

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590572

研究課題名(和文)TLR5活性化におけるLRCTドメイン2量体化の役割の解明

研究課題名(英文)Analysis of structure-function relationship of mouse TLR5 with a focus on roles of LRCT domain

研究代表者

魚住 尚紀(Uozumi, Naonori)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：70313096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体防御において重要な役割を果たす自然免疫に関する研究を分子生物学、細胞生物学的に実施した。自然免疫の主要な受容体であるTLRの活性化機構をマウスTLR4、TLR5を材料に検討した。当初の想定とは異なり、TLR4とTLR5は各々固有の分子機序によって活性化されていることが新規に見出された。さらなる解析により、詳細なTLR活性化機構が解明されると期待され、TLR活性化の人為的調節法の開発につながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Innate immune receptors play important roles at the first line of defense against invading pathogens. Among them, Toll-like receptors, TLR, have been a focus of intense research for years. Structure-function relationship of mouse TLR4 and TLR5 was extensively analyzed by cell biological methods. Through comparisons of various phenotype of point-mutants, and chimera receptors, mouse TLR4 and TLR5 are found, unexpectedly, to be activated by distinct molecular mechanisms. Further analyses would reveal detailed mechanisms for TLR activation, and lead to development of methods to modulate TLR activation and signaling in vivo.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫学 炎症 自然免疫受容体

## 1. 研究開始当初の背景

Toll-like 受容体 (TLR) は、炎症反応の惹起、獲得免疫系の活性化に重要な役割を果たす自然免疫受容体である。自然免疫系は緻密な調節のもと、病原体からの防御、自己に対する攻撃の回避をつかさどり、生体の恒常性維持に重要な役割を担っている。

TLR リガンドや細胞内情報伝達経路の同定や解析は大いに進んだが、TLR 活性化の分子機序には未解明課題が多い。一例を挙げると、TLR の細胞外ドメインは、一般に点対称 2 量体を形成する。その一方、2010 年に報告された 12 分子のデスドメインタンパク質で構成される Myddosome は螺旋構造をとっている (Nature, 465: 885, 2010)。Myddosome 複合体は TLR が惹起する細胞内情報伝達経路において受容体直下に位置する。受容体細胞外ドメインの点対称構造が、細胞内情報伝達複合体の螺旋構造に変換される機序は、いままって不明である。このような未解明課題が TLR 活性化機序には数多く残されている。

そこで、本研究では細胞生物学・生化学的手法により、TLR 活性化分子機序の解明に取り組むこととした。

## 2. 研究の目的

Toll-like 受容体 (TLR) について、多くのことが明らかにされたにもかかわらず、分子レベルでの受容体活性化機序は未解明である。ホ乳類 TLR 分子種が 10 以上知られる中から、本研究において TLR5 を用いる実験上の利点は、1) リガンドが既知 (フラジェリン、市販入手可能)、2) 補助因子・分子非要求、3) 細胞膜表面発現 (リガンド実効濃度をコントロール可能)、4) シグナル経路が既知 (MyD88 依存的経路) に集約される。プロトタイプ TLR であり、もっとも盛んに研究対象とされてきた LPS 受容体 TLR4 は、1) 多くの内在リガンドの存在、2) 補助因子 (MD-2) 要求性、3) 複数箇所への細胞内局在、4) 複数のシグナル経路の活性化など複雑度が高い。それでも、TLR5 と 1 次構造上の保存性を根拠として、受容体活性化機構上も相同であると想像されてきた。本研究においても、マウス TLR5 を主、TLR4 を従とする構成で、比較対象を行いながら TLR5、TLR4 の活性化機構を解明することを当初の目的とした。具体的な目的として、以下の事柄があげられる。

(1) LRRCT ドメインがリガンド非依存的に受容体 2 量体化を媒介することを作業仮説として、TLR5 活性化における Leucine-rich repeat C-terminal (LRRCT) ドメインの役割を検討する。

(2) 引き続き、膜貫通部位、細胞内ドメインの変異体を作成して、細胞外ドメインと細胞内ドメインの相対的位置関係の意義、細胞内ドメイン部分構造のシグナル伝達における役割を明らかにする。

(3) TLR4 と TLR5 の類似性に注目すると、部分構造の交換可能性が想像される。キメラ

受容体を構築し、機能解析を行うことにより、共通して受容体機能に重要な部分構造と、一方でのみで重要な部分構造の切り分けを行うことができる。

こうした分子生物学、細胞生物学的解析を通して、マウス TLR4 と TLR5 の活性化機構の類似性、相違性をつまびらかにし、受容体活性化機構を解明することが本研究の目的である。また、受容体活性化機構モデルを提示することにより、受容体活性化を調節する機構の研究、ならびに人為的介入による生体における TLR 活性化の調節手法の開発が期待される。

