

京都大学	博士 (工学)	氏名	宇野 雅俊
------	---------	----	-------

論文題目	Biophysical analysis of MyD88 and related proteins (MyD88 及び関連タンパク質の分子機構解析)
------	--

(論文内容の要旨)

本論文は、自然免疫系において信号伝達に関わるアダプタータンパク質 MyD88 及び関連タンパク質の分子機構についての研究成果をまとめたものである。本論文は序論ならびに本章 3 章を含む全 5 章から構成されている。

第 1 章は序論であり、免疫系全般から MyD88 とその関連タンパク質の先行研究について記述している。MyD88(Myeloid differentiation factor 88) は免疫系の病原体認識の中核を担う Toll 様受容体群の細胞内シグナル伝達を担うアダプタータンパク質である。MyD88 は受容体に結合しシグナルを受信する構造ユニット TIR(Toll/Interleukin-1 receptor domain)、複合体 Myddosome を形成することでシグナル下流の酵素を活性化させる構造ユニット DD(Death domain)、及び 2 つの機能ユニットを繋ぐリンカー領域からなるタンパク質であり、各ドメイン単独での分子構造及び機能については先行研究によって明らかにされている。しかしながら、全長 MyD88 の分子構造及び分子機構や病原性変異体の病理機構などは明らかにされておらず、未解明の分子機構の存在が示唆されている。第 1 章ではこれらの MyD88 及び類縁体の先行研究で明らかにされている諸性質を示し、続く章の導入としている。

第 2 章では、主に全長 MyD88 の分子内ドメイン間相互作用について論じている。第 1 章で示された病原性変異体の性質から、TIR が分子内相互作用によって DD の機能を抑制しているという仮説を立てている。この仮説の検証のため、最初に各ドメイン単体のリコンビナントタンパク質試料を用いた NMR 滴定実験によって遊離した TIR-DD 間のドメイン間相互作用の存在が確認された。また滴定実験の結果から DD のグルタミン酸 52 を中心とした負電荷領域と TIR のアルギニン 217 を中心とした正電荷領域が各ドメインの相互作用領域であると推定された。次に先行研究では作成されていなかった全長 MyD88 のリコンビナントタンパク質試料の作成方法を確立し、高速原子間力顕微鏡を用いて 1 分子観測を行った。高速原子間力顕微鏡の観測結果及びヒストグラム解析の結果より、全長 MyD88 は分子内相互作用を形成した「閉じた状態」と解離した「開いた状態」の 2 状態間の平衡にあること、及び「閉じた状態」が優勢であることが示された。また、NMR で推定された相互作用面の変異体では「閉じた状態」が消失したことから、全長 MyD88 の分子内相互作用は DD の負電荷と TIR の正電荷に由来する静電相互作用であることが示された。また示された分子内相互作用は DD の機能領域の 1 つを塞ぐ形になることから、受容体からシグナルを受信する前の MyD88 は TIR が分子内相互作用で DD の活性を抑えるという自己抑制機構を提唱している。

第 3 章では TIR の高次複合体形成について記述している。TIR は従来 2 量体を形成するとされていたが、高速原子間力顕微鏡での観測結果から直径約 30 nm の環状複合体を形成することが確認された。詳しく画像解析を行ったところ、29 回回転対称かつ 2 層構造を持つ 58 量体であることが判明した。しかし高速原子間力顕微鏡は基盤平面へ観測対象分子を吸着させるという観測上のアーティファクトが存在する。そこで、溶液中での環状複合体の存在を確認するため、動的光散乱を用いて溶液系内の粒径の刑事変化を観測したところ、時間経過によって環状複合体よりもさらに大きな複合体を形成する可能性が示唆された。この結果に基づき、透過型電子顕微鏡で TIR を観測し

