

博士論文

ニワトリにおける異物認識/シグナル伝達レセプター
Toll-like receptor (TLR) の単離と機能解析

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科
原核生物分子遺伝学講座

福井 理

目次

	頁
略語表	i
序章	1
第1章 ニワトリ TLR のクローニング	5
1-1. 実験材料および試薬	6
1-2. 実験方法	8
1-3. 実験結果	12
1-3-1. ニワトリ TLR cDNA のクローニング	
1-3-2. ニワトリ TLR の一次構造	
1-3-3. ニワトリ TLR の組織分布	
1-3-4. <i>N</i> -結合型糖鎖量の検討	
1-4. 考察	24
第2章 ニワトリ TLR の機能解析	26
2-1. 実験材料および試薬	27
2-2. 実験方法	29
2-3. 実験結果	32
2-3-1. ニワトリ TLR の異物認識/シグナル伝達分子としての機能	
2-3-2. ニワトリ TLR を介したシグナル伝達におけるヒト CD14 依存性	
2-3-3. 異物におけるニワトリ TLR の認識部位	
2-3-4. ニワトリ TLR が認識する細菌および細菌成分の検討	
2-4. 考察	49
終章	52
謝辞	54
参考文献	I

略語表

bp	: base pair
BPB	: bromophenol blue
BSA	: bovine serum albumin
CD	: cluster of differentiation
cDNA	: complementary DNA
cpm	: counts per minute
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
D-PBS	: Dulbecco phosphate buffered saline
EDTA	: ethylenediaminetetraacetate
FACS	: fluorescence activated cell sorter
FCS	: fetal calf serum
FITC	: fluorescein isothiocyanate
GAPDH	: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GPI	: glycosylphosphatidylinositol
HEK	: human embryonic kidney
IgG	: immunoglobulin G
LPS	: lipopolysaccharide
LRR	: Leucine rich repeat
LTA	: lipoteichoic acid
mAb	: monoclonal antibody
MALP-2	: macrophage-activating lipopeptide-2
MHC	: major histocompatibility complex
MOPS	: 3-(<i>N</i> -morpholino) propanesulfonic acid
mRNA	: messenger RNA
n.d.	: not determined
NP-40	: Nonidet P-40
ORF	: open reading frame
PAGE	: polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	: polymerase chain reaction
PGN	: peptidoglycan
PMSF	: phenylmethylsulfonyl fluoride
poly Ab	: polyclonal antibody
PVDF	: polyvinylidene difluoride
RACE	: rapid amplification of cDNA ends
RT	: reverse transcriptase
SDS	: sodium dodecyl sulfate

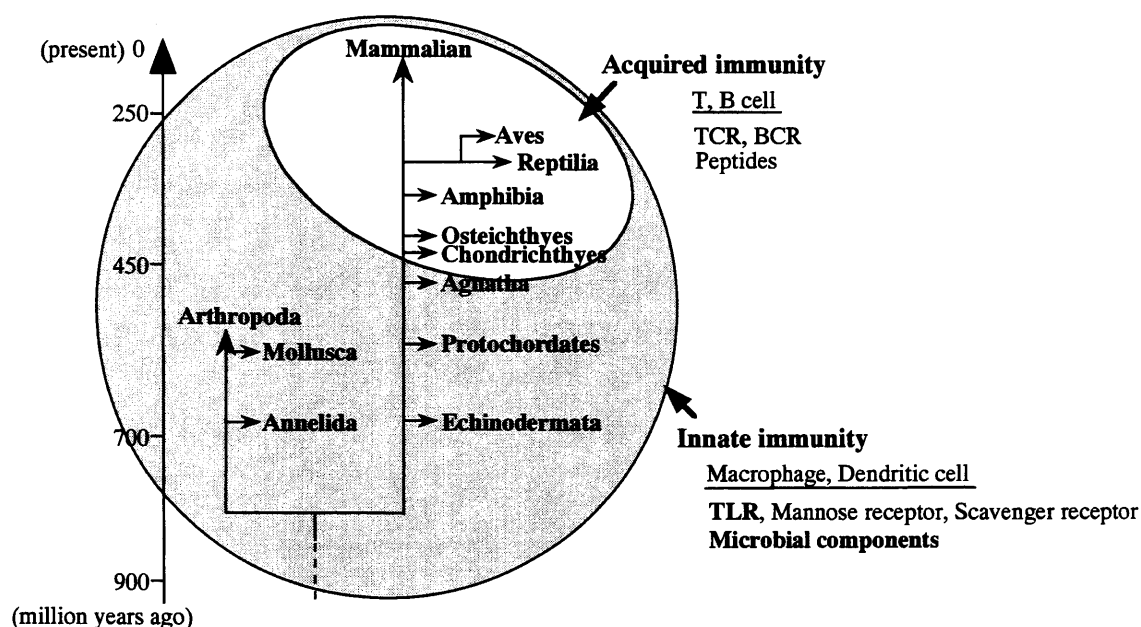
SSC : standard saline citrate
TBS : Tris buffer saline
TIR : Toll/IL-1 receptor homology
TLR : Toll-like receptor
Tris : tris (hydroxymethyl) aminomethane
UV : ultra violet

序章

生物は、微生物などの外来異物が体内に侵入すると、これを排除し、微生物感染から生体を防御しようとする。また、体細胞変異などで生じてしまった異常な細胞を排除し、個体の同一性を保持しようとする。このように、自己非自己の識別・排除は、生命を維持するうえで非常に重要なシステムであり、現在までの研究から、主に免疫系が担っていることが示されている。

免疫系は、全ての生物が有している基本免疫と、軟骨魚類よりも高等な生物だけが有している獲得免疫から構成される (1)。異物が体内に侵入すると、異物特有の成分により基本免疫担当細胞のマクロファージや樹状細胞などが活性化し、炎症メディエーターであるサイトカインを放出することで、基本免疫全体を活性化させる。また、これらの細胞は、異物を貪食し、その分解産物であるペプチドを抗原としてリンパ球に提示することで、獲得免疫も活性化させる (2)。獲得免疫では、提示された抗原と特異的に反応できるレセプターを有するリンパ球のみが活性化されて増殖し、直接または抗体を介して間接的に、異物を効率良く排除する (図 I)。

両免疫系の相違は i) 特異性、ii) 多様性、iii) 記憶の方法、にある。獲得免疫は、遺伝子再編成により、特異性が異なるリンパ球クローンを多数揃えることで、異物認識に対する多様性を獲得する。また、この多様性は抗原と接触することで記憶され、同一異物の再侵入に対してより強力な生体防御を提供する。しかし、獲得免疫の情報は体細胞レベルで得られるため、一代限りで消失してしまう。これに対し、基本免疫は獲得免疫ほどの特異性・多様性は備えていないものの、その情報が生殖細胞の遺伝子に蓄積されるため、次世代へと受け継がれていく。

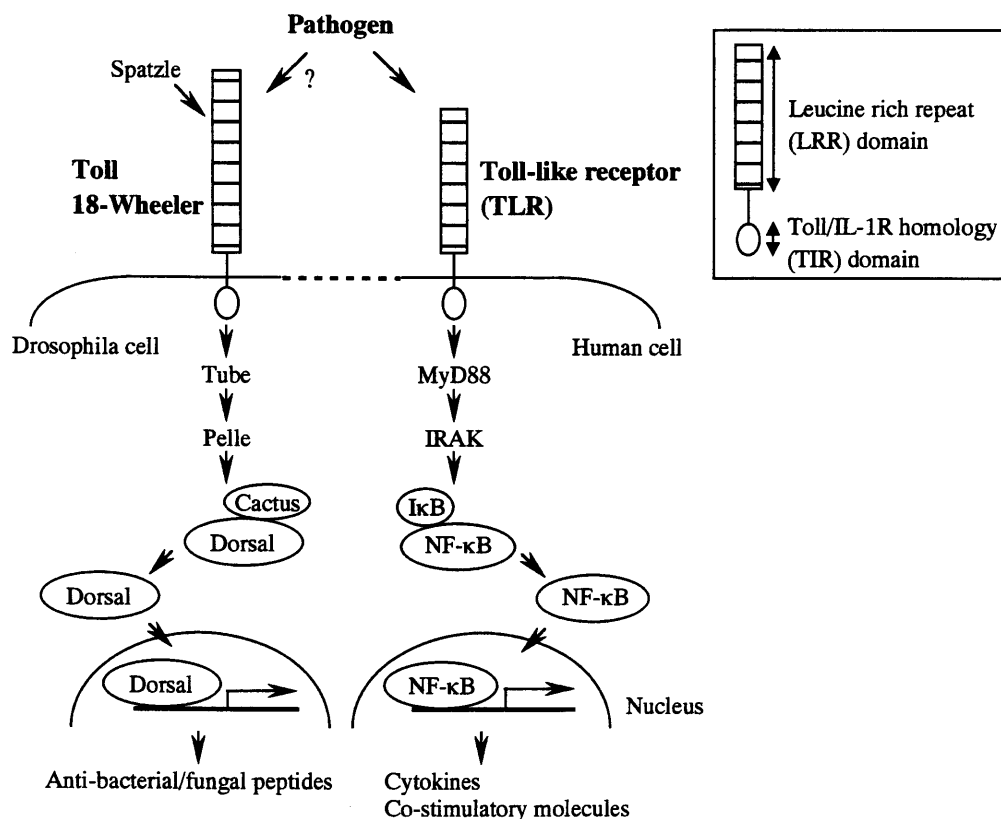


図I. 進化系統樹と各動物種が備えている免疫系

各動物種が出現した年代と備えている免疫系を示した。また、それぞれの免疫系で主要な役割を果たす細胞、レセプターとそれらの認識物を上から順に示した。

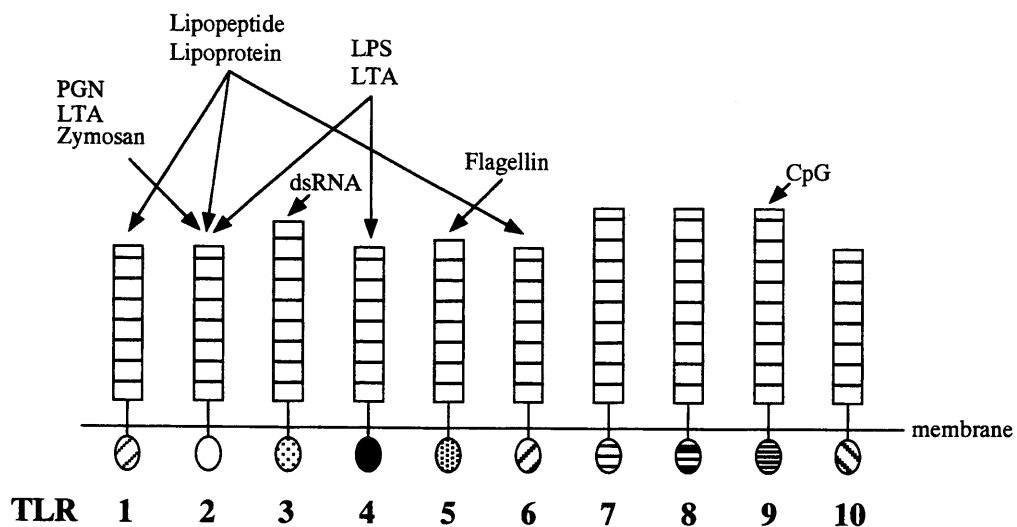
ヒトなどの高等動物においては、基本免疫と獲得免疫が相互作用しながら、効率良く生体防御にあたっている (3)。一方、円口類よりも下等な動物種では、獲得免疫が存在しないにもかかわらず、生命を維持していくことができる (4)。この事実は、生命に普遍的に存在すると考えられる基本免疫の分子が、微生物やガン細胞を識別・排除するシステムにおいて重要な役割を果たしていることを強く示唆している。

1996 年、基本免疫しか持たないショウジョウバエにおいて、微生物感染時に重要な役割を果たす生体防御因子、Toll が報告された。当初、Toll はショウジョウバエの発生時において背腹決定を行う際に必須の分子として発見された (5)。しかし、ショウジョウバエが成体になると、Toll は真菌感染時に抗菌ペプチドの産生を誘導するシグナル伝達レセプターとしても働くことが明らかとなり (6)、ショウジョウバエにおける重要な生体防御因子として注目されるようになった。Toll は I 型の膜タンパク質であり、タンパク質間の相互作用に関与する Leucine rich repeat (LRR) ドメイン (7, 8) を細胞外に数個持っている。ここに、プロテアーゼカスケードによって活性化された内因性物質、spatzle が結合すると、細胞内の Toll/IL-1 receptor homology (TIR) ドメイン (9) を介して Tube、Pelle さらに転写因子 Dorsal が順次活性化され、drosomycin などの抗真菌ペプチドの産生が誘導される (6, 10-12) (図 II)。さらに、細菌感染時には、Toll と同様に LRR タンパク質である 18-wheeler が抗菌ペプチドの産生を促す (13)。このように、Toll/18-wheeler は真菌/細菌感染時に異物の存在を伝え、それを排除するよう生体に働きかける分子であることが明らかとなった。



図II. ショウジョウバエとヒトにおけるToll/Toll-like receptor (TLR) を介した異物認識機構

TubeはMyD88の機能的ホモログとして、Pelle、Cactus、DorsalはIRAK、I κ B、NF- κ Bの構造的、機能的ホモログとして報告されている。



図III. ヒトTLRとその主なリガンド

現在までに報告されているヒトTLRとその主なリガンドを示した。TLR1と6は、TLR2と共同して異物認識を行うことが知られている。

dsRNA, double stranded RNA

その後の研究から、ヒトにおいて Toll-like receptor (TLR) がクローニングされ、哺乳類にもショウジョウバエと同じような異物認識機構が存在し、TLR が Toll/18-wheeler のようにシグナル伝達レセプターとして機能している可能性が示された (14)。TLR は、ショウジョウバエ Toll に似た構造をしており、細胞外の LRR ドメインを介して外来異物の構成成分を認識し、細胞内の TIR ドメインにより下流の分子と相互作用して、最終的に転写因子を活性化することが明らかになりつつある (15, 16) (図 II)。TLR は一次構造上のファミリーを形成しており (17)、現在、データベース上で公開されている 10 種のヒト TLR のうち、TLR2、3、4、5 および 9 はそれぞれのリガンドがすでに明らかとなっている (図 III)。TLR4 はグラム陰性菌の細胞壁成分 lipopolysaccharide (LPS) を認識する主要なレセプターであり、長年不明であった LPS の情報伝達は、TLR4 を介していることが明らかとなった (18, 19)。一方 TLR2 は、グラム陽性菌の peptidoglycan (PGN) や lipoteichoic acid (LTA)、マイコプラズマやスピロヘータ由来のリポペプチドまたはリポプロテイン、細菌の纖毛、酵母の細胞壁成分ザイモザン、寄生虫の GPI タンパク質など、糖脂質を中心として、幅広い異物成分を認識する (20-28)。また TLR3 はウイルスの 2 本鎖 RNA (29, 30) を、TLR5 は細菌の鞭毛構成成分 flagellin (31) を、TLR9 は細菌由来の CpG DNA (32) をそれぞれ認識する。さらに、TLR2 や 4 は、別の TLR や TLR 以外の分子と共同して異物の認識を行うことも報告されている (33-39)。しかし一方で、リガンドが未だに同定されていない TLR も残されている。ヒト TLR を介した異物認識機構がショウジョウバエのそれと異なる点は、活性化した転写因子がサイトカイン産生や抗原提示細胞上の補助因子の発現を促すことによって、獲得免疫系を活性化することである (40, 41)。つまり、哺乳類における TLR は、“基本免疫と獲得免疫の橋渡し役を担う分子”と考えることができる。基本免疫しか持たないショウジョウバエの Toll と両免疫系を持

哺乳類の TLR の機能の違いから、獲得免疫の出現に伴って、基本免疫系が獲得免疫系とリンクするようになってきたことが推測できる。筆者は、この仮定を検証する目的で、本研究を開始した。

現在までに様々な動物種で TLR が単離されているが、機能解析が行われているのは昆虫類と哺乳類のみである。そこで筆者は、哺乳類よりも下等な動物種である鳥類 (ニワトリ) の TLR を単離し、その機能を哺乳類のものと比較することを試みた。その結果、卵生動物で初めて TLR を 2 種単離することに成功した。また、その機能解析より、哺乳類と鳥類では、TLR による異物認識機構が異なることを明らかにしたので、以下に得られた知見を報告する。

第1章 ニワトリ TLR のクローニング

現在、TLR の機能解析が行われているのは哺乳類と昆虫類のみである。進化の系統分類上、その中間に位置する動物種の TLR については、いくつかその cDNA が単離されているものの、機能は明らかにされていない。そこで筆者は、哺乳類よりも下等な動物種の TLR を単離し、その機能を哺乳類のものと比較することを目的とした。鳥類は、比較的哺乳類に近い動物種でありながら、その基本免疫系についてはほとんど解析されていない。そこで、鳥類 (ニワトリ) における TLR の cDNA クローニングを試みたところ、ニワトリ TLR ホモログを 2 種単離することに成功した。本章では、単離した 2 種のニワトリ TLR の構造、遺伝子座および mRNA とタンパク質の組織分布について、得られた知見を述べる。

1-1. 実験材料および試薬

ライブラリー

ニワトリファブリキウス囊の cDNA ライブラリーは、東京理科大学の後飯塚僚博士より供与された。

細胞

ウサギ腎由来繊維芽細胞 RK13 は、理研細胞バンクより購入した。RK13 細胞は、10% (v/v) の非働化ウシ胎児血清 (FCS)、100 U/ml penicillin G、100 µg/ml streptomycin sulfate を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies) を用いて 37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。細胞の回収には、0.02% EDTA を含む D-PBS を用いた。

抗体

ウサギ抗ニワトリ TLR ポリクローナル抗体は当研究室で作成したものを用いた (1-2-7 参照)。マウス抗 His-Tag 抗体は Qiagen より、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギまたはマウス IgG 抗体は Biosource より購入した。

オリゴヌクレオチドプライマー

FISH 解析 (1-2-3 参照) 用のプローブの作製、および RT-PCR (1-2-5 参照) に用いたオリゴヌクレオチドプライマーを以下に示した。なお、プライマーは、北海道システムサイエンスに依頼して合成した。

FISH 解析	Forward, GGCATTGTGTTTCTCAACACG
	Reverse, CACATGTCTGGAATCTCACC
RT-PCR	Forward, (Type 1) GCTTTGCTCTTTAGAAGCCCTGAG
	(Type 2) TTCACGTAACCAAAGAAGCCC
	Reverse, GCCTTTTGCAGATCATGTGTTTCGG

試薬

細胞

D-PBS	137 mM NaCl, 8.10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2.68 mM KCl, 1.49 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7.4)
-------	---

Northern blot

10 X MOPS	0.2 M MOPS, 50 mM sodium acetate, 10 mM EDTA (pH 7.0)
Northern blot 用アガロースゲル	agarose (Sea Kem), 1 X MOPS, 0.66% formaldehyde
Running buffer	0.74% formaldehyde, 1 X MOPS
Sample buffer (5 X)	2 mM EDTA, 1.3% formaldehyde, 16% formamide, 10% (v/v)

	glycerol, 2 X MOPS, BPB
20 X SSC	3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate (pH 7.0)
Denature buffer	50 mM NaOH
Neutralization buffer	0.2 M sodium acetate (pH 4.0)
Wash solution 1	2 X SSC, 0.05% SDS
Wash solution 2	0.1 X SSC, 0.1% SDS

SDS-PAGE

Lysis buffer (組織、細胞溶解用)	1% (w/v) NP-40, 0.15 M NaCl, 10 mM EDTA, 1 mg/ml iodoacetamide, 1 mM PMSF, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)
Running buffer	50 mM Tris, 38 mM glycine, 0.1% SDS
Sample buffer (5 X)	312.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 50% (v/v) glycerol, 10% SDS, BPB

Western blot

Anode 1 buffer	0.3 M Tris-HCl, 20% methanol (pH 10.4)
Anode 2 buffer	25 mM Tris-HCl, 20% methanol (pH 10.4)
Cathode buffer	25 mM Tris-HCl, 40 mM glycine, 20% methanol (pH 9.4)
Washing buffer	20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20 (pH 7.4)
Blocking buffer	10% skimmed milk (雪印乳業), washing buffer

N-結合型糖鎖処理

Lysis buffer	1% (w/v) NP-40, 10 mM EDTA, 1 mg/ml iodoacetamide, 1 mM PMSF, 50 mM Tris-maleate (pH 8.6)
--------------	---

1-2. 方法

1-2-1. ニワトリ TLR のクローニング

(1) 縮重プライマーを用いたニワトリ TLR cDNA 断片の単離

マウス TLR2 と 4、およびショウジョウバエ Toll の細胞内領域 (TIR) において、比較的アミノ酸が保存されている部分に対応する縮重プライマーを作製した (図 1-1)。この縮重プライマーとライブラリーのベクターに対するプライマーを用い、ニワトリファブリキウス囊の cDNA ライブラリーを鋳型として nested PCR 反応を行った (図 1-2)。反応条件は以下に示した。また、反応には LA Taq (TaKaRa) を用いた。

1st PCR

(pME18s-1 または 3 と degenerate primer)

↓ 94°C 2 min
↓ 94°C 30 sec
55°C 1 min
72°C 90 sec } 20 cycles
↓ 4°C

2nd PCR

(pME18s-2 または 4 と degenerate primer)

1st PCR product 1 µl を鋳型として
↓ 94°C 2 min
↓ 94°C 30 sec
55°C 1 min
72°C 90 sec } 35 cycles
↓ 4°C

得られた様々な大きさの cDNA 断片を TA cloning vector (Invitrogen) にサブクローニングし、各大きさの cDNA 断片を含むクローンについて、最低 2 個ずつ塩基配列を決定した。さらに、BLAST search (NCBI) により、これらのクローンとヒトおよびマウス TLR との相同性を調べた。なお、塩基配列の決定は、ABI 310 シークエンサーを用いて行った。

