

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590356

研究課題名（和文） 霊長類における自然免疫関連遺伝子の分子進化とエンドトキシン感受性の関わり

研究課題名（英文） Molecular evolution of the TLR4 gene in the course of primate evolution and their sensitivities to the response to endotoxin

研究代表者

中島 敏晶（NAKAJIMA TOSHIAKI）

東京医科歯科大学・大学院疾患生命科学部・准教授

研究者番号：50307956

研究成果の概要（和文）：本研究は、様々なエンドトキシンに対するTLR4の感受性の霊長類による違いを明らかにすることにより、感染防御機構の霊長類の種類による違いを明らかにすることを目的とする。霊長類7種（ヒト、チンパンジー、ボノボ、ゴリラ、オラウータン、アガゲザル、カニクイザル）のTLR4アミノ酸配列より、TLR4の3D構造予測を行なった。細胞外ドメインのエンドトキシン認識に関わる領域に、正の自然選択の影響下にあるアミノ酸配列の違いが認められたが、3D構造予測では明らかな違いを検出することができなかった。また、TLRファミリー遺伝子およびMYD88、TICAM1、TICAM2などのTLR情報伝達に関わる遺伝子と歯周病、パージャール病、高安病との関連を検討し、パージャール病とMYD88遺伝子多型との関連を報告した。

研究成果の概要（英文）：The innate immune system constitutes the front line of host defense against pathogens. Toll-like receptor 4 (TLR4) recognize molecules derived from pathogens and play crucial roles in the innate immune system. Here we provide evidence that the TLR4 gene have come under natural selection pressure in the course of primate evolution. We compared the nucleotide sequences of TLR4 gene among seven primate species. Analysis of the non-synonymous/synonymous substitution ratio revealed the presence of both strictly conserved and rapidly evolving regions in the TLR4 gene. The genomic segments encoding the intracellular Toll/interleukin 1 receptor (TIR) domains, which exhibited lower rates of non-synonymous substitution, have undergone purifying selection. In contrast, the extracellular domain of TLR4, which carried an unusually high proportion of non-synonymous substitutions, was found to have been the target of positive Darwinian selection in primate evolution. However, the 3D structural prediction showed no difference in the 3D structure of extracellular domain of TLR4 among seven primate species. We also reported the association of MYD88 with the susceptibility to Buerger's disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：分子遺伝学

1. 研究開始当初の背景

人類の歴史上、感染症は生存を脅かす最大の脅威であり、近代の医学における最も重要な解決すべき研究課題であると言える。今日でも発展途上国における最大の死因は感染症であり、先進国においても HIV/AIDS や結核などの難治性感染症が存在し、その克服は医学における喫緊の課題である。SARS や新型インフルエンザなどの新興感染症の発生を見ても、人類の歴史は常に感染症との戦いであると言っても過言ではない。

申請者は、疾患感受性・抵抗性遺伝子の解明に取り組んでいる。従来の遺伝学的な解析手法に加え、ヒトおよび霊長類の進化の視点からアプローチすることにより、新たな展開が期待できると考えており、これまでに、ヒト集団および霊長類のゲノム多様性比較が、その解明に有用であることを報告してきている (Am. J. Hum. Genetics 2002, Am. J. Hum. Genetics 2004, Genes & Immun 2004, Genes & Immun 2005, Cytogenetics Genome Research *in press*)。特に、感染症の感受性・抵抗性に関わる遺伝子の解明においては、有用であると考えている。霊長類の種類によって、様々な感染症に対する感受性・抵抗性が異なることが知られている。例えば、HIV/AIDS ウイルスはヒト、およびチンパンジーに感染するが、HIV 細胞内侵入後の細胞内複製の過程が阻害されていることにより、旧世界ザルには感染することができない。また、チンパンジーは HIV に感染するものの、AIDS 発症に抵抗性を示すことが知られている。同様に、結核菌に対する感受性も霊長類の種類によって異なることが知られている。これらの事実は、各々の霊長類の進化の過程において、種の存続を脅かす感染性微生物に暴露した場合、特異的な感染防御機構を備えた種が進化の過程で生存してきたものと考えられ、ヒトおよび霊長類の進化の視点から、感染症の感受性・抵抗性に関わる遺伝子にアプローチすることは理にかなっている。

我々は、霊長類の感染防御に関わる遺伝子の配列を比較することにより、様々な感染症に対する防御機構の多様性、および霊長類種間の感染感受性の違いのメカニズム明らかにしようと考えた。まず、自然免疫において重要な役割をはたす toll-like receptor (TLR) ファミリー遺伝子 (*TLR1-TLR10*)、その情報伝達に関わる細胞内アダプター分子 (*MYD88, TIRAP, TICAM1, TICAM2*)、およびエンドトキシンの認識に関わる分子 (*CD14, MD2*)、計 16 遺伝子の coding 領域の配列比較に基づく分子進化の検討をおこなった (Immunogenetics 2008)。原猿、新世界ザル、旧世界ザル、類人猿からなる 21 種類の

