

博士論文

抗 TLR3 単クローン抗体を用いた TLR3 応答制御機構の解析

村上 祐輔

目次

序論

- (1) 自然免疫系と獲得免疫系 5
- (2) Toll 様受容体 (TLR) 9
- (3) 核酸認識 TLRs の細胞内局在と翻訳後調節 10

材料と方法 16

結果

- (1) 新規の抗マウス TLR3 単クローン抗体 (mAb) の樹立 24
- (2) マウス TLR3 の切断部位の同定 28
- (3) PaT3 による TLR3N 認識 30
- (4) TLR3N と TLR3C の会合と複合体形成 33
- (5) 二重鎖 RNA (dsRNA) の認識における TLR3N の重要性 36
- (6) CD8 α 陽性樹状細胞 (CD8 α ⁺cDC) について 43
- (7) CD8 α ⁺cDC と辺縁部 B 細胞表面における TLR3 の発現 43
- (8) 切断された TLR3 の細胞表面発現における Unc93B1 の役割 49
- (9) PaT3 による TLR3 応答の増強 52
- (10) PaT3 による TLR3N と TLR3C の会合の増強 55
- (11) PaT3 の増強効果における細胞内への取り込みの重要性 57
- (12) PaT3 による TLR3N+C 複合体の安定化 59

考察

(1) TLR の構造と切断部位 6 1

(2) TLR3N と 3C の会合とリガンド認識 6 3

(3) CD8 α 陽性樹状細胞 (CD8 α ⁺cDC) の細胞表面 TLR3 6 3

(4) PaT3 による TLR3 応答の増強 6 5

謝辞 6 8

引用文献 6 9

序文

(1) 自然免疫系と獲得免疫系

生体は常に外環境にさらされ、細菌、真菌、ウイルスといった微生物の侵入や感染から自己を防御している（図 1）。この生体防御機構を大きく 2 つに分けると、自然免疫系と獲得免疫系（または適応免疫系）に分けることができる。自然免疫系においては、様々な自然免疫受容体が知られているが、特に Toll 様受容体(Toll-like receptor)の発見を契機としてシグナル伝達を担う受容体群が、病原体等が持つ固有の分子パターンを認識し免疫系を活性化することが判明し注目を浴びている。自然免疫系に関わる細胞群には、樹状細胞（DC）、マクロファージ、好中球などが知られており、その機能は、補体の活性化、炎症誘導、異物の貪食、抗菌ペプチドの産生、また、自然免疫受容体が、リガンド応答し炎症性サイトカインや I 型インターフェロンの産生を行う(1)。一方、獲得免疫系は、遺伝子組み換えによって抗原受容体遺伝子の再構成が起こるため、抗原受容体の遺伝子領域は有限であるにも関わらず、そのレパートリーは無制限ともいえるほど膨大となり、多種・多様な病原体由来の非自己分子を特異的に認識できる(1)。適応免疫系に関わる主要な細胞群は、B リンパ球、T リンパ球であり、これらの細胞はそれぞれ単一の抗原受容体を発現している。そして、抗原による受容体の活性化により、抗原特異的なクローン性の増殖、分化が誘導され病原体等の異物の除去を行う (1)。

自然免疫系は、以前まで、獲得免疫系の補助的な役割に過ぎないと考えられていたが、シグナル伝達性自然免疫受容体の発見とその機能解析の進展によって、自然免疫系の活性化が獲得免疫系の誘導にも重要であることが広く知られるようになり、注目されるようになった。例えば、樹状細胞等の抗原提示細胞において、自然免疫受容体が病原体由来分子を認識した場合、TNF- α 、IL-6、IL-12等の炎症性サイトカインやケモカイン、I型インターフェロン産生などが誘導され、病原体の感染防御を担うと同時に、リンパ球の活性化を促すことで獲得免疫系を誘導することは広く知られている

(2)。さらに、リガンドに応答する自然免疫受容体の種類によって、誘導される炎症性サイトカイン等の標的遺伝子の種類や発現量に違いがあることが報告されており

(3)、病原体の種類によって、後に誘導される獲得免疫系の方向性に影響を与えることも知られている (3)。

自然免疫系の特徴は、応答時間の速さとも言われている。獲得免疫系は、病原体を認識する抗原受容体を発現するリンパ球クローンが活性化され、増殖・分化することによって異物の除去が完了するまで数日かかると言われているが、自然免疫系では、病原体が持つリガンドパターンを自然免疫受容体が認識することによって、速やかに活性化シグナル経路が活性化されることから、病原体の排除等において即時的な応答が可能である (4)。

また、近年の飛躍的な研究の進展から、自己免疫疾患や生活習慣病のような、生体の恒常性が破綻した免疫疾患にも自然免疫系が関わるということが報告されている (5,6)。

これは、自己由来の分子が細胞死などのよって放出される障害関連分子

(damage-associated molecular pattern molecules; DAMPs)によって自然免疫受容体が応答することが原因と考えられている (7)。

以上のように、自然免疫系の研究は、異物の侵入や感染防御の面だけでなく、生命体がいかに恒常性を維持しているのか理解する上で重要な分野であり、これからの健康科学、生命科学の発展に、非常に有用であると考えられる。

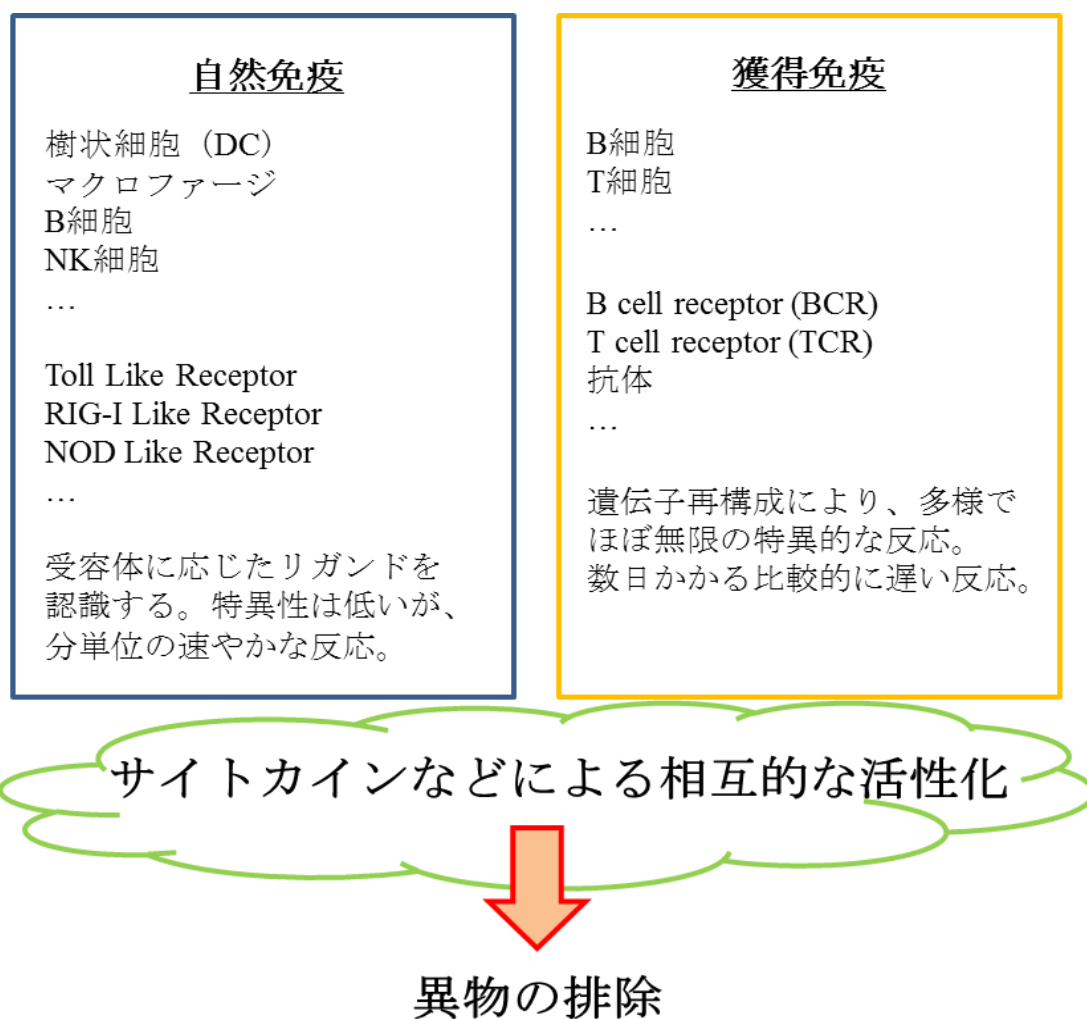


図1 自然免疫と獲得免疫

自然免疫では、微生物由来、または自己由来のリガンドに応答して、マクロファージや樹状細胞が、炎症性サイトカインやI型IFNの産生などを行う。続いて、獲得免疫の活性化が起こり、異物の排除や一連の免疫反応が完了する。

(2) Toll 様受容体 (TLR)

自然免疫系において、最初に発見された自然免疫受容体が Toll 様受容体(TLR)である。TLR は、病原体に共通するパターン構造を認識し、下流に免疫応答シグナルを伝える受容体として発見された。哺乳類での TLR 発見の端緒として、ショウジョウバエの Toll ファミリーがある。Toll は、ショウジョウバエの個体発生時に体軸を決定する分子として発見されたが、その後、抗菌ペプチド産生を誘導し、真菌の感染を防ぐことが明らかになった。そのため Toll 遺伝子に変異を持つショウジョウバエでは、真菌に感受性を示す (8,9)。続いて、1997 年に Toll のヒトホモログとして TLR4 がクローニングされた (10) のを皮切りに、現在まで、ヒトで 10 種類、マウスで 12 種類の TLR ファミリーメンバーが発見されており、おのおの異なるリガンドを認識し、免疫応答を惹起することで、生体防御の機能を発揮している。TLR の特徴的な構造は、I 型膜貫通タンパク質で、N 末端側に、基本的に 23 個のロイシンリッチリピート構造を持ち、C 末端側に Toll/IL-1 receptor domain (TIR domain) を、持つことが知られている (11)。

TLR は、認識するリガンドの種類によって、大きく二つのグループに分けることができる。細胞表面 TLR と呼ばれる、TLR4/MD2、TLR1/TLR2、TLR2/TLR6 は、菌体膜を構成する糖脂質を認識する。一方、TLR3、TLR7、TLR8、TLR9 は、細胞内小器官で微生物由来の核酸を認識する (12-15) (図 2)。核酸を認識する TLR の細胞内での局在に関しては、近年、新たな報告がなされ研究の発展が著しい。核酸認識 TLRs は、

自己と病原体由来のリガンドを区別できないため、その活性化が、時に生体の恒常性が破たんするような自己免疫疾患の原因になる (6)。そのため、核酸認識 TLRs のリガンド認識機構を詳細に明らかにすることは、感染症だけでなく自己免疫疾患のような非感染性炎症性疾患の病態解明にもつながるため重要である。

(3) 核酸を認識する TLRs の局在と翻訳後調節

前述したように、核酸認識 TLRs は、自己と病原体由来の核酸の区別が出来ないため、エンドリソソームにおいて、リガンド認識の場をしっかりと区分化する必要がある。自己に由来する核酸がヌクレアーゼによってすばやく分解されるのに比べて、微生物由来の核酸は、細菌の細胞壁またはウイルス粒子に守られているので分解されにくい。したがって、より簡単にエンドリソソームに到達し、自己由来の核酸よりも核酸認識 TLRs を刺激する (16,17)。さらに、エンドリソソームにおける TLRs の厳密な核酸の識別には、2つのメカニズムが考えられる。

一つは、TLRs は、エンドリソソームへ輸送後、タンパク質分解酵素による切断を受けた後、リガンドに応答することが可能となる。つまり、核酸を認識するにはエンドリソソームに輸送後、TLR の細胞外領域がタンパク質分解酵素による切断を受けて、活性化する必要があるということである。しかしながら、切断後、核酸認識 TLRs の N 末端側断片が、リガンド認識に必要なかは議論が分かれる問題であった。例えば、TLR9 の細胞外領域は、エンドリソソームで、アスパラギン・エンドペプチターゼ (AEP)

やカテプシンファミリーによって切断され活性化型となる (18, 19)。過去の報告で、TLR9 の C 末端側断片 (TLR9C) のみで、一本鎖 DNA を認識することが報告されていたが、その一方で TLR9 の N 末端側断片 (TLR9N) が、切断後も TLR9C と会合し、この会合がリガンド認識に不可欠であるという報告もある (20)。

また、一本鎖 RNA の受容体である TLR7 も、タンパク分解酵素による切断を受ける (21)。TLR7N 末端側断片はジスルフィド結合によって TLR7C 末端側断片につながれており、その結合は、TLR7 におけるタンパク質分解酵素による切断とリガンド応答のために不可欠である(21)。さらに、TLR8 と化学合成リガンドの複合体の結晶構造解析から、TLR8 も切断を受けること、また、TLR8 の N 末端側断片 (TLR8N) は C 末端側断片 (TLR8C) と会合することが分かっている。これは TLR8N と TLR8C の両方が、リガンド結合領域と TLR8 二量体形成領域を持っていること、リガンド認識と免疫反応に TLR8N が欠くことのできない役割を持つことを示している (22)。

二重鎖 RNA の受容体である TLR3 も切断を受ける(図 3)。しかし、正確な切断部位やリガンド認識部位は特定されておらず、TLR3 とリガンド複合体の結晶構造解析などで予想されるに留まっていた (23,24)。また、TLR3 がカテプシンファミリーによって切断され、N 末端側断片(TLR3N)と C 末端側断片(TLR3C)が会合して、二重鎖 RNA を認識することは示唆されてきた (25,26) が、TLR3N のリガンド認識における必要性の直接的な証拠は、上記で述べたように正確な切断部位が特定されていなかったため示されていなかった。

核酸の厳密な識別のための二つ目のメカニズムは、核酸認識 TLRs の細胞内輸送である。小胞体(ER)からの輸送は、多重膜貫通タンパクである Unc93B1 によって行われる (25,26)。この Unc93b1 による細胞内輸送は、TLR との会合に依存していると言われており、会合に重要なアミノ酸である H412 に変異を入れたマウス (3d マウス) では、Unc93B1 と核酸認識 TLR の会合ができないため、TLR の細胞内輸送ができず、TLR が ER に留まったままになるためリガンドに応答することができない (25,26)。

また、核酸認識 TLR のリガンド認識の場を、エンドライソソームに局限する必要性を考える上で、細胞表面への強制的な TLR9 の発現は、マウスで全身性の致死性炎症を引き起こすという報告がされた (27)。それにもかかわらず、最近の知見で、マウスの脾臓の樹状細胞 (DC) の細胞表面に TLR9 が発現していることが報告された (20)。このように、細胞表面の核酸認識 TLR の発現や機能は、未知の部分が多く残されており議論の余地がある。

TLR3 に関しても、細胞内の局在に関していくつかの報告がされている。ヒト TLR3 は、単球から誘導した樹状細胞ではなく、線維芽細胞株の表面に発現していることが示されている (28,29)。また、HEK293T 細胞で過剰発現させたヒト TLR3 は、細胞表面にほとんど発現しないが、上述した Unc93B1 を過剰発現させると、細胞表面に発現する TLR3 は増加する (30)。以上のような報告があるにも関わらず、マウスの免疫細胞表面の TLR3 の発現は、細胞表面の TLR3 を検出できる質の高い抗体が無かったため報告されていなかった。また、細胞表面 TLR3 の二重鎖 RNA 認識における役

割は、不明であった。

TLR3 は、抗腫瘍免疫において強いクロスプレゼンテーション能力を発揮する CD8 α 陽性樹状細胞で強く発現しており、詳細な分子メカニズムは不明であるが、TLR3 の活性化を通じて抗腫瘍効果を増強することが報告されている (31)。また、TLR3 がリガンド認識すると、I 型インターフェロンと炎症性サイトカインの急速で大量の産生を起こすが、TLR3 が欠損した患者では、この防御反応が起こらないため、単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) 脳炎の症状が重篤になることが知られている (32)。さらに、近年、自己由来 RNA への TLR3 応答も報告されている。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 (33)。

以上のことから、ウイルス感染だけでなく、組織の損傷による炎症と免疫反応が起きる際に、TLR3 が重要な役割をしていることは明白であり、TLR3 の細胞内での動態やリガンド認識機構の詳細な解明は、非常に重要である。今回、私が新たに樹立した 2 つの単クローン抗体によって、マウスの脾臓より分離した CD8 陽性樹状細胞と辺縁帯 B 細胞の細胞表面に TLR3 が強く発現していることを明らかにした。また、二重鎖 RNA を認識する際の TLR3N 末端側断片の必要性についても併せて以下に報告する。

