

# 論文の内容の要旨

## 核酸認識型 Toll 様受容体を介した サイトカイン産生における 低分子量 G タンパク質 Arl8 の機能解析

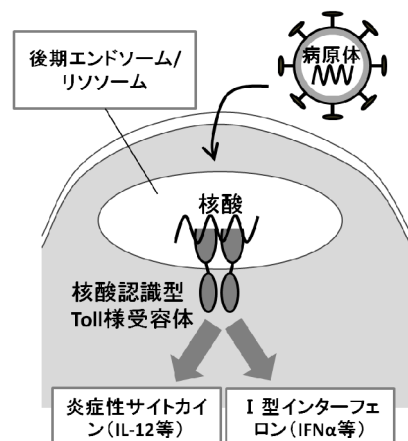
阿部 芙美子

### 【序】

核酸認識型の Toll 様受容体 (TLR) は、病原体の核酸成分を認識することで、自然免疫による生体防御機構を作動させる。例えば TLR7 や TLR9 は、形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells; pDC) などにおいて病原体由来の一本鎖 RNA や非メチル化 CpG モチーフを有する DNA を認識し、I 型インターフェロン (IFN) や炎症性サイトカインの産生を誘導することが知られている (図1)。また、TLR7/TLR9 は全身性エリテマトーデスをはじめとする様々な自己免疫疾患にも関与すると考えられていることから、それらの受容体を介したシグナル伝達系が厳密に制御されていることが個体の機能維持に重要である。

TLR7 や TLR9 は小胞体で合成された後、膜貫通型タンパク質 Unc93B1 によって後期エンドソームやリソソームへと運ばれ、それらのオルガネラにおいて病原体由来の核酸を認識し、下流へシグナルを伝達すると考えられている。しかし、具体的にどのような機構で TLR7/TLR9 の輸送や活性化が制御されているのかについては良く分かっていない。

最近、マスマスペクトロメトリーを用いて Unc93B1 と共免疫沈降する物質の解析が行われ、低分子量 G タンパク質 Arf/Arl ファミリーに属する Arl8 が共沈降物の一つであることが明らかとなった。当研究室ではこれまでに線虫や動物細胞を用いた解析から、Arl8 が後期エンドソーム・リソソームに局在し、それらのオルガネラの機能動態に関与すること



【図1】 形質細胞様樹状細胞における核酸認識型 Toll 様受容体を介したサイトカインの産生

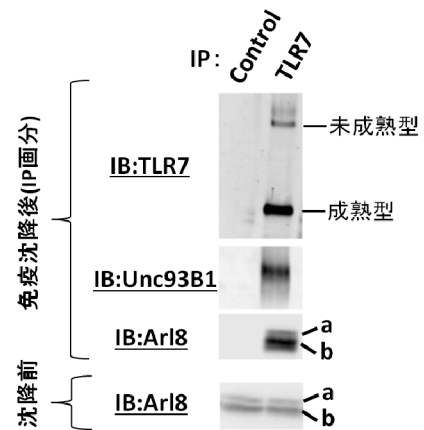
を報告している。哺乳動物においてArl8は、非常に相同性の高いArl8aとArl8bの2種類が存在するが、本研究では主にArl8bノックアウトマウスを用いて、TLR7/TLR9を介した細胞応答におけるArl8bの機能解析を行ったので報告する。