霊長類の配列比較により、グラム陰性菌の細胞壁構成成分であるエンドトキシンの認識に関わる TLR4 細胞外ドメインのアミノ酸置換率が、旧世界ザル、および類人猿の分岐以降に上昇していることを明らかにした (正の自然選択)。TLR4 により誘導される感染防御機構が、霊長類の種類により異なっていることが示唆される。

本研究では、様々なエンドトキシシンに対する感受性の霊長類種間による違いを明らかにすることにより、霊長類の進化の過程における感染症の関わりを紐解くとともに、感染防御機構の霊長類の種類による違いを明らかにすることを目的とする。また、グラム陰性菌感染症が原因である歯周病を高率に合併するパージャー病と TLR4 細胞外ドメインの遺伝子多型との関連も合わせて検討する。このような研究を進展させることは、霊長類の進化における感染症の関わりを明らかにするばかりではなく、新たな治療・予防戦略の開発の基盤を築き、今後生じ得る SARS や新型インフルエンザのような新興感染症に対する研究手法として期待できる。また、新たな研究領域「進化医科学」と言う新たな学問領域の創設に繋がるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、様々なエンドトキシシンに対する TLR4 の感受性の霊長類による違いを明らかにすることにより、霊長類の進化の過程における感染症の関わりへの理解を深めるとともに、感染防御機構の霊長類の種類による違いを明らかにすることを目的とする。以下の 3 点を期間内に明らかにする。

1) エンドトキシシン感受性における霊長類 TLR4 細胞外ドメインアミノ酸配列の特異性

TLR4 はグラム陰性菌のエンドトキシシンの認識に重要な役割を果たしている。我々は、エンドトキシシンの認識部位である TLR4 の細胞外ドメインのアミノ酸置換率が、霊長類進化の過程において旧世界ザルおよび類人猿の分岐以降に上昇していること (正の自然選択) を明らかにしている。

エンドトキシシンの構造はグラム陰性菌の種類により異なることが知られているが、本研究では、様々なエンドトキシシンに対する感受性の違いを調べることににより、霊長類 TLR4 細胞外ドメインアミノ酸配列の特異性を明らかにする。HEK-293 細胞に霊長類 - ヒトキメラ TLR4 (細胞外ドメインを様々な霊長類の配列に置換する)、CD14、MD2、S100A8/A9 を発現させ、様々なエンドトキシシンに対する反応性を、TNF- α 産生量、NF κ B 応答性レポーターアッセイで検討する。現在、入手が可能な *Escherichia coli*、

Klebsiella pneumoniae、*Pseudomonas aeruginosa*、*Salmonella enterica* の 4 種類のグラム陰性菌由来のエンドトキシンに対する感受性を検討する。

2) TLR4 細胞外ドメインの立体構造予測とエンドトキシン感受性を決定するアミノ酸の同定

TLR4 細胞外ドメインの構造予測を行い、エンドトキシン認識機構への理解を深めるとともに、新たな治療薬開発の基盤を築く。ヒト TLR4 の立体構造はすでに報告されており、モデル解析による立体構造予測が可能である。SWISS-MODEL、PyMOL などのプログラムを用い霊長類 TLR4 の立体構造比較をおこない、エンドトキシン感受性との関わりを検討することにより、エンドトキシン感受性を決定するアミノ酸を明らかにする。

3) グラム陰性菌感染症に由来する歯周病を合併するパージャーカー病と TLR4 遺伝子多型との関連

パージャーカー病はグラム陰性菌感染症に由来する歯周病を高率に合併し、その発症において細菌感染症が重要な役割を果たしている。パージャーカー病と TLR4 遺伝子多型との関連を、我々が収集したパージャーカー病患者の DNA サンプルを用いて検討する。

3. 研究の方法

自然免疫において重要な役割を果たす toll-like receptor (TLR) ファミリー遺伝子 (TLR1-TLR10) その情報伝達に関わる細胞内アダプター分子 (MYD88, TIRAP, TICAM1, TICAM2)、およびエンドトキシンの認識に関わる分子 (CD14, MD2) 計 16 遺伝子の coding 領域の配列比較に基づく分子進化の検討により、グラム陰性菌の細胞壁構成成分であるエンドトキシンの認識に関わる TLR4 細胞外ドメインのアミノ酸置換率が、旧世界ザル、および類人猿の分岐以降に上昇していることを明らかにした (正の自然選択)。TLR4 により誘導される感染防御機構が、霊長類の種類により異なっていることが示唆されが、本研究によりそれを明らかにする。

1) TLR4 細胞外ドメインの立体構造予測

ヒト TLR4 の蛋白立体構造はすでに報告されており、モデル解析による立体構造予測が可能である。SWISS-MODEL、PyMOL などのプログラムを用い霊長類 TLR4 の立体構造比較をおこない、エンドトキシン感受性との関わりを検討する。霊長類種間の配列比較では、数多くのアミノ酸置換が観察されるが、立体構造モデルから推測される、エンドトキシン認識の鍵となるアミノ酸置換を予測する。MD2 との相互作用が、エンドトキシン認識において

