

chem. Biophys. Res. Commun., 395, 318–323.

- 13) Kimura, T., Taniguchi, S., & Niki, I. (2010) *Arch. Biochem. Biophys.*, 496, 33–37.
- 14) Kimura, T. & Niki, I. (2011) *Endocr. J.*, 58, 1–6.
- 15) Kimura, T. & Niki, I. (2011) *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 107, 219–223.
- 16) Kimura, T., Yamaoka, M., Taniguchi, S., Okamoto, M., Takei, M., Ando, T., Iwamatsu, A., Watanabe, T., Kaibuchi, K., Ishizaki, T., & Niki, I. (2013) *Mol. Cell. Biol.*, in press.

木村 俊秀, 山岡 真美
(大分大学医学部薬理学教室)

GDP-bound G-protein signaling

Toshihide Kimura and Mami Yamaoka (Department of Pharmacology, Oita University Faculty of Medicine, 1-1 Idaigaoka, Hasamamachi, Yufu, Oita, 879-5593, Japan)

炎症シグナル伝達の間として機能する細胞内小胞の環境制御

1. はじめに

エンドソームやリソソームといった細胞内小胞が物質の運搬・分解だけでなく、様々な細胞機能に必須のシグナル伝達経路を活性化させるプラットフォームとして機能していることは、現在までに広く認識されつつある¹⁾。これらの細胞内小胞上では、小胞内あるいは細胞質からのシグナルを受け取ることで活性化される様々な分子が局在し、それらの分子がさらに下流の分子を活性化することによって、時間的・空間的に限局したシグナルを伝達する。その結果、細胞の増殖、分化、細胞骨格の再構成、細胞移動や転写・タンパク質合成の活性化など、様々な細胞応答が引き起こされる。小胞からのシグナル伝達を活性化させ、そして適切な時期に終結させるために、小胞輸送やイオン濃度といった小胞内環境が巧妙に制御されている。

本稿では、病原体センサーである Toll 様受容体 (TLR) の細胞内小胞からのシグナル伝達に重要な役割を果たす小胞局在型トランスポーター SLC15A4 と小胞内環境制御に焦点を当てて概説する。

2. 炎症応答における細胞内小胞からのシグナル伝達

細胞内小胞からのシグナル伝達は、免疫応答、特に炎症応答において重要な役割を担っている^{1,2)}。マクロファージや樹状細胞といった自然免疫を担う細胞では、細菌、ウイ

ルス、寄生虫などの病原体に特異的な分子パターンを認識する受容体を発現している。このパターン認識受容体が病原体を感知すると、細胞内シグナル伝達経路が活性化され、インターロイキン (IL)-6 や腫瘍壊死因子 α (TNF α) をはじめとする炎症性サイトカインや、I 型インターフェロン (IFN) の産生など様々な炎症応答が誘導される。TLR は、パターン認識受容体ファミリーの一つで、ヒトで 10 種類、マウスで 12 種類の機能的 TLR の存在が報告されている^{2,3)}。これらのうち、TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, ならびに TLR13 は、病原体由来する核酸を認識する TLR で、主に細胞内小胞で機能すると考えられている²⁾。例えば、TLR9 は細菌やウイルスのゲノム DNA 上に存在する非メチル化 CpG (cytidine phosphate-guanosine) モチーフを認識し、感染炎症応答を惹起する。このモチーフを人工的に化学合成したオリゴヌクレオチド (CpG ODN) でマクロファージや樹状細胞を刺激すると、TLR9 は小胞体から CpG ODN を含有するエンドソーム/リソソームへと移行し、エンドサイトーシスによって取り込まれた CpG ODN と結合する。その結果、TLR9 下流のシグナル伝達経路が活性化され、サイトカイン産生などの炎症応答が誘導される。

TLR9 を介した炎症応答には、エンドソームからリソソームに至るまでの小胞輸送制御が重要であることが報告されている⁴⁾。樹状細胞の一つのサブセットである形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells: pDCs) を CpG ODN で刺激を行うと、大量の I 型 IFN (特に IFN- α) の産生が誘導される。それに対して、pDCs 以外の樹状細胞 (conventional dendritic cells: cDCs) を刺激した際には、CpG ODN は細胞内に取り込まれるにも関わらず IFN- α の産生は誘導されない。興味深いことに、cDCs では取り込まれた CpG ODN は速やかにリソソームへと移行するのに対し、pDCs においては CpG ODN はエンドソームに長くとどまる。さらに、CpG ODN とカチオン性脂質 DOTAP (*N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium methylsulfate) との複合体を cDCs に取り込ませると、CpG ODN のリソソームへの移行が抑制され、pDCs の場合と同程度まで IFN- α の産生が亢進される。したがって、TLR9 に依存した IFN- α 産生にはエンドソームからリソソームへの輸送の制御が極めて重要であり、pDC には CpG DNA を含んだ小胞のリソソームへの移行を調節することで、炎症応答を活性化させる制御機構が存在していると考えられている。

小胞の輸送制御だけでなく、小胞内 pH といった小胞内

部の環境制御もまた TLR9 を介したシグナル伝達に不可欠である。TLR9 は細胞内小胞においてプロテアーゼにより限定分解されることで、リガンド認識機能やシグナル伝達機能を獲得すると考えられている^{2,4)}。TLR9 の切断に関わるのは、酸性環境下で作用至適 pH を有する酸性プロテアーゼ（カテプシンやアスパラギンエンドペプチダーゼ）である。また、*in vitro* の実験系では、TLR9 は酸性条件下でリガンドとより強く結合することも示されている³⁾。したがって、酸性プロテアーゼの活性、あるいは小胞内の酸性環境を阻害すると、TLR9 を介した炎症応答は阻害される。

小胞内の酸性化が TLR9 機能に重要である一方で、樹状細胞には、小胞内環境をアルカリ化するという特性が存在する。樹状細胞は外来性の抗原を貪食して取り込み、細胞内小胞（ファゴソーム）内でプロセッシングした後に、MHC クラス I 分子とともに細胞傷害性 T 細胞へ提示し、活性化を誘導する⁵⁾。このクロスプレゼンテーションとよばれる抗原提示は、特定の樹状細胞サブセットの特性であり、その効率を取り込まれた抗原の分解を限定的にとどめることで上昇する。樹状細胞のファゴソーム内は、マクロファージや好中球といった他の食細胞と比較して、アルカリ化されているために、酸性プロテアーゼの活性が抑制され、取り込まれた抗原は完全分解に至らず、限定分解による抗原ペプチドの作出と提示を可能にしていると考えられている⁵⁾。

樹状細胞のファゴソーム内環境の制御に関与する因子として、NADPH オキシダーゼが報告されている⁵⁾。NADPH オキシダーゼは、低分子量 G タンパク質 Rab25a 依存的にファゴソームにリクルートされ、活性酸素を生成する。ファゴソーム内の活性酸素はプロトンを捕捉することによって、酸性化に抑制的に働いていると考えられる。NADPH オキシダーゼの構成因子の一つである gp91phox (Nox2) を欠損させると、ファゴソーム内は酸性化され、クロスプレゼンテーション効率も低下する⁵⁾。一方、NADPH オキシダーゼは小胞内のプロテアーゼを酸化することにより、その活性を制御しているという報告もされており、pH 制御とは異なる制御機構に関与している可能性も指摘されている⁵⁾。

3. 小胞局在型アミノ酸トランスポーター SLC15A4 による TLR9 シグナルの制御

エンドソームやリソソーム内の環境制御の分子機構はいまだ明らかでない。これらの小胞では、前述した分子以外

にも、多くの機能分子を介して環境制御が行われていると考えられる。細胞膜のみならず、細胞内小胞には、糖やアミノ酸など生体の維持に必須な水溶性物質に対して脂質二重膜で構成される生体膜を効率的に通過させるために、膜輸送装置（トランスポーター）が存在している。トランスポーターは多様な水溶性物質に対応した基質選択性を持ち、非常に大きなファミリーを形成しており、ATP の加水分解エネルギーを利用するポンプ（ATP-binding cassette）と、ATP を利用せずに促進拡散を担うキャリア（solute carrier）に大別される。SLC15A4 (PHT1 と呼ばれる) は SLC ファミリーの中で、プロトン共役型オリゴペプチドトランスポータースーパーファミリー（POT スーパーファミリー）に分類される分子で、輸送する基質の特異性が高く、特にヒスチジン、カルノシン（β-アラニンとヒスチジンのジペプチド）、および特定のオリゴペプチドに対して高い輸送活性を有している（図 1A）^{6,7)}。

興味深いことに、SLC15A4 はエンドソームやリソソームといった細胞内小胞に局在し、その輸送活性は pH の低下とともに上昇する^{8~10)}。したがって、エンドソームからリソソームへの成熟化に伴い SLC15A4 は活性化され、小胞内から細胞質へと、プロトンとともにヒスチジンや特定のオリゴペプチドを輸送していると考えられる。一方、*Slc15a4* は全身性エリテマトーデス (SLE) や糖尿病といった疾患の関連遺伝子としても同定されている^{11,12)}。また、ヒトやマウスでは、pDCs で高発現していることから、SLC15A4 は細胞内小胞を介した炎症シグナル伝達に関与している可能性が考えられた。

そこで、SLC15A4 のノックアウトマウスを樹立して TLR9 リガンド刺激に対する応答を解析した結果、野生型と比較して、SLC15A4 を欠損した pDCs では、IL-12p70 や TNFα といったサイトカインや I 型 IFN の産生が減少していた¹⁰⁾。また、同時期に Beutler らによって、ENU (*N*-エチル-*N*-ニトロソ尿素) 変異マウスを用いて、SLC15A4 が TLR9 を介したサイトカイン産生に必要であることが報告された¹³⁾。さらに、TLR9 と同様に細胞内小胞に局在する TLR の一つである TLR7 を介したシグナル伝達の誘導にも SLC15A4 が必要であることが示されていることから¹⁴⁾、SLC15A4 は小胞からの様々なシグナル伝達に関与していると考えられる。

SLC15A4 は細胞内小胞に局在するトランスポーターであるため、その欠損により、小胞内のヒスチジンが細胞質へと排出されず、小胞内ヒスチジン濃度の上昇を引き起こすことが予想された。そこで、樹状細胞培養液中にヒスチ

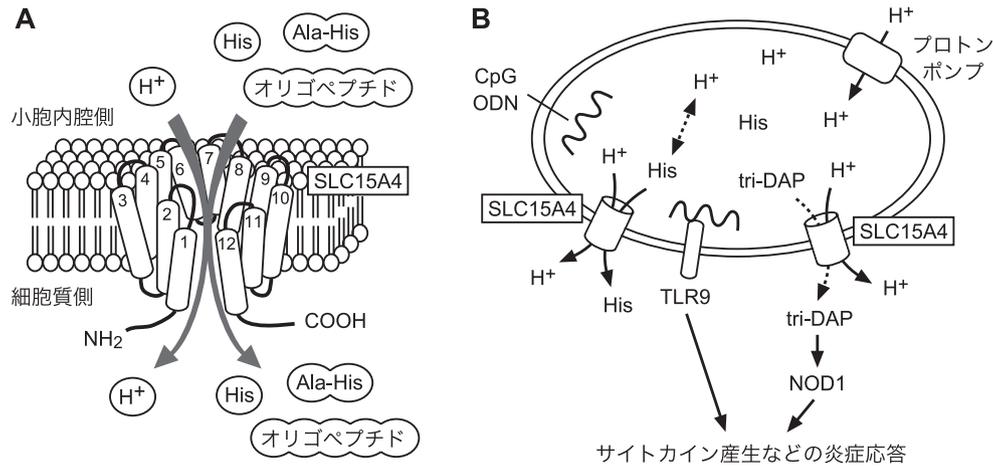


図1 炎症応答における SLC15A4 の機能のモデル

(A) SLC15A4 は、12 回膜貫通領域を持ち、細胞内小胞に局在するアミノ酸トランスポーターである。SLC15A4 はプロトン (H^+) を共役イオンとして、ヒスチジン (His)、カルノシン (β -Ala-His)、および特定のオリゴペプチドを小胞内から細胞質へと輸送する。(B) SLC15A4 は、TLR9 を介した細胞内小胞からのシグナル伝達に参与する。そのメカニズムの詳細は不明であるが、SLC15A4 は、pH やヒスチジン濃度といった小胞内環境を制御していることが予想される。また、SLC15A4 は、細胞質における NOD1 を介したシグナル伝達経路の活性化にも必要であることから、リガンド (tri-DAP) の細胞質への輸送にも働いているのかもしれない。

