

博士論文

Functional analysis of Nogo in
nucleic acid-sensing TLR pathways

(核酸を認識する TLR 経路における Nogo の機能解析)

平成 26 年度

東北大学大学院生命科学研究科

生命機能科学専攻

木村 俊文

博士論文

Functional analysis of Nogo in
nucleic acid-sensing TLR pathways

(核酸を認識する TLR 経路における Nogo の機能解析)

東北大学大学院生命科学研究科生命機能科学専攻

(加齢医学研究所 遺伝子導入分野)

木村 俊文

要 約

自然免疫細胞による Toll-like receptor (TLR) を介した感染微生物由来物質の認識は、自然免疫応答の開始とそれに引き続く獲得免疫応答の惹起において極めて重要である。TLR はその局在性とリガンドの特性にもとづき、細胞表面 TLR と核酸認識 TLR に大別される。核酸認識 TLR は自己由来物質にも反応性があるため、その細胞内局在を厳密に制御することで過剰な炎症応答を回避する必要がある。TLR の局在制御では小胞体に局在するいくつかの膜分子が必須の役割を果たすが、その分子機構は不明な点が多い。本研究で着目した分子である Nogo-B は、小胞体膜貫通タンパク質として知られる reticulon ファミリーに属する reticulon 4 (Nogo) のアイソフォーム B であり、マクロファージなどの自然免疫細胞をはじめ広範な組織や細胞で発現する。Nogo の機能はそのアイソフォーム A (Nogo-A) の神経系における機能に注目して解析が進められ、神経軸索の伸長を阻害する作用があることが明らかになっている。Nogo-B の機能はほとんど知られていないが、reticulon ファミリーの分子が受容体やトランスポーターの輸送に関与すると報告されており、Nogo-B も細胞内の物質輸送に関わる可能性がある。当研究室は抑制性免疫受容体である Paired immunoglobulin-like receptor B (PirB) を同定し、核酸認識 TLR の一つである TLR9 下流のシグナル経路を PirB が抑制的に制御することを報告した。一方で Nogo-A は PirB 依存的に軸索伸長阻害機能を発揮すると報告されたため、免疫系では Nogo-B が PirB と相互作用して TLR 応答制御に関与する可能性がもたれた。そこで本研究では、Nogo-B の TLR 経路における機能を検討するため、Nogo 欠損マウス及びマクロファージを用いて検討を行った。Nogo 欠損マクロファージでは細胞表面 TLR 応答は正常であったが、核酸認識 TLR の活性化によって誘導されるシグナル経路と炎症性サイトカイン産生が著明に減弱していた。同様に Nogo 欠損マウスは核酸刺激に対して応答不全を示した。核酸認識 TLR は細胞内のエンドリソソームでリガンドを認識するため、核酸リガンドの細胞内への取り込みとエンドリソソームへの輸送、及び TLR のエンドリソソームへの局在が下流のシグナル経路の活性化に必須である。Nogo 欠損マクロファージでは核酸リガンド取り込み能力とそのエンドリソソームへの輸送は野生型細胞と同等であった。しかし TLR9 の細胞内局在を解析したところ、そのエンドリソソームへの分布が Nogo 欠損細胞では低下していたことから、Nogo は核酸認識 TLR の輸送を促進すると示唆された。マクロファージにおいて Nogo-B の強い発現が認められるのとは対照的に Nogo-A や Nogo-C の発現はほとんど検出されないことから、TLR の輸送制御に関わるのは Nogo-B であるといえる。続いてその制御機構の解明

を試みたが、当初想定したマクロファージにおける Nogo-B と PirB の相互作用は見出せなかった。そのため Nogo-B に結合する分子の網羅的探索を行い、新規 Nogo-B 結合タンパク質として Gram domain containing 4 (GRAMD4)を得た。GRAMD4 の生理的機能はほとんど報告がないが、GRAMD4 がノックダウンされた細胞では核酸刺激に対する応答が亢進する一方、過剰発現によって応答は抑制された。すなわち GRAMD4 は核酸認識 TLR 経路の負の制御因子であると明らかになった。さらに GRAMD4 が TLR 刺激に伴い発現上昇することや、小胞体からゴルジ体への小胞輸送に関与する small GTPase である Rab1A が GRAMD4 と結合することを見出した。Rab ファミリーの分子による TLR の局在制御機構の存在が既に知られており、GRAMD4 が Rab1A に結合して TLR の輸送を抑制する一方で、Nogo-B が GRAMD4 に会合してその抑制機能を阻害すると示唆された。しかし TLR 刺激によって発現誘導された GRAMD4 は Nogo-B による阻害から逃れ、核 TLR のエンドリソソームへの輸送を遮断することで炎症応答を終息させると考えられる。本研究では、Nogo-B と GRAMD4 の免疫細胞における機能をはじめて報告するとともに、核酸認識 TLR の細胞内局在が両者の相互作用に依存して調節される可能性が示された。

目 次

第 1 章 研究背景と目的	1
第 2 章 材料と方法	4
2.1 実験動物	4
2.2 実験材料	4
2.3 プラスミド	5
2.4 細胞培養	5
2.5 レトロウイルスの調製と感染	6
2.6 TLR リガンド投与とマウスのサイトカイン応答	6
2.7 Nogo-B の免疫沈降と結合因子の同定	6
2.8 イムノプロット解析	7
2.9 定量リアルタイム PCR	7
2.10 フローサイトメトリー	9
2.11 CpG-B の取り込みと局在解析	9
2.12 RNA 干渉実験	9
2.13 ルシフェラーゼレポーター解析	10
2.14 共焦点レーザー顕微鏡観察	10
2.15 統計処理	11
第 3 章 研究結果	12
3.1 免疫細胞における Nogo アイソフォーム発現パターンの検討	12
3.2 Nogo-A/B 欠損マクロファージの機能解析	12
3.3 マクロファージの TLR 応答における Nogo-B の関与の検討	13
3.4 マウスのサイトカイン応答における Nogo の機能の検討	14
3.5 核酸リガンドの取り込み能力と細胞内局在観察	14
3.6 TLR9 の細胞内局在解析	15
3.7 Nogo-B 結合分子の探索による GRAMD4 の同定と機能解析	16
3.8 Nogo-B と GRAMD4 を介した核酸認識 TLR 経路制御機構の検討	18
第 4 章 考察	20
第 5 章 結論	23
謝辞	24
引用文献	25
図の説明	31
図	37

第1章 研究背景と目的

自然免疫は細菌、ウイルス、真菌といった病原体の侵入を認識して炎症反応を誘起し、それに引き続く獲得免疫の誘導に不可欠な生体防御機構である。自然免疫細胞は外来微生物の構成成分に特異的に見られる分子構造を、パターン認識受容体によって認識している。パターン認識受容体はその進化的起源から Toll-like receptor (TLR)、retinoic-acid-inducible protein I (RIG-I)-like receptor (RLR)などのいくつかのグループに大別されるが、中でも TLR は最もよく研究されてきた受容体群である(Takeuchi and Akira, 2010; Kawai and Akira, 2010)。これまでにヒトでは 10 種類、マウスでは 12 種類の TLR 分子の存在が明らかになっている(Akira et al., 2006; Barton and Kagan, 2009; Kawai and Akira, 2010)。TLR はいずれも一回膜貫通型タンパク質であるが、それらがリガンドを認識する場には違いがあり、細胞膜上でリガンドを認識する細胞表面 TLR (TLR4、TLR2/1、TLR2/6 など) と細胞内のコンパートメントであるエンドソームやリソソーム(エンドリソソーム)でリガンドを認識する細胞内 TLR (TLR9、TLR3、TLR7 など)の2つのグループが存在する。各グループ内ではリガンドの物質特性にもある程度共通性があり、TLR4 がリポ多糖を、TLR2/1 や TLR2/6 がリポタンパク質を認識する一方、TLR9 は DNA を、TLR3 や TLR7 は RNA を認識する。特に細胞内 TLR の既知の生理的リガンドは全て核酸であるため、これら細胞内 TLR は核酸認識 TLR と呼ぶことができる。細胞内局在リガンドは異なるものの、リガンドを認識して活性化した後の細胞内シグナル伝達機構は2つのグループ間でも共通性が高く、リガンド依存的に TLR の細胞質側ドメインに集合する MyD88 あるは TRIF を必須のアダプター分子として下流にシグナルを伝達し、nuclear factor- κ B (NF- κ B)及び MAP kinase の活性化を介してサイトカイン、ケモカインといった炎症性遺伝子や抗体遺伝子の発現を誘導する(O'Neill and Bowie, 2007; Kawai and Akira, 2007; Takeuchi and Akira, 2010) (Figure 1)。TLR に関する研究は、これまで分子のクローニング、リガンドの探索、会合するシグナル伝達分子の同定及び機能解析を中心に精力的に進められてきた。

細胞表面 TLR のリガンドが宿主には存在しない病原微生物特異的な分子である一方、核酸認識 TLR は DNA や RNA といった種間で保存された構造を認識するため、自己由来の分子によって TLR が活性化する可能性を排除できない。実際に、自己免疫疾患の一つである全身性エリテマトーデスでは自己由来の核酸に対する TLR7 や TLR9 の異常応答が病態形成に関わるとされている(Barrat et al., 2005; Rahman and Eisenberg, 2006)。これらの疾患では炎症に伴って発生する細胞死から放出された核酸が抗原とし

て免疫細胞に認識され、自己抗体の産生を促進することで病態を悪化させている。核酸認識 TLR は感染防御に重要な反面、自己由来リガンドに応答性があるため、その細胞内局在は厳密に制御される必要がある (Kagan, 2012)。核酸認識 TLR の中でも TLR9 は詳細に研究されてきた分子であるが、定常状態の細胞では TLR9 は生合成の場である小胞体に未成熟型で留まっており、リガンドとなる DNA が細胞に取り込まれることでエンドリソソームへと輸送され、N 末端側の切断を受けた成熟型になった後にリガンド認識と下流のシグナル経路の活性化が可能になるとされてきた。TLR3 や TLR7 も同様の機構で局在制御を受けるとされ、これらの制御に不可欠な因子として Unc93 homolog B1 (Unc93B1) が同定された (Tabeta et al., 2006; Brinkmann et al., 2007; Kim et al., 2008; Fukui et al., 2009)。Unc93B1 は小胞体に局在する膜貫通タンパク質であり、核酸認識 TLR との直接結合が TLR の成熟とエンドリソソームへの移行に必須である。しかしながら、Unc93B1 による TLR の輸送の制御における分子機構は未だ明らかではない。小胞体分子による自然免疫制御は上述の Unc93B1 がその好例であるが、同様に小胞体に局在し、細胞表面 TLR を含む TLR ファミリー全体のシャペロニングを担う分子として gp96 (Yang et al., 2007) や protein associated with TLR4 A (PRAT4A) (Takahashi et al., 2007) が知られている。また、小胞体膜上で自然免疫受容体シグナルを直接制御する分子として、stimulator of interferon genes (STING) が挙げられる (Ishikawa and Barber, 2008; Ishikawa et al., 2009)。STING は RLR がそのリガンドである細胞質中の遊離核酸を認識することで生成されるセカンドメッセンジャー(cyclic GMP-AMP)と直接結合し、下流のシグナル分子を活性化するために必須の分子である (Wu et al., 2013; Sun et al., 2013)。このように、リガンド認識の場である細胞膜やエンドライソソームに局在する受容体、あるいはパターン認識受容体下流のシグナル伝達分子のみならず、小胞体に存在する膜タンパク質が自然免疫応答に非常に重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。

reticulon (RTN) ファミリーに属する分子は小胞体(endoplasmic reticulum)に局在性を示す膜貫通タンパク質であり、C 末端側に機能未知の reticulon-homology domain (RHD) を共通して持つ (Oertle and Schwab, 2003)。ほとんどの真核生物が reticulon 遺伝子を持ち、哺乳類では reticulon 1 から 4 までの 4 つの遺伝子が同定されている。それらの機能については不明な点も多いが、受容体やトランスポーターの局在制御に関与しているとの報告がある (Wakana et al., 2005; Liu et al., 2008; Lee et al., 2011)。本研究で我々が着目した分子である reticulon 4 (RTN-4) は中枢神経系における軸索伸長の阻害因子として見出され (Chen et al., 2000; GrandPré et al., 2000)、明らかになったその機能にもとづき、neurite outgrowth inhibitor (Nogo) と命名された。RTN-4 遺伝子からはプロモーターやスプライシング様式の違いにより主に 3 つの遺伝子産物 (Nogo-A、-B、-C) がアイソフォーム

として発現する(Oertle and Schwab, 2003)。Nogo-B が全身の組織で普遍的に発現する一方、Nogo-A は神経系でのみ、Nogo-C は神経と骨格筋のみで発現すると報告されている(Oertle and Schwab, 2003)。Nogo-A/B/C 全てを欠損するマウスは胎生致死であるものの、Nogo-A/B 欠損マウスは正常に出生し成長する。Nogo-A に関するこれまでの研究から、神経系では Nogo-A がオリゴデンドロサイトの細胞膜表面に発現し、神経細胞の軸索伸長を抑制するとされる(GrandPré et al., 2000; Huber et al., 2002)。その機構にはエフェクターとしての Nogo-結合分子が必要であると示唆され、探索の結果 Nogo receptor 1 (NgR1) が同定された(Fournier et al., 2001)。NgR1 は神経細胞の細胞膜上で LINGO1、p75、TROY などの他の分子と会合し、細胞質中カルシウム濃度の上昇と small GTPase である RhoA の活性化を誘導することで軸索の伸長を阻害する(Yiu and He, 2006; Nash et al., 2009)。

近年、Nogo-A の軸索伸長阻害機構について新たな知見が他のグループからもたらされ、当研究室が同定した抑制性免疫受容体である Paired immunoglobulin-like receptor B (PirB) (Hayami et al., 1997; Kubagawa et al., 1997)に Nogo-A が結合することにより神経細胞に抑制シグナルを伝達しうることが示された (Atwal et al., 2008)。PirB は B 細胞、樹状細胞、マクロファージといった骨髄系免疫細胞に発現しており、特に自然免疫細胞には高発現が認められ、その抑制性シグナルの伝達は脱リン酸化酵素である SHP-1 によって発揮されるとされている(Ho et al., 1999; Maeda et al., 1999; Kubo et al., 2009)。当研究室が作製した PirB 欠損マウスやそれに由来する細胞は Th2 型免疫応答の亢進や樹状細胞の成熟異常などを示すことに加えて、TLR9 刺激に対して過剰応答することが明らかになっている(Kubo et al., 2009)。マウス腹腔に在住する B 細胞集団である B-1 B 細胞は弱い自己反応性を持つ自己抗体を恒常的に産生しており、B-1 B 細胞が PirB を欠損することで TLR9 リガンドに対する応答が亢進し、自己抗体の過剰産生と自己免疫疾患発症のリスクが高まる。PirB との結合に必要な Nogo の配列は RHD 内に 2 か所ある膜貫通領域に挟まれた 66 アミノ酸から構成される領域であり、Nogo-66 と呼ばれる。当研究室の解析により、ペプチド化された Nogo-66 は PirB と高親和性を持つこと、及び Nogo-66 は PirB との結合を介してマスト細胞の TLR 応答を抑制しうることが明らかになった(Matsushita et al., 2011)。また他のグループが行った炎症応答における Nogo の機能解析から、肺上皮細胞に発現する Nogo-B が肺の Th2 型炎症応答を(Wright et al., 2010)、血管内皮細胞の Nogo-B が炎症部位への免疫細胞への浸潤を制御すること(Di Lorenzo et al., 2011)が報告されたが、免疫細胞における Nogo の機能はほとんど解明されていない。本研究では、自然免疫応答における Nogo の機能を究明するため、Nogo-A/B 欠損 (*nogo-A/B*^{-/-}) マウスを利用し、Nogo を高発現するマクロファージの TLR 応答に着目して解析を行った。

第2章 材料と方法

2.1 実験動物

C57BL/6 (B6)マウスは日本クレア株式会社(Shizuoka, Japan)から購入した。Nogo-A/B 欠損(*nogo-A/B^{-/-}*)マウスは Yale University の Stephen M. Strittmatter 博士より分与された。TLR9 欠損(*Tlr9^{-/-}*)マウスはオリエンタルバイオサービス(Kyoto, Japan)より購入した。

全てのマウスは東北大学加齢医学研究所附属動物実験施設において、specific-pathogen free (SPF)環境下で飼育、管理し、東北大学における動物実験等に関する規定にもとづき、東北大学加齢医学研究所動物実験委員会で承認された方法で行った。また全ての実験には8週齢から14週齢のマウスを用いた。