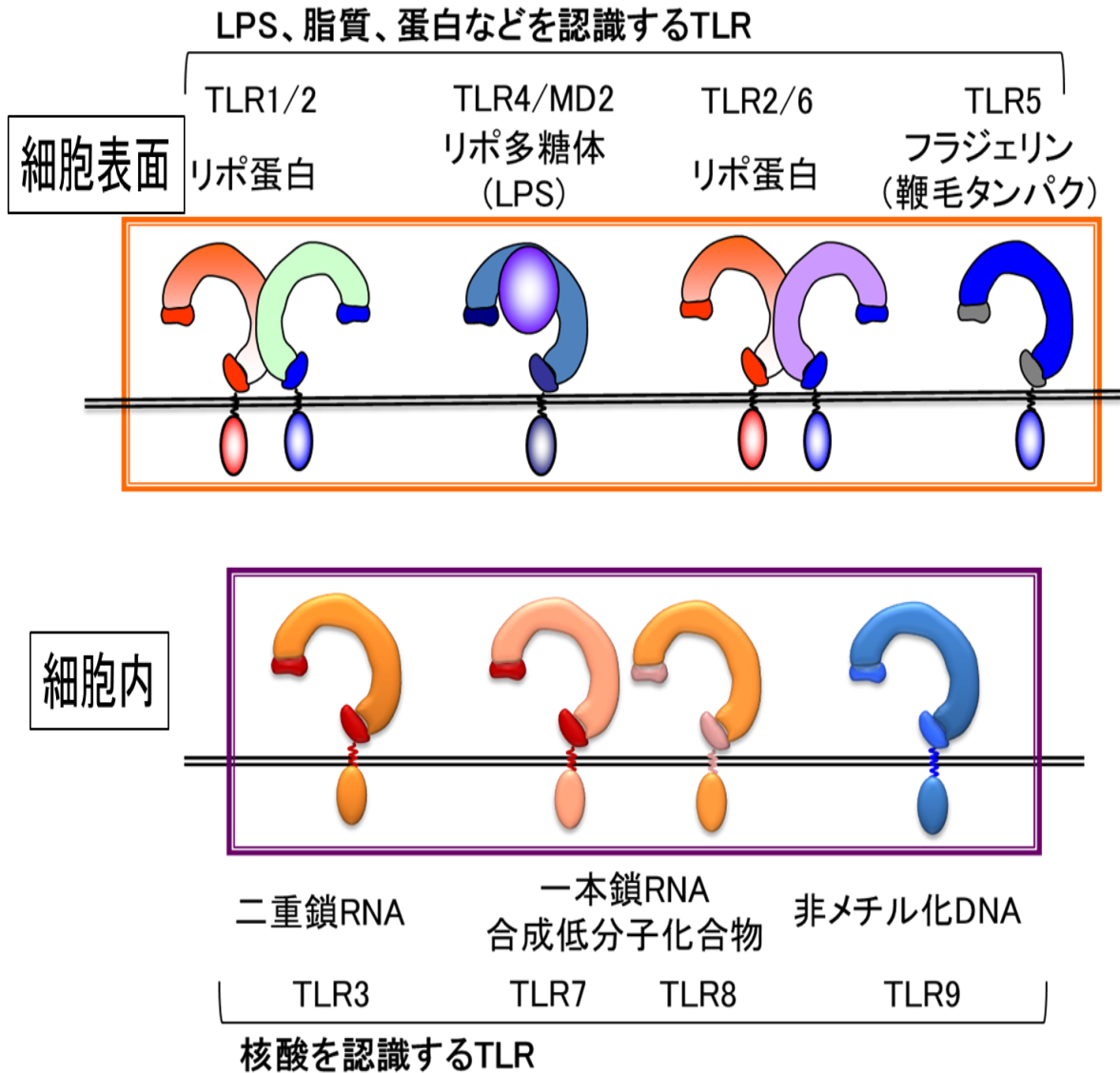


図 2 TLRs

各 TLR と明確になっているリガンドを示した。TLR1/2 および TLR2/6 は、ヘテロダイマーを形成する。TLR7 と TLR8 は、共通のリガンドを持つことが知られている。

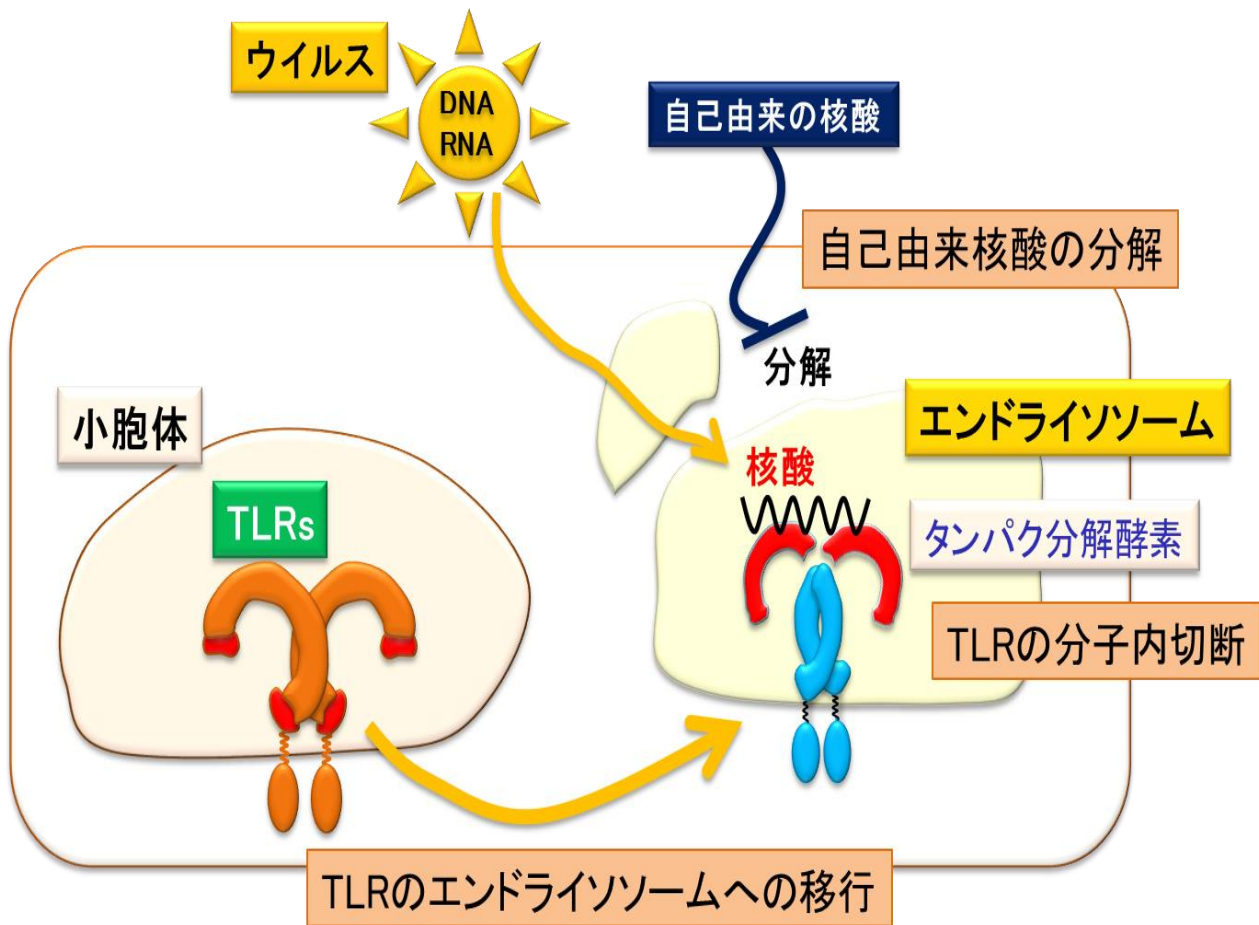


図 3 TLR3 の細胞内局在と翻訳後調節

マウス TLR3 は、定常時、Unc93B1 による運搬によって、小胞体 (ER) からエンドライソソームに移行する。また、ヒト TLR3 は、線維芽細胞株で、細胞表面にも発現していることが報告されている。エンドライソソームでは、タンパク分解酵素による切断を受け、活性型 TLR となり、この場で、リガンドに応答すると考えられている。

材料と方法

・抗マウス TLR3 単クローン抗体の樹立

抗マウス TLR3 単クローン抗体 (mAb) を樹立するために、*Tlr3*^{-/-} BALB/c マウスに、TLR3flag-6xHis を強制発現させた、プロ B 細胞由来の細胞株である Ba/F3 細胞 (Ba/F3-mTLR3fH) を、接種した。この際、アジュバントとして IFA/CFA (Incomplete/Complete Freund's Adjuvant) を用いた。次に、免疫を強めるために、PBS に懸濁した Ba/F3-mTLR3fH を 1 週間 1 回、計 3 回、接種した。最後の接種の 3 日後に、免疫したマウスの脾臓細胞と SP2/O 骨髓腫細胞を融合した。TLR3 mAb を産生しているハイブリドーマを、検出するために、ハイブリドーマの培養上清を用いた、Ba/F3-mTLR3fH の細胞膜透過染色を行い、FACSCalibur によって解析することで、陽性のクローンを選別した。

・試薬と抗体

LipidA は、Sigma-Aldrich から、Pam3CSK4、polyI:C は、Invivogen から購入した。ビオチン化された抗 Flag 抗体 (M2) と抗 Flag 抗体ビーズは、ともに Sigma-Aldrich から購入した。ウサギ Green Fluorescent Protein (GFP) ポリクローナル抗体 (pAb) と mAb (クローン FM264) は Invitrogen と MBL から購入した。TLR3 の N 末端側断片 (TLR3N) への pAb は、Millipore から購入した。

・マウスと細胞株

野生型 C57BL/6N は日本 SLC 社から購入した。 *Tlr3*^{-/-} C57BL/6N マウスは審良静雄教授（大阪大学）より提供を受けた。 *Unc93b1*^{3d/3d} マウスは、ブルース・ボイトラー教授（テキサス大学、USA）とスクリップス研究所により提供された。すべての動物実験は、医科学研究所（東京大学）の動物研究委員会の承認の元で行われた。マウス腹腔マクロファージ由来細胞株である J774.1 細胞は、RPMI1640 培養液（10%胎児ウシ血清（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）で培養した。Ba/F3 細胞は RPMI1640 培養液（IL-3、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）で培養された。骨髄(BM)から誘導したマクロファージ（BM-Mcs）は、 1×10^7 の BM 細胞を、100ng/ml コロニー刺激因子（Peprotech）を加えた DMEM 培養液（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）で 6 日間培養して、準備した。

・遺伝子のクローニング

マウス TLR3、7、8、9 およびヒト TLR3 の C 末端に、Flag-6xHis を付加し、各遺伝子は PCR によって増幅された。続いて、pMX、pMXpuro または pMXneo ベクターに導入された。pMX 系のベクターは、北村俊雄博士（東京大学）より提供された。Unc93B1 をノックダウンするために、shRNA をレトロウイルスベクターである pSSCH ベクターに導入した。

TLR3 の N 末端断片のために、TLR3 のアミノ酸のうち 1-342 (TLR3N342)、1-346 (TLR3N346) または 1-356 (TLR3N356) が、pMX ベクターに導入された。TLR3 の C 末端断片のために、TLR3 のアミノ酸のうち、シグナルペプチド配列を含む 1-35 と 343-905 (TLR3C343)、347-905 (TLR3C347)、または 357-905 (TLR3C357) をつないだ PCR 断片が、C 末端側に HA_x2 を付加し、pMX ベクターに導入された。以上の、遺伝子のベクターへの導入には、In-Fusion HD クローニング・キット (Clontech) または Rapid DNA Ligation kit (Roche) 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 (Roche) で遺伝子を導入した。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 (Roche) を混ぜ合わせて、遺伝子導入先の細胞に加えた。

・アミノ酸 N 末端シーケンス解析

TLR3-GFP を安定的に発現させた、マウスマクロファージ由来細胞株である RAW264.7 細胞を、 7×10^9 回収した。この細胞を、lysis buffer (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH 7.4)、1.0% TritonX-100、1 x complete EDTA(-) Cocktail (Roche)) で溶解した。

抗 GFP 抗体ビーズを溶解物に加え、4°Cで一晩反応させた。このビーズを、wash buffer (150mM NaCl、30mM Tris-HCl (pH 7.4)、0.1% TritonX-100) で2回洗浄した。そして、ビーズに付いたタンパク質は、elution buffer (150mM NaCl、30mM Glycine-HCl (pH 2.5)、0.1% TritonX-100) で抽出され、neutralization buffer (1M Tris-HCl (pH 8.0)) で中和された。採取されたサンプルは、Amicon TM Ultra (Millipore) によって濃縮され、次の buffer (10mM NaCl、0.1% TritonX-100) に透析された。濃縮したサンプルは、sample buffer (2% SDS、10% グリセロール、62.5mM Tris-HCl (pH 6.8)、0.025% BPB、5% 2ME)に溶かされて、96°C、5分間の処理後、SDS-PAGEを行った。SDS-PAGE後、PVDF膜に転写した。転写されたタンパクを、Coomassie brilliant blue (CBB)で染色し、TLR3NとTLR3Cを含む膜を切り出した。切り出した膜は、Edman degradation (アプロサイエンス社) によって、N末端アミノ酸配列を決定した。

・免疫沈降

採取した細胞を、1xPBSで2回洗浄し、lysis buffer (150mM NaCl、50mM Tris-HCl (pH 7.4)、1.0% TritonX-100、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、溶け残りを除去した。細胞溶解物を、抗 Flag 抗体ビーズまたは抗 TLR3 抗体ビーズに加えて、4°Cで2時間、免疫沈降した。その後、ビーズを、3回、wash buffer (0.1% Triton-X 100、20mM Tris-HCl (pH 7.4)、150mM NaCl、1mM CaCl₂、1mM MgCl₂、10% グリセロール、1mM DTT) で洗浄した。

Sample buffer で 96°C、5 分で処理した後、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。

• ルシフェラーゼ・アッセイ

6-well plate に培養された HEK293T 細胞 (1×10^6 /well) に、pMX、pMX-TLR3HA または pMX-TLR3 変異体ベクターを、ルシフェラーゼ遺伝子が挿入された IFN- β プロモーター・リポーター遺伝子ベクター (p55C1B-luc.) を Lipofectamine 2000 試薬 (Invitrogen) を使って、一過性に遺伝子導入した。遺伝子導入から 26 時間後、96-well plate に蒔きなおした。細胞の定着を確認して、polyI:C 10 μ g/ml または 25 μ g/ml を加え、6 時間培養した。培養後、1xPBS で、2 回洗浄し、lysis buffer (Promega) を用いて、細胞を溶解した。ルミノメーターで、ルシフェラーゼ活性を測定し、データは、標準偏差 (SD) による平均値とした。

• ELISA

J774.1 細胞または骨髄誘導マクロファージが、96-well plate に培養され、種々の TLR リガンドで刺激された。刺激から 24 時間後、培養上清を回収し、RANTES ELISA kit (R&D systems) で、濃度を測定した。

・細胞の染色とフローサイトメトリー

マウスの脾臓細胞が、以下の表面マーカーで染色されて、FACSCalibur または FACS Aria で解析された。表面マーカー: CD4 (GK1.5)、CD8 α (53-6.7)、CD11b (M1/70)、CD11c (HL3)、PDCA-1 (927)、B220 (RA3-6B2)、CD21 (7G6)、CD23 (B3B4)、Ly6C (HK1.4)、Ly6G (1A8) と Gr-1 (RB6-8C5)。ビオチン化された抗 TLR3 (CaT3 と PaT3) mAb は、当研究室で樹立された。脾臓から細胞を回収するために、脾臓を鉏で細かく切断し、0.09U/ml Liberase TL (Roche) と 0.1mg/ml DNase I (Roche) を含む RPMI1640 で 37°C、30 分の処理をした。回収した脾臓細胞を溶血処理後、ピペットでナイロンメッシュに通した後、細胞染色を行った。細胞染色は、staining buffer (2.5% FBS、0.1% NaN₃、1xPBS) で行われた。細胞懸濁液は、staining buffer で希釈されたビオチン化抗体で、4°C、15 分置かれた。それから、細胞は、staining buffer で希釈された PE-streptavidin (Biolegend) で、4°C、15 分置かれた。そして、staining buffer で洗浄後、FACSCalibur または FACS Aria (BD Biosciences) で解析された。

・細胞表面のビオチン化とストレプトアビジンによる沈降

野生型、*Tlr3*^{-/-} または、*3d* マウスの BM-Mcs を、HBSS で 2 回洗浄した。その後、EZ-Link sulfo-NHS-LC-LC biotin (Thermo scientific) で、4°C、1 時間、細胞表面をビオチン化した。続いて、BM-Mcs を、lysis buffer (150mM NaCl、50mM Tris-HCl (pH 7.4)、1.0% TritonX-100、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、溶け残りを除去した。上清に、Streptavidin-Dynabeads (Veritas) を加えて、2 時間 4°C で反応させた。その後、ビーズは wash buffer (0.1% Triton-X 100、20mM Tris-HCl (pH 7.4)、150mM NaCl、1mM CaCl₂、1mM MgCl₂、10% グリセロール、1mM DTT) で、3 回洗浄した。Sample buffer で 96°C、5 分で処理した後、SDS-PAGE を行った。電気泳動後、サンプルは PVDF 膜に転写され、TLR3N pAb で、Western blotting を行った。

・抗体の固層化

PaT3 または CaT3 を、96-well plate に 10µg/ml で加えた。それを、37°C で、1 時間置いた。それから、1xPBS で 2 回洗浄した。

・細胞表面の Alexa488 標識抗体の無効化

J774.1 細胞は、37°C で一晩 Alexa488 標識した CaT3、PaT3 またはアイソタイプコントロール IgG1 抗体と共に培養された。採取した細胞を 1xPBS で 2 回洗浄し、抗 Alexa488 抗体 (life technology) で 20 分、4°C で処理した。細胞を、staining buffer で洗った後、抗体の細胞内への取り込みを、FACSCallibur (BD Biosciences) で解析した。

・TLR3 単クローン抗体が結合した TLR3 の免疫沈降

J774.1 細胞は、37°C で一晩、CaT3、PaT3 またはアイソタイプコントロール IgG1 抗

体と共に培養された。1xPBS で洗浄後、lysis buffer (150mM NaCl、50mM Tris-HCl (pH 7.4)、1.0% TritonX-100、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、溶け残りを除去した。上清を回収後、Protein G sepharose™ 4 Fast Flow (Amersham Biosciences) を加えて、8時間4°Cで反応させた。wash buffer (0.1% Triton-X 100、20mM Tris-HCl (pH 7.4)、150mM 塩化ナトリウム水溶液、1mM CaCl₂、1mM MgCl₂、10% グリセロール、1mM DTT)で、3回洗浄した。Sample buffer で96°C、5分で処理した後、SDS-PAGEを行った。電気泳動後、サンプルはPVDF膜に転写され、TLR3N pAbで、Western blottingが行われた。

