

博士論文

論文題目

「**Toll-like receptor 3** 応答における
mammalian target of rapamycin の機能解析」

氏 名 佐藤 亮太

**Toll-like receptor 3 応答における
mammalian target of rapamycin の機能解析**

佐藤 亮太

目次

Toll-like receptor3 応答における mammalian target of rapamycin の機能解析

要旨

序論

- (1) 自然免疫と獲得免疫
- (2) Toll-like receptor (TLR)
- (3) 核酸認識 TLR の認識機構
- (4) TLR3 応答制御
- (5) 代謝センサーmTOR
- (6) ヘルペスウイルスと TLRs

方法

結果

- (1) 細胞株 NIH3T3 における TLR3 の応答
- (2) リガンド応答における TLR3 局在変化
- (3) 二本鎖 RNA (dsRNA)刺激による細胞骨格の変化
- (4) TLR3 応答および細胞内輸送における mTORC2 の重要性
- (5) TLR3 下流シグナル伝達経路
- (6) 血清による mTOR 活性および TLR3 応答への影響
- (7) 脂肪酸による mTORC2 シグナルの活性化
- (8) HSV 感染における TLR3 応答制御

考察

- (1) TLR3 応答制御機構
- (2) 線維芽細胞における TLR3 の応答
- (3) TLR3 の細胞内移行
- (4) mTOR による TLR 応答への影響

- (5) 脂肪酸による TLR 応答への影響
- (6) HSV 感染におけるインターフェロン産生

謝辞

参考文献

要旨

Toll-like receptor 3 (TLR3)はライソソームに局在し、刺激依存的にケモカイン RANTES を産生するとともに細胞内を移行するが、この両方に mTORC2 が関与していることが示された。脂肪酸欠損条件下では、mTORC2 活性が減弱し、RANTES 産生および TLR3 の細胞内移行も認められなかった。脂肪酸は mTORC2 の活性化を介して、TLR3 応答に関わる可能性が示された。Herpes Simplex Virus (HSV)感染においても TLR3 は mTORC2 依存的に細胞膜方向へ移行した。HSV 感染による I 型インターフェロン産生はライソソームの移行に関わる Rab7a に依存することから、TLR3 の細胞内移行を必要とすることが示唆された。これらの結果より、mTORC2 は TLR3 応答における RANTES 産生、および TLR3 の細胞内移行を介した I 型インターフェロン産生に寄与することが示された。

序論

(1) 自然免疫と獲得免疫

生物は生体内で自己成分か、細菌やウイルスのような非自己成分かどうかを認識し、排除することで自己同一性の維持を行っている。この機構は免疫系と呼ばれ、バクテリアのような単細胞生物からヒトを含む脊椎動物まで様々な生物が保持している。単細胞生物はウイルス感染に対する防御機構として酵素系などの簡素な免疫を持つものに対し、多細胞生物は生体内機構が複雑化するにつれて、免疫系もより複雑に進化してきた。特に、ヒトを含む脊椎動物では多くの病原体及びウイルスに対抗する免疫機構として獲得免疫と呼ばれる機構が生まれた。この機構では、膨大な多様性を持つ抗体やT細胞受容体が、ウイルスや細菌が持つタンパク質などの構成成分を特異的な抗原として認識する。一度応答した抗原に対しては再度侵入してきた場合に、初めての抗原よりもより迅速に応答を開始することができるようになる（免疫記憶）(1)。

このような膨大な多様性を持つ獲得免疫を有していない無脊椎動物は、ゲノムにコードされたタンパク質が病原体成分を認識する(2)。ショウジョウバエのTollは発生の段階において背腹軸の決定に関わる一方、成虫においては真菌に対して応答し、シグナル伝達経路が活性化され抗菌ペプチドが産生される(3)。

このような機構は自然免疫と呼ばれ、脊椎動物においても獲得免疫とともに機能している。

様々なパターンの非自己を認識できる獲得免疫に比べ、特定のパターンしか認識できない自然免疫は、原始的な免疫機構であると言われていた。しかし、獲得免疫が応答を開始するのに比較的時間を要するのに対し、自然免疫は迅速に応答を立ち上げることが可能であり、初期段階の免疫応答としての利点を持つ。また、その初期応答によって、獲得免疫の惹起に寄与することも知られている(4,5)。さらに、自然免疫は感染症から身を守る感染防御という正の部分と誤って自己成分を認識することで自己免疫疾患や動脈硬化、乾癬などに関わる負の部分が存在することが明らかになってきている。したがって、この自然免疫機構の分子機構解明は生命科学においても非常に重要なだけでなく、様々な感染症や内因性炎症性疾患の治療にもつながると考えられる。

(2) Toll-like receptor (TLR)

Toll-like receptor (TLR)は自然免疫系に属する分子であり、細菌やウイルスなどの病原体に特異的な構造を認識することで感染の初期応答および活性化による獲得免疫系の惹起に関わっている(6)。前項で述べたように、自然免疫は獲得免

疫と異なり、遺伝子の再構成が行われず、認識の多様性には限度がある。ヒトの場合、TLRは10種類しかない。そこで、一つの受容体がヒトやマウスにはなく、病原体に共通する構造をリガンドとして認識することで、より多くの病原体を認識できるようになっている。

TLRは一回膜貫通タンパク質であり、樹状細胞、マクロファージ、B細胞などの免疫担当細胞を中心に、そのほか皮膚や上皮細胞など、外界と接し病原体と接触する可能性のある細胞に広く分布している。このファミリーに属する分子はヒトでは10種類、マウスでは12種類知られている。その中でも9種類は共通しており、これらは主に脂質やタンパク質を認識し、細胞表面に局在するグループと、細胞内に局在し、核酸を認識するグループに分けることができる(Fig. 1)(7)。前者のグループに含まれるTLR1,2,6はリポタンパク質を、TLR4はリポ多糖を、TLR5は細菌の持つフラジェリンをそれぞれ認識する。後者のグループに含まれるTLR3は二本鎖RNAを、TLR7やTLR8は一本鎖RNAを、TLR9はCpGモチーフを持つ一本鎖DNAを認識することが知られている。基本的にホモ二量体を形成することで応答するが、TLR2はTLR1やTLR6とヘテロ二量体を形成し応答する(8,9)。

TLRには応答を制御する分子が数多く報告されている。MD-2はLPSを認識

する TLR4 に必須の分子であり、MD-2 非存在下では応答することができない(10)。

また、Protein Associated with Tlr4A (PRAT4A) はほとんどの TLR の細胞内輸送に

関与することが知られており、PRAT4A 非存在化では TLR が応答出来ないことも

報告されている(11)。これらの TLR 応答制御分子の探索は TLR 応答の分子基盤

を解明するうえで非常に重要である。活性化された TLR は細胞内シグナル伝達

経路を介して転写因子である IRF や NF- κ B を活性化し、インターフェロン

(Interferon: IFN) やサイトカイン、ケモカイン産生を誘導する (Fig. 2)(12, 13)。

また、細胞質内には TLR 以外にも DNA センサーや RNA センサー (STING、

MDA-5、RIG-I など) が機能しており、細菌感染やウイルス感染の場合には、こ

れらも TLR と共に働くことで生体防御に貢献している(14-17)。

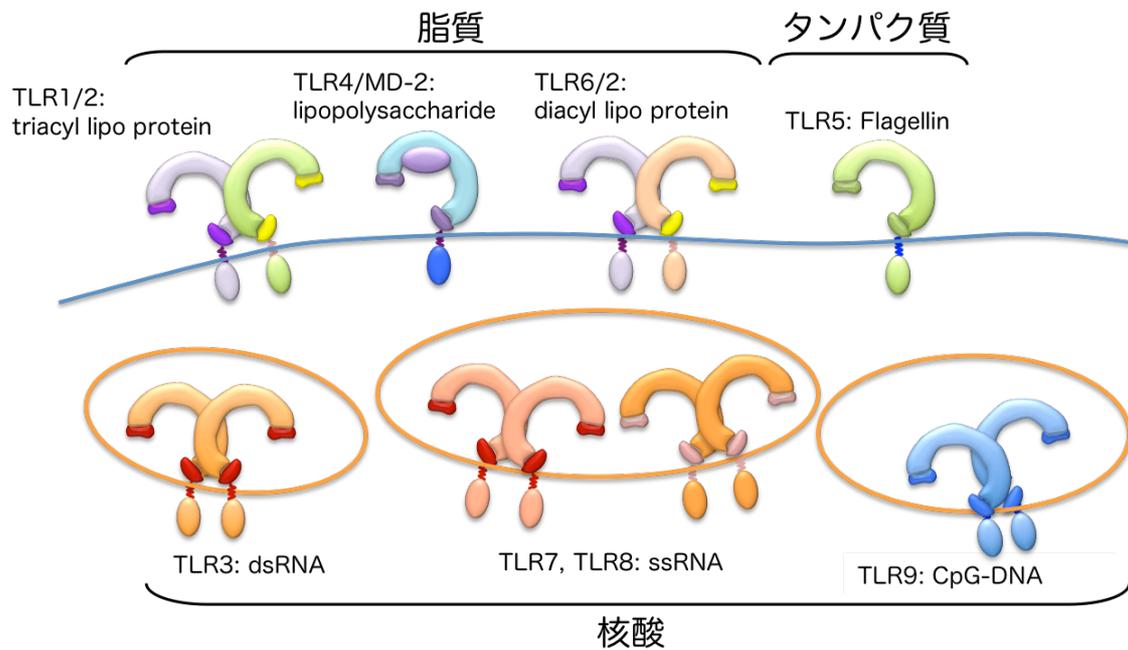


Fig. 1 TLR ファミリーの分類

各種 TLR の局在および代表的なリガンドを模式的に示す。TLR1、2、4、5、6、は細胞表面に主に局在するのに対し、TLR3、7、8、9 は小胞体、エンドソームおよびライソソームなどの細胞内に局在する。TLR1/2 および TLR6/2 はヘテロダイマーで応答する。他の TLR はホモダイマーを形成する。

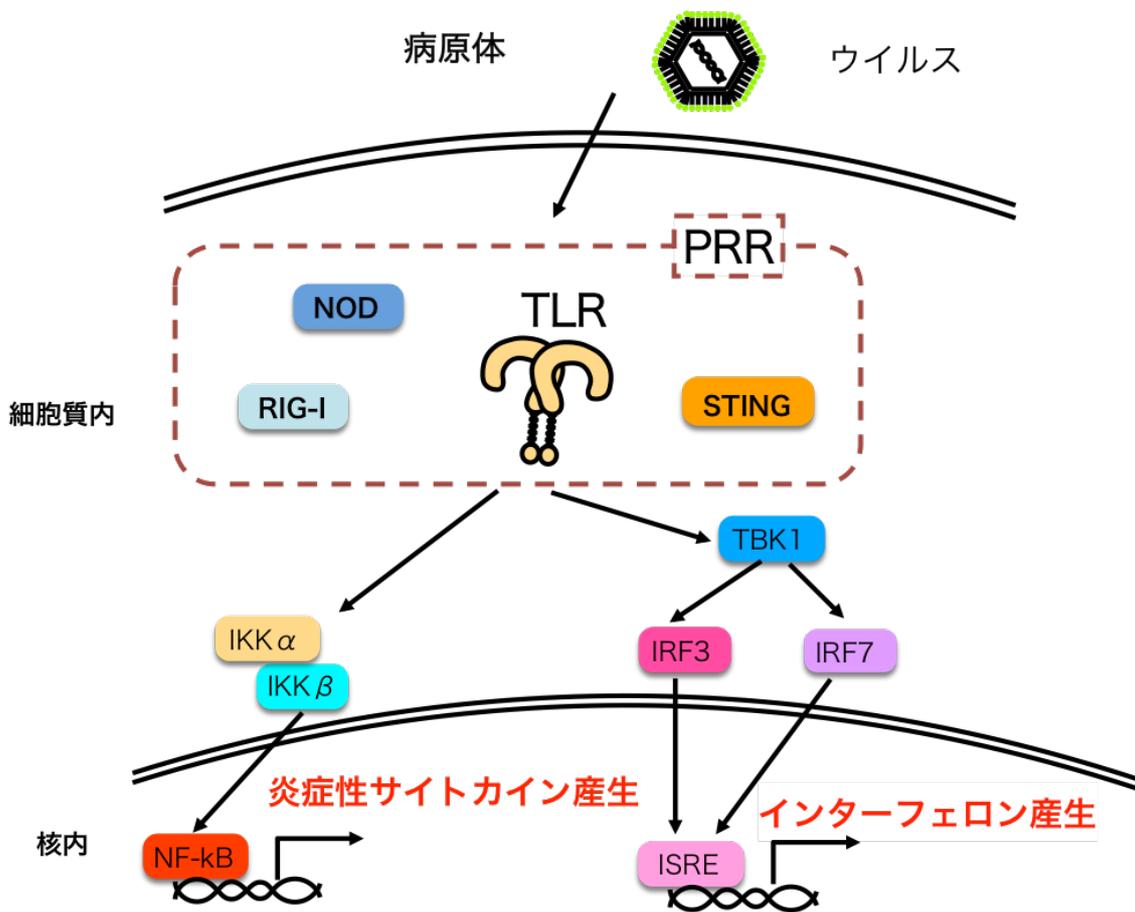


Fig. 2 自然免疫とシグナル伝達

自然免疫レセプターを介したシグナル伝達経路を示す。ウイルスや病原体から細胞が刺激を受けると、TLR、RIG-I、NODやSTINGが認識しIkk α/β を介する経路とTBK1、IRFを介する経路が活性化される。前者は最終的にNF- κ Bを活性化されることで炎症性サイトカインの産生を誘導する。また、後者は最終的にIRF3やIRF7を活性化することでインターフェロン産生を誘導する。

(3) 核酸認識 TLR の認識機構

核酸認識 TLR は病原体由来成分だけでなく内因性リガンドにも応答することが明らかになりつつある。特に、核酸は病原体から宿主に至るまで、基本構造は変わらないため、宿主由来か病原体由来かの識別を厳密に行う事は容易ではない。そのため、核酸における宿主と病原体の識別には、核酸の局在が重要であることが分かっている。例えば、ウイルス由来の核酸は細胞に取り込まれる際、周囲をウイルス由来の膜タンパク質などに覆われているため、分解されにくく、エンドライソソームまで運ばれる。一方、宿主由来の核酸は、通常核内に保存されており、死細胞から遊離した核酸などは細胞外やエンドソーム内で DNase や RNase によりただちに分解されてしまうため、エンドライソソームまで運ばれず、細胞内にいる核酸センサーは活性化されない。しかし、自己抗体が結合し核酸が分解に抵抗性となった場合、宿主由来の DNA でも TLR9 を活性化しうる。すなわち、TLR9 における自己、非自己の区別は核酸の配列やメチル化などの修飾の違いに加えて、TLR の局在するコンパートメントまで核酸が運搬されるかが重要であると考えられている。また、TLR 側の細胞内局在の変化も応答には必須である。核酸認識 TLR は、ウイルス感染などの刺激を受けると、エンドソーム、ライソソーム内を移動すると考えられている(18, 19)。

このような各 TLR の細胞内移動には多様な分子が関連しており、応答制御認識制御がなされていると考えられる (Fig. 3)。これまでの研究で、TLR3、TLR7 および TLR9 の小胞体からエンドソーム、ライソソームへの細胞内移動には Unc93B1 と呼ばれる分子が不可欠であることが明らかとなった(20)。Unc93B1 の機能欠損マウスでは 3 種類の TLR の小胞体からの細胞内輸送ができなくなっており、これらの TLR の応答がすべて欠損していることがわかった(19, 21, 22)。また、当研究室で作成した Unc93B1 変異体 (以下、D34A 変異体) は TLR7 の応答性を亢進させ TLR9 の応答性を抑制することが示された。この変異体において、細胞内で刺激依存的な TLR7 の細胞内移動を増強し、TLR9 の細胞内移動を減弱していることから、Unc93B1 による TLR の細胞内移動は TLR 応答性に強く影響していることがわかる(23)。また、D34A 変異体マウスでは糸球体腎炎を自然発症し、自己免疫疾患様病態を呈する(24)。MRL/lpr は、皮膚病変、リンパ節腫脹、脾腫および糸球体腎炎などの自己免疫病態を呈するマウスとして用いられてきたが、これらの病態形成に TLR が関与していることが報告されている(25, 26)。さらに TLR7 を強制的に発現させても自己免疫疾患様の病態を呈する。これらの結果は、核酸に対する自然免疫応答が自己免疫疾患の一つの原因となりうる可能性を示している(Fig. 4)。

このように、核酸 TLR は自己免疫疾患を引き起こし得ることからも、緻密な
応答制御が必要であることは明らかである。Unc93B1、Protein Associated with
TLR4 A (PRAT4A)のような様々な分子が関わることで応答制御が行われている
ことが報告されているが、まだ不明な点も多く、今後も TLR 応答制御を解明す
るために TLR 制御分子の探索は必須であると考えられる。

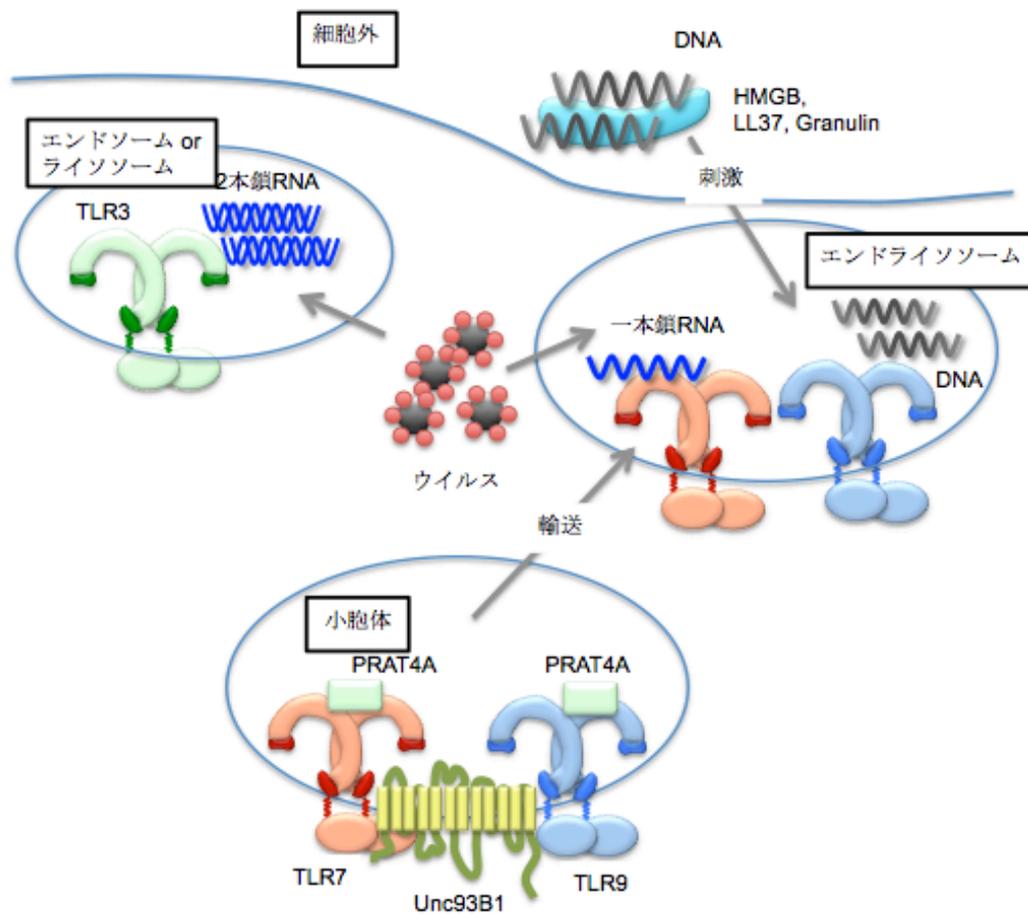


Fig. 3 核酸 TLR とアクセサリー分子

核酸認識レセプターにおいて多くのアクセサリー分子の関連が知られている。PRAT4A や Unc93B1 は TLR7 や TLR9 を小胞体から応答の場であるライソソームへ細胞内移行を行う。また、TLR3 は Unc93B1 によって小胞体からエンドソームやライソソームに移行される。移行された TLR はウイルスや細菌が持つ DNA や RNA を認識し応答する。

