- Nakamura M, 2006. Discovery of Siglec-14, a novel sialic acid receptor undergoing concerted evolution with Siglec-5 in primates. *FASEB J*, **20**, 1964-1973.
- 13) Schauer R, Srinivasan GV, Coddeville B, Zanetta JP, Guérardel Y, 2009. Low incidence of *N*-glycolylneuraminic acid in birds and reptiles and its absence in the platypus. *Carbohydr Res*, **344**, 1494-1500.
- 14) Yasue S, Handa S, Miyagawa S, Inoue J, Hasegawa A, Yamakawa T, 1978. Difference in form of sialic acid in red blood cell glycolipids of different breeds of dogs. *J Biochem*, **83**, 1101-1107.
- 15) Andrews GA, Chavey PS, Smith JE, Rich L, 1992. *N*-glycolylneuraminic acid and *N*-acetylneuraminic acid define feline blood group A and B antigens. *Blood*, **79**, 2485-2491.
- 16) Le Pendu J, 2004. Histo-blood group antigen and human milk oligosaccharides: genetic polymorphism and risk of infectious diseases. *Adv Exp Med Biol*, **554**, 135-143.
- 17) Cserti CM, Dzik WH, 2007. The ABO blood group system and *Plasmodium falciparum* malaria. *Blood*, **110**, 2250-2258.
- 18) Takeuchi Y, Porter CD, Strahan KM, Prece AF, Gustafsson K, Cosset FL, Weiss RA, Collins MK, 1996. Sensitization of cells and retroviruses to human serum by (alpha 1-3) galactosyltransferase. *Nature*, **379**, 85-88.
- 19) Rother RP, Fodor WL, Springhorn JP, Birks CW, Setter E, Sandrin MS, Squinto SP, Rollins SA, 1995. A novel mechanism of retrovirus inactivation in human serum mediated by anti-alpha-galactosyl natural antibody. *J Exp Med*, **182**, 1345-1355.
- 20) Varki A, 2009. Multiple changes in sialic acid biology during human evolution. *Glycoconj J*, **26**, 231-245.

原索動物と脊椎動物における Toll様受容体のリガンド認識機構の比較

佐々木 尚子 ((財) サントリー生有研)
E-mail: sasaki@sunbor.or.jp

1. はじめに

免疫系は獲得免疫と自然免疫の2つから成り立っている。獲得免疫は硬骨魚類以上の生物で確認されており、遺伝子再構成により抗原特異的な受容体がT細胞やB細胞の表面に発現し、異物を認識する。これに対して、自然免疫は全ての生物が生まれながらに持っており、進化的にも保存されたメカニズムであると考えられている。自然免疫において、細菌、真菌、ウイルス、寄生虫などに存在する特定の病原体関連分子パターン (PAMPs) を主に認識しているのが、Toll様受容体 (TLR) である。

2. 哺乳類におけるTLR

TLRは細胞外領域にロイシンリッチリピート (LRR)、細胞内領域にToll/IL-1R相同領域 (TIRドメイン) を持つタイプI型膜貫通タンパク質である。MyD88、TIRAP、TRIF、TRAMの4つのアダプター分子も、TIRドメインを有する。

ヒトでは9種類のTLRの機能が同定されており、各TLRの細胞内局在と認識するリガンドが決定されている。TLRはマクロファージやナチュラルキラー細胞といった免疫細胞の他、消化管、血管、生殖器官等、幅広く発現している。TLR1, 2, 4, 5, 6は細胞膜に局在し、細胞外に存在する病原性微生物の細胞壁構成成分や鞭毛タンパクを認識する (図

図1 ヒトTLRの細胞内局在とシグナル伝達経路

1)。これに対して、TLR3, 7, 8, 9はエンドソームに局在し、エンドサイトーシスで取り込まれたバクテリアやウイルス由来のRNAやDNAを認識する。TLRがリガンドを認識すると、いくつかのアダプター分子がTIRドメインを介してTLRと結合し、シグナル伝達経路が誘導される。TLRによる主なシグナル伝達は、NF- κ BやAP-1を活性化し、炎症性サイトカインやケモカインが産生されるMyD88依存的経路と、インターフェロン制御因子 (IRF) が活性化され、インターフェロンが産生されるMyD88非依存的経路に大別される^{1~5)}。

