

## 126. TLR とシグナル伝達分子群相互作用の一分子ダイナミクス

熊谷 雄太郎

大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 定量免疫学ユニット

Key words : Toll-like receptor, 一分子イメージング

### 緒言

免疫系は大きく自然免疫と獲得免疫に分かれている。前者は進化的に広く保存しており、ゲノムにコードされており遺伝子再構成を受けず個体において変化することのない受容体を用いて病原体の侵入を検知する。Toll 様受容体 (TLR) はそのような受容体の一つであり、病原体由来の分子パターンを認識し自然免疫系の活性化を誘導するのに必須である。さらに、自然免疫の活性化が獲得免疫の活性化に重要であることもわかっている。これらから、TLR は免疫応答のゲートウェイということができ、効果的なアジュバントの開発などのためには TLR の活性化機構を詳細に調べることが重要であると考えられる。

TLR はヒトで 10、マウスで 13 の遺伝子があり、そのリガンドについても明らかになっている。TLR4 はグラム陰性細菌の細胞壁成分である lipopolysaccharide (LPS) を認識する。そのシグナル伝達経路についても詳細な解析がなされており、細胞内のアダプター分子として MyD88、TIRAP、TRIF、TRAM が知られ、またさらに下流のシグナル伝達分子としてリン酸化酵素 IRAK1、2、4 やユビキチン化酵素 TRAF6、MAPKKK である TAK1 等が知られている。TIRAP/MyD88 に依存した経路は転写因子 NF- $\kappa$ B を、TRAM/TRIF に依存した経路は転写因子 IRF3 を活性化する。

アダプターの分子に関しては細胞生物学的解析によって局在等が判明しているが、例えば TRAM については細胞質膜に局在するという観察とエンドソームに局在するという観察があるなど議論がある。また、例えば TIRAP は細胞質膜に局在しているが、MyD88 が TLR4 または TIRAP と結合する解離定数など、種々の反応素過程がどの順序で、どのような速度定数、解離定数を持った反応ダイナミクスで起こるかなどはわかっていない。

分子に基礎を置く現代の生物学においては一分子ダイナミクスの観測は究極の高精度観測であると言えるが、本研究では一分子レベルで反応素過程を同定しながらこれらパラメータを測定することで高精度な TLR によるシグナル伝達のモデル構築に向けた基盤を打ち立てることを試みた。

また、本研究の過程において新たな一分子イメージングデータ解析手法 probabilistic nearest neighbor (PNN) 法を考案した。通常、一分子イメージングによって得られた動画像は、分子の位置を各タイムフレームで決定した後、次のタイムフレームにおいてどの位置にあるかを結び軌跡を決定する。この過程をリンクングというが、分子の密度が大きい場合はエラーを生じやすく、誤った分子の拡散速度の推定を与えるという問題がある。提案手法ではリンクングに起因するエラーを回避することができる。シミュレーション実験により、本法が分子の密度が高い場合においても正確に拡散速度を推定しうることが示された。

### 方法、結果および考察

#### 1. TLR4 と TIRAP は LPS 刺激により膜上での拡散速度が低下する

pFC14A プラスミドまたは pEF-BOS に BL-tag (beta-lactamase E166N mutant<sup>1)</sup>) を導入したプラスミドに、PCR で増幅したヒト TLR4、TIRAP 遺伝子を導入し、TLR4-HaloTag または BL-tag-TIRAP 融合タンパク質発現系を構築した。これらのプラスミドを HEK 293 細胞に導入し、転写因子 NF- $\kappa$ B によって活性化するプロモータ下流にルシフェラーゼを導入したプラスミドと共に細胞に導入、LPS で刺激することにより、これらの融合タンパク質が functional であることを確認した (data not shown)。

これらの融合タンパク質を導入した細胞を全反射蛍光顕微鏡 (total internal reflection fluorescent microscope、TIRFM) で観察した。すると、TLR4、TIRAP とも膜付近に局在し、かつ一分子の観察が可能であることが示された (図 1)。この結果は TIRAP が膜局在するという報告と一致する<sup>2)</sup>。また、分子の軌跡から計算された位置変化の分布より、TLR4、TIRAP 各分子とも拡散係数が違う 2 状態 (遅い状態と早い状態) を取ることが示唆された。