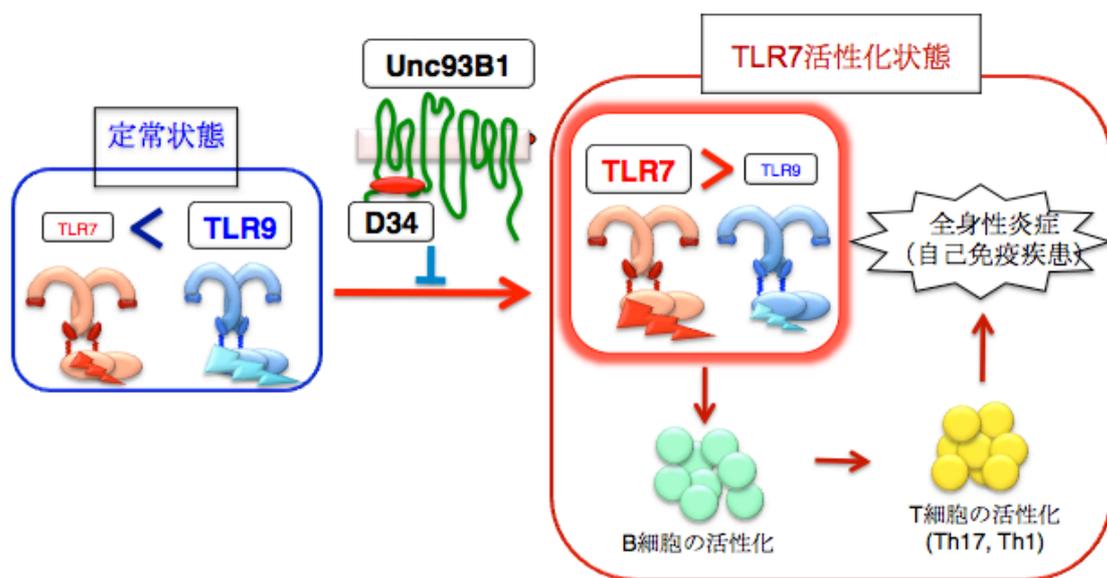


Fig. 4 TLR7 と TLR9 のバランス破綻

TLR 関連分子である Unc93B1 分子に D34A 変異を挿入することで、TLR7 と TLR9 のバランス破綻が起きる。TLR7 と TLR9 バランスが破綻し、TLR7 活性が強くなると、B 細胞が活性化され、それに伴い、T 細胞の活性化も起きる。これにより、自己免疫疾患などの全身性疾患が誘導される。TLR7 と TLR9 とのバランスの破綻は生体の恒常性の維持に著しく不利益をもたらすことが D34A マウスの解析から明らかになった。

(4) TLR3 応答制御

TLR7 や TLR9 については前章の序論でも述べたように応答制御の重要性について多くの報告がなされている。しかし、TLR3 についてはまだ不明な部分が多い。TLR3 のシグナル伝達経路は、他の核酸特異的 TLR とは異なる下流分子 (TRIF など) が機能していることが報告されており、TLR3 の応答が他の核酸 TLR と異なる制御を受ける可能性がある(27)。また、TLR7 や 9 と同様に、カテプシンファミリーによって細胞外ドメインが切断されることでリガンドに応答しうる状態になることが知られている。TLR3 の細胞外ドメインが切断された後も、N 末断片は C 末断片と会合しており、リガンド認識に必要であることが報告されている(28)。TLR3 は免疫細胞だけでなく線維芽細胞などにも発現していることから、初期免疫応答に関わる一つと考えられる。

TLR3 が関わる病態としては、ウイルス感染がある。西ナイルウイルスやヘルペスウイルスに対する応答について多くの研究がなされているが、近年、内因性リガンドである自己由来 RNA への TLR3 応答も報告されている(29-31)。これは、紫外線や放射線により傷害を受けた細胞由来の自己 RNA に TLR3 が応答してしまうため、病態を増悪させる原因となる(32)。しかし、TLR3 のリガンド認識やサイトカイン及び IFN 産生の場合についてほとんどわかっておらず、ウイル

ス感染時における宿主細胞における感染防御システムや自然免疫における初期免疫応答への理解を深めるためにも、今後 TLR3 認識機構解明が必要であると考えられる。

(5) 代謝センサーmTOR

免疫抑制剤の一つである Rapamycin のターゲット分子として発見された代謝センサー mammalian target of Rapamycin (mTOR) は、複数の分子と会合することで複合体を形成し、生体内では複合体として機能している (Fig. 5)。mTOR はインスリンを含む成長因子などの細胞外からの刺激を統括し、多様なタンパク質の転写翻訳を制御することで細胞内の骨格系や増殖に寄与している(33)。mTOR の複合体(mTORC)には、2種類存在することが知られており、それぞれ特異な機能を持ち合わせている。mTORC1 は、mTOR、Raptor、mLST8 および Deptor から構成される複合体であり、Rapamycin によって部分的に阻害される。また、mTORC1 は、増殖因子、栄養素、などから受ける多くの環境要因を統合し、細胞の代謝状態を決定する分子であるため、アミノ酸などの栄養が十分である時には細胞増殖を促進し、ストレス条件下や飢餓状態では不足したアミノ酸を補うためにタンパク質分解を亢進させる(34)。増殖因子やインスリンは PI3 キナー

ぜによる Akt のセリン残基リン酸化を通じて mTORC1 にシグナルを伝える。また、アミノ酸による活性化では、Rag タンパク質関連シグナルを経て mTORC1 が活性化される(35, 36)。活性化された mTORC1 によって、下流にある 4EBP1 および p70 S6 キナーゼのリン酸化を介した mRNA の翻訳、オートファジーの抑制、リボソームの生合成、ライソソームやミトコンドリアの代謝など、数多くの代謝に関連した応答を誘導される。

mTORC2 は、mTOR、Rictor、mLST8、Sin1、及び Deptor から構成され、Akt の Thr をリン酸化し、活性化することによって細胞の生存を促進する。また、PKC α の活性化によって細胞骨格の動きを調節し、SGK1 のリン酸化を通じてイオンの透過性や増殖を調節することが報告されている(37, 38)。しかし、mTORC2 シグナルにおいては、mTORC1 におけるアミノ酸のような上流のシグナルはほとんど分かっていない。

mTOR は免疫シグナルに関連するという報告もされており、アミノ酸輸送体 SLC15A4 は B 細胞において mTORC1 を介した TLR7 の IFN 産生に関わることが知られている(39)。しかし、mTORC1 による他の TLR 応答への影響や mTORC2 の免疫系への関与については分かっておらず、代謝と免疫の関連性を究めるためにも詳細な解析が求められている。

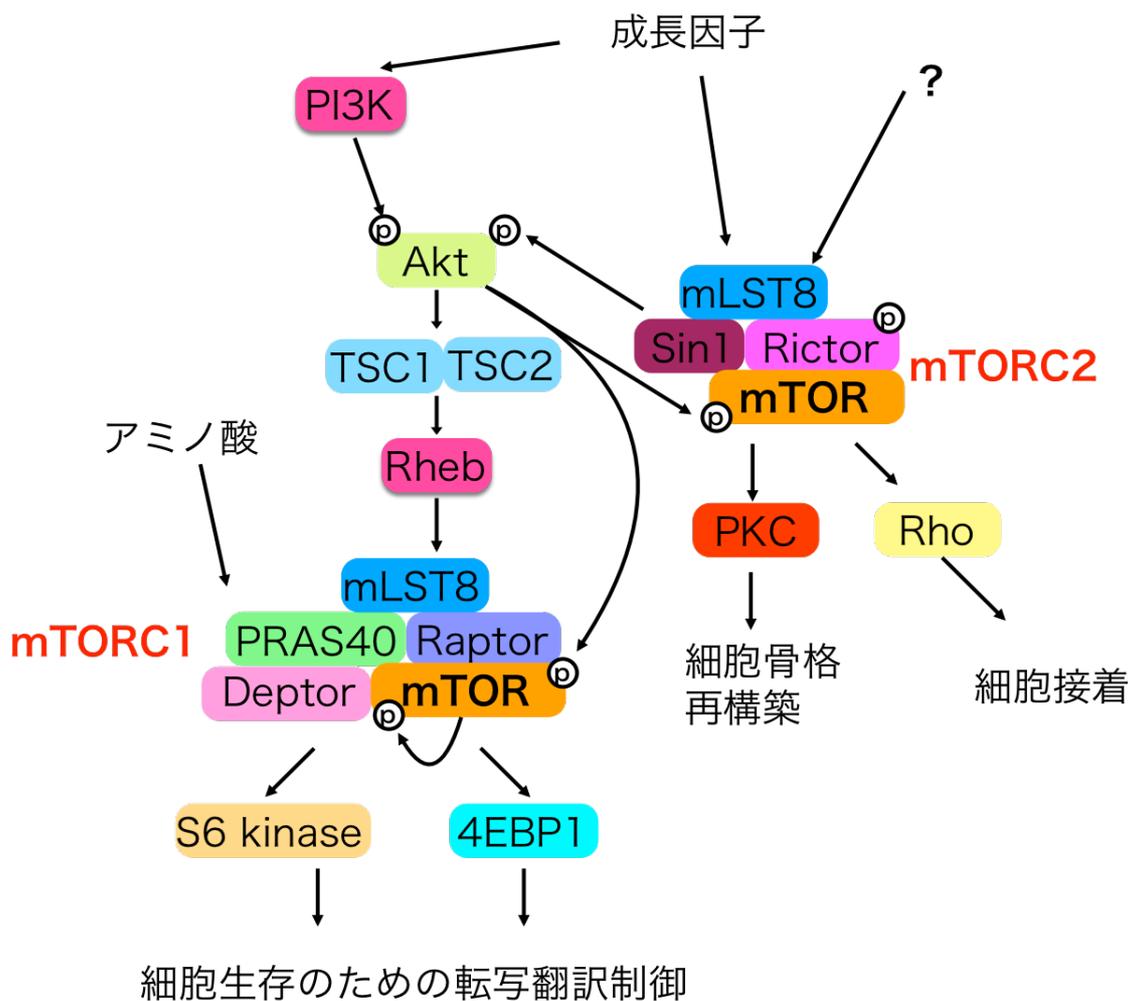


Fig. 5 代謝センサーmTOR シグナル伝達経路

代謝センサーである mTOR は複合体を形成することで機能している。mTORC1 は成長因子やアミノ酸から刺激を受け、主に転写翻訳を制御することで細胞の生存、分裂、増殖を促している。mTORC2 は細胞骨格や細胞間接着に関与している。成長因子から刺激を受けることは報告されているが、他のリガンドについてはわかっていない。

(6) ヘルペスウイルスと TLRs

ヘルペスウイルスは DNA ウイルスの一種であり、2 本鎖 DNA を持つことで知られている。単純ヘルペスウイルス(Herpes Simplex Virus : HSV)はヒトに感染するヒトヘルペスウイルスの一種であり、HSV-1 と HSV-2 に分類される。HSV-1 は口唇ヘルペス、ヘルペス口内炎、角膜炎、単純ヘルペス脳炎(HSE)の原因となる。HSV-2 は主に性器ヘルペス、髄膜炎、脊髄炎の原因となる。前者は三叉神経節に後者は脊髄神経節に潜伏することが知られている(40, 41)。ヘルペスウイルスは感染力の強いウイルスであり、潜伏期間も長いため、ウイルス感染機構やウイルスに対する宿主側の免疫機構の解明が急務である。

ヘルペスウイルスと自然免疫については多数報告されており、TLR2 はウイルスエンベロープタンパク質を認識することでサイトカイン産生を行い、TLR9 は pDC (plasmacytoid DC)においてウイルス DNA を認識して I 型 IFN を産生する(Fig. 6)(42-44)。また、TLR3 はウイルス由来の RNA を認識し、サイトカインや I 型 IFN を産生する(45)。特に、神経細胞や線維芽細胞においては他の TLR の発現量が低いことから TLR3 が感染に対する免疫応答に重要な役割を果たしていると考えられる。ヘルペス脳炎を患った人の疫学調査を行い、遺伝子変異を調査した結果、TLR3 のみならず TLR3 の応答に必要な分子である Unc93B1 や TRAF3

に変異が認められている(31, 45, 46)。これらの患者の線維芽細胞ではヘルペスウイルス感染によって誘導される I 型 IFN 産生の低下が見られたことから、HSV に対する TLR3 応答が欠損すると、I 型 IFN 産生が低下し、ヘルペス脳炎に対する感受性が高くなる可能性が示された。このことから、宿主における TLR3 応答は HSV 感染防御において非常に重要な役割を果たしているがと考えられるが、その分子基盤については、不明な点が多い。血液細胞ではなく、非血液細胞における TLR3 応答制御を解明することでヘルペス脳炎発症の原因を究明できる可能性が高い。

また、ヘルペスウイルス感染に前項で紹介した mTOR の関与が認められている。ウイルスタンパク質 Us3 はリン酸化酵素として働き、宿主細胞の様々な遺伝子を修飾することで宿主細胞におけるウイルスタンパク質の発現をコントロールしているが、基質の一つに mTOR が知られている(46)。しかし、宿主細胞におけるヘルペスウイルスに対する mTOR の機能や TLR 応答への寄与に関しては全く分かっておらず、早急な解析が求められている。

本研究では、HSV-1 に対する宿主細胞における TLR3 の免疫制御機構を詳細に解析した。

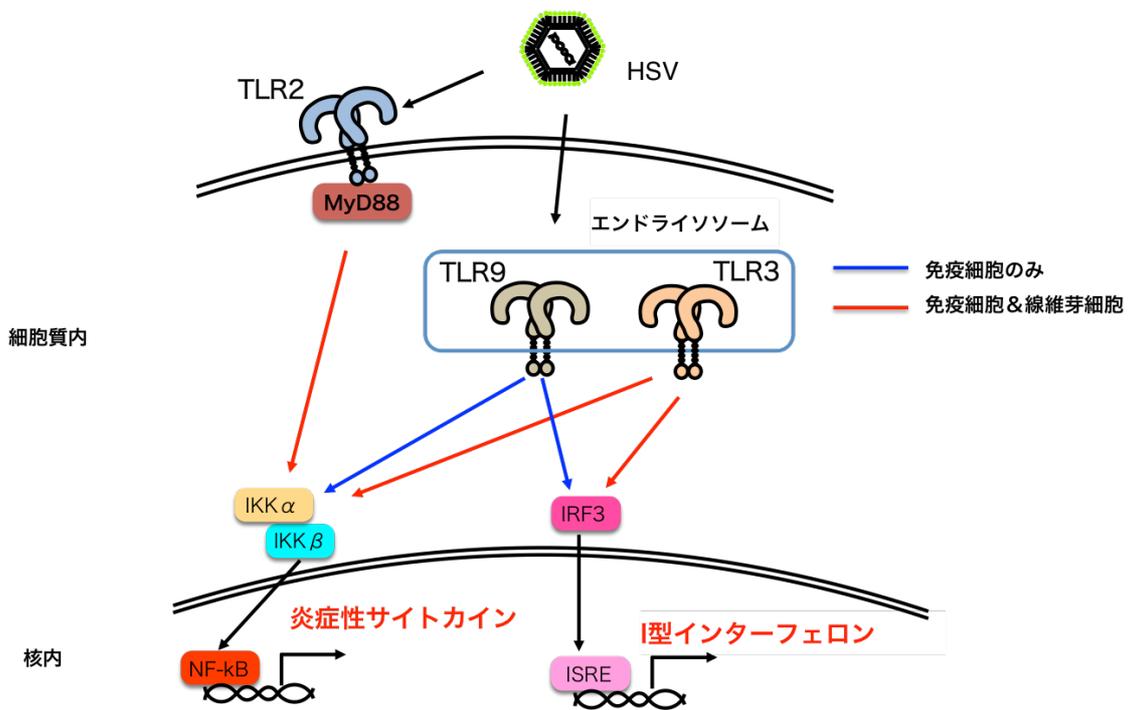


Fig. 6 ヘルペスウイルスと TLR

ヘルペスウイルスが宿主細胞に感染すると、各 TLR が認識して炎症性サイトカインや I 型 IFN を産生する。細胞表面では TLR2 が、細胞内では TLR3 や 9 が認識する。免疫細胞では全 TLR が発現しているが、線維芽細胞や神経細胞では TLR3 と 4 しか発現していないため、HSV 感染の際、TLR3 が免疫応答を誘導する。

方法

・試薬と抗体

polyI:C 及び polyI:C-Rhodamine は、Invivogen から購入した。RNA9.2s は FASMAC に合成を依頼した。LipidA は Sigma Aldrich から購入し、0.2% trimethylamine に調製した滅菌水で溶かした。

RPMI 培養液、DMEM 培養液、OPTI-MEM は Gibco から購入した。ELISA キット RANTES/CCL-5 は R&D Systems から、IFN-beta は PBL Assay Science から購入した。

タンパク質 IFN-alpha、beta は pbl から購入した。

抗 TLR3 モノクローナル抗体 (PaT3) は当研究室の村上によって作製された(28)。

TLR3 の N 末端側断片 (TLR3N) を抗原とするポリクローナル抗体は、Millipore から購入した。抗 Arl8 抗体(47)は紺谷圏二博士 (東京大学) から供与された。

proA 抗体-HRP は GE healthcare、抗マウス抗体-HRP は Santa Cruz Biotechnology から購入した。抗 Lamp1 抗体は abcam から購入した。他の抗体については全て Cell Signaling Technology (CST) から購入した。Alexa Fluor 568 Phalloidin は Life Technologies から購入した。

Real time PCR で用いたプローブは全て Applied Biosystems から購入した。

HSV-1 gB-RFP 変異体ウイルスは川口研究室 (東京大学)にてサル腎臓上皮細胞株である Vero 細胞を用いて培養、multiplicity of infection (MOI)を測定した。

- ・細胞株

マウス繊維芽細胞株である NIH3T3 細胞およびマウス胚線維芽細胞である MEF は、DMEM 培養液に 10% FBS、ペニシリン/ストレプトマイシン/1-グルタミン混合液、50 μ M 2-ME を加えた培養液で培養した。培養は Incubator 内にて 37°C、5%CO₂ の条件下で行った。

NIH3T3 細胞株や MEF 細胞は Cellmatrix Type I-P (新田ゼラチン株式会社)でコーゲンコートしたプレートを用いて培養を行った。

Rab7a ノックアウト MEF は和田洋博士 (大阪大学)から供与いただいた *Rab7a* floxed/floxed の MEF(48)に Cre タンパク質を発現させることで作製した。

- ・遺伝子のクローニング

マウス TLR3 および Unc93B1 は PCR によって増幅され pMX、pMXpuro ベクターに導入された。また、各遺伝子に対する gRNA は CRISPR-direct により検索し、Addgene で購入した pkLV-U6gRNA(BbsI)-PGKpuro2ABFP ベクターに導入し

た。遺伝子のベクターへの導入には、Gibson Assembly Mix を使用した。

- ・レトロウイルスによる遺伝子導入

HEK293 パッケージング細胞株である Plat-E 細胞に、FuGene6 で TLR3 および Unc93B1 遺伝子を導入した。遺伝子は、pMX 系ベクターに導入したものを使用した。遺伝子導入後 24 時間で培養上清を交換し、新たな培養液を加えて、さらに 24 時間培養した。回収した上清をウイルス懸濁液とした。このウイルス懸濁液と DOTAP を混ぜ合わせて、遺伝子導入先の細胞に加えた。

- ・レンチウイルスによる遺伝子導入

HEK293FT 細胞株に、ViraPower Lentiviral Packaging Mix で TLR3-gRNA を導入した。導入には PEI を使用した。gRNA は、pKLV ベクターに導入したものを使用した。遺伝子導入後 24 時間で培養上清を交換し、新たな培養液を加えて、さらに 24 時間培養した。回収した上清をウイルス懸濁液とし、遺伝子導入先の細胞に加えた。

