

学位論文題名

The TLR2 ligand FSL-1 is internalized via clathrin-dependent endocytic pathway triggered by CD14 and CD36 but not by TLR2

(クラスリン依存的な TLR2リガンド FSL-1の取り込みは TLR2ではなく CD14と CD36に依存的である)

学位論文内容の要旨

ジアシルリポペプチド FSL-1 の認識には宿主細胞の TLR2 が重要な役割を果たす。しかしながら、TLR2 リガンドが認識された後どのように処理されるかは未だ不明な点が多い。そこで、本研究ではマクロファージの TLR2 によって FSL-1 が認識された後に、どのように処理されるかを調べた。

FSL-1 の取り込みに及ぼすナイスタチン(カベオラならびにリピッドラフト依存的な取り込みの阻害剤)、クロルプロマジン(クラスリン依存的取り込みの阻害剤)、あるいはメチル-β-サイクロデキストリン(リピッドラフト依存的ならびにクラスリン依存的取り込みの阻害剤)などのエンドサイトーシス阻害剤の影響、ならびに RNAi 法により、FSL-1 の取り込みはクラスリン依存的であることが示唆された。クラスリン依存的な取り込みが受容体依存的であることから、FSL-1 のクラスリン依存的な取り込みには TLR2 が受容体として関与していると考えた。しかしながら、FSL-1 と TLR2 は細胞表面では結合するが細胞質内小胞では共局在せず、さらに、FSL-1 は TLR2 遺伝子欠損マウス由来の腹腔マクロファージでも、正常マウス腹腔マクロファージと同様に取り込まれることがわかった。これに対して、FSL-1 認識後の細胞表面における TLR2 の発現は減少していた。これらのことから、FSL-1 の認識後に TLR2 が細胞内に取り込まれるが、FSL-1 の取り込みには TLR2 は受容体として機能しないことがわかった。そこで、FSL-1 の取り込みに TLR2 の補助レセプターである CD14 と CD36 が関与するのではないかと考えた。HEK293 細胞は FSL-1 を取り込まなかったが、CD14 あるいは CD36 を発現する HEK293 細胞は FSL-1 を取り込むことがわかった。さらに、これらの細胞における CD14 ならびに CD36 の RNAi 法によりそれぞれの細胞表面における発現減少させると FSL-1 の取り込み活性も減少した。

以上のことから、FSL-1 はクラスリン依存的な経路でマクロファージに取り込まれ、その取り込みには TLR2 ではなく CD14 と CD36 が重要な役割を果たしていることがわかった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 柴 田 健 一 郎
副 査 教 授 進 藤 正 信
副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

The TLR2 ligand FSL-1 is internalized via clathrin-dependent endocytic pathway triggered by CD14 and CD36 but not by TLR2

(クラスリン依存的な TLR2リガンド FSL-1の取り込みは TLR2ではなく CD14と CD36に依存적である)

申請者の研究論文は Blackwell 社の Immunology にアクセプトされ、校正も終了し間もなく発表される予定である。審査は鈴木、進藤審査員ならびに柴田出席のもとに、申請者に提出論文の内容を英語で発表してもらい、それに対して英語で口頭試問が行われた。

我々は、これまで口腔細菌の一つである *Mycoplasma salivarium* 細胞膜から分子量 44kDa のリポタンパク質を精製し、その活性部位である N 末端リポペプチド部位の構造を明らかにした後、その構造をもとに化学的に合成したジアシルリポペプチドを FSL-1 と名付け、種々の生物活性ならびに Toll-like receptor (TLR) による認識機構等について研究している。FSL-1 は宿主細胞の TLR2 と TLR6 のヘテロダイマーで認識され、そのシグナルは転写因子 NF- κ B の活性化に導かれ、種々の炎症性サイトカインの産生を誘導する。しかしながら、TLR2 と TLR6 で認識された後どのように処理されるかはこれまで不明のままであった。そこで、申請者には、FSL-1 が TLR2 によって認識された後に、どのように処理されるかを分子レベルで明らかにするという研究テーマを与え、以下のような研究成果を得た。

FSL-1 の取り込みに及ぼすナイスタチン (カベオラならびにリピッドラフト依存的な取り込みの阻害剤)、クロルプロマジン (クラスリン依存적取り込みの阻害剤)、あるいはメチル- β -サイクロデキストリン (リピッドラフト依存적ならびにクラスリン依存적取り込みの阻害剤) などのエンドサイトーシス阻害剤の影響、ならびに RNAi 法により、FSL-1 の取り込みはクラスリン依存적であることが示唆された。クラスリン依存적取り込みが受容体依存적であることから、FSL-1 のクラスリン依存적取り込みには TLR2 が受容体として関与していると考えた。しかしながら、FSL-1 と TLR2 は細胞表面では結合するが細胞質内小胞では共局在せず、さらに、FSL-1 は TLR2 遺伝子欠損マウス由来の腹腔マクロフ

ページでも、正常マウス腹腔マクロファージと同様に取り込まれることがわかった。これに対して、FSL-1 認識後の細胞表面における TLR2 の発現は減少していた。これらのことから、FSL-1 の認識後に TLR2 が細胞内に取り込まれるが、FSL-1 の取り込みには TLR2 は受容体として機能しないことがわかった。そこで、FSL-1 の取り込みに TLR2 の補助レセプターである CD14 と CD36 が関与するのではないかと考えた。HEK293 細胞は FSL-1 を取り込まなかったが、CD14 あるいは CD36 を発現する HEK293 細胞は FSL-1 を取り込むことがわかった。さらに、これらの細胞における CD14 ならびに CD36 の RNAi 法によりそれぞれの細胞表面における発現を減少させると FSL-1 の取り込み活性も減少した。以上のことから、FSL-1 はクラスリン依存的な経路でマクロファージに取り込まれ、その取り込みには TLR2 ではなく CD14 と CD36 が重要な役割を果たしていることがわかった。

この発表に対して以下のような質問がなされた。

1. コンカナバリン A は細胞表面のどのような物質に反応するのか
2. エンドサイトーシス阻害剤の阻害力の違い
3. 細胞内小胞の成熟とはどのような意味か
4. 後期エンドソームのマーカーである lysotracker は細胞内に自由にはいるのか
5. CD14 の CD36 強制発現系で RNAi は有効だったのか
6. CD14 と CD36 の FSL-1 取り込みの際の相乗効果はあるのか

申請者はこれらの質問に対して適切に、しかも論理的に答えた。

以上より、本論文内容が高く評価されるとともに、申請者は研究遂行に十分な能力を有しており、博士（歯学）を授与するのに値するものと判定された。