(2) ニワトリ TLR cDNA 全長の塩基配列の決定

(1) より、ヒトおよびマウス TLR2 と相同性のある cDNA 断片を 1 つ得た。これに対するプライマーを作製し、まずニワトリファブリキウス囊の cDNA ライブラリーを鋳型として、RACE 法によりこの断片を含む分子 (ニワトリ TLR) の cDNA 全長をクローニングした。次に、正確な塩基配列を得るため、開始メチオニンと思われる部分よりも 5' 側と終止コドンよりも 3' 側、および ORF 中央部にそれぞれプライマーを作製し、ニワトリ肝臓の mRNA より作成した cDNA を鋳型として、*Pfu* turbo polymerase (Stratagene) を用いた PCR 反応により、ORF 領域を前半部と後半部に分けて増幅させた。得られたクローンのうち前半部、後半部それぞれ 4 個をシーケンスし、ニワトリ TLR cDNA 全長の塩基配列を決定した。

1-2-2. 2 種のニワトリ TLR の一次構造解析と相同性の比較

2 種のニワトリ TLR のモチーフ検索は、SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) により行った。また、他の動物種の TLR との相同性は、GENETYX-MAC プログラムにより解析した。

1-2-3. ニワトリ TLR のゲノムマッピング

ニワトリ TLR (Type 1, Type 2) それぞれに特異的な ORF 中央部を含む、プローブ (約 800 bp) を作製し、これを用いて Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法を行った (42, 43)。なお、プローブの蛍光標識および FISH 解析は、北海道大学理学部附属動物染色体研究施設の松田洋一博士と山田和彦博士のご協力のもと行った。

1-2-4. Northern blot

様々なニワトリの臓器の total RNA を TRIZOL Reagent (Life Technologies) により添付書類に従って調製した。Total RNA 10 µg に、泳動用 sample buffer を加え、65°C で 5 分間熱処理した後、氷上に静置し、1.2% の Northern blot 用アガロースゲルで分離した。その後、ゲルを 1 µg/ml の EtBr を含む denature buffer に室温で 25 分間振とうさせ、続いて neutralization buffer で室温、20 分間の振とうを 2 度行った。UV ランプで RNA の泳動状態を確認し、一晩かけてニトロセルロース膜 (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia) へ RNA を転写させた。転写後の膜を 50 mM NaOH で 5 分間振とうした後、2 X SSC で 1 分間ほど洗い、吸引しながら 80°C で 2 時間インキュベートすることで RNA を膜に固定化した。膜をハイブリバックに入れ、ExpressHyb Solution (CLONTECH) を加えて 68°C で 1 時間ブロッキングした後、³²P 標識済みのプローブを 1 X 10⁶ cpm/ml になるように加え、68°C で 2 時間さらに反応させた。反応後の膜を wash solution 1 により室温で、溶液の交換を行いながら 40 分間ほど洗浄した。次に、wash solution 2 で 50°C、3 分間洗浄した。膜上のバンドをフィルム (Hyperfilm MP, Amersham Pharmacia) に -80°C で感光させ、5 日後にそのフィルムを現像した。なお、プローブの ³²P 標識には Amersham Pharmacia の Megaprime DNA labelling system を用い、リプローブは、転写膜を沸騰した 0.1% SDS で数回洗浄することにより行った。

1-2-5. RT-PCR

様々なニワトリの臓器から採取した total RNA を鋳型とし、それぞれのニワトリ TLR のタイプに特異的な領域で、イントロンを跨ぐ、もしくは挟むように設定したプライマー (1-1 参照)を用いて、RT-PCR を行った。反応には、Superscript II (Life Technologies) および Ex Taq (TaKaRa) を用い、94°C 30 秒、59°C 1 分、72°C 1 分で 35 サイクル行った。コントロールとして、ニワトリ β-actin に対するプライマーを用いて同様の条件で反応を行った。

1-2-6. C 末端に His-tag を付加したニワトリ TLR のリコンビナント体の作製

PCR 法により、ニワトリ TLR Type 1, Type 2 それぞれの C 末端に His-tag (6 X His (CAC)) の配列を付加した。これを哺乳類用の発現ベクター pME18s に、Type 1 は *Xho* I/*Spe* I サイトで、Type 2 は *Xho* I サイトで挿入した。なお、発現プラスミドは Endotoxin-free Plasmid Maxi kit (Qiagen) で精製した。

1-2-7. ウサギ抗ニワトリ TLR ポリクローナル抗体の作製

ウサギ抗ニワトリ TLR ポリクローナル抗体の作製は、井上らの方法に従った (44)。1-2-6 で作成したリコンビナントニワトリ TLR Type 2 の発現プラスミドを RK13 細胞に LipofectAMINE PLUS (Life Technologies) でトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収、D-PBS で 3 回洗った後、Fruend complete adjuvand (DIFCO) と混ぜ合わせて作製したエマルジョンを免疫原とした。10 cm dish 3-4 枚分の RK13 細胞を 1 回分の免疫原とし、3 週にわたり週 1 回の免疫を行った。4 週目に細胞と Fruend incomplete adjuvand (DIFCO) を混ぜ合わせて作製したエマルジョンで追加免疫し、5 日後に採血を行った。採取したウサギの血液は、低温室に一晩放置し、4°C、3,000 rpm で 10 分間遠心して血清を回収した。血清に硫酸アンモニウムを終濃度 33% になるように攪拌しながら加え、低温室で一晩さらに攪拌した後、4°C、3,000 rpm で 30 分間遠心し、沈殿した IgG 画分を D-PBS (血清の 1/10 量) に溶解した。この溶液を、D-PBS に対して透析し、硫酸アンモニウムを除去した。抗体溶液の濃度は、OD₂₈₀ を測定し、比吸光係数 (E^{1%}) を 13.5 として求めた。なお、ニワトリ TLR の発現は、トランスフェクション後 48 時間の細胞を可溶化し、1-2-8 (2) に従って SDS-PAGE (7.5% アクリルアミド) で分離した後、マウス抗 His-tag 抗体 (0.5 µg/ml) を用いて検出、確認した。

1-2-8. ニワトリ TLR のタンパク質の組織分布

(1) ニワトリ組織のタンパク試料の作製

ニワトリの各臓器に 100 mg/ml になるように lysis buffer を加え、ポッター型のホモジナイザーにより破碎した。4°C で 1 時間攪拌した後、4°C、15,000 rpm で 30 分間遠心し、その上清を組織のタンパク試料とした。各組織のタンパク試料の濃度は、protein assay kit (Bio-Rad) により測定し、BSA 当量で求めた。

(2) SDS-PAGE および Western blot

SDS-PAGE は Laemmli の方法に従った (45)。各ニワトリ組織のタンパク試料 500 µg (BSA 当量) を還元条件下で 6% のアクリルアミドゲルにより分離した。ゲルから PVDF 膜 (Millipore) へのタンパク質の転写は、セミドライ法により行った。まず、泳動終了後、ゲルを Cathode buffer 中で 5 分間振とうさせた。転写装置の陽極側から順に Anode 1 buffer を浸した濾紙 (3MM, Whatman) 2 枚、Anode 2 buffer を浸した濾紙 1 枚、Anode 2 buffer で平衡化した PVDF 膜、ゲル、Cathode buffer を浸した濾紙 3 枚を重ね、90 mA で 90 分間通電した。その後、非特異的な抗体の吸着を防ぐため PVDF 膜を blocking buffer で一晩以上振とうさせた。その後、PVDF 膜を blocking buffer で 5 µg/ml に希釈した抗ニワトリ TLR ポリクローナル抗体と室温で 2 時間反応させ、washing buffer で 10 分間の洗浄を 3 回行った後、blocking buffer で 1 万倍希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG と室温で 1 時間反応させた。再び washing buffer で 10 分間の洗浄を 3 回行った後、ECL 試薬 (Amersham Pharmacia) により膜上のバ

ンドを検出した。

1-2-9. *N*-結合型糖鎖処理

ニワトリ TLR の *N*-結合型糖鎖処理は *N*-glycosidase (Genzyme) を用いて、添付書類に従って行った。まず、ニワトリ TLR Type 1 および Type 2 を RK13 細胞に LipofectAMINE PLUS によりトランスフェクションした。48 時間後に細胞を回収し、D-PBS で 3 回洗った後、*N*-結合型糖鎖処理用の lysis buffer を 1×10^7 cells/ml になるように加えて可溶化した。この可溶化溶液 30 μ l を 100 μ U の neuraminidase (Sigma) と 37°C で 1 時間反応させた後、250 mU の *N*-glycosidase を添加して、37°C で 16 時間さらに反応させた。これを SDS-PAGE (7.5%アクリルアミド) で分離し、ウサギ抗ニワトリ TLR 抗体を用いて Western blot 解析により検出した。

1-3. 実験結果

1. ニワトリ TLR cDNA のクローニング
2. ニワトリ TLR の一次構造
3. ニワトリ TLR の組織分布
4. *N*-結合型糖鎖量の検討

1-3-1. ニワトリ TLR cDNA のクローニング

(1) PCR 法によるニワトリ TLR cDNA のクローニング

ニワトリの TLR を PCR 法でクローニングするため、縮重プライマーを数種作製した。現在、機能が報告されているマウス TLR2 と 4、およびショウジョウバエ Toll において、一次構造上、比較的保存されている細胞内の Toll/IL-1 receptor homology (TIR) ドメイン内で、アミノ酸が連続して保存されている領域を選び、5 種の縮重プライマーを作製した (データは示さない)。このうち、TIR ドメインの 3' 末端側のプライマー (図 1-1) を用いた nested PCR において、哺乳類の TLR2 と相同性の高い cDNA 断片 (260 bp) が 1 つ得られた (図 1-2)。この断片に対してプライマーを作製し、ニワトリファブリキウス囊のライブラリーを鋳型とした RACE 法により、この断片を含む分子の全長 cDNA をクローニングしたところ、2 種類の cDNA クローンが得られた。これらは、予想される一次構造より、Leucine rich repeat (LRR) ドメインおよび TIR ドメインを有していたため、ニワトリにおける TLR であると考えられた。クローニングした 2 種のニワトリ TLR をそれぞれ Type 1、Type 2 と名付けた。

さらに、ニワトリ TLR の正確な塩基配列をニワトリ肝臓から採取した total RNA を用いて決定した。その結果、Type 1 は 793 アミノ酸をコードする open reading frame (ORF, 2,382 bp) を含んでいた (図 1-3 A)。一方、Type 2 は 781 アミノ酸をコードする ORF (2,346 bp) を含んでいた (図 1-3 B)。両タイプの ORF 全体の相同性は 88.5% と高いが、開始メチオニン付近 (Type 1, 62 bp; Type 2, 29 bp) と終止コドン付近 (Type 1, Type 2 共に 13 bp)、および ORF 中央部の約 600 bp (Type 1, 574 bp; Type 2, 570 bp) が互いに異なっていた (図 1-4 A)。特に、ORF 中央部での相同性は 57.0% と低く、それぞれに特異的な配列になっていた。また、両タイプとも、ORF は 1 つのエクソンでコードされており、開始メチオニンよりも Type 1 は 11 bp、Type 2 は 32 bp 上流にそれぞれ 500 bp と 1.8 kb のイントロンが存在していた (図 1-4 A)。以上の結果より、Type 1 と Type 2 はオルタナティブスプライシングフォームではなく、別々の遺伝子でコードされていると予想された。

(2) 2 種のニワトリ TLR の FISH 解析

次に、ニワトリ TLR Type1 と Type 2 の遺伝子座を決定するため、FISH 解析を行った。プローブは、それぞれのタイプに特異的な ORF 中央部を用いた。FISH 解析の結果、両タイプともニワトリ第 4 染色体の長腕側、セントロメア近傍 (4q1.1) に位置することが明らかとなった (図 1-4 B)。またこの結果は、別のグループによって

報告された、ニワトリ TLR を含む BAC クローンをプローブとした FISH 解析の結果と一致した (46)。このクローンは、Type 1 と Type 2 に共通の配列を含んでいるが、4q1.1 の 1 カ所では検出されていない。これらのことから、Type 1 と Type 2 の遺伝子座は非常に近いことが示された。

1-3-2. ニワトリ TLR の一次構造

(1) 2 種のニワトリ TLR 間での比較

予想される一次構造から、2 種のニワトリ TLR のドメイン検索を SMART により行ったところ、Type 1 は 12 個の、Type 2 は 13 個の LRR ドメインを有しており、それぞれのタイプに特異的な ORF 中央部で LRR ドメインの個数が異なっていた (図 1-5)。また、終止コドン付近の塩基配列の相違は、アミノ酸配列には反映されず、TIR ドメインは両者で全く同じであった。また、膜貫通領域よりも N 末端側には、TLR ファミリーに特有の C-terminal flanking region が存在しており、8 カ所存在する N-結合型糖鎖付加可能部位のうち 7 カ所は両タイプに共通であった (図 1-3 A, B)。

(2) ニワトリ TLR とヒト TLR 間での比較

ニワトリ TLR とヒト TLR のアミノ酸配列における相同性を表 1-1 に示した。ニワトリ TLR Type 1、Type 2 は共に、ヒト TLR2 と最も相同性が高かった。ニワトリ TLR とヒト TLR2 間の相同性をドメイン別に比較すると、細胞外の LRR ドメインにおける相同性が 50% 弱であったのに対して、細胞内の TIR ドメインは 80% と非常によく保存されていた。この結果より、2 種のニワトリ TLR はヒト TLR2 のホモログであると考えられた。

1-3-3. ニワトリ TLR の組織分布

(1) mRNA の組織分布

ニワトリ TLR の mRNA の組織分布を Northern blot 解析により検討した。プローブとして Type 2 の ORF 全長を ^{32}P 標識したものをを用いた。その結果、検討したほぼ全ての臓器において 3.4 kb のバンドが検出された (図 1-6 A)。プローブには、Type 1 と 2 に共通の配列が含まれるため、このバンドは両者の mRNA 由来のものと考えられた。

さらに、それぞれのタイプの mRNA の組織分布を明らかにするため、タイプ特異的な領域に対するプライマーを用いて RT-PCR を行った。その結果、Type 2 の mRNA が全ての臓器において発現していたのに対し、Type 1 は脳、脾臓、筋肉ではほとんど発現していなかった。また、心臓、肺、肝臓、卵巣では、両タイプの mRNA が共に強く発現していた (図 1-6 B)。

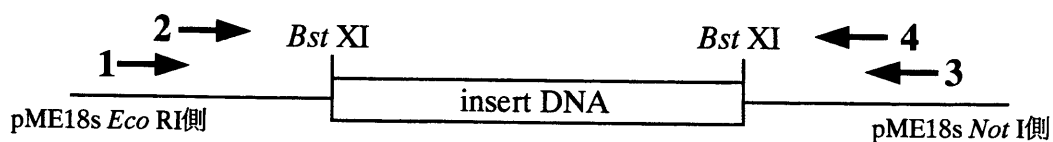
(2) タンパク質の組織分布

次に、ニワトリ TLR のタンパク質の組織分布を Western blot 解析で検討した。ま

ずコントロールとして、一過的にニワトリ TLR のリコンビナント体 (C 末端に His-tag を付加したニワトリ TLR) を発現させた RK13 細胞の可溶化試料を SDS-PAGE で分離し、Western blot 解析を行った。リコンビナント体は、作製した抗ニワトリ TLR ポリクローナル抗体および抗 His-tag 抗体の両方で検出され、その分子量は、Type 1 が 102 kDa、Type 2 が 97、99 kDa であった (図 1-7 A)。次に、各組織に発現するニワトリ TLR のタンパク質を、抗ニワトリ TLR ポリクローナル抗体を用いて検出したところ、肝臓、脾臓以外に、心臓、砂のうおよび筋肉で強く発現していた。一方、肺、腎臓、精巣および卵巣では発現が非常に弱かった。また、これらニワトリ TLR のタンパク質は、リコンビナント体とほぼ同じ分子量の位置に認められた。しかし、用いた抗体は、両タイプのニワトリ TLR を認識できるため、各組織で発現するニワトリ TLR のタイプを区別することはできなかった。

1-3-4. N-結合型糖鎖量の検討

1-3-3 で求められたニワトリ TLR のリコンビナント体の分子量は、シグナルペプチドを除いた一次構造から予想される分子量よりも大きかった。両タイプは共に、8 カ所の N-結合型糖鎖付加可能部位を有しており、そのうち 1 カ所だけがそれぞれのタイプに特異的な配列内に存在する。そこで、N-glycosidase 処理を行い、各タイプにおける N-結合型糖鎖量を調べた。その結果、N-glycosidase 未処理のリコンビナント体と処理後のリコンビナント体の分子量の差から、Type 1 には 19 kDa 相当の、Type 2 には 14-17 kDa 相当の N-結合型糖鎖が付加していることが明らかとなった (図 1-7 B)。また、図 1-7 A で見られた Type 2 の 2 本のバンドは、N-glycosidase 処理後に一本のバンドとして検出された。



(Chicken bursa of Fabricius cDNA library)

- Primer 1, pME18s-1 5'-TAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCT-3'
 2, pME18s-2 5'-TACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAAT-3'
 3, pME18s-3 5'-TAGACTAGTCTAGCGGCCGCACCTG-3'
 4, pME18s-4 5'-GCACCTGCAGGCGCAGAACTGGTAG-3'



Lane 1, Degenerate primer/18s-1 and 2 primer
 Lane 2, Degenerate primer/18s-3 and 4 primer

図1-2. Nested PCR

ニワトリファブリキウス囊のライブラリーを鋳型とし、図1-1で示した縮重プライマーを用いてnested PCRを行った。ライブラリーのベクター (pME18s) に対応するプライマーは、インサートが挿入されている*Bst* XIサイトの外側に2種類ずつ、それぞれが重なるように作製した。PCR産物をアガロース電気泳動したところ、矢印で示したバンドから、ヒトTLR2に相同性を示すcDNAクローンが1つ得られた。

CTGGAAGGCTCTTGTCTATCATTCTCAGTCTCCAGTAAGAAGCAGCAGCACAAGAGGCGTTCAGAGCATGGATGCTGCCATGCCGGTG -154
 GAAAGGGAGAAAGGGGGGACTGCCTGCAACGGTCTCAGAGTATTTAAAGGGGTGTCAGGAGTGGACTCAGCTTTGCTCTTTAGA -64
 AGCCCTGAGGCTCTGGGAGACGCCAGGATCTCTTCAGCAAGTCTGCCACACGCTACACCAAAATGTTCAACCAAGTAAACAGAAACCA 27
 M F R Q S K Q K P 9

ACAATGAAGCTGATGTGGCAAGCATGGCTGATCTACACAGCCTTGCGTGGCACCTCCCTGAAGAACAAGCCCTGAGACAGGCTGTCTT 117
 T M K L M W Q A W L I Y T A L A A H L P E E Q A L R Q A C L 39

TCATGCGATGCCACTCAGTCACTGCAACTGCTCTTTTCATGGGTTTGGAATTCATTCCTCCGGGGCTCACAGGCAAAATCACGGTGTAAAC 207
 S C D A T Q S C N C S F M G L D F I P P G L T G K I T V L N 69

CTGGCCCAACAGGATAAAGCTGATCCGAACACATGATCTGCAAAAGGCTGTGAACCTGAGAACCCTGCTGCTGAGTCCAAACCAATC 297
 L A H N R I K L I R T H D L Q K A V N L R T L L L Q S N Q I 99

AGCTCCATAGACGAGGACTCGTTTGGCTCTCAGGGGAAAGTGGAGCTCTTGGACTTGTCAAATAATAGCTGGCTCACTGTCCCAAGT 387
 S S I D E D S F G S Q G K L E L L D L S N N S L A H L S P V 129

TGGTTTGGGCCCCCTTTTTCGCTCCAACACCTTCGCATTCAAGGCAATTCCTACAGCGACCTGGGGGAAAGTTCCTCCCTTTCCAGCCTG 477
 W F G P L F S L Q H L R I Q G N S Y S D L G E S S P F S S L 159

AGAACTTGAGCTCCCTCCACCTGGGCAACCCAGTTCCTCATCATCAGGCAAGGAACTTTGAGGGCATTGTGTTTCTCAACACGCTG 567
 R N L S S L H L G N P Q P S I I R Q G N F E G I V F L N T L 189

AGGATCGACGGTGACAATCTCAGTCACTGAGCCTGGAAGTCTGAAATCGATCAGGAAGATAAATCACATGATCATAAGCATAAGAAGG 657
 R I D G D N L S Q Y E P G S L K S I R K I N H M I I S I R R 219

ATTGACGTATTCTCAGTCACTCAGGACCTTCTGCATCTGCCATTGGTTAGAGTTAGAGAGATCAAATAGATATTGAAATGAA 747
 I D V P S A V I R D L L H S A I W L E V R E I K L D I E N E 249

AAACTGGTTCAGAACTCTACTCTTCTTTGACGATACAGAACTTACATTTACCGGTGCTTCATTACAGATAAATATATTAGCCAAATA 837
 K L V Q M S T L P L T I Q K L T F T G A S F T D K Y I S Q I 279

GCAGTCTATTGAAGGAAATAGATCTTTGAGAGAGTTAGAAGCAATAGATTGTGTGCTTGAGGGGAAAGGAGCATGGGATATGACAGAA 927
 A V L L K E I R S L R E L E A I D C V L E G K G A W D M T E 309

ATTGCAAGAAGTAAGCAAGTCTTATTGAAACACTATCAATAACAAATAGACTATTCTGGATTTTATTGTTCTTTGACCTGGAAGGT 1017
 I A R S K Q S S I E T L S I Y N M T I L D P Y L F F D L E G 339

ATAGAGACACAGGTAGGTAAAGCTGAAAAGACTCAGCATTGCAAGCTCTAAAGTCTTCATGGTACCATGCAGAGTAGCAAGATATTTTCA 1107
 I E T Q V G K L K R L S I A S S K V F M V P C R L A R Y P S 369

TCACCTTTATATCTTGATTTCATGATAATTGCTTGTAAATAATCGCTTAGGAGAGACAATCTGTGAAGATGCATGGCCTTCTTTACAA 1197
 S L L Y L D F H D N L L V N M R L G E T L C E D A W P S L Q 399

ACTCTAAATCTAAGTAAATTTCTCTGAAATCCCTAAACAGGCTGCAAGATATATAAGTAATCTACACAACTGATTAATCTTGACATT 1287
 T L N L S K N S L K S L K Q A A R Y I S M L H K L I N L D I 429

AGTGAAAACAAATTTGGTGAGATTCCAGACATGTGTGAATGGCCTGAAAACCTGAAATATCTGAATCTCTCCAGCACTCAAATCCCAAA 1377
 S E N N F G E I P D M C E W P E N L K Y L N L S S T Q I P K 459

TAAACAACCTGCATTCCCTCAACTCTTGAAGTCTGGACGTTAGTCTAACAACCTGCAGGATTTGGAGTGCACCTGCCATTCTCTCAAG 1467
 L T T C I P S T L E V L D V S A N N L Q D F G L Q L P F L K 489

GAGCTGTACCTGACAAAAACCATCTGAAGACCTTGCTGAAAGCCAGACATTCCTAATCTAGTGGCCATGTGCATCAGCAGAAACAAG 1557
 E L Y L T K N H L K T L P E A T D I P N L V A M S I S R N K 519

CTCAACAGCTTCTCAAGGAAGAGTTTGAAGTCTTCAAGCAATGGAGTGTGATGCCAGCGCCTAATACTTTATCTGCTCTGTGAA 1647
 L N S F S K E E F E S F K Q M E L L D A S A N N F I C S C E 549

TTCTCTCTCTTATTCACCATGAGGCAGGATAGCCAGGTGCTTGTGGGGTGGCCAGAAAGCTACATCTGTGACTCTCCGCTGACAGTG 1737
 F L S F I H H E A G I A Q V L V G W P E S Y I C D S P L T V 579

CGAGGGGACAGGTTGGGAGTGTGACGCTGTCACTGATGGAGTGGCAACGGTCCCTCCTAGTGTCTGTGCTGCACCTGGTGTCTCTG 1827
 R G A Q V G S V Q L S L M E C H R S L L V S L I C T L V F L 609

TTTACCTCTATCTCTGTTGGTGGTGGTACCAAGTACCATGCAGTCTGGTACATGAGAATGACCTGGGCATGGCTCCAAGCAAGCGGAAG 1917
 F J J J J J V V V E Y K Y H A V W Y M R M T W A W L Q A K R K 639

CCCAAGCGAGCCCCACGAAAGACATCTGCTACGACGCTTTTGTCTCTACAGTGAAGACGACTCCAACCTGGGTGAAAACATCATGGTG 2007
 P K R A P T K D I C Y D A F V S Y S E N D S N W V E N I M V 669

CAGCAGCTGGAGCAGGCATGTCCCCCTTTAGGCTGTGCCTCCATAAGCGGGACTTTGTGCTGGGAAGTGGATTGTGGACAACATCATT 2097
 Q Q L E Q A C P P P R L C L H K R D F V P G K W I V D N I I 699

GACTCCATTGAGAAGAGCCACAAGACGCTCTTTGTGCTATCAGAGCACTTTGTGACAGAGCGAGTGGTGAAGTATGAGCTGGATTCTCTG 2187
 D S I E K S H K T L F V L S E H F V Q S E W C K Y E L D F S 729

CACCTTCGCTTTTGTGACGAGAACAACGATGTGGCGATCTCTCATCTGCTGGAGCCCATTCAGAGCCAGGCGATCCCCAAGAGGTTCTG 2277
 H F R L F D E N N D V A I L I L L E P I Q S Q A I P K R F C 759

AAACTGCGGAAGATAATGAACACCAAGACCTACCTGGAGTGGCTCTCTGATGAAGAGCAACAGCAGATGTTTGGGAAAACCTGAAAGCA 2367
 K L R K I M N T K T Y L E W P P D E E Q Q Q M F W E N L K A 789

GCCTTGAAGTCATAGGACAGGTTAGGAGCTCGTTTCAGTATATTTCCAGAAAGTATATTTATATATATTACAGATACATAAGATAATGG 2457
 A L K S * 793

ATATATACATGTGTATATGAGTTGCGCATGTTTAGTGAGTCTTGTGGCAACCTGAAGTGTCTCTGGAAGGATAAAGTTATATGTGACTT 2547
 TTTCTAAGTTTGTGTTGCTGGAGCATAAGCGCAGAGGAATGTAATGAATGTGTCAGTGTATTTCCCAATGGTCAGTGT 2629

図1-3 A. ニワトリTLR Type 1の塩基配列および予想されるアミノ酸配列
 詳細は、図1-3 Bを参照。(GenBank Accession No., AB050005)

GAGAGAAGAAACATAAAGCAGGATAAACAGCCTGCAGGCACTTGAGATGGAGCACCAGGGAATGGTTTCTGCACAGAGCCAGCTTCACGT -71
 AACCAAAAGAGCCCATAAAGCCTCAGCCAGACAGCAGGTATTTCAAAGTTTAGGCAAAATAAACAACTATGCATCTGGAAAATGTG 20
 M H T W K N W 7

GGCAATTGGCACAGCCTTGGCTGCGCACCTCCCTGAAGAACAAGCCCTGAGACAGGCTGTCTTTCATGCGATGCCACTCAGTCATGCAA 110
 A I C T A L A A H L P E E Q A L R Q A C L S C D A T Q S C N 37

CTGCTCTTTTCATGGGTTTGGACTTCATTCCTCCCGGGGCTCACAGGCAAAATCACGGTGTAAACCTGGCCCATACAGGATAAAGGTGAT 200
 C S F M G L D F I P P G L T G K I T V L N L A H N R I K V I 67

CCGAACACATGATCTGCAAAAGGCTGTGAACCTGAGAACCCCTGCTGCTGCAGTCCAACCAATCAGCTCCATAGACGAGGACTCGTTTGG 290
 R T H D L Q K A V N L R T L L L Q S N Q I S S I D E D S F G 97

CTCTCAGGGGAACTGGAGCTCTTGGACTTGTCAAATAATAGCCTGGCTCACTTGTCCCCAGTGTGGTTTGGGCCCCCTTTTTCGCTCCA 380
 S Q G K L E L L D L S N N S L A H L S P V W F G P L F S L Q 127

ACACCTTCGCATTCAAGGAATTCCTACAGCGACCTGGGGGAAAGTTCCCTTTCAGCCTGAGAACTTGAGCTCCCTCCACCTGGG 470
 H L R I Q G N S Y S D L G E S S P F S S L R N L S S L H L G 157

CAACCCACAGTTCTCCATCATCAGGCAAGGAACTTTGAGGGCATTGTGTTTCTAACACGCTGAGGATCGACGGTGACAATCTCAGTCA 560
 N P Q F S I I R Q G N F E G I V F L N T L R I D G D N L S Q 187

GTATGAGCCTGGAAGTCTGAAATCGATCAGGAAGATAAATCACATGATCATAAGCATAAGAAGATTGACGTATTCTCAGCAGTCATCAG 650
 Y E P G S L K S I R K I N H M I I S I R R I D V F S A V I R 217

GGACCTTCGCACTCTGCCATTGGTTAGATGTAAGAAAATAGCATTCACTGTTCTGAAAAATACAACCTTTTGAGAATTATGCTTTC 740
 D L L H S A I W L D V R K L A F S V P E K I O L L R I M S S 247

CTCTTCGCAAGAAAATTTCTTAAACAGTGCTTATTACAGATGCTACTGTGCTGAGATTGTGTCAGCATTTTAGAAGGCATGCCAAA 830
 S P A K K I S L K Q C L F T D A T V P E I V S I L E G M P K 277

ATTAATGGAGGTGGAGATGAAAGACTGTACACTCTTGGGCACTGGAAGTGTATAAACAATTCATGCAAAACAGTCACAATCTCTGAG 920
 L M E V E M K D C L L L G T G K W Y R Q I H A N Q S Q S L R 307

AATCTGCAATAGAGAATTTATCTATAGAAGAGTTTATTGTTTACAGATCTTCAGTCTGTACTAGATCTCTATCTCTTTTAGGAA 1010
 I L T I E N L S I E E F Y L F T D L Q S V L D L L S I F R K 337

AGTCACAGTTGAAAATACCAAGGTGTTTCTGGTGCATGCAAACTTTCAACAACCTTCTATCATTGGAGTATCTTGACCTTAGCGCAA 1100
 V T V E N T K V P L V P C K L S Q H L L S L E Y L D L S A N 367

TTTACTTGGAGATCAGAGTTTGGAGCATTACGCTGTGAGGTGCATGGCCTTCATTACAACTCTAAATCTAAGTCAGAATTCATTGAG 1190
 L L G D O S L E E S A C Q G A W P S L Q T L N L S Q N S L S 397

TGACTTAAAAATGACAGGTAAAGCTTGTTCATCTAAGAAACCTAAATCTCTTAGACATCAGTGAACAATTTTGGTGAGATTCAGA 1280
 D L K M T G K S L P H L R N L N L L D I S E N N F G E I P D 427

CATGTGTGAATGGCCTGAAACCTGAAATATCTGAATCTCTCCAGCACTCAAATCCCAAATTAACAACCTTGCATTCCTCAACTCTTGA 1370
 M C E W P E N L K Y L N L S S T Q I P K L T T C I P S T L E 457

AGTGCTGGAGCTTAGTGCTAACAACTGCAGGATTTTGGAGTGAACCTGCCATTCTCAAGGAGCTGTACCTGACAAAAAACCATCTGAA 1460
 V L D V S A N N L Q D P G L Q L P F L K E L Y L T K N H L K 487

GACCTTGCCTGAAGCCACAGACATTCCTAACTTAGTGGCCATGTGATCAGCAGAAACAAGCTCAACAGCTTCTCCAAGGAAGAGTTTGA 1550
 T L P E A T D I P N L V A M S I S R N K L N S F S K E E F E 517

GTCTTCAAGCAAATGGAGCTGCTGGATGCCAGCGCAATAACTTTATCTGCTCTGTGAATTCCTCTCTCTTCATTACCATGAGGCAGG 1640
 S F K Q M E L L D A S A N N F I C S C E F L S F I H H E A G 547

GATAGCCAGGTGCTTGTGGGGTGGCCAGAAAGCTACATCTGTGACTCTCCGCTGACAGTGCAGGGGACAGGTTGGGAGTGTGACGT 1730
 I A Q V L V G W P E S Y I C D S P L T V R G A Q V G S V Q L 577

GTCAGTATGGAGTGGCAACCGGTCCCTCTAGTGTCTTGTATCTGCACCTGGTGTCTCTGTTTCATCTCTCTGTTGGTGGTGGGTA 1820
 S L M E C H R S L L V S L I C T L V F L F I L I L V V V G Y 607

CAAGTACCATGCACTGTGATCATGAGAATGACCTGGGCATGGCTCAAGCCAAAGCGGAAGCCCAAGCGAGCCCCAGAAAGACATCTG 1910
 K Y H A V W Y M R M T W A W L Q A K R K P K R A P T K D I C 637

CTACGACGCTTTTGTCTCTACAGTGAAGCACTCCAACCTGGGTGGAACATCATGGTGCAGCAGCTGGAGCAGGCATGTCCCCCTT 2000
 Y D A F V S Y S E N D S N W V E N I M V Q Q L E Q A C P P F 667

TAGGCTGTGCCTCATAAGCGGACTTTGTGCTGGGAAGTGGATTGTGGAACAACATCATTGACTCCATTGAGAAGAGCCACAAGACGCT 2090
 R L C L H K R D F V P G K W I V D N I I D S I E K S H K T L 697

CTTTGTGCTATCAGACACTTTTGTGAGAGCGAGTGGTGAAGTATGAGCTGGATTCTCGCACTTTTCGCTTTTTCGAGAGAACAACA 2180
 F V L S E H F V Q S E W C K Y E L D F S H F R L F D E N N D 727

TGTGGCGATCCTCATCTGCTGGAGCCCATCAGAGCCAGGCGATCCCCAAGAGGTTCTGCAAACTGCGGAAGATAATGAACACCAAGAC 2270
 V A I L I L L E P I Q S Q A I P K R F C K L R K I M N T K T 757

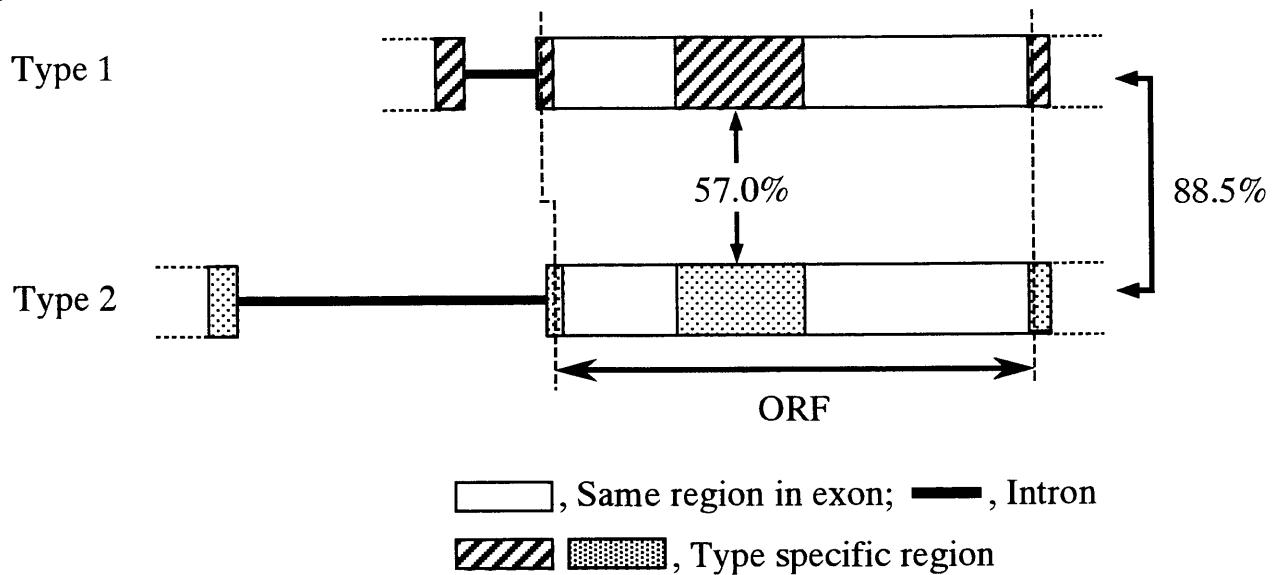
CTACCTGGAGTGGCTCTGTGATGAAGAGCAACAGCAGATGTTTGGGAAAACCTGAAAGCAGCTCTAAAAATCGTAGATAGGATCATTAAA 2360
 Y L E W P P D E E Q Q Q M F W E N L K A A L K S * 781

AATGGAGACTGTAGCCATCCTCTACTGGATTATTTCCATTGCTCTTTTGTCCCTTTTATCTATCTGTATCTATCTACAGAGATCTGAGC 2450
 TACTATAATTGCTGTACTTGTCTTTGAAATGTTCTATTCTGTCTGTGATCATG 2505

図1-3 B. ニワトリTLR Type 2の塩基配列および予想されるアミノ酸配列

シグナル配列を下線で、膜貫通領域を点線で、N-結合型糖鎖付加可能部位のアミノ酸を矢先で示した。また、各ドメインの開始位置を矢印で示し、C-terminal flanking regionは四角で囲った。Type 1とType 2で異なるアミノ酸は、色をつけて示した(灰色)。なお、縮重プライマーに対応する配列を白抜きで示した。(GenBank Accession No., AB046533)

A)



B)

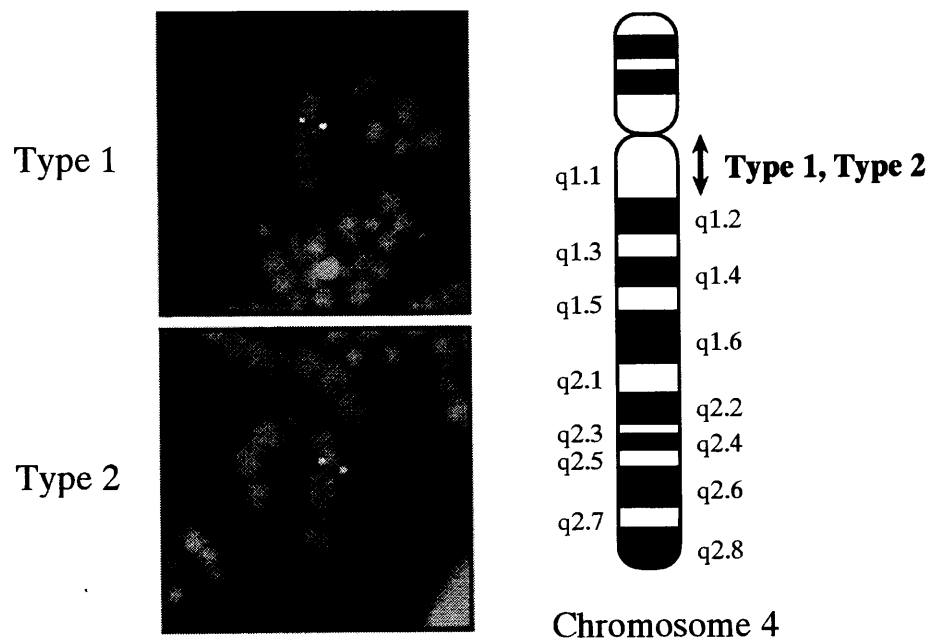


図1-4. ニワトリTLR Type 1と Type 2の塩基配列の比較 (A) とその遺伝子座 (B)

- A) ニワトリTLR Type 1とType 2の塩基配列を模式的に示した。図中の数値は、塩基レベルでの両タイプ間の相同性を示している。矢印で示したORF中央部は、それぞれのタイプに特異的な塩基配列になっており(斜線またはドットで示した領域)、この領域における相同性は57.0%であった。
- B) ニワトリTLRのそれぞれのタイプに特異的なORF中央部に対するプローブを用い、FISH解析を行った。両タイプは共に、ニワトリ第4染色体の長腕側、セントロメア近傍q1.1に検出された。

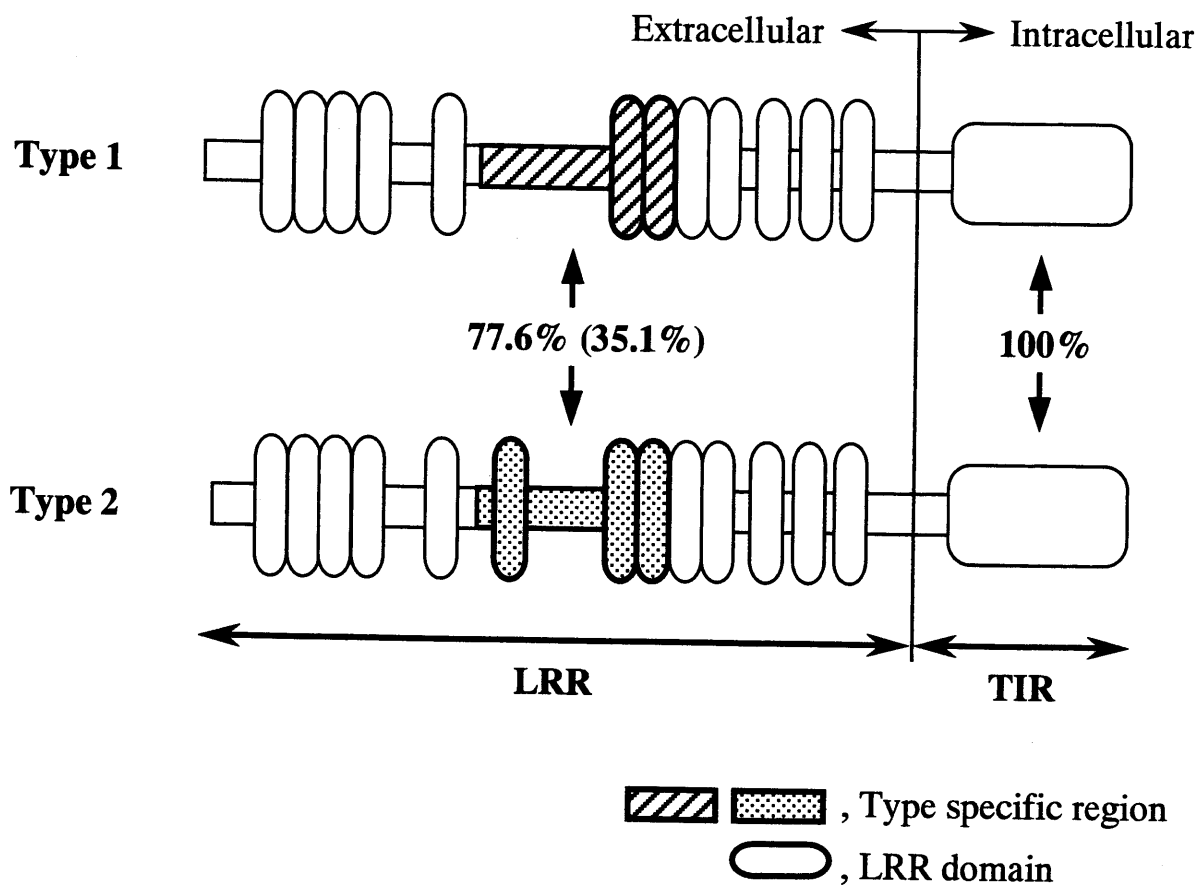


図1-5. ニワトリTLRの一次構造

ニワトリTLRの予想されるアミノ酸配列よりドメイン構造を推定した。ニワトリTLR Type 1とType 2は、細胞外にそれぞれ12個、13個のLeucine rich repeat (LRR) ドメインを有し、細胞内のToll/IL-1 receptor homology (TIR) ドメインは両タイプで完全に一致した。図中の数値は、細胞外および細胞内における両タイプ間の相同性を示している。なお、括弧内の相同性は、それぞれのタイプに特異的な部分(斜線またはドットで示した部分)のみを比較したものである。

表1-1. ニワトリTLRとヒトTLRのアミノ酸配列における相同性

chTLR		huTLR									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Type 1	Total	30.3	52.6	21.7	24.9	21.6	29.3	24.5	23.2	21.1	30.2
	LRR	25.8	45.3 (39.8)	23.1	26.1	20.3	24.6	22.1	23.4	29.0	18.7
Type 2	Total	29.5	53.0	23.1	24.9	22.0	29.2	23.6	23.1	22.7	29.2
	LRR	24.8	46.3 (45.0)	23.1	20.0	20.9	24.6	22.0	21.1	29.0	19.3
TIR		52.4	80.7	27.3	39.9	28.3	51.7	38.8	35.8	34.0	50.3

ニワトリTLR (chTLR) と現在までに報告されているヒトTLR (huTLR) 1-10 をアミノ酸レベルで比較し、全体 (Total) またはLRRドメインが複数個存在する細胞外領域 (LRR)、細胞内のTIRドメインのみでそれぞれ比較した場合の相同性を示した。また、括弧内の相同性は、Type 1、Type 2に特異的なORF中央部のみを比較した場合を示している。

