博士（歯　学）　片　岡　嗣　雄

学位論文題名

Roles of N-linked glycans in the recognition of microbial lipopeptides and lipoproteins by TLR2

（TLR2による細菌由来リポタンパク質・リポペプチドの認識における
N結合型糖鎖の役割）

学位論文内容の要旨

Toll-like receptor (TLR) はマクロファージや樹状細胞などの貪食細胞に発現し、微生物の侵入を感知するセンサーとして、また、自然免疫系と獲得免疫系を橋渡しする分子として注目されている。現在約10種類のTLRが発見され、種々の微生物由来の分子パターン（PAMPs）を認識することが明らかにされている。微生物由来リポペプチド (LPT) の認識にはTLR2が重要な役割を果たしているが、その認識機構の詳細については不明な点が多く残されている。そこで、本研究では、TLR2細胞外ドメインのN114、N199、N414およびN442に結合すると推測されている糖鎖に着目し、これらのN-結合型糖鎖がTLR2のリガンド認識ならびに機能的なレセプター複合体の形成に関与するかどうかを検討した。

*Mycoplasma salivarium*に存在するリポタンパク質（MLP）のN末端の構造をもとにジアシルLPT FSL-1 (S-2,3-bispalmitoyloxypropyl-Cys-Gly-Asp-Pro-Lys-His-Pro-Lys-Ser-Phe)を化学的に合成した。TLR2細胞外ドメインの糖鎖結合部位とされるN114、N199、N414およびN442をAに変換した点変異体 [N114A (M1)、N199A (M2)、N414A (M3)、N442A (M4)]を作成した。これらの変異体と野生型TLR2の遺伝子をNF-κB依存性ルシフェラーゼレポーター遺伝子と共にhuman embryonic kidney (HEK)293細胞に導入し、24時間後にFSL-1ならびにMLPで6時間刺激して、NF-κBレポーター活性を測定した。その結果、M4ではM1、M2、M3および野生型TLR2に比べてNF-κBレポーター活性が有意に低下した。また、全ての点変異体はHEK293細胞表面に発現しており、野生型に比べて分子量が小さくなったことから、これらのN残基にはそれぞれ糖鎖が結合していることが示唆された。

TLR2は細胞表面において複合体を形成し、TLR6を補助レセプターとしてジアシルMLP・LPTを認識する。そこで、これらの点変異体とTLR2野生型ならびにTLR6がレセプター複合体を形成するかどうかを調べるために、TLR2-FLAGタグならびにTLR6-HAタグを安定発現させたHEK293細胞に、これらのTLR2点変異体を導入して免疫沈降法で調べたところ、これらの点変異体は全てTLR2野生型なら

びにTLR6と複合体を形成していた。この結果から、これらの点変異はレセプター複合体の形成を阻害しないということが確認された。以上の結果から、TLR2のN442に結合している糖鎖がリガンド認識に関与していることが示唆された。

これらのN結合型糖鎖の役割をさらに詳細に調べるために、これら4箇所のNを全てAに変換した4点同時変異体[M1+M2+M3+M4 (M1/2/3/4)]、そして4箇所のうち3箇所を同時に変換した3点同時変異体[M2+M3+M4 (M2/3/4)、M1+M2+M4 (M1/2/4)、M1+M2+M3 (M1/2/3)]、2箇所を同時に変換した2点同時点変異体[M3+M4 (M3/4)、M2+M4 (M2/4)、M2+M3 (M2/3)]を作成し、FSL-1 ならびにMLPの認識を、同様にNF-κBルシフェラーゼレポーター法で調べた。その結果、糖鎖結合部位をすべて失った4点同時変異体、3箇所失った3点同時変異体および2箇所失った2点同時変異体では、いずれのリガンドも認識されなかった。

