

学位論文題名

Involvement of Leucine Residues at Positions 107, 112, and 115 in a Leucine-Rich Repeat Motif of Human Toll-Like Receptor 2 in the Recognition of Diacylated Lipoproteins and Lipopeptides and *Staphylococcus aureus* Peptidoglycans

(ジアシルリポタンパク質、ジアシルリポペプチドおよび *Staphylococcus aureus* のペプチドグリカンの認識におけるヒト Toll-Like Receptor 2 のロイシンリッチリピートに存在する107、112、115番目のロイシン残基の関与について)

学位論文内容の要旨

【目的】

Toll-like receptor 2 (TLR2)は、微生物由来リポペプチドの認識において重要な役割を果たすことが明らかにされているが、その認識機構の詳細については不明な点が多い。ジアシルリポペプチドの認識はTLR2とTLR6が、また、トリアシルリポペプチドの認識にはTLR2とTLR1が関与しているということ、さらに、TLR2のS40-I64領域が *S. aureus* 由来ペプチドグリカン(PGN)の認識に関与することが明らかにされている。

本研究では、口腔マイコプラズマ由来のリポタンパク質(LP)、ジアシルリポペプチドならびに *S. aureus* 由来ペプチドグリカン(PGN)のTLR2による認識機構を分子レベルで解析した。

【方法】

HEK293細胞(Human embryonic kidney 293細胞)はDMEM (10% fetal bovine serum, 100 unit/ml Penicillin G, 100 µg/ml streptomycin 含有)で培養し、実験に用いた。LPは *Mycoplasma salivarium* から Triton X-114 による二相分離法によって調製し、ジアシルリポペプチドは *M. salivarium* のLPの活性部位であるN末端のリポペプチド S-(2,3-bisphosphatidyl)-CGDPKHPKSF (FSL-1) を合成し、また、*S. aureus* 由来 PGN は Fluka 社から購入し、実験に用いた。

TLR2 のリポペプチド認識部位を明らかにするため、ヒト TLR2 遺伝子を pEF6/V5-His-TOPO にクローニングし、さらに疎水性のロイシン(L)を親水性のグルタミン酸(E)に置換した点変異体(L107E、L112E、L115E、L123E、L132E)、親水性のグルタミ

ン酸を疎水性のアラニン(A)に置換した点変異体(E178A、E180A、E190A)ならびに C30-S39、S40-I64、L176-Q198 を欠失した変異体を QuickChange™ XL site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE 社)を用いて作成した。

これらの遺伝子を NF- κ B ルシフェラーゼレポーター遺伝子とともに HEK293 細胞に導入し、24 時間後に LP(最終濃度 0.1、1.0、10.0 μ g/ml)、FSL-1(最終濃度 0.1、1.0、10.0 nM)あるいは PGN(最終濃度 10、100、1000 ng/ml)で 6 時間刺激し、Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega 社)を用いて、ルシフェラーゼ活性を測定することにより NF- κ B の活性化を評価した。

野生型および変異型 TLR2 タンパク質の発現は細胞外ドメインに対する polyclonal 抗体を作製し、ウェスタンブロットリング法で確認した。また、TLR2 ならびにその変異体の細胞表面における発現は共焦点レーザー走査顕微鏡およびフローサイトメトリーで確認した。トランスフェクタントを rhodamine-conjugated ConA で染色した後、rabbit polyclonal anti-TLR2 抗体および Alexa-anti-rabbit IgG 抗体で染色し、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。フローサイトメトリーでは、トランスフェクタントを isotype-matched mouse IgG または anti-TLR2 mAb および FITC-conjugated anti-mouse IgG で染色した後、解析した。

【結果と考察】

HEK293 細胞は本来内在性の機能的 TLR2 を発現していないことから、TLR 遺伝子導入細胞として用いた。TLR2 野生型および変異体遺伝子の導入により、それらのタンパク質の発現が、ウェスタンブロットリング法、共焦点レーザー走査顕微鏡観察およびフローサイトメトリーにより確認された。

FSL-1 は TLR2 のみを導入した細胞で認識され、また、TLR6 の共導入により認識レベルが増強されたが、TLR6 のみを導入した細胞では FSL-1 の認識がほとんど認められなかった。これらの結果は、ジアシルリポペプチドが TLR2 および TLR6 により認識されるという以前の報告と一致している。