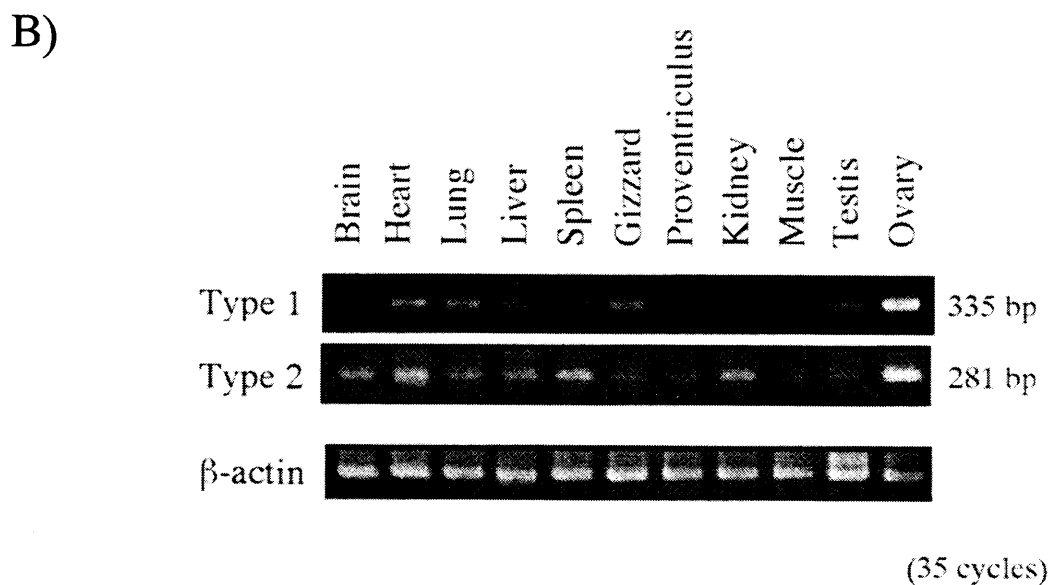
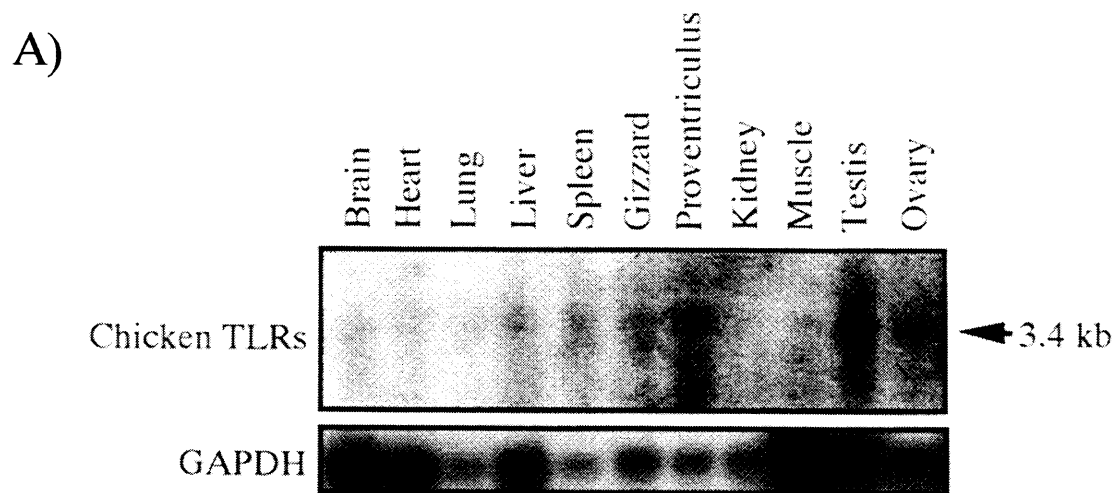


図1-6. ニワトリTLR mRNAの組織分布

- A) ニワトリTLRの mRNAの組織分布をNorthern blot解析により検討した。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ で標識したType 2のORF全長をプローブとして用いた。なお、コントロールとして、ニワトリGAPDHに対するプローブを用いて、同様に検出した。
- B) ニワトリTLR Type 1、Type 2について、それぞれのmRNAの組織分布をRT-PCRにより検討した。なお、コントロールとして、 $\beta\text{-actin}$ に対するプライマーを用いて、同条件で反応を行った。

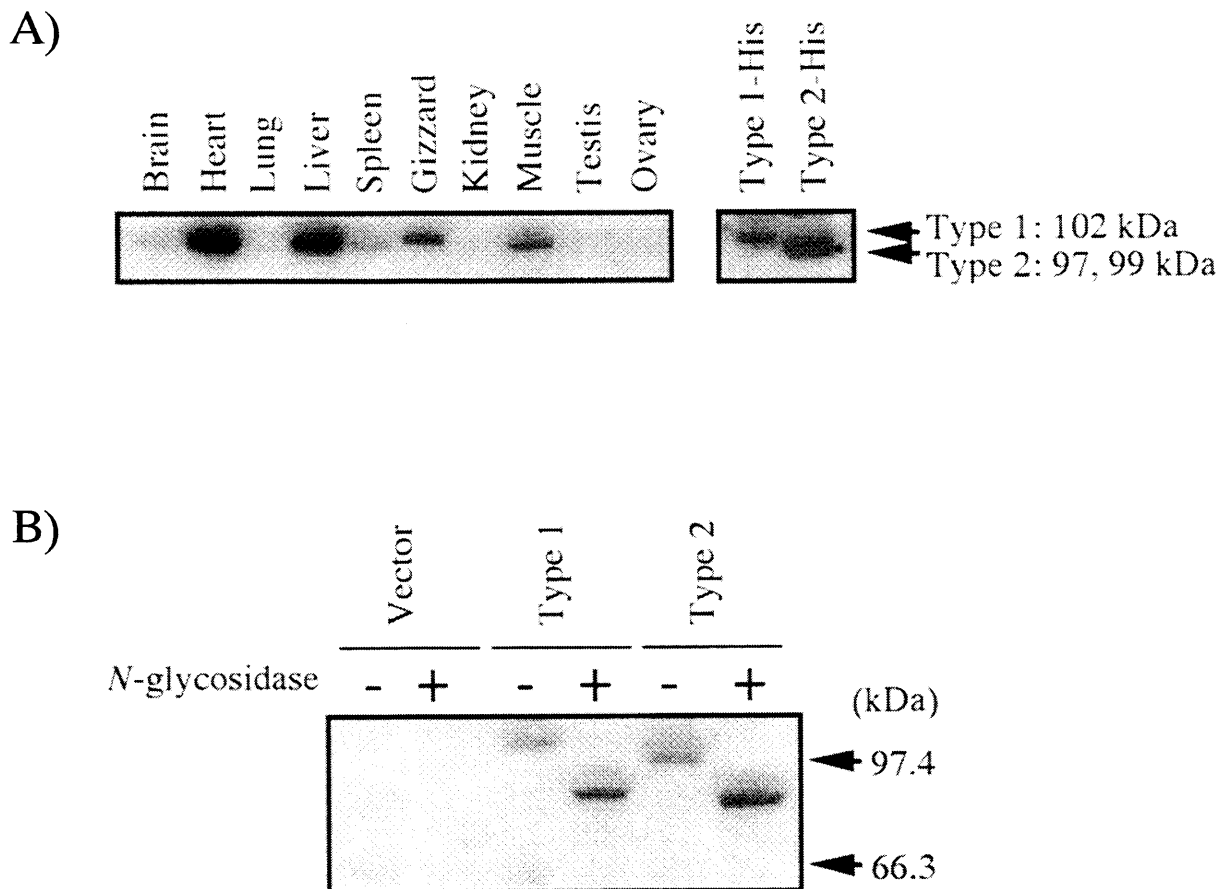


図1-7. ニワトリTLRタンパク質の組織分布 (A) と糖鎖付加量 (B) の検討

A) ニワトリTLRのタンパク質の組織分布をWestern blot解析により検討した。各ニワトリ組織から採取したタンパク試料500 μ g (BSA当量) をSDS-PAGE (6%アクリルアミド) で分離した。これをPVDF膜に転写した後、抗ニワトリTLRポリクローナル抗体を用いて検出した。なお、コントロールとして、ニワトリTLRのリコンビナント体 (C末端にHis-tagを付加したニワトリTLR) を発現させたRK13細胞の可溶化試料を用いた (右の2レーン)。

B) ニワトリTLRに付加するN-結合型糖鎖量を検討した。ニワトリTLRを発現させたRK13細胞を可溶化後、N-glycosidaseで処理した (+) 可溶化試料と未処理 (-) の可溶化試料をSDS-PAGE (7.5%アクリルアミド) で分離した。PVDF膜に転写した後、抗ニワトリポリクローナル抗体を用いて検出した。図の右側に分子量マーカを示した。

1-4. 考察

現在までに機能が報告されている Toll/TLR は哺乳類と昆虫類のみである。本研究では、哺乳類よりも下等な鳥類における TLR の単離および機能解析を行い、哺乳類のそれと比較することを目的とした。

まず、ニワトリ TLR のクローニングを試みたところ、ファブリキウス囊の cDNA ライブラリーから 2 種類のニワトリ TLR (Type 1、Type 2) の cDNA を単離することに成功した。ニワトリ TLR Type 1 と Type 2 の cDNA の特徴として、1) 開始メチオニン付近と終止コドン付近および ORF 中央部の約 600 bp の塩基配列が互いに異なっているだけで、その他の塩基配列は全く同じであること、2) 両者のイントロンは共に開始メチオニンの直前に存在し、ORF が一つのエクソンでコードされていることが挙げられる。これらのことから、ニワトリ TLR Type 1 と Type 2 は、オルタナティブスプライシングによってできたものではなく、異なる遺伝子でコードされていると推測された。配列の一部が異なるだけであるにもかかわらず、別々の遺伝子でコードされている TLR は、今までに報告されていない。ニワトリのゲノムサイズはヒトの約 3 分の 1 しかなく、MHC に至っては 10 分の 1 であると報告されている (47)。そのため、ニワトリでは遺伝子産物に多様性を持たせるために、遺伝子の重複と組換えが頻繁に起こっていると考えられる。実際、ニワトリにおける物理的ゲノムサイズ当たりの染色体組換え頻度は、ヒトの約 2.5 倍、マウスの約 6 倍であることが示されている (48)。本研究の 1-3-1 (2) の FISH 解析において、両タイプのニワトリ TLR が同一染色体上の近傍に検出されたことから (図 1-4 B)、Type 1 と Type 2 は、重複した遺伝子の組換えによって、分子の多様性を遺伝子レベルで獲得したものである可能性が示された。

ニワトリ TLR は、その予想されるアミノ酸配列より、細胞外領域は 12 (Type 1) または 13 (Type 2) 個の LRR ドメインで、細胞内領域は TIR ドメインで構成される I 型の膜タンパク質であることが明らかとなった。また、ニワトリ TLR は、両タイプ共にヒト TLR2 に最も相同性が高く、特に、TIR ドメインは 80% と非常によく保存されていた。一方、LRR ドメインが連続して存在する細胞外領域の相同性は 50% 弱にとどまっていたことから、TLR の細胞内シグナル伝達系が種を越えて保存されているのに対し、認識できるリガンドは動物種によって異なることが示唆された。この相違は、哺乳類と鳥類の生活空間や食生活の違いによるものであると思われる。

Northern blot と RT-PCR 解析から、ニワトリ TLR の mRNA は種々の臓器に発現していることが明らかとなった。これは、脳、肺、脾臓、筋肉、末梢血リンパ球にその発現が局在しているヒトやマウス TLR2 (17, 49-51) とは異なり、ニワトリ TLR が多機能タンパク質である可能性を示している。一方、タンパク質は肝臓、脾臓に加え、心臓、砂のう、筋肉といった結合組織を多く含むような臓器に強い発現が認められた。これまで TLR のタンパク質レベルでの組織分布は不明であったが、本研究において初めて、免疫関連臓器のみならず、結合組織を含む臓器にも強く発現して

いることが明らかとなった。ショウジョウバエ Toll が筋組織の分化に関わっているという報告もあり (52)、結合組織における TLR の発現意義について興味を持たれる。また、mRNA とタンパク質の発現分布が一致していない点について、本研究で明らかにすることはできなかった。しかし、TLR のタンパク質の発現量が極端に低いことや (53)、ある種の細胞株では TLR の mRNA が発現していても、タンパク質の発現は確認できないことが報告されている (30)。TLR のタンパク質の発現調節機構は不明な点が多く、これからの解析が期待される。

また、ニワトリ TLR のタンパク質は、両タイプともに糖鎖修飾されており、Type 1 は Type 2 よりも多く糖鎖が付加していることがわかった。最近、ヒト TLR4 において *N*-結合型糖鎖がその機能に関わっていることが報告されたことから (54)、ニワトリ TLR 両タイプにおける糖鎖量または糖鎖付加部位の違いが、それぞれの機能に影響を及ぼす可能性が考えられる。また、Type 2 で検出された 2 本のバンドは、*N*-glycosidase 処理後に一本のバンドとして検出されたことから、糖鎖付加量の異なる 2 種の Type 2 の存在が明らかとなった。

第 2 章 ニワトリ TLR の機能解析

第 1 章で単離したニワトリ TLR Type 1 と Type 2 の異物認識/シグナル伝達レセプターとしての機能を検討した。HEK293 細胞とニワトリ TLR を発現させた HEK293 細胞において、種々の刺激を加えた時の NF- κ B の活性化をレポータージーンアッセイにより測定し、比較検討したので、以下に報告する。

2-1. 実験材料および試薬

細胞

ヒト腎由来 HEK293 細胞は、10% (v/v) 非働化 FCS、100 U/ml penicillin G、100 µg/ml streptomycin sulfate を含む DMEM を用いて 37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。

抗体

抗ヒト CD14 モノクローナル抗体 (3C10) および抗ヒト CD14 ポリクローナル抗体 (55) は、九州大学医学部牟田達史博士より供与された。FACS 解析用の抗ヒト CD14 モノクローナル抗体 (RMO52) は IMMUNOTECH より購入した。また、FITC 標識ヤギ抗マウスまたはウサギ IgG F(ab')₂ 抗体は、American Qualex Antibodies のものを用いた。マウス抗 FLAG モノクローナル抗体 M2 は、Sigma より購入した。ヤギ抗ビオチン抗体およびブタ抗ヤギ IgG 抗体は、それぞれ Vector および Biosource より入手した。

細菌、細菌構成成分

Staphylococcus epidermidis (*S. epidermidis*, ATCC 12228)、*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC 10832)、*Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*)、*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*, ATCC 49619)、*Nisseria meningitidis* (*N. meningitidis*, ATCC 13090)、*Candida albicans* (*C. albicans*, ATCC 5527)、*Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*, 髄膜炎患者分離株)、*Mycobacterium bovis* (*M. bovis*, Bacillus Calmette-Guerin (BCG)) および *Mycobacterium avium* (*M. avium*) は、大阪府立公衆衛生研究所の鈴木定彦博士より供与された。*Schizosaccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*, L40) は、北海道大学の山本隆晴博士より供与された。*Escherichia coli* (*E. coli*, DH5α) は、Life Technologies より購入した。

E. coli O127: B8 LPS は Life Technologies より購入した。*Salmonella minnesota* (*S. minnesota*) Re595、*Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) および *S. typhimurium* Re LPS は Sigma のものを用いた (図 2-10 参照)。*S. aureus* の peptidoglycan (PGN) および lipoteichoic acid (LTA) はそれぞれ FLUKA と Sigma より購入した。また、MALP-2 は、文献 (56) に従って合成されたものを用いた。

発現プラスミド

ヒト CD14 の発現プラスミド (ベクター: pME18s) は、筑波大学の西村仁博士より (57)、ヒト MD-2 の発現プラスミド (ベクター: pEFBOS, C 末端に His-tag と FLAG-tag が導入されている) は、東京大学医科学研究所の三宅健介博士から (33) それぞれ供与された。ニワトリ MD-1 およびヒト TLR2 は、当研究室において単離したものを、発現ベクター pME18s と pEFBOS にそれぞれ組み込んだ。

試薬

Flow cytometry (FACS) 解析

FACS buffer 0.1% BSA, 0.1% NaN₃, D-PBS

免疫沈降

TBS 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4), 0.75 M NaCl

1 mM DTSSP 3 mg DTSSP, 5 ml D-PBS

Lysis buffer 1% (w/v) NP-40, 0.15 M NaCl, 10 mM EDTA, 1 mg/ml
iodoacetamide, 1 mM PMSF, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)

2-2. 方法

2-2-1. Flow cytometry (FACS) 解析

ニワトリ TLR を一過的に発現させた HEK293 細胞をピペッティングによりはがし、FACS buffer で 3 回洗浄した。1 X 10⁶ 個の細胞に対し、FACS buffer で 50 µg/ml に調製したウサギ抗ニワトリ TLR 抗体またはウサギ IgG を 30 µl 加え、4°C で 1 時間反応させた。細胞を FACS buffer 500 µl で 3 回洗浄し、同 buffer で 25 µg/ml に調製した FITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG F(ab')₂ 抗体 30 µl を加えて 4°C で 30 分さらに反応させた。再び細胞を FACS buffer 500 µl で 3 回洗浄した後、同 buffer 500 µl で再懸濁し、細胞の蛍光強度を FACSCalibur (Becton-Dickinson) で測定した。なお、ヒト CD14 検出の際は、1 次抗体に 25 µg/ml の抗ヒト CD14 モノクローナル抗体 (RMO52) 30 µl を用い、2 次抗体として 25 µg/ml に調製した FITC 標識ヤギ抗マウス IgG F(ab')₂ 抗体を 30 µl 使用した。

2-2-2. ルシフェラーゼレポータージーン解析

(1) トランスフェクション

HEK293 細胞を 3 X 10⁵ cells/2 ml/well で 6-well プレートにまいた。翌日、1 well 当たり発現プラスミド 5 µg、NF-κB レポータープラスミド (pNFκB-Luc, Stratagene) 0.5 µg、pSV-β-Galactosidase コントロールベクター (Promega) 0.025 µg をリン酸カルシウム法 (Mammalian Transfection kit, Stratagene) によりトランスフェクションした。24 時間以内に D-PBS で 1 回洗浄後、培地交換を行った。解析には、トランスフェクション後 40-48 時間の細胞を用いた。なお、ニワトリ TLR、ヒト CD14、ヒト MD-2 を含む発現プラスミドはそれぞれ 2.5 µg トランスフェクションし、ヒト TLR2 を含む発現プラスミドは 0.25 µg 用いた。インサートの入っていない空のベクター (pME18s) で、トランスフェクションに用いる DNA 総量を 5 µg に調製した。

(2) ルシフェラーゼアッセイ

トランスフェクション後の 293 細胞を 6-well プレートから 24-well プレートにまき直した。その際、6-well プレートの 1 well 分の細胞を 24-well プレートの 5 または 6 well に均等にまき、培地は 1 well 当たり 0.5 ml または 1 ml とした。様々な刺激物を添加した後、37°C、5% CO₂ 存在下で 6 時間培養し、細胞を回収した。回収した細胞は、D-PBS 500 µl で 2 回洗浄し、1 X lysis buffer (β-Galactosidase Enzyme Assay System, Promega) 100 µl を加えて -80°C で凍結させた。その後、室温で 15-20 分間インキュベートし、12,000 rpm で 2 分間遠心して上清の可溶化試料を回収した。可溶化試料中のルシフェラーゼ量は、PicaGene (東洋インキ) のルシフェラーゼ基質を用いて、ALOKA ルミネッセンスリーダー (BLR-201) で測定した。また、可溶化試料中の β-Galactosidase 量を β-Galactosidase Enzyme Assay System によって測定し、トランスフェクション効率を求めた。なお、ルシフェラーゼアッセイの原理を図 2-1 に示した。

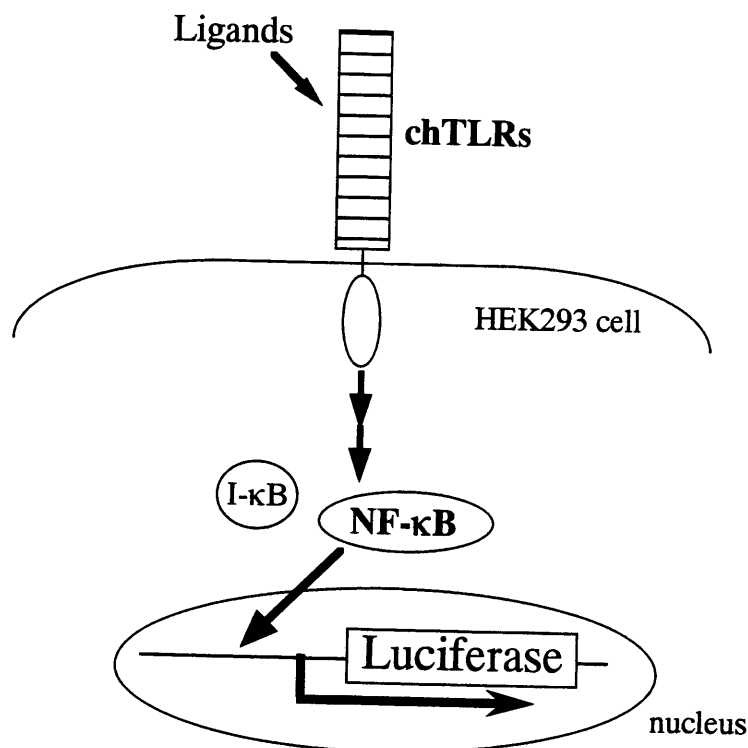


図2-1. HEK293細胞を用いたルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ

HEK293細胞にニワトリTLRの発現プラスミド、NF-κBレポータープラスミド、およびトランスフェクション効率測定用のβ-Galactosidaseコントロールベクターを同時にトランスフェクションした。40-48時間後の細胞を各刺激物で6時間刺激し、可溶化した後、試料中のルシフェラーゼ量を測定した。

