

みにれびゅう

自然免疫受容体 TLR3 により認識される RNA 構造の解明

立松 恵, 瀬谷 司, 松本 美佐子

1. はじめに

自然免疫系においては、パターン認識受容体 (pattern recognition receptor: PRR) が非自己または傷害された自己由来の分子を認識して防御応答を惹起する。このとき認識される分子パターンは病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns: PAMPs), 傷害関連分子パターン (damage-associated molecular patterns: DAMPs) と呼ばれ、それぞれの受容体ごとに異なる。PRR はトル様受容体 (Toll-like receptor: TLR), RIG-I 様受容体 (RIG-I-like receptor: RLR), NOD 様受容体 (NOD-like receptor: NLR) などに大別され、ウイルスや細菌感染、炎症時に生じたリガンドを認識し、さまざまな応答を引き起こして生体の恒常性を保つために機能する。ほとんどの受容体の下流では NF- κ B を活性化してサイトカイン産生を引き起こし、さらに、ウイルス成分を認識する受容体の場合には I 型インターフェロンの産生誘導経路も持つ。本稿では、特に、核酸認識受容体である TLR3 による RNA 認識について紹介する。

2. TLR3 による dsRNA 認識

TLR は I 型膜貫通タンパク質であり、リガンド認識は細胞外のロイシンリッチリピート (LRR) 領域が担い、細胞内の TIR (Toll/interleukin-1 receptor) ドメインはアダプター分子の TIR ドメインと結合することでシグナルを伝達する。TLR 下流シグナルにおいては、炎症性サイトカインや I 型インターフェロンの産生誘導のみでなく、樹状細胞上の共刺激分子の発現誘導などを介して獲得免疫系を活性化することも知られている。核酸を認識する TLR は 4 種類で、TLR3 は二本鎖 RNA (double-stranded RNA:

dsRNA), TLR7, 8 は一本鎖 RNA (single-stranded RNA: ssRNA), TLR9 は非メチル化 CpG DNA により活性化する。

TLR3 の細胞外ドメインと dsRNA 複合体の結晶構造解析により、dsRNA の結合に重要な領域が明らかとなった (図 1)。TLR3 の細胞外ドメインは 23 個の LRR を有し、

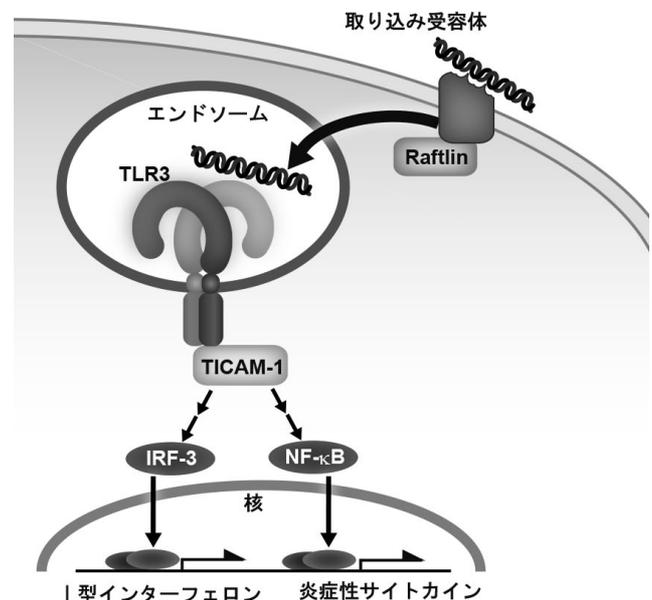
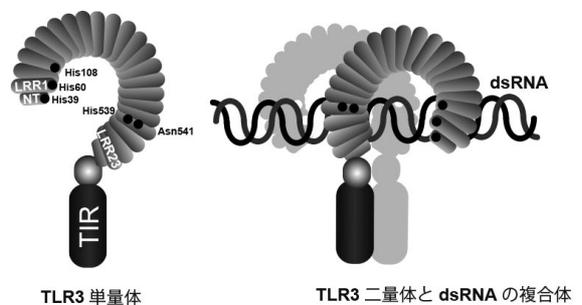


図 1 TLR3 の構造とシグナル伝達経路

細胞外の dsRNA がクラスリンおよび Raftlin 依存的にエンドサイトーシスされると、エンドソームにおいて TLR3 を活性化する。dsRNA の結合により二量体化した TLR3 は、アダプター分子 TICAM-1 を介して NF- κ B や IRF3 といった転写因子を活性化し、炎症性サイトカイン、I 型インターフェロンの産生を引き起こす。

