

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

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

研究代表者 魚住 尚紀 (医学部 生化学)

諸 言

Toll-like receptor (TLR) は、自然免疫受容体の主要な分子群の一つであり、生体防御の第一線で病原体由来の分子パターン (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) の認識に携わっている¹⁾。TLRは宿主体外に由来するPAMPsのみならず、宿主体内に起源を持つ内在リガンドも認識して活性化される。近年は、自然炎症 (homeostatic inflammation または physiological inflammation) の概念が提唱され、TLRを含めた自然免疫受容体が生体恒常性の維持においても重要な役割を果たしていると考えられている。

TLRの研究は、多岐にわたって精力的に進められてきたが、受容体活性化の分子レベルでの解明は未だ途上にある。TLR細胞外ドメイン・リガンド共結晶のX線構造解析結果が、細胞膜に直交する点対称軸をもつ受容体の2量体構造を指し示しているのに対し、TLRの主要な細胞内情報伝達経路であるMyD88経路における細胞膜直下の細胞内情報伝達コンプレックスMyddosomeの結晶X線構造解析結果では、14個のデスドメインタンパク質が形成するらせん構造が報告されている²⁻⁴⁾。細胞外ドメインの点対称構造と細胞内情報伝達コンプレックスのらせん構造を機能的に連結させる機構は分子的に知られていない。また、PAMPsと内在リガンドが化学構造上の類似点に乏しいにもかかわらず同一のTLRを活性化できる、分子レベルでの説明も十分なものとはいえない状況にある。

このような状況を背景に、われわれは細胞生物学的な手法によりTLR4、TLR5それぞれの一次構造と機能の相関を解析し、受容体活性化機構を解明しようとしている。

材料と方法

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実験系である⁵⁾。われわれは、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) を骨格として用い、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⁶⁾。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、プラスミドを大腸菌内で増幅、陰イオン交換カラム (Nucleobond Exta midi EF, Takara, Otsu, Japan) を用いて精製し、得られたエンドトキシンフリーの溶液をトランスフェクショングレード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。これらの発現プラスミドの使用に関しては、埼玉医科大学第二種使用等拡散防止措置承認(1055号)を得ている。

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、1ウェルあたり 9×10^5 個を2 mlの用量で6穴プレートに播種した。トランスフェクションは、総量1 μ gのプラスミドを2 μ lのLipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) と混合して、Opti-MEM I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 中にて実施した。トランスフェクション後、4-6時間後に培地を10% FCS添加DMEMに交換し、引き続いて一晩、培養した。翌日、5% FCS添加DMEMで懸濁した細胞を密度 4×10^5 /mlに調製して、96穴プレートに1ウェルあたり100 μ lずつ播種した。5-7時間後に100 μ lの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。175 μ lの培地を回収、1000 x gで10分間遠心して150 μ lの上清を得た。この培養上清に含まれる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。

結果

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¹⁾。膜貫通部位は疎水性アミノ酸を多く含む 20 残基程度の領域で, 2 次構造として α ヘリックス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 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 (Fig. 1A)。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 (Fig. 1B)。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 (Fig. 1C)。このように, マウス TLR4 の LPS 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。

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^{7,8)}。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 TLR4 の N682D, E796P 変異体では, 野生型とほぼ同様の LPS 反応性を示したのに対して, マウス TLR5 の D718N, P834E は, 100 ng/ml フラジェリンに対しても反応を示さなかった (Fig. 2A, B)。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アルギニンへの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が,

