

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008-2010

課題番号：20590487

研究課題名（和文） PRAT4A による TLR 応答制御機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of the regulatory mechanism by PRAT4A against TLR response

研究代表者 高村 祥子（赤司 祥子）(Akashi-Takamura Sachiko)

東京大学医科学研究所・助教

研究者番号：00325599

研究成果の概要（和文）：

(1) PRAT4A は小胞体にある TLR4 会合分子であり、その会合部位はもうひとつの TLR4 会合分子、MD-2 の会合部位と近接していることがわかった。

(2) PRAT4A のアミノ酸一箇所の変異によりそれぞれの TLR 機能への影響に違いがあることから、PRAT4A と TLR との機能的な関係は単一ではなく、個々の TLR によって異なることが明らかとなった。

(3) PRAT4A ノックアウトマウス由来マクロファージでは細胞表面の TLR4 の発現が消失していることを利用し、細胞内 TLR4 だけでも特異的な LPS 応答を誘導できることを示した。

研究成果の概要（英文）：

(1) The TLR4 region responsible for strong interaction with PRAT4A is very close to the site necessary for interaction with MD-2.

(2) PRAT4A differentially interacts with each TLR and suggests that a single-nucleotide change in the PRAT4A gene influences not only the strength of TLR responses but can also alter the relative activity of each TLR.

(3) Intracellular TLR4/MD-2 is responsible for unique set of LPS responses.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 1,500,000 | 450,000   | 1,950,000 |
| 2009 年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 2010 年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 総計      | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

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：TLR, PRAT4A, LPS

## 1. 研究開始当初の背景

病原体センサーである TLR (Toll-like receptor) について、個々の TLR のリガンド特異性、シグナル伝達経路はすでに明らかになっているが、TLR 間で機能が異なり、その組み合わせによって誘導される応答はさまざまである。免疫細胞が複数の TLR を使って同時に病原体を認識することを考えると、発現している TLR の応答性を全体として制御するとともに、TLR 間のバランスをもコン

トロールする必要があるが、そのような分子メカニズムはわかっていない。我々は LPS (Lipopolysaccharide) センサーである TLR4-MD-2 に会合する分子 PRAT4A (protein associated with Toll-like receptor4) を同定し、PRAT4A ノックアウトマウスを解析したところ、PRAT4A は TLR4 ばかりでなく、TLR3 を除くほとんどの TLR に必要であることがわかった。したがって、PRAT4A は上述したような、TLR 全体の応答性、あるいは TLR 間のバ

ランスを制御するような分子である可能性があるのでないかと考え、本研究の申請にいたった。

## 2. 研究の目的

PRAT4A は小胞体にあるタンパクであり、シャペロン活性を持つ。PRAT4A が欠失すると、TLR4 や TLR1 の細胞表面への発現、リガンド認識に必要な TLR9 のライソゾームへの移行が抑制される。その結果、TLR3 を除くほとんどの TLR 応答が低下するが、それでも TLR2 や TLR4 に対する応答は部分的に残っている。このような PRAT4A 非依存性の TLR 応答を検討することで、また TLR 応答における PRAT4A の発現の変化を調べることで、PRAT4A という分子が TLR 応答において、どのような役割があるかを明らかにする。

さらには TLR 応答における PRAT4A の役割を明らかにすると同時に、TLR 全体の応答性、TLR 間のバランスの制御に関与している可能性について検討し、TLR が関与する疾患の治療の糸口を見出したい。

## 3. 研究の方法

以下の3点について、解析を進める。

### (1) 個体レベルでの TLR 応答の PRAT4A による制御

PRAT4A 依存性、非依存性の応答を、個体レベルでの解析を中心に進めてゆく。すでに PRAT4A KO 骨髄由来キメラマウスは Th1 応答が著明に抑制され、エンドトキシンショックに抵抗性であることをわれわれは報告している (J. Exp. Med., 2007)。したがって、PRAT4A 依存性の TLR 応答は Th1 や LPS で誘導される致死性の炎症誘導に重要であることが予想される。ショックに抵抗性でありながら TLR 応答は部分的に保たれている PRAT4A KO マウスを解析することで、PRAT4A 依存性、非依存性 TLR 応答を明らかにする。また精製 TLR リガンドばかりでなく菌体そのものを用いることで、複数の TLR を同時に刺激した場合についても検討する。

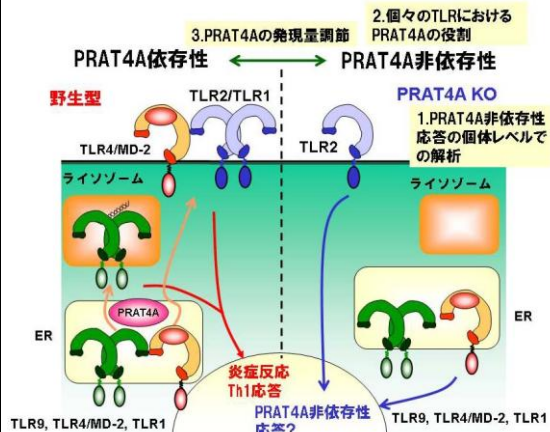
### (2) 個々の TLR における PRAT4A の役割

TLR4 に会合しその細胞表面への発現を制御する分子として PRAT4A はクローニングされたが、ほかの TLR 応答にも PRAT4A が必要であることがわかった。その依存の仕方も様々で、TLR9 は PRAT4A に完全に依存する一方、TLR3 は全く関係ない。TLR2、TLR4 は部分的に PRAT4A に依存する。PRAT4A がそれぞれの TLR に如何に関与するのか、生化学的、および機能的な解析を行う。PRAT4A の代わりをする分子が TLR2、TLR4、TLR3 において機能している可能性があるため、その検索も行う。

### (3) PRAT4A の発現とその制御機構

TLR リガンド刺激により PRAT4A の発現量

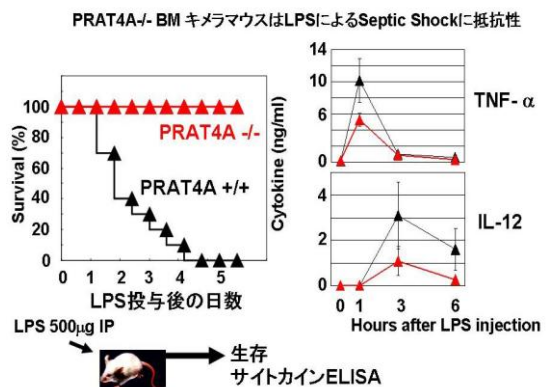
が減少するという結果を得ている。PRAT4A の発現調節により TLR 応答が制御されている可能性を検討する。さらに PRAT4A 依存性、非依存性の応答のバランスがどのように調整されているのか検討してゆく。



**図の説明** PRAT4A は小胞体にあるタンパクであり、シャペロン活性を持つ。PRAT4A が KO されると、TLR4 や TLR1 の細胞表面への発現、リガンド認識に必要な TLR9 のライソゾームへの移行が抑制される。その結果、TLR3 を除くほとんどの TLR 応答が低下するが、それでも TLR2 や TLR4 に対する応答は部分的に残っている。このような PRAT4A 非依存性の TLR 応答を検討することで、また TLR 応答における PRAT4A の発現の変化を調べることで、PRAT4A という分子が TLR 応答において、どのような役割があるかを明らかにする。

## 平成 20 年度

### ① 個体レベルでの TLR 応答の PRAT4A による制御



**【A】** PRAT4A KO マウスを用いて、PRAT4A 依存性 TLR 応答について検討する。PRAT4A KO BM キメラマウスでは LPS 大量投与に対して TNF や IL-12 の産生は検出できるにもかかわらず、ショックに完全に抵抗性であることを我々はすでに報告している (J. Exp. Med., in press、上図参照)。一方、LPS と