・統計解析

3回行った実験データは、Studentのt検定によって統計学的に分析された。その結果が0.01以下の時、比較群間の差が有意であると考えた。

結果

(1) 新規の抗マウス TLR3 単クローン抗体(mAb)の樹立

マウスの免疫細胞表面 TLR3 を検出するために、マウス TLR3 に対する新しい mAb の樹立を試みた。*Tlr3*^{-/-} Balb/c マウスに、マウス TLR3 を強制発現した Ba/F3 細胞を免疫した。免疫したマウスの脾臓細胞と SP2/O 骨髄腫細胞を混和して、ポリエチレングリコールを用いて細胞融合させた後、得られた約 750 のハイブリドーマ培養上清をスクリーニングした。その結果、2 種類の抗マウス単クローン抗体を取得した。これらの抗体は、CaT3 と PaT3 と名付けた。抗体のアイソタイプは、どちらも IgG1 であった。次に、mAb の特異性を調べるため、Flag タグを C 末端側に付加したマウス TLR3、TLR7、TLR8、TLR9 を強制発現した Ba/F3 細胞を用い、細胞膜透過染色を行った。その結果、これらの抗体は、マウス TLR3 を発現させた細胞のみを特異的に染色し、マウス TLR7、TLR8 または TLR9 を発現させた細胞は染色しないことが判明した (図 4A)。また、PaT3 と CaT3 は、ヒト TLR3 と交差反応性を示さなかった (図 4A)。なお、細胞膜透過染色の陽性コントロールとして、抗 Flag 抗体を用いた染色を行った。

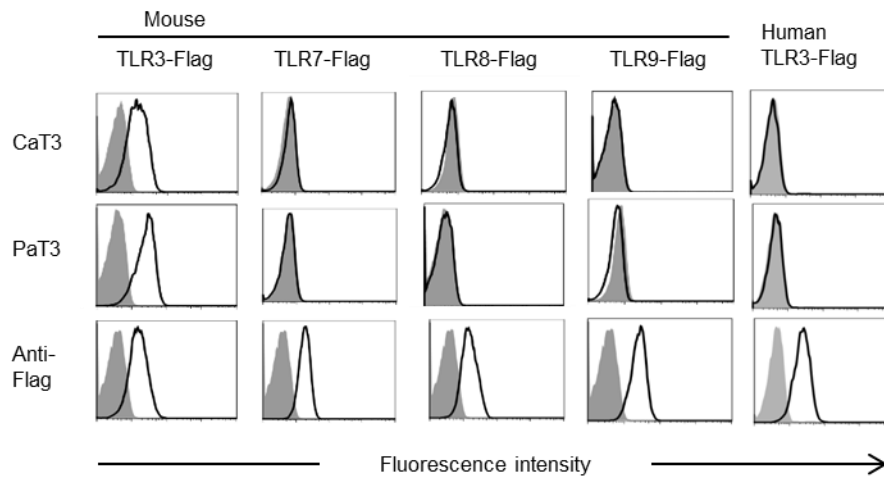
次に、私は、これらの抗体によって、マウス TLR3 を免疫沈降が可能であるかを検討したところ、TLR3 または TLR7 を強制発現した Ba/F3 細胞から、CaT3 と PaT3 はそれぞれ TLR3 を特異的に免疫沈降させることができることが判明した (図 4B)。

さらに、私は、CaT3 と PaT3 が内因性 TLR3 を認識できるか調べるために、マウス

腹腔マクロファージ由来細胞株である J774.1 細胞の内因性 TLR3 を、免疫沈降できるか検討した。この際、コントロールベクターを発現させた J774.1 細胞を Mock とし、TLR3 の細胞内での局在を制御している Unc93B1 ノックダウン細胞 (Unc93B1KD) を使用した。この細胞におけるノックダウンの効率は、約 90%であった(図 5A)。これらの細胞溶解液を、CaT3、PaT3 またはアイソタイプコントロール IgG1 抗体で免疫沈降し、TLR3 の N 末端側断片を認識するポリクローナル抗体 (TLR3NpAb) を用いて、Western blotting により解析した結果、Mock の細胞で、約 110kDa と約 55kDa の 2 つのバンドが確認された (図 5A)。一方、Unc93B1KD 細胞は、約 110kDa のバンドのみが検出された。マウス TLR3 は、905 個のアミノ酸から構成されるため、約 110kDa のバンドは、マウス TLR3 の全長型 (TLR3F) であると考えられた。

以上の結果から、CaT3 と PaT3 は内因性の TLR3F を認識することが判明した。

A



B

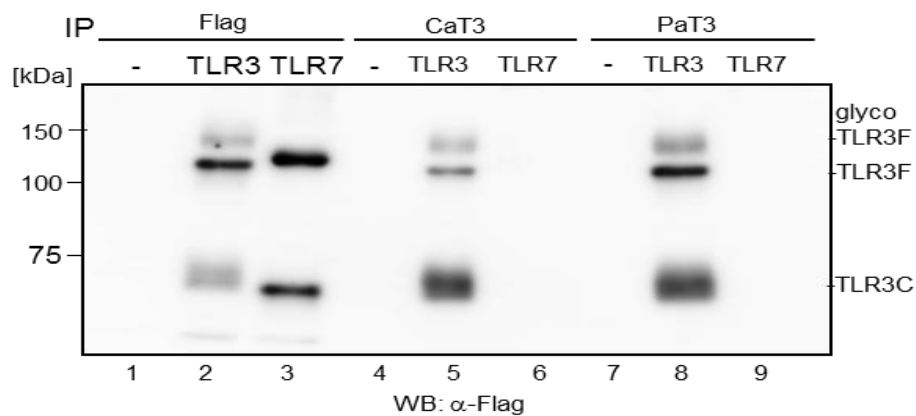
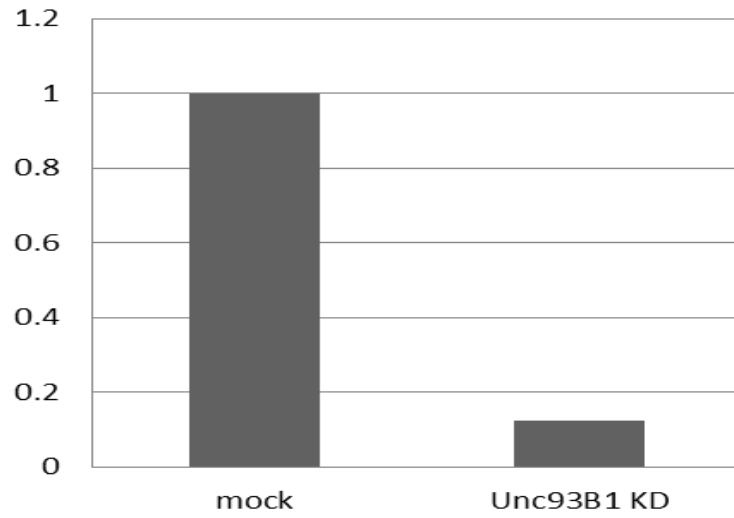


図 4. CaT3 と PaT3 の抗体特異性の確認

A. Ba/F3 細胞に、Flag タグを付加したマウス TLR3、TLR7、TLR8、TLR9 またはヒト TLR3 を発現させ、CaT3、PaT3 または抗 Flag 抗体で、細胞膜透過染色を行った。灰色のヒストグラムは二次抗体のみの染色を表している。B. Flag タグを付加したマウス TLR3 または TLR7 を発現させた Ba/F3 細胞を、CaT3、PaT3 または抗 Flag 抗体で免疫沈降し、抗 Flag 抗体を用いて western blotting により解析した。- : 何も発現させていない Ba/F3 細胞の免疫沈降の結果を示す。

A



B

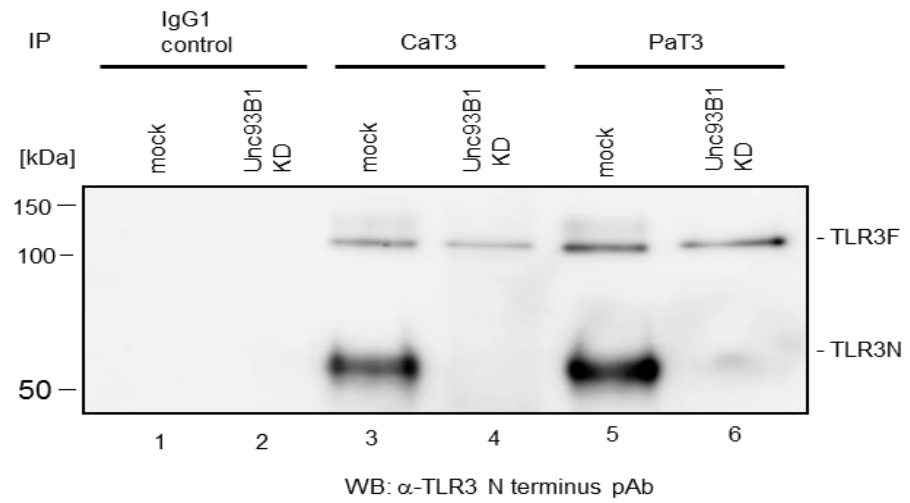


図 5. J774.1 細胞の内因性 TLR3 の免疫沈降

A, B. コントロールベクターを発現させた J774.1 細胞の内因性 TLR3 を、CaT3、PaT3 またはアイソタイプマッチ IgG1 control 抗体で、免疫沈降した。また、Unc93B1 のノックダウン効率が、約 90%の細胞 (Unc93B1KD) も同様に免疫沈降した。その後、抗 TLR3pAb を用いて、Western blotting により解析を行った。

(2) マウス TLR3 の切断部位の同定

タンパク質分解酵素による TLR3 の切断の意義を検証するために、TLR3 の切断部位について、アミノ酸の N 末端配列の決定を試みた。マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞にマウス TLR3 の C 末端に GFP を付加したもの (TLR3 - GFP) を発現させ、抗 GFP 抗体で精製した。精製した分画は、SDS-PAGE とクマシーブリアントブルー (CBB) 染色によって解析した (図 6A)。抗 GFP 抗体を用いた、Western blotting で解析した結果から、マウス TLR3 と GFP のアミノ酸の合計から、約 150kDa に見られたバンドは TLR3-GFP の全長型 (TLR3F) であり、約 90kDa に見られたバンドは、切断された TLR3-GFP の C 末端側断片 (TLR3C) と考えられる。また、TLR3-GFP の N 末端側断片は、TLR3F と TLR3C の分子量の差から約 60kDa と予想されることから、CBB 染色したサンプルの TLR3N と TLR3C と考えられるバンドの N 末端アミノ酸配列を、(株)アプロサイエンスに依頼して決定した (図 6B)。TLR3C と仮定した約 90kDa のバンドは、マウス TLR3 のアミノ酸配列の 343 番目のセリン (S) から始まり、TLR3N と仮定した約 60kDa のバンドは、26 番目のスレオニン (T) から始まっていた。TLR3 の細胞外領域が、22 個の LRR 構造からなるため、アミノ酸 N 末端配列の結果より、TLR3C は、LRR12-LRR22 からなること、また、TLR3N が 26T から始まることから、1-25 番目までのアミノ酸配列は、シグナルペプチド配列と決定した (図 6C)。

(3) PaT3 による TLR3N 認識

CaT3 と PaT3 が認識するエピトープを決定するために、まず、お互いの抗体が、エピトープの認識を阻害するののかについて検討した。マウス TLR3 を発現した Ba/F3 細胞を、CaT3 または PaT3 で処理し、続いて細胞膜透過染色を、一次抗体として、ビオチン化した CaT3 と PaT3 で、二次抗体として、Streptavidin-PE (StAv-PE)で行い、FACSCalibur で解析した。その結果、CaT3 と PaT3 は、Cross block を起こさないことが判明した (図 7)。この結果から、二つの抗体が、それぞれ TLR3 の異なったエピトープを認識することが示された。

続いて、CaT3 と PaT3 が、TLR3N 末端側断片 (TLR3N) と TLR3C 末端側断片 (TLR3C) のどちらの断片を認識するのかを決定するために、アミノ酸 N 末端配列により決定した TLR3N または TLR3C 領域をコードする cDNA を、Ba/F3 細胞に発現させ、ビオチン化した CaT3 または PaT3 で細胞膜透過染色を行った。二次抗体として、StAv-PE で染色を行い、FACSCalibur で解析した。

細胞膜透過染色の実験結果から、PaT3 は TLR3N を認識することを示す結果が得られたが、一方では CaT3 はどちらの断片も認識しないことが判明した (図 8)。しかし、一方では CaT3 は TLR3N と TLR3C の二つのベクターを両方発現させた Ba/F3 細胞を認識した (図 8)。TLR3C の発現を確認するために、ビオチン化した抗 HA 抗体と StAv-PE での染色も行った。

ビオチン化抗体で染色し、
 続いて、Stav-PEで処理した

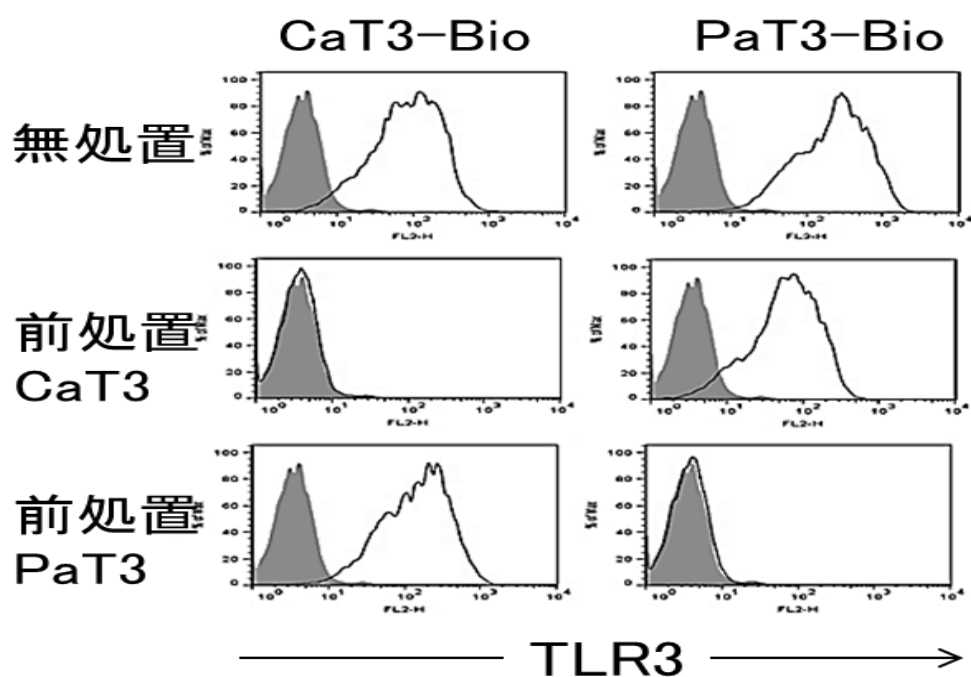


図7. CaT3 と PaT3 は、異なるエピトープを認識する

TLR3 を強制発現した Ba/F3 細胞を、CaT3 または PaT3 で処置し、続いてビオチン化した CaT3 または PaT3 で染色した。二次抗体には、Streptavidin-PE を使い、FACSCalibur で解析した。灰色のヒストグラムは、二次抗体のみの染色を示している。

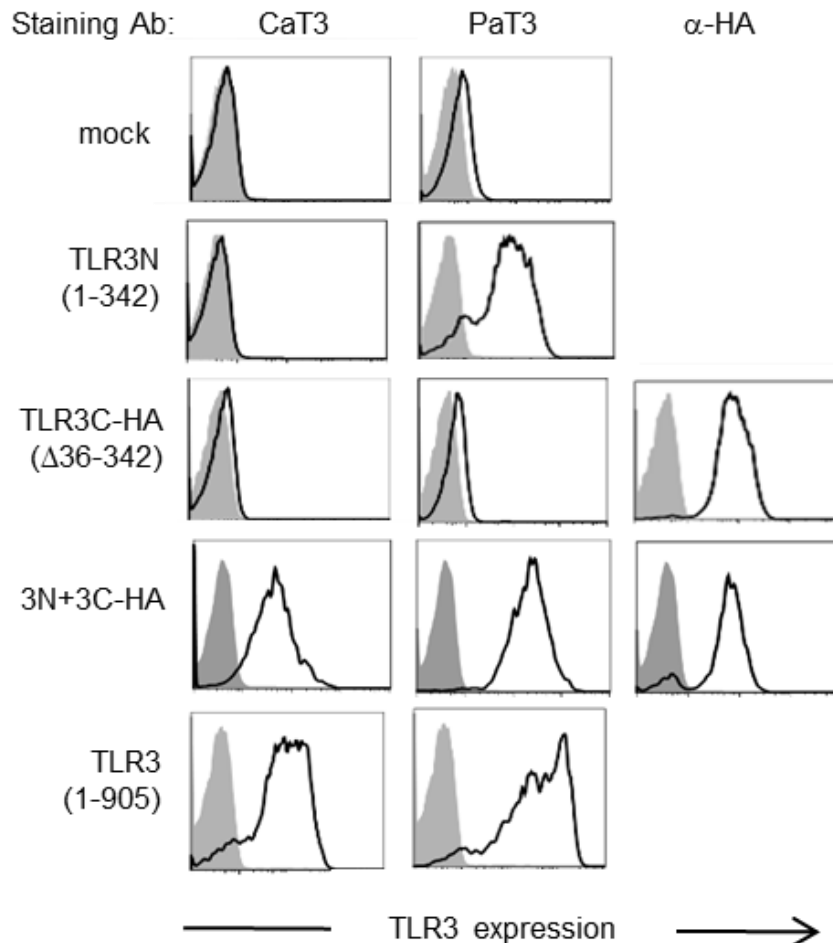


図 8. PaT3 は、TLR3N を特異的に認識する

Ba/F3 細胞に、TLR3N、TLR3C-HA の単独または、両方のベクターを発現させた細胞を、ビオチン化した CaT3 または、PaT3 で細胞膜透過染色した。二次抗体として、StAv-PE で染色し、FACSCalibur で解析した。TLR3C-HA の発現を確認するために、ビオチン化した抗 HA 抗体と StAv-PE の染色を行った。灰色のヒストグラムは、二次抗体のみの染色を表している。

