

本研究は、グラム陰性細菌の細胞壁成分 LPS を認識する Toll 様受容体 (TLR) である TLR4 とその下流に位置する細胞質内のアダプター分子群との相互作用を、細胞表面近くの分子を一分子レベルで観測する技術、全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRFM) を用いて観測し、TLR による情報処理を定量的に記述することを目指したものである。

蛍光色素と共有結合することで分子のラベリングを可能にする Halo-tag または大阪大学大学院工学系研究科の菊地和也氏と協力して開発した BL-tag と TLR4、TIRAP との融合タンパク質発現系を構築し、HEK 293 細胞に導入した。細胞を LPS で刺激前後、TIRFM を用いた一分子イメージングに供したところ、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。その運動の解析から、両分子とも拡散が遅い状態と早い状態の 2 状態を取る可能性が示唆された。さらに、細胞を LPS または培地で刺激したのちに TLR4、TIRAP 分子の運動を解析したところ、LPS 刺激後に TLR4、TIRAP とも拡散が遅い細胞が増加することが示唆された。拡散速度が小さい TIRAP 分子の増加は、TIRAP と相互作用に必要な TLR4 の細胞内ドメインである TIR ドメインに依存しており、TIRAP の拡散速度減少はシグナル伝達の開始と強く相関していることが示唆された。

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。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キ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。

TLR4 と TIRAP の膜上での運動とその LPS による変化