D-galactosamine を投与して TNF 依存性肝細胞アポトーシスを誘導する系では、プレリミではあるが野生型と同様に感受性であるという結果が出ている。これらの結果は PRAT4A 依存性 LPS 応答が LPS による Sepsis での致命的な炎症応答誘導に関与する可能性を示している。LPS sepsis は TNF などのサイトカイン産生だけでは説明がつかないことが知られており、その病態を明らかにする糸口となるかもしれない。PRAT4A KO マウスは死にやすいために十分な数のマウスが得られず、BM キメラマウスを以前は用いたが、BALB/c に交配するとある程度数が得られるようになったので、本年度に KO マウスを用いて、同じ実験を行う。さらにこの実験系において、複数の TLR が刺激される場合を考えて、死菌を投与して Sepsis を誘導する系も試みる。【B】 KO マウスとは逆に PRAT4A を過剰発現させたマウスを現在作製しており、そのマウスを用いて、同様の実験を行う。【C】 PRAT4A に対するモノクローナル抗体作製を試みる。PRAT4A KO マウスに精製した PRAT4A を免疫し、抗体を作製する。PRAT4A は小胞体にあるタンパクであるが、細胞外に分泌される可能性もある。その点も抗体を用いて、検討すると共に、抗体によりエンドトキシンショックを抑制できないか、試みる。

## ② 個々の TLR における PRAT4A の役割

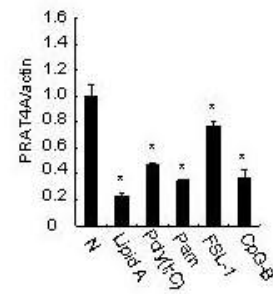
PRAT4A ノックダウン細胞株における個々の TLR について、生化学的な解析を進める。PRAT4A はシャペロン活性を持ち、PRAT4A ノックダウン細胞株では、TLR4 の糖鎖が成熟できず、細胞外に出られない(3)。PRAT4AKO 細胞において、同様な TLR4 の生化学的解析を行う。プレリミの結果では、TLR4 は樹状細胞やマクロファージにおいて、細胞表面での発現が確認できないにもかかわらず、成熟型の糖鎖を持つ TLR4 が確認されている。したがって、細胞表面への発現は PRAT4A に依存している、糖鎖の成熟は必ずしも PRAT4A に依存していないことになる。ほかの TLR についても同様な解析を進める。

TLR9 についてはすでに興味深い結果が得られている。PRAT4A の発現を抑制した細胞では TLR9 リガンドへの応答性が消失しているが、このときの TLR9 は、glycosylated form とともに cleaved form も消失していることがわかってきた。現在 TLR9 がどこで切られているのか、Cleaved form の N 末のアミノ酸を同定しており、この Cleaved form の機能を検討してゆく。

## ③ PRAT4A の発現とその制御機構

図のように TLR リガンドで樹状細胞を刺激すると PRAT4A mRNA の発現が下がるという結果を得ている。PRAT4A の発現が下がると TLR 応答も下がることが予想される。したが

って、PRAT4A の発現調節が TLR 応答の調節に関与している可能性を検討する。そこで、PRAT4A に対する抗体を用いて、タンパクレベル



でも、PRAT4A の発現低下が確認できるかどうか、調べる。その発現低下の Time course も調べてゆく。さらに、PRAT4A 抗体を用いて、腸管リンパ節など、常在菌とつねに接触している組織での PRAT4A タンパクの発現を調べる。また PRAT4A の発現を上げるものがないか検討する。

## 平成 21 年度以降

### ④ PRAT4ASNIP 検索

PRAT4A で報告されている 1 塩基変異 (SNP) の機能についての検討を進める。SNP をもつ PRAT4A を、PRAT4A をノックダウンしたマクロファージ細胞株に発現させ、TLR 応答を調べる。

### ⑤ PRAT4A ファミリーの同定

PRAT4A のように TLR 応答バランスに影響を与えるような分子の検索・解析を、コンピューター検索や免疫沈降などにより行う。【A】 コンピューター検索ではすでにわれわれは PRAT4B という TLR4 会合分子を同定し報告しているが(4)、その機能はまだ明らかではないので、PRAT4A と同様ノックアウト細胞やノックアウトマウスの解析により解明してゆく。【B】 免疫沈降では TLR2 会合分子として別の補体関連分子を同定しており、この分子の TLR2 への影響を調べるためノックアウトマウスの作製に着手する。

