

結核菌感染下での免疫抑制レセプターの役割と機能解析

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

半田 浩

1. 背景

結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) は世界最大の感染症の一つであり、年間180万人が死亡している。近年では先進国においても多剤耐性結核菌の出現・拡散により感染数の増加が確認されていることから新規の抗生物質の開発は急務である。そのために結核菌と宿主の相互作用に焦点を当て、結核菌の感染機構の解明を行うことは新規抗菌薬の開発に向けて極めて重要と考えられる。

結核菌は経口により宿主に取り込まれた後、肺胞マクロファージ、樹状細胞、もしくは単球に侵入する。結核菌は感染初期にはファゴソームに局在しており、リソソームとの融合によるファゴリソーム形成を阻害し、ファゴリソームからの殺菌を回避する。宿主細胞はファゴリソームによる殺菌以外にも免疫応答を用いて結核菌感染に対応する。結核菌感染初期において最も重要な免疫応答としてTLR (Toll-like Receptor) ファミリーによるサイトカイン産生が報告されている。結核菌感染に関与しているTLRとしてはTLR2, 4, そして9が報告されており、その中でもTLR9は結核菌感染下におけるサイトカイン産生に関与しており、さらにTLR9ノックアウトマウスを用いた感染実験により結核菌感染抵抗性に重要であることが明らかとなっている¹。

Ly49QはNK細胞レセプターファミリーの1つであり、他のLy49ファミリーとは異なりNK細胞には発現せず好中球、プラズマ細胞様樹状細胞 (pDC)、マクロファージに発現している。Ly49Qは細胞内領域にITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif) を保有しており、ITIM内のチロシンがリン酸化されることでホスファターゼであるSHP-1, SHP-2との結合と結合することで炎症制御に関与している²。我々はこれまでにLy49Qがエンドライソゾームの細胞内トラフィックを制御することでTLR9依存的なIFN-I産生をITIM依存的に制御すること、さらに近年Ly49Qがファゴサイトーシスによる菌取り込みにも関与していることを明らかにしている^{3,4} (論文未発表)。これら一連のLy49Qの役割は、Ly49Qが結核菌感染においても結核菌取り込みにおけるファゴサイトーシスと、その後の細胞内トラフィックにおけるTLR9のシグナルを制御していると推測される。

本研究の目的は結核菌感染下におけるLy49Qの役割に焦点を当てることで、結核菌感染における免疫応答の新しい制御機構を解明することである。

2. 方法

・材料

結核菌は*Mycobacterium tuberculosis* Erdman株を用い、100°Cで20分熱処理した物を死菌として用いた。Ly49Qノックアウトマウスは以前使用したものを⁴を用いた。

・マクロファージへの結核菌処置

腹腔マクロファージは野生型およびLy49Qノックアウトマウスより採取し、24wellプレートに 5×10^5 になるように播種した後、24時間インキュベートした物を用いた。結核菌の死菌をMOI :1になるように処理した後、適切な時間で細胞もしくは細胞培養培地を採取した。

・新規結合タンパク質の同定

ペプチドはLy49Q ITIMを含むLy49Q 1-15残基を用いた。ペプチドはITIM内のチロシンにリン酸化を修飾した物と非修飾した物（ネガティブコントロール）を用いた。2種類のペプチドをビーズに結合させた後、培養細胞であるRaw264.7細胞Lysateと混和することで結合タンパク質の検出を行い、質量分析法（LC-MS/MS）により同定した。

・タンパク質局在観察

Raw264.7細胞にGFPタグを付けたLy49QとHAもしくはMycタグを付けた新規結合タンパク質を発現させた後、局在を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

・活性化Rac測定

野生型もしくはLy49Qノックアウトマウスより骨髓細胞を採取し、比重分離法にて選別した好中球を用いた。fMLP（ $20 \mu\text{M}$ ）にて刺激して1分後の細胞を回収して活性化RacをG-LISA（Cytoskeleton社）を用いて測定した。

3. 結果

Ly49Qが結核菌感染における初期応答に関与しているかを検討するため、野生型もしくはLy49Q KOマウスより採取した腹腔マクロファージに結核菌死菌を添加し炎症性サイトカイン産生と免疫応答の観察を行った。その結果、Ly49Q KO腹腔マクロファージでの炎症性サイトカインIL-6とTNF α の産生は野生型と比較して有意に減少していた。免疫応答においても、Ly49Q KO腹腔マクロファージでは野生型と比較してErkとI κ B α のリン酸化タンパク質が減少していた。これらの結果からLy49Qは結核菌感染における初期免疫応答誘導に関与していることが示唆された。