重要な役割を果たすことが報告されており、MD2 との相互作用が予測されている部位に注目することにより、エンドトキシン認識の鍵となるアミノ酸置換を予測することが可能であると考えている。

2) TLR4 細胞外ドメインの立体構造予測に基づいたエンドトキシン感受性決定部位の解明

立体構造予測により推測されたエンドトキシン認識の鍵となるアミノ酸を置換した霊長類 - ヒトキメラ TLR4 を発現するベクターを作成する。HEK-293 細胞にヒト TLR4 発現ベクター、霊長類 MD2 発現ベクター、および霊長類 CD14 発現ベクターを導入し、0.01、0.1、1、10、100ng/ml のエンドトキシンに対する反応性を培養液中の TNF-alpha を指標として検討する。TNF-alpha の測定は、市販の ELISA 法による測定キット (BECKMAN COULTER®) で行い、RT-PCR 法による TNF-alpha mRNA の定量評価も行う。同様の検討を、NFkB 応答性ルシフェラーゼレポーターを用いた系でも行い、エンドトキシン認識の鍵となるアミノ酸置換を実験的に確認する。

3) 歯周病、パージャーカー病、および高安病と TLR ファミリー遺伝子多型との関連

閉塞性血栓血管炎パージャーカー病はグラム陰性菌感染症に由来する歯周病を高率に合併し、その発症において細菌感染症が重要な役割を果たしている。パージャーカー病と TLR ファミリー遺伝子多型との関連を、我々が収集した約 100 名からなるパージャーカー病患者の DNA サンプルを用いて検討する。TLR4 細胞外ドメインの coding 領域の塩基配列を決定し、変異を同定する。

4. 研究成果

霊長類 7 種 (ヒト、チンパンジー、ボノボ、ゴリラ、オラウータン、アガゲザル、カニクイザル) の TLR4 アミノ酸配列より、TLR4 の 3D 構造予測を行なった。構造予測は SWISS-MODEL、PyMOL を用いて行なった。グラム陰性菌の細胞壁構成成分であるエンドトキシンの認識に関わる細胞外ドメインの領域に、正の自然選択の影響下にあるアミノ酸配列の違いが認められたが、3D 構造予測では明らかな構造の違いを検出することができなかった。

TLR ファミリー遺伝子および MYD88、TICAM1、TICAM2 などの TLR 情報伝達に関わる遺伝子と歯周病、パージャーカー病、高安病との関連を検討した。パージャーカー病と MYD88 遺伝子の 3' -UTR に位置する rs7744 多型との関連を見出した (表 1)。

表1 . パーチャー病と MYD88 遺伝子多型 rs7744 との関連

	対 照 群 (n=270)	患 者 群 (n=131)	オッズ比(95% CI), P-value
遺伝子型			
AA	114(42.2%)	59(45.0%)	1.12(0.74-1.71), NS
AG	113(41.9%)	63(48.1%)	1.29(0.85-1.96), NS
GG	43(15.9%)	9(6.9%)	0.39(0.19-0.81), p=0.011
対立遺伝子			
A	341(63.2%)	181(69.1%)	1.30 (0.95-1.79), NS
G	199(36.8%)	81(30.9%)	0.77(0.56-1.05), NS

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

An J, Nakajima T, Kuba K, Kimura A. Losartan inhibits LPS-induced inflammatory signaling by PPAR-gamma-dependent mechanism in human THP-1 macrophage. Hypertension Res. 33(8): 831-835, 2010.

Chen Z, Nakajima T, Inoue Y, Kudo T, Jibiki M, Iwai T, Kimura A. A single nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of MyD88 gene is associated with Buerger disease but not with Takayasu arteritis in Japanese. J Hum Genet. 56(7): 545-547, 2011.

Takahashi M, Chen Z, Watanabe K, Kobayashi H, Nakajima T, Kimura A, Izumi Y. Toll-like receptor 2 gene polymorphisms associated with aggressive periodontitis in Japanese. Open Dent J. 5: 190-194, 2011.

Ohtani H, Nakajima T, Akari H, Ishida T, Kimura A. Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates. Immunogenetics. 63(7): 417-428, 2011

[学会発表](計0件)

[図書](計1件)

Nakajima T, Kimura A Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. Comparative genomics: insight into human health and disease. In The HLA Complex in Biology and Medicine: a resource book. (2009), pp.566-589

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等:なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中島 敏晶 (NAKAJIMA TOSHIAKI) 准教授
東京医科歯科大学疾患生命科学研究部
研究者番号: 50307956

(2)研究分担者

木村 彰方 (KIMURA AKINORI) 教授
東京医科歯科大学難治疾患研究所
研究者番号: 60161551

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号: