

佐藤佳昌 論文内容の要旨

主 論 文

A Single Nucleotide Polymorphism in 3'-Untranslated Region Contributes to the Regulation of Toll-Like Receptor 4 Translation

(3'側非翻訳領域における一塩基多型は Toll-Like Receptor 4 翻訳調節に関与する)

佐藤佳昌、吉村篤利、金子高士、鶴飼孝、尾崎幸生、中村弘隆、
リー・シンユエ、松村浩禎、原宜興、小方頼昌

Journal of Biological Chemistry in press

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
主任指導教員：原 宜興 教授

緒 言

Toll-like receptor (TLR) 4 はリポ多糖 (LPS) 等を認識するパターン認識レセプターであり、炎症反応を惹起する。慢性歯周炎は歯周病原細菌により誘発される炎症性病変であり、その病原因子と TLR4 は関連していると考えられる。当教室の福崎らは、*TLR4* 遺伝子多型と慢性歯周炎の関連について解析し、3'側非翻訳領域 (3'-UTR) に存在する一塩基多型 (SNP) の一つ rs11536889 は、歯周病罹患率・重症度と関連していることを報告した。この SNP の C アレルは前立腺癌、ピロリ菌陽性患者における重度の胃粘膜萎縮、肝移植後の B 型肝炎再発および小児白血病の化学療法誘発性好中球減少症のリスク因子となることも報告されている。この研究では遺伝子多型 rs11536889 と TLR4 の発現量や機能との関連を調べることを目的とした。

対象と方法

健康状態に異常のない被験者の rs11536889 における遺伝子型をシーケンス法および PCR-CTPP 法により分類した。各遺伝子型間で年齢・性別の一致した対象者 (G/G、G/C、C/C 群) から末梢血単核球 (PBMC) を採取し、CD14⁺ (単球) 分画における TLR4 発現量をフローサイトメトリーで測定し、PBMC 全分画の TLR4mRNA 発現量を qRT-PCR 法で測定した。次に、G/G と C/C 群の PBMC を TLR2 リガンドの Pam₃CSK₄ で刺激した場合の、TLR4mRNA と TLR4 蛋白発現量の経時的変化を qRT-PCR 法とフローサイトメトリーで解析した。また、遺伝子発現調節における

rs11536889 遺伝子多型の直接的影響を調べるために、ルシフェラーゼ遺伝子上流に *TLR4* プロモーター、下流に G アレルまたは C アレルの rs11536889 を含む 3'-UTR 断片を挿入したコンストラクトを作製し、THP-1 細胞に遺伝子導入後、LPS または IL-6 で刺激し、ルシフェラーゼ活性を比較した。

マイクロ RNA (miRNA) は約 22 塩基の非コード RNA で、mRNA の 3'-UTR と結合して翻訳を抑制することが知られている。データベース上で G アレルの rs11536889 を含む領域は miR-1236 と miR-642a が結合することが予測されたため、これらの miRNA の影響についても検討した。THP-1 細胞を miR-1236 または miR-642a 阻害剤存在下で LPS もしくは IL-6 で刺激し、ルシフェラーゼ活性への影響を検討した。また、THP-1 細胞を miR-1236 および miR-642a 阻害剤存在下において LPS で刺激し、内在性 TLR4 蛋白発現量に与える影響をフローサイトメトリーで解析した。さらに、C アレルの rs11536889 領域と結合すると予想される miR-1236 および miR-642a の変異体を作製し、THP-1 細胞におけるルシフェラーゼ活性への影響を検討した。

結 果

単球表面の TLR4 発現量は C/C 群は G/G、G/C 群と比較して有意に多かったが、PBMC 中の TLR4mRNA 発現量に遺伝子型群間で有意差は認められなかった。また、PBMC を Pam₃CSK₄ で刺激すると、TLR4mRNA 発現量は G/G、C/C 群ともに増加したが、TLR4 蛋白発現量は C/C 群のみ増加した。THP-1 細胞を LPS または IL-6 で刺激すると、ルシフェラーゼ活性が上昇したが、G アレルの rs11536889 を含む 3'-UTR 断片は、これを抑制した。一方、C アレルの断片は、この活性を抑制しなかった。また、G アレルの断片により抑制されたルシフェラーゼ活性は、miR-1236 および miR-642a 阻害剤存在下で回復した。また、THP-1 細胞表面の TLR4 蛋白発現量は、miR-1236 および miR-642a 阻害剤により増加した。一方、C アレルの rs11536889 領域と結合する miR-1236 および miR-642a 変異体は、C アレルの rs11536889 を含む 3'-UTR 断片を挿入したコンストラクトのルシフェラーゼ活性を抑制した。

考 察

今回の実験から、rs11536889 遺伝子多型は miRNA の結合を介して、TLR4 の翻訳抑制に関与していることが示唆された。このことが、TLR4 蛋白の発現量に影響を与えることで、TLR4 リガンドに対する反応に違いをもたらしていると考えられる。rs11536889 における C/C 遺伝子型は、TLR4 リガンドに対する反応が促進されていると考えられ、過剰な炎症反応がもたらされることで、様々な疾患のリスク因子となりえているのではないかと予想される。