(4) TLR3N と TLR3C の会合と複合体形成

過去の報告で、TLR3C 末端側断片単独でのリガンド認識ができるかどうか、相反する報告がなされてきた (14、15)。また、ヒト TLR3 の切断後も、TLR3N 末端側断片 (TLR3N) が、TLR3C 末端側断片 (TLR3C) と会合することが示唆されていた(14)。同様に、細胞内で切断を受ける TLR9 が、一本鎖 DNA の認識に TLR9C だけでなく、TLR9N を必要とし、TLR9N+C 複合体を形成することが判明している(10)。この中で、*Tlr9*^{-/-}マウス由来の BM-cDCs に、TLR9N 末端側断片 (TLR9N)、TLR9C 末端側断片 (TLR9C)、または TLR9N と TLR9C の両方のベクター (TLR9N+C) を発現させた場合、TLR9N+C で、一本鎖 DNA への応答が回復することも報告されている(10)。

TLR9 の報告を参考にすると、TLR3N と TLR3C を、共に発現させた場合、TLR3N と TLR3C は、TLR3N+C 複合体を形成すると考えられた。また、図 8 より、CaT3 は、TLR3N または TLR3C の単独発現させた細胞は、染色できないが、TLR3N と TLR3C を共に発現させた細胞は、全長型 TLR3 を発現させた細胞同様に、染色することが可能であった。これらの結果は、CaT3 が TLR3N+C 複合体を認識することが示唆された。

そこで、TLR3N と TLR3C の直接的会合を確認するために、Ba/F3 細胞に、TLR3N と TLR3C-HA を発現させた細胞を、PaT3 または抗 HA 抗体で、免疫沈降し、それぞれの TLR3 断片に、もう一方の断片が、共沈してくるのか検討した (図 9)。

TLR3N の単独発現の細胞では、全長 TLR3 から切断された TLR3N に比べて、TLR3N

に該当する分子の泳動度が異なった。これは、糖鎖修飾のような翻訳後修飾が、全長型 TLR3 由来の TLR3N で、起きているのではないかと考えられた。

TLR3N と TLR3C の共沈実験では、PaT3 による TLR3N の免疫沈降で、TLR3C の共沈が確認できた (図 9 レーン 4)。ところが、抗 HA 抗体による TLR3C の免疫沈降では、TLR3N の共沈は、検出出来なかった (図 9 レーン 9)。

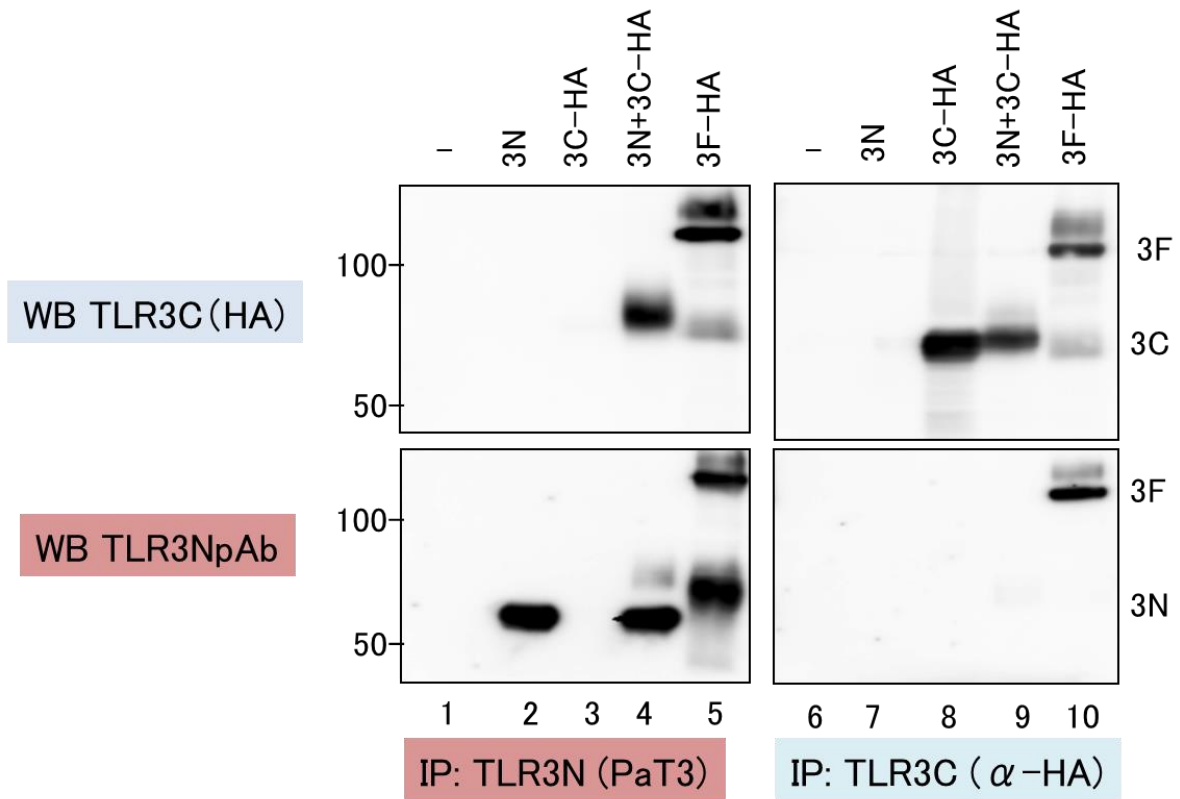


図 9. TLR3N と TLR3C の共発現は、TLR3N+C 複合体を形成する

Ba/F3 細胞に、TLR3N、TLR3C-HA 単独または、TLR3N と TLR3C-HA の 2 つのベクターを発現させた細胞を使って、PaT3 または抗 HA 抗体で、免疫沈降し、もう一方の TLR3 切断断片が共沈するかを検討した。PaT3 で免疫沈降した TLR3N に、TLR3C は共沈してきたが、抗 HA 抗体で免疫沈降した TLR3C に、TLR3N は共沈しなかった。

(5) 二重鎖 RNA(dsRNA)の認識における TLR3N の重要性

TLR3によるdsRNA認識及びシグナル伝達におけるTLR3Nの必要性を明らかにするために、以下の方法を用いて検討を行なった。HEK293T細胞に、TLR3N、TLR3Cを発現するベクター、及びIFN- β プロモーター配列を持つリポーター・プラスミド p55C1B-luc.を一過性に発現させ、合成リガンドであるdsRNA, poly I:Cで刺激して、ルシフェラーゼ・レポーターアッセイを行った。TLR3N末端側断片とTLR3C末端側断片のリガンド認識を検討するにあたり、過去の報告で、ヒトTLR3のN末端側断片またはC末端側断片として、使われた切断部位も検討することにした。マウスTLR3N末端側断片として、われわれが決定した1-342番目までのアミノ酸断片を、TLR3N342とした。また、TLR3C末端側断片は、シグナルペプチドとして1-35番目のアミノ酸配列を付加し、343番目から905番目の最後のアミノ酸までの配列をTLR3C343とした。また、以前に、ヒトTLR3N末端側断片の報告で使用されていた、切断が予想されるループ内に位置する346番目のアミノ酸までの配列N346、ループ外に位置する356番目のアミノ酸までの配列N356も検討に加えた。また、TLR3C343の作製法と同様に、シグナルペプチドを付加したC347またはC357のベクターも作製し検討した

(図10)。poly I:Cに対するIFN- β プロモーターの活性化は、全長型TLR3または各TLR3断片の発現量に依存すると考えられたため、PaT3または抗HA抗体を用いて細胞膜透過染色によるDouble stainingを行い、各細胞で発現量に大きな差がないことを確認した(図11A)。Double stainingの結果、TLR3Nまたは3Cを遺伝子導入した細胞の

内、25.9~52.9%の細胞で、TLR3N または 3C を発現していることが判明した。また、TLR3HA、N342+C343、N346+C347 または N356+C357 を遺伝子導入した細胞の内、28.8~42.1%の細胞で、TLR3N と 3C の両方の断片を発現していることが判明した。(図 11A)

ルシフェラーゼ・レポーターアッセイの結果、TLR3 の各断片単独発現では、polyI:C 依存的なプロモーターの活性化は見られなかった (図 11B)。一方、TLR3N 末端側断片と TLR3C 末端側断片を共発現させた細胞では、N342+C343 または N346+C347 は、polyI:C 依存的なプロモーターの活性化が見られた。切断部位として予想されているループ外の N356+C357 の組み合わせでは、活性化は見られなかった。

次に、TLR3 依存的な NF- κ B の活性化について検討した。Ba/F3 細胞に、プロモーター領域レポーターアッセイベクターである NF- κ B-GFP と図 10 で示した各 TLR3 断片を発現させた。図 11A の実験と同様に、PaT3 または抗 HA 抗体で、細胞内染色を行い、TLR3 断片の発現量を確認した(図 12A)。続いて、polyI:C で刺激して、誘導される GFP の値を、FACSCalibur で解析した。その結果、IFN- β プロモーターの活性化の時と同様に、TLR3N または TLR3C の各断片単独発現では、TLR3 依存的な NF- κ B の活性化は見られなかったが、N342+C343 または N346+C347 の組み合わせの時は、NF- κ B の活性化が確認できた (図 12B)。

以上の結果より、切断部位として予想されるループ内で TLR3N と TLR3C を発現させた場合、3N と 3C は協調して複合体を形成し、dsRNA に応答することが示された。

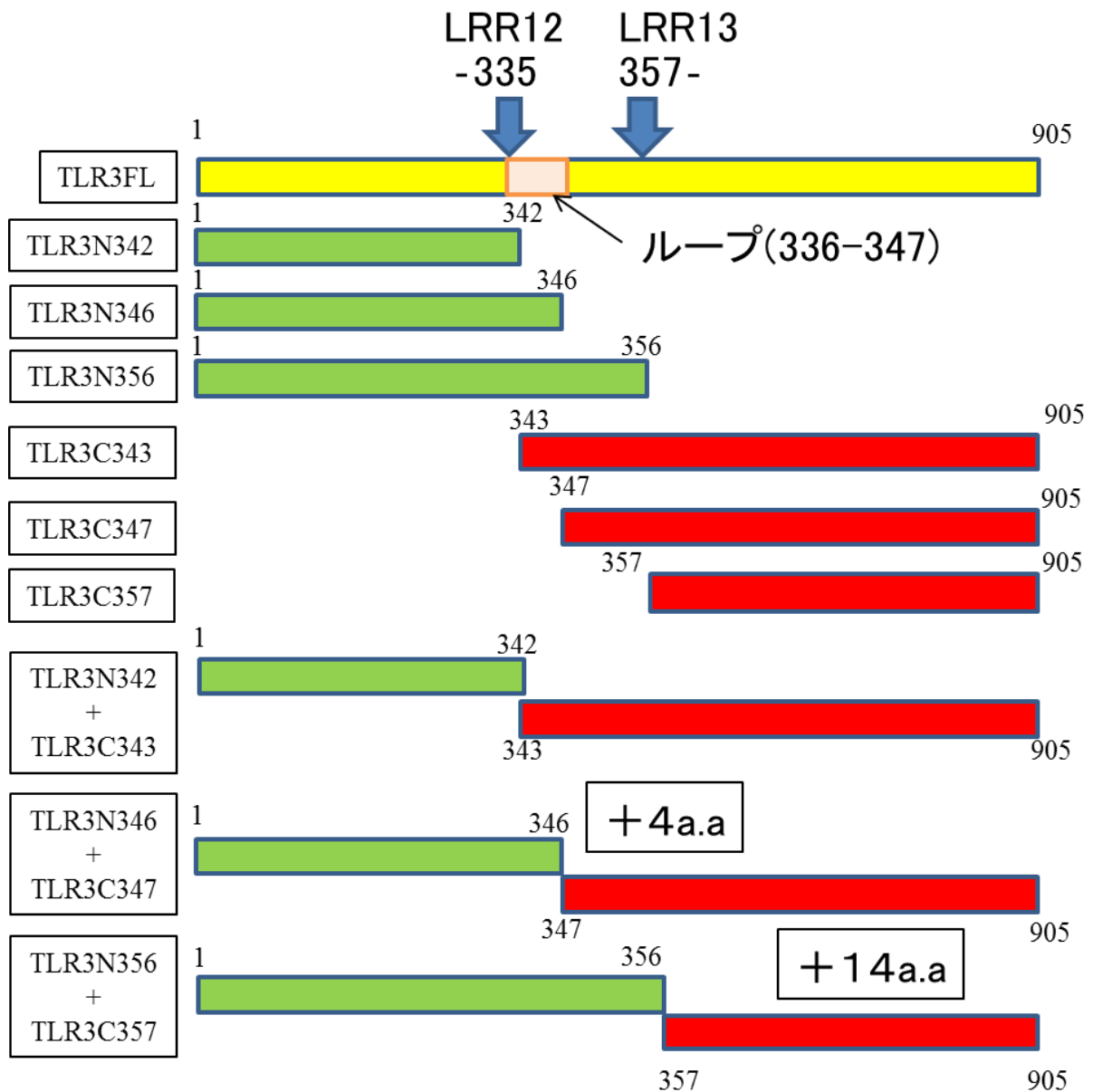


図 10. 作製した各 TLR3N と 3C の配列

マウス TLR3N として、われわれが決定した 1-342 番目までのアミノ酸断片を、TLR3N342 とした。同時に、切断部位を C 末端側に 4 アミノ酸または 14 アミノ酸ずらした変異体 N346、N356 を作製し検討した。また、TLR3C は、シグナルペプチドとして 1-35 と、343 から 905 までのアミノ酸を含む断片を C343 とした。同様に、C347 または C357 のベクターを作製し検討した。

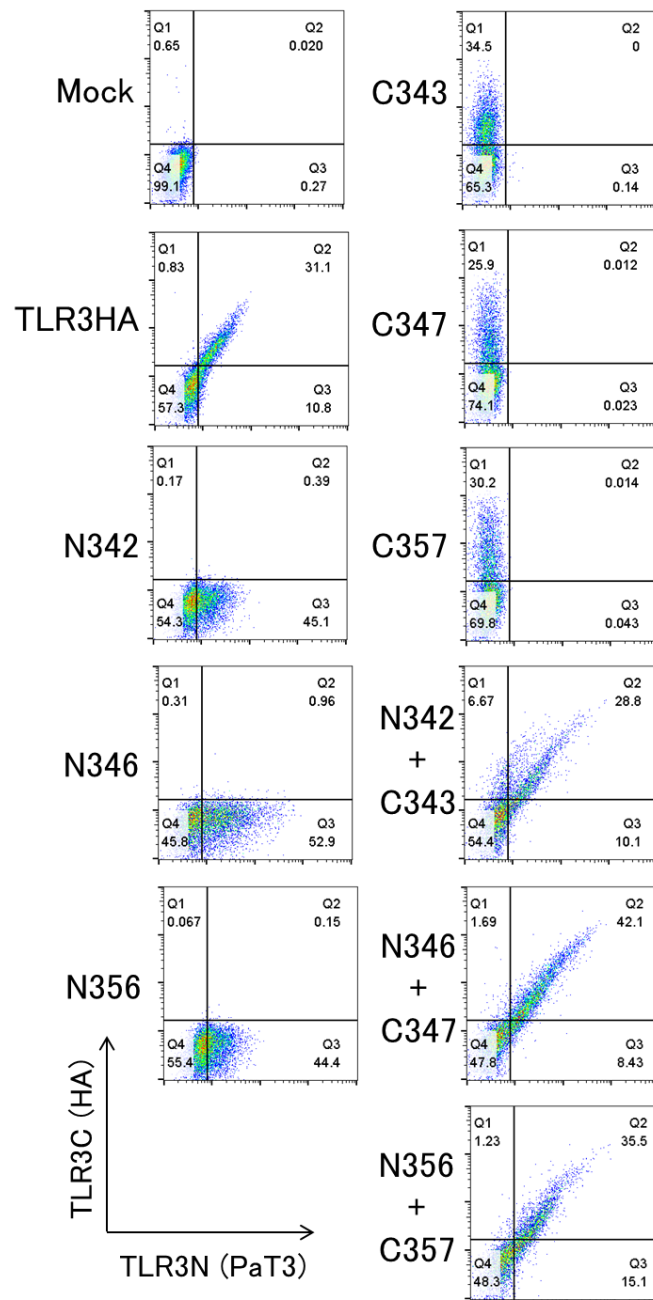


図 11A. HEK293T 細胞の TLR3N と 3C 断片の発現確認

HEK293T 細胞に、p55C1B-luc. と各種の TLR3 断片を発現させて、TLR3N を PaT3 で、TLR3C を抗 HA 抗体で細胞膜透過染色することにより、各 TLR3 断片の発現量を確認した。TLR3N と 3C の発現は、double staining 後、FACSCalibur で解析した。

