

[課程-2]

審査の結果の要旨

山本 千香子

本研究は病原体受容体である TLR7 と TLR9 の制御に関わることは報告されている Unc93B1 の詳細な制御メカニズムを明らかにするため、Unc93B1 D34A 変異体が TLR7 の応答性を増強し、TLR9 の応答性を減弱させる分子機序を明らかにすることを目的としたものであり、以下の結果を得ている。

1. Unc93B1 と TLR7 及び TLR9 の会合を野生型 Unc93B1 と Unc93B1 D34A 変異体との間で比較した結果、Unc93B1 D34A 変異体は TLR9 との会合が減弱した。また、Unc93B1 D34A 変異体との共発現下では切断型 TLR9 の量が減弱した。そのため、Unc93B1 D34A 変異体において TLR9 の応答性が減弱するメカニズムとして、TLR9 の切断が抑制されることが原因である可能性が示唆された。また、TLR7 は野生型 Unc93B1 と Unc93B1 D34A 変異体との間で Unc93B1 との会合も切断型 TLR7 の量にも顕著な変化は見られなかった。
2. TLR9 は切断型 TLR9 の N 末端のアミノ酸解析により 461～467 番目のアミノ酸の間で切断されることが報告されているため、TLR9 切断部位周辺のアミノ酸を 467 番目のアミノ酸から N 末側に 8～13 個欠失させた変異体を作製した。FlagHis タグを C 末側に付加した TLR9 変異体の切断型 TLR9 の量を比較すると 461～467 番目のアミノ酸を欠失した変異体(d13)では、切断型 TLR9(C ter.)が検出できなかった。
3. 切断されない TLR9 の応答性を検討するために Flag-His タグを C 末側に付加した TLR9 野生型および d13 変異体、455～469 番目のアミノ酸をすべてアラニンに置換した変異体(Ala13)を、Ba/F3 細胞に発現させて解析した。その結果、TLR9 変異体(d13、Ala13)は共にリガンド刺激依存的な NF- $\kappa$ B 活性化が優位に減弱したため、TLR9 の切断は、TLR9 のリガンド応答による NF- $\kappa$ B 活性化に重要である可能性が示唆された。
4. Primary の細胞で TLR9 変異体(d13、Ala13)の応答性を検討するために、TLR9 変異体を発現するノックインマウスを作製した。作製したノックインマウスと野生型マ

- ウス間で TLR9 の mRNA 量に有意な差がないことを real-time PCR で確認した。
5. 個体レベルでの TLR9 変異体の応答性について比較するために、TLR9 ノックアウトマウス、TLR9 変異体 (d13、Ala13) ノックインマウス、野生型マウスそれぞれに TLR9 リガンド CpG-B1668 を静脈投与し、血清中のサイトカイン、ケモカイン量を比較した。Ba/F3 細胞での結果とは異なり、TLR9 変異体は刺激依存的なサイトカイン産生が認められたが、測定した IL12p40、TNF $\alpha$ 、RANTES の量は野生型に比較して TLR9 変異体ノックインマウスにおいて CpG-B 依存的に産生される量が有意に減弱した。
  6. マウス由来細胞を用いて免疫細胞毎の TLR9 応答能について比較した。細胞は骨髄細胞誘導性 cDC (conventional dendritic cells)、Macrophage、pDC (plasmacytoid dendritic cells) 及び脾臓由来 B 細胞を利用した。それぞれの細胞を TLR9 リガンド CpG-A1585 及び CpG-B1668 で刺激し、TLR9 応答について比較した。その結果、Macrophage と cDC においては、TLR9 変異体ノックインマウスで応答が優位に抑制された。一方、pDC と脾臓由来 B 細胞においては、TLR9 応答の有意な抑制が認められない条件もあった。
  7. マウス由来細胞中の TLR9 の切断について比較した。その結果、すべての細胞種において TLR9 変異体ノックインマウスで、切断型 TLR9 が検出できるものの、切断型 TLR9 の量は野生型マウス由来細胞に比較して減弱していた。TLR9 変異体ノックインマウス由来 Macrophage については切断型 TLR9 の量が減弱していただけでなく、切断されていない TLR9 の量が増加していた。そのため、TLR9 変異体ノックインマウス由来 Macrophage での TLR9 応答抑制は、TLR9 の切断型の割合の減弱によるものと示唆された。しかし、cDC、pDC、脾臓細胞では、切断型 TLR9 の量だけでなく免疫沈降できた TLR9 の量も減少していたため、TLR9 応答抑制の原因が TLR9 の切断型の割合の減弱によるものと結論付けることはできなかった。
  8. Unc93B1 が TLR7 と TLR9 のどの分子構造を識別して応答を制御しているのかを検討した。そこで、TLR7 と TLR9 を 3 つの機能ドメイン、LRR (leucine rich repeat)・膜貫通領域・細胞質領域に分け、それぞれを入れ替えた TLR7・9 キメラを作製し、

解析することで Unc93B1 によって識別される領域を特定することを試みた。TLR7・9 キメラと野生型及び D34A 変異体の Unc93B1 の会合を比較した。その結果、TLR7 の膜貫通領域と細胞質領域を TLR9 に置換した T799 では、TLR9 と同様に野生型 Unc93B1 に比較して Unc93B1 D34A 変異体で会合量が減弱し、TLR9 の膜貫通領域と細胞質領域を TLR7 に置換した T977 や TLR9 の細胞質領域を TLR7 に置換した T997 では、野生型 Unc93B1 と Unc93B1 D34A 変異体の間で会合量にほとんど差が見られず、切断型 TLR の量にも変化が見られなかった。この結果から、Unc93B1 は、TLR9 の細胞質領域及び膜貫通領域を TLR7 と識別して、TLR9 との会合を制御していることが示唆された。

9. Unc93B1 による TLR7 及び TLR9 の応答の相反的制御が TLR7 と TLR9 のどの分子構造に依存するのか検討した。TLR7 の細胞質領域を TLR9 に置換した T779 では、TLR9 のように野生型 Unc93B1 発現下に比較して Unc93B1 D34A 変異体発現下でリガンド刺激依存的な NF- $\kappa$ B 活性化が減弱した。TLR9 の細胞質領域を TLR7 に置換した T997 では、野生型 Unc93B1 発現下に比較して Unc93B1 D34A 変異体発現下でリガンド刺激依存的な NF- $\kappa$ B 活性化が TLR7 と同様に亢進した。この結果から、Unc93B1 による TLR7 及び TLR9 の応答の相反的制御は、それぞれの TLR の細胞質領域を識別することで制御されていることが示唆された。

以上、本論文は Unc93B1 D34A 変異体が TLR9 の応答性を減弱させる分子機序として、TLR9 と Unc93B1 の会合が減弱し、TLR9 の切断が減少するところが原因となる可能性を示した。また、Unc93B1 の 34 番目のアスパラギン酸は TLR9 と TLR7 の細胞質領域を識別することでそれぞれの応答性を制御していることを示した。本研究では、これまで詳細に示されてこなかった Unc93B1 D34A 変異体による TLR7、TLR9 の応答性の相反制御の分子機序の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位を授与するに値するものと考えられる。