2.2 実験材料

Poly(I:C) (LMW)、R837 (Imiquimod)、Pam3CSK4 及び FSL-1 は Invivogen (San Diego, CA) から購入した。Nuclease-stable phosphorothioate-modified CpG-B 1826 (5'-TCCATGACGTTTCCTGACGTT-3')は北海道システム・サイエンス株式会社(Sapporo, Japan)から購入した。Cy5 標識された CpG-B 1826 及び Alexa Fluor 647 標識された CpG-B 1826 は株式会社日本遺伝子研究所(Sendai, Japan)及び株式会社日本バイオサービス(Saitama, Japan)からそれぞれ購入した。蛍光標識マイクロビーズ(Fluoresbrite YG Microspheres, 1.00 µm)は Polysciences (Warrington, PA)から購入した。LPS、Polybrene、biotin 標識 anti-FLAG-M2 抗体、agarose-conjugated anti-FLAG-M2 抗体及び anti-β-actin 抗体は Sigma-Aldrich から購入した。anti-Nogo-A/B 抗体は Imgenex (San Diego, CA)から購入した。anti-Myc (#2278)、anti-IκB-α (#9242)、anti-phospho-p38 (#9211)、anti-p38 (#9212)、anti-phospho-ERK1/2 (#4370)、anti-phospho-STAT1 (#9171)、及び anti-STAT1 (#9172)抗体は Cell Signaling Technology (Beverly, MA)から購入した。anti-IRAK1 (H-273)、anti-TRAF6 (H-274)、及び anti-ERK2 (K-23) 抗体は Santa Cruz (Santa Cruz, CA)から購入した。anti-MyD88 抗体は QED Bioscience (San Diego, CA)から購入した。Polyclonal anti-PirB 及び anti-PRAT4A 抗体は R&D Systems (Minneapolis, MN)から購入した。horseradish peroxidase (HRP)標識された anti-rabbit IgG 及び anti-mouse IgG は Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, U.K.)から購入した。monoclonal anti-PirA/B (clone 6C1)及び PE 標識された anti-mouse CD11b (clone M1/70)抗体は BD Biosciences から購入した。Alexa Fluor 647 標識された anti-mouse F4/80 (clone A3-1)、PE 標識された anti-mouse TLR4 (clone

MTS510)、PE 標識された anti-mouse IgG (Poly4053)及び Alexa Fluor 647 標識された anti-mouse LAMP1 (clone 1D4B)抗体は Biolegend (San Diego, CA)から購入した。monoclonal anti-TLR9 (clone B33A4 及び J15A7)は東京大学の三宅健介教授より分与された。

2.3 プラスミド

N 末端 FLAG タグベクター pFF6-FLAG 及び N 末端 Myc タグベクター pEF6-Myc は pEF6/V5-His (nvitrogen, San Diego, CA)のタグ領域を FLAG 配列、あるいは Myc 配列に置き換えることで作製した。pEGFP-N3 は Clontech (Palo Alto, CA)から、pTagRFP-C は Evrogena (Moscow, Russia)からそれぞれ購入した。マウス Nogo-B2、GRAMD4、Rab1A、LRCH4 各発現ベクターは、C57BL/6 マウス由来の cDNA を鋳型として PCR で増幅した各遺伝子を pFF6-FLAG あるいは pEF6-Myc のクローニングサイトにそれぞれ挿入することで作製した。C 末端 enhanced green fluorescent protein (eGFP)融合 Nogo-B2、及び C 末端 red fluorescent protein (RFP)融合 GRAMD4 発現ベクターは、マウス cDNA を鋳型として増幅した各遺伝子を pEGFP-N3 あるいは pTagRFP-C のクローニングサイトにそれぞれ挿入することで作製した。C 末端に GFP を融合させたマウス TLR9 (TLR9-GFP)を発現させるためのレトロウイルスベクター pMX-IRES-rCD2-TLR9-eGFP は、マウス由来の cDNA を鋳型として増幅した TLR9 遺伝子を pEGFP-N3 にサブクローニングし、TLR9-eGFP 融合配列を Bgl II 及び Not I サイトを用いて pMX-IRES-rCD2(東京大学の北村俊雄教授が開発した pMX-IRES-GFP を九州大学の山崎晶教授が改変し、信州大学の瀧伸介から譲与されたもの)のクローニングサイトに挿入することで作製した。NF- κ B レポータープラスミド pELAM1-Luc はヒト E-selectin 遺伝子の+30 から-52 までの配列を pGL3-Basic (Promega Corp., Madison, WI)に挿入することで作製した(Schindler and Baichwal, 1994)。

2.4 細胞培養

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 は ATCC (Manassas, VA)から、ヒト胎児由来腎臓上皮 293T 細胞株は RIKEN Cell Bank (Tsukuba, Japan)からそれぞれ購入し、10% fetal calf serum (FCS)、0.1 U/ml ペニシリン、0.1 μ g/ml ストレプトマイシンを添加した DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)中で、37°C 5% CO₂ の条件下で培養した。骨髄由来マクロファージ(bone marrow-derived macrophages; BMMs)は以下のように調製した。マウス大腿骨及び脛骨から採取した骨髄細胞を溶血処理した後、10% FCS、0.1 U/ml ペニシリン、0.1 μ g/ml ストレプトマイシン、20 ng/ml M-CSF (PeproTech, Rocky Hill, NJ)を

添加した DMEM に 1.0×10^6 cells/ml の細胞密度で播種した。37°C 5% CO₂ の条件下で培養しつつ、培養 4 日目に培地交換を行い、計 7 日間培養して得られた接着細胞を BMM として用いた。マウス胎児繊維芽細胞(mouse embryonic fibroblasts; MEFs)は以下のように調製した。妊娠 14.5 日目の野生型マウスから胎児を取り出し、頭部と内蔵を除去し、鋏で細かく刻んだ。遊離した細胞を 10% FCS、0.1 U/ml ペニシリン、0.1 µg/ml ストレプトマイシン、2 mM GlutaMAX、1 mM ピルビン酸ナトリウム及び非必須アミノ酸を添加した DMEM 中で 2 日間培養し、接着細胞をトリプシン/EDTA 処理によって回収して継代した。不死化 MEF を得るため、増殖速度が安定するまで継代を続けた。

2.5 レトロウイルスの調製と感染

TLR9-GFP を BMM に発現させるため、レトロウイルスを用いた遺伝子導入を行った。まず、上述の pMX-IRES-rCD2-TLR9-eGFP をレトロウイルスパッケージセルライン Plat-E (Cell Biolabs, San Diego, CA) にリポフェクション試薬(Lipofectamine LTX, Invitrogen)を用いて一過性に導入した。48 時間の培養の後、レトロウイルスを含む培養上清を回収し、0.45 µm フィルターで濾過して細胞残渣を除去した。BMM へウイルスを感染させるため、BMM への誘導 2 日目の骨髓細胞を 20 ng/ml MCS-F、8 µg/ml の Polybrane (Sigma-Aldrich) を添加したウイルスを含む培養上清中で 37°C 5% CO₂、12 時間培養した。ウイルスを含む培地を除去した後、通常の培地中で 5 日から 7 日間培養し、実験に用いた。レトロウイルスの調製及び使用実験は、東北大学遺伝子組換え実験安全管理規定にもとづき、東北大学加齢医学研究所内の P2 レベル実験室において行った。

2.6 TLR リガンド投与とマウスのサイトカイン応答

13 週齢から 14 週齢の野生型及び *nogo-A/B*^{-/-} の雌マウスに、体重 1 kg あたり 5 mg の poly(I:C)、15 mg の LPS またはネガティブコントロールとして生理食塩水を腹腔内投与した。投与 3 時間後にマウスを CO₂ ガスで安楽死させ、採血を行った。血液から血清を分離し、血清中の IL-6 及び IL-12p40 の濃度を ELISA キット(Biolegend)によって測定した。

2.7 Nogo-B の免疫沈降と結合分子の同定

RAW264.7 に pEF6-FLAG-Nogo-B2 をトランスフェクションし、5 µg/ml blasticidin S (Sigma-Aldrich) でセレクションすることで FLAG-Nogo-B2 安定発現細胞株 (RAW-FLAG-Nogo-B) を樹立した。RAW-FLAG-Nogo-B 及びネガティブコントロールとしての RAW264.7 を lysis buffer [0.75% Brij 97, 50 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl 及び

10% glycerol]を用いて protease 阻害剤(Sigma-Aldrich)及び phosphatase 阻害剤(Roche, Mannheim, Germany)の存在下で溶解させた。細胞溶解液は 4°C で 30 分転倒混和させた後、12,000 g で 10 分間遠心し、沈殿物を除去した上清を以降のサンプルとして用いた。細胞溶解液上清はマウス IgG アガロースビーズ(Sigma-Aldrich)と 4°C で 2 時間反応させてプレクリアを行い、遠心処理によって得られた上清を anti-FLAG-M2 アガロースビーズ(Sigma-Aldrich)と 4°C で 4 時間反応させた。ビーズは PBS で洗浄した後、100 mM glycine-HCl (pH 2.7)と反応させて結合タンパク質を溶出させた。溶出液中の Nogo-B2 会合タンパク質を同定するため、株式会社医学生物学研究所(Nagoya, Japan)が提供する、iTRAQ 法によるタンパク質の網羅的な比較定量解析サービスを利用して質量分析を行った。まず先述の溶出液を限外濾過で濃縮し、50 mM trimethylaluminum acetate バッファーへバッファー置換を行い、BCA Protein assay kit (Pierce, Rockford, IL)を用いてタンパク質濃度を測定した。還元剤と cysteine blocking reagent を加えた後、30 µg の溶出タンパク質を含む溶液をトリプシン処理した。トリプシン消化ペプチドは定量解析に用いる安定同位体標識キット iTRAQ Reagents-4Plex kit (AB SCIEX, Framingham, MA)でラベルし、脱塩の後に AB SCIEX CEX columns によって 8 フラクションに分画した。iTRAQ でラベルされた各分画のペプチドは逆相液体クロマトグラフィー(DiNa System, KYA TECH, Tokyo, Japan)と質量分析器(TripleTOF 5600, AB SCIEX)を用いて解析した。

2.8 イムノブロット解析

BMM は lysis buffer [1% NP-40, 20 mM Tris-HCl (pH 7.3), 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, and 10% glycerol]を用いて protease 阻害剤と phosphatase 阻害剤の存在下で溶解させた。細胞溶解液は遠心によって核を除去し、その上清をサンプルとして以降の処理に用いた。変性後のサンプルは sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gelelektrophorese (SDS-PAGE)によって分離し、タンパク質を PVDF 膜に転写した。PVDF 膜は標的分子の特異的抗体と反応させた後、HRP 標識された二次抗体と反応させ、ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Piscataway, NJ)を加えて発光させた。画像は LAS-4000 mini image analyzer (FUJIFILM, Tokyo, Japan)を用いて取得し、解析を行った。

2.9 定量リアルタイム PCR

細胞からの RNA は抽出 RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA)を用いて行い、cDNA への逆転写反応には ReverTra Ace (Toyobo, Osaka, Japan)を使用した。SYBR GreenER qPCR SuperMix (Invitrogen)と CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA)を用いて、得られた cDNA を鋳型として増幅反応を行った。各遺

伝子発現量の定量には、遺伝子の cDNA 領域を挿入し、直鎖状にしたプラスミドベクターを段階希釈したものを定量のコントロールとして使用した。各遺伝子の増幅に用いたプライマーの配列は、以下に示した。

<i>nogo-A</i> ,	forward,	5'-GCAGAGCTGAATAAACTTCAG-3',
	reverse,	5'-GTTCACATGACCAAGAGCAG-3',
<i>nogo-B</i> ,	forward,	5'-GCAGGGGCTCGGGCTCAGTG-3',
	reverse,	5'-GTTCACATGACCAAGAGCAG-3',
<i>nogo-C</i> ,	forward,	5'-ATCAGAAGAAACGTTGGAAGG-3',
	reverse,	5'-GTTCACATGACCAAGAGCAG-3',
<i>Il-6</i> ,	forward,	5'-CCACGGCCTTCCCTAC-3',
	reverse,	5'-AGTGCATCATCGTTGTTC-3',
<i>Tnf</i> ,	forward,	5'-AAAATTCGAGTGACAAGCCTGTAG-3',
	reverse,	5'-CCCTTGAAGAGAACCTGGGAGTAG-3',
<i>Il-12b</i> ,	forward,	5'-TGGTTTGCCATCGTTTTGCTG-3',
	reverse,	5'-ACAGGTGAGGTTCACTGTTTCT-3',
<i>Il-1b</i> ,	forward,	5'-GCAACTGTTCTGAACTCAACT-3',
	reverse,	5'-ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT-3',
<i>Il-10</i> ,	forward,	5'-GCTCTTACTGACTGGCATGAG-3',
	reverse,	5'-CGCAGCTCTAGGAGCATGTG-3',
<i>Cxcl1</i> ,	forward,	5'-ACTGCACCCAAACCGAAGTC-3',
	reverse,	5'-TGGGGACACCTTTTAGCATCTT-3',
<i>Ifnb</i> ,	forward,	5'-CAGCTCCAAGAAAGGACGAAC-3',
	reverse,	5'-GGCAGTGTA ACTCTTCTGCAT-3',
<i>Unc93b1</i> ,	forward,	5'-GGCTCCCTTGACGAACTC-3',
	reverse,	5'-CACGTTCTTGACCACTCCGAG-3',
<i>Gramd4</i> ,	forward,	5'-CTCCCCGTCATGTCCAGGTG-3',
	reverse,	5'-CTGTTGAAGTCCTGCACGC-3',
<i>Lrch4</i> ,	forward,	5'-GTCCAACCGGCGTTTGAAG-3',
	reverse,	5'-GGGTGATGTCTGACAAGTCGT-3',
<i>Hprt1</i> ,	forward,	5'-TCAGTCAACGGGGACATAAA-3',
	reverse,	5'-GGGGCTGTACTGCTTAACCAG-3'

2.10 フローサイトメトリー

解析に用いた細胞はマウス腹腔及び BMM から調製した。腹腔細胞は氷冷 PBS で腹腔内を洗浄することで回収した。単離した細胞は染色バッファー(2% FCS を含む氷冷 PBS)に懸濁し、anti-CD16/32 (clone 2.4G2)と反応させて Fc 受容体をブロックした。続いて各分子に対する特異的抗体と染色バッファー中で反応させた。死細胞はデータ解析の際にゲーティング処理し、解析対象から除外した。細胞内 TLR9 の染色と発現量解析は、PFA で固定し細胞膜透過処理した BMM を用いて、anti-mouse TLR9 (clone B33A4) と PE 標識された anti-mouse IgG 抗体を使用して、既に報告されている手法に従って行った(Onji et al., 2013)。染色した細胞のデータはフローサイトメーター(FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA)を用いて取得し、FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR)によって解析した。

2.11 CpG-B の取り込みと局在解析

CpG-B の取り込み能力の解析のため、BMM を 24-well プレートに 1.25×10^5 cells/well の密度で播種し、Cy5 標識した CpG-B で 10 分間刺激した。BMM を洗浄した後 trypsin 処理により回収し、フローサイトメーターで Cy5 の蛍光強度を測定した。CpG-B の細胞内局在の解析は以下のように行った。CpG-B と初期エンドリソソームマーカー (Rab5)の共局在解析のため、BMM は $0.5 \mu\text{M}$ CpG-B-Cy5 で 10 分間刺激し、洗浄後に 4% paraformaldehyde (PFA)と室温で 15 分間処理し、固定した。固定した細胞は 0.2% Triton X-100 と室温で 5 分間反応させ透過処理し、1% BSA/PBS で 30 分間ブロッキングした。さらに 1% BSA/PBS 中で anti-Rab5 antibodies (#2413, Cell Signaling Technology, Beverly, MA)と室温で 1 時間反応させた後、1% BSA/PBS 中で Alexa Fluor 488 標識された二次抗体(Invitrogen)と室温で 1 時間反応させた。CpG-B とリソソームの共局在の解析のため、BMM は Alexa Fluor 647 標識された $0.2 \mu\text{M}$ CpG-B と LysoTracker Red DND-99 (Invitrogen) で 1 時間刺激し、洗浄後に固定せずにデータを取得した。画像データの取得と解析には共焦点レーザー走査型顕微鏡(Fluoview FV1000, Olympus, Tokyo, Japan)を使用した。

2.12 RNA 干渉実験

内在性の遺伝子を発現抑制するため、マウス *Gramd4* と *Lrch4* の cDNA 配列を標的とした siRNA オリゴヌクレオチドによる RNA 干渉法を用いた。各遺伝子に対する siRNA とネガティブコントロール siRNA は Dharmacon (Lafayette, CO) から購入した。RAW264.7は抗生物質を含まない培地を用いて 5.0×10^5 cells/well の密度で 6-well プレー

トに播種し、BMM は抗生物質を含まない培地を用いて 7.5×10^4 cells/well の密度で 48-well プレートに播種した。siRNA のトランスフェクションは Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen)を用いて行い、遺伝子発現抑制の効率は siRNA 導入の 48 時間から 60 時間後に細胞から RNA を抽出し、mRNA 発現量をリアルタイム PCR で定量することによって確認した。

2.13 ルシフェラーゼレポーター解析

RAW264.7 は抗生物質を含まない培地を用いて 1.0×10^6 cells/well の密度で 6-well プレートに播種し、Lipofectamine LTX を用いて発現ベクター及びレポータープラスミド(pELAM1-Luc 及び pGL4.74-TK-Luc)をトランスフェクションした。36 時間後、細胞を 48-well プレートに再播種し、さらに 12 時間培養した。細胞に 6 時間の刺激を加えた後、passive lysis buffer (Promega)で細胞を溶解し、溶解液 10 μ l あたり 50 μ l ずつの Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega Corp., Madison, WI)の反応液を加え、ルシフェラーゼ活性の測定と解析を LMAX II384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)と SoftMax Pro v5 (Molecular Devices)を用いて行った。pELAM-Luc から発現したホタルルシフェラーゼの活性は pGL4.74 ベクター(Promega)由来のウミシイタケルシフェラーゼの活性を内部コントロールに用いて補正した。

