

学位論文要約

Extended Summary in Lieu of the Full Text of a Doctoral Thesis

甲第 935 号

氏 名: 山本崇裕
Full Name Takahiro Yamamoto

学位論文題目: ヒト IRAK4 および MyD88 遺伝子における変異効果の機能解析

Thesis Title Functional assessment of the mutational effects of human *IRAK4* and *MyD88* genes

学位論文要約:

Summary of Thesis

IRAK4, 及びMyD88欠損症はToll/interleukin-1受容体の細胞内シグナル伝達を担う分子IRAK4及びMyD88の異常により生じる自然免疫不全症である。両疾患は病因遺伝子変異を同定することで確定診断されるが、IRAK4及びMYD88遺伝子の新規遺伝子バリエントが次々と報告されているため、同定された遺伝子バリエントが真に病因変異なのか遺伝子情報だけでは判断できないことがある。このため今回申請者は、個々の遺伝子バリエントを評価するためのin vitro機能解析法の確立を目的として、細胞内実験、及び蛋白質間相互作用実験を行い、変異導入したIRAK4及びMyD88蛋白質の機能解析を行った。

【対象と方法】

- 1) ベクター作成: FLAGタグ付加したIRAK4 Deathドメインおよびinternalドメイン(DD+ID), または全長をコードしたcDNA, mycタグ付加したMyD88 TIRドメイン, または全長をコードしたcDNAをそれぞれpcDNA3.1+に組み込んだ。IRAK4-DD+ID, MyD88-DD+ID, MyD88-TIR, Mal-TIRをそれぞれ大腸菌発現用ベクターに組み込んだ。これらに対して、部位特異的変異導入を行った。
- 2) ウェスタンブロット解析: enhanced chemiluminescence法で発現蛋白質を検出した。
- 3) NF- κ Bレポーター遺伝子活性解析: HEK293系統の培養細胞をIRAK4全長(野生型と変異体)の発現ベクター, Luciferaseベクターで形質転換後, 対応するリガンドで刺激し, NF- κ B活性を解析した。同様にMyD88全長(野生型と変異体), MyD88-TIRの発現ベクターで形質転換し解析した。
- 4) リコンビナント蛋白質精製: IRAK4-DD+ID, MyD88-DD+IDの発現ベクターを大腸菌BL-21(DE3)株に形質転換し, GST融合蛋白質として発現させた。アフィニティ精製後GSTタグを切断し, イオン交換とゲル濾過クロマトグラフィにて高純度に精製した。1H-15N安定同位体標識したMyD88-DD+ID蛋白質も同様に精製した。
- 5) 分析ゲル濾過法: IRAK4-DD+ID, MyD88-DD+IDの精製蛋白質を1:1の比率で添加し, ゲル濾過法により蛋白溶出体積の解析, 分子量の推定を行った。
- 6) GSTプルダウン法: GST融合MyD88 TIRドメイン蛋白質とMal TIRドメイン蛋白質を発現精製し, グルタチオンセファロース4Bと共に一晩攪拌し, 4回の洗浄後にSDS-PAGEで解析を行った。
- 7) NMR分析: 1H-15N安定同位体標識したMyD88-DD+ID蛋白質の二次元1H-15NスペクトルをBruker Avance II 700MHz spectrometerを使用し, HSQC, SOFAST-HMQCパルスシーケンスにより測定した。
- 8) 蛋白質安定性比較試験: HEK293T細胞にIRAK4-DDの発現ベクターを形質転換し, シクロヘキシミド添加培地で培養し, 検出蛋白質量の経時的変化をウェスタンブロット法にて解析した。

【結果】

- 1) IRAK4変異体の細胞内蛋白質発現: M1V, Q293X, c.118insAは発現がみられず, R183Xは野生型より低分子量の蛋白質が発現, G298Dは僅かに発現した。R12Cは野生型と同程度に発現した。
- 2) IRAK4変異体のNF- κ Bレポーター遺伝子活性: HEK293T細胞にIL-1R1, IL-1RAcP, 及びIRAK4野生型を共発現させると, NF- κ B活性が有意に抑制された。病的変異体c.118insA, R183X, Q293X, 及びG298Dでは, 野生型に比べ活性抑制が減弱したが, 同じく病的変異体であるR12Cは野生型と同程度の活性抑制を示した。多型とされるR20Wは, 野生型より強い活性抑制を示した。
- 3) MyD88変異体の細胞内蛋白質発現: S34Y, E53Xは発現がみられず, E52delおよびL93Pは著明に減弱していた。R98C, M178I, およびR196Cは野生型と同程度に発現した。
- 4) MyD88変異体のNF- κ Bレポーター遺伝子活性: S34Y, E52del, E53X, L93P, R98C, およびR196Cは野生型よりも活性増強が減弱していた。MyD88 TIRドメインを発現させ優性抑制効果を比較すると, M178Iは野生型と同程度に活性抑制したが, 病的変異体R196Cは活性抑制が減弱していた。

- 5) GSTプルダウン法によるMyD88とMalとの相互作用解析：M178Iは野生型と同程度にMal TIR蛋白質と相互作用を示したが、R196Cは相互作用が減弱していた。
- 6) 分析ゲル濾過法によるIRAK4とMyD88との相互作用解析：IRAK4野生型はMyD88野生型と相互作用し、複合体を形成したが、MyD88 R98Cとの相互作用は低下していた。IRAK4 R12CとMyD88野生型との相互作用は低下していた。解析した全ての多型のIRAK4はMyD88と相互作用したが、R20WについてはMyD88が残存し、複合体溶出ピークの強度が低下していた。
- 7) 溶液NMR法による相互作用解析：IRAK4とMyD88とが相互作用すると高分子量の複合体を形成し、観測されるシグナルが減衰する。I5V, I26T, I39V, 及びS98RはIRAK4野生型と同程度のシグナル減衰を示したが、R12CとR20Wはシグナル減衰が抑制されていた。
- 8) IRAK4変異体の安定性比較試験：野生型の検出蛋白質量に経時的変化はなかったが、R12Cと特にR20Wは早期から検出蛋白質量が減少していた。

【考察】

IRAK4のDeathドメイン上の病的変異体R12Cは、細胞内実験では野生型と同様の挙動を示したが、リコンビナント蛋白質による相互作用実験にて、MyD88との相互作用が低下することが示された。多型とされるR20Wは、蛋白質構造の安定性が低下した変異体である可能性が示唆された。一方MyD88変異体の機能解析では、細胞内実験と蛋白質間相互作用実験に矛盾は無かった。IRAK4はMyD88とDeathドメインを介して相互作用し、Myddosomeと呼ばれる複合体を形成してシグナル伝達を行う。IRAK4およびMyD88欠損症は蛋白質発現の低下のみならず、蛋白質間相互作用や蛋白質の安定性の低下がもたらすMyddosome形成の異常により生じることが示唆され、これらの分子の遺伝子バリエーションの機能解析には、細胞内実験とリコンビナント蛋白質を用いた相互作用実験との組み合わせが有用であることが示された。