

Toll-like receptor4結合分子MD-2の機能解析と創薬への応用

所属 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
研究者 大西 貴弘

要旨

MD-2におけるグリコシル化の役割を調べるために、グリコシル化部位を他のアミノ酸に置換したMD-2を作成した。また、TLR4以外のMD-2結合分子をYeast two-hybrid screeningを用いて検索し、その分子の働きを調べた。

1. 研究目的

エンドトキシンは感染症に伴って重篤な疾患を引き起こし、多くの人々が死亡する原因因子として臨床上大きな問題となっている毒素である。しかし、エンドトキシンの作用に中心的な役割を果たしているマクロファージの活性化機構はこれまでほとんど解明されていなかった。このため、エンドトキシン疾患に対する真に効果的な治療法および拮抗薬の開発が妨げられてきた。最近になってエンドトキシンによる細胞活性化シグナルを直接細胞質内に伝達する受容体としてToll-like receptor (TLR)ファミリーの中のTLR4が同定された。このTLR4と細胞膜上で結合しTLR4を介したエンドトキシンのシグナル伝達に必要な不可欠な分子としてMD-2が知られている。しかしながら、このMD-2の分子機序に関してはほとんど知られていない。本研究はこのMD-2の分子機序を明らかにすることにより、エンドトキシンによるマクロファージ活性化機構を解明し、本質的なエンドトキシン疾患治療法および拮抗薬の開発への応用を目指すものである。

2. 研究方法

プラスミドの作成

ヒトCD14cDNAを含むプラスミドは大分医科大学の山本俊輔博士より分与していただいた。ヒトMD-2 (hMD-2)とhTLR4のコード領域はそれぞれTHP-1細胞からのRNAおよび人の脾臓RNA (Origene Technologies, Rockville, MD)よりRT-PCRを用いて増幅した。hMD-2、hCD14、hTLR4のコード領域から予想されるシグナルペプチド配列を除いたものをプレプロトリプシンシグナル配列とEIAVタグ(アミノ酸配列ADRRIPTGTAE)を含む哺乳類発現ベクターにサブクローニングした。タグの付加は培養細胞におけるhMD-2、hCD-14、hTLR4の活性に影響を与えなかった。ルシフェラーゼレポータープラスミドendothelial cell-leukocyte adhesion molecule pELAM-1はE-セレクトインプロモーターのPCR断片(-730から+52)をpGL3 Basic vector (Promega, Madison, WI)のSacI-HindIII部位に挿入して作成した。

MD-2におけるグリコシル化がMD-2の働きにどのような影響を及ぼしているかを調べるために、hMD-2における2ヶ所のN-グリコシル化部位である26, 114番目のアスパラギンの内いずれかひとつ(N26QおよびN114Q)、もしくは両方をグルタミンに置換した変異体MD-2 (N26:114Q)を作成した。変異体作成はPCRで行った。使用したPCRプライマーはN26Qには5'-GGG TCT GCC AGT CAT CCG ATG CA-3'と5'-AAT ACT GCT TCT GAG CTT CAG TAA ATA TGG-3'、N114Qには5'-GAG ACT GTG CAG ACA ACA ATA TCA TTC TCC-3'と5'-TCC CTT CAG AGC TCT GCA AAA AGA GT-3'を用いた。

ヒトHSP70 (HSPA1A)のコード領域はCytoTrap XR Human Spleen Library (Stratagene, LaJolla, CA)からRT-PCRを用いて増幅し、FLAGタグを含むpcDNA3ベクターにサブクローニングした。ATPaseドメインを欠失した変異体HSP70作成はPCRで行った。使用したPCRプライマーは5'-CTC CTC GGG GTA GAA TGC CTT GGT CT-3'と5'-ATC TTC ACC ACC TAC TCC GAC AAC CAA-3'を用いた。

全ての変異はdye terminator cycle sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotch, Piscataway)とABI Prism 310 genetic analyzer (PerkinElmer Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いたシーケンスを行い確認した。