- realtime PCR

細胞回収後、RNeasy (Qiagen)を用いて RNA を抽出し、ReverTra Ace (TOYOBO) によって逆転写反応を行い、cDNA を合成した。FastStart Universal Probe Master (ROX) (Roche)を用いて 7300 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)により行った。Taqman プローブは Unc93B1(Mm00457643)、HPRT1(Mm01545399)を用いた。得られた結果は、HPRT1 発現量との比で正規化した。

- 細胞の染色とフローサイトメトリー

NIH3T3 細胞株を、FACSCalibur で解析した。細胞表面染色の場合は staining buffer で懸濁、細胞内染色の場合、saponine buffer (0.1% Saponine、2.5% FBS、0.1% NaN₃、1xPBS)で懸濁し、室温で 5 分静置した。細胞染色は、staining buffer で希釈されたビオチン化抗体で、4°C、15 分静置した。二次染色として、staining buffer で希釈された PE-streptavidin (BD Bioscience) で、4°C、15 分静置した。そして、staining buffer で洗浄後、FACSCalibur または FACSAria (BD Biosciences) で解析された。

- ・各阻害剤、脂肪酸、BSA-FFA 処置

mTORC1 阻害剤 Rapamycin は Sigma Aldrich、mTORC1&2 阻害剤 Torin1 は Calbiochem、FASN 阻害剤 C75 は Sigma Aldrich から購入した。これらの阻害剤を 2 時間前処置後、poly(I:C)刺激を行い、24 時間後に応答を検証した。

BSA や BSA-FFA(Fatty acid free)は Sigma Aldrich から購入し、最終濃度 2%で RPMI 培養液に添加した。これらは前日から処置することで、細胞を飢餓状態とした。各脂肪酸は Nacalai Tesque から購入し、それぞれ最終濃度 100 μ M とし、PEI を用いて BSA-FFA 培養液中の細胞に導入した。脂肪酸導入後に poly(I:C)刺激を行う際は、一度、PBS で洗浄し、PEI 非存在下で刺激を行った。

- ・シグナル解析

NIH3T3 細胞(1×10^6)を poly(I:C)及び HSV-1 で経時的にリガンドで刺激を行った。poly(I:C)刺激の場合は、前日に無血清培養液で飢餓状態にした細胞を用いた。回収した細胞を、1xPBS で洗浄し、SDS PAGE サンプルバッファー(50mM Tris-HCl (pH7.4)、1% SDS、10% glycerol、1% SDS、10% 2-ME、BPB)で溶解し電気泳動後、サンプルは PVDF 膜に転写され、Western blotting を行った。

・免疫沈降

NIH3T3 細胞を poly(I:C) で 24 時間刺激を行った。回収した細胞を、1xPBS で洗淨し、lysis buffer (1 μ M CaCl₂、1 μ M MgCl₂、10% Glycerol、150mM NaCl、20mM Tris-HCl (pH 7.4)、0.5% CHAPS、1xComplete EDTA (–) Cocktail (Roche)) で溶解した。氷中で 30 分間おいた後、溶解物を遠心分離して、上清を抽出した。同時に、DynaBeads ProteinG (Life Technologies) 15 μ l、抗 TLR3 モノクローナル抗体 (PaT3) 3 μ g を 1 \times PBS 500 μ l に加えた TLR3 抗体ビーズおよび抗 RP105 モノクローナル抗体 (MHR73) 3 μ g を 1 \times PBS 500 μ l に加えた抗 RP-105 抗体ビーズを 4 $^{\circ}$ C で 1 時間転倒混和を行い、1 \times PBS で洗淨した。細胞溶解物を、抗 TLR3 抗体ビーズおよび抗 RP-105 抗体ビーズに加えて、4 $^{\circ}$ C で 2 時間、転倒混和を行った。その後、ビーズを、3 回、wash buffer (20mM Tris-HCl (pH 7.4)、150mM NaCl、1mM CaCl₂、1mM MgCl₂、10% Glycerol) で洗淨した。Sample buffer で溶解後、SDS-PAGE を行った。電気泳動後、サンプルは PVDF 膜に転写され、Western blotting を行った。

・ ELISA

NIH3T3 を 96-well plate に培養し、TLR3 リガンドで刺激した。刺激から 24 時間後、培養上清を回収し、DuoSet ELISA Development Systems CCL5 / RANTES (R&D systems) で、濃度を測定した。また、MEF を 24-well plate に培養し、HSV-1 を感染させた。感染から 24 時間後、培養上清を回収し、IFN-beta ELISA kit (pbl) で濃度を測定した。HSV 感染細胞培養上清を用いた実験においては川口研究室にて行った。

・ 共焦点レーザー顕微鏡

Micro Cover Glass (MATSUNAMI) を 99% エタノールで消毒後、コラーゲンコートした。その上に NIH3T3 細胞を播種し、無刺激サンプル、poly(I:C) 刺激サンプルともに一晩培養した。無血清培養液や脂肪酸欠損培養液(BSA-FFA) で培養する場合は、その培養液で一晩培養後、poly(I:C) 刺激を行い、さらに一晩培養した。

刺激後、カバーガラスごと 1×PBS で洗浄し、4% PFA/PBS を用いて室温で 10 分間固定した。次に、最終濃度 0.2% Saponine の PBS で室温 30 分間透過処理を行い、Blocking buffer (50% Blocking One (Nacalai Tesque)、2.5% BSA、0.01% NaN₃、0.5×PBS) で室温 30 分間ブロッキングを行った。

PBS で洗浄後、 $2\mu\text{g/ml}$ の各抗体を Blocking buffer で希釈した 1 次抗体反応液をパラフィルム上に置き、細胞が播種された面のカバーガラスをかぶせ、Incubator 内で 37°C 90 分間細胞内染色を行った。1 次抗体は抗 TLR3 抗体、抗 Lamp1 抗体、抗 Rab7a 抗体、抗 Arl8 抗体、抗 alpha-tubulin 抗体、抗 phospho-mTOR 抗体、抗 phospho-Rictor 抗体、Alexa Fluor 568 Phalloidin を使用した。PBS で洗浄後、二次抗体を 2000 倍および DAPI を 3000 倍に Blocking buffer で希釈した 2 次抗体反応液をパラフィルム上に置き、細胞が播種された面のカバーガラスをかぶせ、Incubator 内で 37°C 90 分間反応させた。2 次抗体は Goat anti-mouse Alexa 488 (Sigma Aldrich) および Goat anti-rabbit Alexa 568 (Sigma Aldrich) を用いた。PBS で洗浄後、PermaFluor™ Aqueous Mounting Medium (Thermo Fisher Scientific) にてマウントし、一晩乾燥後、共焦点レーザー顕微鏡 LSM710 (Carl Zeiss) で観察し、Software ZEN lite (Carl Zeiss) で解析した。

- ・ ウイルス力価 (MOI) 測定

ウイルス液を 1% FCS 含有 199 培養液 (Thermo Fisher Scientific) を用いて 10^2 から 10^8 倍に段階希釈し、そのうち 10^3 から 10^8 倍のウイルス希釈液を Vero 細胞に感染させた。1 時間吸着後、 $160\mu\text{g/ml}$ ヒト γ -グロブリン (Sigma Aldrich) を含む

新しい 199 培養液に変え、37°Cで培養した。細胞をメタノール固定し、クリスタルバイオレット(Nacalai Tesque)で染色後、実体顕微鏡 Stemi DV4 (Carl Zeiss)により well ごとのプラーク数をカウントし、ウイルスの力価を算出した。これらは、全て川口研究室にて行った。

・ HSV 感染実験

NIH3T3 細胞株および MEF をコラーゲンコートしたプレートに播種し、一晚培養した。翌日、阻害剤処理サンプルには阻害剤処理を 2 時間行い、HSV-gB-RFP 変異体を感染させた。この時、HSV の MOI が 10 になるようにした。共焦点顕微鏡で検証するサンプルにおいては 6 時間後、シグナル解析に用いるサンプルにおいては計時的に、ELISA サンプルにおいては 24 時間後サンプル回収を行った。これらの作業は全て川口研究室にて行った。

・ 統計処理

すべての ELISA および Realtime PCR のデータにおいて有意差検定をおこなっている。有意差検定は Student t 検定を用いて行い、危険率が 0.05 未満のとき、差が有意であるとした(* < 0.05)。エラーバーは標準偏差の値としている。

結果

(1) 細胞株 NIH3T3 における TLR3 の応答

序章で述べたように HSV-1 感染によってヘルペス脳炎(HSE)が起きる。TLR3 は、HSV-1 に対する中枢神経系における感染防御に必須であることが知られているが、HSV-1 に対する TLR3 応答の分子基盤については、不明な点が多い。TLR3 および Unc93B1 の遺伝子に変異を持つヒトにおいて、HSV-1 に対する応答の低下は、免疫細胞では認められず、線維芽細胞において報告されていることから(49)、線維芽細胞株 NIH3T3 における TLR3 応答について検討した。

まず、NIH3T3 野生型にリガンドである poly(I:C)を刺激したが、サイトカイン産生が見られなかった。そこで、TLR3 の発現を抗 TLR3 抗体 (PaT3)で細胞内染色し FACS で検出したところ、TLR3 の発現が見られた(Fig. 7a)。しかし、TLR3 応答及び細胞局在に関連する分子である Unc93B1 の発現量を realtime PCR で確認したところ、ほとんど発現していないことがわかった(Fig. 7b)。そこで Unc93B1-FLAG 強制発現細胞株を作製し、Poly(I:C)に対する応答を見たところ、RANTES 産生が認められた(Fig. 7c)。Unc93B1 の発現に関しては、FLAG 抗体で細胞内染色し、FACS によって検出した。poly(I:C)には RIG-I や MDA5 などの他のセンサーも応答することから、この応答性が TLR3 依存적かどうかを検証する

ために、TLR3 ノックアウト細胞を CRISPR-Cas9 システムによって作製した。

TLR3 に対する gRNA を作製し、hCas9 及び Unc93B1 強制発現株にレンチウイルス

スで感染させた。gRNA のベクターには、BFP が挿入してあるため、BFP ソー

トを行った細胞群を軟寒天培地にてクローン化した。細胞内染色による TLR3

発現の減少が認められたため、poly(I:C)刺激を行ったところ、RANTES 産生が完

全に欠失した。さらに、Unc93B1 強制発現細胞に TLR3 を強制発現させた細胞

株では、RANTES 産生量が上がったことから、Unc93B1 強制発現 NIH3T3 細胞

の poly(I:C)刺激における RANTES 産生は TLR3 依存的であることが示された(Fig.

7c)。

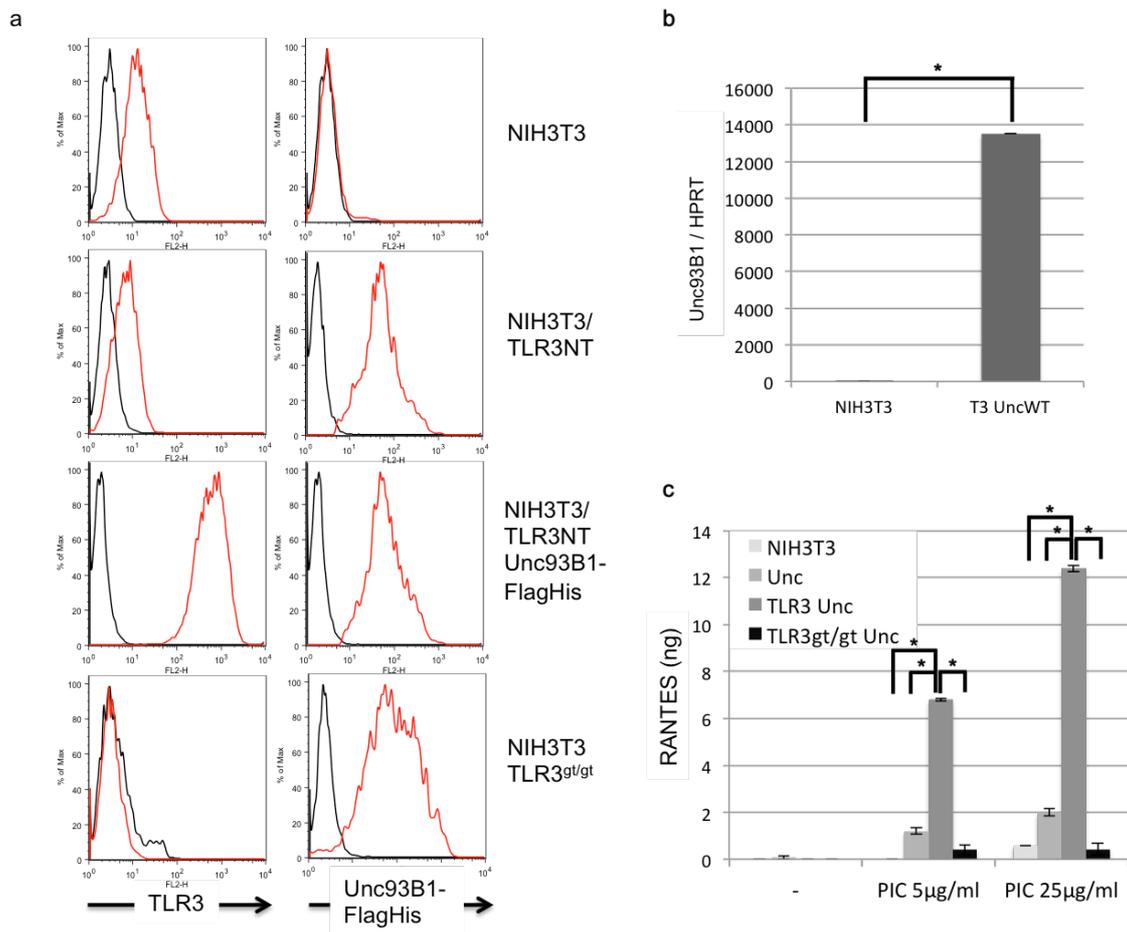


Fig. 7 NIH3T3 細胞株における TLR3 応答

(a)TLR3 および Unc93B1 の発現量を FACS によって検出した。黒いヒストグラムは二次抗体のみで染色したサンプルを表し、赤いヒストグラムは TLR3 抗体 (PaT3) または FLAG 抗体で染色したサンプルを表す。(b)野生型および Unc93B1 強制発現株の Unc93B1 mRNA 相対量を realtime PCR を用いて解析した。HPRT 遺伝子を用いて標準化した。(c)各サンプルにおけるリガンド刺激後の RANTES 産生量を ELISA により解析した。横軸はリガンド刺激濃度、縦軸に RANTES 産生量(ng)を表す。* は $p < 0.05$ を示す。

(2) リガンド応答における TLR3 局在変化

TLR3 の局在については、これまで小胞体から Unc93B1 によって運ばれ、エンドソームやライソソームにて応答すると報告されてきた。しかし、親和性の強い TLR3 抗体が存在しなかったことから、HA や FLAG などの tag を付加した TLR3 を用いた実験が多い。我々のこれまでの結果から、これらのタグが TLR の局在に大きく影響する可能性があることが分かっており、タグのついていない TLR3 の局在を検討する必要がある。また、リガンド応答前後の局在変化については報告がない。そこで、TLR3 及び Unc93B1 強制発現細胞株における TLR3 の局在について検討した。抗 TLR3 抗体及びライソソームに局在する Lamp1 に対する抗体を用いて染色した後、共焦点顕微鏡による観察を行った。すると、TLR3 と Lamp1 との共局在が認められた(Fig. 8a)。このことから、TLR3 はライソソームに局在することがわかった。

次に、poly(I:C)刺激による TLR3 の局在変化について検討した。Poly(I:C)で刺激し 16 時間後に TLR3 及び Lamp1 の局在を観察すると、興味深いことに TLR3 は無刺激では核の周辺に検出され、刺激を受けると細胞膜方向に展開していた。さらに、Lamp1 も共局在していたことから TLR3 が局在しているライソソーム自体がリガンド刺激依存的に核周辺から細胞膜方向に移動することがわかった。

TLR4/MD-2 リガンドである LipidA 及び TLR7 リガンドである RNA9.2s で刺激を行っても TLR3 細胞内移行は起こらないことから、TLR3 刺激依存的な現象だと示唆された。

また、リガンドである poly(I:C)と TLR3 の局在を観察した。蛍光タンパク質である Rhodamine を付加した Poly(I:C)を用いて検証を行った。刺激を受けた移動した TLR3 と poly(I:C)は共局在を示ることが示された(Fig. 8b)。

ライソソームが移動するには、Arl8 や Rab7 のような G タンパク質が必要であると報告されている(50, 51)。そこで、どちらの G タンパク質が TLR3 移動に関わるのか検討するために、抗 Rab7 及び抗 Arl8 抗体で染色を行ったところ、TLR3 は Arl8 と比べて Rab7 と高い共局在を示した(Fig. 9)。さらに刺激後は、Rab7 も細胞膜方向に移動していることから、Lamp1 及び Rab7 発現ライソソームに TLR3 が発現していることが証明された。

また、TLR3 と G タンパク質が複合体を形成するかどうか TLR3 を免疫沈降して検証すると、TLR3 はエンドソームに局在する Rab5 や Arl8 とは会合しないが、Rab7 と TLR3 との会合が確認された(Fig. 10)。この結果から、TLR3 は Rab7 発現ライソソームに局在し、会合することが示された。

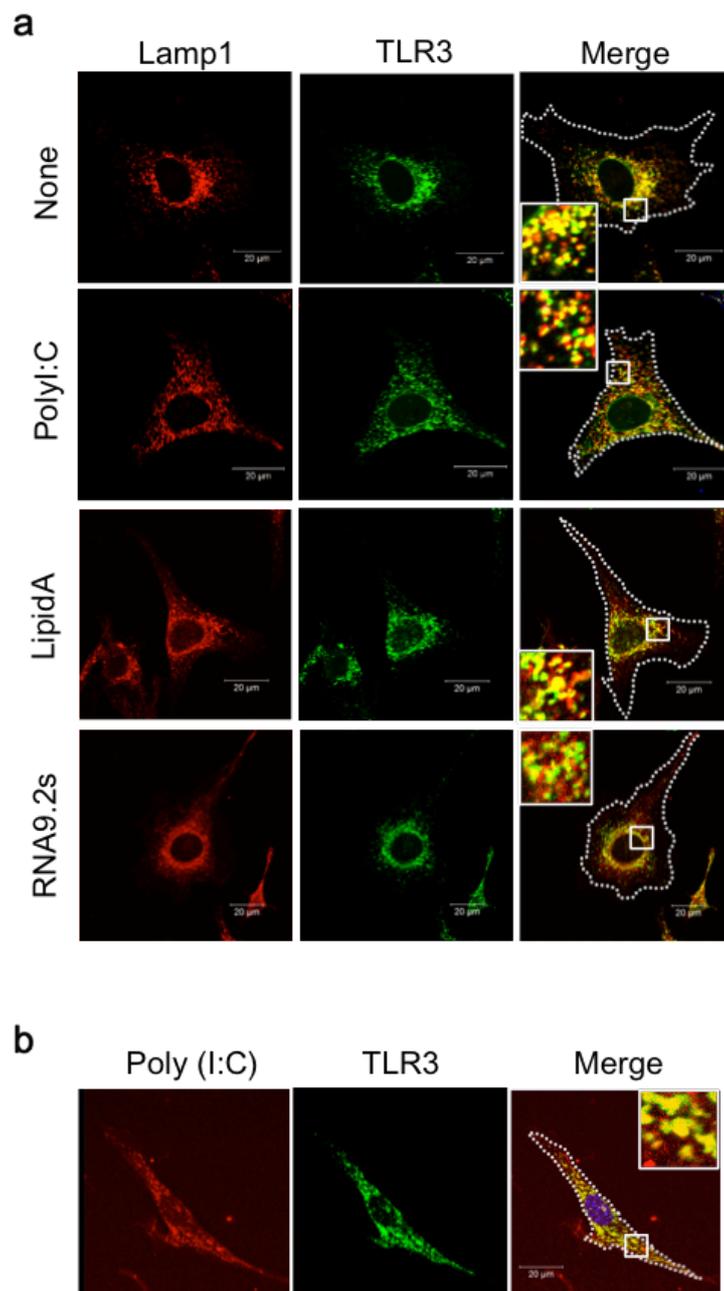


Fig. 8 TLR3 はライソソームに局在する

(a)TLR3 および Unc93B1 強制発現 NIH3T3 株の無刺激時、poly(I:C) 25 μ g/ml、Lipid A 1 μ g/ml、RNA9.2s 25 μ g/ml 刺激後 16 時間における TLR3 および Lamp1 の局在を共焦点レーザー顕微鏡により解析した。赤は Lamp1 で緑は TLR3 を示す。白点線は細胞膜を示す。(b) TLR3 および Unc93B1 強制発現 NIH3T3 株を poly(I:C)-Rhodamine 25 μ g/ml 刺激後 16 時間における TLR3 および poly (I:C)の局在を共焦点レーザー顕微鏡により解析した。赤は poly(I:C)で緑は TLR3 を示す。白点線は細胞膜を示す。白実線は強拡大図を表す。

