

平成13年度

若手研究者奨励研究報告書

創薬等ヒューマンサイエンス研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

エンドトキシン受容体による異物認識の分子的基盤に関する研究

所属 国立感染症研究所 細胞化学部

研究者 川崎清史

(要旨)

TLR4-MD-2 複合体を強制発現させた細胞株 Ba/F3 は Flavolipin 刺激に应答して NF- κ B 活性化が起こるようになることから、Flavolipin は TLR4-MD-2 複合体のリガンドであることがわかった。さらに、Flavolipin 脂肪酸部位中の光学活性中心が R 型であることが異物として認識されるために必要であることがわかった。

1. 研究目的

マクロファージは様々な感染微生物によって活性化されて、様々な炎症性サイトカインを分泌誘導することが古くから知られている。そして、この応答は感染防御上重要であるだけでなく敗血症の原因になることからマクロファージ活性化の機構は多く研究者の関心を集めてきた。マクロファージ活性化は精製した微生物成分によっても引き起こされるので、マクロファージ細胞表面には様々な微生物成分に共通したある種の分子パターンを認識する受容体が存在するとの仮説が立てられていた。最近の研究によって、微生物成分のうち、リポポリサッカライド (LPS) の認識・識別には Toll-like receptor (TLR) 4-MD-2 複合体が、リポペプチドやペプチドグリカンなどの認識・識別には TLR2 を中心とする複合体が関わることを示されている。しかし、それぞれの TLR がどのような分子パターンを認識できるのか、という TLR の分子認識の点についてはまだ未解明の点が多くある。本研究では LPS 受容体である TLR4-MD-2 複合体による異物認識の分子メカニズムの解明を研究目的としている。これまでに LPS とは構造的には異なるけれども、TLR4-MD-2 複合体のリガンドとなりうる分子の検索を行った結果、抗癌剤の一種である、西洋イチイ由来の、タキソールが TLR4-MD-2 複合体のリガンドとなることをこれまでに私は見いだしている。そこでまず、本年度はさらに、TLR4-MD-2 複合体の新規リガンド候補を探し、実験的にリガンドであるか否かを検証した。

アミノ酸含有脂質(lipoaminoacid)は百日咳菌や緑膿菌などのグラム陰性病原菌に存在する膜脂質である。Lipoaminoacid の一種である Flavolipin は日和見感染菌 *Flavobacterium meningosepticum* の膜脂質成分の 20% をしめる主要成分であり、マクロファージを活性化して TNF- α 等の炎症性サイトカインを誘導する活性を持つことが知られている。これまでに Flavolipin の活性に必要な構造の決定や Flavolipin による刺激伝達に関わる分子の同定はされていなかったが、唯一、LPS 低応答性変異マウス C3H/HeJ 由来マクロファージでは Flavolipin による活性化が見られないことが知られていた。そこで、Flavolipin が TLR4-MD-2 複合体のリガンドになるか、検討した。

2. 研究方法

マウス pro-B 細胞株 Ba/F3 に TLR4-MD-2 複合体を強制発現させた細胞株を作成し、*Flavobacterium meningosepticum* の膜脂質成分から分離精製した Flavolipin (図 1) で刺激をした。細胞内に刺激が伝達されたか否かは転写因子 NF- κ B の活性化が見られるかどうかをゲルシフト法及び細胞にあらかじめ導入しておいた NF- κ B 活性化依存レポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ) の発現測定により解析した。細胞にさらに LPS 受容体である CD14 を発現させて、同様の測定により、Flavolipin 刺激に CD14 が関わるか否かを解析した。また、Flavolipin には 2 カ所の光学活性中心が存在する。TLR4-MD-2 複合体による刺激認識においてこの立体構造の重要性を調べるため、それぞれについて光学異性体を合成して TLR4-MD-2 発現 Ba/F3 細胞及びマクロファージ様細胞株 J774.1 に対する光学異性体の刺激効果を比較検討した。