(3) 刺激物の調製

各種 LPS は、市販の粉末を滅菌済みの D-PBS で 1 mg/ml に調製して用いた。MALP-2 は、2-1 で示した方法に従って合成し、25 mM の octyl-glucoside-D-PBS で 200 μM になるように可溶化して用いた。*S. aureus* 由来の PGN または LTA は、市販の粉末を D-PBS で 1 mg/ml に調製し、使用直前にソニケーションを行った。また、各種細菌は、UV または加熱処理 (60°C、30 分) で死菌にした後、D-PBS で洗浄し、同バッファーで OD₆₀₀ が 0.5 または 1.0 になるように懸濁したものを反応系に加えた。なお、LPS、細菌以外の刺激物は、常に polymyxin B (Sigma) 処理してから用いた。刺激物の polymyxin B 処理は、D-PBS で 1 mg/ml に調製し、フィルター滅菌した polymyxin B を刺激物に対して等量加え、37°C で 1 時間インキュベートすることにより行った。

2-2-3. 抗ニワトリ TLR 抗体のビオチン標識

D-PBS で 1 mg/ml に調製した抗ニワトリ TLR ポリクローナル抗体を 0.1 M NaHCO₃ (pH 8.5) バッファーに対して透析した。使用直前に Sulfo-NHS-Biotin (Vector) を 0.1 M NaHCO₃ (pH 8.5) バッファーで 1 mg/ml に調製し、この溶液 60 μl を抗体溶液 1 ml に加え、室温で 2 時間攪拌した。反応後、溶液を D-PBS に対して透析し、4°C、10,000 rpm で 10 分間遠心して、上清の抗体溶液を回収した。

2-2-4. 免疫沈降

HEK293 細胞にリン酸カルシウム法でニワトリ TLR Type 2 単独、もしくは Type 2 とヒト CD14 をそれぞれ含む発現プラスミドを同時にトランスフェクションし、48 時間後に *S. typhimurium* LPS (終濃度 1 $\mu\text{g/ml}$) を加えて 37°C で 1 時間インキュベートした。その後、回収した細胞を D-PBS で 3 回洗浄し、1 mM DTSSP (PIERCE) を 1×10^7 cells/ml になるように加え、4°C で 1 時間攪拌して細胞膜上の分子を架橋した。その後、細胞を TBS で 1 回、続いて D-PBS で 2 回洗浄し、lysis buffer を加え、 1×10^7 cells/ml の濃度で可溶化した。これを 4°C、15,000 rpm で 20 分間遠心し、その上清を可溶化試料とした。可溶化試料 150 μl ずつをマウスおよびウサギ IgG 合わせて 5 μg を予め吸着させた ProteinG Sepharose (Amersham Pharmacia) 10 μl に加え、氷上で時々 vortex しながら非特異的に吸着するタンパク質を取り除いた。1 時間後、可溶化試料と ProteinG Sepharose の入った 1.5 ml チューブの底にマイクロインジェクター (Terumo) で穴を開け、3,000 rpm で 1 分間遠心して上清とゲル (プレクリア画分) を別々に回収した。この上清に抗ヒト CD14 モノクローナル抗体 (3C10) 3 μg を加え、4°C で一晩反応させた。これを、lysis buffer で洗った ProteinG Sepharose 10 μl に加え、4°C で 1 時間攪拌し、吸着画分としてゲルを、非吸着画分として上清を回収した。吸着画分およびプレクリア画分のゲルについて、lysis buffer で 3 回洗浄した後、2 X SDS sample buffer を 10 μl 加え、100°C で 5 分間処理して泳動サンプルとした。一方、非吸着画分は、30 μl (1/5 量) を泳動サンプルとした。これらのサンプルは、還元条件下で SDS-PAGE (7.5%アクリルアミド) 後、ビオチン標識ウサギ抗ニワトリ TLR 抗体 (5 $\mu\text{g/ml}$)、続いてヤギ抗ビオチン抗体、さらにブタ抗ヤギ IgG 抗体を用いた Western blot 解析で、ニワトリ TLR を検出した。

2-3. 実験結果

1. ニワトリ TLR の異物認識/シグナル伝達分子としての機能
2. ニワトリ TLR を介したシグナル伝達におけるヒト CD14 依存性
3. 異物におけるニワトリ TLR の認識部位
4. ニワトリ TLR が認識する細菌および細菌成分の検討

2-3-1. ニワトリ TLR の異物認識/シグナル伝達分子としての機能

ヒト TLR2 または TLR4 発現細胞では、リガンドとなる刺激物の添加により転写因子 NF- κ B が活性化する (15-16)。そこで、ニワトリ TLR の異物認識/シグナル伝達分子としての機能を検討するため、ニワトリ TLR 発現細胞における NF- κ B の活性化をルシフェラーゼを用いたレポータージーン解析により測定した。この解析に、ヒト由来の HEK293 細胞を用いた理由として、ニワトリ TLR の細胞内領域 TIR ドメインがヒト TLR2 のそれと 80% の相同性を示し (表 1-1)、両動物種間においてシグナル伝達系が類似している可能性が考えられたことが挙げられる。なお、HEK293 細胞には、ヒト TLR2 と 4 が mRNA レベルで発現していないことが明らかになっている (55)。

まず、ヒト TLR2 のリガンドとされているマイコプラズマ由来のリポペプチド MALP-2 で両ニワトリ TLR 発現細胞を刺激したところ、両者において NF- κ B の活性化が認められた (図 2-4 A)。次に、HEK293 細胞上での両タイプの発現量を FACS と Western blot 解析により調べたところ、Type 2 は Type 1 よりも発現量が低かったが (図 2-3 A)、NF- κ B の活性化を強く引き起こしていることがわかった。また、両タイプを共発現させると、それぞれの単独発現時よりも活性化が若干強まったが、顕著な正の相乗効果は認められなかった (図 2-4 A)。

次に、ヒト TLR4 のリガンドである LPS で刺激した場合も同様に検討した。ヒト TLR4 は LPS の情報を伝達する際に、LPS レセプターとして知られる CD14 (58) とコファクターである MD-2 の両方を必要とすることが今までに報告されている (34) (図 2-2)。そこで、ニワトリ TLR とヒト CD14 またはヒト MD-2 を共発現させた HEK293 細胞 (ニワトリ TLR-CD14/293、ニワトリ TLR-MD-2/293) における、LPS 刺激時の NF- κ B の活性化を調べた。*E.coli* LPS 刺激の場合、Type 2 では、Type 2-CD14/293 または Type 2-MD-2/293 において NF- κ B の活性化がみられた。特に Type 2-CD14/293 では、コントロールの約 3 倍の活性化が引き起こされた。一方、Type 1 発現細胞では、ヒト CD14 や MD-2 の共存にかかわらず NF- κ B は活性化しなかった (図 2-4 B)。Type 1 または Type 2 とヒト CD14 や MD-2 との共発現細胞におけるヒト CD14 と MD-2 の発現量を調べたところ、その発現量は両タイプ間で差が認められなかった (図 2-3 B)。なお、ニワトリ TLR-CD14-MD-2/293 についても検討したが、3 分子の共発現による顕著な正の相乗効果は確認できなかった (データは示さない)。

さらに、ニワトリ MD-1 共発現細胞における NF- κ B の活性化についても検討した (図 2-5)。ヒト MD-1 は、LRR タンパク質 RP105 のコファクター分子で、RP105 および TLR4 と分子集合体を形成し、B 細胞上で LPS を認識している言われている (59-61)

(図 2-2)。一方、ニワトリでは、MD-1 が Myb 誘導遺伝子としてすでにクローニングされているが (62)、RP105 の存在は不明である。そこで、ニワトリ MD-1 が、本研究で単離したニワトリ TLR の直接的なコファクターと成り得るかどうかを検討した。その結果、MALP-2、LPS のいずれで刺激した場合も、ニワトリ MD-1 は Type 1 および Type 2 を介した NF- κ B の活性化に影響を与えなかった。なお、ニワトリ MD-1 の発現は、どちらのタイプのニワトリ TLR 発現細胞においてもほぼ同等であった (図 2-3 B)。

2-3-2. ニワトリ TLR を介したシグナル伝達におけるヒト CD14 依存性

2-3-1 (図 2-4 B) で述べたように、*E.coli* LPS 刺激の場合、ニワトリ TLR-CD14/293 において NF- κ B の活性化が増強されることを見いだした。そこで、様々な刺激物を用いたときのヒト CD14 による増強効果について調べた。

MALP-2 刺激では、Type 1-CD14/293、Type 2-CD14/293 の両方において、ニワトリ TLR 単独発現時に比べ NF- κ B の活性化が 3-5 倍に増強された (図 2-6 上)。次に、由来の異なる 3 種の LPS を用いて同様に実験を行ったところ、*E. coli* と *S. typhimurium* LPS の刺激により、Type 2-CD14/293 において Type 2 単独発現細胞の約 3 倍の応答がみられた (図 2-6 下)。一方、Type 1 発現細胞はヒト CD14 の存在にかかわらず、LPS には応答しなかった。また、ヒト CD14 単独発現細胞では、いずれの刺激を加えた場合も NF- κ B の活性化は起こらなかった。

ヒトの場合、CD14 への LPS の輸送には血清中の LPS-binding protein (LBP) が必要であることが知られている (63, 64) (図 2-2)。そこで、先に見られたヒト CD14 による NF- κ B 活性化の増強効果に、FCS 中の LBP が関与しているかどうかを調べるため、これまでの実験系である FCS 添加培地条件下をコントロールとし、FCS 非添加培地条件下での NF- κ B の活性化を比較した。FCS 非添加培地条件では、LPS 刺激による NF- κ B の活性化が、Type 2/293、Type 2-CD14/293 のどちらにおいてもほとんど消失した (図 2-7 下)。同様に、MALP-2 刺激による NF- κ B の活性化も、ニワトリ TLR-CD14/293 において低くなり、ヒト CD14 による増強効果が弱まった。しかし一方で、ニワトリ TLR 単独発現細胞では、FCS 非添加培地条件の方が MALP-2 刺激による NF- κ B の活性化が強かった (図 2-7 上)。

次に、ヒト CD14 共発現によるニワトリ TLR の発現量の変化を調べた。MALP-2 または LPS 刺激時、未刺激時において、ヒト CD14 の共発現によりニワトリ TLR の発現量が大きく変化することはなかった (図 2-8)。この結果から、ヒト CD14 はニワトリ TLR の発現量に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

さらに、ニワトリ TLR Type 2 とヒト CD14 の細胞膜上での相互作用を、免疫沈降法により検討した。その結果、*S. typhimurium* LPS で刺激した Type 2-CD14/293 の可溶化試料を抗ヒト CD14 抗体で免疫沈降したが、ニワトリ TLR は共沈してこなかった (図 2-9)。この結果から、ヒト CD14 がニワトリ TLR と直接、強力に相互作用している可能性は低いと考えられた。なお、抗ヒト CD14 ポリクローナル抗体を用い

て、ヒト CD14 が 1% NP-40 を含む lysis buffer で細胞膜から可溶化されていることを確認している (データは示さない)。

2-3-3. 異物におけるニワトリ TLR の認識部位

LPS は、lipidA、R コアおよび O 抗原多糖部から構成されている (図 2-10)。現在までに、ヒトやマウス TLR4 の LPS 認識部位として lipidA が指摘されている (21, 33)。そこで、ニワトリ TLR の LPS 認識部位を検討した。図 2-6 の結果をみると、Type 2/293 または Type 2-CD14/293 では、*S. typhimurium* LPS 刺激で応答が起こるが、同じサルモネラ属の *S. minnesota* Re595 LPS では応答が起こっていない。*S. minnesota* Re595 LPS は、R コアおよび O 抗原多糖部を欠損した Re 型 LPS であることから、ニワトリ TLR が LPS の糖鎖を認識している可能性が考えられた。そこで、糖鎖を欠損した *S. typhimurium* の Re 型 LPS (以下 St.-ReLPS) を刺激物とし、ニワトリ TLR Type 2 を介した NF- κ B の活性化を糖鎖を持つ *S. typhimurium* LPS (以下 St.-LPS) の場合と比較した。その結果、St.-ReLPS で刺激すると、Type 2/293 では全く活性化がみられず、また Type 2-CD14/293 での活性化は St.-LPS 刺激時の約 5 分の 1 に減少した (図 2-11)。これらの活性化が LPS 自身によるものであるかどうかを確かめるため、それぞれの LPS を polymyxin B で処理し、失活させてから加えたところ、St.-LPS による NF- κ B の活性化がほとんど完全に抑制されたのに対して、St.-ReLPS による活性化は全く抑制されなかった (図 2-11)。菌体から精製した St.-ReLPS 試料には、LPS 以外の菌体成分も含まれていることが報告されている (35)。従って、St.-ReLPS 刺激で見られた Type 2-CD14/293 における NF- κ B の活性化は、LPS ではなく、LPS 以外の混入物により引き起こされたものであることが考えられた。以上の結果から、LPS の糖鎖部分がニワトリ TLR Type 2 の認識部位である可能性が示された。

ヒト TLR2 についても同様に、認識部位の検討を行った。ヒト TLR2 発現細胞においても St.-LPS 刺激で NF- κ B の活性化が見られたが、ニワトリ TLR とは異なり、ヒト CD14 共発現による正の相乗効果はほとんど認められなかった (図 2-11 上)。一方、St.-ReLPS で刺激すると、St.-LPS 刺激時に比べてヒト TLR2/293 で約 50%、ヒト TLR2-CD14/293 で若干 NF- κ B の活性化が小さくなるものの、強い活性化が認められた (図 2-11 下)。両 LPS を polymyxin B 処理により失活させると、St.-LPS 刺激時のヒト TLR2/293 およびヒト TLR2-CD14/293、St.-ReLPS 刺激時のヒト TLR2/293 において、polymyxin B 未処理の時に比べて約 50%の活性が抑制された。この結果から、ヒト TLR2 は、St.-LPS、St.-ReLPS のどちらも認識することができ、その認識に糖鎖は必須ではないことが示された。しかし、どちらの LPS を polymyxin B 処理した場合も、NF- κ B の活性化は完全には抑制されなかった。さらに、5 倍量の polymyxin B で LPS を処理しても、活性化の抑制は 1 倍量の polymyxin B で処理した場合とほとんど変わらなかった (データは示さない)。このことから、ヒト TLR2 は、LPS を認識できるが、LPS 試料中に含まれる LPS 以外の物質に対しても非常によく反応することが示された (図 2-11)。

2-3-4. ニワトリ TLR が認識する細菌および細菌成分の検討

ニワトリ TLR のその他のリガンドを模索する目的で、様々なバクテリアに対する細胞応答を同様な実験方法で検討した。本研究では、ヒト TLR2 が認識する可能性のあるものを含め、7種類の細菌/真菌を用いた。その結果、グラム陽性細菌である *S. epidermidis*、*S. aureus*、*L. monocytogenes* の菌体を刺激物として用いた場合に、ニワトリ TLR/293 において NF- κ B の活性化が認められた (図 2-12)。これらの活性化は、いずれもヒト CD14 共発現下において増強された。また、グラム陰性菌である *N. meningitidis* 刺激では、Type 2-CD14/293 のみで細胞応答が見られた。本研究のこれまでの結果から考えると、この応答は *N. meningitidis* の LPS によるものと思われる (図 2-12)。次に、細菌のどの成分をニワトリ TLR が認識しているかを調べるため、NF- κ B の活性化を引き起こした *S. aureus* について、その菌体成分である peptidoglycan (PGN) と lipoteichoic acid (LTA) に注目し、同様な実験を行った (図 2-13)。その結果、PGN で刺激した場合に、Type 2-CD14/293 で NF- κ B の活性化が見られたことから、PGN はニワトリ TLR で認識される成分の一つであることが明らかとなった。

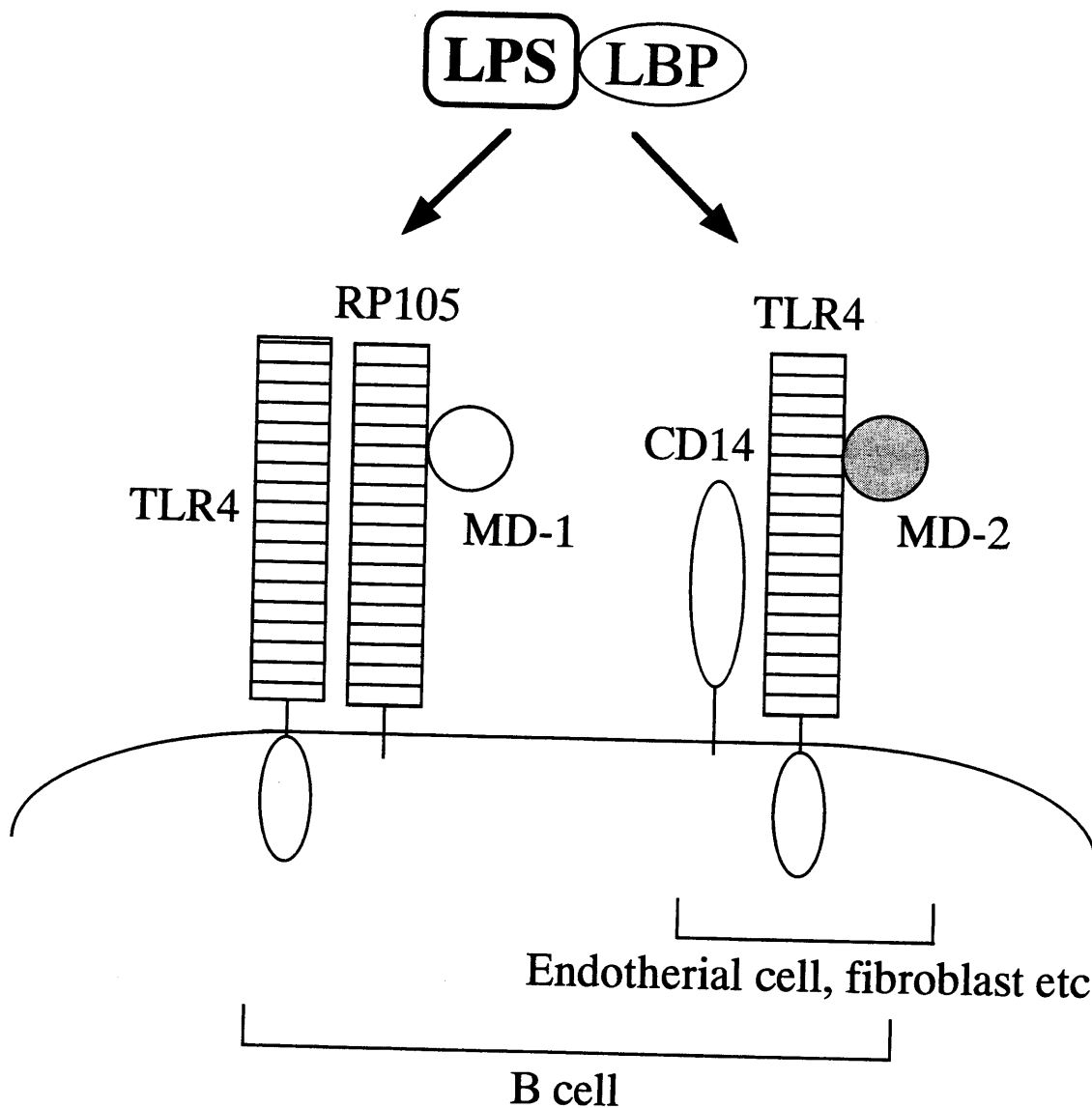


図2-2. ヒト細胞上におけるLPSの認識機構

現在までに報告されている、ヒト細胞上におけるLPS認識機構を示した。内皮細胞や繊維芽細胞などにおけるLPSの認識は、主にTLR4-CD14-MD-2の分子集合体が行っている。しかしB細胞では、B細胞特異的に発現しているLRRタンパク質RP105とコファクターである分泌タンパク質MD-1がTLR4と分子集合体を形成し、LPSを認識していると言われている。また、LPSはLPS-binding protein (LBP) によってこれらのレセプターに運ばれると考えられている。

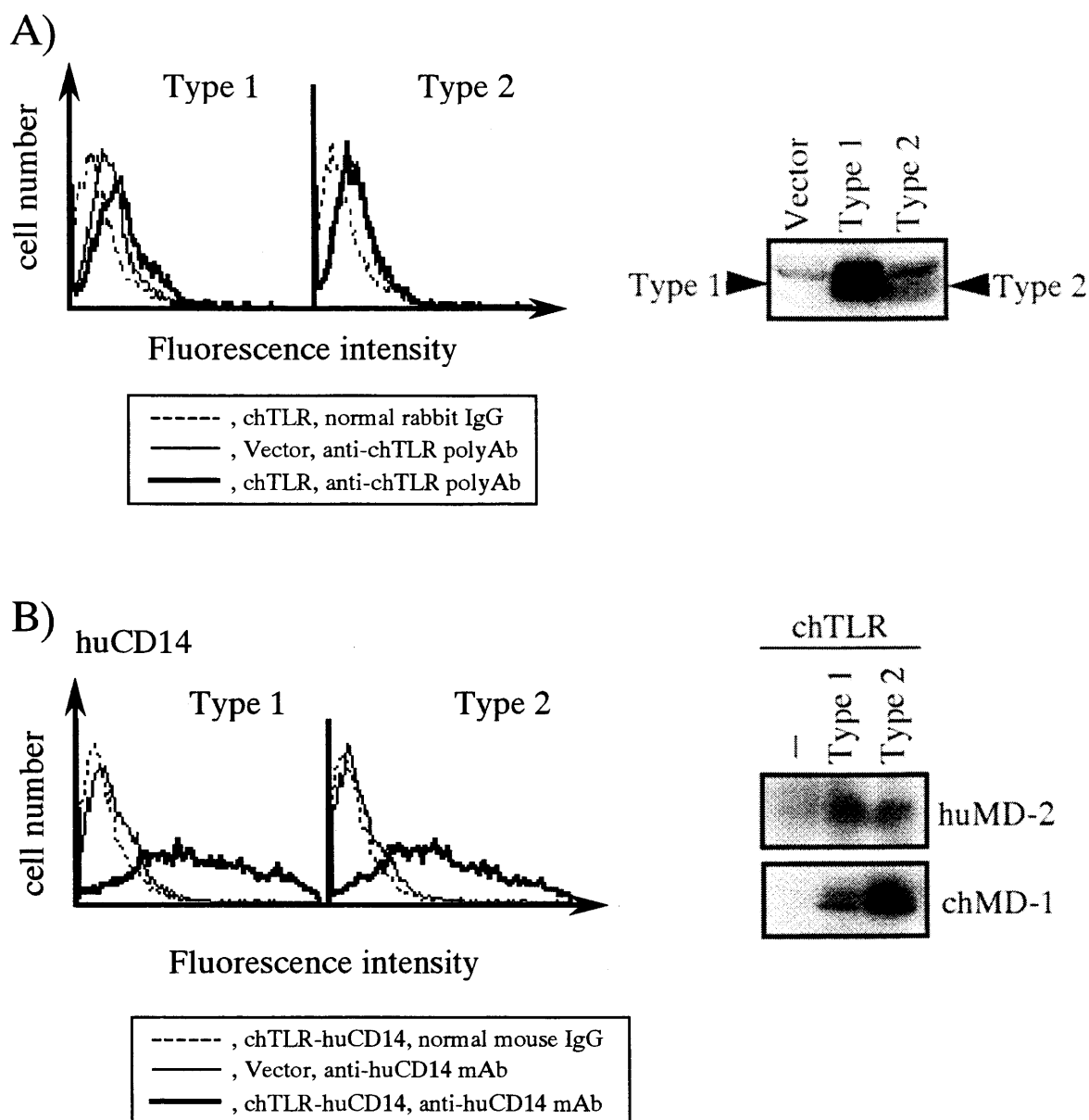
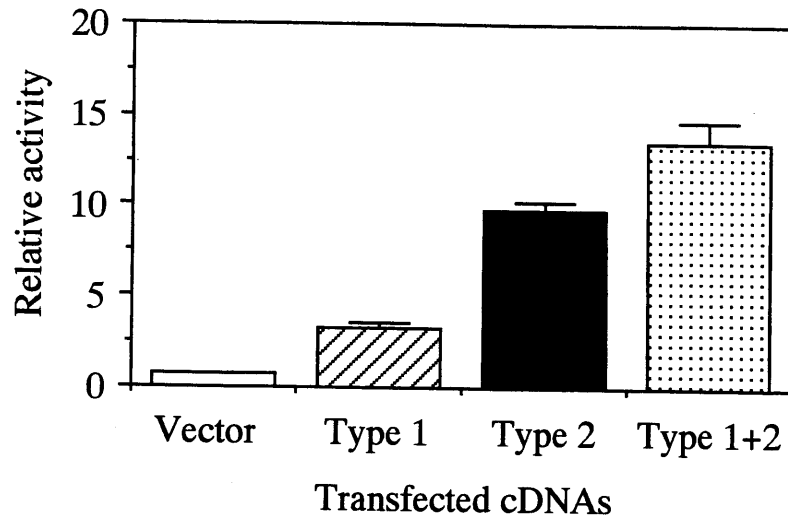


