

WD40 リピート含有分子による新規な Toll-like receptor7 応答制御機構の解析

福井竜太郎

東京大学 医科学研究所 感染遺伝学分野

【研究の背景】

Toll-like receptor (TLR) は、病原体に共通する構造を認識して免疫応答を惹起する自然免疫系の受容体である。生体防御機構の最前線として機能する一方で、宿主由来の分子をリガンドとして認識し、非感染性の炎症を起こすことが知られている。こうした炎症は自己免疫疾患などとの関わりが示唆されていることから、TLR の応答制御機構を理解することは重要な課題である。我々は、TLR の中でも 1 本鎖 RNA やヌクレオシドを認識する TLR7 に着目し、TLR7 の応答制御が生体恒常性の維持に必須であることを示してきた¹⁻³⁾。そこで、TLR7 の応答制御に関わる新規分子の探索を行うため、CRISPR/Cas9 システムによるゲノムワイドな sgRNA ライブラリと、レポーターアッセイを組み合わせたファンクショナルクローニングを行った。その結果、WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 3 (WIPI3) が TLR7 の応答を制御する新規分子としてクローニングされた。

【目 的】

TLR7 の応答を制御する新規分子の探索と解析によって、TLR7 依存的な炎症性疾患の克服を目指す。特に、WD40 リピート含有分子である WIPI3 について、機能の解析を行う。

【方 法】

Ba/F3 の WIPI3 を欠損させると、TLR7 の応答性が亢進する。この細胞に WIPI3 を強制発現させると、TLR7 の応答性が野生型と同程度に戻る。そこで、WIPI3 の各種変異体を WIPI3 が欠損した Ba/F3 細胞に発現させ、機能部位の同定を試みた。同時に、WIPI3 と共役する分子を欠損させることで、WIPI3 が TLR7 の応答を制御する際に必要な経路を特定した。

また、WIPI3 の生体内における機能を解析するため、WIPI3 のノックアウトマウスを作製して表現型を観察した。その際は、WIPI3 をコードする領域に sgRNA を 2 種類作製し、Cas9 タンパク質と受精卵にインジェクションすることで、WIPI3 の遺伝子領域を大きく欠損させる方法を採用した。

【結 果】

WIPI3 はフォスファチジルイノシトール 3 リン酸 (PtdIns3P) との結合能を持ち、mTORC1 シグナル経路でオートファジーの形成に関わることが示唆されている⁴⁾。そこで、PtdIns3P との結合に必要な 225 番目と 226 番目のアルギニンをアラニンに置換した変異体 (RR 変異体) を作製し、WIPI3 を欠損した Ba/F3 に強制発現させて応答を確認した。その結果、RR 変異体を強制発現させた Ba/F3 では応答性の低下が見られず、野生型 WIPI3 の機能である TLR7 の応答制御機構が失われていることが明らかとなった。また、WIPI3 は TSC1、TSC2、FIP200 との結合を介し、mTORC1 シグナルの制御を行っているとの報告がなされている⁴⁾。そこで我々は Ba/F3 の TSC1、TSC2、FIP200 を欠損させて応答を確認したが、WIPI3 の欠損で見られるような TLR7 の応答亢進は認められなかった。また、Ba/F3 にオートファジーフラックスを検出するプローブを導入し⁵⁾、WIPI3 ファミリーを欠損させて飢餓状態に置いたところ、WIPI1 ではオートファジーフラックスが阻害されたのに対し、WIPI3 ではオート

ファジーフラックスに影響は見られなかった。

次に、WIPI3 の欠損マウスを作製したところ、ホモ型の変異を持つマウスが得られた。このマウスは胎生致死にはならないが、出生後の成長が悪く、野生型と比較して概ね半分程度の体重にとどまることが明らかとなった。なお、TLR7 の応答亢進は、WIPI3 欠損マウスから誘導したマクロファージや樹状細胞においても細胞株と同様に見受けられた。

【考 察】

上記の結果から、WIPI3 による TLR7 の制御機構は PtdIns3P との結合に依存的であることが示唆された。その一方で、TSC1, TSC2, FIP200 との関連性は見られなかった。それぞれの作用点を mTORC1 からオートファジーにいたるカスケードで示すと、前者は mTORC1 シグナルの下流、後者は上流に位置する。このことから、WIPI3 が TLR7 の応答を制御する際は mTORC1 シグナルを介さずに、直接 PtdIns3P と結合して何らかの機能を持つものと考えられる。

なお、我々の試行では WIPI3 の欠損細胞においてオートファジーフラックスに影響が見られない。TLR7 とオートファジーとの関連性は示唆されているものの⁶⁾、WIPI3 による TLR7 の応答制御はオートファジー経路に非依存的な可能性がある。すなわち、WIPI3 と PtdIns3P との結合はオートファジーとは異なる細胞内移動に関わることで、TLR7 の応答性を制御していると考えられる。

WIPI3 欠損マウスについては、TLR7 が表現型の誘導に寄与しているかを確認する必要がある。今後は行動解析などによって WIPI3 欠損マウスの神経症状が反映するヒトの病態を確定すると同時に、WIPI3 と TLR7 との二重欠損マウスなどを作製し、表現型が緩和されるかを検討する。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

WIPI3 の変異による神経症状は、ヒトにおける家族性の疾患として最近報告された⁷⁾。本研究によって得られた WIPI3 欠損マウスの解析により、現在のところ脳性発育障害などに限られてはいるが、ヒトの症状を反映する表現型が得られていると考えられる。すなわち、外挿性の高い病態モデル動物として利用可能であると期待される。

【参考・引用文献】

1. Fukui, et al., *J. Exp. Med.* 2009
2. Fukui, et al., *Immunity* 2011
3. Fukui, et al., *J. Immunol.* 2016
4. Bakula, et al., *Nat. Commun.* 2017
5. Kaizuka, et al., *Mol. Cell* 2016
6. Delgado, et al., *EMBO J.* 2008
7. Suleiman, et al., *Clin. Genet.* 2018