2.14 共焦点レーザー顕微鏡観察

Nogo-B と GRAMD4 の細胞内局在の解析は、蛍光タンパク質を融合させたそれぞれのタンパク質を MEF に一過性に発現させることで行った。MEF は 8.0×10^4 cells/well の密度で 6-well プレートに播種し、Nogo-B2-GFP または GRAMD4-TagRFP 発現ベクターを Xfect transfection reagent (Takara, Otsu, Japan)を用いてトランスフェクションした。翌日、細胞を μ -Dishes (ibidi GmbH, Munich, Germany)に再播種し、さらに 24 時間培養した。小胞体を染色するため、MEF を BODIPY-FL または BODIPY-TR 標識された ER-Tracker (Invitrogen)を含む HBSS 中で反応させた。染色後、MEF は 4% PFA で 2 分間処理して固定した。TLR9-GFP とリソソームの共局在の解析のため、TLR9-GFP を発現する BMM を μ -Dishes に播種し、その翌日に 60 nM LysoTracker Red DND-99 と 1 時間反応させてリソソームを染色した。内在性 TLR9 の染色とリソソームの標識は anti-mouse TLR9 (clone J15A7)、Alexa Fluor 488 標識された anti-mouse IgG 抗体及び Alexa Fluor 647 標識された anti-LAMP1 抗体を用いて、既に報告されている手法(Onji et al., 2013)に従って行った。画像データの取得と解析には共焦点レーザー走査型顕微鏡 Fluoview FV1000 を使用した。

2.15 統計処理

統計処理には Student *t*-test を用いた。 $p < 0.05$ の場合、統計的に有意である判定した。

第3章 研究結果

3.1 免疫細胞における Nogo アイソフォーム発現パターンの検討

Nogo のアイソフォーム B (Nogo-B)が免疫系を含む広範な組織や細胞で普遍的に発現する一方、Nogo-A の発現は神経系組織に限られるとされる。本研究ではまず、Nogo-A/B 特異的抗体を用いて、神経系とマクロファージにおける Nogo アイソフォームの発現パターンを解析した(**Figure 2A**)。マウスの脳組織サンプルのウェスタンブロット解析の結果、神経系では Nogo-A 及び Nogo-B のバンドが確認できる。これらのバンドは Nogo-A/B 欠損マウス由来のサンプルでは検出されないことから、抗体は内在性の Nogo-A 及び Nogo-B を特異的に認識していると判断できる。一方でマクロファージ由来のサンプルでは、Nogo-B の高発現が確認できるものの、Nogo-A のバンドは検出されなかった。mRNA レベルでの各 Nogo アイソフォームの発現を検討するため、野生型マウスの脳組織及びマクロファージ由来の cDNA を用いて、各アイソフォームを区別して増幅できるプライマーを使用してリアルタイム PCR 解析を行った(**Figure 2B**)。その結果、これまでの報告通り、脳では Nogo-A、B、C 全てのアイソフォームの発現が確認されたが、BMM においては Nogo-B が強く発現しているものの、Nogo-C の発現は検出されず、Nogo-A の発現も Nogo-B と比較して極めて低いレベルであった。マウスの Nogo-B には、19 アミノ酸残基分の長さが異なる Nogo-B1(分子量約 42 kDa)と Nogo-B2(分子量約 46 kDa)が存在すると報告されている(Oertle et al., 2003; Yu et al., 2009)。アイソフォーム B1 と B2 の発現パターンを種々の免疫細胞で検討するため、野生型マウスの脾臓細胞及び単離した脾臓由来の T 細胞、B 細胞、骨髄由来の樹状細胞 (bone-marrow derived dendritic cells; BMDCs)及びマクロファージにおける Nogo-B の発現をウェスタンブロットで検討した(**Figure 2C**)。Nogo-B は解析した免疫細胞全てで発現していたが、B 細胞、樹状細胞、マクロファージといった骨髄系免疫細胞で強い発現が認められた。特にマクロファージでは、Nogo-B2 の発現が Nogo-B1 と比較して優位であった。

3.2 Nogo-A/B 欠損マクロファージの機能解析

Nogo-A/B 欠損マウスの骨髄細胞は M-CSF の存在下で正常にマクロファージへと分化し、細胞増殖速度に異常は認められなかった(データ呈示せず)。また、成熟マクロファージのマーカーである細胞表面抗原 CD11b と F4/80 の発現も Nogo-A/B 欠損マクロファージと野生型細胞の間で差はなかった(**Figure 3A**)。またマクロファージの特徴の

一つに強い貪食作用があるが、Nogo-A/B 欠損マクロファージにおける蛍光ラベルしたポリスチレンビーズの貪食能力は正常であった(**Figure 3B**)。以上の結果から、マクロファージにおいて Nogo-B2 が高発現する一方、Nogo-A はほとんど発現していないこと、並びに Nogo-B の発現を失ってもマクロファージとしての分化成熟に異常は生じないことが確認された。

3.3 マクロファージの TLR 応答における Nogo-B の関与の検討

マクロファージは末梢組織に分布し、組織に侵入した感染微生物を認識するために各種の TLR を発現している。TLR を介した病原微生物の認識と炎症性サイトカインの発現はそれに引き続く獲得免疫応答の惹起と宿主防御に重要である。Nogo-B と TLR 応答の関与を検討するため、野生型及び Nogo-A/B 欠損マウス由来のマクロファージを各種の TLR リガンドで刺激し、その応答を代表的な炎症性サイトカインである interleukin-6 (IL-6) の発現量を ELISA とリアルタイム PCR で解析することで評価した (**Figure 4A, B**)。細胞表面 TLR である TLR4、TLR2/1、TLR2/6 のそれぞれリガンドとなる LPS、Pam3CSK4、FSL-1 刺激による応答は、Nogo-A/B 欠損マクロファージにおいて野生型細胞と同等であった。しかし、核酸認識 TLR である TLR9、TLR3、TLR7 のリガンドとなる CpG-B、poly(I:C)、R837 刺激によって発現誘導される IL-6 は、野生型細胞と比較して mRNA、タンパク質いずれのレベルにおいても Nogo-A/B 欠損マクロファージにおいて著しく減弱していた。この応答不全は IL-6 の発現のみで見られるのではなく、TNF や CXCL1 などの炎症性サイトカインやケモカインを含む評価対象とした刺激誘導性の全ての遺伝子発現で同様に観察された(**Figure 4C**)。

リガンドを認識した TLR は必須のアダプター分子である MyD88 または TRIF を介してシグナルを伝達し、NF- κ B や MAP kinase の活性化を経て炎症性遺伝子発現を誘導する(O'Neill and Bowie, 2007; Kawai and Akira, 2007; Takeuchi and Akira, 2010) (**Figure 1**)。アダプター分子として TLR9 は MyD88 を、TLR3 は TRIF をそれぞれ使用し、TLR4 は MyD88 と TRIF の双方を使用することが知られている。Nogo-A/B 欠損マクロファージで見出された核酸刺激に対する応答不全が TLR 下流のシグナル経路でも観察されるのか検討するため、刺激依存的なシグナル伝達分子の活性化をウェスタンブロットで解析した。野生型マクロファージでは CpG-B 及び poly(I:C) 刺激に伴う p38 MAP kinase や STAT1 のリン酸化、あるいは NF- κ B 活性化の指標となる I κ B- α の分解が速やかに誘導されるが、Nogo-A/B 欠損細胞ではそれらに遅延が生じ、活性化の程度も低い状態であった(**Figure 4D, E**)。一方で TLR4 を刺激した場合に見られるシグナル伝達分子の活性化は、Nogo-A/B 欠損マクロファージでも正常に生じていた (**Figure 4F**)。

以上の結果から、Nogo は細胞表面 TLR の経路には影響を与えないが、マクロファージにおける核酸認識 TLR の応答経路に必須であることがはじめて示された。Nogo-A がマクロファージにほとんど発現していないことを考慮すると、Nogo-A/B 欠損マクロファージで観察される核酸認識 TLR 経路の応答不全は Nogo-B の発現を失ったことに起因するといえる。また、細胞内シグナル伝達分子の解析により、シグナル伝達の上流か TLR によるリガンド認識などの初期の段階に Nogo-B は関与すると示唆された。

3.4 マウスのサイトカイン応答における Nogo の機能の検討

TLR リガンドをマウス腹腔内に投与することでエンドトキシンショックと呼ばれる全身性の免疫反応を誘導することができる。マクロファージで明らかになった核酸認識 TLR 経路における Nogo の関与がマウス個体レベルの免疫応答でも観察されるか検討するため、TLR リガンドの腹腔投与によるサイトカイン応答を検討した。マウス腹腔内には腹腔在住性のマクロファージが存在する。腹腔投与されたリガンドの認識と初期応答がこれらの細胞集団によって開始されることを考慮し、野生型マウスと Nogo-A/B 欠損マウスの腹腔内の細胞数を解析した。その結果、腹腔細胞の総数と腹腔マクロファージの細胞数は Nogo-A/B 欠損マウスにおいても野生型マウスとほぼ同等であることが確認された(**Figure 5A**)。続いて poly(I:C)投与によるサイトカイン応答を検討するため、投与3時間後の血清中の IL-6 及び IL-12p40 の濃度と脾臓細胞の IL-6 及び type I interferon (IFN β) mRNA の発現レベルを定量した。その結果、刺激依存的な血清中のサイトカイン濃度上昇、脾臓細胞のサイトカイン遺伝子発現はともに Nogo-A/B 欠損マウスにおいて減弱していた(**Figure 5B, C**)。対照的に、LPS によって誘導されるサイトカイン応答は正常であった(**Figure 5D**)。つまり、*in vitro* で観察された結果と同様に、*in vivo* における核酸認識 TLR 応答にも Nogo が必要であることが示された。

3.5 核酸リガンドの取り込み能力と細胞内局在観察

細胞表面の TLR リガンドと異なり、核酸認識 TLR のリガンドは細胞に取り込まれた後、TLR によるリガンド認識の場であるエンドソーム、続いてリソソームへと輸送される必要がある。神経細胞においては、Nogo-A 及びその結合分子が細胞膜上で Pincher 及び Rac1 依存的な機構でエンドサイトーシスされ、それらの複合体が細胞体へと輸送されることで軸索伸長阻害作用が発揮されると報告されている(Joset et al., 2010)。そこで Nogo-B がリガンドの取り込みやその細胞内輸送に関与する可能性を検討するため、蛍光標識された CpG-B を用いて実験を行った。CpG-B は clathrin 依存的なエンドサイトーシス経路によって速やかに細胞内に取り込まれることが知られている

(Takeshita et al., 2004; Blander; 2012)。BMM を CpG-B-Cy5 で刺激し、細胞内に取り込まれた Cy5 の蛍光強度をフローサイトメーターで解析したが、CpG-B の取り込み能力において野生型細胞と Nogo-A/B 欠損細胞との間で差はほとんど見られなかった(**Figure 6A**)。続いて取り込まれた CpG-B の細胞内局在を早期エンドソームマーカである Rab5 との共局在を共焦点顕微鏡で観察することによって評価したが、Nogo-A/B 欠損細胞で異常は認められなかった(**Figure 6B**)。次にリソソーム染色試薬である LysoTracker で BMM を染色し、蛍光標識 CpG-B との共局在を観察したが、野生型細胞と比較して Nogo-A/B 欠損細胞において局在性に違いは見られないという同様の結果を得た(**Figure 6C**)。また TLR の発現量自体に Nogo-B が関与する可能性を考慮し、TLR9 欠損 (*Tlr9^{-/-}*) マウスに由来する TLR9 欠損マクロファージをネガティブコントロールとしつつフローサイトメーターで細胞内の TLR9 発現量を検討したが、Nogo-A/B 欠損細胞においても TLR9 の発現量は正常であった(**Figure 6D**)。同様の検討を細胞表面の TLR4 についても行ったが、発現量に異常は見られなかった。

従って Nogo-A/B 欠損マクロファージで観察される核酸認識 TLR 経路の応答不全は、TLR リガンドのエンドリソソームへの輸送や受容体発現量に起因するものではないことが示された。

3.6 TLR9 の細胞内局在解析

先述のように、核酸認識 TLR はリガンドを認識するために Unc93B1 との結合に依存した機構でエンドリソソームへ移行することが不可欠である。核酸認識 TLR の挙動を評価するため、C 末端に GFP タグを融合させた TLR9 (TLR9-GFP) をレトロウイルスを用いて BMM に発現させ、その局在を観察した。TLR9-GFP は内在性 TLR9 と同様に Unc93B1 依存的にプロセッシングを受けて成熟型となり、正常に機能することが既に確かめられている(Avalos et al., 2013)。定常状態の野生型マクロファージにおいて、一部の TLR9-GFP は LysoTracker 陽性のエンドライソソームに局在することが認められた(**Figure 7A**)。これまで 293 細胞などの本来は TLR9 経路が機能していない細胞に TLR9 を過剰発現させることで行われてきた研究結果にもとづき、核酸認識 TLR は定常状態の細胞において小胞体に隔離されており、核酸刺激依存的にエンドライソソームへ移行するとされてきた。しかしながら、最近のマクロファージや樹状細胞などの内在性 TLR9 経路が機能している細胞を用いた研究では、ある程度の割合の TLR9 は刺激を受ける以前から成熟型となってエンドライソソームに移行していることが示唆されている(Avalos et al., 2013; Onji et al., 2013)。従って野生型マクロファージで観察された TLR9-GFP の局在パターンは妥当なものであるといえる。一方で Nogo-A/B 欠損マクロ

ファージにおいては、一部の TLR9-GFP が LysoTracker 陽性の領域に移行しているものの、その共局在の度合いは野生型細胞より低かった(**Figure 7A**)。各 100 個の細胞を用いた定量解析の結果からも同様の傾向が確認された(**Figure 7B**)。さらに内在性 TLR9 とリソソームマーカーである LAMP1 に対する抗体を用いて同様の解析を行ったところ、Nogo-A/B 欠損マクロファージでは TLR9 と LAMP1 の共局在が野生型細胞と比較して減弱していた(**Figure 7C**)。従って、TLR9 のエンドライソソームへの輸送量が低下していることが、Nogo-A/B 欠損マクロファージで観察される CpG-B 刺激に対する応答不全の原因であると示唆された。

核酸認識 TLR の輸送と成熟には Unc93B1 が必須の役割を果たすため、Unc93B1 の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で解析したが、Nogo-A/B 欠損マクロファージで異常は見られなかった(**Figure 7D**)。また全ての TLR の局在変化に必要なシャペロン分子である PRAT4A の発現量をウェスタブロットで評価したが、同様に異常は認められなかった(**Figure 7E**)。また、TLR の下流でシグナル伝達を担う MyD88、IRAK1、TRAF6 などの分子の発現量も確認したが、これらの分子を共通して用いる細胞表面 TLR 経路が正常に機能することから推測される通り、Nogo-A/B 欠損細胞でもこれらの分子の発現量は野生型細胞と同等であった(**Figure 7F**)。

以上の結果から、Nogo-B は何らかの機構によって核酸認識 TLR のエンドライソソームへの輸送を促進しており、Nogo-B を欠損することによる TLR の局在の異常が核酸刺激に対する応答不全の直接の原因であると考えられた。

3.7 Nogo-B 結合分子の探索による GRAMD4 の同定と機能解析

Nogo-A は ER 局在性のシャペロン分子である protein disulfide isomerase (PDI) の局在を制御し、PDI のシャペロンとしての適切な機能の維持に寄与することが報告されている(Yang et al., 2009)。また reticulon ファミリーの分子の中には小胞体から細胞膜やゴルジ体、エンドソームといった他の膜画分への物質輸送に関わることが示唆されているものがある(Wakana et al., 2005; Liu et al., 2008; Lee et al., 2011)。例えば、reticulon 2B はグルタミントランスポーターである EAAC1 の小胞体から細胞膜への輸送を促進すると報告されている。reticulon ファミリーによるこれらの物質輸送の制御には、小胞体上での reticulon 結合性分子の存在が必要であるとされているが、その詳細な分子機構は不明である。これまでの中枢神経系における他のグループによる先行研究から、Nogo は Nogo-66 領域を介して Ngr1 や PirB と相互作用すると示唆されている。神経細胞において Ngr1 はエフェクター分子であると推測される p75 や TROY と複合体を形成するとされる(GrandPré et al., 2000; Huber et al., 2002)。しかし、マクロファージを用いたウェスタ

ンプロット解析の結果、NgR1 の発現は見出せなかった(データ呈示せず)。また、NgR1 欠損マウス由来のマクロファージは各 TLR 刺激に正常に応答し、野生型細胞と同程度の IL-6 を産生した(データ呈示せず)。PirB はマクロファージを含む骨髄系免疫細胞に高発現し、広範な免疫応答を負に制御する分子として良く知られており、当研究室の窪らは PirB が TLR9 応答を抑制することを報告している(Ho et al., 1999; Maeda et al., 1999; Kubo et al., 2009)。しかしながら、マクロファージにおける PirB の高発現が観察されるものの、免疫沈降実験による Nogo との共沈は検出されなかった(**Figure 8A**)。同様に 293T 細胞に Nogo-B と PirB を過剰発現させた上で行った免疫沈降実験においても Nogo-B と PirB の結合は確認されなかった(**Figure 8B, C**)。すなわち、神経系では Nogo と Ngr1 ないし PirB が相互作用する可能性があるが、免疫細胞、少なくともマクロファージでは NgR1 や PirB は Nogo-B と結合しないと示唆された。

