

学 位 論 文 題 名

CD14 directly binds to triacylated lipopeptides and facilitates recognition of the lipopeptides by the receptor complex of Toll-like receptors 2 and 1 without binding to the complex

(CD14は TLR2/TLR1複合体に結合することなく TLR2/TLR1複合体によるリポペプチド認識を増強させる)

学位論文内容の要旨

微生物ならびにその構成成分 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) は Toll-like receptor (TLR) を介して自然免疫応答を惹起することが知られている。近年、ヒトにおいて10種のTLRが同定され、これらのTLRは細菌、ウイルス、真菌、原虫の侵入を感知するだけでなく、獲得免疫応答への橋渡しを行っている。TLRの中で、特にTLR2はその特異性が広く、リポタンパク質、リポペプチド、ペプチドグリカン、リポアラビノマンナン、ポーリン、原虫のGPI-anchored protein、酵母のザイモザンなど構造の異なる様々のリガンドを認識する。また、TLR2によるトリアシルならびにジアシルリポペプチドの認識には、それぞれTLR1ならびにTLR6を共受容体としていることが明らかとなっている。そこで、我々もTLR2によるトリアシルリポペプチドであるPam₃CSK₄とPam₃CSSNAの認識にTLR1が補助レセプターとして必要であるかどうかを、TLR2あるいはTLR1を共導入したhuman embryonic kidney 293 (HEK293) 細胞を用いて、NF- κ B レポーター法で調べた。しかしながら、これらのトリアシルリポペプチドはTLR2/TLR1によって認識されたが、その認識レベルは非常に低かった。そこで、これらのトリアシルリポペプチド認識には他に何らの分子が必要ではないかと考えた。まず、その第一候補分子としてCD14を考えた。というのは、CD14はLPSに結合し、TLR4/MD-2複合体によるLPS認識に関与すること、また、TLR2によるペプチドグリカンの認識を増強することが明らかされているからである。そこで、本研究では、TLR2/TLR1によるトリアシルリポペプチドの認識に及ぼすCD14の影響を分子レベルで解析した。

HEK293細胞にTLR2、TLR1ならびにCD14を同時に導入することによりトリアシルリポペプチドの認識が劇的に増強されること、また、TLR1がないとCD14による認識の増強は誘導されないことを明らかにした。そこで、このCD14の認識増強活性におけるTLR1の必要性をさらに解析するために、RNA干渉法によりTLR1のmRNAを特異的にノックダウンしたところ、TLR1の発現の減弱とともにCD14による認識増強活性も減弱した。次に、CD14のどの領域がこの増強活性に重要であるかを明らかにするために、X線結晶解析で明らかにされたN末端領域

のbinding pocket部分を欠失した変異体であるCD14^{S39-A48}と、を作成し、その増強活性を調べた。その結果、CD14の認識増強活性は顕著に減弱した。さらに、抗CD14抗体のCD14の認識増強活性に及ぼす影響を調べたところ、その増強活性が減弱した。以上の結果から、TLR2/TLR1によるトリアシルリポペプチドの認識はCD14で増強され、その認識増強活性にはCD14のN末端領域に存在するbinding pocket部分が重要であることが示唆された。また、この認識増強はリコンビナントの可溶性CD14によっても誘導された。興味深いことにジアシルリポペプチドであるFSL-1を用いて同様の実験を行ったところ、CD14による認識の増強は起こらなかった。したがって、この認識増強はTLR2/TLR1によるトリアシルリポペプチドの認識に特異的に起こることが判明した。次に、CD14の認識増強活性のシグナルはTLR2あるいはTLR1のどちらから伝達されているのかを確認するために、TIRドメインを欠損した変異体TLR2^{dE772-S784}ならびにTLR1^{dQ636-K779}を作成し、CD14による認識増強活性を調べたところ、増強活性はみられなかった。このことから、CD14の認識増強活性のシグナルはTLR2とTLR1の双方から伝達されていることが示唆された。

最近、ManukyanらはFRETとFRAP imaging techniqueを用いて、トリアシルリポペプチドがCD14に結合し、さらにこの複合体がTLR2・TLR1と結合し、4分子複合体を形成することでマクロファージを活性化する。しかしながら、我々は、表面プラズモン共鳴法によりPam₃CSK₄とCD14は5.7 μ Mの解離乗数で結合していること、また、免疫沈降法によりTLR1はTLR2と結合しているが、CD14はTLR2/TLR1複合体に結合していないことを明らかにした。

以上の結果より、トリアシルリポペプチド認識の分子メカニズムとして、まずCD14がトリアシルリポペプチドに直接結合し、TLR2/TLR1複合体に結合することなく、TLR2/TLR1複合体にトリアシルリポペプチドを手渡すことにより認識を容易にしているのではないかと推察された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 佐 野 英 彦

副 査 教 授 柴 田 健一郎

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

CD14 directly binds to triacylated lipopeptides and facilitates recognition of the lipopeptides by the receptor complex of Toll-like receptors 2 and 1 without binding to the complex

(CD14は TLR2/TLR1複合体に結合することなく

TLR2/TLR1複合体によるリポペプチド認識を増強させる)