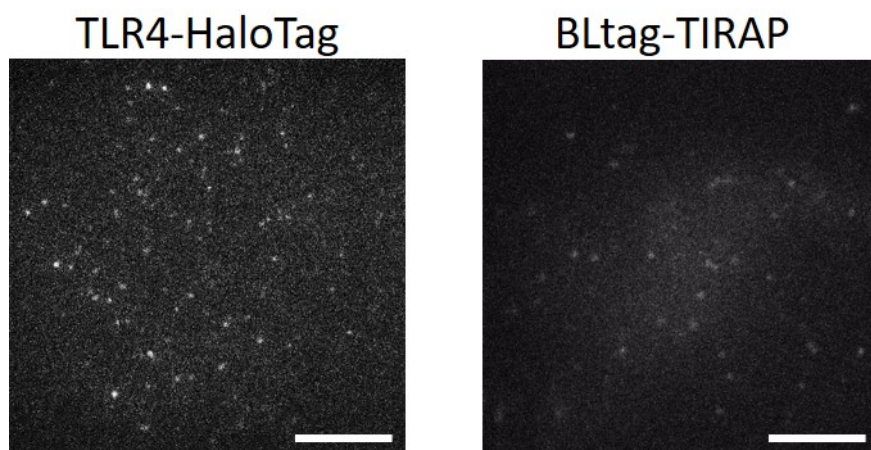


図 1. TLR4、TIRAP の TIRFM 観察像

TLR4-HaloTag、BL-tag-TIRAP を HEK293 細胞に導入し、蛍光リガンドで染色後 TIRFM 観察を行った。スケールバーは  $5\mu\text{m}$ 。

次に、細胞を LPS で刺激して TIRFM に供し、拡散係数の違う 2 状態それぞれにある分子の割合を計算した。すると、TLR4、TIRAP とも遅い状態の分子の割合が LPS 刺激後に増加することが示された (図 2、矢印部分)。これは LPS を認識しシグナル伝達を行う際に分子の拡散が遅くすることを暗示している。また、この際の拡散速度が遅い TLR4 と TIRAP の速度は非常に近く、これらの分子が相互作用していることを暗示している。

