

京都大学	博士 (工学)	氏名	堤 尚孝
論文題目	STRUCTURAL ANALYSIS OF THE PROTEINS RELATED TO TLR/IL-1R SIGNALING (TLR/IL-1R シグナルに関連するタンパク質の構造学的研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文は、interleukin (IL) -1ファミリーに属する炎症性サイトカインIL-18の受容体認識機構と、その下流シグナルの機能障害に関する構造的、生化学的解析であって、四章から構成される。IL-1ファミリー受容体(IL-1R)は、病原体センサーとして働くToll様受容体(TLR)と同様にMyD88依存性経路の起点となり、リガンド結合により多様な炎症性サイトカインの発現を促す。</p> <p>第一章は序論であり、高等生物の免疫機能、特にサイトカインによる免疫細胞の機能制御について、近年の研究を含めごく簡単に概説した後、TLR/IL-1Rの機能や構造、疾患との関連、及び進化について紹介することで、本論文の導入としている。</p> <p>第二章では、自然免疫不全症の一種であるIRAK4欠損症/MyD88欠損症を引き起こしうるIRAK4/MYD88遺伝子の変異を評価するための<i>in vitro</i>機能解析法を提案した。本疾患は、TLR/IL-1R下流のMyD88依存性経路が正常に活性化出来なくなる常染色体劣性遺伝形式の疾患であり、乳幼児期よりグラム陽性菌による重症感染症を繰り返す。その確定診断には、患者の病因遺伝子変異を同定する必要があるが、近年、エクソーム解析や次世代シーケンシング技術の出現によりIRAK4、及びMYD88の新規遺伝子変異(多型・病的変異)が次々と報告されているため、各変異の機能を予め評価することが求められている。本研究では、これまでに報告のあった遺伝子変異(MyD88欠損症変異: E52del, E53X, L93P, R196C; MyD88-SNP: S34Y, R98C, M178I; IRAK4欠損症変異: M1V, R12C, c.118insA, Q293X, G298D; IRAK4-SNP: I5V, R20W, I26T, I39V, S98R)について、培養細胞を用いた発現実験と活性実験、及びリコンビナントタンパク質を用いた相互作用実験を組み合わせた機能評価を行い、機能喪失の機序(タンパク質の発現、分子間相互作用、及び安定性の喪失、低下)を分類した。このとき、MyD88変異体の機能解析では細胞実験と相互作用実験に矛盾が見られなかった。一方で、IRAK4の病的変異体であるR12Cでは、細胞実験においては野生型と同様の挙動を示したが、サイズ排除クロマトグラフィー、NMRを用いた相互作用実験によりMyD88との相互作用が低下することが示された。また、IRAK4-SNPであるR20Wは、野生型と比して安定性が低下している可能性が示唆された。本研究により、変異体のタンパク質発現のみならず、その安定性やタンパク質間相互作用の低下がもたらす複合体(Myddosome)の形成異常により本疾患が生じることが確認され、その機能解析には細胞内実験と相互作用実験を組み合わせた評価系が有用であることが示された。</p> <p>第三章では、IL-18と受容体との複合体構造を解明した。IL-1ファミリーには7種類の炎症性アゴニストが含まれるが、この中でIL-18のみが特異的なシグナル受容体セットを有するという特徴を持つ。感染や細胞ダメージによるシグナルを受けてカスパーゼ1が活性化されると、IL-18前駆体はIL-1β前駆体と共に成熟型</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	堤 尚孝
<p>に変換されて細胞外に分泌さる。分泌された IL-18 は細胞膜上の IL-18Rα、IL-18Rβ と結合して MyD88 依存性経路を活性化し、炎症反応の増大に至る。このため、IL-18 は生体防御因子として重要な役割を担うが、その過剰産出は自己炎症疾患やアレルギーといった様々な疾患に繋がる。従って、IL-18 とその受容体との相互作用を制御することは、上記疾患の有効な治療戦略となると考えられ、これを助けるための構造情報が求められていた。第一節では、IL-18、IL-18Rα、及び IL-18Rβ を高純度で大量精製する方法を記し、IL-18 単体、及び IL-18 に受容体が結合した 2 者、3 者複合体の結晶化と X 線回折実験について纏めた。第二節では、IL-18、IL-18/IL-18Rα、及び IL-18/IL-18Rα/IL-18Rβ の構造決定を行った。得られた 2 者、3 者複合体の構造は、既知の IL-1β 複合体の構造と一見似通っていたが、結合界面を中心に大きな違いが見られた。また、各受容体はそれぞれ 3 つの immunoglobulin (Ig) 様ドメイン (アミノ末端側から D1、D2、D3) から成っていたが、他の IL-1R の Ig 様ドメインとは異なる特徴が見られた。2 者複合体の構造は、IL-18Rα が IL-18 を 3 つの Ig ドメインで握りこむという、IL-1β の 2 者複合体と同じ様式で結合していた。