## 【方法と結果】

### 1. TLR7/Unc93B1はArl8と共沈降し、

#### TLR7はArl8陽性エンドソームに局在する

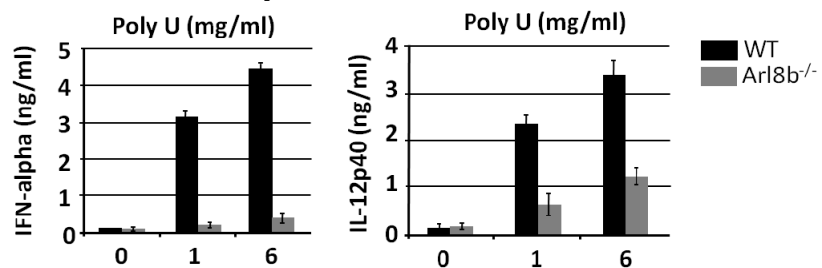
Arl8はUnc93B1の共免疫沈降画分に存在することが分かっていたが、Unc93B1はTLR7とも複合体を形成することが知られている。そこでArl8がTLR7/Unc93B1と相互作用するかを検討した。野生型マウスの骨髄より調製したpDCのライセートに対し、内在TLR7の免疫沈降を行ったところ、TLR7と共にUnc93B1、Arl8aおよびArl8bが共沈降することが明らかとなった(図2)。また、pDCにおいて、TLR7とArl8の局在を免疫染色法で検討したところ、TLR7とArl8は後期エンドソーム・リソソームと考えられるオルガネラに局在し、両者は部分的ではあるがよく共局在していることが分かった。一方、TLR9とArl8はほとんど共局在せず、TLR7とTLR9は全く共局在していないことも分かった。以上により、Arl8はpDCにおいて、TLR7/Unc93B1と直接または間接的に相互作用する可能性が明らかとなった。



【図2】形質細胞様樹状細胞におけるTLR7とArl8の共沈降

### 2. Arl8bはTLR7を介するサイトカインの産生に必要である

次に、Arl8がTLR7を介したI型IFNや炎症性サイトカインの産生に関与する可能性を検討した。野生型マウスまたはArl8bノックアウトマウスよりpDCを調製し、TLR7のリガンド(Poly U)で刺激を行った後、培地中に放出されたIFN $\alpha$ と炎症性サイトカイン(IL-12 p40サブユニット)の量をELISA法で測定した。その結果、Arl8bノックアウトマウスでは野生型に比べ、IFN $\alpha$ やIL-12 p40の産生が減弱していることが判明し、TLR7を介した正常なサイトカイン産生にArl8bが必要であることが明らかとなった(図3)。



【図3】野生型またはArl8b<sup>-/-</sup>マウスの形質細胞様樹状細胞において、TLR7刺激依存的に産生されるIFN $\alpha$ およびIL-12p40の定量

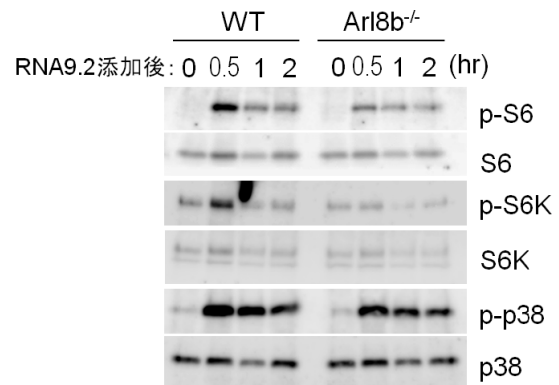
### 3. Arl8bはTLR7の後期エンドソーム・リソソームへの輸送に必須ではない

そこでTLR7を介したサイトカイン産生において、Arl8がどのステップに関与しているのかについて検討した。Arl8がUnc93B1の共免疫沈降物として見いだされた経緯から、TLR7の後期エンドソーム・リソソームへの輸送におけるArl8bの関与を検討した。野生型またはArl8bノックアウトマウスより調整したpDCにおいて、後期エンドソーム・リソソームのマーカーであるLAMP2と内在TLR7との共染色を行った。その結果、野生型およびArl8bノックアウトマウスのいずれにおいても、TLR7はLAMP2と共局在していることが