3. 哺乳類以外の生物におけるTLRおよびTLR様遺伝子

近年、フグやヤツメウナギ、ナメクジウオ、ウニ、ヒドラなどでTLR様遺伝子の解明が進められている。フグではTLRが22種類存在する。フグTLR (fgTLR) 3は消化器官や肝臓で発現している。また、培養細胞系を用いた局在性解析では細胞内の小胞体に局在

し、200bp dsRNAを認識することが報告されている。一方、fgTLR22は肝臓、脾臓、筋肉、腎臓、消化管、皮、心臓、脳で発現している。細胞内では細胞膜に局在し、長鎖dsRNAを認識する^{6, 7)}。

ヤツメウナギでは2種類のTLR、laTLR14aおよびlaTLR14bが同定されている。laTLR14aは鰓で発現し、laTLR14bは消化管、卵、血球、鰓で発現している。またlaTLR14a、laTLR14bはともに細胞内では小胞体に局在が見られる。さらにlaTLR14bの細胞内領域とヒトCD4の細胞外領域のキメラタンパク質を用いた実験により、NF- κ Bを活性化することが報告されている⁸⁾。

ゲノム解析からウニでは222種類⁹⁾、ナメクジウオでは72種類¹⁰⁾とTLR候補の存在が予測されているが、認識するリガンドやシグナル伝達機構は解明されていない。したがって、このようなTLR様遺伝子が全て自然免疫機構に関与しているという証明は得られていない。

哺乳動物のTLR発見のきっかけとなった

図2 TollまたはTLRを介した免疫活性化機構の比較

のが、ショウジョウバエのTollである。TollとヒトTLRの自然免疫活性化機構を比較すると、いくつか相違点が認められる(図2)。ヒトではTLRが異物をリガンドとして直接認識するのに対して、ショウジョウバエでは、異物認識はペプチドグリカン認識タンパク質(PGRP)ファミリーが担っており、Tollはspätzleを介してシグナル伝達を引き起こす。また、ショウジョウバエのDIFはヒトNF- κ Bのホモログであるが、DIFを活性化するための経路にかかわるタンパク質は哺乳類とは異なっている。さらに、誘導因子も哺乳類や魚類ではTNF α やインターフェロンであるのに対し、ショウジョウバエでは抗菌ペプチドが誘導される^{11, 12)}。

4. カタユウレイボヤにおけるTLR

これまで、ヤツメウナギなどで得られたリガンドアッセイやシグナル伝達経路の結果は、ヒトのタンパク質との融合タンパク質を細胞株に発現させたもので得られており、ネイティブなTLRで得られたものではない。無脊椎動物のTLR様遺伝子の機能やシグナル伝達経路の解明には至っておらず、脊椎動物の

TLRファミリーが自然免疫機構を確立するに至った進化的側面は明らかになっていない。そこで脊椎動物の祖先的生物であるカタユウレイボヤに注目し、カタユウレイボヤTLR(Ci-TLR)の構造、組織内発現分布、細胞内局在、リガンド認識について調べた。

カタユウレイボヤの血球からTLRをクローニングし、全長配列を決定した。その結果、カタユウレイボヤは2種類しかTLRを持っておらず、883アミノ酸残基でコードされているものをCi-TLR1、948アミノ酸残基でコードされているものをCi-TLR2とした。前述したように、TLRは構造的特徴として細胞膜外にLRRを、細胞膜内にTIRドメインを持つI型膜タンパク質である。SMARTタンパク質モチーフ解析を行うと、Ci-TLR1およびCi-TLR2は、TLRの特徴であるLRR、TIRドメインを持つI型膜タンパク質であることが明らかになった(図3)。さらにTLRファミリーの分子系統解析により、Ci-TLRは脊椎動物TLRファミリーに属することが判明した¹³⁾。

Ci-TLR1およびCi-TLR2遺伝子をそれぞれHEK293細胞に導入後、安定発現体を作

Ci-TLR1

Ci-TLR2

図3 Ci-TLRのドメイン構造

製し、Ci-TLRの細胞内局在を調べた。Ci-TLR1、Ci-TLR2はともに、細胞膜上とエンドソームの両方に局在していたが、特にCi-TLR1は細胞膜上に、Ci-TLR2はエンドソームに強く発現していた¹³⁾。このようにTLRが細胞膜とエンドソームへ共局在する例は、哺乳類やその他の生物のTLRでも報告されていない。