次に、Ly49Qによる初期免疫応答制御機構を解明するためにペプチドプルダウンアッセイを用いてLy49Q ITIMのチロシンリン酸化依存的に結合するタンパク質のスクリーニングを行った。その結果、これまでに報告されていたSHP-1, SHP-2以外にも多くのタンパク質の結合が観察された。さらに、結合したタンパク質をLC-MS/MSで解析した結果、Srcキナーゼファミリーやアダプタータンパク質を含む多数の新規結合タンパク質が同定された。同定された新規結合タンパク質がITIMと直接結合するのかが確認するため、大腸菌で新規結合タンパク質のSH2ドメインを発現・精製してペプチドプルダウンアッセイを行った結果、精製したSH2ドメインとLy49Q ITIMの結合が確認されたことから直接結合していることが判明した。次に、細胞内におけるLy49Qと新規結合タンパク質の局在を免疫染色により観察するため、Raw264.7細胞にGFPタグを付けたLy49QとHAもしくはMycタグを付けた新規結合タンパク質を強制発現させ、HAもしくはMyc抗体により染色し共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。その結果、Ly49Qは細胞膜において新規結合タンパク質と共局在していることが確認された。

結核菌感染における初期免疫応答の誘導には結核菌の細胞内への取り込みが必要であることから、結核菌の取り込みとLy49Qの関わりを検討した。菌の取り込みには低分子量Gタンパク質Rhoファミリータンパク質に属しているRacが中心的な役割を担っている。我々が同定したLy49Q ITIMへの新規結合タンパク質はRacの活性化誘導に関与していることから、野生型とLy49Q KOにおけるRacの活性化を観察した。Racの活性化を評価するために好中球を用いた。好中球にはLy49Qが発現しており、fMLP刺激により迅速にRacが活性化されるので測定が容易である。野生型好中球にfMLP刺激を行うと1分でRacの活性化が観察されたが、Ly49Q KO好中球ではfMLPで刺激してもRacの活性化は観察されなかった。

これら一連の結果から、Ly49QはITIM依存的に結合するタンパク質を介してRacの活性化を促進することで菌の取り込みを誘導し初期免疫応答に関与していることが示唆された。

4. 考察

本研究では免疫抑制性レセプターの1つであるLy49QがITIM結合タンパク質を介してRacの活性化を促進し菌の取り込みを促進することで結核菌感染における初期免疫応答を制御していることを明らかとした。一般的にITIMを保有する抑制性レセプターはSHP-1, SHP-2に結合することで、種々のシグナルをその名の通り抑制し、過剰な炎症応答などを制御する。一方で、Ly49Qは他の抑制性レセプターとは異なる非常にユニークな機能を示し、種々のシグナルを抑制的ではなく促進的に働いている。本研究で新たにLy49Qが他の抑制性レセプターとは異なるタンパク質と結合することで、一般的な抑制性レセプターとは異なる機能を示す理由だと推測される。

本研究で得られた成果は結核菌感染における宿主細胞初期免疫応答の新しい制御機構の一端を明らかにすることができた。今後は、Ly49Qが*in vivo*においても結核菌感染に重要であることを確認すると共に、ヒトにおけるLy49Qのオルソログを同定し結核治療薬の開発に有用な基盤的知見を得たい。

5. 参考文献

- 1 Bafica, A. *et al.* TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of experimental medicine* **202**, 1715-1724, doi:10.1084/jem.20051782 (2005).
- 2 Toyama-Sorimachi, N. *et al.* Ly49Q, a member of the Ly49 family that is selectively expressed on myeloid lineage cells and involved in regulation of cytoskeletal architecture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 1016-1021, doi:10.1073/pnas.0305400101 (2004).
- 3 Yoshizaki, M. *et al.* Spatiotemporal regulation of intracellular trafficking of Toll-like receptor 9 by an inhibitory receptor, Ly49Q. *Blood* **114**, 1518-1527, doi:10.1182/blood-2008-12-192344 (2009).
- 4 Sasawatari, S. *et al.* The Ly49Q receptor plays a crucial role in neutrophil polarization and migration by regulating raft trafficking. *Immunity* **32**, 200-213, doi:10.1016/j.immuni.2010.01.012 (2010).