The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Mycoplasma fermentans由来 Lipoprotein　M１６１抗原によるToll-Like　Receptor２を介した基本免疫活性化機構の研究
Author(s)	西口，幸希
Citation	大阪大学，2002，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43354
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【19】

氏　　名	西（にし）　口（ぐち）　幸（みゆ）　希（き）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　16972　号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科生命情報環境科学専攻
学　位　論　文　名	*Mycoplasma fermentans* 由来 Lipoprotein M161抗原による Toll-Like Receptor2を介した基本免疫活性化機構の研究
論文審査委員	（主査） 教　授　西澤　恭子 （副査） 教　授　八木　清仁　　教　授　前田　正知　　教　授　土井　健史

論文内容の要旨

基本免疫（innate immunity）は、リンパ球を介した獲得免疫（acquired immunity）に先行して病原体の感染に対して応答する。基本免疫細胞（単球、マクロファージ、樹状細胞）は、特異的なレセプターによって病原体の構成成分を認識し細胞内にシグナルを伝達する。1998年に哺乳類の Toll-like receptors（TLRs）がクローニングされ生体防御におけるシグナル伝達分子であることが明らかにされた。

TLRs は PAMRs（pathogen-associated molecular patterns）と呼ばれる微生物の構成成分の分子パターンを認識する PRRs（pattern recognition receptors）である。現在、データベース上には human TLR1～10が報告されており、TLR2はグラム陽性細菌の peptidoglycan、酵母の zymosan、種々の細菌の lipoproteins を認識する。細菌の lipoprotein は、N末端の lipo-amino acid、N-acyl-S-diacylglyceryl cysteine で特徴づけられており、この脂質および peptide 部分が TLR2を介した細胞活性化に必須である。TLR family 分子は、細胞外領域に微生物産物の認識に重要な leucine-rich repeats（LRR）と細胞内領域にシグナル伝達経路を活性化しサイトカイン（IL-8、IL-12、TNF-α）などの炎症反応に関わる遺伝子の発現を誘導するのに重要な IL-1R に類似の配列 Toll/IL-1R（TIR）homology domain をもつ、I 型の膜タンパク質である。

M161抗原は、グラム陽性細菌 *M.fermentans* 由来の糖鎖を持たない分子量約43kDa の lipoprotein である。M161抗原遺伝子は、signal peptide 部位に lipobox と呼ばれる lipoprotein 特有の配列（AVSC:Ala-Val-Ser-Cys）を持ち、native な状態ではこの 4 番目の Cysteine 残基にパルミチン酸が 2 分子結合している。M161抗原の機能は、①ヒト単球、マクロファージに対して炎症性サイトカイン（IL-1β、TNF-α、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12）産生を誘導②*mycoplasma*に感染したヒト細胞上に補体第 3 成分（C3）を沈着の 2 つである。

はじめに、M161抗原がこれらの機能に寄与する構造モチーフを同定する目的で脂質を持たない 3 種類のリコンビナント M161抗原（rM161抗原）を作製し native M161抗原と rM161抗原を用いて構造と機能の解析を行った。次に、M161のレセプターである TLR2のリガンド認識部位の構造解析を行った。

最初に、M161抗原の構造と機能の解析の結果、以下のことを明らかにした。①ヒト単球および樹状細胞からのサイトカイン産生には、疎水領域（脂質または signal peptide）を有し、タンパク質の単量体の構造が重要である。②M161抗原による補体活性化には、疎水領域とタンパク質部分が重要な役割を果たしている。③Native M161抗原は、補体活性化、ヒト単球および樹状細胞に対するサイトカイン誘導が可能でありそれぞれの活性化には、その脂質部分

