「免疫難病・感染症等の先進医療技術」
平成13年度採択研究代表者

三宅　健介

（東京大学医科学研究所　教授）

「病原体糖脂質認識シグナル伝達機構の解明」

１．研究実施の概要

エンドトキシン（LPS, Lipopolysaccharide）の認識分子は、Toll-like receptor 4 (TLR4)と、TLR4に会合する分子MD-2からなることをこれまで明らかにしてきた。 H16年度において、LPS認識におけるMD-2の役割を明らかにするために、リガンド刺激におけるTLR4/MD-2とエンドトキシンとの結合、結合後のTLR4-MD-2の多量体形成において、MD-2のどのアミノ酸が重要か検討した。その結果、それぞれ異なるアミノ酸が重要であることが明らかとなった。この知見はMD-2の構造と機能の連関を考えるうえで、貴重な知見である。また、これまでの結果から、TLR4によるLPS認識に、MD-2がcoreceptorとして中心的な役割を果たしていることが明らかとなった。

２．研究実施内容

エンドトキシン（LPS, Lipopolysaccharide）はグラム陰性菌の外膜を構成する糖脂質である。さまざまな病原体成分の中でも最も強く免疫機構を活性化する.その認識分子はToll-like receptor 4（TLR4）と、TLR4の細胞外ドメインに会合する分子MD-2からなる。本年度は、TLR4/MD-2によるLPS認識におけるMD-2の役割についての検討を進めた結果、以下のことが明らかとなった。

1. LPSとTLR4/MD-2との結合後、シグナルが伝達されるために多量体形成が必要と考えられていたので、その点について検討した。細胞株にCD14、MD-2と2種類の異なるエピトープタグGFPとFlagをつけたTLR4を発現させ、その細胞株をLPSで刺激し、TLR4-GFPを免疫沈降し、TLR4-Flagの共沈降を調べた。その結果、刺激後15-45分で、一過性の共沈が認められた。LPSの拮抗剤ではTLR4/MD-2に結合するが、その後の共沈が認められないことから、この共沈がシグナル伝達と直接関連することが明らかとなった。
2. レセプターの多量体形成において、MD-2が制御に関わっているか否かについて、検討するために、MD-2のそれぞれのアミノ酸をアラニンに置換したミュータントを作成し、細胞株に発現させて、LPSとの結合、多量体形成について検討した。その結果、LPSとの結合には59番目のグリシンが、刺激後の多量体形成には126番目にフェ

ニルアラニン、129番目にグリシンがそれぞれ特異的に重要であることが明らかとなった。この結果はMD-2がリガンド刺激における多量体形成に関与していること、またLPS結合とは異なるアミノ酸が関与していることを示している。

3. 多量体形成は、リガンド刺激後約2時間で、検出できなくなる。多量体がどのようにして、解離するのか、その分子機構について検討した。その結果、多量体の解離はTLR4からのシグナルに依存すること、エンドソームの酸性化を抑制する薬剤で解離を抑制しうることから、リガンド刺激後に形成された多量体は細胞内に取り込まれ、エンドソームに取り込まれ、酸性化で多量体形成、およびLPSとTLR4/MD-2との結合も解離することが明らかとなった。TLRのリガンドはサイトカインと異なり、病原体の種類によってその構造が異なる。その違いをTLRは識別しうることが明らかとなっているが、その識別はリガンドの結合ではなく、その後の多量体形成で識別されることが明らかとなった。そしてその制御にMD-2が重要な役割を果たしていることが明らかとなった　(図1)。したがって、MD-2がLPS認識そのものに関わっていることが明らかとなった。

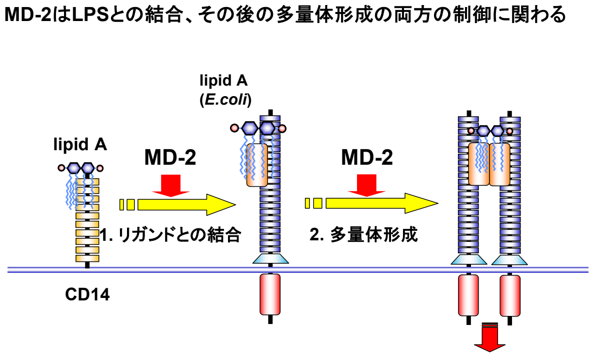

図1

4. Radioprotective105/MD-1はTLR4/MD-2と細胞外ドメインにおいて相同性を持つB細胞表面分子である。我々はノックアウトマウスを使った解析から、RP105/MD-1を欠損したB細胞はLPSに対して低応答性を示すことを示してきた。今回我々は、RP105/MD-1がTLR2リガンドにおいても低応答性を示すことを明らかにした。この結果はRP105/MD-1がTLR4/MD-2ばかりでなく、TLR2にも何らかの機能的な連関があることを示している(図2)。