TLR2 の立体構造はβ-シートを内側にした馬蹄形であると推測されているが、4箇所の糖鎖結合部位のうち、N199、N414、N442に結合する糖鎖は馬蹄形の内側に存在することが推測されている。そこで、次に、このようなTLR2推定立体構造の視点から、馬蹄形ソレノイドの内側に2箇所の糖鎖結合部位を残した2点同時点変異体[M1+M2 (M1/2)、M1+M3 (M1/3)、M1+M4 (M1/4)]を作成して同様にFSL-1 ならびにMLPの認識を調べたが、これらの変異体のうちM1/2とM1/3は野生型とほぼ同程度にリガンドを認識し、M1/4は認識が弱くなるという結果が得られた。これらのことから、馬蹄形ソレノイドの内側に2箇所の糖鎖結合部位を残した変異体はリガンドを認識するのに対し、内側に1箇所しか糖鎖結合部位が残っていない変異体はリガンドを認識しないということが示された。これらの複数同時点変異体は、前述の点変異体と同様に全てHEK293 細胞表面に発現しており、変換箇所の増加に従ってTLR2野生型よりも分子量が低下したことから、これらのN残基に糖鎖が結合していることが示唆された。さらに前述のように、免疫沈降法によってTLR2野生型ならびにTLR6との複合体形成を調べたところ、これら全ての複数同時点変異体はレセプター複合体の形成を阻害しなかった。以上のことを考え合わせると、TLR2がリガンドを認識するためには、細胞外ドメインの立体構造として推測される馬蹄形ソレノイドの内側に3箇所存在する糖鎖結合部位のうち、N442を含む2箇所が最低限必要であることが示唆された。

次に、ゴルジ体での糖鎖修飾阻害剤であるTunicamycinのTLR2によるリガンド認識に及ぼす影響を検証した。前述したNF-κBルシフェラーゼレポーター法において、TLR2野生型遺伝子を導入したHEK293細胞をFSL-1で刺激し、さらにTunicamycinを添加すると、Tunicamycinの濃度に依存してリガンド認識が弱くなることを確認した。さらに、TunicamycinにはTLR2の細胞表面への発現を阻害する作用はみられなかった。このことからも、TLR2に存在するN結合型糖鎖はTLR2のリガンド認識に重要な役割を果たすことが示唆された。

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　柴　田　健一郎

副　査　教　授　田　村　正　人

副　査　教　授　鈴　木　邦　明

学位論文題名

Roles of N-linked glycans in the recognition of microbial lipopeptides and lipoproteins by TLR2

(TLR2による細菌由来リポタンパク質・リポペプチドの認識における N結合型糖鎖の役割)

審査は柴田、田村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。

論文の要旨

Toll-like receptor (TLR)はマクロファージや樹状細胞などの貪食細胞に発現し、微生物の侵入を感知するセンサーとして、また、自然免疫系と獲得免疫系を橋渡しする分子として注目されている。現在約10種類のTLRが発見され、種々の微生物由来の分子パターン (PAMPs) を認識することが明らかにされている。微生物由来リポペプチド (LPT) の認識にはTLR2が重要な役割を果たしているが、その認識機構の詳細については不明な点が多く残されている。そこで、本研究では、TLR2細胞外ドメインのN114、N199、N414およびN442に結合すると推測されている糖鎖に着目し、これらのN-結合型糖鎖がTLR2のリガンド認識ならびに機能的なレセプター複合体の形成に関与するかどうかを検討した。

*Mycoplasma salivarium*に存在するリポタンパク質 (MLP) のN末端の構造をもとにジアシルLPT FSL-1 (S-2,3-bispalmitoyloxypropyl-Cys-Gly-Asp-Pro-Lys- His-Pro-Lys-Ser-Phe)を化学的に合成した。TLR2細胞外ドメインの糖鎖結合部位とされるN114、N199、N414およびN442をAに変換した点変異体 [N114A (M1)、N199A (M2)、N414A (M3)、N442A (M4)]を作成した。これらの変異体と野生型TLR2の遺伝子をNF-κB依存性ルシフェラーゼレポーター遺伝子と共にhuman embryonic kidney (HEK)293細胞に導入し、24時間後にFSL-1ならびにMLPで6時間刺激して、NF-κBレポーター活性を測定した。その結果、M4ではM1、M2、M3および野生型TLR2に比べてNF-κBレポーター活性が有意に低下した。また、全ての点変異体はHEK293細胞表面に発現しており、野生型に比べて分子量が小さくなったことから、これらのN残基にはそれぞれ糖鎖が結合していることが示唆された。TLR2は細胞表面において複合体を形成し、TLR6を補助レセプターとしてジアシルMLP・LPTを認識する。そこで、これらの点変異体とTLR2野生型ならびにTLR6がレセプター複合体を形成するかどうかを調べるために、TLR2-FLAGタグならびにTLR6-HAタグを安定発現させたHEK293細胞に、これらのTLR2点変異体を導入して免疫沈降法で調べたところ、これらの点変異体は全てTLR2野生型ならびにTLR6と複合体を形成していた。この結果から、これらの点変異はレセプター複合体の形成を阻害しないということが確認された。以上の結果から、TLR2のN442に結合している糖鎖がリガンド認識に関与していることが示唆された。