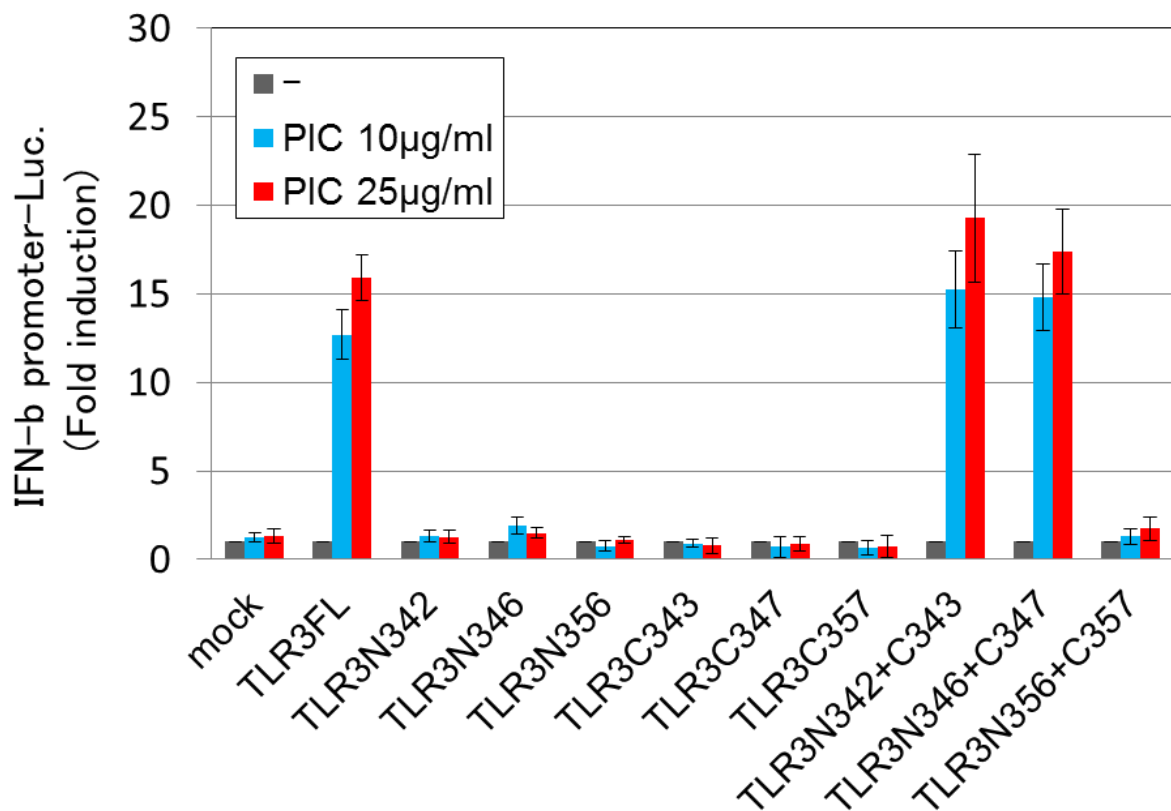


図 11B. N342+C343 複合体による dsRNA 刺激依存性 IFN-β プロモーターの活性化

図 11A で、TLR3 断片の発現量を確認した細胞に、polyI:C 10μg/ml または 25μg/ml を加えて、ルシフェレース・レポーターアッセイを行った。値は、無刺激を 1 とした時、縦軸を誘導値として示している。

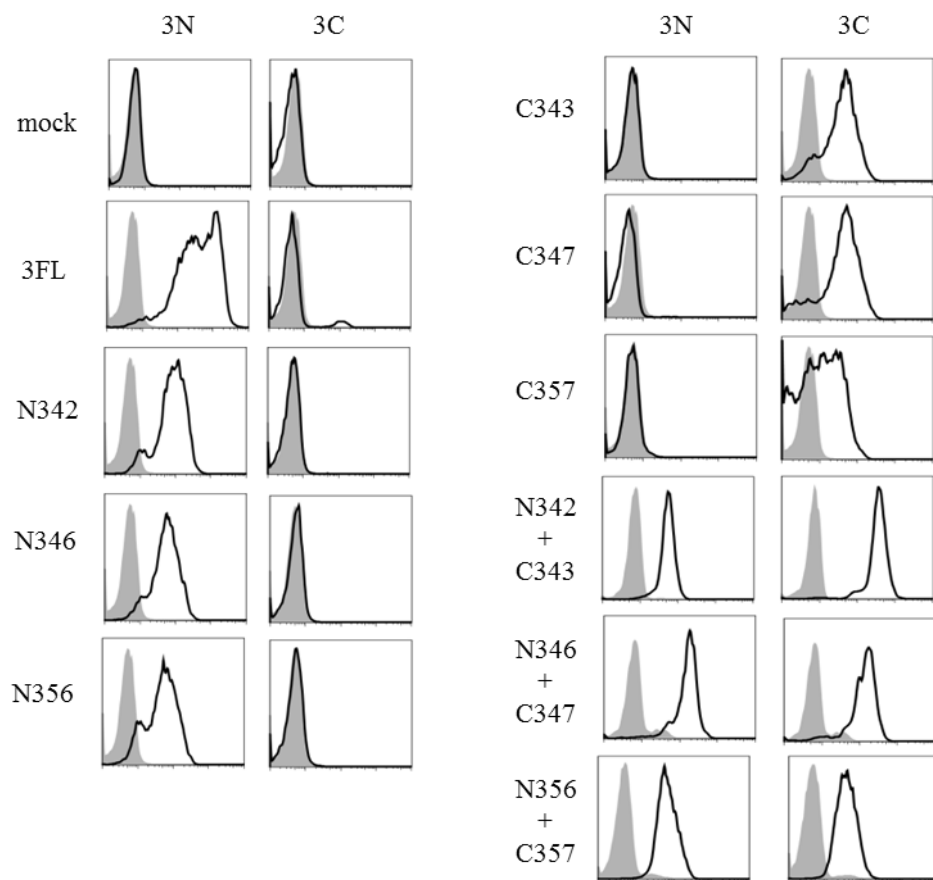


図 12A. Ba/F3 細胞の TLR3N と 3C 断片の発現確認

Ba/F3 細胞に、プロモーターレポーターベクターNF- κ B-GFP と各 TLR3 断片を発現させ、TLR3N は、PaT3 で、TLR3C は、抗 HA 抗体を用いて細胞膜透過染色を行った。灰色のヒストグラムは、二次抗体のみでの染色を表している。

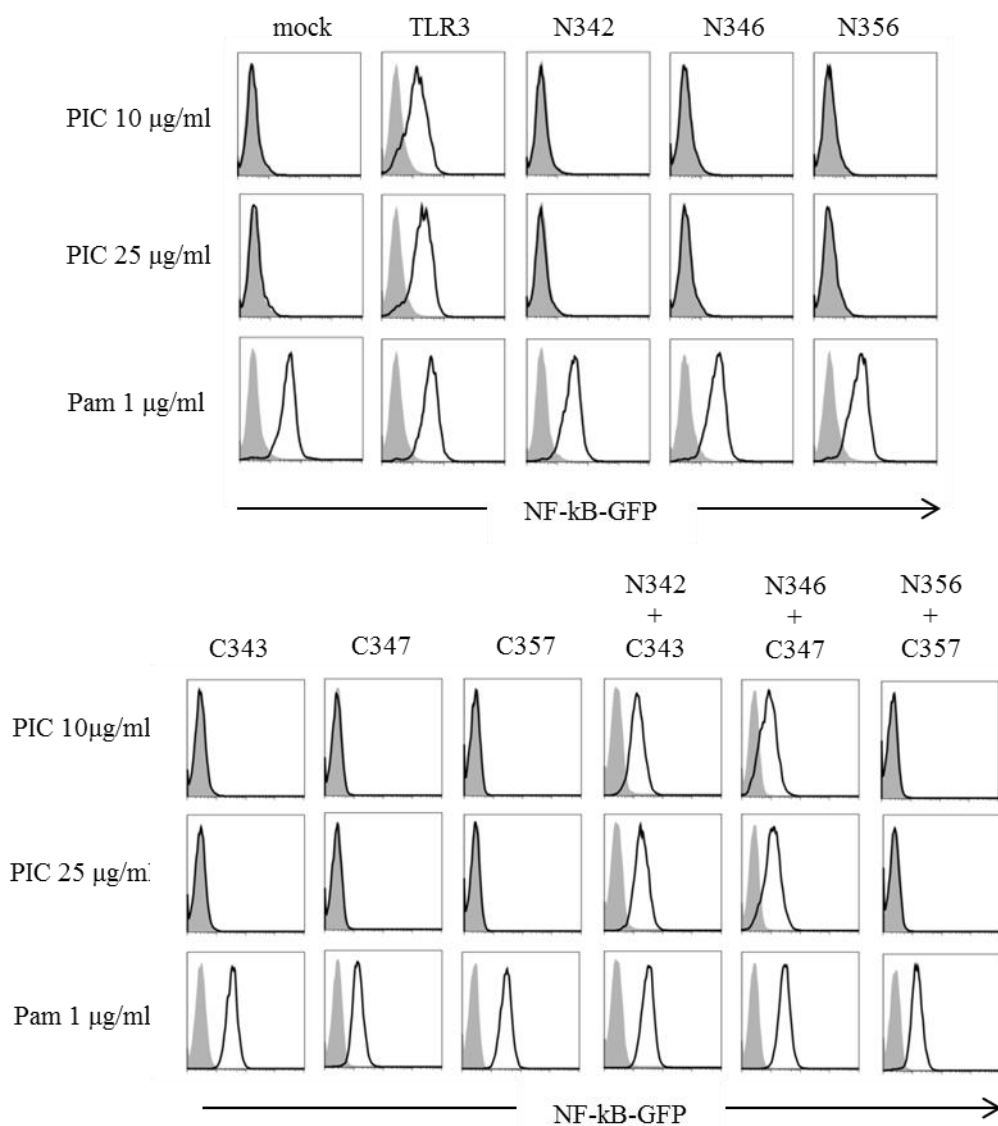


図 12B. TLR3N+C 複合体による dsRNA 刺激依存性 NF-κB の活性化

図 12A で発現量を確認した細胞に、polyI:C 10µg/ml または 25µg/ml を加えて、GFP の蛍光を FACSCalibur で解析した。Pam3csk4(Pam)は、NF-κB 活性化の陽性コントロールとして用いた。灰色のヒストグラムは、無刺激時を表している。

(6) CD8 α 陽性樹状細胞 (CD8 α ⁺cDC) について

CD8 α ⁺cDC は、腫瘍抗原やウイルス感染細胞由来の抗原をクロスプレゼンテーションすることで抗腫瘍免疫やウイルス免疫において重要な働きをしている。また、TLR3 を強く発現していることが報告されており、polyI:C による刺激が、この細胞サブセットのクロスプレゼンテーション能力を増強し、細胞傷害性 T 細胞を強く活性化することが報告されている (31,35)。この細胞サブセットは、ヒトでも保存されているため、TLR3 応答を介したクロスプレゼンテーションの増強効果の詳しい分子基盤の解明は、重要である。

(7) CD8 α ⁺cDC と辺縁部 B 細胞表面における TLR3 の発現

細胞表面に発現する TLR3 について、ヒトでは、単球から誘導した DC (iDC) では発現が見られないが、線維芽細胞株では、発現していることが報告されている (19、20)。また、この線維芽細胞株に、ヒト TLR3mAb を処置すると、dsRNA への反応が抑制できることが報告されている (19) が、iDC では、同じ抗体で抑制効果が見られないことが報告されている(20)。このことは、細胞表面 TLR3 が、免疫反応を調節する上で機能的な役割をすることが示唆されてきた。しかしながら、マウス TLR3 に関しては、免疫細胞の表面に発現しているのか検討されたことがなかった。

過去の報告で、細胞膜透過染色の結果、CD8 α ⁺cDC サブセットが他の cDC サブセットより強く TLR3 を発現している(22)と報告されていたので、われわれは、PaT3 でマウス脾臓から回収した CD8 α ⁺cDC、CD4⁺cDC、CD8 α ・CD4 両陰性 cDC または、形

質細胞様樹状細胞 (pDC) の、細胞表面と細胞膜透過染色を行うことにした (図 13)。

その結果、細胞表面の発現においては、cDC サブセットで、特に、 $CD8\alpha^+$ cDC で強く発現していることがわかった。また、細胞膜透過染色においては、cDC サブセットで強く TLR3 を発現していた。逆に、pDC では、細胞表面、細胞内ともに TLR3 を検出できなかった (図 13)。染色の TLR3 特異性を見るために、 $TLR3^{-/-}$ マウスを陰性コントロールとして解析した。

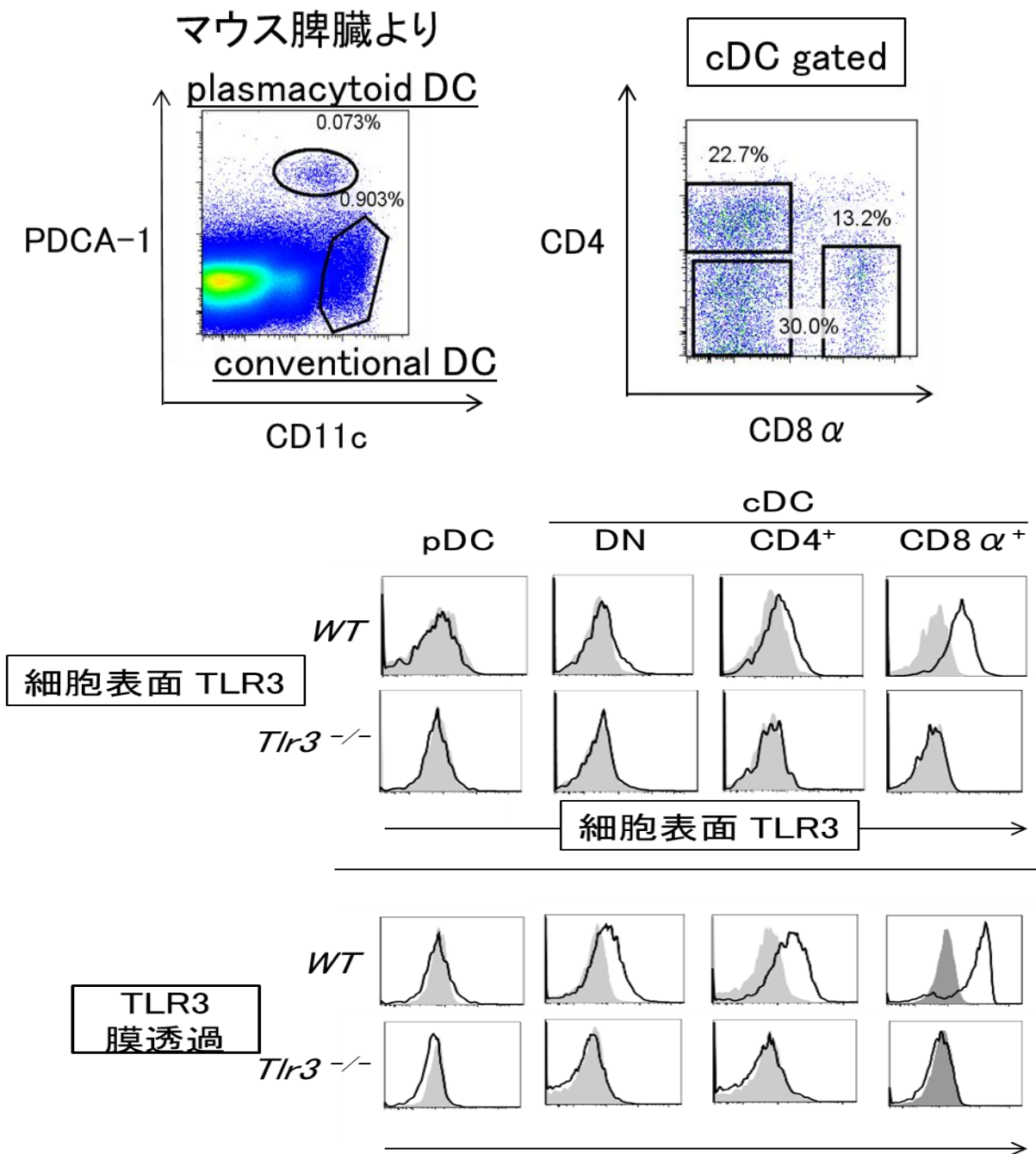


図 13. CD8 α 陽性樹状細胞 (CD8 α ⁺cDC) 表面における TLR3 の発現

マウス脾臓から回収した、cDC サブセットと pDC を使って、細胞表面と細胞内を PaT3 で染色した。cDC サブセットと pDC を調べるために、脾臓細胞を、表面マーカー ; CD11c、PDCA-1、CD4、CD8 α で染色後、FACS Aria で解析した。灰色のヒストグラムは、二次抗体のみの染色を表している。

次に脾臓の B 細胞サブセットを検討した。B 細胞サブセットは、表面マーカーで、濾胞 B 細胞 (follicular B 細胞) と辺縁帯 B 細胞 (Marginal zone B 細胞) に分けた。PaT3 による細胞表面の染色では、辺縁帯 B 細胞でのみ、発現が見られた。一方、細胞膜透過染色では、両サブセットで発現が見られた (図 14)。

さらに、われわれは、100ng/ml M-CSF または 10ng/ml GM-CSF を用いて、骨髄から誘導したマクロファージ (BM-Mcs) と cDC (BM-cDC) について、TLR3 の発現を検討した。細胞表面の染色では、BM-Mcs で、TLR3 の発現を確認できたが、BM-cDC では、検出できなかった。細胞膜透過染色では、BM-Mcs、BM-cDC ともに TLR3 が発現していた (図 15)。

