

## 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 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590528

研究課題名（和文） UNC93b1 による TLR7, TLR9 反応性のバランス制御機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the regulatory mechanisms for balancing TLR7 and TLR9 responses by UNC93b1

研究代表者 齋藤 伸一郎 (SAITOH SHIN-ICHIROH)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：90361625

研究成果の概要（和文）：DNA を認識する TLR9 と RNA を認識する TLR7 の応答性のバランスをとるメカニズムが存在することを明らかにした。そしてそのバランスを調節しているのが UNC93b1 の N 末端に存在する PDZ binding domain であり、その PDZ binding domain を壊す 1 アミノ酸置換のノックインマウスは TLR7 の反応性が增強して、TLR9 の反応性は減弱していた。ノックインマウスは、1 年以内に 75% のマウスが死亡した。マウスの脾臓は著しく肥大しており、全身性の炎症が確認された。そして、肝臓に塞栓が起こることで、肝障害でマウスは死に至ることが明らかとなった。ノックインマウスは TLR7 のノックアウトマウスと交配することで病態が消失することから、TLR7 の反応性の增強がその病態と関わっていることが示唆された。これらの結果より UNC93b1 の PDZ binding domain を介した TLR7 の抑制機構の vivo における重要性を示した。次にこの UNC93b1 に会合して TLR7 と TLR9 の反応性を調節する分子を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We revealed that we have a mechanism for balancing TLR9 response as a DNA sensor and TLR7 response as a RNA sensor. We identified the PDZ binding domain in N terminal region of UNC93b1 regulating the balance. We established knock-in mice for disrupting the PDZ binding domain by single amino-acid substitution. TLR7 response significantly increases and TLR9 response decreases in the Knock-in mice. Around 75% of the Knock-in mice died within a year. The mice have systemic inflammation with splenomegaly. TLR7 knockout and UNC93b1 knock-in mice are no phenotype. This result indicates that TLR7 plays an important role for the systemic inflammation. We revealed the importance of negative regulatory mechanism via PDZ binding domain in UNC93b1 in vivo. We also identified a functional UNC93b1 binding protein to regulate TLR7 and TLR9 responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
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：Toll-like receptor、核酸認識、ノックインマウス、LC-Ms/Ms 解析

### 1. 研究開始当初の背景

私達はウイルスや病原性微生物の感染の危険性に常にさらされており、感染を感知し反応するための免疫機構を進化させてきた。その病原体センサーの一つとして **Toll-like Receptor (TLR)** が機能している。TLR は病原性微生物特異的な糖脂質、タンパク、核酸を認識し、強い炎症反応を引き起こすとともに、樹状細胞などの抗原提示細胞の成熟を促がすことで、T 細胞や B 細胞を中心とする獲得免疫の誘導にも貢献している。興味深いことに、TLR が病原体成分だけを認識しているのではなく、自己成分にも応答しうるということが最近明らかになってきている。例えば、TLR7 や TLR9 は私達の細胞内に存在する核酸をも認識しうる。このような内在性のリガンドに対する応答が過剰となると、自己免疫疾患が惹起される危険性が高まる。最近、TLR7 と自己免疫疾患との関わりが報告されている。アポトーシスで死ねずに、**Secondary necrosis** の死細胞が過剰となる自己免疫疾患モデルマウス **MRL/lpr** において、TLR7 シグナルが症状を増悪するとの報告である。もう一つに自己免疫疾患モデルマウス **Yaa** においてその発症に関わる遺伝子が TLR7 であると判明した。これは TLR7 遺伝子の **duplication** により、X 染色体にある TLR7 遺伝子が通常 1 コピーのところから 2 コピーとなり、その発現が増強することが、自己免疫の原因と考えられる。さらに興味深いことに **MRL/lpr** において、TLR7 と反対に、TLR9 が症状を緩和するとの報告もある。TLR9 が症状の悪化に作用する自己免疫疾患モデルマウスも報告されており、TLR7 と TLR9 の自己免疫に対する作用は常に同じではなく、状況によって **Pathogenic** に、あるいは **Protective** に作用する可能性がある。

### 2. 研究の目的

我々は以下の仮説を立てた。TLR7/TLR9 は、常に自己の核酸に応答しており、何らかのバランスを維持している。その際には、TLR7 と TLR9 の役割は必ずしも同じではなく、互いに相反する可能性があり、TLR7 と TLR9 の応答性のバランスも巧妙に維持されている。この仮説に立って、本研究においては、TLR7/TLR9 が如何にして、病原体と自己由来の核酸を認識、識別し、また TLR7 と TLR9 の間のバランスを維持しているのか、分子レベルで明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

我々は、**Unc93b1** を TLR7 の応答性を獲得させるが、TLR9 の応答性に影響は無い遺伝子として単離した。我々の単離した **Unc93b1** 遺伝子は 5'側が欠損しており、アミノ末端側の 80 アミノ酸が発現していないことが分かった。興味深いことに、全長の **Unc93b1** を発現させても、TLR7 も TLR9 の応答性に影響はなかった。これらの結果をふまえて、本研究期間において、**Unc93b1** のアミノ末端の 80 アミノ酸のうち、どのアミノ酸が TLR7 の応答にどのように影響するかを検討し、その選択的な制御機構を分子レベルで明らかにする。

