム内 pH 環境下で作用するプロテアーゼの機能が低下し、これらウイルスの侵入や複製段階が抑えられることが分かっている[48]。

自然免疫の研究においては、ゴルジ体からエンドソームに輸送された核酸認識型 TLR である TLR3、TLR7 および TLR9 は、エンドソーム pH 環境化で作用するカテプシンファミリーやアスパラギンエンドペプチダーゼといったプロテアーゼにより N 末端領域の切断修飾を受けることでリガンドを認識可能な成熟型に変化することが知られている（図 1.5）[49-52]。この局在と成熟化は細胞内の自己核酸に対して自然免疫応答を誘導しないための制御機構の一つとして考えられている。一旦、エンドソーム内へと輸送されこれら TLR が成熟化すると、前述したシグナル伝達経路のもと自然免疫応答を誘導することが可能となるが、放射線や紫外線照射などを介した細胞死による内在性因子の放出や核酸分解酵素（DNase I、DNase II、TREX1（Three prime repair exonuclease 1）など）の機能低下に伴って自己核酸を誤認識する危険性が上昇し、全身性エリテマトーデスや多発性関節炎などの重篤な自己免疫疾患の発症に起因することが示唆されている[53-57]。先行研究では、アミノ酸輸送体である Slc15a4（Solute carrier family 15 member 4）ノックアウトマウスにおいて、緩衝作用を有するヒスチジンがエンドソーム内腔に蓄積することでエンドソーム内 pH の中性化と下流のシグナル分子の動員異常が生じ、核酸認識型 TLR のシグナル応答が減弱することが示唆されている[58]。また、エンドソーム内 pH 内腔の酸性化阻害剤である **Bafilomycin A1** や **Chloroquine** 薬剤処理を施した細胞では、核酸認識型 TLR 依存的な自然免疫応答が減弱することも明らかとなっている[59]。しかしながら、これら薬剤は細胞死の誘導や細胞増殖抑制を有することや、抗マラリア感染作用ならびに自己免疫疾患の一種である全身性エリテマトーデスの中心的薬剤として機能することなど、現在解明されている知見以外の作用機序のもと自然免疫応答の調節に影響を与えることも示唆されている[60-62]。

そこで本研究では、エンドソーム内 pH 環境が自然免疫応答へ及ぼす影響を詳細に解析することを目的とし、エンドソームなどの酸性オルガネラの内部酸性化に中心的な役割を果たす V 型 ATPase に着目した。V 型 ATPase は 14 のサブユニットから成る超分子複合体であり、ATP 結合部位（V₁ ドメイン：A~H サブユニット）と膜に組み込まれているプロトン通過部位（V₀ ドメイン：a、

c、c'、c''、d、e サブユニット）から構成される[63,64]。このプロトンの輸送機構は主に 2 段階に分類される（図 1.5）。まず、V₁ ドメインの A サブユニットおよび B サブユニットに ATP が結合することで軸の役割を担う D サブユニットが回転する。その後、V₀ ドメインのプロトンを含む膜内 c、c' および c'' サブユニットがそれぞれ回転することで小胞内にプロトンが輸送される。V 型 ATPase は普遍的に発現し生体内の恒常性の維持に寄与するが、V₁ ドメインの B、C、E、G サブユニットおよび V₀ ドメインの a、d サブユニットはアイソフ

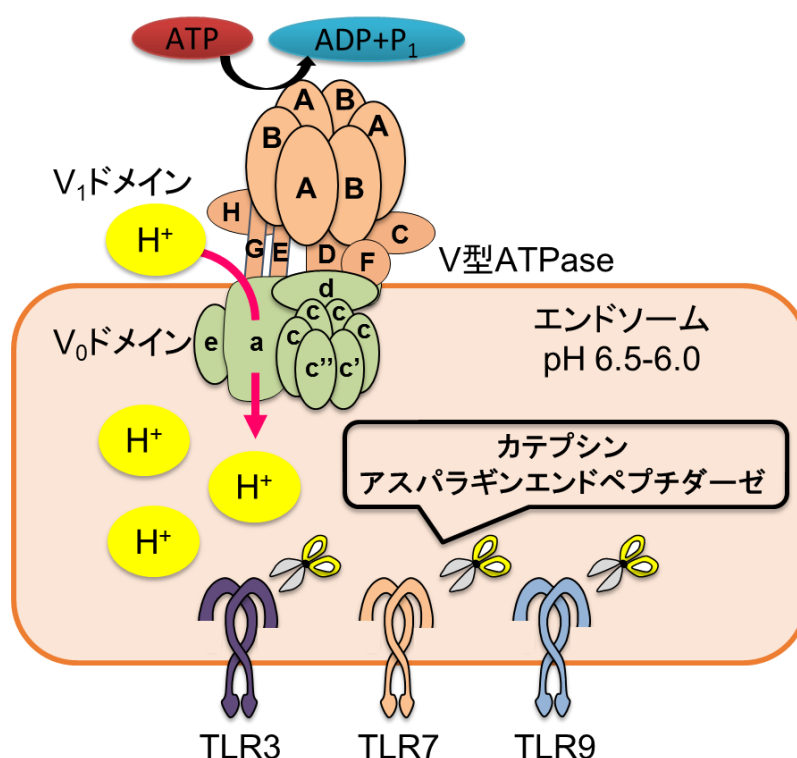


図 1.5 V 型 ATPase によるエンドソーム pH 制御と核酸認識型 TLR の成熟化

ATP 駆動型ポンプである V 型 ATPase はエンドソーム内にプロトン輸送することで内腔の酸性化を促す。V 型 ATPase は 14 のサブユニットから構成され、エンドソームなどの細胞内オルガネラの膜に組み込まれている V₀ ドメイン（a、c、c'、c''、d、e サブユニット）と ATP 結合部位を持つ V₁ ドメイン（A~H サブユニット）を有する。この酸性 pH 環境で作用するプロテアーゼにより TLR3、TLR7、TLR9 は N 末端領域の切断修飾を受け、成熟型となる。

オームを有し、組織や細胞に応じてアイソフォームの発現パターンが異なり選択性を有していることが知られている[64]。V 型 ATPase のサブユニットの一つである ATP6V₀D2 ドメインは V₁ ドメインと V₀ ドメインの接合に不可欠な役割

を担っており樹状細胞、破骨細胞などの免疫系の細胞に加え、腎臓、副睾丸などの組織で選択的に発現していることが知られている[65,66]。また、先行研究より ATP6V₀D2 ノックアウトマウスにおいて細胞内エンドソームの pH の中性化ならびに破骨細胞の機能障害に伴う大理石病の表現型を有することが明らかとなっている[65,67]。さらに、ATP6V₁B2、および ATP6V₀A3 の欠損マウスにおいても胎生致死にはならず、エンドソーム内 pH の酸性化が阻害されることが報告されている[68-70]。これらのことから、当研究室の先行研究より、CRISPR/Cas9 システムを用いて V 型 ATPase ATP6V₀D2 又は ATP6V₁B2 サブユニットの欠損 RAW264.7 細胞株（マウス系マクロファージ癌細胞株、以下 V0D2 KO および V1B2 KO）が樹立され、これら細胞株を用いた自然免疫応答に関する解析から以下の3つの研究成果が得られてきた[NAIST バイオサイエンス研究科 2016 年度 箱崎理花 修士論文]。

(1) V 型 ATPase 欠損細胞の樹立とエンドソーム内 pH の解析

CRISPR/Cas9 システムにより、V0D2 KO 細胞はエキソン 2 配列の開始コドン近辺に 8 塩基/10 塩基の欠失、V1B2 KO 細胞はエキソン 1 配列の開始コドン近辺に 23 塩基/23 塩基の欠失のフレームシフト変異が挿入された欠損細胞株が樹立された（参考図 1）。この V0D2 KO 細胞および V1B2 KO 細胞のエンドソーム内 pH を調べるため、pH 指示薬であるアクリジンオレンジの染色実験を行った。エンドソーム酸性 pH 下で発する 620 nm のアクリジンオレンジの蛍光強度を共焦点顕微鏡観察または FACS 解析にて測定した結果、これら欠損細胞株はその蛍光量が野生型細胞と比較して減弱する傾向にあることが分かった（参考図 2）。同様の実験系で、野生型細胞に V 型 ATPase の阻害剤である Bafilomycin A1 投与を施すと、エンドソーム内のアクリジンオレンジの蛍光強度が減少することも確認された（参考図 2）。

(2) V 型 ATPase 欠損細胞による核酸認識型 TLR 依存的な抗ウイルス応答

V0D2 KO および V1B2 KO 細胞を用いて、核酸認識型 TLR である TLR3、TLR7 および TLR9 の合成リガンドである Poly(I:C)、R837 および ODN1668 の刺激をそれぞれ施し、抗ウイルス作用を有する I 型 IFN の一つである *Ifnb1* の転写量を RT-qPCR にて測定した。その結果、これら合成リガンドの刺激において各欠損細胞における *Ifnb1* の転写量は野生型細胞と比較して有意に減少することが分かった（参考図 3A）。また *Ifnb1* の転写因子である IRF3 のリン酸化量をウェスタンブロットにより検出した結果、Poly(I:C)による TLR3 刺激誘導後の野生型細胞では IRF3 のリン酸化量が刺激時間依存的に著しく促進されるのに対し、V0D2 KO および V1B2 KO 細胞では野生型細胞と比較して IRF3 のリン酸化が抑

えられることが分かった（参考図 3B）。

(3) V 型 ATPase 欠損細胞による TLR4 依存的な自然免疫応答

V0D2 KO および V1B2 KO 細胞に TLR4 の合成リガンドである LPS 刺激を施し、炎症性サイトカインである *Il6* と *Ifnb1* の転写量を RT-qPCR にて測定した。その結果、V0D2 KO および V1B2 KO 細胞の *Il6* の転写量は野生型細胞と比較して顕著に増加するのに対し、*Ifnb1* の転写量は減弱することが分かった（参考図 4A）。また、LPS 刺激後の IL-6 タンパク質量を ELISA 法にて測定した結果も同様に各欠損細胞で野生型細胞と比べて増加することが分かった（参考図 4B）。次に、IL-6 などの炎症性サイトカイン上流のシグナル伝達経路を解析するため、LPS 刺激前後における炎症性サイトカインの転写因子である NF- κ B の p65 サブユニットのリン酸化量をウェスタンブロットにより検出した。その結果、V0D2 KO 細胞において NF- κ B p65 のリン酸化量が野生型細胞と比べて強く誘導されることが明らかとなった（参考図 4C）。

本研究では、これらの先行研究を踏まえ、自然免疫応答制御におけるエンドソーム内 pH 環境の役割についての理解を目指した。特に先行研究（3）に関する知見の報告例はこれまでにないことから、エンドソーム内 pH 環境と TLR4 依存的な自然免疫応答に着目し、その作用機序の解明を本論文の最終的な目的とした。次に、これまでに知られている TLR4 のシグナル調節機構や自己免疫疾患との関与について述べる。

1.5 TLR4 依存的なシグナル調節制御機構と自己免疫疾患

TLR4 はこれまでに関節リウマチや全身性エリテマトーデスなどの様々な自己免疫疾患の発症や病態に寄与することが明らかとされてきており、新規創薬の標的分子として注目されている[71]。当初 TLR4 は LPS などの病原体成分を認識する受容体として同定されたが、その後の研究から TLR4 は PAMPs のみならず自己由来の内在性因子もリガンドとして認識することで、自然免疫応答を惹起することが分かってきた[72]。したがって、TLR4 が寄与する自己免疫疾患は PAMPs の相互作用に加え、自己由来成分の認識を介したシグナル伝達誘導も関わってくる。例えば、関節を構成する滑膜の肥大と関節部の慢性的な炎症を伴い発症する関節リウマチ患者において、患部の TLR4 の発現量の顕著な亢進に加え内因性 TLR4 リガンドである HMGB1（High Mobility Group Box 1）やテネイシン C の血中濃度の増加が観察されている[73-75]。また、関節リウマチ患者に高頻度で確認されるシトルリン化フィブロンネクチンは親和性の高いリガンドとなり、TLR4 の活性化を増進させるとの報告もある[76]。さらに、敗血症（＝全身

性炎症反応症候群)や腎臓、肺、心臓など各種臓器における慢性的な炎症を伴う全身性エリテマトーデス発症患者において、HMGB1などの内在性リガンドの血中濃度の上昇が認められ、これら複数の病態の進行を抗 HMGB1 中和抗体の投与で緩和されることが知られている[75]。よって、TLR4 を介したシグナル伝達の破綻は様々な炎症性疾患の発症と関連している。先行研究より TLR4 依存的なシグナル伝達応答を負に調節する制御因子として、TLR4 やその下流のシグナル分子の分解を促す SOCS (Suppressor of cytokine signaling) -1、TRIAD3A、TRIM30α (Tripartite motif-containing protein 30α) などの K48 型の E3 ユビキチンリガーゼに加え、miR-146a、miR-155、miR223 などの炎症応答を抑制する miRNA が TLR4 刺激依存的に増加することが明らかとなっている[28,77-79]。また、TLR4 の K63 型ユビキチン化によるシグナル伝達応答を阻害する脱ユビキチン化酵素である A20 (tumor necrosis factor alpha-induced protein 3, TNFAIP3 とも呼称される)、CYLD (Cylindromatosis)、DUBA (Deubiquitynating enzyme A) なども同定されており、これら分子の制御機構の破綻は過剰な炎症応答を誘導してしまう引き金となることがノックアウトマウスを用いた実験から明らかとされている[80-82]。

次に TLR4 と PAMPs との相互作用により誘導される疾患としては、敗血症が広く知られている[71]。細菌感染が全身に波及すると、細菌細胞壁成分の LPS による TLR4 を介した過剰な炎症応答を誘導し、生体に死をもたらす敗血症ショックへと陥る。この TLR4 依存的なサイトカインストーム(=炎症性サイトカインの大過剰細胞外放出)を防ぐ免疫抑制機構の一つとして近年、「エンドトキシン・トレランス(=LPS トレランス)」という概念が提唱されている[83,84]。エンドトキシン・トレランスは LPS などのエンドトキシン刺激により活性化したマクロファージや樹状細胞などの自然免疫細胞が再度エンドトキシン刺激にさらされると、炎症性サイトカインの産生が抑制され、かつ抗炎症性サイトカインの産生が亢進する現象である。実際に、低濃度 LPS を前投与したマウスに致死量の LPS を投与しても、致死に至らないことが知られている[83,84]。このトレランス時に TLR4 のエンドサイトーシスが促進されることで MyD88-TIRAP 依存経路が選択的に阻害され、対照的に TRIF-TRAM 依存経路が活性化することが見出されている[85,86]。強い炎症応答を誘発する MyD88-TIRAP 依存経路が抑えられ、TRIF-TRAM 依存経路が主体となり誘導されるサイトカイン産生は、前述した I 型 IFN に加え、抗炎症性サイトカインの産生も含まれる。したがって、LPS 刺激後の TLR4 の内在化に続く TRIF-TRAM 依存経路の活性化がエンドトキシン・トレランスにおける抑制機構の一つであると考えられている(図 1.5)。

以上のことからエンドソーム内 pH 環境と TLR4 を介した自然免疫応答の関係性を詳細に解明することは、学術的意義に留まらず、上述したような自己免疫疾

患の新たな発症機構の解明や治療法の開発に繋がる可能性を秘めている。そこで本研究では免疫寛容機構の一つであるエンドトキシン・トレランスにも焦点を当て、エンドソーム内 pH 環境が自然免疫応答に及ぼす影響について解析を行った。

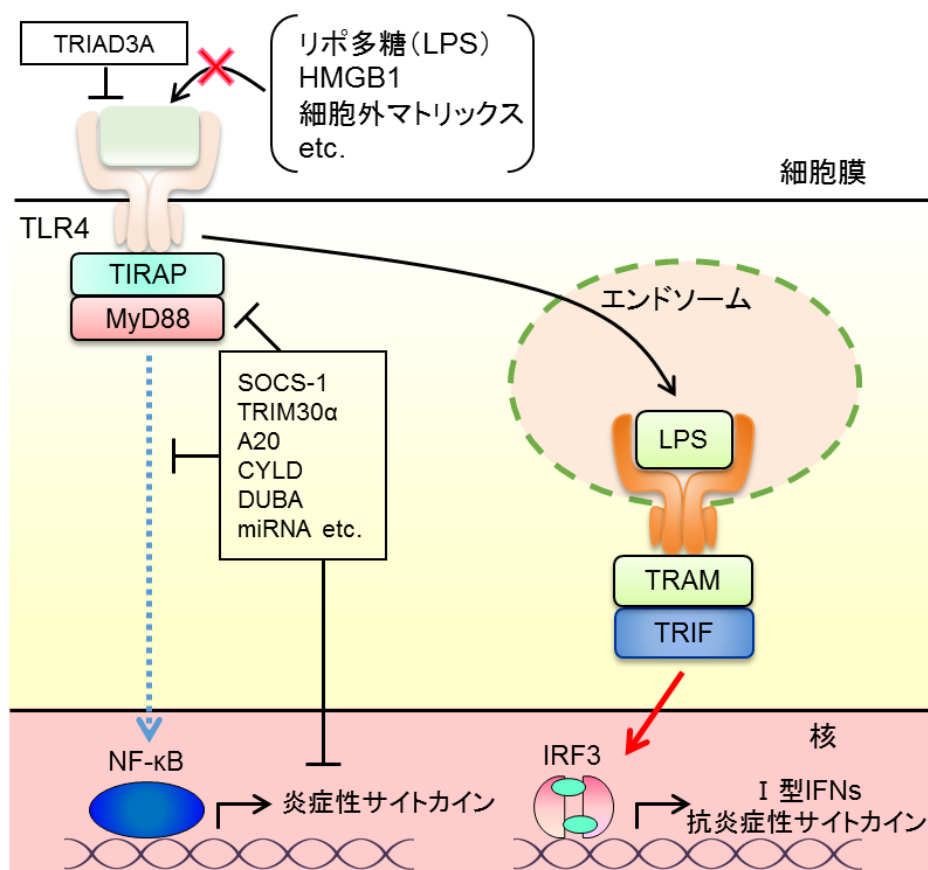


図 1.5 TLR4 を介したシグナル応答の抑制機構

TLR4 がリガンドを認識し炎症応答を誘導後、炎症性サイトカインの慢性的な産生を防ぐため、即座に抑制機構が作用する。抑制方法としては、TLR4 のエンドソームの内在化に伴うリガンドの認識阻害やシグナル分子の分解に必要な制御因子の活性化ならびに産生されている炎症性サイトカインの分解など様々であり、これらの免疫寛容が正常に作用することで、自己免疫疾患の防止へと繋がる。

第2章 材料と方法

2.1 使用した実験材料

マウス

マウス (C57BL/6J) は日本クレアより購入後、奈良先端科学技術大学院大学の動物実験施設 SPF (Specific-pathogen-free) 2 を使用し飼育管理した。動物実験を行う際は、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守するとともに、奈良先端科学技術大学院大学の動物実験委員会が定める規程・指針を遵守しながら本計画を実施した。

培養細胞

本実験で使用した培養細胞株を以下に示す。

- マウス由来マクロファージ癌細胞株である RAW264.7 細胞
- ヒト胎児由来腎癌細胞株である HEK293 および HEK293T 細胞
- TLR4 発現ヒト胎児由来腎癌細胞株である HEK293 細胞
- レトロウイルスパッケージ細胞である Platinum-E (Plat-E) 細胞
- マウス骨髄細胞より M-CSF で分化誘導したマクロファージ (BM-M)
- マウス骨髄細胞より GM-CSF で分化誘導した樹状細胞 (BM-DC)

RAW264.7 細胞、HEK293 細胞、HEK293T 細胞および TLR4 発現 HEK293 細胞は、10% ウシ胎児血清 (FBS、Life Technologies) 含有 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM 培地、Nacalai) にて、37°C、5% CO₂ 存在下のもと培養を行った。Plat-E 細胞は 100 μ M 2-mercaptoethanol (Nacalai)、1 μ g/mL ピューロマイシン (Invivogen)、10 μ g/mL Blasticidin (Invivogen) および 10% FBS を含んだ DMEM 培地で使用時まで 37°C、5% CO₂ 存在下のもと培養を行った。BM-M および BM-DC 細胞はマウスの大腿骨および脛骨より採取した骨髄細胞を 10 ng/mL M-CSF (Proteo Tech) 又は 10 ng/mL GM-CSF (Proteo Tech)、100 μ M 2-mercaptoethanol、100 units/mL ペニシリン・100 μ g/mL ストレプトマイシン (Nacalai) および 10% FBS を含んだ Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 培地、Nacalai) で 37°C、5% CO₂ 条件下のもと 6~8 日間分化誘導を行った。

菌株

プラスミド構築時の形質転換に大腸菌 (*Escherichia coli* DH5 α 株、Toyobo) を使用した。形質転換大腸菌は LB 液体培地および LB 平板培地 (Nacalai) で 37°C 条件下のもと培養を行った。

プラスミド

発現プラスミドの構築のため、pFlag-CMV-2 (Sigma) および pcDNA3.1-Myc (Santa Cruz Biotechnology) を使用した。ルシフェラーゼレポーターアッセイには、当研究室で保持している pGL3-IFN- β -Luc、pGL3-NF- κ B-Luc、pSV40-Luc および pTK-Luc を使用した。また CRISPR/Cas9 システムには、大阪大学微生物病研究所・附属遺伝情報実験センターより供与いただいた Guide RNA (gRNA) と Cas9 をコードする pX330 プラスミドとレポータープラスミドとして EGFP を発現する pCAG-EGxxFP プラスミドをそれぞれ使用した[87]。CRISPR/Cas9 システムで樹立した細胞株の変異位置を特定するため、TOPO vector (Life Technologies) を使用した。また、樹立した欠損細胞の欠損遺伝子の発現を回復させるため、pMXs-IRES-puro レトロウイルスプラスミド (CELL BIOLABS, INC.) に CMV プロモーターおよび Flag タグをマルチクローニングサイトの upstream に組み込んで改変させた pMRX-Flag-puro を使用した。

プライマー

NCBI よりマウス由来の各遺伝子配列に基づきオープンリーディングフレームを含む領域を増幅可能なプライマーを設計した。RT-qPCR 用プライマーに関しては、先行論文で使用された配列情報または GenScript Real-time PCR Primer Design ツール (<https://www.genscript.com/tools/real-time-pcr-tagman-primer-design-tool>) を用いてプライマーを設計した。また、pX330 に組み込む gRNA 用プライマーは CHOPCHOP (<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/>) を用いて設計した。これらプライマーのオリゴ合成は Greiner bio-one または Eurofins Genomics に受諾した。設計したプライマーの塩基配列を表 2.1-2.9 に示す。

表 2.1 CRISPR/Cas9 システムで使したプラスミド構築用プライマー

Gene	Forward primer 配列 (5'-3')	制限酵素	Reverse primer 配列 (5'-3')	制限酵素
V 型 ATPase V ₀ D2-pX330	caccgaaaattcatctccagacca	<i>Bbs</i> I	aaactggtctggagatgaatttc	<i>Bbs</i> I
V 型 ATPase V ₁ B2-pX330	caccgaactgccgtgccaccgg	<i>Bbs</i> I	aaaccgggtggcagggcagttc	<i>Bbs</i> I
ARF6-pX330	caccgcggatcctcatgctgggcc	<i>Bbs</i> I	aaacggcccagcatgaggatccgc	<i>Bbs</i> I
V 型 ATPase V ₀ D2-pEGxxFP	gctaggattcatgcttgagactgcagagctgtac	<i>Bam</i> H I	gctagaattcctcaaaactcaagaatggg	<i>Eco</i> R I
V 型 ATPase V ₁ B2-pEGxxFP	aaaggatccatggcgttgcgagcgcgagggaatcg	<i>Bam</i> H I	aaagaattcagcctggcgacagatctgagctgcaatc	<i>Eco</i> R I
ARF6-pEGxxFP	aaactgcagggccctgctcccctagccg	<i>Pst</i> I	aaagaattcgacataccagttctctgtcccg	<i>Eco</i> R I

表 2.2 CRISPR/Cas9 標的配列を含む DNA 断片増幅用プライマー

Gene	Forward primer 配列 (5'-3')	Reverse primer 配列 (5'-3')
V 型 ATPase V ₀ D2	ctgtctctcagttgactccagatc	ctctatgtattcaaaattacagacc
V 型 ATPase V ₁ B2	tctgccgcagcttcgaagcgcgcatg	gtgagagcacaagccaagggttggtgg
ARF6	aggcttgaggggacccgggacacgtgaatg	tgataatgcggtgcagctcctggcggg

表 2.3 各欠損細胞株のシーケンス解析用プライマー

Gene	Forward primer 配列 (5'-3')	Reverse primer 配列 (5'-3')
M13-TOPO-Seq	gtaaaacgacggccag	—