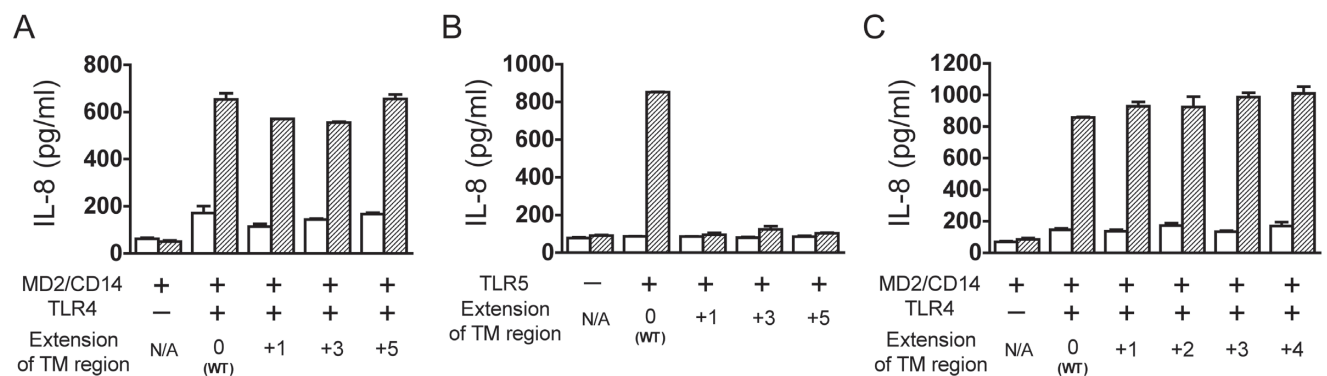


Fig. 1. 膜貫通部位延長変異体のリガンドに対する反応。A: マウス TLR4, 膜貫通部位 C 末端側の延長変異体。0 (WT): 野生型 (延長なし), +1: 1 残基 (V) 挿入, +3: 3 残基 (VLV) 挿入, +5: 5 残基 (VIFLV) 挿入。トランスフェクションベクター重量比, TLR4 カセット: MD2/CD14 カセット: 空ベクター = 1:1:8 (総プラスミド量 1 μ g/well)。白抜き: 無刺激, 斜線: 12.5 ng/ml LPS 刺激。B: マウス TLR5, 膜貫通部位 C 末端側の延長変異体。0 (WT): 野生型 (延長なし), +1: 1 残基 (V) 挿入, +3: 3 残基 (VLV) 挿入, +5: 5 残基 (VIFLV) 挿入。トランスフェクションベクター重量比, TLR5 カセット: 空ベクター = 1:9 (総プラスミド量 1 μ g/well)。白抜き: 無刺激, 斜線: 100 ng/ml フラジェリン刺激。C: マウス TLR4, 膜貫通部位 N 末端側の延長変異体。0 (WT): 野生型 (延長なし), +1: 1 残基 (A) 挿入, +2: 2 残基 (AA) 挿入, +3: 3 残基 (AAA) 挿入, +4: 4 残基 (AAAA) 挿入。トランスフェクションベクター重量比, TLR4 カセット: MD2/CD14 カセット: 空ベクター = 1:4:15 (総プラスミド量 1 μ g/well)。白抜き: 無刺激, 斜線: 12.5 ng/ml LPS 刺激。

LPS非依存的に認められる恒常的な活性化能は保たれていた (Fig. 2C). TLR5に関して、現在、実験の準備を進めている。

考 察

本プロジェクトは、一次構造や機能が類似するマウスTLR4とTLR5は、同様の活性化機構を利用しているとの仮説をもって開始した。マウスTLR5をモデル受容体として解析し、細胞膜に分布するTLR一般の活性化機序を分子レベルで解明するのが当初計画であった。TLR4は、細胞外ドメインの補助タンパク質因子としてMD2やCD14を利用していることが知られ、解析を進めるためにはこうした分子の共発現系を構築する必要がある。また、TLR4は形質膜に発現するだけでなく、エンドソーム膜にも分布することができ、細胞内での場所によって、細胞内情報伝達経路を使い分けていることも知られている。これに対して、マウスTLR5は形質膜に分布する受容体で、補助タンパク質因子を要求しない。このため、実験系の単純化を考え、マウスTLR5を研究対象に採用した。HEK293細胞はマウスTLR5を単独で遺伝子導入することによって、リガンドであるフラジェリンに反応するようになる。これまでの実験結果は、予想に反し、マウスTLR4とTLR5の違いを顕著とするものであった。現在では、マウスTLR4とTLR5の異なる分子機序による活性化を念頭において実験を進めている。