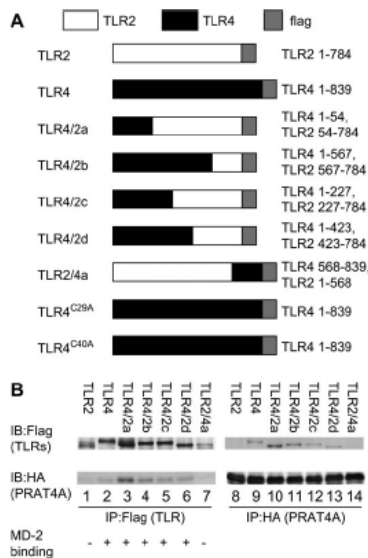
## 4. 研究成果

### (1) 個体レベルでの TLR 応答の PRAT4A による制御

PRAT4A に対するポリクローナル、およびモノクローナル抗体作製に成功し、ウエスタンによる内在的な PRAT4A の蛋白レベルでの発現確認が可能となった。PRAT4AKO マウスはエンドトキシンショックに抵抗性であるので、PRAT4A に対するモノクローナル抗体投与でショックが抑制されるかどうか検討してみたが、はっきりとした抑制傾向は得られなかった。PRAT4A 発現量に応じてショックが増強されるかどうかに関して調べるため全身に PRAT4A を過剰発現するマウスを作製したがワイルドタイプに比べて生育が悪く数か月で死んでしまうため、conditional Transgenic mouse を作製し現在検討中である。

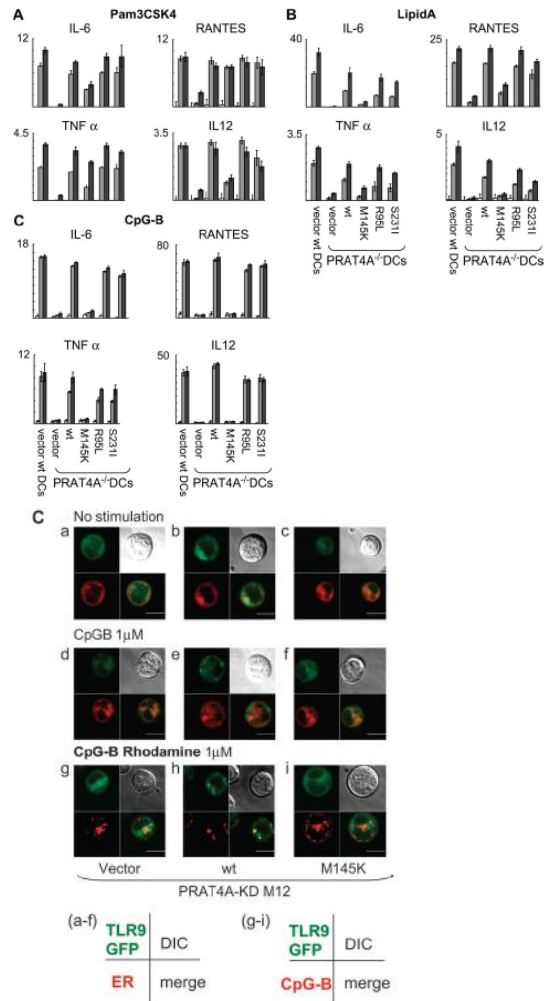
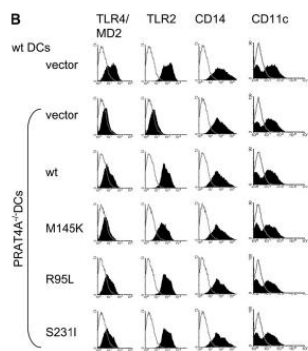
## (2) 個々のTLRにおけるPRAT4Aの役割

① PRAT4Aは小胞体にあるTLR4会合分子である。もうひとつのTLR4会合分子、MD-2とはその会合においてまったく違う位置に会合するのか、近い位置であれば競合する可能性はないか、という点に関して調べてみた。まず数種類のTLR2/TLR4キメラ発現ベクターを用いてPRAT4Aと共に発現させ、免疫沈降によってどのTLRの位置がPRAT4A会合に重要か検討したところ、その会合部位はMD-2のTLR4会合部位と非常に近接しており(下図)、しかしMD-2会合とPRAT4A会合とは阻害しあわないことがわかった。