表 2.4 本研究で使用した各発現プラスミドの構築用プライマー

Gene	Forward primer 配列 (5'-3')	制限酵素	Reverse primer 配列 (5'-3')	制限酵素
Flag-V 型 ATPase V ₀ D2	atgcaagcttatgcttgagactgcagagctgtac	<i>Hind</i> III	atgcgaattctaaaattggaatgtagctgttgatttag	<i>Eco</i> R I
Flag-V 型 ATPase V ₀ C	aagggaattcaatggctgacatcaagaacaaccccgaa	<i>Eco</i> R I	atcgctgcactactttgtggagaggattaggccac	<i>Sal</i> I
Flag-ARF1	aaaggaattcaatggggaatatctttgcaaacctcttc	<i>Eco</i> R I	aaaggctcgactcactctggttccggagctgattagac	<i>Sal</i> I
Flag-ARF2	aaaggaattcaatggggaatgtctttgaaaagctgttta	<i>Eco</i> R I	aaaggctcgactcactctggttttgagctggttgag	<i>Sal</i> I
Flag-ARF3	aaaggaattcaatgggcaatatctttgggaacctcttg	<i>Eco</i> R I	aaaggctcgactcactctggttttgagctgattggc	<i>Sal</i> I
Flag-ARF4	atgcaagcttatgggcctcaccatctcctctctcttc	<i>Hind</i> III	atgcgaattctaacgtttgaaagtcatgtgacagcc	<i>Eco</i> R I
Flag-ARF5	atgcaagcttatgggcctcacggtgtccgcgctcttttc	<i>Hind</i> III	atgcgaattcctagcgctttgacagctcgtgggacagcc	<i>Eco</i> R I
Flag-ARF6	atgcaagcttatggggaagtgctatccaagatcttcg	<i>Hind</i> III	atgcgaattcttaggattgtagttagaggttaacctg	<i>Eco</i> R I
Myc-ARF6	aagggaattcatggggaagtgctatccaagatcttcg	<i>Eco</i> R I	aacctcgagtaggattgtagttagaggttaacc	<i>Xho</i> I

表 2.5 各発現プラスミドのシーケンス解析用プライマー

Gene	Forward primer 配列 (5'-3')	Reverse primer 配列 (5'-3')
pFlag-CMV-2-seq	aatgtcgtataaaccgccccggttgacgc	tattaggacaaggctggtgggcac
pcDNA3.1-Myc-seq	cggtgggaggtctatataagc	gcaactagaaggcaca

表 2.6 ARF6 変異体 (ARF6 T27N) 発現プラスミドの構築用プライマー

Gene	Forward primer 配列 (5'-3')	Reverse primer 配列 (5'-3')
ARF6 T27N mutant	gcagccggcaagaacagatcctgtac	gtacagatcggtgttctgccggtgc

表 2.7 Real-time RT-PCR 用プライマー

Gene	Forward primer 配列 (5'-3')	Reverse primer 配列 (5'-3')
mV 型 ATPase V ₀ D2	tcagatctcttcaaggtgtgctg	gtgccaaatgagttcagagtgatg
hV 型 ATPase V ₀ D2	cttgagtttgaggccgacag	tgccgaaggttgatagagg
mV 型 ATPase V ₁ B2	cgaactgtttatgagacttggacatt	gggtgctgagggattctcttc
mIFN-β	atggtggtccgagcagagat	ccaccactcattctgaggca
mIL-6	gtagctatgtactccagaagac	acgatgatgcacttgacaaa
mIL-12p40	agacctgcccattgaactg	gaagctgggtgctgtagttctcatatt
mTNFα	cacagaaagcatgatccgcgacgt	cggcagagaggaggttgactttct
mARF6	gccatcatcctcatcttcgc	gctgcacataccagttcctg
m18S rRNA	gtaaccggtgaacccatt	ccatccaatcggtagtagcg
hGAPDH	aatcccatcaccattctcca	tggactccacgacgtactca

表 2.8 V 型 ATPase ATP6V₀D2 発現レトロウイルスプラスミドの構築用プライマー

Gene	Forward primer 配列 (5'-3')	制限酵素	Reverse primer 配列 (5'-3')	制限酵素
pMRX-FLAG-V 型 ATPase V ₀ D2-puro	tgacgacaaggatccatgcttgagactgcagagctg	<i>EcoR</i> I	cggccgctccgaattcttataaaattggaatgtagctg	<i>Bam</i> H I

表 2.9 レトロウイルスプラスミドのシークエンス用プライマー

Gene	Forward primer 配列 (5'-3')	Reverse primer 配列 (5'-3')
pMRX-Flag-puro-seq	caccgcctcaaagtagacggcatc	gacaaacgcacaccggccttattc

2.2 CRISPR/Cas9 システムによる V 型 ATPase および ARF6 欠損細胞株の樹立

当研究室の先行研究より作製した V 型 ATPase ATP6V₀D2 および ATP6V₁B2 欠損細胞の樹立は以下に示した方法で行われた。また、本研究では新たに ARF6 欠損細胞株の樹立を先行研究と同様に行った。

V 型 ATPase および ARF6 を標的とする pX330 プラスミドの作製

CRISPR/Cas9 システムは Cas9 スクレアーゼと gRNA の複合体が PAM 配列 (NGG 配列) を認識して結合し、その上流の gRNA と相補的な配列を切断する機構である。この切断後の修復時に一定の確率でフレームシフト変異が挿入されることを利用して V 型 ATPase および ARF6 の欠損細胞株を樹立した。まず、V 型 ATPase を構成する ATP6V₀D2 サブユニットや ATP6V₁B2 サブユニット、さらには ARF6 の開始コドン近辺に存在する PAM 配列上流 20 bp を gRNA 配列としてそれぞれ選択した。この 20 bp を含む Forward プライマーおよび Reverse プライマーを相補的に設計し (表 2.1)、これらプライマーと 10×T4 Kination Buffer (New England Biolabs) および 10 units/μL T4 PNK (New England Biolabs) を加え

で滅菌水で全量 10 μ L に調製してアニーリング反応を行った。アニーリング反応条件は、95°Cを 5 分間、プライマーTm 値+3°Cを 30 分間、プライマーTm 値を 30 分間、プライマーTm 値-3°Cを 30 分間行った後、氷上でインキュベートした。なお、アニーリング後の N 末端および C 末端は *Bbs* I の粘着末端になるようにプライマーを設計した (表 2.1)。その後、アニーリング産物は以下に示したクローニング操作を用いて制限酵素 *Bbs* I (Thermo) で処理した pX330 ヘライゲーションを行った。

pCAG-EGxxFP プラスミドの作製

CRISPR/Cas9 システムにより切断を受けた細胞を単離するためのレポータープラスミドを構築した。EGFP 遺伝子の中流に 2 連続のリピート配列を有する EGFP 発現プラスミド pCAG-EGxxFP (x がリピート配列) を使用し、このリピート配列間に標的配列を含む約 600 bp の V 型 ATPase ATP6V₀D2、ATP6V₁B2 および ARF6 の DNA 断片をそれぞれ挿入した。まず、リピート配列内に *Eco*R I、*Bam*H I および *Pst* I サイトがあることから、これらの制限酵素 (TOYOBO) で pCAG-EGxxFP を処理した。次に表 2.1 に示した制限酵素配列を付加したプライマーで約 600 bp の V 型 ATPase ATP6V₀D2、ATP6V₁B2 および ARF6 の DNA 断片を PCR 増幅した。PCR 反応組成はマウス由来 cDNA を鋳型として KOD (TOYOBO) のプロトコルに従い作製し、50 μ L に調製した。PCR 反応条件は、1 サイクル目は 95°Cを 5 分間とし、その後、95°Cを 30 秒間、50-60°Cを 30 秒間、68°Cを 1 分間の反応を 40 サイクル行った。得られた PCR 産物を *Eco*R I および *Bam*H I 消化し、以下に示したクローニング操作で pCAG-EGxxFP プラスミドへ組み込んだ。

FACS Sorting による 1 細胞由来 EGFP 陽性細胞の取得

構築した pX330 プラスミドと pCAG-EGxxFP プラスミドを RAW264.7 細胞へトランスフェクションした。RAW264.7 細胞は 1.0×10^7 cells/100 mL に調製し、Neon Transfection System (Life Technologies) に従って、これらプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。トランスフェクション 2 日後、培地を除去して PBS (Nacalai) で洗浄し、200 μ L の FACS Buffer [1% BSA (Nacalai)、2 mM EDTA (Nacalai) 含有 PBS] で懸濁し、FACS Aria (BD Bioscience) で図 2.1 の作用機序のもとゲノム編集が機能したと考えられる EGFP 陽性細胞の割合を測定した。その後、FACS Aria の Cell Sorting システムを利用して EGFP 陽性細胞を 96 well プレートにシングルナイズした。

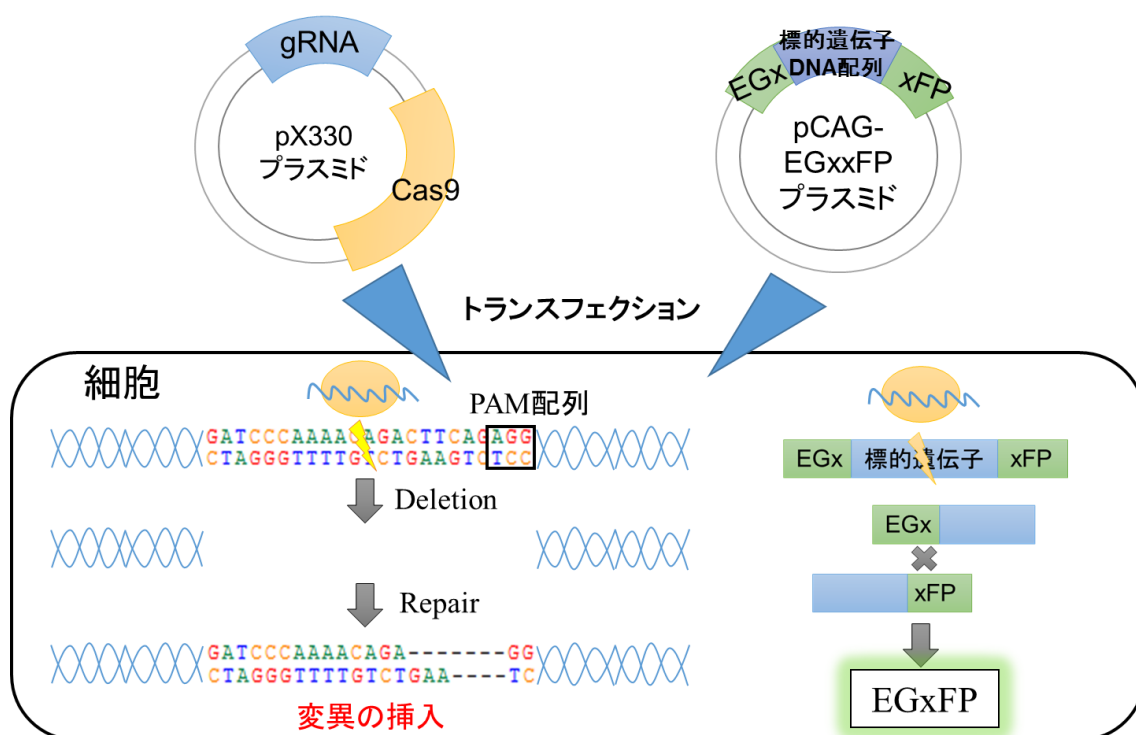


図 2.1 CRISPR/Cas9 システムを駆使した各欠損細胞株の樹立

Cas9 タンパク質および gRNA 複合体が PAM 配列を認識して結合し、その上流の gRNA と相補的な配列を切断する。この切断後の修復時に変異が挿入される。Cas9/ gRNA 複合体により切断修飾を受けると EGFP を発光するレポータープラスミドを用いることにより、EGFP 蛍光の消長を指標として、ゲノム上の標的遺伝子配列に変異の挿入が見られる細胞を選定することが可能となる[87]。

ゲノム配列の変異位置の決定

FACS ソーティングにより単離した RAW264.7 細胞を 24 well プレーットの細胞密度が 70-80 % になるまで培養を行った。その後、この細胞の一部を回収し、50 mM NaOH (Wako) を加えて 95°C で 1 時間インキュベートした後、1 M Tris-HCl (pH 8.0, Nacalai) で中和することで、ゲノム DNA の懸濁液を得た。このゲノム DNA を鋳型とし、標的配列を含む DNA 断片増幅用プライマー (表 2.2) を用いて Ex Taq HS (TaKaRa) で PCR を行った。PCR 反応組成は、Ex Taq HS のプロトコルに従い、全量 50 μ L に調製した。PCR 反応条件は、1 サイクル目は 98°C を 5 分間とし、その後 98°C を 30 秒間、55°C を 30 秒間、72°C を 1 分間の反応を 40 サイクル行った。PCR 産物を電気泳動後、標的バンドをゲル精製して得た DNA 断片を TOPO vector にライゲーションし、以下と同様のクローニング操作でプラスミドを構築して、表 2.3 に示したプライマーを用いてシーケンス解析を行うことで変異位置を決定した。

電気泳動およびゲル精製

電気泳動緩衝液として 1×TAE 緩衝液 (Nacalai) を使用した。DNA の染色のために 1/10000 倍容のミドリグリーン (日本ジェネティクス) を含む 0.8% アガロースゲルに 6×Loading buffer (TOYOBO) を加えた PCR 産物を注入し、100 V で電気泳動を行った。泳動後、UV を照射し、DNA バンドを確認した。目的の DNA 断片をゲルから切り出し、illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare) に従って、ゲル精製を行った。ゲル精製後の産物濃度を分光蛍光高度計 Nano drop (Thermo) で測定し、以下の実験に使用した。

ライゲーションおよび形質転換

制限酵素消化した pX330 および pCAG-EGxxFP を illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit で精製し、上記で作製した DNA 断片をそれぞれライゲーションした。ライゲーション反応は、反応液全量の 1/2 倍容の 2×Ligation Mix (日本 Gene)、50 ng の pX330 または pCAG-EGxxFP、ベクターのモル数の約 5 倍量に相当する各 DNA 断片を混合し、16℃にて 1 時間反応させた。その後、氷上で融解させた 30 µL の *E.coli* DH5α 株のコンピテントセル懸濁液をライゲーション反応液へ加えて穏やかに攪拌した。次に 42℃のヒートブロックで 1 分間加温した後、500 µL の LB 液体培地を加えて穏やかに混合し、37℃で 30 分間インキュベートした。この培養液を 100 µg/mL アンピシリン (Nacalai) 含有 LB 平板培地に塗付し、37℃で一晩培養を行った。

プラスミド抽出およびシーケンス解析

コロニーを形成した形質転換大腸菌を 100 µg/mL アンピシリン含有 LB 培地 2 mL に接種し、37℃で一晩振とう培養を行った。培養液の 1.5 mL を遠心分離し、上清を除去した後、プラスミド抽出および精製は Fast Gene Plasmid Mini Kit (日本ジェネティクス) に従って行った。精製したプラスミドの濃度を分光蛍光高度計 Nano drop で測定し、その 100-200 ng をシーケンス反応の鋳型として用いた。シーケンス反応は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABi) に従って調製し、得られた塩基配列は、日本 DNA データバンクの相同性検索ソフト BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) で既知遺伝子と比較することで、目的のプラスミドが構築されていることを確かめた。また GENETYX Ver.12 (GENETYX) を用いてマルチプルアラインメント解析を行うことにより、ゲノム編集による変異位置を特定した。なお、高濃度の発現プラスミドが必要な際は、目的プラスミドを含む形質転換大腸菌を再度 50 mL の 100 µg/mL アンピシリン含有 LB 液体培地に接種し、37℃で一晩振とう培養後、Nucleo Bond Xtra Midi kit (TaKaRa) に従ってプラスミドを抽出した。

2.3 発現プラスミドの構築

V 型 ATPase ATP6V₀D2、各 ARF ファミリーの発現プラスミドの作製

NCBI よりマウス由来の各遺伝子の塩基配列情報を入手し、開始コドンから終止コドンまでが増幅されるプライマーをそれぞれ設計した（なお、開始コドン上流および終止コドン下流に表 2.4 に示した制限酵素認識配列が付加されるようにプライマーは設計している）。これらプライマーを用いてマウス由来 cDNA を鋳型として上記に示した KOD (TOYOBO) のプロトコルに従って PCR を行った。PCR 産物を電気泳動およびゲル精製した後、あらかじめ該当する制限酵素で消化した pFlagCMV-2 又は pcDNA3.1-Myc プラスミドにライゲーションを行った。その後、上記方法 2.2 に示した操作でプラスミドを精製し、pFlag-CMV-2 又は pcDNA3.1-Myc プラスミド上のマルチクローニングサイト近辺の配列（表 2.5）を用いて、シーケンス解析を行った。また、本研究で使用した ARL ファミリーの発現プラスミドは pcDNA3.1-Myc プラスミドに組み込まれた当研究室で既に保持しているものを使用した。

ARF6 変異発現プラスミドの作製

ARF6 の 27 番目のトレオニン残基をアスパラギン残基に置換した機能欠損型変異プラスミド pFlag-CMV-2-ARF6 T27N の構築を行った（図 2.2）。まず、標的部位が目的のアミノ酸残基に置換するように変異を加えた Forward プライマーおよび Reverse プライマーを設計した（表 2.6）。PCR 反応はこれら設計したプライマーに加え、上記で作製した ARF6 の発現プラスミドおよび表 2.4 の ARF6 発現プラスミド用プライマーを使用して行った。野生型の ARF6 発現プラスミドを鋳型とし、*Hind*III 付加した開始コドンを含む Forward プライマーと変異 Reverse プライマーペア、*Eco*R I 付加した終止コドンを含む Reverse プライマーと変異 Forward プライマーペアでそれぞれ PCR を行った。PCR 産物を電気泳動後ゲル精製して、2 組のプライマーペアで増幅された 2 種類の DNA 断片を得た。次に、この 2 種類の DNA 断片の混合溶液を鋳型として、*Hind*III 付加した開始コドンを含む Forward プライマーおよび *Eco*R I 付加した終止コドンを含む Reverse プライマーのペアで再度 PCR を行うことで全長鎖の標的部位が目的のアミノ酸残基へと置換した DNA 断片を得た。PCR 反応組成、反応条件および PCR 後の実験操作については上記の方法と同様に行った。

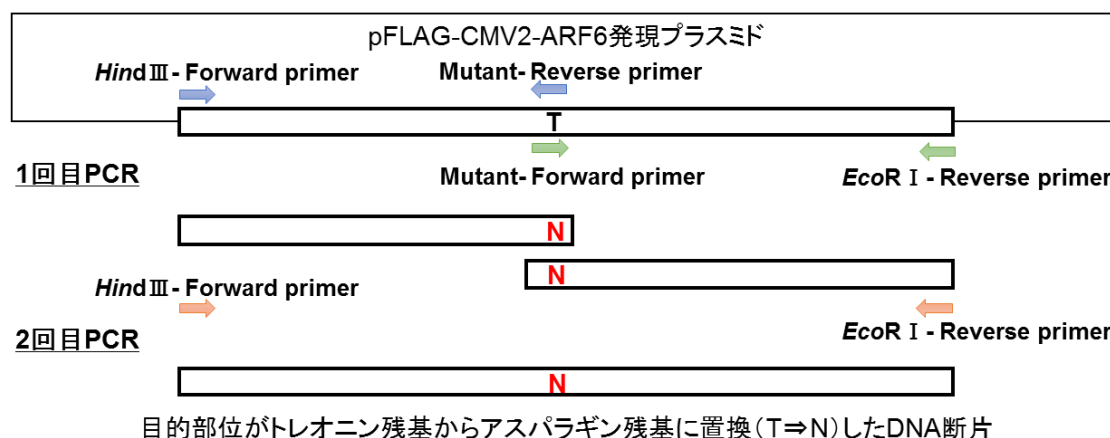


図 2.2 ARF6 T27N の DNA 断片の PCR 増幅の手順

野生型の ARF6 発現プラスミドを鋳型とし、*Hind*III 付加した開始コドンを含む Forward プライマーと変異 Reverse プライマーペア、*Eco*R I 付加した終止コドンを含む Reverse プライマーと変異 Forward プライマーペアで 1 回目の PCR を行った。次に、増幅した 2 種類の DNA 断片の混合溶液を鋳型として、*Hind*III 付加した開始コドンを含む Forward プライマーおよび *Eco*R I 付加した終止コドンを含む Reverse プライマーで 2 回目の PCR を行い、目的部位がアスパラギン残基に置換した ARF6 T27N の DNA 断片を得た。

2.4 V 型 ATPase 阻害剤 Bafilomycin A1 の投与

RAW264.7 細胞や BM-M、TLR4 発現 HEK293 細胞を 6 well プレート又は 24 well プレートに細胞密度が 50-70% になるように前培養した。この細胞上清に V 型 ATPase の阻害剤である Bafilomycin A1 を 10-100 nM の濃度で投与し、30 分間インキュベートした。反応後、Bafilomycin A1 含有培地を除去して新しい培地に交換し、各実験系に適用した。

2.5 PRRs リガンド刺激によるサイトカイン量の測定

PRRs 合成リガンドの投与

RAW264.7 細胞および BM-M に各 PRRs 合成リガンドを表 2.10 に示した濃度で培養上清に添加し、6 時間または 24 時間反応させることで、自然免疫応答を誘導した。なお、Immuno stimulatory DNA (ISD、配列：5'-TACAGATCTAC TAGTGATCTATGACTGATCTGTACATGATCTACA-3') のオリゴ合成は Greiner bio-one に受諾し、それ以外の合成リガンドはいずれも Invivogen より購入した。また、RLRs や細胞内 DNA センサーに細胞内刺激を施す際はトランスフェクション試薬である Lipofectamine 2000 (Life Technologies) を用いた。

各合成リガンドで自然免疫応答を誘導後、I 型 IFN の一つである *Ifnb1* および

炎症性サイトカインである *Il6*、*Il12p40*、*Tnfa* の転写量は RNA を抽出して RT-qPCR で定量し、細胞上清中の IL-6 タンパク質量は ELISA 法にて測定した。また、CRISPR/Cas9 システムにより欠損させた遺伝子および siRNA によりノックダウンさせた遺伝子の転写量についても RT-qPCR にて解析した。以下に RT-qPCR および ELISA 法の詳細な実験方法を記す。

表 2.10 各 PRRs の合成リガンドと刺激濃度

受容体	合成リガンド試薬	刺激濃度
TLR2	グラム陽性菌細胞壁成分: MALP-2	100 ng/mL
TLR3	合成二本鎖 RNA アナログ: Poly(I:C)	100 µg/mL
TLR4	グラム陰性菌細胞壁成分: リポ多糖 (LPS)	10-1000 ng/mL
TLR7	合成化学物質: R837 (別名: Imiquimod)	5 µg/mL
TLR9	合成 CpG DNA: ODN1668	1 µM
RLRs (RIG-I および MDA5)	Poly(I:C) + Lipofectamine 2000	どちらも等量の 1-4 µg
細胞内 DNA センサー	合成 DNA: ISD + Lipofectamine 2000	どちらも等量の 1-4 µg

RNA 抽出と cDNA 合成

各合成リガンドで刺激後、細胞を PBS で洗浄し、RNA 抽出試薬である TRIzol Reagent (Life Technologies) を 500 µL 加えて回収した。そのサンプルに対して 100 µL のクロロホルムを加えてボルテックス後、遠心分離 (13,000 rpm、4℃、15 min) を行い、上部水相を新しいエッペンチューブに移した。このクロロホルム抽出操作を再度繰り返した後、250 µL のイソプロパノール (Nacalai) を加えて、遠心分離 (13,000 rpm、4℃、20 min) した。上清を除去後、RNA ペレットを 70%エタノール (Nacalai) で洗浄し、遠心分離 (13,000 rpm、4℃、10 min) を行い、上清を除去して 70%エタノールが完全になくなるまで乾燥させた。乾燥 RNA ペレットを 10 µL の RNase-free 滅菌水 (Nacalai) で溶解し、分光蛍光高度計 Nano drop で RNA 濃度を測定した。

上記で精製した RNA 溶液の約 500 ng を逆転写用キットである ReverTraAce (TOYOBO) を使用して、cDNA を合成した。cDNA 反応溶液組成は、ReverTraAce のプロトコルに従い、全量 10 µL に調製した。逆転写反応条件は、1 サイクル目は 30℃を 10 分間とし、その後は 42℃を 1 時間、99℃を 5 分間の条件で行った。

RT-qPCR による各サイトカイン転写量の測定

RT-qPCR は Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies) を使用し、Light Cycler 96 (Roche) で測定した。反応溶液組成は、Power SYBR Green PCR Master Mix のプロトコルに従い、滅菌水を加えて 20 µL に調製した。使用したプ

ライマーを表 2.7 に示す。RT-qPCR 反応条件は、1 サイクル目は 95°C を 10 分間とし、その後 95°C を 10 秒間、60°C を 1 分間の反応を 45 サイクル行った。なお、内部標準として 18S rRNA と GAPDH 遺伝子を用いて補正し、 $\Delta\Delta C_t$ 法によりサイトカイン発現量を相対的に評価した。

ELISA 法によるサイトカイン量の測定

各合成リガンド反応後、培養上清中の IL-6、TNF α および IL-12p40 のタンパク質量を mouse DuoSet ELISA Development Kit (R&D) を用いて測定した。まず、Capture 抗体含有 PBS を 96 well ELISA プレートに 50 μ L/well 滴下し、一晩反応させた。翌日、ELISA Wash Buffer [0.05% Tween20 を含む PBS] で洗浄後、1% BSA 含有 PBS を 200 μ L/well で加えて 1 時間ブロッキングを行った。ELISA Wash Buffer で洗浄後、各サンプル上清およびスタンダードとして 2000 pg/mL の各スタンダード溶液を 2 倍毎で段階希釈した 8 つの検量線用コントロールサンプルをそれぞれ 50 μ L/well 滴下し、2 時間反応させた。その後、ELISA Wash Buffer で洗浄を行い、Detection 抗体および 1% BSA 含有 PBS を 50 μ L/well で加えて 2 時間反応させた。ELISA Wash Buffer で洗浄後、Streptavidin-HRP および 1% BSA 含有 PBS を 20 分間反応させた。ELISA Wash Buffer で洗浄し、ELISA POD Substrate TMB kit (Nacalai) 中の Staining 溶液および Substrate 溶液の等量混合溶液を 50 μ L/well ずつ加えて発光させ、コントロールサンプルの発光度合を目安として、その反応を 25 μ L の 1 M H₂SO₄ (Nacalai) で止めた。iMARK マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) を用いて 450 nm の吸光度を測定し、検量線を指標として各サンプル上清に含まれる IL-6 タンパク質量を算出した。一方、各合成リガンド反応後の培養上清中に含まれる IFN- β タンパク質量の測定は LumiKineTM mIFN- β (Invivogen) の方法に従って行った。

