

機関番号 : 12601

研究種目 : 研究活動スタート支援

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21890050

研究課題名 (和文) Toll 様受容体における細胞内分布の意義に関する研究

研究課題名 (英文) Analyzing the biological significance in intracellular localization of Toll Like Receptors

研究代表者

柴田 琢磨 (SHIBATA TAKUMA)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号 : 30554505

研究成果の概要(和文): Toll Like Receptor (TLR) ファミリーは病原体認識レセプターであり、生体内の様々な免疫応答制御に必須の役割を果たす。しかし、TLR の基本的性質に関しては不明な点が多い。本研究では、TLR の細胞内分布を制御する PRAT4A のノックアウトマウスを用い、TLR4 や TLR5 における細胞内分布と免疫応答との関連を検討した。

FACS 解析より、PRAT4A 欠損骨髄マクロファージ(M $\phi$ )や PEC では細胞表面 TLR4 は完全に欠損した。TLR4 では細胞表面への分布がリガンド認識に必須であると考えられており、同仮説に一致して PRAT4A 欠損 PEC では TLR4 リガンド(Lipid A、大腸菌)に対する応答は消失した。しかし、PRAT4A 欠損骨髄 M $\phi$  では多くのサイトカイン産生が残存した。また、同 M $\phi$  では TLR4 リガンド刺激に伴う共刺激分子の発現上昇がほとんど影響を受けなかった。これらの結果は、細胞表面のみならず細胞内の TLR4 も LPS レセプターとして機能することを示している。これら成果は、研究期間内に得られ、その成果は学術雑誌に掲載された。

研究成果の概要(英文): Toll-like receptors (TLRs) sense a variety of microbial products. TLRs activate innate immune responses and prime adaptive immune responses. TLR4/MD-2, a sensor for LPS, delivers the MyD88-dependent signal from the cell surface, then traffics to endolysosomes and delivers the TRIF/TICAM-1-dependent signal. Both signals are thought to be dependent on cell surface TLR4/MD-2. Although TLR4/MD-2 is located also in recycling endosomes, the Golgi apparatus or the endoplasmic reticulum, little is known about a role for intracellular TLR4/MD-2 in LPS responses. We here studied intracellular LPS sensing in macrophages. PRAT4A (protein associated with TLR4 A) is a cochaperone for a general chaperone gp96 and required for cell surface expression of TLR4/MD-2. Cell surface TLR4/MD-2 was undetectable on PRAT4A deficient thioglycollate-elicited peritoneal macrophage cells (P-Macs) and bone marrow-derived macrophages (BM-Macs). LPS responses were all abolished in PRAT4A deficient P-Macs, whereas a part of LPS responses remained detectable in PRAT4A deficient BM-Macs. Of note, LPS responses in PRAT4A deficient BM-Macs were not necessarily dependent on TRIF/TICAM-1 signaling. PRAT4A deficient BM-Macs showed unimpaired production of both TRIF/TICAM-1-dependent chemokine RANTES (CCL5) and MyD88-dependent chemokine MCP-1 (CCL2). Moreover, up-regulation of co-stimulatory molecules, CD40 and CD86 was not

altered. In contrast, TRIF/TICAM-1-dependent production of type I IFN was profoundly impaired. These results demonstrate that 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
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

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: TLR4, LPS, TLR5, Flagellin, PRAT4A, マクロファージ, 細胞内分布

1. 研究開始当初の背景

Toll Like Receptor (TLR) ファミリーは免疫細胞に高発現する病原体認識レセプターである。同分子は生体内の様々な免疫応答制御に必須の役割を果す。しかし、TLR ファミリーの細胞内分布が各々のTLRで大きく異なる理由には不明な点が多く、リガンド認識部位およびシグナル伝達部位を含めた細胞内分布の意義がほとんどのTLRで未だ明らかとなっていない。

2. 研究の目的

機能的TLR4は細胞表面TLR4であると考えられてきたが、同分子は細胞内分画(小胞体、ゴルジ体など)にも分布することが知られている。PRotein Associated with TLR4 (PRAT4A)はTLR4の細胞表面分布を制御するタンパク質であることが知られていることから、細胞表面TLR4を欠損するPRAT4Aノックアウト細胞を用いることで細胞内TLR4に機能的役割が

存在するか否かを解析することが可能となる。また、細胞表面TLR5であると考えられているTLR5でも、その細胞内分布が明示されておらず、実際のリガンド認識部位は不明なままである。