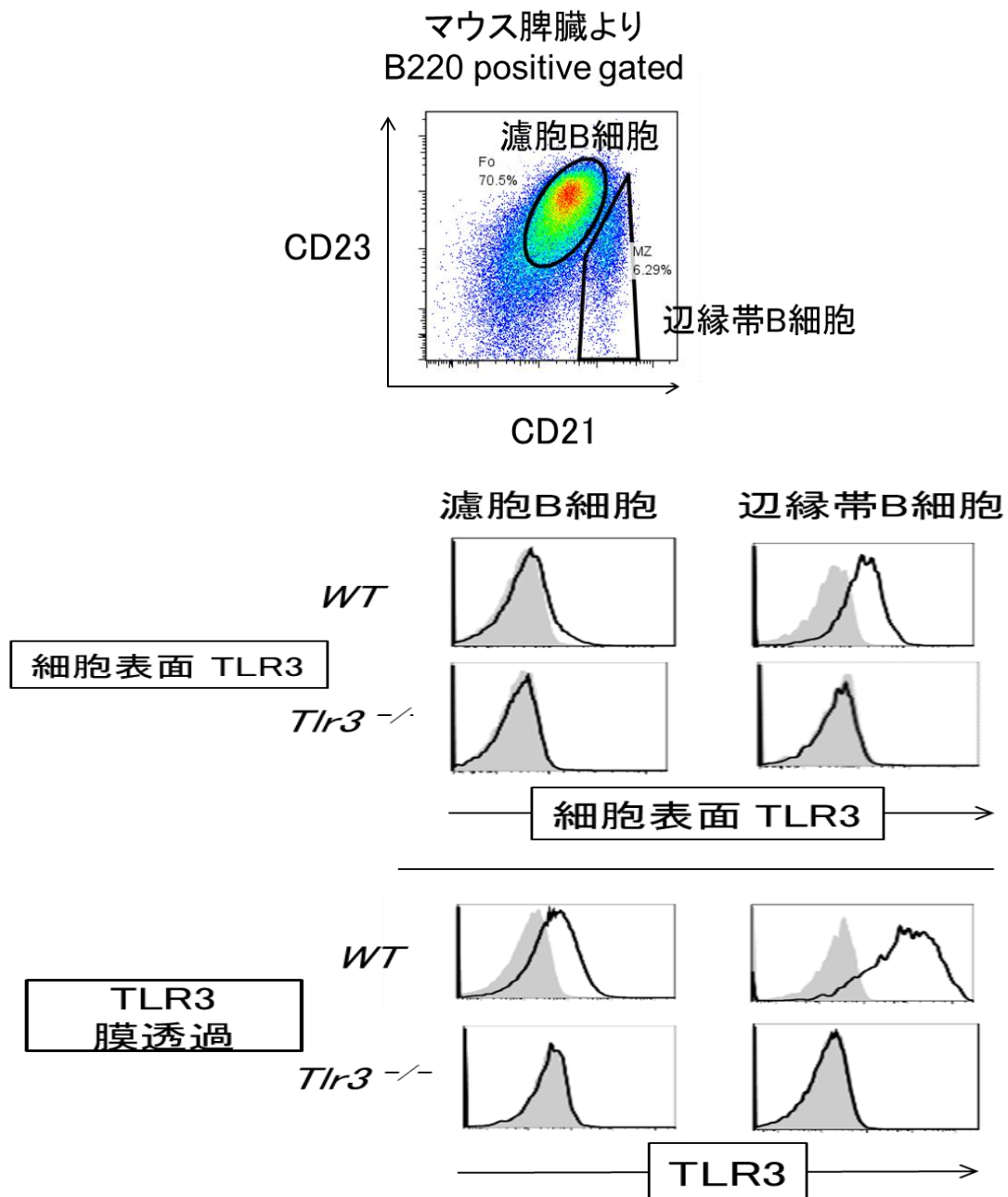


図 14. 辺縁帯 B 細胞表面における TLR3 の発現

脾臓から、辺縁帯 B 細胞 (Marginal zone B cell) と濾胞 B 細胞 (Follicular B cell) を分離して、PaT3 で、細胞表面または細胞膜透過染色を行った。分離には、表面マーカー ; CD19、CD21 そして CD23 で染色し、FACSAria で解析した。灰色のヒストグラムは、二次抗体のみの染色を示している。

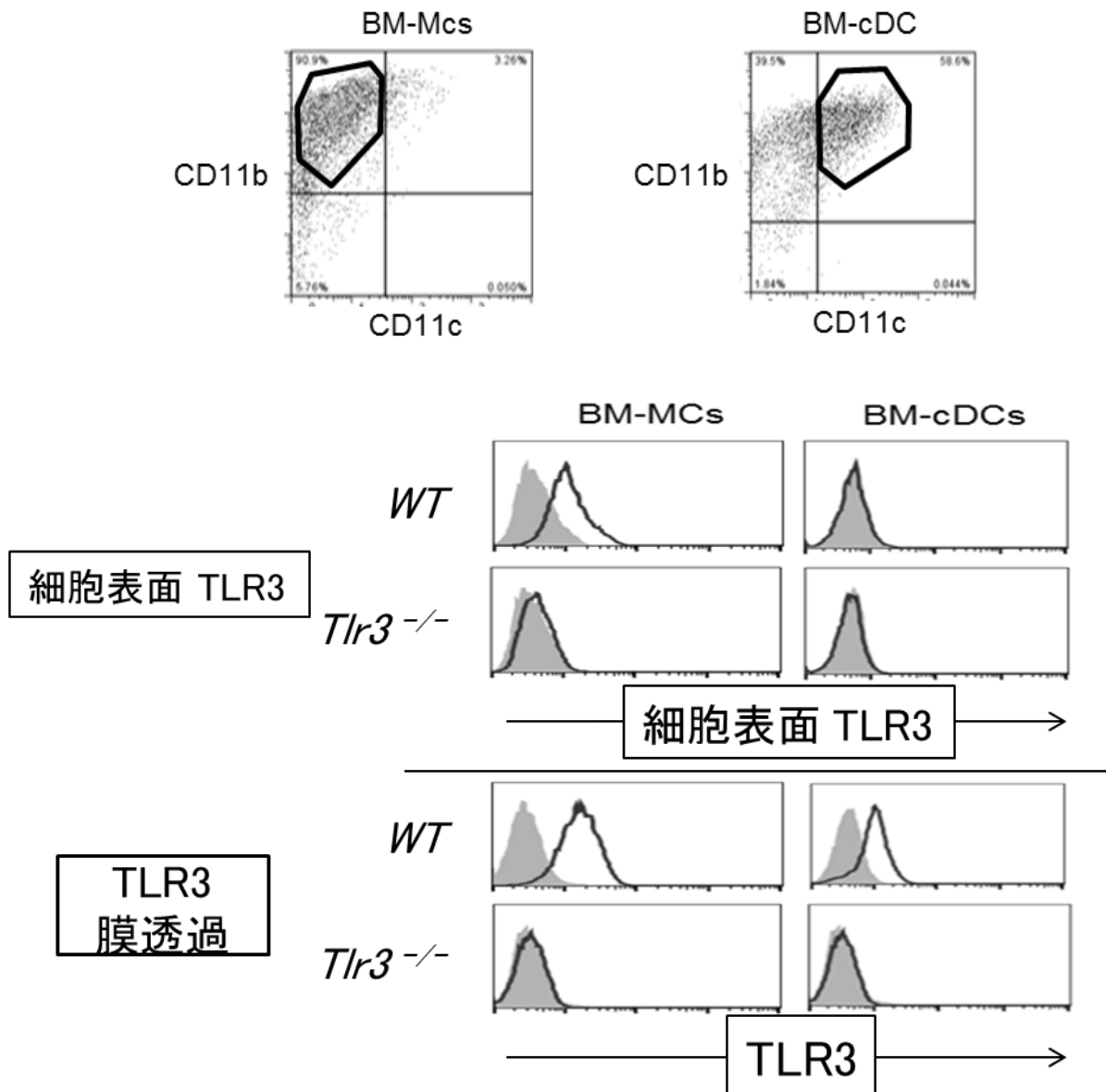


図 15. BM-Mcs 細胞表面の TLR3 の発現

マウス骨髄から、M-CSF (100ng/ml) で誘導したマクロファージ (BM-Mcs) と、GM-CSF (10ng/ml) で誘導した樹状細胞 (BM-cDC) を使って、PaT3 で細胞表面と細胞膜透過染色した。マクロファージと cDC の誘導を確認するために、CD11b と CD11c の染色を行い、FACSCalibur で解析した。灰色のヒストグラムは、二次抗体のみの染色を示している。

(8) 切断された TLR3 の細胞表面発現における Unc93B1 の役割

TLR3 の細胞内移行に重要な分子として、Unc93B1 が知られている (17)。そこで、細胞表面に発現している TLR3 を制御しているメカニズムについて検討するために、Unc93b1 3d 変異体マウス (3d マウス) を用いた。この変異体マウスは、TLR3 を含むいくつかの TLR が ER から移行できないため、TLR がリガンドを認識するエンドライソソームなどに移行できない変異体マウスである (16、17)。そこで、この 3d マウスの免疫細胞表面を、PaT3 で染色することにより、細胞表面 TLR3 の発現に、Unc93B1 が関与しているのかを検討することにした。骨髄からマクロファージを誘導し、PaT3 で細胞表面染色を行った結果、3d マウスでは、TLR3 を検出できなかった (図 16A)。そのため、細胞表面に TLR3 が発現するためにも、Unc93B1 が重要であることが示唆された。

次に、私は細胞表面 TLR3 の由来について検討した。細胞表面 TLR3 が ER から直接、移行するならば、タンパク分解酵素による切断を受けないため、非切断型の TLR3 が多く存在するはずである。そこで、BM-Mcs の細胞表面をビオチン化し、Streptavidin (StAv) ビーズまたは PaT3 で免疫沈降し、抗 TLR3N p Ab を用いて、western blotting によって解析した。その結果、野生型 (WT) の BM-Mcs では、細胞表面 TLR3 は、TLR3N のバンドを検出した (図 16B、上段レーン 1)。一方、3d マウスの BM-Mcs では、細胞表面 TLR3 の発現は確認できなかった (図 16B、上段レーン 2)。PaT3 を用いた免疫沈降の結果 (図 16B、中段) と比較すると、細胞表面も細胞全体も、切断型

TLR3が多く存在していることが判明した。

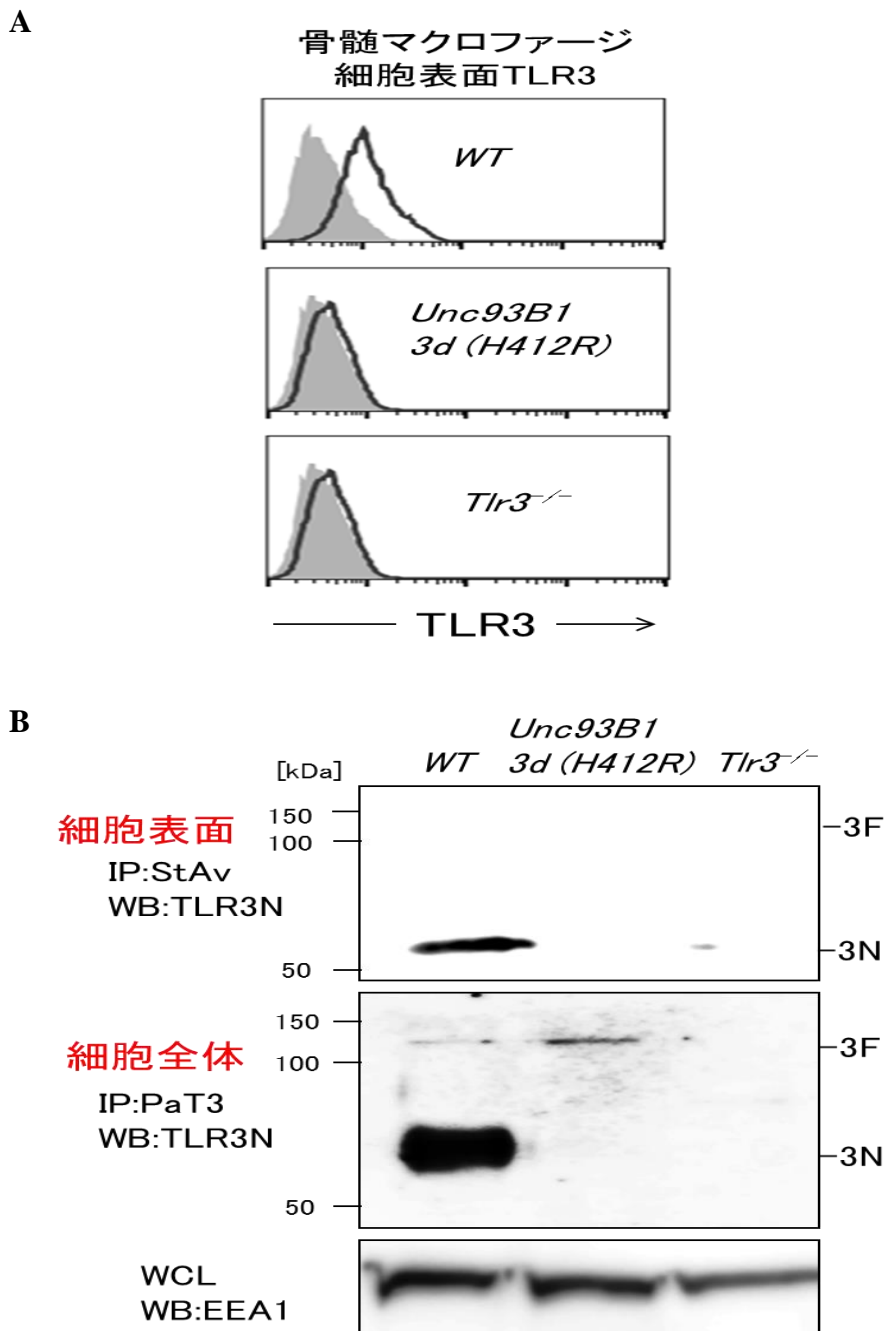


図 16. 切断型 TLR3 の細胞表面発現における、*Unc93B1* の重要性

A. 野生型 (WT)、*3d* マウス、*Tlr3^{-/-}* マウスの骨髄から、マクロファージ (BM-Mcs) を誘導し、細胞表面を PaT3 で染色した。灰色のヒストグラムは二次抗体のみの染色を表している。B. WT、*3d*、*Tlr3^{-/-}* マウスから BM-Mcs を誘導し、細胞表面をビオチン化し、StAv ビーズまたは PaT3 で免疫沈降し、TLR3NpAb を用いて western blotting により解析した。input コントロールとして、EEA1 を検出した。

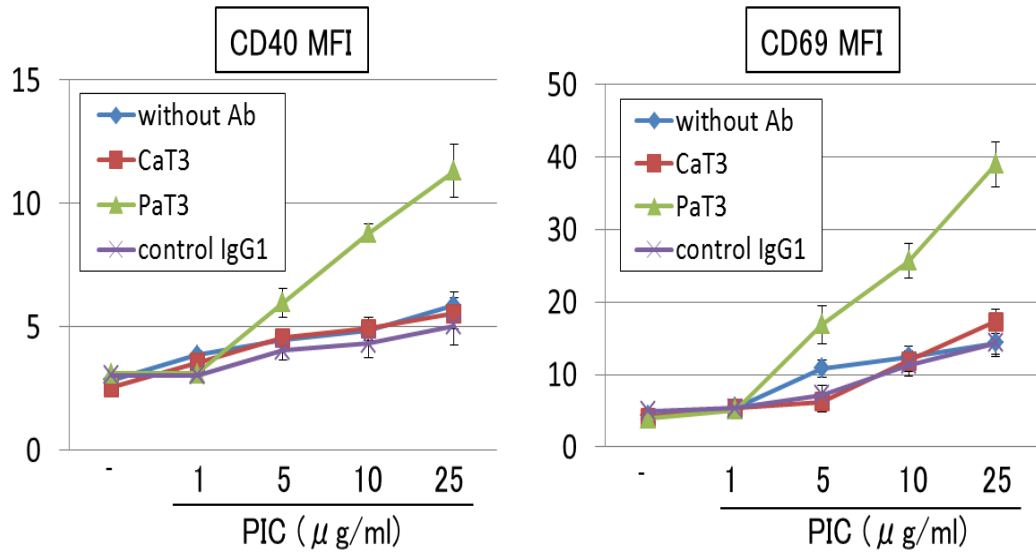
(9) PaT3 による TLR3 応答の増強

dsRNA の認識に、細胞表面 TLR3 の発現が重要かを検討するために、TLR3 のリガンド応答に対する PaT3 と CaT3 の効果を調べることにした。

マウス腹腔マクロファージ由来細胞株である J774.1 細胞は、細胞表面に TLR3 を発現していた。そこで、J774.1 細胞に、CaT3 または PaT3 を前処置しておいて、polyI:C で刺激し、共刺激分子である CD40 または CD69、そして RANTES の産生量を測定した。その結果、CaT3 ではなく、PaT3 を前処置した細胞で、polyI:C による CD40 または CD69 の活性化が、アイソタイプマッチコントロール IgG1 抗体や抗体で処理しなかった J774.1 細胞に比べて増強した (図 17A)。また、RANTES 産生も同様に、PaT3 の前処置で増強した(図 17B)。一方、TLR4 のリガンドである Lipid A に対する応答は、PaT3 を前処置しても変化がみられなかった。

次に、BM-Mcs の polyI:C 応答に対する PaT3 の効果を検討することにした。前述したように、BM-Mcs は、細胞表面に TLR3 を発現しているため、J774.1 細胞と同様に、PaT3 の増強効果が期待された。BM-Mcs に、PaT3 を前処置して、polyI:C または Lipid A で刺激し、RANTES 産生を測定した。また、IFN- β の mRNA 量を、定量的 PCR 法にて測定した。その結果、RANTES 産生、IFN- β の誘導ともに、PaT3 の前処置と polyI:C の刺激で増強された (図 18A、B)。一方、LipidA の免疫応答への影響はなかった。これらの PaT3 の増強効果と対照的に、PaT3 単独の処置では、J774.1 細胞と BM-Mcs の活性化を確認できなかった。