これらのN結合型糖鎖の役割をさらに詳細に調べるために、これら4箇所のNを全てAに変

換した4点同時変異体[M1+M2+M3+M4 (M1/2/3/4)]、そして4箇所のうち3箇所を同時に変換した3点同時変異体[M2+M3+M4 (M2/3/4)、M1+M2+M4 (M1/2/4)、M1+M2+M3 (M1/2/3)]、2箇所を同時に変換した2点同時点変異体[M3+M4 (M3/4)、M2+M4 (M2/4)、M2+M3 (M2/3)]を作成し、FSL-1 ならびに MLP の認識を、同様に NF-κB ルシフェラーゼレポーター法で調べた。その結果、糖鎖結合部位をすべて失った4点同時変異体、3箇所失った3点同時変異体および2箇所失った2点同時変異体では、いずれのリガンドも認識されなかった。

TLR2 の立体構造はβ-シートを内側にした馬蹄形であると推測されているが、4 箇所の糖鎖結合部位のうち、N199、N414、N442 に結合する糖鎖は馬蹄形の内側に存在することが推測されている。そこで、次に、このような TLR2 推定立体構造の視点から、馬蹄形ソレノイドの内側に2箇所の糖鎖結合部位を残した2点同時点変異体[M1+M2 (M1/2)、M1+M3 (M1/3)、M1+M4 (M1/4)]を作成して同様に FSL-1 ならびに MLP の認識を調べたが、これらの変異体のうち M1/2 と M1/3 は野生型とほぼ同程度にリガンドを認識し、M1/4 は認識が弱くなるという結果が得られた。これらのことから、馬蹄形ソレノイドの内側に2箇所の糖鎖結合部位を残した変異体はリガンドを認識するのに対し、内側に1箇所しか糖鎖結合部位が残っていない変異体はリガンドを認識しないということが示された。

これらの複数同時点変異体は、前述の点変異体と同様に全て HEK293 細胞表面に発現しており、変換箇所の増加に従って TLR2 野生型よりも分子量が低下したことから、これらの N 残基に糖鎖が結合していることが示唆された。さらに前述のように、免疫沈降法によって TLR2 野生型ならびに TLR6 との複合体形成を調べたところ、これら全ての複数同時点変異体はレセプター複合体の形成を阻害しなかった。以上のことを考え合わせると、TLR2 がリガンドを認識するためには、細胞外ドメインの立体構造として推測される馬蹄形ソレノイドの内側に3箇所存在する糖鎖結合部位のうち、N442 を含む2箇所が最低限必要であることが示唆された。

次に、ゴルジ体での糖鎖修飾阻害剤である Tunicamycin の TLR2 によるリガンド認識に及ぼす影響を検証した。前述した NF-κB ルシフェラーゼレポーター法において、TLR2 野生型遺伝子を導入した HEK293 細胞を FSL-1 で刺激し、さらに Tunicamycin を添加すると、Tunicamycin の濃度に依存してリガンド認識が弱くなることを確認した。さらに、Tunicamycin には TLR2 の細胞表面への発現を阻害する作用はみられなかった。このことからも、TLR2 に存在する N 結合型糖鎖は TLR2 のリガンド認識に重要な役割を果たすことが示唆された。

審査委員からの質問として、

1）N結合糖鎖はモチーフ解析で推測できるのか
2）TLR2の変異体をどのようにして作ったのか
3）どのような糖鎖が結合しているのか
4）このような認識機構の解析はどのようなことに応用可能なのか
5）Tunicamycinは何を阻害するのか
6）今後の研究の展望と発展性について

等があったが、論文提出者はそれぞれに的確に解答した。

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。