そこで免疫細胞における Nogo-B 結合分子を探索するため、FLAG タグ融合 Nogo-B2 を安定発現する RAW264.7 マウスマクロファージ様細胞株(RAW-Nogo-B)を樹立した。近年の安定同位体タグによるペプチド標識技術と定量(iTRAQ)手法の向上により、タンパク質存在量の網羅的な比較定量と同定が可能となっており(Aggarwal et al., 2006)、本研究では iTRAQ と質量分析を用いて、RAW-Nogo-B における Nogo-B 結合分子の網羅的な探索を行った。定常状態の RAW-Nogo-B 及びネガティブコントロールとしての RAW264.7 から細胞溶解液を調製し、anti-FLAG 抗体で免疫沈降を行った。共沈分子は安定同位体タグで標識し、液体クロマトグラフィーと質量分析によって解析した。取得したデータにはペプチド配列としての情報だけでなく、RAW-Nogo-B と RAW264.7 由来のサンプル間での各ペプチドの比較定量情報が含まれており、このペプチド存在量の相対値と同定されたタンパク質の信頼度を基準として解析を行い、約 40 の Nogo-B 結合候補タンパク質を得た。

これらの候補分子にそれぞれ Myc タグを融合してクローニングし、293T 細胞において FLAG-Nogo-B とともに強制発現させ、免疫沈降実験によって結合能を評価した。その結果、GRAMD4 及び leucine-rich repeats and calponin homology domain containing 4 (LRCH4)が Nogo-B と強く結合する分子として見出された (**Figure 9A, D**)。それらのうち LRCH4 は酵母を用いた two-hybrid 法によって Nogo と結合することが示唆された分子であった(Goncalves et al., 2009)。これらの Nogo-B 結合分子の TLR 応答における機能を検討するため、内在性の Nogo-B を発現しており、かつ核酸認識 TLR 経路が機能する RAW264.7 において、標的遺伝子のノックダウンによる TLR 応答への影響を評価した。Gramd4 遺伝子に対する siRNA 処理によって内在性 Gramd4 の発現抑制が確認され (**Figure 9B**)、Gramd4 ノックダウン細胞では CpG-B 刺激に伴う IL-6 mRNA の発現量が

約2倍に亢進したことから(Figure 9C)、GRAMD4のTLR経路における抑制的作用が示唆された。一方でLRCH4はNogo-Bと結合するが、その発現を抑制してもTLR9応答は変化しなかった(Figure 9E, F)。そこで、以後はGRAMD4に着目して機能解析を進めた。ノックダウン実験によってGRAMD4の抑制的機能が示唆されたため、RAWA264.7細胞においてGRAMD4の過剰発現とTLR応答における影響を検討した。プラスミドベクターはsiRNAと異なり免疫系細胞に高効率で導入することは困難であるため、GRAMD4発現プラスミドと少量のルシフェラーゼレポーターを同時にトランスフェクションし、レポーターが導入されたほぼ全ての細胞でGRAMD4が発現する条件で実験を行った。TLR刺激によって誘導されるNF- κ B活性化は多くの炎症性遺伝子発現に重要であるため、NF- κ B活性化をモニターできるELAM1レポーターを使用した。その結果、GRAMD4を過剰発現させることにより、CpG-B及びpoly(I:C)刺激依存的なNF- κ B活性化が抑制される一方、LPS刺激によるNF- κ Bは変化しなかった(Figure 9G)。以上のノックダウン並びに過剰発現実験の結果から、GRAMD4は核酸認識TLR経路を抑制的に制御することが明らかとなった。TLR経路の抑制的制御分子はしばしば定常状態の細胞では発現レベルが低い状態にあり、TLR刺激依存的に発現誘導されてTLR経路を遮断することが知られている(Liew et al., 2005)。そこで特異的抗体を用いてCpG-B刺激した野生型マクロファージにおけるNogo-B及びGRAMD4の発現レベルをウェスタンブロットで検討したところ、Nogo-Bの発現量は刺激の有無によって変化しないが、GRAMD4は刺激依存的な発現誘導が見られた(Figure 9H)。

すなわち、GRAMD4は核酸認識TLR応答を負に調節するだけでなく、TLR経路における他の抑制的制御分子と同様に、刺激に伴い発現上昇する負のフィードバック因子として機能することが示唆された。

3.8 Nogo-BとGRAMD4を介した核酸認識TLR経路制御機構の検討

GRAMD4とNogo-Bの関連を検討するため、蛍光タンパク質と融合したNogo-B及びGRAMD4を野生型MEFに発現させ、またそれぞれのタンパク質と小胞体染色試薬ER-Tracker陽性領域との共局在を共焦点顕微鏡で観察した(Figure 10A)。それぞれ100個の細胞を用いて蛍光強度を測定し、相関係数(r)を算出したところ、Nogo-B-GFPとER-Trackerでは $r = 0.647$ であり、中程度の相関を示した。一方、GRAMD4-TagRFPとER-Trackerでは $r = 0.829$ 、Nogo-B-GFPとGRAMD4-TagRFPでは $r = 0.841$ であり、高い相関が認められた。Nogoは以前より小胞体局在性の分子として知られるが、GRAMD4も主に小胞体に集積しており、Nogo-BとGRAMD4の相互作用も

小胞体で起きていると示唆され、小胞体における Nogo-B の結合分子であるといえる。

さらに Nogo-B が GRAMD4 と結合することで TLR 経路をどのように制御するか解析するため、内在性 Nogo-B が存在しない Nogo-A/B 欠損マクロファージにおいて GRAMD4 をノックダウンすることによる影響を検討した。野生型マクロファージにおいて GRAMD4 をノックダウンすることにより CpG-B 刺激に伴う IL-6 産生は亢進した (**Figure 10B, C**)。一方、Nogo-A/B 欠損細胞では、GRAMD4 発現抑制による IL-6 産生亢進はより著明であった。この結果から、野生型マクロファージでは Nogo-B が GRAMD4 の定常状態における抑制的作用を阻害しており、GRAMD4 発現量を低下させても顕著な影響が見られないと考えられる。一方で Nogo-A/B 欠損細胞では Nogo-B による阻害を受けない GRAMD4 が恒常的に核酸認識 TLR 経路を抑制しており、ノックダウンによって GRAMD4 発現量が低下することで TLR 経路の抑制が解除され、核酸刺激に対する応答が回復すると示唆された。Nogo-B は核酸認識 TLR の輸送に必要な分子であることを既に示したが (**Figure 7**)、GRAMD4 が TLR の局在変化に関与するか検討を行った。データは呈示しないが、Nogo-B、GRAMD4 はいずれも TLR そのものや TLR のシャペロン分子である Unc93B1 とは会合しないことを確認している。一方、外部のグループによる研究から reticulon ファミリー分子の一つである RTN1 が、小胞体に局在する Rab1 に対する GTPase activator protein を抑制的に制御することが示されている (Haas et al., 2007)。Rab1 と TLR の関連についてはこれまで報告がないが、Rab1 は小胞体からゴルジ体への小胞輸送を制御する分子である。本研究における RAW-Nogo-B を用いた Nogo-B 結合分子の探索によって Rab1A が Nogo-B 結合候補分子の一つとして見出されていたものの、両者を強制発現させた 293T 細胞における免疫沈降実験では弱い相互作用しか確認できなかったため、解析対象から除外していた。そこで GRAMD4 と Rab1A の会合を 293T において解析したところ、両者の強い相互作用を見出した (**Figure 10D**)。

これらの結果から、GRAMD4 は Rab1A に結合することで小胞体からゴルジ体への核酸認識 TLR の輸送を負に制御し、Nogo-B は小胞体上で GRAMD4 と結合するとによって GRAMD4 の抑制的作用を阻害するという分子機構が考えられる。

第4章 考察

Nogo の発現は免疫系を含む幅広い組織や細胞種で見られるが、免疫応答における機能はほとんど知られていなかった。本研究によって、Nogo アイソフォーム B は核酸認識 TLR によって誘導される免疫反応の正の制御因子であることが明らかになった。Nogo-A/B 欠損マウスでは poly(I:C)投与によって引き起こされるサイトカイン応答が減弱したことから、Nogo が果たす機能は *in vivo* においても確認された。核酸リガンド取り込み能力やその細胞内局在変化について Nogo-A/B 欠損マクロファージでは異常は見られなかった。対照的に Nogo-A/B 欠損細胞では TLR9 のエンドリソソームへの移行が減少しており、結果として核酸リガンドの認識能力が低下することで TLR9 下流のシグナル伝達経路の活性化が阻害される。神経軸索伸長阻害因子としての機能を Nogo-A が発揮するためにはエフェクター分子との会合が必要であるという外部のグループによる報告にもとづき、TLR の局在制御という異なる局面においても Nogo は何らかのエフェクター分子を使用すると想定した。Nogo-B との結合分子を探索するため、本研究では質量分析を用いたプロテオミクス解析を行い、新規 Nogo-B 結合分子として GRAMD4 を同定した。核酸認識 TLR 応答を促進する Nogo-B とは異なり、GRAMD4 は TLR9 や TLR3 応答を抑制的に制御した。GRAMD4 の機能を解析することによって、小胞体からゴルジ体への小胞輸送を制御する Rab ファミリーGTPase である Rab1A が GRAMD4 と相互作用することを見出した。Rab1A と GRAMD4 が TLR の輸送を制御する分子機構は現段階では不明であるものの、本研究によって、Nogo-B が GRAMD4 に結合することで GRAMD4 の抑制的作用を阻害し、核酸刺激によって開始される免疫応答を活性化していると示唆された。一方で GRAMD4 は TLR 刺激に伴い発現増強され、負のフィードバック因子として炎症応答を終息させると考えられる (Figure 11)。以上のことから、Nogo-B と GRAMD4 は核酸認識 TLR 経路の活性化を適切な度合いに調節することで、個体恒常性の維持に貢献していると示唆される。

Nogo の各アイソフォームの発現パターンは組織や細胞によって異なるが、本研究によって、Nogo-B の顕著な発現が免疫細胞、特にマクロファージで認められた。一方でこれまでの報告通り、Nogo-A の発現はマクロファージではほとんど検出されなかった(Figure 2A, B)。従って、Nogo-A/B 欠損細胞で観察される免疫応答不全は Nogo-A の欠損によるものではなく、主に Nogo-B の欠損に起因するといえる。中枢神経系における研究から、Nogo の3つのアイソフォームに共通するアミノ領域である Nogo-66 を介して NgR1 や PirB が Nogo と会合する可能性が示されている。ただし Nogo と同様に

軸索伸長阻害作用を持つ MAG や OMgp も NgR1 や PirB と会合するとされている (Domeniconi et al., 2002; Liu et al., 2002; Wang et al., 2002; Oertle and Schwab, 2003)。NgR1 は LINGO1、p75、TROY などとともに複合体を形成し、軸索の伸展を阻害すると考えられているものの、神経系における Nogo の結合分子とその機能解析が技術的に容易でないこともあり、Nogo による細胞機能の調節機構はほとんど解明されていなかった (Schwab, 2010)。

当研究室では PirB がマウス B-1 細胞において TLR9 シグナル経路を負に制御することを報告している。本研究においても、当初は Nogo-B による核酸認識 TLR 応答制御は PirB との会合に依存すると想定したものの、本研究ではマクロファージ、293T 細胞のいずれにおいても Nogo-B と PirB の相互作用は見出せなかった (Figure 8)。中枢神経系においては、Nogo-A が小胞体だけでなく細胞膜上にも発現し、細胞表面受容体である PirB などの分子と会合できるとされる。内在性 Nogo を染色しフローサイトメトリ解析や免疫蛍光観察できる抗体がないため確認できないが、免疫細胞では Nogo-B が細胞膜上には発現しないため PirB と相互作用できないのかもしれない。NgR1 もまた Nogo 会合分子として知られるが、NgR1 mRNA の発現パターンは脳、心臓及び腎臓に限られており、他の末梢組織には発現しないとされる。また本研究における RAW-Nogo-B を用いた結合分子の網羅的探索においても、これらの既知の Nogo-66 結合タンパク質は会合分子として同定されなかった。従って、免疫細胞で明らかになった TLR 経路制御因子としての Nogo の機能は PirB や NgR1 には依存しない新たな機構を用いているといえる。今回行った研究結果から、Nogo-B 結合分子として新たに見出した GRAMD4 が核酸認識 TLR 応答を負に制御することが明らかになった。GRAMD4 の既知の機能としては、Bcl-2 と会合することで Bax のミトコンドリア膜上でのオリゴマー化を促進するという報告がある (Stanelle et al., 2005; John et al., 2011)。この proapoptotic な機能以外には GRAMD4 の機能に関する報告はなかったが、本研究によって自然免疫応答における GRAMD4 の抑制的作用が初めて明らかになった。

これまでの先行研究から、reticulon ファミリー分子は小胞体からゴルジ体、細胞膜、エンドソームといった他の膜画分への物質輸送に関わることが示されている。一例としては、RTN2B がグルタミントランスポーター EAAC1 の小胞体から細胞膜への輸送を促進する (Liu et al., 2008)。他方で TLR の小胞体から細胞膜やエンドリソームへの局在変化はリガンド認識とシグナル経路の活性化に必須である。この局在変化に必須の分子として、小胞体膜貫通タンパク質である Unc93B1、PRAT4A、gp96 が同定されている。TLR の輸送は他の膜分子と同様に小胞輸送系が利用されると見られるが、その積み荷分子の選別、小胞の形成と融合などは、それぞれの TLR を適切なタイミングで

輸送し感染防御の維持と過剰な炎症応答の抑制を両立させるため、厳密な制御を受ける必要がある。その分子機構は不明な部分が多いが、いくつかの研究により、small GTPase である Rab ファミリー分子が TLR4 の細胞膜からライソソームへの輸送と分解に関与することが示唆されている(Wang et al., 2007; Wang et al., 2010)。最近 Lee らは小胞体からゴルジ体への物質輸送のステップの一つである COPII 小胞への分子の移行について、Unc93B1 が核酸認識 TLR の輸送を直接制御すると報告した(Lee et al., 2013)。小胞輸送において Rab1 は小胞体由来の COPII 小胞をゴルジ体へ融合させる際に必要となる小胞係留因子 p115 を招集するとされる(Allan et al., 2000; Short et al., 2005)。一方で GRAMD4 の GRAM ドメイン(Glucosyltransferases, Rab-like GTPase activators and Myotubularins domain)はいくつかの Rab-like GTPase activator に見られる(Short et al., 2005)。ただしその GTPase activator としての機能に GRAM ドメインは必ずしも必要ではないようである(Doerks et al., 2000)。これらの報告と本研究から得られた GRAMD4 が Rab1A と結合するという実験結果を踏まえると、Nogo-B は GRAMD4 との会合を介して Rab1 の活性を制御すると推測できる。293T における結合評価実験では Nogo-B の免疫沈降によっても Rab1A は共沈したが、これは結合相手として GRAMD4 を用いた際の Rab1A の共沈よりも著しく弱いものであり、内在性の GRAMD4 を介して Nogo-B が Rab1A と相互作用しているためと考えられる。本研究で示唆された TLR 応答における Nogo-B と GRAMD4 の機能を考慮すると、定常状態の免疫細胞において、Nogo-B は GRAMD4 に結合することで GRAMD4 の機能を阻害しているが、TLR 刺激によって活性化した細胞では、刺激依存的に発現上昇した GRAMD4 が Nogo-B による阻害を逃れて Rab1A の機能に影響を与えることで、核酸認識 TLR の局在変化を負に制御するようになるというモデルを提示できる。この機構を用いることで、活性化した細胞では核酸認識 TLR のエンドリソソームにおける存在量を減少させることにより持続的炎症を抑えると同時に、定常状態における TLR の一定の局在変化を保つことで感染微生物の排除と宿主防御を実現できる。Rab1A による TLR の輸送への関与の検討、及び Nogo-B と GRAMD4 が核酸認識 TLR 特異的に局在変化を制御する分子機構を解明するためには、今後のより詳細な解析が必要である。

第5章 結論

1. Nogo-B は核酸認識 TLR のエンドリソソームへの局在を促進することで、核酸リガンドに対する免疫応答を正に制御することが明らかになった。
2. GRAMD4 が Nogo-B の結合分子として同定され、GRAMD4 は核酸認識 TLR 応答において抑制的に作用することが判明した。
3. Nogo 欠損細胞では GRAMD4 が恒常的に核酸認識 TLR 経路を抑制していると示唆されたことから、Nogo-B は GRAMD4 に結合することでその抑制機能を阻害すると考えられた。
4. GRAMD4 は Rab1A と結合することから、Rab1A の活性制御を介して小胞輸送を調節すると考えることが可能であり、TLR のエンドリソソームへの移行を阻害すると示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、東北大学加齢医学研究所・遺伝子導入研究分野の高井俊行教授、坂本譲客員准教授、乾匡範講師、遠藤章太助教から多大なるご指導、ご教授を頂きましたこと、また同分野の飛内(菅原)章子さんに実験動物管理並びに実験手法に関して多大なご支援を頂きましたことを厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Aggarwal, K., L. H. Choe, and K. H. Lee. 2006. Shotgun proteomics using the iTRAQ isobaric tags. *Brief Funct. Genomic Proteomic.* 5: 112–120.
2. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783–801.
3. Allan, B. B., B. D. Moyer, and W. E. Balch. 2000. Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science* 289: 444–448.
4. Atwal, J. K., J. Pinkston-Gosse, J. Syken, S. Stawicki, Y. Wu, C. Shatz, and M. Tessier-Lavigne. 2008. PirB is a functional receptor for myelin inhibitors of axonal regeneration. *Science* 322: 967–970.
5. Avalos, A. M., O. Kirak, J. M. Oelkers, M. C. Pils, Y. M. Kim, M. Ottinger, R. Jaenisch, H. L. Ploegh, M. M. Brinkmann. 2013. Cell-specific TLR9 trafficking in primary APCs of transgenic TLR9-GFP mice. *J. Immunol.* 190: 695–702.
6. Barrat, F. J., T. Meeker, J. Gregorio, J. H. Chan, S. Uematsu, S. Akira, B. Chang, O. Duramad, R. L. Coffman. 2005. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* 202: 1131-1139.
7. Barton, G. M., and J. C. Kagan. 2009. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat. Rev. Immunol.* 9: 535–542.
8. Blander, J. M. 2012. Designing a type I interferon signaling phagosome. *Immunity* 37: 947–949.
9. Brinkmann, M. M., E. Spooner, K. Hoebe, B. Beutler, H. L. Ploegh, and Y. M. Kim. 2007. The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *The J. Cell Biol.* 177: 265-275.
10. Chen, M. S., A. B. Huber, M. E. van der Haar, M. Frank, L. Schnell, A. A. Spillmann, F. Christ, and M. E. Schwab. 2000. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 403: 434–439.
11. Di Lorenzo, A., T. D. Manes, A. Davalos, P. L. Wright, and W. C. Sessa. 2011. Endothelial reticulon-4B (Nogo-B) regulates ICAM-1-mediated leukocyte transmigration and acute inflammation. *Blood* 117: 2284–2295.