分かった。よって、Arl8b は TLR7 の酸性オルガネラへの輸送には必須ではないと考えられた。

#### 4. Arl8b は TLR7 を介した mTOR 経路の活性化に必要である

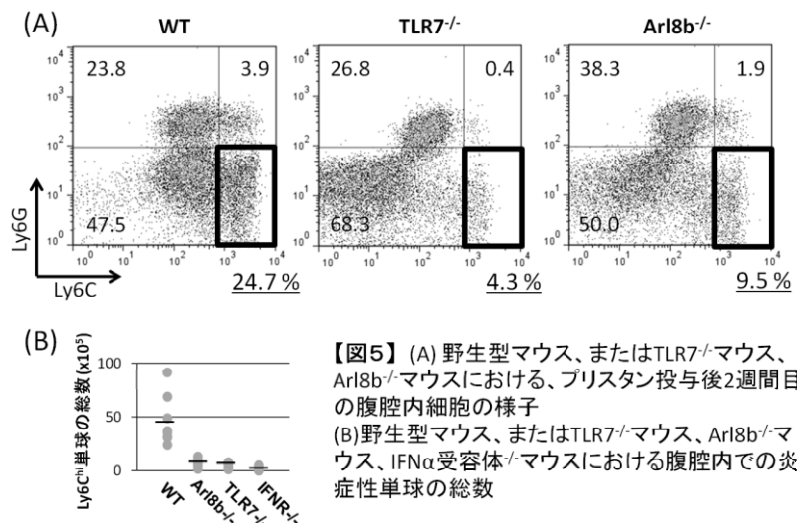
近年、セリン・スレオニンキナーゼである mTOR (mammalian target of rapamycin) の活性が、TLR7 を介した IFN $\alpha$  の産生に重要であることが報告されている。mTOR は TLR7 や Arl8b と同様に後期エンドソーム・リソソームに局在することが知られている。そこで、野生型と Arl8b ノックアウトマウスの pDC における、TLR7 を介した mTOR 経路の活性化について検討を行った。リン酸緩衝生理食塩水中で pDC に TLR7 リガンド(RNA 9.2s-DR)を添加し、mTOR の基質として知られている p70 S6K (ribosomal protein S6 kinase) および S6 のリン酸化状態をウェスタンブロット法で検出した。その結果、野生型の pDC では、リガンド刺激依存的に S6K (T389) および S6 (S235/6) のリン酸化が観察されたが、Arl8b ノックアウトの pDC ではそれらが顕著に抑制されていた(図4)。一方で、mTOR 経路とは別に、TLR7 の下流にあることが知られている p38 MAPK 経路の活性化は、野生型と Arl8b ノックアウトマウスで同程度であった。以上により、Arl8b は mTOR 経路の活性化に寄与することで、TLR7 を介したサイトカイン産生に対して促進的に機能する可能性が示唆された。



【図4】野生型またはArl8b<sup>-/-</sup>マウス由来の形質細胞様樹状細胞におけるTLR7刺激依存的なmTOR経路の活性化

#### 5. Arl8b ノックアウトマウスではプリスタン誘導性の腹膜炎が抑制される

プリスタン (2,6,10,14-tetramethylpentadecane) をマウスの腹腔に投与すると、腹腔内に炎症性単球 (CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>lo</sup>Ly6C<sup>hi</sup>) が浸潤し、I 型 IFN を産生して慢性的な腹膜炎が引き起こされることが知られている。そしてこの腹腔内への炎症性単球の浸潤は、I 型 IFN や TLR7 に依存的であることが報告されている。In vivo における Arl8b の機能を解析する目的で、プリスタン投与後 2 週間目に採取した腹腔内細胞を、表面抗原 (CD11b, Ly6C, Ly6G) に対する蛍光抗体で標識し、フローサイトメトリーを用いて炎症性単球の割合を測定した。その結果、野生型マウスに比べると Arl8b ノックアウトマウスでは炎症性単球の割合が顕著に減少していることが分かった(図5)。よって、In vivo においても、Arl8b が TLR7 を介した I 型 IFN の産生に関与している可能性が示唆された。