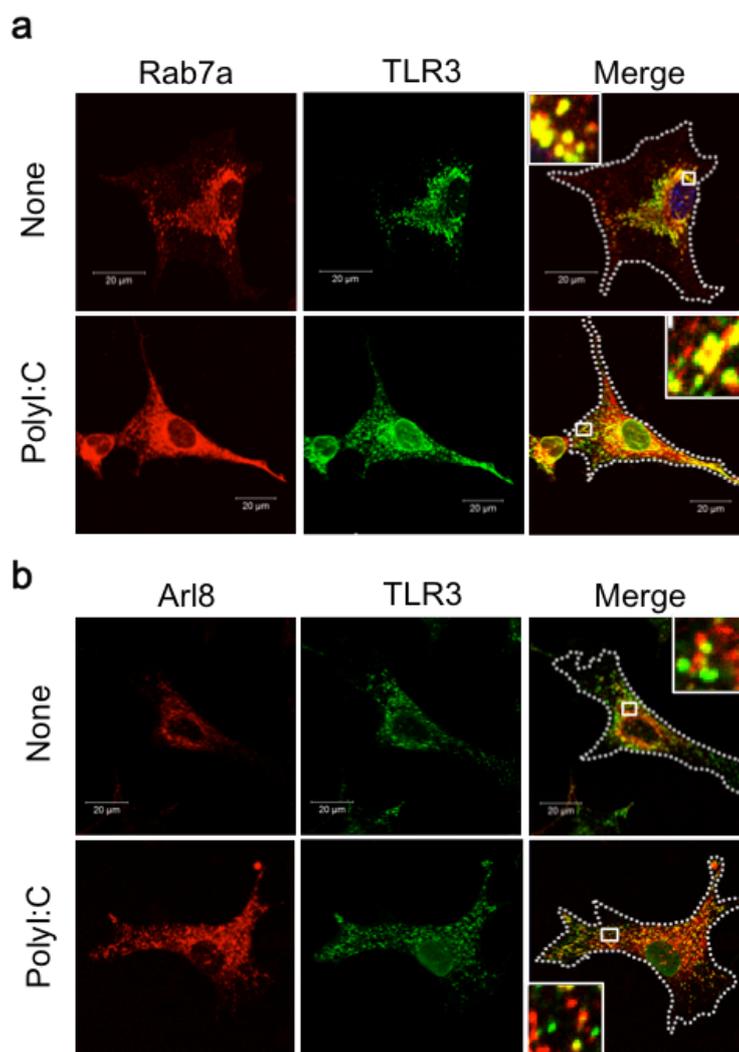


Fig. 9 TLR3 は Rab7a と共局在する

TLR3 および Unc93B1 強制発現 NIH3T3 株の無刺激時、poly(I:C) 25 μ g/ml 刺激後 16 時間における TLR3、Rab7a 及び Arl8 の局在を共焦点レーザー顕微鏡により解析した。(a)赤は Rab7a で緑は TLR3 を示す。(b)赤は Arl8 で緑は TLR3 を示す。白点線は細胞膜を示す。白実線は強拡大図を表す。

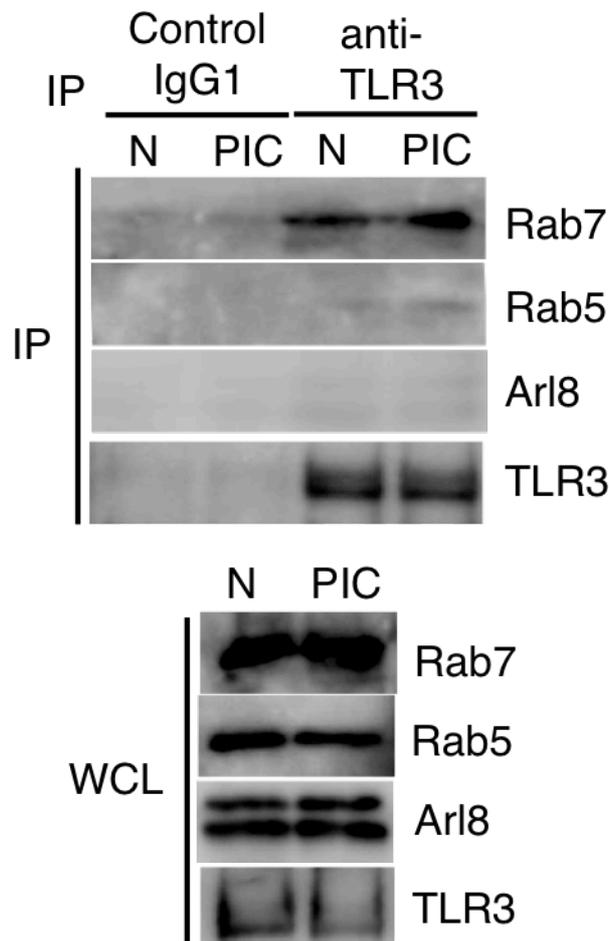


Fig. 10 TLR3 は Rab7a と会合する

TLR3 および Unc93B1 強制発現 NIH3T3 株の無刺激時、poly(I:C) 25 μ g/ml 刺激 6 時間後の細胞を用いて、抗 TLR3 抗体および、ネガティブコントロールとして抗 RP-105 抗体による免疫沈降を行い、ウェスタンブロッティングを行った。IP は免疫沈降後のサンプルを、WCL は全細胞溶解液のサンプルを示す。

(3) 二本鎖 RNA 刺激による細胞骨格の変化

Rab7a はライソソームに局在し、微小管との結合を調節することで、ライソソームの移動を制御している(52)。TLR3 が細胞内を移動し、さらに TLR3 は Rab7a 発現ライソソームに局在するという結果から、微小管による細胞内小器官の移動に関わる可能性が示唆された。そこで、微小管を構成する分子アルファチューブリンに対する抗体で染色した。すると、リガンド刺激後には微小管の量が増えており、さらに、TLR3 は微小管上にも在していることが観察された(Fig. 11a)。Rab7a が FYCO-1 及び kinesin という分子と複合体を作り、順行性に微小管上を移動することが報告されていることから、TLR3 局在ライソソームは Rab7 によって、微小管に沿って核から細胞膜の方向に輸送されている可能性が考えられる(53)。また、ファロイジンは、タマゴテングタケから単離された 7 アミノ酸ペプチドで重合アクチン (F-actin) に対し、特異的な高い結合能を示す(54)。そこで、微小管以外の細胞骨格の変化を見るためにファロイジンを用いて F-アクチンを染色した。すると、poly(I:C)刺激後にアクチンの重合が進み、ストレスファイバー状になっていることが観察されたことから、TLR3 刺激依存的に細胞骨格が再構築されることが認められた(Fig. 11b)。TLR3 とアクチンとの共局在は認められなかった。

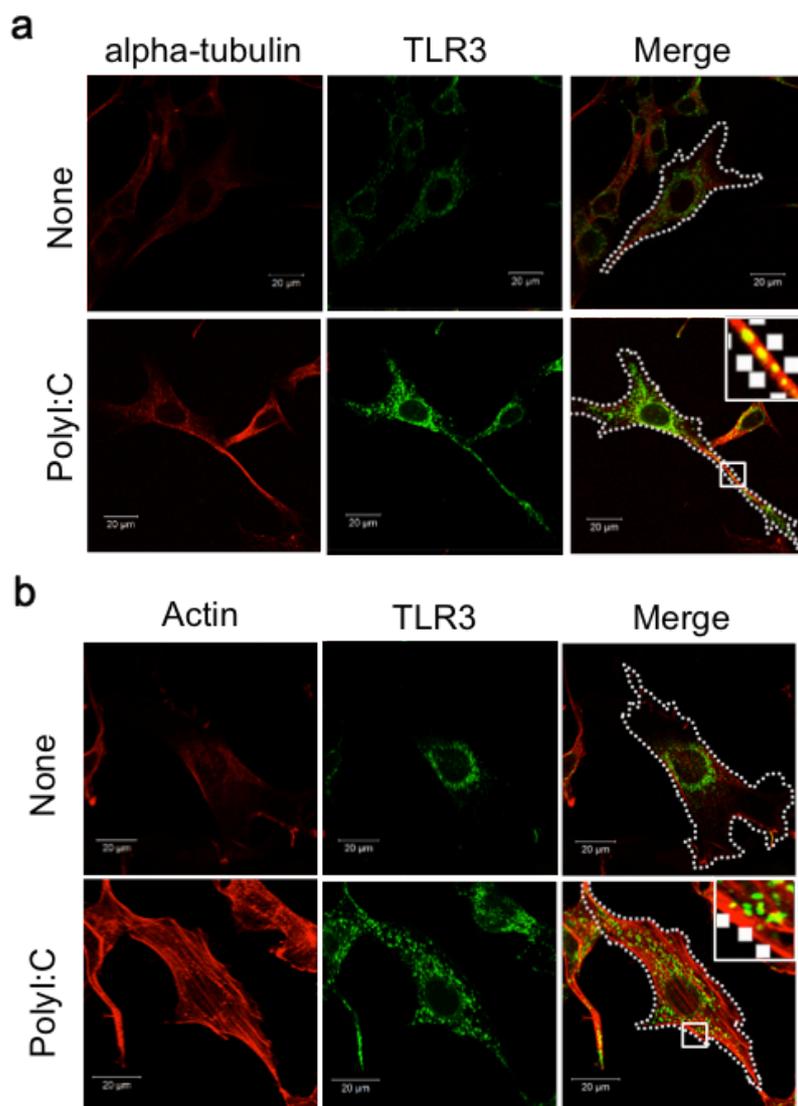


Fig. 11 TLR3 刺激依存的な細胞骨格再構築

TLR3 および Unc93B1 強制発現 NIH3T3 株の無刺激時、poly(I:C) 25μg/ml 刺激後 16 時間における TLR3、alpha-tubulin 及び F-actin を共焦点レーザー顕微鏡により解析した。(a)赤は alpha-tubulin で緑は TLR3 を示す。(b)赤は actin で緑は TLR3 を示す。白点線は細胞膜を示す。Actin は phalloidin で染色した。白実線は強拡大図を表す。

(4) TLR3 応答及び細胞内輸送における mTORC2 の重要性

mTOR は代謝センサーとして知られており、mTORC1 と mTORC2 の二つの複合体のタイプがある。mTORC1 は TLR7 や TLR9 の I 型 IFN 産生に関与することが知られている(39, 55)。しかし、TLR3 についての報告はない。mTORC1 は細胞生存のための翻訳制御をおこなっており、mTORC2 は細胞骨格再構築や細胞接着に関与することが知られている(33)。TLR3 刺激依存的に細胞骨格の再構築が認められたことから、細胞骨格を変化させる代謝センサーとして mTOR の関連性が示唆された。そこで、mTORC1 の阻害剤である Rapamycin や mTORC1 及び C2 双方の阻害剤である Torin1 を前処置した細胞にリガンド刺激を行い、RANTES 産生量を確認した。すると、Rapamycin 前処置では無処置と比べ変化がないが、Torin1 前処置において産生量が減少していた(Fig. 12a)。したがって、mTORC2 が TLR3 応答に関与する可能性が示された。mTORC2 が RANTES 転写量と翻訳量のどちらを制御しているかを検証するため、realtime PCR で poly(I:C) 刺激後の RANTES の mRNA 量を調べたところ、Torin1 を加えた細胞ではリガンド刺激依存的な RANTES の mRNA 量増加が有意に低下していた(Fig. 12b)。このことから、mTORC2 が TLR3 応答による RANTES 産生を転写レベルで制御している可能性が示された。

次に、mTORC2 活性の細胞内移行への影響について検討するために、阻害剤前処置後にリガンド刺激を行い、TLR3 の局在変化を見たところ、Torin1 を加えた細胞のみ TLR3 の局在変化が見られなくなっていたため、TLR3 応答及び局在変化について mTORC2 活性が必要である可能性が示された(Fig. 12c)。

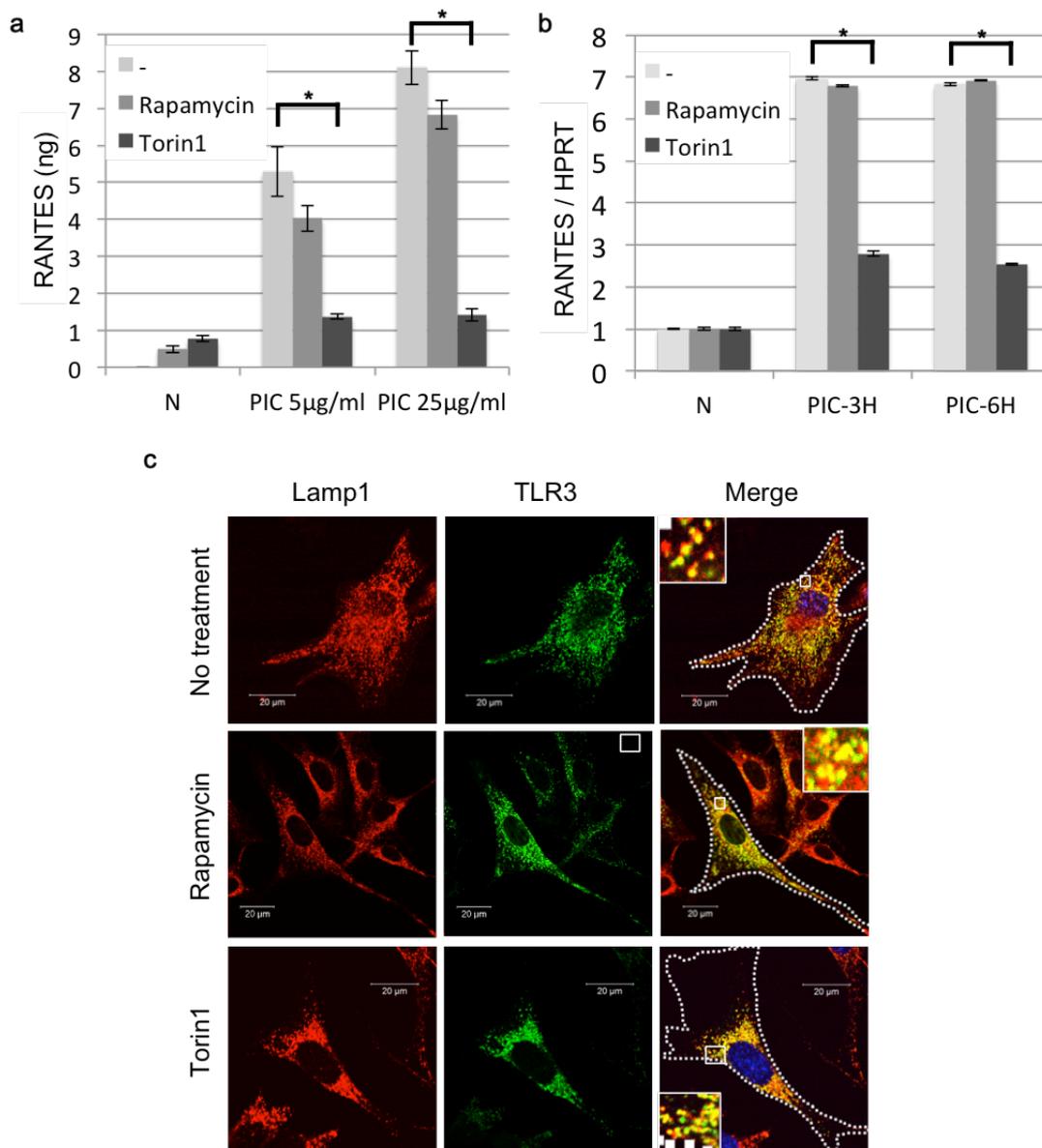


Fig. 12 TLR3 応答および細胞内移行における mTORC2 活性

(a) TLR3 および Unc93B1 強制発現 NIH3T3 株の無処理、Rapamycin、Torin1 処理 2 時間後、poly(I:C) 刺激時における RANTES 産生量を ELISA によって検出した。横軸はリガンド濃度、縦軸は RANTES 産生量 (ng) とした。(b) 同様に RANTES 産生量を real-time PCR で検出した。HPRT 遺伝子を用いて標準化した。* は $p < 0.05$ を示す。(c) TLR3 および Unc93B1 強制発現 NIH3T3 株の無処理、Rapamycin、Torin1 処理 2 時間後、poly(I:C) 25 μ g/ml 刺激後 16 時間における TLR3 及び Lamp1 を共焦点レーザー顕微鏡により解析した。赤は Lamp1 で緑は TLR3 を示す。白点線は細胞膜を示す。Rapamycin は 200nM、Torin1 は 250nM を最終濃度とした。白実線は強拡大図を表す。

(5) TLR3 下流シグナル伝達経路

TLR3 応答におけるシグナル伝達経路を見るために、poly(I:C)刺激後 15min、30min、60min、2 hours、3hours の時間経過に伴う MAPK シグナルや NF- κ B シグナルについて検討した (Fig. 13)。血清の影響を無くすために無血清培養液にて検討を行った。MAPK シグナル伝達分子である Erk1/2 や p38、NF- κ B シグナルである p65 は活性化に伴い、リン酸化されるため、各分子のリン酸化を調べた。p65 の Ser-536 リン酸化は 15min をピークに、Erk の T202/Y204 リン酸化は 30min をピークに、p38 の T180/T182 リン酸化は 30 min をピークに誘導されていた。Torin1 で処理した細胞においては、刺激依存的な Erk のリン酸化は変わらないが、p38 や p65 のリン酸化が減弱していた。この結果から、p38 および NF- κ B の活性化に mTORC2 が関与する可能性が示された。

次に、mTOR のシグナルについて検証を行った。mTOR シグナル伝達分子についても MAPK シグナルなどと同様に、活性化に伴いリン酸化されるため、各分子のリン酸化を検討した。mTOR の S2448 残基は、Rheb や Akt からリン酸化される(33)。この mTOR の S2448 残基は刺激後 1hour をピークにリン酸化されていた。また、mTORC2 の構成成分である Rictor の T1135 残基のリン酸化は 30min をピークに検出されていた。さらに mTORC2 下流シグナル伝達分子であ

る PKC α のリン酸化は 15min をピークにリン酸化され、同じく mTORC2 下流シグナル伝達分子である Akt S473 のリン酸化は時間経過に伴って増加した。

mTOR の S2481 残基は mTORC1 活性化に伴って自己リン酸化されることが知られている(56)。mTOR S2481 残基は刺激前からリン酸化されており、リガンド刺激後は、経時的に減弱することが認められた。mTORC1 活性は mTORC2 活性が上昇すると減少する報告がある(57)ことから、mTOR S2481 のリン酸化の減弱は mTORC2 活性化による可能性がある。これらの結果より、poly(I:C)刺激依存的に mTORC1 ではなく、mTORC2 が活性化され、p38 や NF- κ B の活性化に必要な可能性が示された。