## 3. 研究の方法

HEK293 細胞 TLR 発現系の刺激に対する応答解析は、TLR 研究において広く用いられている。本研究では、マウス TLR4、TLR5 の発現プラスミドとその点変異体を調製し、それぞれを HEK293 細胞に一過性発現させたときのリガンドに対する応答を解析した。

マウス TLR4、TLR5 の発現プラスミドは、pcDNA3.1 hygro (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を骨格とし、それぞれの cDNA を挿入して構築した。変異体は校正機能の高い KOD-plus DNA 合成酵素 (Toyobo, Osaka, Japan) を使用し、inverse PCR 法にて、定法に従い作製した。DNA 塩基配列を発現カセット部分全長にわたって確認の上、トランスフェクション用のベクターとして調製した。マウス MD2、CD14 の発現カセットは、pDUO2-mMD2/CD14 (Invivogen, San Diego, CA, USA) を使用した。

HEK293 細胞は 10% FCS 添加 DMEM (Sigma, St. Lewis, MO, USA) 中で培養し、トランスフェクション前日に、6 穴プレートに播種した。トランスフェクションは、リポフェクション法により実施した。トランスフェクション翌日、5% FCS 添加 DMEM で懸濁した細胞を 96 穴プレートに細胞数をそろえて播種した。5-7 時間後に 5% FCS 添加 DMEM で調製した 2 倍濃度のリガンド溶液を添加し、さらに 24 時間培養した。培養上清を回収し、これに含まれる HEK293 細胞由来のヒト IL-8 濃度を BD OptEIA Set Human IL-8 (BD biosciences, San Diego, CA, USA) にて定量した。

リガンドは、LPS-EB Ultrapure (cat. #tlrl-pelps, Invivogen, San Diego, CA, USA)、フラジェリン FLA-ST Ultrapure (cat. #tlrl-pstfla, Invivogen, San Diego, CA, USA) を生理食塩水 (Otsuka, Tokushima, Japan) に溶解し、5% FCS 添加 DMEM で希釈して使用した。

## 4. 研究成果

TLR は 1 回膜貫通型受容体の構造を持ち、N 末端側を細胞外に配置してリガンドを認識し、C 末端側にある細胞内 TIR ドメインを介して情報を細胞内に伝達する。細胞外構造は、約 650 アミノ酸残基からなり、LRRNT、LRR、

LRRCT の 3 ドメインに細分化される。膜貫通部位は疎水性アミノ酸に富んだ 20 残基程度の領域である。細胞内 TIR ドメインは約 130 アミノ酸残基より構成されている。

#### (1) 細胞外 LRRCT ドメイン構造機能相関

まず、TLR5 LRRCT ドメインに対する点変異体の解析から着手した。アラニン置換体 V597A、Y627A については、リガンド結合変異体である D293A、E365A と同等の用量反応曲線右方変位を認め、LRRCT ドメインがマウス TLR5 において、リガンド結合 LRR ドメインと機能上、匹敵する役割を果たしていることが示された。近傍アミノ酸残基 N599、M626 のアラニン変異体はリガンド反応特性に影響がなく、V597 と Y627 の部位特異性が示唆された。この知見は、TLR5 LRRCT 中の特定アミノ酸残基が機能上重要であることを示している。この知見は、マウス TLR3 細胞外ドメインのリガンド共結晶構造解析で見いだされた LRRCT ドメインによる 2 分子 TLR3 間の唯一の直接会合点を形成する (Science, 320: 379, 2008) を、細胞生物学的に機能側面から補強する重要な知見である。

#### (2) 膜貫通部位長による受容体機能への影響

膜貫通部位は 20 残基程度の領域で、疎水性アミノ酸に富み  $\alpha$  ヘリックス 2 次構造を取っていると考えられている。細胞外ドメインと細胞内ドメインの相対的位置関係に影響を与える目的で、膜貫通部位の C 末端側に疎水性アミノ酸残基を追加した変異体を構築し、リガンドに対する反応性を野生型受容体と比較した。マウス TLR5 の細胞膜貫通部位変異体は、フラジェリンに対する反応性を失っていた。一方、マウス TLR4 の細胞膜貫通部位変異体は、LPS に対する反応性が野生型と全く同様であった。膜貫通部位 N 末端側にアラニンを追加した場合でも、マウス TLR4 変異体の LPS に対する反応性に変化が認められなかった。このように、マウス TLR4 のリガンドに対する反応性は膜貫通疎水性部位の長さに依存しないことが明らかになった。それに対して、TLR5 は膜貫通部位の長さに関して、自由度をもたないことが示された。TLR4 と TLR5 は構造上の相同性が認められることから、活性化機構にも類似性を仮定していたが、細胞膜貫通部位変異体のリガンド反応性は全く異なっており、活性化機構に大きな違いがある可能性が考えられた。この知見は、予想外のものであり、TLR 分子種ごとに固有の活性化機構を持つことを示唆している。