A



B

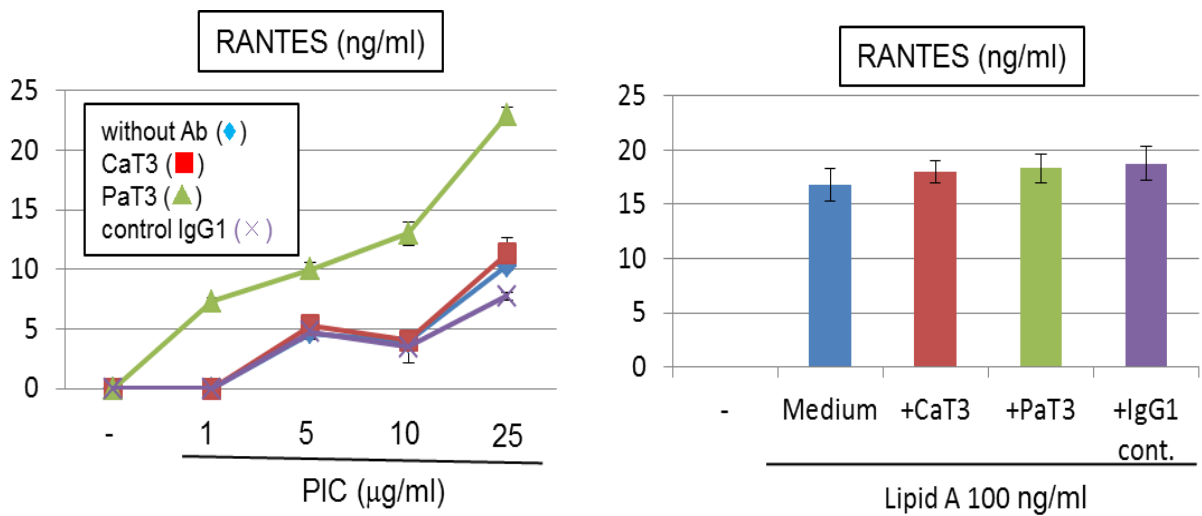


図 17. J774.1 細胞における PaT3 による polyI:C 応答の増強

J774.1 細胞に、CaT3、PaT3、アイソタイプコントロール IgG1 抗体または培地を、刺激 2 時間前に処置して、polyI:C または、LipidA 100ng/ml を加え、(A) CD40 または CD69 の活性化を FACSCalibur で、(B) RANTES の産生量を ELISA で測定した。

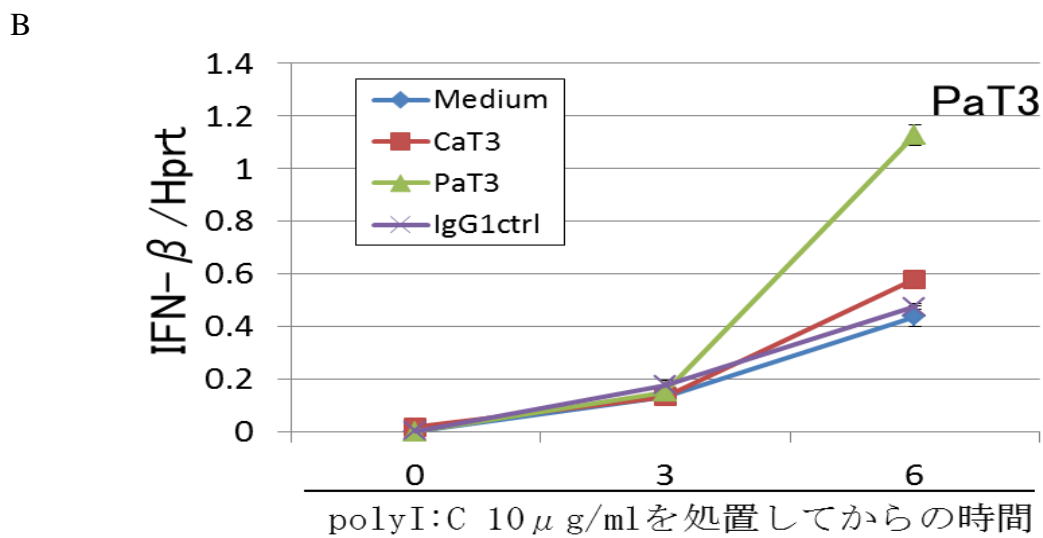
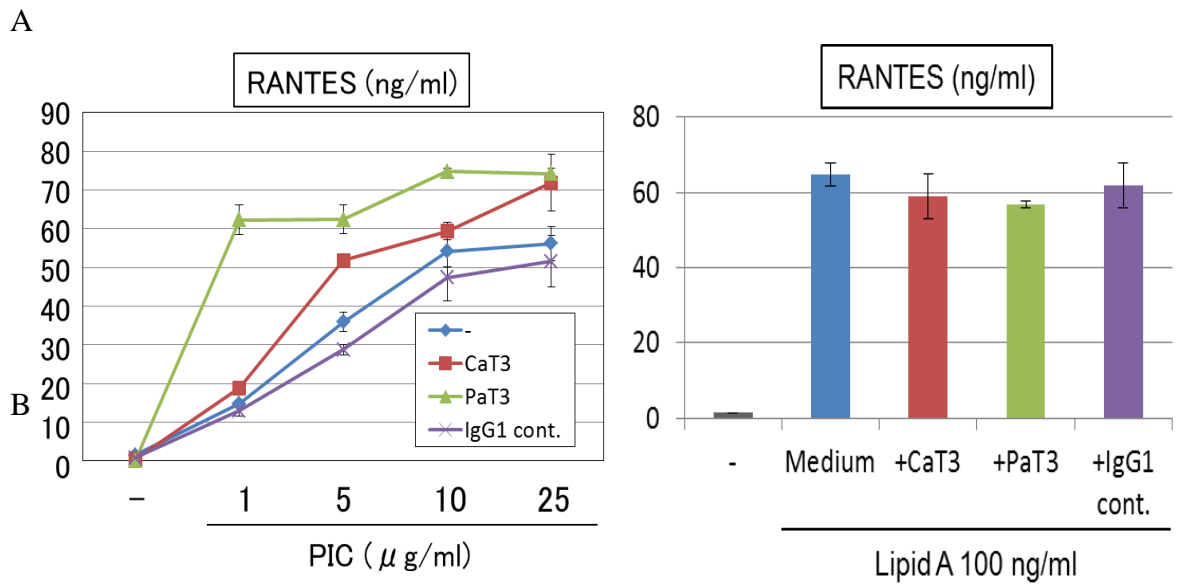


図 18. BM-Mcs における PaT3 による polyI:C 応答の増強

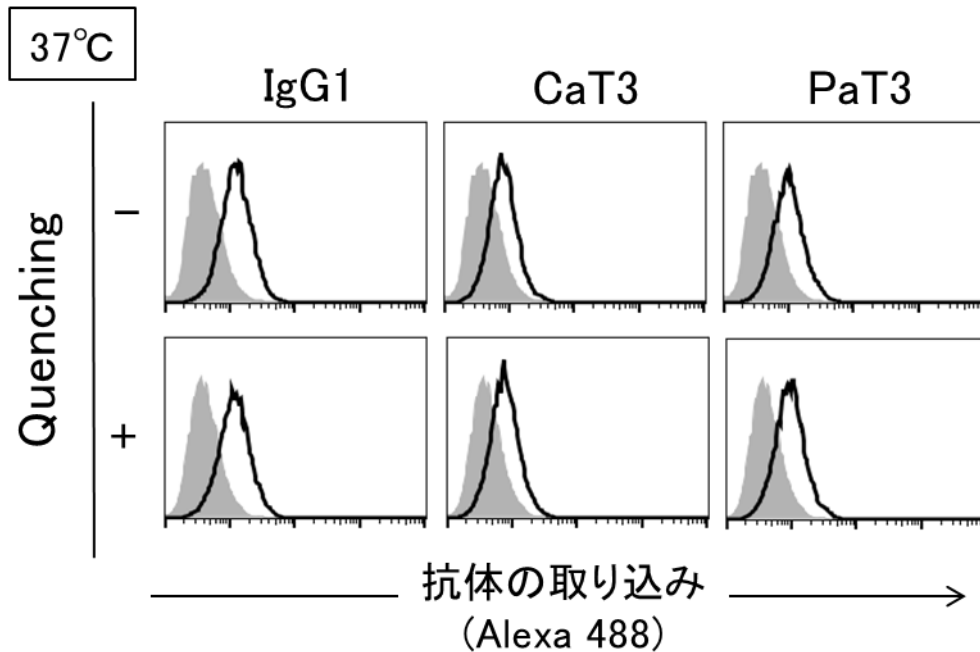
BM-Mcs に、CaT3、PaT3、アイソタイプコントロール IgG1 抗体または培地を、刺激 2 時間前に処置して、polyI:C または、LipidA 100ng/ml を加え、(A) RANTES の産生量を ELISA で、(B) IFN-β の誘導を定量的 PCR 法で測定した。

(10) PaT3 による TLR3N と TLR3C の会合の増強

PaT3 による TLR3 応答の増強のメカニズムを探るために、PaT3 が細胞内に取り込まれるのかを調べた。私は、J774.1 細胞を、37°C で Alexa488 を付加した PaT3、CaT3 またはアイソタイプコントロール IgG1 抗体を加えて一晩培養した。細胞表面に結合した抗体の蛍光を quench するために、抗 Alexa488 抗体で、細胞を処理してから、FACSCalibur によって解析した。結果、アイソタイプコントロール IgG1 抗体を含むすべての抗体は、37°C の培養で細胞内に取り込まれた (図 19A)。また、抗 Alexa488 抗体の処理の有無に関わらず、蛍光の強さが変わらなかったことから、細胞表面に結合した抗体は、長く留まらないことが考えられた。

次に、細胞内に取り込まれた抗 TLR3mAb が TLR3 と結合するのかを確認するために、PaT3、CaT3 またはアイソタイプコントロール IgG1 抗体と J774.1 細胞を一晩培養し、内因性の TLR3 と抗体の複合体をプロテイン G で沈降し、抗 TLR3p Ab で western blotting することにした。TLR3 は、アイソタイプコントロール IgG1 抗体では、検出できなかったが、CaT3 または PaT3 を加えた細胞では、検出できた (図 19B)。これらの結果は、取り込まれた抗 TLR3 抗体が TLR3 と結合し複合体を形成することを示唆した。

A



B.

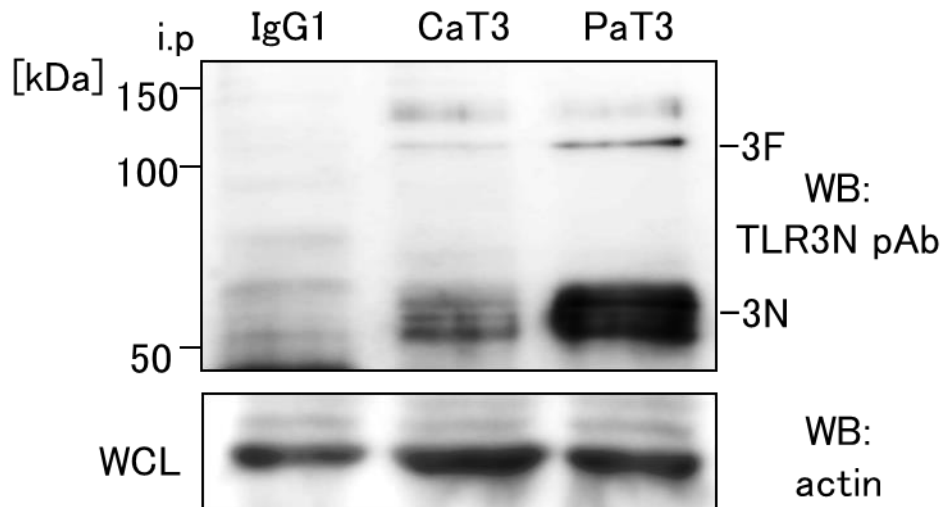


図 19. 細胞内における PaT3、TLR3 の複合体形成

(A) J774.1 細胞に、Alexa488 を付加した CaT3、PaT3 またはアイソタイプコントロール IgG1 抗体を加え、37°C で一晩培養した。培養後、抗 Alexa488 抗体で処理して、細胞表面を quenching した。その後、FACSCalibur で解析した。(B) J774.1 細胞に、CaT3、PaT3 またはアイソタイプコントロール IgG1 抗体を加えて一晩培養した。その後、プロテイン G で、抗体と TLR3 の複合体を免疫沈降し、TLR3NpAb を用いて、解析した。

(1 1) PaT3 の増強効果における細胞内への取り込みの重要性

PaT3 が TLR3 応答を増強する分子基盤を明らかにするために、細胞内への抗体の取り込みの必要性を検討した。PaT3 を、培養するプレートの底に固層化し、その上で J774.1 細胞を培養した。固定化された PaT3 は、細胞内へ取り込まれずに、細胞表面の TLR3 と結合するはずである。結果、PaT3 による TLR3 応答の増強効果は見られなかった (図 20)。よって、PaT3 が増強効果を発揮するためには、PaT3 が細胞内に取り込まれる必要があることが示唆された。

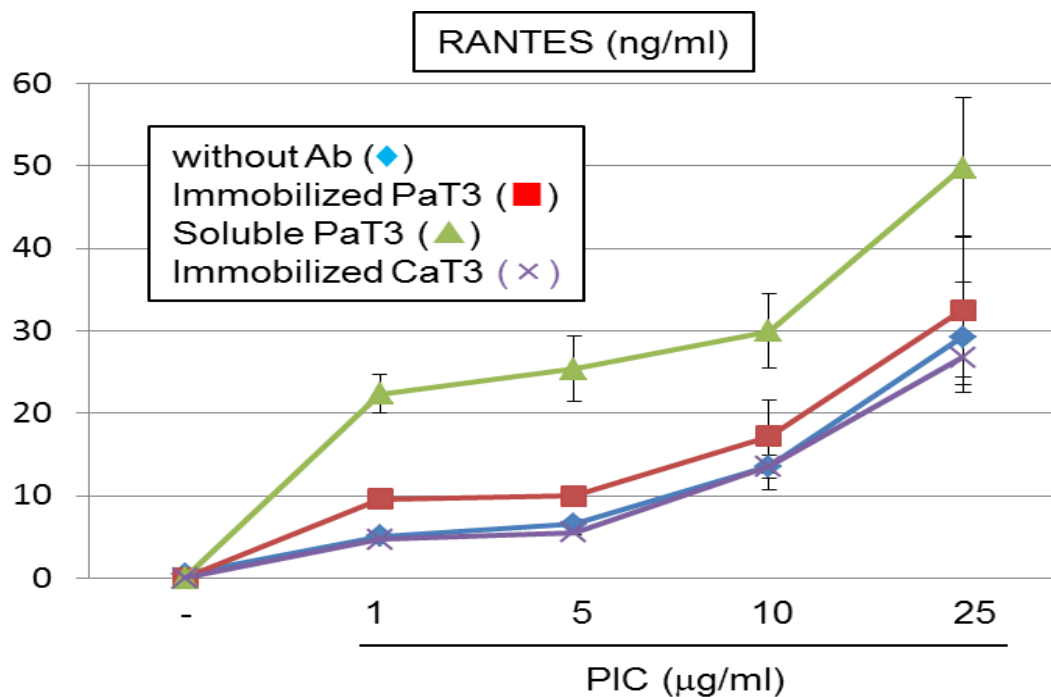


図 20. PaT3 の増強効果における細胞内への取り込みの重要性

CaT3 と PaT3 を、培養するプレートに固層化し、その上で、J774.1 細胞を培養した (immobilized CaT3 または PaT3)。また、PaT3 で 2 時間前処置する細胞も用意した。示した濃度の polyI:C で、刺激した後、RANTES の産生量を ELISA で測定した。

(1 2) PaT3 による TLR3N+C 複合体の安定化

CaT3 では見られない、PaT3 特異的な TLR3 応答の増強効果を調べるために、PaT3 と TLR3 の間で特異的な現象が起きているのではないかと予想した。前述したように、TLR3N 末端側断片 (TLR3N) と TLR3C 末端側断片 (TLR3C) は、複合体を形成し、また TLR3N はリガンドを認識するために必要であった。そこで、われわれは、PaT3 が TLR3N と TLR3C の会合を強化しているかもしれないという仮説を立てた。この仮説を、証明するために、TLR3N と TLR3C-HA を発現させた Ba/F3 細胞を溶解後、CaT3 または PaT3 で処理をして、抗 HA 抗体で免疫沈降し、TLR3NpAb で検出した。図 9 で示したように、TLR3C-HA で免疫沈降した場合、TLR3N の検出は難しかったが、PaT3 を処置した細胞で、TLR3N を検出することが可能になった。しかし、CaT3 の処置では、TLR3N を検出することはできなかった (図 21)。また、polyI:C による刺激は、TLR3N の共沈に影響しなかった。

以上の結果より、PaT3 がエンドリソソームで TLR3N と TLR3C の会合を安定化させることが考えられた。

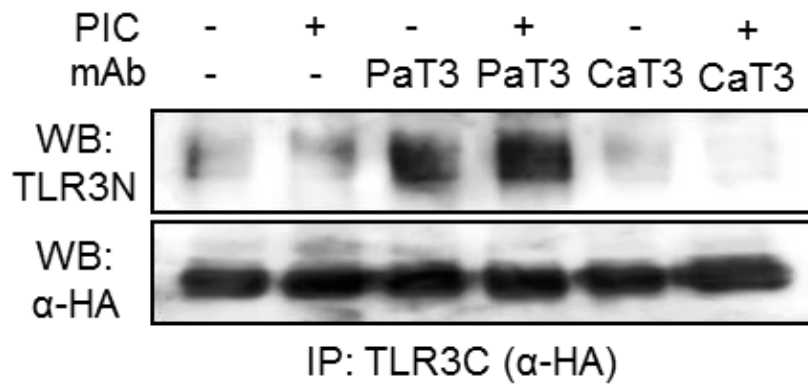


図 21. PaT3 による TLR3N+C 複合体の安定化

Ba/F3 細胞に、TLR3N と TLR3C を発現させて、polyI:C (PIC) 10μg/ml で刺激するものと、しないものを用意した。続いて細胞溶解後、PaT3 または CaT3 で 30 分処理をし、抗 HA 抗体で免疫沈降後、TLR3NpAb を用いて、western blotting で解析した。

