

Toll-like receptor (TLR) の局在と活性化

齋藤伸一郎

東京大学医科学研究所感染遺伝学

Toll-like receptor (TLR) localization and activation

Shin-Ichiroh Saitoh

Division of Innate Immunity, Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

Abstract

Toll-like receptor (TLR) recognizes viral and bacterial specific components to activate immune responses. TLR plays an essential role for a pathogen sensor. TLR can be divided two groups by their localization. One is cell surface TLR which localizes in cell membrane to recognize mainly bacterial cell wall components. The other is nucleic acid-sensing TLRs, which localize in endosome or lysosome in immune cells to recognize viral and bacterial nucleic acids. We have investigated about TLR trafficking to regulate TLR7 activation. First, I want to introduce TLR4 trafficking and activation mechanism as a cell surface receptor which recognizes gram-negative bacterial cell wall component LPS. Second, I want to introduce TLR7 trafficking and activation mechanism as an endo-lysosomal TLR to recognize bacterial and viral RNAs.

Endotoxin and Innate Immunity 21 : 1~6, 2018

Key words : Toll-like receptor 4 (TLR4), Toll-like receptor 7 (TLR7), 2 量体, 1 型インターフェロン, ADP ribosylation factor-like 8b (Arl8b)

はじめに

ウイルスや細菌に特異的な成分を認識して活性化する Toll-like receptor (TLR) は感染のセンサーとしての役割を持つ。TLR はその局在により大きく 2 種類のタイプに分類できる。一つは細胞表面上に発現し主に細菌の膜成分を認識する TLR。そしてもう一つは細胞内のエンドソーム・ライソソームに局在して細菌やウイルスの核酸成分を認識する TLR である。われわれは TLR の細胞内輸送と活性化に関する研究を行ってきた。初めに細胞表面に発現してグラム陰性菌の膜成分 LPS を認識する TLR4 の輸送と活性化について紹介する。次に細胞内のエンドソーム・ライソソームに局在して細菌やウイルスの RNA 成分を認識する TLR7 の輸送と活性化についてわれわれの研究を紹介する。

1. TLR4 の局在と活性化

TLR4 は 1 型膜貫通蛋白質であり小胞体にて合成されると、小胞体に存在するシャペロン分子熱ショック

蛋白質 glycoprotein (gp) 96 と会合する^{1,2)}。加えてわれわれが TLR4 と会合して小胞体に存在しシャペロ的に働くと報告した protein-associated with TLR4 (PRAT4A 別名 Canopy FGF Signaling Regulator 3 : CNPY3) も会合する^{2~4)}。そして TLR4 が受容体として機能できるように立体構造的に問題がないように蛋白質を折りたたむと同時に糖鎖修飾を付加する。さらに TLR4 は MD-2 と会合して、ゴルジ体で更なる糖鎖修飾を受けた後成熟型の TLR4 となり細胞膜表面へと発現する。

細胞表面に発現した TLR4 はリガンドである LPS が MD-2 に会合するまでは TLR4-MD-2 の複合体が 1 量体で存在する。われわれの解析から TLR4-MD-2 は細胞膜表面にて LPS と会合することが明らかとなった⁵⁾。さらに CD14 は LPS と会合するが TLR4-MD-2 と複合体を形成せず、TLR4-MD-2 に LPS を供与する存在であることを示した。われわれは TLR4 の C 末端に GFP, または Flag タグをつけて発現させ、LPS 刺激後に抗 GFP 抗体にて免疫沈降すると TLR4-GFP に

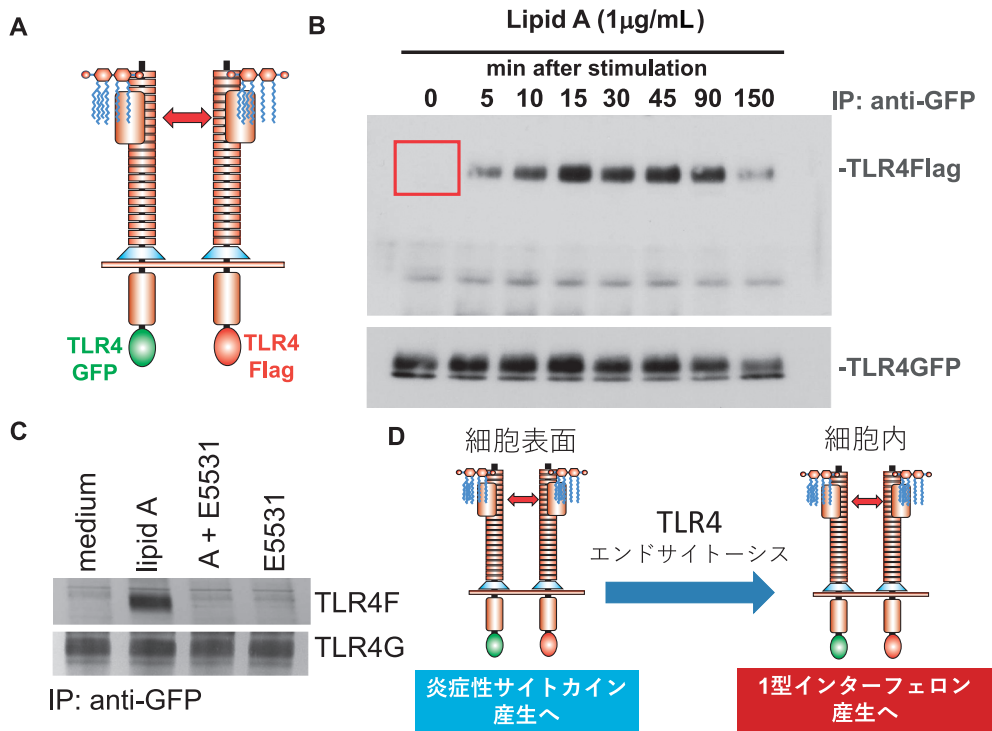


図 1 TLR4 は LPS 刺激により 2 量体を形成して活性化する

A : 細胞に TLR4-GFP と TLR4-Flag を発現させる。B : TLR4-GFP と TLR4-Flag と MD-2 を発現させた細胞を抗 GFP 抗体にて免疫沈降すると TLR4 同士の会合が確認された。C : Lipid A のアンタゴニスト E5531 を加えると TLR4 の 2 量体形成が完全に抑制された。D : 細胞表面上で TLR4 が LPS を認識すると 2 量体を形成して活性化し炎症性サイトカインを産生するためのシグナル伝達を活性化する。その後、TLR4 は細胞内にエンドサイトーシスされてから 1 型インターフェロン産生のためのシグナル伝達を活性化する。

TLR4-Flag が会合することから、TLR4-MD-2 は LPS と会合すると多量体を形成することが明らかとなった (図 1A, B)^{6,7)}。現在では立体構造解析の結果により TLR4-MD-2 が LPS と会合して 2 量体を形成することが明らかになっている^{8,9)}。MD-2 には大きなポケット状のくぼみが存在して LPS がそこにはまる形で会合する¹⁰⁾。さらにわれわれはマウス MD-2 の 126 番目のフェニルアラニン、または 129 番目のグリシンをアラニンに変えた変異体を細胞株に発現させると、TLR4-MD-2 に LPS は会合しているにもかかわらず 2 量体を形成していないことが観察された¹¹⁾。この結果より MD-2 には LPS と会合するだけでなく TLR4-MD-2 が 2 量体形成をする時にも重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

TLR4-MD-2 にはアンタゴニストについての研究が精力的に行われている。そのアンタゴニストの一つ E5531 を加えると LPS の活性中心 lipid A を加えた時に形成される 2 量体形成が認められなくなることを観察した (図 1C)⁶⁾。この結果よりアンタゴニスト E5531 は TLR4-MD-2 の 2 量体形成に作用し、2 量体形成を阻止することでアンタゴニストとして作用しているこ

とが示唆された。さらに Lipid A の前駆体の Lipid IVa はマウスの TLR4-MD-2 にはアゴニストとして作用し、ヒト TLR4-MD-2 とマウス TLR4-ヒト MD-2 にはアンタゴニストとして作用することを報告している。その Lipid IVa で刺激をするとマウスの TLR4-MD-2 は 2 量体形成を誘導するが、ヒト TLR4-MD-2 やマウス TLR4-ヒト MD-2 では 2 量体形成を誘導せず、なおかつ Lipid A 刺激にて誘導する 2 量体形成をほとんど完全に抑制することが観察された⁶⁾。このことよりアンタゴニストの作用が TLR4-MD-2 の 2 量体形成のところに作用しており、MD-2 がアンタゴニストの作用に重要な役割を果たしていることを示唆している。

細胞表面上で LPS を認識して活性化した TLR4-MD-2 は、シグナル伝達分子 Myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) と会合して炎症性サイトカイン産生のためのシグナル伝達機構を活性化させる。さらに TRIF-related adaptor molecule (TRAM) と会合して一緒に細胞内にエンドサイトーシスされ、細胞内で 1 型インターフェロン産生へのシグナル伝達の活性化を誘導することを明らかにした¹²⁾。TLR4-MD-2 のエンドサイトーシスを抑制する Dynasore を

加えると1型インターフェロン産生にかかわる Interferon regulatory factor (IRF) 3のリン酸化が著しく抑制され、1型インターフェロン産生が認められなかった¹³⁾。このようにTLR4-MD-2の局在する場の違いで活性化できるシグナル伝達の種類が変わる(図1D)。

2. TLR7の局在と活性化

TLR7はウイルスや細菌のRNA成分を認識して活性化する。TLR7も小胞体にて合成された後に小胞体に存在する uncoordinated 93 homolog B1 (Unc93B1) と会合してCOPII小胞へ移行し、COPII小胞を介してゴルジ体へ移行する¹⁴⁾。そしてゴルジ体で更なる糖鎖修飾を受け、クラスリンのアダプター分子AP-4を介してエンドソーム・ライソソームへ移行することが報告された¹⁴⁾。TLR7との会合ができないUnc93B1変異体では、TLR7が小胞体から出られずエンドソーム・ライソソームへ移行できないことから、Unc93B1がTLR7の輸送にかかわっていることが示唆された¹⁵⁾。われわれはTLR7に対する抗体を作製してTLR7の細胞内局在を確認したところ、TLR7はほとんどがLamp1またはLamp2陽性の小胞に存在しており、TLR7が刺激前からライソソームに存在していることが明らかとなった¹⁶⁾。さらに今まで細胞表面に存在しないといわれていたTLR7が細胞表面にも発現していることが明らかとなった¹⁶⁾。TLR7はTLR4と異なりゴルジ体で糖鎖修飾をされただけでは十分ではなく、未熟な受容体としてゴルジ体を出る。そしてエンドソーム・ライソソームに到達すると、エンドソーム・ライソソームに存在する蛋白質分解酵素の働きにより限定分解される。TLR7の限定分解される場所はTLR7のN末端側の14番目と15番目のロイシンリッチ繰り返し配列(Leucine-rich repeat: LRR)の領域の間をつなぐZ-loopと呼ばれるつなぎ配列の部分で起きる¹⁷⁾。Z-loopの部分で限定分解されてもTLR7のN末端側はジスルフィド結合でC末端側と会合しており分子量的にはほとんど変わらない。しかし立体構造的に違いが生まれリガンド結合後に2量体を形成できるようになると考えられている^{18,19)}。このようにTLR7は反応の場であるエンドソーム・ライソソームに到達して初めて活性化できるタイプの成熟型TLR7となる。このことで移動中のTLR7が自己のRNAを誤って認識して反応するなどの不必要な活性化を防いでいるものと考えられる。

TLR7とTLR9はウイルスや細菌のRNAやDNA成分を認識するだけでなく、自己の核酸成分をも認識してしまう可能性がある。そのためTLR7とTLR9は厳密に制御される必要がある。Unc93B1を詳細に解析するとN末端側にTLR7との会合を調節する領域が存在することが明らかとなった²⁰⁾。Unc93B1にはTLR9とTLR7が競合的に結合する関係ができており、野生型の

Unc93B1はTLR9を優先的にエンドソーム・ライソソームへ移行させている。Unc93B1のN末端領域の34番目のアスパラギン酸をアラニンに変えた1アミノ酸変異体ではTLR7との会合が強くなり、TLR7を選択的に反応の場であるエンドソーム・ライソソームへ移行し、反対にTLR9の移行は抑制された²⁰⁾。このことがTLR7の反応を増強させる結果となり、この変異のノックインマウスを作製すると全身性の炎症を引き起こした²¹⁾。これらの結果からUnc93B1はTLR9とTLR7の競合的な会合のなかでTLR9を優先することでTLR7の輸送を抑制して自己のRNAに対する不必要な活性化を防いでいることが明らかとなった。

3. Arl8bによるTLR7の調節

TLR7はUnc93B1と小胞体で会合した後反応の場であるエンドソーム・ライソソームへ移行することが明らかになったが、Unc93B1には小胞輸送にかかわる機能領域がクラスリンのアダプター分子会合ドメイン以外に存在しない。そのため小胞輸送にかかわる機能的な分子がUnc93B1に会合してTLR7を輸送しているものと推測して、Unc93B1またはTLR7を免疫沈降後にUnc93B1やTLR7に会合する分子を液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS/MS)にかけて解析をした。するとUnc93B1を免疫沈降した時もTLR7を免疫沈降した時もどちらにも同定されてきた分子が存在した。それは低分子量G蛋白質のADP ribosylation factor-like 8b (Arl8b)であった²²⁾。樹状細胞、マクロファージやB細胞でTLR7とArl8bは会合が認められた。Arl8bはライソソームに局在する低分子量G蛋白質で、ライソソームを中心体から膜方向へ輸送する順行性の輸送にかかわっている。同様の働きをするRab7aとTLR7の関係を検討してみるとTLR7はArl8bと共局在が強く認められているが、Rab7aとは部分的にしか共局在が認められなかった。このことからTLR7とArl8bの関係の特異性が示唆された。われわれはArl8bの遺伝子発現を欠損させたマウスArl8bGt/Gtマウスを作製して形質細胞様樹状細胞(pDCs)を解析した。すると野生型の細胞ではライソソームに局在しているTLR7が刺激により微小管上で順行性の移動をするが、Arl8bGt/Gtマウス由来の細胞ではその移動が全く認められなかった²²⁾。Arl8bに会合する分子であり順行性輸送にかかわるpleckstrin homology and RUN domain containing M2 (PLEKHM2: SifA and kinesin-interacting protein (SKIP))のノックアウトマウス由来のpDCsでも同様にTLR7刺激後のTLR7の動きが全く認められなかった。このことからTLR7は刺激後にArl8bとPLEKHM2を介して微小管上を順行性に移動することが明らかとなった。そしてこれらの遺伝子改変マウス由来のpDCsにおいてTLR7刺激による1

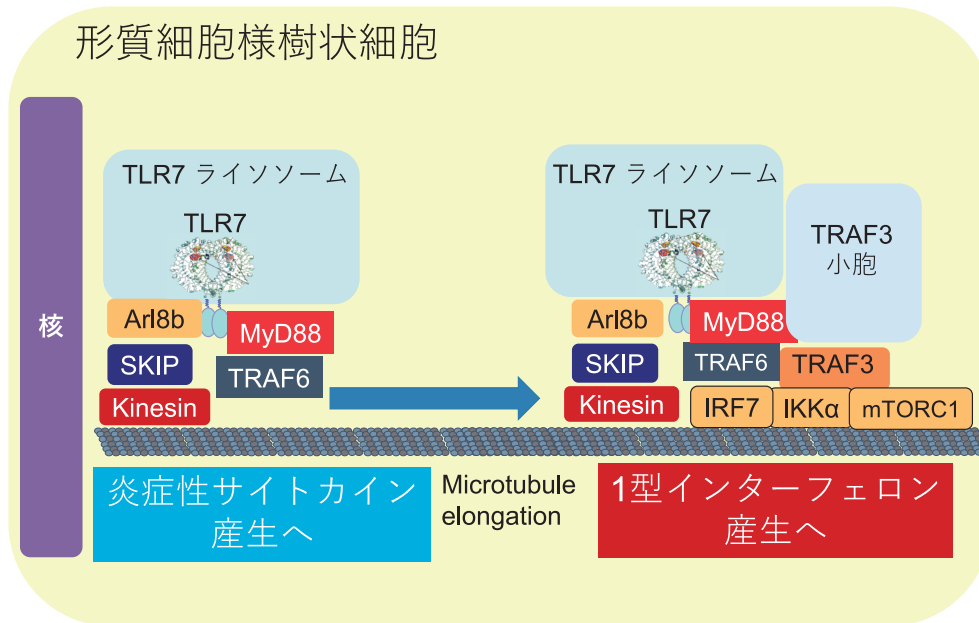


図 2 TLR7 はライソソームに存在し順行性に移動することで 1 型インターフェロン産生を誘導するシグナル伝達を活性化する

TLR7 は刺激を受けると炎症性サイトカインを産生するためのシグナル伝達を活性化。その後微小管上を移動して TRAF3 が存在する小胞に出会い 1 型インターフェロン産生のためのシグナル伝達を活性化させる。

型インターフェロン産生が著しく抑制されていた²²⁾。これらの結果は TLR7 の順行性の移動が 1 型インターフェロンの産生につながることを示唆していた。TLR7 が存在する小胞が移動して到達する場所について検討すると、それは mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) が活性化してリン酸化されている小胞であった。mTORC1 は TLR7 刺激による 1 型インターフェロンの産生に重要な役割を果たす分子であり、mTORC1 の阻害剤により pDCs からの TLR7 依存的な 1 型インターフェロン産生は抑制された。さらに 1 型インターフェロン産生にかかわる TNF receptor-associated factor (TRAF) 3 を免疫沈降すると 1 型インターフェロン産生につながるシグナル伝達分子 IκB kinase α (IKKα) や mTORC1 が会合していることが明らかとなった。mTORC1 はリン酸化されており活性化されていた。そしてこれらの分子の会合は刺激とは関係なく認められた。TRAF3 の上流のシグナル伝達分子である TRAF6 を免疫沈降すると TLR7 刺激により TRAF3 と IRF7 が会合することが観察された。IRF7 は IKKα によりリン酸化されて活性化し、核に移行して 1 型インターフェロン産生を誘導する転写因子である。そして Arl8bGt/Gt マウス由来の pDCs では TLR7 刺激依存的な TRAF6 と TRAF3 の会合が認められなかった²²⁾。これらの結果より TLR7 刺激により TLR7 が存在する小胞が Arl8b 依存的に移動して、TRAF3 と mTORC1 が存在する小胞と出会うことで 1 型インター

フェロンを産生するためのシグナル伝達が始まることを示唆された (図 2)。

4. Arl8b による全身性エリテマトーデスの発症の制御

全身性エリテマトーデス (SLE) は病気の原因がまだ不明の点が多いが、SLE の患者の血中における 1 型インターフェロンの濃度が高いことや、ウイルス性肝炎の患者や悪性の腫瘍の患者の治療による 1 型インターフェロン投与により SLE 様の症状が認められるケースがあることから、1 型インターフェロンが SLE の発症にかかわっていることが推測されている。さらに SLE モデルマウスの実験で 1 型インターフェロンの受容体のノックアウトマウスとの交配により SLE の発症が抑制されることや 1 型インターフェロン受容体に対する抑制抗体の投与で SLE モデルマウスの SLE の発症が抑制されたことから、SLE の発症における 1 型インターフェロンの関与が示唆されている。さらに SLE のモデルマウスである BXSB. Yaa マウスにおいて Yaa (Y-linked autoimmune acceleration) 変異遺伝子の原因遺伝子は TLR7 であることが報告されている。さらに TLR7 のノックアウトマウスをさまざまな SLE モデルマウスと交配することで、SLE の発症が抑制されていることから SLE 発症における TLR7 の重要性が示唆されている。BXSB. Yaa マウスにおいて pDCs 除去により SLE の発症が抑制されたことから、SLE の発

症における Arl8b の役割を解明すべく、BXSb. Yaa マウスと Arl8bGt/Gt マウスを交配した。すると SLE の発症が全く認められなかった。さらに 2,6,10,14-tetramethylpentadecane (TMPD) の腹腔投与による SLE の発症モデルにおいても Arl8bGt/Gt マウスにおいて SLE の発症が著しく抑制されることが明らかとなった。これらの結果から Arl8b は SLE の発症にかかわっている重要な分子であることが示唆された。

おわりに

いままでに TLR4 と TLR7 を中心に研究を行ってきた。TLR4 と TLR7 は刺激に伴って移動をすることで炎症性サイトカインへのシグナル伝達と 1 型インターフェロン産生へのシグナル伝達の 2 つの異なるシグナル伝達機構を活性化させることが明らかとなってきた。そして、その TLR7 の移動にかかわる分子 Arl8b を欠損させた場合には 1 型インターフェロンの産生が著しく低下し、SLE の発症が顕著に抑制された。このことから、細胞内の輸送を制御することで SLE の治療につながる可能性を示唆している。細胞内小胞輸送、そしてそもそも小胞に関してもほとんど明らかになっていない。われわれは詳細に小胞を分類しその機能を明らかにすることで TLR の活性化制御システムを明らかにできたらと考えている。