2.6 ルシフェラーゼレポーターアッセイ

IFN- β および NF- κ B プロモーター活性を Dual-Luciferase Reporter assay (Promega) により解析した。レポータープラスミドとして、IFN- β 又は NF- κ B プロモーター下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む pGL3-IFN- β -Luc と pGL3-NF- κ B-Luc プラスミド、さらに内部標準として恒常的にプロモーター活性を示す SV40 又は TK プロモーター下流にウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を含む pSV40-Luc と pTK-Luc プラスミドを使用した。RAW264.7 細胞又は TLR4 発現 HEK293 細胞を細胞密度 50-70% になるように 24 well プレートに前培養した。翌日、1 well あたり 100 ng の pGL3-IFN- β -Luc 又は pGL3-NF- κ B-Luc、10 ng の pSV40-Luc 又は pTK-Luc、250 ng の各発現プラスミドを混合し、OptiMEM (Life Technologies) を加えて 50 μ L に調製した。このプラスミド溶液に用いたプラスミド濃度の 3-4

倍濃度のポリエチレンジイミン (Polysciences, Inc.) を含む 50 μ L の OptiMEM を混合し、15 分間静置した。その後、細胞培養上清にこの混合液を滴下し、6 時間後培地を交換して一晩培養を行った。翌日、表 2.10 の濃度で各合成リガンドの刺激を行い、6 時間インキュベートした。その後、DMEM 培地を除去し、100 μ L の 5 \times Passive Lysis Buffer (Promega) を加えて細胞を溶解した。この細胞溶解液を 96 well プレートに 10 μ L ずつ分注し、各 well あたり 50 μ L の Luciferase Assay Reagent II (Promega)、50 μ L の Stop&Glo Reagent (Promega) の順に反応させ、ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼの活性を Multi-mode plate reader TriStar LB942 (Berthold) で検出した。ウミシイタケルシフェラーゼの活性を内部標準として、サンプルごとの遺伝子導入効率の違いを補正し、IFN- β および NF- κ B のプロモーター活性を算出した。

2.7 PRRs リガンド刺激によるシグナル伝達経路の活性化

PRRs 合成リガンドの投与

RAW264.7 細胞を細胞密度 50-70% になるように前培養した。翌日、Poly(I:C) 又は ISD を 0、1、3 時間、LPS を 0、0.5、1 時間又は 0、15、30 分間のタイムコースで刺激した。なお、各合成リガンドの濃度は上記操作 2.5 と同様の条件で行った。その後、細胞を PBS で洗浄し、細胞溶解液である RIPA buffer [0.5% DOC (Nacalai)、1% NP-40 (Nacalai)、150 mM NaCl (Nacalai)、0.1% SDS (Nacalai)、50 mM Tris-HCl (pH8.0)] を 200 μ L 加えることで細胞からタンパク質を抽出した。回収した各サンプルのタンパク質濃度は Pierce BCA protein assay kit (Thermo) のプロトコルに従い、BCA 法により定量した。

SDS-PAGE

各タンパク質抽出サンプルは SDS sample buffer [0.125 M Tris-HCl、4% SDS、20% Glycerol (Nacalai)、0.01% BPB (Nacalai)、0.2 M DTT (Nacalai)] で調製し、95 $^{\circ}$ C で 5 分間、熱処理を行った。その後、5-20% SDS ポリアクリルアミドゲル (アトー株式会社) および電気泳動緩衝液である SDS-PAGE Running buffer [0.25 M Tris、1% SDS、192 M Glycine (Nacalai)] を用いて 20 mA、80 分間の条件で電気泳動を行った。

ウェスタンブロット

SDS-PAGE により分離したタンパク質を PVDF メンブレン (Bio-Rad) および Transfer buffer [25 mM Tris、20% Methanol (Nacalai)、192 mM Glycine] を用いて 200 mA、60 分間の条件で転写を行った。転写後、メンブレンを 5% スキムミルク (Nacalai) に室温で 1 時間インキュベートすることで、ブロッキングを行っ

た。ブロッキング後、TBST buffer [0.5 M Tris、1.38 M NaCl、0.027 M KCl (Nacalai)、0.05 % tween20 (Nacalai)] で洗浄し、5% ウシ血清アルブミン (BSA) 含有 TBST buffer で希釈した各種一次抗体を 4℃で一晩反応させた。再度 TBST で洗浄後、5% スキムミルク含有 TBST buffer で希釈した二次抗体を加えて室温で 30 分間インキュベートした。その後、TBST buffer で洗浄し、メンブレンを発光試薬 Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer) の Enhanced Luminol Reagent および Oxidizing Reagent の等量混合溶液で反応させ、Image Quant LAS-4000 (GE Healthcare) で蛍光を検出した。なお、ARF6 KO 細胞のタンパク質レベルでの標的遺伝子の発現解析、下記操作 2.9 のレスキュー実験における標的遺伝子の発現解析および下記操作 2.12 の共免疫沈降についてもウェスタンブロットにて評価した。従って、これら実験も合わせて使用した一次抗体と二次抗体の希釈倍率を以下に示す。

一次抗体

- Rabbit anti-IRF3 monoclonal antibody (Cell signaling)、1/1000 倍
- Rabbit anti-Phospho-IRF3 monoclonal antibody (Cell signaling)、1/1000 倍
- Rabbit anti-NF-κB p65 monoclonal antibody (Cell signaling)、1/1000 倍
- Rabbit anti-Phospho- NF-κB p65 monoclonal antibody (Cell signaling)、1/1000 倍
- Mouse anti-ARF6 monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology)、1/500 倍
- Goat anti-β-Actin polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology)、1/1000 倍
- Rabbit anti-Flag monoclonal antibody (Sigma)、1/1000 倍
- Rabbit anti-Myc monoclonal antibody (Sigma)、1/1000 倍

二次抗体

- Rabbit HRP 標識 anti-IgG monoclonal antibody (Sigma)、1/10000 倍
- Mouse HRP 標識 anti-IgG monoclonal antibody (Sigma)、1/10000 倍
- Goat HRP 標識 anti-IgG monoclonal antibody (Sigma)、1/10000 倍

2.8 siRNA を用いたノックダウン解析

1.0×10⁷ cells/100 mL に調製した BM-DC または TLR4 発現 HEK293 細胞に 3 μM のスクランブル siRNA、m*Atp6v0d2* siRNA : 5'-AUUAUCUGCCACUCUCUUCUUCUGC-3'、h*ATP6V0D2* : 5'- CAGAUCUCUUUAAUGCCAUUCUGAU -3' (いずれも Life Technologies) をそれぞれ混合後、Neon Transfection System の方法に従ってエレクトロポレーションを行った。siRNA を導入して 2 日後、本操作で示した方法を用いて、RT-qPCR によるサイトカイン量の測定、LPS の細胞内取り込み量の評価および細胞膜上の TLR4 の発現量の FACS 解析を行った。

2.9 レトロウイルスプラスミドを用いた V0D2 KO 細胞のレスキュー実験

ウイルス用発現プラスミドの構築

実験操作 2.3 と同様のアッセイ系で表 2.8 に示した制限酵素認識配列を付加したプライマーを用いて V 型 ATPase ATP6V₀D2 サブユニットの全長鎖を PCR 増幅および精製を行った。次に該当する制限酵素で PCR 遺伝子断片および鋳型となる pMRX-Flag-puro プラスミドを消化後、ライゲーション反応を行い、上記に記載したクローニング操作のもと pMRX-Flag-ATP6V0D2-puro プラスミドの構築を試みた。なお、標的遺伝子配列の挿入の有無は pMRX-Flag-puro プラスミド上のマルチクローニングサイト近辺の配列（表 2.9）を用いて、シーケンス解析にて確かめた。

pMRX-Flag-ATP6V₀D2-puro 含有レトロウイルスの作成と細胞感染

レトロウイルスパッケージ細胞である Plat-E 細胞を 4×10^6 cells/10 cm dish で前培養し、細胞が接着後、6 μ g の pMRX-Flag-ATP6V₀D2-puro プラスミドと 1 μ g の pVSV-G (Addgene) の混合溶液と等倍量の Lipofectamine 2000 を 15 分間反応させ、トランスフェクションを行った。翌日新しい培地に交換し、36 時間インキュベートしてウイルスを産生させた後、その細胞上清を回収することで pMRX-Flag-ATP6V₀D2-puro プラスミドを取り込んだレトロウイルスを得た。その後、あらかじめ 5×10^5 cells/10 cm dish で前培養しておいた RAW264.7 細胞 (V0D2 KO) にレトロウイルス液を 0.22 μ M フィルターを通して添加することで感染させた。感染開始から 16 時間後、レトロウイルス液を除去して 4 μ g/mL ピューロマイシン含有 DMEM 培地を用いて抗生物質による薬剤セクションを行った。なお、pMRX-Flag-ATP6V₀D2-puro プラスミド上にはピューロマイシン耐性遺伝子が発現しているため、標的プラスミドを有したレトロウイルス感染細胞はこの環境下でも生存する。この選別過程を経て生き残った細胞に対して、上記操作で示した方法で RT-qPCR およびウェスタンブロットにて V 型 ATPase ATP6V₀D2 遺伝子の発現量を解析し、その発現が回復した細胞株を本研究のレスキュー実験に使用した。

2.10 FACS 解析による細胞膜上 TLR4 の発現量の測定

RAW264.7 細胞、BM-M および BM-DC を 24 well プレートに細胞密度が 50-70%になるように前培養した。翌日、実験条件に応じて Bafilomycin A1 前処理を行った後に LPS を 0、1、3、6 時間のタイムコースで刺激を行った。LPS 刺激後、培地を除去し、FACS Buffer で洗浄した後、100 μ L の FACS Buffer に懸濁した。次に免疫染色のため、0.5 μ L の抗 CD16/CD32 抗体 (BD Bioscience) を加え、氷上で 30 分間静置し、Fc 受容体のブロッキングを行った。その後、PE 標識マウ

ス由来抗 TLR4 抗体 (BD Bioscience) を 0.5 μ L 加え、氷上で 30 分間静置した。なお、BM-M と BM-DC においては骨髓系細胞やリンパ球などの複数種の免疫細胞が混合しているため、PE 標識マウス由来抗 TLR4 抗体と同時に各細胞のマーカー遺伝子の抗体を反応させることで FACS ゲートによりマクロファージと樹状細胞を分画して解析できるようにした。BM-M は FITC 標識マウス由来抗 CD11b 抗体 (BioLegend) および Percp/Cy5.5 標識マウス由来抗 F4/80 抗体 (BioLegend) をそれぞれ 0.5 μ L 加えて免疫染色を行うことにより、CD11b・F4/80 両陽性マクロファージ系細胞を FACS ゲートにより分画して解析を行った。一方、BM-DC は FITC 標識マウス由来抗 CD11b 抗体 (BioLegend) および APC 標識マウス由来抗 CD11c 抗体 (BioLegend) をそれぞれ 0.5 μ L 加えて免疫染色を行うことにより、CD11b・CD11c 両陽性樹状細胞を FACS ゲートにより分画して解析を行った。これら抗体で染色後、FACS Buffer で 3 回洗浄を行い、再度 300 μ L の FACS Buffer に懸濁したものをサンプルとし、FACS Accuri C6 (BD Bioscience) を用いて細胞膜上の TLR4 の発現量の解析を行った。

2.11 蛍光標識された合成リガンドの細胞内取り込み量の解析

RAW264.7 細胞および TLR4 発現 HEK293 細胞または野生型 HEK293 細胞を 24 well プレートに細胞密度が 50-70% になるように前培養した。翌日、RAW264.7 細胞に 0.5 μ g/ml の Rhodamine 標識 Poly(I:C) (Invivogen) 又は 5 ng/ml の Alexa488 標識 LPS (Thermo) を 1 時間反応させた。また、TLR4 発現 HEK293 細胞は上記 2.6 の方法による発現プラスミドの導入あるいは上記 2.8 の方法による siRNA の導入後、実験条件に応じて Bafilomycin A1 前処理を施し、5 ng/ml の Alexa488 標識 LPS を 1 時間反応させた。これら刺激後の培地を除去した後に FACS Buffer で 3 回洗浄し、300 μ L の FACS Buffer に懸濁した。調製したサンプルは FACS Accuri C6 (BD Bioscience) を用いて合成リガンドの細胞内取り込み量を評価した。

2.12 V 型 ATPase サブユニットと ARF6 の共免疫沈降

10 cm dish に HEK293T 細胞を細胞密度 50-70% 程度になるように前培養を行い、Lipofectamine 2000 を用いて Flag タグを付加した V 型 ATPase サブユニット (ATP6V₀D2 又は ATP6V₀C) の発現プラスミドおよび Myc タグを付加した ARF6 発現プラスミドを細胞へ導入した (プラスミド : Lipofectamine 2000 = 1:2 の割合でそれぞれ混合)。24 時間後、プレートに接着した細胞をピペッティングにより剥離させた細胞懸濁液を 15 mL ファルコンチューブへと移し、遠心分離 (2,000 rpm、4°C、5 min) を行った。細胞を PBS で洗浄後、細胞溶解液である HOMO buffer [150 mM NaCl、5 mM EDTA、25 mM Tris-HCl pH 8.0、0.2% Triton-X] を

300 μ L 添加し、細胞を完全に溶解させるため超音波で粉碎して遠心分離（7,500 rpm、4°C、15 min）を行った。以上の過程で得られた細胞上清の 200 μ L を別の 1.5 mL エッペンドルフチューブへと移し、50% Myc ビーズ（Santa Cruz Biotechnology）を 20 μ L 添加して 4°C で一晩ローテーターを用いて攪拌した。翌日、PBS で Myc ビーズを 3 回洗浄し、上記で記載した方法で SDS-PAGE およびウェスタンブロットを行った。なお本操作に一次抗体として抗ラビット抗 Flag モノクローナル抗体および抗ラビット抗 Myc モノクローナル抗体を使用し、HRP 標識抗ラビット抗 IgG モノクローナル抗体を二次抗体として使用した。

2.13 エンドトキシン・トレランスの誘導

RAW264.7 細胞および BM-M を 6 well プレートに細胞密度が 50-70% になるように前培養した。翌日、これら細胞に 10 ng/mL の濃度で LPS 刺激を行い、18 時間反応させた。その後、培地を除去し、PBS で 5 回洗浄して一回目に投与した LPS を可能な限り除去した後、100 ng/mL の濃度で 2 回目の LPS 刺激を 6 時間行った。このタイムコースで 2 度に渡る LPS 刺激を施すことで、エンドトキシン・トレランスを誘導させ、上記に示したアッセイ系により、RT-qPCR および ELISA 法によるサイトカイン量や NF- κ B p65 のリン酸化量の測定を行った。

2.14 統計処理

実験成績は、mean \pm SD で表した。2 群間の比較は、Student の unpaired *t* 検定を使用し、3 群間以上の比較は one-way ANOVA または two-way ANOVA 多重比較検定後、Tukey 検定を用いた。P < 0.05 の場合を有意差有りと判定した。

第3章 結果

3.1 各 V 型 ATPase 欠損細胞株は欠損標的遺伝子の ATP6V₀D2 又は ATP6V₁B2 の発現量が低下する

当研究室の先行研究において、CRISPR/Cas9 システムを用いて V 型 ATPase ATP6V₀D2 サブユニット又は ATP6V₁B2 サブユニットを欠損する V0D2 KO および V1B2 KO RAW264.7 細胞の樹立に成功している（参考図 1）。また、エンドソーム pH 指示薬であるアクリジンオレンジ染色実験から、これら欠損細胞株のエンドソーム内腔の酸性化が阻害されていることも明らかとなっている（参考図 2）。しかしながら、V0D2 KO および V1B2 KO 細胞のそれぞれの欠損させた遺伝子の発現量の具体的な解析はなされていないことから、本研究ではまず、V 型 ATPase ATP6V₀D2 および ATP6V₁B2 遺伝子の発現量を RT-qPCR にて測定した。その結果、これら欠損細胞株は野生型細胞株と比較してそれぞれの欠損遺伝子の発現量が顕著に減少していることが分かった（図 3.1）。以上のことから、標的遺伝子の機能が低下した細胞株が樹立されたと考えられる。

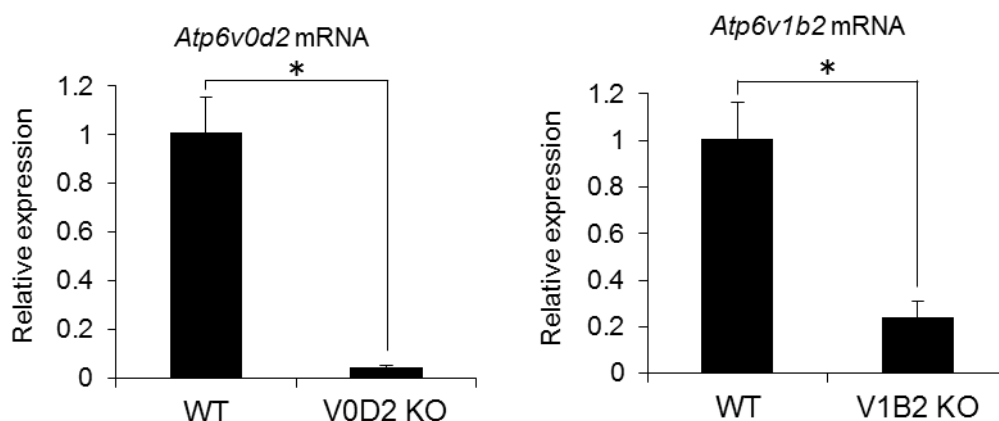


図 3.1 V 型 ATPase 欠損細胞株の各欠損遺伝子の発現解析

V 型 ATPase 欠損細胞株の各欠損遺伝子（*Atp6v0d2* および *Atp6v1b2*）の mRNA 量を RT-qPCR により測定した（ $n = 3$ 、 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 、*: t -test $p < 0.05$ ）。

3.2 V 型 ATPase 欠損細胞は核酸認識型 TLR（TLR3、TLR7、TLR9）を介した自然免疫応答が減弱する

核酸認識型 TLR はエンドソーム内 pH 環境化（pH6.0~6.5）で作用するカテプシンファミリーやアスパラギンエンドペプチダーゼといったプロテアーゼにより N 末端領域の切断修飾を受けることで成熟化し、下流にシグナルが誘導可能となる[49-52]。そこで、当研究室の先行研究では、V0D2 KO および V1B2 KO 細

胞を用いて、核酸認識型 TLR (TLR3、TLR7 および TLR9) を介した自然免疫応答について I 型 IFN の一つである *Ifnb1* の転写量を指標に解析が行われた。その結果、従来考えられてきた通り、各欠損細胞株は野生型細胞株と比べ、*Ifnb1* 転写量の減弱が認められた (参考図 3A)。また、先行研究および本研究より *Ifnb1* の転写因子である IRF3 のリン酸化量をウェスタンブロットにより検出したところ、Poly(I:C)による TLR3 刺激誘導後の野生型細胞では IRF3 のリン酸化量が刺激時間依存的に著しく促進されるのに対し、V0D2 KO 細胞では野生型細胞と比較して IRF3 のリン酸化が抑えられることが明らかとなった (参考図 3B, 図 3.2A)。これらを踏まえ、本研究ではまず IFN- β および炎症性サイトカインにも視野を広げ、ELISA 法を用いて V0D2 KO 細胞におけるこれらタンパク質産生量の解析を試みた。その結果、TLR3、TLR7、TLR9 の合成リガンド (それぞれ Poly(I:C)、R837、ODN1668) の刺激により、IFN- β および TNF α のタンパク質産生量は野生型細胞と比べて有意に減少することが確認された (図 3.2B)。さらに、炎症性サイトカイン遺伝子転写を調節する転写因子 NF- κ B の活性化をルシフェラーゼレポーターアッセイにより評価した。NF- κ B 遺伝子プロモーター下で制御されるルシフェラーゼレポータープラスミドを V0D2 KO 細胞および野生型細胞に導入し、各核酸認識型 TLR の合成リガンドで刺激後のルシフェラーゼ量を検出したところ、V0D2 KO 細胞は野生型細胞と比較してプロモーター活性の減弱が認められた (図 3.3C)。これらのことから、V 型 ATPase の機能低下に伴い、I 型 IFN や炎症性サイトカインの産生が抑制されることが明らかとなった。

次に *Ifnb1* 遺伝子プロモーター下で制御されるルシフェラーゼレポータープラスミドと共に V 型 ATPase ATP6V₀D2 発現プラスミドを V0D2 KO 細胞に導入し、ルシフェラーゼの発現を定量することで、レスキュー実験を試みた。その結果、V0D2 KO 細胞において Poly(I:C)による TLR3 刺激誘導後の *Ifnb1* プロモーター活性は野生型細胞と比べて有意に低下するものの、V0D2 KO 細胞に V 型 ATPase ATP6V₀D2 発現プラスミドを導入することで、*Ifnb1* プロモーター活性の低下が抑制されることが分かった (図 3.2D)。したがって、欠損させた V 型 ATPase ATP6V₀D2 の機能を戻すことで、核酸認識型 TLR 依存的な *Ifnb1* の誘導能が回復すると考えられた。また、エンドソーム内腔酸性化阻害剤である Bafilomycin A1 処理においても同様の結果が得られるか検討を行った。Bafilomycin A1 処理後の野生型細胞に Poly(I:C)、R837 および ODN1668 の刺激をそれぞれ施したところ、*Ifnb1* の転写量は Bafilomycin A1 未処理の細胞株と比べ、有意に減少することが RT-qPCR を用いた解析により明らかとなった (図 3.2E)。加えて、正常細胞であるマウス骨髄由来マクロファージ (BM-M) においても Poly(I:C)刺激後の *Ifnb1* の転写活性量が Bafilomycin A1 投与により同様に抑えられることが分かった (図 3.2F)。以上のことから、エンドソーム内 pH 環境が核酸認識型 TLR 依存的な抗

ウイルス応答ならびに炎症応答に重要な役割を担うことが示唆された。

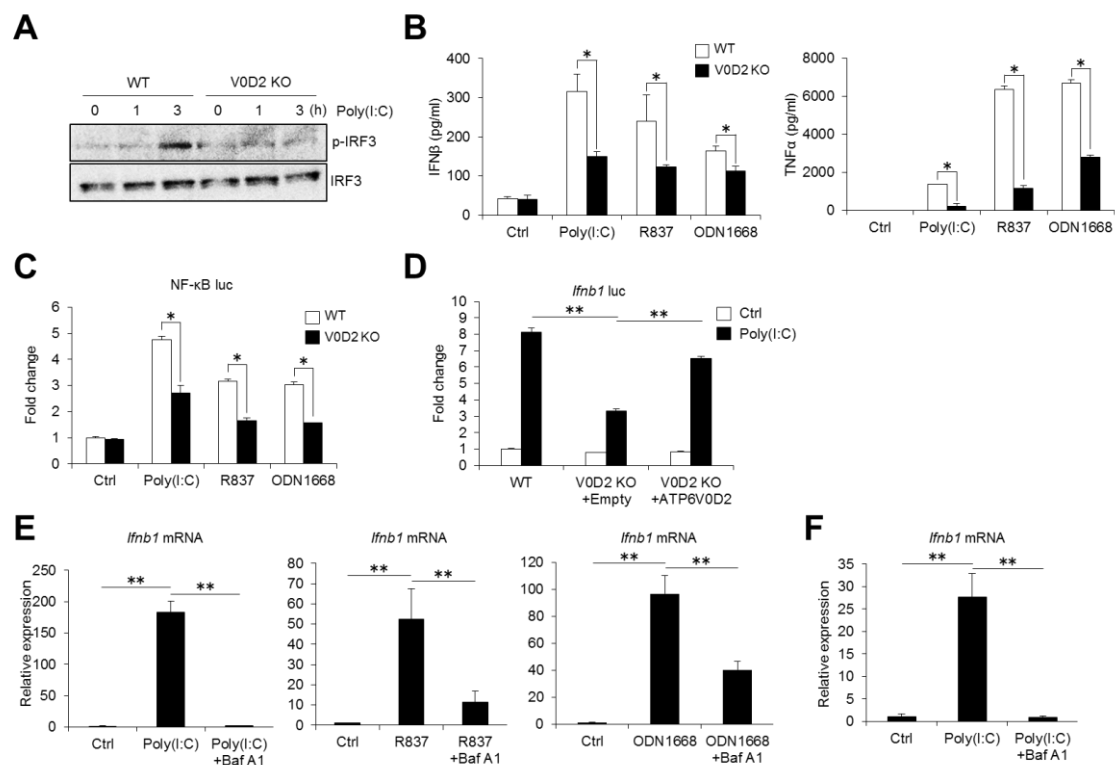


図 3.2 V 型 ATPase 欠損細胞株の核酸認識型 TLR 依存的な自然免疫応答

A : 野生型 RAW264.7 細胞および V0D2 KO 細胞に TLR3 リガンドである Poly(I:C) を 0、1、3 時間で刺激し、IRF3 のリン酸化量をウェスタンブロットにより検出した。

B : 野生型 RAW264.7 細胞と V0D2 KO 細胞に TLR3、TLR7、TLR9 リガンド (Poly(I:C)、R837、ODN1668) を 6 時間刺激後、細胞上清中の IFN-β および TNFα のタンパク質量を ELISA 法により測定した (n = 3、mean ± SD、*: t-test $p < 0.05$)。