ジンを添加し、小胞内のヒスチジン濃度を上昇させたところ、ヒスチジン濃度に依存して CpG ODN 刺激によるサイトカイン産生の減少が認められた¹⁰。一方、アラニンを添加して同様の実験を行ったところ、サイトカイン産生における抑制効果は認められなかった。これらのことから、ヒスチジンの小胞内への蓄積は TLR9 応答を阻害することが強く示唆された。

ヒスチジンの小胞内への蓄積がなぜ TLR9 を介したシグナル伝達に異常をきたすのかはまだわかっていない。ヒスチジンはイミダゾール基を有し、中性付近に pK 値を有する唯一のアミノ酸である。pH に依存して酸塩基触媒活性を発揮しうることから、ヒスチジンがプロトンを補足することで、小胞内の pH に作用している可能性がある (図 1 B)。したがって、SLC15A4 の欠損は酸性プロテアーゼによる TLR9 の切断や TLR9 とリガンドとの結合といった小胞内 pH に依存した過程に影響を与えるのかもしれない。また、ヒスチジンの添加により酸性プロテアーゼであるカテプシン B や L の活性は抑制されることから¹⁰、小胞内 pH 制御とは別の過程に SLC15A4 が関与していることも考えられる。

さらに、SLC15A4 は小胞からのシグナル伝達ばかりでなく、細胞質からのシグナル伝達にも関与していることが明らかとなった^{9,10}。NOD1 は、パターン認識受容体ファ

ミリーの一つである NLRs (NOD-like receptors) に分類される因子で、細胞質で機能している³。NOD1 は細菌ペプチドグリカンの部分構造を認識することで、NF- κ B の活性化を誘導し、免疫応答を活性化させる。NOD1 は細胞質に存在しているため、そのリガンドは細胞質まで運ばれる必要があるが、リガンドの輸送経路やそのメカニズムについては不明であった。野生型のマウス腹腔に NOD1 のリガンド (tri-DAP) を投与すると、血清中あるいは腹腔浸出細胞の培養上清に IL-1 β などの炎症性サイトカインが検出されるようになる。しかし、*Slc15a4* ノックアウトマウスでは、NOD1 依存性のサイトカイン産生がほとんど認められなかった¹⁰。このような結果と一致して、HEK293 細胞で SLC15A4 をノックダウンすると、NOD1 リガンド刺激に対する応答が低下した⁹。これらの結果は、SLC15A4 が NOD1 リガンドを細胞質に輸送するトランスポーターとして機能していることを示唆している (図 1B)。

このような機能を持つ SLC15A4 の欠損マウスでは、感染炎症応答においても個体レベルで大きな影響が認められる。SLC15A4 欠損マウスでは、腸炎の病態が軽減する¹⁰。これは腸内細菌を介した TLR9 や NOD1 シグナルが伝達されないことによると考えられる。また TLR7 のシグナル異常により、ある種のウイルス感染に対する感受性が亢進する¹⁴。このように細胞内小胞環境の異常は個体レベルの

免疫応答に影響を与える。

4. おわりに

細胞内小胞の輸送や小胞内環境の制御機構を理解することは、ウイルスや細菌に対する免疫応答の理解にとどまらず、小胞輸送や小胞内環境の異常に起因する種々の疾患の発症機序や療法を理解する上で非常に重要であると考えられる。今後、細胞内小胞の輸送や小胞内環境の制御におけるSLC15A4の機能に焦点を当てて解析していくことにより、炎症性疾患の発症機序の理解につながる基礎的情報や新たな治療標的候補分子が明らかになることが期待される。