北海道大学大学院医学研究科 (〒060-8638 北海道札幌市北区北 15 条西 7 丁目)

RNA structure recognized by Toll-like receptor 3 in innate immunity

Megumi Tatematsu, Tsukasa Seya and Misako Matsumoto
(Graduate School of Medicine, Hokkaido University, North 15, West 7, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-8638, Japan)

N末端側とC末端側にそれぞれリガンド結合領域がある。N末端側のLRR-NT上のHis39, LRR1上のHis60, LRR3上のHis108, およびC末端側のLRR20上のHis539, Asn541がリガンド結合に必須のアミノ酸として同定された¹⁻⁴⁾。pH 6.0~6.5のエンドソーム内でプロトン化したヒスチジンが、負電荷を持つdsRNAのリン酸基と結合すると考えられ、dsRNAはその配列とは無関係にリガンドとなりうる。リガンドの塩基長としては46 bpのdsRNAがTLR3二量体と安定な複合体を形成できるとされるが⁵⁾、十分なシグナル伝達には90 bp以上の長さが必要であるという報告もある⁶⁾。また、21~30 bpのdsRNAでもやや安定性が低いながらもTLR3を二量体化することができる⁴⁾。dsRNAの結合によりTLR3が二量体化してTIRドメインどうしが相互作用することで、アダプター分子であるTICAM-1へのシグナル伝達が可能となる。

TLR3は骨髄系樹状細胞ではエンドソームに、上皮系細胞の一部やマクロファージでは細胞表面とエンドソームに局在しているが、いずれの細胞でもTLR3を介したシグナルはエンドソームから伝達されるため、dsRNAが細胞内へと取り込まれるステップが必要となる。dsRNAはクラスリン依存的なエンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれ、初期エンドソームでTLR3に認識される。このとき、取り込みに必須の分子としてRaftlinが機能しており、細胞表面の未知の受容体にdsRNAが結合すると、樹状細胞などでは細胞質に散在しているRaftlinが細胞表面へと集合し、dsRNAとともにエンドソームへと移行することがわかっている⁷⁾。

3. ウイルス感染における TLR3

(+) 鎖 RNA ウイルスおよび dsDNA ウイルスの感染時には、ウイルスゲノム複製中間体として多量の dsRNA が生じる。感染細胞がアポトーシスを起こして dsRNA が細胞外へ流出した場合には、流出した dsRNA が TLR3 を発現する樹状細胞などに取り込まれてエンドソームにおいて TLR3 を活性化すると考えられる。TLR3 ノックアウトマウスを用いた研究により、感染時に TLR3 が感染防御に働く場合とむしろ感染病態を増悪させる場合がそれぞれ報告されている⁸⁾。(+) 鎖 RNA ウイルスであるポリオウイルス^{9,10)}やウエストナイルウイルス、dsDNA ウイルスであるマウスサイトメガロウイルスのほか、(-) 鎖 RNA ウイルスであるインフルエンザウイルスやフレボウイルスの感染制御にも TLR3 が関わりとされる⁸⁾。(-) 鎖 RNA ウイルスは複製中間体としての dsRNA 生成が少ないことから、どのような構造の RNA が TLR3 に認識されているのかは不明である。

ヒトのウイルス感染における TLR3 の役割については、

単純ヘルペスウイルス I 型によるウイルス脳炎への防御応答に重要であることが報告された¹¹⁾。

また、細胞質内センサーである RIG-I および MDA5 も dsRNA を認識する受容体である。RIG-I は 5' 末端が三リン酸化されたウイルス RNA を、MDA5 はウイルス感染細胞内で生じた dsRNA を直接細胞質内で認識し、I 型インターフェロン産生を介して抗ウイルス応答を誘導する。これらの二つの受容体は、免疫細胞に限らずあらゆる細胞種で発現している点でも TLR3 と異なり、C 型肝炎ウイルスやインフルエンザウイルス、脳心筋炎ウイルス、センダイウイルスといったさまざまな RNA ウイルスの感染制御に関わる¹²⁾。

4. TLR3 による structured RNA 認識

TLR3 のリガンドとしては、ウイルスの dsRNA や poly(I:C) のほかに、mRNA やネクローシスに陥った細胞由来の RNA が報告されている。さらに近年、small nuclear RNA が紫外線照射により傷害を受けて構造が変化することで TLR3 を活性化できるようになることが見いだされた¹³⁾。

我々の研究では、ポリオウイルスゲノム配列から *in vitro* 転写により作製した RNA を用い、ssRNA がその二次構造依存的に TLR3 を活性化することを示した¹⁴⁾。ポリオウイルスゲノム由来の 500~900 塩基長程度の各種 RNA 断片により TLR3 発現 HEK293 細胞を刺激したところ、IFN- β プロモーター活性のみられるいくつかの RNA 断片があった。中でも、630 塩基の ssRNA (PV5) が最も TLR3 活性化能が高く、さらに血清培地での分解耐性も高かった。また、PV5 はマウスの脾臓由来の樹状細胞においても TLR3 依存的に IFN- β や IL-6, TNF- α の産生を誘導し、HEK293 細胞と同様に、細胞内へ取り込まれて TLR3 を活性化できることがわかった。PV5 の取り込みも poly(I:C) 同様にクラスリンおよび Raftlin 依存的であった。さらに、TLR3 細胞外ドメインの N 末端側と C 末端側の両方のリガンド結合領域に PV5 が結合することで TLR3 が活性化する点でも従来の TLR3 リガンドと同様であった。

ssRNA は、分子内で部分的に相補鎖を形成することで、ステム、ループ、バルジなどの二次構造をとることが知られている。二次構造解析ソフトにより PV5 の構造を予測したところ、部分的な dsRNA 構造であるステムが連続して存在する領域があり、この領域が TLR3 に認識されると推定された (図 2)。この領域の前後の塩基配列を欠く欠損体を作製したところ、この領域 (図 2a) のみでは TLR3 を活性化できず、両側の領域により立体的に安定な構造をとることが必要であることがわかった。完全な dsRNA で

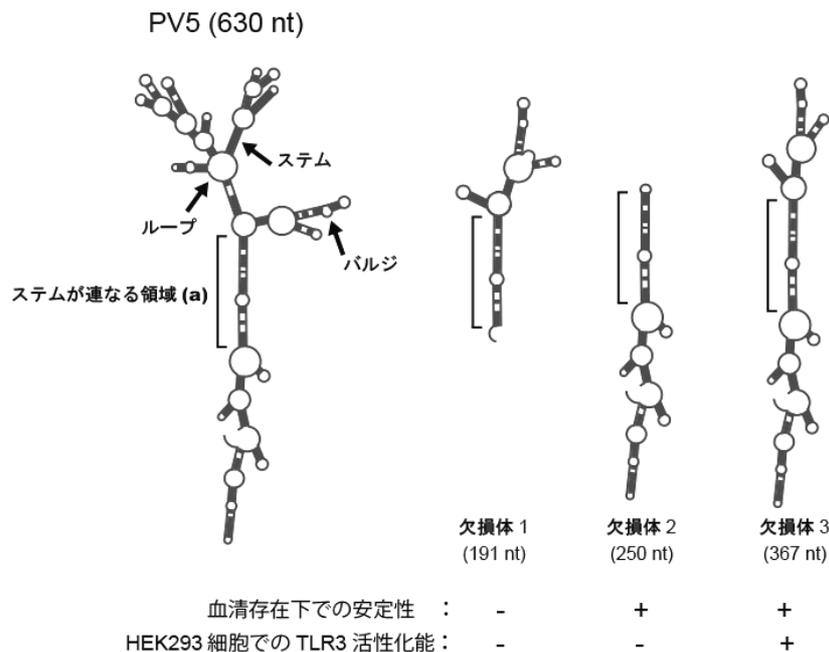


図2 PV5 とその欠損体の二次構造

なくとも、TLR3 のリガンド結合領域と相互作用する部分が二本鎖であれば TLR3 と結合することができると考えられる。したがって、二本鎖領域を含むある程度の長さの不完全なステムを持つ安定な構造の RNA (structured RNA) は、TLR3 二量体を形成してシグナル伝達を開始させることが可能となると考えられる。

