

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860354

研究課題名(和文)Unc93B1によるTLR5の制御とその意義の解明

研究課題名(英文)Unc93B1 controls plasma membrane localization and signaling of TLR5

研究代表者

柴田 琢磨 (Shibata, Takuma)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：30554505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Toll様受容体(TLR)の適切な細胞内分布は、リガンド認識や効率的なシグナル伝達に必須です。細胞内に分布する核酸認識TLRの小胞体からエンドリソームへの移行はUNC93B1により厳密に制御されますが、細胞表面に分布するTLRに対してUNC93B1は制御機能を持たないと考えられていました。我々は細菌のFlagellinレセプターであるTLR5のシグナル伝達にUNC93B1が必須であることを見出し、UNC93B1がTLR5と会合することでTLR5の細胞表面分布に必須であることを明らかにしました。我々の発見は、TLR5の応答の場として細胞表面が重要であることを示しています。

研究成果の概要(英文)：The proper trafficking and localization of Toll-like receptors (TLRs) are important for specific ligand recognition and efficient signal transduction. The nucleotide-sensing TLRs are believed to localize inside cells and signal from the endolysosomes. Trafficking of the nucleotide-sensing TLRs from the ER to the endolysosomes strictly depends on UNC93B1. Although UNC93B1 was considered to have no role for the cell surface-localized TLRs, we unexpectedly discovered that TLR5, a cell surface receptor for bacterial protein flagellin, also requires UNC93B1 for plasma membrane localization and signaling. TLR5 physically interacts with UNC93B1, and the cells from the 3d(H412R) or UNC93B1-deficient mice not only lack TLR5 at the plasma membrane but also fail to secrete cytokines upon flagellin stimulation, demonstrating the essential role of UNC93B1 in TLR5 signaling. Our study reveals that the role of UNC93B1 is not limited to the TLRs signaling from the endolysosomes.

研究分野：免疫学

キーワード：Unc93B1 TLR5

1. 研究開始当初の背景

免疫システムは自然免疫と獲得免疫の両輪により構成され、自己から非自己を見分けて排除することで多細胞生物の生命維持を担う。自然免疫は Toll Like Receptor (TLR) 等の病原体レセプターを介して侵入病原体を感知し、早期の炎症およびその後の獲得免疫応答を誘導することで侵入病原体を効率的に排除する。

Toll Like Receptor 5 (TLR5) は細菌の鞭毛構成成分である Flagellin を認識する細胞表面レセプターである。ヒトの TLR5 には多くの一塩基多型が報告されており、全体の10%は Dominant Negative 型となる 392STOP を有すると考えられる。この事実は TLR5 応答の欠損が生存に有利になる環境の存在を示唆する。しかし、リガンド認識およびシグナル伝達を含め、TLR5 に関する基礎的情報は不足しているのが現状であり、その生理的意義には未だ不明瞭な点が多い。

2. 研究の目的

我々は以前に抗 TLR5 モノクローナル抗体 (ACT5) を樹立し、特定の免疫細胞が細胞表面に TLR5 を発現することを報告している。同抗体を用いた解析により、申請者は Unc93B1 の H412R 変異体である 3d マウスの免疫細胞において細胞表面 TLR5 発現が消失していることを発見した。また、TLR5 の膜近傍配列が TLR3/7/9 と同様に負電荷を持つアミノ酸 (DEEE) で構成されることも見出し、Unc93B1 が TLR5 を制御する可能性が強く示唆された。以上の知見より、本研究では Unc93B1 による TLR5 の制御機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、主に Unc93B1 機能を欠損する細胞やマウスを用い、TLR5 応答が Unc93B1 に依存する程度およびその制御機構を中心に調べた。以下に検討方法を記す。

Unc93B1 機能欠損細胞における細胞表面 TLR5 応答の検討

Unc93B1 に H412R 変異を有する 3d マウスおよび Unc93B1 ノックアウトマウスの様々な免疫細胞 (末梢血中好中球、骨髓細胞、脾臓樹状細胞、腸管樹状細胞) における TLR5 発現をモノクローナル抗体により網羅的に解析した。その結果、Unc93B1 機能欠損 (ノックダウン、ノックアウト) により細胞表面 TLR5 発現は全ての免疫細胞において完全に消失していた。(図 1) また、Unc93B1 ノックダウン細胞においても細胞表面 TLR5 は完全に欠損し、同フェノタイプは Unc93B1 の強制発現により補完された。以上の結果は、TLR5 の細胞表面発現に Unc93B1 が普遍的に関与することを示して

いる。

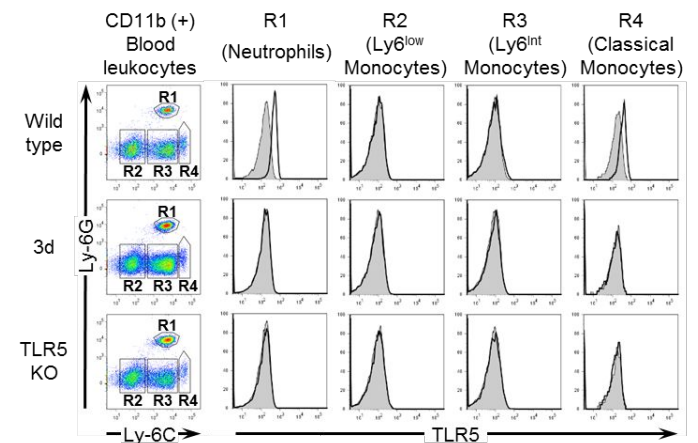


図1: 末梢血細胞における細胞表面TLR5の発現量

Unc93B1 機能欠損細胞における TLR5 応答の検討

細胞内における TLR5 の分布が Unc93B1 発現量の減少に伴い変化したことから、TLR5 のリガンドである Flagellin 応答についても検討を行った。その結果、Unc93B1 ノックダウン細胞では Flagellin 刺激によるサイトカイン産生や細胞表面活性化マーカー CD40 の発現上昇欠損が認められ (図 2)、Unc93B1 ノックアウトマウスへの Flagellin 投与でもサイトカイン産生や共刺激分子 CD86 の発現上昇が完全に欠損していた。これらの事実は Unc93B1 が TLR5 応答にも必須であることを示している。