- Murphy, J.E., Padilla, B.E., Hasdemir, B., Cottrell, G.S., & Bunnett, N.W. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 17615–17622.
- Kagan, J.C. (2012) *Cell*, 151, 1168–1178.
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006) *Cell*, 124, 783–801.
- Kawai, T. & Akira, S. (2010) *Nat. Immunol.*, 11, 373–384.
- Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., & Amigorena, S. (2012) *Nat. Rev. Immunol.*, 13, 557–569.
- Daniel, H. & Kottra, G. (2004) *Pflügers Arch.*, 447, 610–618.
- Yamashita, T., Shimada, S., Guo, W., Sato, K., Kohmura, E., Hayakawa, T., Takagi, T., & Tohyama, M. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 10205–10211.
- Bhardwaj, R.K., Herrera-Ruiz, D., Eltoukhy, N., Saad, M., & Knipp, G.T. (2006) *Eur. J. Pharm. Sci.*, 27, 533–542.
- Lee, J., Tattoli, I., Wojtal, K.A., Vavricka, S.R., Philpott, D.J., & Girardin, S.E. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 23818–23829.
- Sasawatari, S., Okamura, T., Kasumi, E., Tanaka-Furuyama, K., Yanobu-Takanashi, R., Shirasawa, S., Kato, N., & Toyama-Sorimachi, N. (2011) *Gastroenterology*, 140, 1513–1525.
- Takeuchi, F., Ochiai, Y., Serizawa, M., Yanai, K., Kuzuya, N., Kajio, H., Honjo, S., Takeda, N., Kaburagi, Y., Yasuda, K., Shirasawa, S., Sasazuki, T., & Kato, N. (2008) *J. Hum. Genet.*, 53, 314–324.
- Han, J.W., Zheng, H.F., Cui, Y., Sun, L.D., Ye, D.Q., Hu, Z., Xu, J.H., Cai, Z.M., Huang, W., Zhao, G.P., Xie, H.F., Fang, H., Lu, Q.J., Xu, J.H., Li, X.P., Pan, Y.F., Deng, D.Q., Zeng, F.Q., Ye, Z.Z., Zhang, X.Y., Wang, Q.W., Hao, F., Ma, L., Zuo, X.B., Zhou, F.S., Du, W.H., Cheng, Y.L., Yang, J.Q., Shen, S.K., Li, J., Sheng, Y.J., Zuo, X.X., Zhu, W.F., Gao, F., Zhang, P.L., Guo, Q., Li, B., Gao, M., Xiao, F.L., Quan, C., Zhang, C., Zhang, Z., Zhu, K.J., Li, Y., Hu, D.Y., Lu, W.S., Huang, J.L., Liu, S.X., Li, H., Ren, Y.Q., Wang, Z.X., Yang, C.J., Wang, P.G., Zhou, W.M., Lv, Y.M., Zhang, A.P., Zhang, S.Q., Lin, D., Li, Y., Low, H.Q., Shen, M., Zhai, Z.F., Wang, Y., Zhang, F.Y., Yang, S., Liu, J.J., & Zhang, X.J. (2009) *Nat. Genet.*, 41, 1234–1237.
- Blasius, A.L., Arnold, C.N., Georgel, P., Rutschmann, S., Xia, Y., Lin, P., Ross, C., Li, X., Smart, N.G., & Beutler, B.

(2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 19973–19978.

- Blasius, A.L., Krebs, P., Sullivan, B.M., Oldstone, M.B., & Popkin, D.L. (2012) *PLoS Pathog.*, 8, e1002915.

田中 翼, 小林 俊彦, 反町 典子
((独)国立国際医療研究センター研究所
分子炎症制御プロジェクト)

The endosome-lysosome system in inflammatory signal transduction

Tsubasa Tanaka, Toshihiko Kobayashi and Noriko Toyama-Sorimachi (Department of Molecular Immunology and Inflammation, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine, Toyama 1-21-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan)

高等植物の概日時計を支配する翻訳後制御と転写制御機構

1. はじめに

約24時間周期の自律的な概日(概ね一日)リズムを生み出す概日時計は、細菌からヒトまで生物に広く存在している。動き回ることのできない植物にとって、昼夜や季節変動などの来るべき外環境の変化に適応しながら生きていくために概日時計は必須である。

高等植物シロイヌナズナを用いたリズム異常を示す変異体のスクリーニングなどにより、複数の時計関連遺伝子が単離されてきた¹⁾。それらの変異体を用いた下流遺伝子の発現解析など、転写レベルでの解析が多く行われてきたが、個々の時計関連遺伝子がコードするタンパク質の機能は不明な場合がほとんどで、またそれぞれの因子が時計の制御にかかわる分子メカニズムも未解明であった。そこで、筆者らは、時計関連因子の転写後制御に着目し、個々の因子の分子機能や概日リズムが生み出される分子メカニズムの解明を目指して研究を行った。本稿では、筆者らの研究内容を中心に、概日時計の中心因子が正確な概日リズムを生み出すために働く様々な形の翻訳後調節や分子機能の一例を紹介する。

2. 概日時計の中心因子 TOC1 は ZTL により分解される

TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1) は、PSEUDO RESPONSE REGULATOR (PRR) ファミリーの一員で、PRR1 とも呼ばれる^{1,2)}。TOC1 のみならず他のファミリー