12. Doerks, T., M. Strauss, M. Brendel, and P. Bork. 2000. GRAM, a novel domain in glucosyltransferases, myotubularins and other putative membrane-associated proteins. *Trends Biochem. Sci.* 25: 483–485.
13. Domeniconi, M., Z. Cao, T. Spencer, R. Sivasankaran, K. C. Wang, E. Nikulina, N. Kimura, H. Cai, K. Deng, Y. Gao, Z. He, and M. Filbin. 2002. Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron* 35: 283–290.
14. Fournier, A. E., T. GrandPré, and S. M. Strittmatter. 2001. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 409: 341–346.
15. Fukui, R., S. Saitoh, F. Matsumoto, H. Kozuka-Hata, M. Oyama, K. Tabeta, B. Beutler, and K. Miyake. 2009. Unc93B1 biases Toll-like receptor responses to nucleic acid in dendritic cells toward DNA- but against RNA-sensing. *J. Exp. Med.* 206: 1339–1350.
16. Goncalves, J. P., M. Graos, and A. X. Valente. 2009. Polar Mapper: a computational tool for integrated visualization of protein interaction networks and mRNA expression data. *J. R. Soc. Interface* 6: 881–896.
17. GrandPré, T., F. Nakamura, T. Vartanian, and S. M. Strittmatter. 2000. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 403: 439–444.
18. Haas, A. K., S. Yoshimura, D. J. Stephens, C. Preisinger, E. Fuchs, and F. A. Barr. 2007. Analysis of GTPase-activating proteins: Rab1 and Rab43 are key Rabs required to maintain a functional Golgi complex in human cells. *J. Cell Sci.* 120: 2997–3010.
19. Hayami, K., D. Fukuta, Y. Nishikawa, Y. Yamashita, M. Inui, Y. Ohyama, M. Hikida, H. Ohmori, and T. Takai. 1997. Molecular cloning of a novel murine cell-surface glycoprotein homologous to killer cell inhibitory receptors. *J. Biol. Chem.* 272: 7320–7327.
20. Ho, L. H., T. Uehara, C. C. Chen, H. Kubagawa, and M. D. Cooper. 1999. Constitutive tyrosine phosphorylation of the inhibitory paired Ig-like receptor PIR-B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 15086–15090.
21. Huber, A. B., O. Weinmann, C. Brosamle, T. Oertle, and M. E. Schwab. 2002. Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *J. Neurosci.* 22: 3553–3567.
22. Ishikawa, H., and G. N. Barber. 2008. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 455: 674–678.
23. Ishikawa, H., Z. Ma, and G. N. Barber. 2009. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 461: 788–792.
24. John, K., V. Alla, C. Meier, and B. M. Pützer. 2011. GRAMD4 mimics p53 and mediates the

- apoptotic function of p73 at mitochondria. *Cell Death Differ.* 18: 874-886.
25. Joset, A., D. A. Dodd, S. Haleboua, and M. E. Schwab, 2010. Pincher-generated Nogo-A endosomes mediate growth cone collapse and retrograde signaling. *J. Cell Biol.* 188: 271–285.
 26. Kagan, J. C. 2012. Signaling organelles of the innate immune system. *Cell* 151: 1168–1178.
 27. Kawai, T., and S. Akira. 2007. TLR signaling. *Semin. Immunol.* 19: 24–32.
 28. Kawai, T., and S. Akira. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11: 373–384.
 29. Kim, Y.M., M.M. Brinkmann, M. E. Paquet, and H. L. Ploegh. 2008. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 452: 234–238.
 30. Kubagawa, H., P. D. Burrows, and M. D. Cooper. 1997. A novel pair of immunoglobulin-like receptors expressed by B cells and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 5261–5266.
 31. Kubo, T., Y. Uchida, Y. Watanabe, M. Abe, A. Nakamura, M. Ono, S. Akira, and T. Takai. 2009. Augmented TLR9-induced Btk activation in PIR-B-deficient B-1 cells provokes excessive autoantibody production and autoimmunity. *J. Exp. Med.* 206: 1971–1982.
 32. Lee, B. L., J. E. Moon, J. H. Shu, L. Yuan, Z. R. Newman, R. Schekman, and G. M. Barton. 2013. UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs. *Elife* 2: e00291.
 33. Lee, H. Y., C. H. Bowen, G. V. Popescu, H. G. Kang, N. Kato, S. Ma, S. Dinesh-Kumar, M. Snyder, and S. C. Popescu. 2011. Arabidopsis RTNLB1 and RTNLB2 reticulon-like proteins regulate intracellular trafficking and activity of the FLS2 immune receptor. *Plant Cell* 23: 3374–3391.
 34. Liew, F. Y., D. Xu, E. K. Brint, and L. A. O’Neill. 2005. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev. Immunol.* 5: 446–458.
 35. Liu, B. P., A. Fournier, T. GrandPre, and S. M. Strittmatter. 2002. Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. *Science* 297: 1190–1193.
 36. Liu, Y., S. Vidensky, A. M. Ruggiero, S. Maier, H. H. Sitte, and J. D. Rothstein. 2008. Reticulon RTN2B regulates trafficking and function of neuronal glutamate transporter EAAC1. *J. Biol. Chem.* 283: 6561–6571.
 37. Maeda, A., A. M. Scharenberg, S. Tsukada, J. B. Bolen, J. P. Kinet, and T. Kurosaki. 1999. Paired immunoglobulin-like receptor B (PIR-B) inhibits BCR-induced activation of Syk and Btk by SHP-1. *Oncogene* 18: 2291–2297.
 38. Matsushita, H., S. Endo, E. Kobayashi, Y. Sakamoto, K. Kobayashi, K. Kitaguchi, K.

- Kuroki, A. Soderhall, K. Maenaka, A. Nakamura, S. M. Strittmatter, and T. Takai. 2011. Differential but competitive binding of Nogo protein and class I major histocompatibility complex (MHCI) to the PIR-B ectodomain provides an inhibition of cells. *J. Biol. Chem.* 286: 25739–25747.
39. Nash, M., H. Pribiag, A. E. Fournier, and C. Jacobson. 2009. Central nervous system regeneration inhibitors and their intracellular substrates. *Mol. Neurobiol.* 40: 224–235.
40. Oertle, T., C. Huber, H. van der Putten, and M. E. Schwab. 2003. Genomic structure and functional characterisation of the promoters of human and mouse Nogo/Rtn-4. *J. Mol. Biol.* 325: 299–323.
41. O'Neill, L. A., and A. G. Bowie. 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 353–364.
42. Oertle, T., and M. E. Schwab. 2003. Nogo and its paRTNers. *Trends Cell Biol.* 13: 187–194.
43. Onji, M., A. Kanno, S. Saitoh, R. Fukui, Y. Motoi, T. Shibata, F. Matsumoto, A. Lamichhane, S. Sato, H. Kiyono, K. Yamamoto, and K. Miyake. 2013. An essential role for the N-terminal fragment of Toll-like receptor 9 in DNA sensing. *Nat Commun*, 4: 1949.
44. Rahman, A. H., R. A. Eisenberg. 2006. The role of toll-like receptors in systemic lupus erythematosus. *Springer Semin. Immunopathol.* 28: 131–143.
45. Schindler, U., and V. R. Baichwal. 1994. Three NF- κ B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor α -induced expression. *Mol. Cell. Biol.* 14: 5820–5831.
46. Schwab, M. E., 2010. Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 11: 799–811.
47. Short, B., A. Haas, and F. A. Barr. 2005. Golgin and GTPases, giving identity and structure to the Golgi apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* 1744: 383–395.
48. Sun, L., J. Wu, F. Du, X. Chen, and Z. J. Chen. 2013. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* 339: 786–791.
49. Stanelle, J., H. Tu-Rapp, and BM. Pützer. 2005. A novel mitochondrial protein DIP mediates E2F1-induced apoptosis independently of p53. *Cell Death Differ.* 12: 347–357.
50. Tabeta, K., K. Hoebe, E. M. Janssen, X. Du, P. Georgel, K. Crozat, S. Mudd, N. Mann, S. Sovath, J. Goode, L. Shamel, A. A. Herskovits, D. A. Portnoy, M. Cooke, L. M. Tarantino, T. Wiltshire, B. E. Steinberg, S. Grinstein, and B. Beutler. 2006. The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat.*

- Immunol.* 7: 156–164.
51. Takahashi, K., T. Shibata, S. Akashi-Takamura, T. Kiyokawa, Y. Wakabayashi, N. Tanimura, T. Kobayashi, F. Matsumoto, R. Fukui, T. Kouro, Y. Nagai, K. Takatsu, S. Saitoh, and K. Miyake. 2007. A protein associated with Toll-like receptor (TLR) 4 (PRAT4A) is required for TLR-dependent immune responses. *J. Exp. Med.* 204: 2963–2976.
 52. Takeshita, F., I. Gursel, K. J. Ishii, K. Suzuki, M. Gursel, and D. M. Klinman. 2004. Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9. *Semin. Immunol.* 16: 17-22.
 53. Takeuchi, O., S. Akira. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140: 805–820.
 54. Wakana, Y., S. Koyama, K. Nakajima, K. Hatsuzawa, M. Nagahama, K. Tani, H. P. Hauri, P. Melancon, and M. Tagaya. 2005. Reticulon 3 is involved in membrane trafficking between the endoplasmic reticulum and Golgi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334: 1198-1205.
 55. Wang, D., J. Lou, C. Ouyang, W. Chen, Y. Liu, X. Liu, X. Cao, J. Wang, L. Lu. 2010. Ras-related protein Rab10 facilitates TLR4 signaling by promoting replenishment of TLR4 onto the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 13806–13811.
 56. Wang, K. C., V. Koprivica, J. A. Kim, R. Sivasankaran, Y. Guo, R. L. Neve, and Z. He. 2002. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 417: 941–944.
 57. Wang, Y., T. Chen, C. Han, D. He, H. Liu, H. An, Z. Cai, X. Cao. 2007. Lysosome-associated small Rab GTPase Rab7b negatively regulates TLR4 signaling in macrophages by promoting lysosomal degradation of TLR4. *Blood* 110: 962-971.
 58. Wright, P. L., J. Yu, Y. P. Di, R. J. Homer, G. Chupp, J. A. Elias, L. Cohn, and W. C. Sessa. 2010. Epithelial reticulon 4B (Nogo-B) is an endogenous regulator of Th2-driven lung inflammation. *J. Exp. Med.* 207: 2595–2607.
 59. Wu, J., L. Sun, X. Chen, F. Du, H. Shi, C. Chen, and Z. J. Chen. 2013. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* 339: 826–830.
 60. Yang, Y., B. Liu, J. Dai, P. K. Srivastava, D. J. Zammit, L. Lefrançois, and Z. Li. 2007. Heat shock protein gp96 is a master chaperone for toll-like receptors and is important in the innate function of macrophages. *Immunity* 26: 215–226.

61. Yang Y. S., N. Y. Harel, S. M. Strittmatter. 2009. Reticulon-4A (Nogo-A) redistributes protein disulfide isomerase to protect mice from SOD1-dependent amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* 29: 13850–13859.
62. Yiu, G., and Z. He. 2006. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 7: 617–627.
63. Yu, J., C. Fernandez-Hernando, Y. Suarez, M. Schleicher, Z. Hao, P. L. Wright, A. DiLorenzo, T. R. Kyriakides, and W. C. Sessa. 2009. Reticulon 4B (Nogo-B) is necessary for macrophage infiltration and tissue repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106: 17511–17516.

図の説明

Figure 1 TLR によるリガンド認識とシグナル伝達経路。

TLR ファミリーの受容体は細胞表面 TLR と核酸認識 TLR に大別できる。細胞表面 TLR は細胞膜上でリガンドを認識し、核酸認識 TLR は小胞体からエンドリソソームに移行して成熟した後、リガンドと結合する。いずれのグループも MyD88 または TRIF を介してシグナルを伝達し、転写因子の活性化と炎症性遺伝子応答を誘導する。(Takeuchi and Akira, *Cell*, 2010 を改変)

Figure 2 マクロファージには Nogo アイソフォーム B が高発現するが、アイソフォーム A を発現しない。

(A) Nogo アイソフォーム A/B に対する特異的抗体を用いて、野生型及び Nogo-A/B 欠損マウスから調製した脳組織及び BMM のウェスタンブロット解析を行った。ローディングコントロールには Erk1/2 を用いた。データは 3 回以上の独立した実験の代表例として示した。(B)野生型マウスの脳組織及び BMM から抽出した mRNA を用いてリアルタイム PCR 解析を行い、*nogo-A*、*-B*、*-C* 発現量を定量した。mRNA 発現量は *Hprt1* mRNA のコピー数により標準化した。データは独立した 3 回の実験結果の mean \pm SEM で表した。(C) B220 陽性の B 細胞、CD3 陽性の T 細胞は野生型マウスの脾臓から MACS ビーズを用いて単離した。BMM 及び BMDC は野生型マウスの骨髄細胞を M-CSF または GM-CSF の存在下でそれぞれ培養することにより調製した。これらの細胞及び野生型マウスの脾臓細胞を溶解させ、Nogo-B 発現量のウェスタンブロット解析を行った。ローディングコントロールには β -actin を用いた。

Figure 3 Nogo-A/B 欠損細胞は正常にマクロファージに分化成熟する。

(A)野生型及び Nogo-A/B 欠損マウス由来の BMM を培養プレートから回収し、anti-CD11b 及び anti-F4/80 抗体で染色してフローサイトメトリー解析を行った。(B)野生型及び Nogo-A/B 欠損マウス由来の BMM を蛍光標識されたポリスチレンビーズ (Fluoresbrite YG Microspheres) で 4°C または 37°C において 30 分間刺激した。洗浄後に細胞を回収し、ビーズの食食量をフローサイトメトリー解析した。データは 3 回以上の独立した実験の代表例として示した。

Figure 4 Nogo-Bはマクロファージの核酸認識TLR経路の活性化を正に制御する。

(A)野生型及びNogo-A/B欠損マウス由来のBMMを10 ng/ml LPS、100 ng/ml FSL-1、0.1 μ M CpG-Bまたは10 μ g/ml poly(I:C)で6時間または24時間刺激した。刺激後の培養上清に含まれるIL-6濃度をELISAで測定した。データはtriplicateのサンプルのmean \pm SEMで表し、独立した3回の実験結果の代表例として示した。(B)野生型及びNogo-A/B欠損マウス由来のBMMを10 ng/ml LPS、100 ng/ml Pam3CSK4、100 ng/ml FSL-1、0.1 μ M CpG-B、10 μ g/ml poly(I:C)または300 ng/ml R837で1時間または4時間刺激した。刺激後の細胞のmRNAを用いてリアルタイムPCR解析を行い、*Il-6* mRNA発現量を定量した。mRNA発現量は*Hprt1* mRNAのコピー数により標準化した。データはtriplicateのサンプルのmean \pm SEMで表し、独立した3回以上の実験結果の代表例として示した。(C)野生型及びNogo-A/B欠損マウス由来のBMMを0.1 μ M CpG-Bで1時間から6時間刺激した。刺激後の細胞のmRNAを用いてリアルタイムPCR解析を行い、*Il-6*、*Tnf*、*Il-12b*、*Il-1b*、*Cxcl1*及び*Il-10* mRNA発現量を定量した。mRNAコピー数は*Hprt1* mRNAのコピー数により標準化した。データはduplicateのサンプルのmean \pm SEMで表し、独立した3回の実験結果の代表例として示した。(D—F)野生型及びNogo-A/B欠損マウス由来のBMMを0.1 μ M CpG-Bで5分間から60分間(D)、3 μ g/ml poly(I:C)で10分間から120分間(E)、1 ng/ml LPSで5分間から60分間刺激した(F)。刺激後の細胞溶解液を用いてウェスタンブロット解析を行い、*I κ B- α* の発現量、及びp38、Erk1/2、STAT1のリン酸化レベルを評価した。ローディングコントロールにはp38、Erk1/2またはSTAT1を用いた。データは3回以上の独立した実験の代表例として示した。

Figure 5 Nogo-A/B欠損マウスはTLR3刺激に対して応答不全を示す。

(A)同一週齢の野生型及びNogo-A/B欠損雌マウスの腹腔内細胞を回収し、その総細胞数、及びF4/80陽性の腹腔マクロファージの細胞数をフローサイトメトリー解析によって算出した。 $n = 4$ 。(B—D)同一週齢の野生型及びNogo-A/B欠損雌マウスの腹腔に、poly(I:C) (5 mg/kg body weight)、LPS (15 mg/kg body weight)または生理食塩水を投与し、その3時間後に血清と脾臓細胞を回収した。血清中のIL-6とIL-12p40濃度はELISAで測定した。脾臓細胞から抽出したmRNAはリアルタイムPCR解析を行い、*Il-6*と*Ifnb* mRNA発現量を定量した。mRNA発現量は*Hprt1* mRNAのコピー数により標準化した。野生型とNogo-A/B欠損マウスの間で*t-test*による統計学的解析を行い、* $p < 0.05$ 及び** $p < 0.01$ で有意差があると判定した。N.S. (not statistically significant)は、*t-test*による判

定で差が無いことを示している。 $n = 5-7$ 。

Figure 6 Nogo-B は核酸リガンドの取り込みと細胞内輸送に関与しない。

(A)野生型及びNogo-A/B欠損マウス由来のBMMをCy5標識されたCpG-Bで10分間刺激し、洗浄後に培養プレートから細胞を回収した。細胞内に取り込まれたCpG-B-Cy5の蛍光をフローサイトメトリー解析によって定量した。右にそれぞれの細胞の無刺激時の蛍光強度(mean fluorescence intensity; MFI)を1.0として、刺激後のCy5の蛍光強度をグラフとして示した。データは独立した3回の実験結果の代表例とそれらのmean \pm SEMで表した。N.S.は、*t-test*による判定で差が無いことを示している。(B)野生型及びNogo-A/B欠損マウス由来のBMMを0.5 μ M CpG-B-Cy5 (赤)で10分間刺激した。細胞を洗浄後に固定し、anti-Rab5抗体(緑)で染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で解析した。倍率は180倍、スケールバーは20 μ mである。データは3回の独立した実験の代表例として示した。(C)野生型及びNogo-A/B欠損マウス由来のBMMを0.2 μ M CpG-B-Alexa Fluor 647 (赤)で60分間刺激し、同時に60 nM LysoTracker Red DND-99で染色した。倍率は300倍、スケールバーは10 μ mである。データは3回の独立した実験の代表例として示した。(D)野生型、Nogo-A/B欠損およびTLR9欠損マウス由来のBMMをanti-TLR9抗体(clone B33A4)またはanti-TLR4抗体で染色し、フローサイトメトリー解析によってTLR発現量を評価した。anti-TLR9抗体による染色の場合のみ、固定と膜透過処理を行った細胞を使用した。データは3回の独立した実験の代表例として示した。

Figure 7 Nogo-B はTLR9のエンドリソソームへの局在変化に必要である。

(A)野生型及びNogo-A/B欠損マウス由来のBMMにレトロウイルスを用いてTLR9-GFP(緑)を発現させ、LysoTracker Red DND-99(赤)で1時間染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で解析した。倍率は480倍、スケールバーは10 μ mである。merge画像上の矢印方向にcross-line scanを行い、TLR9-GFP及びLysoTrackerの蛍光強度を右のヒストグラムに表した。データは3回の独立した実験の代表例として示した。(B)(A)における実験と同条件で野生型及びNogo-A/B欠損マウス由来のBMMにおいてcross-line scanを行い、TLR9-GFPとLysoTrackerの蛍光強度の相関を、Pearson correlation coefficientsによって求めた。それぞれ100個のBMMにおいてデータを取得し、算出した相関係数はmean \pm SEMとしてグラフに表した。野生型細胞とNogo-A/B欠損細胞の間で*t-test*による統計学的解析を行い、** $p < 0.01$ で有意差があると判定した。(C)野生型、Nogo-A/B

欠損および TLR9 欠損マウス由来の BMM を固定し、anti-TLR9 抗体(clone J15A7) (緑) 及び anti-LAMP1 抗体(赤)で染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で解析した。倍率は 480 倍、スケールバーは 5 μm である。データは 3 回の独立した実験の代表例として示した。

(D) 野生型及び Nogo-A/B 欠損マウス由来の BMM から抽出した mRNA を用いてリアルタイム PCR 解析を行い、*Unc93b1* mRNA 発現量を定量した。mRNA 発現量は *Hprt1* mRNA のコピー数により標準化した。データは独立した 4 回の実験結果の mean \pm SEM で表した。

(E, F) PRAT4A (E)または MyD88、IRAK1、TRAF6、Nogo-A/B (F)に対する特異的抗体を用いて、野生型及び Nogo-A/B 欠損マウス由来の BMM のウェスタンブロット解析を行った。ローディングコントロールには Erk1/2 を用いた。データは 3 回以上の独立した実験の代表例として示した。

Figure 8 マクロファージにおいて、Nogo と PirB は相互作用しない。

(A) 野生型及び Nogo-A/B 欠損マウス由来の BMM の細胞溶解液を用いて anti-PirB 抗体で免疫沈降を行い、Nogo-A/B 及び PirA/B に対する特異的抗体でウェスタンブロット解析した。

(B) FLAG 融合 Nogo-B または FLAG empty ベクターとともに GFP 融合 PirB 発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収した。その細胞溶解液を用いて anti-PirB 抗体で免疫沈降を行い、PirA/B 及び FLAG に対する特異的抗体でウェスタンブロット解析した。

(C) GFP 融合 PirB または GFP empty ベクターとともに FLAG 融合 Nogo-B 発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収した。その細胞溶解液を用いて anti-FLAG 抗体で免疫沈降を行い、PirA/B 及び FLAG に対する特異的抗体でウェスタンブロット解析した。

データは 3 回以上の独立した実験の代表例として示した。

Figure 9 新規 Nogo-B 結合分子として同定された GRAMD4 は核酸認識 TLR 応答を負に制御する。

(A) FLAG 融合 Nogo-B または FLAG empty ベクターとともに Myc 融合 GRAMD4 発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収した。その細胞溶解液を用いて anti-FLAG 抗体で免疫沈降を行い、Myc 及び FLAG に対する特異的抗体でウェスタンブロット解析した。

(B) RAW264.7 に *Gramd4* 遺伝子を標的とした 3 nM の siRNA (*siGramd4*)またはネガティブコントロール siRNA (*siCtrl*)をトランスフェクションし、60 時間後に RNA を抽出してリアルタイム PCR 解析を行い、*Gramd4* mRNA 発現量を定量した。mRNA 発現量は *Hprt1* mRNA のコピー数により標準化し、*siCtrl* 導入細胞における発現を 100%としてグラフに表した。データは独立した 3 回の実験結果

の mean ± SEM で表した。(C) siRNA 導入の 60 時間後に(B)の RAW264.7 を CpG-B で刺激し、4 時間後に RNA を抽出してリアルタイム PCR 解析を行い、*Il-6* mRNA 発現量を定量した。mRNA 発現量は *Hprt1* mRNA のコピー数により標準化した。データは独立した 3 回の実験結果の mean ± SEM で表した。siCtrl 導入細胞と *siGramd4* 導入細胞の間で *t-test* による統計学的解析を行い、* $p < 0.05$ 及び** $p < 0.01$ で有意差があると判定した。(D) FLAG 融合 Nogo-B または FLAG empty ベクターとともに Myc 融合 LRCH4 発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収した。その細胞溶解液を用いて anti-FLAG 抗体で免疫沈降を行い、Myc 及び FLAG に対する特異的抗体でウェスタンブロット解析した。(E) RAW264.7 に *Lrch4* 遺伝子を標的とした 3 nM の siRNA (*siLrch4*)または siCtrl をトランスフェクションし、60 時間後に RNA を抽出してリアルタイム PCR 解析を行い、*Lrch4* mRNA 発現量を定量した。mRNA 発現量は *Hprt1* mRNA のコピー数により標準化し、siCtrl 導入細胞における発現を 100%としてグラフに表した。データは duplicate のサンプルの mean ± SEM で表し、独立した 3 回の実験結果の代表例として示した。(F) siRNA 導入の 60 時間後に(E)の RAW264.7 を CpG-B で刺激し、4 時間後に RNA を抽出してリアルタイム PCR 解析を行い、*Il-6* mRNA 発現量を定量した。mRNA 発現量は *Hprt1* mRNA のコピー数により標準化した。データは duplicate のサンプルの mean ± SEM で表し、独立した 3 回の実験結果の代表例として示した。(G) RAW264.7 に Myc 融合 GRAMD4 発現ベクターまたは Myc empty ベクターとともにルシフェラーゼレポータープラスミド(pELAM1-Luc 及び pGL4.74-TK-Luc)をトランスフェクションし、遺伝子導入の 60 時間後に CpG-B、poly(I:C)または 10 ng/ml LPS で刺激した。6 時間後に細胞を溶解させ、溶解液中のルシフェラーゼ活性を測定した。ELAM1 レポーターの活性は pGL4.74 レポーターの活性により標準化し、relative light units (RLU) としてグラフに表した。データは triplicate のサンプルの mean ± SEM で表し、独立した 3 回以上の実験結果の代表例として示した。(H) 野生型マウス由来の BMM を 0.2 μM の CpG-B で 24 または 48 時間刺激し、細胞を溶解させ、GRAMD4 及び Nogo-A/B に対する特異的抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。ローディングコントロールには Erk1/2 を用いた。データは 3 回以上の独立した実験の代表例として示した。

Figure 10 GRAMD4 と Nogo-B は Rab1A と結合することで核酸認識 TLR 経路を制御しうる。

(A)野生型マウス由来の MEF に GFP 融合 Nogo-B (緑)を発現させ、小胞体を ER-Tracker (赤)で染色した(i—iii)。MEF に TagRFP 融合 GRAMD4 (赤)を発現させ、小胞体を ER-Tracker (緑)で染色した(iv—vi)。MEF に GFP 融合 Nogo-B (緑)及び TagRFP 融合

GRAMD4 (赤)を発現させた(vii—ix)。染色後に細胞を固定し共焦点レーザー顕微鏡で解析した。倍率は 120 倍、スケールバーは 20 μm である。merge 画像上の矢印方向に cross-line scan を行い、Nogo-B-GFP、TagRFP-GRAMD4 または ER-Tracker の蛍光強度を右のヒストグラムに表した。それぞれ 100 個の MEF におけるデータを取得し、蛍光強度の相関を Pearson correlation coefficients によって求め、その平均値と標準偏差を算出した。データは 3 回の独立した実験の代表例として示した。(B) 野生型及び Nogo-A/B 欠損マウス由来の BMM に 20 nM の si*Gramd4* または siCtrl をトランスフェクションし、48 時間後に RNA を抽出してリアルタイム PCR 解析を行い、*Gramd4* mRNA 発現量を定量した。mRNA 発現量は *Hprt1* mRNA のコピー数により標準化し、siCtrl 導入細胞における発現を 100%としてグラフに表した。データは triplicate のサンプルの mean \pm SEM で表し、独立した 3 回の実験結果の代表例として示した。(C) siRNA 導入の 60 時間後に(B)の BMM を CpG-B で刺激し、6 時間後に培養上清中の IL-6 濃度を ELISA で測定した。データは triplicate のサンプルの mean \pm SEM で表し、独立した 3 回の実験結果の代表例として示した。siCtrl 導入細胞と si*Gramd4* 導入細胞の間で *t-test* による統計学的解析を行い、* $p < 0.05$ 及び** $p < 0.01$ で有意差があると判定した。(D, E) FLAG 融合 Nogo-B、FLAG 融合 GRAMD4 または FLAG empty ベクターとともに Myc 融合 Rab1A 発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収した。その細胞溶解液を用いて anti-FLAG 抗体で免疫沈降を行い、Myc 及び FLAG に対する特異的抗体でウェスタンブロット解析した。データは 3 回以上の独立した実験の代表例として示した。

Figure 11 Nogo-B と GRAMD4 を介した核酸認識 TLR 経路制御機構の模式図。

野生型細胞では、小胞体上で Nogo-B が GRAMD4 に結合することでその抑制的作用を阻害している。Nogo-A/B 欠損細胞では、Nogo-B による抑制から逃れた GRAMD4 が Rab1A と結合することにより、核酸認識 TLR がエンドリソソームへ局在変化することを抑制している可能性がある。

Figure 1

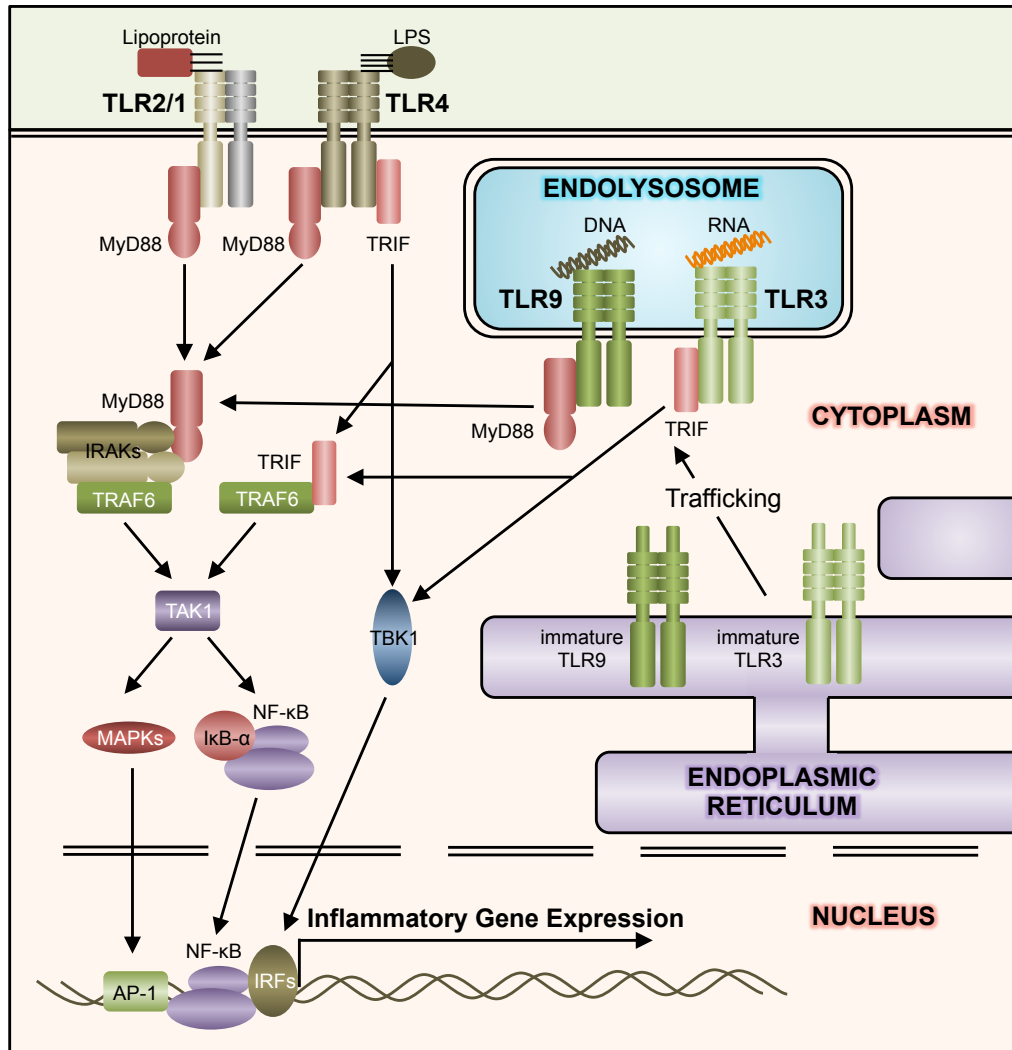


Figure 2

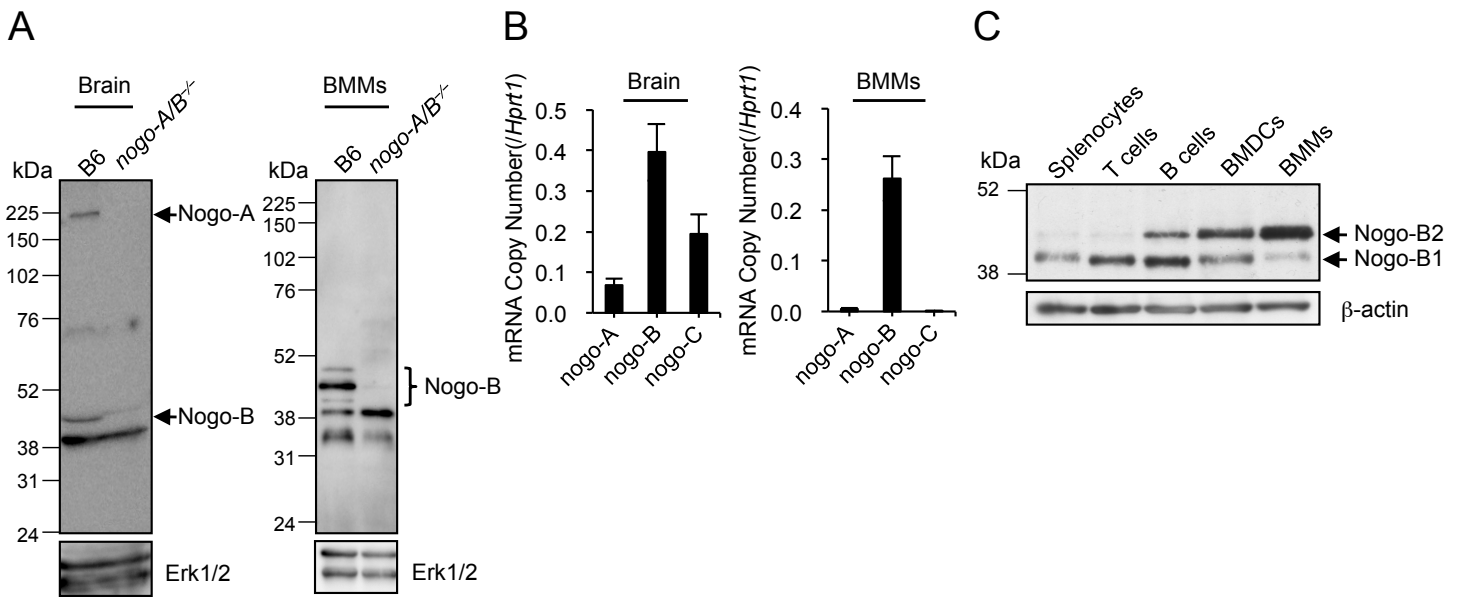


Figure 3

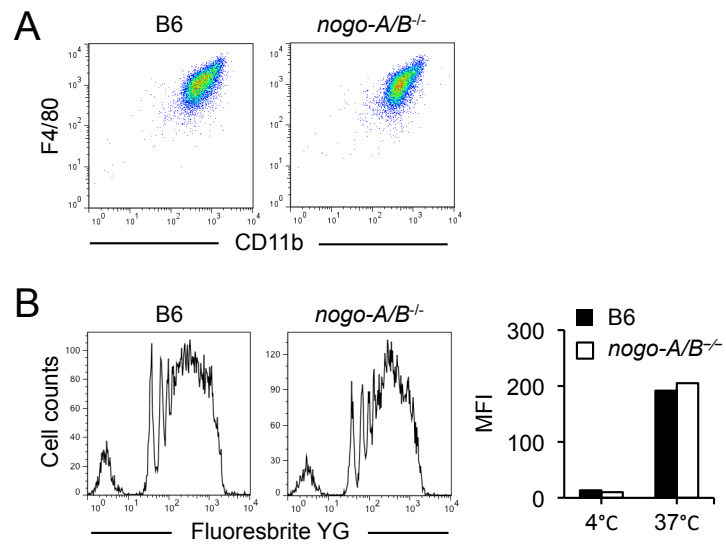


Figure 4

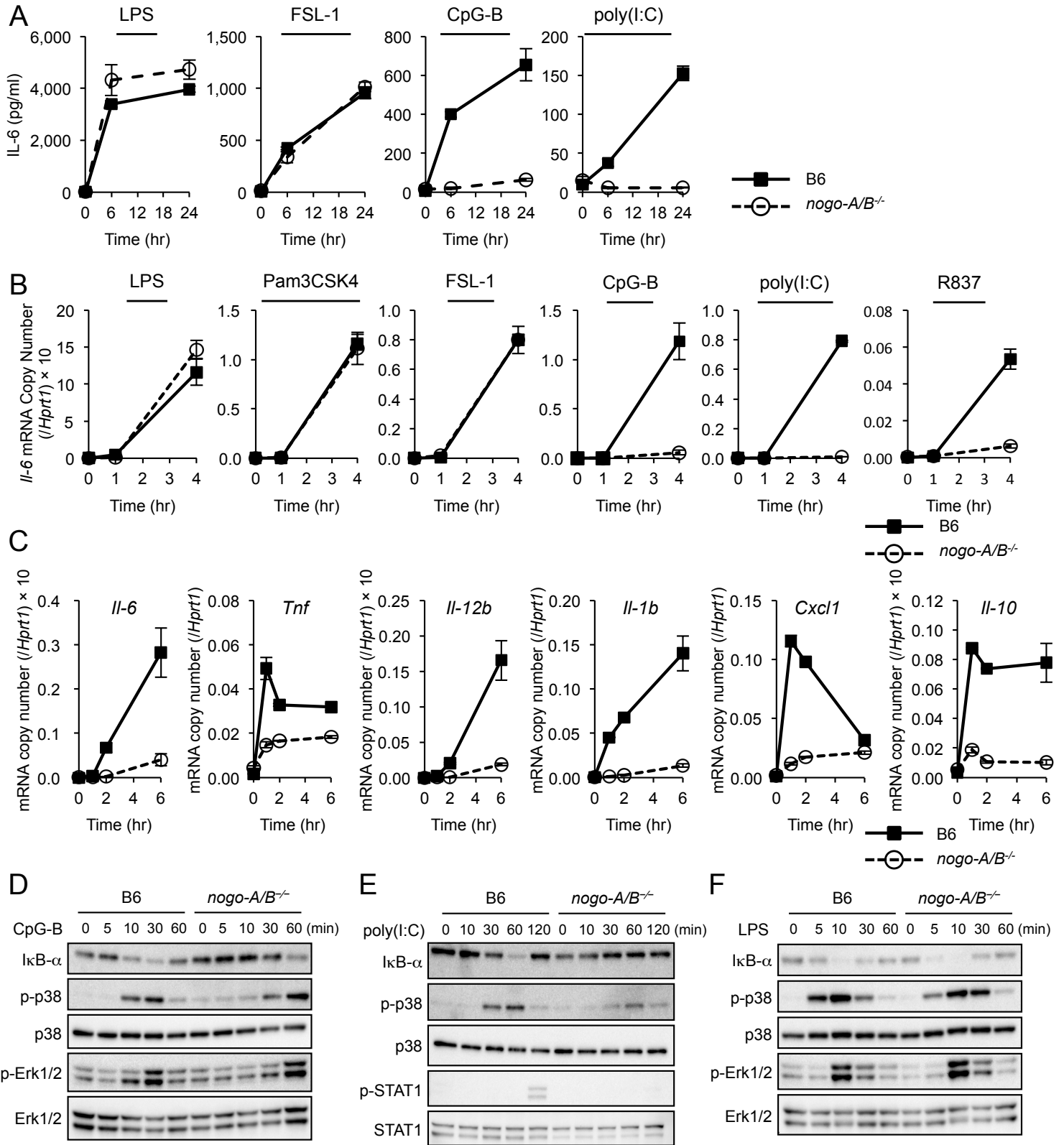


Figure 5

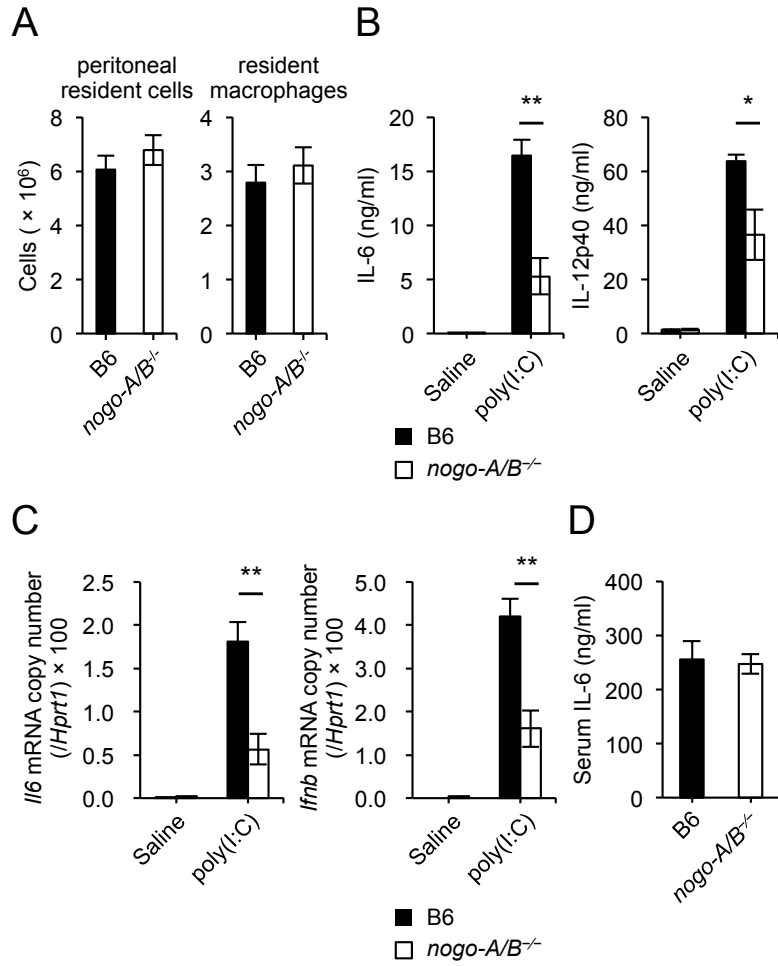


Figure 6

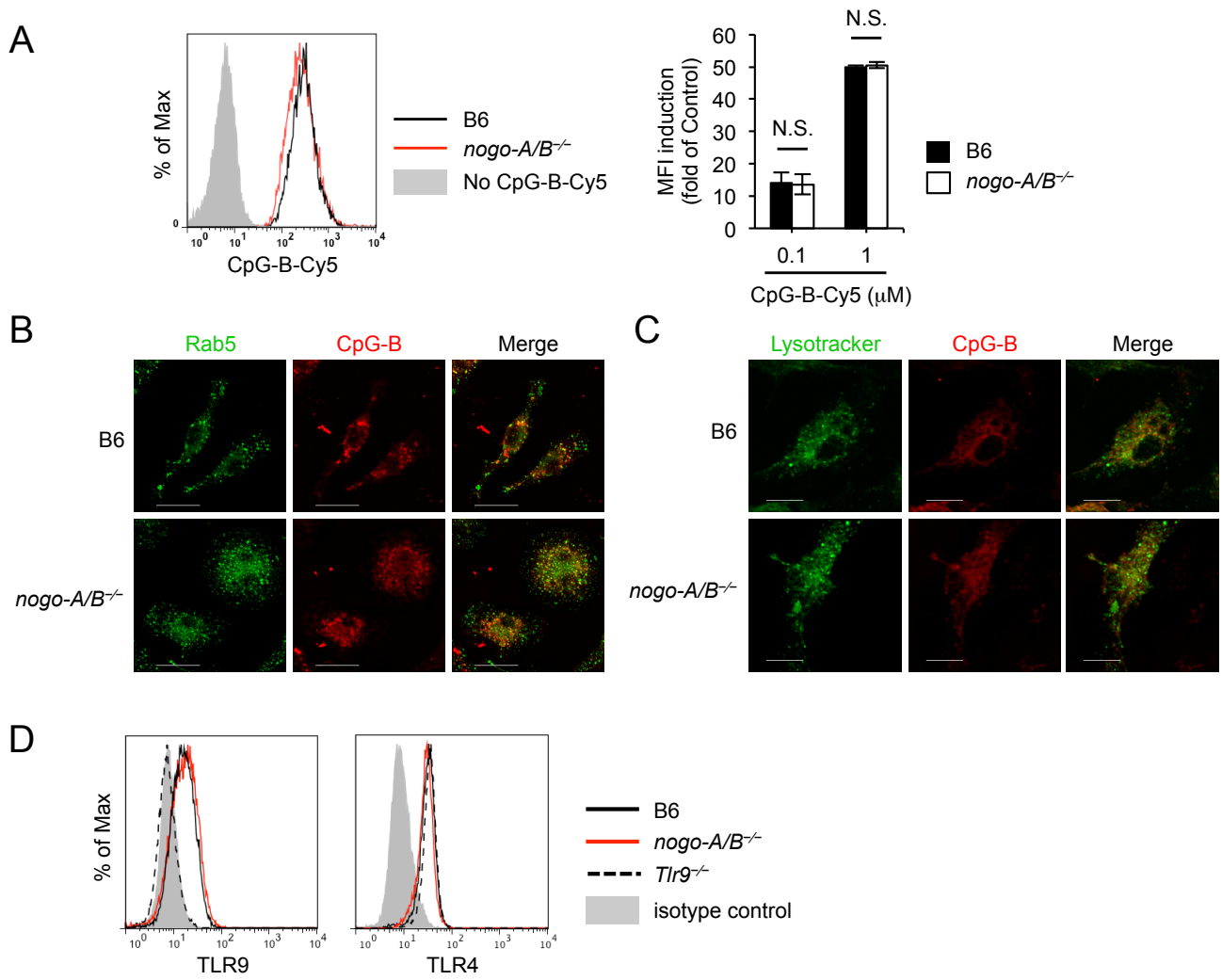


Figure 7

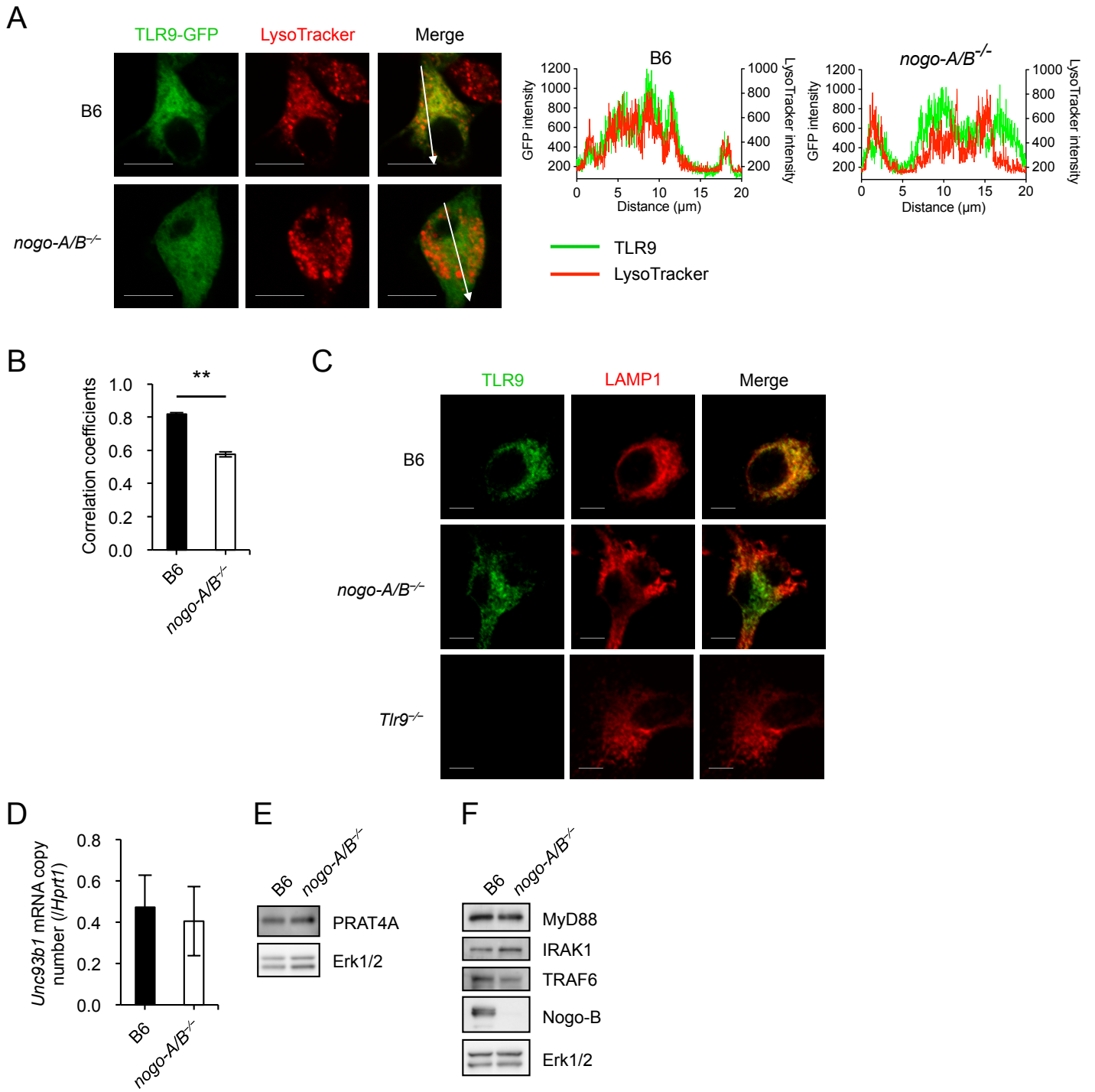


Figure 6