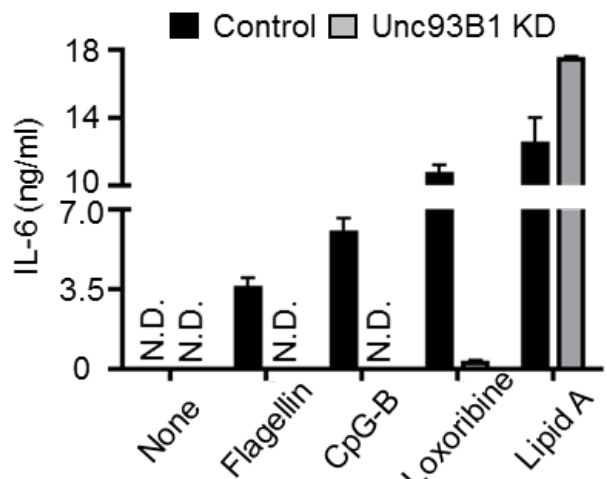


図2: Unc93B1ノックダウンJ774細胞におけるTLR応答

TLR5 と Unc93B1 の会合および TLR5 における修飾の検討

Unc93B1 は核酸認識 TLR と会合してその細胞内分布を制御する。その為、TLR5 と Unc93B1 の会合についても検証を行った。その結果、TLR5 も Unc93B1 と会合しており、その会合は Unc93B1 による H412R 変異体では完全に消失していた。Unc93B1 との会合を失

った TLR5 では EndoH 抵抗性の糖鎖修飾が消失しており、このことは Unc93B1 が TLR5 を小胞体外に移行させる役割を果たすことを示している。(図 3) また TLR5 は核酸認識 TLR と同様に膜近傍配列に負電荷を持つアミノ酸 (DEEE) 配列を持っているが、同配列の DEEE/STEE 変異体では TLR5 との会合が弱くなり TLR5 の細胞表面分布が障害された。

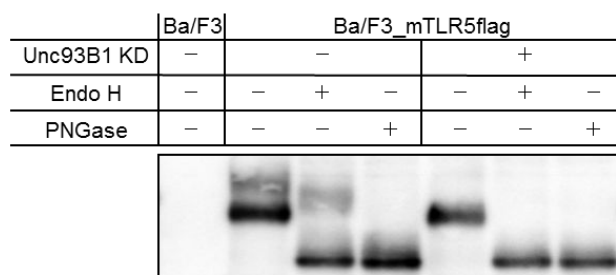


図3: Unc93B1ノックダウンBa/F3細胞におけるTLR5の修飾変化

TLR5 抗体による TLR5 応答の制御

TLR5 が細胞表面に分布していたことから、抗 TLR5 モノクローナル抗体による TLR5 の応答制御が可能である可能性が考えられた。樹立したモノクローナル抗体による TLR5 の阻害効果を検証した結果、高濃度 Flagellin 応答を阻害する抗体の取得は出来なかったが、低濃度 Flagellin による TLR5 を介した NF- κ B の活性化はモノクローナル抗体 (ACT5) を加えることで阻害可能であった。

4. 研究成果

これまで細胞内小器官に分布する核酸認識 TLR3/7/9 に特異的な制御分子であると考えられてきた。本研究の結果、Unc93B1 は細胞表面 TLR の一つである TLR5 の新規制御分子であり、TLR5 の細胞表面分布およびその応答に必須であることが判明した。また、TLR5 の細胞表面分布と TLR5 の応答に強い相関が認められたことから細胞表面が Flagellin 認識の場であると考えられた。細胞表面分子に作用する抗 TLR5 モノクローナル抗体が TLR5 の応答を阻害するという結果は同結論を支持するものであった。

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 2件)

(1) Lipopeptides are signaled by Toll-like receptor 1, 2 and 6 in endolysosomes (2013)
Motoi Y*, Shibata T*, Takahashi K, Kanno A, Murakami Y, Li X, Kasahara T and Miyake K. *: equally contributed
Int Immunol. 26, 563-73
(doi: 1093/intimm/dxu054)

(2) UNC93B1 is essential for the plasma membrane localization and signaling of Toll-like receptor 5. (2014)
Huh JW, Shibata T, Hwang M, Kwon EH, Jang MS, Fukui R, Kanno A, Jung DJ, Jang MH, Miyake K, Kim YM.
Proc Natl Acad Sci U S A. **111**, 7072-7077
(doi: 10.1073/pnas.1322838111)

[学会発表](計 2件)

柴田琢磨, Single Stranded RNA adjusts the TLR7/8 response to agonistic base analogues, 日本免疫学会、千葉・幕張メッセ、2013年12月11日-13日

柴田琢磨, Human TLR7/TLR8 are sensors for nucleoside derivatives, 日本免疫学会、国立京都国際会館、2014年12月10日-12日

[図書](計 0件)

[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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/kanseniden/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者
柴田 琢磨 (SHIBATA TAKUMA)
東京大学医科学研究所・助教
研究者番号: 30554505

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号：