研究方法としては、**Unc93b1** のアミノ末端部分に、TLR7 と TLR9 の活性化のバランスを調節するための領域が存在することについて、欠損やアミノ酸置換ミュータントを用いて、どこが重要なのか、その部位を決定すると同時に、**UNC93b1** に会合する分子を **LC-Ms/Ms** 解析により同定し、ノックアウトマウスを作成して会合分子の機能的メカニズムについての解析を進める。そして、**Unc93b1** による TLR7/TLR9 のバランス調節機構の重要性を個体レベルで明らかにするために、TLR7 のみを活性化しうるような **Unc93b1** のミュータントが得られたら、ノックインマウスの作成をはじめ。このマウスにおいて TLR7 と TLR9 の反応性のバランスが崩れた結果として自己免疫疾患が誘導されるのか検討する。

### 4. 研究成果

#### 1, **UNC93b1** の N 末端部位における TLR7 と TLR9 の調節領域の同定

我々は **UNC93b1** の N 末端側の 80 アミノ酸の中で、PDZ binding domain である 34 番目から 36 番目のアミノ酸に変異を加えると TLR7 の反応性が著しく増強した。反対に TLR9 の反応性が減弱した。この結果により、PDZ binding domain が TLR7 と TLR9 の調節領域であることが明らかとなった。34 番目のアスパラギン酸をアラニンに変異する変異体を

樹状細胞に発現させ、免疫沈降後に LC-Ms/Ms 解析を行うと、この変異体は TLR9 との会合が著しく失われていた。この成果は Journal of Experimental Medicine に掲載された。

2, UNC93b1 の 34 番目のアスパラギン酸をアラニンに変異するノックインマウスの作製と解析  
ノックインマウスは、樹状細胞、マクロファージ、B 細胞において TLR7 の反応性が著しく増強し、TLR9 の反応性が減弱していた。ノックインマウスはメンデルの法則通りに生まれるが、1 年以内に 75% のマウスが死亡した。マウスの脾臓は著しく肥大しており、その中で顕著に増えた細胞は CD11b+ の Myeloid 細胞と Ter119+CD71+ erythroblast であった。そしてさらに、肝臓に塞栓が起こることで、肝障害でマウスは死に至ることが明らかとなった。このノックインマウスは TLR7 のノックアウトマウスと交配することで病態が消失することから、TLR7 の反応性の増強がその病態と関わっていることが示唆された。加えて、これらの結果より UNC93b1 の PDZ binding domain を介した TLR7 の抑制機構の vivo における重要性を示した。この研究結果については Immunity に掲載された。

3, UNC93b1 に会合して TLR7 と TLR9 の反応性を制御する分子の同定

UNC93b1 は機能的なドメインが存在しないそのため、UNC93b1 に機能的な蛋白質が会合して制御すると予測した。UNC93b1 に会合する分子は、樹状細胞に GFP タグをつけた UNC93b1 を導入し、抗 GFP 抗体にて免疫沈降をすることで、その共沈分子を LC-Ms/Ms 解析にて同定した。ノックアウトマウスを解析すると TLR7 と TLR9 の反応を調節する分子であることが明らかとなった。Nature に論文投稿準備中である。

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 2 件)

1. Fukui R, Saitoh S, Kanno A, Onji M, Shibata T, Ito A, Onji M, Matsumoto M, Akira S, Yoshida N, & Miyake K. Unc93B1 restricts systemic lethal inflammation by orchestrating TLR7- and TLR9-trafficking. *Immunity*, 35: 69-81 (2011)
2. Fukui R, Saitoh S, Matsumoto F, Kozuka-Hata H, Oyama M,

Tabeta K, Beutler B, & Miyake K. Unc93B1 biases Toll-like receptor responses to nucleic acid in dendritic cells toward DNA- but against RNA-sensing. *J Exp Med.* 206: 1339-1350 (2009)

[学会発表] (計 3 件)

1. 2011 年 11 月 28 日 幕張メッセ  
タイトル: TRAM の分子動態と抗原提示プラットフォーム [発表者: 谷村奈津子]

2. 2011 年 11 月 28 日 幕張メッセ  
タイトル: UNC93 homolog B1 は TLR7 と TLR9 の反応性を相反的に制御し、致死的な自然炎症から生体を防御する  
[発表者: 福井竜太郎]

3. 2009 年 6 月 20 日 東京大学

第 18 回内毒素・LPS 研究会

タイトル: UNC93b1 を介した Toll-like receptor (TLR) 7 と 9 の制御

[図書] (計 3 件)

- 1, Saitoh, S. Toll-like Receptors and Their Regulatory Mechanisms. *Innate Immune Regulation and Cancer Immunotherapy.* 39-49, (2011)
- 2, Saitoh S, & Miyake K. Regulatory molecules required for nucleotide-sensing Toll-like receptors. *Immunol. Rev.* 227, 32-43 (2009)
- 3, Saitoh S. Chaperones and transport proteins regulate TLR4 trafficking and activation. *Immunobiology.* 214, 594-600 (2009)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: UNC93b1 遺伝子改変マウスの確立とその応用

発明者: 三宅 健介

齊藤 伸一郎福井 竜太郎

権利者：三宅 健介

種類：特許

番号：61/372191

出願年月日：2010年8月10日

国内外の別：国内

〔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

齋藤 伸一郎 (SAITOH SHIN-ICHIROH)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：90361625

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：90361625

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：