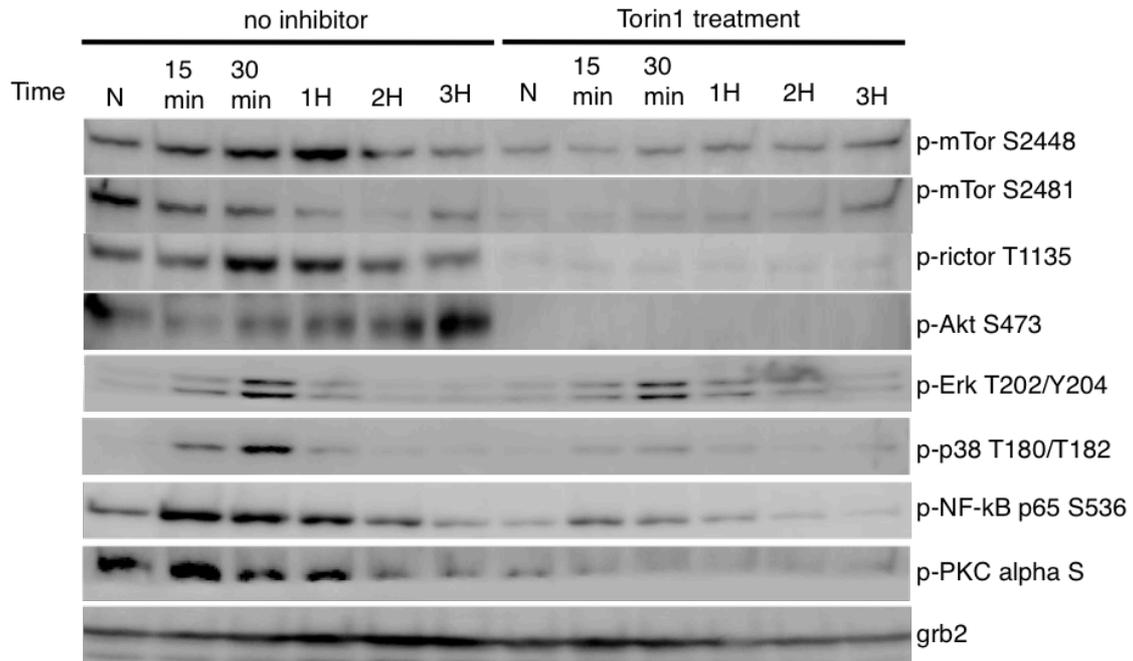


Fig. 13 poly (I:C)刺激によるシグナル伝達

無血清培養液で16時間培養したTLR3およびUnc93B1強制発現NIH3T3株に無処理、Torin1処理2時間後、poly(I:C)刺激におけるシグナル伝達について経時的にウェスタンブロッティングで検出した。Torin1は最終濃度250nMで処理した。ローディングコントロールとして、grb2を検出した。

(6) 血清による mTOR 活性および TLR3 応答への影響

第 5 項では、血清非存在下においてリガンド刺激依存的な mTORC2 活性化が p38 や NF- κ B シグナル活性化を介して RANTES 産生に変化をもたらす可能性が示された。mTOR は代謝センサーとして、血清中に含まれるアミノ酸や成長因子から刺激を受けることが知られており、これらの刺激を受けて下流のシグナルを活性化することで、細胞の代謝や生存、増殖を行っている(33)。そこで、血清存在下における poly(I:C)刺激後の mTOR シグナルへの影響について検討した (Fig. 14)。mTOR S2448 のリン酸化は血清非存在下では 1 hour をピークに活性化するのに対し、血清存在下では 2 hour をピークに活性化されることが示された。Rictor のリン酸化は血清非存在下では 1 hour をピークに活性化するのに対し、血清存在下では刺激後 30 分をピークに一過性に減弱した。mTORC2 下流シグナル伝達分子である Akt の S473 残基は血清非存在下ではリガンド刺激後、時間経過に伴ってリン酸化されるのに対し、血清存在下では活性の上昇が認められなかった。これらの結果から、血清成分が、TLR3 による mTOR の活性化に大きく影響することが示唆された。

血清が TLR3 応答に及ぼす影響を調べるために、poly(I:C)刺激における RANTES 産生を検討した。Poly(I:C) 5 μ g/ml 刺激においては、血清非存在下の方

が血清存在下よりも応答が高くなったが、poly(I:C) 25 μ g/ml 刺激においては、血清存在、非存在における変化はなかった(Fig. 15a)。poly(I:C) 25 μ g/ml 刺激後の RANTES の mRNA 量を realtime PCR で調べたところ、血清存在、非存在において変化はなかった(Fig. 15b)。

次に、血清非存在下における TLR3 細胞内移行について検証したところ、血清非存在下ではリガンド刺激による TLR3 の細胞内移行が起こっていないことが示された(Fig. 15c)。TLR3 の細胞内移行には mTORC2 が関与しており、TLR3 による mTORC2 の活性化は血清によって大きく影響された。そこで血清が mTORC2 の活性化を介して TLR3 の細胞内移行に影響している可能性が考えられる。したがって、TLR3 の細胞内移行における mTORC2 の役割を検討する必要があると考えて、mTORC2 の構成分子である Rictor の活性化型(リン酸化型)の局在を調べた (Fig. 16a)。血清非存在下では活性化型 Rictor は poly(I:C)刺激後にもみ検出され、TLR3 との共局在を示した。興味深いことに、血清存在下では無刺激時から細胞質に活性化型 Rictor が検出され、核周囲に局在する TLR3 との共局在は認められなかった。リガンド刺激後は、TLR3 が核周囲から細胞膜に方向に移行し、活性化型 Rictor と TLR3 の共局在が認められた。リン酸化型 mTOR は、血清存在下でリガンド刺激前から TLR3 と共局在を示しており、リガンド刺

激後も TLR3 と共局在が認められることから、TLR3 と共に移行している可能性が示された(Fig. 16b)。これらの結果より、血清による Rictor の活性化が TLR3 細胞内移行に重要である可能性が示唆された。

これまでの結果から、TLR3 リガンド刺激による mTORC2 活性化は血清非依存性で、p38 や NF- κ B 活性化を介して RANTES 産生誘導に必要であるが、TLR3 の刺激依存性細胞内移行には、血清による Rictor 活性化が重要である可能性が示された。また、poly(I:C)刺激による RANTES 産生には TLR3 の細胞内移行が必ずしも必要ではないことも示された。TLR3 応答における TLR3 の細胞内移行の役割については第 8 項にて述べる。

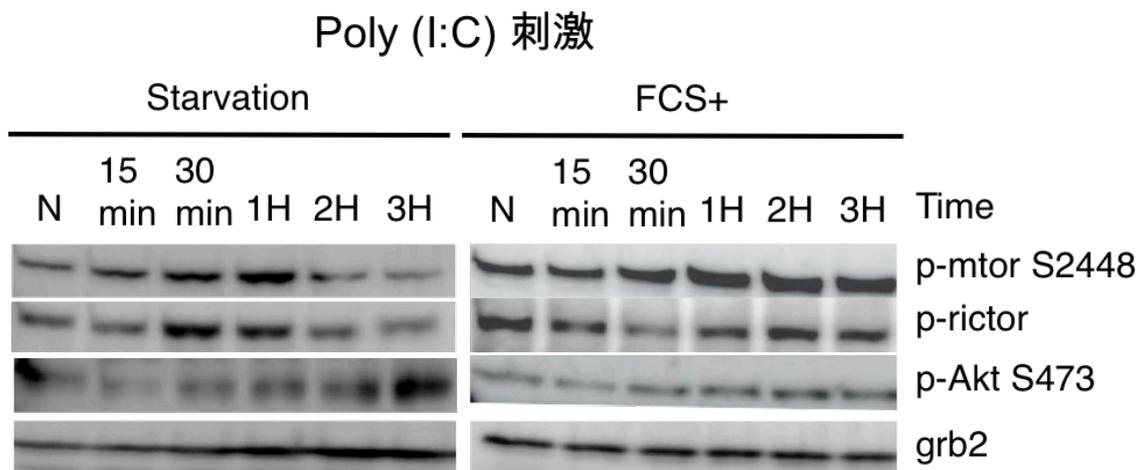


Fig. 14 TLR3 応答依存的な mTORC2 活性上昇

TLR3 および Unc93B1 強制発現 NIH3T3 株の血清存在下、非存在条件下での poly(I:C) 刺激におけるシグナル伝達について経時的にウェスタンブロッティングで検出した。ローディングコントロールとして、grb2 を検出した。

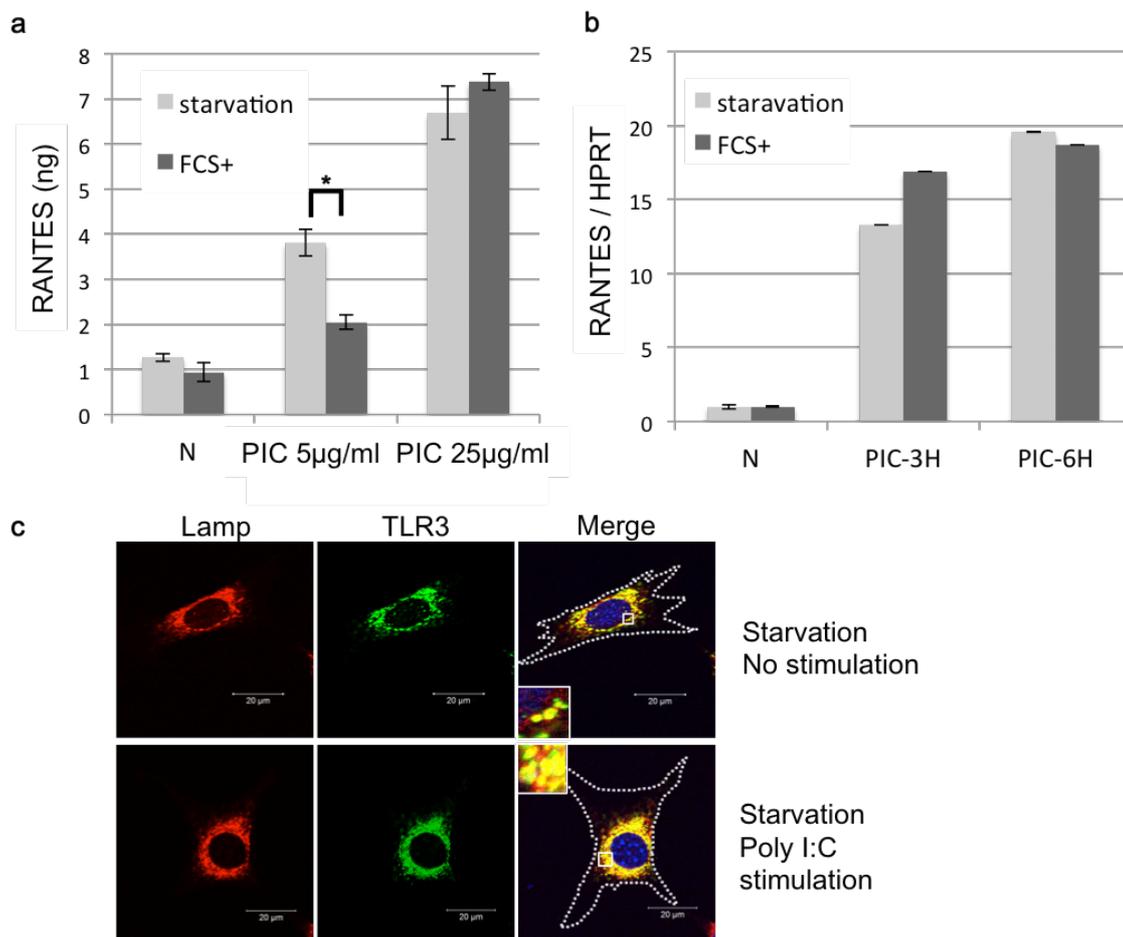


Fig. 15 血清非存在下における TLR3 応答と細胞内移行

(a) 無血清培養液で 16 時間培養した細胞の poly(I:C)刺激時における RANTES 産生量を ELISA によって検出した。横軸はリガンド濃度、縦軸は RANTES 産生量 (ng)とした。(b) poly(I:C)25 µg/ml 刺激後に RANTES 産生量を realtimePCR で検出した。HPRT 遺伝子を用いて標準化した。* は $p < 0.05$ を示す。(c) TLR3 および Unc93B1 強制発現 NIH3T3 株を無血清培養液で 16 時間培養し、poly(I:C) 25µg/ml 刺激後 16 時間における TLR3 及び Lamp1 を共焦点レーザー顕微鏡により解析した。赤は Lamp1 で緑は TLR3 を示す。白点線は細胞膜を示す。白実線は強拡大図を表す。

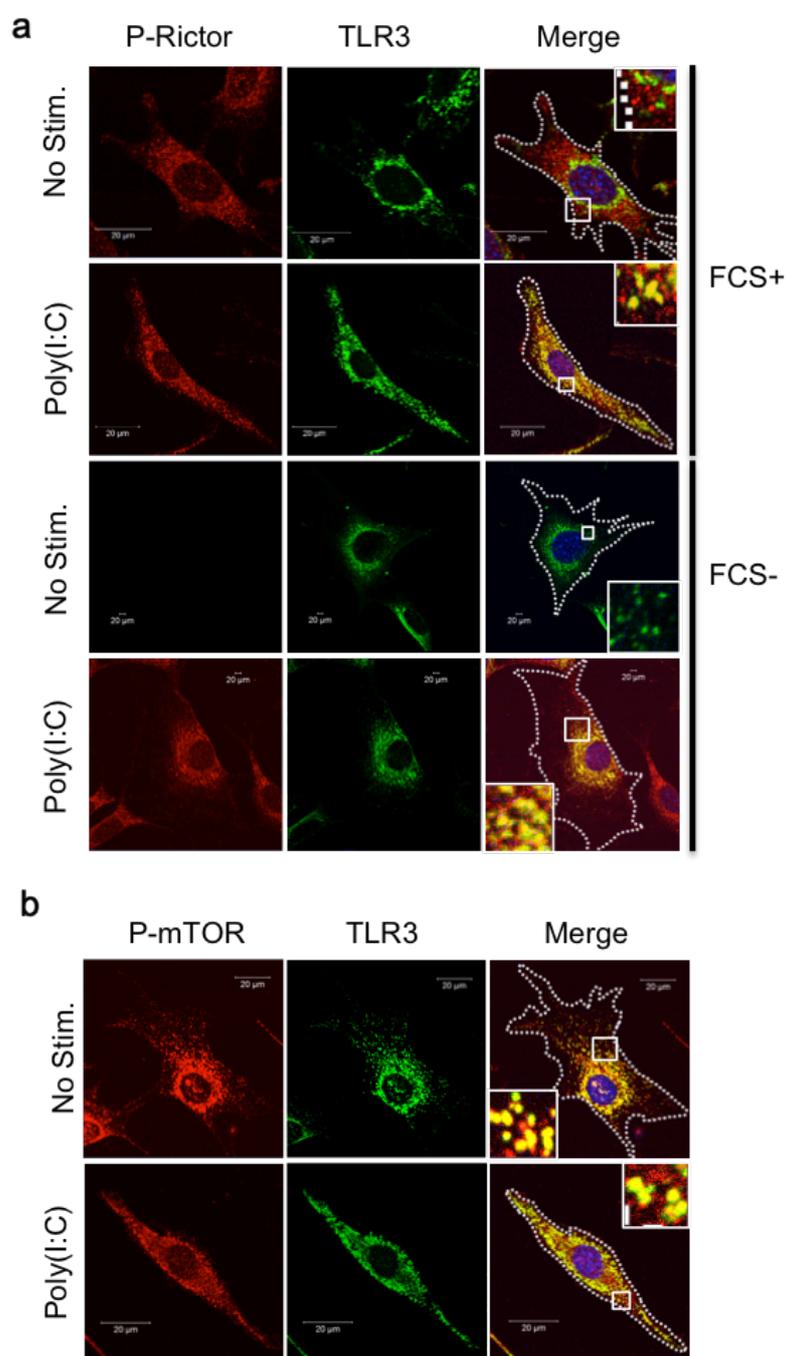


Fig. 16 TLR3 と mTORC2 の局在

TLR3 および Unc93B1 強制発現 NIH3T3 株の無血清条件下、血清条件下における無刺激時、poly(I:C) 25 μ g/ml 刺激後 16 時間における TLR3、p-mTOR 及び p-Rictor の局在を共焦点レーザー顕微鏡により解析した。(a)赤は p-rictor T1135 で緑は TLR3 を示す。(b)赤は p-mTOR S2448 で緑は TLR3 を示す。白点線は細胞膜を示す。白実線は強拡大図を表す。

(7) 脂肪酸による mTORC2 シグナルの活性化

TLR3 の細胞内移行が血清の存在に依存することから、何らかの血清因子が TLR3 の細胞内移行に必要である可能性が示唆される。mTORC1 は、成長因子だけでなく、アミノ酸やグルコースでも活性化される。しかし、TLR3 の細胞内移行に關与する mTORC2 では、成長因子以外に活性化する血清因子が報告されていない。我々の用いた無血清培養液にはすでにアミノ酸や糖が含まれているが、脂肪酸は含まれていないことから、脂肪酸が mTORC2 を活性化する可能性について検討した。そこで、血清非存在下で TLR3 の細胞内移行は認められなくなったが、さらに細胞内の脂肪酸も除去した時の TLR3 の局在を検討した。BSA は脂肪酸に結合する特性を持つ。細胞由来の脂肪酸を BSA で吸収させるために、脂肪酸が結合していない BSA (BSA-Free Fatty Acid, BSA-FFA) を無血清 RPMI 培養液に添加し、リガンド刺激後の TLR3 細胞内移行について検討したところ、血清非存在下に比べて、TLR3 は核の周辺にさらに強く集積していた(Fig. 17)。脂肪酸を除去していない BSA を添加してもそのような変化は認められなかった。さらに、RPMI-BSA-FFA の条件下で、飽和脂肪酸の一つであるステアリン酸をリポフェクション試薬である PEI と共に加えると、TLR3 のリガンド依存性細胞内移行が回復した。この結果から、脂肪酸が TLR3 の細胞内移行に重要であ

ることが示された。

次に、脂肪酸存在下、非存在下における TLR3 応答について検討した(Fig. 18a)。血清非存在下では TLR3 刺激で RANTES 産生は認められたが、BSA-FFA 添加により、細胞内の脂肪酸を除去すると、RANTES 産生量が低下した。この条件下でラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸などの飽和脂肪酸を添加すると、ラウリン酸を除く脂肪酸でリガンド刺激による RANTES 産生が回復した。脂肪酸は生体内で Fatty acid synthase (FASN)を介する経路によって合成される。細胞内の脂肪酸合成を減少させるもう一つの方法として、無血清の条件下で FASN inhibitor で処理したところ、TLR3 依存性の RANTES 産生は著明に低下した。これらの結果から、TLR3 刺激による RANTES 産生誘導にも脂肪酸が関わることを示された。血清非存在下では TLR3 刺激による RANTES 産生は認められることから、RANTES 産生は細胞内の脂肪酸に依存する可能性が考えられる。

次に、脂肪酸を除去した細胞での TLR3 シグナルを調べた。リガンド刺激後の Rictor のリン酸化は、無血清の条件下で低下し、ステアリン酸添加で部分的ではあるが、回復が認められた(Fig. 18b)。また、NF- κ B p65 のリン酸化も、脂肪酸除去による低下、ステアリン酸添加での回復が認められた。これらの結果から、

TLR3 刺激による mTORC2 及び NF- κ B の活性化は脂肪酸の存在に依存する可能性が示された。

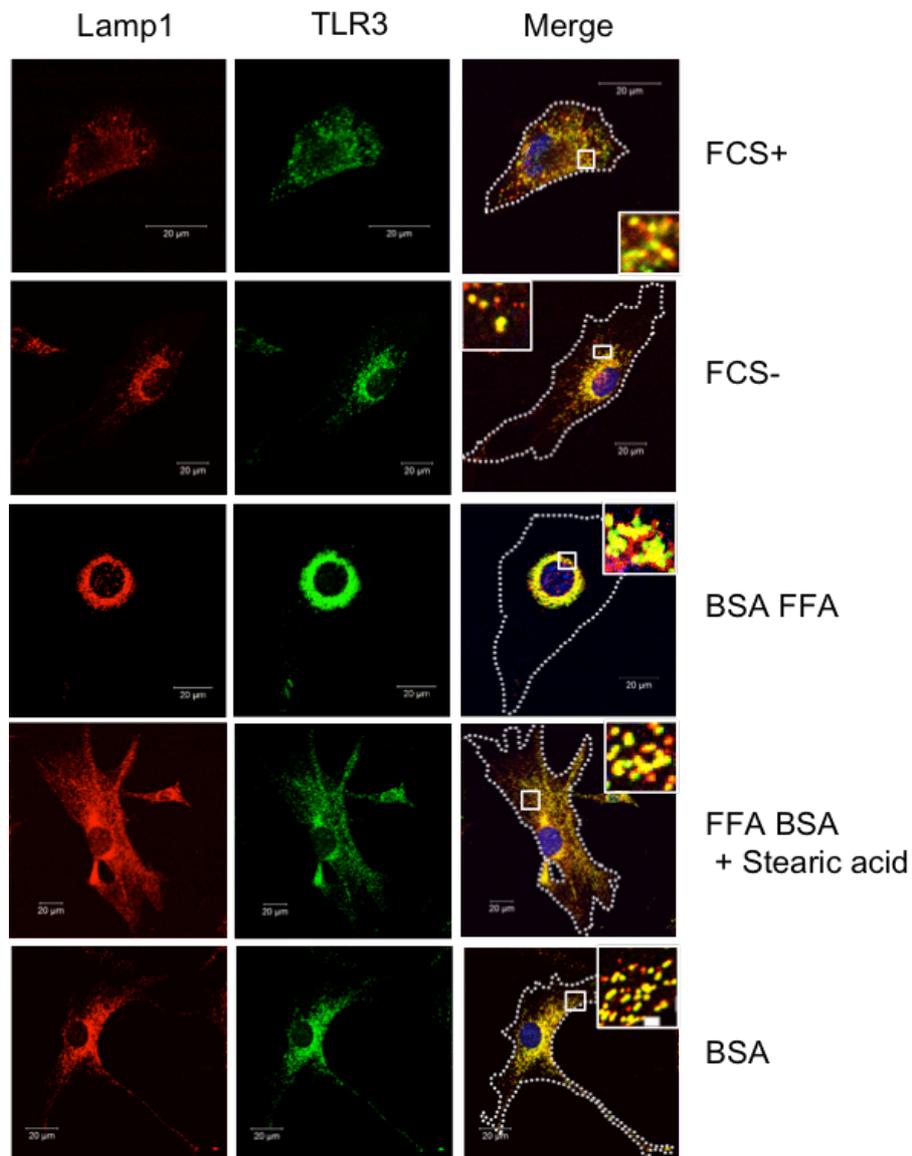


Fig. 17 脂肪酸非存在下における TLR3 細胞内移行

TLR3 および Unc93B1 強制発現 NIH3T3 株を血清添加培養液、無血清培養液、BSA 添加無血清培養液、脂肪酸欠損培養液(BSAFFA)、それにステアリン酸を添加した培養液で 16 時間培養し、poly(I:C) 25 μ g/ml 刺激後 16 時間における TLR3 及び Lamp1 を共焦点レーザー顕微鏡により解析した。赤は Lamp1 で緑は TLR3 を示す。白点線は細胞膜を示す。白実線は強拡大図を表す。

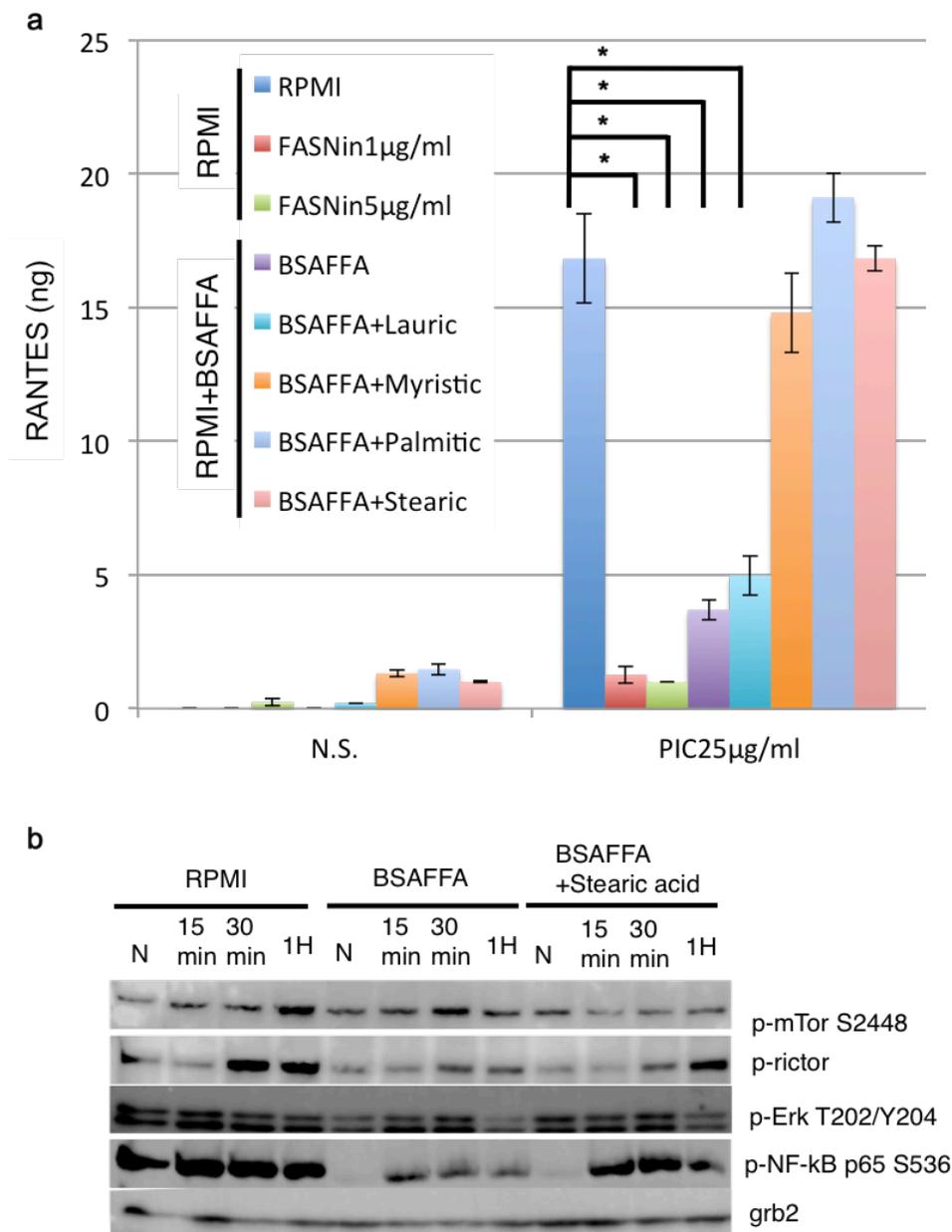


Fig. 18 脂肪酸非存在下における TLR3 応答とシグナル伝達

(a)無血清培養液に FASNinhibitor を添加した細胞および脂肪酸欠損培養液 (BSAFFA)、それに各脂肪酸添加し培養した細胞の poly(I:C)刺激時における RANTES 産生量を ELISA によって検出した。FASNinhibitor は最終濃度 1 μg/ml および 5 μg/ml で 2 時間前処理し、各脂肪酸は最終濃度 100 μM になるように添加した。* は $p < 0.05$ を示す。(b)無血清、脂肪酸欠損、ステアリン酸添加した細胞の poly(I:C)刺激におけるシグナル伝達について計時的にウェスタンブロッティングで検出した。Torin1 は最終濃度 250nM で処理した。コントロールとして、grb2 を検出した。

(8) HSV 感染における TLR3 応答制御

無血清の条件下での TLR3 は、RANTES 産生を誘導しうるが、細胞内移行は示さなかった (Fig. 15)。この結果は、TLR3 の細胞内移行が RANTES 産生とは直接関係しないことを示している。TLR9 のリガンド依存性細胞内移行が I 型 IFN 産生に重要であることが報告されている(58, 59)。TLR3 の細胞内移行も、I 型 IFN 産生に関与する可能性がある。しかしながら、用いた 3T3 細胞では poly(I:C) で刺激しても、I 型 IFN 産生が検出されなかったことから、TLR3 を刺激するヘルペスウイルス感染における I 型 IFN 産生と細胞内移行について検証した。HSV-1 は共焦点顕微鏡でも用いることができるようにウイルス由来の糖タンパク質 gB に RFP 蛍光タンパク質を付加したウイルスである gB-RFP HSV-1 変異体ウイルスを用いて実験を行った(60)。HSV タンパク質である ICP4 は経時的に発現量が上昇することから、感染が成立していることが確認された。TLR3 下流シグナルを検証したところ、Rictor や Akt のリン酸化が認められ、感染依存的に mTORC2 が活性化されていることが示された(Fig. 19)。mTORC1 の会合分子 Raptor のリン酸化が認められたことから、ヘルペスウイルスは mTORC1 の活性化も誘導しうることが示された。これは、HSV タンパク質の一つであるリン酸化酵素 Us3 による mTOR シグナル活性化が関与している可能性が考えられる。

ヘルペスウイルス感染における TLR3 細胞内移行について検証したところ、HSV 感染 6 時間後で細胞膜周辺まで TLR3 が移行していた(Fig. 20a)。このことから、poly(I:C)刺激と同様に TLR3 が刺激依存的に核周辺から細胞膜方向に移行していることが示された。また、微小管や F-アクチンの重合も HSV 感染によって増大していることも確認された(Fig. 20b)。これらの現象は全て、mTORC1 阻害剤 Rapamycin では阻害できず、mTORC1、C2 阻害剤 Torin1 で阻害することが確認されたことから、HSV 感染における TLR3 の細胞内移行や細胞骨格変化も、poly(I:C)刺激と同様に mTORC2 活性依存的である可能性が示された。

HSV 感染防御における TLR3 応答について検証した。HSV 感染においては、TLR3 だけでなく、TLR2 や他の免疫レセプターが HSV 構成成分を認識して RANTES を産生することが知られている(42)。HSV 感染における I 型 IFN 産生は TLR3 依存的であることが報告されていることから、TLR3 および Unc93B1 強制発現 NIH3T3 株における HSV 感染時の I 型 IFN 産生について検討したが、NIH3T3 細胞では IRF3 発現量が少なく I 型 IFN 産生が検出できなかった。そこで、マウス由来線維芽細胞である Murine Embryonic Fibroblast (MEF)を使って I 型 IFN 産生を調べたところ、HSV 依存性の I 型 IFN 産生が誘導された(Fig. 21)。また、野生型 MEF に阻害剤 Rapamycin または Torin1 を処理したサンプルは、無

処理と比べて HSV 感染における I 型 IFN 産生が低かった(Fig. 21a,b)。この結果より、HSV 感染における I 型 IFN 産生には mTORC1、mTORC2 の両方が関与する可能性が示された。

TLR3 の細胞内移行が mTORC2 によって制御されている可能性を考慮すると、mTORC2 の活性化が TLR3 の細胞内移行を介して、IFN 産生に関与している可能性がある。第 7 項にて、TLR3 の細胞内移行には脂肪酸による mTORC2 の活性化が重要であることを示した。そこで、FASN 阻害剤処置の MEF について IFN 産生量を検証したところ、無処理と比べて産生量が完全に阻害されることが示された(Fig. 21c)。また、TLR3 の細胞内移行には Rab7a タンパク質が関与する可能性が示されたことから、Rab7 a 遺伝子欠損細胞を用いて、HSV 感染による I 型 IFN 産生を検討したところ、野生型細胞に比べて産生量が欠損していることが分かった(Fig. 21d)。これらの結果から、HSV 感染による I 型 IFN 産生には脂肪酸が必要であり、mTORC2 依存性の TLR3 細胞内移行が必要である可能性が示された。

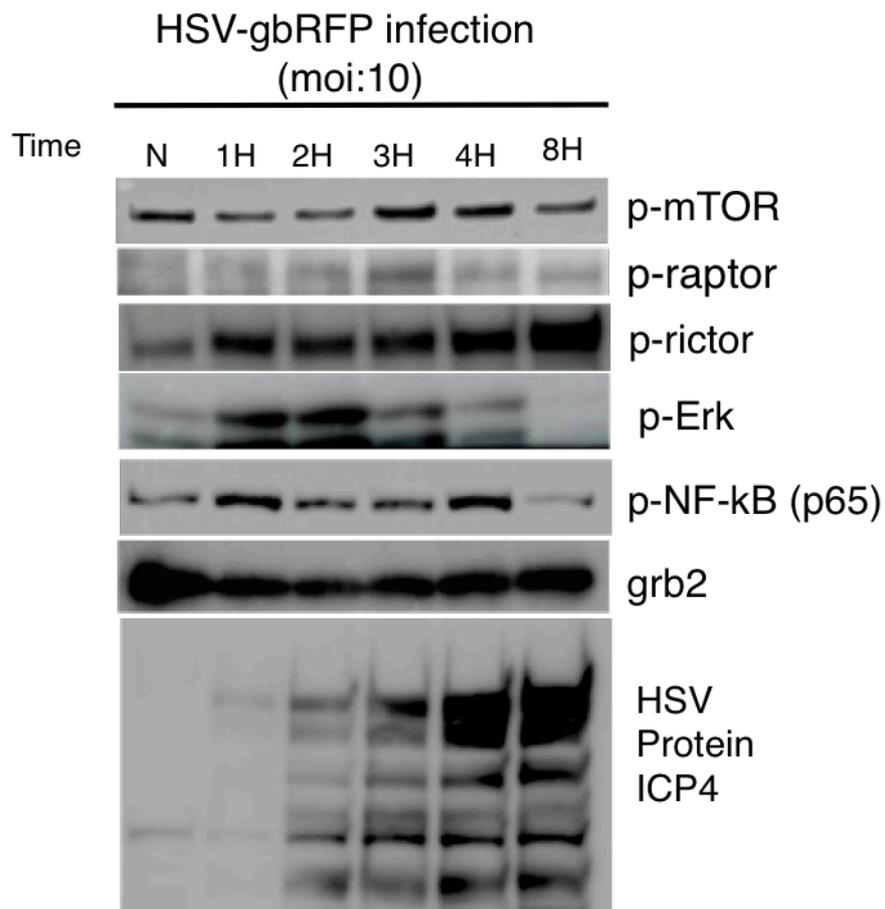


Fig. 19 HSV 感染におけるシグナル伝達

(a) TLR3 および Unc93B1 強制発現 NIH3T3 株の HSV 感染におけるシグナル伝達について経時的にウェスタンブロッティングで検出した。培養は血清入り DMEM で行った。gB タンパク質に RFP が付加された HSV-1 変異体(HSV-gBRFP) を使用した。ローディングコントロールとして、grb2 を、HSV 感染のコントロールとして ICP4 を検出した。moi は 10 とした。

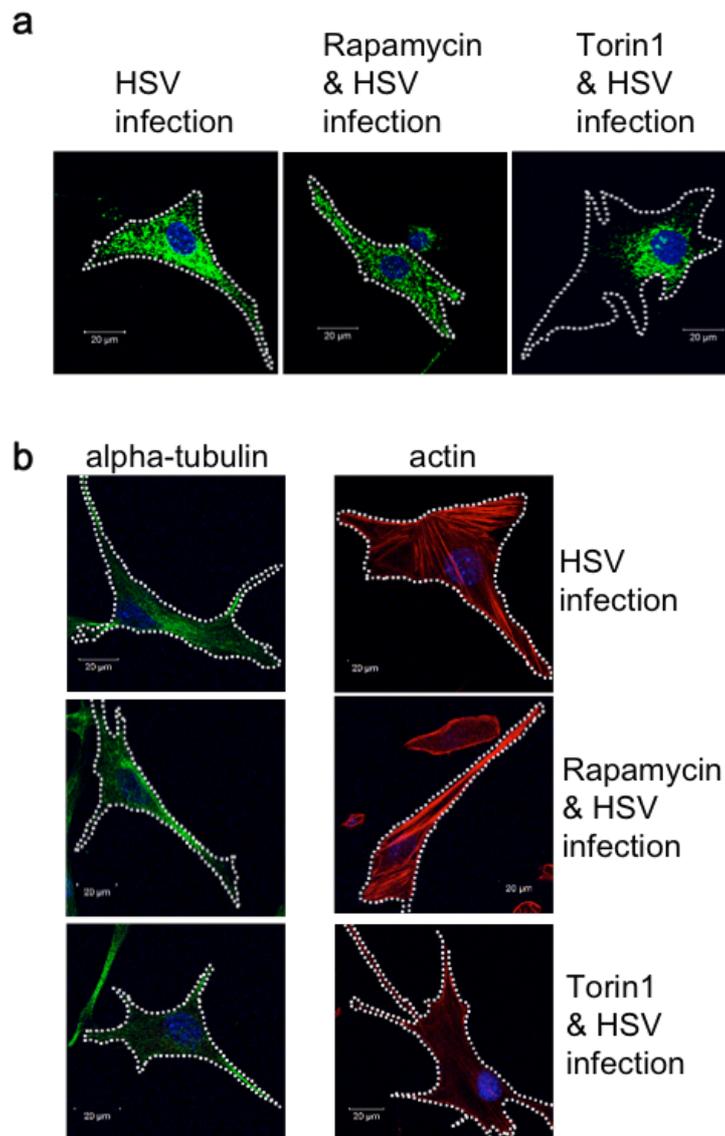


Fig. 20 HSV 感染における TLR3 細胞内移行と細胞骨格変化

(a)TLR3 および Unc93B1 強制発現 NIH3T3 株の無処理、Rapamycin、Torin1 処理 2 時間後、HSVgB-RFP 感染 6 時間における TLR3 を共焦点レーザー顕微鏡により解析した。緑は TLR3 を示す。(b)同様の条件で alpha-tubulin 及び F-actin を共焦点レーザー顕微鏡により解析した。緑は alpha-tubulin、赤は F-actin を示す。白点線は細胞膜を示す。Rapamycin は 200nM、Torin1 は 250nM を最終濃度とした。白実線は強拡大図を表す。

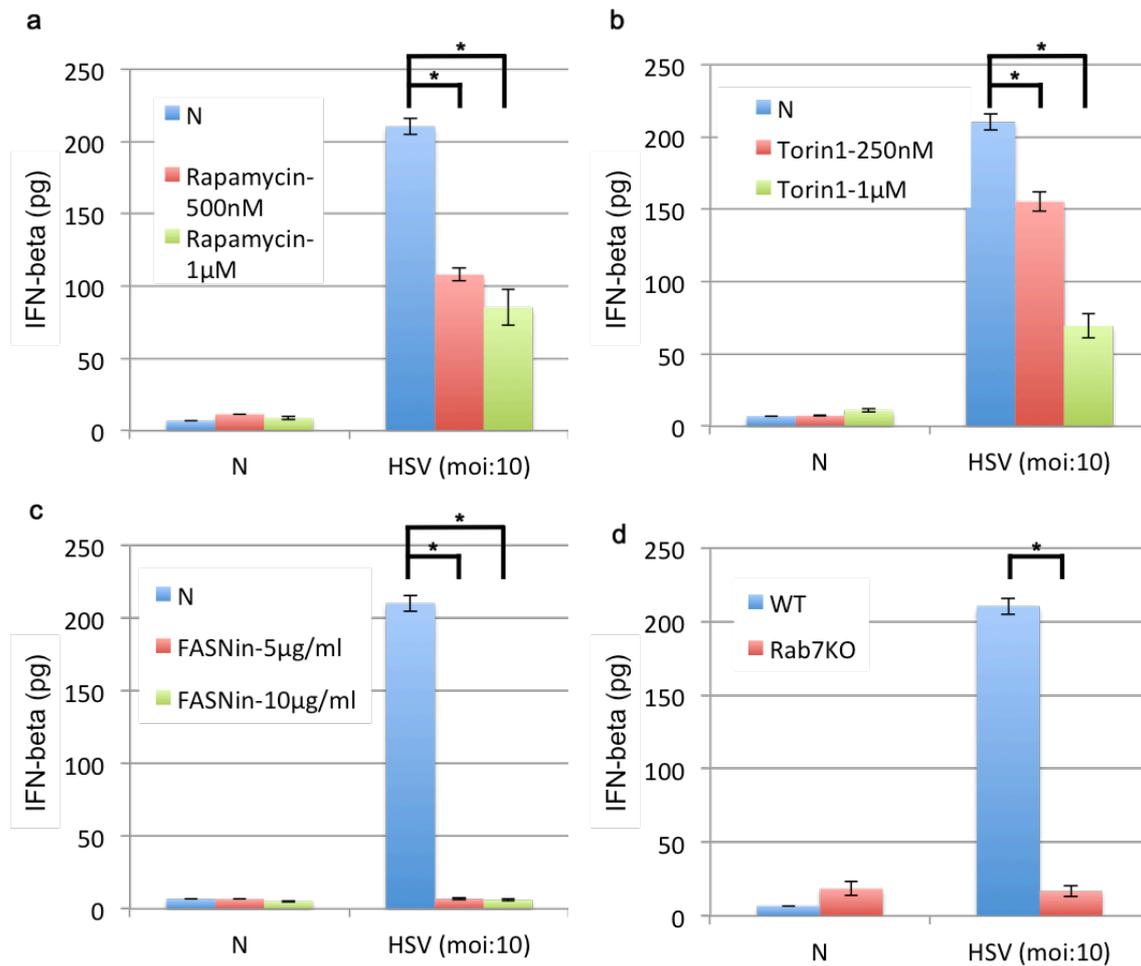


Fig. 21 HSV 感染における IFN β 産生

マウス線維芽細胞株(MEF)野生型の無処理、(a)Rapamycin、(b)Torin1、(c)FasN阻害剤処理2時間後および(d)Rab7ノックアウト細胞のHSV感染24時間におけるIFN β 産生量をELISAによって検出した。縦軸はIFN-beta産生量(pg)とした。Rapamycinは500nM、1 μ M、Torin1は250nM、1 μ Mを最終濃度とした。*は $p < 0.05$ を示す。

考察

(1) TLR3 応答制御機構

核酸 TLR はこれまで応答制御について多くの研究がなされている。Unc93B1 によって TLR が ER からエンドライソソームに移行し、移行した先でリガンドに
応答しサイトカインを産生することが報告されている。また、TLR7 や TLR9
に関しては、AP-3 によってライソソームに移行することで I 型 IFN 産生が行わ
れることが知られている(59)。このように TLR の応答制御には TLR の細胞内移
行が重要であるが、TLR3 については、詳細な解析が進められていなかった。ま
た、HSV 感染の際には、TLR3 応答依存的な I 型 IFN 産生が重要であり、TLR3
依存的 I 型 IFN 産生がないとヘルペス脳炎にかかりやすいことも報告されてい
る(31)。そこで、TLR3 および Unc93B1 強制発現 NIH3T3 を用いて実験を進める
ことで、線維芽細胞における TLR3 の局在と応答の関係を詳細に検討した。この
細胞における TLR3 の局在を確認したところ、Lamp1 と共局在していた(Fig. 8)。
この結果から Unc93B1 を強制発現している細胞においては、Unc93B1 によって
小胞体からライソソームに移行されていることが示された。TLR3 は核周辺に局
在していることも観察された。脂肪酸欠損条件下では、TLR3 は核膜周辺に移行
し、リガンド刺激刺激依存的な RANTES 産生が低下した。そこに飽和脂肪酸を

加えた条件下では細胞内移行、RANTES 産生どちらも回復することが示された (Fig. 17, 18a)。また、脂肪酸欠損条件下においてはリガンド刺激依存的な p65 活性化が無血清培養液に比べ低いのに対し、脂肪酸を加えた条件下では回復した (Fig. 18b)。無血清の条件下では RANTES 産生は認められ (Fig. 15)、BSA-FFA による細胞内の脂肪酸除去や脂肪酸合成阻害剤では RANTES 産生が阻害されたことから、RANTES 産生には細胞内の脂肪酸が重要である可能性が示された。

TLR3 リガンドで刺激すると、TLR3 は核近傍から、細胞膜方向に移動していることが示された (Fig. 8)。この現象は、他の TLR リガンドである LipidA や RNA9.2s では起こらず、poly(I:C) 刺激だけで起こったことから、TLR3 応答依存性であることが示された (Fig. 8a)。また、HSV 感染においても TLR3 の細胞内移行が認められた (Fig. 20)。微小管の伸長やアクチンの重合が TLR3 リガンド刺激後に増強されており、TLR3 は微小管の上を伝って順行性移行している可能性が示唆された (Fig. 11)。さらに、Rab7a と TLR3 が会合し共局在していたことから、TLR3 はリガンド刺激により核周辺から細胞膜方向に重合された微小管の上を Rab7a を介して移行する可能性が示された (Fig. 9-11)。

微小管重合の増強およびライソソームの細胞内移行は mTORC1 および mTOR C2 阻害剤である Torin1 によって阻害され、mTORC1 阻害剤である Rapamycin

では阻害できないことから、mTORC2 活性が重要である可能性が高い(Fig. 12, 20)。mTORC2 は、これまで細胞骨格の制御に重要であることが報告されていることから、mTORC2 活性化が、微小管重合に関わることが考えられる。また、Torin1 処理によって TLR3 刺激による RANTES 産生が減少した(Fig. 12)。さらに、Torin1 処理細胞ではリガンド刺激依存的な p38 や p65 のリン酸化の活性化が阻害された(Fig. 13)。これらのことから、poly(I:C)刺激依存的に mTORC2 が活性化され、p38 や NF- κ B の活性化に関わることで、RANTES 産生を誘導する可能性が示された。

mTORC2 構成分子である mTOR や Rictor は血清非存在下におけるリガンド刺激によって活性化が見られたことより、TLR3 のシグナル伝達経路で機能していることが示された(Fig. 13)。血清存在下では無刺激時でも Rictor のリン酸化が検出され、リガンド刺激後に TLR3 の細胞内移行によって TLR3 と共局在する可能性が示された(Fig. 14)。無血清の条件下では TLR3 刺激依存性の細胞内移行が認められなかったことから(Fig. 15)、血清依存性にリン酸化された Rictor が TLR3 の刺激依存性細胞内移行に関わる可能性が示された。

TLR3 の細胞内移行には血清成分の中でも脂肪酸に関わる可能性が本研究により示された。無血清培養液にさらに BSA-FFA を加えることで、細胞内の脂肪酸

も低下させると、無血清の条件下に比べてさらに TLR3 が核膜付近に集積し、リガンド刺激による細胞内移行も認められなかった。この条件下で、飽和脂肪酸であるステアリン酸を添加すると、リガンド刺激による TLR3 の細胞内移行が検出された(Fig. 17)。さらに、リガンド刺激依存性の Rictor 活性化も部分的ではあるが回復した。ラウリン酸では TLR3 の細胞内移行の回復が認められなかったことから、脂肪酸の炭素鎖の長さが C12 より長い必要がある可能性が示唆された。

TLR7 や 9 は AP-3 により、エンドライソソームからライソソームへ運ばれることで、I 型 IFN 産生を行うことができるようになると報告されている(58, 59)。しかし、TLR3 については I 型 IFN 産生に細胞内移行が関わる報告はまだない。そこで、MEF 細胞において HSV 感染実験を行ったところ、Rapamycin 処理および Torin1 処理細胞において I 型 IFN 産生が低下していた。このことから、IFN 産生には mTORC1 および mTORC2 の活性化が関わる可能性が示された。Rab7a 遺伝子を欠損した細胞や細胞内の脂肪酸合成を阻害する薬剤を用いて I 型 IFN 産生への影響を検討したところ、HSV 感染による I 型 IFN 産生誘導には、Rab7a、脂肪酸合成の両方が必要であることが示された。これらの結果は、TLR3 の細胞内移行が HSV 感染による I 型 IFN 産生誘導に必要である可能性を示しているが、実際に TLR3 の局在を調べて確認する必要がある。

TLR3 および Unc93B1 強制発現線維芽細胞における実験を通して、線維芽細胞における TLR3 応答制御機構として以下の可能性が示唆された。細胞内の脂肪酸がないと、TLR3 は mTORC2 を活性化できず、RANTES 産生は誘導されない。細胞外に脂肪酸が存在すると、mTORC2 が TLR3 刺激なしでも恒常的に活性化される。この恒常的な mTORC2 の活性化が TLR3 の細胞内移行に関与する可能性がある。この TLR3 の細胞内移行が、TLR3 による I 型 IFN 産生に重要である可能性も示された。mTORC1 も TLR3 による HSV 感染による I 型 IFN 産生誘導に重要である可能性が示された(Fig. 22)。今後、TLR3 の細胞内移行と mTORC1 活性化の関係を検討する必要がある。

脂肪酸の存在は、TLR3 が I 型 IFN 産生を誘導する際のチェックポイントとなっている可能性がある。また、mTORC1 もアミノ酸によって活性化されることから、アミノ酸も TLR3 による I 型 IFN 産生のチェックポイントとして機能している可能性がある。本研究での結果は、TLR3 による I 型 IFN 産生誘導における代謝機構からのチェックシステムの理解に貢献しうる可能性がある。

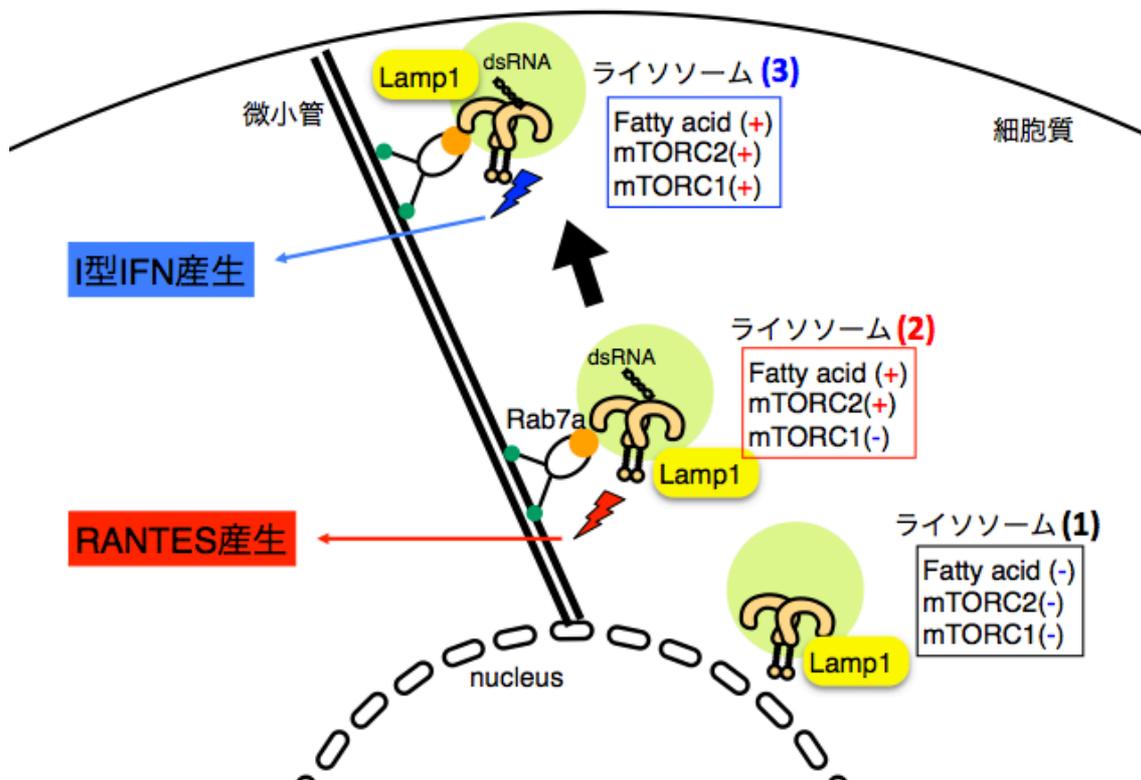


Fig. 22 線維芽細胞における TLR3 応答制御機構の概念図

TLR3 は小胞体から Unc93B1 によって Lamp1 発現ライソソームへ運ばれる。細胞内に脂肪酸非存在下の場合、核膜付近のリガンド応答できない場(1)へ移行されるが、脂肪酸存在下では核周辺局在 Rab7a 発現ライソソーム(2)に移行され、mTORC2 リガンド依存的なリガンド応答による RANTES 産生が可能になる。(2)で TLR3 がリガンド刺激を受けると、mTORC2 依存的に細胞表面付近ライソソーム(3)に移行され、mTORC1 依存的なインターフェロン産生が可能になる。

(2) 線維芽細胞における TLR3 の応答

Unc93B1 は TLR3 の小胞体からライソソームへの細胞内移行に関わり、それにより、TLR3 応答にも関与することが報告されている(22)。しかし、線維芽細胞株 NIH3T3 では Unc93B1 発現量が低く、強制発現して初めて TLR3 応答が検出された(Fig. 7)。また、TLR3 をノックアウトすると poly(I:C)による RANTES 産生能がなくなる(Fig. 7c)。これにより、TLR3 および Unc93B1 強制発現 NIH3T3 細胞株における poly(I:C)による RANTES 産生は TLR3 および Unc93B1 依存的であることが示された。線維芽細胞 MEF においてもほとんど Unc93B1 は発現していないが、I 型 IFN やエストロゲンシグナルの活性化によって発現量が上昇することが報告されている(62)。HSV 感染においても線維芽細胞による I 型 IFN 産生が誘導される(Fig. 21)。このことから、HSV 感染によって、Unc93B1 発現量が高くなる可能性が考えられる。これらの事実から、免疫細胞では、Unc93B1 発現量が十分であることから、TLR3 はライソソームまで運ばれており、リガンド刺激されるとすぐ応答できるように配備されていることが考えられる。それに対して、線維芽細胞ではウイルス感染などの刺激によって Unc93B1 の発現量が上昇して初めて TLR3 が小胞体からライソソームへ移行し、ウイルスに応答できるようになる可能性が示唆された。

(3) TLR3 の細胞内移行

これまで TLR と細胞内移行については多くの報告がなされており、特に、核酸認識 TLR7 や 9 は Unc93B1、PRAT4A によってリガンド認識及び応答が制御されており、これらのバランスが破綻することで自己免疫疾患様になることが報告されている(59)。また、Adaptor protein (AP)ファミリーなどのタンパク質によってリガンド応答の場へ移行されることも報告されている。しかし、TLR3 はエンドソームに局在するという報告があるが、リガンド刺激がどこでどのように行われているのか、応答後にどのような挙動を示すかについての検討はなされていなかった(63)。今回、線維芽細胞では、Unc93B1 強制発現下で TLR3 は Rab7 を発現するライソソームに局在している可能性が示された。また、TLR3 リガンドである poly(I:C)で刺激することで TLR3 が細胞内を核周囲から細胞膜の方向に移動することが示された(Fig. 8,9)。

また、mTORC1 阻害剤である Rapamycin では細胞内移行は阻害されず、mTORC1、C2 阻害剤である Torin1 によって細胞内移行が阻害されたことから、mTORC2 依存的な細胞内移行である可能性が示された(Fig. 12)。mTORC2 の下流では、PKC などが活性化することで、微小管など細胞骨格の再組織化が行われるが、細胞内小器官の移行に関わることについては報告がなかった(37)。

mTORC2 の活性化は、微小管重合を介して、ライソソームの移行を誘導する可能性が本研究によって示唆された(Fig. 11,13)。

また、本研究では、TLR3 は Rab7a と会合し、核周囲から細胞膜方向に展開することを示した(Fig. 10)。Rab7a はエンドライソソームに局在する GTPase であるが、他にライソソームに局在する GTPase として Arl8 が報告されている(64)。TLR3 は Arl8b とは会合しなかったことから、Arl8b を含むライソソームに局在することは少ないと考えられる。TLR7 や TLR9 もライソソームに局在することから(65)、これらの TLR が Rab7a、Arl8b どちらと共局在を示すのか、興味深い点である。

(4) mTOR による TLR 応答への影響

TLR3 および Unc93B1 強制発現線維芽細胞株において mTORC2 活性は TLR3 刺激依存的に起こっており、p38 や NF- κ B シグナルを介して RANTES 産生を誘導する可能性が示唆された(Fig. 13)。さらに mTORC2 は TLR3 の細胞内移行を介して TLR3 による I 型 IFN 産生誘導にも重要である可能性が示された。一方、mTORC1 については、RANTES 産生には関与しないが、I 型 IFN 産生に関与する可能性が示された。

先行研究において、mTORC1の活性がTLR7、TLR9によるI型IFN産生誘導に重要であると報告されている(39)。mTORC1はライソソームに局在しており、mTORC2はライソソームの細胞内移行に関わることから、これらのmTOR複合体の間で何らかの相互作用がライソソームにおいて存在している可能性がある。

(5) 脂肪酸によるTLR応答への影響

TLR3およびUnc93B1強制発現線維芽細胞株において脂肪酸を低下させると、TLR3応答は誘導されなかった。脂肪酸合成酵素であるFASNを阻害した場合も同様の結果であった。脂肪酸合成を阻害するFASN inhibitorを用いると、PI3Kシグナル伝達分子を阻害することで、オートファジーを誘導することが報告されている(68)。また、ライソソームはオートファゴソームと融合することで、オートライソソームになり、オートファジーが開始されることも既知である(69)。脂肪酸非存在下のライソソームは核膜近くに局在するが、オートファジーも核の周囲で誘導されることが分かっている(67, 69)。したがって、脂肪酸を除去することで、TLR3はオートファゴソームに局在するという可能性が考えられる。今後は、脂肪酸非存在下における核膜近くのライソソームがオートファジー誘導に関わるかどうかマーカー遺伝子であるLC-3活性に着目して検証を進めると

ともに、オートファジーと誘導と TLR 活性の関連についても検証を進める。

また、脂肪組織において飽和脂肪酸は内因性リガンドとして TLR4/MD-2 応答を誘導する報告がされている(70)。また、TLR4 応答に関わる飽和脂肪酸を細胞内に運ぶキャリアーとして、Fetuin-A が報告されている(71)。本研究では、キャリアーとして、リポソーム試薬である PEI を採用しているが、生体内では他の物が代替していると考えられる。リポタンパク質と結合し、認識や脂質代謝に酵素群アポリポタンパク質の Apo-E は細胞上清中に添加すると、TLR3 や 4 応答が減弱することが知られている(72)。これは、通常は細胞内に脂質を運ぶキャリアーとして働いているが、過剰に存在することで細胞内の脂質が細胞外へ除去されることで応答が減弱していると考えられる。脂肪酸を運ぶキャリアータンパク質については、今後、gRNA ライブラリーを用いたスクリーニング系を用いることで分子の探索を行う予定である。

また、脂肪酸が TLR3 の応答や細胞内移行に非常に重要な役割を果たす可能性が示唆されたことから、TLR7 や TLR9 の応答や細胞内移行にも関わる可能性が考えられる。今後、検証を行う必要がある。脂肪酸が mTORC2 を活性化する可能性が今回の結果で示唆されたことから、脂肪酸による mTORC2 の活性化にかかわる分子基盤を解明する必要がある。脂肪酸認識に関わる分子を探索するた

め、gRNA ライブラリーを用いたスクリーニングを行い、得られた分子についての検証を行う予定である。それらの遺伝子を線維芽細胞だけでなく、マクロファージなどの様々な細胞種でノックアウトし、脂肪酸の mTORC2 活性化および TLR 応答を検証する予定である。