#### (3) 細胞内 TIR ドメインの構造機能相関

細胞内 TIR ドメインのアラインメントを、マウス TLR 分子種間・各 TLR での動物種間で作製したところ、ほぼすべての分子種、動物種で保存されたアミノ酸残基が見いだされる一方で、種間での保存性と TLR 分子間で保

存性に相違が認められるアミノ酸残基も見いだされた。前者には、マウス TLR4 の細胞内情報伝達に重要な P712 残基が含まれ、ヒスチジン点変異 P712H を保有する C3H/HeJ マウスが LPS に非感受性であることはよく知られている。後者の例として、マウス TLR4 の N682、E796 残基が挙げられ、マウス TLR5 では相同位置のアミノ酸残基はそれぞれ D718、P834 となっている。こうしたアミノ酸残基の中に TLR 活性化に関与するものが含まれる可能性が考えられるため、アミノ酸残基を交換した点変異体を構築し、リガンドに対する反応性を解析した。その結果、マウス TLR5 の D718N、P834E は、実験上最高濃度のフラジェリンに対しても反応を示さなかったのに対して、マウス TLR4 の N682D、E796P 変異体では、野生型とほぼ同様の LPS 反応性を示した。また、マウス TLR4 の R729 残基は、マウス TLR5 では R767 残基に対応し、TLR4 と TLR5 の比較においては動物種を越えて保存されている。他の TLR 分子種との比較においては、TLR2 ではいくつか動物種で塩基性アミノ酸間での置換が認められ、TLR1、TLR6 では疎水性のチロシン残基となっている。マウス TLR4 R729Y 点変異体は、LPS に対する応答性を失っていた。TLR5 に関しては、点変異 R767Y は比較的軽微なフラジェリン応答性の減弱を与えるにとどまっていた。これらの知見は、上記(2)の場合と同様、TLR4 と TLR5 の活性化機序における相違点を強く示唆するものである。

#### (4) TLR4/5 キメラ受容体の解析

(1) から (3) に述べた点変異体を中心とした解析に加え、マウス TLR4 と TLR5 の部分構造を交換したキメラ受容体発現プラスミドも構築して受容体機能の解析を並行して行った。これは、1 次構造上の類似性より推測されたドメインの機能的交換の可能性を実験により検証したものである。先に述べたように、マウス TLR4 と TLR5 は、点変異体や膜貫通部位延長変異体に対して異なった表現型を示し、共通性よりも相違性の大きさを指し示している。このことと合致するように、16 種類構築したキメラ受容体の過半は、リガンドに対する応答を示さなかった。減弱したもののリガンド応答を示したものとして、TLR4 の膜貫通部位と細胞内の TIR ドメインまでのリンカー領域を TLR5 の対応する領域と交換したキメラ受容体が見いだされた。当該領域の TLR4 と TLR5 の組み合わせを逆に配置したキメラ受容体は機能的ではなかった。このことから、細胞内のリンカー領域の受容体活性化における機能が示唆された。この領域の点変異体はこれまで構築されておらず、今後の検討課題として残された。

これらの結果から、当初の想定とは異なっており、TLR4 と TLR5 は各々固有の分子機序によって活性化されていることが新規に見出された。マウス TLR5 について、LRRCT ドメイン

を介して2量体を形成した受容体がりガンド会合によって、非対称複合体を生成して細胞内情報伝達経路を活性化するという新規の活性化機構モデルが想像される。マウスTLR4に関しては、単量体化することが細胞内情報伝達経路の活性化を引き起こすとの解釈が妥当ではないかと考えている。さらなる解析により、詳細なTLR活性化機構が解明されると期待され、TLR活性化の人為的調節法の開発につながるものと考えられる。

#### 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 1件)

① 魚住尚紀 単量型マウスTLR4による細胞内情報伝達の分子機序と意義の解明 埼玉医科大学雑誌 査読無 40 (2013) 48-51。

[学会発表] (計 1件)

① 魚住尚紀、村越隆之 変異体を用いたマウスTLR4, 5活性化機構の解析 第86回日本生化学会大会 2013.9.12 横浜。

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

魚住 尚紀 (Naonori Uozumi)  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70313096

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし