

自然免疫に関する受容体 TLR4の糖鎖の機能解析

高橋 素子 [札幌医科大学医学部生化学第一講座／准教授]

西谷 千明 [札幌医科大学医学部生化学第一講座／助教]

黒木 由夫 [札幌医科大学医学部生化学第一講座／教授]

背景・目的

Toll様受容体(TLR)は細胞表面にて病原微生物を認識し、下流のシグナルの活性化を介して炎症反応を惹起するレセプターファミリーである。ヒトでは10種類あり、それぞれ異なったリガンドを認識する。TLR4はリポ多糖(LPS)のシグナル伝達に関わる分子であり、その細胞外ドメインに9カ所の糖鎖付加ポテンシャル部位を持つ。これまでの研究で、TLR4の糖鎖のいくつかは細胞内輸送にかかわっていることが明らかとなっている。また、糖鎖を認識する分子であるコレクチンとの相互作用がTLR4の制御に関わっていることなどから、糖鎖の重要性が注目されている。本研究では、TLR4のN型糖鎖の構造と機能の関係を解析し、糖鎖によるTLR4シグナルの制御機構を解明することを目的とする。TLR4の糖鎖の解析を通じて、自然免疫における糖鎖の役割を明らかにする。

内容・方法

1) TLR4高発現細胞の作製

野生型およびC88A変異型TLR4の高発現細胞を作製した。FLAGタグ付きの野生型およびC88A変異型TLR4をCMVプロモーター下でヒト胎児腎細胞由来HEK293細胞に発現させた。

2) TLR4の糖鎖構造の解析

1)で調製した細胞中のTLR4の糖鎖構造をグリコシダーゼ処理とレクチンプロットによって解析した。

3) TLR4の細胞表面での発現

C88A変異体で細胞内輸送がどのように変化するか解析した。具体的には、細胞表面をビオチン化したのちTLR4を免疫沈降し、アビジンで検出することによって細胞表面での発現レベルを定量した。また、抗TLR4抗体を用いてフローサイトメトリーを行った。

4) TLR4の糖鎖プロセシングとシグナル伝達機能

TLR4およびMD-2を共発現させた細胞をLPS刺激してTLR4シグナルを解析し、レセプター機能を評価した。TLR4シグナルの解析はNF-κBレポーターアッセイと培養上清中のIL-8の定量によった。

結果・成果

1) 野生型およびC88A変異型TLR4の糖鎖構造

野生型およびC88A変異型TLR4をHEK293細胞に高発現させて、FLAGタグの抗体にて免疫沈降およびウェスタンプロットを行ったところ、野生型TLR4では分子量130kDaおよび110kDaの2つの形態が見られるのに対し、C88A変異体では分子量110kDaの形態のみが見られた。両者の糖鎖構造を調べたところ、110kDaの分子は高マンノース型、130kDaの分子はバイセクティングNアセチルグルコサミンをもつ複合型の糖鎖を持つことがわかった。また、MD-2を共発現させたところ、野生型TLR4では糖鎖構造に変化は見られなかつたが、C88A変異体ではMD-2の濃度依存性に複合型糖鎖をもつ分子種が出現することがわかった。

2) TLR4の細胞表面での発現の解析

TLR4の細胞内輸送を調べたところ、野生型、C88A変異体とともに複合型糖鎖をもつ分子量130kDaのものが細胞表面に発現していることがわかった。特にC88A変異体では細胞表面での発現はMD-2の濃度依存性であることがわかった。

3) TLR4の糖鎖プロセシングと細胞内輸送およびシグナル伝達の関係

N型糖鎖を高マンノース型から複合型へ修飾される過程を阻害するスワインソニンを用いて、さらにTLR4の糖鎖構造と細胞内輸送の関係を検討した。スワインソニンで細胞を処理するとTLR4の糖鎖は高マンノース型のみになるが、TLR4は細胞表面に発現することがわかった。またLPS-TLR4の下流シグナルの指標であるNF-κB活性化とIL-8分泌を測定したところ、スワインソニン存在下、非存在下で変化はなかった。すなわち、TLR4の細胞表面上の発現には糖鎖のプロセシングは必須ではなく、高マンノース型糖鎖をもつ分子でも細胞表面に発現することによってシグナル分子としての機能をもつことがわかった。以上の結果より、野生型およびMD-2存在下でのC88A変異型TLR4では糖鎖のプロセシングがおこるより早い段階で細胞内局在が決定され、その後の糖鎖プロセシングが阻害されても細胞膜への輸送は阻害されないことが示唆された。野生型TLR4ではMD-2非存在下でこのような細胞内局在の“振り分け”が行われるが、C88A変異型では“振り分け”にMD-2が関与していると考えられる。TLR4の細胞内局在に関与する分子として、小胞体シャペロンgp96やprotein associated with TLR4(PRAT4)が報告されている。C88A変異体ではMD-2存在下ではじめてこれらの分子を相互作用できる立体構造をとる可能性がある。

今後の展望

以上、TLR4の変異体と糖鎖構造の関係、および細胞内輸送に与える影響について検討した。TLR4の細胞膜へ輸送されない画分の細胞内局在や、合成以後の経時的变化を明らかにすることによって、細胞内輸送の詳細を明らかにできると予想している。今後TLR4の細胞内輸送の振り分けに関与する分子を決定し、なぜC88A変異

体ではその振り分けに MD-2 が必要なのかを明らかにしたい。さらに将来的には糖鎖改変 TLR4 の細胞外ドメインを精製することによって、糖鎖が TLR4 の立体構造にどのように影響するか観察し、糖鎖改変が TLR4 の挙動を制御するメカニズムを明らかにしたい。