一般に、リガンドと会合したTLRは受容体の2量体を形成し、細胞内情報伝達を開始すると考えられている。TLR細胞外ドメインは600アミノ酸残基以上

から構成され、ロイシンリッチリピート (LRR) の繰り返しによって、単量体で馬蹄形の立体構造を取っている²⁾。これまで知られているTLR細胞外ドメインの結晶構造解析の結果から、1分子のリガンドが2分子のTLR細胞外ドメインと相互作用し、2つのTLR細胞外ドメインが点对称の配置をとるリガンド受容体複合体モデルが提唱されている。このモデルでは、TLR細胞外ドメインのC末端、すなわち、細胞膜貫通部位との接合部の位置は2つのサブユニット間で相対的に固定されている。その結果、1回膜貫通部位によって連結された2分子の細胞内情報伝達TIRドメイン (200アミノ酸残基程度) の相対的位置も細胞外ドメインの複合体形成によって固定されると考えるのが妥当で、その位置が細胞内情報伝達複合体の形成にとって重要であると想像されている。現時点では、TLRと細胞内情報伝達複合体すべてを含む構造体としての立体構造は実験的には報告されていない。このため、2つのTIRドメインが1つの細胞内情報伝達複合体に含まれるのか、各々が1つの複合体を形成させるのかも含め、実証的な議論は困難である。マウスTLR4の膜貫通部位の長さを改変した変異体が野生型と同様のLPS反応性を示したことは、1) 2分子の細胞内TIRドメインの相対的位置は細胞内情報伝達機構の活性化に重要ではない、あるいは、2) マウスTLR4細胞内の高次構造に自由度があり膜貫通部位長さの変異による位置変化を相殺できる、可能性を示している。2)は、仮定されている高次構造の自由度が、野生型受容体での活性制御を困難にさせると考えられる。1)の方が高適合度と考えているが、この場合、1つのTIRドメイン

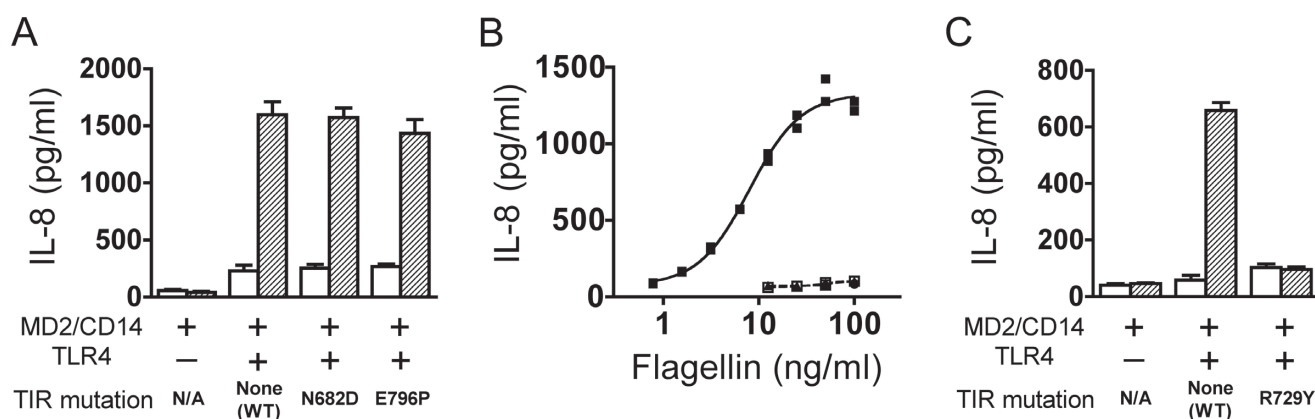


Fig. 2. 細胞内情報伝達 TIR ドメイン変異体のリガンドに対する反応. A: マウスTLR4. トランスフェクションベクター重量比, TLR4カセット: MD2/CD14カセット: 空ベクター = 1:4:15 (総プラスミド量 1 μ g/well). 白抜き: 無刺激, 斜線: 12.5 ng/ml LPS 刺激. B: マウスTLR5. トランスフェクションベクター重量比, TLR5カセット: 空ベクター = 1:9 (総プラスミド量 1 μ g/well). 野生型マウスTLR5 (■) 以外はフラジェリンに対する反応を認めなかった. D718N (●), P834E (▲) 変異体のプロットは, 空ベクター導入細胞 (□) のデータ点と重なっている. C: マウスTLR4. トランスフェクションベクター重量比, TLR4カセット: MD2/CD14カセット: 空ベクター = 1:10:89 (総プラスミド量 1 μ g/well). 白抜き: 無刺激, 斜線: 10 ng/ml LPS 刺激.