文 献

- 1) Yang Y, Liu B, Dai J, et al. : Heat shock protein gp96 is a master chaperone for toll-like receptors and is important in the innate function of macrophages. *Immunity* 26 : 215-226, 2007 (doi : 10.1016/j.immuni.2006.12.005)
- 2) Liu B, Yang Y, Qiu Z, et al. : Folding of Toll-like receptors by the HSP90 paralogue gp96 requires a substrate-specific cochaperone. *Nat Commun* 1 : 79, 2010 (doi : 10.1038/ncomms1070)
- 3) Wakabayashi Y, Kobayashi M, Akashi-Takamura S, et al. : A protein associated with toll-like receptor 4 (PRAT4A) regulates cell surface expression of TLR4. *J Immunol* 177 : 1772-1779, 2006
- 4) Takahashi K, Shibata T, Akashi-Takamura S, et al. : A protein associated with Toll-like receptor (TLR) 4 (PRAT4A) is required for TLR-dependent immune responses. *J Exp Med* 204 : 2963-2976, 2007 (doi : 10.1084/jem.20071132)
- 5) Akashi S, Saitoh S, Wakabayashi Y, et al. : 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 (doi : 10.1084/jem.20031076)
- 6) Saitoh S, Akashi S, Yamada T, et al. : 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 (doi : 10.1093/intimm/dxh097)
- 7) Saitoh S, Akashi S, Yamada T, et al. : Ligand-dependent Toll-like receptor 4 (TLR4)-oligomerization is directly linked with TLR4-signaling. *J Endotoxin Res* 10 : 257-260, 2004 (doi : 10.1179/096805104225005904)
- 8) Park BS, Song DH, Kim HM, et al. : The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458 : 1191-1195, 2009 (doi : 10.1038/nature07830)
- 9) Kim HM, Park BS, Kim JI, et al. : Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* 130 : 906-917, 2007 (doi : 10.1016/j.cell.2007.08.002)
- 10) Ohto U, Fukase K, Miyake K, et al. : Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVa. *Science* 316 : 1632-1634, 2007 (doi : 10.1126/science.1139111)
- 11) Kobayashi M, Saitoh S, Tanimura N, et al. : Regulatory roles for MD-2 and TLR4 in ligand-induced receptor clustering. *J Immunol* 176 : 6211-6218, 2006
- 12) Tanimura N, Saitoh S, Matsumoto F, et al. : Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 368 : 94-99, 2008 (doi : 10.1016/j.bbrc.2008.01.061)
- 13) Kagan JC, Su T, Horng T, et al. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol* 9 : 361-368, 2008 (doi : 10.1038/ni1569)
- 14) Lee BL, Moon JE, Shu JH, et al. : UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs. *Elife* 2 : e00291, 2013 (doi : 10.7554/eLife.00291)
- 15) Kim YM, Brinkmann MM, Paquet ME, et al. : UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 452 : 234-238, 2008
- 16) Kanno A, Tanimura N, Ishizaki M, et al. : Targeting cell surface TLR7 for therapeutic intervention in autoimmune diseases. *Nat Commun* 6 : 6119, 2015 (doi : 10.1038/ncomms7119)
- 17) Majer O, Liu B, Barton GM : Nucleic acid-sensing TLRs : trafficking and regulation. *Curr Opin Immunol* 44 : 26-33, 2017 (doi : 10.1016/j.coi.2016.10.003)
- 18) Kanno A, Yamamoto C, Onji M, et al. : Essential role for Toll-like receptor 7 (TLR7)-unique cysteines in an intramolecular disulfide bond, proteolytic cleavage and RNA sensing. *Int Immunol* 25 : 413-422, 2013 (doi : 10.1093/intimm/dxt007)
- 19) Tanji H, Ohto U, Motoi Y, et al. : Autoinhibition and relief mechanism by the proteolytic processing of Toll-

- like receptor 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113 : 3012-3017, 2016 (doi : 10.1073/pnas.1516000113)
- 20) Fukui R, Saitoh S, Matsumoto F, et al. : Unc93B1 biases Toll-like receptor responses to nucleic acid in dendritic cells toward DNA- but against RNA-sensing. *J Exp Med* 206 : 1339-1350, 2009 (doi : 10.1084/jem.20082316)
- 21) Fukui R, Saitoh S, Kanno A, et al. : Unc93B1 restricts systemic lethal inflammation by orchestrating Toll-like receptor 7 and 9 trafficking. *Immunity* 35 : 69-81, 2011 (doi : 10.1016/j.immuni.2011.05.010)
- 22) Saitoh SI, Abe F, Kanno A, et al. : TLR7 mediated viral recognition results in focal type I interferon secretion by dendritic cells. *Nat Commun* 8 : 1592, 2017 (doi : 10.1038/s41467-017-01687-x)