

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「免疫難病・感染症等の先進医療技術」
研究課題「病原体糖脂質認識シグナル伝達機構の解明」

研究終了報告書

研究期間 平成13年12月～平成19年3月

研究代表者: 三宅健介
(東京大学医科学研究所、教授)

1 研究実施の概要

自然免疫は、マクロファージを中心とした免疫機構をさすのに対して、獲得免疫はリンパ球を中心とした免疫システムをさす。感染防御機構の中では、自然免疫と獲得免疫が一体となって機能しているのはいうまでもない。我々の免疫システムは、非自己である抗原に対して応答するようにプログラムされているが、その応答の感度は非自己抗原の中でも大きく異なっている。花粉など非病原性のものに比べて、病原体由来の成分に対し非常に高い応答性を示す。また核酸などのように、自己と非自己で区別が付きにくいものであっても、細胞質内など、場所によっては強い免疫応答が誘導される。このように非自己抗原に対して、応答するか否か、またどのような免疫応答を誘導するか、という決定を我々の免疫システムは瞬時に下している。そのような決定に大きく関わっている分子が病原体センサーである(図1)。代表的なセンサーである Toll-like receptor (TLR) は、細胞外の病原体を細胞表面で、あるいは細胞内に取り込み、エンドソーム・リソソームで認識する。多くの病原体は細胞質内にも侵入するが、細胞質内では non-TLR 病原体センサーが、菌体成分や二重鎖 RNA を認識する。病原体センサーは感染防御反応を誘導するが、それぞれのセンサーによって誘導される防御反応が異なっており、個々の病原体に対応する防御反応が誘導されている。防御反応の質、強さを制御するために、さまざまなシグナル伝達分子がセンサーの下流で機能しており、病原体の侵入に対して、迅速で、適切な強さの防御反応の誘導が可能となっている。

病原体センサー

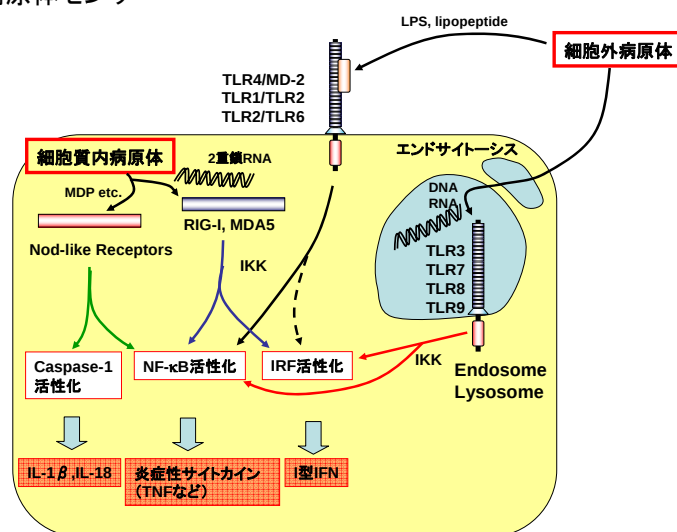


図1. 自然免疫における病原体センサー

病原体センサーには細胞表面や小胞体に局在して細胞外の病原体を察知する Toll-like receptor (TLR) と細胞質内の病原体を察知する Non-TLR 病原体センサーに分類される。後者は Nod-like receptor と RIG-I や MDA5 などの 2 重鎖 RNA センサーからなる。

これらの病原体センサーが感染の際の炎症反応誘導に大きく関与していることを考慮すると、炎症反応を制御する治療法の標的分子として病原体センサーが注目される。本研究においては、病原体センサーの中でも TLR、特にグラム陰性菌の膜成分である LPS (lipopolysaccharide) を認識する TLR4/MD-2 について、その LPS 認識機構を生化学的、

構造学的手法で解明し、LPS 応答の新たな制御法の可能性を探る。さらに TLR4/MD-2 に対する抗体などを用いた制御法の可能性を探るための基礎的な研究を進めた。具体的には、以下の点について、進めてきた。

1. TLR4/MD-2 による LPS 認識機構の解明

グラム陰性菌の膜を構成する糖脂質であるLPSは強い免疫応答を誘導する。そのためにエンドトキシンショックをはじめとする多くの疾患への関与が指摘され、精力的に研究が進められてきた。このLPS認識機構を解明するために、生化学的手法を用いて、LPSとTLR4/MD-2との結合などを検討した。TLR4/MD-2を免疫沈降すると、リガンドであるLPSが共沈することが明らかとなった。この結合は膜面型のCD14を必要とし、TLR4単独では、そのような結合は認められなかったことから、MD-2がLPSとの結合に重要であることがわかった。放射性同位元素を標識したLPSを用いて、その結合を定量化すると、Dose依存性で飽和する特異的な結合であることがわかった。

LPSと結合した後に、TLR4をエピトープタグに対する抗体で免疫沈降すると、別のエピトープタグをつけたTLR4も免疫沈降されることから、LPS刺激によってTLR4同士が会合する、すなわち、TLR4-oligomerizationが誘導されていることが明らかとなった。TLR4-oligomerizationは、LPSに特異的で、15-45分をピークとする一過性のものであった。この現象によって細胞内のシグナル伝達ドメインのdimerizationが活性化され、シグナルが伝達されることが予想される。これらの結果から、LPS認識は1) リガンド結合、2) リガンド依存性のTLR4-clusteringの2段階で進むことが明らかとなった(図2A)。この2つの段階にMD-2が関与しているか否かを明らかにするために、LPS応答が低下するMD-2のアラニン置換ミュータントを用いて調べたところ、LPSとの結合に59番目のグリシンが、その後のTLR4-clusteringに126番目のフェニルアラニンと129番目の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LPS結合、TLR4-clusteringの両方に必要であること、そしてその2つのステップをそれぞれ別々に制御していることを示している。

上述の生化学的な解析とともに、佐藤グループを中心に、MD-2の構造解析を現在進めているが、類似分子であるダニアレゲンDerP2から類推される構造を当てはめてみると、図2Bのようになる。MD-2ミュータントを使った他のグループの結果から、アミノ酸119-132番目の部位はLPS結合に重要であることがわかっている。F126、G129はその部位に入っており、アミノ酸119-132の部位は、LPS結合、TLR4-clusteringの両方に重要な部位であることが明らかとなった。この部位は、LPS応答を制御するような治療法を考えるときの標的部位として有望であると考えられる。構造解析の結果が待たれる。

深瀬グループはLipid Aおよびその誘導体を合成し、我々に供給するとともに、Lipid Aの構造と活性の相関を明らかにすることで、LPS認識機構の解明に寄与することを目指している。

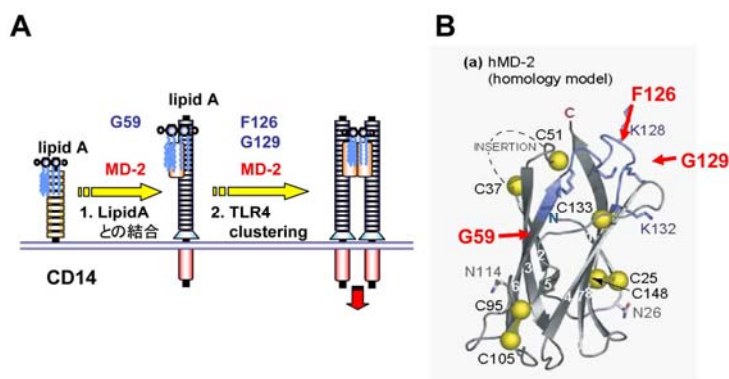


図2. LPS認識におけるMD-2の役割

(A) LPS認識機構を示す。リガンドとの結合、リガンド依存性のTLR4-clusteringの2段階で進み、それぞれに、MD-2のG59, F126, G129が重要である。(B) ではこれらのアミノ酸の位置を推定されるMD-2の構造上で示した。

2. TLR4に対する抗体を用いた、エンドトキシンショック治療法の開発

LPS認識機構の解明と並行して、LPSレセプターであるTLR4/MD-2に対するモノクローナル抗体が、LPSによる炎症応答を制御できるかどうかについての検討も進めた結果、LPSとD-galactosamineで誘導される肝細胞アポトーシスによるエンドトキシンショックをTLR4に対する抗体であるSa15-21が予防しうるということがマウスモデルによって明らかとなった。その作用機序を検討したところ、抗体がTLR4/MD-2を介して肝細胞を活性化しアポトーシス抑制遺伝子の発現を誘導し、アポトーシスから回避させる可能性が示唆された{Akashi-Takamura, 2006 #209}。TLR4/MD-2の機能を抗体によって制御することで、エンドトキシンショックの状態を制御しうる可能性が示された。

3. TLR4に会合する新規分子のクローニング

TLR4に会合する新規の分子の検索を行い、TLR4の細胞内局在を制御する分子としてPRAT4A (Protein Associated with Tlr4 A) をクローニングした{Wakabayashi, 2006 #210}。この分子の機能を解析するためにPRAT4A遺伝子を細胞株においてsilencingしたところ、TLR4/MD-2の細胞表面での発現が低下し(A)、LPS応答性も低下した(B)。現在この分子についての解析をノックダウン細胞株、ノックアウトマウス作成を通じて進めているが、LPS応答の制御を考えるうえで、TLR4やMD-2に加えて、新たな標的分子となりうる可能性がある。

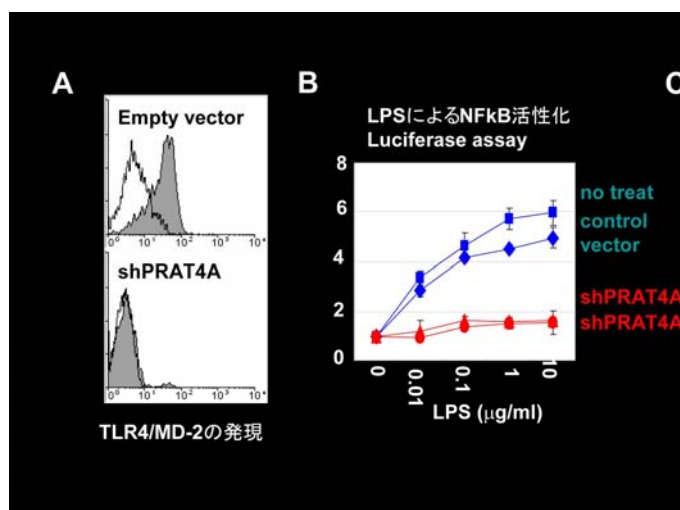


図3 TLR4に会合する新規分子PRAT4A

(A) PRAT4Aをノックダウンした細胞株(上)とコントロール(下)、それぞれの細胞表面上のTLR4/MD-2をFACSで染色した。(B) 同様の細胞をLPS刺激し、NF-κBの活性化をルシフェラーゼアッセイで調べたもの。

これらの解析を通して、TLR4/MD-2によるLPS認識機構を生化学的、構造学的に解明して

きた。さらにTLR4/MD-2に対する抗体が、どのような効果を生体内で発揮するのかについてもある程度の結果が得られた。さらには、TLR4/MD-2そのものではなく、その局在を制御することで、LPS応答性を制御しうる分子をクローニングし、新たな標的分子の可能性を示すことができた。本研究で得られた結果は、自然免疫に関連する分子を標的とした新たな免疫制御法の開発に貢献しうると我々は期待している。

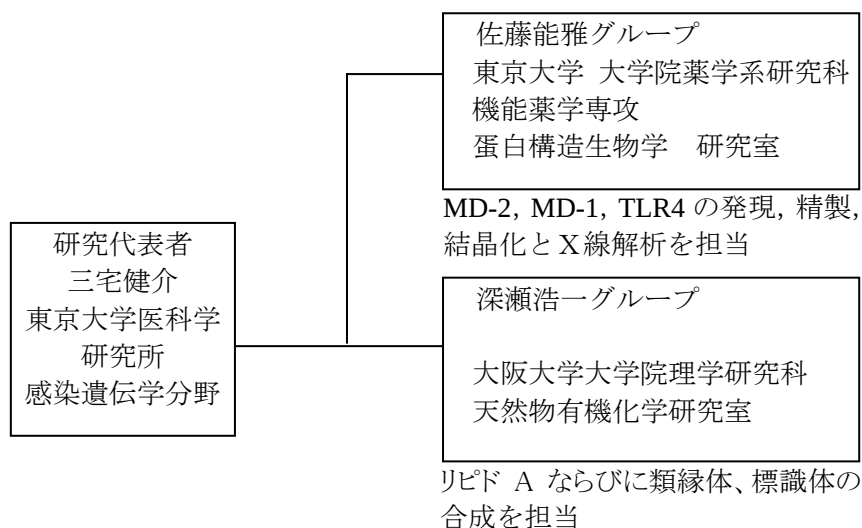
2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

Toll-like receptor は自然免疫における病原体センサーである。本研究においては、TLR 特にグラム陰性菌の膜を構成するエンドキシン(LPS)の認識機構を解明することを目的とする。具体的には、認識機構の解明として、レセプターである TLR4/MD-2 と LPS との結合、その後の TLR4-oligomerization を生化学的な手法で検討する。LPS については、構造と活性の相関についての研究が長い間進められてきた。その結果、脂肪酸の構造によっては、lipid A はアゴニストになったり、アンタゴニストになったりすることが報告されている。この構造と活性の相関の解析を深瀬グループを中心に進めるとともに、その解析で得られた、アゴニスト、拮抗作用を示す合成 LipidA を用いて、TLR4/MD-2 との結合、TLR4-oligomerization を調べる。これにより、Lipid A の活性と TLR4/MD-2 との結合や TLR4-oligomerization との相関について検討することができると期待される。これらの生化学的な解析と並行して、MD-2 および MD-2 と LPS との複合体の構造を明らかにする。この解析は佐藤グループを中心として進める。さらにはレセプターである TLR4/MD-2 の機能を直接制御しうるような技術として、TLR4 に対するモノクローナル抗体を用いて、エンドキシンショックの治療に使えるかどうかを検討する。

MD-2 の役割として、LPS の認識に直接関わることを示してきたが、同時に我々は TLR4 の細胞表面への発現にも重要であることを示した。しかしながら、細胞によっては MD-2 がなくとも、TLR4 は細胞表面に発現することが明らかとなった。そこで、TLR4 の細胞表面への発現を制御する新たな分子を検索し、TLR4 に会合する分子、PRAT4A(Protein Associated with TLR4)をクローニングすることに成功した。この分子をノックダウンすると、TLR4 の細胞外への発現が低下し、LPS 応答性も低下する。したがって、LPS 応答の制御を考えたときに、TLR4, MD-2 ばかりでなく、この PRAT4A も標的分子となりうる可能性を示すことができた。レセプターの細胞内局在を変えることで、その機能を制御しようという新しい概念を提出することができるのではないかと期待している。

(2)実施体制



3 研究実施内容及び成果

3.1 病原体糖脂質認識機構の解明(東京大学 三宅グループ)

(1)研究実施内容及び成果

LPS をいかにして TLR4/MD-2 が認識するか、また TLR4/MD-2 に対する抗体が個体レベルで LPS 応答を制御しうるか、という 2 点を中心に解析を進めた。また TLR4 に会合する分子の検索、同定によって、TLR4/MD-2 の局在を制御する新たな分子をクローニングし、その解析も進めた。この 3 点についての成果をまとめる。

1. TLR4/MD-2 による LPS 認識機構の解明

グラム陰性菌の膜を構成する糖脂質であるエンドトキシン(LPS)は、免疫細胞を非常に強く活性化する。このセンサーとして、TLR4とそれに会合するMD-2が発見された。LPSはTLR4/MD-2というレセプターのよって認識される。しかしながら、LPSとの結合はまだ示されていない。そこで我々は、TLR4/MD-2とLPSとの結合について、検討を加えた。LPS刺激後にTLR4/MD-2を免疫沈降したところ、LPSが共沈降することが明らかとなった。深瀬グループから供給された、トリチウムで標識したlipid Aを用いて、共沈降するlipid Aを定量化したところ、共沈降するlipid Aは加えた量に比例して増加し、飽和しうることが明らかとなった(図1)。

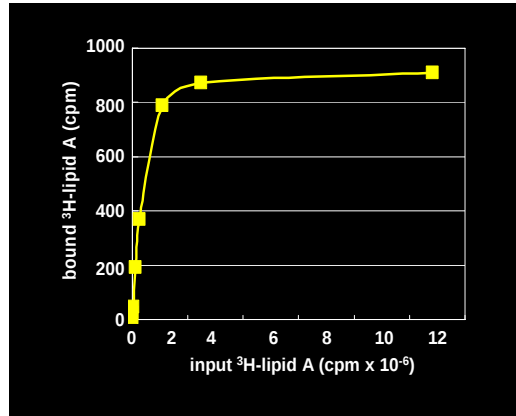


図1 lipid AとTLR4/MD-2との結合

CD14、TLR4/MD-2を発現したBa/F3細胞をトリチウムで標識したlipid Aで刺激した後に、TLR4に対する抗体で免疫沈降し、共沈降したlipid A由来のカウントを示した。

TLR4/MD-2とLPSとの強い結合には膜面型のCD14を必要とし、TLR4単独では、そのような結合は認められなかったことから、MD-2がLPSとの結合に重要であることがわかった。此れと並行して、ほかのグループからも同様な報告がなされている。またMD-2単独とLPSが結合するという報告もなされている。ところがTLR4単独とLPSとの結合は報告されておらず、MD-2がLPSに結合するというコンセンサスができつつある。

LPSと結合した後に、どのような変化がTLR4に生ずるかを次に検討した。TLRの細胞内ドメインはIL-1レセプターのそれと類似しており、TIRドメインと呼ばれる。その活性化には、TIRドメインのDimerizationが必要であると考えられている。そこで、リガンド依存性にTLR4のdimerizationあるいはoligomerizationが誘導される可能性を考えて以下の実験を行った。GFPとFlagの2種類のエピトープタグをつけたTLR4をCD14やMD-2とともに細胞株に発現させ、LPS刺激をした後に、TLR4をGFPエピトープタグに対する抗体で免疫沈降すると、FlagエピトープタグをつけたTLR4も共沈降されることが明らかとなった。その共沈降は刺激なしでは検出されず、またLPS以外の刺激では認められなかった。LPS刺激後、15-45分をピークとする一過性のものであった(図2)。

