

所 属 (主指導教官)	原核生物分子遺伝学講座 (真木 寿治 教授)		
氏 名	福井 理	提 出	平成14年1月29日
題 目	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		
要旨 自己・非自己の認識は、個体の同一性を保持し、種を保存していくために重要なシステムである。これまでの研究から外来異物などの非自己成分の排除は、主に免疫系が行っていると考えられている。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ている。ヒトなどの高等動物においては、基本免疫、獲得免疫の両方が相互作用しながら生体防御にあたっており、生命を維持していく上で重要な役割を果たしている。一方、無顎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。この事実は、異物を識別・排除するシステムが生物に普遍的に存在しており、基本免疫の分子がこのシステムに関与していることを示唆している。 近年、ヒトにおいて、基本免疫分子の一つであるToll-like receptor (TLR) がクローニングされた。TLRは、ショウジョウバエにおける細菌感染時に重要な生体防御分子、Tollの構造的、機能的ホモログとして報告された。ヒトTLRは、一次構造上でファミリーを形成しており、複数のTLRが細胞外のLeucine rich repeat (LRR) ドメインを介して様々な外来異物の構成成分を認識し、細胞内のToll/IL-1 receptor homology (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 (NF-κB) を活性化することが明らかになりつつある。しかし、ヒトTLRを介した異物認識機構は、基本免疫系しか存在しないショウジョウバエのそれとは異なり、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。基本免疫しか持たないショウジョウバエのTollと両免疫系を持つ哺乳類の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と推測できる。そこで筆者は、この仮定を検証する目的で、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、卵生動物において初めてその機能を解析し、哺乳類のものと比較した。 まず、現在までに機能が報告されているマウスTLR2とTLR4およびショウジョウバエTollのTIRドメインにおいて、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、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PCRを行った。その結果、2種のニワトリTLR (Type 1、Type 2) 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中央部の連続した約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。哺乳類においては、このようなTLRの報告はない。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。

次に、RT-PCRとWestern blot解析により、ニワトリTLRのmRNAおよびタンパク質の発現分布を調べた。その結果、mRNAは種々の臓器に発現していることが明らかとなり、ニワトリTLRが多機能タンパク質である可能性が示された。一方、タンパク質は肝臓、脾臓に加え、心臓、砂のう、筋肉に強い発現が認められ、免疫関連臓器のみならず、結合組織を多く含む臓器にも強く発現していることが明らかとなった。

さらに、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。その結果、ニワトリTLRは、両タイプ共にヒト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Lipopolysaccharide (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、分子中央部に存在する、それぞれの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。また、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。

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。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で、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、免疫応答を起こす細菌がヒトよりも限定されているという報告が成されていることを考え合わせると、ニワトリTLRの多様性はヒトよりも少ないことが予想される。こうした多様性が少ないといった弱点を補強するため、ニワトリでは、ヒトCD14の機能的ホモログが存在し、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している可能性が考えられる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 福井理

免疫は微生物の多様性の識別と排除を通して宿主生体防御を司る。遺伝子の同一性、種の保存性は一部これによって維持される。免疫系は長い間リンパ球の遺伝子再編成によって微生物の多様性に対抗する多様なクローンを獲得すると信じられてきた。これが高等生物のみの特殊化された系であること、120 万種の動物のうち 110 万種以上はこれ以外の生体防御系を持つ故に感染症・がんなどから免れることがごく最近明らかになった。即ち、生物に普遍的な微生物の認識・排除機構は既知の獲得免疫とは別に存在し、この生物に普遍的な生体防御系を基本免疫と呼ぶ。基本免疫は germline-encoded であり子孫に伝わり種を越えて比較対応が可能である。さらに、ヒトでも基本免疫が保持されており、リンパ球の獲得免疫と連動して宿主保存に働くことが判明したのは 3 年前である。今日でも生命の進化史でヒトの免疫系が確立した過程は不明であるが、高等動物の基本免疫系の発見によって、1) 免疫系が生物の進化の一環として 5 億年以上の歴史をもつこと、2) さらに、難治性免疫疾患は基本免疫を含めた「免疫系」の異常として根本から見直す必要があることが判明してきている。申請者はこの観点からトリの免疫系の解析を行ったもので、以下の成果を上げている。

- 1) 2 種のニワトリ TLR を cDNA クローニングした。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。
- 2) 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。
- 3) ニワトリ TLR は、両タイプ共にヒト TLR2 と共通の微生物のリガンド (LPS, リボ蛋白質、ペプチドグリカン) を認識した。ニワトリ TLR は両方とも NF- κ B を強く活性化した。異物における TLR の認識モチーフが種を越えて保存されており、微生物に特有のパターン・糖や脂質であることを示した。

以上、本論文で申請者はトリのパターン認識レセプターを世界で最初に報告し、その構造・機能をほ乳類の相同レセプターと詳細に比較検討し、ホニュウ類と鳥類の共通性と独自性を推論した。本研究は生命の進化と生体防御の関連など学術的視点に止まらず畜産・人畜共通感染など応用科学の領域にも広く貢献が見込まれる。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。