グリコシダーゼ処理

hMD-2発現ベクター(5 μ g)をリン酸カルシウム法で293細胞にトランスフェクトして24時間後、protease inhibitor mix (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)を含むlysis buffer(10 mM HEPES-KOH, 5 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 10 mM KCl (pH 7.9))を用いて細胞を氷上で溶解した。1000 \times g、5分間遠心後、上清を細胞抽出液として使用した。細胞抽出液は0.5% SDS、1% 2-ME存在下で10分間煮沸した。1/10容量の0.5 M sodium phosphate (pH 7.5)と10% Nonidet P-40を加えた後、PNGaseF(最終濃度10U/ml)と共に37 $^{\circ}$ C、1時間加熱し、SDS-PAGE電気泳動に用いた。hMD-2は抗EIAV抗体とECLシステム(Amersham, Arlington Heights, IL)を用いたウエスタンブロットで検出した。

LPSによる細胞活性化に対するMD-2のグリコシル化の影響

MD-2におけるグリコシル化がTLR4を介したLPSによる細胞の活性化にどのような影響を与えているか調べた。hTLR4、hCD14および野生型もしくは変異体hMD-2を発現させた293細胞をLPS刺激した(0~100ng/ml)。6時間後、細胞の活性化をNF- κ B依存性のレポーターアッセイで測定した。さらにグリコシル化の影響を調べるために、N-グリコシル化の阻害剤であるツニカマイシン存在下でLPS刺激を行った。hMD-2、hTLR4を発現させた293細胞をツニカマイシン存在下(0~100ng/ml)で16時間培養後、DMEM(10%FCS)中でLPS(10 ng/ml)もしくはTNF- α (10 ng/ml)で刺激した。6時間後、細胞の活性化をNF- κ B依存性のレポーターアッセイで測定した。この実験ではツニカマイシンの影響でGPI-アンカータンパクであるCD14が細胞膜表面から遊離するためCD14は発現させなかった。代わりに10%FCS添加DMEMを用いて、可溶化CD14とLBPを供給した。

細胞表面におけるMD-2の発現に対するグリコシル化の役割

グリコシル化はタンパクの折りたたみや輸送に重要な役割を果たすと考えられているため、MD-2の細胞表面での発現にグリコシル化が関与しているか調べた。293細胞に野生型もしくは変異体hMD-2を発現させ、24時間後、PBSで2回洗浄した。氷冷した膜非透過性のビオチン化試薬 sulfo-NHS-LC-LC-biotin (Pierce) と共に4°C、30分培養した。その後、ビオチン化反応を停止するために20 mMグリシンを含むPBS中で4°C、15分培養した。細胞は200 μ lのlysis bufferで溶解し、0.5% Nonidet P-40を含むPBS (PBSN)で500 μ lに希釈した。ストレプトアビジンアガロースを加え4°C、1時間培養後、PBSNでアガロースを3回洗浄した。アガロースはSDS-PAGE sample buffer中で煮沸し、上精から抗EIAV抗体とECLシステムを用いたウエスタンブロットでhMD-2を検出した。

TLR4との結合に対するMD-2のグリコシル化の役割

MD-2は細胞表面でTLR4と複合体を形成しているため、MD-2とTLR4の結合にMD-2のグリコシル化が関与しているか調べた。293細胞に野生型もしくは変異体hMD-2とhTLR4を発現させて24時間後、上述の様に細胞抽出液を作成した。PBSNで500 μ lに希釈後、抗hTLR4抗体とプロテインA/Gセファロース (Pierce)を加え4°C、1時間培養した。セファロースをPBSNで3回洗浄後、SDS-PAGE sample buffer中で煮沸し、上精から抗EIAV抗体とECLシステムを用いたウエスタンブロットでTLR4を検出した。

細胞表面におけるLPSの結合に対するMD-2のグリコシル化の役割

細胞表面へのLPSの結合にMD-2のグリコシル化が関与しているか調べた。293細胞をラットコラーゲン type I コートカバーグラス (BD Biosciences, San Jose, CA) に接種した後、野生型もしくは変異体hMD-2、hCD14、hTLR4をそれぞれ単独もしくは複数の組み合わせで発現させ、Alexa fluor 594 標識 LPS (100 ng/ml) (Molecular Probes) と共に37°C、1時間培養した。PBSで3回洗浄後、3%パラホルムアルデヒドを含むPBS (pH7.6) で20分間固定後、VECTASHIELD mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用いてスライドグラス上に載せ、蛍光顕微鏡下で観察した。