図2-3. ニワトリTLR (A) およびコファクター (B) のHEK293細胞における発現
 A) HEK293細胞に発現させたニワトリTLR (chTLR) について、FACS (左) とWestern blot解析 (右) を行った。1次抗体として抗ニワトリTLRポリクローナル抗体を用いた。なお、FACS解析後のヒストグラムの下に、3種のラインについて、トランスフェクトした発現プラスミドと検出抗体の組み合わせを示している。
 B) コファクターとして用いたヒトCD14 (huCD14)、ヒトMD-2 (huMD-2) およびニワトリMD-1 (chMD-1) の共発現細胞におけるそれぞれの発現量を調べた。細胞膜上のhuCD14の検出は、抗ヒトCD14モノクローナル抗体 (RMO52) を用いてFACS解析を行い (左)、培養上清中のhuMD-2およびchMD-1は抗FLAG抗体を用いWestern blot解析を行った (右)。なお、FACS解析後のヒストグラムの下に、トランスフェクトした発現プラスミドと検出抗体の組み合わせを示した。

A)



B)

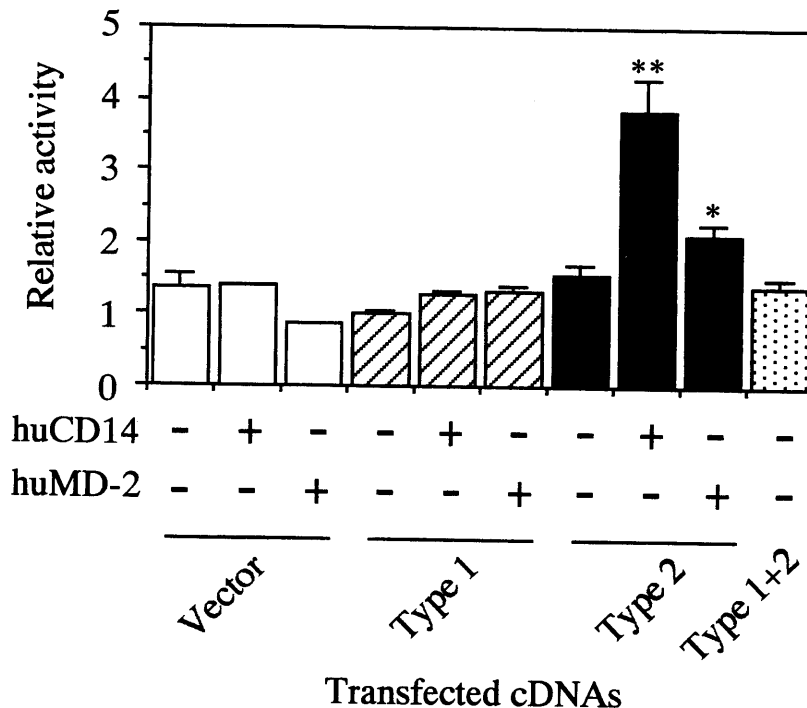


図2-4. MALP-2 (A) およびLPS (B) 刺激時のニワトリTLRを介したNF- κ Bの活性化
 A) MALP-2 (終濃度1 μ M) で各種cDNAをトランスフェクトしたHEK293細胞を刺激した。横軸は、用いたニワトリTLRのcDNA、またはインサートを含まない空ベクター (vector) を示している。縦軸は、空ベクターをトランスフェクトした細胞の未刺激時におけるルシフェラーゼ量を1として、それぞれのcDNAをトランスフェクトした細胞におけるNF- κ Bの活性化を比活性値で示している。

B) *E. coli* LPS (終濃度10 μ g/ml) で各種cDNAをトランスフェクトしたHEK293細胞を刺激した。横軸は、トランスフェクトしたcDNAの組み合わせ (+, トランスフェクトした; -, トランスフェクトしていない) を示している。また、図中のアステリスクは有意差を示している (**, $p < 0.005$; *, $p < 0.01$)。

なお、(A) および (B) の結果は、3回の実験から得られた3つ以上の値の平均値を標準偏差を付けて示した。

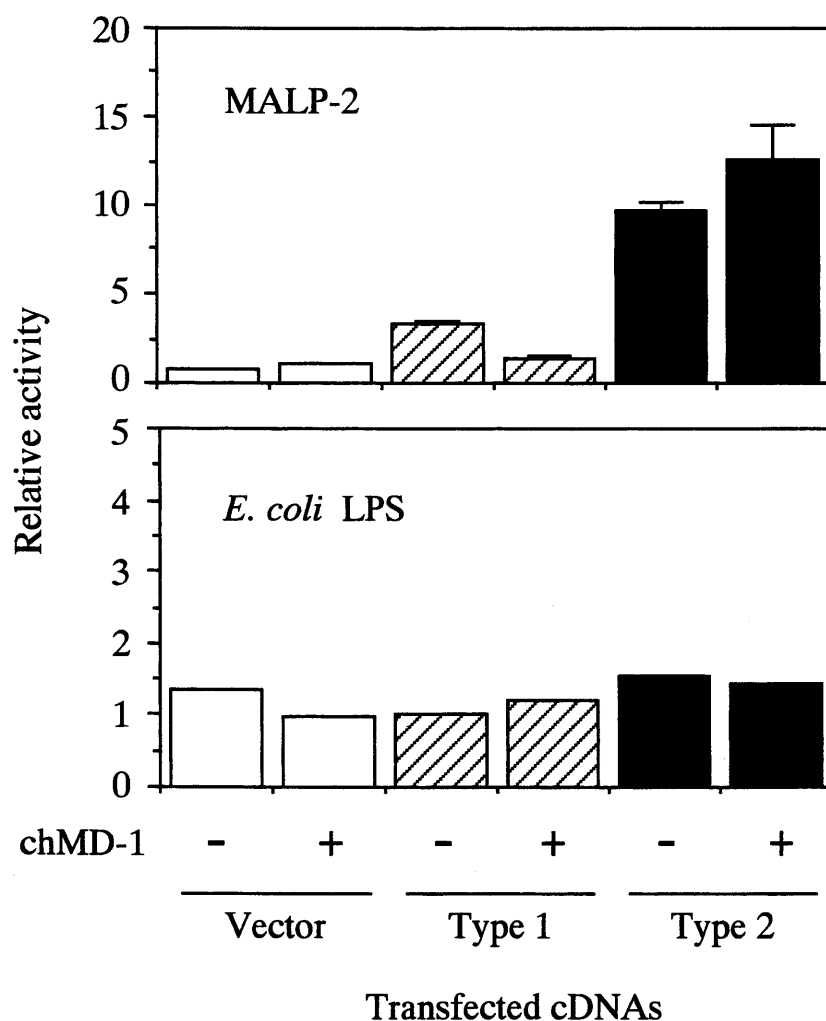


図2-5. ニワトリMD-1を共発現させた細胞におけるニワトリTLRを介したNF- κ Bの活性化

ニワトリTLRのみを発現させたHEK293細胞(-)およびニワトリTLRと共にニワトリMD-1(chMD-1)を発現させた細胞(+)を、MALP-2(終濃度1 μ M)(上)または*E. coli* LPS(終濃度10 μ g/ml)(下)で刺激し、NF- κ Bの活性化を検討した。NF- κ Bの活性化は、コントロール(vectorの未刺激時におけるルシフェラーゼ量)に対する比活性値で示した。

なお、これらの結果は、3回の実験から得られた3つ以上の値の平均値を標準偏差を付けて示した。

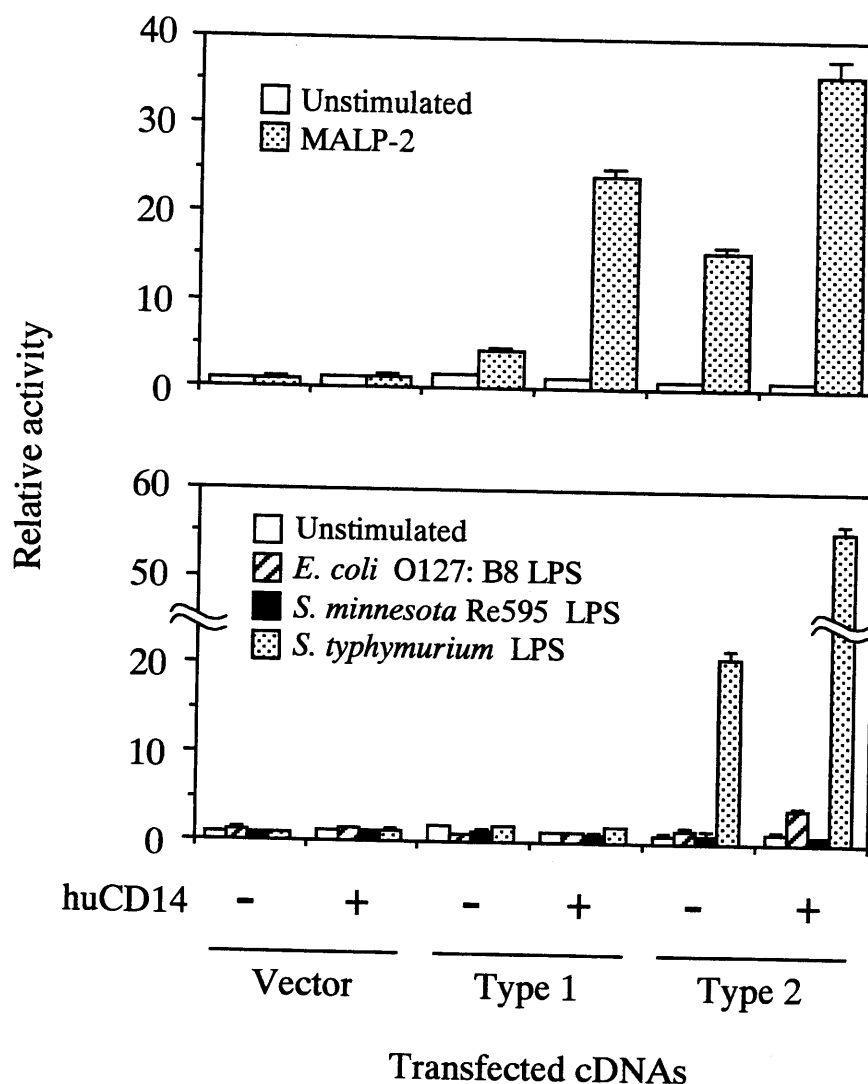


図2-6. ヒトCD14を共発現させた細胞におけるニワトリTLRを介したNF- κ Bの活性化

ニワトリTLRのみを発現させたHEK293細胞 (-) およびニワトリTLRと共にヒトCD14 (huCD14) を発現させた細胞 (+) を、MALP-2 (終濃度1 μ M) (上) または3種のLPS (*E. coli* O127: B8, *S. minnesota* Re595, *S. typhimurium*, 終濃度10 μ g/ml) (下) で刺激し、NF- κ Bの活性化を検討した。NF- κ Bの活性化は、コントロール (vectorの未刺激時におけるルシフェラーゼ量) に対する比活性値で示した。

なお、これらの結果は、3回の実験から得られた3つ以上の値の平均値を標準偏差を付けて示した。

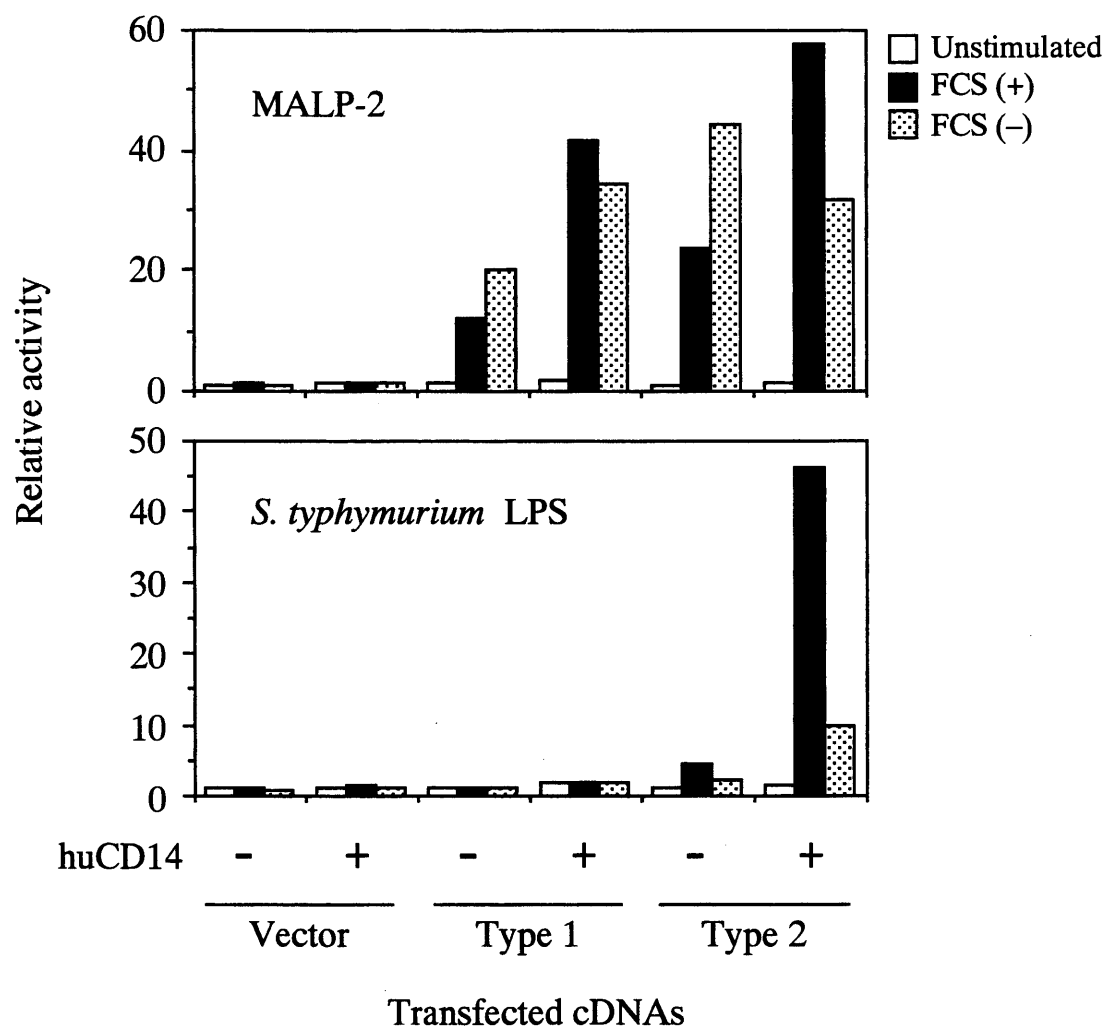


図2-7. ニワトリTLRを介したNF- κ Bの活性化に及ぼすFCS中の分子の影響

ニワトリTLRのみを発現させたHEK293細胞 (-) およびニワトリTLRとヒトCD14 (huCD14) を共発現させた細胞 (+) を、MALP-2 (終濃度0.8 μ M) (上)、または *S. typhimurium* LPS (終濃度1 μ g/ml) (下) で刺激し、NF- κ Bの活性化を、FCS存在下 (FCS (+)) またはFCS非存在下 (FCS (-)) で検討した。NF- κ Bの活性化は、コントロール (vectorの未刺激時におけるルシフェラーゼ量) に対する比活性値で示した。なお、3回行った実験のうち、1回の結果を代表で示している。他の実験結果もほぼ同様な傾向を示した。

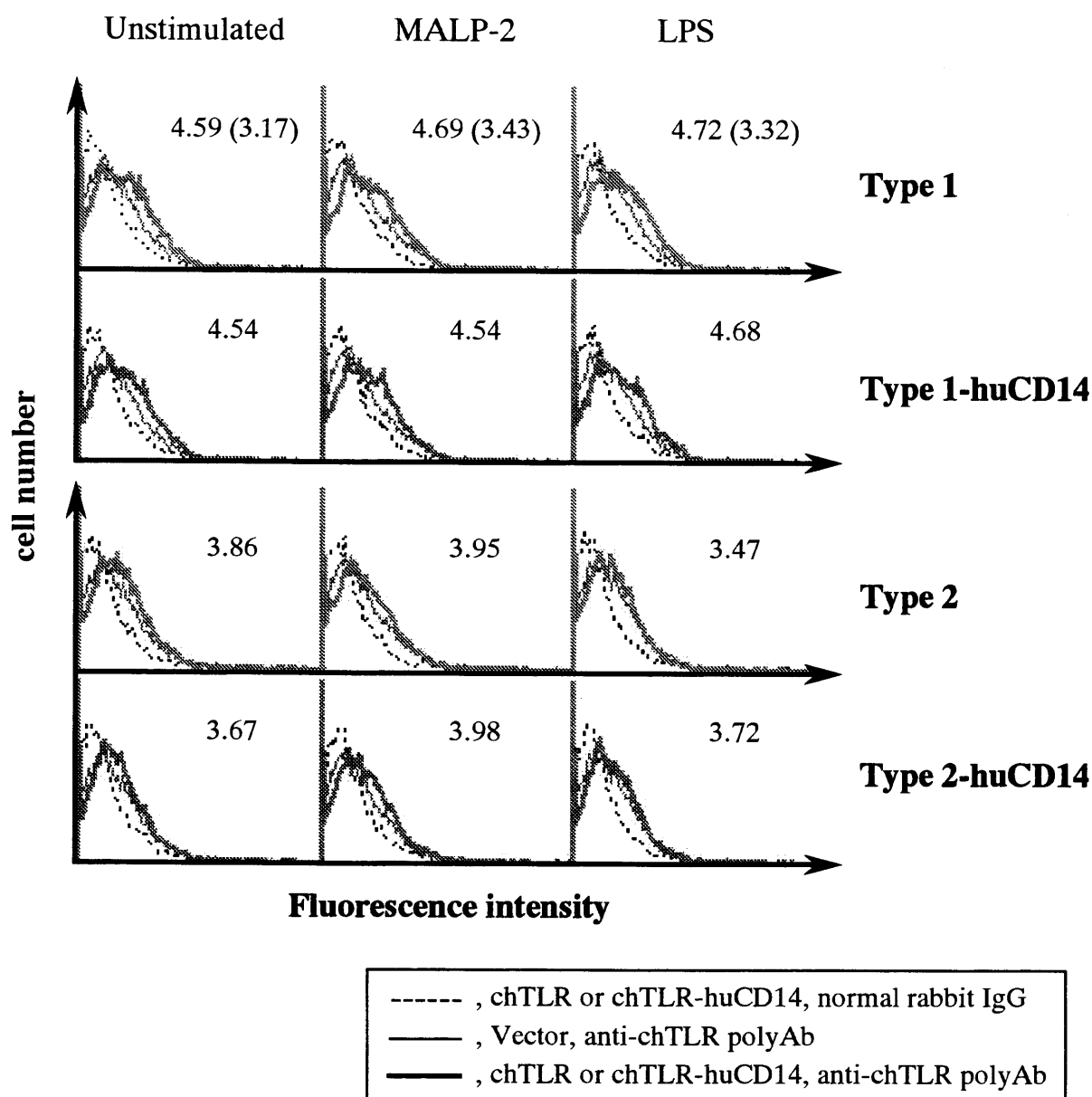
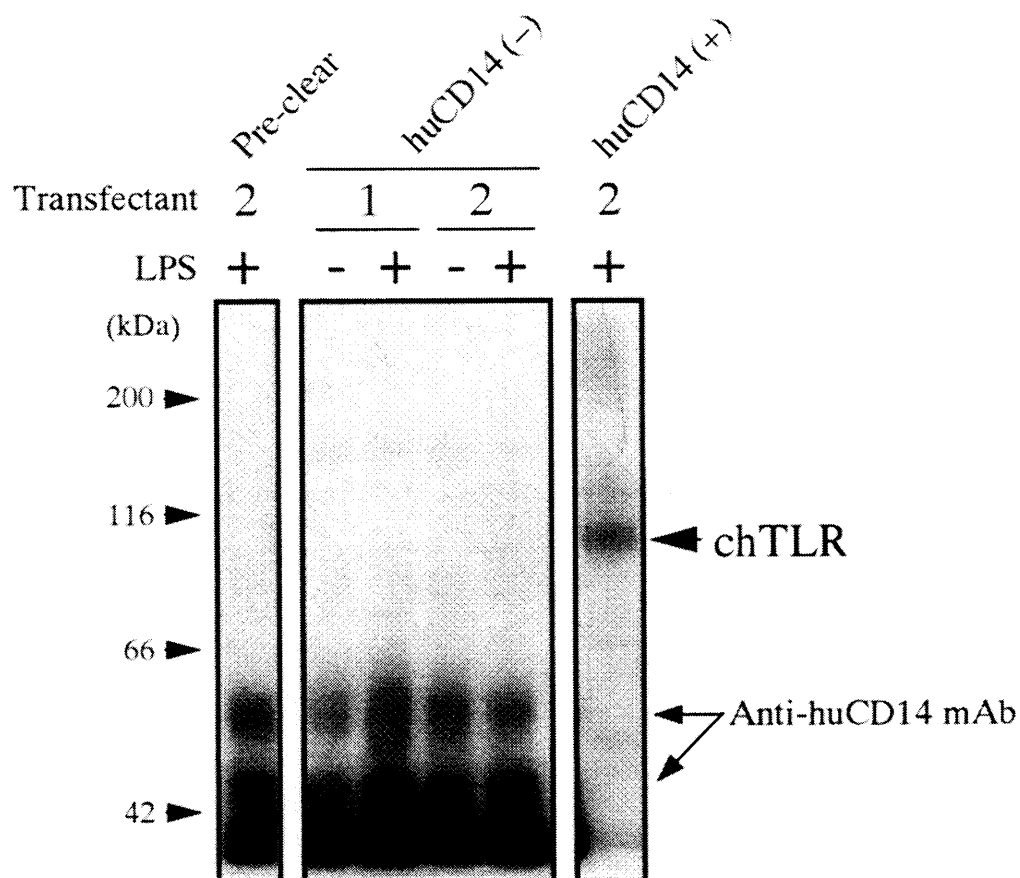