しかしながら、IL-18Rα-D1 は Ig スーパーファミリーにおいて良く保存された f ストランド上のシステイン残基がフェニルアラニンに置き換わっているために、ドメインコアのジスルフィド結合が存在しなかった。その一方で、リガンド結合表面に 2 つのジスルフィド結合を有し、それらにより維持されるポケットが IL-18 の特徴的な β ヘアピンを認識していた。さらに、IL-18Rα-D3 の Asn297 に付加した糖鎖が、IL-18 と相互作用していた。このような特異的な機構によって、リガンドの受容体に対する配向は IL-1β のものと比較して約 20 度回転し、2 次受容体との結合面から IL-18 の β4-β5 ループが遠ざかっていた。IL-18Rβ は、IL-1RAcP と同様に、形成されたヘテロ 2 量体に対して側面から結合していた。しかし、IL-18Rα と IL-18Rβ の D2 では Ig ドメインで良く保存された d ストランドが欠失していたため、IL-18Rβ の c-d ループは c-e ループに置き換わり、結合界面から遠ざかっていた。IL-1RAcP の c-d ループと IL-1RI の d ストランドは、IL-1β、IL-1RI、IL-1RAcP の 3 者が接する結合界面に存在し、シグナル複合体の形成に決定的な影響を及ぼすと考えられる。さらに、IL-18 複合体と IL-1β 複合体の間では、2 者複合体 (IL-18/IL-18Rα、IL-1β/IL-1RI) に対する 2 次受容体 (IL-18Rβ、IL-1RAcP) の配向が約 20 度ずれていた。この d ストランドの欠損は他の IL-1R では見られず、これが IL-1RAcP と対照的な IL-18Rβ の特異性に寄与すると考えられる。これらの知見は、溶液 NMR 法を用いた相互作用解析、SAXS を用いた構造解析、SPR による変異体の結合実験、及び細胞実験による変異体の機能評価と良く一致した。本研究により、IL-1 ファミリーの受容体認識機構に関する知見が深まる一方で、得られた構造は IL-18 シグナルの阻害剤設計に寄与すると期待される。</p>			
<p>第四章は結論であり、本論文で得られた成果について要約している。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、① I R A K 4 欠損症 / M y D 8 8 欠損症に係わる新規遺伝子バリエーションの解析方法の提案とその発症機構の解明、及び② I L - 1 8 とその受容体から成る複合体構造の解明、の2つを目標に研究した成果について纏めたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. これまでに報告のあった各種遺伝子変異による、I R A K 4 欠損症 / M y D 8 8 欠損症の発症機構 (タンパク質発現、分子間相互作用、及び安定性の喪失、低下) について、培養細胞による機能実験とリコンビナントタンパク質を用いた相互作用実験を組み合わせることによって明らかにすると共に、新たに I R A K 4 の R 2 0 W が機能低下型の変異である可能性を示した。
2. I L - 1 8、I L - 1 8 R α 、及び I L - 1 8 R β をリコンビナントタンパク質として高効率に得る方法を確立した。また、I L - 1 8 単体、I L - 1 8 / I L - 1 8 R α の2者複合体、及び I L - 1 8 / I L - 1 8 R α / I L - 1 8 R β の3者複合体についてX線結晶構造解析を行い、それぞれ2. 3 3 Å、3. 1 0 Å、3. 1 0 Å の分解能で構造決定に成功した。得られた3者複合体構造は、I L - 1 ファミリーに共通な「レフト型」の2次受容体認識機構を証明した。また、I L - 1 8 R α - D 1 のコアジスルフィド結合の欠失や、3者界面における両受容体D 2 のd ストランドの欠失を明らかにすることで、I L - 1 R A c P と対照的な、I L - 1 8 R β の特異的な3者複合体形成を説明した。
3. I L - 1 8 と各受容体の変異体を用いて相互作用実験、細胞機能実験を行うことで、複合体形成とシグナル伝達に係わる重要な領域を確定した。また、得られた I L - 1 8 複合体の構造と相互作用実験を基に、I L - 1 8 シグナルを抑制する方法について議論した。

本論文は、T L R / I L - 1 R のシグナル伝達機構に関する興味深い知見や、アミノ酸変異による機能変換を生化学的、構造学的な観点から明らかにしており、①自然免疫不全症の確定診断や病態解明、②アレルギーや自己炎症性疾患に関連する I L - 1 8 シグナルの阻害剤探索などに有用で、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27年2月23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、(平成37年3月30日までの間) 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。