NF- κ B レポーターアッセイ

293細胞を6-ウェルプレートに接種後(4 \times 10⁵/ウェル)、リン酸カルシウム法で発現プラスミド(0.02 μ g)、pELAM-L luciferase プラスミド (0.2 μ g)、pRL-TK (*Renilla* luciferase-thymidine kinase) (Promega) をトランスフェクトした。24時間後、LPSを添加し6時間培養した。結果はthymidine kinaseの活性で標準化した。

Yeast two-hybrid screening

hMD-2のコード領域から予想されるシグナルペプチド配列を除いたものをプレプロトリプシンシグナル配列とEIAVタグを含むpSosベクターにサブクローニングした。このプラスミドを用いてCytoTrap XR Human Spleen Libraryをスクリーニングした。Yeast two-hybrid screeningはCyto trap Yeast two hybrid system (Stratagen, La Jolla, CA)を用いてメーカーの方法に従った。

LPSによる細胞活性化におけるHSP70の役割

HSP70 (HSPA1A)がLPSによる細胞活性化にどのような影響を与えているかを調べるために293細胞にTLR4、MD-2とATPaseドメインを欠失した変異体HSP70を発現させ、LPS刺激(10ng/ml)による細胞活性化をNF- κ B依存性のレポーターアッセイで測定した。HSP70には分子シャペロンとしての働きがあるため、この変異体HSP70を発現させた時の細胞表面におけるTLR4、MD-2の発現を膜非透過性のビオチン化試薬 sulfo-NHS-LC-LC-biotinを用いて上述の方法で検出した。HSP70がMD-2以外にTLR4やCD14と結合しているかどうかを調べるためにHSP70と共にTLR4もしくはCD14を293細胞に発現させ24時間後、上述の様に

細胞抽出液を作成した。PBSN で 500 μ l に希釈後、抗 FLAG 抗体とプロテイン A/G セファロースを加え 4°C、1 時間培養した。セファロースを PBSN で 3 回洗浄後、SDS-PAGE sample buffer 中で煮沸し、上精から抗 EIAV 抗体と ECL システムを用いたウエスタンブロットで TLR4、CD14 を検出した。

3. 研究結果

hMD-2 を 293 細胞に発現させ、細胞から細胞抽出液を作成した。この細胞抽出液から抗 EIAV 抗体を用いたウエスタンブロットで hMD-2 を検出すると移動度の異なる 3 本のバンドとして検出された。見かけ上の分子量は ~14、18、23kDa だった。このような複数のバンドが検出された原因としてグリコシル化の影響が考えられたので、hMD-2 を発現させた 293 細胞の細胞抽出液を N-グリコシダーゼの 1 種である PNGaseF で処理した。PNGaseF 処理した細胞抽出液を抗 EIAV 抗体を用いたウエスタンブロットによって調べたところ、3 本のバンドは最も移動度の速いバンド一本に収束した。フォスファターゼ処理ではバンドの移動度に変化はなかった。これらのことから、hMD-2 が 3 本のバンドとして検出される原因として hMD-2 の N-グリコシル化が示唆された。このことをさらに明らかにするために、hMD-2 上の 2 ヶ所の N-グリコシル化部位 (26、114 番目のアスパラギン) をグルタミンに置換した変異体 hMD-2 を作成した。1 ヶ所のグリコシル化部位を置換した変異体 (N26Q もしくは N114Q) を発現させるともともと移動度の遅いバンドが消失した。2 ヶ所のグリコシル化部位を置換した変異体 (N26:114Q) を発現させるともともと移動度の遅いバンドと中間のバンドが消失し、1 本に収束した。以上のことから hMD-2 は 26 番目と 114 番目のアスパラギンに N-グリコシル化を受ける糖タンパクであることが明らかとなった。TLR4 を介した LPS による NF- κ B の活性化に対する hMD-2 のグリコシル化の影響を NF- κ B 依存性のレポーターアッセイで調べた。293 細胞に hTLR4 と hCD14 のみを発現させて LPS 刺激を行っても細胞はほとんど反応しなかった。ここに野生型 hMD-2 を発現させると LPS によるレポーター活性の強い増強が見られた。野生型 MD-2 に代えて N26Q もしくは N114Q を発現させると部分的な活性が見られた。特に全てのグリコシル化部位を置換した N26:114Q を発現させるとわずかな活性化のみが認められた。グリコシル化の消失がこの弱い活性化の原因であることを確認するために、ツニカマイシンの影響を調べた。野生型 hMD-2 と hTLR4 を発現させた 293 細胞をツニカマイシン処理すると LPS による NF- κ B の活性化はツニカマイシンの濃度依存性に抑制された。一方 TNF- α による NF- κ B の活性化は抑制されなかった。これらのことから TLR4 を介した LPS による NF- κ B の活性化には MD-2 のグリコシル化が重要であることが示唆された。hMD-2 の細胞表面での発現に対して hMD-2 のグリコシル化が及ぼす影響を検討した。野生型もしくは変異体 hMD-2 を 293 細胞に発現させ、細胞表面のタンパクを膜非透過性のビオチン化試薬で標識した。ビオチン化タンパクはストレプトアビジンアガロースで回収し、ウエスタンブロットで hMD-2 を検出した。ストレプトアビジンでの沈降物からはほぼ等量の野生型 hMD-2 と変異体 hMD-2 が回収された。このことから 26 番目、114 番目のアスパラギンのグリコシル化は hMD-2 の細胞表面への発現には関与していないことが示された。