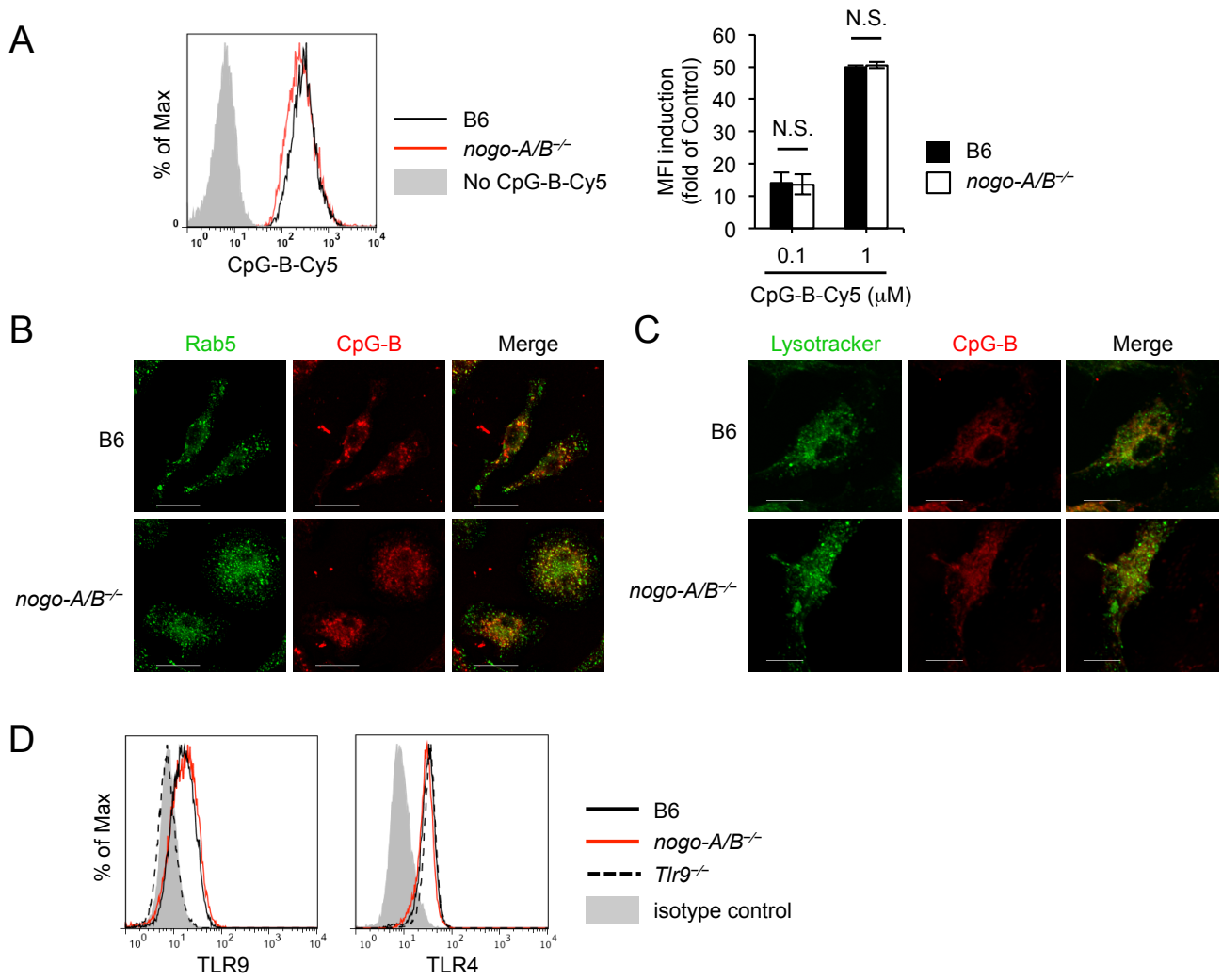


Figure 7

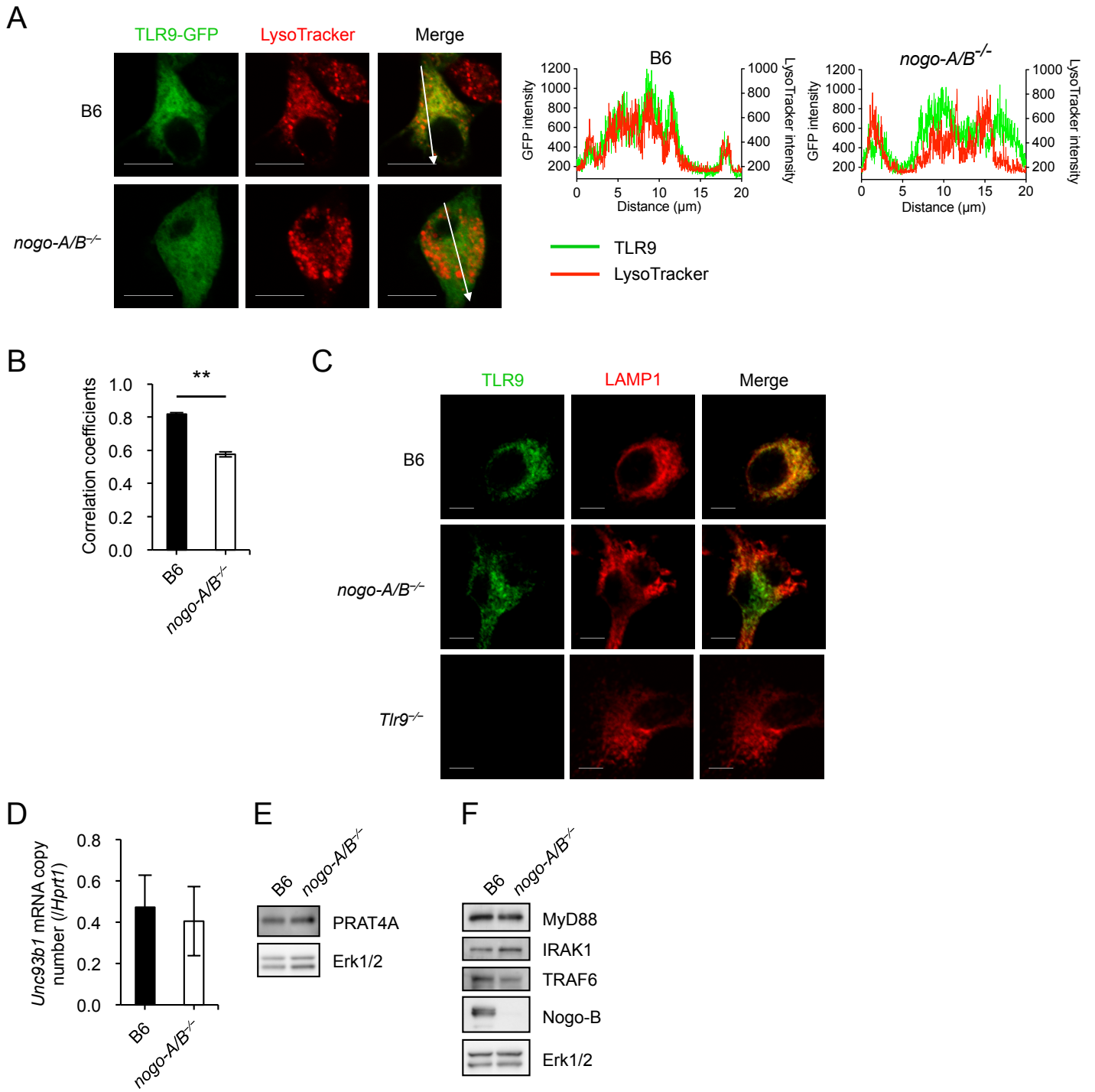


Figure 8

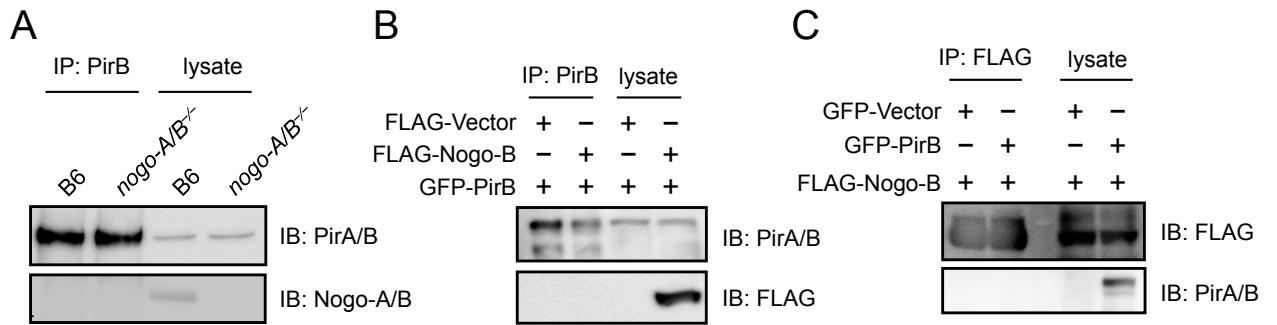


Figure 9

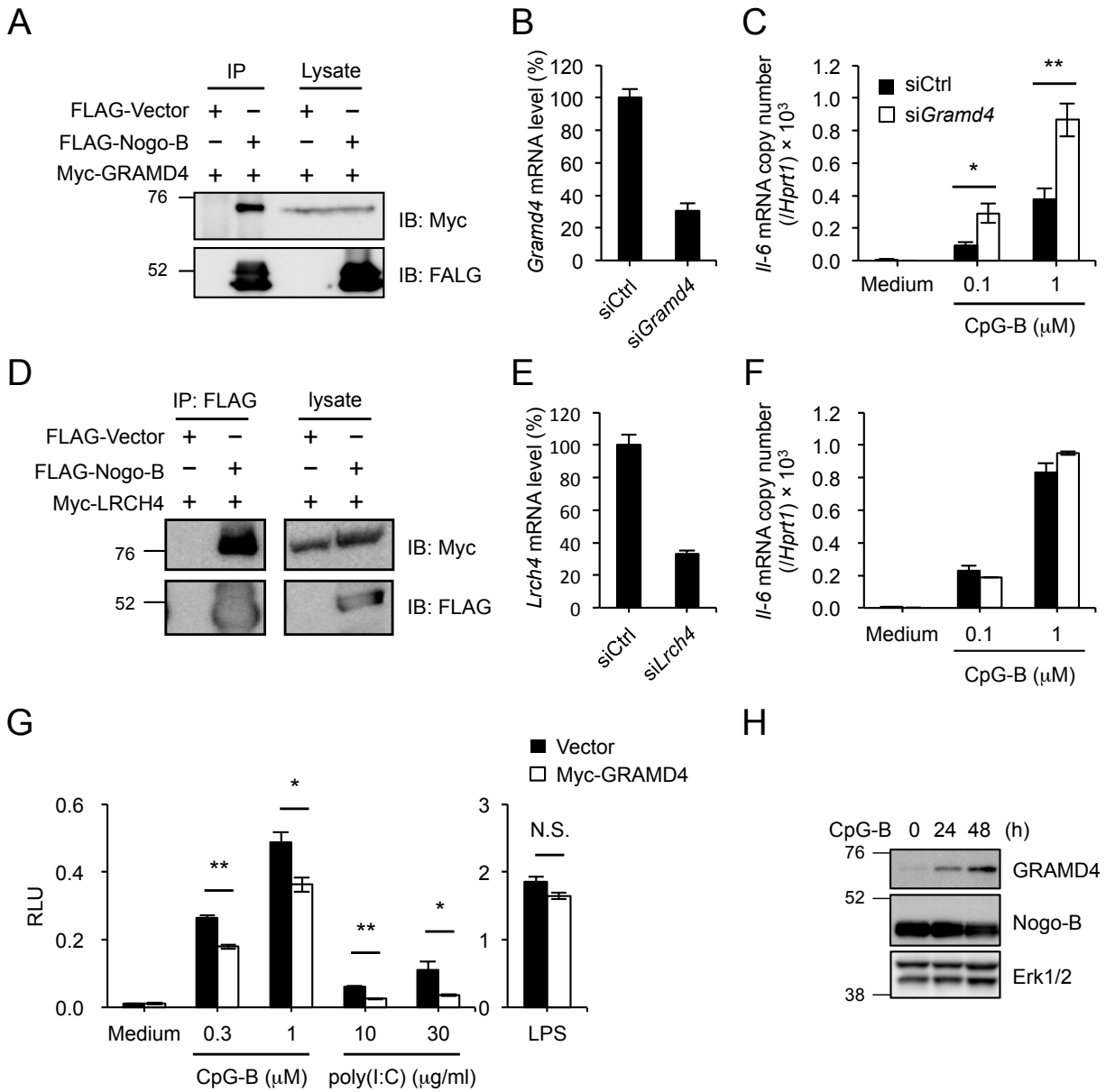
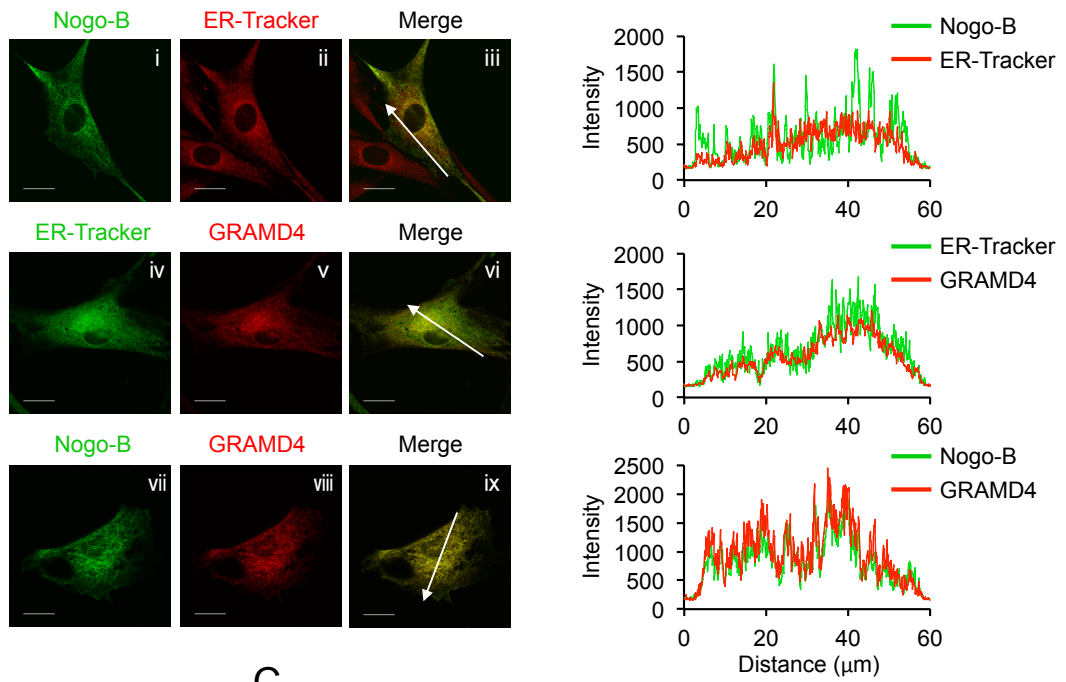
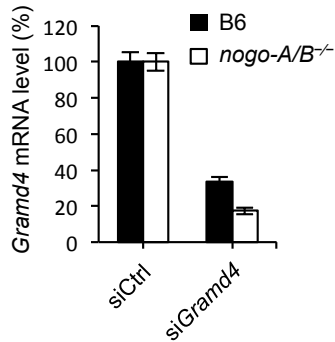


Figure 10

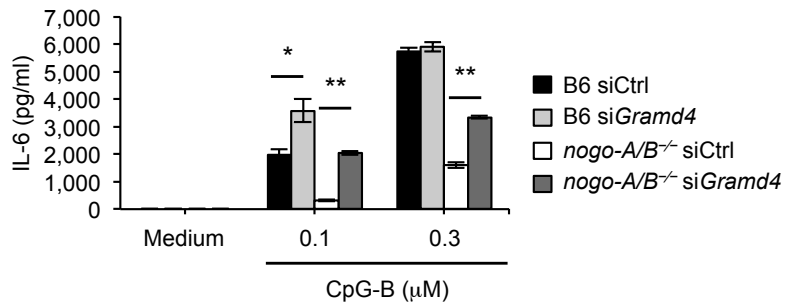
A



B



C



D

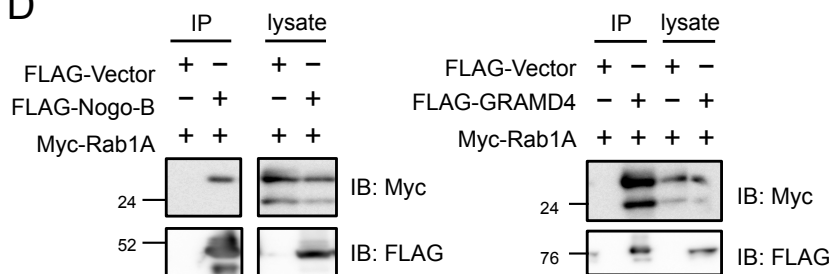


Figure 11