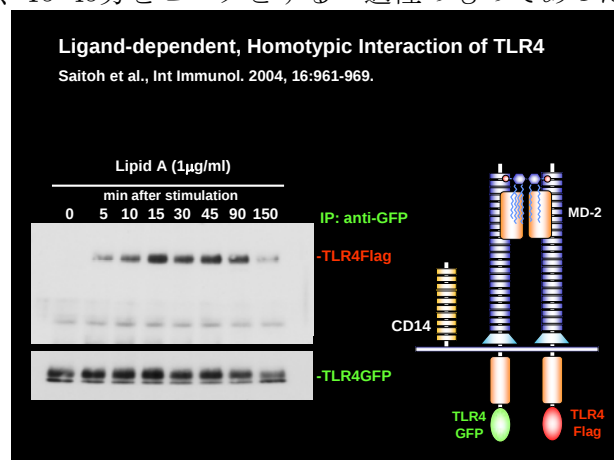


図2 リガンド依存性のTLR4-oligomerization

GFPとFlagの2つのエピトープタグをつけたTLR4をCD14やMD-2とともに発現させ、lipid A刺激後にTLR4-GFPを免疫沈降し (lower panel)、TLR4の共沈降 (upper panel) を調

べた。

この現象は、リガンド結合後にTLR4同士が互いに結合することを示しており、細胞内のシグナル伝達ドメインであるTIRドメインが活性化され、シグナルが伝達されることが予想される。この現象がシグナル伝達に直結する点を明らかにするために我々は、深瀬グループから供給されたlipid Aの前駆体であるlipid IVaを用いて検討した。Lipid IVaはヒトTLR4/MD-2には拮抗剤として作用するが、マウスTLR4/MD-2にはアゴニストとして作用する。同じマウスTLR4であっても会合するMD-2がヒトの場合には、lipid IVaは拮抗剤として作用することが明らかになった。そこで、lipid IVaをマウスTLR4/MD-2かマウスTLR4/ヒトMD-2をそれぞれ発現する細胞株に作用させ、それぞれアゴニストか拮抗剤として作用させ、リガンドとの結合、リガンド依存性のTLR-oligomerizationの両方で比べてみると、どちらも同じようにTLR4/MD-2に結合するが、TLR4-clusteringが拮抗剤の場合には誘導されないことが明らかとなった(図3)。この結果は、我々が検出しているTLR4-clusteringがシグナル伝達と直結していることを強く示している。TLRのoligomerizationはほかにも報告がある。TLR2の場合には、TLR1やTLR6とheterodimerを形成して活性化シグナルが伝達される。また一方、TLR3の場合には構造がわかっており、少なくとも結晶の上程では最初からhomodimerを形成していることがわかっている。このようにTLRは何らかの形でDimerを形成することで活性化シグナルが伝達されるが、具体的なDimer形成の仕方は異なっている。

以上の結果から、LPS認識は1)リガンド結合、2)リガンド依存性のTLR4-clusteringの2段階で進むことが明らかとなった(図3)。

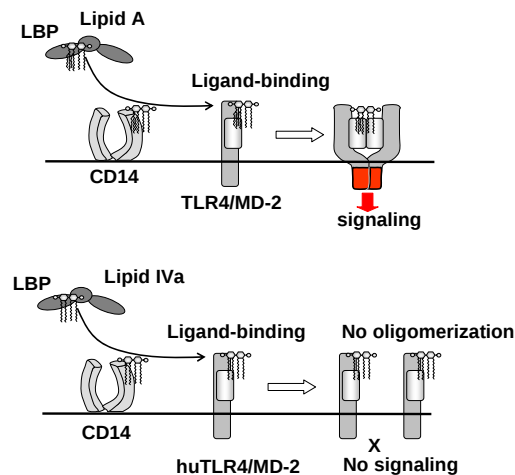


図3 LPS認識機構

LBP (LPS結合タンパク)が菌体膜からLPS (lipid A) をCD14に単体の形で、転送する。CD14とLPSとの複合体はTLR4/MD-2へLPSを提示し、LPS結合を促す。LPSが結合したTLR4/MD-2は互いに結合し、Oligomerizationが誘導され、シグナルが伝達される。Lipid IVaのような拮抗剤の場合には、LPSは結合するが、TLR4-oligomerizationは誘導されず、シグナルも伝達されない。

図3で示されたLipid AとLipid IVaの違いは、ペスト菌と宿主応答の関係を表している。のみとヒトでは、体温がそれぞれ20-27度と、37度と異なっている。ペスト菌はのみの体内では脂肪酸側鎖が6本のLPSを産生し、ヒトの体内に入ると脂肪酸側鎖は4本となる。したがって、のみの体内ではLipid A、ヒトの体内ではlipid IVaとなる。興味深いことに、Lienらは深瀬グループや我々との共同研究で、この違いがペスト菌の病原性に密接に関連していることを示していた。彼らはペスト菌が6本鎖のlipid Aしか作れないようにして、その病原性をマウスにおいて調べたところ、著しく低下したという結果を得ている。したがって、ペスト菌はヒトの体内ではLPSの脂肪酸側鎖を4本に減らすことで、宿主応答を減弱させ、宿主内での生存、増殖を可能としていることになる。そこで、制御されているのは、TLR4/MD-2への結合ではなく、その後のTLR4-clusteringということになる(図3)。

LPS結合、TLR4-oligomerizationの2つのLPS認識における段階にMD-2がどのように関与しているか否かを明らかにするために、MD-2のアラニン置換ミュータントを用いて検討した。その結果、59番目のグリシン(G59)をアラニンに置換したミュータントがLPSとの結合が低下していること、126番目のフェニルアラニン(F126)と129番目のグリシン(G129)をアラニンに置換したミュータントではLPS結合は野生型とそれほど変わらないが、TLR4-clusteringが低下していることが明らかとなった。この結果は、MD-2がLPS認識の両方に必要であること、そしてその2つのステップをそれぞれ別々に制御していることを示している。MD-2の構造解析は現在、佐藤グループによって進められており、結晶化にまで到達しているが、構造を明らかにするところまでにはいたっていない。そこで、類似分子であるダニアレルゲンDerP2から類推した構造に当てはめてみると、図4のようになる。

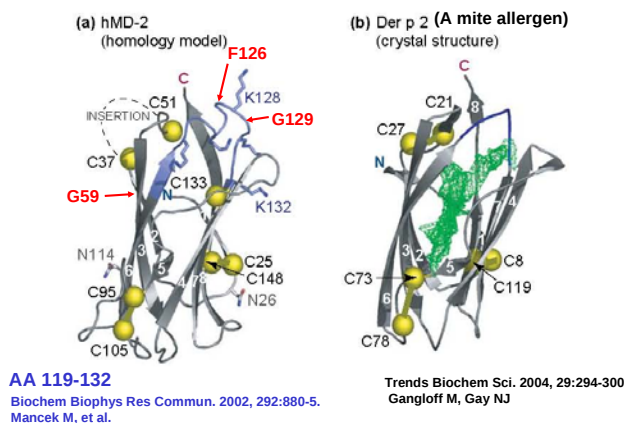


図4 類似分子から、類推されたMD-2の構造とLPS認識に重要なアミノ酸
MD-2の類似する分子であるダニアレルゲン、Derp2の構造とそれによって類推されたMD-2の構造を参考文献から引用{Gangloff, 2004 #114}。またLPS結合に重要な部位(アミノ酸119-132)は青色で示されている。われわれが明らかにしたLPS結合に重要なG59, TLR4-clusteringに必要なF126, G129も示す。後者の2アミノ酸はLPS結合に重要な部位の中に含まれている。

MD-2ミュータントを使った他のグループの結果から、アミノ酸119-132番目の部位はLPS結合に重要であることがわかっている。F126、G129

はその部位に入っており、アミノ酸119-132の部位は、LPSとの結合、TLR4-clusteringの両方に重要であり、LPS認識に大きく関与する部位であることが明らかとなった(図4)。いずれ、リガンドであるLPSとMD-2の複合体の構造が明らかになれば、LPS認識とこの部位との関連がわかるであろう。また、LPS応答を制御するような治療法を考えるときに、MD-2は標的分子として、有望であるが、MD-2の中でもこの部位が薬剤の標的部位として有望であると考えられる。

2. エンドトキシンショックを予防する抗 TLR4 抗体

LPSによって強く免疫細胞が活性化され、サイトカインの過剰な産生により、エンドトキシンショックが誘導される。このショックをTLR4に対する抗体で制御する可能性について、検討を加えた。我々はTLR4に対するモノクローナル抗体を2種類確立している。MTS510とSa15-21である。前者はTLR4/MD-2複合体に特異的に結合しLPS応答を抑制するが、後者はTLR4単独にも反応し、抑制効果はない抗体である。これら2種類の抗体とCD14に対する抗体を用いて、エンドトキシンショックに対する影響を検討した。LPSとD-galactosamineを投与するとマウスは約10時間で死亡する。D-galactosamineによって肝細胞の転写が抑制されると同時に、LPS刺激によって産生されたTNF- α がアポトーシスを肝細胞に誘導することで、肝不全となり、死に至る。この実験系において、LPS/D-galactosamineを投与する2時間前に、抗体を投与し、マウスの生存を調べたところ、TLR4に対する抗体のうち、Sa15-21に予防効果が認められた(図5)。

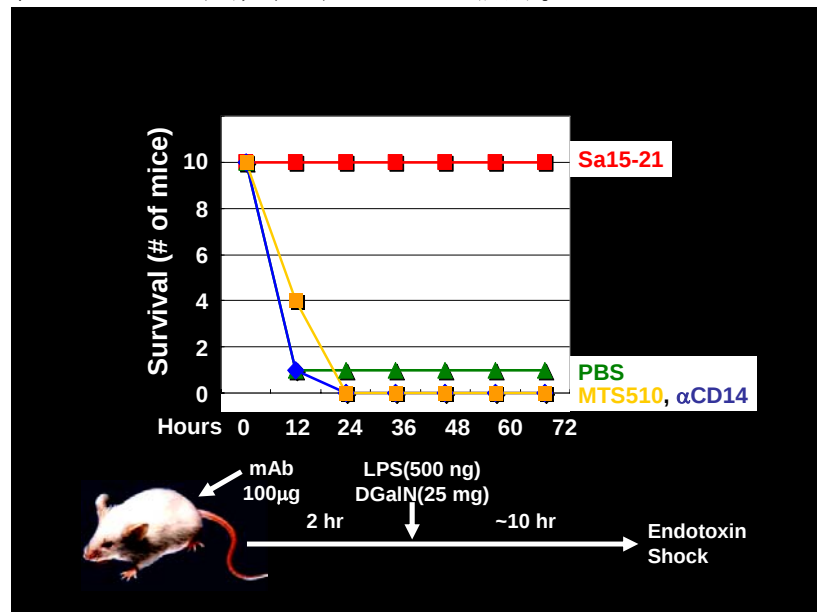


図5 Sa15-21抗体による肝不全の予防効果

マウスに抗体(100 μ g)を腹腔内投与し、2時間後にLPS 500ngとD-galactosamine 25mgを腹腔内投与した後に、マウスの生存をプロットした。抗CD14抗体、抗TLR4抗体のうちのMTS510では効果がなかったが、Sa15-21には抑制効果が認められた。

この効果は LPS/D-galactosamine と同時あるいは遅れて抗体を投与しても効果はなく、予防効果であることがわかった。肝臓を調べてみると、LPS/D-galactosamine 投与9時間後に出血が肉眼で確認されるが、Sa15-21を

前投与した場合には、そのような出血は認められなかった(図6a)。また組織所見でも出血、組織障害がPBSやもうひとつのTLR4に対する抗体MTS510では認められたが、Sa15-21投与では認められなかった(図6b)。また実際に肝細胞のアポトーシスが抑制されていることもTUNEL法によって確認された。

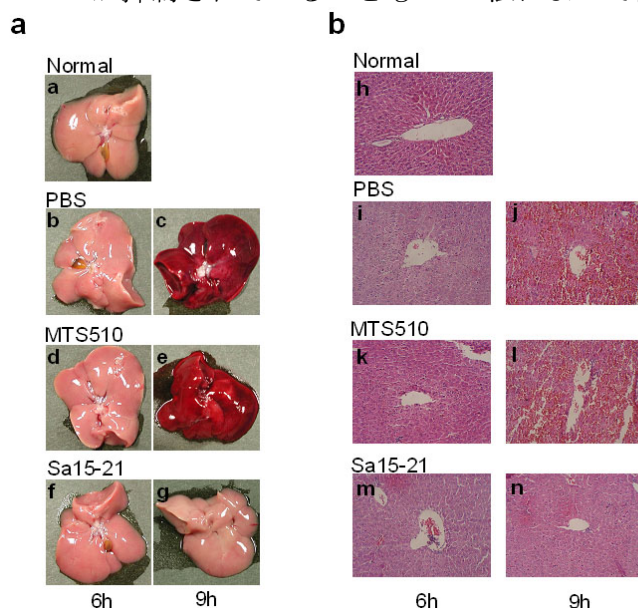


図6 LPS/D-galactosamine投与後の肝臓の肉眼的、組織学的所見

何も投与していないマウス (Normal)、PBSか抗体 (TLR4に対する抗体、MTS510とSa15-21) 前投与の後にLPS/D-galactosamine投与後6時間、9時間後のマウスの肝臓を肉眼的(a)、組織学的に調べたもの(b)。c, e, j, iに出血、組織傷害が認められるが、g, nにはそのような傷害は認められない。

抗体によって肝細胞のアポトーシスが抑制された機序として、肝臓においてアポトーシス抑制遺伝子の発現が抗体によって誘導された可能性が考えられる。実際にアポトーシス抑制遺伝子であるA20を肝臓で過剰発現させるとLPS/D-galactosamineによる肝不全を防ぐことができたという報告がある。そこで、抗体投与後に発現が上昇した遺伝子をMicroarrayで調べたところ、A20をはじめとするアポトーシス抑制遺伝子群の発現が誘導されることが明らかとなった(図7a)。中でもA1, A20, Gadd45 β などの遺伝子の、Sa15-21による発現誘導はRT-PCRでも確認された(図7b)。さらに、Sa15-21によるA20のmRNA発現誘導は、Northern hybridizationによっても確認された(図7c)。これらの遺伝子の誘導はNF- κ Bの活性化によって誘導される。そこで、抗体投与後に肝臓のNF- κ B活性化を測定したところ、Lipid Aと同等の活性化が認められた。同じTLR4に対する抗体MTS510ではそのような活性化は認められなかった(図7d)。

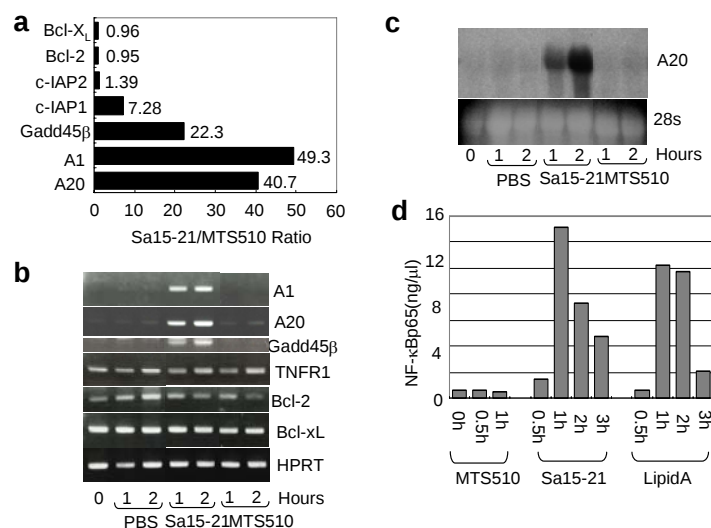


図7 Sa15-21抗体による肝臓でのNF- κ Bの活性化、アポトーシス抑制遺伝子の発現誘導

(a) MTS510またはSa15-21を投与された肝臓の遺伝子の発現をMicroarrayで調べ、その中で、アポトーシス抑制遺伝子群の結果を示す。(b)PBS, MTS510, Sa15-21を投与したマウスの肝臓におけるアポトーシス抑制遺伝子群の発現をRT-PCRで測定したもの。(c)A20の発現をNorthern hybridizationで比較した。(b)と同じ条件のマウスを用いている。(d)MTS510, Sa15-21, lipid Aを投与したマウスの肝臓におけるNF- κ Bの活性化をELISAで測定した。NF- κ Bを構成するp65とDNAとの結合を測定している。

肝臓におけるTLR4/MD-2の発現を確認するために、肝臓のLysateをTLR4/MD-2に対する抗体で免疫沈降し、TLR4に対する抗体で検出したところ、脾臓と変わらない程度の発現が確認された。また肝細胞株においてもTLR4の発現が確認されている(図8a)。Sa15-21抗体によるA20の誘導がTLR4/MD-2を介しているかどうかを明らかにするために、ミュータントマウスを用いて検討した。A20はTLR4ミュータントマウスであるC3H/HeJではSa15-21投与で誘導されなかった。さらにSa15-21による予防効果についても検討した。LPSにC3H/HeJは応答しないので、LPSの代わりにTNF- α を用いて、TNF/D-galactosamine投与で誘導される肝細胞アポトーシスによる個体死をSa15-21はプロテクトできなかった(図8c)。MD-2KOマウスでもSa15-21抗体投与でA20が誘導されないことから、Sa15-21抗体による予防効果は、TLR4/MD-2を介したシグナルによる誘導であることが示された。