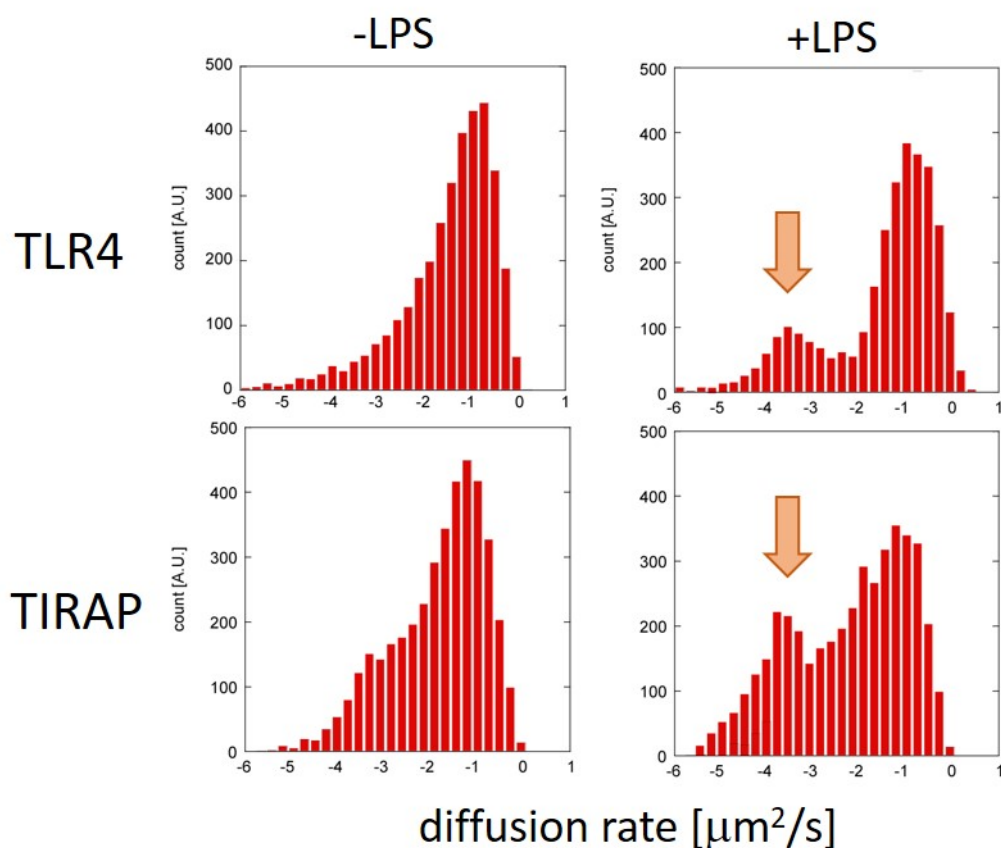


図2. TLR4、TIRAP 分子の拡散係数

TLR4 および TIRAP の拡散係数を一分子ごとに計算し、拡散係数の分布をプロットした。LPS 刺激前後における分布を示した。LPS 刺激後に増加する拡散速度の遅い分子を矢印で示した。

この分子の運動の変化とシグナル伝達との関係を見るために TLR4 と TIRAP 等のアダプター分子の相互作用とシグナル伝達を媒介する TIR ドメインを除いた TLR4 と HaloTag の融合タンパク質 TLR4dTIR-HaloTag と BL-tag-TIRAP を発現させ、LPS 刺激前後の分子の動きを TIRFM によって観察した。TLR4dTIR 分子は拡散速度が遅い分子が増加した一方、TIRAP では増加が見られなかった (図3)。これは、LPS の TLR4 への結合そのものが TLR4 分子の拡散速度の低下に重要であることと、TIRAP の拡散速度の低下には TLR4 との TIR ドメインを介した相互作用が重要であることを示唆している。EGF の受容体 EGFR や cAMP 受容体 CAR1 においてはリガンドとの結合後にその拡散速度が低下すること、その低下とシグナル伝達に密接な関係があることが示唆されており、本研究の結果はこれらと符合する。