図2-8. ヒトCD14共発現によるニワトリTLRの発現量の変化

ニワトリTLRのみを発現させた細胞 (Type 1、Type 2) とニワトリTLRと共にヒトCD14を共発現させた細胞 (Type 1-huCD14、Type 2-huCD14) における、ニワトリTLRの発現量をFACS解析により検討した。それぞれの細胞をMALP-2 (終濃度1 μ M) またはLPS (*S. typhimurium* LPS, 終濃度1 μ g/ml) で刺激した後に、抗ニワトリTLRポリクローナル抗体を用いて細胞表面のニワトリTLRの発現量を測定した。FACS解析後のヒストグラムの下に、トランスフェクトした発現プラスミドと検出抗体の組み合わせを示した。なお、図中の数値は、太線のヒストグラムにおけるgeo-mean値を示しており、括弧内の数値は、細線のgeo-mean値を示している。



Transfectant 1, chTLR Type 2
2, chTLR Type 2+huCD14

図2-9. ニワトリTLRとヒトCD14のHEK293細胞上での相互作用

S. typhimurium LPS (終濃度1 $\mu\text{g/ml}$) 刺激 (+) または未刺激 (-) のニワトリTLR (chTLR) Type 2単独あるいはchTLR Type 2とヒトCD14 (huCD14) の共発現細胞を1% NP-40で可溶化し、抗huCD14モノクローナル抗体 (3C10) を用いて免疫沈降を行った。マウス/ウサギIgG-ProteinG Sepharoseに吸着した非特異的な画分 (Pre-clear)、抗huCD14抗体-ProteinG Sepharoseに吸着した画分 (huCD14 (+)) また吸着しなかった画分 (huCD14 (-)) を還元条件下でSDS-PAGE (7.5%アクリルアミド) 後、PVDF膜に転写し、1次抗体としてビオチン標識抗ニワトリTLRポリクローナル抗体、2次抗体としてヤギ抗ビオチン抗体、さらに3次抗体としてブタ抗ヤギIgG抗体を用いて、ニワトリTLRを検出した。

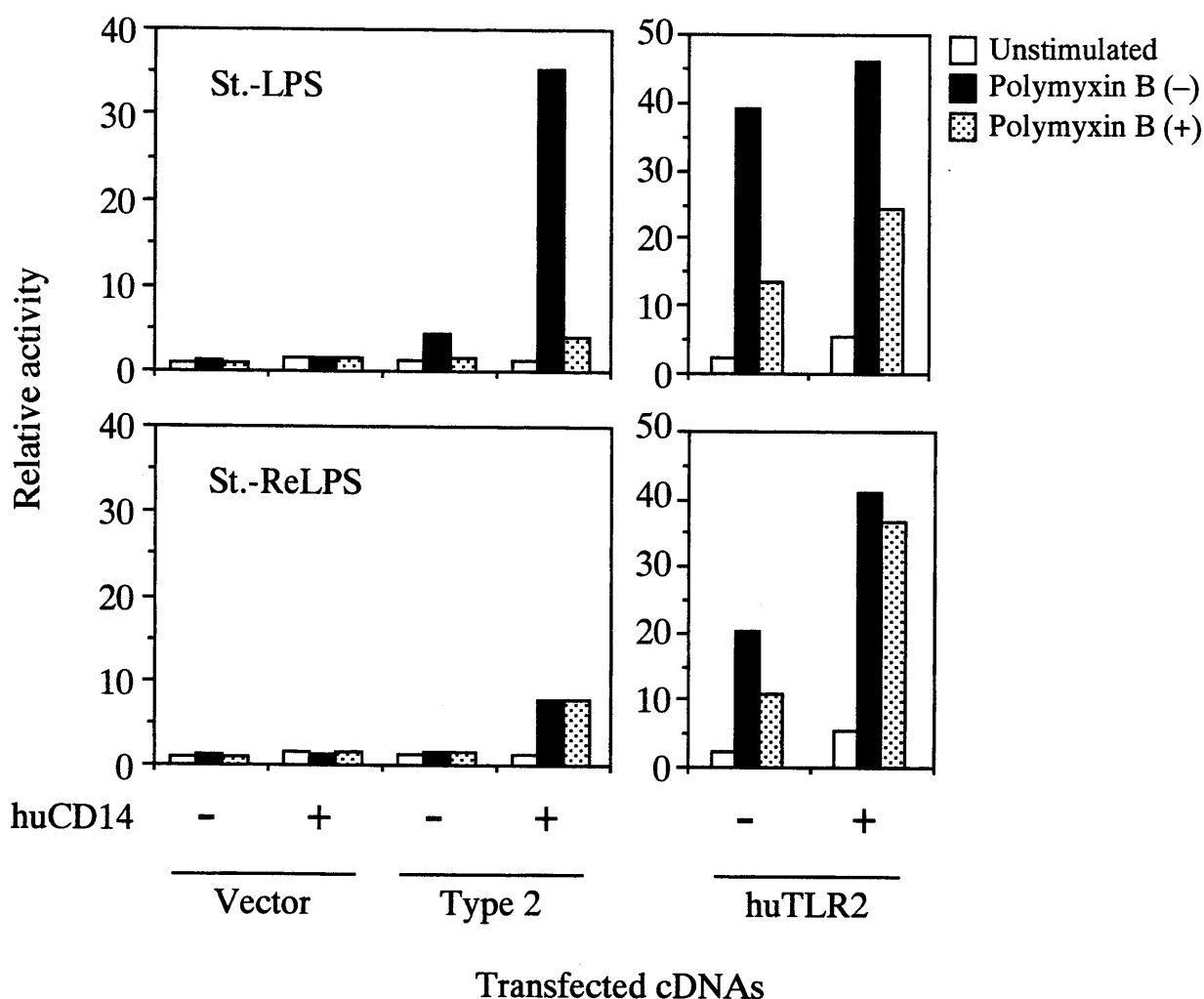


図2-11. 糖鎖欠損型LPS、*S. typhymurium* Re LPS刺激時のニワトリTLR Type 2ならびにヒトTLR2を介したNF-κBの活性化

ニワトリTLR Type 2またはヒトTLR2 (huTLR2) のみを発現させたHEK293細胞 (-) およびType 2またはhuTLR2とヒトCD14 (huCD14) を共発現させた細胞 (+) を糖鎖を欠損していない*S. typhymurium* LPS (St.-LPS) (上) または糖鎖を欠損した*S. typhymurium* Re型LPS (St.-ReLPS) (下) で刺激し、NF-κBの活性化を検討した。LPS阻害剤であるpolymyxin B処理 (polymyxin B (+)) または未処理 (polymyxin B (-)) の各LPSは、終濃度1 μg/mlになるように反応系に加えた。NF-κBの活性化は、コントロール (vectorの未刺激時におけるルシフェラーゼ量) に対する比活性値で示した。なお、3回行った実験のうち、1回の結果を代表で示している。他の実験結果もほぼ同様な傾向を示した。

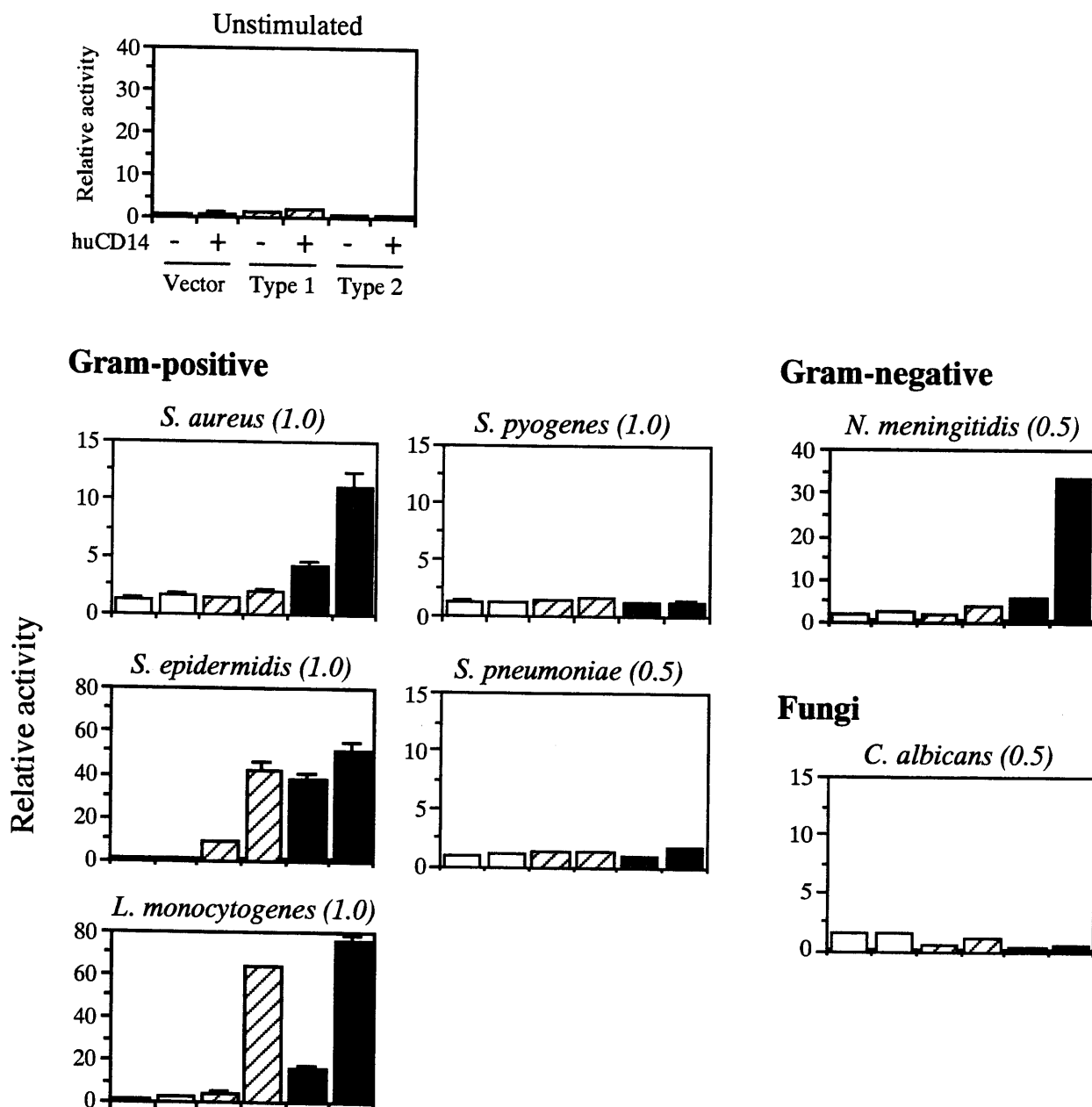


図2-12. 細菌/真菌で刺激した時のニワトリTLRを介したNF- κ Bの活性化

ニワトリTLRのみを発現させたHEK293細胞 (-) およびニワトリTLRとヒトCD14 (huCD14) を共発現させた細胞 (+) を様々な細菌/真菌 (各グラフの上に表示) 懸濁液で刺激し、NF- κ Bの活性化を検討した。各グラフの横軸は、未刺激時のグラフと同様である。NF- κ Bの活性化は、コントロール (vectorの未刺激時におけるルシフェラーゼ量) に対する比活性値で示した。また、括弧内の数値は、細菌/真菌懸濁液のOD₆₀₀の値を示している。なお、これらの結果は、3回の実験から得られた3つ以上の値の平均値を標準偏差を付けて示した。

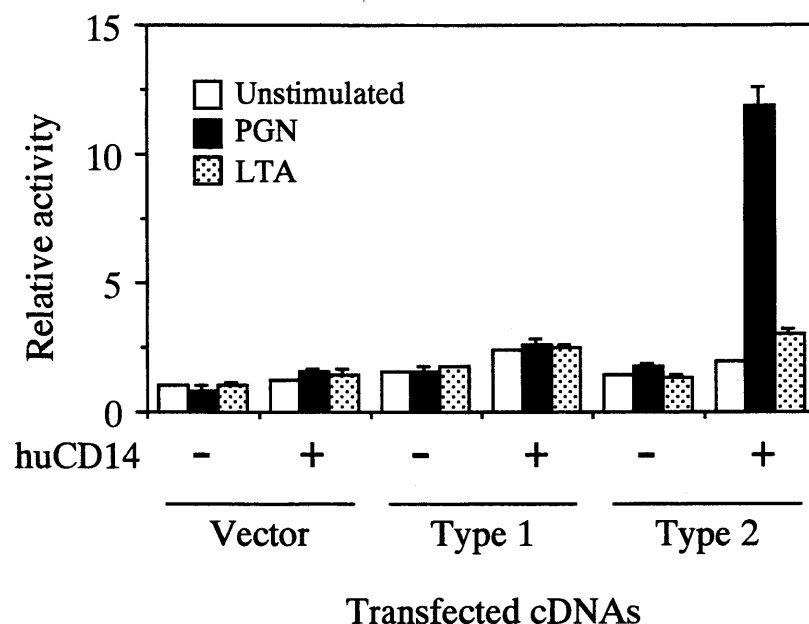


図2-13. *S. aureus* 由来のpeptidoglycan およびlipoteichoic acid刺激時のニワトリTLRを介したNF- κ Bの活性化

ニワトリTLRのみを発現させたHEK293細胞 (-) およびニワトリTLRとヒトCD14 (huCD14) を共発現させた細胞 (+) を *S. aureus* 由来のpeptidoglycan (PGN) および lipoteichoic acid (LTA) で刺激し、NF- κ Bの活性化を検討した。NF- κ Bの活性化は、コントロール (vectorの未刺激時におけるルシフェラーゼ量) に対する比活性値で示した。PGNおよびLTAは、ソニケートした後にpolymyxin Bで処理し、20 μ g/mlになるように反応系に加えた。なお、これらの結果は、3回の実験から得られた3つ以上の値の平均値を標準偏差を付けて示した。

表2-1. ニワトリTLRとヒトTLR2の微生物に対する認識

Bacteria	chTLR		huTLR2
	Type 1	Type 2	
Gram-positive			
<i>S. aureus</i>	-	+ *	+ (20)
<i>S. epidermidis</i>	+ *	+ *	n.d.
<i>S. pyogenes</i>	-	-	n.d.
<i>S. pneumoniae</i>	-	-	+ (71)
<i>L. monocytogenes</i>	+ *	+ *	+ (72)
Gram-negative			
<i>E. coli</i>	-	+	+ (35)
<i>N. meningitidis</i>	-	+ *	+*(73)
Mycobacteria			
<i>M. bovis</i>	-	+	+ (#)
<i>M. avium</i>	-	-	+ (28)
Fungi			
<i>C. albicans</i>	-	-	n.d.
Yeast			
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+*(24)

ニワトリTLR (chTLR) が認識する微生物についてヒトTLR2 (huTLR2) のものと比較した。アステリスクで示した微生物-TLRの組み合わせでは、ヒトCD14の共発現によって細胞応答が増強された。また、図2-12では示していない組み合わせを灰色で囲った。

+, 認識する; -, 認識しない; n.d., 報告なし

#, 当研究室における未公表結果より

2-4. 考察

ニワトリ TLR が異物認識/シグナル伝達レセプターとして機能するかどうかをルシフェラーゼを用いたレポータージーンアッセイにより、NF- κ B の活性化を指標にして検討した。ニワトリ TLR Type 1、Type 2 は共に、ヒト TLR2 と最も相同性が高いため、まずヒト TLR2 のリガンドであるマイコプラズマ由来のリポペプチド、MALP-2 を刺激物として用いた。その結果、ニワトリ TLR の両タイプにおいて NF- κ B の活性化が認められたことから、ニワトリ TLR は MALP-2 を認識すると考えられた。さらに、Type 2 に関しては、ヒト CD14 共存下において *E. coli* および *S. typhimurium* 由来の LPS も認識できることが明らかとなった。ヒト TLR2 の場合、*S. typhimurium* 由来の LPS 刺激により NF- κ B を活性化させるが、その活性化は polymyxin B で LPS を失活させても約 50% しか抑制されなかったことから、残存する 50% の活性化は、LPS 試料中に含まれている LPS 以外の物質によって起こっていると考えられる (図 2-11 上)。一方、ニワトリ TLR Type 2 の場合は、polymyxin B 処理により失活させた *S. typhimurium* LPS 刺激では NF- κ B の活性化をほとんど引き起こさないことから、LPS そのものを認識していることが示された (図 2-11 上)。ニワトリ TLR Type 2 は、MALP-2、LPS の両方を認識できることから、ヒト TLR2 と 4 の機能を併せ持つ TLR であることが明らかとなった。

また、Type 1 と Type 2 の LPS に対する応答性の違いは、ORF 中央部の互いに異なる部分に起因するものと考えられる。この部分で両タイプは 1) LRR ドメインの個数 (図 1-5)、2) 糖鎖修飾 (図 1-7 B)、が異なることから、これらの相違により、分子全体の立体構造が両者で大きく異なり、認識できるリガンドや相互作用できるコファクターに違いが生じた可能性が考えられる。

本研究では、いくつかのコファクターをニワトリ TLR と共発現させ、ニワトリ TLR の異物認識への影響をみているが、特に興味深い知見が得られたのは、ヒト CD14 共存下における細胞応答である。MALP-2 および LPS 刺激時のニワトリ TLR を介した NF- κ B の活性化は、ヒト CD14 共存下で非常に増強される (図 2-6)。この増強効果は、ヒト TLR2 を介した場合では認められない (図 2-11 上)。2-3-3 から得られた以下の 2 つの知見、1) ヒト CD14 の共発現によってニワトリ TLR の発現量は変わらないこと、2) ニワトリ TLR とヒト CD14 は強く相互作用していないことから考えると、ヒト CD14 は強力な結合力を利用して異物を膜上にひきつけ、それをニワトリ TLR へ受け渡す“運び屋”の働きをしていると考えられる。最近、ヒト細胞上において、CD14 が LPS を捕らえ、それをシグナルを伝える別の分子集合体に受け渡しているという仮説が報告された (65, 66)。これまでに報告された知見と考え合わせると、ヒト TLR4 がこの分子集合体に含まれる可能性が高い。本研究で得られた結果は、このような現象がニワトリ TLR-ヒト CD14/293 においても起きていることを示唆している。CD14 がどのようにして TLR または TLR を含む分子集合体に異物を受け渡すのか、などの具体的な機構について、今後検討していく必要があると思われる。

さらに、このようなヒト CD14 による増強作用には、ヒト CD14 以外の分子も関わっていることが FCS を添加しない実験系から明らかとなった (図 2-7)。LPS の場合、この増強作用には FCS 中の LBP が必要であり、哺乳類で考えられている LPS 輸送機構と同様に、LPS は LBP によりまず CD14 へ、さらにニワトリ TLR へ受け渡されていると考えられる。興味深いことに、MALP-2 の場合も LPS 同様、ニワトリ TLR-CD14/293 での細胞応答は FCS 依存的であった。このような現象はヒト TLR2 では見られない。しかし、LPS ほど依存性が高くないことから、ニワトリ TLR は単独で MALP-2 を認識してシグナルを送ることもできるが、ヒト CD14 と FCS 中の分子が存在すると、MALP-2 との接触頻度が高くなり、シグナルが大きくなると考えられる。一方、ニワトリ TLR 単独発現細胞では、MALP-2 刺激の場合、FCS 非添加時の方が強い細胞応答が起きた。これは、FCS 中に MALP-2 と結合する分子が存在し、その分子はヒト CD14 のように MALP-2 をニワトリ TLR に受け渡すことができないと推測された。

以上の結果から、ニワトリ TLR を介した異物の認識は、CD14 によって制御されていると考えられる。このような制御には、次のようなメリットが考えられる。

- 1) CD14 が発現している免疫担当細胞において、異物に対する免疫応答を効率よく惹起することができる。
- 2) TLR の発現やりガンドが少量であっても、CD14 の共存により強い応答を引き起こすことができる。

ニワトリの CD14 ホモログは未だにクローニングされていないが、ニワトリにもヒト CD14 に似た分子が存在し、TLR の機能を制御している可能性が十分に考えられる。今後、ニワトリ CD14 をクローニングし、TLR との関係を確認する予定である。