C : 野生型 RAW264.7 細胞および V0D2 KO 細胞に NF-κB 遺伝子プロモーター下で制御されるルシフェラーゼレポータープラスミドを導入し、6 時間の TLR3、TLR7、TLR9 リガンド (Poly(I:C)、R837、ODN1668) 刺激前後におけるルシフェラーゼの発現量を測定した (n = 3、mean ± SD、*: t-test $p < 0.05$)。

D : 野生型 RAW264.7 細胞および V0D2 KO 細胞に *Ifnb1* 遺伝子プロモーター下で制御されるルシフェラーゼレポータープラスミドとともに V 型 ATPase ATP6V0D2 発現プラスミドを導入し、6 時間の Poly(I:C) 刺激前後におけるルシフェラーゼの発現量を測定した (n = 3、mean ± SD、**: one-way ANOVA および Tukey test $p < 0.05$)。

E, F : 野生型 (E) RAW264.7 細胞、(F) BM-M および Bafilomycin A1 投与を施した各々の細胞に TLR3、TLR7、TLR9 リガンド (Poly(I:C)、R837、ODN1668) で刺激をそれぞれ

れ施し、6 時間反応後、*Ifnb1* の mRNA 量を RT-qPCR により測定した (n = 3、mean ± SD、**: one-way ANOVA および Tukey test $p < 0.05$)。

3.3 エンドソーム内 pH 環境は細胞内 PRRs (RLR ファミリーおよび細胞内 DNA センサー) を介した自然免疫応答に影響を及ぼさない

細胞内 PRRs である RLR ファミリーや細胞内 DNA センサーを介した自然免疫応答にエンドソーム内 pH 環境が関与するかを調べるため、V0D2 KO および V1B2 KO 細胞に Poly(I:C) 又は合成 DNA である ISD を細胞内にトランスフェクション刺激し、*Ifnb1* と炎症性サイトカインの一種である *Il6* の発現量を RT-qPCR にて測定した。なお、Poly(I:C) は細胞外から刺激を施すと TLR3 リガンドとして作用する一方、トランスフェクション試薬を用いて細胞内に導入すると、RLR ファミリーのリガンドとして作用することが知られている[88]。細胞内にこれらリガンド刺激を施した結果、野生型細胞と V0D2 KO 細胞間で *Ifnb1* と *Il6* の発現量に変化は認められなかった (図 3.3A)。また、同様のリガンド刺激後の IL-6 タンパク質量を ELISA 法にて測定したが、この場合も変化は認められなかった (図 3.3B)。さらに Bafilomycin A1 処理を施した細胞においても RLR ファミリー刺激依存的な *Ifnb1* および *Il6* の発現量に変化は確認されなかった (図 3.3C)。次にシグナル伝達経路の活性化を解析するため、Poly(I:C) 又は ISD トランスフェクション刺激後の IRF3 のリン酸化量を測定したが、野生型細胞と V0D2 KO 細胞間で変化は認められなかった (図 3.3D, E)。これらのことから、エンドソーム内 pH 環境は細胞内 PRRs 依存的な自然免疫応答には影響を及ぼさないと考えられる。

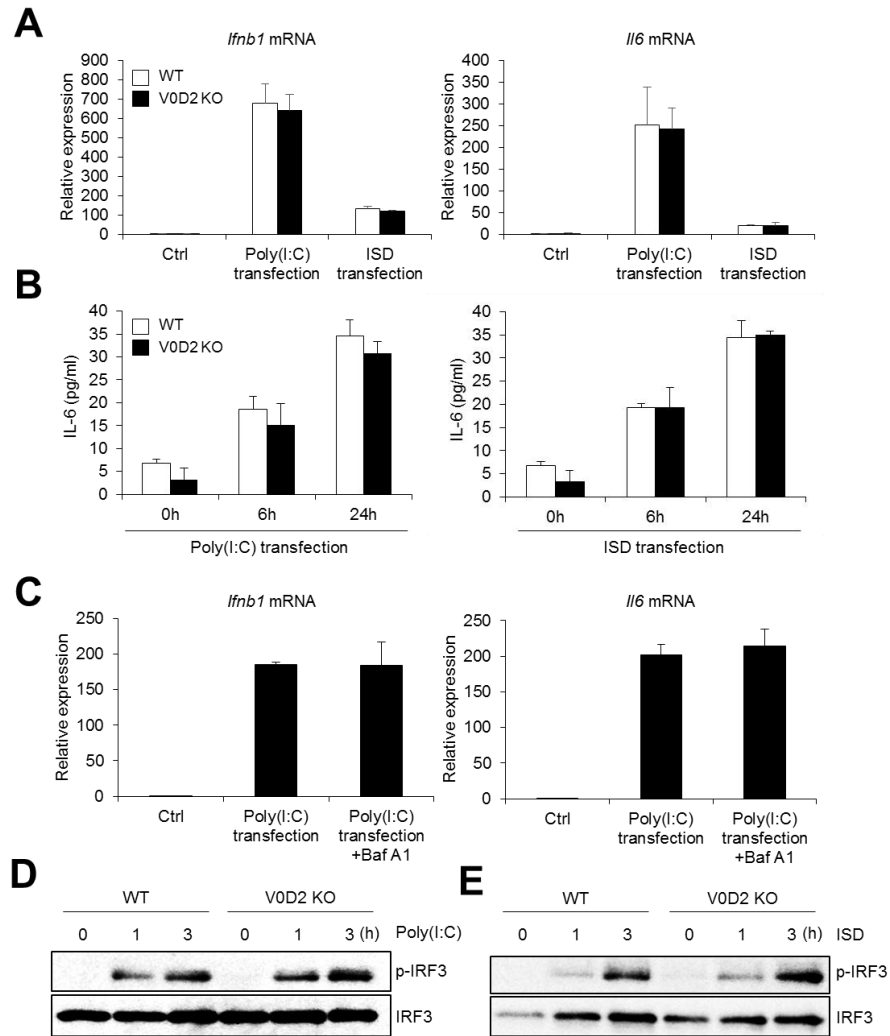


図 3.3 V 型 ATPase 欠損細胞株の細胞内 PRRs を介した自然免疫応答

A : 野生型 RAW264.7 細胞と V0D2 KO 細胞に Poly(I:C)および ISD を細胞内にそれぞれ 6 時間刺激後、*Ifnb1* および *Il6* の mRNA 量を RT-qPCR により測定した (n = 3、mean ± SD)。

B : 野生型 RAW264.7 細胞と V0D2 KO 細胞に Poly(I:C)および ISD を細胞内にそれぞれ 0、6、24 時間で刺激を施した後、上清中の IL-6 タンパク質量を ELISA 法により測定した (n = 3、mean ± SD)。

C : 野生型 RAW264.7 細胞および Bafilomycin A1 投与を施した細胞に Poly(I:C)を細胞内に刺激して 6 時間反応後、*Ifnb1* と *Il6* の mRNA 量を RT-qPCR により測定した (n = 3、mean ± SD)。

D, E : 野生型 RAW264.7 細胞および V0D2 KO 細胞に (D) Poly(I:C)および (E) ISD を細胞内にそれぞれ 0、1、3 時間で刺激し、IRF3 のリン酸化量をウェスタンブロットにより検出した。

3.4 V 型 ATPase 欠損細胞は TLR4 依存的な炎症性サイトカインの産生は亢進するが、抗ウイルス応答は減弱する

次に、エンドソーム内 pH 環境が細胞膜上に局在する TLR ファミリーに与える影響について着目した。当研究室の先行研究において、V0D2 KO および V1B2 KO 細胞は LPS 刺激により、*Il6* の転写量は野生型細胞と比較して顕著に増加するのに対し、*Ifnb1* の転写量は減弱することが明らかとなった（参考図 4A, B）。また、V0D2 KO 細胞では LPS 刺激後の NF- κ B p65 サブユニットのリン酸化量が野生型細胞と比べて減少することが分かった（参考図 4C）。そこで本研究では、V0D2 KO 細胞を用いて IL-6 以外の炎症性サイトカインの産生量ならびに TLR4 と同じく細胞膜上で発現する TLR2 を介した自然免疫応答にも着目し、解析を行った。V0D2 KO 細胞に LPS および TLR2 の合成リガンドである MALP-2 刺激をそれぞれ施し、各炎症性サイトカイン（IL-6、IL-12p40、TNF α ）のタンパク質量を ELISA 法にて測定した結果、V0D2 KO 細胞における TLR4 刺激後の各炎症性サイトカインの産生量が野生型細胞と比べて有意に亢進するのに対し、TLR2 刺激時は両細胞間に変化は認められなかった（図 3.4A）。さらに、同様の方法で IFN- β のタンパク質量を測定した結果、V0D2 KO 細胞の TLR4 を介した IFN- β の産生量が低下する一方、TLR2 依存的な IFN- β の産生量は V0D2 KO 細胞と野生型細胞で変化は確認されなかった（図 3.4A）。以上の先行研究および本研究で得られた知見より、以降の実験では TLR4 とエンドソーム pH 環境に関する解析を中心的に行うこととした。

まず、LPS 刺激後における IRF3 のリン酸化量をウェスタンブロットにより検出したところ、V0D2 KO 細胞で野生型細胞と比べて IRF3 のリン酸化量が減少することを確認した（図 3.4B）。次に、NF- κ B レポータープラスミドとともに V 型 ATPase ATP6V₀D2 発現プラスミドを V0D2 KO 細胞に導入し、ルシフェラーゼの発現を定量した。その結果、V0D2 KO 細胞において LPS 刺激誘導後の NF- κ B プロモーター活性は野生型細胞と比較して上昇するものの、その欠損細胞に V 型 ATPase ATP6V₀D2 発現プラスミドを導入して機能を回復させることで、NF- κ B プロモーター活性は野生型細胞と同程度まで低下することが分かった（図 3.4C）。さらに、V0D2 KO 細胞にレトロウイルスベクターを用いて FLAG タグを付加した ATP6V₀D2 遺伝子を導入することによってもレスキュー実験を行った。その結果、レトロウイルス感染後の V0D2 KO 細胞は ATP6V₀D2 遺伝子の発現が誘導されていることがウェスタンブロットおよび RT-qPCR を用いた発現解析から分かり、その発現の回復に応じて LPS 刺激後の *Il6* および *Ifnb1* の転写量の表現型が野生型細胞へと近づくことが明らかとなった（図 3.4D, E）。したがって、V 型 ATPase ATP6V₀D2 が TLR4 依存的な自然免疫応答を制御する上で重要な役割を担うことが示唆された。

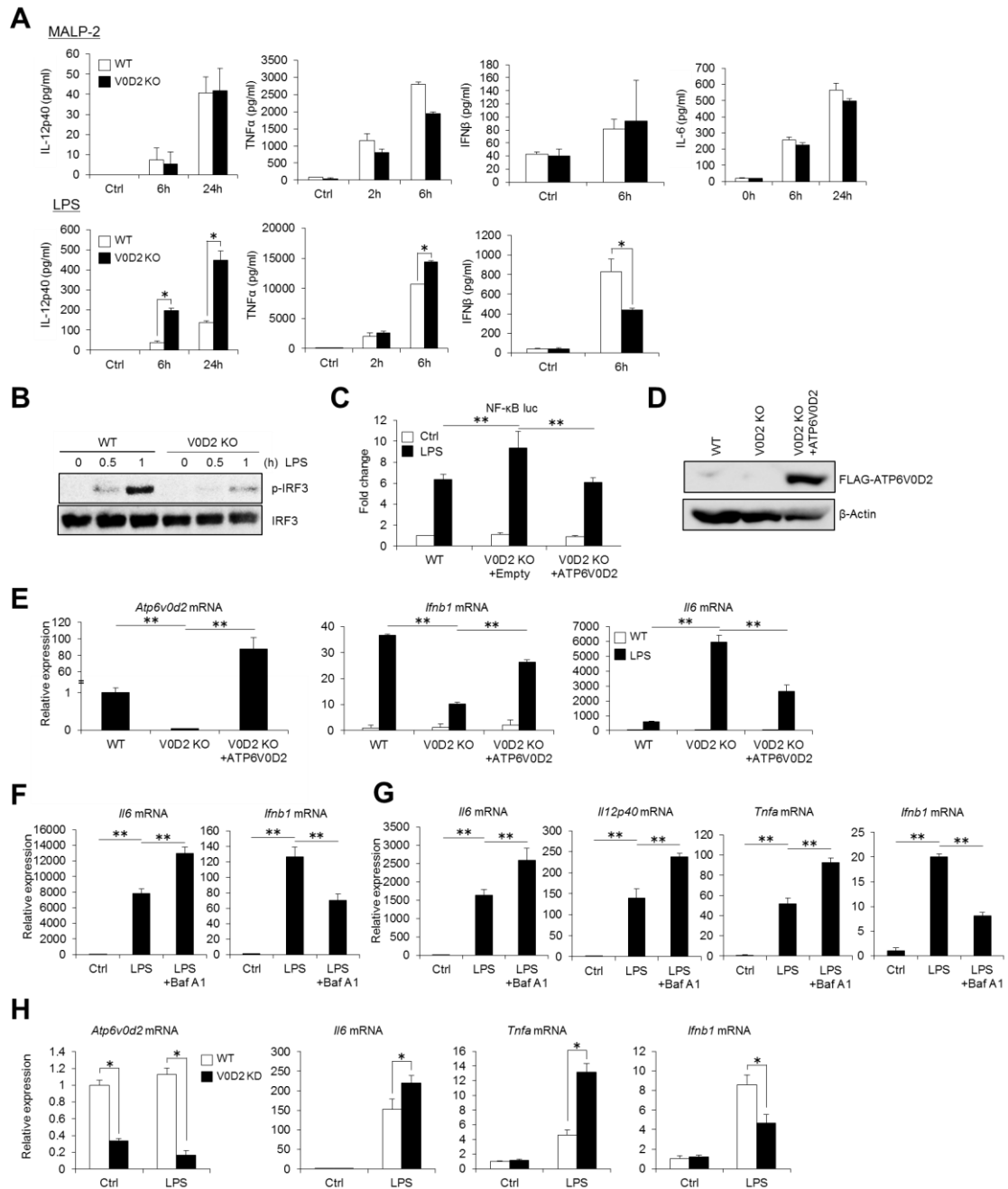


図 3.4 V 型 ATPase 欠損細胞株の TLR4 依存的な自然免疫応答

A: 野生型 RAW264.7 細胞と V0D2 KO 細胞に TLR2 リガンドである MALP-2 または TLR4 リガンドである LPS で刺激後、上清中の IL-12p40、TNFα、IFN-β および IL-6 タンパク質を ELISA 法により測定した (n = 3、mean ± SD、*: t-test $p < 0.05$)。

B: 野生型 RAW264.7 細胞および V0D2 KO 細胞に LPS を 0、0.5、1 時間で刺激し、IRF3 のリン酸化量をウェスタンブロットにより検出した。

C: 野生型 RAW264.7 細胞および V0D2 KO 細胞に NF-κB プロモーター下で制御される

ルシフェラーゼレポータープラスミドと実験条件に応じて V 型 ATPase ATP6V₀D2 発現プラスミドを導入し、6 時間の LPS 刺激前後におけるルシフェラーゼの発現量を測定した (n = 3、mean ± SD、**: one-way ANOVA および Tukey test $p < 0.05$)。

D: 野生型 RAW264.7 細胞、V0D2 KO 細胞および FLAG 標識した V 型 ATPase ATP6V₀D2 発現プラスミドを導入した V0D2 KO 細胞の標的遺伝子の発現量を FLAG 抗体によるウェスタンブロットにて検出した。

E: 野生型 RAW264.7 細胞、V0D2 KO 細胞および FLAG 標識した V 型 ATPase ATP6V₀D2 発現プラスミドを導入した V0D2 KO 細胞に LPS を刺激して 6 時間反応させ、*Atp6v0d2*、*Il6* および *Ifnb1* の mRNA 量を RT-qPCR により測定した (n = 3、mean ± SD、**: one-way ANOVA および Tukey test $p < 0.05$)。

F: 野生型 RAW264.7 細胞および Bafilomycin A1 投与を施した同細胞に LPS を刺激して 6 時間反応後、*Il6* と *Ifnb1* の mRNA 量を RT-qPCR により測定した (n = 3、mean ± SD、**: one-way ANOVA および Tukey test $p < 0.05$)。

G: BM-M および Bafilomycin A1 投与を施した同細胞に LPS を刺激して 6 時間反応後、*Il6*、*Il12p40*、*Tnfa* および *Ifnb1* の mRNA 量を RT-qPCR により測定した (n = 3、mean ± SD、**: one-way ANOVA および Tukey test $p < 0.05$)。

H: V 型 ATPase ATP6V₀D2 遺伝子を siRNA によりノックダウンした BM-DC (V0D2 KD) およびスクランブル siRNA を導入した同細胞に LPS 刺激を 6 時間施した後、*Il6*、*Tnfa* および *Ifnb1* の mRNA 量を RT-qPCR により測定した (n = 3、mean ± SD、*: *t*-test $p < 0.05$)。

次に、Bafilomycin A1 処理においても同様の結果が得られるかどうかの検討を行った。Bafilomycin A1 処理を施した野生型 RAW264.7 細胞に LPS 刺激を施し、*Il6* と *Ifnb1* の転写量を RT-qPCR にて測定した結果、*Il6* の転写量は増加し、逆に *Ifnb1* の転写量は減少することが分かった (図 3.4F)。

次に、正常細胞である BM-M とマウス骨髄由来樹状細胞 (BM-DC) を使用し、同様の現象が誘導されるかを検討した。Bafilomycin A1 処理を施した BM-M に LPS 刺激を行い、炎症性サイトカインである *Il6*、*Il12p40* および *Tnfa* の転写量を測定した結果、これら遺伝子の転写量は Bafilomycin A1 処理前と比較して有意に増加するのに対し、*Ifnb1* の転写量は抑制されることが分かった (図 3.4G)。さらに、ATP6V₀D2 遺伝子を siRNA によりノックダウンした BM-DC (V0D2 KD) においてもコントロール (スクランブル siRNA 導入時) と比較して LPS 刺激後の *Il6* および *Tnfa* の転写量は亢進する一方、*Ifnb1* の転写量は減弱することが明らかとなり、正常マクロファージや樹状細胞の場合でも同様の表現型を有すると考えられた (図 3.4H)。以上のことから、V 型 ATPase を介したエンドソーム内 pH 環境は核酸認識型 TLR のみならず TLR4 依存的な自然免疫応答の制御に

も重要な役割を担うことが示唆された。

3.5 V 型 ATPase 欠損細胞は TLR4 のエンドサイトーシスに異常が生じ、LPS の細胞内取り込み量が減少する

V0D2 KO および V1B2 KO 細胞において、TLR4 依存的な炎症性サイトカインの転写量が増強し、対照的に *Ifnb1* の転写量が抑制されたことを受け、TLR4 のエンドサイトーシスにエンドソーム pH 環境が何らかの重要な制御機構を有している可能性が考えられた。つまり、これらの欠損細胞株は TLR4 の内在化が抑制された結果、細胞膜上の TLR4 依存的な炎症応答を誘導する MyD88-TIRAP 経路が活性化されたのに対し、エンドソーム TLR4 依存的な抗ウイルス応答を誘導する TRIF-TRAM 経路が減退したという仮説を立てた。そこで、LPS 刺激前後における細胞膜上の TLR4 の発現量を蛍光標識した抗 TLR4 抗体を用いて染色し、FACS 解析にて解析を行った。その結果、LPS 未刺激条件では、V0D2 KO 細胞と野生型細胞で同程度の TLR4 が細胞膜上に発現していた (図 3.5A, B)。また、野生型細胞に LPS 刺激を施すと、今回測定した全てのタイムコースで未刺激条件と比較して細胞膜上の TLR4 の発現が減退し、LPS 刺激依存的に TLR4 の内在化が誘導された (図 3.5A, B)。しかしながら、V0D2 KO 細胞では、LPS 未刺激条件と比べると細胞膜上の TLR4 の発現は減少するものの、一部の TLR4 が細胞膜上に留まることが示唆された (図 3.5A, B)。さらに Bafilomycin A1 処理を行った野生型細胞においても同様に細胞膜上 TLR4 の発現が LPS 刺激後に Bafilomycin A1 未処理の野生型細胞のように減退せず、部分的に TLR4 が細胞膜上に留まることが分かった (図 3.5A, B)。また、正常細胞である BM-M および BM-DC においても同様の表現型が得られるかどうかの解析を試みた。BM-M は M-CSF でマクロファージに分化誘導しているものの、その細胞中にはなお骨髄系細胞やリンパ球などの複数種の免疫細胞が混在しているため、マクロファージ細胞表面マーカーである CD11b および F4/80 蛍光抗体を反応させてゲートした CD11b・F4/80 両陽性細胞において同様のアッセイ系を適用後、TLR4 の細胞動態を評価した。その結果、Bafilomycin A1 処理後の BM-M は Bafilomycin A1 未処理時と比較して LPS 刺激後の細胞膜上 TLR4 の発現量が高い傾向にあることが分かった (図 3.5C)。さらに、BM-DC は V 型 ATPase ATP6V₀D2 遺伝子を標的とした siRNA を導入してノックダウンを施した後に樹状細胞表面マーカーである CD11b および CD11c 蛍光抗体を用いて解析を行った。その結果、V 型 ATPase ATP6V₀D2 がノックダウンされた CD11b・CD11c 両陽性細胞は LPS 刺激を施してもコントロール (スクランブル siRNA 導入時) で観察される細胞膜上 TLR4 の発現量の減少は認められず、TLR4 の細胞膜上の発現が保持されていることが分かった (図 3.5D)。

次に、野生型および V0D2 KO 細胞に蛍光標識した LPS で刺激することで、TLR4 の細胞内へのリガンド取り込み量を FACS 解析にて評価した。その結果、V0D2 KO 細胞は野生型細胞と比べて LPS の細胞内取り込み量が低下することが確認された (図 3.5E)。なお、蛍光標識した Poly(I:C) の取り込み実験も同様に行ったが、野生型細胞と V0D2 KO 細胞間に変化は認められなかった (図 3.5F)。これらのことから、V 型 ATPase の機能低下から生じるエンドソーム内 pH の酸性化阻害により、LPS 刺激後の TLR4 の内在化に異常をきたし、TLR4 依存的なサイトカイン産生に影響を与えたと考えられた。

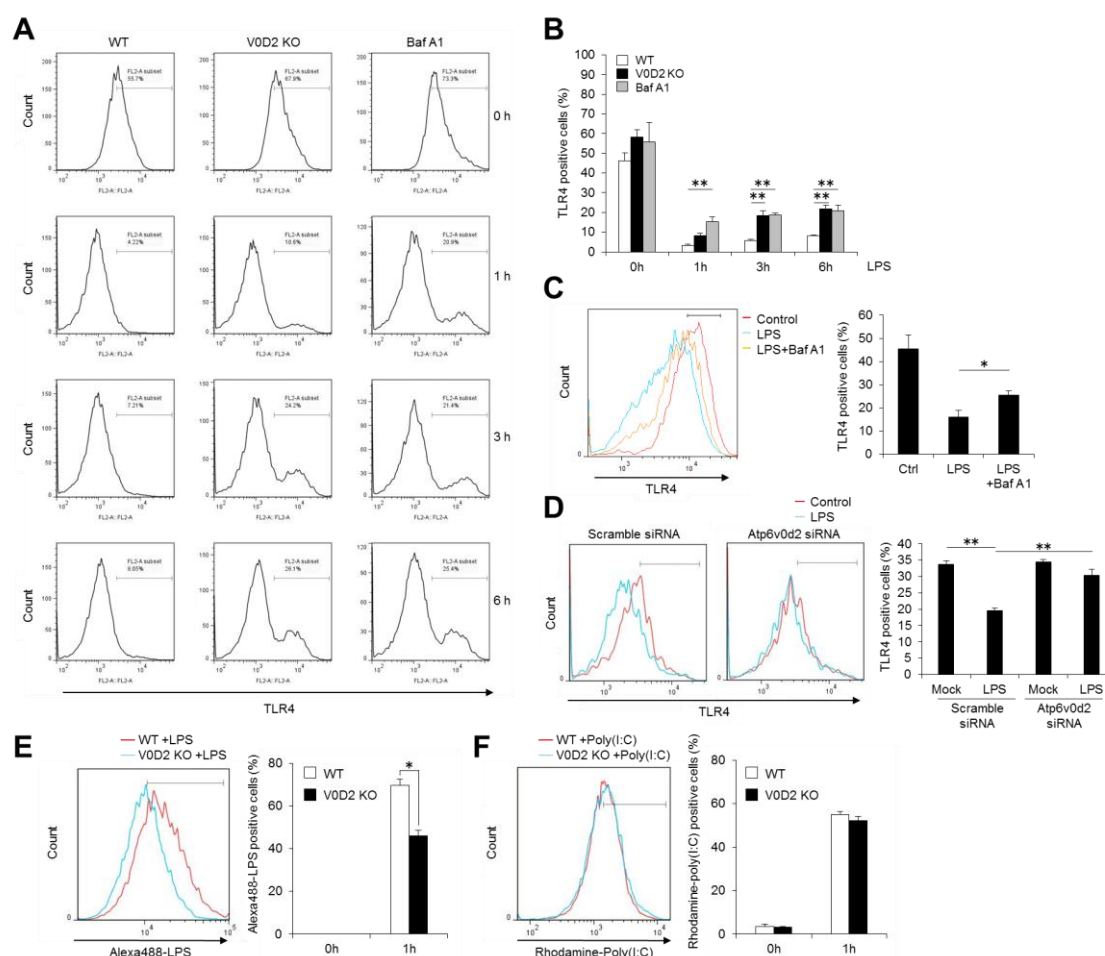


図 3.5 V 型 ATPase 欠損細胞株による TLR4 の内在化

A, B : 野生型 RAW264.7 細胞と Bafilomycin A1 刺激を施した同細胞、さらに V0D2 KO 細胞に LPS を 0、1、3、6 時間で刺激後、PE 標識抗 TLR4 抗体で染色して FACS 解析を行った。(A) 細胞膜上 TLR4 の蛍光強度をヒストグラムで表し、(B) その陽性細胞の割合をグラフ化した (n = 3、mean ± SD、*: one-way ANOVA および Tukey test $p < 0.05$)。