② PRAT4Aの一変異多型(PRAT4A-M145K)をPRAT4Aノックアウトマウス由来のDC細胞に導入すると、細胞表面TLRのうちTLR2とは弱いながらも会合を認め細胞表面への発現は回復し

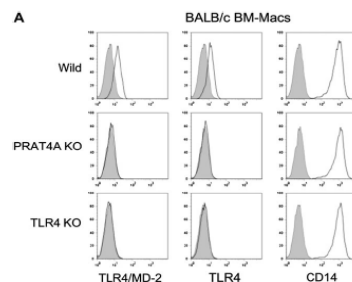
(右図)リガンド刺激においてサイトカインの産生も回復を認めたが(次ページ図)、一方でTLR4とは会合せず細胞表面への発現や、その応答も回復しなかった。細胞内TLRであるTLR9とはPRAT4A-M145Kは会合するにも関わらず、細胞内移動や応答性の回復は認められず、PRAT4Aが会合するだけでなくさらに何らかの機能が必要であることがわかった(次ページ下図)。

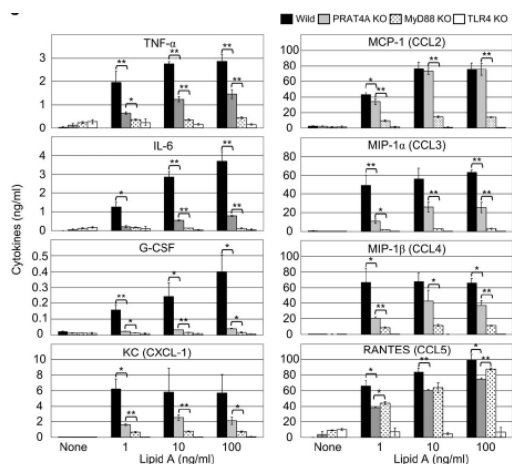


このようにPRAT4Aのアミノ酸一箇所の変異によりそれぞれのTLR機能への影響に違いがあることから、PRAT4AとTLRとの機能的な関係は単一ではなく、個々のTLRによって異なることが明らかとなり、PRAT4AはTLR応答バランスに影響を与える分子であることがわかった。

③ PRAT4AKOマウスを用いた細胞内TLR4/MD-2応答の解析

PRAT4Aは小胞体蛋白でシャペロン活性をもち、そのノックアウトマウス由来マクロファージでは細胞表面のTLR4の発現が消失することから、このマウス由来細胞でのTLR4応答は細胞内TLR4による応答を意味する(下図)。





PRAT4AKO マウス由来マクロファージのうち骨髄由来マクロファージでは、LPS 刺激による TLR4 応答において TRIF/TICAM 依存的応答のうち一部のケモカイン (CCL2, CCL5) 産生や、co-stimulatory molecule 発現上昇などは残っていることから、細胞内 TLR4 だけでも特異的な LPS 応答を誘導できることがわかった。(上図)。

またさらに、加熱処理した細菌に対しても PRAT4AKO マウス由来マクロファージでは LPS のときと同様にケモカイン (CCL2, CCL5) 産生や、co-stimulatory molecule 発現上昇などを認めたことから、細胞内 TLR4/MD-2 は細菌をどん食して検知し、免疫応答を活性化できることがわかった。

### (3) PRAT4A の発現とその制御機構

① 完成した PRAT4A に対する抗体を用いて、ELISA の実験系ができてきた。このことにより今後は血清中の PRAT4A の発現変化などを、疾患発症マウスや他の TLR 応答関連ノックアウトマウスの血清などでも検討し、TLR 応答における各会合分子と PRAT4A との関連を調べていくことで、TLR 制御分子同士の関係を調べていく。

② PRAT4A ファミリーの同定・検討 : PRAT4A とホモロジーのある TLR4 会合分子 PRAT4B に関しては、conditional で作製しキメラマウスができたものの Germline に通らなかったため、さらに ES 細胞も変えてやりなおして作製している。