5. 核酸認識 TLR の切断活性化

近年、TLR7 および TLR9 はエンドリソソーム内で切断を受けて活性化することが報告された。さらに、TLR3 も TLR7、9 と同様にカテプシンにより切断され、切断された TLR3 はエンドソームへ積極的に輸送されることがわかった¹⁵⁾。TLR3 の切断がシグナル伝達に必須であるかについては複数の報告があり詳細は未解明であるが、マウスのマクロファージ細胞である RAW264.7 細胞においては、poly(I:C) 刺激に対する応答性は切断の有無に関わらず変化しないのに対し、poly(A:U) への応答はカテプシン阻害剤処理により減弱し、レオウイルス由来の dsRNA への応答は増大した。一方でこれらのリガンドに対するヒト気道上皮細胞 BEAS-2B 細胞での応答はカテプシン阻害剤の影響を受けなかった¹⁵⁾。したがって、TLR3 のプロセッシングにより認識できるリガンドの範囲が変化する可能性があると同時に、その応答性の変化は細胞の種類や動物種により異なることも考えられる。ステム構造を持つ ssRNA の場合も TLR3 の切断状態により活性が変化することは十分に考えられ、ヒトとマウスの細胞、免疫細胞と非免疫担当細胞の間で活性の差について検討の余地がある。

TLR3 の切断は、TLR3 の構造を変化させることでリガンド認識の多様性を生じることや、カテプシンの発現量による細胞内での TLR3 の活性制御といった意味を持つことが考えられる。

6. おわりに

これまで、TLR3 はウイルス感染時においてウイルス複製中間体として生じる dsRNA により活性化すると考えられ、実験的には主に poly(I:C) がリガンドとして用いられてきた。しかし、構造によっては ssRNA による活性化も起こることが明らかとなり、生体内において TLR3 が幅広い機能を有する可能性が示された。TLR3 は、ウイルス感染細胞だけでなく非感染性のネクロシス細胞から遊離されるウイルスや自己由来の RNA に応答し、I 型インターフェロンや炎症性サイトカイン産生を通して生体の恒常性維持に深く関与すると考えられる (図 3)。一方、TLR3 が認識することのできる RNA 構造の詳細なルールや、リガンド取り込みの分子機構、細胞種やリガンドの種類による切断活性化の必要性など、いまだ不明な点は多い。TLR3 経路はウイルス感染防御のみでなく、樹状細胞の活性化を介してナチュラルキラー細胞や細胞傷害性 T 細胞の活性化を誘導することから、抗がん免疫におけるアジュバントのターゲットとして注目されており¹⁶⁾、今後、リガンドの開発や取り込み機構の解明が期待される。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は、西川富美子先生 (産業技術

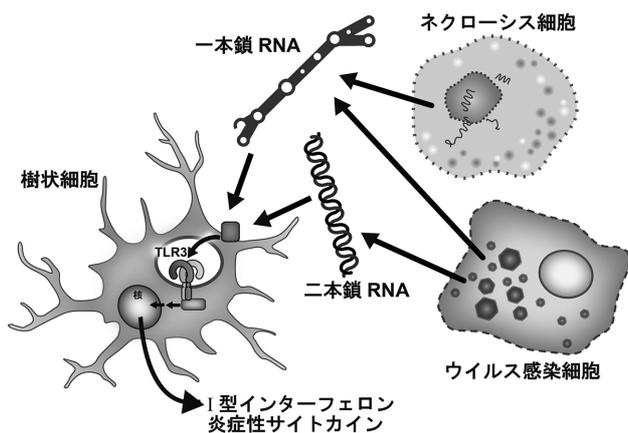


図3 ウイルス感染および炎症時に引き起こされる TLR3 依存的な応答

ネクロシスに陥った細胞やウイルス感染細胞から自己由来またはウイルス由来の structured RNA や dsRNA が流出し、樹状細胞にエンドサイトーシスされると、TLR3 を活性化して炎症性サイトカインや I 型インターフェロンの産生を誘導する。