TLRがリガンドを認識するとNF-κBが活性化されることを利用し、Ci-TLR安定発現細胞株を用いてリガンド探索を行った。リガンド候補として、ヒトTLRのリガンドとして知られている16種類の病原体構成成分

や菌体(表1)を使用した結果、Ci-TLR1とCi-TLR2はともに、Zymosan、HKLP、Poly(I:C)、Flagellinの4種類のリガンドを認識し、濃度依存的にNF-κBを活性化した(図4)¹³⁾。Zymosan、HKLPはヒトTLR2^{14, 15)}、Poly(I:C)はヒトTLR3¹⁶⁾、FlagellinはヒトTLR5¹⁷⁾と、それぞれ別のTLRが認識するリガンドである。一方、Ci-TLR1およびCi-TLR2は全く同じこれら4種類全てのリガンドを認識し、NF-κBを活性化した。以上のことから、Ci-TLRはショウジョウバエのTollとは異なり、哺乳類TLRの様に直接リガンドを認識すること、さらにCi-TLRは哺乳類TLRよりも広い範囲のPAMPsを認識することが立証された。

幼若体におけるCi-TLR1およびCi-TLR2の発現を解析するために、whole-mount *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。Ci-TLR1は、胃と腸で強く発現していた。また、一部血球でも発現していた。さらに、Ci-TLR2は、Ci-TLR1と同様に胃と腸、一部の血球で発現していた。成体のカタユウレイボヤ組織でのCi-TLRの発現を調べるために、RT-PCRを行った結果、Ci-TLR1は様々な組織で発現が認められたが、胃と腸の前方部分で特に強く発現していた。Ci-TLR2は胃と腸の前方および中間部分で発現が検出され、特に胃で強く発現していた。以上より、Ci-TLRはヒトTLRと同様に、外部環境にさらされやすい消化管や、免疫に関与している血球に強く発現していることが明らかになった。

表1 Ci-TLRに対する投与リガンド

投与リガンド	ヒトTLR
・ Pam3CSK4	TLR1/2
・ heat-killed <i>Listeria monocytogenes</i> (HKLM)	TLR2
・ Zymosan	TLR2
・ 1, 3-β-glucan	TLR2
・ heat-killed <i>Legionella pneumophila</i> (HKLP)	TLR2
・ heat-killed <i>Staphylococcus aureus</i> (HKSA)	TLR2
・ Poly (I:C)	TLR3
・ LPS	TLR4
・ Lipid A	TLR4
・ Flagellin	TLR5
・ FSL1	TLR6
・ Imiquimod	TLR7
・ Single-strand (ss) RNA40/LyoVec	TLR8
・ ODN2006	TLR9
・ ssDNA	TLR9
・ <i>E. coli</i> DNA	TLR9

図4 Ci-TLRに対するリガンド探索

哺乳類ではNF- κ Bが活性化されると、炎症性サイトカインTNF α の産生増加が誘導される。そこでカタユレイボヤ成体組織でTLRを強く発現していた胃、腸におけるCi-TNF α 産生量の変化を調べた。Poly(I:C)を投与すると、腸の前方部分で約4倍、胃で約10倍Ci-TNF α の産生が増加した。またFlagellinを投与すると胃で約6倍、腸の中間部分で約10倍Ci-TNF α 産生が増加した。これらの結果より、Ci-TLRがカタユレイボヤ成体組織においてPAMPsを認識し、哺乳類と同様に炎症性サイトカインを誘導していることが示された。

5. まとめ

これらの結果は、TLRを中心とする脊椎動物型の自然免疫系がカタユレイボヤでも保存されていたことを示唆している。我々は、無脊椎動物で初めてTLRの構造と機能を明らかにするとともに、Ci-TLRは哺乳類の細胞

膜型TLRとエンドソーム型TLRの両方の性質を合わせ持つ「ハイブリッド」型であることを実証した。最後にこれらの結果を踏まえ、カタユレイボヤを用いたTLR研究の目標について、シンポジウムのテーマである一般解と特殊解という観点から述べたい。