3. 研究成果

マウス pro-B 細胞株 Ba/F3 に TLR4-MD-2 複合体を強制発現させると細胞は Flavolipin 刺激に応答して NF- κ B 活性化が起こるようになった (図 2)。TLR4 の細胞質領域を欠損させた変異 TLR4 では刺激が伝達されないことから TLR4 の細胞質領域を介して刺激伝達が行なわれると考えられた。以上の結果から、LPS やタキソールと同様に Flavolipin は TLR4-MD-2 複合体のリガンドであることが明らかになった。この NF- κ B 活性化は細胞表面への CD14 に発現によって、さらに増強された。従って、CD14 も Flavolipin 刺激伝達に関わることがわかった。CD14 は LPS 刺激伝達を増強したが、タキソール刺激伝達は増強しなかった。TLR4-MD-2 複合体のリガンドのうちでも、CD14 の要求性は異なると考えられた。また、Flavolipin には 2 カ所の光学活性中心が存在する。TLR4-MD-2 複合体による刺激認識においてこの立体構造の重要性を調べるため、それぞれについて光学異性体を合成して TLR4-

MD-2 発現 Ba/F3 細胞及びマクロファージ様細胞株 J774.1 に対する光学異性体の刺激効果を比較検討した。その結果、脂肪酸部位中の光学活性中心が R 型であると TLR4-MD-2 複合体を強制発現した Ba/F3 細胞株での NF- κ B 活性化依存レポーター遺伝子の活性化 (図 3)、マクロファージ様細胞株からの TNF α 発現誘導活性が見られることがわかった。以上の結果から、Flavolipin の刺激伝達に TLR4-MD-2 複合体が関与すること、及び Flavolipin の脂肪酸部位の立体配置が R 型であることがマクロファージ活性化に重要であることが明らかになった。

4. 考察

以上の結果より、Flavolipin は CD14 及び、TLR4-MD-2 複合体に認識されるリガンドであると考えられる。また以上の因子は LPS 認識にも関わる因子である。Flavolipin と LPS は構造が部分的に類似しているが、この類似した部分が受容体に認識されるのに関わる部分であるかもしれない。

5. まとめ

TLR4-MD-2 複合体は構造的に異なる LPS、タキソール、Flavolipin を認識できる受容体である。これらのリガンドが TLR を活性化する分子機構を解明することにより、パターン認識の分子基盤を解明したい。

6. 研究発表

- 1) K. Gomi, K. Kawasaki, Y. Kawai, M. Shiozaki, and M. Nishijima. Toll-like receptor 4-MD-2 complex mediates the signal transduction induced by flavolipin, an amino acid-containing lipid unique to *Flavobacterium meningosepticum*. *J. Immunol.* In press
- 2) K. Kawasaki and M. Nishijima. Invited minireview: Molecular basis for innate immune recognition of microbial components. *Jpn. J. Infect. Dis.* In press
- 3) S. Akashi, Y. Nagai, H. Ogata, M. Oikawa, K. Fukase, S. Kusumoto, K. Kawasaki, M. Nishijima, S. Hayashi, M. Kimoto, and K. Miyake. Human MD-2 confers on mouse Toll-like receptor 4 species-specific lipopolysaccharide recognition. *Int. Immunol.* 13 1595-1599 (2001)
- 4) K. Kawasaki, S. Akashi, R. Shimazu, T. Yoshida, K. Miyake, and M. Nishijima. Involvement of Toll-like receptor 4/MD-2 Complex in species-specific lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J. Endotoxin Res.* 7 232-236 (2001)

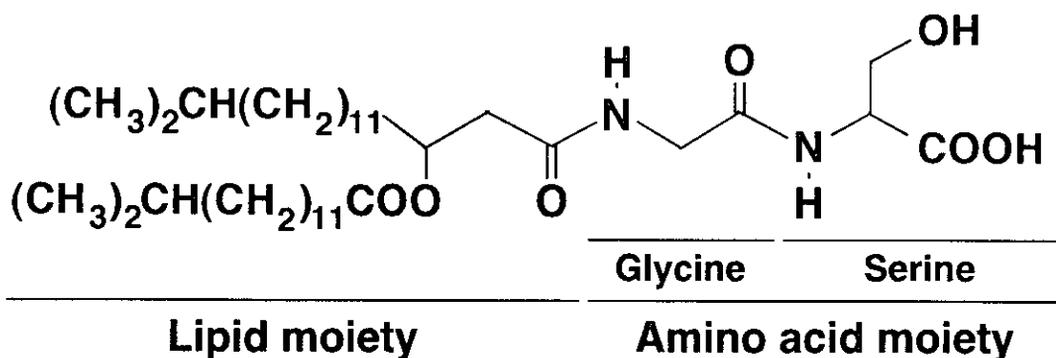


FIGURE 1. Structure of flavolipin.