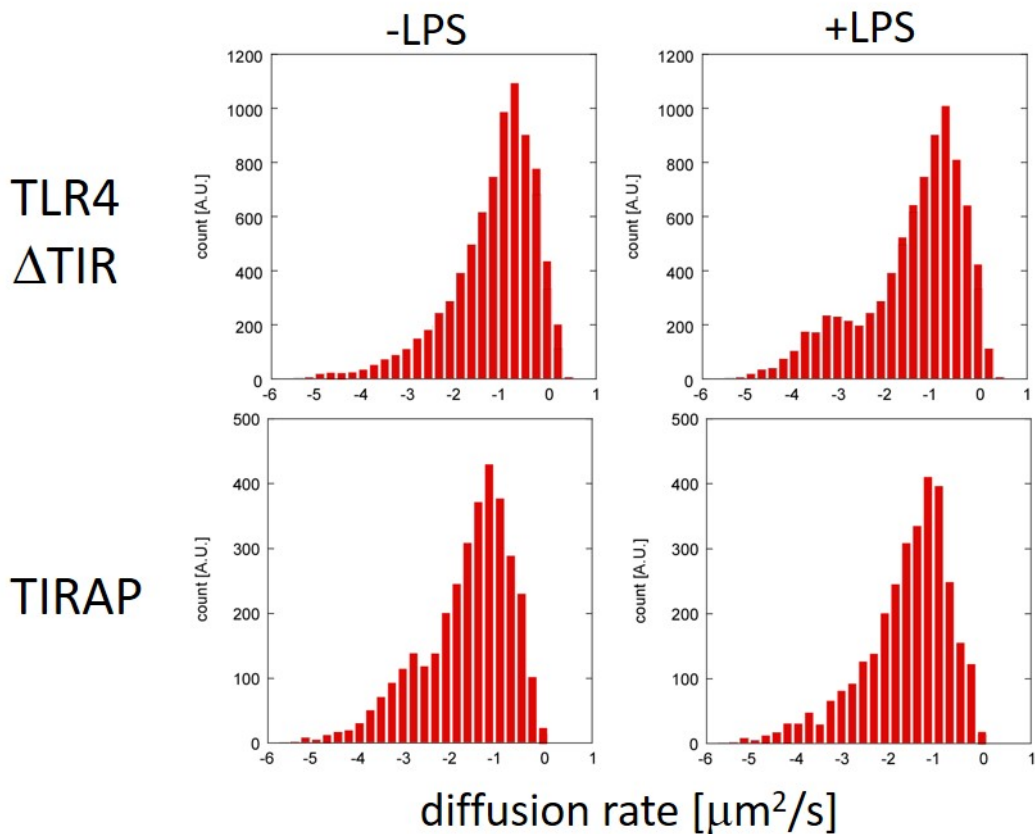


図3. TLR4 $\Delta$ TIR、TIRAP の拡散係数

図2と同様にTLR4 $\Delta$ TIR分子、TIRAP分子の拡散係数を一分子ごとに計算しその分布をプロットした。

## 2. 新規の拡散係数推定法、Probabilistic Nearest Neighbor (PNN) 法

本研究ではさらに一分子イメージングによって得られた画像の解析手法として probabilistic nearest neighbor (PNN) 法を考案した<sup>3)</sup>。本法は通常用いられる分子トラッキングと違い、分子移動経路のリンクに起因するエラーを回避することができる。TIRFM 動画像を解析する際、分子の位置を各タイムフレームで決定した後、次のタイムフレームにおいてどの位置にあるかを結び軌跡を決定する。この過程をリンクというが、分子の密度が大きい場合はエラーを生じやすく、誤った分子の拡散速度の推定を与えるという問題がある。PNNにおいては、リンクを避け、分子の位置関係の確率モデルにもとづいて推定を行う。現在注目している分子の現在のタイムフレームにおける位置と次のタイムフレームにおける自らおよび他の分子の位置関係は図4左上のようになり、これは(1)自らが一番近い位置にいる場合(図4右上)と(2)他の分子が一番近い場合(図4左下)の2通りに分けることができる。これを用いて、分子の密度、拡散速度等を考慮した確率モデルを作ることができる。

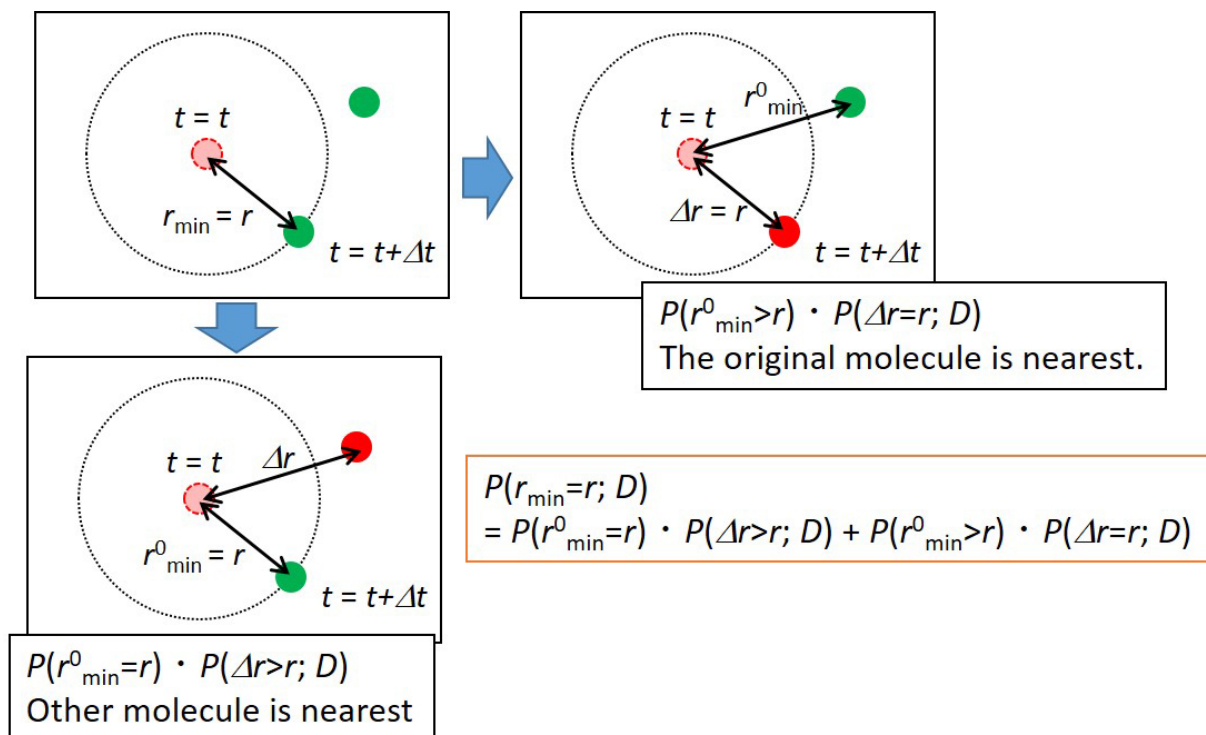


図4. PNN 法の概念図

注目している分子の現在位置と次のタイムフレームでの位置は左上のようになっており、(1) 自らが一番近い位置にいる場合 (右上) と (2) 他の分子が一番近い場合 (左下) の2通りに分けることができる。これらの確率の和としてモデルを作ることができる (赤枠内の式)。