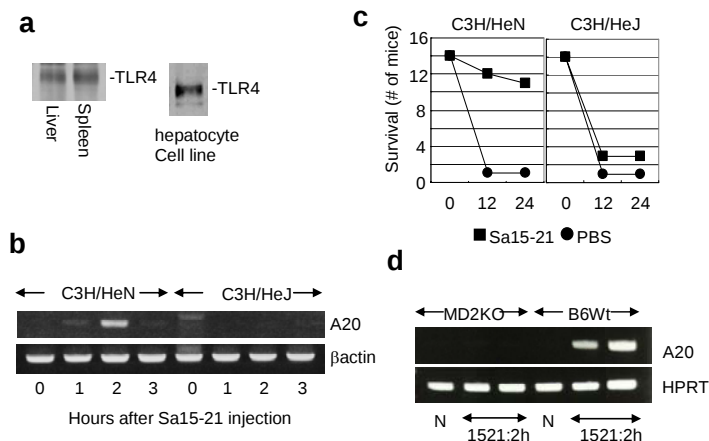


図8 Sa15-21による肝細胞アポトーシス予防効果はTLR4/MD-2を介する

(a) 肝臓、脾臓、肝細胞株のTLR4を免疫沈降し、TLR4に対する抗体で検出したもの。
 (b) TLR4ミュータントマウスC3H/HeJとそのコントロールマウスC3H/HeNにSa15-21抗体を投与し、A20の肝臓における発現をRT-PCRによって検出した。
 (c) C3H/HeJとC3H/HeNにSa15-21あるいはPBSを投与した後に、TNF- α とD-galactosamineを投与し、その後のマウスの生存を調べた。
 (d) MD-2KOマウスと野生型B6マウスにSa15-21抗体を投与し、肝臓におけるA20の発現をRT-PCRによって調べたもの。

現在、Sa15-21抗体による肝不全の予防効果について、我々は図6のように考えている。腹腔投与されたLPSは肝臓のマクロファージであるKupffer細胞に作用し、TNF- α の産生を誘導する。同時に投与されたD-galactosamineとともにTLR- α は肝細胞に作用し、アポトーシスを誘導する。抗体は肝細胞に発現するTLR4/MD-2に作用し、A20などのアポトーシス抑制遺伝子の発現を誘導し、アポトーシスを防ぐ。

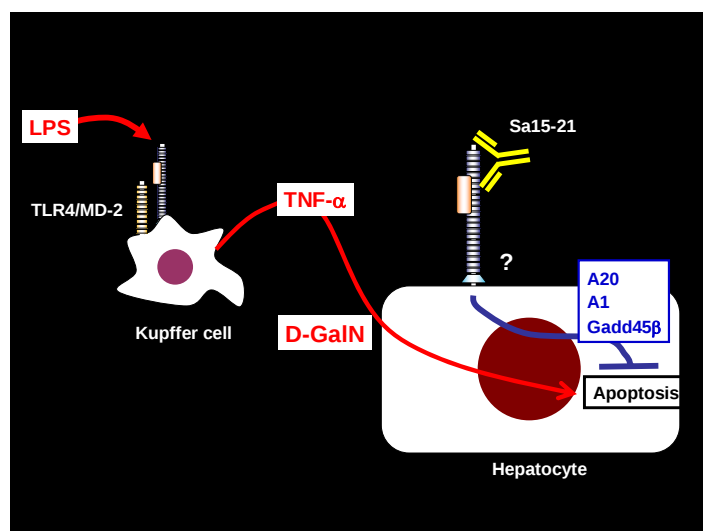


図9 Sa15-21抗体による肝細胞アポトーシス予防効果の作用機序

Sa15-21とLPSはともにTLR4/MD-2に作用するが、誘導される応答は大きく異なる。肝臓において同等なNF- κ Bの活性化を誘導するLPSとSa15-21を腹腔投与したときに血清中のTNF- α を測定すると、LPSに比べて、Sa15-21によって誘導されるTNF- α は著しく低い。したがって、同じTLR4/MD-2に作用するが、誘導される応答は異なっている。Sa15-21のようなAgonisticな抗体をそのまま治療に応用する際の危険性を解消することは難しい。しかしながら、Sa15-21とLPSとの違いを分子レベルで解明することで、LPSで誘導されるTNF- α の産生を制御しうる新たな標的分子が同定される可能性がある。現在、その可能性を考えており、Sa15-21とLPSで発現が誘導される遺伝子の違いをMicroarrayで調べている。

3. TLR4の発現を制御する分子 PRAT4AとPRAT4B

上記の解析と並行して、TLR4に会合する新規の分子の検索を我々は続けてきた。その結果得られた分子がPRAT4A(Protein associated with TLR4A)である。このタンパクはシグナルペプチドに続いてアミノ酸 239 個からなるタンパクで、小胞体に位置する分子であると考えられる。これと同時に、MD-2はTLR4の細胞表面への発現に重要であると我々は報告してきたが、MD-2欠損マウスにおいても、TLR4の発現を確認することができた。MD-2はTLR4の発現を高めるが、それがなくてもTLR4は細胞表面に発現しうることになる。我々はTLR4の細胞表面への発現を制御する新たな分子があるのではないかという仮定の下に、TLR4単独に会合する分子の検索を続けてきたが、その分子もPRAT4Aであることが明らかとなった。この分子はTLR4と共沈降するが、MD-2やTLR2との会合は検出できなかった(図10a)。またPRAT4Aの免疫沈降では、TLR4の中でも電気泳動における見かけの分子量の小さいものがよく沈降された(図10b)。この結果は、TLR4とPRAT4Aは糖鎖修飾の終わっていない段階で会合していることが予想される。

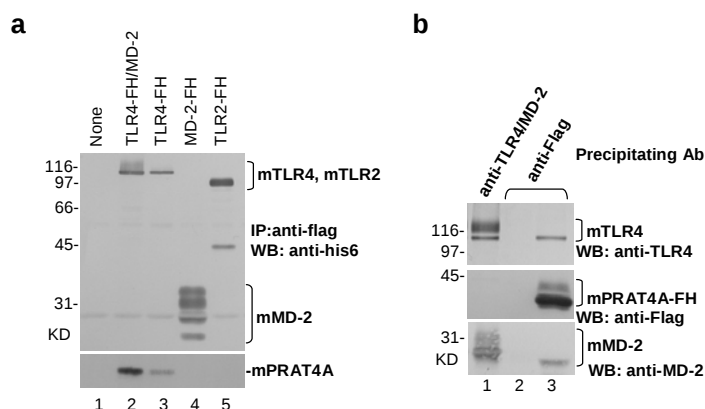


図 10 PRAT4AとTLR4、TLR2、MD-2との会合

(a) Ba/F3 細胞株に FlagHis6 タグ(FH)をつけた TLR4, TLR4/MD-2, MD-2, TLR2 を発現させ、これらを Flag に対する抗体で免疫沈降し His6 に対する抗体で検出した(上段)。共沈降する PRAT4A を PRAT4A に対する抗体で検出した(下段)。(b) Ba/F3 細胞株に FH タグをつけた PRAT4A, TLR4/MD-2 を発現させ、TLR4/MD-2 および Flag に対する抗体で免疫沈降し、TLR4(上段)、PRAT4A(中段)、MD-2(下段)をそれぞれ図に示す抗体で検出した。

PRAT4A の TLR4/MD-2 の細胞表面への発現における役割を明らかにするために、我々は PRAT4A のノックダウンを試みた。TLR4/MD-2 を発現させた Ba/F3 細胞株に PRAT4A を標的とした short hairpin RNA (shRNA) を発現させたところ、約 90% 程度低下した細胞株を得ることに成功した(図 11A)。その細胞の細胞表面の TLR4/MD-2 の発現を調べてみると、TLR4/MD-2 の発現が著明に低下していた。ところが、TLR2 や CD43 の発現にはあまり影響はなかった(図 11B)。RT-PCR で TLR4 や MD-2 の mRNA の発現を測定しても、PRAT4A のノックダウンによる影響は認められなかった(図 11C)。

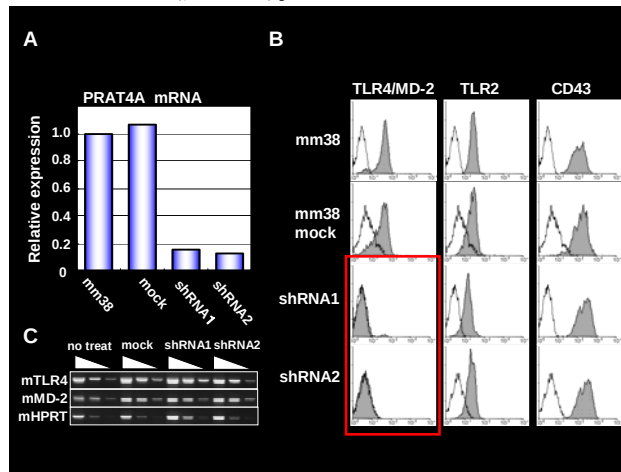


図 11 PRAT4A のノックダウンによる細胞表面 TLR4/MD-2 の発現低下

(A) TLR4/MD-2 を発現する Ba/F3 に PRAT4A を標的とする shRNA を発現させた細胞株を 2 つ確立した(shRNA1, shRNA2)。PRAT4A の mRNA の発現を Real-time RT-PCR で測定し、もとの細胞(mm38)やコントロールベクターを導入した細胞株(mock)に比べて、約 85% 程度のノックダウンが認められた。(B) この細胞表面上の TLR4/MD-2、TLR2、CD43 の発現を Flowcytometry で測定した。Open histogram は 2 次抗体単独の染色。(C) それぞれの細胞における TLR4、MD-2 の mRNA の発現を RT-PCR で測定したもの。HPRT の mRNA の発現をコントロールとして表している。

このときに用いた Ba/F3 細胞には NF- κ B のプロモーターの後に Luciferase をつないだレポーター遺伝子を導入しており、LPS 刺激による NF- κ B の活性化を Luciferase の活性で調べる事が可能である。そこで、LPS 刺激後に Luciferase の活性を調べたところ、PRAT4A をノックダウンして細胞表面の TLR4/MD-2 の発現が低下した細胞では応答性も低下していることが明らかとなった(図 12)。

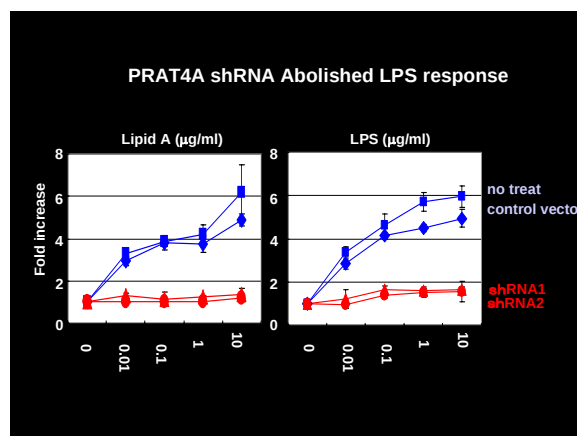


図 12 PRAT4A の発現が低下すると LPS 応答性も低下する

図 11 で用いた Ba/F3 細胞株を LPS(右)あるいは lipid A(左)で刺激し、4 時間後に Luciferase 活性を測定したもの。これらの細胞株には NF- κ B プロモーターで制御される Luciferase をコードしたレポーター遺伝子を導入している。shRNA を導入していない細胞株(No treat)、shRNA をコードしていないベクターだけを導入したもの(control vector)、shRNA を導入した 2 つの独立した細胞株(shRNA1, shRNA2)をそれぞれ示す。

さらにこの結果が免疫系の細胞株においても見られることを確認するために、マクロファージ細胞株 RAW264 に PRAT4A を標的とした shRNA(shPRAT4A)を発現させ、TLR4/MD-2 の細胞表面への発現を調べてみた(図 13)。shPRAT4A を発現させ、PRAT4A の発現が約 90%にまで低下したことを Real-time PCR にて確認した(図 13a)。その細胞表面での TLR4/MD-2 の発現を調べたところ、低下が確認できた。TLR2 や CD14 の発現には影響はなかった(図 13b)。この細胞を用いて、Lipid A で刺激し、サイトカインの産生を ELISA にて調べたところ、コントロールベクターを発現させた細胞に比べて、著明に TNF- α 、IL-6 の産生が低下していた(図 13c)。これらの結果は、マクロファージ系の細胞においても、TLR4/MD-2 の発現に PRAT4A が重要であることを示している。

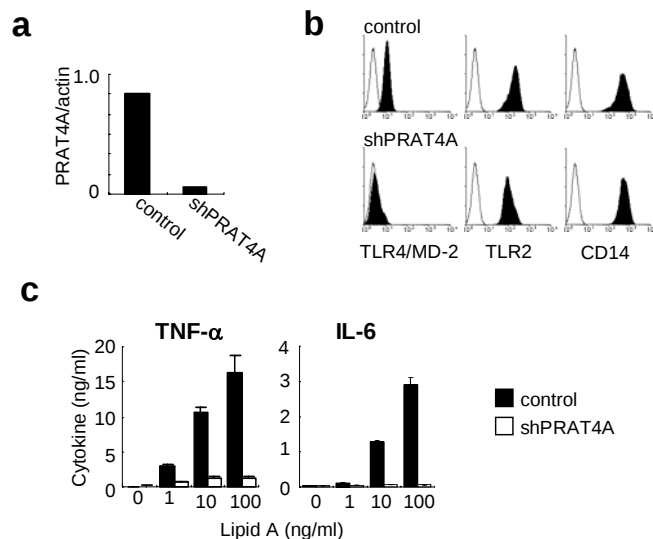


図 13 マクロファージ細胞株 RAW264 における PRAT4A の役割

(a) PRAT4A を標的とする shRNA を発現させた株(shPRAT4A)、コントロールのベクターを発現させた株(Control)について、Real-time RT-PCR を行った。アクチンの mRNA の発現と比較した値を示している。(b) 上述の 2 つの細胞について、細胞表面の TLR4/MD-2、TLR2、CD14 を染色した。Open histogram は 2 次抗体単独を示す。(c) LipidA 刺激後、24 時間後に上清を回収し、TNF- α 、IL-6 の濃度を ELISA にて測定した。

さらに細胞株ばかりでなく、Primary の細胞においても同様な結果が得られるかどうかを検討するために、骨髓由来樹状細胞を用いて検討した。その結果、これまでと同様に、PRAT4A をノックダウンすると、TLR4/MD-2 の細胞表面への発現が低下し、Lipid A 刺激によるサイトカイン産生が低下することが明らかとなった(図 14)。また、図には示さないが、補助刺激分子である CD86 や CD40 の Lipid A 刺激による発現上昇も PRAT4A ノックダウンによって低下することが明らかとなった。

これらの結果から、PRAT4A は TLR4 の細胞表面への発現に必要な分子であることが明らかとなった。

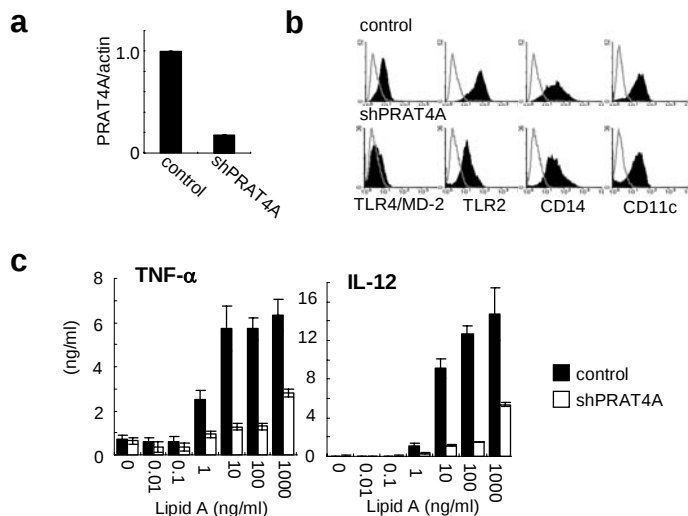


図 14 骨髄由来樹状細胞における PRAT4A の役割

マウスに細胞増殖を抑制する薬剤である 5-FU を投与し、4 日後に骨髄を回収した。骨髄幹細胞が enrich された骨髄細胞に shPRAT4A をコードするベクターあるいはコントロールベクターを導入したのちに、骨髄から樹状細胞を GM-CSF にて誘導した。その際に Puromycin 選択を行い、ベクターを発現していない細胞を除去した。この細胞を用いて、図 13 と同様に、(a)Real-time RT-PCR、(b)細胞表面の TLR4/MD-2、TLR2、CD14、および樹状細胞のマーカーである CD11c の発現を Flowcytometry で調べた。(c)得られた樹状細胞を Lipid A で刺激し、24 時間後の上清中の TNF- α 、IL-12 を ELISA にて測定した。

PRAT4A に類似した分子として、PRAT4B を我々はすでに報告している(図 15)。アミノ酸配列で PRAT4A と PRAT4B は高い相同性を示し、その発現も PRAT4A と同様に広範な組織で検出されている。

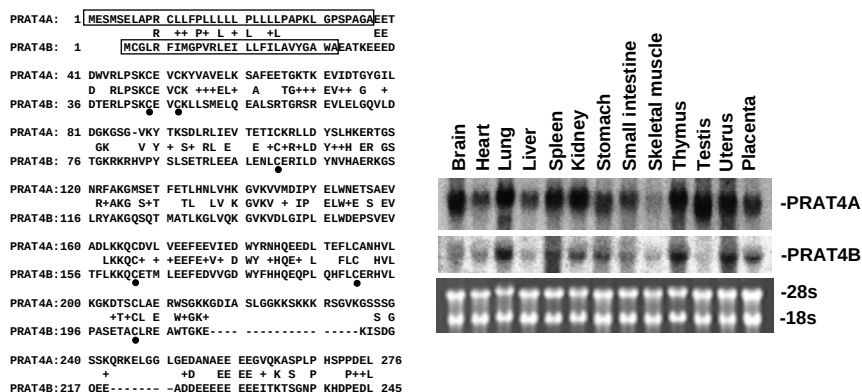


図 15 PRAT4B のアミノ酸配列と mRNA の組織発現

PRAT4A は PRAT4B と同様に TLR4 に会合することが確認されている(図 16)。今後、この分子の LPS 応答における役割をノックダウン細胞株やノックアウトマウスで探っていく。