今回の研究では、TLR4リガンド(Lipid A)およびTLR5リガンド(Flagellin)の認識部位および細胞内分布と免疫応答との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

**(細胞内TLR4の機能解明)**

PRAT4Aノックアウトマウスに由来する様々なマクロファージを解析し、TLR4の細胞表面発現がPRAT4Aにより制御されることを示す。また、同マクロファージ群においてどのようなTLR4応答が残存するのかに関して解析を行う。

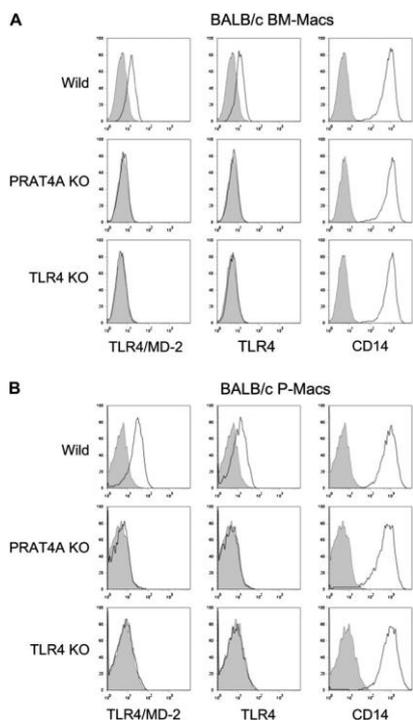
**(TLR5におけるリガンド認識部位の同定)**  
内因性に発現するTLR5を認識できる抗

体が存在しない為、Balb/c バックグラウンドの TLR5 ノックアウトマウスを使用することで抗 TLR5 モノクローナル抗体を作製する。また、樹立した抗体を使用して TLR5 が細胞表面に発現する否かを検証する。PRAT4A は様々な TLR の細胞表面発現を制御することから、TLR5 と PRAT4A の関係も検証する。

#### 4. 研究成果

##### (細胞内 TLR4 の機能解明)

##### 1. PRAT4A 欠損マクロファージでは細胞表面 TLR4 が消失する。

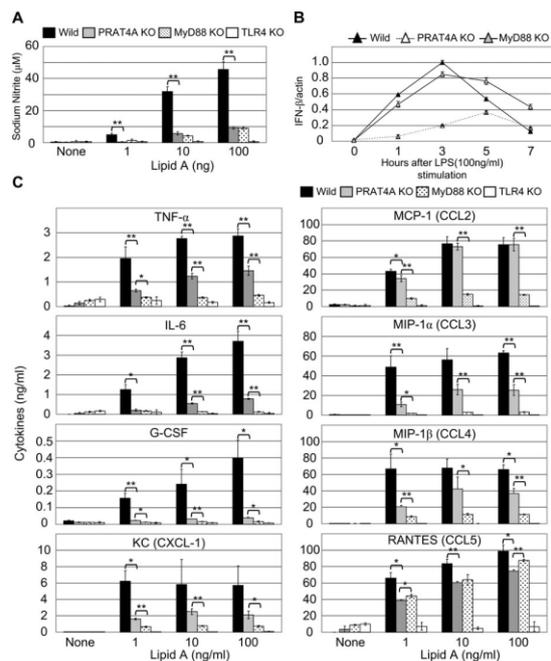


我々は以前に PRAT4A が TLR4 の細胞表面発現に必須であることを見出したが、同知見に一致して細胞表面 TLR4 は骨髄由来マクロファージ(BM-Macs)、チオグリコレートにより誘導された腹腔内マクロファージ(P-Macs)および骨髄由来樹状細胞において完全に消失した。(図 A, B)

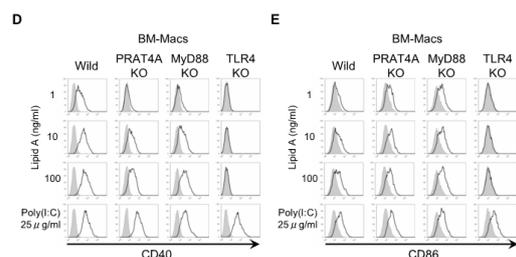
##### 2. 腹腔内マクロファージ(P-Macs)の LPS 認識には細胞表面 TLR4 が必須である。