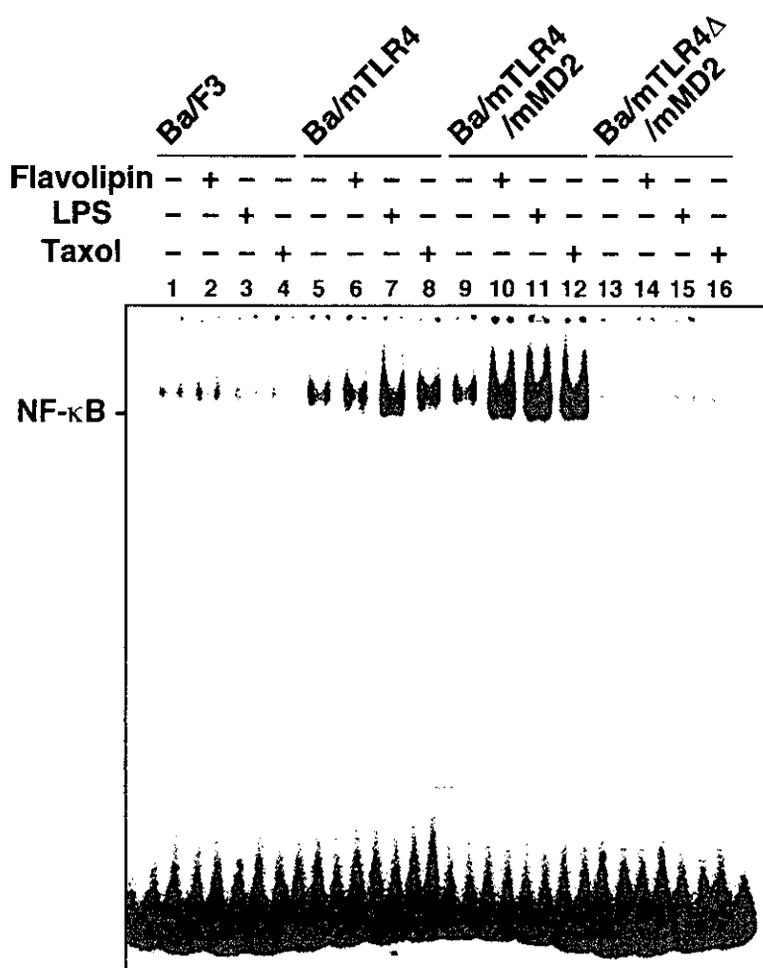


FIGURE 2. The TLR4-MD-2 complex mediates flavolipin signaling. *A*, Total of 2×10^6 Ba/F3 (lanes 1–4), Ba/mTLR4 (lanes 5–8), Ba/mTLR4/mMD2 (lanes 9–12), or Ba/mTLR4Δ/mMD2 (lanes 13–16) cells were incubated at 37°C for 1 h in culture medium containing 0.001% TEA and 0.0025% DOC (lanes 1, 5, 9, and 13); 100 μg/ml flavolipin, 0.001% TEA, and 0.0025% DOC (lanes 2, 6, 10, and 14); 5 ng/ml LPS (lanes 3, 7, 11, and 15); or 10 μM Taxol (lanes 4, 8, 12, and 16). After incubation, nuclear extracts were prepared and subjected to EMSA to measure NF-κB activation as described previously (38). *B*, Ba/mTLR4/mMD2 cells were stimulated with the indicated concentrations of flavolipin or LPS, and NF-κB activation was measured as described for *A*.