(6) HSV 感染におけるインターフェロン産生

MEF 細胞において、poly(I:C)刺激とは違い、HSV 感染は I 型 IFN 産生を誘導した(Fig. 21)。HSV 感染による I 型 IFN 産生は Rapamycin で阻害されること、poly(I:C)刺激は mTORC1 の活性化を誘導できなかったことを考えると、I 型 IFN 産生には TLR3 による mTORC1、mTORC2 の両方の活性化が重要である可能性が考えられる。HSV は多くのウイルスタンパク質を保持しており、それらを用いて宿主細胞内のタンパク質を利用することでウイルスが生体で生存、増殖できるようにしている。HSV タンパク質の一つである Us3 は宿主細胞内の多くのタンパク質を活性化、不活化する酵素として知られており、その機能の一つに IRF3 不活化がある(73)。つまり、HSV は Us3 を用いて宿主細胞における IFN 産生を妨げている。しかし、同時に Us3 は、宿主細胞内の mTORC1 活性化を誘導することで、ウイルス由来のタンパク質を転写翻訳させる働きも持つ(74)。この

HSV による mTORC1 の活性化を宿主細胞は利用して、TLR3 依存性 I 型 IFN 産生を行っている可能性が今回の結果から示唆された。

線維芽細胞において HSV 感染で I 型 IFN 産生が誘導されることが示され、この I 型 IFN 産生に mTORC1、mTORC2 の依存度が高いことが示唆された(Fig. 21)。

線維芽細胞 MEF では、I 型 IFN によって Unc93B1 の発現量が上昇することが報告されている(62)。これらのことから、ウイルス感染した細胞は I 型 IFN を産生することで、周りの細胞の Unc93B1 発現量を上昇させ、応答性を増加させていることが考えられる。今後は、TLR3 や Unc93B1 以外の TLR 応答制御分子についても IFN 添加による発現量の変化を検証する予定である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導ご鞭撻していただいた、東京大学医科学研究所感染遺伝学分野の三宅健介教授に厚く御礼申し上げます。また、研究の進め方において、多大なご助力、ご助言をいただいた斎藤伸一郎助教、柴田琢磨助教、福井竜太郎助教（感染遺伝学分野）に感謝いたします。また、TLR3 抗体を取得した村上祐輔博士および協力していただいた感染遺伝学分野のみなさまに感謝致します。

HSV 感染実験において、ご指導と助言をいただいた東京大学医科学研究所ウイルス病態制御分野の川口寧教授、加藤哲久助教、有井潤助教に御礼申し上げます。

Rab7a^{floxed/floxed} の MEF を供与いただいた大阪大学産業科学研究所の和田洋准教授、同志社女子大学の和田戈虹教授に御礼申し上げます。

次世代シーケンサー解析を行うにあたり、ご助力をいただいた東京大学医科学研究所臨床ゲノム腫瘍学分野古川洋一教授、山口貴世志助教、畠山晴良さんに感謝いたします。

gRNA シーケンス解析のためのプログラムを作成の際に、ご指導、ご助力をいただいた東京大学医科学研究所 DNA 情報解析分野宮野悟教授、井元清哉教授、山口類准教授、清水英悟さんに感謝申し上げます。また、R 言語を使ったプログラム作成の際に、ご指導いただいた東京大学医科学研究所 DNA 情報解析分野システム免疫学社会連携部門木村恭将助教にも感謝申し上げます。

最後になりましたが、家族の協力がなかったらここまで充実した学生生活は送れなかったと思います。博士 4 年間の研究生生活を含む長い学生生活を一人で支え、励ましてくれた母に深く感謝いたします。

参考文献

1. Janeway, C., and K. Murphy. 2011. *Janeway's Immunobiology 8th*. Garland Science.
2. Ezekowitz, R. A. B., and J. Hoffmann. 2003. *Innate Immunity*. Humana Press.
3. Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86: 973-983.
4. Heine, H., and E. Lien. 2003. Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *Int Arch Allergy Immunol* 130: 180-192.
5. Kawai, T., and S. Akira. 2007. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13: 460-469.
6. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783-801.
7. Beutler, B., Z. Jiang, P. Georgel, K. Crozat, B. Croker, S. Rutschmann,

- X. Du, and K. Hoebe. 2006. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol* 24: 353-389.
8. Takeuchi, O., S. Sato, T. Horiuchi, K. Hoshino, K. Takeda, Z. Dong, R. L. Modlin, and S. Akira. 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 169: 10-14.
9. Botos, I., D. M. Segal, and D. R. Davies. 2011. The structural biology of Toll-like receptors. *Structure* 19: 447-459.
10. Nagai, Y., S. Akashi, M. Nagafuku, M. Ogata, Y. Iwakura, S. Akira, T. Kitamura, A. Kosugi, M. Kimoto, and K. Miyake. 2002. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 3: 667-672.
11. Takahashi, K., T. Shibata, S. Akashi-Takamura, T. Kiyokawa, Y. Wakabayashi, N. Tanimura, T. Kobayashi, F. Matsumoto, R. Fukui, T. Kouro, Y. Nagai, K. Takatsu, S. Saitoh, and K. Miyake. 2007. A protein associated with Toll-like receptor (TLR) 4 (PRAT4A) is

- required for TLR-dependent immune responses. *J Exp Med* 204: 2963-2976.
12. Fitzgerald, K. A., D. C. Rowe, B. J. Barnes, D. R. Caffrey, A. Visintin, E. Latz, B. Monks, P. M. Pitha, and D. T. Golenbock. 2003. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 198: 1043-1055.
 13. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, S. Uematsu, K. Hoshino, T. Kaisho, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira. 2003. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 4: 1144-1150.
 14. Ishikawa, H., and G. N. Barber. 2008. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 455: 674-678.
 15. Ishikawa, H., Z. Ma, and G. N. Barber. 2009. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 461: 788-792.
 16. Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi,

- M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira, and T. Fujita. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5: 730-737.
17. Kato, H., O. Takeuchi, E. Mikamo-Sato, R. Hirai, T. Kawai, K. Matsushita, A. Hiiragi, T. S. Dermody, T. Fujita, and S. Akira. 2008. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* 205: 1601-1610.
18. Blasius, A. L., and B. Beutler. 2010. Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 32: 305-315.
19. Beutler, B. 2009. Microbe sensing, positive feedback loops, and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Immunol Rev* 227: 248-263.
20. Kim, Y. M., M. M. Brinkmann, M. E. Paquet, and H. L. Ploegh. 2008. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 452: 234-238.
21. Tabeta, K., K. Hoebe, E. M. Janssen, X. Du, P. Georgel, K. Crozat, S. Mudd, N. Mann, S. Sovath, J. Goode, L. Shamel, A. A. Herskovits, D.

- A. Portnoy, M. Cooke, L. M. Tarantino, T. Wiltshire, B. E. Steinberg, S. Grinstein, and B. Beutler. 2006. The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat Immunol* 7: 156-164.
22. Brinkmann, M. M., E. Spooner, K. Hoebe, B. Beutler, H. L. Ploegh, and Y. M. Kim. 2007. The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J Cell Biol* 177: 265-275.
23. Fukui, R., S. Saitoh, F. Matsumoto, H. Kozuka-Hata, M. Oyama, K. Tabeta, B. Beutler, and K. Miyake. 2009. Unc93B1 biases Toll-like receptor responses to nucleic acid in dendritic cells toward DNA- but against RNA-sensing. *J Exp Med* 206: 1339-1350.
24. Fukui, R., S. Saitoh, A. Kanno, M. Onji, T. Shibata, A. Ito, M. Matsumoto, S. Akira, N. Yoshida, and K. Miyake. 2011. Unc93B1 restricts systemic lethal inflammation by orchestrating Toll-like receptor 7 and 9 trafficking. *Immunity* 35: 69-81.
25. Christensen, S. R., J. Shupe, K. Nickerson, M. Kashgarian, R. A.

- Flavell, and M. J. Shlomchik. 2006. Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity* 25: 417-428.
26. Deane, J. A., P. Pisitkun, R. S. Barrett, L. Feigenbaum, T. Town, J. M. Ward, R. A. Flavell, and S. Bolland. 2007. Control of toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation. *Immunity* 27: 801-810.
27. Kawai, T., and S. Akira. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11: 373-384.
28. Murakami, Y., R. Fukui, Y. Motoi, A. Kanno, T. Shibata, N. Tanimura, S. Saitoh, and K. Miyake. 2014. Roles of the cleaved N-terminal TLR3 fragment and cell surface TLR3 in double-stranded RNA sensing. *J Immunol* 193: 5208-5217.
29. Wang, T., T. Town, L. Alexopoulou, J. F. Anderson, E. Fikrig, and R. A. Flavell. 2004. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* 10: 1366-1373.

30. Daffis, S., M. A. Samuel, M. S. Suthar, M. Gale, and M. S. Diamond. 2008. Toll-like receptor 3 has a protective role against West Nile virus infection. *J Virol* 82: 10349-10358.
31. Lafaille, F. G., I. M. Pessach, S. Y. Zhang, M. J. Ciancanelli, M. Herman, A. Abhyankar, S. W. Ying, S. Keros, P. A. Goldstein, G. Mostoslavsky, J. Ordovas-Montanes, E. Jouanguy, S. Plancoulaine, E. Tu, Y. Elkabetz, S. Al-Muhsen, M. Tardieu, T. M. Schlaeger, G. Q. Daley, L. Abel, J. L. Casanova, L. Studer, and L. D. Notarangelo. 2012. Impaired intrinsic immunity to HSV-1 in human iPSC-derived TLR3-deficient CNS cells. *Nature* 491: 769-773.
32. Takemura, N., T. Kawasaki, J. Kunisawa, S. Sato, A. Lamichhane, K. Kobiyama, T. Aoshi, J. Ito, K. Mizuguchi, T. Karuppuchamy, K. Matsunaga, S. Miyatake, N. Mori, T. Tsujimura, T. Satoh, Y. Kumagai, T. Kawai, D. M. Standley, K. J. Ishii, H. Kiyono, S. Akira, and S. Uematsu. 2014. Blockade of TLR3 protects mice from lethal radiation-induced gastrointestinal syndrome. *Nat Commun* 5: 3492.
33. Laplante, M., and D. M. Sabatini. 2012. mTOR signaling in growth

- control and disease. *Cell* 149: 274-293.
34. Hara, K., K. Yonezawa, Q. P. Weng, M. T. Kozlowski, C. Belham, and J. Avruch. 1998. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J Biol Chem* 273: 14484-14494.
35. Settembre, C., R. Zoncu, D. L. Medina, F. Vetrini, S. Erdin, T. Huynh, M. Ferron, G. Karsenty, M. C. Vellard, V. Facchinetti, D. M. Sabatini, and A. Ballabio. 2012. A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J* 31: 1095-1108.
36. Shimobayashi, M., and M. N. Hall. 2014. Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 155-162.
37. Ikenoue, T., K. Inoki, Q. Yang, X. Zhou, and K. L. Guan. 2008. Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J* 27: 1919-1931.
38. Mizunuma, M., E. Neumann-Haefelin, N. Moroz, Y. Li, and T. K.

- Blackwell. 2014. mTORC2-SGK-1 acts in two environmentally responsive pathways with opposing effects on longevity. *Aging Cell* 13: 869-878.
39. Kobayashi, T., S. Shimabukuro-Demoto, R. Yoshida-Sugitani, K. Furuyama-Tanaka, H. Karyu, Y. Sugiura, Y. Shimizu, T. Hosaka, M. Goto, N. Kato, T. Okamura, M. Suematsu, S. Yokoyama, and N. Toyama-Sorimachi. 2014. The histidine transporter SLC15A4 coordinates mTOR-dependent inflammatory responses and pathogenic antibody production. *Immunity* 41: 375-388.
40. Azwa, A., and S. E. Barton. 2009. Aspects of herpes simplex virus: a clinical review. *J Fam Plann Reprod Health Care* 35: 237-242.
41. Kinchington, P. R., A. J. Leger, J. M. Guedon, and R. L. Hendricks. 2012. Herpes simplex virus and varicella zoster virus, the house guests who never leave. *Herpesviridae* 3: 5.
42. Kurt-Jones, E. A., M. Chan, S. Zhou, J. Wang, G. Reed, R. Bronson, M. M. Arnold, D. M. Knipe, and R. W. Finberg. 2004. Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal

- encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1315-1320.
43. Kurt-Jones, E. A., J. Belko, C. Yu, P. E. Newburger, J. Wang, M. Chan, D. M. Knipe, and R. W. Finberg. 2005. The role of toll-like receptors in herpes simplex infection in neonates. *J Infect Dis* 191: 746-748.
44. Hochrein, H., B. Schlatter, M. O'Keeffe, C. Wagner, F. Schmitz, M. Schiemann, S. Bauer, M. Suter, and H. Wagner. 2004. Herpes simplex virus type-1 induces IFN- α production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 11416-11421.
45. Zhang, S. Y., E. Jouanguy, S. Ugolini, A. Smahi, G. Elain, P. Romero, D. Segal, V. Sancho-Shimizu, L. Lorenzo, A. Puel, C. Picard, A. Chapgier, S. Plancoulaine, M. Titeux, C. Cogan, H. von Bernuth, C. L. Ku, A. Casrouge, X. X. Zhang, L. Barreiro, J. Leonard, C. Hamilton, P. Lebon, B. Héron, L. Vallée, L. Quintana-Murci, A. Hovnanian, F. Rozenberg, E. Vivier, F. Geissmann, M. Tardieu, L. Abel, and J. L. Casanova. 2007. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* 317: 1522-1527.

46. Sancho-Shimizu, V., S. Y. Zhang, L. Abel, M. Tardieu, F. Rozenberg, E. Jouanguy, and J. L. Casanova. 2007. Genetic susceptibility to herpes simplex virus 1 encephalitis in mice and humans. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7: 495-505.
47. Okai, T., Y. Araki, M. Tada, T. Tateno, K. Kontani, and T. Katada. 2004. Novel small GTPase subfamily capable of associating with tubulin is required for chromosome segregation. *J Cell Sci* 117: 4705-4715.
48. Kawamura, N., G. H. Sun-Wada, M. Aoyama, A. Harada, S. Takasuga, T. Sasaki, and Y. Wada. 2012. Delivery of endosomes to lysosomes via microautophagy in the visceral endoderm of mouse embryos. *Nat Commun* 3: 1071.
49. Guo, Y., M. Audry, M. Ciancanelli, L. Alsina, J. Azevedo, M. Herman, E. Anguiano, V. Sancho-Shimizu, L. Lorenzo, E. Pauwels, P. B. Philippe, R. Pérez de Diego, A. Cardon, G. Vogt, C. Picard, Z. Z. Andrianirina, F. Rozenberg, P. Lebon, S. Plancoulaine, M. Tardieu, Valérie Doireau, E. Jouanguy, D. Chaussabel, F. Geissmann, L. Abel,

- J. L. Casanova, and S. Y. Zhang. 2011. Herpes simplex virus encephalitis in a patient with complete TLR3 deficiency: TLR3 is otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med* 208: 2083-2098.
50. Rosa-Ferreira, C., and S. Munro. 2011. Arl8 and SKIP act together to link lysosomes to kinesin-1. *Dev Cell* 21: 1171-1178.
51. Vanlandingham, P. A., and B. P. Ceresa. 2009. Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. *J Biol Chem* 284: 12110-12124.
52. Wang, T., Z. Ming, W. Xiaochun, and W. Hong. 2011. Rab7: role of its protein interaction cascades in endo-lysosomal traffic. *Cell Signal* 23: 516-521.
53. Pankiv, S., E. A. Alemu, A. Brech, J. A. Bruun, T. Lamark, A. Overvatn, G. Bjørkøy, and T. Johansen. 2010. FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *J Cell Biol* 188: 253-269.
54. Vandekerckhove, J., A. Deboben, M. Nassal, and T. Wieland. 1985.

- The phalloidin binding site of F-actin. *EMBO J* 4: 2815-2818.
55. Ma, C., N. P. Spies, T. Gong, C. X. Jones, and W. M. Chu. 2015. Involvement of DNA-PKcs in the type I IFN response to CpG-ODNs in conventional dendritic cells in TLR9-dependent or -independent manners. *PLoS One* 10: e0121371.
56. Soliman, G. A., H. A. Acosta-Jaquez, E. A. Dunlop, B. Ekim, N. E. Maj, A. R. Tee, and D. C. Fingar. 2010. mTOR Ser-2481 autophosphorylation monitors mTORC-specific catalytic activity and clarifies rapamycin mechanism of action. *J Biol Chem* 285: 7866-7879.
57. Altomare, D. A., and A. R. Khaled. 2012. Homeostasis and the importance for a balance between AKT/mTOR activity and intracellular signaling. *Curr Med Chem* 19: 3748-3762.
58. Lee, C. C., A. M. Avalos, and H. L. Ploegh. 2012. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat Rev Immunol* 12: 168-179.
59. Lee, B. L., and G. M. Barton. 2014. Trafficking of endosomal Toll-like receptors. *Trends Cell Biol* 24: 360-369.

60. Kato, A., Z. Liu, A. Minowa, T. Imai, M. Tanaka, K. Sugimoto, Y. Nishiyama, J. Arii, and Y. Kawaguchi. 2011. Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 and major tegument protein UL47 reciprocally regulate their subcellular localization in infected cells. *J Virol* 85: 9599-9613.
61. Betz, C., and M. N. Hall. 2013. Where is mTOR and what is it doing there? *J Cell Biol* 203: 563-574.
62. Panchanathan, R., H. Liu, and D. Choubey. 2013. Expression of murine Unc93b1 is up-regulated by interferon and estrogen signaling: implications for sex bias in the development of autoimmunity. *Int Immunol* 25: 521-529.
63. Matsumoto, M., K. Funami, M. Tanabe, H. Oshiumi, M. Shingai, Y. Seto, A. Yamamoto, and T. Seya. 2003. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 171: 3154-3162.
64. Korolchuk, V. I., S. Saiki, M. Lichtenberg, F. H. Siddiqi, E. A. Roberts, S. Imarisio, L. Jahreiss, S. Sarkar, M. Futter, F. M. Menzies, C. J.

- O'Kane, V. Deretic, and D. C. Rubinsztein. 2011. Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nat Cell Biol* 13: 453-460.
65. Mancuso, G., M. Gambuzza, A. Midiri, C. Biondo, S. Papasergi, S. Akira, G. Teti, and C. Beninati. 2009. Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat Immunol* 10: 587-594.
66. Wang, Y., T. Chen, C. Han, D. He, H. Liu, H. An, Z. Cai, and X. Cao. 2007. Lysosome-associated small Rab GTPase Rab7b negatively regulates TLR4 signaling in macrophages by promoting lysosomal degradation of TLR4. *Blood* 110: 962-971.
67. Korolchuk, V. I., and D. C. Rubinsztein. 2011. Regulation of autophagy by lysosomal positioning. *Autophagy* 7: 927-928.
68. Tomek, K., R. Wagner, F. Varga, C. F. Singer, H. Karlic, and T. W. Grunt. 2011. Blockade of fatty acid synthase induces ubiquitination and degradation of phosphoinositide-3-kinase signaling proteins in ovarian cancer. *Mol Cancer Res* 9: 1767-1779.

69. Eskelinen, E. L., and P. Saftig. 2009. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1793: 664-673.
70. Cullberg, K. B., J. Larsen, S. B. Pedersen, and B. Richelsen. 2014. Effects of LPS and dietary free fatty acids on MCP-1 in 3T3-L1 adipocytes and macrophages in vitro. *Nutr Diabetes* 4: e113.
71. Pal, D., S. Dasgupta, R. Kundu, S. Maitra, G. Das, S. Mukhopadhyay, S. Ray, S. S. Majumdar, and S. Bhattacharya. 2012. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat Med* 18: 1279-1285.
72. Zhu, Y., A. Kodvawala, and D. Y. Hui. 2010. Apolipoprotein E inhibits toll-like receptor (TLR)-3- and TLR-4-mediated macrophage activation through distinct mechanisms. *Biochem J* 428: 47-54.
73. Wang, S., K. Wang, R. Lin, and C. Zheng. 2013. Herpes simplex virus 1 serine/threonine kinase US3 hyperphosphorylates IRF3 and inhibits beta interferon production. *J Virol* 87: 12814-12827.
74. Norman, K. L., and P. Sarnow. 2010. Herpes Simplex Virus is Akt-ing

in translational control. *Genes Dev* 24: 2583-2586.