

研究課題別評価

1 研究課題: 自然免疫による微生物認識の分子機構の解明

2 研究者氏名: 牟田 達史

グループメンバー: 砂川 優子(研究期間:H14.4.1~H16.3.31)

横山 照史(研究期間:H14.5.1~H14.6.30)

浅井 大輔(研究期間:H15.4.1~H17.3.31)

3 研究の狙い:

多細胞生物が1個体として成立するためには、異なる細胞間の認識を介して、それぞれの場における反応の制御により、同一のゲノムからなる多機能の自己を確立することが必要である。自己細胞を認識する初期発生と、外来の異物・微生物を認識する生体防御系はその代表的な例である。全ての多細胞生物がもつ生体防御系である自然免疫系は、体内に侵入した病原微生物表面の特異的な分子パターンを認識し、適切な炎症反応を、適切な場所で、適切な程度、惹起する。

本研究では、異物認識の物質的基盤、シグナル増幅システム、及び反応の“場”を限定する機構に関する新しい概念の提唱を目指し、自然免疫系において受容体として機能する Toll-like receptor(TLR)による微生物表面物質に対する分子認識機構とともに、我々が見出した新規誘導型核タンパク質 I κ B- ζ による細胞応答制御機構を明らかにすることを目的とした。

4 研究成果:

(1) 哺乳動物の真菌に対する自然免疫機構

哺乳動物では、リポ多糖(LPS)に代表される様々な細菌由来成分、あるいはウイルス由来の成分が、TLR を介して自然免疫担当細胞を活性化することが明らかにされている。一方、細菌と並んで重要な病原微生物である真菌に対する細胞応答反応については、未だ不明な点が多い。研究者が以前研究していた節足動物カブトガニの体液凝固系は、真菌に由来する(1 \rightarrow 3)- β -D-グルカンによって活性化される。本研究では、 β -グルカンの哺乳動物マクロファージ活性化能について解析した。

様々な β -グルカンのマクロファージ活性化能を、炎症応答において中心的な役割を果たす転写因子 Nuclear Factor (NF)- κ B の活性化を指標に検討したところ、直鎖状(1 \rightarrow 3)- β -D-グルカンであるカードランに最も強い活性を見出した。中性の水溶液中で不溶性のカードランは、その三重らせん構造を基本とした高次構造を破壊する 50-300 mM のアルカリ溶液を用いて溶解することによって、その活性が著しく増強され、マクロファージ様細胞株において、腫瘍壊死因子(TNF- α)、ケモカイン(MIP-2)、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS)の発現を誘導した。カードランに対する細胞応答は、TLR/インターロイキン(IL)-1 受容体に共通するアダプター分子 MyD88 の変異体の遺伝子導入により抑制された。従って、直鎖状(1 \rightarrow 3)- β -D-グルカンは、その高次構造に依存してマクロファージ刺激活性をもち、その受容体は、TLR のような Toll/IL-1 receptor-like (TIR)ドメインを含む膜タンパク質であることが強く示唆された。また、我々は、 β -グルカンによるマクロファージ活性化には、細胞膜上の分子に加え、血清成分が必須であることを明らかにしており、血清中、あるいは細胞表面で β -グルカンと直接相互作用する因子を介して、 β -グルカンの高次構造変換が誘導され、TLR の活性化が惹起されていると考えられる。

(2) 自然免疫応答を制御する新規転写制御因子 I κ B- ζ の分子機能

我々は、自然免疫系の強力な活性化剤であるグラム陰性菌由来のリポ多糖(LPS)でマクロファージを刺激した際に誘導される分子を検索し、非刺激の細胞ではほとんどその発現が観察されないが、LPS 刺激によって強く誘導される新規分子を見出し、I κ B- ζ (zeta)と命名した。この分子は C 末端側に I κ B タンパク質ファミリーにみられるアンキリンリピート構造をもつが、その N 末端側は、

既知のタンパク質と相同性を示さない。典型的な I κ B タンパク質と異なり、核内に局在する I κ B- ζ は、炎症応答において中心的な役割を果たす転写因子 NF- κ B の p50 サブユニットとその C 末端側を介して結合し、その転写活性を阻害することが当初の解析によって示された。