C : BM-M と Bafilomycin A1 刺激を施した同細胞に LPS を 0、1 時間で刺激後、PE 標識抗 TLR4 抗体で染色して FACS 解析を行った。細胞膜上 TLR4 の蛍光強度をヒストグラムで表し、その陽性細胞の割合をグラフ化した (n = 3、mean ± SD、*: *t*-test $p < 0.05$)。

D : V 型 ATPase ATP6V₀D2 遺伝子を siRNA によりノックダウンした BM-DC およびスクランブル siRNA を導入した同細胞に LPS を 0、1 時間で刺激後、PE 標識抗 TLR4 抗体で染色して FACS 解析を行った。細胞膜上 TLR4 の蛍光強度をヒストグラムで表し、その陽性細胞の割合をグラフ化した (n = 3、mean ± SD、**: two-way ANOVA および Tukey test $p < 0.05$)。

E, F : 野生型 RAW264.7 細胞と V0D2 KO 細胞に (E) Alexa488 標識 LPS および (F) Rhodamine 標識 Poly(I:C) をそれぞれ投与して 1 時間反応させ、FACS 解析にて各蛍光量をヒストグラムで示した。また、陽性細胞の割合をグラフ化した (n = 3、mean ± SD、*: *t*-test $p < 0.05$)。

3.6 ARF6 はエンドソーム内酸性 pH 環境に関与して TLR4 の内在化および TLR4 依存的な自然免疫応答を制御する

3.6.1 ARF6 により NF-κB プロモーターの活性化が制御される

次にエンドソーム内 pH 環境が TLR4 の内在化にどのように寄与しているかを明らかにするため、その制御因子の候補分子として細胞内小胞輸送制御に関わる低分子 GTPase である ARF ファミリーに着目した。マウスにおいて、ARF ファミリーは 6 種類の ARF メンバーおよび類似した機能を有する約 20 種類の ARL (ARF-like) メンバーから構成され、近年 ARF ファミリーが TLR4 や TLR9 の細胞動態や下流のアダプター分子の動員、RLRs を介したシグナル応答制御にも重要な制御因子として機能することが明らかとなってきた[30,89-92]。これらのことから、自然免疫応答ならびに細胞内小胞輸送に密接に関与すると予想される ARF ファミリーの発現プラスミドを構築後、NF-κB レポータープラスミドとともに TLR4 発現 HEK293 細胞に導入し、LPS 刺激前後におけるルシフェラーゼの発現量を定量した。その結果、LPS 刺激後の NF-κB プロモーター活性は ARF6 過剰発現時に減少し、ARL13A および ARL13B 過剰発現時に上昇することを見出し、TLR4 を介した自然免疫応答にこれら分子は何らかの関与があることが示唆された (図 3.6A)。特に ARF6 は先行研究より、TLR4 のエンドサイトーシスの制御に貢献することが報告されているのに加え、V 型 ATPase と相互作用するという報告があること、さらに Bafilomycin A1 処理を施した ARF6 および TLR4 発現 HEK293 細胞の LPS 刺激後の NF-κB プロモーターの減少が抑えられたことから (図 3.6B)、ARF6 を標的候補分子として位置付けた[30,93]。次に ARF6 の機能欠損型の変異として知られる ARF6 T27N (27 番目のトレオニン をアスパラギンに置換した変異体[94]) を TLR4 発現 HEK293 細胞に導入し、同

様にルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、変異体 ARF6 T27N 過剰発現時の LPS 刺激後の NF- κ B プロモーター活性はコントロール (空プラスミドの発現時) と比べて有意な差は認められなかった (図 3.6C)。このことから、ARF6 の機能が TLR4 依存的な自然免疫応答の制御に重要であることが示唆された。

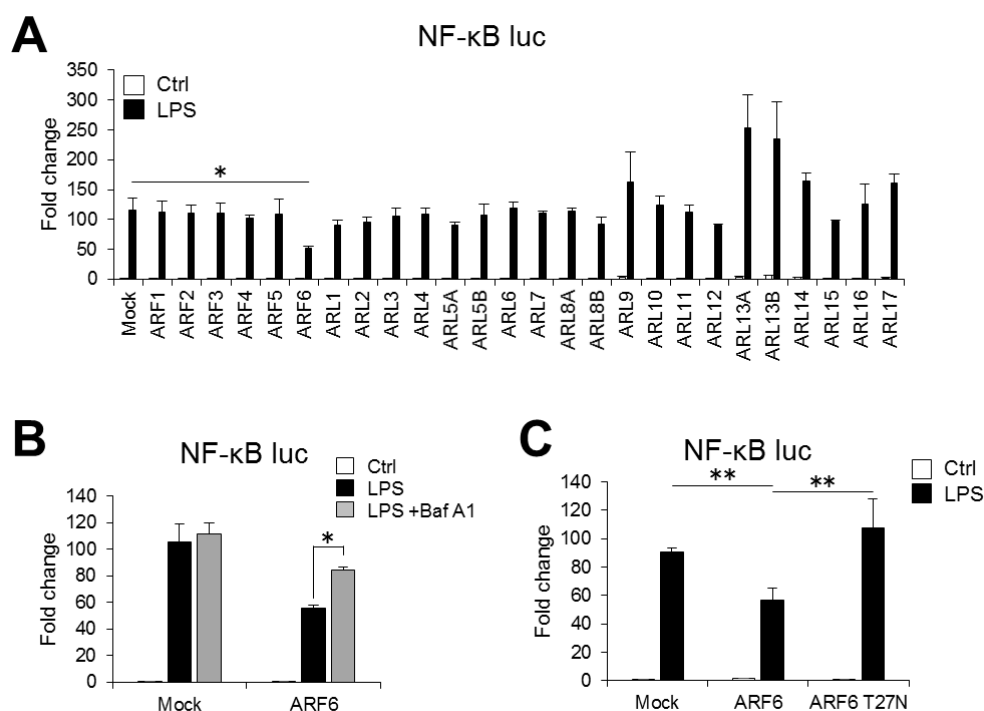


図 3.6 ARF6 過剰発現時の NF- κ B プロモーター活性

A : TLR4 発現 HEK293 細胞に NF- κ B プロモーター下で制御されるルシフェラーゼレポータープラスミドとともに各 ARF ファミリー発現プラスミドを導入し、6 時間の LPS 刺激前後におけるルシフェラーゼの発現量を測定した (n = 3、mean \pm SD、*: *t*-test p < 0.05)。

B : TLR4 発現 HEK293 細胞と Bafilomycin A1 刺激を施した同細胞に NF- κ B プロモーター下で制御されるルシフェラーゼレポータープラスミドとともに ARF6 発現プラスミドを導入し、6 時間の LPS 刺激前後におけるルシフェラーゼの発現量を測定した (n = 3、mean \pm SD、*: *t*-test p < 0.05)。

C : TLR4 発現 HEK293 細胞に NF- κ B プロモーター下で制御されるルシフェラーゼレポータープラスミドと野生型 ARF6 または変異型 ARF6 T27N 発現プラスミドを導入し、6 時間の LPS 刺激前後におけるルシフェラーゼの発現量を測定した (n = 3、mean \pm SD、**: one-way ANOVA および Tukey test p < 0.05)。

3.6.2 ARF6 は V 型 ATPase と相互作用し、TLR4 リガンドである LPS の細胞内取り込み能を制御する

ARF6 が TLR4 を介したシグナル応答に関与することが示唆されたことから、次に TLR4 リガンドの LPS の細胞内取り込み量を測定することで ARF6 が TLR4 の細胞動態に影響を与えるかの解析を試みた。この解析にあたり、まず TLR4 依存的に LPS が細胞内へと取り込まれるかどうかを調べるため、HEK293 細胞を用いて検討を行った。HEK293 細胞は TLR4 を発現しておらず、その為 TLR4 を安定的に発現するように遺伝子改変させた HEK293 細胞株を用いた。まず、これら細胞（HEK293 及び TLR4-HEK293）に蛍光標識した LPS を投与して FACS 解析にて LPS の蛍光量を評価した。その結果、TLR4-HEK293 細胞において HEK293 細胞と比べて顕著に LPS 由来の蛍光量が増加していることが認められたことから、TLR4 を介して LPS が細胞内へと取り込まれることが明らかとなった（図 3.7A）。LPS が TLR4 依存的に細胞内に取り込まれることから、TLR4 の細胞内動態と ARF ファミリーの関与を明確にするため、各 ARF ファミリーを TLR4-HEK293 細胞に一過的に発現させ、LPS の細胞内取り込み量を評価した。その結果、ARF6 発現細胞で LPS の細胞内取り込み量が増加する傾向が観察されたものの、他の ARF ファミリー（ARF1~5）では変化は認められなかった（図 3.7B）。次に野生型および変異型 ARF6T27N を発現させた TLR4-HEK293 細胞における LPS の細胞内取り込み能を測定することで TLR4 の内在化に ARF6 の機能が重要であるかどうかを FACS 解析にて確かめた。その結果、野生型 ARF6 発現細胞では、コントロール（空プラスミドの発現時）および機能欠損型 ARF6 T27N 発現細胞と比べて LPS の細胞内取り込み量が増加する傾向が観察された（図 3.7C）。興味深いことに、Bafilomycin A1 処理を施すことにより、野生型 ARF6 発現細胞の LPS の細胞内取り込み量も抑えられた（図 3.7C）。加えて、ARF6 と V 型 ATPase ATP6V₀D2 との関与を明らかにするため、ATP6V₀D2 を標的とした siRNA（V₀D2 siRNA）を設計し、ARF6 を発現させた TLR4-HEK293 細胞に導入することで ATP6V₀D2 ノックダウン細胞株を樹立した（図 3.7D）。このノックダウン細胞株に同様に LPS の細胞内取り込み能を評価した結果、コントロール（スクランブル siRNA 導入時）と比較して LPS の細胞内取り込み量が有意に減少することが確認された（図 3.7E）。

次に、ARF6 と V 型 ATPase が相互作用するかを調べるため、HEK293T 細胞に Myc タグを付加した ARF6 および FLAG タグを付加した各 V 型 ATPase サブユニットを導入し、そのライセートを抗 Myc 抗体ビーズにより免疫沈降を行った。免疫沈降後のサンプルを各標識タグの抗体にてウェスタンブロットを試みた結果、ARF6 と ATP6V₀D2 サブユニットとの共免疫沈降は確認されなかったものの、Bafilomycin A1 の標的阻害部位と考えられている ATP6V₀C サブユニットと

の共免疫沈降が認められた (図 3.7F)。以上のことから、ARF6 は TLR4 の内在化に寄与していることが示唆され、その制御に V 型 ATPase によるエンドソーム内酸性 pH 環境が重要である可能性が考えられる。

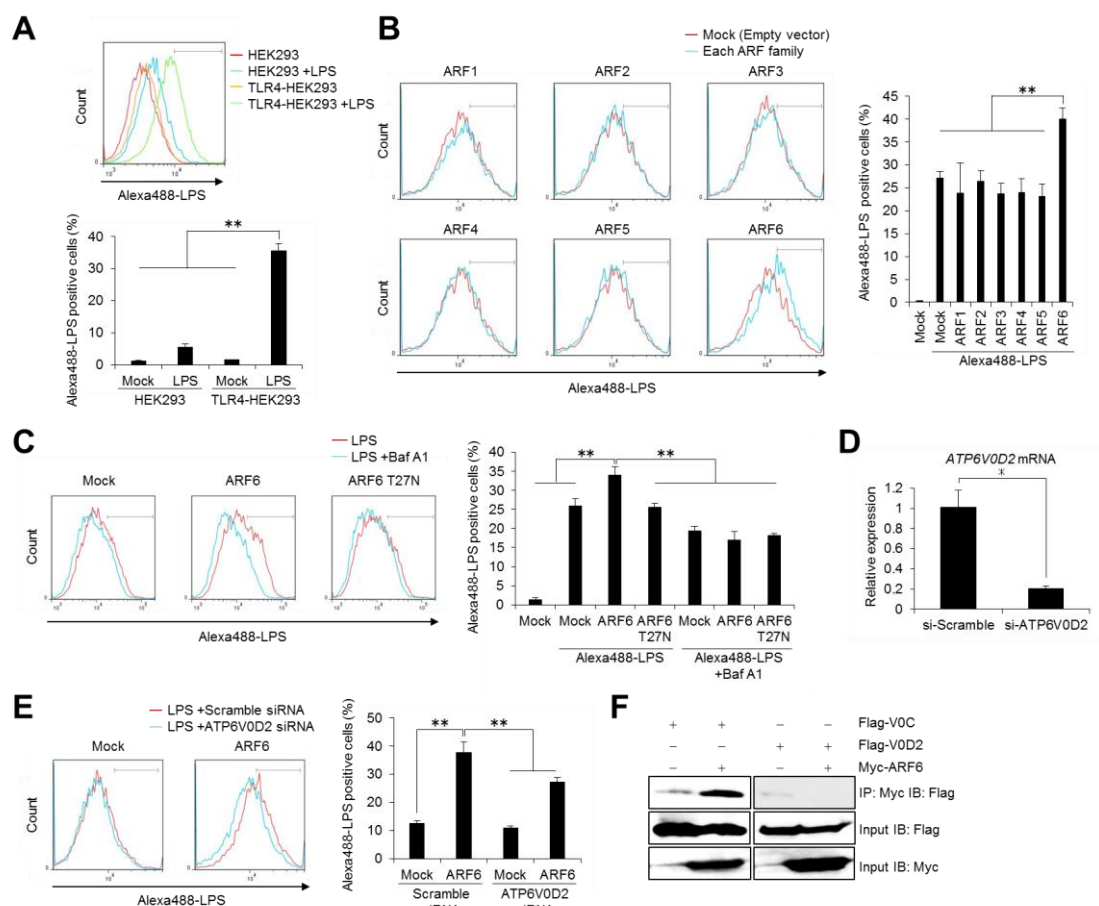


図 3.7 ARF6 過剰発現時の LPS 取り込み能と V 型 ATPase との相互作用

A : TLR4 発現 HEK293 細胞と TLR4 が発現していない通常の HEK293 細胞に Alexa488 標識された LPS を 1 時間反応させ、その蛍光量を FACS 解析にて評価した。LPS を取り込んだ細胞の蛍光強度をヒストグラムで表し、その陽性細胞の割合をグラフ化した (n = 3、mean ± SD、** : two-way ANOVA および Tukey test $p < 0.05$)。

B : TLR4 発現 HEK293 細胞に各 ARF ファミリー (ARF1~6) 発現プラスミドを導入後、Alexa488 標識された LPS を 1 時間反応させ、その蛍光量を FACS 解析にて評価した。LPS を取り込んだ細胞の蛍光強度をヒストグラムで表し、その陽性細胞の割合をグラフ化した (n = 3、mean ± SD、** : one-way ANOVA および Tukey test $p < 0.05$)。

C : TLR4 発現 HEK293 細胞と Bafilomycin A1 刺激を施した同細胞に野生型 ARF6 または変異型 ARF6 T27N 発現プラスミドを導入後、Alexa488 標識された LPS を 1 時間反応

させ、その蛍光量を FACS 解析にて評価した。LPS を取り込んだ細胞の蛍光強度をヒストグラムで表し、その陽性細胞の割合をグラフ化した ($n = 3$, mean \pm SD, **: two-way ANOVA および Tukey test $p < 0.05$)。

D : ATP6V₀D2 遺伝子を siRNA によりノックダウンした TLR4 発現 HEK293 細胞およびスクランブル siRNA を導入した同細胞における ATP6V₀D2 の mRNA 量を RT-qPCR により測定した ($n = 3$, mean \pm SD, *: t -test $p < 0.05$)。

E : ATP6V₀D2 遺伝子を siRNA によりノックダウンした TLR4 発現 HEK293 細胞およびスクランブル siRNA を導入した同細胞に Alexa488 標識された LPS を 1 時間反応させ、その蛍光量を FACS 解析にて評価した。LPS を取り込んだ細胞の蛍光強度をヒストグラムで表し、その陽性細胞の割合をグラフ化した ($n = 3$, mean \pm SD, **: two-way ANOVA および Tukey test $p < 0.05$)。

F : HEK293T 細胞に Myc タグ標識した ARF6 および FLAG タグ標識した各 V 型 ATPase サブユニット (ATP6V₀C および ATP6V₀D2) を導入 24 時間後、そのライセートを抗 Myc 抗体ビーズによりプルダウンアッセイを行った。プルダウンアッセイ前後 (前 : Input、後 : IP でそれぞれ表記) のサンプルを各標識タグの抗体 (IB) にてウェスタンブロットを行った。

3.7 ARF6 欠損細胞は TLR4 の内在化が抑制され、TLR4 を介した自然免疫応答が抑制される

CRISPR/Cas9 システムを用いて、ARF6 の機能が欠損した RAW264.7 細胞の樹立を行った。本実験で使用したプラスミドは、Cas9 ヌクレアーゼおよび gRNA をコードする pX330 プラスミドと pCAG-EGxxFP プラスミドの 2 種類である [87]。pX330 プラスミドがコードする gRNA 領域に任意の 20 bp の配列を挿入することで、標的遺伝子配列特異的にゲノム編集を行うことができる。本実験では ARF6 のエキソン 2 の開始コドン近辺が標的配列となるように gRNA を設計した。一方の pCAG-EGxxFP は、CRISPR/Cas9 システムが機能する細胞を見分けるためのレポータープラスミドである。pCAG-EGxxFP 中の EGFP 配列内に 2 連続のリピート配列 (x がリピート配列) が組み込まれており、このリピート配列間にマルチクローニングサイトを有する。したがって、gRNA の標的部位を含んだ 600 bp 程度の ARF6 遺伝子配列を挿入した pCAG-EGxxFP プラスミドを構築した。以上の過程で構築したプラスミドを同時に細胞内へトランスフェクションすると、Cas9-gRNA 複合体の働きでゲノム上の標的配列に加え、pCAG-EGxxFP 上の標的配列上にも結合し、二本鎖切断が生じる。その際に切断された pCAG-EGxxFP はリピート配列を利用して相同組換え修復が起こり、EGFP 蛍光が発現できるようになる。また、ゲノム上の標的配列も切断され、その修復時に一定の割合でフレームシフト変異の挿入が生じる。これら一連の機構のもと EGFP が

発現し、ゲノム編集が機能した細胞を特定できる。

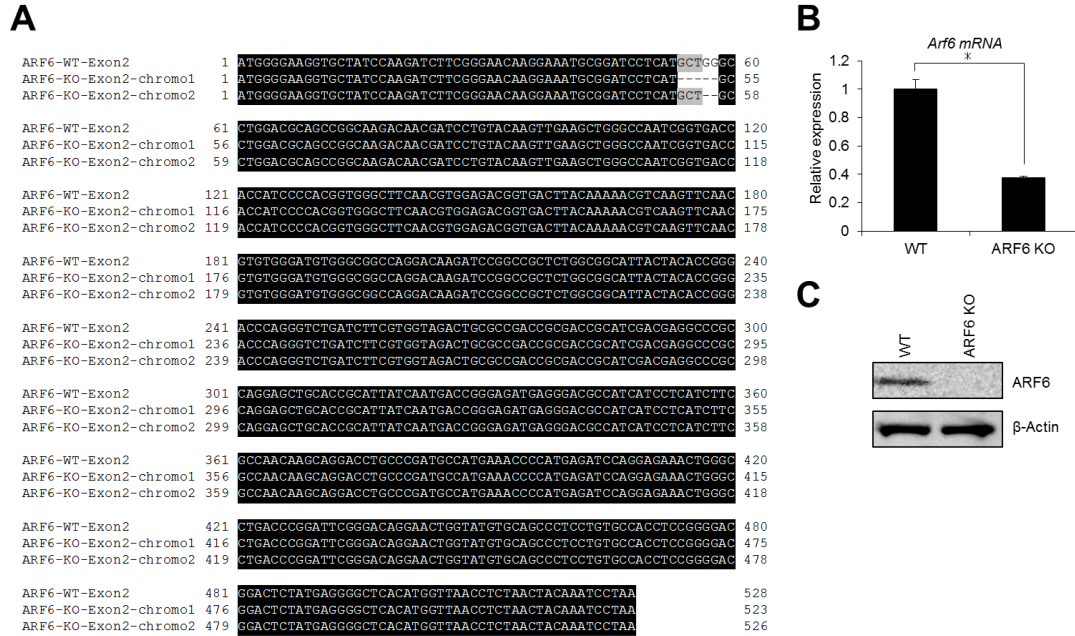


図 3.8 ARF6 欠損細胞株の樹立

A : CRISPR/Cas9 システムにより樹立した ARF6 KO 細胞の欠損配列部位の塩基配列を示した。

B, C : 野生型 RAW264.7 細胞および ARF6 KO 細胞の ARF6 の (B) 転写量と (C) タンパク質量を RT-qPCR およびウェスタンブロットにてそれぞれ解析した (n = 3、mean ± SD、*: t -test $p < 0.05$)。

以上のゲノム編集技術を利用して、新たに ARF6 のエキソン 2 配列の開始コドン近辺に 2 bp の欠失と 5 bp の欠失が挿入されたフレームシフト変異を有する ARF6 欠損細胞株 (以下 ARF6 KO) を樹立した (図 3.8A)。なお、ARF6 KO 細胞の ARF6 の発現量が低下していることを RT-qPCR およびウェスタンブロットにて確認した (図 3.8B, C)。この樹立した ARF6 KO 細胞に LPS 刺激を行い、細胞膜上の TLR4 の発現量を蛍光標識した抗 TLR4 抗体を用いて染色し、FACS 解析にて TLR4 の内在化が正常に行われているか否かを評価した。その結果、ARF6 KO 細胞は LPS 未刺激条件で野生型細胞と比較して高いレベルで細胞膜上に TLR4 が発現していることが分かった (図 3.9A, B)。さらに、LPS 刺激を施しても野生型細胞のように TLR4 の内在化は起こらず、細胞膜上の TLR4 の発現が維持されることが確認された (図 3.9A, B)。次に TLR4 の内在化の異常が TLR4 を介した自然免疫応答に影響を与えるか否かを解析するため、LPS 刺激による

Ifnb1 および *Il6* の転写量を RT-qPCR にて測定した。その結果、興味深いことに ARF6 KO 細胞はこれらサイトカインの転写量が野生型細胞と比較して顕著に低下していた (図 3.9C)。また、MALP-2 刺激時には、*Ifnb1* の転写量に変化は認められなかったものの、*Il6* の転写量は野生型細胞と比べて減弱した (図 3.9C)。さらに、ARF6 KO 細胞の LPS 刺激前後における IRF3 および NF- κ B p65 のリン酸化量をウェスタンブロットにて調べた結果、野生型細胞と比べてこれらリン酸化量が減少することが分かった (図 3.9D, E)。以上のことから ARF6 は TLR4 のエンドサイトーシスの誘導に必要な不可欠な分子であり、その機能が損なわれると TLR4 ならびに TLR2 を介するサイトカイン産生が減少することが示唆された。

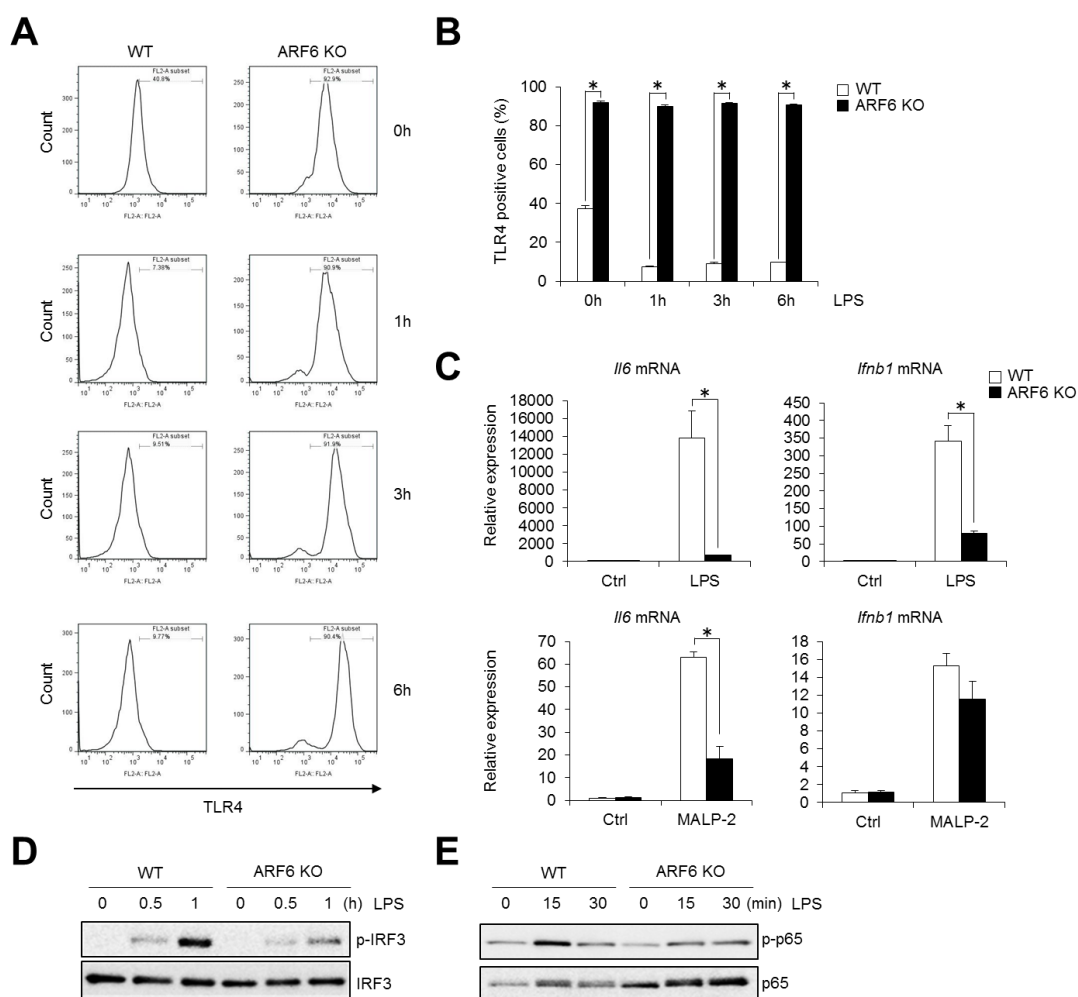


図 3.9 ARF6 欠損細胞株による TLR4 の内在化と自然免疫応答

A, B : 野生型 RAW264.7 細胞と ARF6 KO 細胞に LPS を 0、1、3、6 時間で刺激後、PE 標識抗 TLR4 抗体で染色して FACS 解析を行った。(A) 細胞膜上 TLR4 の蛍光強度をヒ