また、どのような種類の細菌をニワトリ TLR が認識するのかについても検討した。その結果、ヒト TLR2 と同様、主にグラム陽性菌に対して強い応答を誘導することがわかった (表 2-1)。さらに、*S. aureus* の PGN 刺激で、Type 2-CD14/293 において細胞応答が見られたことから、ニワトリ TLR はグラム陽性菌の PGN を認識していると考えられた。しかし、同じグラム陽性菌でも、*Streptococcus* 属には全く反応しない。グラム陽性菌の PGN は、菌種によってその構成成分が異なることから、ニワトリ TLR の認識部位が、PGN 全体ではなく、さらに特定の PGN 構成物質である可能性が考えられる。

本研究において、ニワトリ TLR は MALP-2、LPS、PGN といった、菌体構成成分を認識することが明らかとなった。ヒト TLR2 も様々な成分を認識すると報告されているが (20-28)、その認識部位は同定されていない。筆者は、2-3-3 において、ニワトリ TLR Type 2 の認識部位の 1 つが糖鎖である可能性を示した (図 2-11)。Type 2 は *E. coli* と *S. typhimurium* 由来の LPS を認識できるが、両者の刺激による NF- κ B の活性化には大差がある。これは、2 種の LPS における糖鎖量、もしくはある種の糖の含有量の違いによるものと思われる (図 2-10)。TLR が糖を認識するという報告は現在までになく、本研究で得られた知見は大変興味深い。しかし、MALP-2 は糖を

含んでいないことから、ニワトリ TLR の認識部位は、糖鎖だけではないことが考えられる。TLR の認識部位については、さらに限定した菌体成分の合成品を用いた解析が必要であると思われる。

終章

筆者は、異物認識/シグナル伝達レセプターとして異物の排除に関わる、基本免疫分子 TLR に着目し、哺乳類よりも下等な動物において TLR を単離し、機能解析を行った。以下に、本研究において明らかにしたことを示す。

1. ニワトリファブリキウス囊の cDNA ライブラリーから、2 種の TLR ホモログ (ニワトリ TLR Type 1、Type 2) をクローニングした。これらは、ORF 内の塩基配列がほぼ同じであるにもかかわらず、別々の遺伝子によりコードされており、共に 4q1.1 の位置で近傍に存在していたことから、遺伝子の重複と組換えによってできたものであると予想された。
2. ニワトリ TLR の mRNA は、幅広い臓器で発現しており、特に心臓、肺、肝臓、卵巣では両タイプが強く発現していた。一方、タンパク質は肝臓、脾臓以外に、心臓、砂のう、筋肉といった結合組織を多く含む臓器で強く発現していることを明らかにした。
3. ニワトリ TLR の一次構造は、両タイプ共にヒト TLR2 に最も相同性が高く、細胞内領域の TIR ドメインは、ニワトリとヒトで非常によく保存されていた。これは、TLR のシグナル伝達系が種を越えて保存されていることを示唆する。
4. ニワトリ TLR は、両タイプ共にヒト TLR2 のリガンドである MALP-2 を認識した。さらに、Type 2 はヒト CD14 共存下で、ヒト TLR4 のリガンドである LPS を認識したことから、Type 2 がヒト TLR2 と 4 の機能を併せ持つ TLR であることを明らかにした。また、Type 1 と Type 2 での認識物の相違は、両タイプに特異的な一次構造部位に起因するものと考えられた。
5. ヒト CD14 共存下で、ニワトリ TLR を介した NF- κ B の活性化が増強されたことから、ヒト CD14 がニワトリ TLR の異物認識時の強力なコファクターとして働くことを明らかにした。このことから、ニワトリにもヒト CD14 と似た働きをする分子が存在し、ニワトリ TLR の機能を制御している可能性が考えられた。
6. 異物における、ニワトリ TLR の認識部位の一つが、糖である可能性を示した。

本研究では、鳥類においても TLR による異物認識機構が存在することを明らかにした。単離した 2 種のニワトリ TLR は、共にヒト TLR2 のホモログと考えられた。また、最近、ヒト TLR3 や 5 と相同性を示すニワトリ cDNA 断片が別のグループから単離され、データベース上で公開されている。さらに、サルモネラ感染に関与する遺伝子座、*NRAMP1* と *TNC* がニワトリにおいて同定されており、これらの遺伝子座に変異があるとサルモネラ菌に対して不応答性になることが報告されているが (67)、両遺伝子座は、今回単離したニワトリ TLR の遺伝子座とは異なる。これらのことから、ニワトリにおいても何種類かの TLR 分子がファミリーを形成しており、それらによって様々な異物の認識が行われていると考えられる。しかし、1) 本研究で単離したニワトリ TLR は、ORF の一部の配列の相違により、異なる機能を獲得していたこと、2) ニワトリ TLR Type 2 が、ヒト TLR2 と 4 の機能を併せ持っていたこと、3) ニワトリでは、免疫応答を引き起こす細菌がヒトよりも限定されていること (68)、を考え合わせると、ニワトリ TLR のレパートリーはヒトよりも少ないことが予想される。こうしたレパートリーの少なさを補強するため、ニワトリでは、本研究でその存在が示唆されたヒト CD14 の機能的ホモログ分子により、ニワトリ TLR が適所で、最大の機能を発揮できるように制御されている可能性が考えられる。

今後、より下等な動物種の TLR を単離し、コファクター因子との相互作用を調べていくことで、生物における異物認識機構の全貌が明らかになり、その機構における基本免疫系の重要性が示されることを期待する。

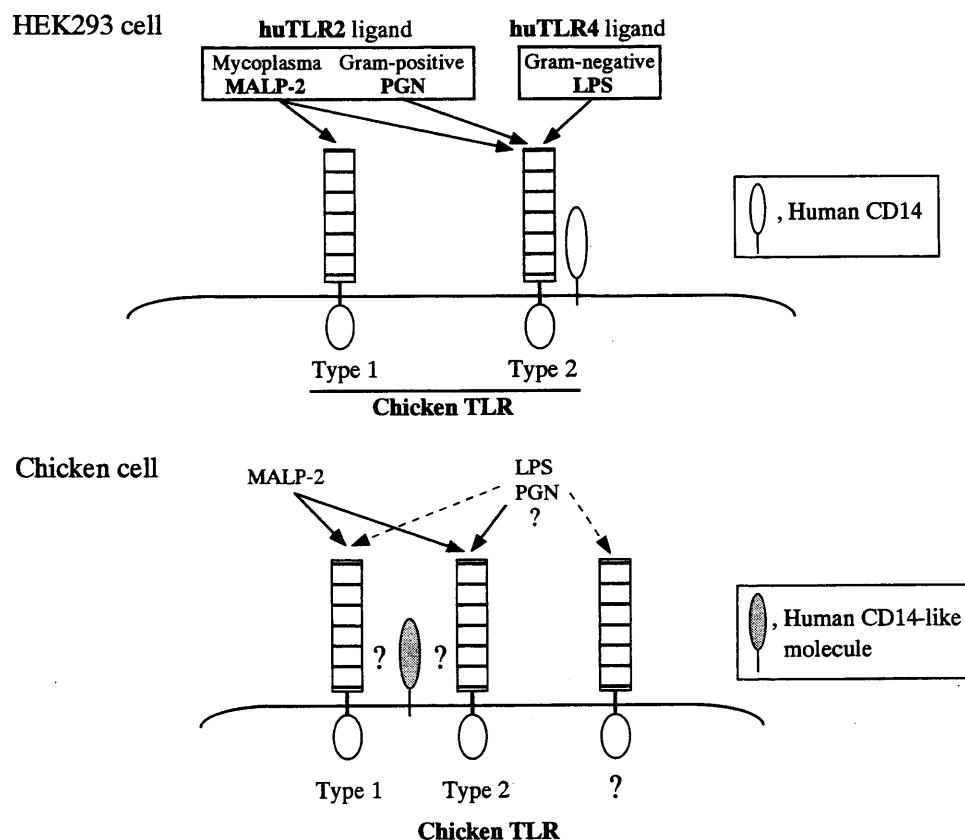


図. ヒト細胞 (HEK293) 上でのニワトリTLRによる異物認識とニワトリ細胞上で予想されるニワトリTLRの異物認識

謝辞

本研究を遂行するにあたり、始終適切なご助言、ご討議をしていただきました、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科原核生物遺伝学講座、真木寿治教授に深く感謝致します。同様に、始終適切なご指導をいただきました大阪府立成人病センター免疫学部門、瀬谷司博士に深く感謝致します。

ニワトリファブリキウス囊 cDNA ライブラリーを御供与下さいました、東京理科大学、後飯塚僚博士、ヒト CD14 発現プラスミドを御供与下さいました、筑波大学、西村仁博士、ならびにヒト MD-2 発現プラスミドを御供与下さいました、東京大学医科学研究所、三宅健介博士に深く感謝致します。また、様々な細菌を御供与下さいました、大阪府立公衆衛生研究所の鈴木定彦博士に心から感謝致します。

ニワトリ TLR の FISH 解析に御協力くださいました、北海道大学理学部附属動物染色体研究施設の松田洋一博士と山田和彦博士に深く感謝致します。

本論文を審査して下さいました、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞遺伝学講座、小笠原直毅教授ならびに細胞増殖学講座、竹家達夫教授に深く感謝致します。

研究および様々な面で大変お世話になりました、大阪府立成人病センター免疫学部門、松本美佐子博士をはじめ、研究室の皆様ならびに同期生に心から感謝致します。

最後に、私を信じ、常に暖かい目で見守ってくれた家族に心から感謝致します。

2002 年 3 月 福井 理

参考文献

1. Thompson, C.B. (1995) New insights into V(D)J recombination and its role in the evolution of the immune system. *Immunity* **3**, 531-539
2. Medzhitov, R. and Janeway, C. A. Jr. (1997) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295-298
3. Fearon, D. T. and Locksley, R. M. (1996) The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* **272**, 50-53
4. Cooper, E. L., Rinkevich, B., Uhlenbruck, G. and Valembois, P. (1992) Invertebrate immunity: another viewpoint. *Scand. J. Immunol.* **35**, 247-266
5. Hashimoto, C., Hudson, K. L., and Anderson, K. V. (1988) The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* **52**, 269-279
6. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. and Hoffmann J. A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-983
7. Kobe, B. and Deisenhofer, J. (1994) The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 415-421
8. Kajava, A. V. (1998) Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *J. Mol. Biol.* **277**, 519-527
9. Gay, N. J. and Keith, F. J. (1991) *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* **351**, 355-356
10. Lemaitre, B., Meister, M., Govind, S., Georgel, P., Steward, R., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (1995) Functional analysis and regulation of nuclear import of dorsal during the immune response in *Drosophila*. *EMBO. J.* **14**, 536-545
11. Galindo, R. L., Edwards, D. N., Gillespie, S. K. and Wasserman, S. A. (1995) Interaction of the pelle kinase with the membrane-associated protein tube is required for transduction of the dorsoventral signal in *Drosophila* embryos. *Development* **121**, 2209-2218
12. Tauszig, S., Jouanguy, E., Hoffmann, J. A. and Imler, J. L. (2000) Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 10520-10525
13. Williams, M. J., Rodriguez, A., Kimbrell, D. A. and Eldon, E. D. (1997) The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense. *EMBO. J.* **16**, 6120-6130
14. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, C. A. Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-397
15. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S. and Janeway, C. A. Jr. (1998) MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* **2**, 253-258

16. Gerard, C. (1998) Bacterial infection. For whom the bell tolls. *Nature* **395**, 284-288
17. Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A. and Bazan, J. F. (1998) A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**, 588-593
18. Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Huffel, C. V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. and Beutler, B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-2088
19. Chow, J. C., Young, D. W., Golenbock, D. T., Christ, W. J. and Gusovsky, F. (1999) Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* **274**, 10689-10692
20. Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M. and Kirschning, C. J. (1999) Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* **274**, 17406-17409
21. Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S. (1999) Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**, 443-451
22. Takeuchi, O., Kaufmann, A., Grote, K., Kawai, T., Hoshino, K., Morr, M., Muhlradt, P. F. and Akira, S. (2000) Preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J. Immunol.* **164**, 554-557
23. Nishiguchi, M., Matsumoto, M., Takao, T., Hoshino, M., Shimonishi, Y., Tsuji, S., Begum, N. A., Takeuchi, O., Akira, S., Toyoshima, K. and Seya, T. (2001) Mycoplasma fermentans lipoprotein M161Ag-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2: role of N-terminal hydrophobic portion in its multiple functions. *J. Immunol.* **166**, 2610-2616
24. Underhill, D. M., Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Bassetti, M. and Aderem, A. (1999) The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* **401**, 811-815
25. Hirschfeld, M., Kirschning, C. J., Schwandner, R., Wesche, H., Weis, J. H., Wooten, R. M. and Weis, J. J. (1999) Inflammatory signaling by Borrelia burgdorferi lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *J. Immunol.* **163**, 2382-2386
26. Campos, M. A., Almeida, I. C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E. P., Procopio, D. O., Travassos, L. R., Smith, J. A., Golenbock, D. T. and Gazzinelli, R. T. (2001) Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J. Immunol.* **167**, 416-423
27. Asai, Y., Ohyama, Y., Gen, K. and Ogawa, T. (2001) Bacterial Fimbriae and Their Peptides Activate Human Gingival Epithelial Cells through Toll-Like Receptor 2. *Infect. Immun.* **69**, 7387-7395
28. Lien, E., Sellati, T. J., Yoshimura, A., Flo, T. H., Rawadi, G., Finberg, R. W., Carroll, J.

- D., Espevik, T., Ingalls, R. R., Radolf, J. D. and Golenbock, D. T. (1999) Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J. Biol. Chem.* **274**, 33419-33425
29. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. and Flavell, R. A. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-738
 30. Matsumoto, M., Kikkawa, S., Funami, K. and Seya, T. (2002) Activation of human Toll-like receptor 3 by double-stranded RNA induces interferon- β via MyD88-and Mal/TIRAP-independent pathway. *J. Biol. Chem.* In press
 31. Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M. and Aderem, A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099-1103
 32. Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. and Akira, S. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-745
 33. Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K. and Kimoto, M. (1999) MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* **189**, 1777-1782
 34. Akashi, S., Ogata, H., Kirikae, F., Kirikae, T., Kawasaki, K., Nishijima, M., Shimazu, R., Nagai, Y., Fukudome, K., Kimoto, M. and Miyake, K. (2000) Regulatory roles for CD14 and phosphatidylinositol in the signaling via toll-like receptor 4-MD-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**, 172-177
 35. Dziarski, R., Wang, Q., Miyake, K., Kirschning, C. J. and Gupta, D. (2001) MD-2 enables Toll-like receptor 2 (TLR2)-mediated responses to lipopolysaccharide and enhances TLR2-mediated responses to Gram-positive and Gram-negative bacteria and their cell wall components. *J. Immunol.* **166**, 1938-1944
 36. Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L. and Aderem, A. (2000) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 13766-13771
 37. Wyllie, D. H., Kiss-Toth, E., Visintin, A., Smith, S. C., Boussof, S., Segal, D. M., Duff, G. W. and Dower, S. K. (2000) Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J. Immunol.* **165**, 7125-7132
 38. Hajjar, A. M., O'Mahony, D. S., Ozinsky, A., Underhill, D. M., Aderem, A., Klebanoff, S. J. and Wilson, C. B. (2001) Functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J. Immunol.* **166**, 15-19
 39. Bulut, Y., Faure, E., Thomas, L., Equils, O. and Arditi, M. (2001) Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. *J. Immunol.* **167**, 987-994

40. Akira, S., Takeda, K. and Kaisho, T. (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* **2**, 675-680
41. Schnare, M., Barton, G. M., Holt, A. C., Takeda, K., Akira, S. and Medzhitov, R. (2001) Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **2**, 947-950
42. Matsuda, Y. and Chapman, V. M. (1995) Application of fluorescence in situ hybridization in genome analysis of the mouse. *Electrophoresis* **16**, 261-272
43. Suzuki, T., Kurosaki, T., Shimada, K., Kansaku, N., Kuhnlein, U., Zadworny, D., Agata, K., Hashimoto, A., Koide, M., Koike, M., Takata, M., Kuroiwa, A., Minai, S., Namikawa, T. and Matsuda, Y. (1999) *Cytogenet. Cell Genet.* **87**, 32-40
44. Inoue, N., Fukui, A., Nomura, M., Matsumoto, M., Toyoshima, K., and Seya, T. (2001) A novel chicken membrane-associated complement regulatory protein: molecular cloning and functional characterization. *J. Immunol.* **166**, 424-431
45. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
46. Boyd, Y., Goodchild, M., Morroll, S. and Bumstead, N. (2001) Mapping of the chicken and mouse genes for toll-like receptor 2 (TLR2) to an evolutionarily conserved chromosomal segment. *Immunogenetics* **52**, 294-298
47. Kaufman, J., Milne, S., Gobel, T. W., Walker, B. A., Jacob, J. P., Auffray, C., Zoorob, R. and Beck, S. (1999) The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex. *Nature* **401**, 923-925
48. Bloom, S. E., Delany, M. E. and Muscarella, D. E. (1993) Constant and variable features of Avian chromosomes. Gibbins ed. (CRC Press, Manipulation of the Avian genome) pp39-59
49. Yang, R. B., Mark, M. R., Gray, A., Huang, A., Xie, M. H., Zhang, M., Goddard, A., Wood, W. I., Gurney, A. L. and Godowski, P. J. (1998) Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* **395**, 284-288
50. Chaudhary, P. M., Ferguson, C., Nguyen, V., Nguyen, O., Massa, H. F., Eby, M., Jasmin, A., Trask, B. J., Hood, L. and Nelson P. S. (1998) Cloning and characterization of two Toll/Interleukin-1 receptor-like genes TIL3 and TIL4: evidence for a multi-gene receptor family in humans. *Blood* **91**, 4020-4027
51. Matsuguchi, T., Takagi, K., Musikachoen, T. and Yoshikai, Y. (2000) Gene expressions of lipopolysaccharide receptors, toll-like receptors 2 and 4, are differently regulated in mouse T lymphocytes. *Blood* **95**, 1378-1385
52. Govind, S. (1999) Control of development and immunity by rel transcription factors in *Drosophila*. *Oncogene* **18**, 6875-6887
53. Visintin, A., Mazzoni, A., Spitzer, J. H., Wyllie, D. H., Dower, S. K. and Segal, D. M. (2001) Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J. Immunol.* **166**, 249-255
54. da Silva, Correia, J. and Ulevitch, R. J. (2001) MD-2 and TLR4 N-linked glycosylations

- are important for a functional lipopolysaccharide receptor. *J. Biol. Chem.* In press
55. Muta, T. and Takeshige, K. (2001) Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR)2 as well as TLR4 Reconstitution of TLR2- and TLR4-activation by distinguishable ligands in LPS preparations. *Eur. J. Biochem.* **268**, 4580-4589
 56. Muhlradt, P. F., Kiess, M., Meyer, H., Sussmuth, R. and Jung, G. (1997) Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *J. Exp. Med.* **185**, 1951-1958
 57. Nishimura, H., Gogami, A., Miyagawa, Y., Nanbo, A., Murakami, Y., Baba, T. and Nagasawa, S. (2001) Bactericidal/permeability-increasing protein promotes complement activation for neutrophil-mediated phagocytosis on bacterial surface. *Immunology* **103**, 519-525
 58. Wright, S. D. (1995) CD14 and innate recognition of bacteria. *J. Immunol.* **155**, 6-8
 59. Miyake, K., Shimazu, R., Kondo, J., Niki, T., Akashi, S., Ogata, H., Yamashita, Y., Miura, Y. and Kimoto, M. (1998) Mouse MD-1, a molecule that is physically associated with RP105 and positively regulates its expression. *J. Immunol.* **161**, 1348-1353
 60. Miura, Y., Shimazu, R., Miyake, K., Akashi, S., Ogata, H., Yamashita, Y., Narisawa, Y. and Kimoto, M. (1998) RP105 is associated with MD-1 and transmits an activation signal in human B. *Blood* **92**, 2815-2822
 61. Ogata, H., Su, I., Miyake, K., Nagai, Y., Akashi, S., Mecklenbrauker, I., Rajewsky, K., Kimoto, M. and Tarakhovsky, A. (2000) The toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cells. *J. Exp. Med.* **192**, 23-29
 62. Burk, O. and Klempnauer, K. H. (1991) Estrogen-dependent alterations in differentiation state of myeloid cells caused by a v-myb/estrogen receptor fusion protein. *EMBO. J.* **10**, 3713-3719
 63. Schumann, R. R., Leong, S. R., Flaggs, G. W., Gray, P. W., Wright, S. D., Mathison, J. C., Tobias, P. S., and Ulevitch, R. J. (1990) Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* **249**, 1429-1431
 64. Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. and Mathison, J. C. (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**, 1431-1433
 65. Triantafilou, K., Triantafilou, M., Dedrick, R. L. (2001) A CD14-independent LPS receptor cluster. *Nat. Immunol.* **2**, 338-345
 66. Triantafilou, K., Triantafilou, M., Ladha, S., Mackie, A., Fernandez, N., Dedrick, R. L., and Cherry, R. (2001) Fluorescence recovery after photobleaching reveals that LPS rapidly transfers from CD14 to hsp70 and hsp90 on the cell membrane. *J. Cell Sci.* **114**, 2535-2545
 67. Hu, J., Bumstead, N., Barrow, P., Sebastiani, G., Olien, L., Morgan, K. and Malo, D. (1997) Resistance to salmonellosis in the chicken is linked to NRAMP1 and TNC.

68. Kaiser, P., Rothwell, L., Galyov, E. E., Barrow, P. A., Burnside, J. and Wigley, P. (2000) Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum*. *Microbiology* **146**, 3217-3226
69. Widmalm, G. and Leontin, K. (1993) Structural studies of the *Escherichia coli* O127 O-antigen polysaccharide. *Carbohydr. Res.* **247**, 255-262
70. Schindler, M. and Osborn, M. J. (1979) Interaction of divalent cations and polymyxin B with lipopolysaccharide. *Biochemistry* **18**, 4425-4430
71. Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls, R. R., Tuomanen, E., Dziarski, R. and Golenbock, D. (1999) Recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J. Immunol.* **163**, 1-5
72. Flo, T. H., Halaas, O., Lien, E., Ryan, L., Teti, G., Golenbock, D. T., Sundan, A. and Espevik, T. (2000) Human toll-like receptor 2 mediates monocyte activation by *Listeria monocytogenes*, but not by group B streptococci or lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **164**, 2064-2069
73. Ingalls, R. R., Lien, E. and Golenbock, D. T. (2001) Membrane-associated proteins of a lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through toll-like receptor 2. *Infect. Immun.* **69**, 2230-2236