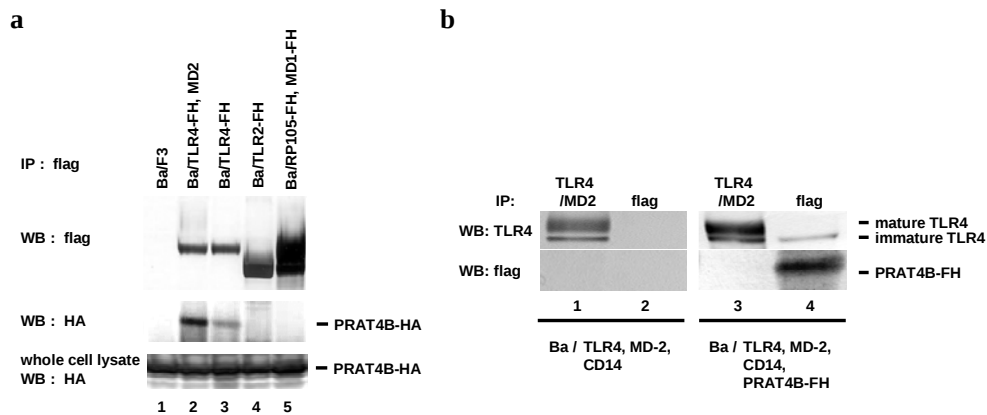


図 16 PRAT4B と TLR4 との会合

(a) Ba/F3 細胞株に FlagHis6 タグ (FH) をつけた TLR4/MD-2, TLR4, TLR2 を発現させ、これらを Flag に対する抗体で免疫沈降し検出した(上段)。共沈降する HA タグをつけた PRAT4B を HA に対する抗体で検出した(中段)。PRAT4B の発現を下段に示す。(b) Ba/F3 細胞株に TLR4/MD-2+CD14(lane 1, 2)、そこにさらに FH タグをつけた PRAT4B を発現させた。これらを TLR4/MD-2、あるいは Flag に対する抗体で検出し、免疫沈降した TLR4(TLR4)、共沈降した PRAT4A(下段)をそれぞれ図に示す抗体で検出した。

(2)研究成果の今後期待される効果

LPS の認識機構については、リガンドの結合から、TLR4-oligomerization まで、生化学的な解析は終えることができた。また、MD-2 ミュータントの解析から、リガンドの結合、TLR4-oligomerization にそれぞれ重要なアミノ酸をマウス MD-2 について同定することができた。TLR の中でも最もよく研究されている TLR4/MD-2 について、本研究の結果は、認識機構の解明に大きく貢献するとともに、佐藤グループが進めている MD-2 の構造解析、MD-2 とリガンドの複合体の構造解析において、有用となることが予想される。現在 TLR ファミリーのリガンドの同定はすでに終わっているが、リガンドと TLR との複合体の構造学的な解析はまだ報告されていない。構造解析も含めた我々の結果は TLR の病原体認識の理解に大きな貢献なしうるとともに、構造、機能的に重要なアミノ酸の情報が、新規の LPS 応答を制御する薬剤の開発に寄与しうると我々は期待している。

LPS と D-galactosamine によって誘導される肝細胞アポトーシスを TLR4/MD-2 に対する抗体が予防できたという知見については、この方法をそのまま新規治療法としてヒトに応用することは難しい。特に Agonistic な抗体については、最近、CD28 に対する抗体の危険性がヒトにおいて明らかとなった。しかしながら、抗体を用いた知見は新たな TLR 制御法の可能性を示唆していると我々は考えている。TLR4 に対する抗体 Sa15-21 を腹腔投与すると、LipidA と同等の NF- κ B の活性化を肝臓において誘導することができた(図 7d)。しかしながら、血中の TNF- α の産生は Lipid A に比べて著明に低い(図 17)。

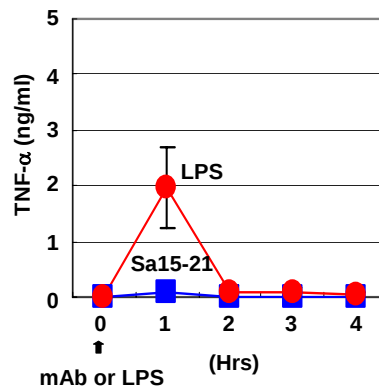


図 17 LPS と Sa15-21 抗体による TNF- α 産生誘導

LPS(500ng)と Sa15-21 抗体(100 μ g)を腹腔投与し、その後の血中の TNF- α の濃度を調べた。それぞれ 4 匹ずつの結果の平均を出している。

したがって、どちらも TLR4/MD-2 に作用するが、その作用は異なることが予想される (図 18)。

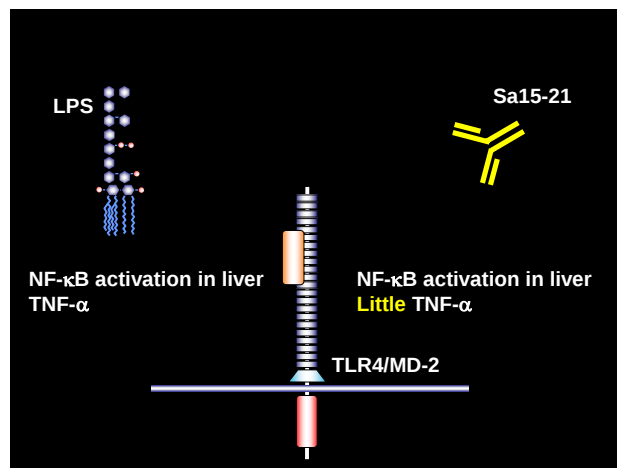


図 18 LPS と Sa15-21 抗体の違い

LPS は強い NF- κ B の活性化を肝臓において誘導するとともに、TNF- α の産生も誘導する。一方、Sa15-21 抗体は、LPS と同等の NF- κ B 活性化を肝臓において誘導するが、TNF- α 産生誘導は LPS に比べて著しく弱い。

抗体だけではなく、LPS においてもその構造に違いによっても活性が異なることが報告されている。したがって、これらの知見でわかったことは、同じ TLR4/MD-2 に作用するリガンドであっても誘導される宿主応答が異なるという点である。そこで、今後は、抗体と LPS で作用が異なる原因となっている機構、分子を検索する必要がある。そのような機構に関与する分子は、LPS によって誘導される炎症反応、エンドトキシンショックの制御法を開発するときの標的分子となりうる可能性がある。特に LPS 応答の際の TNF- α 産生を制御しうる方法が見つかれば、有用であると考えられる。

TLR4 の細胞表面への発現を制御する分子 PRAT4A、PRAT4B については、まだクローニングしたばかりであり、今後の解析が待たれるところである。TLR は細胞表面に

局在し、菌体膜成分を認識する TLR4/MD-2, TLR1/TLR2, TLR2/TLR6 と、小胞体に局在し、エンドソーム、リソソームで核酸を認識する TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 に大別される(図 19)。TLR の細胞内局在は、TLR の病原体認識、シグナル伝達に大きく関与していることが報告されつつある。しかしながら、どのような分子によって TLR の細胞内局在が制御されているのか、ほとんどわかっていない。TLR の細胞内局在を制御する分子として、PRAT4A および PRAT4B が大きな役割を果たしているのではないかと仮定の元に、今後の研究を進めてゆく必要がある。とくに PRAT4A、PRAT4B のノックダウン細胞株、ノックアウトマウス の確立、解析を進める必要がある。TLR の機能を制御するときに、認識のステップを標的とすると、MD-2 のような分子が標的分子となるが、細胞内局在を標的とすると、PRAT4A のような分子が標的分子の有望な候補となる可能性がある。TLR4 や MD-2 とは異なる観点からの新たな TLR 制御法の標的分子として注目されるかもしれない。

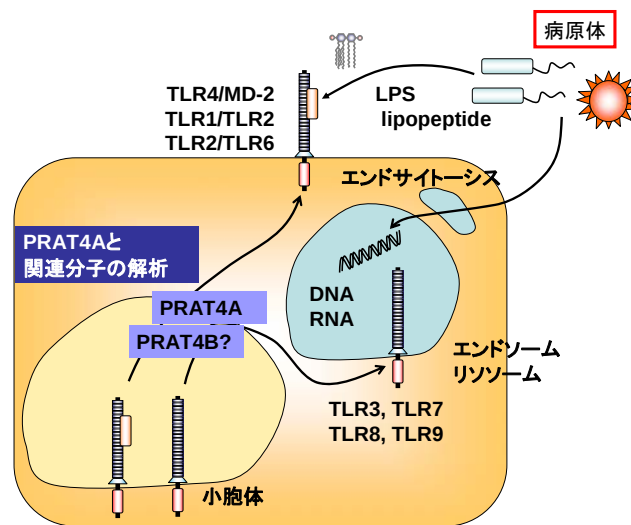


図 19 TLR の細胞内局在とその制御機構

3. 2 MD-2 の構造解析(東京大学大学院薬学系研究科 佐藤グループ)

MD-2 による LPS 認識の機構の詳細な解明を目指し、ヒトおよびマウスの MD-2 の X 線結晶構造解析を行うこととした。そのためには、これまで大量調製が困難とされていた MD-2 を大量に発現させ、高純度精製と結晶化のシステムを構築することとした。

ヒトとマウスの MD-2 について、大量発現させた MD-2 に修飾付加されている *N* 結合型糖鎖を酵素処理により均一に短鎖化することができ、高純度の結晶化試料を得た。ヒト MD-2 の結晶化に成功し、世界に先駆けて、高分解能での MD-2 の三次元構造の解明に成功した。さらに、アンタゴニストである Lipid IVa との複合体の結晶も調製でき、その X 線回折データも収集し、三次元構造を得ることができた。MD-2 の三次元構造は、2 層の β シート・サンドイッチの間に脂質が挟まる広い空間を有することが明らかとなった。

MD-1 についても、その三次元構造に基づいて、機能と相互作用するリガンドに関する知見を得ることを目指した。MD-1 の発現系を MD-2 と同様にしない、*P. pastoris* を用いて単量体画分を得て、糖鎖を均一化した精製試料を得ることができた。結晶化と X 線解析は、これまでの MD-2 で得た方法を準用することにより、その三次元構造が迅速に得られるものと期待される。

MD-2 と相互作用する TLR4 の X 線結晶構造解析に向けて、ヒトおよびマウスの TLR4 の細胞外ドメインの大量発現系の構築を進めた。ヒト TLR-4 について、MD-2 と相互作用する細胞外ドメインの全長の発現を目指した。*P. pastoris* の細胞内発現と細胞外分泌発現で、細胞外ドメイン全長体についてはの高レベルの発現は認められなかったが、MD-2 と相互作用すると考えられるアミノ末端側の 54 番目の残基までと 203 番目までの残基までのポリペプチド鎖を発現させることができた。ヒト TLR4 細胞外ドメインを昆虫細胞を用いることにより、発現が最近認められた。

(2)研究成果の今後期待される効果

ヒト MD-2 の大量調製とその三次元構造の詳細を明らかにできたことの意義は多大である。敗血症の治療薬の創薬に向けて、高純度精製 MD-2 試料はリガンドのアッセイ評価に用いることができる。三次元構造を、MD-2 単体とアンタゴニストの Lipid IVa について得たことから、MD-2 を解する LPS 認識応答の理解が著しく進展する。また、創薬面でも、アンタゴニスト複合体の構造に基づけば、新たなリガンドの構造知見に基づく設計が直ちに可能となる。すなわち、創薬に向けた、設計と評価の基盤を提供することになり、社会への寄与は多大である。

機能の詳細が未だ不明な MD-1 についても良好な結晶試料が得られ、X 線解析を進展させる見通しが立ったことから、今後引き続いて研究を進展させたい。TLR4 についても、試料調製を推し進め、MD-2 との相互作用と生物応答の機構を構造面から明らかにしたい。

3. 3 リピドAならびに類縁体、標識体の合成(大阪大学大学院理学研究科 深瀬グループ)

(1)研究実施内容及び成果

リポ多糖 (LPS) の活性中心であるリピド A については、強いエンドトキシン活性を持つ大腸菌型リピド A が代表的構造として知られており、その生物活性は、受容体である Toll-like receptor 4 (TLR4) / MD-2 複合体によって認識されることにより誘導される。TLR4/MD-2 を介する細胞内シグナル伝達経路には幾つかの経路があることが知られており、大腸菌リポ多糖は種々の経路でサイトカインを誘導し、特に炎症性のサイトカインを誘導することにより、強い免疫増強活性ーエンドトキシン活性を示す。一方、大腸菌 LPS 生合成中間体のリピド IVa は、ヒトに対してアンタゴニスト作用を持つ。本研究ではリピド A の活性発現のための構造要因を明らかにするとともに受容体機能や細胞内シグナル伝達の制御を目指し、新規なアゴニストならびアンタゴニストを創成した。また TLR4-MD-2 との相互作用解析のための蛍光標識体を合成した。

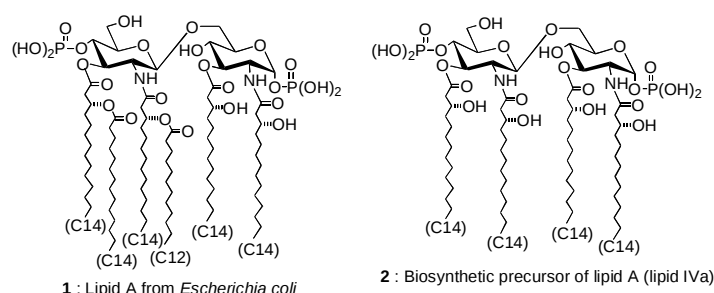


図1 大腸菌型リポドAと生合成中間体のリポドIVaの構造

特に本研究においては、医薬品への展開も考慮し、弱い免疫活性化作用あるいはアンタゴニスト作用を持つリポドAに着目し、種々のリポドA及びその類縁体の合成を行った。特に、特徴的な構造を持つピロリ菌 *Helicobacter pylori* のリポドAとLPS部分構造ならびに紅色光合成細菌 *Rubrivivax gelatinosus* リポドAについて化学合成を行い、興味深い生物活性試験の結果を得た。

さらには寄生性ならびに高病原性のバクテリアの持つLPSならびにリポドAの活性と病原性との関連を調べるために、ペスト菌 *Yersinia pestis* LPS部分構造、上記のピロリ菌 *Helicobacter pylori* のリポドAとLPS部分構造の合成を行い、これらの多くはTLR4/MD-2を活性化しないだけでなく、アンタゴニストとして作用するために自然免疫を始動しないことを示唆する結果を得た。

精密な分子モデリングを基盤として新規アゴニストならびにアンタゴニストを創成した。その一つとして、酸性アミノ酸置換の単糖類縁体において酸性官能基の変化によってエンドキシン活性-アンタゴニスト活性の転換が起こることを見出し、リポドAの構造変換によって受容体の機能を制御できる可能性を見出した。また、2本のアシル鎖をオレフィンメタセシスによって架橋することで配座を固定した新規類縁体の合成を行ったところ、アシル鎖数とその炭素数が同じ場合、架橋していない類縁体よりも環状構造をもつ類縁体の方が強いサイトカイン(IL-6)誘導活性を示し、配座固定を行うことによりその類縁体はリポドAの活性配座に近い3次元構造をとることを示した。

また、合成した種々のリポドAおよびその類縁体については、TLR4-MD-2との共結晶の作成やその他の相互作用解析に供した。

(1-1) ヘリコバクター・ピロリのリポ多糖部分構造

ーリポドAとKDO-リポドAの化学合成と生物活性

胃や十二指腸潰瘍の起因菌であるピロリ菌は、胃の中という酸性度の高い特有の環境に生息していることや、その病原性との関連から、LPSおよびリポドAの構造について興味を持たれ解析が行われている。ピロリ菌リポドAは、アシル基が3あるいは4本と少なく、その鎖長は炭素数18と大腸菌のリポドA（炭素数12、14）に比べて長いという特徴を有している（図2）。また、4位リン酸基を持たず、1位リン酸がエタノールアミンと縮合しているものが多く存在している。生物活性については、ピロリ菌LPSは大腸菌のLPSに比べると弱いものの、IL-6、TNF- α 等のサイトカイン誘導活性を示し免疫増強活性を持つ事が報告されていた。しかし最近になって、Triantafilouらは、ピロリ菌のLPSがTLR4のアンタゴニストであると報告した。構造の不均一性が活性に影響を及ぼす可能性があると同時に、天然のLPSに他の活性因子が混入する可能性も考えられることから、合成化合物を用いてピロリ菌LPSの活性を精査することとした。

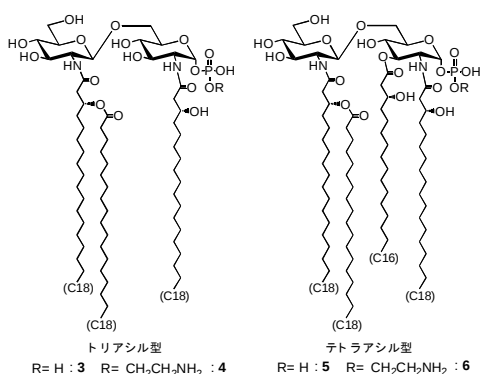


図2 *Helicobacter pylori* のリピド A

ピロリ菌のリピドAについては、**4**の合成を以前に行い、その生物活性試験を行った。その結果、トリアシル-アミノエタノールリン酸体**4**は大腸菌型に比べ非常に弱いもののTNF- α 誘導活性を示すとともに、インターフェロン γ 誘導因子として注目されているIL-18を誘導することを見出した。大腸菌型の場合、リピドAと多糖部をつなぐ3-deoxy-D-manno-2-octurosonic acid (Kdo)が結合したKdo-リピドAがリピドAのみより強いTNF- α およびIL-6誘導活性を示すことを見出していた。そこで、ピロリ菌リピドAについて、酸性基を持つKdoが生物活性に及ぼす影響について調べることにした。リピドA (**3**)の6'位にKdoが結合したLPS部分構造を合成し、得られたリピド(**3**)とKdo-リピドA(いずれも1位リン酸体)についてヒト全血を用いたIL-6誘導活性を測定したところ、全く活性は認められず、大腸菌型LPSのIL-6誘導に対する明確な阻害活性が観測された(図2)。以前の結果と合わせるとリン酸基のエタノールアミン体の有無による生物活性の違いが示唆された。