ストグラムで表し、(B) その陽性細胞の割合をグラフ化した ($n = 3$ 、 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 、*: t -test $p < 0.05$)。

C: 野生型 RAW264.7 細胞と V0D2 KO 細胞に MALP-2 または LPS で刺激 6 時間後、*Il6* および *Ifnb1* の mRNA 量を RT-qPCR により測定した ($n = 3$ 、 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 、*: t -test $p < 0.05$)。

D: 野生型 RAW264.7 細胞および ARF6 KO 細胞に LPS を 0、0.5、1 時間で刺激し、IRF3 のリン酸化量をウェスタンブロットにより検出した。

E: 野生型 RAW264.7 細胞および ARF6 KO 細胞に LPS を 0、15、30 分間で刺激し、NF- κ B p65 のリン酸化量をウェスタンブロットにより検出した。

3.8 V 型 ATPase 欠損細胞はエンドトキシン・トレランスに異常が生じる

エンドトキシン・トレランスの誘導には TLR4 のエンドサイトーシスが重要であることが知られていることから、V 型 ATPase 欠損細胞のエンドトキシン・トレランスに関して解析を行った。まず、野生型細胞、V0D2 KO および V1B2 KO 細胞に 1 回又は 2 回に渡る LPS 刺激を行い、炎症性サイトカインの転写量とタンパク質量を RT-qPCR と ELISA 法にてそれぞれ測定した。その結果、V0D2 KO 細胞と野生型細胞ともに 2 回目の LPS 刺激時では 1 回目の LPS 刺激時と比べて IL-6、IL-12p40、TNF α の転写量ならびにタンパク質量が顕著に減少していることが分かった (図 3.10A, B, C)。しかしながら、それと同時に V0D2 KO 細胞は 2 度目の LPS 刺激時の炎症性サイトカインの産生能が減少するものの、野生型細胞と比較してその産生能が依然保持されることが明らかとなった (図 3.10A, B, C)。さらに、V0D2 KO 細胞と野生型細胞に 2 度の LPS 刺激を行い、NF- κ B p65 のリン酸化量を測定したところ、そのリン酸化量は V0D2 KO 細胞で野生型細胞と比較して増加する傾向にあることが分かった (図 3.10D)。同様に Bafilomycin A1 処理を施した野生型の RAW264.7 細胞および正常細胞の BM-M においても、Bafilomycin A1 処理を行わずにエンドトキシン・トレランスを誘導した時と比べ、*Il6*、*Il12p40* および *Tnfa* の転写誘導能と IL-6 タンパク質の産生能が保持されることが RT-qPCR および ELISA 法にて明らかとなった (図 3.10E, F, G)。これらのことから、V 型 ATPase のサブユニットの欠損あるいは Bafilomycin A1 投与により、エンドトキシン・トレランスに異常が生じると考えられる。

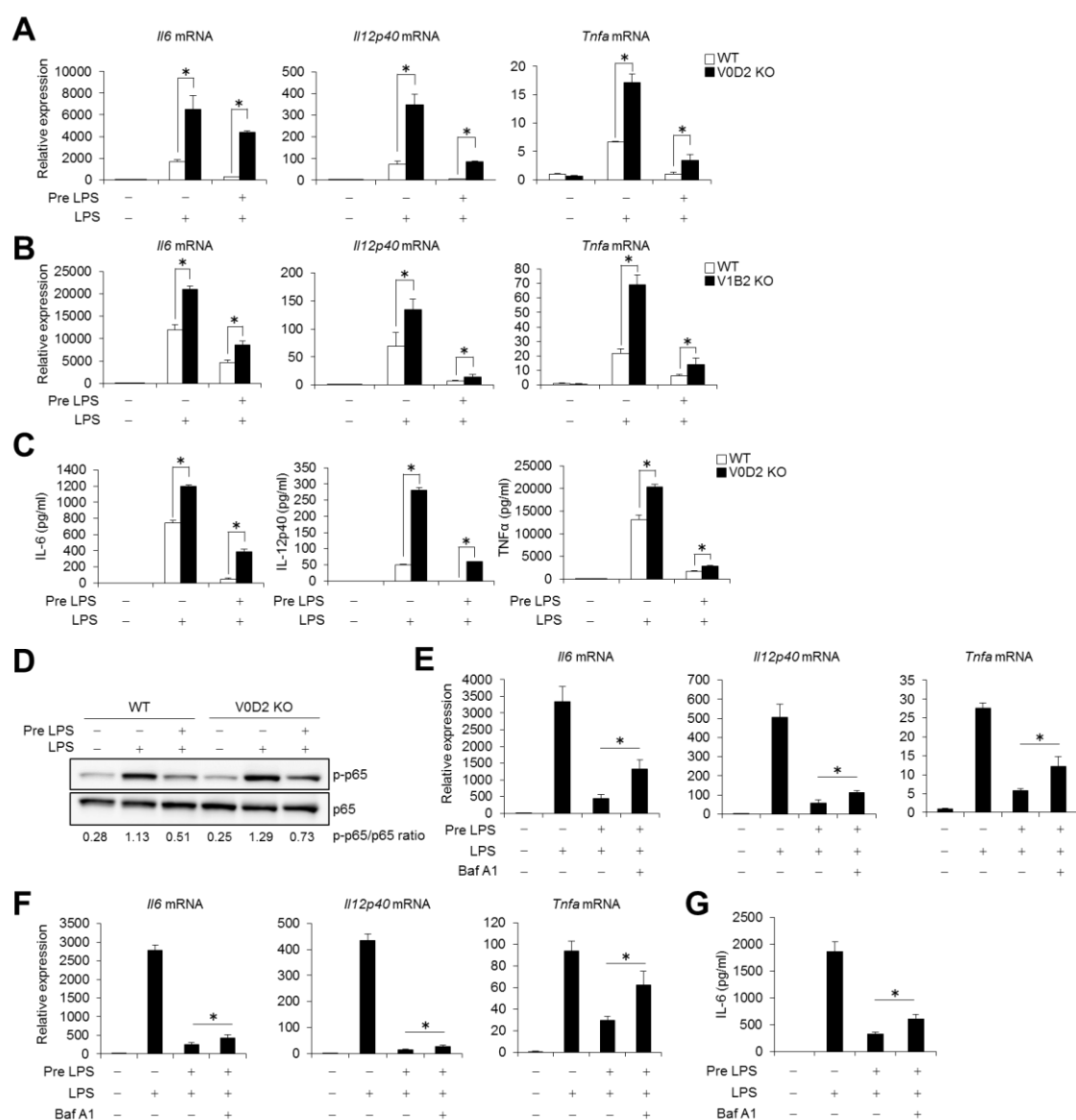


図 3.10 V 型 ATPase 欠損細胞株のエンドトキシン・トレランス

A, B, C : 野生型 RAW264.7 細胞と V0D2 KO 細胞または V1B2 KO 細胞に LPS の前処理 (Pre LPS) を 18 時間行った後に PBS で洗浄し、再度 6 時間の LPS 刺激を施すことでエンドトキシン・トレランスを誘導した。この反応条件の下、(A, B) *Il6*、*Il12p40*、*Tnfa* の転写量を RT-qPCR にて測定し、(C) IL-6、IL-12p40、TNFα のタンパク質量を ELISA 法にて測定した (n = 3、mean ± SD、*:t-test $p < 0.05$)。

D : 野生型 RAW264.7 細胞と V0D2 KO 細胞に LPS の前処理 (Pre LPS) を 18 時間行った後に PBS で洗浄し、NF-κB p65 のリン酸化量をウェスタンブロットにて測定した。

E : RAW264.7 細胞と Bafilomycin A1 処理を施した同細胞に 18 時間の LPS の前処理と 6 時間の LPS 刺激を施し、*Il6*、*Il12p40*、*Tnfa* の転写量を RT-qPCR にて測定した (n = 3、

mean \pm SD、*:*t*-test $p < 0.05$)。

F, G : BM-M と Bafilomycin A1 処理を施した同細胞に 18 時間の LPS の前処理と 6 時間の LPS 刺激を施した。この反応条件の下、(F) *Il6*、*Il12p40*、*Tnfa* の転写量を RT-qPCR にて測定し、(G) IL-6 のタンパク質量を ELISA 法にて測定した (n = 3、mean \pm SD、*:*t*-test $p < 0.05$)。

第4章 考察

4.1 V 型 ATPase 欠損細胞株の樹立とエンドソーム内 pH 環境

V 型 ATPase は酸性オルガネラの内腔酸性化に中心的な役割を果たすプロトンポンプである。このプロトンポンプは 14 のサブユニットから構成され、当研究室の先行研究より V 型 ATPase ATP6V₀D2 および ATP6V₁B2 サブユニットを欠損させると、エンドソーム内の恒常性が破綻し、本来 pH6.0~6.5 で酸性に維持されている pH が上昇することが分かった。しかしながら、これらサブユニットの欠損は、V 型 ATPase 阻害剤 Bafilomycin A1 で処理した場合のようなエンドソーム内 pH の大幅な上昇には及ばなかった(参考図 2)。そこで V 型 ATPase ATP6V₀D2 および ATP6V₁B2 サブユニット以外の Bafilomycin A1 の阻害部位として知られる ATP6V₀C サブユニットの欠損細胞株の樹立を先行研究で検討されているが、FACS ソーティングによる単離は成功したものの、その後細胞が増殖しなかったため、ATP6V₀C サブユニットの欠損細胞株は得られていない[NAIST バイオサイエンス研究科 2016 年度 箱崎理花 修士論文]。この結果は、V 型 ATPase ATP6V₀C 遺伝子のノックダウンで細胞内ストレスに過敏となり細胞死が誘導されることや CRISPR/Cas9 による細胞性致死遺伝子スクリーニングにより V 型 ATPase ATP6V₀C の欠損は細胞死を誘導する先行研究と一致している[95-97]。したがって、ATP6V₀C サブユニットは V 型 ATPase の構造的あるいは機能的に特に重要であることが示唆され、その遺伝子の欠損は V 型 ATPase ATP6V₀D2 および ATP6V₁B2 サブユニットの欠損よりもエンドソーム内 pH に大きな影響を及ぼす可能性があると考えられる。これらのことから、本研究および先行研究では Bafilomycin A1 投与による V 型 ATPase への強い機能阻害に加え、V 型 ATPase ATP6V₀D2 または ATP6V₁B2 サブユニットの欠損に伴うエンドソーム内 pH 制御の比較的弱い阻害に関しても自然免疫応答に及ぼす影響を評価したと考えられる。

V 型 ATPase ATP6V₀D2 ノックアウトマウスを用いた先行研究において、生存率に影響を及ぼさないものの、破骨細胞の骨吸収の異常に伴う骨硬化症が確認されている[65,67,98]。通常、破骨細胞はエンドソームやリソソーム pH 環境下で作用するカテプシンやアスパラギンエンドペプチダーゼなどのプロテアーゼの働きにより、骨の吸収が担われるが、このノックアウトマウスはエンドソームやリソソーム内腔の中性化も起因して、本来の機能が低度で阻害されると考えられている。破骨細胞の骨吸収の機能低下により発症する大理石病は重篤な場合、生存率の低下に繋がることも報告されている[99,100]。したがって、本研究のような比較的弱い阻害であってもエンドソーム内酸性 pH 環境下で誘導されるプロテアーゼの働きなどの制御機構に影響を及ぼすことが示唆される。

4.2 V 型 ATPase 欠損細胞株による核酸認識型 TLR 依存的な自然免疫応答

当研究室の先行研究より、V0D2 KO 細胞および V1B2 KO 細胞を TLR3、TLR7、TLR9 リガンドでそれぞれ刺激すると、野生型細胞と比較して *Ifnb1* の転写量や IRF3 のリン酸化量が減弱していることが明らかとなった（参考図 3, 図 3.2）。これらの結果は、V 型 ATPase の阻害剤である Bafilomycin A1 投与による本研究の結果と一致するものであった（図 3.2）。また、V0D2 KO 細胞に ATP6V0D2 遺伝子を発現させると、核酸認識型 TLR の機能が回復したことを受け、V 型 ATPase によるエンドソーム内 pH 環境の制御が核酸認識型 TLR を介した自然免疫応答の活性化に重要な役割を果たすことが示唆された（図 3.2）。この核酸認識型 TLR の機能が損なわれる要因として、核酸認識型 TLR の翻訳後修飾の阻害が第一に挙げられる[49-52]。つまり、核酸認識型 TLR は、エンドソーム内の酸性環境下で機能するプロテアーゼにより、N 末端領域の切断修飾を受けて成熟化することから、エンドソーム内 pH の恒常性が破綻しているこれら欠損細胞では、プロテアーゼによる切断修飾が正常に作用しない結果、核酸認識型 TLR を介したシグナル伝達系の減弱が生じたと考えられる（図 4.1）。また、先行研究より Bafilomycin A1 投与後の形質細胞様樹状細胞などの自然免疫細胞において TLR7 リガンドである R837 のエンドソームへの取り込みが Bafilomycin A1 未投与の細

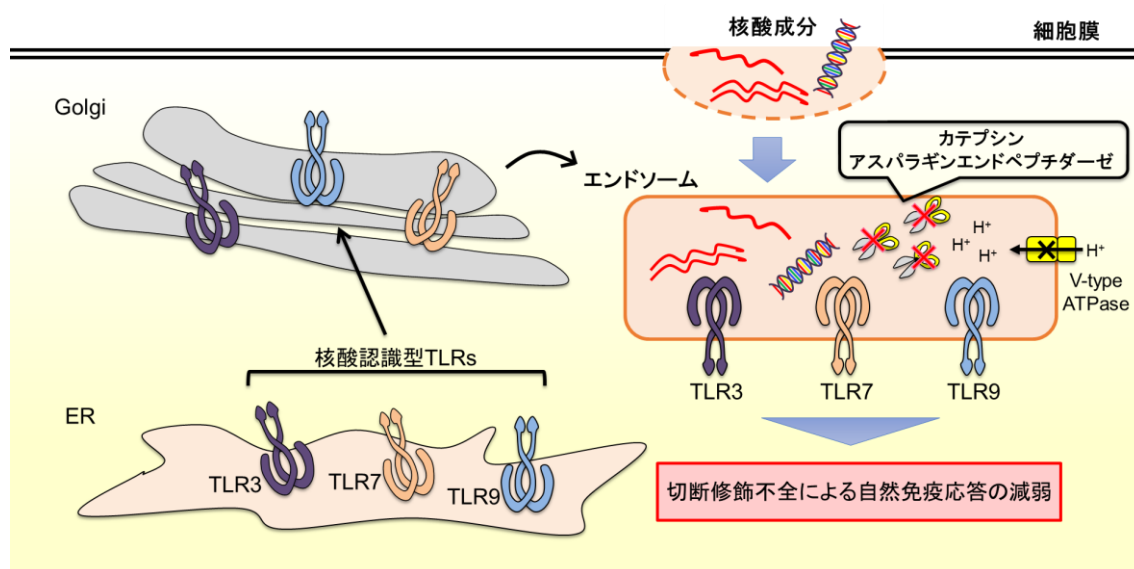


図 4.1 V 型 ATPase 欠損細胞による核酸認識型 TLR を介した自然免疫応答

V 型 ATPase 欠損細胞はエンドソーム内 pH の酸性化環境が破綻していることからプロテアーゼによる核酸認識型 TLR の切断修飾が正常に作用せず、その結果、これら分子を介したシグナル伝達系の減弱が生じたと考えられる。核酸認識型 TLR の局在やリガンド成分のエンドソームへの取り込みにおいては V 型 ATPase 欠損細胞において正常に機能すると考察される。

胞と比較して抑えられるものの、TLR9 リガンドである ODN1668 の取り込みは正常に維持されることが報告されている[101]。本研究においても、V0D2 KO 細胞や Bafilomycin A1 投与に伴い TLR4 リガンドである LPS の取り込みが抑制されたことから（図 3.5, 3.7）、第二の要因として各リガンドの取り込み能の減弱も考慮する必要がある。そこで、TLR3 リガンドのローダミン蛍光標識された Poly(I:C) を野生型細胞および V0D2 KO 細胞に投与したところ、その取り込み量に変化は認められなかった（図 3.5）。したがって、TLR7 においては両方の阻害機構が作用すると考えられるが、TLR3 および TLR9 においてはエンドソーム内のプロテアーゼによる切断修飾がより重要であることが示唆される。これらのことから、今後は樹立した各欠損細胞において核酸認識型 TLR が切断修飾を受けるか否かを切断領域のアミノ酸構造を特異的に認識可能な抗体を用いて評価していく必要がある。

4.3 V 型 ATPase 欠損細胞株による TLR4 依存的な自然免疫応答

興味深いことに、V 型 ATPase 欠損細胞株や Bafilomycin A1 で処理した細胞において TLR4 リガンドである LPS 刺激を施すと、野生型細胞と比べて *Il6* や *Tnfa* などの炎症性サイトカインの発現量が上昇するのに対し、*Ifnb1* の発現量が低下することが確認された（参考図 4, 図 3.4）。一般に、LPS 刺激が加わると、MyD88-TIRAP 依存的な炎症性サイトカインの発現が誘導されると同時にクラスリン-AP2 依存的なエンドサイトーシスを開始される[23]。エンドソームへと移行した TLR4 は TRIF-TRAM 依存的に I 型 IFN や IFN 誘導性遺伝子の発現を惹起することが知られている[8]。本実験の結果から、野生型細胞は LPS 刺激により TLR4 の内在化が引き起こされたが、V0D2 KO 細胞や Bafilomycin A1 投与を施した細胞においては、その内在化に異常をきたし、TLR4 が一部細胞表面上に残り続けることが観察された（図 3.5）。これまでの先行研究においても TLR4 のエンドサイトーシスの制御因子として知られる CD14、p120-catenin および ARF6 などの機能が損なわれると TLR4 の内在化が強く抑制されることが明らかとなっている[26,29,30,102]。同時にこれら分子の機能障害に伴い、本研究と同様に TRIF-TRAM 依存的に誘導される IRF3 を介したシグナル伝達応答が減弱し、逆に MyD88-TIRAP 依存的に誘導される NF- κ B を介した炎症性サイトカインの発現が上昇することも見出されている。以上のことから、エンドソーム内 pH 環境は TLR4 の内在化を制御する因子の一つだと考えられ、TLR4 の MyD88-TIRAP 依存的なシグナル伝達経路と TRIF-TRAM 依存的なシグナル伝達経路のバランスを調節する上で重要な役割を果たしていることが示唆される。

近年 TLR4 と同様に TLR2 においてもリガンドを認識後、細胞膜からエンドソームへと輸送されることや TRIF-TRAM 依存的なシグナル応答の活性化を介し

でウイルス免疫に貢献するという知見が得られてきている[103]。しかしながら、このシグナル応答は骨髄細胞中の CD11b 陽性 CD11c 陰性 Ly6C 陽性単球で選択的に制御されているとの報告もあり、マクロファージや CD11c をマーカータンパク質とする樹状細胞においては、TRIF-TRAM 依存的なシグナル応答は関与しないことが示唆されている[9]。本研究でも V 型 ATPase を介したエンドソーム pH 環境と TLR2 依存的なシグナル応答について解析を行ったが、V0D2 KO 細胞と野生型細胞の間に変化は認められなかった (図 3.4)。以上のことから、本実験系で使用了細胞株においては V 型 ATPase の異常が生じ、エンドソーム内腔の酸性化が抑えられても TLR2 を介した自然免疫応答には影響を与えないことが示唆された。

本研究ではさらにエンドソーム内 pH 環境が TLR4 の内在化にどのように寄与するかを明らかにするため、ARF ファミリーに着目した (図 3.6)。近年、ARF ファミリーに属する ARL5B および ARL16 がそれぞれ RLR ファミリーの MDA5 や RIG-I に結合し、シグナル伝達応答を負に制御することを当研究室と別の研究グループが報告したことに加え、上述したように ARF6 が TLR4 のエンドサイトーシスを制御する重要な因子であることが明らかとされている[30,91,92,104]。また、細胞内小胞輸送を担う ARF1 およびコートタンパク質である COP I がエンドソーム膜へ結合するのにエンドソーム内の酸性化が必要であるとの報告もある[105]。これらの知見から ARF ファミリーに焦点を当て、本研究で NF- κ B プロモーター活性を指標としたスクリーニングおよび LPS の細胞内取り込み量の解析を行った結果、ARF6 をエンドソーム内 pH 環境と TLR4 の内在化を繋ぐ候補分子として同定した (図 3.6, 3.7)。ARF6 の欠損細胞や機能欠損型変異体の過剰発現により、従来考えられていた通り TLR4 の内在化や LPS の取り込み能、サイトカイン産生に異常が生じることが分かった (図 3.7, 3.9)。また、Bafilomycin A1 処理や V 型 ATPase ATP6V0D2 のノックダウンを施すことによって、ARF6 発現細胞で LPS の細胞内取り込み量が抑制されることが示唆された (図 3.7)。先行研究より、エンドソーム内腔の pH 依存的に ARF6 とその GDP/GTP 交換因子である ARNO (ARF nucleotide binding site opener、Cytohesin-2 とも呼称される) が V 型 ATPase の ATP6V0C サブユニットおよび ATP6V0A2 サブユニットにそれぞれ結合し、クラスリン-AP2 依存的なエンドサイトーシスを誘導することが明らかとなっている[93]。また、RILP (Rab-interacting lysosomal protein) は V 型 ATPase の ATP6V1G1 サブユニットと相互作用することで、エンドソーム膜に局在を有し、Rab ファミリーとの相互作用を介して細胞内小胞輸送を制御することも知られている[106]。つまり、V 型 ATPase は酸性オルガネラの pH 恒常性維持以外にエンドサイトーシス関連分子の反応の足場としての機能を有すると考えられる (図 4.2)。本研究においては、ARF6 と V 型 ATPase ATP6V0D2 との相互

作用は確認できなかったものの、従来考えられている通り ARF6 と Bafilomycin A1 の阻害部位として知られる V 型 ATPase ATP6V₀C サブユニットの相互作用を共免疫沈降法により明らかにした (図 3.7)。これらのことから、ATP6V₀D2 又は ATP6V₁B2 サブユニットの欠損や Bafilomycin A1 の相互作用に伴う V 型 ATPase の立体構造の変化が TLR4 のエンドサイトーシスの異常に起因する可能性が示唆される。したがって、今後更なる作用機序の解明のため、V 型 ATPase 欠損細胞や Bafilomycin A1 投与に伴い、これら V 型 ATPase とエンドサイトーシス関連分子間の相互作用に影響を与えるか否かをより詳細に共免疫沈降法により評価する必要がある。

4.4 ARF6 欠損細胞株による TLR4 依存的な自然免疫応答

本研究の ARF6 欠損細胞株を用いた自然免疫応答の解析から、LPS 刺激時の IRF3 を介した *Ifnb1* の転写量が減弱していることが明らかとなった (図 3.9)。この結果は ARF6 欠損細胞株の TLR4 のエンドサイトーシスが抑制されたため、エンドソーム TLR4 を介した TRIF-TRAM 依存的な抗ウイルス応答が抑えられたと考えられる。しかしながら、ARF6 欠損細胞株は V 型 ATPase 欠損細胞株と同様に細胞膜上の TLR4 の発現が亢進しているにもかかわらず、MyD88-TIRAP 依存的な NF- κ B を介した *Il6* の転写量が減弱した (図 3.9)。また、この炎症性サイトカインの減弱は TLR2 を介した MyD88-TIRAP 依存的な自然免疫応答においても同様に観察されたことから、ARF6 欠損細胞株による炎症応答を抑制する何らかの重要な負の制御機構の存在が示唆された (図 3.9)。先行研究より、ARF6 は細胞内小胞輸送の機能の他にホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ (PI(4P)-5 キナーゼ) のアロステリック活性化因子として作用し、ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸 (PI(4,5)P₂) の産生に関与することが報告されている [107,108]。産生された PI(4,5)P₂ は細胞膜成分となり、TLR4 および TLR2 のアダプター分子である TIRAP を細胞膜上に集積させることが知られている [6]。これらのことから、TIRAP の N 末端の脂質結合部位が欠損した変異体や ARF6 を GTP 活性型から GDP 不活性型へと移行させる GAP 活性を有する AIP1 の強発現細胞において MyD88-TIRAP 依存的な自然免疫応答が著しく減弱することが示されている [6,104]。したがって、ARF6 の欠損により PI(4,5)P₂ の産生が阻害された結果、TIRAP の細胞膜上への集積が抑制され TLR4 および TLR2 との相互作用が妨げられたため、MyD88-TIRAP 依存的な下流のシグナル応答の減弱が生じたと考えられる (図 4.2)。

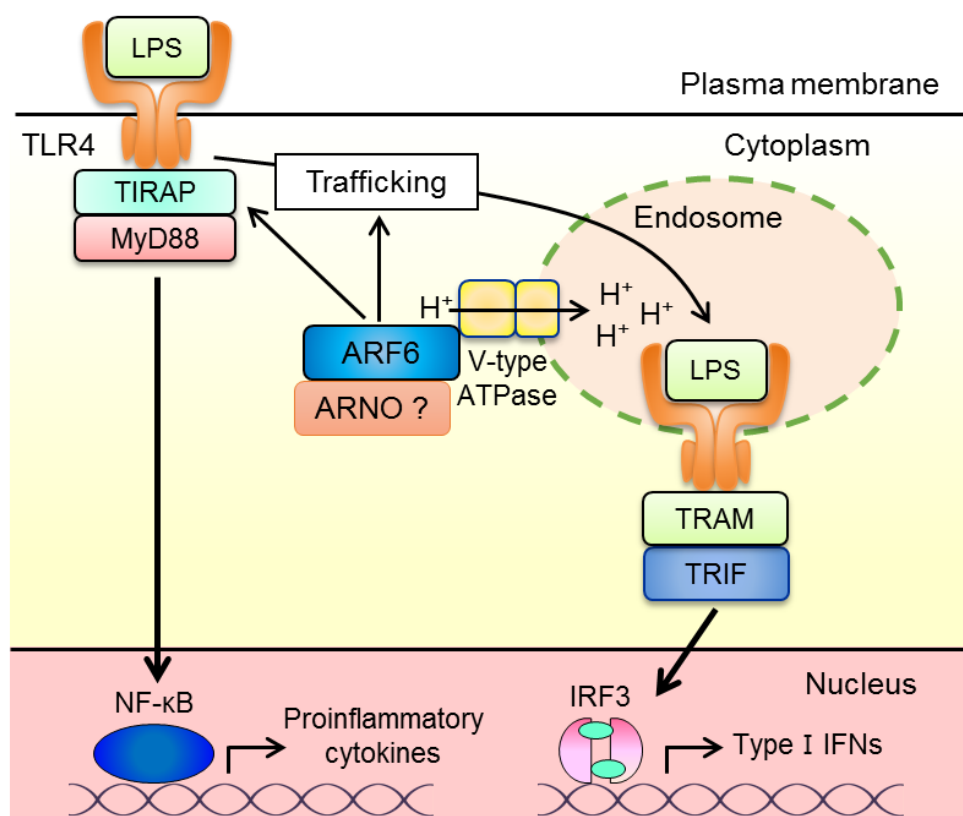


図 4.2 V 型 ATPase および ARF6 による TLR4 依存的な自然免疫応答の予想図

V 型 ATPase は ARF6 と相互作用してリガンド認識後、TLR4 を細胞膜からエンドソームへと輸送する。この輸送過程は、ARF6 が同様に V 型 ATPase と相互作用する ARNO により GDP/GTP 交換反応 (GEF 活性) を受けることで活性化すると考えられる。また、ARF6 は TLR4 などの下流のアダプター分子である TIRAP の動員に必要不可欠な PI(4,5)P₂ の産生にも関与することで TLR4 を介したシグナル応答の制御に寄与することが考察される。

4.5 V 型 ATPase 欠損細胞株によるエンドトキシン・トレランス

LPS などのエンドトキシン刺激により活性化した単球やマクロファージ、樹状細胞などの自然免疫細胞が再度エンドトキシン刺激にさらされると、炎症性サイトカインの産生が抑制されることが知られている[83,84]。この現象は一般に「エンドトキシン・トレランス」として認知されており、過剰な炎症応答を抑えて炎症性疾患を防ぐ一種の免疫寛容として定義付けられている。そこで本研究ではこの免疫寛容機構に着目し、樹立した V 型 ATPase 欠損細胞に 2 度の LPS 刺激を施してエンドトキシン・トレランスを誘導したが、野生型細胞と比較して正常に作用せず、炎症性サイトカインの産生能が保持されることが分かった (図 3.10)。また、Bafilomycin A1 で処理した細胞においても同様の現象が確認された (図 3.10)。先行研究より、エンドトキシン・トレランスを誘導するための重要

な機構として TLR4 のエンドサイトーシスが第一に挙げられる[85,86]。TLR4 のエンドソームへの内在化により、細胞膜上の TLR4 の局在を減退させることで、MyD88-TIRAP 依存的なシグナル経路を選択的に阻害され、逆に TRIF-TRAM 依存的なシグナル経路が惹起される。その結果、MyD88-TIRAP 依存的な強い炎症性サイトカインの産生が抑えられ、かつ TRIF-TRAM 依存経路を介した抗炎症性サイトカイン (IL-10、TGF β など) の産生や負の制御因子 (IL-1RA、IRAK-M、hyaluronic acid、prostaglandin E2 など) の発現が誘導されるという複数の抑制機構が存在する[83,84]。これらのことから、V 型 ATPase 欠損細胞および Bafilomycin A1 投与を施した細胞では、TLR4 のエンドサイトーシスの異常に伴い、エンドトキシン・トレランスが障害されていると考えられる。しかしながら、樹立した V 型 ATPase 欠損細胞ではエンドトキシン・トレランスが部分的に障害されており、他の抑制機構が存在していることが示唆される。近年の研究からエンドトキシン・トレランスは TLR4 の内在化以外にも様々な誘導機構のもと制御されることが明らかとなってきた。例えば、NF- κ B ファミリーは p65、p50、c-Rel、RelB および p52 で構成されるが、一般に炎症応答時は p65 と p50 のヘテロ二量体や RelB と p50 のヘテロ二量体を中心となって炎症性サイトカインの転写が誘導される[109]。しかしながら、トレランス時は炎症性サイトカインの転写活性を持たない p50 ホモダイマーの形成が促進され、NF- κ B プロモーター領域に優先的に結合することで、炎症応答を抑制することが報告されている[110]。また、RelB は、G9a ヒストンメチル基転移酵素と相互作用することによりヒストン H3 のメチル化を誘導し、TNF α や IL-1 β といった炎症性サイトカインのプロモーター活性を負に制御するフィードバック機構を有している[111,112]。さらにエンドトキシン・トレランス時に miRNA の発現量が上昇し、炎症性サイトカインの産生が抑制されることが知られている[79,113]。特に miR-146a について詳細に解析されており、PRRs 下流のシグナル伝達分子である IRAK1 や TRAF6 (TNF receptor associated factor 6)、TNF α の転写レベルを負に制御する[114,115]。miR-9、miR-21 および Let-7 ファミリーにおいても NF- κ B のシグナル応答を抑制する作用を有することが報告されている上、miR-125b や miR-221 は TNF α の転写を阻害することが明らかとなっている[116-120]。したがって、これらの抑制機構が働き、樹立した V 型 ATPase 欠損細胞や Bafilomycin A1 投与を施した細胞で、1 度目の LPS 刺激時と比べて 2 度目の LPS 刺激時に炎症性サイトカインの産生量の減少が見られたと考えられる。

4.6 今後の展望

当研究室の先行研究で示されたアクリジンオレンジ染色の結果より、V 型 ATPase 欠損細胞においてエンドソーム内 pH 制御機構に異常をきたすことは確

認められたものの、核酸認識型 TLR の N 末端領域の切断修飾が阻害されているかは不明である。そこで、その修飾を受けたかどうかを切断領域のアミノ酸構造を特異的に認識する抗体を用いて評価していく。また、正確なエンドソーム内 pH の測定ができていないため、今後定量的な検討が必要である。さらに、本研究ではエンドソーム内 pH 環境と TLR4 の内在化を結びつける候補遺伝子として ARF6 を同定した。しかしながら、従来考えられている通りに ARF6 やその制御因子が V 型 ATPase と相互作用し、エンドソーム内酸性 pH 下でエンドサイトーシスが誘導されるかどうかは今のところ不明である。したがって、TLR4-HEK293 細胞に各遺伝子を過剰発現させ、Bafilomycin A1 処理の有無に伴い、これら分子間の結合親和性が変化するかを共免疫沈降法を用いて詳細に解析していく。また、TLR4 のエンドサイトーシスの誘導制御機構は、エンドソーム内酸性 pH 環境というよりはエンドサイトーシス関連分子を引き寄せるために V 型 ATPase がエンドソーム膜に存在することが重要であるという見方もできる。そこで、V 型 ATPase 以外のエンドソーム pH 制御因子である ClC ファミリーや NHE ファミリーにも着目し、CRISPR/Cas9 システムを用いて欠損細胞を樹立後、サイトカイン産生や TLR4 の内在化を指標に自然免疫応答における機能を明らかにしていく。また、これら本研究の異常が生体内においても同様に誘導されるか否かを確かめるため、将来的には CRISPR/Cas9 システムを用いて V 型 ATPase ATP6V₀D2 又は ATP6V₁B2 遺伝子のノックアウトマウスの樹立を目指す。樹立したノックアウトマウスに LPS 腹腔内投与による敗血症モデルの適用や他の PRRs リガンドの投与を施し、生存率や投与部位に流入する免疫細胞の動態ならびに血中サイトカイン量を測定する。さらに、ノックアウトマウスから取り出した細胞（樹状細胞、腹腔マクロファージ、肺や胎児の繊維芽細胞など）における各 PRRs リガンド刺激後のサイトカイン産生やシグナル伝達分子の活性化（リン酸化、ユビキチン化など）を解析することにより、生体内でのエンドソーム内 pH 環境が自然免疫応答に及ぼす影響を紐解いていく。

自然免疫細胞における V 型 ATPase の機能低下やエンドソーム内 pH 環境の変化により、TLR4 依存的なサイトカイン産生の異常やエンドトキシン・トレランスに支障をきたすといった知見は今までに報告されていない。炎症応答は病原体の感染防御を果たす一方、その継続的な過剰誘導は慢性的な炎症を誘発し、関節リウマチや脳脊髄炎、敗血症といった自己免疫疾患発症の原因となる[121,122]。この異常な炎症応答の原因として、本研究のようなエンドソーム内 pH 環境の恒常性の破綻がそれを引き起こしている可能性が考えられる。ヒトにおいて V 型 ATPase ATP6V₀A3 サブユニットの先天的な機能欠損型の遺伝子変異の存在が知られており、この患者は酸性オルガネラの中性化によって生じる破骨細胞の機能異常を伴う大理石病様の疾患を発症することが報告されている[70,123]。大理

石病の発症機構に RANKL (Receptor activator of NF- κ B ligand) シグナル伝達を介した NF- κ B の活性化が寄与することから、この疾患要因の一側面に本研究で得られた知見が関与している可能性も考えられる[124]。したがって、今後は V 型 ATPase ATP6V₀A3 サブユニットを対象とした TLR4 依存的な自然免疫応答の解析を行っていくとともに、本研究で樹立した V 型 ATPase サブユニット欠損 RAW264.7 細胞株を RANKL タンパク質存在下で培養することにより破骨細胞へと分化させて同様に実験を行っていきたいと考えている。これら解析で得られた知見は学術的意義に留まらず、大理石病などの V 型 ATPase の異常を起因とした疾患に対する新たな診断の道を模索するための一助となる可能性を有していると考えられる。

さらに、エンドソーム内 pH 環境の崩壊は破骨細胞の機能異常によって生じる大理石病以外にもエンドサイトーシスの異常により発症するデント病や遠位尿細管アシドーシスなどの多くの疾患を誘発することが報告されている[45,125-127]。また、結核菌のようなマイコバクテリウムは宿主に貪食された際に自身の生存のため V 型 ATPase やホスファチジルイノシトール 3-リン酸 (PI(3)P)、活性化 Rab7 などの発現を低下させることで、ファゴソーム内の酸性化抑制やリソソームとの融合を阻害していることが明らかとなっている[128,129]。このような細菌感染時に TLR4 が細胞膜上に留まり続けることに伴って NF- κ B を介した強い炎症応答が誘発され、結果的に宿主の生体防御反応に貢献する可能性が考えられる。したがって、以上で示したような自然免疫制御機構および疾患の発症メカニズムの理解に繋げるためにも、V 型 ATPase の機能や構造ならびにエンドソーム内 pH 環境の変化が TLR4 の動態にどのような影響を及ぼすかについて、更なる作用機序の解明と個体レベルでの研究が必要である。

第5章 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究を実施する機会を与えて頂くとともに、多大なるご指導を頂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分子免疫制御研究室の河合太郎教授に厚く御礼申し上げます。また、研究に対する心構えや多岐にわたる実験手技を丁寧にご指導頂きました同研究室の川崎拓実助教、織大祐助教、同研究室の先輩である鍛代悠一博士（現北海道大学）、Surya Pandey 博士（現シカゴ大学）に深く感謝いたします。本研究の欠損細胞の樹立にあたり、CRISPR/Cas9 システムで使用したプラスミドを供与いただきました大阪大学微生物病研究所・附属遺伝情報実験センターの伊川正人教授ならびにマウスの飼育管理をしていただきました奈良先端科学技術大学院大学・動物実験施設の技術スタッフの方々のご協力に心より御礼申し上げます。

本研究は当研究室の卒業生である箱崎理花氏が V 型 ATPase 欠損細胞株を樹立し、これら細胞株を用いて詳細に解析した結果、新たな自然免疫応答の制御機構の発見に繋がりました。本研究の礎を築いていただいた箱崎理花氏に感謝の意を表します。

当研究室の第一期生であり同期でもある末吉拓也氏と木下雅崇氏には互いに支え合いながら大きく成長することができたことをここに感謝いたします。この 5 年間、和やかな雰囲気のもと研究に取り組むことができたのは、研究生活に係る事務手続きなどの様々な手助けをしていただきました阿部香代秘書、鈴木千裕秘書ならびに河合研究室の皆様の良き人柄のおかげだと感じています。心より御礼申し上げます。

アドバイザーとして貴重なご意見を頂きました別所康全教授、塩崎一裕教授をはじめ、講義を通してバイオロジーの面白さと奥深さを伝えて頂きました先生方に心より感謝いたします。最後に精神的、経済的に支えて頂いた両親に深謝いたします。

第 6 章 参考文献

1. Kawai T, Akira S (2011) Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* **34**: 637-650
2. Jin MS, Lee J-O (2008) Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity* **29**: 182-191
3. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**: 783-801
4. Barton GM (2007) Viral recognition by Toll-like receptors. *Journal* **19**: 33-40
5. Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* **11**: 373-384
6. Kagan JC, Medzhitov R (2006) Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* **125**: 943-955
7. Nguyen TTN, Kim YM, Kim TD, Le OTT, Kim JJ, Kang HC, Hasegawa H, Kanaho Y, Jou I, Lee SY (2013) Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase α facilitates Toll-like receptor 4-mediated microglial inflammation through regulation of the Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein (TIRAP) location. *Journal of Biological Chemistry* **288**: 5645-5659
8. Gangloff M (2012) Different dimerisation mode for TLR4 upon endosomal acidification? *Trends in biochemical sciences* **37**: 92-98
9. Barbalat R, Lau L, Locksley RM, Barton GM (2009) Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nature immunology* **10**: 1200-1207
10. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC (2015) Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annual review of immunology* **33**: 257-290
11. Lee BL, Barton GM (2014) Trafficking of endosomal Toll-like receptors. *Trends in cell biology* **24**: 360-369
12. Kim Y-M, Brinkmann MM, Paquet M-E, Ploegh HL (2008) UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* **452**: 234-238
13. Tabeta K, Hoebe K, Janssen EM, Du X, Georgel P, Crozat K, Mudd S, Mann N, Sovath S, Goode J (2006) The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nature immunology* **7**: 156-164
14. Takahashi K, Shibata T, Akashi-Takamura S, Kiyokawa T, Wakabayashi Y, Tanimura N, Kobayashi T, Matsumoto F, Fukui R, Kouro T (2007) A protein associated with Toll-like receptor (TLR) 4 (PRAT4A) is required for TLR-dependent immune responses. *The*

Journal of experimental medicine **204**: 2963-2976

15. Liu B, Yang Y, Qiu Z, Staron M, Hong F, Li Y, Wu S, Li Y, Hao B, Bona R (2010) Folding of Toll-like receptors by the HSP90 paralogue gp96 requires a substrate-specific cochaperone. *Nature communications* **1**: 79
16. Lee BL, Moon JE, Shu JH, Yuan L, Newman ZR, Schekman R, Barton GM (2013) UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs. *Elife* **2**: e00291
17. Sasai M, Linehan MM, Iwasaki A (2010) Bifurcation of Toll-like receptor 9 signaling by adaptor protein 3. *Science* **329**: 1530-1534
18. Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R (2006) Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nature immunology* **7**: 49-56
19. Mouchess ML, Arpaia N, Souza G, Barbalat R, Ewald SE, Lau L, Barton GM (2011) Transmembrane mutations in Toll-like receptor 9 bypass the requirement for ectodomain proteolysis and induce fatal inflammation. *Immunity* **35**: 721-732
20. Babdor J, Descamps D, Adiko AC, Tohmé M, Maschalidi S, Evnouchidou I, Vasconcellos LR, De Luca M, Mauvais F-X, Garfa-Traore M (2017) IRAP+ endosomes restrict TLR9 activation and signaling. *Nature Immunology* **18**: 509-518
21. Liaunardy-Jopeace A, Bryant CE, Gay NJ (2014) The COPII adaptor protein TMED7 is required to initiate and mediate the anterograde trafficking of Toll-like receptor 4 to the plasma membrane. *Science signaling* **7**: ra70
22. Wang D, Lou J, Ouyang C, Chen W, Liu Y, Liu X, Cao X, Wang J, Lu L (2010) Ras-related protein Rab10 facilitates TLR4 signaling by promoting replenishment of TLR4 onto the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 13806-13811
23. Wang Y, Yang Y, Liu X, Wang N, Cao H, Lu Y, Zhou H, Zheng J (2012) Inhibition of clathrin/dynamin-dependent internalization interferes with LPS-mediated TRAM–TRIF-dependent signaling pathway. *Cellular immunology* **274**: 121-129
24. Rajaiah R, Perkins DJ, Ireland DD, Vogel SN (2015) CD14 dependence of TLR4 endocytosis and TRIF signaling displays ligand specificity and is dissociable in endotoxin tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: 8391-8396
25. Kim SJ, Kim HM (2017) Dynamic lipopolysaccharide transfer cascade to TLR4/MD2 complex via LBP and CD14. *BMB reports* **50**: 55
26. Zanoni I, Ostuni R, Marek LR, Barresi S, Barbalat R, Barton GM, Granucci F, Kagan JC (2011) CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell* **147**: 868-880
27. Husebye H, Halaas Ø, Stenmark H, Tunheim G, Sandanger Ø, Bogen B, Brech A,

- Latz E, Espevik T (2006) Endocytic pathways regulate Toll - like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *The EMBO journal* **25**: 683-692
28. Chuang T-H, Ulevitch RJ (2004) Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors. *Nature immunology* **5**: 495-502
29. Yang Z, Sun D, Yan Z, Reynolds AB, Christman JW, Minshall RD, Malik AB, Zhang Y, Hu G (2014) Differential role for p120-catenin in regulation of TLR4 signaling in macrophages. *The Journal of Immunology* **193**: 1931-1941
30. Van Acker T, Eyckerman S, Walle LV, Gerlo S, Goethals M, Lamkanfi M, Bovijn C, Tavernier J, Peelman F (2014) The small GTPase Arf6 is essential for the Tram/Trif pathway in TLR4 signaling. *Journal of Biological Chemistry* **289**: 1364-1376
31. Kagan JC (2010) Recycling endosomes and TLR signaling—the Rab11 GTPase leads the way. *Immunity* **33**: 578-580
32. Wang Y, Chen T, Han C, He D, Liu H, An H, Cai Z, Cao X (2007) Lysosome-associated small Rab GTPase Rab7b negatively regulates TLR4 signaling in macrophages by promoting lysosomal degradation of TLR4. *Blood* **110**: 962-971
33. Yoo J-S, Kato H, Fujita T (2014) Sensing viral invasion by RIG-I like receptors. *Current opinion in microbiology* **20**: 131-138
34. Dempsey A, Bowie AG (2015) Innate immune recognition of DNA: A recent history. *Virology* **479**: 146-152
35. Chen Q, Sun L, Chen ZJ (2016) Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nature Immunology* **17**: 1142-1149
36. Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Szukiewicz D (2014) The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators of inflammation* **2014**: 1
37. Eshleman EM, Lenz LL (2014) Type I interferons in bacterial infections: taming of myeloid cells and possible implications for autoimmunity. *Frontiers in Immunology* **5**: 431
38. Paroutis P, Touret N, Grinstein S (2004) The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation. *Physiology* **19**: 207-215
39. Demaurex N (2002) pH Homeostasis of cellular organelles. *Physiology* **17**: 1-5
40. Marshansky V, Futai M (2008) The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Current opinion in cell biology* **20**: 415-426
41. Ohgaki R, van IJendoorn SC, Matsushita M, Hoekstra D, Kanazawa H (2010) Organellar Na⁺/H⁺ exchangers: novel players in organelle pH regulation and their emerging functions. *Biochemistry* **50**: 443-450
42. Estévez R, Jentsch T (2002) CLC chloride channels: correlating structure with function. *Current opinion in structural biology* **12**: 531-539

43. Kornak U, Reynders E, Dimopoulou A, Van Reeuwijk J, Fischer B, Rajab A, Budde B, Nürnberg P, Foulquier F, Dobyns WB (2008) Impaired glycosylation and cutis laxa caused by mutations in the vesicular H⁺-ATPase subunit ATP6V0A2. *Nature genetics* **40**: 32-34
44. Kornak U, Schulz A, Friedrich W, Uhlhaas S, Kremens B, Voit T, Hasan C, Bode U, Jentsch TJ, Kubisch C (2000) Mutations in the $\alpha 3$ subunit of the vacuolar H⁺-ATPase cause infantile malignant osteopetrosis. *Human Molecular Genetics* **9**: 2059-2063
45. Piwon N, Günther W, Schwake M, Bösl MR, Jentsch TJ (2000) ClC-5 Cl⁻-channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature* **408**: 369-373
46. Kornak U, Kasper D, Bösl MR, Kaiser E, Schweizer M, Schulz A, Friedrich W, Delling G, Jentsch TJ (2001) Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* **104**: 205-215
47. Mauvezin C, Neufeld TP (2015) Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* **11**: 1437-1438
48. Al - Bari M, Alim A (2017) Targeting endosomal acidification by chloroquine analogs as a promising strategy for the treatment of emerging viral diseases. *Pharmacology research & perspectives* **5**: E00293
49. Ewald SE, Engel A, Lee J, Wang M, Bogyo M, Barton GM (2011) Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. *The Journal of experimental medicine* **208**: 643-651
50. Garcia-Cattaneo A, Gobert F-X, Müller M, Toscano F, Flores M, Lescure A, Del Nery E, Benaroch P (2012) Cleavage of Toll-like receptor 3 by cathepsins B and H is essential for signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 9053-9058
51. Park B, Brinkmann MM, Spooner E, Lee CC, Kim Y-M, Ploegh HL (2008) Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nature immunology* **9**: 1407-1414
52. Sepulveda FE, Maschalidi S, Colisson R, Heslop L, Ghirelli C, Sakka E, Lennon-Duménil A-M, Amigorena S, Cabanie L, Manoury B (2009) Critical role for asparagine endopeptidase in endocytic Toll-like receptor signaling in dendritic cells. *Immunity* **31**: 737-748
53. Jounai N, Kobiyama K, Takeshita F, Ishii KJ (2013) Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **2**: 168
54. Kawane K, Ohtani M, Miwa K, Kizawa T, Kanbara Y, Yoshioka Y, Yoshikawa H, Nagata S (2006) Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from

degradation in macrophages. *Nature* **443**: 998-1002

55. Gao D, Li T, Li X-D, Chen X, Li Q-Z, Wight-Carter M, Chen ZJ (2015) Activation of cyclic GMP-AMP synthase by self-DNA causes autoimmune diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: E5699-E5705
56. Bernard JJ, Cowing-Zitron C, Nakatsuji T, Muehleisen B, Muto J, Borkowski AW, Martinez L, Greidinger EL, Benjamin DY, Gallo RL (2012) Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nature medicine* **18**: 1286-1290
57. Takemura N, Kawasaki T, Kunisawa J, Sato S, Lamichhane A, Kobiyama K, Aoshi T, Ito J, Mizuguchi K, Karuppuchamy T (2014) Blockade of TLR3 protects mice from lethal radiation-induced gastrointestinal syndrome. *Nature communications* **5**: 3492
58. Kobayashi T, Shimabukuro-Demoto S, Yoshida-Sugitani R, Furuyama-Tanaka K, Karyu H, Sugiura Y, Shimizu Y, Hosaka T, Goto M, Kato N (2014) The histidine transporter SLC15A4 coordinates mTOR-dependent inflammatory responses and pathogenic antibody production. *Immunity* **41**: 375-388
59. Kužnik A, Benčina M, Švajger U, Jeras M, Rozman B, Jerala R (2011) Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. *The Journal of Immunology* **186**: 4794-4804
60. Yan Y, Jiang K, Liu P, Zhang X, Dong X, Gao J, Liu Q, Barr MP, Zhang Q, Hou X (2016) Bafilomycin A1 induces caspase-independent cell death in hepatocellular carcinoma cells via targeting of autophagy and MAPK pathways. *Scientific Reports* **6**: 37052
61. Yuan N, Song L, Zhang S, Lin W, Cao Y, Xu F, Fang Y, Wang Z, Zhang H, Li X (2015) Bafilomycin A1 targets both autophagy and apoptosis pathways in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **100**: 345-356
62. Lee S-J, Silverman E, Bargman JM (2011) The role of antimalarial agents in the treatment of SLE and lupus nephritis. *Nature Reviews Nephrology* **7**: 718-729
63. Cotter K, Stransky L, McGuire C, Forgac M (2015) Recent insights into the structure, regulation, and function of the V-ATPases. *Trends in biochemical sciences* **40**: 611-622
64. Marshansky V, Rubinstein JL, Grüber G (2014) Eukaryotic V-ATPase: novel structural findings and functional insights. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1837**: 857-879
65. Wu H, Xu G, Li YP (2009) Atp6v0d2 Is an Essential Component of the Osteoclast - Specific Proton Pump That Mediates Extracellular Acidification in Bone Resorption. *Journal of Bone and Mineral Research* **24**: 871-885
66. Ayodele BA, Mirams M, Pagel CN, Mackie EJ (2017) The vacuolar H⁺ ATPase V0 subunit d2 is associated with chondrocyte hypertrophy and supports chondrocyte