が1つの細胞内情報伝達複合体に含まれるモデルが示唆される。今後の実験による検証が必要である。対照的に、マウスTLR5では、膜貫通部位の長さに対する変異がリガンドに対する応答性を失わせるため、これまでのところ、従来の活性化機序モデルと整合性をもって解釈可能である。

細胞内情報伝達TIRドメイン中のアミノ酸残基の点変異によっても、マウスTLR4とTLR5の違いが浮き彫りとなった。それぞれが一次構造上相同の位置にあるマウスTLR4のN682, E796 残基、マウスTLR5のD718, P834 残基の交換変異体は、マウスTLR4ではリガンド応答性が野生型と違いを認めなかったのに対して、TLR5ではリガンドに反応しなくなっていた。MyD88, Malなど、他のTIRドメインをもつ細胞内タンパク質と会合体を形成することが、細胞内情報伝達の第一段階であると考えられている。TLR4とTLR5は、細胞内TIRドメインの異なる部位を使って、他のTIRドメインタンパク質と会合し、情報伝達をおこなっている可能性がある。マウスTLR4とTLR5で細胞内情報伝達複合体の形成過程が異なっていることを示唆するものと考えられる。

マウスTLR4はリガンド非依存的に細胞内情報伝達系を活性化することが知られている。この構成的な情報伝達機能は、細胞外ドメインを削り込んだ変異体で増強されることも知られている^{9, 10)}。こうした構成的な情報伝達機能は、TLR4のTIRドメイン固有の作用であり、単量体での細胞内情報伝達機能を示唆している。マウスTLR4のR729 残基の点変異体が、構成的情報伝達機能を保持したままLPS感受性を失っていることは、LPS刺激時と構成的、2つの情報伝達機能が、異なった機序でおこなわれている可能性も考えさせる。現在、マウスTLR5の対応する変異体の構築や、マウスTLR4の構成的情報伝達機能のみを欠失した変異体をスクリーニングするための変異体の構築など、さらなる変異体の調製を進めている。

マウスTLR4とTLR5の類似性を利用して解析を進める当初の計画は、マウスTLR4とTLR5の相違点を際立たせる方向へ変化した。TLR4は、グラム陰性菌の細胞壁成分である内毒素LPSをリガンドとするのみならず、宿主由来の数多くの内在リガンドによっても活性化されることが知られている。タンパク質、リポ多糖、ムコ多糖、リン脂質、脂肪酸など、多様な化学型と分子量をもつ物質を認識し、細胞内情報伝達系を活性化する機序は分子レベルで未解明である^{1, 11)}。本プロジェクトで構築した多様なマウスTLR4 変異体は、リガンドごとの活性化機構の違いを見いだすためにも利用可能である。こうした実験結果の蓄積により、TLR活性化機構分子モデルが構築でき、

TLRの生理的役割、病態における機能の解明に有用な情報を提供できると考えている。

引用文献

- 1) Kawai T and Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11:373-84.
- 2) Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H and Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 2009;458:1191-5.
- 3) Lin SC, Lo YC and Wu H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* 2010;465:885-90.
- 4) Gay NJ, Gangloff M and O'Neill LA. What the Myddosome structure tells us about the initiation of innate immunity. *Trends Immunol* 2011;32:104-9.
- 5) Divanovic S, Trompette A, Atabani SF, Madan R, Golenbock DT, Visintin A, et al. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105. *Nat Immunol* 2005;6:571-8.
- 6) Martin A, Toselli E, Rosier MF, Auffray C and Devignes MD. Rapid and high efficiency site-directed mutagenesis by improvement of the homologous recombination technique. *Nucleic Acids Res* 1995;23:1642-3.
- 7) Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998;282:2085-8.
- 8) Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999;162:3749-52.
- 9) Rhee SH and Hwang D. Murine TOLL-like receptor 4 confers lipopolysaccharide responsiveness as determined by activation of NF kappa B and expression of the inducible cyclooxygenase. *J Biol Chem* 2000;275:34035-40.
- 10) Panter G and Jerala R. The ectodomain of the Toll-like receptor 4 prevents constitutive receptor activation. *J Biol Chem* 2011;286:23334-44.
- 11) O'Neill LA, Golenbock D and Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2013;13:453-60.