以上のように、ピロリ菌リピドAは、IL-18を誘導するものの、炎症性サイトカインの誘導作用は弱いかあるいは阻害作用を示し、ピロリ菌リピドAによる免疫活性化は弱いものと推測される。このようなピロリ菌リピドAの活性が、ピロリ菌が胃の中に寄生できる一つの要因となっていると思われる、その病原性に深い関わりがあると考えられる。特にアシル基の数やリン酸基のエタノールアミン体の有無による生物活性の違いが示唆されており、これらリピドAの組成の違いや電荷の違いが、病原性や感染性に影響を及ぼしている可能性が高いと考えている。

(1-2) ペスト菌リポ多糖部分構造の化学合成と生物活性

ペスト菌は27°Cで生育すると大腸菌型のリピドA構造を発現するが、哺乳類の体温である37°Cでは生合成前駆体であるテトラアシルリピドA(リピドIVa)を発現する。我々はそのLPSの生物活性に興味を持ち、リピドIVaにKdoが2残基結合したLPSを合成したところ、この化合物もテトラアシルリピドAと同様にアンタゴニスト作用を示した。ペスト菌LPSのアンタゴニスト作用が、感染初期の自然免疫反応を阻害し、ペスト菌の病原性に影響を与えているものと考えられる。最近37°CにおいてもヘキサアシルリピドAを発現する変異ペスト菌が感染能を失うことが見出され、病原体の感染阻止におけるTLR4-MD2の重要性が明らかとなった。

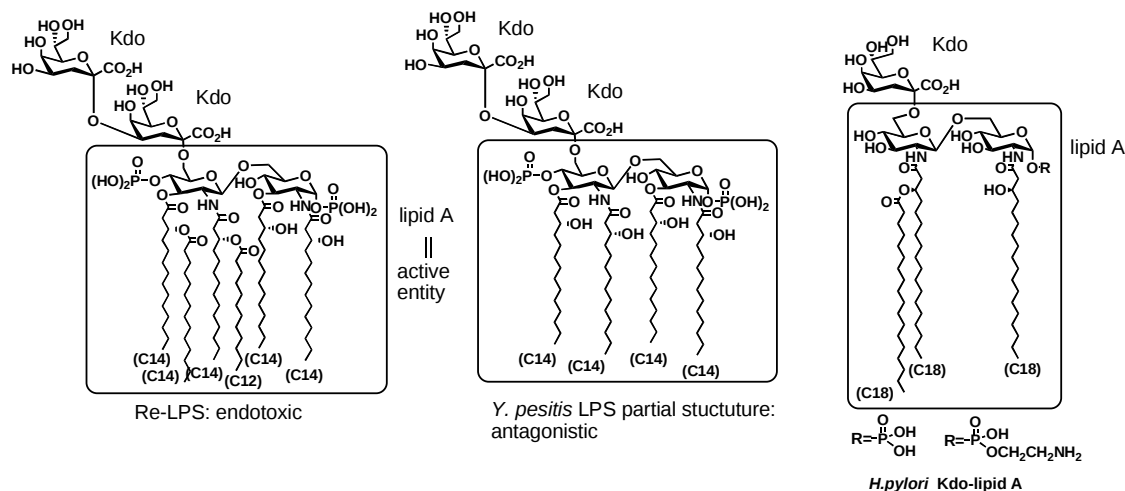


図3 合成したLPS部分構造

なお以前に合成したKdo二残基が大腸菌リポドAに結合したRe変異株LPSはリポドAのみよりも明確に強い活性を示し、Kdo残基が活性を増強すること、すなわちTLR4-MD2はリポドAに加え、Kdo部も認識することを見出していた。これに対してリポドIVaにKdoが結合してもアンタゴニスト活性は増強されなかった。

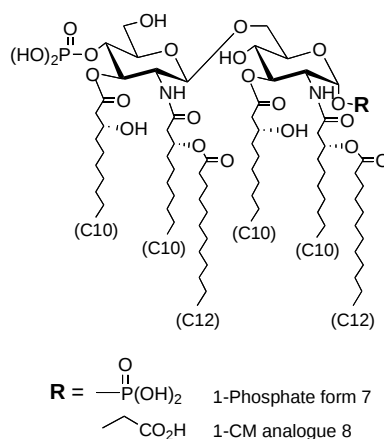
リポドAの放射性標識体を用いた解析では、アンタゴニストのTLR4-MD2への結合量は、活性型である大腸菌型のヘキサアシルリポドAの結合量の約2倍であることがわかった。これはヘキサアシルリポドA一分子が二つのTLR4-MD2複合体に結合することで、TLR4-MD2を二量化し、TLR4-MD2の活性化と細胞内へのシグナル伝達を行うことを示唆している。一方アンタゴニストはTLR4-MD2と1:1で結合するので、TLR4-MD2を活性化しないものと考えられる。

これらの結果を総合して考えるとTLR4-MD2一分子には酸性官能基認識部が2カ所あり、TLR4-MD2一分子ではリポドA部（2カ所の酸性官能基）のみを認識するが、TLR4-MD2二分子はKdo-Kdo-リポドA構造（4カ所の酸性官能基）を認識できることが示唆される。

(1-3) 紅色光合成細菌 *Rubrivivax gelatinosus* リポドA

紅色光合成細菌の一種である *Rubrivivax gelatinosus* (Rvi.) *gelatinosus* のリポドAは、大腸菌型やピロリ菌型とはアシル基の結合パターンが異なり、その鎖長が炭素数10あるいは12と大腸菌のリポドA（炭素数12、14）に比べて短い（右図）。鎖長が炭素数10程度と短いリポドAについては、アシル基の配置等の構造上の小さな差異で、エンドトキシン活性を持つか阻害活性を持つか分かれる傾向にあることから、生物活性を決定する構造要因を検討し、受容体による認識機構を考察するために、Rvi. *gelatinosus* リポドA（1位リン酸体）**7** および1-CMアナログ（1位カルボキシメチル体）**8** の化学合成を行い、そのIL-6誘導活性、および大腸菌LPSのIL-6誘導に対する阻害活性を測定した。

天然型である1位リン酸**7**は、IL-6の誘導活性を持たず、強い阻害活性を持つのにに対し、1-CMアナログ**8**は活性は弱いが明らかなIL-6誘導活性を示した。強いエンドトキシン活性を持つ大腸菌型のリポドAや生合成前駆体では、1位の酸性基をリ



ン酸からカルボン酸に置換した場合でも IL-6 等のサイトカイン誘導活性に変化はないことから、構造的に、エンドトキシン活性あるいはアンタゴニスト活性を発現するかの境界領域にある化合物については、小さな構造変化が大きな活性の変化につながると考えられる。

(1-4) 酸性アミノ酸置換リピドA単糖類縁体の合成と生物活性

リピドAの生物活性発現には、酸性基（大腸菌型の場合 1 位および 4'位のリン酸基）とアシル基の配置が重要であることが示唆されているが、その詳細については解析された例が少ない。リピドAの生物活性を決定する最小の構造要因を解析するため、大腸菌型リピドAの非還元末端側の 4-リン酸化グルコサミンを酸性アミノ酸と置換した化合物を合成し（図 4）、その生物活性を調べた（図 5）。その結果、**D-Asp2011** が明らかな IL-6 誘導活性を示し **L-Asp2011** も弱いながら活性を有していた。しかしながら、他の化合物は、活性を示さなかった。それに対し、IL-6 誘導阻害活性については、**D-Asp1011**、**D-Asp2011** 以外の全ての化合物が活性を示し、特にリン酸化セリン類縁体はいずれも比較的強い活性を示した。これらの結果から、リピドAの酸性アミノ酸置換単糖類縁体が生物活性を示し、特に 2011 型の化合物についてはアミノ酸上の酸性基のカルボン酸（Asp）とリン酸（リン酸化 Ser）の変換により、エンドトキシン活性とアンタゴニスト活性とのスイッチングを可能とした。このような性質は、*Rvi. gelatinosus* リピドAの 1 位におけるリン酸基およびカルボキシメチル基の違いによる活性の転換と共通の機構に基づくと考えられる。

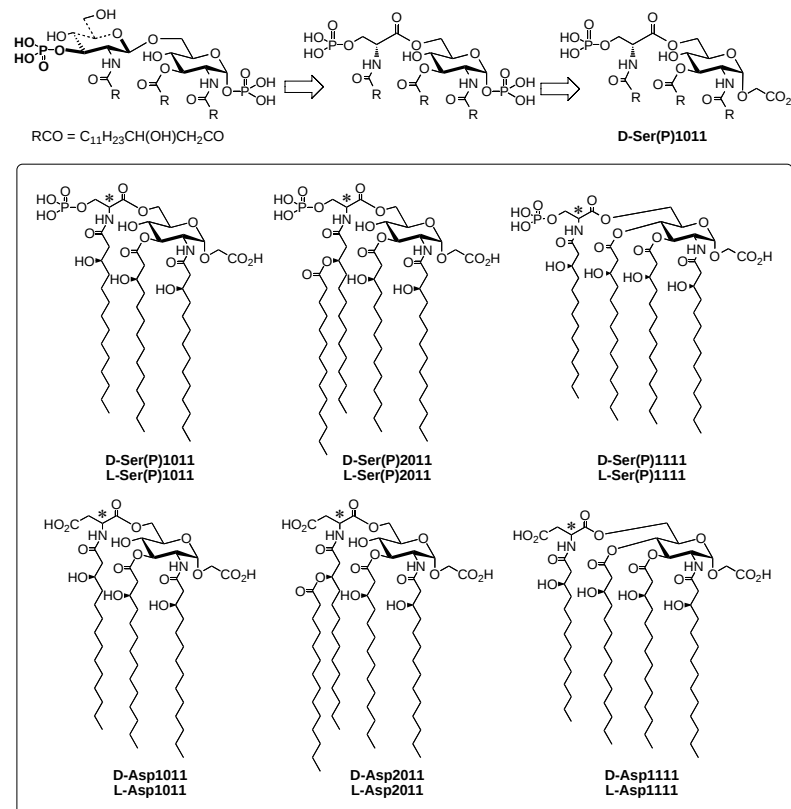


図 4 酸性アミノ産置換リピドA単糖類縁体

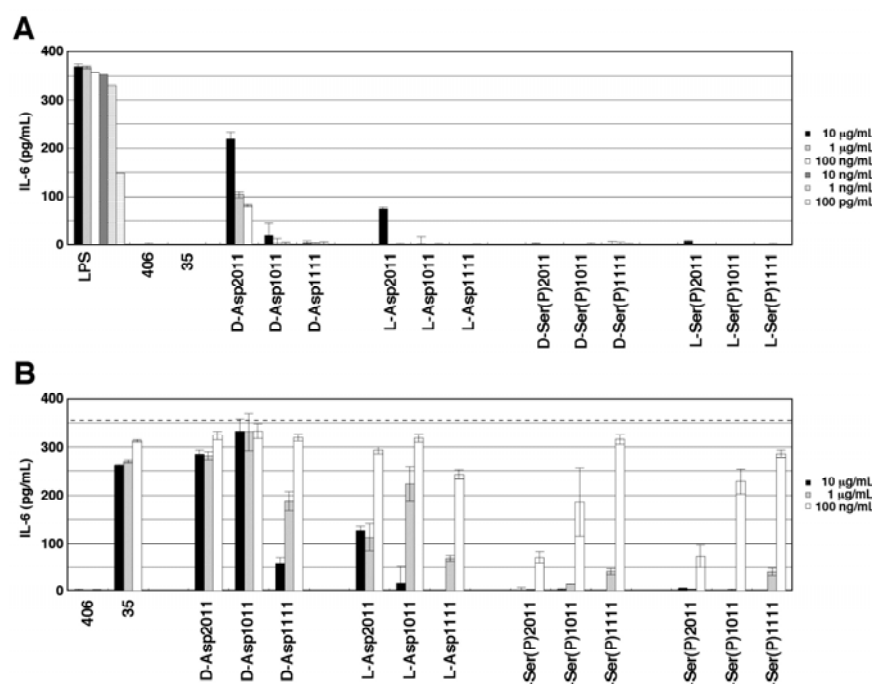
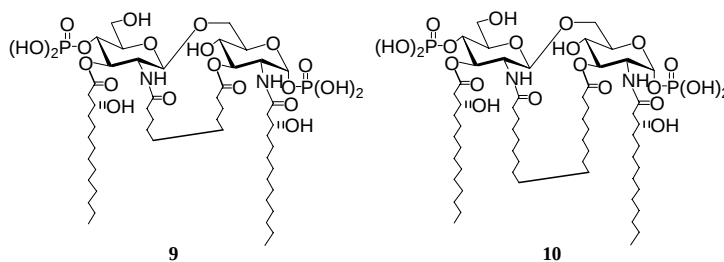


図5 酸性アミノ酸置換単糖リピドA類縁体の IL-6 誘導活性 (A) および阻害活性 (B)

(B) においては、大腸菌 LPS (*E. coli*, 0111:B4, 5 ng/mL) の IL-6 誘導に対する阻害活性を測定
 図中の点線は大腸菌 LPS 5 ng/mL のみを用いた際の誘導量

(1-5) 配座固定リピドA類縁体の合成

これまでに我々は、リピドAのアシル鎖の鎖長や数が減少すると活性を失ってしまうことを見出しており、この分子が TLR4-MD-2 複合体に認識されるためにはアシル鎖同士が疎水性相互作用によって集合し、分子が一定の配座をとることが必要であると考えている。そこで、2本のアシル鎖をオレフィンメタセシスによって架橋することで配座を固定した新規類縁体 (9, 10) の合成を行った。これらの類縁体のヒトに対する IL-6 誘導活性および阻害活性を調べたところ、アシル鎖数とその炭素数が同じ場合、架橋していない類縁体よりも環状構造をもつ類縁体の方が強い誘導活性を示した。配座固定を行うことによりその類縁体はリピドAの活性配座に近い3次元構造をとると考えており、今後さらに解析を進める予定である。



(1-6) リピドA標識体の合成

細胞膜状での挙動や受容体との相互作用を解析するためのビオチン標識体、蛍光標識体の合成を行った。われわれは還元性のグルコース残基を複合糖質に結合させ、そのグルコースの一位に穏和な条件で蛍光基を導入する方法をすでに開発していたので、この手法を適用した。

(2)研究成果の今後期待される効果

リピドAは、基本的には類似構造を持つものの、菌種によってそのアシル基あるいは酸性基部分が多少異なり、その結果、受容体の認識に対して、アンタゴニスト活性を持つものが見られる。病原性細菌の中にはアンタゴニスト活性をもつLPSを持つために宿主体内で増殖しやすいものが存在するが、本研究において、ユニークな構造を持つピロリ菌のリピドAが、IL-6誘導を阻害し、免疫抑制作用を持つ構造を持つことを明らかとし、その病原性に関わる結果を示した。一方ペスト菌では、LPSの構造が病原性を支配していることが明らかとなった。また *Rvi. gelatinosus* リピドAやアミノ酸置換単糖リピドAに見られたような、酸性基の種類の違いによってエンドトキシン活性—アンタゴニスト活性の変換が可能であることを明らかにしたが、このことは、ピロリ菌リピドAにおけるKdo結合の有無やエタノールアミン体の有無など、電荷の違いによる活性の変化とも関連づけられると思われる。自然界においては、リン酸基の構造修飾などリポ多糖に様々な構造修飾が行われており、このような変化によって活性が転換し、病原性に大きな影響を与えている可能性がある。またIL-18誘導経路とNF- κ B活性化経路は異なることが示唆されており、ピロリ菌リピドAはこれらの活性化については大腸菌型とは明らかに異なったパターンを示すことから、本研究で得られた化合物は、特定のシグナル伝達経路のみを活性化し、受容体の機能を制御できる化合物の鍵となる。すなわち、LPSの毒性の主因の一つである炎症作用を抑えた、有用な生物活性を選択的に発現するリピドA類縁体の創製へ繋がる成果と考えている。