提案手法の有効性を示すため、シミュレーション実験を行った。図5に示したように、粒子の密度を高くするとリンクを行う通常の方法においては拡散係数を小さく推定するが (図5左)、提案手法では正確に推定することができた (図5右)。この結果は、提案手法が分子の密度が高い場合においても正確に拡散速度を推定しうることが示している。一分子イメージングにおいては分子の密度の制御、ノイズの制御が非常に重要であると指摘されており、本提案手法により制御すべき範囲が広がり、一分子観察の自動化等に資すると考えられる。

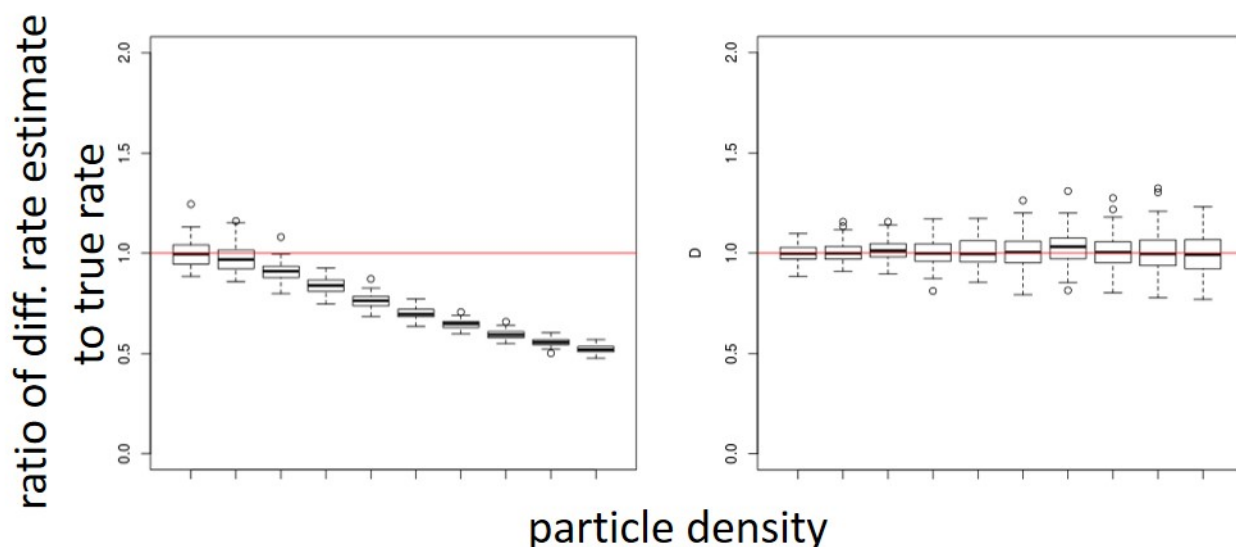


図5. 拡散係数推定のシミュレーション実験

粒子の密度を変化させた場合における通常の方法（左）と提案手法（右）による拡散係数推定値の真の値に対する比をプロットした。各密度について100回計算している。

### 共同研究者

本研究の共同研究者は、理化学研究所生命システム研究センターの上田昌宏氏、小塚淳氏、大阪大学大学院工学研究科の菊地和也氏、同免疫学フロンティア研究センターの寺口俊介氏である。

### 文 献

- 1) Mizukami S, Watanabe S, Hori Y, Kikuchi K. Covalent protein labeling based on noncatalytic beta-lactamase and a designed FRET substrate. *J Am Chem Soc.* 2009 Apr 15;131(14):5016-7. DOI: 10.1021/ja8082285.
- 2) Kagan JC, Medzhitov R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell.* 2006 Jun 2;125(5):943-55. DOI: 10.1016/j.cell.2006.03.047
- 3) Teraguchi S, Kumagai Y. Probabilistic Nearest Neighbor Estimation of Diffusion Constants from Single Molecular Measurement without Explicit Tracking. Preprint. arXiv: 1601.00756