hMD-2 におけるグリコシル化が hMD-2 と TLR4 の結合に関与しているか調べた。hMD-2 と hTLR4 を 293 細胞に発現させ抗 hTLR4 抗体で免疫沈降を行い hTLR4 と共沈降してきた hMD-2 を検出した。その結果、hTLR4 もしくは hMD-2 を単独で発現させた場合、hMD-2 は沈降しなかった。野生型 hMD-2 と hTLR4 を発現させると hMD-2 は hTLR4 と共に沈降した。N26Q、N114Q、N26:114Q それぞれと hTLR4 を発現させても hTLR4 と共に沈降した。以上のことからグリコシル化を受けていない hMD-2 も野生型 MD-2 同様に TLR4 と結合できることが明らかになった。

Alexa Fluor594 標識 LPS を用いて、LPS の細胞表面への結合に hMD-2 のグリコシル化に関与しているか調べた。293 細胞に Vector control、hTLR4、野生型 hMD-2、N26:114Q のいずれか単独もしくはそれらの組み合わせを発現しただけでは LPS の結合は検出できなかった。しかし、野生型 hMD-2 と hCD14 もしくは野生型 hMD-2、TLR4、hCD14 の組み合わせで発現させると LPS の明らかな結合が観察された。この時、野生型 hMD-2 の代わりに N26:114 を発現させても LPS の結合を観察することができた。これらのことから hMD-2 におけるグリコシル化は LPS の細胞表面への結合には関与していないことが示唆された。

Yeast two-hybrid screening を用いて TLR4 以外の hMD-2 結合分子をスクリーニングした。hMD-2 を用いてヒトの脾臓の cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ HSP70 ファミリーの HSPA1A が MD-2 と結合した。TLR4/MD-2 を介した LPS の情報伝達における HSP70 の影響を調べるため ATPase ドメインを欠失した変異体 HSPA1A を作成した。この変異体 HSPA1A と TLR4、MD-2 を 293 細胞に発現させ、LPS 刺激による細胞の活性化を NF- κ B 依存性のレポーターアッセイで測定した。その結果、変異体 HSPA1A を発現させると LPS による細胞の活性化が大きく抑制された。このときに細胞表面の TLR4、MD-2 の発現量は変異体 HSPA1A を発現させることにより変化は見られなかった。

293 細胞に FLAG タグを付加した HSPA1A と TLR4 もしくは CD14 を発現させ、抗 FLAG 抗体で HSPA1A の免疫沈降を行い、このとき HSPA1A と共沈降してくる TLR4 もしくは CD14 を検出した。その結果、HSPA1A は MD-2 だけでなく TLR4 や CD14 と結合していることが明らかとなった。