C30-S39 の欠失変異体を導入した細胞では 10 nM の FSL-1 で、野生型とほぼ同程度の NF- κ B の活性化が誘導されたが、低濃度では明らかな活性化レベルの減少が認められた。したがって、C30-S39 領域は FSL-1 の認識に関与しているものと推測される。また、S40-I64 の欠失変異体を導入した細胞では NF- κ B の活性化がまったく認められなかった。このことから、以前報告された PGN の場合と同様に FSL-1 の認識についても S40-I64 領域が関与しているものと推測される。さらに、L176-Q198 の欠失変異体導入細胞では、S40-I64 の場合と同様に NF- κ B の活性化が認められず、この領域の FSL-1 の認識への関与が示唆される。

TLR2 野生型および TLR2 点変異体(E180A、E190A、L123E、L132E)を導入した細胞では LP、FSL-1 ならびに PGN 刺激によって NF- κ B の活性化が誘導されたが、

L115Eを導入した細胞では3つのリガンドに対してNF- κ Bの活性化は誘導されなかった。この結果は、L115がTLR2のFSL-1、LPならびにPGNの認識に関与していることを示唆している。さらに、L115近傍に存在する107番目、112番目、123番目のロイシンをグルタミン酸に置換した点変異体の導入細胞でもFSL-1およびPGN刺激によるNF- κ Bの活性化は誘導されなかった。さらに、E180A、L115E、L107E、S40-I64をTLR2野生型とともに導入し、FSL-1刺激によるNF- κ Bの活性化を調べた。その結果、E180Aの点変異体導入細胞では約2倍のNF- κ Bの活性化が誘導されたが、L115E、L107EならびにS40-I64の導入細胞ではFSL-1刺激によるNF- κ Bの活性化は約半分になっていた。すなわち、NF- κ Bの活性化を誘導しない変異体はドミナントネガティブとして機能することが示唆された。

以上の結果より、TLR2の40番目のセリンから64番目のイソロイシンまでの領域は、*S. aureus*由来PGNだけでなく、ジアシルリポペプチドFSL-1の認識にも関与しているということ、またTLR2細胞外ドメインにおけるひとつのロイシンリッチリピートに存在する107、112、115番目のロイシン残基はFSL-1および*S. aureus*PGNの認識に関与しているものと推測される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 森 田 学

副 査 教 授 柴 田 健一郎

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

Involvement of Leucine Residues at Positions 107, 112, and 115 in a Leucine-Rich Repeat Motif of Human Toll-Like Receptor 2 in the Recognition of Diacylated Lipoproteins and Lipopeptides and *Staphylococcus aureus* Peptidoglycans

(ジアシルリポタンパク質、ジアシルリポペプチドおよび *Staphylococcus aureus* のペプチドグリカンの認識におけるヒト Toll-Like Receptor 2 のロイシンリッチリピートに存在する107、112、115番目のロイシン残基の関与について)

審査は柴田、鈴木および森田審査委員全員が出席のもとに、まずは論文提出者に対して提出論文の内容の要旨を説明させ、提出論文の内容に関する審査委員の口頭試問を行った。以下に、提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

【提出論文の要旨】

Toll-like receptor 2 (TLR2)は、微生物由来リポペプチドの認識において重要な役割を果たすことが明らかにされているが、その認識機構の詳細については不明な点が多い。本研究では、口腔マイコプラズマ由来のリポタンパク質(LP)、ジアシルリポペプチドならびに *S. aureus* 由来ペプチドグリカン(PGN)のTLR2による認識機構を分子レベルで解析した。

HEK293 細胞(Human embryonic kidney 293 細胞)はDMEM (10% fetal bovine serum, 100 unit/ml Penicillin G、100 µg/ml streptomycin 含有)で培養し、実験に用いた。LPは *Mycoplasma salivarium* から Triton X-114 による二相分離法によって調製し、ジアシルリポペプチドは *M. salivarium* のLPの活性部位であるN末端のリポペプチド S-(2,3-bisphosphatidyl)-CGDPKHPKSF (FSL-1) を合成し、また、*S. aureus* 由来 PGN は Fluka 社から購入し、実験に用いた。

TLR2 のリポペプチド認識部位を明らかにするため、ヒト TLR2 遺伝子を pEF6/V5-His-TOPO にクローニングし、さらに疎水性のロイシン(L)を親水性のグルタミン酸(E)に置換した点変異体(L107E、L112E、L115E、L123E、L132E)、親水性のグルタミン酸を疎水性のアラニン(A)に置換した点変異体(E178A、E180A、E190A)ならびに C30-S39、S40-I64、L176-Q198を欠失した変異体を QuickChange™ XL site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE 社)を用いて作成した。