RP105/MD-1はTLR4/MD-2ばかりでなく、TLR2とも機能的な連関がある

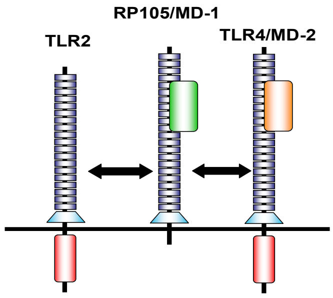

図2

３．研究実施体制

三宅グループ

① 研究分担グループ長：三宅　健介（東京大学医科学研究所　感染遺伝学分野、教授）

② 研究項目：病原体糖脂質認識シグナル伝達機構の解明
　　　　　　エンドトキシンショックの新たな治療法の開発

佐藤グループ

① 研究分担グループ長：佐藤　能雅（東京大学大学院薬学系研究科機能薬学専攻 蛋白構造生物学分野、教授）

② 研究項目：Ｘ線解析に向けたMD-2タンパク質などの発現精製と結晶化

深瀬グループ

① 研究分担グループ長：深瀬　浩一（大阪大学大学院理学研究科化学専攻 天然物有機化学研究室、助教授）

② 研究項目：リピドAならびに類縁体、標識体の合成

４．主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（１）　論文（原著論文）発表

○ Miyake K. Endotoxin recognition molecules, Toll-like receptor 4-MD-2. **Semin Immunol.** 16:11-16.2004

○ Moon BG, Takaki S, Miyake K, Takatsu K. The role of IL-5 for mature B-1 cells in homeostatic proliferation, cell survival, and Ig production. **J Immunol.** 172:6020-6029. 2004.

○ Saitoh S, Akashi S, Yamada T, Tanimura N, Kobayashi M, Konno K, Matsumoto F, Fukase K, Kusumoto S, Nagai Y, Kusumoto Y, Kosugi A, Miyake K. Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in

interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. Int Immunol. 16:961-969. 2004

○ Miyake K. Endotoxin recognition molecules MD-2 and toll-like receptor 4 as potential targets for therapeutic intervention of endotoxin shock. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 3: 291-297, 2004.

○ Hyakushima N, Mitsuzawa H, Nishitani C, Sano H, Kuronuma K, Konishi M, Himi T, Miyake K, Kuroki Y.Interaction of Soluble Form of Recombinant Extracellular TLR4 Domain with MD-2 Enables Lipopolysaccharide Binding and Attenuates TLR4-Mediated Signaling. *J Immunol.* 173:6949-6954. 2004.

○ Epelman S, Stack D, Bell C, Wong E, Neely GG, Krutzik S, Miyake K, Kubes P, Zbytnuik LD, Ma LL, Xie X, Woods DE, Mody CH. Different domains of Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S activate distinct TLRs. *J Immunol.* 173:2031-2040. 2004.

○ Shinohara H, Inoue A, Toyama-Sorimachi N, Nagai Y, Yasuda T, Suzuki H, Horai R, Iwakura Y, Yamamoto T, Karasuyama H, Miyake K, Yamanashi Y. Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of lipopolysaccharide-induced signaling. *J Exp Med.* 201:333-339. 2005

○ Martha Triantafilou, Klaus Brandenburg, Shoichi Kusumoto, Koichi Fukase, Alan Mackie, Ulrich Seydel, Kathy Triantafilou Combinational clustering of receptors following stimulation by bacterial products determines lipopolysaccharide responses.
Biochemical Journal 381(2), 527-536. 2004.

○ Mareike Mueller, Buko Lindner, Shoichi Kusumoto, Koichi Fukase, Andra B. Schromm, Ulrich Seydel Aggregates Are the Biologically Active Units of Endotoxin.
Journal of Biological Chemistry 279(25), 26307-26313. 2004.

（２） 特許出願

H16年度特許出願件数：１件（CREST研究期間累積件数：３件）