4 研究参加者

①三宅グループ(病原体糖脂質認識機構の解明の研究)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
三宅 健介	東京大学 医科学研究所 感染遺伝学分野	教授	統括	平成 13 年 12 月～ 平成 19 年 3 月
赤司 祥子	東京大学 医科学研究所 感染遺伝学分野	助手	LPS 認識機構の解明	平成 13 年 12 月～ 平成 19 年 3 月
斉藤 伸一郎	東京大学 医科学研究所 感染遺伝学分野	助手	LPS 認識機構の解明	平成 15 年 5 月～ 平成 19 年 3 月
楠本 豊	東京大学 医科学研究所 感染遺伝学分野	CREST 研究員	LPS 認識機構の解明	平成 14 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
長井 良憲	東京大学 医科学研究所 感染遺伝学分野	CREST 研究員	MD-2K0 マウスの解析	平成 14 年 4 月～ 平成 16 年 3 月
古田 隆久	東京大学 医科学研究所 感染遺伝学分野	助手	MD-2K0 マウスの解析	平成 13 年 12 月～ 平成 16 年 3 月
菊地 たかね	東京大学 医科学研究所 感染遺伝学分野	技官	MD タンパク構造解析	平成 13 年 12 月～ 平成 15 年 4 月
小林 真紀子	東京大学 医科学研究所 感染遺伝学分野	大学院生	LPS 認識機構の解明	平成 14 年 4 月～ 平成 18 年 3 月 H15. 10～H16. 3CREST 研究補助 平成 14 年 4 月～
若林 靖貴	東京大学 医科学研究所 感染遺伝学分野	大学院生	MD-2K0 マウスの解析	平成 18 年 3 月 H15. 10～H16. 3CREST 研究補助 平成 14 年 10 月～
今野 和典	東京大学 医科学研究所 感染遺伝学分野	大学院生	LPS 認識機構の解明	平成 18 年 3 月 H15. 10～H16. 3CREST 研究補助 平成 15 年 4 月～
小林 俊彦	東京大学 医科学研究所 感染遺伝学分野	大学院生	MD-2K0 マウスの解析	平成 19 年 3 月 H15. 10～H16. 3CREST 研究補助 平成 15 年 4 月～
高橋 浩一郎	東京大学 医科学研究所 感染遺伝学分野	大学院生	LPS 認識機構の解明	平成 19 年 3 月 H15. 10～H16. 3CREST 研究補助 平成 16 年 4 月～
石井 崇司	東京大学 医科学研究所 感染遺伝学分野	大学院生	LPS 認識機構の解明	平成 17 年 12 月 H17. 4～H17. 12CREST 研究補助 平成 15 年 10 月～
石黒 光太郎	東京大学 医科学研究所 感染遺伝学分野	大学院生	LPS 認識機構の解明	平成 17 年 3 月
松本 文	東京大学 医科学研究所 感染遺伝学分野	大学院生	LPS 認識機構の解明	平成 16 年 1 月～ 平成 19 年 3 月 H16. 2～H17. 3CREST 研究補助
谷村 奈津子	東京大学 医科学研究所 感染遺伝学分野	日本学術振 興会特別研 究員	LPS 認識機構の解明	平成 16 年 4 月～ 平成 19 年 3 月

福井 竜太郎	東京大学 医科学研究所 感染遺伝学分野	大学院生	TLR の認識機構	平成 17 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
柴田 琢磨	東京大学 医科学研究所 感染遺伝学分野	大学院生	TLR の認識機構	平成 17 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
清川 貴志	東京大学 医科学研究所 感染遺伝学分野	大学院生	TLR の認識機構	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
玄 彩華	東京大学 医科学研究所 感染遺伝学分野	大学院生	TLR の認識機構	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
本井 祐二	東京大学 医科学研究所 感染遺伝学分野	CREST 研究補助員	MD-2K0 マウスの解析	平成 14 年 6 月～ 平成 18 年 6 月
佐藤 由美果	東京大学 医科学研究所 感染遺伝学分野	チーム 事務員	研究チーム事務業務	平成 13 年 12 月～ 平成 19 年 3 月

②佐藤グループ(MD-2 の構造解析の研究)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
佐藤 能雅	東京大学・大学 院薬学系研究科	教授	MD-2 の構造生物学の 研究。グループリーダー	平成 15 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
水谷 隆太	東京大学・大学 院薬学系研究科	助手	MD-2 の構造生物学の 研究。試料調製の補助	平成 15 年 4 月～ 平成 19 年 3 月

③深瀬グループ(リピド A ならびに類縁体、標識体の合成の研究)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
深瀬 浩一	大阪大学・大学 院理学研究科	教授	リピド A ならびに類縁 体、標識体の合成	平成 16 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
藤本 ゆかり	大阪大学・大学 院理学研究科	講師	リピド A ならびに類縁 体、標識体の合成	平成 16 年 4 月～ 平成 19 年 3 月

④小杉グループ(TLR4/MD2シグナル伝達と脂質代謝機構)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
小杉 厚	大阪大学医学 部保健学科	助教授	TLR4/MD2 シグナル伝達と 脂質代謝機構	平成 13 年 12 月～ 平成 16 年 3 月
齋藤 伸一郎	大阪大学医学 部保健学科	CREST 研究員	TLR4/MD2 シグナル伝達と 脂質代謝機構	平成 14 年 10 月～ 平成 15 年 4 月

加藤 彰子	大阪大学医学部保健学科	大学院生・CREST 研究補助員 CREST 技術員	TLR4/MD2 シグナル伝達と脂質代謝機構	平成 13 年 12 月～平成 15 年 3 月 CREST 研究補助員 平成 15 年 4 月～平成 16 年 3 月 CREST 技術員
永福 正和	大阪大学医学部保健学科	大学院生 CREST 研究補助員	TLR4/MD2 シグナル伝達と脂質代謝機構	平成 13 年 12 月～平成 16 年 3 月
谷村 奈津子	大阪大学医学部保健学科	大学院生 CREST 研究補助員	TLR4/MD2 シグナル伝達と脂質代謝機構	平成 13 年 12 月～平成 16 年 3 月
谷一 靖江	大阪大学医学部保健学科	大学院生 CREST 研究補助員	TLR4/MD2 シグナル伝達と脂質代謝機構	平成 13 年 12 月～平成 16 年 3 月
山田 武直	大阪大学医学部保健学科	大学院生	TLR4/MD2 シグナル伝達と脂質代謝機構	平成 14 年 4 月～平成 16 年 3 月
岡 大輔	大阪大学医学部保健学科	大学院生	TLR4/MD2 シグナル伝達と脂質代謝機構	平成 15 年 4 月～平成 15 年 12 月
松本 文	大阪大学医学部保健学科	大学院生	TLR4/MD2 シグナル伝達と脂質代謝機構	平成 15 年 4 月～平成 15 年 12 月
後藤 弥生	大阪大学医学部保健学科	大学院生	TLR4/MD2 シグナル伝達と脂質代謝機構	平成 15 年 4 月～平成 16 年 3 月

5 招聘した研究者等

氏 名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Dr. Allan M. Weissman (米国国立衛生研究所、Branch Chief)	大阪大学医学部保健学科にて講演をするため。	新・都ホテル (京都市南区京都市八条口)	平成 15 年 3 月 17 日～平成 15 年 3 月 19 日

6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内誌 0 件、国際誌 52 件)

Nagai, Y., S. Akashi, M. Nagafuku, M. Ogata, Y. Iwakura, S. Akira, T. Kitamura, A. Kosugi, M. Kimoto, and K. Miyake. Essential role of MD-1 in lipopolysaccharide responsiveness and Toll-like receptor 4 distribution. *Nat. Immunol.* 3:667-672, 2002.

Yasuda, K., M. Nagafuku, T. Shima, M. Okada, T. Yagi, T. Yamada, Y. Minaki, A. Kato, S. Tani-ichi, T. Hamaoka, and A. Kosugi. Fyn is essential for tyrosine phosphorylation of Csk-binding protein/phosphoprotein associated with glycolipid-enriched microdomains in lipid rafts in resting T cells. *Journal of Immunology* .169:2813-2817, 2002.

Matsumoto, M., S. Kikkawa, M. Kohase, K. Miyake, and T. Seya. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 293: 1364-1369, 2002.

Triantafilou M, Miyake K, Golenbock DT, Triantafilou K. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J. Cell. Sci.* 115:2603-2611, 2002.

Ando, I., Y. Tsukumo, T. Wakabayashi, S. Akashi, K. Miyake, T. Kataoka, and K. Nagai. Safflower polysaccharides activate the transcription factor NF- κ B via Toll-like receptor 4 and

induce cytokine production by macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 2: 1155-1162, 2002.

Duesberg U, von dem Bussche A, Kirschning C, Miyake K, Sauerbruch T, Spengler U. Cell activation by synthetic lipopeptides of the hepatitis C virus (HCV)-core protein is mediated by toll like receptors (TLRs) 2 and 4. *Immunol Lett.* 84:89, 2002.

Abel B, Thieblemont N, Quesniaux VJ, Brown N, Mpagi J, Miyake K, Bihl F, Ryffel B. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *J Immunol.* 169:3155-3162, 2002.

Ogawa T, Asai Y, Hashimoto M, Takeuchi O, Kurita T, Yoshikai Y, Miyake K, Akira S. Cell activation by Porphyromonas gingivalis lipid A molecule through Toll-like receptor 4- and myeloid differentiation factor 88-dependent signaling pathway. *Int. Immunol.* 11:1325-1332, 2002.

Hijiya N, Miyake K, Akashi S, Matsuura K, Higuchi Y, Yamamoto S. Possible involvement of toll-like receptor 4 in endothelial cell activation of larger vessels in response to lipopolysaccharide. *Pathobiology.* 70:18-25, 2002.

Tanimura, N., M. Nagafuku, Y. Minaki, Y. Umeda, F. Hayashi, J. Sakakura, A. Kato, Douglas R. Liddicoat, M. Ogata, T. Hamaoka, and A. Kosugi. Dynamic changes in the mobility of LAT in aggregated lipid rafts upon T cell activation. *Journal of Cell Biology.* Vol.160, Num.1, 125-135, 2003.

Miyake, K. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and Toll-like receptor4-MD-2: unique roles for MD-2. *International Immunopharmacology.* 1:119-128, 2003.

Okamoto M, Oshikawa T, Tano T, Ohe G, Furuichi S, Nishikawa H, Ahmed SU, Akashi S, Miyake K, Takeuchi O, Akira S, Moriya Y, Matsubara S, Ryoma Y, Saito M, Sato M. Involvement of Toll-Like Receptor 4 Signaling in Interferon-gamma Production and Antitumor Effect by Streptococcal Agent OK-432. *J. Natl. Cancer Inst.* 95:316-326, 2003.

T Matsunaga, N Takemoto, T Sato, R Takimoto, I Tanaka, A Fujimi, T Akiyama, H Kuroda, Y Kawano, M Kobune, J Kato, Y Hirayama, S Sakamaki, K Kohda, K Miyake & Y Niitsu. Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nat. Med.* 9:1158-1165, 2003.

Adib-Conquy M, Moine P, Asehnoune K, Edouard A, Espevik T, Miyake K, Werts C, Cavaillon JM. Toll-like receptor-mediated tumor necrosis factor and interleukin-10 production differ during systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 168:158-164, 2003.

S Akashi, S Saitoh, Y Wakabayashi, T Kikuchi, N Takamura, Y Nagai, Y Kusumoto, K Fukase, S Kusumoto, Y Adachi, A Kosugi, K Miyake. Lipopolysaccharide Interaction with Cell Surface Toll-like Receptor 4-MD-2: Higher Affinity than that with MD-2 or CD14. *J. Exp. Med.* 198: 1035-1042, 2003.

Kimoto M, Nagasawa K, Miyake K. Role of TLR4/MD-2 and RP105/MD-1 in innate recognition of lipopolysaccharide. *Scand J Infect Dis.* 35:568-572, 2003.

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, Zbytniuk 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.

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.

M. Oikawa, T. Shintaku, N. Fukuda, H. Sekljic, Y., Fukase, H. Yoshizaki, K. Fukase, S. Kusumoto, NMR conformational analysis of biosynthetic precursor-type lipid A: monomolecular state and supramolecular assembly, *Org. Biomol. Chem.*, (2004) 2, 3557-3564.

M. Triantafilou, K. Brandenburg, S. Kusumoto, K. Fukase, A. Mackie, U. Seydel, K. Triantafilou, Combinational clustering of receptors following stimulation by bacterial products determines lipopolysaccharide responses, *Biochem. J.*, (2004), 381, 527-536.

M. Mueller, B. Lindner, S. Kusumoto, K. Fukase, A. B. Schromm, U. Seydel, Aggregates are the biologically active units of Endotoxin, *J. Biol. Chem.* (2004), 279, 26307-26313.

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.

Nagai Y, Kobayashi T, Motoi Y, Ishiguro K, Akashi S, Saitoh S, Kusumoto Y, Kaisho T, Akira S, Matsumoto M, Takatsu K, Miyake K. The Radioprotective 105/MD-1 Complex Links Toll-like Receptor 2 (TLR2) and TLR4/MD-2 in Antibody Response to Microbial Membranes. *J. Immunol*. 174: 7043-7049. 2005.

Inamine A, Takahashi Y, Baba N, Miyake K, Tokuhisa T, Takemori T, Abe R. Two waves of memory B-cell generation in the primary immune response. *Int Immunol*. 17:581-589. 2005.

Nagaoka K, Takahara K, Tanaka K, Yoshida H, Steinman RM, Saitoh S, Akashi-Takamura S, Miyake K, Kang YS, Park CG, Inaba K. Association of SIGNR1 with TLR4-MD-2 enhances signal transduction by recognition of LPS in gram-negative bacteria. *Int Immunol*. 17:827-836. 2005.

U. Seydel, A. B. Schromm, L. Brade, S. Gronow, J. Andra, M. Muller, M. H. J. Koch, K. Fukase, M. Kataoka, M. Hashimoto, S. Kusumoto, K. Brandenburg, Physicochemical characterization of carboxymethyl lipid A derivatives in relation to biological activity, *FEBS J.*, 272, 327-340, (2005).

- H. Tokimoto, K. Fukase, New deprotection method of the 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl (Troc) group with $(\text{Bu}_3\text{Sn})_2$, *Tetrahedron Lett.*, 46 (40), 6831-6832 (2005).
- K. Fukase, M. Takashina, Y. Hori, D. Tanaka, K. Tanaka, S. Kusumoto, Oligosaccharide synthesis by affinity separation based on molecular recognition between podand ether and ammonium ion, *Synlett*, 2005 (15), 2342-2346.
- K. Tanaka, T. Goi, K. Fukase, Highly efficient sialylation towards $\alpha(2-3)$ - and $\alpha(2-6)$ -Neu5Ac-Gal synthesis: significant 'fixed dipole effect' of *N*-Phthalyl group on α -selectivity, *Synlett*, 2005 (19), 2958-2962.
- Y. Fujimoto, Y. Adachi, M. Akamatsu, Y. Fukase, M. Kataoka, Y. Suda, K. Fukase, S. Kusumoto, Synthesis of lipid A and its analogues for investigation of the structural basis for their bioactivity, *J. Endotoxin Res.*, 11 (6), 341-347 (2005).
- T. Goi, Y. Fujimoto, K. Fukase, Separation of S-form lipopolysaccharide with resins having branched tri-lysine, a putative phosphate recognition sequence, *Peptide Science* 2005, 433-436.
- Konno K, Wakabayashi Y, Akashi-Takamura S, Ishii T, Kobayashi M, Takahashi K, Kusumoto Y, Saitoh S, Yoshizawa Y, Miyake K. A molecule that is associated with Toll-like receptor 4 and regulates its cell surface expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 339:1076-1082. 2006.
- Akashi-Takamura S, Furuta T, Takahashi K, Tanimura N, Kusumoto Y, Kobayashi T, Saitoh SI, Adachi Y, Doi T, Miyake K. Agonistic Antibody to Toll-like receptor 4/MD-2 Protects Mice from Acute Lethal Hepatitis Induced by Tumor Necrosis Factor- α *J. Immunol.*, 176: 4244 – 4251, 2006.
- Kobayashi M, Saitoh S. -I, Tanimura N, Takahashi K, Kawasaki K, Nishijima M, Fujimoto Y, Fukase K, Akashi-Takamura S, Miyake K. Regulatory Roles for MD-2 and Toll-like receptor 4 (TLR4) in Ligand-induced Receptor Clustering. *J. Immunol.*, 176: 6211-6218, 2006
- Gorczynski RM, Kai Y, Miyake K. MD1 Expression Regulates Development of Regulatory T Cells. *J Immunol* 2006 177: 1078-1084.
- Wakabayashi Y, Kobayashi M, Akashi-Takamura S, Tanimura N, Konno K, Takahashi K, Ishii T, Mizutani T, Iba H, Kouro T, Takaki S, Takatsu K, Oda Y, Ishihama Y, Saitoh S -I, Miyake K. A Protein Associated with Toll-like Receptor 4 (PRAT4A) Regulates Cell Surface Expression of TLR4. *J. Immunol.*, 177: 1772-1779, 2006
- Youn HS, Saitoh SI, Miyake K, Hwang DH. Inhibition of homodimerization of Toll-like receptor 4 by curcumin. *Biochem Pharmacol.* 2006, 72:62-69
- Montminy SW, Khan N, McGrath S, Walkowicz MJ, Sharp F, Conlon JE, Fukase K, Kusumoto S, Sweet C, Miyake K, Akira S, Cotter RJ, Goguen JD, Lien E. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *Nat Immunol.* 2006, 7: 1066 - 1073
- Shuji Noguchi and Yoshinori Satow, Purification of Human b_2 -Adrenergic Receptor Expressed in Methyotrophic Yeast *Pichia pastoris*, *J. Biochem.*, in press.
- K. Ono, C. Nishitani, H. Mitsuzawa, T. Shimizu, H. Sano, H. Suzuki, T. Kodama, N. Fujii, K. Fukase, K. Hirata, Y. Kuroki, Mannose-Binding Lectin Augments the Uptake of Lipid A, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* by Kupffer Cells through Increased Cell Surface Expression of Scavenger Receptor A. *J. Immunol.* 177(8), 5517-5523 (2006).
- S. W. Montminy, N. Khan, S. McGrath, M. J. Walkowicz, F. Sharp, J. E. Conlon, K. Fukase, S.

Kusumoto, C. Sweet, K. Miyake, S. Akira, R. J. Cotter, J. D. Goguen, E. Lien, Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *Nature Immunol.* 7(10) 1066-1073 (2006).

M. Akamatsu, Y. Fujimoto, M. Kataoka, Y. Suda, S. Kusumoto, K. Fukase, Synthesis of lipid A monosaccharide analogues containing acidic amino acid: Exploring the structural basis for the endotoxic and antagonistic activities, *Bioorg. Med. Chem.*, 14, 6759-6777 (2006)

Y. Fujimoto, E. Kimura, S. Murata, S. Kusumoto, K. Fukase, Synthesis and bioactivity of fluorescence- and biotin-labeled lipid A analogues for investigation of recognition mechanism in innate immunity, *Tetrahedron Lett.*, 47 (4), 539-543 (2006)

M. Kobayashi, S. Saitoh, N. Tanimura, K. Takahashi, K. Kawasaki, M. Nishijima, Y. Fujimoto, K. Fukase, S. Akashi-Takamura, K. Miyake, Regulatory roles for MD-2 and TLR4 in ligand-induced receptor clustering, *J. Immunol.*, 176 (10), 6211-6218, (2006).