ホヤはゲノムが小さく遺伝子数も少ない。またライフサイクルも短く、生理機能もシンプルである。実際、ゲノム中のTLRの数も2個と少ない。また、哺乳類と共通の複数のリガンドを認識し、炎症性サイトカインを活性化することから、シグナル伝達機構は基本的に脊椎動物と共通である。このような普遍的な機構が保存されていることに加え、ホヤは体が半透明であることから、蛍光標識Ci-TLRトランスジェニック体を作製することにより、リアルタイムでの動態の可視化が可能になり、TLRの機能解析における有用性が高い。すなわち、Ci-TLRが有するTLRの一般性に基づいた新たな自然免疫機構研究や、

自然免疫進化モデルを確立することが出来る
と考えている。

また、今回のホヤのリガンド選択性や、
これまでの様々な動物のゲノム解析の結果から、
TLRは生物種間で多様化していることが示
唆された。このような特殊性を活かし、種特
異性の高いTLR阻害剤や免疫賦活剤の開発
などを行い、外来生物の駆除や特定生物の保
護などへ応用することも可能であろう。

謝 辞

カタウレイボヤの飼育や供給の手配を行
って下さった京都大学理学部平山和子氏、お
よび京都大学舞鶴水産実験所の皆様に深く感
謝いたします。カタウレイボヤは、ナショ
ナルバイオリソースプロジェクトから提供を
受けました。

文 献

- 1) Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A, 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 13766-13771.
- 2) Akira S, Takeda K, 2004. Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol*, **4**, 499-511.
- 3) Dunne A, O'Neill LA, 2005. Adaptor usage and Toll-like receptor signaling specificity. *FEBS Lett*, **579**, 3330-3335.
- 4) Nishiya T, DeFranco AL, 2004. Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J Biol Chem*, **279**, 19008-19017.
- 5) Nishiya T, Kajita E, Miwa S, DeFranco AL, 2005. TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements. *J Biol Chem*, **280**, 37107-37117.
- 6) Oshiumi H, Matsuo A, Matsumoto M, Seya T, 2008. Pan-vertebrate toll-like receptors during evolution. *Curr Genomics*, **9**, 488-493.
- 7) Matsuo A, Oshiumi H, Tsujita T, Mitani H, Kasai H, Yoshimizu M, Matsumoto M, Seya T, 2008. Teleost TLR22 recognizes RNA duplex to induce IFN and protect cells from birnaviruses. *J Immunol*, **181**, 3474-3485.
- 8) Ishii A, Matsuo A, Sawa H, Tsujita T, Shida K, Matsumoto M, Seya T, 2007. Lamprey TLRs with properties distinct from those of the variable lymphocyte receptors. *J Immunol*, **178**, 397-406.
- 9) Hibino T, Loza-Coll M, Messier C, Majeske AJ, Cohen AH, Terwilliger DP, Buckley KM, Brockton V, Nair SV, Berney K, Fugmann SD, Anderson MK, Pancer Z, Cameron RA, Smith LC, Rast JP, 2006. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Dev Biol*, **300**, 349-365.
- 10) Huang S, Yuan S, Guo L, Yu Y, Li J, Wu T, Liu T, Yang M, Wu K, Liu H, Ge J, Yu Y, Huang H, Dong M, Yu C, Chen S, Xu A, 2008. Genomic analysis of the immune gene repertoire of amphioxus reveals extraordinary innate complexity and diversity. *Genome Res*, **18**, 1112-1126.
- 11) Michel T, Reichhart JM, Hoffmann JA, Royet J, 2001. Drosophila Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature*, **414**, 756-759.
- 12) Hoffmann JA, 2003. The immune response of Drosophila. *Nature*, **426**, 33-38.
- 13) Sasaki N, Ogasawara M, Sekiguchi T, Kusumoto S, Satake H, 2009. Toll-like receptors of the ascidian *Ciona intestinalis*: prototypes with hybrid functionalities of vertebrate Toll-like receptors. *J Biol Chem*, **284**, 27336-27343.
- 14) Sato M, Sano H, Iwaki D, Kudo K, Konishi M, Takahashi H, Takahashi T, Imaizumi H, Asai Y, Kuroki Y, 2003. Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF- κ B activation and TNF- α secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. *J Immunol*, **171**, 417-425.
- 15) Girard R, Pedron T, Uematsu S, Balloy V, Chignard M, Akira S, Chaby R, 2003. Lipopolysaccharides from *Legionella* and *Rhizobium* stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2. *J Cell Sci*, **116**, 293-302.
- 16) Chu WM, Ostertag D, Li ZW, Chang L, Chen Y, Hu Y, Williams B, Perrault J, Karin M, 1999. JNK2 and IKK β are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity*, **11**, 721-731.