考察

(1) TLR の構造と切断部位

TLR の細胞外領域は、ロイシンが豊富なモチーフ [Leucine Rich Motif(LRM)]の繰り返し構造からなる Leucine Rich Repeat (LRR)で構成される。LRM は、基本的に 24 個のアミノ酸からなり、ループ構造をとる(34)。TLR9 の細胞外領域は、LRR14 と LRR15 の間で、アスパラギン・エンドペプチターゼ (AEP) やカテプシンファミリーによって切断されることが報告されている(17,18)。同様に、ヒト TLR3 の細胞外領域にも似たような切断部位が、LRR12 に位置すると予想され、カテプシンファミリーによる切断が報告されている(23,24)。この予測と一致して、本研究で切断部位を、343 番目のセリンと同定し、その場所は仮説と一致した。

ヒト TLR3 の N 末端側断片 (TLR3N) と C 末端側断片 (TLR3C) の会合については、還元処理や熱変性処理をしないと全長型 TLR3 (TLR3F) しか検出できないが、処理をすると TLR3 の各切断断片が検出されるようになることから、非共有結合で TLR3N と TLR3C が会合していることが示唆されている(23)。しかしながら、エンドライソソームにおける全長型 TLR3 (TLR3F) の細胞外領域のタンパク質分解酵素による切断による TLR3 の活性化の評価では、切られていない TLR3Fに加えて、TLR3N、TLR3C の 3 つの状態が存在してしまう。そのため、切断された 2 つの TLR3N と 2 つの TLR3C が成す TLR3 の 2 量体が機能している可能性以外に、切断されていない

TLR3F の 2 量体、あるいは TLR3F と、切断された TLR3N または TLR3C が会合し機能しているという可能性を除外することは難しい。そこで、本研究において、完全に TLR3F が存在しない状態を作るために、TLR3 の発現が検出できない細胞に、TLR3N と TLR3C をそれぞれエンコードするベクターを別々に作成し、それらを同時に発現させることにした。この細胞を使って、PaT3 で TLR3N を免疫沈降すると、HA タグを付加した TLR3C (TLR3C-HA) が共沈してくるにもかかわらず、TLR3C-HA を抗 HA 抗体で免疫沈降すると、TLR3N の共沈は検出が難しかった。そのため、TLR3N と TLR3C は会合しているが、その会合は細胞溶解時に不安定になる可能性が考えられた。

しかし、PaT3 を細胞溶解液に加えることで、TLR3C-HA を免疫沈降した場合でも、TLR3N と TLR3C の共沈を検出できるようになった (図 21)。そのため、PaT3 は二つの断片の会合を強め、TLR3N と TLR3C の複合体を安定化させていると考えられた。さらに図 9 の結果より、CaT3 は TLR3F を発現させた細胞や、TLR3N と TLR3C をそれぞれエンコードしたベクターを同時に発現させた細胞は認識できるが、各 TLR3 断片を単独で発現させた細胞は認識できないことから、TLR3N と TLR3C が会合し、その複合体を CaT3 が特異的に認識していると考えられた。さらに、TLR3N と TLR3C を同時に発現させた時の構造は、TLR3F を発現させた場合と比較して、大きな変化を起ささないことが示唆された。つまり、TLR の細胞外領域において、LRR は安定した構造をとり、タンパク質分解酵素による切断は隣接した LRM 同士の位置関係に変

化を与えることはなさそうである。また、TLR3N と TLR3C は別々に翻訳されても、会合やリガンド認識能力を維持することから、TLR の結晶構造解析で報告されているような正しい馬蹄形を取ることが可能であると予測できる。

(2) TLR3N と 3C の会合とリガンド認識

TLR3N 末端側断片 (TLR3N) と C 末端側断片 (TLR3C) の間の会合は、TLR3 のリガンド応答に重要であった。 dsRNA を認識し、IFN- β と NF- κ B プロモーターを活性化することは TLR3C のみでは不可能で、TLR3N と TLR3C が形成する複合体が必要であった。また、TLR3C の N 末端の 14 アミノ酸を削除すると (TLR3C357)、TLR3N と TLR3C の複合体のリガンド応答は消失する。TLR3C357 の N 末端部分が、切断部位を含まない LRR に位置することを考えれば、14 個のアミノ酸の削除は、LRR 構造を変えてしまうために、TLR3N と TLR3C の会合ができず、複合体を形成できない可能性がある。また、TLR3N の C 末端側のアミノ酸を 14 個延長した、TLR3N356 と TLR3C343 をエンコードするベクターをそれぞれ発現させた細胞のリガンド応答は、減弱する。この結果は、延長した部分が TLR3C の N 末端部分と重なるために、正確な TLR3N と TLR3C の会合を損なっている可能性を示唆している。

以上の結果は、TLR3 の切断部位が、LRR の構造を崩さない位置にあることが、TLR3N と TLR3C の会合とリガンド認識に重要であることを示唆している。

(3) CD8 α 陽性樹状細胞 (CD8 α^+ cDC) の細胞表面 TLR3

マウスより分離した CD8 α^+ cDC と辺縁帯 B 細胞の細胞表面の TLR3 発現が、今回の

研究で初めて明らかになった。TLR3 の高い発現量が報告されていた、CD8 α^+ cDC だけでなく、辺縁帯 B 細胞の表面に TLR3 が発現していたことは予想外であった。

BM-Mcs の細胞表面 TLR3 を解析した結果、切断を受けた TLR3 が発現していた。タンパク分解酵素による翻訳後の切断が、リガンド認識に必要な過程であるという過去の報告を踏まえて考えると、細胞表面 TLR3 は細胞外のリガンドと結合できることが予想される。しかしながら、リガンドに応答し、免疫系を惹起するためには、エンドライソソーム内のような酸性環境が必要なこと(29)、図 20 で示したように、PaT3 による TLR3 応答の増強効果も処置した抗体が細胞内に取り込まれることが必要であることから、リガンドと結合した細胞表面 TLR3 が即時的に下流の免疫シグナルを活性化するとは考えにくい。今後、細胞表面 TLR3 の役割や機能を明らかにするために、細胞表面 TLR3 を発現している細胞と発現していない細胞で、リガンド応答に何か違いがないか検討することが求められる。また、細胞表面 TLR3 にリガンドが結合し、そのまま両者が細胞内に取り込まれるのか検討するべきである。

細胞表面 TLR3 の発現メカニズムの解明の一つとして、TLR3 の細胞内移行を制御する分子である、Unc93B1 の変異体マウス (3d マウス) を用いた実験を行った。試験管内での実験や細胞株で報告されていた結果と同様に、マウスの脾臓から分離した CD8 α^+ cDC の細胞表面 TLR3 の発現は、Unc93B1 に依存していた。しかしながら、図 16 B の結果から、細胞表面 TLR3 はエンドライソソームで切断を受けた後に、細胞表面に移行していると考えられるが、小胞体からエンドライソソームへの移行は、

Unc93B1 に依存していても、エンドライソソームから細胞表面への移行には、別の分子やメカニズムがある可能性も否定できないと考えられる。

前述したように、CD8 α^+ cDC は、クロスプレゼンテーション能力が高く、抗腫瘍免疫、抗ウイルス免疫に重要である。TLR3 応答を介した刺激が、この機能を増強するという報告を踏まえて考えると、CD8 α^+ cDC 細胞表面の TLR3 の機能やリガンド認識の有無を解明することは重要であると考えられる。

(4) PaT3 による TLR3 応答の増強

マウス TLR3 は、J774.1 細胞と BM-Mcs の細胞表面にも発現していた。これらの細胞では、TLR3 単クローン抗体の PaT3 が、TLR3 のリガンド応答を増強した。PaT3 単独の刺激が、J774.1 細胞と BM-Mcs のいずれの活性化も誘導しなかったため、TLR3 と単クローン抗体の単純な架橋による刺激では説明できないメカニズムがあると考えられた。さらに、同じく抗 TLR3 単クローン抗体である CaT3 ではなく、TLR3N を認識する PaT3 だけが、TLR3 応答への増強効果を示した。この結果は、細胞表面の TLR3N と PaT3 の結合には、TLR3 の応答性を調節する機能があることを示唆している。

また、PaT3 が、TLR4/MD-2 の応答とは無関係に、TLR3 の応答性を増強すること、CaT3 やアイソタイプコントロール IgG1 抗体が、TLR3 応答に影響を与えないことを考えると、抗体処置による副次的な効果ではないと考えられる。

図 19 より、37°C の培養下で、PaT3 と CaT3 は、細胞表面の TLR3 だけでなく、共

に、細胞内に取り込まれ、TLR3 と結合した。アイソタイプコントロール IgG1 抗体も同様に取り込まれたことを考えると、マクロファージ系の細胞では、Fc 受容体のように、抗体を非特異的に細胞内に取り込むメカニズムが存在しているようである。しかしながら、PaT3 のみが、TLR3N と TLR3C の会合を増強した。PaT3 による TLR3N と TLR3C の会合の強化は、エンドリソソームにおける TLR3 の応答性を強くしているようである。そのため、TLR3 の応答性に TLR3N と TLR3C の会合が重要な役割を担っていることが考えられる。

ヒト TLR3 単クローン抗体が、細胞表面に TLR3 を発現しているヒト線維芽細胞株で TLR3 の応答性を抑制することが報告されている(28)。一方、このヒト TLR3 抗体は、細胞表面に TLR3 を発現していない、単球から誘導したヒト DC では TLR3 応答の抑制効果を示さなかった(29)。それらを踏まえると、細胞表面 TLR3 には、リガンド応答を制御する何らかの役割があるのかもしれない。また、TLR3 の下流のシグナルが活性化するためには、アダプター分子やシグナル伝達分子が TLR3 と抗体の複合体に会合し、活性化する必要がある。そのため、細胞表面の TLR3 がリガンドを認識し、下流にシグナルを伝えるメカニズムを分子レベルで明らかにすることが、細胞表面 TLR3 の機能を解明するための課題だと考えられる。

BM-Mcs で、大部分のマウス TLR3 が切断を受けて、切断を受けない全長型のマウス TLR3 は、急速に分解されることが内因性 TLR3 の免疫沈降で報告されている(22)。これと一致して、細胞表面をビオチン化し、ストレプトアビジンビーズで免疫沈降し

た実験では、細胞表面 TLR3 の大部分が切断型であることを示した。TLR3 を強制発現させた報告でも、細胞表面 TLR3 は、全長型と切断型 TLR3 の存在が示されてきた(22)。これらの結果は、TLR3 がエンドリソソームで切断を受けてから、細胞表面に移行していることを支持している。前述したように、細胞内に取り込まれる単クローン抗体の PaT3 が TLR3 の応答性を強くしたことを考慮すると、細胞表面 TLR3 は、細胞内に取り込まれた後、dsRNA を認識する。そのため、エンドリソソームで切断を受けた TLR3 が細胞表面に移行し、さらに、リガンドを認識するために、細胞表面からエンドリソソームに TLR3N と TLR3C が形成する複合体が移行している可能性が考えられる。

以上のように、細胞表面 TLR3 は、TLR3 の応答を調節することが示唆される。例えば、TLR3 を細胞表面で強く発現し、ヒトでも保存されている CD8 α +cDC サブセットにおいて TLR3 応答により産生される I 型インターフェロンや炎症性サイトカインの刺激が、ウイルス感染や腫瘍免疫における、抗原特異的な CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞へのクロスプレゼンテーションやナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) の活性化を促進する(35)。今回樹立した、TLR3 応答を増強するような抗 TLR3 単クローン抗体は、polyI:C と併用することで細胞表面 TLR3 を発現している CD8 α +cDC のような免疫細胞を標的としたワクチン開発の可能性を持ち、これからの研究発展が望まれる。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始、丁寧に指導していただいた、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、研究や論文作成において、多大な助力をいただいた、谷村奈津子博士（感染遺伝学分野）、また、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。

また、東京大学「ライフイノベーションを先導するリーダー養成プログラム」(GPLLI)を通じて、研究活動やGPLLIでの活動を支援していただいた各先生に深く感謝いたします。

参考文献

1. Janeway, C.A., Jr., Travers, P., Walport, M., and Murphy, K. (2012). *Immuno Biology*, 8th edition (Garland Science)
2. Heine, H., and Lien, E. (2003). Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *International archives of allergy and Immunology* 130: 180-192.
3. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335-376.
4. Kawai, T., and Akira, S. (2007). Signaling to NF-KappaB by Toll-like receptors. *Trends in molecular medicine* 13: 460-469.
5. Tobias, P.S., and Curtiss, L.K. (2007). Toll-like receptors in atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 35: 1453-1455
6. Gilliet, M., Cao, W., and Liu, Y.J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nature reviews* 8: 594-606.
7. Krysko, D.V., Patrizia Agostinis, Olga Krysko, Abhishek D. Garg, Claus Bachert, Bart N. Lambrecht, Peter Vandenabeele (2011). Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol* 32: 157-164
8. Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J.M. Reichhart, and J.A. Hoffmann. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86: 973-983.
9. Tauszig, S., E. Jouanguy, J.A. Hoffmann, and J.L. Imler. (2000). Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci.* 97: 10520-10525.
10. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.

11. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21: 335-376.
12. 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.
13. Kaisho, T., and S. Akira. 2006. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 117: 979-987; quiz 988.
14. 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.
15. Barton, G. M., and J. C. Kagan. 2009. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol* 9: 535-542.
16. Ewald, S. E., B. L. Lee, L. Lau, K. E. Wickliffe, G. P. Shi, H. A. Chapman, and G. M. Barton. 2008. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* 456: 658-662.
17. Park, B., M. M. Brinkmann, E. Spooner, C. C. Lee, Y. M. Kim, and H. L. Ploegh. 2008. Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat Immunol* 9: 1407-1414.
18. Ewald, S. E., A. Engel, J. Lee, M. Wang, M. Bogyo, and G. M. Barton. 2011. Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. *J Exp Med* 208: 643-651.
19. Sepulveda, F. E., S. Maschalidi, R. Colisson, L. Heslop, C. Ghirelli, E. Sakka, A. M. Lennon-Duménil, S. Amigorena, L. Cabanie, and B. Manoury. 2009. Critical role for asparagine endopeptidase in endocytic Toll-like receptor signaling in dendritic cells. *Immunity* 31: 737-748.
20. Onji, M., A. Kanno, S. Saitoh, R. Fukui, Y. Motoi, T. Shibata, F. Matsumoto, A. Lamichhane, S. Sato, H. Kiyono, K. Yamamoto, and K. Miyake. 2013. An essential role for the N-terminal fragment of Toll-like receptor 9 in DNA sensing. *Nat Commun* 4: 1949.

21. Kanno, A., C. Yamamoto, M. Onji, R. Fukui, S. Saitoh, Y. Motoi, T. Shibata, F. Matsumoto, T. Muta, and K. Miyake. 2013. Essential role for Toll-like receptor 7 (TLR7)-unique cysteines in an intramolecular disulfide bond, proteolytic cleavage and RNA sensing. *Int Immunol* 25: 413-422.
22. Tanji, H., U. Ohto, T. Shibata, K. Miyake, and T. Shimizu. 2013. Structural reorganization of the Toll-like receptor 8 dimer induced by agonistic ligands. *Science* 339: 1426-1429.
22. Qi, R., D. Singh, and C. C. Kao. 2012. Proteolytic processing regulates Toll-like receptor 3 stability and endosomal localization. *J Biol Chem* 287: 32617-32629.
23. Toscano, F., Y. Estornes, F. Virard, A. Garcia-Cattaneo, A. Pierrot, B. Vanbervliet, M. Bonnin, M. J. Ciancanelli, S. Y. Zhang, K. Funami, T. Seya, M. Matsumoto, J. J. Pin, J. L. Casanova, T. Renno, and S. Lebecque. 2013. Cleaved/associated TLR3 represents the primary form of the signaling receptor. *J Immunol* 190: 764-773.
24. Garcia-Cattaneo, A., F. X. Gobert, M. Müller, F. Toscano, M. Flores, A. Lescure, E. Del Nery, and P. Benaroch. 2012. Cleavage of Toll-like receptor 3 by cathepsins B and H is essential for signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 9053-9058.
25. 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.
26. 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.
27. Mouchess, M. L., N. Arpaia, G. Souza, R. Barbalat, S. E. Ewald, L. Lau, and G. M. Barton. 2011. Transmembrane mutations in Toll-like receptor 9 bypass the requirement for ectodomain proteolysis and induce fatal inflammation. *Immunity* 35: 721-732.
28. Matsumoto, M., S. Kikkawa, M. Kohase, K. Miyake, and T. Seya. 2002. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks

- double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 1364-1369.
29. 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.
 30. Pohar, J., N. Pirher, M. Benčina, M. Manček-Keber, and R. Jerala. 2013. The Role of UNC93B1 Protein in Surface Localization of TLR3 Receptor and in Cell Priming to Nucleic Acid Agonists. *J Biol Chem* 288: 442-454.
 31. Jelinek, I., J. N. Leonard, G. E. Price, K. N. Brown, A. Meyer-Manlapat, P. K. Goldsmith, Y. Wang, D. Venzon, S. L. Epstein, and D. M. Segal. 2011. TLR3-specific double-stranded RNA oligonucleotide adjuvants induce dendritic cell cross-presentation, CTL responses, and antiviral protection. *J Immunol* 186: 2422-2429.
 32. 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. Cognet, 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.
 33. Bernard, J. J., C. Cowing-Zitron, T. Nakatsuji, B. Muehleisen, J. Muto, A. W. Borkowski, L. Martinez, E. L. Greidinger, B. D. Yu, and R. L. Gallo. 2012. Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nat Med*.
 34. Botos, I., D. M. Segal, and D. R. Davies. 2011. The structural biology of Toll-like receptors. *Structure* 19: 447-459.
 35. Schulz, O., S. S. Diebold, M. Chen, T. I. Näslund, M. A. Nolte, L. Alexopoulou, Y. T. Azuma, R. A. Flavell, P. Liljeström, and C. Reis e Sousa. 2005. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 433: 887-892.