③ TLR2 会合分子の同定・解析

PRAT4A のように TLR 応答バランスに影響を与えるような分子の検索・解析を、コンピューター検索や免疫沈降などにより行った結果、ある補体関連分子が TLR2 会合分子として同定された。この分子は培養液に使用する FCS 中にも含まれており in vitro での解析が難しく、この分子の TLR2 への影響を調べるためノックアウトマウス由来細胞での解析を行ったが、ワイルドタイプ由来細胞と比べ

て TLR2 はじめ TLR 応答に関して有意な差は得られなかった。また免疫沈降結果では TLR2 のみならず他の TLR とも会合しているため他の TLR 応答含め検討しなおしたが、細胞レベルでは有意な差は認めなかった。in vivo の実験にきりかえて TLR リガンドを投与しその応答をマウス血清にて検討しているが、現時点では有意な差は得られていない。

### 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 6 件)

- ① Shibata T., Motoi Y., Tanimura N., Yamakawa N., Akashi-Takamura S., Miyake K. Intracellular TLR4/MD-2 in macrophages senses Gram-negative bacteria and induces a unique set of LPS-dependent genes. *Int. Immunol.*, in press.
- ② Murata A, Okuyama K, Sakano S, Kajiki M, Hirata T, Yagita H, Zúñiga-Pflücker JC, Miyake K, Akashi-Takamura S., Moriwaki S, Niida Y, Yoshino M, Hayashi S. A Notch ligand, Delta-like 1 functions as an adhesion molecule for mast cells. *J. Immunol.* 査読有、185 巻、2010、3905-3912.
- ③ Kiyokawa T, Akashi-Takamura S., Shibata T, Matsumoto F, Nishitani C, Kuroki Y, Seto Y, and Miyake K. A single base mutation in the PRAT4A gene reveals differential interaction of PRAT4A with Toll-like receptors. *Int. Immunol.* 査読有、20 巻、2008、1407-1415
- ④ Akashi-Takamura S., Miyake K. TLR accessory molecules. *Curr Opin Immunol* 査読有、20 巻、2008、420-425.
- ⑤ Hiratsuka S, Watanabe A, Sakurai Y, Akashi-Takamura S., Ishibashi S, Miyake K, Shibuya M, Akira S, Aburatani H, Maru Y. The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nat Cell Biol.* 査読有、10 巻、2008、1349-55.
- ⑥ Shawkat S, Karima R, Tojo T, Tadokuma H, Saitoh S, Akashi-Takamura S., Miyake K, Funatsu T, Matsushima K. Visualization of the molecular dynamics of lipopolysaccharide on the plasma membrane of murine macrophages by total internal reflection fluorescence microscopy. *J Biol Chem.* 査読有、283 巻、2008、22962-71.

[学会発表] (計 4 件)

- ① Murata A, Okuyama K, Wagatsuma



K.,Moriyama T.,Sakano S, Yagita H, Miyake K, Akashi-Takamura S, Yoshino M, Hayashi S. A Notch ligand, Delta-like 1 functions as an adhesion molecule. 第39回日本免疫学会総会,2009年12月2日,大阪

② 清川貴志、高村祥子、柴田琢磨、松本文、西谷千明、黒木由夫、瀬戸泰之、三宅健介。A single base mutation in the PRAT4A gene reveals differential interaction of PRAT4A with Toll-like receptors. 第38回日本免疫学会総会,2008年12月2日,京 都

③ Shibata Takuma, Takamura Sachiko, Richard Jennings, Miyake Kensuke. Detection of soluble PRAT4A (PRotein Associated with Toll-like receptor 4) by novel anti- PRAT4A monoclonal antibody. 第38回日本免疫学会総会,2008年12月2日,京 都

④ Jennings Richard, Akashi-Takamura Sachiko, Takuma Shibata, Toshihiko Kobayashi, Miyake Kensuke. Soluble MD-1 detection using novel monoclonal antibodies. 第38回日本免疫学会総会,2008年12月2日,京 都

[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 :

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 高村 祥子 (赤司 祥子)

(Akashi-Takamura Sachiko)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号 : 00325599

(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 :