総合研究所) との共同研究により得られたものであり、RNA 作製および分析において多大なご協力を賜りましたことを深く感謝いたします。

- Choe, J., Kelker, M.S., & Wilson, I.A. (2005) *Science*, 309, 581-585.
- Bell, J.K., Askins, J., Hall, P.R., Davies, D.R., & Segal, D.M. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 8792-8797.
- Fukuda, K., Watanabe, T., Tokisue, T., Tsujita, T., Nishikawa, S., Hasegawa, T., Seya, T., & Matsumoto, M. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 22787-22794.
- Pirher, N., Ivicak, K., Pohar, J., Bencina, M., & Jerala, R. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15, 761-763.
- Liu, L., Botos, I., Wang, Y., Leonard, J.N., Shiloach, J., Segal, D.M., & Davies, D.R. (2008) *Science*, 320, 379-381.
- Jelinek, I., Leonard, J.N., Price, G.E., Brown, K.N., Meyer-Manlapat, A., Goldsmith, P.K., Wang, Y., Venzon, D., Epstein, S.L., & Segal, D.M. (2011) *J. Immunol.*, 186, 2422-2429.
- Watanabe, A., Tatematsu, M., Saeki, K., Shibata, S., Shime, H., Yoshimura, A., Obuse, C., Seya, T., & Matsumoto, M. (2011) *J. Biol. Chem.*, 286, 10702-10711.
- Matsumoto, M., Oshiumi, H., & Seya, T. (2011) *Rev. Med. Virol.*, doi: 10.1002/rmv.680.
- Oshiumi, H., Okamoto, M., Fujii, K., Kawanishi, T., Matsumoto, M., Koike, S., & Seya, T. (2011) *J. Immunol.*, 187, 5320-5327.
- Abe, Y., Fujii, K., Nagata, N., Takeuchi, O., Akira, S., Oshiumi, H., Matsumoto, M., Seya, T., & Koike, S. (2012) *J. Virol.*, 86, 185-194.
- Sancho-Shimizu, V., Pérez de Diego, R., Lorenzo, L., Halwani, R., Alangari, A., Israelsson, E., Fabrega, S., Cardon, A., Maluenda, J., Tatematsu, M., Mahvelati, F., Herman, M., Ciancaneli, M., Guo, Y., AlSum, Z., Alkhamis, N., Al-Makadma, A. S., Ghadiri, A., Boucherit, S., Plancoulaine, S., Picard, C., Rozenberg, F., Tardieu, M., Lebon, P., Jouanguy, E., Rezaei, N., Seya, T., Matsumoto, M., Chaussabel, D., Puel, A., Zhang, S.Y., Abel, L., Al-Muhsen, S., & Casanova, J.L. (2011) *J. Clin. Invest.*, 121, 4889-4902.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y., Gale, M.J., Akira, S., Yonehara, S., Kato, A., & Fujita, T. (2005) *J. Immunol.*, 175, 2851-2858.
- Tatematsu, M., Seya, T., & Matsumoto, M. (2014) *Biochem. J.*, 458, 195-201.
- Tatematsu, M., Nishikawa, F., Seya, T., & Matsumoto, M. (2013) *Nat. Commun.*, 4, 1833.
- Qi, R., Singh, D., & Kao, C.C. (2012) *J. Biol. Chem.*, 287, 32617-32629.
- Seya, T., Azuma, M., & Matsumoto, M. (2013) *Expert Opin. Ther. Targets*, 17, 533-544.

 著者寸描

●立松 恵 (たてまつ めぐみ)



北海道大学大学院医学研究科微生物学講座免疫学分野特任助教。博士(医学)。

■略歴 2008年北海道大学薬学部卒業、10年同大学院生命科学院博士前期課程修了、13年同大学院医学研究科博士後期課程修了、14年より現職。

■研究テーマと抱負 Toll-like receptorによるリガンド認識とシグナル伝達の分子機構について。特にTLR3とTLR4の下流シグナル分子に関する研究をしています。

■趣味 写真, 読書。

●瀬谷 司 (せや つかさ)

北海道大学大学院医学研究科微生物学講座免疫学分野特任教授。薬学博士(1984年), 医学博士(1987年)

■略歴 1976年北海道大学医学部卒業, 4年間の内科研修後に5年間北海道大学薬学部研究生, 84~87年ワシントン大学(セントルイス), 帰国後16年間大阪府立成人病センター研究所, 2004年より北海道大学医学部免疫学教授, 今年から現職。

■研究テーマ 免疫生化学, 進化医学。

■抱負 社会通念に囚われない自由な発想が好きです。発想が突飛すぎて失敗するのも振幅があつていい人生かと。

■ウェブサイト <http://www.hucc.hokudai.ac.jp/~e20536/>

■趣味 古代史, 人類学。

●松本美佐子 (まつもと みさこ)

北海道大学大学院医学研究科微生物学講座免疫学分野特任准教授。薬学博士。

■略歴 1972年大阪大学薬学部卒業, 同年大阪府立成人病センター研究所研究員, 2001年免疫学部門主任研究員, 03年同部長, 05年北海道大学大学院医学研究科免疫学分野准教授, 13年より現職。

■研究テーマと抱負 自然免疫のパターン認識受容体による自己・非自己識別機構。細胞外RNAの取り込みやエンドソームからのシグナル伝達など, 免疫応答の時空間的制御機構に関心をもっている。

■趣味 園芸, アート鑑賞。