I κ B- ζ は、LPS 刺激のみならず、ペプチドグリカン、CpG DNA などの TLR 刺激物質、さらには IL-1 β による刺激によっても強く発現が誘導された。一方、同様な炎症性サイトカインである TNF- α 刺激の場合には、その誘導はほとんど見られなかった。I κ B- ζ 誘導に関わる細胞内シグナル伝達系について検討したところ、この分子の誘導には、NF- κ B 自身の活性が必須であるが十分ではないことが判明し、TLR、IL-1 受容体に共通して存在する細胞内ドメインである TIR ドメインの活性化に由来する、特異的な mRNA 安定性の上昇が重要であることが明らかになった。

他のタンパク質と相同性を示さない I κ B- ζ の N 末端側の機能について検討した結果、この領域内に核移行シグナル(NLS)とともに、転写活性化活性をもつ領域が存在することを明らかにした。この領域の示す活性は、全長の I κ B- ζ には検出されず、共に転写活性をもたない NF- κ B p50 サブユニットと全長の I κ B- ζ を共発現した際に、転写活性が検出されるようになることを見出した。従って、I κ B- ζ の転写活性化能は、NF- κ B との結合を介した構造変換によって発揮されると考えられた。実際の遺伝子の転写に及ぼす影響を調べるため、繊維芽細胞やマクロファージにレトロウイルス発現系を用いて I κ B- ζ を過剰発現したところ、LPS 刺激に伴う IL-6 の産生が亢進する一方、TNF- α の産生が抑制されることを見出した。

さらに、I κ B- ζ の生体内での機能を明らかにする目的で、大阪大学の審良教授のグループと共同で I κ B- ζ 遺伝子欠損マウス由来の細胞の自然免疫応答について検討したところ、LPS や他の TLR 刺激物質による刺激、あるいは IL-1 β 刺激に対する IL-6 mRNA の誘導がほとんどみられないことが判明した。一方、TNF- α 刺激に伴う IL-6 産生は正常であった。さらにこの細胞では、IL-6 のみならず、IL-12 などを含む一群の LPS 誘導性の遺伝子の発現が著しく障害されていることが判明し、I κ B- ζ は自然免疫活性化時におけるこれらの遺伝子発現に必須の因子であることが明らかになった。さらに、LPS 投与後のマウス個体レベルでのサイトカイン産生について検討したところ、IL-12 の産生は減弱しているものの、TNF- α の産生が著しく亢進していることが明らかになった。

以上の結果より、I κ B- ζ は、自然免疫活性化時に、NF- κ B 活性化と特異的な mRNA 安定化を介して細胞内に出現する分子であり、NF- κ B やその他の因子との相互作用を介して、ある一群の遺伝子の転写の亢進に必須な役割を果たす一方、別の遺伝子群の転写に対しては抑制的に機能する二面性をもち、炎症の方向性を左右する極めて重要な因子であることが判明した。

5 自己評価:

微生物由来物質による TLR 活性化の分子基盤に関しては、真菌の構成成分である β -グルカンにその高次構造依存的に細胞刺激活性があることを示すことができたが、分子認識の本質に迫るには至らなかった。しかし、本分野は、TLR の biology の解析が非常に進んだ現在でも、世界的に未解決の分野であり、今後も解析を進める必要がある。一方、I κ B- ζ による細胞応答制御については、in vitro の解析によって、この分子のもつ NF- κ B 結合性および転写活性化能、さらにその特異的誘導機構について明らかにするとともに、その炎症の転写制御における生理機能についても遺伝子欠損マウスの解析により示すことができた。本研究の成果により、本因子が転写を正と負、双方向に制御する極めて重要な転写制御因子であることを確立することができた。さらに、これまで NF- κ B などの単一の転写因子によって制御されていると考えられていた多くの転写反応に、刺激に伴い初めて誘導される I κ B- ζ が必須であることが示されたことにより、炎症反応が、複数の活性化ステップにより誘導される転写制御因子によって、時系列および遺伝子特異的に巧妙に制御されていることを示すことができ、シグナル増幅とともに、反応の「場」および「質」を規定する転写反応制御において新たな概念を提唱することができたと考えられる。

6 研究総括の見解:

自然免疫系において受容体として機能する Toll-Like Receptor (TLR) による微生物表層物質に対する分子認識機構を解明するとともに新規誘導型核蛋白質 I κ B- ζ による細胞応答制御機構を

明らかにすることを目的とした研究である。微生物由来物質による TLR 活性化に関しては、真菌の構成成分である β -グルカンがその高次構造依存的に細胞刺激活性があることを示した。また I κ B- ζ による細胞応答制御については、in vitro の解析によって、この分子の NF- κ B 結合性および転写活性化能、さらにその特異的誘導機構について明らかにした。今後これらの成果を基に一層の発展が期待される。

7 主な論文等：

論文

1. Motoyama, M., Yamazaki, S., Eto-Kimura, A., Takeshige, K., and Muta, T.:
Positive and Negative Regulation of Nuclear Factor- κ B-mediated Transcription by I κ B- ζ , an Inducible Nuclear Protein
J. Biol. Chem., Papers In Press, published online ahead of print December 23, 2004. *J. Biol. Chem.*, 10.1074/jbc.M412738200.
2. Yamazaki, S., Muta, T., Matsuo, S., and Takeshige, K.:
Stimulus-Specific Induction of a Novel NF- κ B Regulator, I κ B- ζ , via Toll/Interleukin-1 Receptor Is Mediated by mRNA Stabilization.
J. Biol. Chem. 280, 1678-1687, (2005)
3. Fujimoto, T., Yamazaki, S., Eto-Kimura, A., Takeshige, K., and Muta, T.:
The Amino-terminal Region of Toll-like Receptor 4 Is Essential for Binding to MD-2 and Receptor Translocation to the Cell Surface.
J. Biol. Chem. 279, 47431-47437, (2004)
4. Yamamoto, M., Yamazaki, S., Uematsu, S., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Kuwata, H., Takeuchi, O., Takeshige, K., Saitoh, T., Yamaoka, S., Yamamoto, N., Yamamoto, S., Muta, T., Takeda, K., Akira, S.:
Regulation of Toll/IL-1 Receptor-mediated Gene Expression by the Inducible Nuclear Protein I κ B ζ .
Nature 430, (6996), 218-222, (2004).
5. Muta, T., Yamazaki, S., Eto, A., Motoyama, M., and Takeshige, K.:
I κ B- ζ , a New Anti-inflammatory Nuclear Protein Induced by Lipopolysaccharide, Is a Negative Regulator for Nuclear Factor- κ B.
J. Endotoxin Res. 9, (3), 187-191, (2003).
6. Eto, A., Muta, T., Yamazaki, S., and Takeshige, K.:
Essential Roles for NF- κ B and a Toll/IL-1 Receptor Domain-Specific Signal(s) in the Induction of I κ B- ζ .
Biochem. Biophys. Res. Commun. 301, (2), 495-501, (2003).
7. Kataoka, K., Muta, T., Yamazaki, S., and Takeshige, K.:
Activation of Macrophages by Linear (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucans: IMPLICATIONS FOR THE RECOGNITION OF FUNGI BY INNATE IMMUNITY.
J. Biol. Chem. 277, (39), 36825-36831, (2002).

招待講演

Muta, T.:

Molecular Basis for Innate Immune Recognition of (1,3)- β -D-Glucan as a Pathogen-Associated Molecular Pattern.

The 8th Conference of the International Endotoxin Society (Lunchon Seminar), November 17, 2004, Kyoto.

牟田 達史:

獲得免疫系の発動を制御する Toll-like receptor を介した自然免疫系活性化とその制御の分子機構。

第 63 回日本癌学会学術総会(教育講演), 2004 年 10 月 1 日, 福岡.

牟田 達史:

異なる種間でみられる Toll-like receptor を介した自然免疫機構の共通性。

第 5 回日本進化学会(シンポジウム), 2003 年 8 月 3 日, 福岡.

牟田 達史:

Roles of Toll-like receptors in innate immune responses to fungi and their regulation by a novel inducible nuclear protein, I κ B- ζ .

第 76 回日本生化学会大会(シンポジウム), 2003 年 10 月 18 日, 横浜.

牟田 達史:

微生物菌体成分に対する自然免疫担当細胞の Toll-like receptor (TLR)を介した応答とその制御。

第 76 回日本細菌学会(シンポジウム), 2003 年 4 月 1 日, 熊本.

牟田 達史:

自然免疫による真菌細胞壁主要成分(1 \rightarrow 3)- β -D-Glucan 認識の分子機構。

第 25 回日本分子生物学会年会(ワークショップ), 2002 年 11 月 14 日, 横浜.

Muta, T., Yamazaki, S., Eto, A., Motoyama, M., and Takeshige, K.:

I κ B- ζ , a New Anti-inflammatory Nuclear Protein Induced by LPS, Is a Negative Regulator for NF- κ B.

The 7th Conference of International Endotoxin Society (Invited), July 18-21, 2002, Washington D. C. USA