S. C. Gangloff, G. Ladam, V. Dupray, K. Fukase, K. Brandenburg, M. Guenounou, P. Schaaf, J.-C. Voegel, N. Jessel, Biologically active lipid A antagonist embedded in a multilayered polyelectrolyte architecture, *Biomaterials* 27, 1771-1777 (2006)

Y. Sugawara, A. Uehara, Y. Fujimoto, S. Kusumoto, K. Fukase, K. Shibata, S. Sugawara, T. Sasano, H. Takada, Toll-like receptors, NOD1 and NOD2, in oral epithelial cells, *J. Dent. Res.* 85 (6), 524-529, (2006).

(2)その他の著作物

Yasuhiro Anraku, Ryuta Mizutani, and Yoshinori Satow; Protein Splicing: Its Discovery and Structural Insight into Novel Chemical Mechanisms, *IUBMB Life* 57, 563-574, 2005.

K. Fukase, S.-Q. Zhang, Y. Fukase, N. Umesako, and S. Kusumoto
Synthesis based on affinity separation: a new methodology for high-throughput synthesis using affinity tags.

“ACS Symposium Series 892 New Discoveries in Agrochemicals” eds. by J. M. Clark and H. Ohkawa, Am. Chem. Soc., 2005, 87-98.

藤本ゆかり、隅田泰生、楠本正一、深瀬浩一
「受容体機能の制御を指向したリポド A の合成と生物活性」,
エンドトキシン研究 9
熊沢義雄 監修, 医学図書出版株式会社 (東京), 2006 出版予定

深瀬浩一「固相合成ならびに固相-液相のハイブリッド法による糖鎖の迅速合成」
糖鎖科学の新展開
谷口直之, 伊藤幸成監修, エヌ・ティー・エス刊行 (東京), (2005. 8. 19) p. 393-399

深瀬浩一「糖鎖の効率合成法の開発と免疫増強活性複合糖質の合成と機能研究」,
未来を拓く糖鎖科学
永井克孝監修, 金芳堂 (京都), (2005. 12. 15), p119-122.

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

- ① 招待講演 (国内会議 15 件、国際会議 25 件)

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、エンドトキシン認識における MD-2 の役割、第 21 回 International Society for Analytical Cytology、Convention Center San Diego, California, USA、2002/5/7、

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、Essential Role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution、第 9 回東アジア合同シンポジウム、Samsung Biomedical Research Institute, SungKyunKwan University 韓国、2002/7/12

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、Targeting of the MD-2 Gene Reveals an Essential Role in LPS Responsiveness and Suggests a Contribution to Intracellular Distribution of Toll-Like Receptor 4、The 7th Biennial Conference of the International Endotoxin Society、Washington, D.C.,USA、2002/7/19

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、Roles of TLR4-MD-2 and RP105-MD-1 in lipopolysaccharide Responsiveness in vivo、第 2 回あわじしま 感染症・免疫フォーラム、兵庫県立淡路夢舞台国際会議場、2002/8/27

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、Toll-like Receptors and Innate Immunity、6th FIMSA Advanced Course and Conference、Krungsri River Hotel Ayutthaya, Thailand、2002/10/21

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、Activation of Host Response to Infection、6th FIMSA Advanced Course and Conference、Krungsri River Hotel Ayutthaya, Thailand、2002/10/24

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、Essential role for MD-2 in lipopolysaccharide responsiveness and Toll-like receptor 4 distribution、第 32 回日本免疫学会総会・学術集会、京王プラザホテル（東京）、2002/12/4

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、エンドトキシン認識、応答における MD-2 の役割、第 25 回日本分子生物学年会「自然免疫による異物認識の分子基盤」、パシフィコ横浜、2002/12/14

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、Roles for MD-2 in Lipopolysaccharide Responses、Keystone Symposia 「Linking Innate with Adaptive Immune Responses (J4)」 Joint Symposium 「Regulatory and Effector Functions of Macrophages」、Taos Convention Center, New Mexico, USA、2003/1/31

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、エンドトキシン認識における Toll-like receptor4-MD-2 の役割、第 15 回日本アレルギー学会春季臨床大会、2003/5/13

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、Roles for MD-2 in Lipopolysaccharide Responses、EMBOworkshop "Pattern Recognition Proteins and Receptors"、チェコ、2003/5/15

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、ヒト自然免疫 (Toll-like receptor)：異物識別とシグナル分配の分子機構、Innate Recognition of Lipopolysaccharide by TOLL-LIKE RECEPTOR4 (TLR4)-MD-2、第 76 回日本生化学会大会 2003

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、Innate Microbial Recognition by Toll-like Receptors and Its Manipulation by Monoclonal Antibody、Japan-China Joint Seminar on Infectious Diseases、東京大学医科学研究所、2004/11/9

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、Innate immune recognition

of LPS by TLR4/MD-2、The 8th Conference of the International Endotoxin Society、国立京都国際会館、2004/11/16

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、Innate immune recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4/MD-2 and its manipulation by an antibody for therapeutic intervention in endotoxin shock、第 34 回日本免疫学会総会・学術集会、ロイトン札幌・北海道厚生年金会館ウエルシティ札幌、2004/12/1

K. Fukase, Y. Fujimoto, and S. Kusumoto (Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, JST CREST)
Synthesis of bacterial glycoconjugates for elucidation of their immunostimulation、The 14th International Symposium on Fine Chemistry and Functional Polymer、 Hohhot, Inner Mongolia, P. R. China、2004.8.17

深瀬浩一（大阪大学大学院理学研究科,JST CREST）
-有機合成でせまる生体反応の分子基盤-自然免疫に関わる細菌複合糖質の合成とその活性発現機構の解明、鹿児島大学ベンチャーラボラトリーセミナー、2004.9.27

K. Fukase (Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, JST CREST), Synthetic and biological studies of bacterial glycoconjugates, key stimulators of innate immunity、Glycobiology 2004 Satellite Symposium I: From Chemistry to Systems Honolulu, Hawaii（日米糖質化学合同会議サテライトシンポジウム）、2004.11.17

三宅 健介（東京大学医科学研究所感染遺伝学分野、JST CREST）、Toll-like receptor とその制御、第 17 回日本アレルギー学会春季臨床大会、ホテルグランヴィア岡山・ラヴィール岡山、2005. 6. 3

三宅 健介（東京大学医科学研究所感染遺伝学分野、JST CREST）、Regulatory Roles for MD-2 in Lipopolysaccharide Recognition、第 78 回日本生化学会大会、神戸国際会議場・神戸国際展示場ポートピアホテル、2005. 10. 19

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、Innate immune recognition of microbial products by Toll-like receptors 、2005 CAS-JSPS アジア学術セミナー、Tianjin China、2005/12/23

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、MOLECULAR MECHANISM FOR INNATE RECOGNITION OF MICROBIAL PRODUCTS BY TOLL-LIKE RECEPTORS、上原記念シンポジウム、京王プラザホテル、2005/7

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、Regulatory Roles for MD-2 in Lipopolysaccharide Recognition、山田シンポジウム、淡路夢舞台国際会議場、2005/9/13

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、Innate Microbial Recognition by Toll-like Receptors Innate Microbial Recognition by Toll-like Receptors、UT forum、China、2005/4/29

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、Regulatory Roles for MD-2 in Lipopolysaccharide Recognition、日本生化学会国際シンポジウム、神戸国際会議場、2005/10/19

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、Innate Immune Recognition of Microbial Products by Toll-like Receptors、第 11 回大正富山国際シンポジウム、下田セントラルホテル、2005/4/22

K. Fukase (Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, JST CREST), Key Substances of Innate Immunity、The 2nd Workshop of Netherlands - Japan on Recent

Advances in Glycobiology, Utrecht, The Netherlands Synthetic and Biological Studies of Bacterial Glycoconjugates, 、2005.4.17-21

深瀬浩一(大阪大学大学院理学研究科,JST CREST)
糖鎖の化学合成と化学生物学、免疫増強複合糖質の機能研究を中心に、
疾患グライコプロテオミクスセミナー 大阪、2005.5.15

K. Fukase(Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University,JST CREST),Oligosaccharide Synthesis by Using Solid-Phase Method and Affinity Separation Method.Parallel Synthesis Approaches for Drug Discovery and Catalysis
Southampton, UK、2005.7.22

Y. Fujimoto(Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University,JST CREST),Synthetic Library Approach in Innate Immunity; Elucidation of Immunostimulating Mechanism of Bacterial Glycoconjugates. 、Parallel Synthesis Approaches for Drug Discovery and Catalysis Southampton, UK、2005.7.22

深瀬浩一(大阪大学大学院理学研究科,JST CREST)
糖鎖合成と糖鎖のケミカルバイオロジー：免疫増強複合糖質における展開、
第17回生体機能関連化学若手の会サマースクール 広島、2005.8.26-27

K. Fukase(Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University,JST CREST),Chemistry of Key Molecules in Innate Immunity.、The 2nd Yamada Symposium
Awaji, Japan、2005.9.10-14

K. Fukase(Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University,JST CREST),Chemistry and chemical biology of bacterial glycoconjugates, key molecules in innate immunity.、3rd Japan-Korea Young Scientists Meeting on Bioorganic and Natural Products
Chemistry Nishinomiya, Japan、Nishinomiya, Japan、2005.9.24-26

深瀬浩一(大阪大学大学院理学研究科,JST CREST)
生物機能解明を目指した複合糖質の合成研究、第3回糖質科学コンソーシアムシンポジウム 東京、2005.12.6-7

三宅健介(東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST)、Roles for Accessory Molecules in Lipopolysaccharide Recognition by Toll-like Receptor 4、
RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2006、HAMAGIN HALL
VIAMAREYokohama、2006/6/16

三宅健介(東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST)、Roles for Accessory Molecules in Lipopolysaccharide Recognition by Toll-like Receptor 4、第6回あわじしま感染症免疫フォーラム、淡路夢舞台国際会議場、2006/9/6

佐藤 能雅(東大院薬,JST CREST)、メタノール資化酵母による糖(膜)蛋白質の発現と精製・機能解析、第6回日本蛋白質科学会、京都、2006/4/25

深瀬浩一(大阪大学大学院理学研究科,JST CREST)
糖鎖合成と糖鎖のケミカルバイオロジー：免疫増強活性糖質の機能研究を中心に、日本農芸化学会2006年度大会 京都、2006.3.25-28

藤本ゆかり(大阪大学大学院理学研究科,JST CREST)
複合糖質ライブラリーを用いた自然免疫受容体の機能の解析と制御、第3回コンビナトリアル・バイオエンジニアリング会議 大阪、2006.11.10

K. Fukase(Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, JST CREST), Innate Immunity: Receptors, Regulation, and Response (Joint meeting of the Society for Leukocyte Biology and the International Endotoxin and Innate Immunity Society)
San Antonio, USA Synthesis of Peptidoglycan Fragments for Elucidation of Structural Requirements Allowing Detection by Pattern Recognition Receptors、2006.11.9-11

② 口頭発表 (国内会議 40 件、国際会議 11 件)

三宅健介(東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野, JST CREST)、エンドトキシン認識における TLR4/MD-2、RP105/MD-1 の役割、分子標的薬剤開発センターセミナー、金沢大学・がん研究所、2002/6/21

三宅健介(東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野, JST CREST)、個体レベルでの L P S 応答における MD-2 の役割、平成 14 年度第一回班会議 「高次複雑系免疫システムの情報伝達制御」-自然免疫・樹状細胞-、大阪大学銀杏会館 阪急電鉄・三和銀行ホール、2002/7/9

三宅健介(東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野, JST CREST)、自然免疫病原体認識機構、日本免疫学会 免疫サマースクール 2002、兵庫県立淡路夢舞台国際会議場、2002/7/23

三宅健介(東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野, JST CREST)、自然免疫機構における細菌由来リポ多糖 (LPS) 認識分子複合体の解明、第 3 回研究課題会議 科学技術振興調整費 「免疫システムの構築・作動の分子機構とその制御技術の開発」[(2) 粘膜免疫、自然免疫の分子機構と制御のための基盤技術の開発]、東京大学医科学研究所、2002/8/6

三宅健介(東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野, JST CREST)、自然免疫病原体認識機構、ハエからヒトまで、平成 14 年度新潟大学大学院医歯学総合研究科 大学院セミナー ー免疫学・遺伝子学・歯周病学ー、新潟大学大学院、2002/9/20

三宅健介(東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野, JST CREST)、エンドトキシン認識における Toll-like receptor 4-MD-2 及び Radioprotective 105-MD-1 の役割、第 4 回 GGA-HSP 勉強会、東京国際フォーラム、2002/10/19

三宅健介(東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野, JST CREST)、自然免疫病原体認識機構～ハエからヒトまで～、第 7 回香川アレルギー研究会、香川県社会福祉総合センター、2002/11/18

三宅健介(東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野, JST CREST)、エンドトキシン認識複合体、CD14、MD-2、Toll-like receptor 4 (TLR4)、第 85 回日本細菌学会関東支部総会、東京大学医科学研究所、2002/11/21

三宅健介(東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野, JST CREST)、Toll-like receptor(TLR4)によるエンドトキシン認識における MD-2 の役割、第 8 回日本エンドトキシン研究会「自然免疫の基礎から臨床まで」、大阪大学銀杏会館、2002/11/30

三宅健介(東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野, JST CREST)、自然免疫病原体認識機構、ハエからヒトまで、第 6 回岡山外科生体反応研究会、ホテルグランヴィア岡山、2003/1/10

長井良憲(東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野, JST CREST)、MD-2 は L P S の認識・応答に必須の分子である、特定領域研究「感染の成立と宿主応答の分子基盤」感染症若手

研究者沖縄フォーラム「感染と発症の分子機構」、沖縄コンベンションセンター、2003/1/22

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、Roles for MD-2 in Lipopolysaccharide Responses、Keystone Symposia 「Linking Innate with Adaptive Immune Responses (J4)」 Joint Symposium 「Regulatory and Effector Functions of Macrophages」、Taos Convention Center, New Mexico, USA、2003/1/31

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、自然免疫病原体認識機構、ハエからヒトまで、第3回神経・筋の免疫疾患を考える会、梅田スカイビル、2003/2/22

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、自然免疫病原体認識機構、エンドトキシンを中心に、第91回北海道大学分子医学セミナー、2003/2/25

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、シグナル伝達、自然免疫自然免疫病原体認識機構、ハエからヒトまで、財) 神奈川科学技術アカデミー教育講座 シグナル伝達とゲノム医学の最先端と医薬品への応用、東京大学医科学研究所、2003/2/28

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、Innate endotoxin recognition by CD14,MD-2,and Toll-like receptor4:Unique roles for MD-2、東京大学医科学研究所／九州大学生体防御医学研究所 合同シンポジウムゲノムから個体へー、九州大学生体防御医学研究所、2003/3/7

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、自然免疫におけるエンドトキシンの認識、第76回日本細菌学会総会、2003/4/3

小杉厚（大阪大学医学部保健学科,JST CREST）、Dynamic changes in the mobility of LAT in aggregated lipid rafts upon T cell activation、Immunology 2003 (AAI's 90th Anniversary Annual Meeting)、2003/5/9

齋藤伸一郎（大阪大学医学部保健学科,JST CREST）、The role of LAT tyrosine residues in mast cell function、Immunology 2003 (AAI's 90th Anniversary Annual Meeting)、2003/5/9

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、エンドトキシン認識機構、第1回健康と環境の国際シンポジウム-キノコと免疫-、2003/5/29

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、自然免疫病原体認識機構、第30回医科学研究所創立記念シンポジウム「病原菌の発見からゲノム医学へ」-北里柴三郎誕生150年記念-、2003/5/30

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、INNATE RECOGNITION OF LIPOPOLYSACCHARIDE BY TOLL-LIKE RECEPTOR4 (TLR4)-MD-2、第16回内藤コンファレンス 自然免疫の医学・生物学 [I]、2003/10/29

赤司祥子（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、LPS 認識機構の解明、第16回内藤コンファレンス 自然免疫の医学・生物学 [I]、2003/10/29

齋藤伸一郎（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、TOLL-LIKE RECEPTOR(TLR4)OLIGOMER FORMATION UPON LPS STIMULATION:LIPID IVA ANTAGONIST MECHANISM BY COMPETITIVE INHIBITION OF TLR4

OLIGOMERIZATION、第 16 回内藤コンファレンス 自然免疫の医学・生物学〔I〕、
2003/10/29

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、Toll like receptor 自然免疫の分子機構、2003 合同学術集会 基礎と臨床の調和と融合 ～新世紀の感染症学・化学療法学の確立を目指して～ワークショップ：キーワードからみた感染症・微生物学の進歩、2003/10/30

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、自然免疫病原体認識機構 第 44 回日本呼吸器学会学術講演会 シンポジウム-自然免疫と肺-
東京国際フォーラム、2004/4/2

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、自然免疫と Toll-like receptor、第 48 回日本リウマチ学会総会・学術集会、岡山コンベンションセンター・ホテルグランヴィア岡山、2004/4/17

三宅健介（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、エンドトキシン認識機構の解明、自然免疫 ―難治疾患の克服に向けた分子戦略― I. 自然免疫系受容体の機能とシグナル、下田セントラルホテル、2004/6/13

赤司祥子（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、抗 TLR4/MD-2 モノクローナル抗体を用いたマウス肝細胞アポトーシス抑制の分子機構の解析、第 13 回内毒素・LPS 研究会、東京大学医科学研究所、2004/6/26

赤司祥子（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、The inhibitory mechanism of anti-TLR4/MD-2 mAb in LPS and D-galactosamine-mediated Hepatocellular apoptosis、1st International Meeting 「Innate Immunity at Mucosal Surface」 The 3rd Stage Surface Barrier Immunology Study Group、都ホテル東京、2004/7/9