【図5】(A)野生型マウス、またはTLR7<sup>-/-</sup>マウス、Arl8b<sup>-/-</sup>マウスにおける、プリスタン投与後2週間目の腹腔内細胞の様子 (B)野生型マウス、またはTLR7<sup>-/-</sup>マウス、Arl8b<sup>-/-</sup>マウス、IFN $\alpha$ 受容体<sup>-/-</sup>マウスにおける腹腔内での炎症性単球の総数

## 【まとめと考察】

本研究を通じて、(1)pDCにおいてArl8はTLR7/Unc93B1と共沈降し、TLR7とArl8は後期エンドソーム・リソソームと考えられるオルガネラ上で共局在すること、(2)pDCにおけるTLR7を介したサイトカイン産生にArl8bが必要であることが分かった。また個体レベルでも、(3)プリスタン誘導性の腹膜炎においてArl8bがTLR7を介したI型IFNの産生に関与している可能性が示された。さらに、(4)Arl8bはTLR7下流のmTOR経路の活性化に必要であることが分かった。

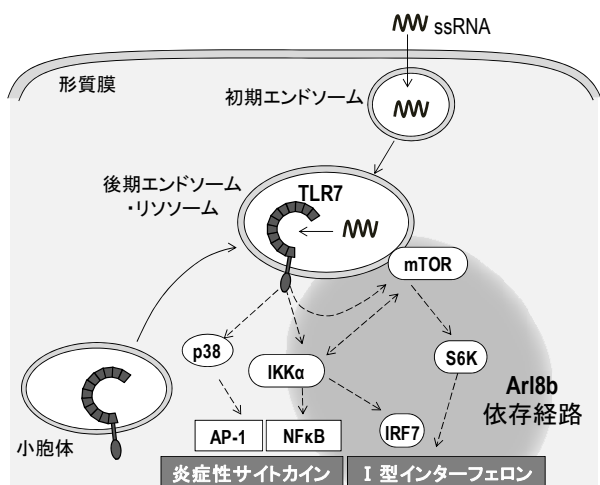
既に、mTORの阻害は、pDCからのTLR7依存的なIFN $\alpha$ の産生を抑制することが報告されており、Arl8bはこのTLR7依存的なmTOR経路の活性化に対する制御を介して、IFN $\alpha$ 産生に関与している可能性がある。また、mTOR上流に位置する可能性のあるIKK $\alpha$ は、TLR7下流のNF $\kappa$ B経路のシグナル伝達経路の伝達因子の一つであるが、このIKK $\alpha$ 欠損したマウスでは、Arl8bジーントラップマウスと同様に、pDCにおけるIL-12およびIFN $\alpha$ の産生が低下することが知られており、Arl8bがIKK $\alpha$ やその周囲の伝達因子の制御に関与している可能性も考えられる(図6)。今後、Arl8bジーントラップマウスにおけるTLR7依存的なmTOR経路の活性化の低下と、サイトカイン産生の減少とが、どのような関係性にあるのかということや、Arl8bが具体的にどのような分子の制御を介して、これらのシグナル伝達経路に関与しているのかを明らかにしてゆきたい。

また、Arl8はTLR7/Unc93B1と結合することが示された初めての低分子量Gタンパク質であるが、TLR7/Unc93B1/Arl8の複合体形成のmTOR経路の活性化またはIFN $\alpha$ の産生に対する機能的意義については未解明である。Arl8がTLR7やUnc93B1とどのような結合様式で相互作用しているのかといった分子メカニズムも含めて、さらなる検討が必要である。

個体レベルでの検討の結果から、今後、Arl8を介するTLR7シグナル伝達の詳細な機構を解析してゆくことで、全身性自己免疫疾患治療薬の新規標的の発掘に繋がる可能性も期待できることが分かった。

## 【謝辞】

本研究は、東京大学医科学研究所の三宅健介先生、齋藤伸一郎先生らとの共同研究によって行われました。



【図6】TLR7シグナル伝達において、Arl8bが関与する可能性のある経路(考察)