細胞表面 TLR4 を消失した PRAT4A 欠損 P-Macs では Lipid A により誘導される一酸化窒素、サイトカイン(TNF- $\alpha$ , IL-6, RANTES)、および IFN- $\beta$  の産生が完全に欠損していた。この事実は、P-Macs の TLR4 応答が主に細胞表面 TLR4 に依存することを示している。

##### 3. 骨髄由来マクロファージ(BM-Macs)は機能的細胞内 TLR4 を有する。



P-Macs とは対照的に、細胞表面 TLR4 を消失した PRAT4A 欠損 BM-Mac では多くの TLR4 応答が残存し(A, B, C)、ケモカインである RANTES や MCP-1 は Wild Type とほとんど遜色なく産生された。特に MyD88 依存的な MCP-1 産生が残っていたことより、細胞表面 TLR4 のシグナル伝達を司る MyD88 が細胞内 TLR4 の下流でも機能していることが示された。



更に、PRAT4A 欠損 BM-Mac では Lipid A による co-stimulatory molecules (CD40, CD86)の誘導が Wild type と遜色なく誘導された。

以上の結果は、細胞内 TLR4 が機能的であることを明確に示したものであり、細胞内分画における TLR4 が選択的かつ特徴的な TLR4 応答を誘導することを示している。

#### (TLR5 におけるリガンド認識部位の同定)

1. 抗 TLR5 モノクローナル抗体の樹立。  
TLR5 を強制発現させた Ba/F3 細胞を Balb/c バックグラウンドの TLR5 ノックアウトマウスに免疫した。同マウスより得られた脾臓細胞をハイブリドーマ細胞と融合することで得られた抗体産生ハイブリドーマ株を FACS スクリーニングに供し、Ba/F3 細胞は染色しないが TLR5 強制発現 Ba/F3 細胞を染色するモノクローナル抗体を 1 種類得ることができた。同モノクローナル抗体は GFP タグ着き TLR5 を選択的に免疫沈降できることから、TLR5 特異的であると考えられる。

2. 細胞表面 TLR5 発現細胞の探索。  
樹立した TLR5 抗体を用いて複数の細胞株を染色/FACS 解析を行った結果、J774 細胞(マクロファージ系列)が内因性 TLR5 を細胞表面に発現することが判明した。同知見に一致して、J774 細胞は Flagellin を認識し、サイトカインを産生した。

3. PRAT4A は TLR5 の細胞表面発現を制御する。

細胞表面 TLR(TLR1,2,4)の細胞表面への移行は PRAT4A により制御されることから、TLR5 と PRAT4A との関係を解析した。その結果、PRAT4A をノックダウンした J774 細胞では TLR5 の細胞表面発現が完全に消失した。また、内因性 PRAT4A

が TLR5GFP と共沈殿すること、PRAT4A ノックダウンにより TLR5 の糖鎖修飾が欠損することを発見した。この事実は、PRAT4A が小胞体にて糖鎖修飾を制御することで TLR5 の細胞表面発現を制御することを示している。

4. 細胞表面 TLR5 はサイトカイン産生に必要である。

PRAT4A をノックダウンした J774 細胞では Flagellin 刺激に伴うサイトカイン産生が完全に消失していた。同結果は、TLR5 において細胞表面分布がサイトカイン誘導に重要であることを強く示唆するものである。

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, Takuma Shibata, Yuji Motoi, Natsuko Tanimura, Natsuko Yamakawa, Sachiko Akashi-Takamura and Kensuke Miyake  
“Intercellular TLR4/MD-2 in macrophages senses Gram-negative bacteria and induces a unique set of LPS-dependent genes”  
*International Immunology*誌、査読あり、in press, 2011年

2, Ryutaro Fukui, Shin-ichiro Saitoh, Atsuo Kanno, Masahiro Onji, Takuma Shibata, Akihiko Ito, Morikazu Onji, Mitsuru Matsumoto, Shizuo Akira, Nobuaki Yoshida, and Kensuke Miyake  
“Unc93B1 restricts systemic lethal inflammation by orchestrating TLR7- and TLR9-trafficking”  
*Immunity*誌、査読あり、in press, 2011年

[学会発表](計1件)

(ポスター発表)

柴田琢磨, 赤司(高村)祥子, 三宅健介  
「Toll Like Receptor 4 (TLR4)における細胞内分布の意義に関する研究」  
『第 11 回東京大学生命科学シンポジウム』、東京大学本郷キャンパス、PB31、2011年6月

[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

柴田 琢磨(SHIBATA TAKUMA)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号:30554505

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし