

氏名（本籍）	山本 崇裕（岐阜県）		
学位の種類	博士（医学）		
学位授与番号	甲第	935	号
学位授与日付	平成	26	年 1 月 15 日
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	Functional assessment of the mutational effects of human <i>IRAK4</i> and <i>MyD88</i> genes		
審査委員	（主査）教授 長岡 仁		
	（副査）教授	中川 敏幸	教授 武田 純

論文内容の要旨

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ーションが次々と報告されているため、同定された遺伝子バリエーション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ーションを評価するための *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 - ^{15}N 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 - ^{15}N 安定同位体標識した MyD88-DD+ID 蛋白質の二次元 ^1H - ^{15}N 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。

論文審査の結果の要旨

申請者 山本崇裕は, IRAK4 および MyD88 欠損症の遺伝子バリエーションについて, 培養細胞を用いた蛋白質発現実験, 及びリコンビナント蛋白質を用いた分子間相互作用実験を行った。その結果, 両者の組み合わせが *in vitro* 機能解析に有用であることを明らかにした。この研究成果は自然免疫不全症の病態解析や, 小児科学の進歩発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌] Takahiro Yamamoto, Naotaka Tsutsumi, Hidehito Tochio, Hidenori Ohnishi, Kazuo Kubota, Zenichiro Kato, Masahiro Shirakawa, Naomi Kondo: Functional assessment of the mutational effects of human *IRAK4* and *MyD88* genes

Molecular Immunology 58, 66-76 (2014)