の構造が重要である。④*Mycoplasma*の lipoprotein（M161抗原）が樹状細胞の成熟化を誘導することを初めて明らかにし、樹状細胞の成熟化には、M161抗原の脂質部分が重要である。⑤マウスマクロファージに対するサイトカイン産生誘導の結果から M161Agは TLR2を介していることを明らかにした。⑥脂質を持たない単量体 rM161抗原 SP+C25S はヒト細胞を活性化しサイトカイン産生を誘導したが、マウス細胞を活性化しなかった。これらの結果から native M161抗原の脂質部分がマウスマクロファージの TLR2を介したサイトカイン産生誘導に不可欠であるが、ヒト単球および樹状細胞の活性化においては疎水領域が重要であることを示唆した。

次に、TLR2のリガンド認識部位の構造解析の結果、以下のことを明らかにした。①抗 hTLR2モノクローナル抗体により、ヒト単球からの IL12p40産生が部分阻害された。阻害の程度が抗体の種類およびリガンドの種類によって異なったことから、hTLR2のリガンド認識部位はリガンドにより異なることが示唆された。②Human TLR2による *Mycoplasma* lipoprotein（M161抗原）および lipopeptide（MALP2）の認識には血清成分の関与はないことが明らかとなった。③ヒト腎臓由来細胞 HEK293において、hTLR2を単独発現させた場合、リガンド刺激によって NF-κB 活性化が認められたが、hTLR2と hTLR6（mTLR2の co-receptor である mTLR6のヒト型）、hTLR2と hCD14（LPS 認識における co-factor）を共発現させた場合において、NF-κB 活性化の増強は認められなかった。従って、M161抗原および MALP2の hTLR2による認識には hTLR6および hCD14は関与しないことが明らかとなった。④Human TLR2のリガンド認識には、N末端近傍の LFR が重要であり、この領域に含まれる30番目と36番目の Cystein 残基が特に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

以上、本研究において、基本免疫活性化機構について、*M.fermentans*由来 Lipoprotein M161抗原（リガンド）側および Toll-Like Receptor 2（レセプター）側、両者の構造と活性化の関係について分子レベルで明らかにした。

M161抗原が基本免疫細胞を活性化する機能を活かして将来的に抗腫瘍免疫療法への応用の道が開けるかもしれないと期待している。

論文審査の結果の要旨

哺乳類の Toll-like receptors（TLRs）は、1998年クローニングされ生体防御におけるシグナル伝達分子であることが明らかにされた。TLRs は PAMPs（pathogen-associated molecular patterns）と呼ばれる微生物の構成成分の分子パターンを認識する PRRs（pattern recognition receptors）である。一方、M161抗原はグラム陽性細菌 *M.fermentans*由来の糖鎖を持たない lipoproteinで、その機能は(1)ヒト単球、マクロファージによる炎症性サイトカイン産生誘導、(2)*mycoplasma*に感染したヒト細胞上に補体第 3 成分（C3）を沈着、の 2 つである。本研究では、これらの機能に寄与する M161抗原の構造モチーフ同定および M161抗原レセプターである TLR2のリガンド認識部位の構造解析を行った。その結果、以下の成果が得られた。

1. M161抗原の脂質部分は、TLR2を介したマウスマクロファージによるサイトカイン産生誘導に不可欠である。
2. ヒト単球や未成熟樹状細胞による TNF-α，lL12 p40の誘導にはアミノ末端側の疎水部位（脂質または signal peptide）が重要であり、TLR2によるリコンビナント M161抗原の認識は、種依存的である。
3. M161抗原誘導性の樹状細胞成熟化（CD83と CD86の up-regulation）は、脂質部分依存的である。
4. アミノ末端側の疎水部位は、補体活性化の機能に深く関係する。
5. TLR2リガンド認識部位はリガンドの種類により異なることが示唆された。
6. TLR2の*Mycoplasma* lipoprotein/lipopeptide の認識には、可溶型、膜型の CD14は影響を及ぼさない。
7. TLR2のリガンド認識には、アミノ末端最初の LRR 近傍の領域に存在する30、36番目の Cysteine 残基が重要である。

以上の成果は、将来、M161抗原の基本免疫細胞活性化機能を活用した抗腫瘍免疫療法に応用できる可能性を示しており、博士（薬学）の学位授与に値するものと考える。