高村（赤司）祥子（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、TLR4/MD-2 を介するマウス肝細胞アポトーシス制御機構の解析、第 34 回日本免疫学会総会・学術集会 ロイトン札幌、北海道厚生年金会館ウェルシティ札幌、2004/12/1

若林 靖貴（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、TLR4 に会合する分子の検索、第 34 回日本免疫学会総会・学術集会、ロイトン札幌、北海道厚生年金会館ウェルシティ札幌、2004/12/1

小林 俊彦（東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST）、RP105 は TLR2・TLR4 リガンドに対する抗体産生を制御する、第 34 回日本免疫学会総会・学術集会、ロイトン札幌、北海道厚生年金会館ウェルシティ札幌、2004/12/1

Y. Fujimoto, M. Akamatsu, Y. Adachi, Y. Fukase, M. Kataoka, Y. Suda, K. Fukase, S. Kusumoto、(Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University,JST CREST) Synthesis of lipid A and its novel analogues for investigation of the structural and conformational bases for their bioactivity、8th Conference of the International Endotoxin Society,Kyoto, Japan、2004.11.16

Sachiko Akashi-Takamura, Natsuko Tanimura, Shin-ichiroh Saioh, Kohuchiroh Takahashi, and Kensuke Miyake (University of Tokyo,JST CREST) Anti-Toll Like Receptor 4 Antibody Protects Mice from Acute Lethal Hepatitis Induced by Tumor Necrosis Factor-alpha、Keynote Symposia Dendritic Cells at the Center of Innate and Adaptive Immunity: Eradication of Pathogens and Cancer and Control of Immunopathology (B2) Workshop 7: Dendritic Cells In Infectious Diseases Fairmont Hotel Vancouver Vancouver, British Columbia Canada,2005/2/6

高村 祥子 (東京大学医科学研究所感染遺伝学分野、JST CREST)、Toll-like receptor を介する病原体認識機構、第 13 回バイオフィジオロジー研究会、2005.2.26

三宅 健介 (東京大学医科学研究所感染遺伝学分野、JST CREST)、TLR4/MD-2 によるエンドトキシン認識機構、第 12 回小児気道アレルギー研究会、名古屋マリオットアソシアホテル、2005. 4. 10

三宅 健介 (東京大学医科学研究所感染遺伝学分野、JST CREST)、自然免疫における病原体認識機構、第 11 回岡山癌分子生物学セミナー、岡山大学医歯学薬学総合研究科、2005. 6. 15

大戸 梅治, 水谷 隆太, 佐藤 能雅 (東京大学大学院薬学系研究科,JST CREST)
エンドトキシンを認識するヒト MD-2 蛋白質の大量発現と性状解析
日本薬学会第 125 年会, 大阪、2005/3/29

Umeharu Ohto, Ryuta Mizutani, and Yoshinori Satow (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo)、Expression, purification, and characterization of human MD-2 protein recognizing lipopolysaccharide、第 78 回日本生化学会、神戸、2005/10/19

堀裕美子¹、高階 理¹、田中克典¹、楠本正一^{2,3}、深瀬浩一¹(¹阪大院理 JST CREST、²サントリー生有研、³福井工大環境生命未来工学)、アフィニティー分離を用いた効率的糖鎖合成: 新規ポダント型エーテルタグの開発、第 25 回日本糖質学会、大津、2005.7.20-22

藤本ゆかり¹、楠本正一²、深瀬浩一¹ (¹阪大院理 JST CREST、²サントリー生有研)、受容体機能の制御を指向した lipid A 類縁体の合成、第 11 回 日本エンドトキシン研究会、東京、2005. 11. 25-26

岩田昌門、今北紀子、隅田泰生、藤本ゆかり、楠本正一、深瀬浩一(大阪大学大学院理学研究科,JST CREST)、ヘリコバクターピロリ菌リポ多糖部分構造の合成と生物活性、日本化学会第 85 春季年会 (2005)、神奈川大学、2005.3.26-29

藤本ゆかり、楠本正一、深瀬浩一(大阪大学大学院理学研究科,JST CREST)、受容体機能の制御を指向した lipid A 類縁体の合成、第 11 回 日本エンドトキシン研究会、東京、2005.11.25-26

Akashi-Takamura Sachiko (University of Tokyo,JST CREST) ,A Protein Associated with Toll-like Receptor4(PRAT4A)Regulates Cell Surface Expression of TLR4 ,International Endotoxin&Innate Immunity Society,USA,2006.11.11

赤松雅夫、住野裕子、藤本ゆかり、楠本正一、深瀬浩一(大阪大学大学院理学研究科,JST CREST)、免疫増強活性複合糖質リポド A の活性配座解明を目指した合成研究-配座固定類縁体によるアプローチ、日本化学会第 86 春季年会、船橋、2006.3.27-30

赤松雅夫、住野裕子、藤本ゆかり、楠本正一、深瀬浩一(大阪大学大学院理学研究科,JST CREST)、免疫増強活性複合糖質リポド A の活性配座解明を目指した合成研究-配座固定類縁体によるアプローチ、第 7 回関西グライコサイエンスフォーラム、大阪、2006.5.13

Y. Fujimoto, M. Iwata, N. Imakita, A. Shimoyama, Y. Suda, S. Kusumoto and Fukase (Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University,JST CREST)、Synthesis of *Helicobacter pylori* and *Yersinia pestis* Lipopolysaccharide (LPS) Partial Structures, Which

Regulate the Host's Innate Immune Activation、XXIIIrd International Carbohydrate Symposium (ICS2006)Whistler, Canada、2006.7.23-28

藤本ゆかり、岩田昌門、今北紀子、下山敦史、吉崎弘明、吉留敬太郎、隅田泰生、楠本正一、深瀬浩一(大阪大学大学院理学研究科,JST CREST)、ピロリ菌およびペスト菌リポ多糖部分構造の合成と自然免疫活性化の制御、第26回日本糖質学会年会(仙台)、2006.8.23-25

K. Fukase(Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, JST CREST)、Synthetic Study of Biofunctional Molecules by Using Microfluidic System、The forth Spanish-Portuguese-Japanese Organic Chemistry Symposium (4SPJ-OCS), Santiago de Compostela, Spain、2006.9.8-11

Y. Fujimoto, M. Iwata, N. Imakita, A. Shimoyama, H. Yoshizaki, Y. Suda, S. Kusumoto K. Fukase(Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, JST CREST)、Synthesis of *Helicobacter pylori* and *Yersinia pestis* Lipopolysaccharide (LPS) Partial Structures, Which Regulate the Host's Innate Immune Activation、The 10th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC10), Kyoto, Japan、2006.11.13-17

③ ポスター発表 (国内会議 15 件、国際会議 18 件)

小林 真紀子(東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST)、MD-2 点変異体を用いたリポ多糖認識およびシグナル伝達における MD-2 の機能解析、第34回日本免疫学会総会・学術集会、ロイトン札幌・北海道厚生年金会館ウエルシティ札幌、2004/12/1

高橋 浩一郎(東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST)、Toll-like receptor2(TLR2)および TLR4 によるリン脂質認識機構の解析、第34回日本免疫学会総会・学術集会、ロイトン札幌、北海道厚生年金会館ウエルシティ札幌、2004/12/1

斉藤 伸一郎(東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST)、LPS 刺激後に起こる TLR4 の多量体形成とエンドサイトーシス、第34回日本免疫学会総会・学術集会、ロイトン札幌、北海道厚生年金会館ウエルシティ札幌、2004/12/1

谷村 奈津子(大阪大学・院医、日本学術振興会、東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野,JST CREST)、T 細胞活性化における LAT の細胞外領域の機能についての検討、第34回日本免疫学会総会・学術集会、ロイトン札幌、北海道厚生年金会館ウエルシティ札幌、2004/12/3

大戸 梅治、水谷 隆太、佐藤 能雅、リポ多糖を認識する蛋白質マウス MD-2 の大量発現系の構築、日本薬学会第124年会、大阪、2004/3/29

Umeharu Ohto, Ryuta Mizutani, and Yoshinori Satow (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo)、“Expression and purification of mouse MD-2 protein recognizing bacterial lipopolysaccharide”、Pharmaceutical sciences world congress 2004, Kyoto、京都、2004/6/1

Noguchi Shuji, Nobuo N. Suzuki, and Yoshinori Satow、Expression of Human β_2 -Adrenergic Receptor with the Sequence of Optimized Codon-Usage in *Pichia pastoris*、Pharmaceutical sciences world congress 2004, Kyoto、京都、2004/6/1

藤本ゆかり、木村英司、村田修一、深瀬浩一、楠本正一、斉藤伸一郎、赤司祥子、三宅健介、標識化 lipid A の合成と受容体との相互作用研究、第46回天然物有機化合物討論会 広島、2004.10.6-8

足立 庸・深瀬嘉之・藤本 ゆかり・隅田泰生・深瀬浩一・楠本正一、紅色光合成細菌リ
ピドAの全合成と生物活性、第39回天然物化学談話会 淡路島、2004.7.22

M. Akamatsu, M. Kataoka, Y. Fujimoto, Y. Suda, K. Fukase, and S. Kusumoto, Synthesis and
biological activity of lipid A analogues containing N-acyl amino acids、22nd International
Carbohydrate Symposium (ICS22)
Glasgow, UK、2004.7.25

足立 庸、深瀬嘉之、藤本ゆかり、隅田泰生、深瀬浩一、楠本正一、紅色光合成細菌リ
ピドAの全合成と生物活性、第31回有機反応懇談会、京都大学、2004.7.31

M. Akamatsu, M. Kataoka, Y. Fujimoto, K. Fukase, Y. Suda, S. Kusumoto、
Synthesis and biological activity of N-acyl amino acid substituted lipid A、
15th International Conference on Organic Synthesis Nagoya, Japan、2004.8.5

藤本ゆかり、木村英司、村田修一、深瀬浩一、楠本正一、斉藤伸一郎、赤司祥子、三宅健
介、標識化 lipid A の合成と受容体との相互作用研究、第46回天然物有機化合物討論会
広島、2004.10.7

K. Fukase, E. Kimura, S. Murata, Y. Fujimoto, and S. Kusumoto、Synthesis of labeled lipid A for
biofunctional analysis、8th Conference of the International Endotoxin Society
Kyoto, Japan、2004.11.16

M. Akamatsu, M. Kataoka, Y. Fujimoto, Y. Suda, K. Fukase, and S. Kusumoto、Synthesis and
biological activities of lipid A mimics possessing acidic amino acid、Glycobiology 2004 - Joint
Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research (日米糖
質化学合同会議) Honolulu, Hawaii、2004.11.20

H. Tokimoto, and K. Fukase、New method for deprotection of 2,2,2-Trichloroethoxycarbonyl (Troc)
group by using radical reaction、Glycobiology 2004 - Joint Meeting of the Society for Glycobiology
and the Japanese Society of Carbohydrate Research (日米糖質化学合同会議) Honolulu, Hawaii、
2004.11.20

M. Iwata, N. Imakita, Y. Suda, Y. Fujimoto, K. Fukase, and S. Kusumoto、Synthesis and biological
activity of helicobacter pylori lipopolysaccharide partial structures containing
2-keto-3-deoxy-D-manno-octonic acid (Kdo)、Glycobiology 2004 - Joint Meeting of the Society for
Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research (日米糖質化学合同会議)
Honolulu, Hawaii、2004.11.20

M. Takashina, Y. Hori, S. Kusumoto, and K. Fukase、Synthesis based on affinity separation using
interaction between podand type tag and ammonium ion: application to oligosaccharide synthesis、
Glycobiology 2004 - Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of
Carbohydrate Research (日米糖質化学合同会議) Honolulu, Hawaii、2004.11.20

T. Goi, S. Kusumoto, and K. Fukase、New separation method for (R)- and (S)-form of
lipopolysaccharide、Glycobiology 2004 - Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the
Japanese Society of Carbohydrate Research (日米糖質化学合同会議) Honolulu, Hawaii、
2004.11.20

大戸 梅治、水谷 隆太、佐藤 能雅、エンドトキシンを認識するヒト MD-2 蛋白質の大量発現
と性状解析、日本薬学会第125年会、大阪、2005/3/29

Umeharu Ohto, Ryuta Mizutani, and Yoshinori Satow (Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
University of Tokyo、JST CREST)、Expression, purification, and characterization of human MD-2

protein recognizing lipopolysaccharide、第 78 回日本生化学会、神戸、2005.10.19

堀裕美子、高階 理、田中克典、楠本正一、深瀬浩一、アフィニティー分離を用いた効率的糖鎖合成:新規ポダンド型エーテルタグの開発、第 25 回日本糖質学会、大津、2005.7.20-22

藤本ゆかり、岩田昌門、今北紀子、吉留敬太郎、楠本正一、隅田泰生、深瀬浩一、ヘリコバクター・ピロリ菌リポ多糖部分構造の合成と生物活性、第 47 回天然有機化合物討論会、徳島、2005.10.7-9

T. Goi, Y. Fujimoto, K. Fukase、Separation of S-form lipopolysaccharide with resins having branched tri-lysine, a putative phosphate recognition sequence.、第 42 回ペプチド討論会、大阪、2005.10.27-29

Y. Fujimoto, M. Iwata, N. Imakita, Y. Suda, S. Kusumoto, K. Fukase、Synthesis and biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide partial structures containing 2-keto-3-deoxy-D-mannono-octonic acid (Kdo)、Pacifichem 2005、Honolulu, USA、2005.12.15-20

S. Murata, Y. Fujimoto, S. Kusumoto, K. Fukase、Synthesis of fluorescence labeled lipid A for investigation of the recognition mechanism in innate immune system、Pacifichem 2005、Honolulu, USA、2005.12.15-20

Y. Hori, M. Takashina, S. Kusumoto, K. Fukase、Synthesis of oligosaccharides by using affinity separation、Pacifichem 2005、Honolulu, USA、2005.12.15-20

Saitho Shin-ichiroh (University of Tokyo, JST CREST) ,Regulatory role of CD14 in Ligand-Induced Receptor re-localization, International Endotoxin & Innate Immunity Society, USA, 2006.11.10

Takahashi Koichiro (University of Tokyo, JST CREST) , PRAT4 regulates cell surface expression of TLR1, International Endotoxin & Innate Immunity Society, USA, 2006.11.10

Kobayashi Toshihiko (University of Tokyo, JST CREST) , Innate immune receptors on B cell regulate the immunoglobulin gamma3 transcription, International Endotoxin & Innate Immunity Society, USA, 2006.11.10

K. Fukase, Y. Fujimoto, A. Shimoyama, Y. Suda, S. Kusumoto、Synthetic and Biological Studies of Lipopolysaccharide a Major Stimulator of Innate Immunity.、The Second International Symposium on Biomolecular Chemistry、Kobe, Japan、2006.8.5-9

Y. Fujimoto, S. Inamura, A. Kawasaki, A. Shimoyama, Z. Shiokawa, G. Nuñez, N. Inohara, S. Kusumoto, K. Fukase、Synthesis of Immunostimulating Bacterial Components and Investigation of the Innate Immune receptors、2006.10.16-20

大戸梅治、水谷隆太、佐藤能雅 (東大院薬、JST CREST)、ヒト MD-2 蛋白質の発現、精製と結晶化、日本薬学会第 126 年会、仙台、2006.3.28

(4)特許出願

①国内出願 (2件)

1. 発明の名称: MD-2 遺伝子改変マウスの作製

発 明 者: 三宅 健介

出 願 人: 科学技術振興事業団

出 願 日: 2002 年 5 月 2 日

出 願 番 号 : 特 願 2 0 0 2 - 1 3 0 9 6 4

2. 発明の名称 : TLR4-MD-2 複合体を標的とするエンドトキシン
ショック治療剤

発 明 者 : 三宅健介、赤司祥子

出 願 人 : 科学技術振興機構

出 願 日 : 2 0 0 3 年 1 1 月 1 7 日

出 願 番 号 : 特 願 2 0 0 3 - 3 8 7 1 7 3

その他 0 件

②海外出願 (1 件)

1. 発明の名称 : TLR4-MD-2 複合体を標的とするエンドトキシン
ショック治療剤

発 明 者 : 三宅健介、赤司祥子

出 願 人 : 科学技術振興機構

出 願 日 : 2 0 0 4 年 9 月 2 8 日

出 願 番 号 : PCT / JP04 / 14194

その他 0 件

(5)受賞等

①受賞

特になし

②新聞報道

特になし

③その他

特になし

(6)その他特記事項

特になし

7 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

特になし

8 結び

LPS のレセプターが TLR4/MD-2 であるということが、わかってから、その認識機構の解明、最終的に構造学的な解明にいたるまでを目標とした。生化学的な解析については、レセプターとの結合、その後の TLR4 同士の oligomerization を示し、この両方のステップに MD-2 が関与していることを MD-2 ミュータントを使って示すことができた。展開は少し地味ではあったが、TLR の認識機構の解析は今後の感染免疫学において、大変重要な結果であったと信じている。最終的な締めくくりとして、MD-2・Lipid A 複合体の構造学的な解明を待つばかりであるが、それも佐藤グループ、深瀬グループの貢献で、ゴールに近いことを確信している。今後は TLR 一つ一つについて蓄積したこれまでの結果を如何にして、細胞レベル、個体レベルでの病原体と宿主との相互作用の理解につなげていくかという点が重要となる。樹状細胞やマクロファージは複数の TLR を発現し、複数の TLR リガンドを発現する病原体を認識する。したがって、

複数の TLR がほぼ同時に認識し、シグナルを伝達することになる。したがって、TLR を全体として制御する機構の理解が今後重要となる。この点においては、我々は今後の方向性として、TLR の細胞内局在の重要性の理解が鍵となると考えており、研究期間内にクローニングした。PRAT4A, PRAT4B の機能解析を続ける予定である。

東京大学医科学研究所へ移ってきて、最初の 5 年間で CREST でサポートしていただいたことは、大変幸運なことであり、領域代表者の岸本先生、山西先生を始め、アドバイザーの先生方に深く感謝する次第である。この期間にいただいた、ご指導ご鞭撻を糧に、更なる発展を期してがんばりたい。