審査は佐野、柴田および鈴木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

微生物ならびにその構成成分 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) は Toll-like receptor (TLR) を介して自然免疫応答を惹起することが知られている。近年、ヒトにおいて10種のTLRが同定され、これらのTLRは細菌、ウイルス、真菌、原虫の侵入を感知するだけでなく、獲得免疫応答への橋渡しを行っている。TLRの中で、特にTLR2はその特異性が広く、リポタンパク質、リポペプチド、ペプチドグリカン、リポアラビノマンナン、ポーリン、原虫のGPI-anchored protein、酵母のザイモザンなど構造の異なる様々のリガンドを認識する。また、TLR2によるトリアシルならびにジアシルリポペプチドの認識には、それぞれTLR1ならびにTLR6を共受容体としていることが明らかとなっている。そこで、我々もTLR2によるトリアシルリポペプチドであるPam₃CSK₄とPam₃CSSNAの認識にTLR1が補助レセプターとして必要であるかどうかを、TLR2あるいはTLR1を共導入したhuman embryonic kidney 293 (HEK293) 細胞を用いて、NF- κ B レポーター法で調べた。しかしながら、これらのトリアシルリポペプチドはTLR2/TLR1によって認識されたが、その認識レベルは非常に低かった。そこで、これらのトリアシルリポペプチド認識には他に何らの分子が必要ではないかと考えた。まず、その第一候補分子としてCD14を考えた。というのは、CD14はLPSに結合し、TLR4/MD-2複合体による

LPS認識に関与すること、また、TLR2によるペプチドグリカンの認識を増強することが明らかされているからである。そこで、本研究では、TLR2/TLR1によるトリアシルリポペプチドの認識に及ぼすCD14の影響を分子レベルで解析した。

HEK293細胞にTLR2、TLR1ならびにCD14を同時に導入することによりトリアシルリポペプチドの認識が劇的に増強されること、また、TLR1がないとCD14による認識の増強は誘導されないことを明らかにした。そこで、このCD14の認識増強活性におけるTLR1の必要性をさらに解析するために、RNA干渉法によりTLR1のmRNAを特異的にノックダウンしたところ、TLR1の発現の減弱とともにCD14による認識増強活性も減弱した。次に、CD14のどの領域がこの増強活性に重要であるかを明らかにするために、X線結晶解析で明らかにされたN末端領域のbinding pocket部分を欠失した変異体であるCD14^{S39-A48}と、を作成し、その増強活性を調べた。その結果、CD14の認識増強活性は顕著に減弱した。さらに、抗CD14抗体のCD14の認識増強活性に及ぼす影響を調べたところ、その増強活性が減弱した。以上の結果から、TLR2/TLR1によるトリアシルリポペプチドの認識はCD14で増強され、その認識増強活性にはCD14のN末端領域に存在するbinding pocket部分が重要であることが示唆された。また、この認識増強はリコンビナントの可溶性CD14によっても誘導された。興味深いことにジアシルリポペプチドであるFSL-1を用いて同様の実験を行ったところ、CD14による認識の増強は起こらなかった。したがって、この認識増強はTLR2/TLR1によるトリアシルリポペプチドの認識に特異的に起こることが判明した。次に、CD14の認識増強活性のシグナルはTLR2あるいはTLR1のどちらから伝達されているのかを確認するために、TIRドメインを欠損した変異体TLR2^{dE772-S784}ならびにTLR1^{dQ636-K779}を作成し、CD14による認識増強活性を調べたところ、増強活性はみられなかった。このことから、CD14の認識増強活性のシグナルはTLR2とTLR1の双方から伝達されていることが示唆された。

最近、ManukyanらはFRETとFRAP imaging techniqueを用いて、トリアシルリポペプチドがCD14に結合し、さらにこの複合体がTLR2・TLR1と結合し、4分子複合体を形成することでマクロファージを活性化する。しかしながら、我々は、表面プラズモン共鳴法によりPam₃CSK₄とCD14は5.7 μ Mの解離乗数で結合していること、また、免疫沈降法によりTLR1はTLR2と結合しているが、CD14はTLR2/TLR1複合体に結合していないことを明らかにした。

以上の結果より、トリアシルリポペプチド認識の分子メカニズムとして、まずCD14がトリアシルリポペプチドに直接結合し、TLR2/TLR1複合体に結合することなく、TLR2/TLR1複合体にトリアシルリポペプチドを手渡すことにより認識を容易にしているのではないかと推察された。

審査委員からの質問として、

- 1) sCD14とアレルギー疾患との関連について
- 2) リポペプチドの認識に関わるTLR2とその共受容体であるTLR1とTLR6について
- 3) TLR1をノックダウンすることによる発現の抑制の度合について
- 4) リポペプチドとCD14の結合様式と結合部位について
- 5) TLR2単独よりもTLR1またはCD14の共発現することによるTLR2の発現増加について
- 6) FSL-1刺激によるlysate中のCD14の発現増加について

7) 今後の研究の展望と発展性について等についての質問があったが、論文提出者はそれぞれに的確に解答した。

自然免疫における抗原の認識は獲得免疫のそれに比して、明らかとされていなかったが、TLRの発見により自然免疫でもレセプターによる特異的な認識が行われており、そのシグナルによる獲得免疫系の活性化など生体の恒常性維持に必須な分子である。本研究はトリアシルリポペプチドの認識に関わるTLR2, TLR1, CD14の分子メカニズムを解明した興味深い内容である。感染また、それに伴う炎症等の制御にはTLRによる認識のメカニズムを解明することは非常に重要であり、本研究はその一助となると考えられ、また臨床応用への発展性の面でも評価できる内容である。

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。