17) Mizel SB, Honko AN, Moors MA, Smith PS, West AP, 2003. Induction of macrophage nitric oxide production by Gram-negative fla-

gellin involves signaling via heteromeric Toll-like receptor 5/Toll-like receptor 4 complexes. J Immunol, **170**, 6217-6223.

棘皮動物の生殖を司る神経ペプチド

吉 国 通 庸 (九州大・農院・アクアフィールド科学)

E-mail: yosikuni@agr.kyushu-u.ac.jp

1. はじめに

3年ほど前に、この比内ニュースでイトマキヒトデ (*Asterina pectinifera*) の放射神経に含まれる生殖巣刺激物質 GSS (gonad-stimulating substance) の精製の記事を載せて頂きました (123号)。その後、きちんとした論文になるまでにかなり手こずり、漸く今年初めに掲載されるに至りました¹⁾。論文出版後、共同研究者である三田雅敏氏 (学芸大) が、やはりこのニュースに論文の解説記事を寄稿しています (134号)。GSS 精製後、私は九州大学農学研究院に移動したこともあって、農学部らしい材料を使いながらも生物に普遍性のあることを調べたいと思い、ヒトデと同じ棘皮動物であるウニ・ナマコからヒトデ GSS と同様の生理活性物質を探す仕事を始めました。何より、ヒトデ GSS の化学的実体がインスリン族ペプチドであったこと、また、ウニ・ナマコでもヒトデ同様に神経抽出物が卵成熟・排卵を誘起することから、ヒトデ GSS に似たインスリン族ペプチドが見つかることを期待していました。そうであれば、本シンポジウムの「一般解」にぴったりの現象なのですが。

ヒトデ GSS については前回の記事に詳しく書きましたので、今回はナマコの話と比較できる程度に簡単に説明する程度にさせて頂き、次にナマコの卵成熟、放卵・放精を誘起するペプチドを紹介致します。

2. 棘皮動物の卵成熟研究

1959年に米国の Chaet と McConnaughey

が、ヒトデの放射神経の熱水抽出物を産卵期の雌個体に注射して放卵現象を観察した。当時、東京大学海洋研究所にいた故金谷晴夫博士 (元基礎生物学研究所長) は日本産のヒトデを用いて同様の現象を確認し、神経由来の物質による産卵制御のモデルとなることを確信したという。その後、金谷らのグループを中心として、放卵現象の解析と、それを支配する生理活性物質の探索が進められてきた。

ヒトデに限らず一般に動物の産卵期卵巢中の卵 (正確には卵母細胞) は、個々に濾胞細胞に取り巻かれており、十分に肥大成長したものであっても、そのままでは受精出来ず未成熟な卵と呼ばれる。この時の卵はまだ減数分裂を完了していない (第1減数分裂前期に留まっている)。金谷らは、ヒトデの放射神経から分泌される成分が濾胞細胞に作用して新たに2次成分を合成・分泌させること (神経成分の生殖腺刺激活性)、濾胞細胞から分泌された2次成分が卵母細胞に直接働いて減数分裂を再開させ、受精可能な卵細胞へと変化させることを明らかにした (濾胞成分の卵成熟誘起活性)。卵母細胞の減数分裂が進み受精可能となる現象を卵成熟と呼ぶ。

イトマキヒトデ (*Asterina pectinifera*) の濾胞細胞から分泌される卵成熟誘起活性成分は核酸の微量塩基成分でもある 1-methyladenine であることが1969年に明らかにされた。動物界で初めて明らかにされた卵成熟誘起ホルモンであった。一方、ヒトデ放射神経から分泌され濾胞細胞を刺激する生殖腺刺激活性成分 GSS の探索は、金谷の弟子である白井弘子