differentiation. *Bone reports* **7**: 98-107

67. Lee S-H, Rho J, Jeong D, Sul J-Y, Kim T, Kim N, Kang J-S, Miyamoto T, Suda T, Lee S-K (2006) v-ATPase V0 subunit d2-deficient mice exhibit impaired osteoclast fusion and increased bone formation. *Nature medicine* **12**: 1403-1409
68. Supanchart C, Kornak U (2008) Ion channels and transporters in osteoclasts. *Archives of biochemistry and biophysics* **473**: 161-165
69. Yuan Y, Zhang J, Chang Q, Zeng J, Xin F, Wang J, Zhu Q, Wu J, Lu J, Guo W (2014) De novo mutation in ATP6V1B2 impairs lysosome acidification and causes dominant deafness-onychodystrophy syndrome. *Cell research* **24**: 1370-1373
70. Li Y-P, Chen W, Liang Y, Li E, Stashenko P (1999) Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. *Nature genetics* **23**: 447-451
71. Wittebole X, Castanares-Zapatero D, Laterre P (2010) Toll-like receptor 4 modulation as a strategy to treat sepsis. *Mediators of inflammation* **2010**: 568396
72. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P (2012) Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* **12**: 860-875
73. Park M-K, Oh H-J, Heo Y-M, Park E-M, Cho M-L, Kim H-Y, Park S-H (2011) Myeloid differentiation primary response protein 88 blockade upregulates indoleamine 2, 3-dioxygenase expression in rheumatoid synovial fibroblasts. *Experimental & molecular medicine* **43**: 446-454
74. Chen Y, Sun W, Gao R, Su Y, Umehara H, Dong L, Gong F (2013) The role of high mobility group box chromosomal protein 1 in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **52**: 1739-1747
75. Kang R, Chen R, Zhang Q, Hou W, Wu S, Cao L, Huang J, Yu Y, Fan X-g, Yan Z (2014) HMGB1 in health and disease. *Molecular aspects of medicine* **40**: 1-116
76. Sokolove J, Zhao X, Chandra PE, Robinson WH (2011) Immune complexes containing citrullinated fibrinogen costimulate macrophages via Toll - like receptor 4 and Fcγ receptor. *Arthritis & Rheumatology* **63**: 53-62
77. Nakagawa R, Naka T, Tsutsui H, Fujimoto M, Kimura A, Abe T, Seki E, Sato S, Takeuchi O, Takeda K (2002) SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity* **17**: 677-687
78. Shi M, Deng W, Bi E, Mao K, Ji Y, Lin G, Wu X, Tao Z, Li Z, Cai X (2008) TRIM30α negatively regulates TLR-mediated NF-κB activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation. *Nature immunology* **9**: 369-377
79. O'Neill LA, Sheedy FJ, McCoy CE (2011) MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like

receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* **11**: 163-175

80. Boone DL, Turer EE, Lee EG, Ahmad R-C, Wheeler MT, Tsui C, Hurley P, Chien M, Chai S, Hitotsumatsu O (2004) The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nature immunology* **5**: 1052-1060
81. Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, Israël A, Wallach D, Courtois G (2003) The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF- κ B signalling by deubiquitination. *Nature* **424**: 801-805
82. Wang J, Hu Y, Deng WW, Sun B (2009) Negative regulation of Toll-like receptor signaling pathway. *Microbes and infection* **11**: 321-327
83. Biswas SK, Lopez-Collazo E (2009) Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in immunology* **30**: 475-487
84. Seeley JJ, Ghosh S (2016) Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *Journal of Leukocyte Biology* **1**: 107-119
85. Biswas SK, Bist P, Dhillon MK, Kajiji T, del Fresno C, Yamamoto M, Lopez-Collazo E, Akira S, Tergaonkar V (2007) Role for MyD88-independent, TRIF pathway in lipid A/TLR4-induced endotoxin tolerance. *The Journal of Immunology* **179**: 4083-4092
86. Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, Nakanishi K, Kimoto M, Miyake K, Takeda K (2000) Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *The Journal of Immunology* **164**: 3476-3479
87. Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M (2013) Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Scientific reports* **3**: 3355
88. Chattopadhyay S, Sen GC (2014) dsRNA-activation of TLR3 and RLR signaling: gene induction-dependent and independent effects. *Journal of Interferon & Cytokine Research* **34**: 427-436
89. Donaldson JG, Jackson CL (2011) ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nature reviews Molecular cell biology* **12**: 362-375
90. Wu J-Y, Kuo C-C (2012) Pivotal role of ADP-ribosylation factor 6 in Toll-like receptor 9-mediated immune signaling. *Journal of Biological Chemistry* **287**: 4323-4334
91. Kitai Y, Takeuchi O, Kawasaki T, Ori D, Sueyoshi T, Murase M, Akira S, Kawai T (2015) Negative regulation of melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5)-dependent antiviral innate immune responses by Arf-like protein 5B. *Journal of Biological Chemistry* **290**: 1269-1280
92. Yang Y-K, Qu H, Gao D, Di W, Chen H-W, Guo X, Zhai Z-H, Chen D-Y (2011) ARF-

- like protein 16 (ARL16) inhibits RIG-I by binding with its C-terminal domain in a GTP-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 10568-10580
93. Hurtado-Lorenzo A, Skinner M, El Annan J, Futai M, Sun-Wada G-H, Bourgoin S, Casanova J, Wildeman A, Bechoua S, Ausiello DA (2006) V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway. *Nature cell biology* **8**: 124-136
94. Macia E, Luton F, Partisani M, Cherfils J, Chardin P, Franco M (2004) The GDP-bound form of Arf6 is located at the plasma membrane. *Journal of Cell Science* **117**: 2389-2398
95. Yokomakura A, Hong J, Ohuchi K, Oh S-E, Lee J-Y, Mano N, Takahashi T, Hwang G-W, Naganuma A (2012) Increased production of reactive oxygen species by the vacuolar-type (H⁺)-ATPase inhibitors bafilomycin A1 and concanamycin A in RAW 264 cells. *The Journal of toxicological sciences* **37**: 1045-1048
96. Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, Heckl D, Ebert BL, Root DE, Doench JG (2014) Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* **343**: 84-87
97. Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES (2014) Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* **343**: 80-84
98. Kim T, Ha H, Kim N, Park E-S, Rho J, Kim EC, Lorenzo J, Choi Y, Lee SH (2010) ATP6v0d2 deficiency increases bone mass, but does not influence ovariectomy-induced bone loss. *Biochemical and biophysical research communications* **403**: 73-78
99. Sobacchi C, Schulz A, Coxon FP, Villa A, Helfrich MH (2013) Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function. *Nature Reviews Endocrinology* **9**: 522-536
100. Stark Z, Savarirayan R (2009) Osteopetrosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **4**: 5
101. Russo C, Cornella-Taracido I, Galli-Stampino L, Jain R, Harrington E, Isome Y, Tavarini S, Sammiceli C, Nuti S, Mbow ML (2011) Small molecule Toll-like receptor 7 agonists localize to the MHC class II loading compartment of human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **117**: 5683-5691
102. Husebye H, Aune MH, Stenvik J, Samstad E, Skjeldal F, Halaas Ø, Nilsen NJ, Stenmark H, Latz E, Lien E (2010) The Rab11a GTPase controls Toll-like receptor 4-induced activation of interferon regulatory factor-3 on phagosomes. *Immunity* **33**: 583-596
103. Stack J, Doyle SL, Connolly DJ, Reinert LS, O'Keeffe KM, McLoughlin RM, Paludan SR, Bowie AG (2014) TRAM is required for TLR2 endosomal signaling to type

I IFN induction. *The Journal of Immunology* **193**: 6090-6102

104. Wan T, Liu T, Zhang H, Tang S, Min W (2010) AIP1 functions as Arf6-GAP to negatively regulate TLR4 signaling. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 3750-3757

105. Gu F, Gruenberg J (2000) ARF1 regulates pH-dependent COP functions in the early endocytic pathway. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 8154-8160

106. De Luca M, Cogli L, Progida C, Nisi V, Pascolutti R, Sigismund S, Di Fiore PP, Bucci C (2014) RILP regulates vacuolar ATPase through interaction with the V1G1 subunit. *J Cell Sci* **127**: 2697-2708

107. Honda A, Nogami M, Yokozeki T, Yamazaki M, Nakamura H, Watanabe H, Kawamoto K, Nakayama K, Morris AJ, Frohman MA (1999) Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase α is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* **99**: 521-532

108. Funakoshi Y, Hasegawa H, Kanaho Y (2011) Regulation of PIP5K activity by Arf6 and its physiological significance. *Journal of cellular physiology* **226**: 888-895

109. Zhang H, Sun S-C (2015) NF- κ B in inflammation and renal diseases. *Cell & bioscience* **5**: 63

110. Ziegler-Heitbrock L (2001) The p50-homodimer mechanism in tolerance to LPS. *Journal of endotoxin research* **7**: 219-222

111. Chan C, Li L, McCall CE, Yoza BK (2005) Endotoxin tolerance disrupts chromatin remodeling and NF- κ B transactivation at the IL-1 β promoter. *The Journal of Immunology* **175**: 461-468

112. El Gazzar M, Yoza BK, Chen X, Garcia BA, Young NL, McCall CE (2009) Chromatin-specific remodeling by HMGB1 and linker histone H1 silences proinflammatory genes during endotoxin tolerance. *Molecular and cellular biology* **29**: 1959-1971

113. Nahid MA, Satoh M, Chan EK (2011) MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance. *Cellular & molecular immunology* **8**: 388-403

114. Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D (2006) NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 12481-12486

115. El Gazzar M, Church A, Liu T, McCall CE (2011) MicroRNA-146a regulates both transcription silencing and translation disruption of TNF- α during TLR4-induced gene reprogramming. *Journal of leukocyte biology* **90**: 509-519

116. El Gazzar M, McCall CE (2010) MicroRNAs distinguish translational from transcriptional silencing during endotoxin tolerance. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 20940-20951

117. Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, Martin C, O'leary JJ, Ruan Q, Johnson DS, Chen Y, O'Neill LA (2010) Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nature immunology* **11**: 141-147
118. Bazzoni F, Rossato M, Fabbri M, Gaudiosi D, Mirolo M, Mori L, Tamassia N, Mantovani A, Cassatella MA, Locati M (2009) Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 5282-5287
119. Androulidaki A, Iliopoulos D, Arranz A, Doxaki C, Schworer S, Zacharioudaki V, Margioris AN, Tsichlis PN, Tsatsanis C (2009) The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs. *Immunity* **31**: 220-231
120. Tili E, Michaille J-J, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, Fabbri M, Alder H, Liu CG, Calin GA (2007) Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF- α stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *The Journal of Immunology* **179**: 5082-5089
121. Leech MD, Barr TA, Turner DG, Brown S, O'Connor RA, Gray D, Mellanby RJ, Anderton SM (2013) Cutting Edge: IL-6-Dependent Autoimmune Disease: Dendritic Cells as a Sufficient, but Transient, Source. *The Journal of Immunology* **190**: 881-885
122. Marshak-Rothstein A (2006) Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nature Reviews Immunology* **6**: 823-835
123. Frattini A, Orchard PJ, Sobacchi C, Giliani S, Abinun M, Mattsson JP, Keeling DJ, Andersson A-K, Wallbrandt P, Zecca L (2000) Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nature genetics* **25**: 343-346
124. Boyce BF, Xing L (2008) Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of biochemistry and biophysics* **473**: 139-146
125. Scheel O, Zdebik AA, Lourdel S, Jentsch TJ (2005) Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLC proteins. *Nature* **436**: 424-427
126. Weinert S, Jabs S, Supanchart C, Schweizer M, Gimber N, Richter M, Rademann J, Stauber T, Kornak U, Jentsch TJ (2010) Lysosomal pathology and osteopetrosis upon loss of H⁺-driven lysosomal Cl⁻-accumulation. *Science* **328**: 1401-1403
127. Karet FE, Finberg KE, Nelson RD, Nayir A, Mocan H, Sanjad SA, Rodriguez-Soriano J, Santos F, Cremers CW, Di Pietro A (1999) Mutations in the gene encoding B1 subunit of H⁺-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nature genetics* **21**: 84-90
128. Wong D, Bach H, Sun J, Hmama Z, Av-Gay Y (2011) Mycobacterium tuberculosis

protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 19371-19376

129. He Y, Li W, Liao G, Xie J (2012) Mycobacterium tuberculosis-specific phagosome proteome and underlying signaling pathways. *Journal of proteome research* **11**: 2635-2643

参考図

V型ATPase V₀D2サブユニット欠損RAW264.7細胞 (V0D2 KO)

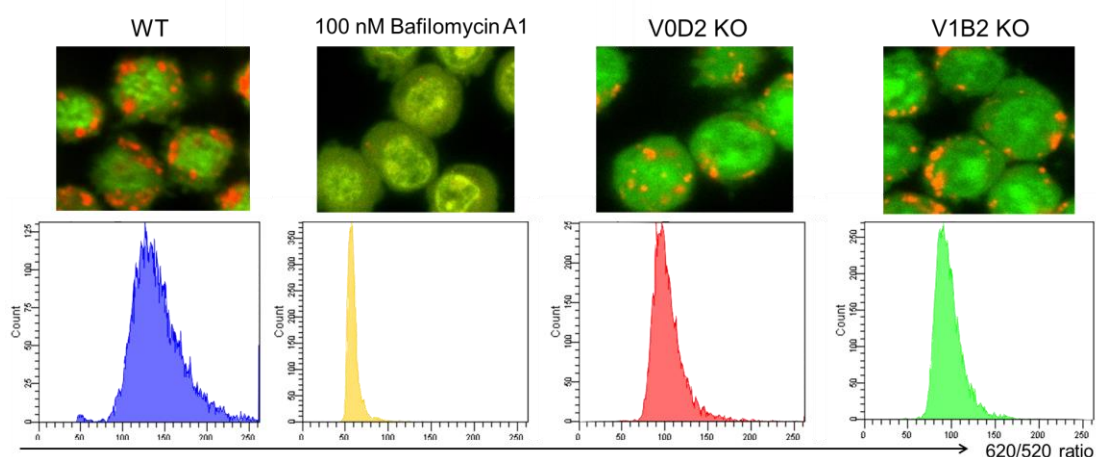
V0D2-WT-Exon2	1	ACCTGAAAATTCATCTCCAGACCACGGACTATGGCAACTTCCTGGCTAATGAAACAAATC	60
V0D2-KO-Exon2-chromo1	1	ACCTGAAAATTCATC-----ACGGACTATGGCAACTTCCTGGCTAATGAAACAAATC	52
V0D2-KO-Exon2-chromo2	1	ACCTGAAAATTCATCTCCAG-----ATGGCAACTTCCTGGCTAATGAAACAAATC	50
V0D2-WT-Exon2	61	CTCTCACTGTTTCCAAAATTGACACGGAGATGAGGAAGAAGCTCTGCAGAGAGTTTGACT	120
V0D2-KO-Exon2-chromo1	53	CTCTCACTGTTTCCAAAATTGACACGGAGATGAGGAAGAAGCTCTGCAGAGAGTTTGACT	112
V0D2-KO-Exon2-chromo2	51	CTCTCACTGTTTCCAAAATTGACACGGAGATGAGGAAGAAGCTCTGCAGAGAGTTTGACT	110
V0D2-WT-Exon2	121	ATTTCGGGAATCATTCCTTGGAGCCCCTGAGCACATTTCTCACCTACATGAC	172
V0D2-KO-Exon2-chromo1	113	ATTTCGGGAATCATTCCTTGGAGCCCCTGAGCACATTTCTCACCTACATGAC	164
V0D2-KO-Exon2-chromo2	111	ATTTCGGGAATCATTCCTTGGAGCCCCTGAGCACATTTCTCACCTACATGAC	162

V型ATPase V₁B2サブユニット欠損RAW264.7細胞 (V1B2 KO)

V1B2-WT-Exon1	1	ATGGCGTTGCGAGCGATGCGGGGAATCGTGAACGGGGCCGCACCCGAATGCCCGTGCCC	60
V1B2-KO-Exon1-chromo1	1	ATGGCGTTGCGAGCGATGCGGGGAATCGTGAACGGGGCCGCACCCGAATGCCCGTGCCC	60
V1B2-KO-Exon1-chromo2	1	ATGGCGTTGCGAGCGATGCGGGGAATCGTGAACGGGGCCGCACCCGAATGCCCGTGCCC	60
V1B2-WT-Exon1	61	ACCGGTGGGCCGATGGCCGGAGCTCGGGAGCAGGCGCTGGCGGTGAGCCGGAATACCTA	120
V1B2-KO-Exon1-chromo1	61	ACCGGTGGGCCGATGGCCGGAGCTCGGGAGC-----CTA	94
V1B2-KO-Exon1-chromo2	61	ACCGGTGGGCCGATGGCCGGAGCTCGGGAGC-----CTA	94
V1B2-WT-Exon1	121	TCCCAGCCTCGTCTCA	136
V1B2-KO-Exon1-chromo1	95	TCCCAGCCTCGTCTCA	110
V1B2-KO-Exon1-chromo2	95	TCCCAGCCTCGTCTCA	110

参考図 1 V 型 ATPase 欠損細胞株の欠損配列部位

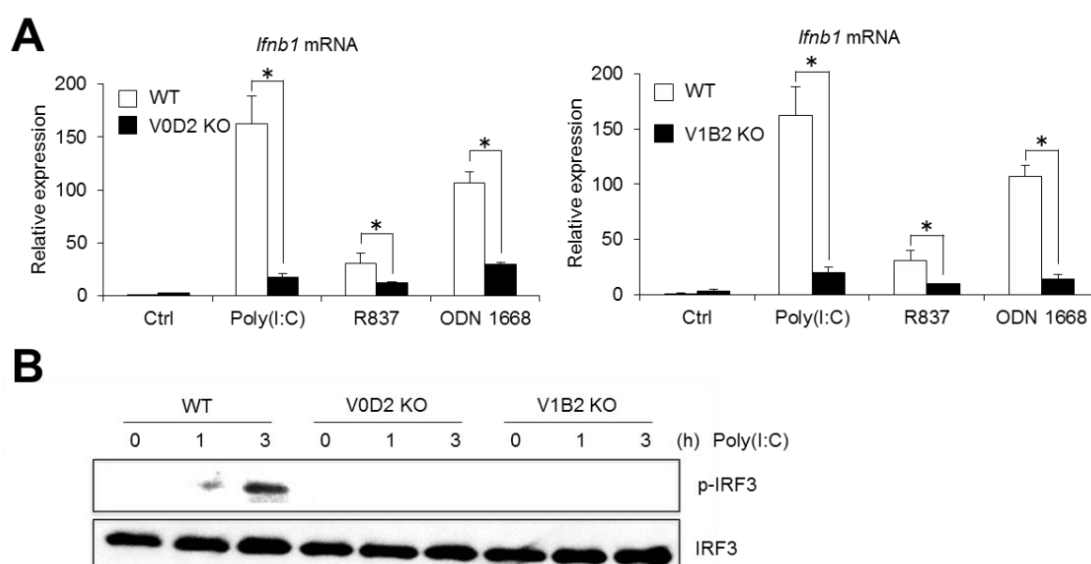
CRISPR/Cas9 システムにより樹立した V0D2 KO および V1B2 KO 細胞の欠損配列部位の塩基配列を示した[NAIST バイオサイエンス研究科 2016 年度 箱崎理花 修士論文]。



参考図 2 V 型 ATPase 欠損細胞株のアクリジンオレンジ染色

野生型細胞と V 型 ATPase 欠損細胞株のエンドソーム内 pH をアクリジンオレンジ染色により評価した。アクリジンオレンジは pH 感受性を持つ蛍光試薬であり、小胞内の

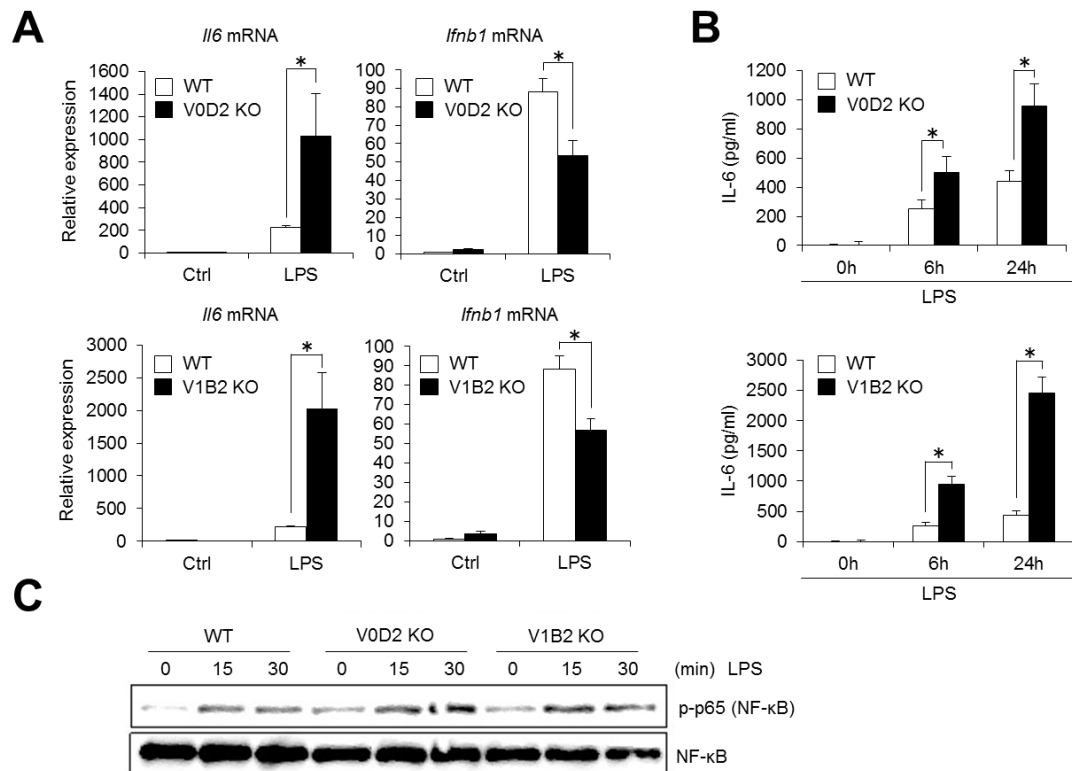
pH が酸性時は 480 nm で励起することにより 620 nm の蛍光波長が検出されるが、pH の値が中性へ移行するにつれて 620 nm の蛍光波長が減弱する。また、アクリジンオレンジは核内の二本鎖 DNA と結合して 500 nm で励起することにより 520 nm の蛍光波長を発する。アクリジンオレンジを 5 $\mu\text{g/mL}$ で PBS に溶解し、5 分間染色後、共焦点蛍光顕微鏡下で 620 nm (赤) および 520 nm (緑) の蛍光波長を検出した。加えて野生型細胞に V 型 ATPase 阻害剤 Bafilomycin A1 を投与し、5 分間インキュベート後、アクリジンオレンジ染色を行った。さらに、FACS 解析にてエンドソーム内 620 nm 蛍光波長に対する核内 520 nm 蛍光波長 (620 nm / 520 nm 蛍光比率) をヒストグラムで表示した[NAIST バイオサイエンス研究科 2016 年度 箱崎理花 修士論文]。



参考図 3 V 型 ATPase 欠損細胞株の核酸認識型 TLR 依存的な抗ウイルス応答

A : 野生型細胞と V 型 ATPase 欠損細胞株に TLR3、TLR7、TLR9 リガンド (Poly(I:C)、R837、ODN1668) で刺激をそれぞれ施し、6 時間反応後、*Ifnb1* の mRNA 量を RT-qPCR により測定した (n = 3、mean \pm SD、*: *t*-test $p < 0.05$)。

B : 野生型細胞と V 型 ATPase 欠損細胞株に TLR3 リガンドである Poly(I:C)を 0、1、3 時間で刺激し、IRF3 のリン酸化量をウェスタンブロットにより検出した[NAIST バイオサイエンス研究科 2016 年度 箱崎理花 修士論文]。



参考図 4 V 型 ATPase 欠損細胞株の TLR4 依存的な自然免疫応答

A: 野生型細胞と V 型 ATPase 欠損細胞株に TLR4 リガンド (LPS) で刺激 6 時間後、*Il6* および *Ifnb1* の mRNA 量を RT-qPCR により測定した (n = 3、mean ± SD、*: t-test $p < 0.05$)。

B: 野生型細胞と V 型 ATPase 欠損細胞株に LPS を 0、6、24 時間で刺激後、上清中の IL-6 タンパク質量を ELISA 法により測定した (n = 3、mean ± SD、*: t-test $p < 0.05$)。

C: 野生型細胞と V 型 ATPase 欠損細胞株に LPS を 0、15、30 分間で刺激し、NF-κB p65 のリン酸化量をウェスタンブロットにより検出した[NAIST バイオサイエンス研究科 2016 年度 箱崎理花 修士論文]。