

学位論文審査結果の要旨

氏名	周 薇
審査委員	主 査 江口 真理子
	副 査 東山 繁樹
	副 査 岩波 純
	副 査 矢野 元
	副 査 吉田 理

論 文 名 ヒト death domain superfamily インタラクトームの網羅的研究と自己免疫疾患への応用

審査結果の要旨

【背景と目的】 Death domain superfamily タンパク質 (DDSP) は death-fold domains (DFD) を含むたんぱく質で、death domain (DD)、death effector domain (DED)、caspase recruitment domain (CARD)、pyrin domain (PYD) をそれぞれ有する 4 つのサブファミリーから構成される。これらのタンパク質は、DDSP 同士の同種結合ドメインを介して複合体を形成し、カスパーゼやキナーゼの活性化を誘導することで、アポトーシスや炎症などの様々なシグナル経路に関与している。また DFD 含有タンパク質の遺伝子変異は、免疫不全症や自己炎症疾患の原因となることが知られている。その例として、FAS は DD を介して fas-associated death domain (FADD) と相互作用し、FADD の DED を介してカスパーゼ-8 前駆体と結合し、細胞死を誘導するシグナル伝達複合体 (DISC) を形成しているが、FAS やカスパーゼ-8 の変異は自己免疫性リンパ増殖症候群 (ALPS) の原因となる。このように DDSP と疾患との関連が見いだされている一方で、原因とされる遺伝子変異が同定されていない疾患も多く存在する。申請者らは、その原因として未知の DDSP 間相互作用があるのではと考え、網羅的解析により免疫不全症や自己炎症疾患に関連する新たな経路や因子を発見することを目的として本研究を行った。

【方法】 DFD の相互作用を検討するためには、DFD の全リコンビナントタンパク質合成と網羅的なドメイン-ドメイン結合の解析が必要と考えた。そのために DFD 含有たんぱく質の cDNA 情報を公共のデータベースから同定し、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成システムを用いて 116 個の FLAG タグ付きドメインと 116 個の biotin タグ付きドメインを合成した。そしてこれらを用いて網羅的なドメイン-ドメイン間相互作用アッセイを Amplified Luminescence Prox-

imity Homogeneous Assay (ALPHA)を行い、合計 13,924 ペアの反応を 2 回実施した。

【結果】相互作用アッセイの結果、30%の自己相互作用ペアと 5.1%の非自己相互作用ペアが強い相互作用を示し、異種結合ドメインペアよりも同種結合ドメインペアの方が正の相互作用が多い傾向があることを示した。また異種 DFD を含む 2 つのドメインがあるタンパク質でも、ほとんどの自己相互作用ペアは同種結合ドメインを介して相互作用していることを明らかにした。この結果を、MA プロット、バブルチャート、免疫沈降アッセイで解析したところ、いくつかのドメイン間結合は先行論文で報告されているものであり、解析手法の信頼性が証明された。FLAG タグと biotin タグタンパク質の双方向の相互作用がみられるものを信頼性が高いと考え、その中から 9 つの新規な相互作用ペアの候補を見いだした。一方 FLAG タグまたは biotin タグだけの一方方向の相互作用を示すペアについては、新規のタンパク質ペアが多く含まれ信頼性が低い可能性が考えられたが、その中の CARD10-CARD と NOD2-CARD1-CARD2 について、免疫沈降法で確認したところ双方向での相互作用が確認された。このことから他の多くの一方方向相互作用を示すタンパク質についても相互作用している可能性があり、今後検証を進める必要がある。

【結論】本研究での DDSP 相互作用網羅的解析から複数の新たな DDSP ドメイン間相互作用が見いだされた。本研究では DDSP に関連する希少疾患、特に免疫不全症や自己炎症疾患の病態解明、診断および創薬標的に繋がりうる重要な知見を得ることが出来、今後の疾患研究に新たな発展をもたらすと考えられた。

公開審査会は、令和 3 年 1 月 15 日に開催され、申請者は、研究内容を英語で明確に発表した後に、審査員から本研究に関する以下の質問がなされた。

- ・タンパク質そのものではなく inactive なドメインを用いて相互作用を解析している理由。
- ・ドメイン間で homotypic な結合と heterotypic な結合があるが、両方で結合のしやすさや、惹起される炎症反応の違いなどがあるか。
- ・ALPHA アッセイで negative control に相互作用がみられているのはなぜか。
- ・MA plot の解析は 2 回の結果で十分か。
- ・HEK293 細胞以外でのドメイン相互作用解析の必要性、*in vivo* の相互作用検討の具体的手法。
- ・免疫疾患の原因究明のためにあえて DDSP を用いた理由。
- ・c DNA 情報を公共のデータベースから同定することで DDSP を全て同定できたかどうか。
- ・116 個の peptide の発現量がそれぞれ異なる理由。
- ・ドメインではなく全長のタンパク質で解析した場合の結果の予測。
- ・ALPHA で用いたバッファの組成がドメインの相互作用に影響しうるか。
- ・ALPHA で強い相互作用が検出されたものが、実際に細胞内でも強く結合しているか。
- ・相互作用の定量的な評価の必要性。
- ・免疫不全症や自己炎症疾患の患者細胞で今回同定されたドメインの異常があるか。
- ・今後具体的にどのように研究を進展させていくのか。免疫疾患の研究にどうつなげていくのか、また阻害剤などのスクリーニングをどう行っていくのか。

申請者はそれらの質問やコメントすべてに対して明確に応答し、世界的な研究の現状を踏まえた説明や、今後の課題や将来的な展望について申請者の考えを説明した。

審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。