これらの遺伝子を NF- κ B ルシフェラーゼレポーター遺伝子とともに HEK293 細胞に導入し、24 時間後に LP、FSL-1 あるいは PGN で 6 時間刺激し、Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega 社)を用いて、ルシフェラーゼ活性を測定することにより NF- κ B の活性化を評価した。

野生型および変異型 TLR2 タンパク質の発現は細胞外ドメインに対する polyclonal 抗体を作製し、ウェスタンブロッティング法で確認した。また、TLR2 ならびにその変異体の細胞表面における発現は共焦点レーザー走査顕微鏡およびフローサイトメトリーで確認した。

FSL-1 は TLR2 のみを導入した細胞で認識され、また、TLR6 の共導入により認識レベルが増強されたが、TLR6 のみを導入した細胞では FSL-1 の認識がほとんど認められなかった。これらの結果は、ジアシルリポペプチドが TLR2 および TLR6 により認識されるという以前の報告と一致している。

C30-S39 の欠失変異体を導入した細胞では 10 nM の FSL-1 で、野生型とほぼ同程度の NF- κ B の活性化が誘導されたが、低濃度では明らかな活性化レベルの減少が認められた。したがって、C30-S39 領域は FSL-1 の認識に関与しているものと推測される。また、S40-I64 の欠失変異体を導入した細胞では NF- κ B の活性化がまったく認識されなかった。このことから、以前報告された PGN の場合と同様に FSL-1 の認識についても S40-I64 領域に関与しているものと推測される。さらに、L176-Q198 の欠失変異体導入細胞では、S40-I64 の場合と同様に NF- κ B の活性化が認められず、この領域の FSL-1 の認識への関与が示唆される。

TLR2 野生型および TLR2 点変異体(E180A、E190A、L123E、L132E)を導入した細胞では LP、FSL-1 ならびに PGN 刺激によって NF- κ B の活性化が誘導されたが、L115Eを導入した細胞では3つのリガンドに対してNF- κ Bの活性化は誘導されなかった。この結果は、L115がTLR2のFSL-1、LPならびにPGNの認識に関与していることを示唆している。さらに、L115近傍に存在する107番目、112番目のロイシンをグルタミン酸に置換した点変異体の導入細胞でもFSL-1およびPGN刺激によるNF- κ Bの活性化は誘導されなかった。さらに、E180A、L115E、L107E、S40-I64をTLR2野生型とともに導入し、FSL-1刺激によるNF- κ Bの活性化を調べた。その結果、E180Aの点変異体導入細胞では約2倍のNF- κ Bの活性化が誘導されたが、L115E、L107Eならび

に S40-I64 の導入細胞では FSL-1 刺激による NF- κ B の活性化は約半分になっていた。すなわち、NF- κ B の活性化を誘導しない変異体はドミナントネガティブとして機能することが示唆された。

以上の結果より、TLR2 の 40 番目のセリンから 64 番目のイソロイシンまでの領域は、*S. aureus* 由来 PGN だけでなく、ジアシルリポペプチド FSL-1 の認識にも関与しているということ、また TLR2 細胞外ドメインにおけるひとつのロイシンリッチリピートに存在する 107、112、115 番目のロイシン残基は FSL-1 および *S. aureus* PGN の認識に関与しているものと推測される。

審査委員からの質問として、

- 1) ジアシルリポペプチド FSL-1 と *M.salivarium* のリポタンパク質の分子量の比較について
- 2) リポペプチドとリポタンパク質の認識機構の違いの有無について
- 3) TLR2 のみでリガンド認識する機構について(二量体の形成について)
- 4) TLR6 の co-receptor としての役割について
- 5) TLR2 の点変異体、欠失変異体作成について
 - (1)方法
 - (2)部位の決定理由
- 6) PGN の構造とリポタンパク質およびリポペプチドの構造の違いについて

等があったが、論文提出者はそれぞれに的確に解答し、考察・展望について明確に言及した。

論文提出者は、ヒト TLR2 におけるマイコプラズマ由来リポタンパク質ならびにその合成リポペプチド FSL-1 の認識機構について検討した。本研究のような基礎的見解を今後の臨床へ応用する展望についても考察しており、将来性の点においても評価できる。よって、学位申請者は博士(歯学)の学位授与に値するものと判断し、主査ならびに副査は合格と判定した。