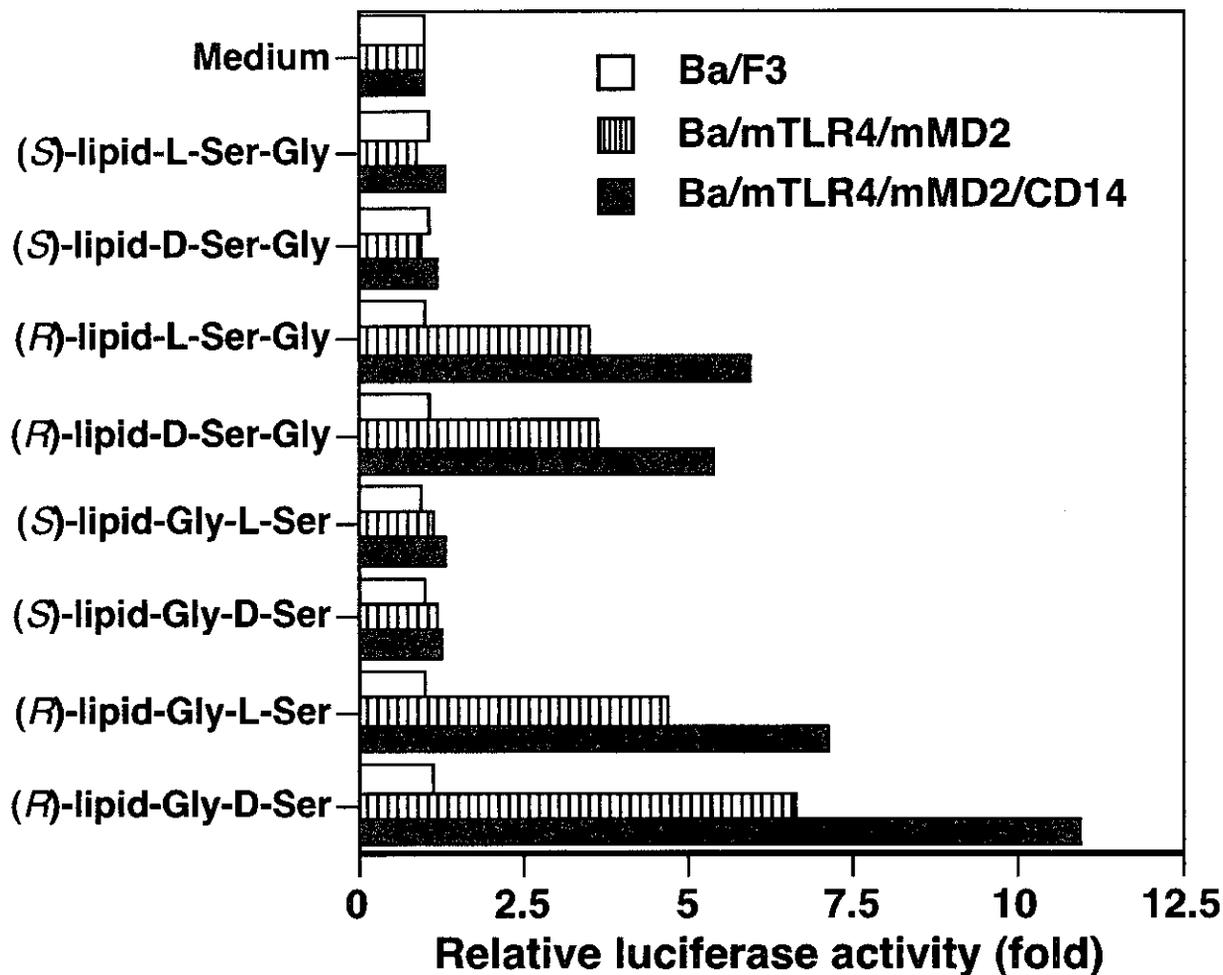


FIGURE 3. The (*R*)-configuration of the flavolipin lipid moiety is important for signal induction via the TLR4-MD-2 complex. Ba/F3 cells with p55Igκluc introduced and Ba/mTLR4/mMD2 and Ba/mTLR4/mMD2/CD14 cells (4×10^4 cells/100 μ l of cell culture medium containing 1% DMSO in the wells of a 96-well dish (Costar)) were stimulated without (medium) or with 50 μ g/ml of the synthesized flavolipin ((*R*)-lipid-Gly-L-Ser), flavolipin stereoisomers ((*R*)-lipid-Gly-D-Ser and (*S*)-lipid-Gly-(D or L)-Ser), and flavolipin analogs ((*R* or *S*)-lipid-(D or L)-Ser-Gly). After stimulation at 37°C for 4 h, 25 μ l of 5 \times cell lysis reagent (Promega) was added to the wells, and then luciferase activity was measured. Luciferase activity was normalized as to the activity in cells incubated without a stimulant and is presented as fold induction. The data represent the averages for duplicate wells.

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社