4. 考察・まとめ

N-グリコシル化は多くの細胞表面タンパクに見られる修飾である。しかし、タンパクにおける糖鎖付加の正確な役割については明らかになっていない。現在までに理解されているグリコシル化の役割は少なくとも2つのグループに別けられる。ひとつはタンパクの物理化学的な正常に関するもので、タンパクの可溶性、電化、質量などの変化に関与する。これらはタンパクの折りたたみや、立体構造の維持、細胞内輸送に重要である。もうひとつは、生物学的な機能に関するものである。最近では細胞表面のレセプターにおけるリガンドの認識や情報伝達にこのグリコシル化が関与しているという報告がある。hMD-2におけるこのグリコシル化の機能を探るために、N-グリコシル化部位を欠失した変異体 hMD-2 を作成した。LPS 刺激による TLR4 を介した NF- κ B の活性化は野生型 hMD-2 に代えて変異体 MD-2 を発現させるとわずかな活性しか認められなくなった。しかし、変異体 hMD-2 も TLR4 との結合能を保持していることから、hMD-2 のアミノ酸を置換したことによって hMD-2 の二次構造が変化し、その機能の消失につながったとは考えにくい。さらに、ツニカマイシン処理を行った実験では、LPS による TLR4 を介した NF- κ B の活性化が大きく阻害された。この結果は hMD-2 におけるグリコシル化が TLR4 を介した LPS の反応に重大な意味を持つことを示唆している。TLR4 もそのアミノ酸配列上にグリコシル化部位を持つ。TLR4 を単独で細胞に過剰発現させると、定常的な NF- κ B の活性化の増加が見られるが、ツニカマイシン処理によっては、この定常的な NF- κ B の活性化の増加は阻害されなかった。このことは TLR4 におけるグリコシル化の欠失は少なくとも TLR4 の機能には影響を与えないことを示唆している。また、TNF- α レセプターには三ヶ所のグリコシル化部位が存在するが、TNF- α による NF- κ B の活性化はツニカマイシン処理による影響を受けなかった。このことは LPS 反応における hMD-2 のグリコシル化が特別な役割を持つことを示唆する。

Yeast two-hybrid screening を用いて MD-2 結合タンパクを検索したところ、HSP70 ファミリーの HSPA1A が検出された。HSP70 は分子シャペロン的一种で、多くの細胞内タンパクの折りたたみや輸送などに関与している。また、HSP70 は ATPase 活性をもっており、HSP70 と結合したタンパクは HSP70 に ATP が結合することによって放出される。ATPase ドメインを欠失した変異体 HSPA1A を TLR4、MD-2 と共に 293 細胞に発現させると、LPS による細胞活性化が阻害された。しかし変異体 HSPA1A を発現させたことにより TLR4、MD-2 の細胞表面での発現量に変化は見られなかった。このことから、変異体 HSPA1A を発現させたときに見られる細胞活性化の阻害は ATPase ドメインを欠失することにより HSPA1A の持つシャペロン機能が失われ、TLR4 もしくは MD-2 の細胞表面への発現が抑制されたために起こったとは考えにくい。むしろ TLR4/MD-2 を介した LPS による細胞活性化において HSPA1A が特別な機能を持つために起こったと考えられる。また、HSPA1A を用いた共沈降実験により HSPA1A は MD-2 以外に TLR4、CD14 と結合している事が明らかになった。このことから HSPA1A は TLR4/MD-2/CD14 と複合体を形成し、LPS の情報伝達に関与している可能性が示唆された。

5. 研究発表

誌上発表

T. Ohnishi, M. Muroi, and K. Tanamoto. N-linked glycosylations at Asn(26) and Asn(114) of human MD-2 are required for toll-like receptor 4-mediated activation of NF- κ B by lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 167 (6):3354-3359, 2001.

学会発表

大西貴弘、室井正志、棚元憲一： Toll-like receptor 結合分子 MD-2 におけるグリコシル化の役割、第 74 回日本細菌学会総会 (2001)

大西貴弘、室井正志、棚元憲一： エンドトキシンの情報伝達における MD-2 分子上のグリコシル化の役割、第 7 回日本エンドトキシン研究会 (2001)

Ohnishi, T., Muroi, M., and Tanamoto, K.: The function of N-linked glycosylations at Asn26 and Asn114 of human MD-2 on Toll-like receptor 4-mediated signal transduction. 7th Conference of the International Endotoxin Society (2002)

6. 知的所有権の取得状況

特に無し。