京都大学	博士（工学）	氏名	宇野 雅俊
<p>たところ繊維状複合体の存在が確認された。この繊維状複合体を極低温透過型電子顕微鏡法で解析したところ、繊維状複合体は高速原子間力顕微鏡で観測された環状複合体が重なった筒状構造を形成していることが示された。極低温電子顕微鏡法の方法は原子分解能で分子構造を明らかにすることは出来なかったものの、変異体解析を行うことで、複合体内の TIR-TIR ホモ相互作用の様式を推定することに成功した。この相互作用の様式から全長 MyD88 の場合でも環状複合体は形成し得るが、繊維状複合体の形成は難しいことが示唆された。以上の結果から、従来は2量体を形成するとされていた TIR が環状複合体を形成することで、DD の4量体形成の足場として機能し、Myddosome の形成に寄与するという分子機構を提案している。</p> <p>一方、第4章では、主にチャンネルタンパク質 TRPC6 とカルシウム結合タンパク質カルモジュリン間の相互作用について記述している。TRPC6 は非選択的陽イオン透過チャンネルとして機能する膜タンパク質で、4量体を形成している。共同研究者の先行研究から未解明であった TRPC6 の不活性化機構にカルシウムイオン結合タンパク質であるカルモジュリンが寄与していることが示唆されたため、TRPC6 のカルモジュリン結合領域を模したペプチドとカルモジュリン間の結合様式を NMR と等温滴定型熱量測定を用いて解析した。一般的なカルモジュリンとチャンネルタンパク質の結合時の化学量論比はカルモジュリン：チャンネルタンパク質=1：1であることが知られているが、TRPC6 の場合、化学量論比が1：1の反応では見られない非線形な変化の様子が観測された。その変化の様子が1等量の点を境に変化し、2等量で大凡飽和していたこと、及びカルモジュリンの変異体解析の結果から、当該反応の化学量論比はカルモジュリン：TRPC6 ペプチド=1：2であることが示唆された。この結果から活性状態の TRPC6 の4量体に対して2分子のカルモジュリンが架橋様に結合することで、TRPC6 の構造変化を誘導し不活性化するという分子機構を提唱している。</p> <p>第5章は結論であり、本論文で得られた成果について要約している。本論文で得られた知見は、未解明であった MyD88 の分子機構を明らかにすることで、受容体のリガンド認識から Myddosome 形成までの多段階の反応で構成された複雑な分子機構の全体像を解明するうえで非常に重要な役割を果たすことが期待できる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、免疫系において信号伝達に関わるアダプタータンパク質 MyD88 及び関連タンパク質の分子機構についての研究成果をまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. 全長 MyD88 の分子内ドメイン間相互作用の存在を示した。世界で初めて精製に成功した全長 MyD88 試料を、高速原子間力顕微鏡を用いた 1 分子観測実験で観測することで、全長 MyD88 が分子内ドメイン間相互作用を平衡的に形成することを示した。また、NMR 滴定実験及び高速原子間力顕微鏡の観測結果に対するヒストグラム解析は、DD の機能領域近傍の負電荷領域と TIR の正電荷領域が分子内相互作用を形成し、DD の機能を抑制していることを示唆した。
2. MyD88 の TIR が高次複合体を形成することを明らかにした。高速原子間力顕微鏡を用いた解析により、TIR が 2 層構造かつ回転対称性を持つ環状複合体を形成することが明らかとなった。また、極低温透過型電子顕微鏡を用いた構造解析は、TIR で構成された繊維状複合体は環状複合体を積み重ねた筒状複合体であることを示した。
3. TRPC6 とカルモジュリンの結合反応における化学量論比が TRPC6 : カルモジュリン = 4 : 2 であることを示した。通常チャンネルタンパク質とカルモジュリンの結合反応における化学量論比は 1 : 1 であるが、NMR 滴定実験と等温滴定型熱量測定の結果は TRPC6 とカルモジュリンの結合反応は 1 等量を境にした 2 段階の反応であり、その化学量論比は TRPC6 : カルモジュリン = 2 : 1 であることを示した。

以上、本論文は MyD88 に関する新しい物理化学的ならびに生物学的性質を解明した。本論文の内容は国内外の MyD88 に関する研究分野や免疫学分野において画期的な成果であり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 31 年 2 月 20 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。